

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”

DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y ALIMENTOS



Producción de enzima tanasa a través de *Aspergillus niger* Aa-20 utilizando Hojasen (*Flourensia cernua D.C*) como única fuente de carbono y energía.

Por

JULIO ENRIQUE MARTINEZ HERNÁNDEZ.

T E S I S

Presentada como Requisito Parcial para
Obtener el título de:

Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Buenvista, Saltillo, Coahuila. México.

Febrero del 2003.

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y ALIMENTOS

TESIS

**Producción de enzima tanasa a través de *Aspergillus niger* Aa-20 utilizando hojásén
(*Flourensia cernua D.C*) como única fuente de carbono y energía.**

**Presentada
por**

JULIO ENRIQUE MARTINEZ HERNÁNDEZ

**Que se Somete a Consideración del H. Jurado Examinador Como requisito Parcial
Para Obtener el Título de:**

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

APROBADA

ANTENTAMENTE

Q.F.B. Antonio Aguilera Carbó Dr.
Presidente

Cristóbal Noe Aguilar Gonzáles
Sinodal

Rodríguez Herrera
Sinodal

M.C. Heliodoro de la Garza Toledo
Sinodal

Dr. Raúl

M.C. Rodolfo Peña Oranday
Coordinador de Ciencia Animal



Este trabajo de forma parte del proyecto de investigación sobre producción de enzimas degradantes de taninos y obtención de nutraceuticos por cultivos microbianos en fermentación en medio sólido y en medio líquido que se llevó a cabo en colaboración entre la Universidad Autónoma de Coahuila, El Consejo estatal de ciencia y tecnología y la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”.

El proyecto ha sido dirigido por el siguiente comité:

Dr. Cristóbal Noe Aguilar Gonzáles U.A de C. _____

Q.F.B. Antonio Aguilera Carbó UAAAN. _____

Dr. Raul Rodríguez Herrera U.A. de C. _____

c. Dr. Juan C. Contreras Esquivel U. A. de C. _____

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Febrero 2003.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo estatal de ciencia y tecnología por el otorgamiento de la beca-tesis para la realización de este trabajo.

Al Dr. Juan Carlos Contreras por su colaboración y sugerencias en la realización de este trabajo.

Al Dr. Cristóbal Noé Aguilar por brindarme la oportunidad de ver cristalizado mi anhelo de superación.

Al Dr. Raúl Rodríguez Herrera por brindarme su apoyo y consejos valiosos en la preparación de la tesis.

A la Profesora Laura Olivia por su importante colaboración en la realización de este trabajo.

Al Q.F.B. Antonio Aguilera Carbó por su apoyo y momentos compartidos.

A mi Alma Terra Mater por haberme formado como ingeniero.

A mis compañeros de la UAAAN por todos aquellos momentos compartidos juntos.

A mis amigos y compañeros del DIA.

A todas aquellas personas que en alguna forma participaron en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

Con gran cariño y respeto dedico este trabajo a mis padres

Sr. Armando Martínez Castillo

Sra. Elisa Hernández Méndez

A mis queridos hermanos

Jorge Armando

Griselda Elena

Olga Elizabeth

Juan Carlos

Por brindarme su apoyo incondicional y por todos aquellos momentos que hemos compartido juntos.

A la Familia **Martínez Flores** y **Martínez Fajardo** por su apoyo y la amistad que nos une.

INDICE DE CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	v
INDICE DE CUADROS	x

INDICE DE FIGURAS	xi
ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVOS	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Antecedentes.....	4
Sistemas de producción de enzima tanasa.....	5
Soportes utilizados en la producción de enzimas fúngicas.....	6
Mecanismo de acción de la tanasa.....	9
Taninos.....	11
Aplicaciones.....	14
Importancia.....	15
Asimilación de sustratos por <i>A. niger</i> Aa-20.....	17
Transporte de solutos.....	17
Metabolismo de <i>A. niger</i>	18
Síntesis de enzimas por <i>A. niger</i>	19
Secreción de enzimas por de <i>A. niger</i>	19
Regulación de la tanasa.....	19
Evaluación de la actividad tanasa.....	21
Purificación de la tanasa.....	23
Características de la enzima purificada.....	24
MATERIALES Y METODOS	25
Etapa 1.....	25
Recolección del material vegetal.....	25
Caracterización físico -química.....	26
Determinación de materia seca total.....	27
Humedad.....	27
Cenizas.....	27
Proteína cruda.....	28
Grasa.....	28
Fibra.....	29
pH.....	30
Azúcares totales y reductores.....	30
Fenoles totales.....	32

Extracción de fenoles totales en agua sin aplicación de temperatura.....	32
Valoración de fenoles totales.....	32
Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin Ciocalteu.....	32
Extracción de fenoles totales en acetona al 70% (taninos condensados) fenoles totales en agua destilada (relación 1:4 peso volumen) aplicación de temperatura.....	33
Valoración de taninos condensados y taninos Hidrolizables.....	34
Cuantificación de taninos condensados y taninos hidrolizables.....	34
Etapa 2.....	35
Utilización de <i>Aspergillus niger</i> Aa-20.....	35
Microorganismo utilizado.....	35
Medio de propagación.....	36
Medio de cultivo.....	36
Propagación del inoculo.....	37
Etapa 3.....	39
Sistemas de producción de enzimas fúngicas y acumulación de ácido gálico.....	39
Cultivo en medio líquido (CML).....	39
Cultivo en medio sólido (CMS).....	40
Obtención de extractos intracelular y extracelular en CML y CMS.....	41
Métodos analíticos realizados en los cultivos en medio sólido y líquido.....	42
Evaluación del pH.....	42
Determinación de azúcares totales.....	42
Determinación de fenoles totales.....	43
Ensayo de la actividad tanasa.....	43
Determinación de ácido gálico acumulado.....	45
Determinación de las velocidades de consumo de sustrato y producción enzimática en CML y CMS.....	46
Evaluación del consumo de azúcares y fenoles totales y la actividad tanasa total en CML y CMS.....	46

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
Caracterización físicas y químicas del hojasén.....	48
Cinéticas de consumo de sustrato, producción de enzima y Acumulación de ácido gálico en CML.....	49
Cinéticas de consumo de sustrato, producción de enzima y Acumulación de ácido gálico en CMS.....	54
Velocidad de consumo de azúcares y fenoles totales y producción enzimática en CML y CMS.....	60
Evaluación de porcentaje de azúcares y fenoles totales consumidos producción de tanasa total y ácido gálico máximo acumulado en CML y CMS.....	65
CONCLUSIONES	70
RECOMENDACIONES	71
LITERATURA CITADA	72

APENDICES

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1.1. Clasificación taxonómica de <i>Flourensia cernua</i> D.C.....	8
Cuadro 1.2. Propiedades de la TAH de <i>Aspergillus niger</i> producida por Cultivo líquido.....	24
Cuadro 1.3. Composición del medio Czapeck-Dox.....	37
Cuadro 1.4. Caracterización físico –química de hojasén	

(<i>Flouensia cernua</i> D.C.).....	48
--------------------------------------	----

INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.1.	<i>Flouensia cernua</i> D.C.....	7
Figura 1.2.	Reacción de hidrólisis de la tanasa.....	10
Figura 1.3.	Estructuras básicas de galotaninos, ácido gálico, elagitaninos, ácido hexahidroxifénico y ácido elágico.....	14
Figura 1.4.	Arbustos de hojásén (<i>Flouensia cernua</i> D.C.).....	26
Figura 1.5.	Determinación de azúcares totales.....	31
Figura 1.6.	Cepa <i>Aspergillus niger</i> Aa-20.....	36
Figura 1.7.	Medio de Propagación Papa Dextrosa (PDA).....	36

Figura	1.8.	Conteo de esporas de <i>A. niger</i> Aa-20.....	38
Figura	1.9.	Acercamiento de la Cámara Neubauer.....	38
Figura	1.10.	Cultivo en medio líquido.....	39
Figura	1.11.	Cultivo en medio sólido.....	40
Figura	1.12.	Obtención de extractos enzimáticos.....	41
Figura	1.13.	Medición de pH en extractos enzimáticos.....	42
Figura	1.14.	Determinación de azúcares y fenoles totales.....	43
Figura	1.15.	Ensayo de la actividad tanasa.....	44
Figura	1a.	Consumo de azúcares totales en CML.....	50
Figura	1b.	Consumo de fenoles totales en CML.....	50
Figura	1c.	Producción de tanasa intracelular en CML.....	50
Figura	1d.	Producción de tanasa extracelular en CML.....	50
Figura	1e.	Gálico acumulado en CML.....	50
Figura	1f.	Evolución del pH.....	50
Figura	2a.	Consumo de azucares totales en CMS.....	55
Figura	2b.	Consumo de fenoles totales en CMS.....	55
Figura	2c.	Producción de tanasa intracelular en CMS.....	55
Figura	2d.	Producción de tanasa extracelular en CMS.....	55
Figura	2e.	Gálico acumulado en CMS.....	55
Figura	2f.	Evolución del pH.....	55
Figura	3a.	Velocidad de consumo de azúcares totales a las 48 horas de cultivo en CML y CMS.....	61
Figura	3b.	Velocidad de consumo de fenoles totales a las 48 horas de cultivo en CML y CMS.....	61
Figura	3c.	Velocidad de producción de tanasa a las 48 horas en CML y a las 96 horas en CMS.....	62
Figura	4a.	Porcentaje de azúcares totales degradados a las 48 horas de cultivo en CML y CMS.....	65
Figura	4b.	Porcentaje de degradación de fenoles totales a las 48 horas de cultivo en CML y CMS.....	65

Figura 4c.	Actividad tanasa total en CML a las 48 horas y a las 96 horas en CMS.....	65
Figura 4d.	Acido gálico máximo acumulado en CML y CMS.....	65

Ecuaciones

Ecuación 1.	Porcentaje de materia seca total.....	27
Ecuación 2.	Porcentaje de cenizas.....	27
Ecuación 3.	Porcentaje de nitrógeno.....	28
Ecuación 4.	Porcentaje de grasa.....	29
Ecuación 5.	Porcentaje de fibra.....	29
Ecuación 6.	Cuantificación de fenoles totales.....	33
Ecuación 7.	Esporas por mililitro.....	37
Ecuación 8.	Gálico producido.....	45
Ecuación 9.	Gálico acumulado.....	45
Ecuación 10.	Gramos de azúcares consumidos a las 48 horas de cultivo.....	46

ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

A.T.B.	Actividad Tanasa Basal.
CML	Cultivo en medio líquido.
CMS	Cultivo en medio sólido.
GRAS	Generalmente reconocido como seguro.
TAH	Tanin acil hidrolasa.
UAM-IRD	Universidad Autónoma de México-Institut de Recherche pour le Metropolitana-México-Developpement, Francia.
Rpm.	Revoluciones por minuto.
E.C.	Clasificación Enzimática.
D.C.	Dillon tomado de Cabazos (1976).

Ppm Partes por millón.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación ha sido desarrollado para evaluar el potencial del hojaseén como fuente de inductores de la enzima tanasa y precursores de compuestos nutraceuticos en dos sistemas de cultivo microbiano. Se utilizó polvo de hojaseén (*Flourensia Cernua* D.C) a una humedad del 2% en Cultivo en medio Líquido (CML) en concentraciones del 5%,10% y 15% y en cultivo en medio sólido (CMS) en concentraciones del 30%, 40% y 50%. como soporte para evaluar la producción de tanasa fúngica y acumulación de ácido gálico El presente estudio se realizó en el departamento de investigación de alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas en colaboración con la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Las cinéticas de producción se llevaron a cabo en matraces erlenmeyer estériles de 250 ml de capacidad, con medio de cultivo esterilizado CzapeK Dox a un pH de 5.5. Se inocularon con esporas de *Aspergillus niger* Aa-20 ajustadas a una concentración de 5×10^6 esporas por 50 ml de medio Czapec Dox en CML y 2×10^7 esporas por gramo de soporte en CMS. Los matraces se llevaron en un agitador multi-Shaker a 200 rpm y a una temperatura de 26°C en CML y en CMS se realizó en una incubadora Napco a una temperatura de 32°C.

Las cinéticas tuvieron una duración de 120 horas, en las cuales cada 24 horas se determinó el consumo de fenoles totales por el método de Folin Ciocalteu, el consumo de azúcares totales por el método de Dubois y Miler (1956), la actividad enzimática y la acumulación de ácido gálico por el método de Sharma col., 2000, además se analizó el pH como parámetro de control.

Los resultados mostraron que el CMS es más productivo que el CML. Al aumentar la concentración de hojaseñ en CML se incrementó la actividad de la enzima, esto no sucedió en la totalidad en CMS, ya que sólo se presentó este comportamiento en los dos primeros tratamientos. En relación a la velocidad de producción de enzima tanasa, el CML, en función del tiempo, es mejor sistema, ya que se observó una velocidad de producción a las 48 horas (0.0003 U/l-h) que en CMS donde la misma producción se alcanzó a las 96 horas.

ABSTRACT

This work has been developed to evaluate the potential of “hojasén” as tannase inductors and nutraceuticals intermediates sources in two different culture systems. Hojasen powder (*Flourensia cernua* D.C.) was used at several initial concentrations in submerged culture (CML): 5, 10 and 15 %, while in solid state culture (CMS) the initial concentrations were of 30, 40 and 50%, which were used as solid support of the fungal growth for the tannase productions and the recovery of gallic acid. Present work was ejected at the Food Research Department of the Universidad Autonoma de Coahuila in collaboration with the Universidad Autonoma Agraria “Antonio Narro”.

Tannase production kinetics were evaluated in Erlenmeyer Flasks using as culture broth, the Czapek Dox medium with a pH initial value of 5.5. Spores of *Aspergillus niger* Aa-20 were added to both culture systems. Those reactors of CML were incubated at 26°C in a multi-shaker at 200 rpm, while in CMS the reactors were incubated at 32°C.

Each kinetic has a time period of 120 hours, which were monitored each 24 hours, evaluating the total phenol contents, total sugars contents, tannase activity and the gallic acid accumulation and the pH as control parameter. Obtained results showed that CMS was more productive than CML. When initial hojasen concentration was increased in CML, the tannase activity was higher.

However, in CMS, this pattern was not found. On the other hand, better results of the tannase enzyme production rate were obtained in CML in shorter times (0.0003 U/l-h at 48 h) than those obtained in CMS (96 h).

INTRODUCCION

Las enzimas son proteínas que aceleran la velocidad con que las reacciones se llevan a cabo sin alterar el equilibrio y son las responsables de las transformaciones metabólicas en los seres vivos, pero también pueden considerarse como aditivos altamente específicos para aplicaciones diversas en procesos químicos, físicos y biológicos. Tienen una gran importancia en diversas áreas que permite reducir los costos de producción, mejora en la calidad de productos, desarrollo de procesos más eficientes, y generación de ganancias y mayores rendimientos.

En el área de alimentos, se ha utilizado la enzima lactasa que permite desdoblar la lactosa presente en la leche y reducir significativamente los problemas asociados en personas intolerantes a la lactosa. En procesos de elaboración de quesos se han aplicado proteasas que permiten la coagulación de la leche y mejoramiento de las características finales del producto. Mediante el uso de una enzima o el acoplamiento de dos o más de ellas es posible cuantificar más de 30 sustancias en el control de calidad de alimentos como ácido ascórbico, ácido láctico, ácido cítrico, almidón, colesterol, lactosa, lecitina y glucosa.

El uso de enzimas, en detergentes, aumenta el poder limpiador del producto; en diagnósticos médicos, facilita la detección a tiempo, se genera un mayor conocimiento de los casos de enfermedades y por tanto mejora en salud de la población. Por otro lado, la tanasa fúngica, tiene diversas aplicaciones entre las

que destaca la manufactura de té instantáneo o licor de grosella, en la producción de ácido gálico (intermediario en la síntesis del fármaco antimicrobiano trimetropin), en la industria alimentaria como substrato para la síntesis química o enzimática del propil galato, (alternativa a los antioxidantes sintéticos tradicionales con grado alimentario para grasas, aceites, esencias en alimentos, emulsiones y ceras), en el tratamiento de aguas contaminadas por compuestos fenólicos de la industria del cuero y como agentes clarificantes de vinos, cerveza, jugos de fruta o bebidas refrescantes con sabor a té.

En relación a lo anterior, la presente investigación busca satisfacer las necesidades de su producción mediante el uso de especies vegetales baratas, fáciles de procesar y de adquirir, para lo cual se seleccionó hojásen ya puede representar una fuente atractiva, que resultaría altamente interesante tanto para los industriales como los agricultores de la región, los cuales tendrán un mayor ingreso al cultivar plantas adaptadas de la región o al aprovechar los recursos naturales del semidesierto con un mayor valor agregado, permitirá reducir considerablemente los costos de producción en materia prima, ya que la inversión inicial es baja, este arbusto puede propagarse a través de semilla y mediante rebrote a partir de secciones del tallo lo que representa ventajas importantes cuando no se tiene con los recursos para reanudar una siembra y se puede encontrar en una gran extensión territorial de México y los E.U.

En base a lo anterior se planteó el presente trabajo con la siguiente:

HIPOTESIS HIPOTESIS

El arbusto conocido como hojaseén (*Flourensia cernua* D.C) por su contenido de compuestos fenólicos es una fuente potencial de carbono y energía e inductores para la producción de enzima tanasa y acumulación de ácido gálico.

OBJETIVOS

Utilizar hojaseén como fuente de carbono, energía y/o soporte en la producción de enzima tanasa y acumulación de ácido gálico a partir de cultivos en medio sólido y en medio líquido empleando *Aspergillus niger* Aa-20.

Objetivos específicos

- a) Evaluar la producción de enzima tanasa y acumulación de ácido gálico en cultivo en líquido utilizando concentraciones de 5, 10 y 20% de hojaseén.

- b) Evaluar la producción de enzima tanasa y acumulación de ácido gálico en cultivo en sólido utilizando concentraciones de 30, 40 y 50% de hojaseén.

REVISION DE LITERATURA

Antecedentes

La tanasa fúngica es una glicoproteína, (Aoki y col., 1976; Rajakumar y Nandy, 1983) formada por una mezcla de una esterasa y una depsidasa (Haslm y col., 1961; Beverini y Metche, 1990). Su nombre específico es Tanin acil hidrolasa (E.C. 3.1.1.20) y puede extraerse a partir de fuentes animales a través de la mucosa rumial e intestino delgado de bovinos (Begovic y Duzic, 1976 y 1977).

En vegetales la enzima está presente en cortezas de los árboles como el “Konnam”, “el mirobolano” y el “badúl” (Madhavakrishna y col., 1960; Pourrat y col., 1985; Lekha y Lonsane, 1997). Nieresntein (1930), menciona que algunos insectos producen la enzima durante el estado larvario. Sin embargo, la fuente más importante es por vía microbiana, debido a que las enzimas generadas son más estables, son producidas en grandes cantidades y en forma constante (Lekha y Lonsane, 1997). De entre los microorganismos productores, se encuentran levaduras, bacterias, y principalmente hongos de los géneros *Penicillum* y *Aspergillus*, siendo en éste último, la especie *niger* el más ampliamente utilizado como modelo, ya que no es patógeno, es un productor conocido de una gran variedad de enzimas y es considerado como GRAS (Generalmente Reconocido Como Seguro).

Sistemas de producción de enzima tanasa

La tanasa es producida por procesos fermentativos en cultivo en medio líquido (CML), entendiéndose por éste en el que los nutrientes y el microorganismo se encuentran en fase acuosa. Este sistema se caracteriza por utilizar procedimientos mecánicos que permiten mezclar y abastecer oxígeno (elemento indispensable en el metabolismo de los microorganismo aerobios) y ha sido usado ampliamente en la producción de una gran variedad de enzimas. La ventaja de este sistema facilita en gran medida el control de la fermentación, ya que homogeniza los productos metabólicos y la transferencia de calor. Sin embargo, puede presentar problemas de contaminación debido al alto contenido de humedad y baja en la producción de metabolitos ya que la solubilidad del oxígeno en el medio de cultivo es escasa y por consiguiente limita el crecimiento de los hongos filamentosos (Righelato, 1975; Solomon y col., 1975; Raimbault, 1998).

Lekha y Lonsane, 1994 reportan que la tanasa también puede producirse a partir de cultivo en estado sólido, donde los microorganismos crecen sobre la superficie de éste (Pandey, 1992). El sustrato contiene agua que se encuentra retenida en la matriz porosa que permite que las funciones vitales del microorganismos se realicen. En este sistema Aguilar y col., (1999c) indican que la enzima se caracteriza por expresarse de forma extracelular en altos títulos cuando se compara con la producida cultivo en medio líquido. Además se ha reportado que este cultivo es más productivo, reduce el consumo energético, es simple de preparar y los riesgos de contaminación son menores (Ward, 1989). No obstante

tiene la desventaja de acumular el calor, y la dificultad en el control de la humedad y pH.

Soportes utilizados en la producción de enzimas fúngicas

Los sustratos que normalmente se han utilizado para la producción de enzimas fúngicas son residuos de remolacha, plátano, maíz, yuca, bagazo de caña, pulpa de café, cáscara cítrica, salvado de trigo, arroz y soya (Pandey, 1992). Por otro lado el uso de plantas como soporte para estos fines ha sido poco empleado. Entre éstos se encuentra el hojaseén. su nombre científico es *Flourensia cernua* D.C., es un arbusto muy ramificado de hasta 2 m de altura que exuda una sustancia resinosa con olor a alquitrán (Correl y Johnston, 1970).

Tiene ramas delgadas, resinosas, color café claro a gris (Vines, 1960) con hojas alternas, simples, elípticas a oblongas de 17-25 mm de largo y 6.5-11.5 mm de ancho, agudas a ambos lados, haz verde oscuro, y a veces resinoso, envés más pálido y pecíolo de 1-2.5mm (Correl y Johnston, 1970; Vines 1960). Las flores son cabezuelas en corimbos o panículas y presenta de 12 a 20 flores por cabezuela (Vines, 1960).

El Fruto es un aquenio muy veloso de 6 mm de largo y 2 mm de ancho, lateralmente comprimido, de 2 a 4 aristas desiguales y ciliadas de 2-3 mm de largo, casi obscurecidas por los pelos largos del aquenio (Benson y Darrow, 1981; Correl y Johnston, 1970; Vines, 1960).



Figura 1.1. *Flourensia cernua* D.C.

Se le conoce comúnmente de varias formas, ya que se encuentra tanto en Estados Unidos de Norteamérica como en México. Los nombres que se le dan en Estados Unidos de Norteamérica son: tarbush, hojase, american tarbush, black brush, varnish-brush y hojasén (Benson y Darrow, 1981; Correl y Johnston, 1970; Gay y cols., 1970; Vines, 1960). En México se le conoce como hojasén, arbusto de alquitrán y escobilla negra (Arredondo, 1981).

Se encuentra en suelos con gran cantidad de carbonato de calcio y suelos arenosos (Blake, 1913; Buffington y Herbel, 1965). En México se encuentra en los estados de Sonora, Chihuahua, Coahuila, Durango, San Luis Potosí, Zacatecas y México, D.F. (Vines, 1960). Silva (1980) la reportan para el sur de Nuevo León.

En los Estados Unidos de Norteamérica se localiza en el Oeste de Texas y Sur de Nuevo México y Arizona (Vines, 1960). Se encuentra en altitudes que van de los 1000 a 2000 metros sobre el nivel del mar (msnm) (Gay y col., 1970). Sin embargo, Arredondo, 1981; Gonzáles, 1975; Silva, 1980; Siller, 1980 mencionan que la altitud predominante son los 1900 msnm y pendientes del 1 al 6 por ciento.

El hojaseén se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera:

Cuadro 1.1. Clasificación taxonómica de *Flourensia cernua* D.C.

Reino	Metaphyto.
Subreino	Spermatophyto
Clase	Angiospermas
Subclase	Dicotyledonas
Orden	Companulatae
Familia	Compositae
Subfamilia	Tubuliflorae
Tribu	Heliantheae
Género	Flourensia
Especie	Cernua D.C

Blake (1913) describe 23 especies de este género, 9 mexicanas y 14 sudamericanas; Correl y Johnston (1970), indican que *Flourensia* es un género de 24 especies distribuidas en Norteamérica y Sudamérica; Dillon (1976) reporta 2 nuevas especies de este género encontradas en el Estado de Chihuahua (*Flourensia pulcherrima* y *f. Monticola*) y De Loach (1980), menciona que el género está compuesto por 29 especies. El hojaseén se reproduce por semilla (Fisher, 1975; citado por Scifres, 1980). No posee zonas de yemas bajo la superficie del suelo (Herbel, 1967), no obstante, Scifres (1980) reporta que presenta reproducción vegetativa a partir de secciones del tallo. Actualmente, se aplica

como remedio para problemas digestivos (Arredondo, 1981) y como fungicida agrícola (Hossein y Maldonado, 1982), quienes reportan que soluciones de hojas de hojásén en concentraciones de 1000 ppm controló un 100 por ciento de especies como *Rhizoctonia solani*, *Pytium sp* y *Fusarium oxysporum*.

De los estudios de análisis realizados en esta planta, Vines, 1960; Beltrán, 1964, reportan que contiene un aceite esencial en la proporción de 0.864%, cuyos componentes principales son beta-eudesmol (24.5%), alfa-eudesmol (6.9%), limoneno (6.6%), gamma-eudesmol (4.6%), mirceno (3,8%), borneol (3.3%), 3-delta-careno (3.0%) y Flourensiadiol (44.6%) (Téllez y col. (1997); un glucósido de una proporción de 0.332% y una resina. Wall y cols., (1961), encontraron escasas cantidades de alcaloides en hojas, ramas y flores. Jones y Earle (1966) en semillas de hojásén, reportan un 16.2% de proteína, 6.6% de aceite y presencia de taninos.

Mecanismo de acción de la tanasa

La tanasa cataliza la hidrólisis de los enlaces éster presentes en los taninos hidrolizables y en los ésteres del ácido gálico (Lekha y Lonsane, 1997). Sobre el ácido tánico (un tanino hidrolizable), la TAH genera glucosa y ácido gálico como productos finales de la reacción (Haworth y col., 1958). Los compuestos intermediarios de esta hidrólisis son: 1,2,3,4,6,-pentagaloi-glucosa, 2,3,4,6-tetragaloi-glucosa y dos tipos de monogaloi-glucosa. Si el sustrato de la reacción es el metil éster del ácido tánico o el metil galato, la TAH genera ácido gálico y alcohol metílico como productos finales (Ibuchi y col., 1972). La Figura 1.2, muestra la reacción catalizada por la TAH sobre ácido tánico, el cual puede o no estar metilado; si no lo está, la molécula de glucosa puede unirse a través de enlaces tipo éster a radicales R_2 (ácido digálico) sobre los carbonos 1,2,3 y 4. Y al radical R_1 (ácido gálico) sobre el carbono 6. Si el ácido tánico está metilado, el radical R_2 será reemplazado en todas las posiciones por un radical R_3 (m-digalato metilado) (García –Peña y col., 1999).

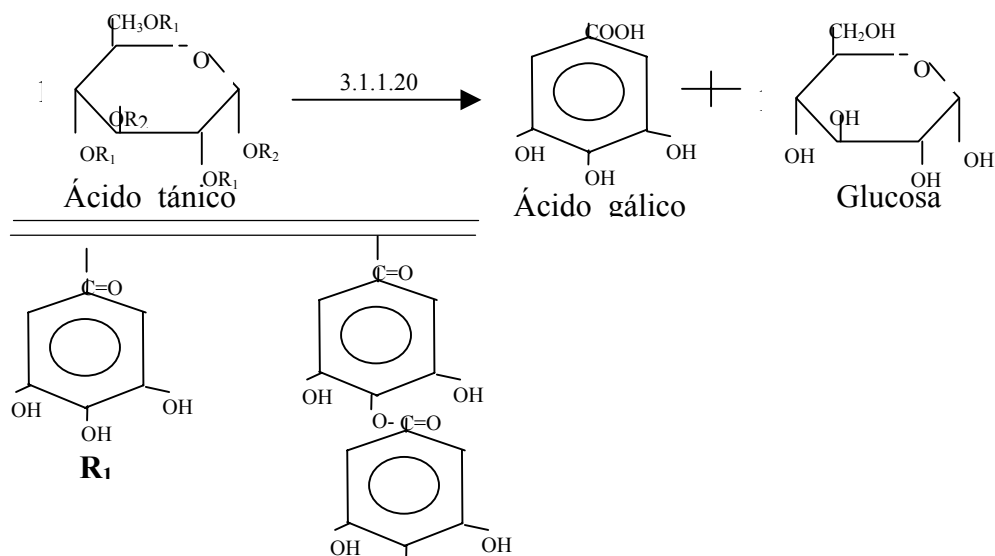


Figura 1.2. Reacción de hidrólisis (R_2 anasa). En la reacción de hidrólisis de una mol de ácido tánico (tanino hidrolizable) se libera una mol de glucosa y de 7 a 9 moles de ácido gálico, dependiendo del grado de sustitución. R_1 , galoil y R_2 , digaloil.

Taninos

Los taninos se han definido como sustancias orgánicas solubles en agua, presentes en extractos de hojas, corteza, maderas, frutas y agallas de ciertos helechos, gimnospermas y angiospermas; capaces de curtir pieles convirtiéndolas en cueros impermeables que son resistentes al ataque de bacterias, al calor y a la abrasión (Swain, 1979).

Sora, 1984; Esau, 1997; Fahn 1974; mencionan que son compuestos orgánicos no nitrogenados, amorfos, de sabor astringente, débilmente ácidos, la mayoría solubles en agua, sólo unos pocos en solventes

orgánicos; son de color amarillo, rojo, o café y se localizan en el citoplasma y vacuola de la célula como metabolitos secundarios.

Los taninos se forman a partir de los productos de la ruta del ácido Shíquimico (Hasslan, 1974; citado por Swain, 1979); se sintetizan en el retículo endoplásmico liso y rugoso y se depositan en la vacuola de la célula. Se distribuyen de acuerdo a la planta que se trate ya que varias familias de plantas tienen capacidad para sintetizar diferentes tipos de taninos, aunque una planta específica puede especializarse en una forma particular (*Ericaceae*-*Calluna sp.*, *Erica sp.* y *Rhodendron sp.* ricas en proantocianidinas y *Aceraceae*-contienen un bajo nivel de proantocianidinas combinado con diferentes patrones de taninos hidrolizables).

Un examen de tejidos puede revelar diferentes patrones de metabolismo de taninos. (*Quercus robur* en hojas jóvenes principalmente elagitaninos; en la corteza fresca tiene un balance elagitaninos-proantocianidinas; en las bellotas se encuentran proantocianidinas). La cantidad de éstos puede variar en las distintas porciones de la planta (*Rhus coriaria* 27% en hojas, 6% en corteza y 4% en la madera) y en algunas plantas se producen en forma abundante en semillas en germinación, yemas en crecimiento y durante el desarrollo del fruto, correspondiendo todo ello a sitios de intenso metabolismo (Haslam, 1966).

Se clasifican como taninos hidrolizables (TH) y como taninos condensados (TC). Los primeros están constituidos por ésteres de glucosa u otros polioles,

ácido elágico, digálico, m- digálico, hexahidroxidifénico o sus congéneres. Por hidrólisis con ácidos, bases y enzimas hidrolíticas se rompe el enlace glucosídico para liberarse azúcar y los compuestos fenólicos que lo integran (López, 1984). Se subdividen en elagitaninos y ácido tánico. Los elagitaninos consisten de ácido hexahidroxifénico, el cual espontáneamente se deshidrata a la forma lactona, conocida como ácido elágico.

Dentro de los elagitaninos se cita como ejemplo al corilagin, primer tanino aislado de *Caesalpinea corarea* (nombre común div-divi), *Terminalla chebula* (nombre común mirabolano) y el isorugosin B, aislado de Liquidambar (ALNICOLSA, 2001). El ácido tánico, tiene una molécula central de D-glucosa y 5 unidades más de galosilos ligados a uno de los centros del núcleo glucósido. Se obtiene de los frutos de *Caesalpinea tinctoria* (nombre común tara).

Los taninos condensados o proantocianidinas son polímeros de flavan 3-ol (grupo catequinas y de flavan 3-4 diol (grupo leucoantocianidinas). Su contenido de carbohidratos es nulo o muy bajo. Por ser grandes polímeros tienen un alto peso molecular (1000 a 3000 daltons), lo que le da una relativa inmovilidad.

Los taninos condensados incluyen los flavonoides (que se subdividen en antocianidinas y leucoantocianidinas) y la catequina. Los flavonoides son compuestos polifenólicos distribuidos ampliamente en los vegetales, frutas y en determinadas bebidas como el té y el vino rojo y que poseen actividad antioxidante (Sanchez, 2001). Las antocianidinas son pigmentos presentes en flores, tallos, hojas y frutos y son muy inestables en un medio ácido y son fácilmente convertibles a antocianinas en solventes ligeramente ácidos.

Las leucoantocianidinas son flavan 3-4 dioles (hidroxilo en C₃-C₄) que son compuestos incoloros que producen antocianidinas rojas cuando se les trata con ácido (Watterson y Butler, 1983) y las catequinas son moléculas antioxidantes que tienen una acción de inhibición de la oxidación de la lipoproteínas de baja densidad o "colesterol malo" (Sanchez, 2001).

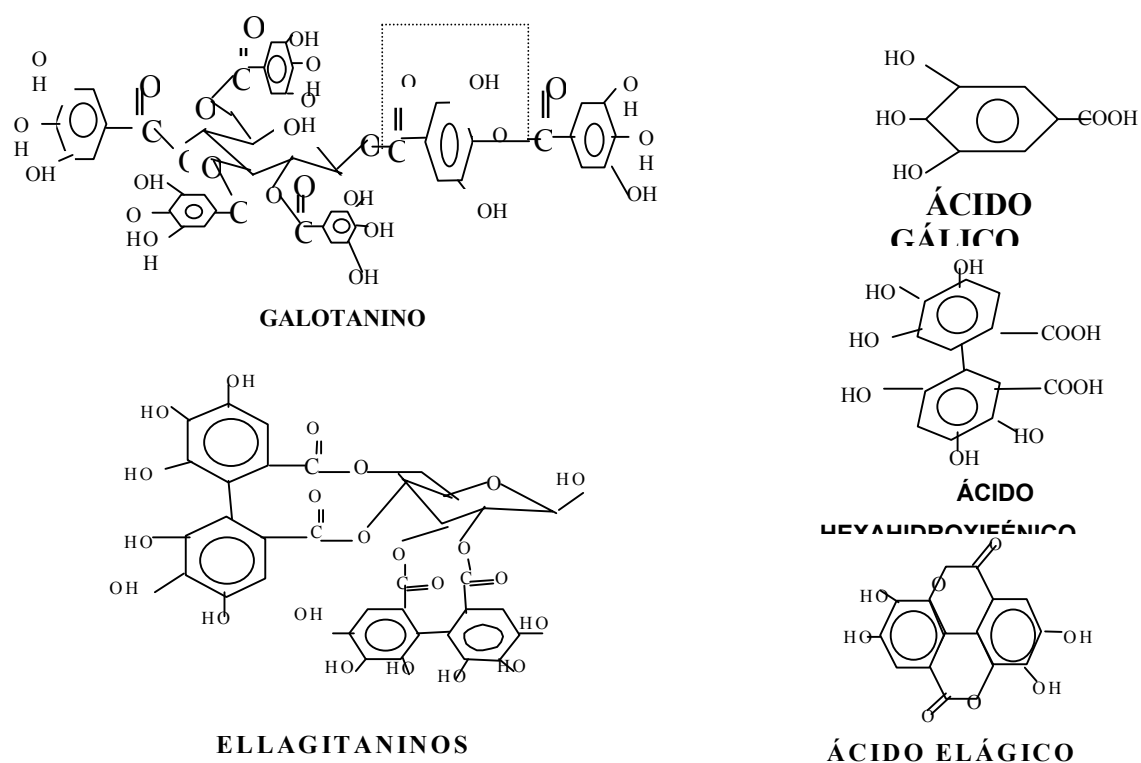


Figura 1.3. Estructuras básicas de galotaninos, ácido gálico, elagitaninos, ácido hexahidroxifénico y ácido elágico.

Aplicaciones

Los taninos hidrolizables y condensados, se emplean en la industria de cuero, permitiendo obtener una amplia variedad de productos, que se diferencian en flexibilidad y resistencia. Los taninos condensados se

usan en la fabricación de adhesivos, resinas y como precipitantes para suspensión de arcilla (ANILCOLSA 2001).

Los taninos hidrolizables se aplican como estabilizadores de la cerveza al combinarse con las proteínas de éste para formar complejos que precipitan y disminuyen la presencia de turbidez. Además, se usan para remover impurezas proteínicas, en la preservación y maduración de alimentos, aprovechando sus propiedades antisépticas y antioxidantes; así como en la clarificación del vino.

Su aplicación en otros campos está orientada a la extracción de plomo, fierro, calcio, bario y radio presentes en soluciones, por co-precipitación con gelatina y taninos; al efecto anticorrosivo en superficies de fierro, expuestos al medio ambiente; al empleo en la elaboración de tintas; como recubrimiento protector de zinc y aleaciones (ANICOLSA, 2001).

Importancia

Los taninos tienen diversas características y propiedades que permiten su aplicación en varios rubros. De entre los aspectos más importantes:

1- Actúan como repelentes naturales contra predadores y microbios y pueden ayudar de esta manera a proteger la planta.

2- Efecto tóxico contra patógenos potenciales por resistencia de ciertos tejidos de la planta al ataque de virus y microorganismos, asociándose con el componente proteico del virus o inactivando la enzima microbiana. Similarmente donde los

taninos se polimerizan (oxidación de la quinona por la enzima fenolasa) se forma una barrera protectora insoluble, la cual previene el ataque microbiano.

3- Por su propiedad astringente destruye los tejidos del paladar por precipitación de proteínas salivales (por la interacción con proteínas salivales y glicoproteínas en la boca (Stumpf, 1981).

4- Tienen el inconveniente de combinarse con proteínas y otros polímeros de celulosa y pectina, limitando la disponibilidad de proteínas para los animales, inhibe la acción de algunas enzimas y en general reduce la energía metabolizable (Méndez, 1984).

5- En frutos no maduros promueven la astringencia, que durante el proceso de maduración determinan su sabor y varía de acuerdo a la concentración en el fruto (en la sidra y la vid, con pocos taninos el sabor es flojo e insípido y con una gran concentración le da una condición demasiado áspera (Stumpf, 1981). Pero al madurar se polimerizan y se elimina el sabor astringente, es decir, es un mecanismo de defensa contra insectos nocivos (Olivares, 1983).

6- Por su habilidad para formar enlaces con las proteínas y otros polímeros y para inhibir enzimas tienen un efecto negativo en la formación de suelo, por disminuir el nitrógeno disponible para los microorganismos de este (Olivares, 1983) o contribuir a su destrucción por inactivación enzimática.

7- En granos como sorgo y frijol los taninos constituyen un factor limitante dentro de la calidad nutritiva de éstos (Burs, 1971, Maxón y cols., 1972; Jambunathan y Mertz, 1973 Ronnenkamp, 1976; Elias y Bressami, 1979).

La asociación tanino-proteína parece ser de tipo inespecífica (Guiragossian y col., 1978) y muy estable, pues los enlaces de hidrógeno entre los fenoles y amidas N-sustituidas, como las proteínas, resulta ser un tipo de enlace muy fuerte (Loomis y Battaile, 1966).

Asimilación de sustratos por *A. niger* Aa-20

Aspergillus niger además de poseer una membrana plasmática externa que protege a la célula, también tiene un extenso sistema de membranas y orgánulos internos. Algunas materiales son transportados a la célula por endocitosis proceso en el que una región de la membrana plasmática se invagina o engloba formando una vesícula que contiene el material proveniente del exterior de la misma.

La vesícula se funde con otro orgánulo, un lisosoma primario, formando un lisosoma secundario en el que gran parte del material externo es degradado y transportado al citoplasma. Los productos de degradación se almacenan en vesículas hasta ser expulsados por exocitosis (Ward, 1989).

Transporte de solutos

Los solutos son transportados a través de la membrana y el retículo endoplásmico por difusión pasiva, a favor de un gradiente de concentración; por difusión

facilitada por un gradiente de concentración, transporte activo que involucra proteínas transportadoras que llevan el soluto al interior de la célula (Ward, 1989).

Metabolismo de *Aspergillus niger*

Dado que es un hongo aerobio, es capaz de oxidar completamente algunos de los sustratos a bióxido de carbono y agua, obteniendo el máximo de energía para la conversión de los sustratos en nueva masa celular. Las rutas productoras generan ATP y varios intermediarios químicos utilizados como puntos de partida para las reacciones de biosíntesis.

Los azúcares consumidos por el hongo se rompen por la vía Embden-Meyhof Parnas (EMP) que convierte la glucosa en 2 moléculas de piruvato a través de la triosa fosfato. Un producto final significativo de esta ruta es el ácido pirúvico que se introduce en el ciclo de Krebs o ácido tricarbóxicos. En esta ruta el acetil CoA (2 C) formado a partir del piruvato, se condensa en oxalacetato siguiendo el ciclo, con producción de 2 moléculas de bióxido de carbono (CO₂).

De este modo, el piruvato se oxida a CO₂ con formación de coenzimas reducidas que pueden volver a oxidarse pasando sus electrones a través de la cadena de transporte hasta los aceptores de electrones, como el oxígeno. Durante el proceso de respiración parte de la energía producida se utiliza para formar ATP, necesario para la biosíntesis (Ward, 1989).

Síntesis de enzimas por *A. niger*

El proceso de síntesis de enzimas en *Aspergillus niger*, el ARN polimerasa presente dentro de la célula de éste, se une a centros de ADN específicos denominados promotores, iniciando la síntesis de ARN mensajero (ARN_m) y la transcripción de un operón. La transcripción se produce en el núcleo y el ARN primario que se transcribe se modifica ampliamente en el núcleo antes de que salga al citoplasma para asociarse con los ribosomas. En el extremo del gen estructural, una región de terminación hace que la ARN polimerasa cese la transcripción y se disocie del ADN (Ward, 1989).

Secreción de enzimas por *A. niger*

Las enzimas son sintetizadas en la superficie del retículo endoplásmico y transportados a través de la membrana al espacio de éste. Las proteínas contenidas en éstos espacios se procesan posteriormente en el aparato de Golgi y en otras vesículas y se secretan al medio ambiente externo de la célula por fusión de las vesículas con la membrana plasmática (Ward, 1989).

Regulación de la tanasa

Existen pocos estudios relacionados con los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión de la TAH en los microorganismos, lo cual ha provocado grandes controversias sobre este tópico. Knudson (1913) reportó que la tanasa se induce únicamente cuando el microorganismo *Aspergillus niger* crece en presencia de ácido tánico, generando ácido gálico y glucosa (Nishira y Mugibayashi, 1953); esto no concuerda con lo reportado por Seiji y col., (1973) quienes indicaron que la actividad TAH se expresa cuando el microorganismo crece únicamente sobre glucosa.

Bradoo y col., (1997) demostraron que la enzima puede expresarse aún en presencia del ácido tánico cuando *Aspergillus niger* crece sobre otros sustratos, tales como monosacáridos, disacáridos, polisacáridos o incluso sobre peptona y caseína, considerando que la enzima se expresa en forma constitutiva. Estos niveles de actividad pueden ser considerados como los niveles basales de expresión, de los cuales depende que el microorganismo utilice eficientemente a los taninos hidrolizables como fuente de carbono y energía.

Bajpai y Patil, (1997) reportaron que la TAH puede inducirse por diversos compuestos, tales como: pentagalatoil-glucosa, metil galato, ácido gálico y el pirogalatoil sugieren que la regulación de la tanasa no puede ser controlada por inhibición de retroalimentación, ni tampoco por represión catabólica, debido que el ácido gálico es el producto final de muchos sustratos empleados como inductores de la actividad TAH.

Sobre estas aportaciones puede cuestionarse que el ácido gálico induzca la expresión de la actividad TAH, debido a que dicha enzima por naturaleza es una esterasa, e incluso este ácido ha sido involucrado en el mecanismo de regulación de la actividad por producto final (Bradoo y col., 1997).

Esto puede apoyarse con recientes evidencias que demuestran que los títulos de actividad TAH disminuyen por debajo de los niveles basales cuando el microorganismo crece sobre ácido gálico como única fuente de carbono, lo que implicaría que dicho ácido es un efector negativo de la TAH (Aguilar y col., 1999a).

Por otro lado, también se ha cuestionado que el ácido tánico sea el inductor de la actividad TAH, debido a que es una molécula de gran tamaño y muy reactiva, lo que implica que este compuesto no puede atravesar la membrana celular del microorganismo. Esto lleva a pensar que probablemente uno de los intermediarios formados sea en realidad el inductor de la actividad.

Sobre este aspecto, Lekha y Lonsane (1997) proponen que la inducción de la tanasa se ejecuta de forma similar a la involucrada en la inducción de las celulasas, en donde se requiere de ciertos niveles basales de la enzima necesarios para iniciar la hidrólisis del sustrato y generar de esta forma al inductor real de la actividad.

Evaluación de la actividad tanasa

Diversos métodos han sido revisados en la literatura para evaluar la actividad TAH, entre los cuales destacan algunos ensayos de titulación potenciométrica (Freudenberg y col., 1927; Nishira, 1961; Haslam y Stangroom, 1966; Yamada y col., 1967), un ensayo fotométrico Chen (1969), un colorimétrico (Haslam y Tanner, 1970). Algunos UV- espectrofotométricos (Parmentier, 1970; Ibuchi y col., 1967; Aoki y col., 1976; Rajakumar y Nandy, 1983). Todos estos métodos se basan en la liberación del ácido gálico a partir del ácido tánico por la acción de la enzima TAH.

Los métodos para evaluar la actividad TAH han sido brevemente revisados por Lekha y Lonsane (1997), así también por Madhavakrishna y col., 1960; Jean y col., 1981 y Bajpai y Patil, 1996).

El debate se centraba en el hecho de que los sustratos usados en los ensayos específicos existentes para evaluar la actividad TAH no son los adecuados, existen variaciones en las lecturas lo que lleva a grandes discrepancias en los valores de actividad observados, algunos métodos no son específicos o presentan problemas para determinar el punto final de la reacción; incluso longitudes de onda, en el caso de los ensayos espectrofotométricos, varían de un autor a otro haciendo muy difícil una comparación de los resultados obtenidos.

Recientemente, Aguilar y cols., (1999b) llevaron a cabo un estudio comparativo de 6 métodos para determinar la actividad TAH producida por *A. niger* Aa-20 en cultivos en medio sólido, encontrando que no todos los métodos analizados son capaces de evaluar la actividad enzimática intracelular y recomendaron el uso de la técnica reportada por Beverini y Metche (1990) y el método modificado de Bajpai y Patil (1997).

Purificación de la tanasa

Existen reportes desde los setentas sobre la purificación de la tanasa a partir de fuentes vegetales y microbianas (Aoki y col., 1976). Beverini y Metche (1990) purificaron y caracterizaron una TAH a partir de un producto comercial de *A. oryzae*. En la primera etapa de purificación se usó acetona en el proceso de precipitación (pH 3.6), una etapa de filtración para eliminar los derivados oxidados del ácido gálico, y dos pasos de cromatografía para fraccionar la proteína.

Barthomeuf y col., 1994 purificaron una TAH de *A. niger*, producida en cultivo líquido que consistió en 4 etapas: el extracto crudo enzimático se obtuvo por ruptura mecánica de la masa micelial congelada en presencia de concavalina. Los materiales insolubles fueron removidos por centrifugación, y el sobrenadante se filtró en una membrana de nylon y se sometió a una ultra filtración tangencial. La enzima pura se obtuvo por cromatografía líquida de alta presión usando una columna protein-pak 30°, seguida de una ultra filtración en centricon 100Kda.

Características de la enzima purificada

Cuadro 1.2. Propiedades de la TAH de *Aspergillus niger* producida por Cultivo líquido. (Barthomeuf y col., 1994).

CARACTERÍSTICAS	VALOR
Punto isoelectrico	4.3
Peso molecular	186,000Daltons.
Contenido de azúcares	43%
pH óptimo de la Actividad tanasa	6.0
Actividad esterasa	5.0
Estabilidad al pH	3.5-8.0
Temperatura óptima	35°C
Estabilidad a la temperatura	4.0-45.0°C
Inhibidores	DPF, ZnCl ₂ , FeCl ₃ , CuSO ₄
Inactivadores	o-fenantrolina, P.M.S.F., EDTA, 2-mercaptoetanol, tioglicolato de sodio, MgSO ₄ , CaCl ₂ , MnCl, CoCl ₂ .

En cultivo sólido, Lekha y Lonsane reportaron una purificación parcial de la TAH producida por *A. niger* PKL104, en la que usaron una precipitación con sulfato de amonio al 50% y 80% (peso/ volumen) de saturación, una diálisis, una representación con acetona (50% volumen/ volumen) y una etapa final de recuperación por centrifugación.

MATERIALES Y METODOS

El desarrollo experimental del presente trabajo, se realizó en 3 etapas. La primera etapa consistió en la recolección de material vegetal que incluyó la caracterización físico-química de éste, la cual se realizó en el departamento de nutrición y alimentos de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. La segunda etapa, se utilizó la cepa *Aspergillus niger* Aa-20 obtenido de la UAM-IRD, posteriormente, la tercera etapa, se estableció los sistemas de producción de enzima fúngica y acumulación de ácido gálico en CML y en CMS.

Etapa 1. **Recolección del material vegetal**

Se recolectó hojaseñ fresco el 20 de Junio del 2002 en las orillas de la carretera Saltillo- Zacatecas a la altura del Km 20.5. Se separaron las hojas del arbusto, fueron deshidratadas a una temperatura de 80°C por 24 horas. Posteriormente, se redujeron a un tamaño de partícula de 2 mm en un molino Wiley.



Figura 1.4. Arbustos de hojasén (*Flourensia cernua* D.C.).

Caracterización físico química

La caracterización físico-química de las hojas procesadas consistió en la determinación, por triplicado, de proteína, extracto etéreo, fibra, cenizas, humedad y materia seca total mediante los procedimientos descritos en la AOAC de 1980.

Determinación de materia seca total

En la determinación de materia seca total, se pesó 1 gramo de muestra en un crisol de porcelana (el cual, previamente, se colocó en una estufa a una

temperatura de 100°C hasta obtener un peso constante), posteriormente, se sometió a una temperatura de 80°C por 24 horas, se enfrió en un desecador y se registró el peso.

La materia seca total obtenida fue calculada mediante la fórmula:

Ecuación 1.

$$\% \text{ materia seca total} = \frac{\text{crisol con muestra seca} - \text{crisol solo}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

Humedad

La humedad se determinó por diferencia de 100 y los resultados obtenidos en el análisis de materia seca total.

Cenizas

En la determinación de cenizas, se pesó 1 gramo de muestra en un crisol de porcelana (previamente sometido a peso constante) en seguida se introdujo en un mufla marca Termolyne 200 a una temperatura de 600°C por 5 horas. El porcentaje de cenizas en la muestra se calculó mediante la expresión:

Ecuación 2.

$$\% \text{ cenizas} = \frac{\text{crisol con ceniza} - \text{crisol solo}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

Proteína cruda

La determinación de proteína se realizó por el método Kjeldhal en el cual se colocó 1 gramo de muestra en un matras Kjeldhal, 6 perlas de vidrio, 3 g de catalizador selenio y 30 ml de ácido sulfúrico concentrado. Estos reactivos fueron adicionados en otro matraz excepto la muestra de hojaseñ. Los matraces se colocaron en el digestor Kjeldhal a una temperatura de 100 °C hasta obtener una mezcla color verde translúcida y un color cristalino en el matraz sin muestra (blanco). Una vez frías las mezclas, en seguida, se adicionaron 300 ml de agua

destilada, 110 ml de hidróxido de sodio y 5 granallas de zinc. Posteriormente se obtuvieron 250 ml de destilado de cada muestra en un matraz erlenmeyer de 250 ml de capacidad y se titularon con ácido sulfúrico 0.099 Normal (N).

El nitrógeno obtenido se calculó mediante la fórmula:

Ecuación 3:

$$\% \text{ de nitrógeno} = \frac{(ml H_2SO_4 \text{ gastados} \times N H_2SO_4) - (ml \text{ gastados blanco} \times N \text{ blanco})}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

Finalmente, el por ciento de proteína cruda se calculó multiplicando el porcentaje de nitrógeno por 6.25 factor.

Grasa

En la determinación de grasa, se pesaron 5 gramos de muestra, colocados en un dedal de celulosa e introducido a un sifón y unidos a un matraz bola fondo plano (previamente sometido a peso constante y adicionado con 150 ml de hexano). Enseguida, se insertó la parte superior del sifón a un refrigerante y la muestra se reflujó por 14 horas a una temperatura de 80°C. Después de este tiempo, se evaporó el hexano contenido en el matraz, enseguida se introdujo en una estufa a una temperatura de 105°C por 24 horas, se enfrió en un desecador silica-gel y se registró el peso. El por ciento de grasa obtenido fue calculado mediante la expresión:

Ecuación 4.

$$\% \text{ grasa} = \frac{\text{peso matraz con grasa} - \text{peso matraz bola solo}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

Fibra

El análisis de fibra cruda consistió en 2 fases: En la primera fase, se colocaron 2 gramos de muestra desgrasada en un vaso de Berzelius y 100 ml de ácido sulfúrico 0.255 N. éste se sometió a ebullición por 30 minutos y después se lavó con 100 ml de agua destilada caliente. La segunda fase, se midió 100 ml de NaOH 0.313 N y se colocó en el mismo vaso, enseguida, se calentó a ebullición por 30 minutos y se lavó con 100 ml de agua destilada caliente. La fibra obtenida se colocó en un crisol de porcelana y se introdujo en una estufa a un temperatura de 105°C por 24 horas. Después de este tiempo se registró el peso, del crisol y finalmente la muestra se calcinó a 600°C por 5 horas en un mufla marca Termolyne 200. El por ciento de fibra se calculó mediante la fórmula:

Ecuación 5.

$$\% \text{ fibra} = \frac{\text{peso crisol muestra seca} - \text{peso crisol con cenizas}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

pH

La medición del pH del polvo hojaseñ se realizó del extracto crudo filtrado través de papel Whatman No. 41. obtenido de la homogenización de 2 gramos de muestra en 20 ml de agua destilada por un tiempo de 5 minutos (AOAC, 1980).

Azúcares totales y reductores

Los azúcares totales y reductores se evaluaron por los métodos de fenol sulfúrico Dubois (1956), y por DNS Miller (1959) respectivamente en el extracto filtrado en papel Whatman No. 41, de la homogenización de 2 gramos de muestra en 20 ml de agua destilada por un tiempo de 10 minutos. Se preparó una curva patrón de azúcares totales y una curva patrón de azúcares reductores para su cuantificación.

En la curva de azúcares totales, se utilizó 8 tubos de ensayo. Los primeros seis tubos fueron enumerados del cero al cinco a los que se adicionó 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 ml de solución estándar de sacarosa, y 0, 0.8, 0.6, 0.4, y 0.2 ml de agua destilada respectivamente de tal manera que cada tubo contenía un total de 1 ml de la mezcla. En los tubos 7 y 8 se etiquetaron como A y B, y fueron agregados 1 mL de extracto respectivamente. Los ocho tubos se introdujeron en un baño de agua y hielo, y se adicionó lentamente por las paredes, a cada uno, 2 mL de fenol sulfúrico, se agitaron y se llevaron a ebullición por 5 minutos, posteriormente se enfriaron a temperatura ambiente, se calibró el espectrofotómetro con la muestra del tubo número cero en una celdilla de vidrio a 480 nm y finalmente se procedió a leer los tubos restantes. Las absorbancias obtenidas se analizaron a través de regresión lineal simple y la ecuación obtenida se utilizó en la cuantificación de azúcares totales. En la curva patrón de azúcares reductores, se utilizó 8 tubos, los cuales fueron enumerados del 0 al 5 y como A y B. A los primeros 6, se adicionó 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, y 0.5 ml de solución estándar de dextrosa y 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 y 0 ml de agua destilada de tal manera que cada tubo contenía un total de 5 ml de mezcla. En los tubos A y B se colocó 0.5 ml del extracto crudo y los 8 tubos se les adicionó 0.5 ml de DNS, enseguida, se llevaron a ebullición por 5 minutos, se introdujeron inmediatamente en un baño de agua y hielo por 2 minutos y posteriormente se les añadió 5 ml de agua destilada. Cada tubo fue agitado perfectamente y el tubo número cero fue usado en la calibración de un espectrofotómetro Spectronic 20 Genesys modelo LR 45227 a una longitud de onda de 540 nm. Posteriormente, se procedió a leer las muestras restantes. Las absorbancias se procesaron mediante regresión lineal simple y la ecuación obtenida fue utilizada para cuantificar el contenido de azúcares reductores.



Figura 1.5. Determinación de azúcares totales.

Fenoles totales

Extracción de fenoles totales sin aplicación de temperatura

La extracción de fenoles totales se realizó del extracto filtrado en papel Whatman No 41, obtenida de la homogenización de 2 gramos de muestra en 20 ml de agua destilada por un tiempo 10 minutos.

Valoración de fenoles totales

Los fenoles totales fueron valorados por el método de Folin Ciocalteu. Se etiquetaron 3 tubos de ensayo como A, B, C. En cada tubo fueron añadidos 0.8 ml de muestra y 0.8 ml de reactivo Folin Ciocalteu, enseguida fueron mezclados perfectamente y se dejaron a un tiempo de reposo por 5 minutos. Posteriormente, a éstos fueron añadidos 0.8 ml de carbonato de sodio 0.01M, se mezclaron perfectamente y se dejaron a un tiempo de reposo por un minuto. Finalmente, a cada tubo se adicionaron 4 ml de agua destilada, fueron homogenizados perfectamente y la muestra en el tubo C fue utilizada en la calibración de un espectrofotómetro Spectronic 20 Genesys modelo LR 45227 a una longitud de onda de 480 nm.

Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin Ciocalteu

Se preparó una curva patrón con una solución estándar de ácido gálico (SIGMA) a una concentración de 5mM. Se etiquetaron 6 tubos de numerados del 0 al 5. fueron añadidos a cada uno 0, 0.08, 0.16, 0.32, y 0.4 de solución estándar, adicionalmente se añadió 0.8, 0.72, 0.64, 0.56, 0.48, y 0.4 ml de agua destilada,

(de manera que cada tubo contenía 0.8 ml de la mezcla). A continuación, en cada tubo, fue añadido 0.8 ml de reactivo Folin Ciocalteu, se agitaron perfectamente, y enseguida fueron sometidos a un tiempo de reposo de 5 minutos. A continuación, a cada tubo, fue agregado 0.8 ml de carbonato de sodio 0.01 M , se agitaron perfectamente y fueron sometidos a un tiempo de reposo de 1 minuto. Posteriormente, se adicionó 4 ml de agua destilada y el tubo numero cero se utilizó en la calibración de un espectrofotómetro Spectronic a 20 Genesys modelo LR 45227 a 750 nm. Las absorbancias obtenidas fueron analizadas por regresión lineal simple. La ecuación generada fue utilizada en la cuantificación de fenoles totales, mediante el siguiente lineamiento:

$$Y=ax+b$$

$$X=\frac{(y-b)}{a}$$

Donde

X= concentración en de fenoles totales en gramos por litro (g/L)

Y = absorbancia

Extracción de fenoles totales en acetona al 70 por ciento (taninos condensados) y fenoles totales en agua destilada (Taninos hidrolizables) (relación 1:4 peso/volumen) con aplicación de temperatura

La extracción de fenoles totales en la muestra, se realizó por el método de Schoelfeld y col. 2000. Se pesó 5 gramos de muestra y se colocó en un matraz bola fondo plano con 20 ml de acetona al 70 por ciento, al mismo tiempo que se preparó otro matraz con 5 gramos de muestra y 20 ml de agua destilada . Ambas muestras refluaron por 14

horas a una temperatura de 60°C. Posteriormente cada muestra se colocó en un tubo de centrífuga para su separación a 2500 rpm. El sobrenadante obtenido fue utilizado en la valoración de fenoles totales.

Valoración de taninos condensados y taninos hidrolizables

La valoración de taninos condensados y taninos hidrolizables se realizó por el método de Folin Ciocalteu, descrito en el apartado anterior.

Cuantificación de taninos condensados y taninos hidrolizables

La cuantificación de taninos hidrolizables fue realizada a través de la preparación de una curva patrón de ácido gálico (SIGMA) a una concentración de 5 mM por el método de rodanina metanólica. se enumeraron 6 tubos del cero al cinco. Fueron añadidos 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ml de solución estándar de ácido gálico, enseguida 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 y 0.1 ml de buffer de citrato pH 5.0, posteriormente, cada tubo fue adicionado con 0.3 ml de rodanina metanólica al 0.67 por ciento, enseguida se mezclaron perfectamente, fueron incubados a una temperatura de 30°C por 5 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, a cada tubo se agregó con 0.2 ml de hidróxido de potasio 0.5 N, enseguida, éstos fueron agitados e incubados a una temperatura de 30°C por 10 minutos. Finalmente, se leyeron a 750 nm mediante un espectrofotómetro Spectronic 20 Genesys modelo LR 45227. La taninos condensados fueron cuantificados a través de la preparación de una curva patrón de catequina (SIGMA) a una concentración de 5 mM mediante el método de Folin Ciocalteu. Las absorbancias obtenidas fueron

analizadas por regresión lineal simple. La ecuación generada fue utilizada en la cuantificación de taninos condensados, mediante el siguiente lineamiento:

$$Y=ax+b$$

$$X=\frac{(y-b)}{a}$$

Donde

X= concentración de taninos condensados en gramos por litro (g/L)

Y = absorbancia

Etapa 2.

Utilización de *Aspergillus niger* Aa-20

Microorganismo utilizado

En todos los experimentos se usó la cepa de *Aspergillus niger* Aa-20 (Colección IRD-UAMI), caracterizada por producir específicamente tanasa, por tolerar amplios rangos de pH (de 3.5 a 8) y porque ésta no es considerada tóxica (Clasificada como GRAS por la FDA). (Romero-Gómez, 2001).



Figura 1.6. Cepa *Aspergillus niger* Aa-20

Medio de propagación

El medio de propagación de la cepa fue el agar papa dextrosa (PDA) distribuido y solidificado en matraces erlenmyer de 250 mL. El cual se inoculó con esporas de *A. niger* Aa-20 y se incubó por 5 días a 30°C.



Figura 1.7. Medio de Propagación Papa Dextrosa (PDA)

Medio de cultivo

El medio de cultivo para la producción de la enzima fue Czapek-dox como se ilustra en el presente cuadro.

Cuadro 1.3. Composición del medio Czapeck-Dox

Componente	(%)
NaNO ₃	0.25
KH ₂ PO ₄	0.10
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.1024
KCl	0.05
pH	5.5 pH

Propagación del inóculo

Se inocularon 30 ml de agar papa dextrosa (contenidos en matraces erlenmeyer de 250 mL) con 300 µl de *A. niger* Aa-20 y éstos se incubaron a 30°C por 5 días; las esporas producidas se cosecharon con una solución tween 80 al 0.01%, enseguida fueron añadidas 1 ml de éstas en un tubo de ensayo que contenía 19 ml agua destilada. Posteriormente, se homogenizó por un tiempo de 1 minuto, y finalmente fue añadida 1 gota de ésta solución en una cámara de Neubauer donde fueron considerados 13 cuadros de ésta (4 de la esquina y 9 del centro). Las esporas se contaron en la cuadrícula de glóbulos rojos en un microscopio Olympus modelo: CK2 ULWCD 0.30. El número de esporas presentes en 1 mL. de inóculo se calculó mediante la formula:

Ecuación 7.

$$\frac{\text{esporas}}{\text{ml}} = (\text{promedio de esporas en los 13 cuadros} \times 25 \text{ (total cuadros)} \times 1 \times 10^4 \times 20$$



Figura 1.8. Conteo de esporas de *A. niger* Aa-20.

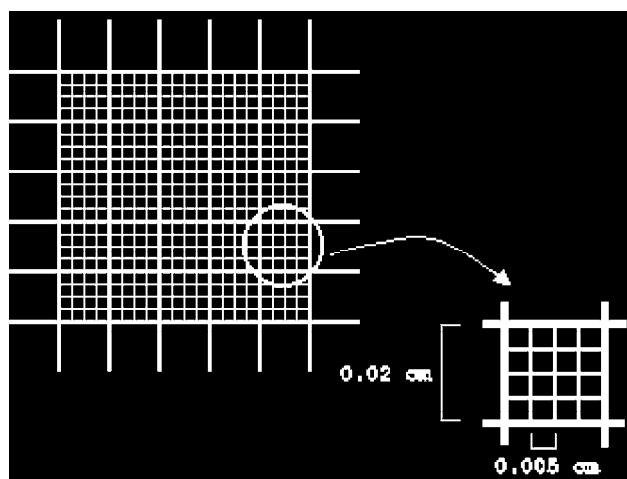


Figura 1.9. Acercamiento de la cámara Neubauer.

Etapa 3.

Sistemas de producción de enzima fúngica y acumulación de ácido gálico

Cultivo en medio líquido (CML)

Se utilizó concentraciones de 5, 10 y 20% de polvo hojásén a una humedad del 2% como soporte para la producción de enzima tanasa y acumulación de ácido gálico. Se emplearon como reactores 6 matraces erlenmyer de 250 ml de capacidad con repetición, con 50 ml de medio de cultivo Czapeck-Dox a cada uno ajustados a un pH de 5.5. Enseguida, estos fueron esterilizados en un autoclave modelo No. 25X a 15 psi por 15 minutos. Una vez fríos, bajo condiciones estériles, fueron inoculados con 12, 18 y 15 μL (5×10^6 esporas por ml) en las concentraciones de 5, 10 y 20% respectivamente. Finalmente, fueron incubados a una temperatura de 26°C por un periodo de 120 horas en un agitador multi-wrist shaker modelo 3569 con una agitación de 220 rpm.



Figura 1.10. Cultivo en medio líquido.

Cultivo en medio sólido (CMS)

Se usó concentraciones del 30, 40 y 50% de polvo hojásén a una humedad de 2% como soporte para la producción de tanasa fúngica y acumulación de ácido gálico. Se utilizaron 6 matraces erlenmeyer de 250 ml de capacidad con repetición, con 7 ml, 6 ml y 5 ml de medio Czapeck-Dox ajustados a un pH de 5.5 en las concentraciones de 30, 40 y 50% respectivamente. Enseguida éstos fueron esterilizados a 15 psi por 15 minutos en un autoclave modelo No. 25X. Una vez fríos, bajo condiciones estériles, fueron inoculados con 303, 420 y 518 μL (2×10^7 esporas por gramo de soporte) para las respectivas concentraciones. Finalmente se sometieron a una temperatura de 32°C por 120 horas en incubadora Napco modelo 322.



Figura 1.11. Cultivo en medio sólido. Obtención de extractos intracelular y extracelular en CML y CMS

El extracto crudo extracelular en CML se obtuvo directamente al filtrar la mezcla fermentada contenida en el matraz erlenmyer en papel Whatman No.41. El caldo de cultivo libre de células fue utilizado como extracto enzimático. El extracto crudo intracelular se obtuvo al lavar 3 veces los sólidos retenidos en el papel filtro con 30 ml de solución salina al 0.9%. Enseguida fue congelada por 24 horas, se maceró en un mortero de porcelana con una solución amortiguadora de acetatos 0.05 M pH 5.6. y finalmente fue centrifugada a 2000 rpm.



Figura 1.12. Obtención de extractos enzimáticos.

El extracto extracelular en CMS, fue obtenido al agregar 45 ml de agua destilada a la mezcla contenida en el matraz erlenmeyer, enseguida fue perfectamente mezclada y se filtró en papel filtro Whatman No. 41. El caldo libre de células fue utilizado como extracto enzimático. El extracto intracelular fue obtenida de la misma manera que en el CML

Métodos analíticos realizados en los cultivos en medio sólido y líquido

Evaluación del pH

La determinación de pH se realizó directamente de los extractos crudos extracelular e intracelular utilizando un potenciómetro CORNING Modelo 220.



Figura 1.13. Medición de pH en extractos enzimáticos.

Determinación de azúcares totales

Los azúcares totales se evaluaron por el método de Dubois (1956) a una longitud de onda de 480 nm, del extracto crudo obtenido al filtrar el material celular contenido en los matraces Erlenmeyer en papel Whatman No. 41. Las absorbancias obtenidas se utilizaron en la determinación de azúcares totales a través de la curva realizada para este propósito.

Determinación de fenoles totales

Los fenoles totales se evaluaron directamente del extracto crudo, empleando el método de Folin Ciocalteu a una longitud de onda de 750 nm y utilizando un espectrofotómetro Spectronic 20 Genesys modelo LR 45227. Las absorbancias obtenidas se sustituyeron en la curva de fenoles totales.



Figura 1.14. Determinación de azúcares y fenoles totales.

Ensayo de la actividad tanasa

El ensayo de la actividad tanasa se evaluó directamente de los extractos crudos intracelular y extracelular mediante el método de Sharma y col. (2000) en el cual se preparó una serie de 3 tubos, blanco, control y muestra. Se preincubó los sustratos A, B y C a 30°C por cinco minutos. Una vez realizado esto, se añadió 0.25 ml de A (metil galato 0.01 M en buffer de citratos 0.05 M a pH 5.0) a los tres tubos, posteriormente se adicionó 0.25 ml de buffer B (buffer de citratos pH 5.0) al blanco y 0.25 ml del extracto C (extracto enzimático) al tubo muestra.

Enseguida se incubaron los tubos por 5 minutos a 30°C, una vez transcurrido el tiempo se añadió 0.3 ml de rodanina metanólica (0.67%), se agitó, se agregó 0.2 ml de

KOH (0.5N) a cada tubo y se incubaron 30°C por 5 minutos. A continuación se añadió 0.25 ml del extracto C al tubo control seguido de 4 ml de agua destilada pH 7 a los tres tubos completando de esta manera un total de 5 ml.



Figura 1.15. Ensayo de la actividad tanasa.

Las muestras fueron leídas a una longitud de onda de 520 nm. Las absorbancias obtenidas se corrigieron mediante la expresión:

Absorbancia (Abs) corregida = (Abs muestra- Abs Blanco)- (Abs control –Abs blanco)

Posteriormente se transformó a gramos por litro mediante la curva patrón de ácido gálico realizada por el método de rodanina metanólica. Finalmente la conversión de g/L de ácido gálico a actividad tanasa se realizó mediante la formula

Ecuación 8.

$$\frac{x \text{ g ac. gálico ext}}{L \text{ mezcla}} = \left[\frac{1 L \text{ mezcla}}{1000 \text{ ml mezcla}} \times \frac{5 \text{ ml mezcla}}{0.25 \text{ ml extracto}} \times \frac{1 \text{ mola galico}}{170.1 \text{ g a galico}} \times \frac{10^3 \mu \text{ mol}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1}{25 \text{ min}} \times \frac{1000 \text{ ml ext}}{1 L \text{ ext}} \right]$$

$$\frac{x \text{ g ac. galico extracto}}{L \text{ mezcla}} \times 4.7$$

Donde:

4.7 factor de la multiplicación de la ecuación 8.

170.1 g peso de 1 mol de ácido gálico.

25 min= tiempo total que dura el ensayo tanasa.

La actividad tanasa fue definida como la cantidad de enzima requerida para hidrolizar 1 μ mol de éster en 1 minuto.

Determinación de ácido gálico acumulado

El ácido gálico acumulado fue determinado por las absorbancias obtenidas en el control del ensayo tanasa, las cuales fueron inicialmente cuantificadas en g/L de ácido gálico y posteriormente se aplicó el siguiente criterio:

Ecuación 9.

Galico acumulado g/L=Gálico acumulado en el control en g/L x 20

Donde: 20 producto de la división de $\left(\frac{0.005 L \text{ mezcla total ensayo tanasa}}{0.00025 L \text{ control}} \right)$

Determinación de las velocidades de consumo de sustrato y producción enzimática en CML y CMS

Las velocidades de consumo de sustrato como azúcares y fenoles totales y la velocidad de producción de enzima tanasa, fueron tomadas de la actividad tanasa a las 48 y 96 horas de cultivo en CML y en CMS. Los datos fueron procesados mediante regresión lineal simple y los valores de consumo de sustrato y actividad tanasa fue obtenido del valor “a” de la expresión:

$$Y=ax+b$$

Evaluación del consumo de azúcares y fenoles totales y la actividad tanasa total en CML y CMS

La Evaluación de porcentaje de azúcares fue evaluada mediante la diferencias entre la concentración inicial en g/l de azúcares totales en el cultivo y la concentración de azúcares a las 48 horas. Enseguida, el resultado obtenido se transformó en gramos de azucars totales mediante la expresión:

Ecuación 10.

$$\text{Gramos de azúcares totales consumidos a las 48 horas} = \frac{\text{dif Conc}}{l} \times (0.05L)$$

Donde 0.05 L= 50 ml de medio Czapek Dox

Una vez calculados se estableció el porcentaje consumido a las 48 horas de cultivo, esto a través de los gramos de soporte utilizados en cada tratamiento en CML 5% (2.631 g), 10% (5.555g) y 20% (10.5g) mediante una regla de tres simple:

Gramos de soporte utilizados----- 100%

Gramos de azucars totales consumidos a las 48 horas----- “X”

X= porcentaje de azúcares consumidos a las 48 horas

De igual manera se realizó en el consumo de los fenoles totales en CML, y azúcares y fenoles totales en CMS, siendo en éste último las siguientes consideraciones: CMS 30% (3 g de hojaseén y 7 ml de medio Czpek Dox = 0.007L); 40% (4 g de hojaseén y 6 ml de medio Czapek Dox=0.006L) y 50% (5 g de hojaseén y 5 ml de medio Czapek Dox=0.005L).

La actividad tanasa total se determinó mediante la suma de la actividad intracelular más las actividad extracelular a las 48 horas en CML, y en CMS se determinó a través de la actividad extracelular a las 96 horas más la actividad intracelular a este tiempo, considerando que estos valores fueron los mayores alcanzados en el cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Caracterización físicas y químicas del hojásén

En el cuadro 1.4 se presentan los valores promedios de la caracterización físico – química del hojásén.

Cuadro 1.4. Caracterización físico –química de hojásén (*Flouensia cernua D.C.*)

Determinación	%
Materia seca total	96.91
Humedad	3.08
Cenizas	11.2
Proteína	17.64
Fibra	8.44
Azucares totales	3.57
Azucares reductores	3.17
Grasa	8.29
.pH	6.64
Fenoles totales (Método Folin ciocalteu)	
Extracción en agua sin aplicación de temperatura	0.054
<i>Extracción con aplicación de temperatura</i>	
Extracción en Agua relación 1:4 peso/volumen	0.48
Extracción en Acetona al 70% relación 1:4 peso/volumen	8.41
Fenoles totales	8.89

Se puede observar que el porcentaje de proteína, grasa, fibra y de minerales es relativamente elevado, lo que representa una fuente atractiva para la alimentación animal. Sin embargo el alto contenido de fenoles (8.8%), limita la utilización de este material, ya que este tipo de compuestos son factores antinutricionales, que afectan la disponibilidad del nitrógeno durante el proceso de metabolismo, debido al acomplejamiento de las proteínas.

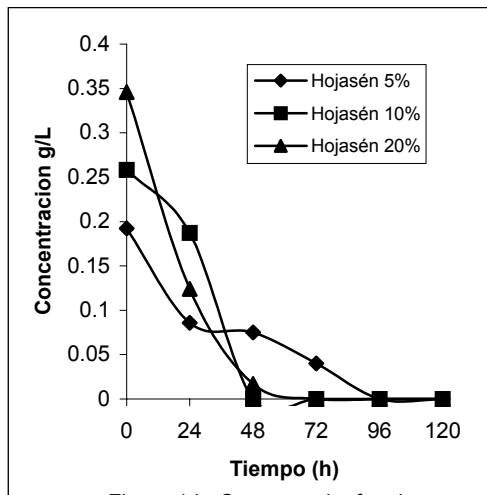
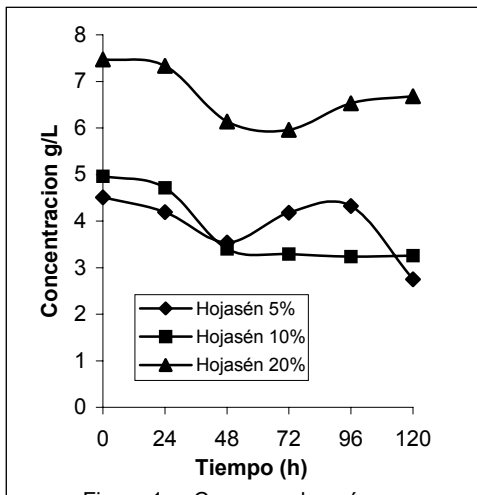
Los estudios realizados en ésta planta muestran que contiene un aceite esencial en la proporción de 0.864%, un glucósido de un 0.33% y una resina (Vines, 1960; Beltrán, 1964); de los cuales, los componentes encontrados en el aceite fueron betaudesmol (24.5%), alfa-eudesmol (6.9%), Limoneno (6.6%), gamma-eudesmol (4.6%), mirceno (3.6%), borneol (3.3%) y delta-3-careno (3%).

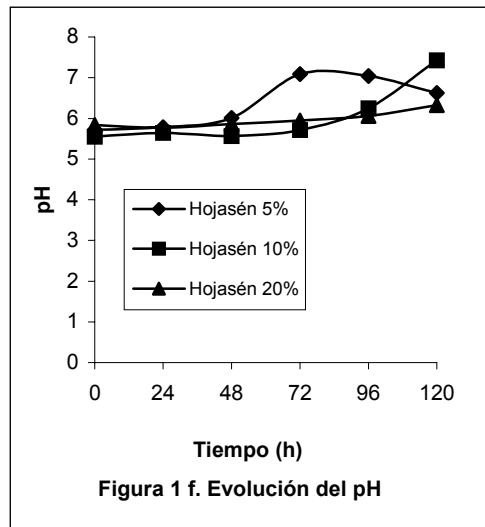
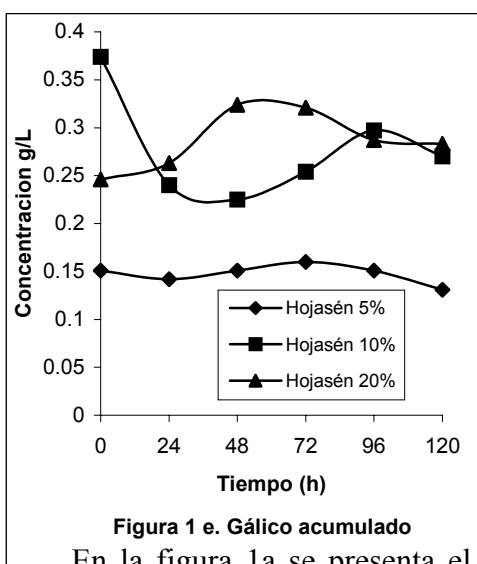
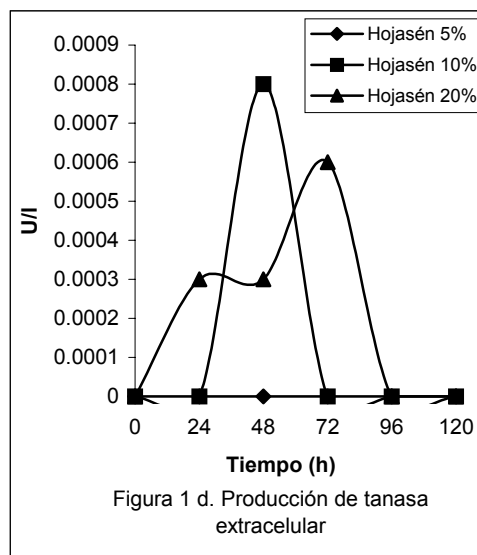
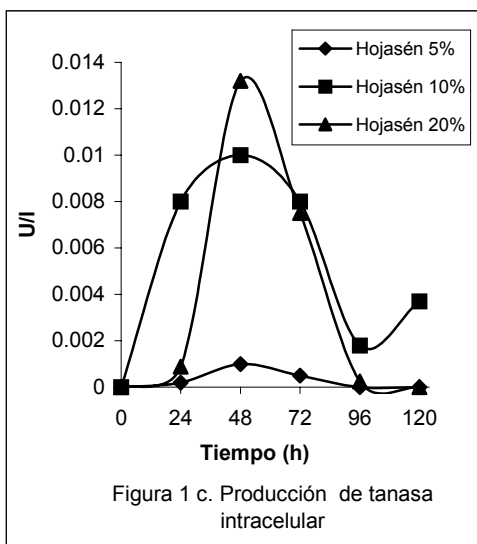
La extracción en etanol de hojas intactas se encontró flourensadiol (44.6%), alcohol artemisia (5.5%), viridiflorol (2.7%) y bomeol (2%), los cuales fueron compuestos responsables en el tratamiento contra la indigestión. (Téllez y col., 1997).

Jones y Earle, (1966) indican que las semillas contiene un 16.2% de proteína, 6.6% de aceite y presencia de taninos. Por otro lado Wall y col., (1961), encontraron una escasa cantidad de alcaloides en hojas, ramas y flores. Sobre estos aspectos no existe información en relación a la caracterización físicoquímica en hojas. Este es el primer trabajo que reporta los resultados de una caracterización proximal mas amplia de las hojas.

Cinéticas de consumo de sustrato, producción de enzima y acumulación de ácido gálico en CML

En las figuras 1a-1f se presentan los resultados obtenidos en cultivo en medio líquido.





En la figura 1a se presenta el consumo de azúcares totales por *A. niger* Aa-20. Se puede observar que las tendencias de consumo se aprecian de una mejor manera a las 48 horas de cultivo en los 3 tratamientos. El mayor observado corresponde al tratamiento de 10% el cual muestra un consumo de 30.7% de azúcares totales, seguido por el tratamiento de 5% que muestra el 21.5% de degradación. La menor degradación se presenta en el

tratamiento de 10% que muestra el 17.8%. De acuerdo con el análisis físico-químico de hojásén del total de los azúcares, el 88.7% son azúcares reductores, esto indica que son azúcares simples de fácil degradación por *A. niger* Aa-20, y es la fuente inicialmente utilizable por el hongo.

Con base a lo anterior, se esperaría que éstos se consumieran rápidamente hacia las horas finales de cultivo. Sin embargo, este comportamiento se observa en el consumo de los fenoles totales (figura 1b). Lo anterior aplica en los 3 tratamientos, siendo el mayor observado en el tratamiento de 10% con el consumo total y el tratamiento de 20% el cual muestra el 95% de consumo. La menor degradación se muestra en el tratamiento de 5% con una degradación de 36.8% de fenoles totales.

Esto parece indicar que los fenoles totales es la fuente más factible para el hongo en su entorno dado que los consume significativamente. Hoseein y Maldonado (1982) indican que el hojásén tiene propiedades funguicidas, ya que demostró que concentraciones de 1000 ppm (1g/L) de soluciones de hojas de hojásén controlaron el 100% de especies como *Rhizoctonia solana*, *Pytium sp.* y *Fusarium oxysporum*. No obstante, *A. niger* Aa-20 fue capaz de degradar y crecer sobre infusiones de hojásén.

En la figura 1c se muestra los valores de la producción de tanasa intracelular. Se puede observar que la más alta producción se presenta a las 48 horas de cultivo en los 3 tratamientos de hojásén. Siendo el mayor el tratamiento de 20% que muestra una actividad de 0.013 U/L, seguido del tratamiento de 10% (0.01 U/L) y el tratamiento de 5% presenta 13 veces menos con respecto al tratamiento de 10%. Estos resultados coinciden con los estudios realizados por Banerjee y col., (2000) quienes utilizaron polvo de *Caesalpinia*

digyna (comúnmente llamado gilo basado en un 58% de taninos) como soporte para la producción de enzima la cual generó 0.0098 U/l a las 48 horas.

En la figura 1d se presenta la producción de tanasa extracelular donde se pueden observar valores inferiores con relación a la producción de tanasa intracelular. La mayor producción se observa en el tratamiento 10% con 0.0008U/l. Seguido del tratamiento de 20% que presenta 0.0006U/l. El tratamiento de 5% presenta una producción poco significativa. Estos resultados no coinciden con los reportados por Lekha y Lonsane (1994) que indicaron que la producción de tanasa en CML se expresa exclusivamente de forma intracelular a las 48 horas de cultivo.

La mayor producción intracelular con respecto a producción extracelular, probablemente se debe a la forma de crecimiento de *A. niger* Aa-20. De acuerdo con Solomons (1975) indica que el crecimiento de *A. niger* en CML, se presenta en forma de pellets ya que es una respuesta a procesos de agitación y está regulada por la agregación de esporas, los tubos germinativos y la baja concentración de oxígeno, al respecto esto se apoya con los estudios realizados por Romero-Gómez (2001), quien menciona que la mayor producción intracelular se favorece a la forma de crecimiento del hongo donde la enzima queda atrapada en el interior del pellet dando como resultado una menor liberación al medio de cultivo.

En la figura 1e se presenta el ácido gálico acumulado. Se puede observar que la acumulación de ácido gálico se incrementa al aumentar el porcentaje de hojaseén, siendo el tratamiento de 20% quien muestra el mayor índice con 0.32 g/l a las 48 horas, seguido del tratamiento de 10% (0.27 g/l) a las 96 horas. La menor acumulación se presenta en el tratamiento de 5% con 0.16 g/l de ácido gálico a las 72 horas. Lo anterior explica que a medida que se incrementa el hojaseén, aumenta el contenido de fenoles, hay mayor hidrólisis de éstos por la enzima tanasa y por consiguiente la correspondiente acumulación.

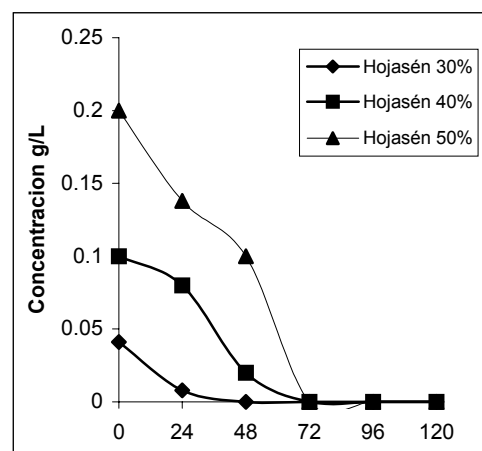
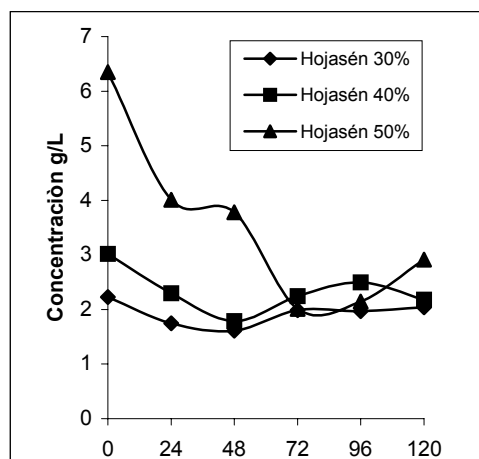
En la figura 1f se muestra la evolución del pH extracelular, donde se puede observar que los 3 tratamientos se mantienen estables a las 48 horas de cultivo. El tratamiento de 20% presenta la mejor estabilidad a lo largo del periodo de incubación. Los tratamientos de 5 y 10% muestran incrementos importantes que van de pH 5.5 a 7.43 y 7.04.

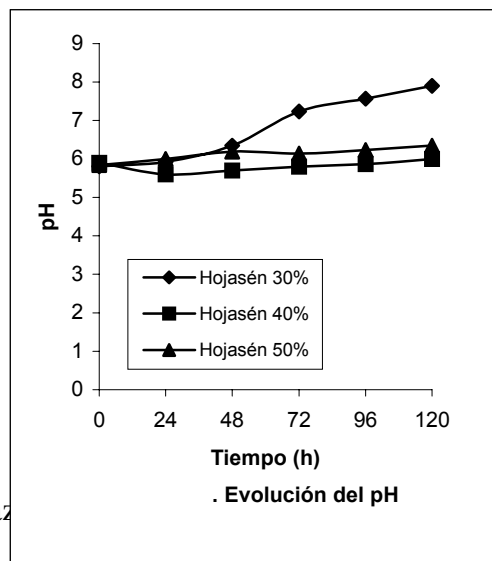
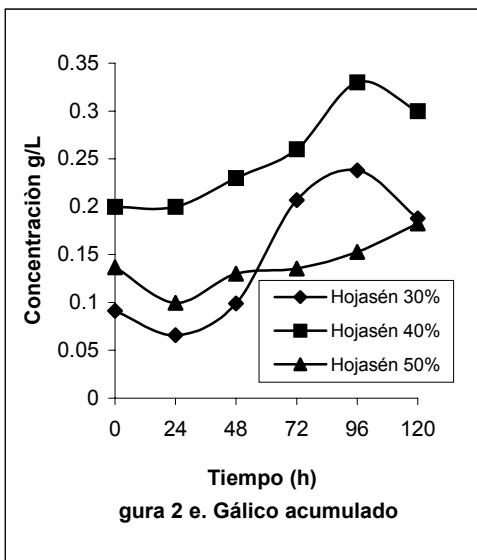
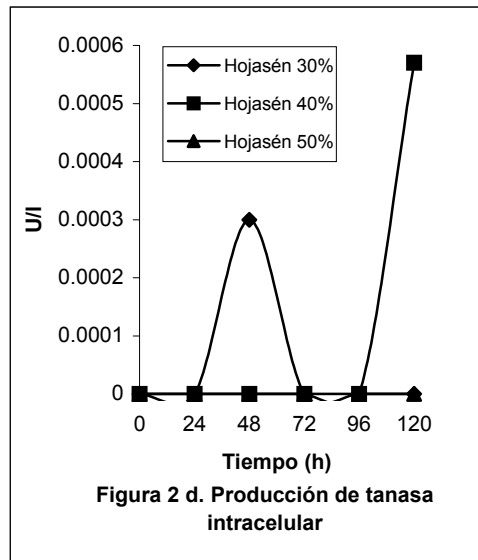
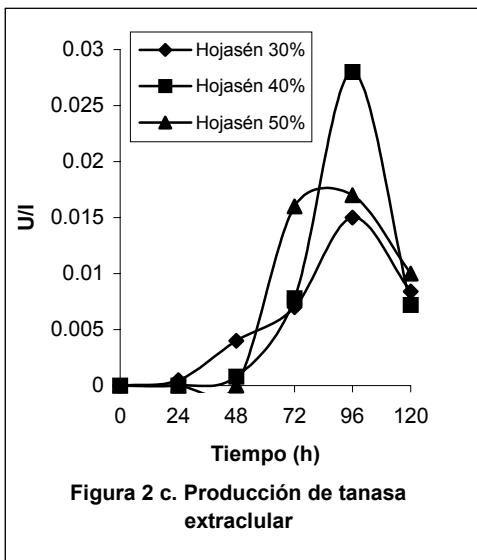
En relación esto, la acumulación de ácido gálico en el medio se esperaría que disminuyera el pH. Sin embargo esto no ocurre, probablemente se debe actividades proteolíticas en el medio, tales como proteasas alcalinas que incrementaron el pH. Esto se apoya con investigaciones realizadas por Domínguez-Luna y col., 2002, quienes reportan que las tendencias en incrementos a pH en CML se deben a la acción de aminoácidos básicos, producto de proteasas alcalinas.

Por otro lado, en relación a los títulos de actividad enzimática alcanzados, es probable que el alto contenido de minerales presentes en el soporte (11.2%), produjeran procesos de inactivación enzimática ya que la actividad tanasa es inhibida por Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} , sulfato de magnesio y cloruros de calcio y sodio (Yamada y col., 1968; Adachi y col., 1971; Barthomeuf y col., 1972; Chae y col., 1983; Rajakumar y Nandy, 1983; Aoki y col., 1976).

Cinéticas de consumo de sustrato, producción de enzima y acumulación de ácido gálico en CMS

En las figuras 2a-2F se presentan los resultados obtenidos en CMS.





que los 3 tratamientos presentan la degradación de los azúcares en forma más clara a las 48 horas de cultivo, siendo el mayor observado en el tratamiento al 50% con una degradación de 68.3%, en contraste con el tratamiento del 40% que muestra el 40.8% de

degradación. El tratamiento de 30% presenta el menor consumo con una degradación 36% de azúcares totales. Se puede apreciar claramente que existen tendencias de consumo importantes durante la fase media de cultivo, probablemente estos resultados se debe al hecho de que las condiciones de crecimiento para *A. niger* Aa-20 en medio sólido son similares al habitat natural en que se desarrolla y por tanto, se puede relacionar a la utilización satisfactoria de dichos nutrientes. Sin embargo, las tendencias de consumo por *A. niger* implica que los azúcares totales, tenderían a utilizarse rápidamente como fuente de carbono para su crecimiento, ya que la mayor parte de ellos son azúcares simples, y son la fuente inicial y fácilmente degradada por el hongo.

Probablemente, estos resultados se deben a factores físico-químicos tales como la difusión de nutrientes sobre el soporte, la adherencia de las células sobre este que influyen notablemente en la utilización de los sustratos por el hongo (Ramesh y Lonsane, 1991). Esto implica que la matriz porosa del soporte, posea partículas pequeñas y granulosas que no tiendan a unirse unas con otras, que esté libre de contaminantes y de inhibidores de crecimiento de microorganismos y deba ser capaz de permitir fácilmente el paso de oxígeno con otros gases y aerosoles (Raimbault, 1988).

En la figura 2b, se muestra el consumo de fenoles totales por *A. niger* Aa-20. Se puede observar que a partir de las 24 y 48 horas se presenta consumos importantes en 3 los tratamientos de hojaseñ. El mayor índice corresponde al tratamiento de 30% con el consumo total por el hongo, seguido del tratamiento de 40% que muestra el 80% de degradación. El menor consumo se presenta en el tratamiento de 50% que muestra el 50% de degradación de los mismos. Del total de los fenoles, el 94.4% son taninos de tipo condensado; de acuerdo con los resultados obtenidos en la presente investigación, se

observa que fueron consumidos significativamente, esto demuestra la capacidad de *A. niger* Aa-20 de crecer sobre hojásén.

No obstante, es importante mencionar que hasta el momento no se han realizados ensayos que involucren la degradación específica de taninos condensados en CMS. Los reportes de biodegradación de taninos condensados son muy escasos y los existentes solo se refieren a la actividad fúngica en CML (Chandra y col. 1973).

De los pocos estudios de biodegradación de taninos condensados sobre este cultivo, se encuentra el reportado por Deschamps (1983) quien indicó que numerosas cepas de levaduras aisladas del suelo degradan los taninos condensados del “quebracho” y estudios realizados en bacterias aisladas del rumen de cabras caracterizada como *Selenomonas Ruminantium*, quien fue capaz de degradar el 3% de taninos condensados en CML (Skene y Brooker 1995). Esta observación abre un campo de gran interés que ha sido poco estudiado.

En la figura 2c se presenta la producción de tanasa extracelular en CMS. Se puede observar que la máxima actividad tanasa se alcanza a las 96 horas en los 3 tratamientos. La mayor producción corresponde al tratamiento de 40% con una actividad de 0.025 U/l., seguido del tratamiento de 50% que muestra una producción de 0.017 U/l. La menor actividad se observa en el tratamiento de 30% que muestra una actividad de 0.015 U/l.

Estos resultados no coinciden con los observados por Banerjee. y col., (2000) quienes reportaron una producción de 0.017 U/l a las 72 horas utilizando polvo de *Caesalpynia Digyna* (gilo). Probablemente, este comportamiento se debe a la secreción de sustancias tóxicas como ácido catéquico, ácido 2,6 dihidroxibenzoico y pirogaloil, que causan lisis

celular producto de la hidrólisis de taninos hidrolizables. Lo anterior se apoya con estudios realizados por Ibuchi y col., 1972 quien menciona que los compuestos intermediarios de la hidrólisis de éstos por la acción de la enzima tanasa son 1,2,3,4,6-pentagalaoil –glucosa, 2,3,4,6-tetragalaoil-glucosa y metil galato que causan efectos en la actividad tanasa, esto por inhibición al sitio activo de la enzima. Esto no coincide con lo reportado por Bajpai y Patil, 1997; quienes mencionan que estos compuestos , en especial el pentagalaoil –glucosa es uno de los inductores de mayor efecto.

En la figura 2d se presenta la producción tanasa intracelular en CMS, donde se puede observar, que el tratamiento de 30% presenta la mayor actividad tanasa a las 48 horas de cultivo con una producción de 0.003 U/l. Los tratamientos de 40 y 50% muestran una actividad poco significativa. En relación a la producción de tanasa extracelular, se observa que ésta es evidente con respecto a la tanasa intracelular, lo anterior sugiere que la forma de crecimiento de *A. niger* Aa-20 en CMS permite producir productos enzimáticos más concentrados, ya que según Raimbault (1988), indica que en este sistema de cultivo, el hongo se desarrolla en una combinación de crecimiento apical con la generación de nuevas hifas apicales y ramificaciones de las mismas, esto da la posibilidad de penetrar en el interior de la matriz sólida y secretar enzimas hidrolíticas por las puntas liberándola libremente al medio externo, y por tanto, concentrándola en este, en contraste, con los resultados obtenidos en CML, la tanasa se produce mayoritariamente intracelular, donde las enzimas se mantienen en el interior del pellet.

En la figura 2e se presenta la acumulación de ácido gálico en CMS, donde se puede observar que la mayor acumulación se alcanza después de

las 72 horas en los 3 tratamientos, siendo el mayor observado en el tratamiento de 40% que muestra una acumulación de 0.33 g/L a las 96 horas, seguido del tratamiento de 30% el cual muestra 0.23 g/L de ácido gálico a este mismo tiempo. La menor acumulación se presenta en el tratamiento de 50% que muestra 0.18 g/L a las 120 horas de cultivo.

Este comportamiento supone que mientras se incrementa la concentración de hojasén, aumenta el contenido de fenoles totales, por tanto, aumentaría la hidrólisis de éstos por la tanasa y se esperaría un mayor índice de acumulación en el tratamiento de 50%. Sin embargo, este resultado no fue el esperado, probablemente este comportamiento se debe a la heterogeneidad estructural del soporte y las condiciones estáticas de cultivo, ya que los hongos en este sistema, degradan los compuestos disponibles más inmediatos lo que puede representar que los fenoles se encuentren distribuidos en una determinada zona y por consiguiente no sean utilizados dentro del entorno donde se desarrollan.

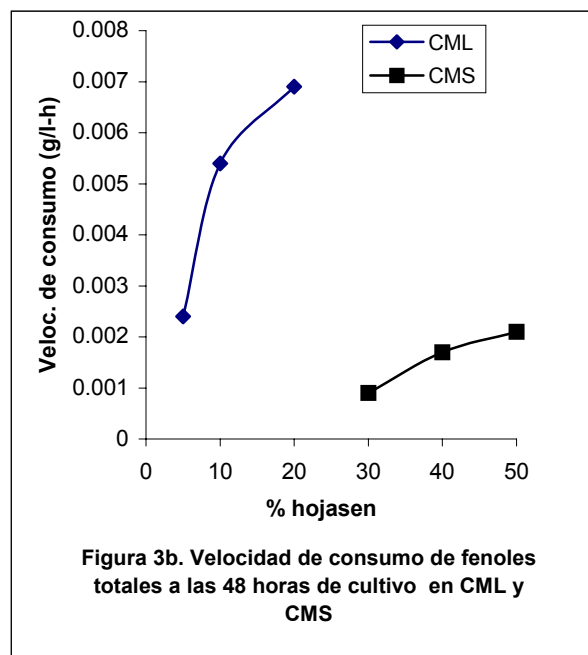
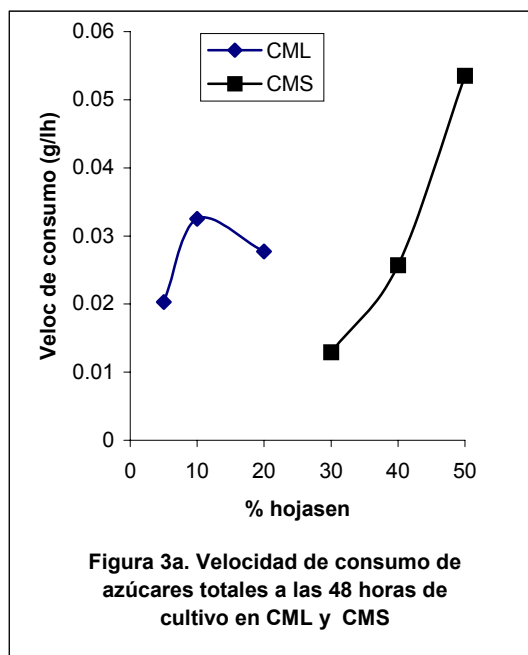
En la figura 2f se presenta la evolución del pH. Se puede observar que éste mostró tendencias a pHs alcalinos en la concentración de 30% con un valor de 7.9. En las concentraciones de 40 y 50% se incrementa en intervalos pequeños hasta alcanzar los máximos de 5.88 y 6.35 respectivamente. Estos últimos comportamientos concuerdan con los estudios reportados por Banerjee y col., (2000) quienes obtienen que el rango de pH para la producción de enzima tanasa es de 3.0-6.5 en CMS.

Sin embargo, el incremento de éste en el tratamiento de 30% sugiere la producción de proteasas de tipo alcalino las cuales incrementaron el pH. Esto se apoya con investigaciones realizadas por Domínguez de Luna y col., 2002, en la producción de proteasas bacterianas por *Streptomyces sp.* quienes reportan que el CMS produce cantidades importantes de proteasas,

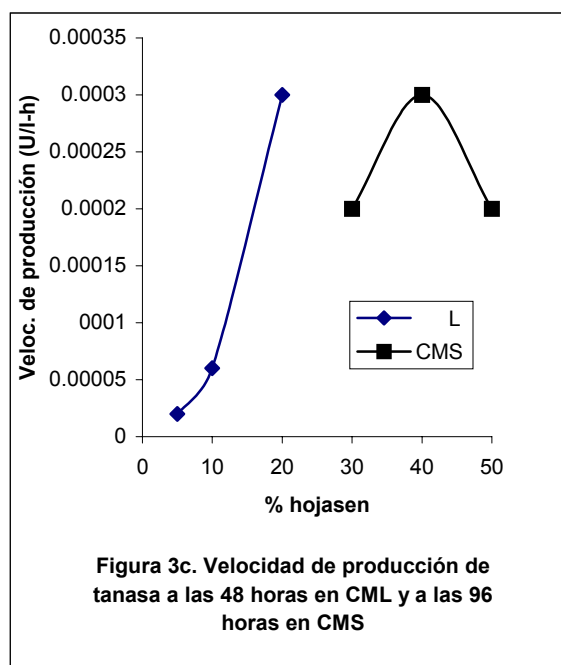
debido a la presencia de proteína en el medio, lo que sugiere en el presente estudio, que éstas fueron inducidas por la proteína del hojásén.

Velocidades de consumo de azúcares y fenoles totales y producción enzimática en CML y CMS

En las figuras 3a, 3b y 3c , se presentan las velocidades de consumo de azúcares totales, fenoles totales y producción de enzima tanasa en CML y CMS respectivamente.



En la figura 3a se presenta la velocidad de consumo de azúcares totales a las 48 horas de cultivo en CML y CMS. Se puede observar, que medida que aumenta el porcentaje de hojásén, se incrementa el consumo de azúcares totales en los 3 tratamientos en CMS, siendo el mayor observado en el tratamiento de 50% quien presenta 0.05 g/l-h. Seguido del tratamiento de 40% (0.025g/l-h). La menor velocidad se muestra en el tratamiento de 30% con un consumo de 0.012 g/l-h de azúcares totales.



En relación al CML, esto ocurre sólo en los 2 primeros tratamientos y se muestra que las velocidades son inferiores al CMS. El tratamiento de 10% presenta la velocidad de consumo más elevada (0.032 g/l-h). Seguido del tratamiento de 20% quien presenta una velocidad de consumo de 0.027 g/l-h. La menor velocidad se muestra en el tratamiento de 5% con un índice de 0.02 g/l-h. El mayor consumo de azúcares totales en CMS, en contraste, con el CML, probablemente se deben, a que en este tipo de cultivo, las condiciones estáticas permiten a los hongos degradar los compuestos disponibles más inmediatos, a diferencia del CML, donde la agitación le permite la posibilidad de consumir otros nutrientes en su entorno.

Esta observación se apoya con los estudios realizados por Aguilar y col., 2001, quienes mencionan que el CMS favorece la formación de microgradientes de concentración, debido al crecimiento en forma de hifas como respuesta a las condiciones estáticas, facilitando el consumo de nutrientes, en comparación con el CML, donde no hay formación de estas zonas debido a la agitación inherente.

En la figura 3b, se muestra las velocidades de consumo de fenoles totales en CML y en CMS a las 48 horas de cultivo. Se puede observar que las tasas de consumo más elevadas se presentan en CML, siendo el tratamiento de 20% quien muestra la mayor velocidad con 0.007 g/l-h, seguido del tratamiento de 10% (0.005g/l-h). EL menor consumo corresponde al tratamiento de 5% con una velocidad de 0.002 g/l-h. En CMS, se presenta un comportamiento similar donde el mayor índice corresponde al tratamiento de 50%, seguido del tratamiento de 40% quien presenta una velocidad de 0.0017 g/l-h y el tratamiento de 30% se observa una velocidad de consumo de 0.0009 g/l-h. En ambos sistemas de cultivo, se observa que al incrementar el porcentaje de hojaseñ se incrementa la velocidad de consumo, esto debido a que el contenido de fenoles aumenta y existe una mayor concentración de éstos para su consumo por el hongo. Sin embargo, las diferencias de consumo en CML en relación al CMS, probablemente se deben a las condiciones de cada cultivo, como sucede con el consumo de azúcares totales.

Por otro lado, se puede constatar que las velocidades de consumo de azúcares totales de ambos cultivos es mayor que la velocidad de consumo de fenoles totales. Este comportamiento era el esperado ya que del total de los azúcares, el 88.7% son azúcares reductores para consumo inmediato del hongo.

La figura 3c se presentan la producción de enzima tanasa intracelular y extracelular a las 48 y 96 horas de cultivo respectivamente en CML y CMS. Se puede apreciar que el CML, a medida

que el porcentaje de hojasén incrementa, aumenta la velocidad de producción enzimática, siendo el mayor observado el 10% con una velocidad de 0.003U/l-h, seguido del tratamiento de 10% (0.0006 U/l-h), la menor velocidad se presenta en el tratamiento de 5% con 0.00002 U/l-h. En CMS se observa un efecto similar, sin embargo, sólo el tratamiento de 40% presenta la máxima velocidad con una producción de 0.003 U/l-h. Los tratamientos de 5 y 20% muestran velocidades iguales (0.002 U/l-h).

Las velocidades de consumo de sustrato en la velocidad de producción de tanasa en CML y CMS, parecen indicar que existe una relación importante entre la cantidad de nutrientes y la producción de enzima ya que se observa que al incrementar el hojasén aumenta la velocidad de producción, esto debido a que se incrementa el contenido de nutrientes. Los azúcares totales son utilizados durante la fase de crecimiento, de tal manera que los fenoles se reservan para la síntesis enzimática. Se puede considerar de esta manera, que el CML, en función del tiempo es más adecuado en la producción de enzima, ya que a las 48 horas de cultivo, las velocidades de producción se alcanzan a las 96 horas en CMS.

Evaluación de consumo de azúcares y fenoles totales, producción de tanasa total y ácido gálico máximo en CML y CMS

En la figuras 4a, 4b, 4c y 4d se presentan el porcentaje de azucares totales y fenoles totales consumidos a las 48 horas de cultivo, la producción de tanasa total y el ácido gálico máximo acumulado en CML y CMS respectivamente.

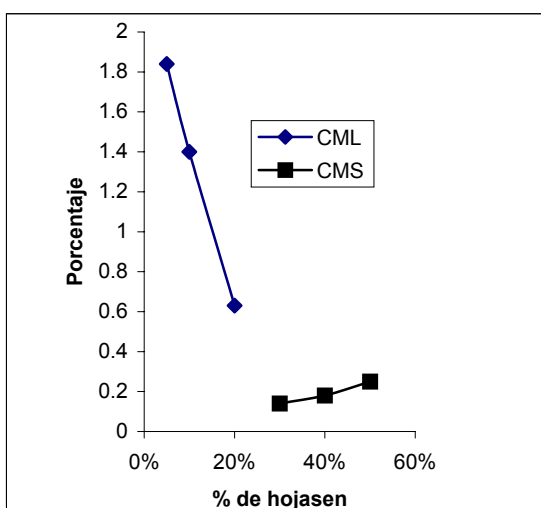


Figura 4a. Porcentaje de azúcares

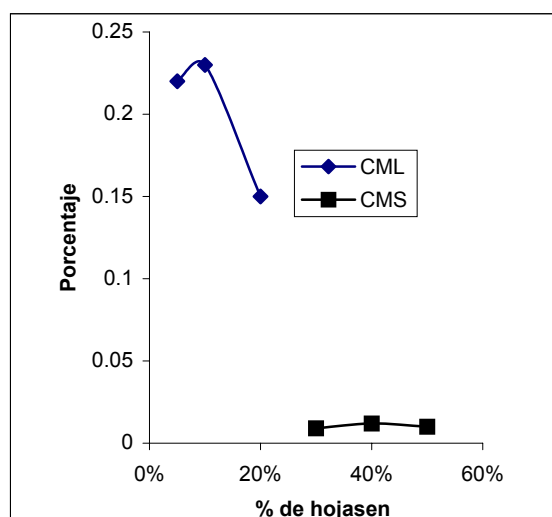


Figura 4b. Porcentaje de degradación de fenoles totales a las 48 horas en CML y

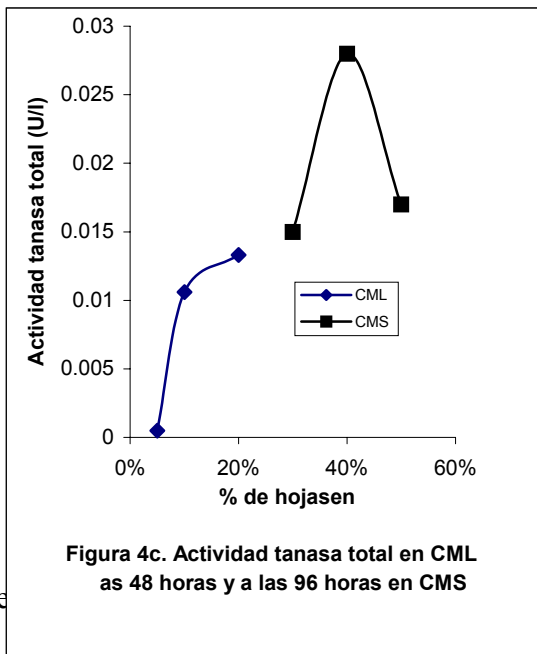
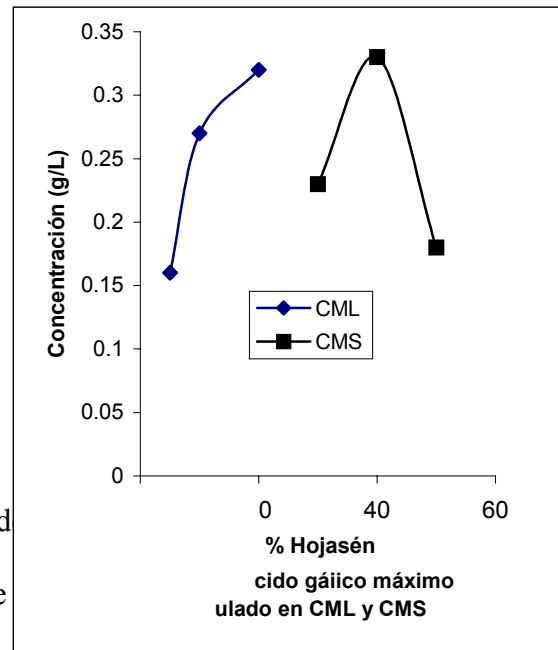


Figura 4c. Actividad tanasa total en CML as 48 horas y a las 96 horas en CMS



Concentración máxima
ulada en CML y CMS

porcentaje de hojaseñ en CML, disminuye el porcentaje de consumo de azúcares totales.

EL tratamiento de 5% presenta un porcentaje de degradación 1.8%, seguido del tratamiento de 10% que muestra el 1.4%. El menor porcentaje se observa en el tratamiento de 20% que presenta el 0.63% de degradación. Esto indica que el bajo contenido de azúcares totales en el tratamiento de 5% permite un determinado consumo de los mismos ya que se puede observar que a medida que incrementa el contenido de éstos el porcentaje de consumo decrece. Este comportamiento sugiere que la tasa metabólica de *Aspergillus niger Aa-20* permanece de forma invariable ya que sólo puede consumir una determinada cantidad de éstos, aún cuando se incremente la cantidad de los azúcares totales.

En CMS, presenta un efecto distinto. Se puede apreciar a medida que se incrementa el porcentaje de hojaseñ aumenta el porcentaje de consumo. El tratamiento 50% presenta el

mayor porcentaje de degradación con 0.25%, seguido del tratamiento de 40% (0.18%). El menor porcentaje se observa en el tratamiento de 30% que muestra un porcentaje de consumo de 0.14%. Esto indica que las características de consumo de azúcares totales en CMS es distinto que en CML, ya que en este último se observan porcentajes de consumo más altos. Este comportamiento, probablemente se debe a la solubilización de los azúcares que permiten utilizarlos de manera implícita por el hongo.

En la figura 4b, se presenta el porcentaje de degradación de los fenoles totales a la 48 horas de cultivo en CML y CMS, donde se puede observar un comportamiento en forma de campana. El mayor porcentaje de degradación se presenta en el tratamiento de 10%, con un consumo de 0.23%, seguido del tratamiento de 5% quien muestra un 0.22% de degradación a las 48 horas. La menor degradación se presenta en el tratamiento de 20% con una degradación de 0.15%. Un efecto similar ocurre en CMS, donde se aprecia que el tratamiento de 40% degrada el 0.012% de fenoles totales, y los tratamientos de 30 y 50% muestran porcentajes de degradación de 0.009 y 0.01%, lo que sugiere que la tasa metabólica por *A. niger* permanece de forma invariable, ya que el hongo solo puede degradar cierta cantidad de éstos, aunque la presencia en el contenido de fenoles totales aumente.

En relación a lo anterior, del total de los azúcares, el 88.7% son azúcares simples que son la fuente de relativa facilidad de hidrólisis por *A. niger* Aa-20. Se observa que el tratamiento de 5% en CML degrada 8 veces más azúcares totales que fenoles totales en el tratamiento de 10% y este degrada 6 veces más que el tratamiento de 20%, en contraste con el CMS, en el cual el tratamiento de 30 y 40% consumen 15 veces más que los fenoles y el tratamiento de 50% presenta 25 veces más. Este comportamiento era el esperado ya que los azúcares se encuentran en menor porcentaje y dada la facilidad con que pueden ser consumidos, realmente se comprueba este aspecto.

En ambos casos, el CMS y CML presentan un comportamiento de consumo de azúcares totales mayor que los fenoles totales, sólo que éste último representa un porcentaje mayor de degradación. Probablemente, este comportamiento se debe a que el CML favorece la solubilidad de nutrientes y la homogenización de los mismos, facilitando de esta manera la disponibilidad por el hongo. El CMS, es un medio heterogéneo ya que no existe agitación que permita mantener una mezcla homogénea y el hongo consume éstos de acuerdo a su disponibilidad inmediata en su entorno.

En la figura 4c se presenta la producción total de tanasa en CML y CMS a las 48 y 96 horas respectivamente. Se puede observar que al incrementar la concentración de hojásén se obtiene una mayor producción en CML. El tratamiento de 20% presenta la mayor producción con 0.0132 U/l, seguido del tratamiento de 10% quien muestra una producción de 0.001 U/l. La menor producción corresponde al tratamiento de 5 % con una actividad 0.0008 U/l. Un efecto similar ocurre en CMS, donde los tratamientos de 30 y 40% presentan un incremento en la producción total (0.015 y 0.028 U/l) respectivamente. Posteriormente se observa que en el tratamiento de 50% disminuye la actividad total en un 60% con respecto al tratamiento de 40%. Estos resultados indican que el CMS favorece la expresión de la enzima en altos títulos en tiempos largos que en CML, esto no coincide con los estudios realizados por Solis-Pereira y col., 1993 y Lekha y Lonsane, 1994, quienes mencionan que la productividad de los cultivos por medio sólido produjeron títulos enzimáticos más altos en menor tiempo que el CML.

La acumulación de ácido gálico en CML y CMS en la presente investigación, se alcanzó en diferentes tiempos, por lo que es muy difícil hacer una comparación entre los mismos. Sin embargo, en la Figura 4d, se aprecia el patrón de acumulación máxima de ácido gálico, la cual permite establecer diferencias entre los sistemas de cultivo evaluados. Se puede observar que al incrementar el porcentaje de hojásén aumenta el índice de acumulación de ácido gálico en CML, siendo el tratamiento de 20% el mayor valor observado (0.32 g/l), seguido del tratamiento de 10% el cual muestra una acumulación de 0.27 g/l, mientras que la menor acumulación se presentó en el tratamiento de 5% con un valor de 0.16 g/l. En CMS se obtuvo un patrón de acumulación en forma de campana, donde los tratamientos de 30 y 40% muestran 0.23 y 0.35 g/l de ácido gálico, mientras que el tratamiento de 50% muestra la menor acumulación con 0.18 g/l.

Estos resultados parecen indicar que el ácido gálico se consume en cantidades poco significativas que otros sustratos como fuente de energía para el crecimiento de *Aspergillus niger* Aa-20, por lo que tienden a acumularse en el medio. El CML acumula una cantidad de ácido gálico comparable que el CMS, lo que sugiere que se deben a las condiciones y características de cultivo que influye de manera notable en el consumo de nutrientes, y por tanto el efecto sobre el metabolismo del hongo.

Con los resultados obtenidos es importante recomendar se evalúen los factores que pueden estar influenciando el proceso de acumulación del ácido gálico durante la fermentación en CML y CMS del hojásén.

RECOMENDACIONES

Durante el desarrollo del presente estudio se encontraron una serie de inconvenientes que podemos sugerir para la mejora del mismo:

- Someter al hojásén a una serie pretratamientos que permitan reducir o eliminar la presencia de otros compuestos para evaluar de una manera más clara la degradación de azúcares y fenoles totales por el *Aspergillus niger* Aa-20.
- Someter al hojásén a pruebas de detanificación que permitan utilizarlo en la alimentación de ganado.
- Evaluar la influencia de la adición de enzimas tanasas exógenas en la obtención de ácido gálico a partir de muestras de hojásén a diferentes concentraciones iniciales.

LITERATURA CITADA

- Acuña-Argüelles, M., Gutiérrez-Rojas, M., Viniegra-González, G. and Favela-Torres, E. 1995. Production and properties of three pectonolytic activities produced by *Aspergillus niger* by submerged and solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 808-814.
- Adachi, O., Watanabe y Yamada, H. 1971. Physicochemical properties of the tannase from *Aspergillus flavus*. *Agric. Biol. Chem.* 32, 1079-1085-234.
- Aguilar, C.N., Augur, C., Favela, E., Viniegra- González, G. 1999a. Effect of the gallic and tannic acids on tannase production from *Aspergillus niger* Aa- 20. Memorias del IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. Pp. 14. Huatulco, Oax., México.
- Aguilar, C. N., Augur, C., Favela, E., Viniegra- González, G. 1999b. A comparison of methods to determine tannin acyl hydrolase activity. *Arch Biol Technol*, en prensa.
- Aguilar, C. N., Augur, C., Favela, E., Viniegra- González, G. 1999c. Production of fungal tannase by liquid and solid cultures. Memorias del IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. Pp. 14. Huatulco, Oax., México.
- Aguilar, C. Augur C. Favela, E. Viniegra- González, G. 2001. Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. *Process Biochemistry*, 36, 565-570.
- Aguilar, C. and Gutiérrez-Sánchez, A. 2001. Review: Sources, Properties, Applications and Potential uses of Tannin Acyl Hydrolase. *Food Sci Tech Int* 7,(5) 373-382.
- ANILCOLSA. 2001. Productos agroindustriales de exportación. Lima, Perú.
- AOAC. 1980. Methods of Analysis Association of Official Analytical Chemists, Ed. William Horwitz.
- Aoki, K., Shinke, R., and Nishira, H. 1976. Purification and some properties of yeast tannase. *Agr Biol Chem* 40: 79- 85.
- Arredondo V., D.G. 1981. Componentes de la vegetación del rancho demostrativo “Los Angeles”. Tesis Licenciatura UAAAN. Buenavista, Coahuila, México. 284 p.
- Bajpai, B., and Patil, S. 1996. Tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Trichoderma*. *World J Microbiol Biotechnol* 12: 217- 220.
- Bajpai, B., and Patil, S. 1997. Introduction of tannin acyl Hydrolase (EC 3.1.1.20) activity in some members of fungi imperfecti. *Enz Microb Technol* 20: 612- 614.

- Banerjee, R. 2000. Biosynthesis of Tanin Acyl Hydrolase from tanin rich forest residue under different fermentation conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, (2000) 25, 29-38.
- Banerjee D. Mondal , C.K. and Patil, R.S. 2001. Production and Characterization of extracellular and intracellular Tannase from newly isolated *Aspergillus Aculeatus* DBF 9.41,6,313-318.
- Barthomeuf, C. Regeat, F., and Pourrat, H. 1994. Improvement in tannase recovery using enzymatic disruption on micelium in combination with reserve mycellar enzyme extraction. *Biotechnol Tech* 8: 137- 142.
- Begovic, S., and Duzic, E. 1976. *Vetenaria*. 25: 421- 428. In: Lekha, P., Lonsane, B. 1997 Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Adv Appl Microbiol* 44: 215- 260.
- Begovic, S., and Duzic, E. 1977. *Vetenaria*. 26: 227- 233. In: Lekha, P., Lonsane, B. (1997) Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Adv Appl Microbiol* 44: 215- 260.
- Beltrán, E. 1964. Las zonas áridas del centro de Noreste de México y el aprovechamiento de sus recursos. Ed. Inst. Mex. De Rec. Nat. Ren. México D.F. pp78-79.
- Benson, L. and R.A. Darrow, 1981. Trees and Shrubs of the southwestern deserts. The Univ. Of Arizona Press. Tucson, Arizona United States of America. 416 p.
- Beverini, M. 1987. Tesis doctoral. Insitut National Polytechnique, Nancy, Francia.
- Beverini, M., and Metche, M. 1990. Identification, purification and physicochemical properties of tannase of *Aspergillus oryzae*. *Sci Aliments* 10: 807- 816.
- Blake, S.F. 1913. Revision of the genus *Flourensia*. *Proc. Amer. Acad* 49: 393-409.
- Bradoo, S. Gupta, R., and Saxena, R. (1996). Screening of extracellular tannase producing fungi: development of a rapid and simple plate assay. *J Gen Appl Microbiol* 42: 325- 329.
- Bradoo, S., Gupta, R., and Saxena, R.K. (1997). Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tannase from *Aspergillus japonicus*. *Proc Biochem* 32: 135- 139.
- Buffington, L.C. , and Herbel C.H. 1965 Vegetation changes on a semidesert grass land range from 1858 to 1963. *Ecol. Monogr.* 35:139-164.
- Burs, E. R. 1971. Method for estimation of tannin in grain sorhum *Agr. D.* 63:511-512.

- Cavazos C., O.E. 1984. Control químico de *Flourensia Cernua D.C.* en el pastizal mediano abierto. Tesis. Maestría. UAAAN. Buenavista, Coahuila, México, 121p.
- Chae, S. y Yu, T. (1983). Experimental manufacture of acorn wine by fungal tannase. *Hanguk Sipkum Kwahakoechi*. 15, 326-332.
- Chaterjee, R. Dutta, A. Banerjee, R., and Bhattacharyya, M. 1996. Production of tannase by solid state fermentation. *Bioproc Eng* 14: 159- 162.
- Chavan, J.R. Ghonsiker C.P. Radam, S.A. and Salunke, D.K. 1979. Protein Tannin and Starch Changes in Developing seeds of low and high Tannin Cultivares of Sorghum. *Food Bioc.* 3:13.
- Chandra, T. Krishnamurthy, V., Madhavakrishana, W. and Nayudamma, Y. (1973). Astringency in fruits: microbial degradation of wood apple tannin. *Leather Science*. 20, 269-273.
- Chen, T. 1969. The induction of tannase in *Aspergillus niger*. PhD. Thesis. University of California, Berkeley, U.S.A.
- Clawes, F. A.L. and Juniper, B.E. 1968. Plant cells. Black well Scientific Publications Oxford.
- Cohen, B.L., Morris, J. E. And Druker, H. 1975. Regulation of two extracellular proteases of *Neurospora crassa* by induction and by carbon-nitrogen and sulfur-metabolite repression. *Arch. Biochem. Biophys.* 169, 324-330.
- Correll. D.S. and Johnston M. C 1970. Manual of the vascular plants of Texas. Texas Research Fundation, Ranner, Texas 1881p.
- De Loach, C. J. 1980. Procnosis for biological control of weeds of Southwestern U.S. Rangelands. Proc. V Int. Symp. Biolog. Contr. Weeds Brisbane, Australia. pp 175-199.
- Deschamp, A. Otuk, G. and Lebeault, J. 1983. Production of tannase and degradation of chestnut tannin by bacteria. *J. Ferment Technol.* 61-55-59.
- Diaz, S. H. 1985. Control de Hojasén (*Flourensia cernua D.C.*) con diferentes diseños de riel en el norte de Zacatecas, México. Tesis Maestría. UAAAN. Saltillo, Coah. p 30.
- Dillon, M. O. 1976. Two species of *Flourensia* (Asteraceae Heliantheae) from North Central México. *The Southwestern*. 21:145-149.

- Domínguez, L. J. 2002. Producción Comparativa de Proteasas por *Streptomyces sp.* en Cultivo en Estado Sólido y Cultivo Líquido. Estudios preliminares.
- Dubois, M. Guiles, K. A. Hamiton, J.K. Rebers P.A. and Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem.* 25:530.
- Elias, L.G., Fernandez, D.G. and Bressami, R. 1979. Possible effects of seed coat polyphenolics on the nutritional quality of bean protein *J. Food Sci*, 44:524-527.
- Esau, K. 1977. *Anatomy of seed plants.* 2^a ed. Wiley, New York.
- Fahn, A. 1974. *Plant Anatomy.* 2ed. Pergamon Press, Oxford.
- FAO, 1953. Proyecto 5000. Las posibilidades de producción de materiales taninos vegetales. Inst. Mex. De Inv. Tec. México.
- Fernandez-Prida, C. 1977. Análisis de productos forestales. Esc. Tec. Sup. De Ing. De Montes, Madrid.
- Freudenberg, K., Bummel, F., and Frank, T. 1927. Tannin acyl hidrolase. *Z. Physiol Chem* 164:262-270.
- García Dager, R.R. 1981. Alternativas de control de Mezquite (*Prosopia glandulosa Tor var glandulosa*), Largoncillo (*Acacia constricta Benth*) y Hojasén (*Flouresia cernua D.C.*) en el Norte de Coahuila. Tesis Lic. UAAAN. Saltillo, Coahuila.
- García-Peña. 1996. Producción, purificación y caracterización de tanasa producida por *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. México.
- García- Peña, I., Augur, C., and Favela- Torres, E. 1999. Purificación parcial de tanasa producida por *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido. En: *Avances en Purificación y Aplicación de Enzimas en Biotecnología* (Prado, A., Huerta, S., Rodríguez, G., Saucedo, G. eds.) pp.247-261. México. Ediciones UAM-Iztapalapa.
- Gay, C.W., Dwyer, D.D. and Steger, R.E. 1970. New Mexico range plants. Circ No. 374. New Mexico, State Univ. Unites States of América. 85 p.
- Gentry H.W., 1957. Los pastizales de Durango: estudio ecológico fisiográfico y florístico. IMRNR. 361 p.
- George, E.C. y Sen, S.N. (1960). *Bull. CLRI.* 6, 279-280.
- González, E.M. 1975. Distribución especial de la vegetación y su interpretación sucesional en el Norte del estado de Zacatecas. Tesis Lic. Chapingo. Estado de México. p263.

- Guiragossian, B.A.K., Chibber, S.; Van Scoyoc, R.; Jambunathan, E.T.; Mertz and Axtell, J. D. 1978. Characteristics of protein from normal, high lysine and high tannin sorghums. *J. Agric. Food Chem.* 26:219.
- Hahn, D. H., and Rooney, L. W., 1985. Genotype effect on tannins and phenols of sorghum. *Cereal Chem.* 64: 4-6.
- Hahn, D. H., Faubion, J. M., and Rooney, L. W. 1983. Sorghum phenolic acids, their high performance liquid chromatography separation and their relation to fungal resistance. *Cereal Chem.* 60: 255-259.
- Halloran, H. 1983. Variación de los granos alimenticios. *Avicultura Profesional.* 1:12.
- Harborne, J. B. 1980. Plant phenolics 329-442 in: E.A. Bell and B.V. Charlwood ED. *Secondary plant products Encyclopedia of Plant Physiology.* Vol. 8 Springer-Verlag Berlin.
- Haslam, E., Haworth, R., Jones, K., and Rogers, H. 1961. Gallotannins. Part I. The fractionation of tannase. *J Chem Soc* 1829-1835.
- Haslam, E., and Stangroom, J. 1966. The esterase and depsidase activities of tannase. *Biochem* 99: 28-31.
- Haslam, E., and Tanner, R. 1970. Spectrophotometric assay of tannase. *Phytochem* 90:2305-2309.
- Haslman, E. 1966. Chemistry of vegetable tannins. In: *Economic Botany. Plants in Our World.* Berul Brintnall-Simpson and Molly Conner-Ogorzaly., the University of Texas at Austin editorial Mc Graw-Hill, Inc pp. 505.
- Haworth, R., Jones, K., and Rogers, H. 1958. Ion-exchange chromatography of *Aspergillus niger* extract. *Proc Chem Soc* 8-9.
- Herbel, C.H. 1967. Jornada experimental range. *Proc. Range weed Res. Meeting and field Tour, New Mexico, United States of America.* P. 65-70.
- Hossein, S.A. y Maldonado, R. G. 1982. Potencial de la flora de zonas áridas. *Ciencia y Tecnología.* 47:98-109.
- Iibuchi, S., Monida, Y., and Yamada, K. 1967. Studies on Tannin Acylhydrolase of Microorganisms Part III. Purification of enzyme and some properties of it. *Agr Biol Chem* 32: 803-809.

- Iibuchi, S., Midona, Y., and Yamada, K. 1972. Hidrolyzing pathway, substrate specificity and inhibition of tannin acylhydrolase. *Agr Biol Chem* 36: 1553-1568.
- Imshenatskii, A. A., Kasatkina, I. D. and Zhelteva, E. T. 1971. Repression of protease synthesis in *Aspergillus terricola* by exogenic amino acids. *Microbiology (USSR)*. 40, 382-386.
- Jacob, F.H. and Pignal, M.C. 1975. Interactions levures-tannins: etude en millieu tannant de quelques levures hydrolysant l'acide tannique. *Mycopathologia*. 57, 139-148.
- Jambunathan, R. and Mertz, T.E. 1973. Relationship between tannin levels rat growth and distribution of proteins in sorghum. *J. Ag. Food Chem.* 21:692-696.
- Jean, D., Pourrat, A., and Carnat, A. 1981. Assay of tannase (tannin acylhydrolase EC 3.1.120) by gas chromatography. *Anal Biochem* 110: 369-372.
- Jones, Q. and Earle, F.R. 1966. Chemical analysis of seed II: oil and protein content of 759 species *Econ. Bot.* 20(2): 127-155.
- Kar, B. Banerjee, R and Bhattacharyya, B.C. 1999. Microbial production of gallic acid by modified solid state fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23, 173-177.
- Kar, M. Banerjee. 2000. Modeling Gallic Acid Production Rate by Empirical and Statical Analysis. *Process Biochemistry* 36, 39-44.
- Knudson, L. 1913. Tannic acid fermentation. *Journal of Biological Chemistry* 14: 159-207.
- Lane, R. Yamakoshi, J. Kikushi, M. Mizusawa, K. Henderson, L., and Smith, M. 1997. Safety evaluation of tannase enzyme preparation derived from *Aspergillus oryzae*. *Food Chem Toxicol* 35:207-212.
- Lekha, P., and Lonsane, B. 1994. Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. *Proc Biochem* 29: 497-503.
- Lekha, P., and Lonsane, B. 1997. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Adv Appl Microbiol* 44: 215-260.
- Loomis, W. D. and Battaile, J. 1966. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry* 6:423.
- López Ríos, G.F. 1984. *Fitoquímica*. 1 ed. U.A. Chapingo. Estado de México. p13.
- Madhavakrishna, W., Bose, S., and Nayudamma, Y. 1960. Estimation of tannase y certain oxidising enzymes in indian vegetables tanstuffs. *Bull Cent Leath Res Inst* 7: 1-11.

- Madhavakrishna, W., and Bose, S.M. 1961. Purification, crystallization and properties of tannase from divi-divi pods. *Bull Cent Leather Res Ins* 8: 153-165.
- Mahadevan, A. and Muthukumar, G. 1980. Aquatic microbiology with reference to tannin degradation. *Hydrobiología*. 72, 73-79.
- Maxon, E.D. Clarck, E.E. Rooney, L. W. and Johnson, J.W. 1972. Factors affecting the tannin content of sorghum grain, as determined by two methods of tannin analysis *Crop. Sci.* 12: 233-235.
- Mendez, A. and Prq 1984. Energía metabolizable del sorgo y efecto de la adición de aceite a dietas con sorgo dulce o amargo. *Avances de investigación (resúmenes)*. Colegio de Postgraduados.
- Mendez, R.A. 1984. Determinación de energía Metabolizable y Efecto de la Utilización de sorgos con diferente contenido de taninos. UACH, México. Tesis Lic.
- Miller, G.L. 1989. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31:426-428.
- Moo young, M. Moreira, A. R. and Tengerdy, R.P. 1983. Principles of Solid- Substrate Fermentation. En *The Filamentous Fungi*. Vol. IV Fungal Technology. Esis, E., E. Smith, Berry, D. R. and Kristiansen, B. Edit. Arnold, London. Pp. 117-143.
- Nierenstein, M. 1930. *Nature* 125: 338-342.
- Nishira, H. and Mugibayashi, N. 1953. Tannin decomposing enzyme of molds. XI Formation of tannase by various molds on wheat bran medium. *Hyogo Noka Diagaku Kenkyu Hokoku Nogelkagaku Hen* 4:113-116.
- Nishira, H. 1961. *Hakko Kogaku Zasshi*. 39:137-146.
- Oriol, E., Schettino, B., Viniestra-González, G., Raimbault, M. 1988. Solid State culture *Aspergillus* in support. *Journal of Fermentation Technology*. 66:57-62.
- Olivares, S.C. 1983. Determinación del contenido de taninos vegetales en Acacia. *Phosopis y quercus*. Inst. Tecn. Y de Est. Sup. De Monterrey. Tesis.
- Okamura, S., and Yuasa, K. 1987. Manufacture of tannase with *Aspergillus*. (Kikkoman y Inabata) Jpn. Patent. 62,272,973.
- Okamura, S., Mizusawa, K., Takei, K., and Ito, S. 1988. Fermentative manufacture of tannase. (Kikkoman y Inabata) Jpn. Patent. 63,304,981.
- Osawa, R. and Walsh, T.P. 1993. Visual reading method for detection of bacterial tannase. *Appl Environ Microbiol* 59: 1251-1252.

- Pandey, A. 1992. Recent Process Developments in Solid State Fermentation. *Process Biochemistry*. 24 :109-117.
- Parmentier, F. 1970. *Arch Int Physiol Biochem* 78: 131-133.
- Pourrat, H., Regeat, F., Pourrat, A., and Jean, D. 1985. Production of gallic acid from tara tannin by a strain of *A. niger*. *J Ferment Technol* 63: 401-403.
- Quintanar, F. A, 1961. Los desiertos mexicanos. IMRNR. 157 p.
- Raimbault, M. 1988. General and microbiological aspects of solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 1(3) in electronic Journal of Biotechnology. Wwww.ejb.org.
- Ramesh, M.V. and Lonsane, B.K. (1991). Ability of solid state fermentation technique to significantly minimize catabolic repression of α -amylase production by *Bacillus licheniformis* M27. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 591-593.
- Rajakumar, G., and Nandy, S. (1983). Isolation, purification and some properties of *Penicillium chrysogenum* tannase. *Appl Environ Microbiol* 46;: 525-527.
- Righelato, R.C. 1975. Growth kinetics of mycelial fungi. In: Filamentous fungi. Industrial mycology, Smith, J. E., Berry, D. Edit. Edward Arnold, London. Vol 1.
- Romero- Gómez, S de J. 2001. Producción de Invertasa por *Aspergillus niger* en Fermentación Líquida y Fermentación sólida. Tesis Doctorado. U. A. Metropolitana.
- Ronnekamp, R.R. 1976. The effect of tannins on nutritional quality of dry beans, *Phaseolus vulgaris* L. Tesis de Ph. D. Purdue Univ. Lafayette Indiana (Resumen del Centro Inst. Agr, Trop. 3061.
- Ronne, H. 1995. Glucose repression in fungi. *Trends in Genetics*. 11:13-17.
- Rooney, L.W., Khan, M. N., and Earp, C. F. 1980. The technology of sorghum products. In: Inglett, G. E., and Munck, L. (eds.) *Cereals for Food and Beverages*: Academic Press, New York.
- Rooney, L.W., and Miller, F.R. 1982. Variation in the structure and kernel characteristics of sorghum. In: ICRISAT. 1982. Proc. Int. symp. On Sorghum Grain Quality. ICRISAT, India.
- Ruiter, G. J. and Visser, J. 1997. Carbon repression in Aspergilli. *FEMS Microbiology Letters*. 151: 103-114.

- Sanderson, G., Englewood, N., Coggon, P., and Orangeburg, N. (1974). Green tea conversion using tannase and natural tea leaves. U.S. Patent 3: 812,266.
- Sánchez A., E.E. 2001. Aplicación y usos potenciales de la tanasa y taninos. Monografía QFB. U. A. de C.. Saltillo. Coah.
- Sanz M, Ferrandiz M, and Cejudo, M. 1994. Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. *Xenobiotica* 24:689-699.
- Schofield, P., Mbugua, D.M. and Pell, A.N. 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 91:21-40.
- Scifres E. J. 1980 Brush management; Principles and practices for Texas and the Southwest Texas A& M University Press. 360 p.
- Seiji, D. Atsuhiko, S. Toshio, E., and Gyoza, T. 1973. *Hakko Kogaju Zasshi* 51: 768-771.
- Seth, M. and Chand, S. 2000. Biosynthesis of tannase and hydrolysis of tannins to gallic acid by *Aspergillus awamori* – optimization of Process parameters. *Process Biochemistry*, 36, 39-44.
- Sharm, S. Bhat, T.K. and Dawra, R.K. 1999. Isolation, Purification and Properties of Tanasse from *Aspergillus niger* Van Tieghem. *Wourld journal of microbiology and Biotecnology*, 15, 673-677.
- Sharm, S. Bhat, T.K. and Dawra, R.K. 2000. A Spectrophotometric Method For Assay of Tannase Using Rhodanine *Analytical Biochemistry*, 279, 85-89.
- Siller, S. M.I. 1980. Datos ecológicos de las áreas salinas del valle de Santa Rita y el Ejido el Prado. Municipio de Galeana, Nuevo León, México. Tesis Licenciatura Fac. de Biología, UANL. Monterrey, N.L., México 73p.
- Silva, S. R. E. 1980. Estado actual de los recursos naturales renovables de los ejidos El Prado y San Juna del Prado, Municipio de Galeana Nuevo León, México. Tesis Licenciatura Fac. de Biología UANL. Monterrey N.L., México. 75 p.
- Sitting, M. 1988. Trimethoprim. In: *Pharmaceutical Manufacturing Encyclopedia*. New Jersey: Noyes Publication. Pp. 282-284.
- Skene, I. and Brooker, J. 1995. Characterization of tannin acylhidrolase activity in the rumial bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Anaerobe*. 1, 321-327.

- Solis Pereira, S., Favela-Torres, E., Viniegra-González, G. y Gutiérrez-Rojas, M. (1993). Effect of different carbon sources on the synthesis of pectinases by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39, 36-41.
- Solis, V.A. 1953. Propiedades curtientes del Tanino de la *Potentilla candicans*.
- Solomon, R. 1975. Growth of *Aspergillus* in liquid fermentors. En Filamentous fungi (Industrial mycology). Smith, J. E., Berry, D. Eds. Edward Arnold, London. Vol. 1.
- Sora, M.E. 1984. Algunas consideraciones nutricionales y químicas de sorgos con diferente contenido de taninos. Tesis M.C. UAM. México.
- Suárez, R.G. 1981. Depósito de taninos en la testa de *A. hypochondriacus*. Col. Pp58. México.
- Stumpf, P.K. and Conn, E.E. 1981. The Biochemistry of Plants. Academic Press Inc. USA. 527-555.
- Swain, R.G. 1979. Tannis and Lignins in herbivores their interaction with secondary.
- Swain, T., and Bate-Smith, E. 1962. In: Comparative Biochemistry. 3, 755-809- Academic Press, N.Y.
- Teighem, V. 1967. Sur la fermentation gallique. Compt. Rend. De l'Acad. Des Sci. 65, 1091-1094.
- Tellez, M.R., Estell, R.E., Fredrickson, B.L and Havslad, K.M. 1997. Essential oil of *Flourensia cernua* D.C. Journal of Essential Oil Research. 21 : 619-624.
- Thomas, R., and Mutagh, K. 1985. Characterization of tannase activity on tea extracts. J Food Sci. 50: 1126-1129.
- Van Acker, S. Groot, M. and Van den Berg. 1996. A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. Chem Res Toxicol 9:1305-1312.
- Van Soest, P.J. 1982. Nutritional Ecology of the Rumiant. Ed. O. and B. Book. Inc. New York.
- Vines, R.A. 1960. Trees shrubs and woddy vines of the South west. University of Texas Press. Austin, Texas, 1104 p.

- Wall, C.M. Garvin, J.W., Willman, J.J. Q, Jones and Schubert, B. G. 1961. Survey of plants for steroidal sapogenins and other constituents. *J. Pharm Sci.* 50:1001-1034.
- Walker, J. R. L. 1975. *The Biology of Plant Phenolics. Studies in Biology No. 54* Edward Arnold. London.
- Ward, P. O. 1989. *Biología de la fermentación. Principios, procesos y productos.* Edit Acribia S.A.
- Waterman, P.G., Mole, S. 1994. *Analysis of phenolic plant Metabolites,* Blackwell Scientific Publications: Oxford, U.K.
- Watterson, J.J., and Butler, L.G. 1983. Occurrence of an unusual leucoanthocyanidin and absence of proanthocyanidins in sorghum leaves. *J. Agric. Food Chem.* 12:145-128.
- Yamada, K., Adachi, O., Watanabe, M., and Ogata, K. 1967. Tannase (tannin acyl hydrolase) a typical serine esterase. *Agr Biol Chem* 32: 257-258.
- Yamada, K. Iibuchi, S., and Minoda, Y. 1968. Studies on tannin acyl hydrolase of microorganisms. I. Isolation and identification of producing molds and studies on the conditions of cultivation. *Agr Biol Chem* 45: 233-240.
- Yamada, H., Adachi, M, Watanabe, M. and Soto, N. 1968. Studies on fungal tannase:formation, purification and catalytic properties of tannase of *Aspergillus flavus*. *Agricultural and Biological Chemistry.* 32, 1070-1078.
- Yokoyama, S. Ogawa, A., and Obayashi, A. 1988. *Enzyme Microb Technol* 10:52-55.

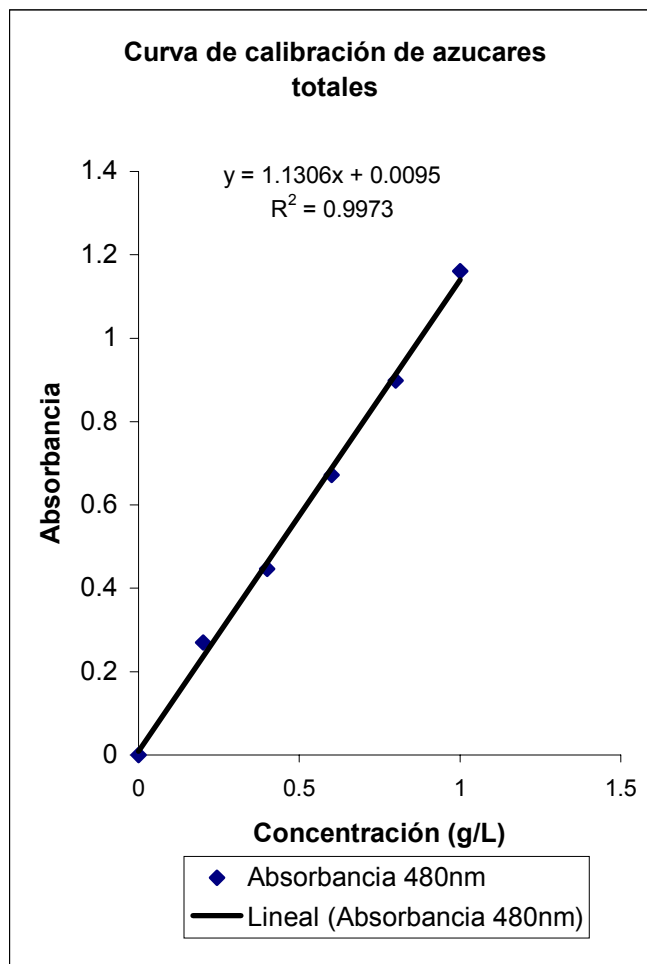
APENDICES

**CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES
TOTALES.**

METODO: FENOL SULFÚRICO (Dubois,
1956)

MUESTRA: HOJASEN
1g/10ml

No. De tubo	Curva patrón	
	Conc. Azúc. (g/L)	Absorbancia 480nm
0	0	0
1	0.2	0.2705
2	0.4	0.447
3	0.6	0.6716
4	0.8	0.8989
5	1	1.1609



CURVA DE CALIBRACION DE TANINOS CONDENSADOS

sol estandar

0.020g de catequina en 14 ml de agua destilada=concentracion 5mM=1.4285 g/L

metodo: follin Ciocalteu

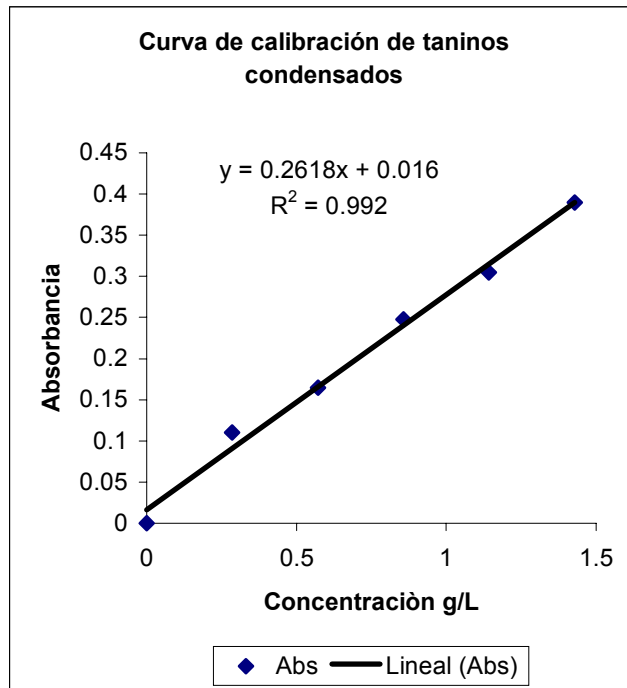
Abs a 750 nm.

Catequina (Sigma)

PM=290.3 g/mol

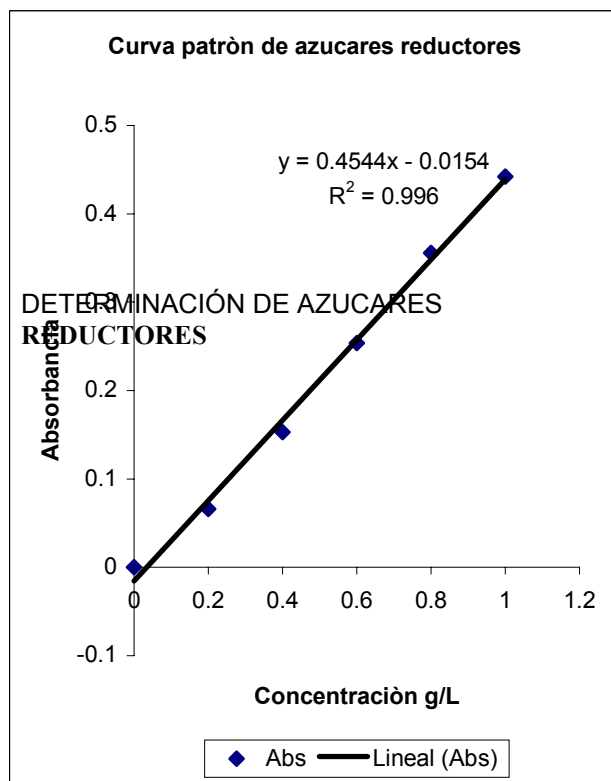
m=MPML $m=0.005 \cdot 290.3 \cdot 0.14 = 0.0203$ g de catequina en 14 ml de agua dest.

g/L	Absorbancia
0	0
0.2857	0.198
0.5714	0.375
0.8571	0.483
1.1428	0.649
1.4285	0.76



Abs 540 nm.
 Concentraci3n 0-1g/l
 M3todo: DNS (Miller, 1956)
 1 g muestra/ 10 ml agua destilada
 Abs 540 nm.

Conc g/L	Abs
0	0
0.2	0.066
0.4	0.153
0.6	0.254
0.8	0.356
1	0.442



DETERMINACION DE TANINOS TOTALES

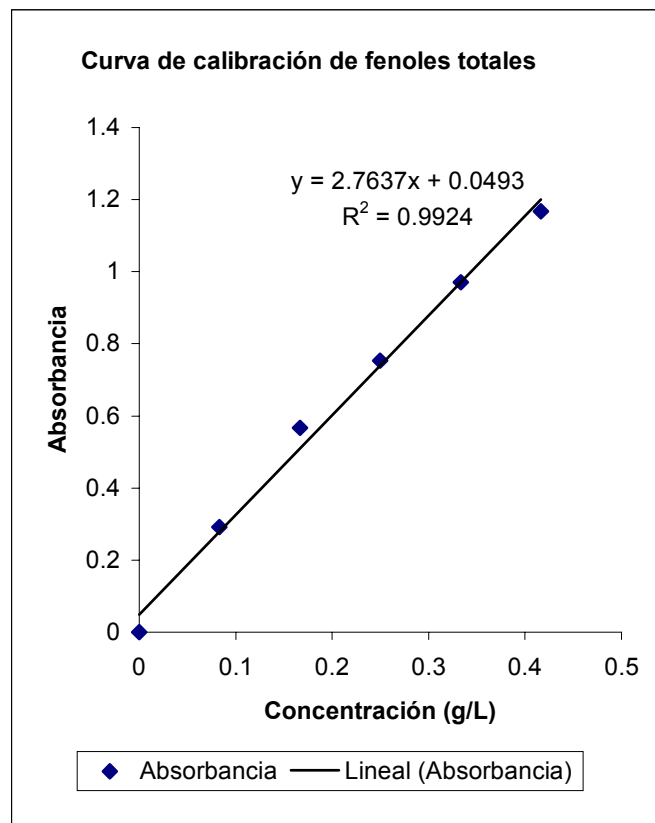
Metodo de determinación de Folin-
Ciocalteu

(Waterman y Mole, 1994)

longitud de onda: 750 nm

Curva calibración Fenoles totales

concentracion g/L	Absorbancia
0	0
0.0833	0.29215
0.1666	0.5663
0.2499	0.7528
0.3332	0.97115
0.4166	1.1671



DETERMINACION DE ÁCIDO GALICO

Metodo de determinación de rodanina metanolica

(Sharman y col, 2000).

Longitud de onda 520nm

g/L	absorbancia
0	0
0.08	0.6381
0.16	1.1885
0.24	1.6442
0.32	2.4951
0.4	2.9623

