

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA  
“ANTONIO NARRO”**

**DIVISION DE CIENCIA ANIMAL**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**



**Aislamiento de Cepas Fúngica Nativas de la Región Sureste del Estado de  
Coahuila para la Producción de la Enzima Tanasa.**

Por

**DOLORES BARRANCO VALLE**

**TESIS**

Presentada como Requisito Parcial para  
Obtener el título de:

**Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

Buenavista, Saltillo, Coahuila. México

Marzo 2012.

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA  
"ANTONIO NARRO"

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL  
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
TESIS

Aislamiento de Cepas Fúngicas Nativas de la Región Sureste del Estado de  
Coahuila para la producción de la Enzima Tanasa

Presentada  
Por:

DOLORES BARRANCO VALLE

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

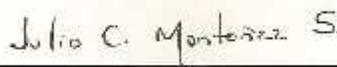
INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

APROBADA

ATENTAMENTE



Dr. Mario Alberto Cruz Hernández  
Presidente



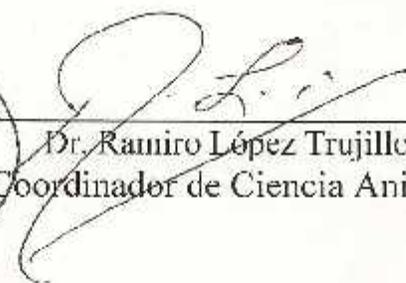
Dr. Julio César Montañez Sáenz  
Sinodal



Dr. Antonio Aguilera Carbó  
Sinodal



M.C. Mildred Inna M. Flores Verastegui  
Sinodal



Dr. Ramiro López Trujillo  
Coordinador de Ciencia Animal

## DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño:

A Dios por haberme dado la oportunidad de estar aquí en este momento y por estar siempre a mi lado.

Con mucho cariño principalmente a mis padres que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento. Gracias por todo papá y mamá por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre han estado apoyándome y brindándome todo su amor, por todo esto les agradezco de todo corazón el que estén conmigo a mi lado.

Los quiero con todo mi corazón y este trabajo que me llevo un año hacerlos es para ustedes, por ser la más chica de sus hij@s aquí esta lo que ustedes me brindaron.

A mis hermanos y hermanas gracias por estar conmigo y apoyarme siempre, los quiero mucho. A mis cuñados y cuñada Clau por estar siempre conmigo y mis papas, los quiero.

Sobrinos y sobrinas, quisiera nombrar a cada uno de ustedes pero son muchos, a todos los quiero mucho. A ti Didi que llegaste para llenar de alegría mi vida, gracias porque eres mi inspiración y fortaleza, una sonrisa tuya ilumina mi mundo da fuerza necesaria para conseguir mis metas te quiero mucho.

Ariel, muchas gracias por estos cuatro años de conocernos y en las cuales hemos compartido tantas cosas, hemos pasado tanto que ahora estás conmigo en este día tan importante para mí. Solo quiero darte las gracias por todo el apoyo que me has dado para continuar y seguir con mi camino, gracias por estar conmigo y recuerda que eres muy importante para mí Te Amo.

A mis amigos Hellen, Gelly, Blan, Ivan Isai, Ivan Morales, Sergio, Mario, Lauro, Alex, Marisol, Vera y Dianita; muchas gracias por estar conmigo en todo este tiempo donde he vivido momentos felices y tristes, gracias por ser mis amigos y recuerden que siempre los llevare en mi corazón.

A mis profesores por confiar en mí gracias por tenerme la paciencia necesaria, por apoyarme en momentos difíciles, muchas gracias. Agradezco el haber tenido unos profesores tan buenas personas como ustedes nunca los olvidare.

Y no me puedo ir sin ante decirles, que sin ustedes a mi lado no lo hubiera logrado, tantas desveladas sirvieron de algo y aquí esta el fruto. Les agradezco a todos con toda mi alma el haber llegado a mi vida y el compartir momentos agradables y momentos tristes, pero esos momentos son los que nos hacen crecer y valorar a las personas que nos rodean. Los quiero mucho y nunca los olvidaré.

*“Es la hora de partir, la dura y fría hora que la noche sujeta a todo horario.”*

*(Pablo Neruda)*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco el tiempo y vivencia que pase con mis amigos de generación, Hellen, Gelly, Blan, Ivan Isai.

Agradezco a mis compañeros de ICTA que no voy a nombrar por que crecen más rápido que los hongos, pero también fueron parte de este proyecto.

A mi asesor Dr. Mario pues confiaste en mi para realizar este trabajo y me has permitido crecer en conocimientos académicos.

Al Dr. Tony gracias por dedicarme un poco de tu tiempo al momento de trabajar en esta tesis y para platicar de lo que fuera.

A usted Maestra Mildred gracias por confiar en mí y darme los ánimos para seguir adelante.

A mi Alma Terra Mater por haberme formado como ingeniero.

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

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

# Índice

<b>1. Resumen</b> .....	1
<b>2. Introducción</b> .....	3
<b>3. Objetivo general</b> .....	5
3.1. Objetivos específicos .....	5
<b>4. Hipótesis</b> .....	5
<b>5. Revisión de literatura</b> .....	6
5.1 Enzimas .....	6
5.1.1 Sitio activo y sitio regulatorio .....	7
5.1.2 Producción industrial de enzimas .....	8
5.1.3 Determinación de la actividad enzimática .....	11
5.1.4 Microorganismos más usados en la producción de enzimas.....	12
5.2 TANIN ACIL HIDROLASA .....	13
5.2.1 Generalidades .....	13
5.2.1.1 Fuentes de obtención .....	14
5.2.1.2 Taninos.....	17
5.2.1.3 Mecanismo de acción .....	20
5.2.1.4 Aplicaciones .....	21
5.2.1.5 Importancia .....	21
5.2.1.6 Regulación y biosíntesis .....	23
5.2.1.7 Propiedades de la TAH.....	24
5.2.1.8 Evaluación de la actividad TAH. ....	25
5.2.1.9 Purificación de TAH .....	26
5.2.2 Usos de la Tanasa.....	28
5.3 Hongos filamentosos .....	29
5.3.1 Estructuras de los hongos .....	30
<b>6. Materiales y métodos</b> .....	38
<b>6.1 Etapa I.- Purificación y Conservación de hongos filamentosos.</b> .....	38
6.1.1 Recolección de muestras. ....	38
6.1.2 Preparar medios de cultivo. ....	38
6.1.3 Siembra en cajas petri con PDA. ....	38

6.1.4	Medios de cultivos para resembrar los hongos purificados.....	39
6.1.5	Siembra en los distintos medios de cultivo .....	40
6.1.6	Caracterización morfológica .....	40
6.1.7	Conservación de hongos puros .....	41
<b>6.2</b>	<b>Etapa II.- Utilización de los hongos filamentosos.....</b>	<b>41</b>
6.2.1	Medio de propagación .....	41
6.2.2	Propagación del inóculo.....	42
6.3.-	Sistema de producción de enzima fúngica .....	43
6.3.1	Medio de cultivo.....	43
6.3.1.1	Preparar medios de cultivo medio solido.....	44
6.3.1.2	Siembra en cajas petri con caldo ácido tánico – agar bacteriológico. ..	44
6.3.2	cultivo en medio líquido (CML).....	44
6.3.2.1	Preparar medios de cultivo .....	44
6.3.2.2	Siembra en cultivo medio líquido .....	45
6.3.3.1	Análisis de Actividad Tanasa .....	45
6.3.3.2	Ensayo .....	46
6.3.4	Determinación de Azúcares Totales .....	48
6.3.5	Determinación de Biomasa por peso seco mediante filtración.....	49
6.3.5.1	Peso contrastante de los filtros para filtrar. ....	49
6.3.5.2	Filtración y peso constante de los filtros con biomasa. ....	49
<b>7.</b>	<b>Resultados y discusiones .....</b>	<b>51</b>
7.1.1.	<b>Etapa I purificación y conservación de hongos filamentosos.....</b>	<b>51</b>
7.1.2.	<b>Etapa II Uso de los hongos filamentosos en sales Czapek-dox con Ácido Tánico en cultivo medio solido y cultivo medio líquido.....</b>	<b>55</b>
7.1.2.1.-	Cinéticas de producción de enzima, consumo de azúcares totales y acumulación de biomasa.....	56
<b>8.</b>	<b>Conculcaciones.....</b>	<b>60</b>
<b>9.</b>	<b>Perspectivas de la investigación .....</b>	<b>61</b>
<b>10.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>62</b>
<b>11.</b>	<b>Anexos .....</b>	<b>70</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.-</b> Reacción de hidrólisis de ácido tánico (tanino hidrolizable) R1, galaoil y digalaoil .....	13
<b>Figura 2.-</b> Clasificación de los taninos.....	19
<b>Figura 3.-</b> Hidrólisis del ácido tánico catalizado por la TAH (Aguilar-Sánchez, 2001).....	20
<b>Figura 4.-</b> Estructuras somáticas.....	31
<b>Figura 5.-</b> Estructuras de resistencia y multiplicación.....	32
<b>Figura 6.-</b> Tipos de esporas.....	32
<b>Figura 7.-</b> Estructuras anamórficas.....	34
<b>Figura 8.-</b> Estructuras telecomórficas.....	37
<b>Figura 9.-</b> Método de siembra con sacabocados.....	40
<b>Figura 10.-</b> Conteo de esporas.....	42
<b>Figura 11.-</b> Acercamiento de la cámara de Neubauer.....	42
<b>Figura 12.-</b> caldo sales Czapek-ácido tánico.....	43
<b>Figura 13.-</b> Muestras en espectrofotómetro.....	46
<b>Figura 14.-</b> Filtración con bomba de vacío.....	50
<b>Figura 15.-</b> Muestras en el horno de secado.....	50
<b>Figura 16.-</b> Muestras en el desecador y balanza de precisión.....	50
<b>Figura 17.-</b> Crecimiento de hongos en CMS.....	55
<b>Figura 18.-</b> Actividad tanasa en CML.....	57
<b>Figura 19.-</b> Consumo de azúcares totales.....	57
<b>Figura 20.-</b> Producción de biomasa.....	57
<b>Figura 21.-</b> Curva patrón de actividad tanasa.....	73
<b>Figura 22.-</b> Curva patrón de azúcares totales.....	73

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.-</b> Fuentes microbianas de tanasa.....	16
<b>Tabla 2.-</b> Propiedades de la TAH de <i>A. niger</i> producida por fermentación líquida.....	27
<b>Tabla 3.-</b> Resumen de algunas características de la TAH microbiana producida por fermentaciones líquida y sólida.....	28
<b>Tabla 4.-</b> Componentes del medio de cultivo caldo ácido tánico.....	43
<b>Tabla 5.-</b> Esquema del ensayo enzimático propuesto por Sharma y col. (2000).....	48
<b>Tabla 6.-</b> Observaciones macroscópicamente y microscópicamente de las cepas puras.....	52
<b>Tabla 7.-</b> Observaciones de las cepas puras cultivadas en sales Czapek-ácido tánico.....	71

## 1. Resumen

Este trabajo se caracterizó por el aislamiento de cepas fúngicas aisladas de la región sureste del estado de Coahuila. De las que se aisló un total de 22 cepas. De las cuales se eligieron dos cepas muestra X y muestra P, para la producción de enzima tanasa.

Este presente estudio se realizó en el departamento de ciencia y tecnología de alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Las cinéticas de producción se llevaron a cabo en cultivo medio sólido en cajas petri y cultivo medio líquido en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad con medio de cultivo esterilizado Czapek-dox con ácido tánico 10 g/L a un pH de 6. Se inocularon con esporas de las muestras X y P ajustadas a una concentración de  $5 \times 10^6$  esporas por 20 ml de Czapek-dox 10 g/L con ácido tánico en CML y  $2 \times 10^7$  esporas por gramo de soporte en CMS.

Los matraces se llevaron en un agitador multi-Shaker a 100 rpm y a una temperatura de 30°C en CML y en CMS se realizó en una incubadora (Riossa modelo E-17, México) a una temperatura de 30°C.

Las cinéticas tuvieron una duración de 120 horas, en las cuales cada 24 h se determinó la actividad enzimática por el método de Sharman col.2000, consumo de azúcares totales por el método de fenol-sulfúrico 5% y determinación de biomasa por peso seco mediante filtración.

En el CMS pudimos obtener dos hongos filamentosos que son muestra X y P para que se pudiera hacer la cinética en CML.

Mediante los resultados se pudo deducir que con el hongo muestra X se observó una mayor cinética de actividad enzimática y azúcares totales así como de producción de biomasa a comparación con la muestra P.

Estos resultados parece indicar que mientras hay azucares totales la actividad tanasa aumenta y se mantiene por un cierto tiempo ya que como van disminuyendo la actividad tanasa va declinando.

También se observa q mientras los hongos tiene nutrientes esta crece y se produce más biomasa pero solo por un cierto tiempo ya que cuando este ya no tenga nutrientes este deje de producir biomasa.

**Palabras claves:** Hongos filamentosos, actividad enzimática, acido tánico, CMS y CML.

## 2. Introducción

El aislamiento y la identificación de microorganismos presentes en un ambiente natural es el primer paso de una investigación para determinar las propiedades y características articulares de los diferentes géneros presentes y los metabolitos o enzimas extracelulares que pueden producir.

La primer etapa de aislamiento e identificación es de importancia para una caracterización posterior y determinar objetivamente su aplicabilidad a nivel industrial como son las enzimas (proteínas) que actúan como catalizadores; es decir, aceleran la velocidad de las reacciones químicas y lo realizan con un elevado grado de especificidad y sin alterar el equilibrio; en su ausencia, la mayoría de las transformaciones químicas requeridas para mantener activas a las células tardarían mucho tiempo en efectuarse o simplemente no procederían. (Badui 1999).

Hongos, levaduras, bacterias al igual que todos los animales y vegetales, sintetizan las enzimas; de hecho, su acción está estrechamente ligada con cualquiera de las etapas biológicas de todos los tejidos activos. Debido a esto, los alimentos contienen una gran variedad de enzimas endógenas que les provocan cambios benéficos o dañinos, además de las que provienen de las distintas contaminaciones microbianas. Por esta razón, es muy importante conocer las diversas actividades enzimáticas de cada producto, para así obtener ventajas de ellas y evitar los problemas indeseables que puede traer consigo su presencia. (Badui, 1999).

El primer aspecto a considerar en el desarrollo de un sistema de producción de enzimas es, la selección del microorganismo adecuado para el proceso. El microorganismo no debe de ser patógeno, ni estar asociado con la producción de toxinas. Los aspectos de reglamentación de la FDA (Food and Drug Administration), consideran GRAS a una enzima producida por un microorganismo GRAS (Generalmente Reconocido Como Seguro).

---

La mayoría de las enzimas a nivel industrial son producidas en CML debido a que la obtención de títulos enzimáticos en gramos por litro es mucho más simple (Harvey y McNeil 1993). Sin embargo, a menudo los niveles de obtención de metabolitos secundarios es muy pobre y los costos de la recuperación del producto son inversamente proporcionales a la concentración de producto en los extractos enzimáticos de la fermentación (Kroner y col. 1984).

Aun que actualmente el CMS se considera como una opción interesante en la producción de enzimas y es por eso que ha ido creciendo la cantidad de artículos científicos en los que se involucra este sistema de fermentación no se ha encontrado un sistema que se pueda escalar a planta piloto o que permita la producción de la tanasa a escala comercial (Pandey y col. 1999).

También en este tipo de cultivos los títulos enzimáticos son frecuentemente mayores comparados con los que se pueden obtener en CML pero las concentraciones de enzima son muy bajas por lo que no se pueden obtener cantidades mayores (Viniestra-González 1998). La producción de enzimas en CMS es en mayores títulos cuando se usan hongos filamentosos, debido a que la fermentación sólida se lleva a cabo casi en ausencia de agua, por este efecto el microorganismo puede obtener el sustrato produciendo las enzimas extracelulares que encuentran a lo largo de todo el soporte sólido. Las enzimas pueden penetrar muy fácilmente por los espacios inter-partícula de tal manera que dispone de todo el sustrato disponible (Pandey 2003).

La presente investigación representa la obtención de información relevante y de gran beneficio para industrias del tipo farmacéutico, textil, alimentario, ingeniería ambiental y bioprocesos que nos permite producir una gran variedad de enzimas como tanasa, proteasa, pectinasa, celulasa y xilanasas, las cuales provienen de una fuente fúngica estas enzimas se utilizan ampliamente en las industrias anteriormente mencionadas; principalmente en la alimentaria, donde se emplean en la elaboración de quesos, yogurt, pan, vino, ablandar carne, entre otras muchas aplicaciones.

---

### **3. Objetivo general**

Producción de la enzima tanasa con fuente de carbono y energía ácido tánico a partir de cultivos en medio sólido y medio líquido, empleando las cepas fúngicas aisladas de la región sureste del estado de Coahuila.

#### **3.1. Objetivos específicos**

- Recolectar muestras de tierra para la producción de hongos filamentosos de la región sureste del estado de Coahuila.
- Purificación, conservación y caracterización morfológica de cepas fúngicas de la región sureste del estado de Coahuila.
- Comparar la producción de la enzima tanasa por las cepas fúngicas empleando en cultivo medio sólido.
- Evaluar la producción de la enzima tanasa por las cepas fúngicas empleando en cultivo medio líquido.

### **4. Hipótesis**

Las cepas fúngicas nativas de la región sureste del estado de Coahuila son capaces de crecer sobre ácido tánico utilizándolo como fuente de carbono y energía, en fermentaciones en cultivo medio sólido y medio líquido para la producción de enzima tanasa.

## 5. Revisión de literatura

### 5.1 Enzimas

Las enzimas son catalizadores biológicos con una eficiencia y especificidad extraordinarias. La mayoría de las reacciones catalizadas por enzimas no se efectuarían en tiempo razonable en ausencia de las mismas, y requerirían de condiciones extremas de temperatura, pH, presión, etc. Las enzimas son altamente específicas en cuanto al sustrato que utilizan y a los productos de la reacción que catalizan, de esta manera la célula que contiene la enzima ahorra energía y evita la formación de compuestos tóxicos. Otra característica típica de las enzimas es que pueden sufrir fenómenos de inhibición e inactivación.

Las enzimas pueden ser inactivadas (desnaturalizadas) por factores como el calor excesivo, el secuestro de calcio, el punto isoeléctrico y la agitación mecánica. La inhibición se presenta cuando una sustancia interfiere en la reacción enzimática, reduciendo su velocidad. La inhibición puede darse de manera reversible o irreversible. Dentro de los inhibidores reversibles están los competitivos (se unen al sustrato, compitiendo con la enzima) y los no competitivos, que no dependen de la concentración del sustrato (Horton y col., 1995).

Las enzimas se distinguen de los catalizadores químicos por su alto poder catalítico, varios órdenes de dimensión mayor; por la alta especificidad tanto en el sustrato que utiliza, como en la reacción que cataliza y porque generalmente pueden regularse mediante iones o moléculas pequeñas. Además, las enzimas suelen catalizar reacciones a temperaturas, presiones y valores de pH mucho menos severos (y, por tanto, a menor costo) que los catalizadores químicos.

La actividad de una enzima depende tanto de su secuencia de aminoácidos como de las estructuras superiores. Si una enzima pierde su forma nativa (se desnaturaliza), generalmente pierde su actividad, si es descompuesta en sus aminoácidos constituyentes siempre se destruye su actividad catalítica.

Algunas enzimas sólo requieren para la catálisis de los grupos funcionales de sus aminoácidos; en cambio, otras requieren, para ser activas, de un grupo no proteico llamado *cofactor*. Los cofactores pueden ser uno o más iones inorgánicos o un compuesto orgánico llamado *coenzima*. También hay enzimas que requieren ambos (ion y coenzima). La parte proteica de la enzima se denomina *apoenzima*, la enzima completa (apoenzima y grupo prostético) se llama *holoenzima*. Cabe aclarar que aunque hasta mediados del siglo XX, los avances en la purificación, cristalización y secuenciación de enzimas, con el apoyo de técnicas como la difracción de rayos X indicaban que todas las enzimas eran proteínas, estudios más recientes han demostrado que existen moléculas de ARN con capacidad catalítica, también conocidas como ribozimas (Fersht, 1980; Walter y Engelke, 2002).

### **5.1.1 Sitio activo y sitio regulatorio**

Las enzimas suelen compararse con una cerradura cuya llave es el sustrato, esta comparación llevó al concepto de sitio activo. El sitio activo es la región en la que se forma el complejo Enzima-Sustrato. Esta unión generalmente se da por fuerzas débiles, como los puentes de hidrógeno y, en menor grado, por uniones covalentes (Horton y col. 1995).

Algunas enzimas, además del sitio activo poseen un sitio que puede ser importante para la regulación de la actividad de la enzima (*sitio regulatorio*). Una molécula efectora o inhibidora puede unirse a este sitio y causar un cambio conformacional en la proteína de modo que el sitio esté más disponible (o menos, en presencia de un inhibidor) para la unión con el sustrato o para aumentar, o bien, reducir la rapidez de la reacción (Marison, 2002).

### 5.1.2 Producción industrial de enzimas

La explotación comercial de enzimas microbianos fue iniciada por Jokichi Takamine un Japonés que emigro a E.E.U.U., que en 1884 patentó un método para la preparación de enzimas diastásicos a partir de mohos comercializados con el nombre de Takadiastasa.

El desarrollo de fermentaciones de enzimas industriales fue iniciado por Boidin y Efront en España y Alemania respectivamente, quienes en 1917 patentaron el empleo de *Bacillus subtilis* y *Bacillus mesentericus* para obtener amilasas y diastasas también, mediante técnicas de cultivo en superficie.

Los métodos de cultivo en superficie para la producción de enzimas fúngicos se utilizaron en E.E.U.U. en los años 50's y aún hoy continúan empleándose, especialmente en Japón. Las fermentaciones fúngicas sumergidas se utilizaron en E.E.U.U. y Europa para la producción de enzimas basándose en la experiencia conseguida con las fermentaciones sumergidas en el desarrollo del proceso de producción de *Penicillium*, en los Northern Regional Research Laboratories (NRRL) de E.E.U.U. (Aguilar, 1998).

La introducción de enzimas microbianos industriales en el mercado estableció el fundamento de la tecnología para la aplicación de enzimas, particularmente en el área del procesado de alimentos como la producción de cervezas y zumos de frutas y la manufactura de hidrolizados de almidón. En los años 60's el mercado de las enzimas industriales se expandió dramáticamente al incluirse proteasas alcalinas en los detergentes en polvo, la producción y el empleo de la glucosa isomerasa microbiana para la producción de jarabes de maíz ricos en fructuosa, representó un hito muy importante de esta década, produciéndose un gran impacto en el mercado de edulcorantes calóricos dominado hasta entonces por la sacarosa. Otro desarrollo técnico significativo de los años 70's consistió en la comercialización de la alfa-amilasa estable a temperaturaselevadas obtenida a partir de *Bacillus licheniformes*. La capacidad de esta enzima para licuar el almidón a temperaturas de hasta 110°C no solo

---

ha hecho más eficaz el proceso de hidrólisis del almidón sino también ha impulsado el aislamiento o modificación de otras enzimas con estabilidad elevada (Aguilar, 1998).

El primer aspecto de importancia que debe considerarse para diseñar un proceso para la producción de enzimas microbianas es la selección del microorganismo que ha de utilizarse. En general, se buscan ciertas características en el microorganismo productor, como son: No ser patógeno ni producir toxinas, producir la enzima deseada en altos rendimientos y, de preferencia de manera extracelular, permitir que los costos de producción, recuperación y/o purificación sean razonables. Sin embargo, en ocasiones el microorganismo seleccionado corresponde a aquel que produce una enzima con características particulares (mayor actividad, estabilidad, etc.) aunque esto afecte alguna de las características antes mencionadas.

Existen dos tecnologías principales para la producción de enzimas microbianas, de las cuales se desprenden algunas variantes. Estas tecnologías son la Fermentación Líquida Sumergida (FLS) y la Fermentación en Estado Sólido (FES) cada una presenta ventajas y desventajas con respecto a la otra.

La FLS es aquella en la que los nutrientes y el microorganismo se encuentran en fase acuosa. La casi totalidad de enzimas comercialmente producidas en occidente utilizan este sistema. La FLS tiene la gran ventaja de la homogeneidad que se puede alcanzar en el medio de cultivo.

Los factores más importantes que influyen en este tipo de fermentaciones son: la temperatura y pH de incubación, la composición del medio nutritivo y la aireación; todos ellos se pueden regular en los diferentes biorreactores que utilizan este sistema.

La FES se refiere al crecimiento de microorganismos sobre medios nutritivos en ausencia de agua libre. Se ha empleado desde hace miles de años para la elaboración de alimentos tradicionales (el *koji* en China y Japón, el

*tempeh* en Indonesia, diversos quesos en Europa, etc). Y desde ya hace algunas décadas, ha surgido un nuevo interés en la aplicación de esta tecnología para la producción de metabolitos tan diversos como enzimas, antibióticos, ácidos orgánicos o para el enriquecimiento de alimento para ganado.

Existen dos tipos de soporte sólido que se pueden utilizar para una FES: Un soporte inerte, como la esponja de poliuretano (PUF, por su nombre en inglés), el cual es humedecido por un medio nutritivo líquido; o un soporte nutritivo (generalmente un residuo agroindustrial), el cual puede ser enriquecido por una solución de sales, fuentes orgánicas de nitrógeno y/o carbono. Dentro de esta segunda categoría de sustratos encontramos: bagazo de caña, salvado de trigo, paja de arroz, cascarilla de soya, paja de trigo, entre otros.

Aunque la FES ha demostrado ser más efectiva que la FLS para la producción de ciertos metabolitos secundarios y enzimas asociadas con el crecimiento estacionario, muchos de estos productos siguen produciéndose por FLS (Robinson y col. 2001). Dentro de las ventajas que ofrece este sistema están: rendimientos iguales o mayores que los obtenidos por FLS, menor posibilidad de contaminación con bacterias y levaduras, proporciona un ambiente similar al de los hongos filamentosos en la naturaleza, la construcción de los reactores suele ser más compacta, sencilla, con menores requerimientos energéticos y reducidos efluentes contaminantes. Además, en ocasiones los productos obtenidos por FES tienen mayor tolerancia a cambios fisicoquímicos del medio (Pérez-Guerra y col. 2003).

En los procesos de producción de enzimas las materias primas puede representar del 50 al 70% del costo total de producción. Por ello, en el escalamiento de un proceso de esta naturaleza, se prefiere sustituir los medios sintéticos de alta pureza y elevado costo por otros más baratos. Cuando las enzimas van a purificarse, el costo relativo de las materias primas se reduce significativamente, por ello en ocasiones se prefiere utilizar componentes de

mayor costo pero de una pureza tal que facilite las operaciones siguientes de recuperación y purificación (López-Munguía, 2002).

Actualmente la tendencia industrial es el reemplazo de muchas enzimas provenientes de tejidos por aquellas que resultan de la aplicación de cultivos de microorganismos seleccionados, que generan la enzima específica. La producción de enzimas por microorganismos tiene la ventaja de su costo, generalmente menor, y por realizarse en un periodo relativamente breve: Por ejemplo, 1 a 5 días en el caso de una fermentación discontinua por lotes ("batch"). Además, se puede incrementar el rendimiento de una enzima específica por un determinado organismo, recurriendo a modificar sus condiciones ambientales, o bien, a formar por vía genética cepas mutantes, en las cuales la producción de la enzima puede ser varias veces superior que en la cepa original.

### **5.1.3 Determinación de la actividad enzimática**

El estudio cinético de una enzima proporciona datos útiles para la optimización de procesos catalizados por enzimas. Por eso, para llegar a utilizar adecuadamente estos sistemas biológicos, es indispensable contar con métodos para la medición de la actividad enzimática.

El producto de una fermentación para la producción de enzimas se cuantifica en términos de capacidad catalítica disponible, llamada también actividad enzimática. Para este fin, la Comisión Internacional de Enzimas sugirió la definición de unidad de actividad como la cantidad de enzima que transforma 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto bajo condiciones definidas (las condiciones de pH, temperatura, concentración de sustrato, etc., en las que se presenta una mayor actividad enzimática). Sin embargo, esta definición no puede ser aplicada en todos los casos. La actividad de la enzima generalmente se mide en condiciones de estado estacionario, donde la concentración de sustrato es mucho mayor que la concentración de la enzima (usualmente 5 o

más veces el valor de  $K_m$ ) de esta manera, la velocidad de reacción difícilmente variará debido a cambios en la concentración de sustrato.

Las reacciones catalizadas por enzimas exhiben cinética de saturación. A bajas concentraciones de sustrato, la velocidad de la reacción es proporcional a la concentración del sustrato y la reacción es de primer orden con respecto al sustrato. A medida que la concentración de sustrato aumenta, la rapidez de la reacción disminuye y ya no es proporcional a la concentración de sustrato; la reacción es de orden mixto. A concentraciones aún más altas la rapidez de reacción es constante e independiente de la concentración de sustrato, la reacción se vuelve de orden cero (Marison, 2002).

#### **5.1.4 Microorganismos más usados en la producción de enzimas**

Los organismos más utilizados en la producción de enzimas extracelulares industriales son los *Bacillus* y *Aspergillus*, los cuales en su conjunto representan del 80 al 85% del mercado de enzimas extracelulares, *Trichoderma resei* el principal productor de celulasa. La glucosa isomerasa se produce a partir de especies de *Arthrobacter*, *Streptomyces* y *Actinoplanes* para la manufactura de jarabes de fructuosa (Aguilar, 1998).

Actualmente se están realizando importantes investigaciones sobre la producción de la enzima tanasa. Esta enzima es producida por diferentes géneros de mohos, principalmente de *Aspergillus*, *Penicilium*, *Fusarium*, *Rhizopus* y *Trichoderma* (Libuchi y col., 1967; Bajpai y Patil, 1997), además se ha reportado que algunas bacterias y levaduras son capaces de producirla (Deschamp, 1983; Aoki y col., 1976).

La tanasa también puede extraerse de fuentes vegetales y animales (Sourlangas, 1947; Begovic y Duzic, 1977). La elaboración de enzimas de origen microbiano comprende la selección de microorganismo puro e identificado.

## 5.2 TANIN ACIL HIDROLASA

### 5.2.1 Generalidades

La enzima tanasa es una hidrolasa (EC; 3.1.1.20) que actúa sobre algunos taninos (Figura 1). Su nombre correcto es tanin acil hidrolasa (TAH) y desempeña un papel importante en la formación de los taninos complejos en las plantas, los cuales por definición son un grupo de compuestos fenólicos hidrosolubles con diferentes pesos moleculares que dependerán de los enlaces que posean con proteínas, polisacáridos (ejemplos la celulosa y la pectina) y gelatina (Swain y Bate-Smith, 1962), variando entre 500 y 20,000 D; además, la TAH está involucrada en la maduración de las frutas, debido a que desesterefica algunos ésteres formados a partir de los ácidos quebulínico, gálico y hexahidrofenólico con la glucosa (Madhavakrishna y col., 1960).



Figura 1.- Reacción de hidrólisis de ácido tánico (tanino hidrolizable). R<sub>1</sub>, galloil y R<sub>2</sub> digalloil.

Con relación a los sustratos de la TAH, muchos autores usan la palabra tanino en forma generalizada, pero esto es erróneo, debido a que no sólo se trata de un único compuesto. Lekha y Lonsane (1997), reportaron que la terminología relacionada con el tema es muy pobre, sobre todo en la literatura antigua, y criticaron la forma usada por Haslam y Stangroon en el 1966, para referirse al ácido tánico como “taninos”. En el trabajo presentado por Lekha y Lonsane (1997), se sugiere que la terminología correcta debe apegarse a la clasificación de los compuestos fenólicos en cuestión, los cuales se dividen en dos grandes grupos: taninos hidrolizables y condensados. El primer grupo involucra un alcohol polihídrico esterificado con ácido gálico o alguno de sus derivados, por lo

que se incluyen las familias de galotaninos y elagitaninos; el segundo grupo está formado por fenoles del tipo flavan conocidos como flavolanos (Nishira y Joslyn, 1968; Garcia-Peña y col., 1999; Lekha y Lonsane, 1997).

El contenido de azúcares y la disponibilidad como sustratos de la TAH son dos de las diferencias entre los taninos hidrolizables y los condensados. Se ha reportado que los taninos condensados no poseen residuos de azúcares, solamente son polímeros de flavan-3-ol o del flavan-3,4-diol (Lekha y Lonsane, 1997). Así también, George y Sen (1960) demostraron que la TAH no actúa sobre este tipo de taninos, únicamente sobre los taninos hidrolizables. En la literatura son escasos los trabajos relacionados con la biodegradación de los taninos condensados, lo que ha dado como resultado una falta de comprensión, sobre los mecanismos involucrados en la hidrólisis de dichos compuestos.

#### **5.2.1.1 Fuentes de obtención**

En el caso de fuentes de origen animal, la tanasa se puede extraer de la mucosa ruminal e intestino delgado de bovinos. Probablemente se encuentra en estos animales para poder hidrolizar el ácido tánico presente en su dieta y convertirlos en fenoles y azúcares, los cuales pueden ser aprovechados fácilmente (Aguilar y Gutiérrez-Sánchez, 2001). La TAH ha sido extraída de plantas que contienen taninos hidrolizables: frutas de myrobalan o haritaki (*Terminalia chebula*), vainas de dividivi o cascalote (*Caesalpinia coriaria*) y hojas dhawa (*Anogeissus latifolia*); también ha sido aislada de fuentes vegetales que contienen taninos condensados, como avaram (*Cassia auriculata*), badúl (*Acacia arabica*) y corteza de konnam (*Cassia fistula*) (Madhavakrishna y col. 1960). Niehaus y Gross (1997) aislaron y caracterizaron una tanasa vegetal a partir de hojas de una especie de roble (*Quercus robur*). Se cree que la tanasa de origen vegetal tiene importancia en la maduración de las frutas, además puede intervenir en los mecanismos de defensa en contra de insectos y herbívoros (Albertse, 2002).

Aunque se sabe que los taninos inhiben el crecimiento microbiano, existen especies que han desarrollado los mecanismos para degradarlos, entre ellos la producción de la enzima tanasa. Se han reportado bacterias, mohos y levaduras productores de tanasa (Tabla 1). Desde que Tieghem descubrió accidentalmente la tanasa, los hongos filamentosos han sido el grupo de microorganismos más ampliamente estudiados para la producción de esta enzima, siendo los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* los más utilizados para este fin. Tieghem observó la producción de ácido gálico cuando crecieron dos cepas fúngicas en una solución de ácido tánico, posteriormente identificadas como *Aspergillus niger* y *Penicillium glaucum*. Sin embargo, fueron Fernback y Pottevin quienes descubrieron independientemente la naturaleza enzimática de esta hidrólisis utilizando extracto enzimático de fermentaciones utilizando *A. niger* (Lewis y Starkey, 1969).

Otros mohos utilizados exitosamente para la producción de tanasa pertenecen a los géneros *Cryphonectria*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, entre otros. Bajpai y Patil (1996, 1997) compararon la producción de tanasa por varios hongos filamentosos, encontrando que los hongos filamentosos *Fusarium solani*, *Trichoderma viride* y *Aspergillus fischerii* producen mayores títulos de actividad tanasa que *Aspergillus niger*, una de las especies más ampliamente utilizadas para este fin. Lewis y Starkey (1969) reportaron por primera vez una bacteria (*Achromobacter* sp) capaz de utilizar galotaninos como única fuente de energía. Deschamps y col. (1980, 1983) aislaron mediante cultivos de enriquecimiento un grupo de bacterias capaces de crecer en un medio con ácido tánico como única fuente de carbono, y a partir de ellas extrajeron por primera vez la tanasa bacteriana. En años más recientes ha habido interés en la producción de tanasa bacteriana, y se han aislado nuevas cepas para su producción de diferentes fuentes. Skene y Brooker (1995) aislaron una bacteria anaeróbica del rumen de cabras salvajes. Otras cepas bacterianas productoras de TAH han sido aisladas de heces humanas, alimentos fermentados, suelo, desperdicios de olivo, mosto de uva y efluentes de tanerías.

---

**Tabla1.** Fuentes microbianas de tanasa

Hongos filamentosos	Hongos filamentosos (cont.)	Bacterias
<i>Aspergillus aculeatus</i>	<i>Penicillium caryophilum</i>	<i>Achromobacter sp.</i>
<i>Aspergillus alliaceus</i>	<i>Penicillium charlessi</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
<i>Aspergillus aureus</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Bacillus polymyxa</i>
<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Corynebacterium sp.</i>
<i>Aspergillus caespitosum</i>	<i>Penicillium crustosum</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Aspergillus fischeri</i>	<i>Penicillium digitatum</i>	<i>Klebisella planticola</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Penicillium glabrum</i>	<i>Klebisella pneumoniae</i>
<i>Aspergillus foetidus</i>	<i>Penicillium glaucum</i>	<i>Pseudomonas solanaceanum</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Penicillium islandicum</i>	<i>Streptococcus Boris</i>
<i>Aspergillus gallomyces</i>	<i>Penicillium notatum</i>	<i>Streptococcus gallolyticus</i>
<i>Aspergillus japonicus</i>	<i>Penicillium restrictum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium variable</i>	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>
<i>Aspergillus rugulosus</i>	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Trichoderma hamatum</i>	<i>Lactobacillus animalis</i>
<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Lactobacillus murinus</i>
<i>Cryphonectria parasitica</i>	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Cunninghamella sp.</i>	<i>Verticillium sp</i>	<i>Weissella paramesenteroides</i>
<i>Fusarium oxysporium</i>		<i>Leuconostoc fallax</i>
<i>Fusarium solana</i>	<b>Levaduras</b>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Heliocostylum sp.</i>	<i>Candida sp.</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Mucor sp.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Neurospora crassa</i>	<i>Mycotorula japonica</i>	<i>Citrobacter freundii</i>

Adaptado de: Aguilar y col., 2007

Existen pocos reportes sobre la producción de tanasa de levaduras. Aoki y col. (1976) produjeron, purificaron y caracterizaron la enzima tanasa de una levadura del género *Candida*. Albertse (2002) logró expresar el gen de la tanasa de *A. oryzae* en una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo, los títulos de actividad obtenidos fueron muy bajos. Por otra parte, Zhong y col. (2004) clonaron y expresaron también el gen de la tanasa de *A. oryzae* en otra levadura (*Pichia pastoris*) obteniendo una alta producción de la enzima (7000 U/L). Por último, Hong y col. (1990), estudiaron la producción de TAH por 6 especies de Basidiomicetos (*Lenzites betulina*, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotas sajor-caju*, *Lyophyllum decastes* y *Pleurotus ostreatus*).

### 5.2.1.2 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 *Caesalpineae 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 *Caesalpineae tinctoria* (nombre común tara).

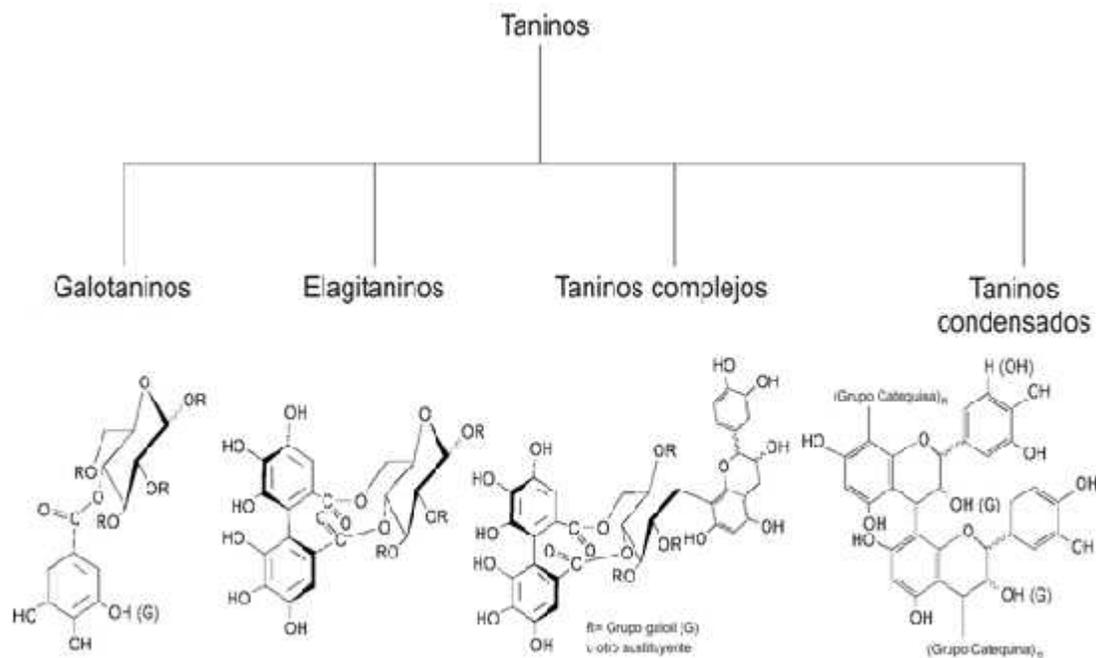
Los taninos condensados o proantocianidinas son polímeros de flavan 3-ol (grupo catequinas y de flavan 3-4 diol (grupo leucoantocianidinas). Su contenido de carbohidratos es nulo o muy bajo. Por ser grandes polímeros

---

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.-** clasificación de los taninos

### 5.2.1.3 Mecanismo de acción

La tanasa presenta actividad de esterasa y depsidasa. Actúa sobre galotaninos, elagitaninos y taninos complejos, pero sólo rompe enlaces éster y depsida, sin afectar las uniones C-C, por lo cual no actúa sobre taninos condensados (Haslam y Stangroom, 1966).

La TAH hidroliza el ácido tánico dando como productos 9 moléculas de ácido gálico y 1 de glucosa por cada molécula de sustrato (Figura 3). Los compuestos intermediarios en esta reacción son: 1, 2, 3, 4, 6 penta-galoil-glucosa, 2, 3, 4, 6 tetra-galoil-glucosa y dos tipos de mono-galoil-glucosa. Cuando el sustrato de la reacción es un metil-éster del ácido gálico, la TAH produce ácido gálico y metanol (Aguilar y Gutiérrez Sánchez, 2001).

Para que un éster forme un verdadero complejo enzima-sustrato con la TAH, deben cumplirse las siguientes condiciones:

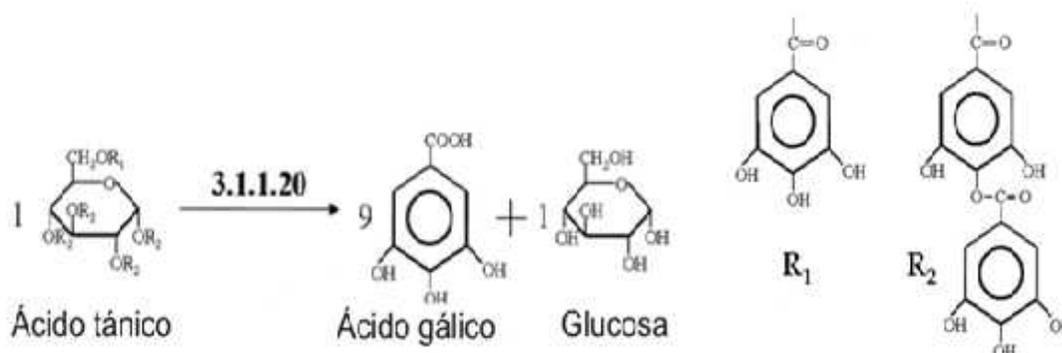


Figura 3.- Hidrólisis del ácido tánico catalizada por la TAH (Aguilar y Gutiérrez-Sánchez, 2001).

- No existe restricción en cuanto a la parte alcohólica del éster, aunque la parte ácida debe ser ácido gálico.
- Cualquier grupo hidroxilo fenólico puede reaccionar con el sitio de la tanasa, impidiendo que se forme el verdadero complejo enzima-sustrato.
- El enlace éster o carboxilo no se unen directamente al sitio activo de la enzima (Albertse, 2002).

#### **5.2.1.4 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).

#### **5.2.1.5 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).

### 5.2.1.6 Regulación y biosíntesis

Dependiendo de la cepa y las condiciones de fermentación, la producción de la enzima tanasa se puede dar de forma constitutiva o inducida. Knudson (1913) reportó que la producción de tanasa sólo ocurre en presencia de ácido tánico, dando como productos finales de la hidrólisis, el ácido gálico y la glucosa. Posteriormente Seiji y col. (1973) observaron la producción de tanasa cuando el microorganismo crece solamente sobre glucosa.

Por otra parte, Siegenthaler y col. (1997) demostraron que *Aspergillus japonicus* produce tanasa de manera constitutiva cuando crece en un medio con azúcares simples o complejos, pero que la producción de la enzima se duplicó cuando creció con ácido tánico como única fuente de carbono.

Bajpai y Patil (1997) estudiaron el efecto de diferentes sustratos (ác. gálico, pentagalolil-glucosa, metil-galato y pirogalol) como inductores de la actividad tanasa en cuatro especies de hongos filamentosos (*Aspergillus niger*, *A. fischerii*, *Fusarium solani* y *Trichoderma viride*). Encontraron que sólo *A. niger* no produjo tanasa de manera constitutiva, pero también fue la única especie capaz de crecer en presencia de pirogalol produciendo la enzima; cada especie respondió diferente a cada sustrato.

Así, *A. fischerii* fue inducido mayormente por el ácido gálico, *F. solani* por el galotanino y *T. viride* por metil-galato.

Los mecanismos de regulación de la TAH aún no están claros, y existe cierta controversia acerca del papel que desempeñan algunos compuestos en la inducción y represión de su expresión. Es generalmente aceptado que el ácido tánico no puede actuar directamente como inductor, ya que su molécula es muy grande y reactiva como para atravesar la membrana celular de los microorganismos.

Esto sugiere que la producción de la TAH es inducida por algún compuesto intermediario de la hidrólisis de los taninos, el cual es liberado por la

---

acción de la tanasa producida constitutivamente (Aguilar y Gutiérrez-Sánchez, 2001). Por otro lado, el ácido gálico, que ha sido utilizado como inductor para la producción de tanasa (Bajpai y Patil, 1997) también se ha visto implicado en la regulación por producto final (Siegenthaler y col., 1997).

Los mecanismos de regulación de la tanasa son muy diferentes en FES y FLS. Aguilar y col. (2001a y 2001b) estudiaron los patrones de inducción y represión de la producción de tanasa en ambos sistemas. Encontraron que mientras la adición de ácido tánico a concentraciones mayores de 25 g/L inhibió fuertemente la producción de tanasa en FLS, en FES la enzima se produjo en concentraciones de ácido tánico de hasta 200 g/L.

La adición de pequeñas cantidades de glucosa (12.5 g/L) incrementó los títulos de actividad en FES, con menor efecto en FLS. Mayores concentraciones de glucosa resultaron en una fuerte represión catabólica en FLS, pero tuvo un efecto muy pequeño en FES. Por último, utilizando ácido gálico como única fuente de carbono, la producción de tanasa fue inferior a los niveles basales de actividad.

#### **5.2.1.7 Propiedades de la TAH**

Uno de los tópicos más estudiados de la TAH es aquel relacionado con las propiedades fisicoquímicas de la enzima; principalmente, las contribuciones han sido generadas usando cultivos en estado líquido, aun así, estos reportes no han podido aportar conocimientos que permitan entender cómo actúa y como se regula la TAH.

Se sabe que la TAH fúngica es una glicoproteína (Aoki y col., 1976; Rajakumar y Nandy, 1983) formada por una mezcla de una esterasa y una dehidrasa (Toth, 1944; Haslam y col., 1961; Beverini y Metche, 1990) cuya estabilidad al pH se encuentra en un rango de 3.5 a 8.0, posee un pH óptimo de 5.5 a 6.0, una estabilidad a la temperatura entre 30 y 60<sup>0</sup>C, una temperatura óptima de 30 a 50<sup>0</sup>C, un punto isoeléctrico de 4.0 a 4.5 y un

---

peso molecular entre 186 a 300 kDa. La actividad TAH es inhibida por  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  e inactivada por o-fenantrolina, EDTA, 2-mercaptoetanol, tioglicolato de sodio, sulfato de magnesio y los cloruros de calcio y magnesio; por supuesto que estos valores pueden variar en función de la cepa usada y de las condiciones de producción y purificación empleadas (Yamada y col., 1968; Adachi y col., 1971; Barthomeuf y col., 1994; Libuchi y col., 1972; Chae y Yu., 1983; Rajakumar y Nandy, 1983; Aoki y col., 1976).

#### **5.2.1.8 Evaluación de la actividad TAH.**

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).

#### **5.2.1.9 Purificación de TAH**

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
 

---

**Tabla 2.** Propiedades de la TAH de *A. niger* producida por fermentación líquida.

CARACTERÍSTICAS	VALOR
Punto isoeléctrico	4.3
Peso molecular	186,000 Dts
Contenido de azúcares	43.0%
pH óptimo	
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 <sub>2</sub> , FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub>
Inactivadores	o-fenantrolina, P.M.S.F., EDTA, 2-mercaptoetanol, tioglicolato de sodio, MgSO <sub>4</sub> , CaCl <sub>2</sub> , MnCl, CoCl <sub>2</sub> .

---

Datos tomados de García-Peña y col., (1996).

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.

En otro estudio de purificación de la TAH en fermentación en estado sólido, García-Peña (1996) centrifugó el extracto obtenido 120 h de cultivo usando la cepa de *A. niger* N888, lo filtró en membrana de nylon y lo dializó para purificarla, usando una cromatografía de baja presión (BIO-RAD) y caracterizarla por isoelectroenfoque y cromatografía de permeación en gel. Sus resultados mostraron que la TAH posee un punto isoeléctrico de 3.8, un peso molecular de 80-85 kDa, un pH óptimo de 6.0 y una

---

temperatura óptima de 70°C. La Tabla 3 muestra un resumen de algunas de las características de la TAH fúngica producida por fermentación líquida y por fermentación sólida

**Tabla 3.** Resumen de algunas características de la TAH microbiana producida por fermentación líquida y sólida.

Sistema de fermentación	Microorganismo	Punto Isoeléctrico	Peso Molecular (Da)	pH Óptimo	Temperatura Óptima	Referencia
Líquido	<i>A. niger</i>		194,000	5.0-5.5	50-60	Adachi y col., 1976
Líquido	<i>C. sp K-1</i>			6.0	50	Aoki y col., 1976
Líquido	<i>A. oryzae</i>	3.5 – 4.0				Beverini y Metche, 1990
Líquido	<i>A. niger</i>	4.3	186,000	6.0	35	Barthomeuf y col., 1994
Sólido	<i>A. niger</i> PKL-104			5.5	60	Lekha y Lonsane, 1994
Sólido	<i>A. niger</i> N888	3.8	165-kDa	6.0	70	García-Peña, 1999

### 5.2.2 Usos de la Tanasa

La tanasa es usada en la manufactura de té instantáneo y otros productos también de origen vegetal, principalmente para eliminar o al menos disminuir la astringencia de productos como el té, el café y los jugos de frutas. También, es utilizada para clarificar productos como los jugos y hacerlos más apetitosos (Lehmberg *et al*, 1999; Barmentlo *et al*, 1993) y en la preparación de procianidinas las cuales tienen aplicación en la industria farmacéutica (Ariaga *et al*, 1998), así como en la clarificación de productos vegetales (Agbo *et al*, 1995).

### 5.3 Hongos filamentosos

Los hongos son organismos eucarióticos quimioorganotróficos, y su pared celular contiene quitina, celulosa o ambas. Se reproducen por medio de esporas. Las esporas son muy importantes en la clasificación de los hongos; sus clases se diferencian principalmente por las características morfológicas de los estadios sexuales de las esporas.

Los hongos no tienen clorofila y sus cuerpos son alargados. La morfología del talo y las esporas asexuales están en segundo lugar de importancia en la taxonomía de los hongos (Pelczar *et al*, 1990).

Los hongos filamentosos viven en muy diferentes hábitats terrestres, en los suelos, las plantas y los insectos (Burgstaller, 1990). Los hongos toleran y pueden desarrollarse en concentraciones de acidez relativamente elevadas. Soportan escalas de pH entre 2 a 9.0 pero el pH óptimo para casi todas las especies es de 5.6. Si bien, necesitan humedad para su desarrollo y pueden obtener agua de la atmósfera y del medio los hongos pueden sobrevivir en ambientes deshidratados. Casi todos los hongos son aeróbicos, su crecimiento se incrementa con la presencia de abundante oxígeno. Se desarrollan en condiciones de temperatura muy variada pero, entre 22 y 30°C es la óptima para la mayor parte de las especies (Pelczar *et al*, 1990).

La glucosa es la fuente de carbono mejor aprovechada por los hongos aunque otros azúcares como: la sacarosa, la maltosa y algunos compuestos más complejos, como el almidón y la celulosa, también pueden ser utilizados por muchas especies (Pelczar *et al*, 1990).

Los hongos son heterótrofos y saprofitos, ya que obtienen su alimento de materia orgánica muerta y muchos de ellos son parásitos cuando se alimentan de huéspedes vivos. Como saprofitos, destruyen plantas y restos orgánicos degradándolos a formas simples que constituyen la materia orgánica del suelo.

---

Los hongos filamentosos típicamente son saprófitos. Secretan una gran cantidad de enzimas encargadas del rompimiento y utilización de complejos poliméricos de tejidos de plantas y animales (MacKenzie *et al*, 1993). Dichas enzimas son liberadas a través de la membrana plasmática en el espacio periplásmico, en donde en algún momento, pueden ser secretadas al medio externo (Pelczar *et al*, 1990).

### 5.3.1 Estructuras de los hongos

- **Somáticas:**

Micelio es el conjunto de filamentos y un trozo del mismo se denomina hifa. Las hifas pueden presentar septos y entonces el micelio está tabicado. Septos primarios son los formados cuando hay divisiones nucleares y adventicias los otros. Si los tabiques están ausentes se habla de micelio continuo. Los mohos son micromicetos filamentosos.

Cuando el hongo es una célula aislada se dice unicelular o levadura. Los cortos filamentos compuestos por las células que brotan de una levadura constituyen el pseudomicelio.

Plecténquima es un conjunto de hifas entrelazadas que se asemejan a un tejido. Se dice prosénquima si las hifas pueden ser reconocidas y pseudoparénquima cuando han perdido su individualidad. Esclerocio es un plecténquima generalmente macroscópico que puede permanecer en vida latente. Rizomorfa es un cordón grueso donde el conjunto de las hifas fusionadas ha tomado el aspecto de raíz. Rizoides son las hifas de succión, como raicillas, que penetran en el substrato. Haustorio es la hifa de succión del hongo parásito dentro de la célula del hospedador.

Apresorios son unas hifas achatadas que se adhieren al substrato o al hospedador como sostén, especialmente en el comienzo de la infección.

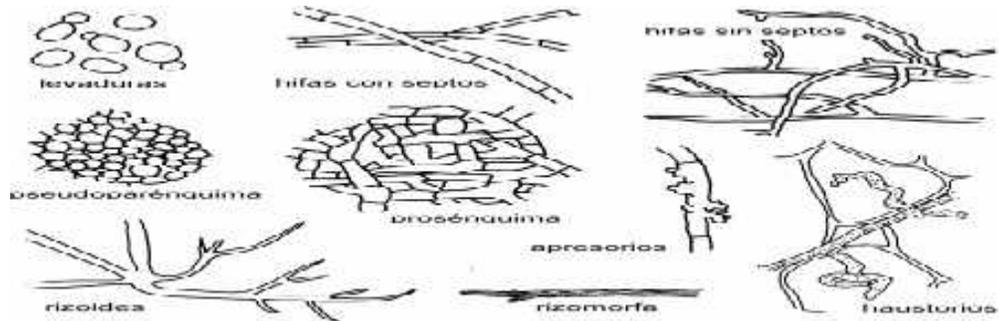


Figura 4.- Estructuras somáticas

- **Reproductoras:**

Anamorfo es el hongo con multiplicación asexual y teleomorfo es el mismo con reproducción sexual. Se les asigna distinto género y especie. Holomorfo indica el ciclo de vida total. Esporas son los elementos de perpetuación de la especie.

De acuerdo a la morfología reciben distinto nombre: alantospora con forma de banana, aleuriopora con base plana, dictiospora con septos longitudinales y transversales, didimospora con un tabique, equinulada como un erizo, escolescospora como un gusano, estaurospora como una estrella, feospora de color obscuro, fragmospora con tabiques transversales, fusiforme como un huso, helicospora como una espiral, hialospora de color claro y translúcido, planospora móvil, verrucosa con verrugas, zoospora con flagelos. Las balistosporas son proyectadas violentamente una vez maduras.

Las hipnosporas son aquellas capaces de permanecer con vida latente por largo tiempo.

Las esporas pueden ser de origen asexual (mitosporas) o sexual (meiosporas), y por su ubicación relativa internas o externas. Las mitosporas se originan en las estructuras anamórficas y las meiosporas en las teleomórficas.

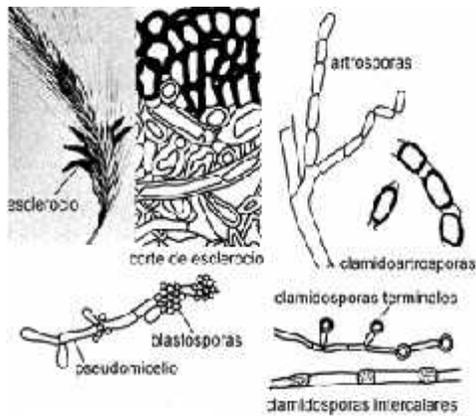


Figura 5.- Estructuras de resistencia y multiplicación

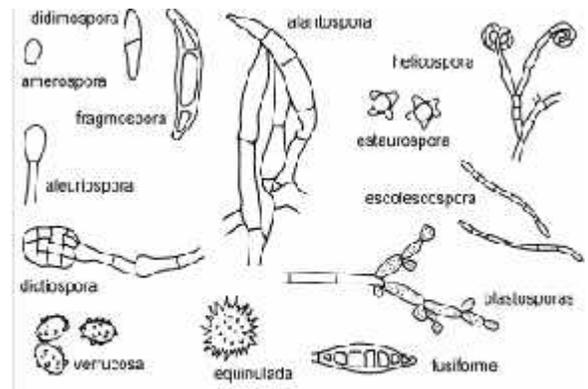


Figura 6.- Tipo de esporas.

- **Anamórficas:**

Artrosporas o artroconidios son esporas desarrolladas en una hifa terminal que al madurar se separan. En algunos hongos se forman artrosporas separadas por una zona libre de citoplasma (disyuntor) cuya pared se rompe liberando las entosporas o clamido-artrosporas. Clamidospora o clamidoconidio es una hipnospora o célula de resistencia, terminal o interhifal, con pared gruesa y sustancias de reserva. Blastosporas o blastoconidios son las esporas que se originan de una parte de una célula somática, una hifa, un conidióforo u otra espora, y se desarrollan antes de la formación del septo que lo separa de la célula de origen.

Conidios o conidiosporas son las esporas asexuadas externas. Si están implantadas directamente sobre la hifa se llaman sésiles. La parte del micelio que origina y sostiene a las esporas se denomina esporóforo y si se trata de conidios se dice conidióforo. Fiálide es la célula conidiógena que desde un extremo origina por brotación y sin aumentar su longitud, los fialoconidios o fialosporas. La pared de la fiálide suele extenderse en el ápice formando un collarín. Anélide es una célula conidiógena con el ápice ancho y cicatrices en anillo, que se alarga con la formación de cada espora. Los conidióforos pueden ser simples o ramificados y a veces están agrupados en un conidioma. En

*Penicillium* cada nivel de ramificaciones recibe distinto nombre, se llama *métulas* a las que sostienen a las *fiálides* productoras de esporas. En *Aspergillus* las *fiálides* o las *métulas* están implantadas sobre una vesícula o dilatación del esporóforo.

Los conidios nacen de los conidióforos aisladamente o quedan reunidos, ya sea en una cabezuela mucosa o en cadenas. Éstas se forman por sucesión *basípeta* cuando todas las esporas surgen de la célula conidiógena o *basífuga* si es por brotación de la espora anterior. A veces después que se forma un conidio, el conidióforo se alarga lateralmente y origina el segundo conidio. El proceso continúa y las esporas quedan en zig-zag (*proliferación simpodial*). En algunos hongos surgen, simultáneamente o no, varios conidios en diferentes puntos de la misma célula conidiógena (*brotación múltiple*).

Los conidióforos suelen estar reunidos en un haz llamado *coremio* o sobre un conjunto de hifas entrelazadas constituyendo un *conidioma*, ya sea un *esporodoquio* (*almohadilla* de *fiálides* con las esporas expuestas) o una *acérvula* (*estructura chata* y cubierta al principio por el tejido del hospedador donde los esporóforos están en *empalizada*). *Funículo* es una cuerda de hifas de las cuales surgen, a intervalos, los conidióforos. *Picnidio* es un conidioma globoso o en forma de *pera*, cuya pared *plectenquimatosa* está recubierta internamente por las células conidiógenas y está abierto por un *ostiolo*. Las esporas originadas se llaman *picnidiosporas*. También la cavidad *picnidial* puede estar encerrada en una estructura somática compacta denominada *estroma*.

*Esporangio* es una estructura globosa con una membrana *peridial* simple, generalmente en el extremo de un *esporangióforo*, que contiene innumerables *esporangiosporas*. El ápice dilatado del *esporangióforo* se llama *columela*. Cuando el *esporangio* tiene pocas esporas se denomina *esporangiolo*. Los *merosporangios* son *cilíndricos*, contienen pocas esporas y están reunidos sobre la *columela* o los extremos de las ramas del *esporangióforo*; si son *monosporados* suelen ser considerados como conidios. Los *zoosporangios* de

---



Ascosporas son las esporas sexuadas internas que se originan en un número limitado (generalmente 4 u 8) dentro de una célula llamada asco. En las levaduras se fusionan los citoplasmas de dos células de polaridad distinta e inmediatamente o mucho después de la cariogamia ocurre la meiosis formándose las ascosporas dentro del asco libre.

En los hongos filamentosos se producen gametangios (anteridio y ascogonio), en generales morfológicamente distintos, y los núcleos pasan a través del poro formado en el punto de contacto o de un tubo receptivo llamado tricogino. En algunas especies heterotálicas los espermacios, microconidios incapaces de germinar, cumplen la función de gametas masculinas. Después de la fecundación nacen hifas ascógenas binucleadas cuyas células terminales, en forma de cayado, se convierten en ascos.

Las hifas somáticas vecinas a los elementos sexuales suelen formar un plecténquima originando un ascoma que si está cerrado y es esférico se llama cleistotecio. Cuando tiene las hifas fértiles (himenio) estratificadas y generalmente una forma de pera, poseyendo en la madurez un poro u ostiolo por donde salen las ascosporas, se denomina peritecio. Si el plecténquima tiene forma de copa con el himenio expuesto se habla de apotecio. El ascostroma es una estructura con cavidades o lóculos que contienen ascos.

Los ascos tienen distinta forma según las especies, pueden ser sésiles o pedicelados, estar organizados en un fascículo común o nacer independientemente. Con frecuencia hay entre los ascos hifas estériles alargadas llamadas parafises. En el ostiolo suele haber hifas cortas como pelos, las perifises. Algunos ascomas tienen hifas ornamentales. La liberación de los ascos puede ser explosiva o no. En algunos ascos se abre un opérculo en el momento de liberar las esporas. Los ascos bitunicados tienen dos paredes y la externa se rompe, dejando expandirse la interna, antes de la descarga de las ascosporas.

Basidiosporas son las esporas sexuales externas que se originan en el basidio. Este es una célula hifal binucleada que sufre cambios morfológicos y se llama probasidio al estado o parte de la misma donde se produce la cariogamia. Se denomina metabasidio a la parte o estado en el cual ocurre la meiosis y forma 4 (a veces 2) tubos pequeños o esterigmas en cada uno de los cuales se forma una basidiospora.

Hay dos tipos de metabasidios. El holobasidio es cilíndrico con aspecto de clava y en algunos hongos tiene forma de tenedor. Los fragmobasidios están divididos generalmente en 4 células por septos transversales o longitudinales. En muchos hongos las hifas se agregan para formar un basidioma macroscópico y en aquellos con el himenio expuesto, las basidiosporas están sobre unas laminillas radiales o tubos o espinas ubicados generalmente en el envés.

Algunos basidiomas son como una sombrilla extendida (píleo) sostenida por un pie que a veces tiene un anillo o resto de una membrana que unía al píleo con el pie. Otras veces hay en la base una volva o resto de un velo que envolvía a todo el basidioma joven. Hay hongos cuyos basidiomas se asemejan a un abanico, en otros son cilíndricos, esféricos o coralinos. En el basidioma cerrado el peridio envuelve a la gleba fértil y se rompe cuando las esporas están maduras.

En las royas y carbonos el probasidio es una espora de pared muy gruesa llamada teliospora o teleutospora, que germina formando un tubo o metabasidio que dará origen a las basidiosporas. En el micelio uninucleado de algunas royas se forma el espermogonio o picnio que da ametas llamadas espermacios o picnosporas y lleva las hifas receptoras en la parte exterior, pero no hay autogamia.

Las células binucleadas formadas como resultado de la espermatización constituyen el strato basal del ecidio y comienzan a dividirse produciendo cadenas de ecidiosporas. Por germinación de una ecidiospora surge un micelio

---

binucleado que origina el uredosoro con las uredosporas generalmente de largos pedicelos. Éstos al germinar dan otra vez un micelio dicariótico que puede formar nuevas uredosporas o bien teleutosporas con células binucleadas y paredes gruesas en el teliosoro o teleutosoro.

En los carbones el micelio binucleado se forma por fusión de dos células compatibles de diverso tipo y constituye un soro de teleutosporas o ustilosporas. Cada una de éstas al germinar se convierte en un metabasidio sin esterigmas que origina las basidiosporas o esporidios por brotación.

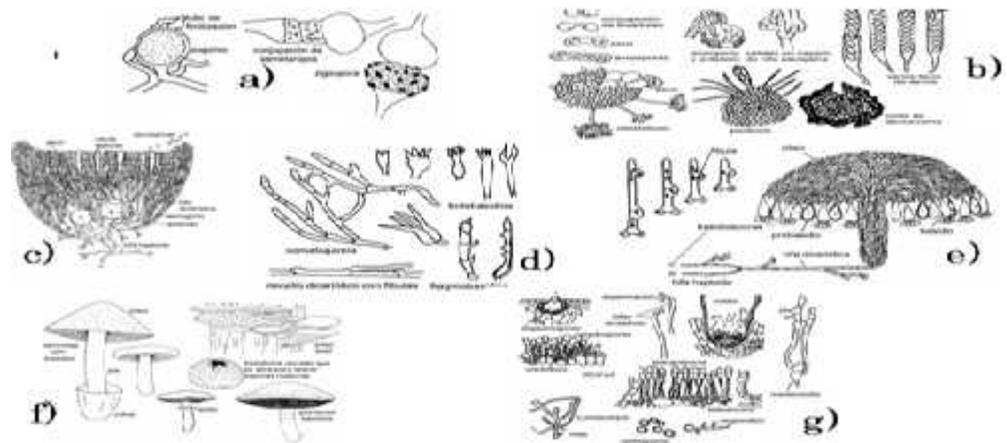


Figura 3. (a). Estructura teleomorfas de hongos con micelio continuo, (b). Estructura con meiosporas internas, (c). Esquema de un escome (apotecio), (d). Estructuras de basidiomicetos, (e). Esquema de un basidioma, (f). Esquema de basidiomas, (g). Royas y carbones.

## **6. Materiales y métodos**

El desarrollo experimental del presente trabajo, se realizó en dos etapas. La primera etapa consistió en la purificación y conservación de hongos filamentosos de muestras de tierra de la Región Sureste del Estado de Coahuila. La segunda etapa consistió en la utilización de los hongos filamentosos aislados de la Región Sureste del Estado de Coahuila, en sales Czapek-dox con Acido Tánico en cultivo medio sólido y líquido.

### **6.1 Etapa I.- Purificación y Conservación de hongos filamentosos.**

#### **6.1.1 Recolección de muestras.**

Se muestreamos diferentes áreas de la Región Sureste del Estado de Coahuila, recolectando 10 muestras tomadas del suelo y de la micro flora regional de cultivos de maíz, chile así como también de las raíces de nogal.

#### **6.1.2 Preparar medios de cultivo.**

Se preparó 39g de medio PDA en matraces de 1000 ml en agua esterilizada, posteriormente se esterilizó en un autoclave Evar Mod. Ev24 (USA) a 15 libras de presión, a 121°C por 15 minutos. Se esperó a que el medio se enfriara un poco y en seguida se hizo el llenado de cajas Petri, colocando aproximadamente 30 ml de medio en cada caja.

#### **6.1.3 Siembra en cajas petri con PDA.**

Las muestras recolectadas en las diferentes áreas fueron sembradas en 4 diferentes puntos de las cajas petri que contenían agar PDA. Para evitar que no hubiera contaminación, se limpió perfectamente el área de trabajo con alcohol etílico (96 % v/v) y se colocaron mecheros alrededor del área de trabajo para esterilizar el mayor área posible. Una vez realizada la siembra, las cajas petri fueron almacenadas a 30°C por cinco días en incubadora Riossa (Modelo

E-17, Mexico). El mismo proceso fue repetido las veces necesarias hasta aislar y observar macroscópicamente que el hongo no estaba contaminado.

#### 6.1.4 Medios de cultivos para resembrar los hongos purificados.

##### CYA (Agar Czapek con extracto de levadura)

Reactivos	g/L
Extracto de levadura	3
Agar Czapek	5
3 g ZnSO <sub>4</sub>	
5 g CuSO <sub>4</sub>	1 ml /L
100 ml agua destilada	

##### MEA3 (Agar extracto de malta)

Reactivos	g/L
Extracto de malta	20 g
Peptona de carne	1 g
Sacarosa	20
Agar bacteriológico	20 g

##### G25 Agar con Nitrato

Reactivos	g/L
Agar Czapek dox	50
Extracto de levadura	3.7
Glicerol	250

Se preparó cada uno de estos medios en matraces de 1000 ml, en agua esterilizada, posteriormente se esterilizó en un autoclave Evar Mod. a 15 libras de presión, a 121°C por 15 minutos.

Se esperó a que el medio se enfriara un poco y en seguida se hizo el llenado de cajas Petri, colocando aproximadamente 30 ml de medio en cada caja.

### 6.1.5 Siembra en los distintos medios de cultivo

Con los hongos ya purificados se etiquetaron con un nombre para poder identificarlas posteriormente, en seguida se tomaron tres porciones de cada uno de los hongos puros con un sacabocado y se pusieron en forma de un triángulo en una caja en los distintos medios cada uno de los hongos puros (tres cajas petri por hongo una caja petri por de cada uno de los medios).

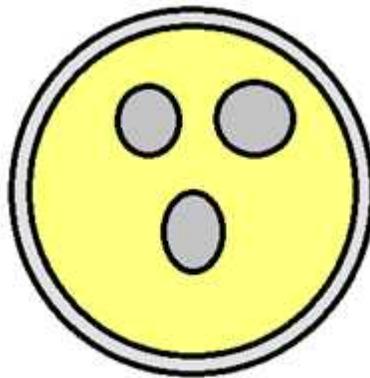


Figura 9.- Método de siembra con sacabocados

Para evitar que no hubiera contaminación, se limpio perfectamente el área de trabajo con alcohol etílico (96 % v/v) y se colocaron mecheros alrededor del área para hacerlo en un medio lo más limpio y estéril posible.

Posteriormente se sometieron a 30°C por cinco días en incubadora (Riossa modelo E-17, Mexico).

### 6.1.6 Caracterización morfológica

Después de purificar los hongos, se procedió a caracterizarlos e identificarlos en el microscopio. Para esto, se colocó una gota de azul de algodón sobre un portaobjetos, con un asa se tomó una muestra del hongo y se puso sobre el azul de algodón estirándola lo más posible; posteriormente se

---

colocó el cubre objetos y se observó con un microscopio Konus Campus # 5306.

### **6.1.7 Conservación de hongos puros**

Las cepas se almacenaron utilizando la siguiente metodología:

Se preparó una solución acuosa de glicerol al 10% (v/v), a esta solución se le agregó el equivalente en gramos al 9 % (p/v) de leche descremada (lala descremada).

La solución se mezcló hasta quedar disuelta la leche, posteriormente se esterilizó a 15 libras de presión, a 121°C por 15 minutos. Previamente se prepararon matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de agar PDA, estos matraces fueron inoculados cada uno con 250 µL de las esporas de cada una de las cepas, obtenidas con el método anterior.

Los matraces llevaron a una incubadora a 30 °C hasta observar la esporulación completa del microorganismo.

A estos matraces se les agregaron 20 mL de la solución de glicerol-leche descremada estéril y se les colocó el magneto. En una parrilla de agitación a una velocidad lenta se desprendieron las esporas y se llevo a cabo la cosecha de estas. La leche descremada con esporas se recolectó de los matraces para almacenarlos en tubos Eppendorff de 1.5 mL estériles. Los tubos fueron almacenados en un congelador a -20 °C hasta que fueron usados.

## **6.2 Etapa II.- Utilización de los hongos filamentosos.**

### **6.2.1 Medio de propagación**

El medio de propagación de las cepas fue PDA distribuido y solidificado en matraces erlenmeyer de 250 ml. El cual se inoculo con esporas de los hongos conservados anteriormente mencionados y se incubaron por cinco días a 30°C.

## 6.2.2 Propagación del inóculo

El inóculo se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 30 mL de medio de cultivo sólido PDA. Los matraces se inocularon con 300  $\mu$ L de esporas y se incubaron a 30 °C hasta observar la esporulación del hongo. Una vez esporulado en cada matraz se le agregaron de 30-50 mL de una solución de Tween 80 al 0.01% (v/v). La solución de Tween 80 se mezcló con agitador magnético previamente esterilizado por 5 min en una parrilla termo-agitadora. Terminado el tiempo de agitación, la suspensión de esporas de cada matraz se combinó para dar lugar al inóculo. Del matraz de inóculo se procedió al conteo de esporas. La suspensión de esporas fue diluida 1:100 (v/v) y posteriormente el número de esporas se realizó en un hematímetro (cámara de Neubauer) con el objetivo de 40 $\times$ . La concentración de esporas se calculó con la siguiente ecuación:

### Ecuación 1.

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



Figura 10.- Conteo de esporas.

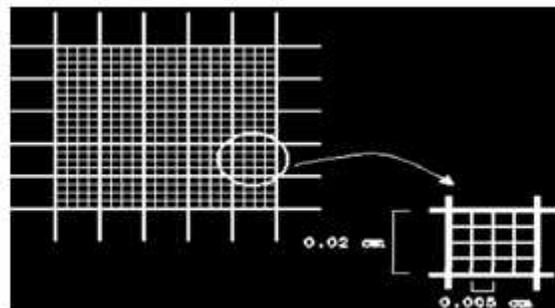


Figura 11.- Acercamiento de la cámara de Neubauer

### 6.3.- Sistema de producción de enzima fúngica

Esta fase consistió en la selección de las cepas de la producción de enzima tanasa en fermentación sólido midiendo halo cada 24 horas por 120 horas en incubación.

#### 6.3.1 Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para la degradación de ácido tánico por los microorganismos contiene lo siguiente, que se mencionan en la tabla 3.

**Tabla 4.-** Componentes del medio de cultivo caldo ácido tánico.

Reactivos	g / L
Sulfato ferroso	0.1
Nitrato de sodio	3
Fosfato dipotásico	1
Sulfato de magnesio	.5
Cloruro de potación	.5
Acido tánico	10



**Figura 12.-** Caldo sales Czapek ácido tánico

### **6.3.1.1 Preparar medios de cultivo medio solido**

Se preparó las sales de la tabla 3 diluyendo conforme al orden que tiene, en un matraz erlenmeyer de 1000 ml en agua destilada ajustando el pH a 6 - 6.5 posteriormente se agrego 20 g/L de agar bacteriológico, por último se esterilizó en un autoclave Evar Mod. Ev24 a 15 libras de presión, a 121°C por 15 minutos. Se esperó a que el medio se enfriara un poco y en seguida se hizo el llenado de cajas Petri, colocando aproximadamente 30 ml de medio en cada caja.

### **6.3.1.2 Siembra en cajas petri con caldo acido tánico – agar bacteriológico.**

Una vez fríos, bajo condiciones estériles, fueron inoculados en la parte de en medio 100 µl de cada una de las cepas para que se pueda medir el radio cada 24 horas por 120 horas por duplicado.

Para evitar que no hubiera contaminación, se limpio perfectamente el área de trabajo con alcohol y se colocaron mecheros para hacerlo en un medio lo más limpio y estéril posible.

Finalmente se sometieron a una temperatura de 30°C por 120 horas en incubadora (Riossa modelo E-17, México). Cada 24 horas se midió el radio de cada uno de los hongos con su respectiva repetición.

## **6.3.2 cultivo en medio líquido (CML)**

### **6.3.2.1 Preparar medios de cultivo**

Se prepararon las sales de la tabla 3 diluyendo conforme el orden que tienen en la tabla en un matraz erlenmeyer de 1000 ml con agua destilada ajustando el pH a 6 – 6.5, para posteriormente vaciar 20 ml de esta solución en reactores de vidrio de 50 ml, una vez vaciado se esterilizo en un autoclave Evar Mod. Ev24 a 15 libras de presión, a 121°C por 15 minutos.

### 6.3.2.2 Siembra en cultivo medio líquido

Una vez fríos, bajo condiciones estériles, fueron inoculados con 100 µl de cada una de las cepas por triplicado.

Para evitar que no hubiera contaminación, se limpio perfectamente el área de trabajo con alcohol y se colocaron mecheros para hacerlo en un medio lo más limpio y estéril posible.

Finalmente se sometieron a una temperatura de 30°C con 100 rpm por 120 horas en incubadora Riossa modelo E-17 (ambiente a 60°C).

Cada 24 horas se sacaban 3 reactores por cada hongo.

### 6.3.3.1 Análisis de Actividad Tanasa

La determinación de actividad tanasa fue por el método de rodanina metanólica de Sharma y col (2000).

El método consiste en la medición gálico liberado durante la reacción enzimática, utilizando como sustrato para la tanasa un éster del ácido gálico (metil-galato). la medición del ácido gálico se basa en la formación de un cromoforo entre dicho ácido y la 2-tio-4-cetotiazolidiana, también conocida como rodanina.

Para la cuantificación de la actividad tanasa se requiere 5 soluciones:

- Buffer de citratos 50 Nm a pH 5.0
  - ✓ Citrato de sodio 0.1 M ajustando el pH a 5.0 con ácido cítrico 0.1 M.
- Metil-galato 0.01 M en buffer de citratos (50 Nm pH 5.0)
- Rodanina 0.667% p/v en metanol
- KOH 0.5 N
- Ácido gálico 300 ppm en buffer de citratos (50 mM pH 5.0)

\*E l metil-galato, el ácido gálico y la rodanina deben protegerse de a luz.

### 6.3.3.2 Ensayo

Las soluciones se pre-incubaron a 30°C durante 5 – 10 minutos. Se etiquetaron tres tubos de ensayo como blanco, muestra y control, se colocaron 250 µL de metil galato 0.01 M en buffer de citratos 50 mM a pH 5.0.

Al tubo blanco se le añadieron 250 µL de buffer de citratos y al tubo muestra se le agregaron 250 µL del extracto enzimático, los tres tubos se incubaron 5 minutos a 30°C. Después de la incubación, se adicionaron 300 µL de rodanina metanolica (0.667% p/v), se incubaron a 30°C por 5 min, se agregaron 200 µL de hidróxido de potasio (0.5 N) y se incubó otros 5 min. Se agrega el extracto enzimático al tubo control. Después se agregaron 4 mL de agua destilada, se agito el contenido de los tubos y se incubaron durante 10 minutos a 30°C.

Se leyó la absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro Genesys 10 uv. Este ensayo se realizo por triplicado. En la tabla 5 se muestra un esquema de esta técnica.



Figura 13.- Muestras en espectrofotómetro

Las absorbancias obtenidas se corrigieron mediante la expresión:

### Ecuación 2:

$$\text{Absorbancia (Abs) corregida} = (\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco}) - (\text{Abs control} - \text{Abs blanco})$$

La unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de ácido gálico por min. Y se calculo con la ecuación 3:

### Ecuación 3:

$$\frac{x \text{ g ac. gálico ext}}{L \text{ mezcla}} = \left[ \frac{1 \text{ L mezcla}}{1000 \text{ ml mezcla}} \times \frac{5 \text{ ml mezcla}}{0.25 \text{ ml extracto}} \times \frac{1 \text{ mol ac. gálico}}{170.1 \text{ g a gálico}} \times \frac{10^3 \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1}{25 \text{ min}} \right] \times \frac{1000 \text{ ml ext}}{1 \text{ L ext}} \times \frac{\text{g ac. gálico extracto}}{L \text{ mezcla}} \times 4.7$$

Donde:

4.7 factor de la multiplicación de la ecuación 3.

170.1 g peso de 1 mol de acido gálico.

25 min = tiempo total que dura el ensayo tanasa.

\*La actividad tanasa fue definida como la cantidad de enzima requerida para hidrolizar 1 μmol de éster en 1 minuto.

**Tabla 5.** Esquema del ensayo enzimático propuesto por Sharma y col. (2000)

Blanco	Muestra	Control	Curva patrón
250 $\mu$ L Metil-Galato + 250 $\mu$ L Buffer	250 $\mu$ L Metil-Galato + 250 $\mu$ L E. Enzimático	250 $\mu$ L Metil-Galato	500 $\mu$ L Ác. Gálico (0-100 ppm)
+ 300 $\mu$ L Rodanina	5 min a 30 °C + 300 $\mu$ L Rodanina	+ 300 $\mu$ L Rodanina	5 min a 30 °C + 300 $\mu$ L Rodanina
+ 200 $\mu$ L KOH 0.5 N	5 min a 30 °C + 200 $\mu$ L KOH 0.5 N	+ 200 $\mu$ L KOH 0.5 N	5 min a 30 °C + 200 $\mu$ L KOH 0.5 N
+ 4 mL H <sub>2</sub> O	5 min a 30 °C + 4 mL H <sub>2</sub> O	+ 250 $\mu$ L E. Enzimático + 4 mL H <sub>2</sub> O	5 min a 30 °C + 4 mL H <sub>2</sub> O
	10 min a 30 °C →		10 min a 30 °C ←
		ABS 520 nm	

### 6.3.4 Determinación de Azúcares Totales

Para la cuantificación de la actividad tanasa se requiere 5 soluciones:

- **Fenol-Sulfúrico 5%:**

Se colocaron 5.0 g de fenol y se aforaron a 100 mL con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado.

Los azúcares totales se evaluaron por el método de Fenol-Sulfúrico de Dubois (1956). Se colocó 1 mL de fermentado dentro de un tubo de ensaye. Los tubos se introdujeron en un baño de hielo; se agregó por las paredes del tubo 2 ml de reactivo Fenol-Sulfúrico al 5%. Se agitó con el fin de homogenizar las dos fases presentes.

Las unidades de análisis se colocaron en un baño de ebullición por 5 minutos y después se dejaron enfriar para leerse en un espectrofotómetro (Genesys 10 uv, USA) a 480 nm. El valor de la concentración de azúcares se estableció de acuerdo a la relación con la ecuación obtenida de la curva patrón. Este ensayo se realizó por triplicado.

### **6.3.5 Determinación de Biomasa por peso seco mediante filtración**

La estimación de biomasa por peso seco, aplicable a todo tipo de microorganismos en medio líquido claro.

#### **6.3.5.1 Peso contrastante de los filtros para filtrar.**

Para la determinar de biomasa se empezó con poner filtros Whatman No. 1 en un horno de secado a temperatura de 60°C por 24 horas para ponerlos a peso constante, una vez que trascendió ese tiempo se pasaron a un desecador con ayuda de unas pinzas metálicas para no toca los filtros con los dedos, ya que los filtros reposaron unos 3 minutos en el desecador se pesaron cada uno de ellos en una balanza de precisión y se etiquetaron.

#### **6.3.5.2 Filtración y peso constante de los filtros con biomasa.**

Poner el filtro previamente llevado a peso constante y etiquetado al embudo Buchner y depositar cuidadosamente en el centro del filtro la suspensión microbiana homogénea y filtrar con bomba de vacío, lavar con agua destilada el reactor de la suspensión para que no quede nada de biomasa en este y así sucesivamente con cada una de las muestras, para poder determinar la biomasa se utiliza un filtro por muestra.

Una vez que se hace esto se retira el filtro y se dobla y se coloca en una charola para llevarlo al horno de secado y ponerlo a una temperatura de 60°C por 40 horas, trasendido este tiempo y esta temperatura se pasan al desecador con ayuda de las pinzas sin tocarlas con los dedos y se pesan nuevamente en una balanza analítica sin tocarlos con los dedos.



Figura 14.- Filtración con bomba de vacío



Figura 15.- Muestra en el horno de secado



Figura 16.- muestras en el desecador y balanza de precisión

Para calcular la biomasa se utiliza la siguiente fórmula:

**Ecuación 4:**

$$g \text{ de Biomasa} = \text{peso del filtro con muestra} - \text{peso del filtro peso constante}$$

## **7. Resultados y discusiones**

El desarrollo experimental del presente trabajo, se realizo en dos etapas. La primera en la purificación y conservación de hongos filamentosos. La segunda etapa fue el uso de los hongos filamentosos en sales Czapek-dox con Acido Tánico en cultivo medio solido y cultivo medio liquido.

Posteriormente se presentan los resultados según las etapas de la investigación:

### **7.1.1. Etapa I purificación y conservación de hongos filamentosos**

Se obtuvieron 21 cepas puras, que se conservaron en leche descremada con glicerol en congelación. Estas se encuentran en el laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la UAAAN, las cuales se usaron para desarrollar la segunda etapa de la investigación y serán usadas en investigaciones posteriores.

La purificación de algunos de los hongos fue complicada debido a que algunos esporulan mucho y eso da lugar a contaminación entre unos y otros. Sin embargo, pese a esos factores se logro el objetivo que era purificación y conservación de los hongos.

El tabla 6 podemos observar las cepas puras con su nombre, medio en el que se encuentra, color del hongo, observaciones macroscópicas así como las fotos tanto observado macroscópicamente como microscópicamente.

**Tabla 6.-** Observaciones macroscópicas y microscópicas de las cepas purificadas

Foto macroscópica	Nombre	medio	Color del hongo	Observaciones macroscópicas	Foto microscópica
	Pino Arteaga 2.1	CYA	Blanco	Con muy poco crecimiento y el hongo con un aspecto cremoso.	
	Chile 1.2	MEA3	Verde oscuro	El crecimiento fue muy abundante con una consistencia polvosa	
	Contaminación x V	PDA	Negro	El crecimiento fue muy abundante con consistencia polvosa	
	Contaminación x	PDA	Gris oscuro con su perímetro blanco	su crecimiento fue muy poco pero es un hongo con crecimiento bien redondeado, este cambio el color del medio de color amarillo transparente a un amarillo mas fuerte	
	Chile 2 1.2	MEA3	Verde	Con crecimiento abundante pero con aspecto muy polvoso seco	
	Hormiga 1.1	G25N	Verde	Crecimiento abundante pero con aspecto polvoso seco	
	Contaminación D	PDA	Verde con perímetro blanco	con crecimiento abundante de aspecto algodonoso	

Aislamiento de Cepas Fúngicas de la Región Sureste del Estado de Coahuila para la Producción de la Enzima Tanasa

	2 Chile 3 1.2	MEA3	Verde	Con muy poco crecimiento de aspecto polvoso	
	Chile 1.2	CYA	En medio de color blanco y el primer anillo de color negro y el segundo y último anillo de color beige	Algodonoso con tres colores diferentes	
	Contaminación P	PDA	Blanco con puntos negros	Con crecimiento medio y de forma irregular, de aspecto algodónoso	
	Chile 1.1	G25N	Blanco	De crecimiento muy abundante y de aspecto algodónoso	
	Maíz 2.1	CYA	Blanco	De crecimiento muy abundante y de aspecto algodónoso	
	Contaminación	PDA	Verde con perímetro blanco amarillento	de abundante crecimiento con aspecto polvoso pero a la ves como algodónoso	
	Hormiga /Araña	G25N	Verde con perímetro v Blanco	Es un hongo de aspecto algodónoso y con un ombligo	
	Chile 2 1.1	G25N	Blanco	De aspecto algodónoso y poco crecimiento	

Aislamiento de Cepas Fúngicas de la Región Sureste del Estado de Coahuila para la Producción de la Enzima Tanasa

	Chile 2 1.1	CYA	Blanco	De crecimiento muy abundante y de aspecto algodonoso	
	Chile 1.1	CYA	Beige con color blanco en el perímetro y centro	Aspecto cremoso y crecimiento abundante	
	Chile 2 1.2	MEA3	Verde	De poco crecimiento y de aspecto polvoso	
	1 Chile 3 1.2	MEA3	Verde muy oscuro	De crecimiento abundante y aspecto polvoso	
	Contaminación 1.2	CYA	Verde con perímetro y puntos blancos	De crecimiento uniforme y abundante de aspecto algodonoso	
	Chile 3 1.2	MEA3	Verde oscuro	Crecimiento abundante con aspecto polvoso	
	Hormiga/Araña 2.1	CYA	Blanco con centro verde	Crecimiento abundante y de aspecto algodonoso	

### 7.1.2. Etapa II Uso de los hongos filamentosos en sales Czapek-dox con Acido Tánico en cultivo medio solido y cultivo medio liquido.

En esta etapa se utilizaron las 21 cepas puras que se mencionan en la tabla 6 las cuales se sembraron en cultivo medio solido que se monitorearon por 120 horas cada 24 horas para poder así obtener los hongos que mas produjeron la enzima tanasa y así poder sembrarlos en cultivo medio liquido; enseguida en la figura 17 se observan los resultados.

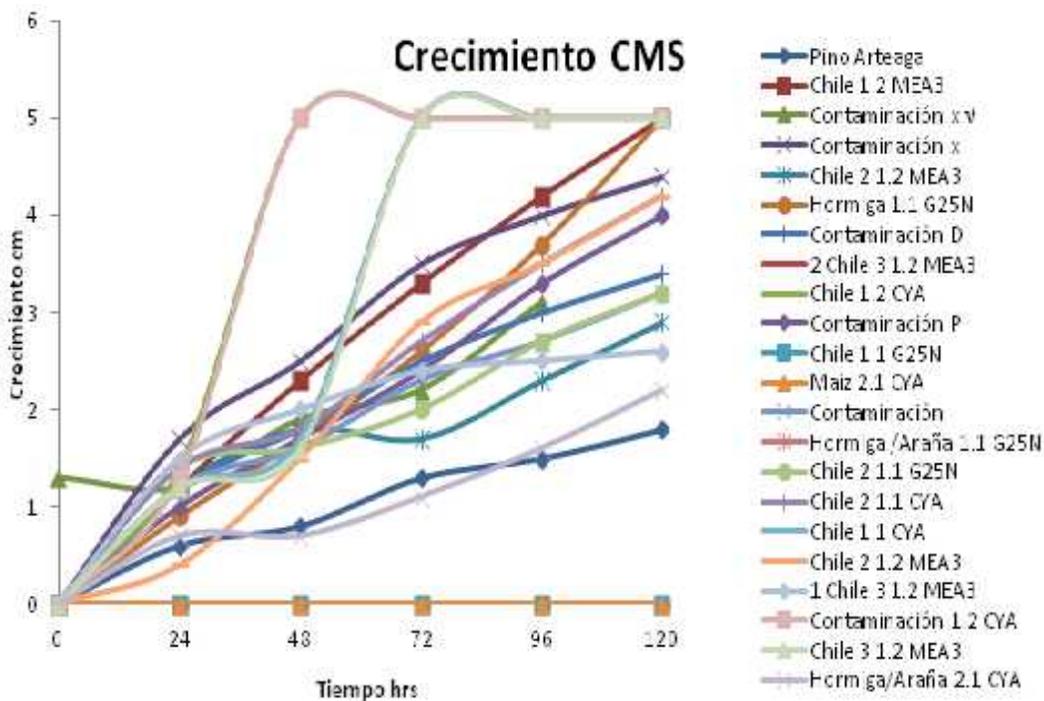


Figura 17.- Crecimiento de hongos en CMS

En la figura 17 se observan tres tipos de hongos que crecieron desde la hora 48 donde tienen un diámetro de 5 centímetros, los cuales pudieron haber sido los elegidos para la resiembra en cultivo medio liquido pero estos no se eligieron ya que desde la hora 48, las colonias no crecieron de una sola colonia para poder monitorear correctamente sino crecieron varias colonias y estas se unieron y se formaba una pero irregular la cual no se podía medir correctamente.

En base a esta figura 17 pudimos escoger a los hongos que más crecieron uniformemente y que se pudieron monitorear cada 24 horas por las 120 horas correspondientes y esos hongos fueron 2, que son las muestras siguientes: muestra contaminación X la cual creció uniformemente, principiando a las 24 horas con un crecimiento de 1.7 cm de diámetro llegando a medir 4.4 cm al cumplir las 120 hrs y la muestra contaminación P empezó con un crecimiento de 1 cm de diámetro llegando a medir a las 120 hrs un diámetro de 4 cm.

Por esta razón fueron por las cuales se seleccionaron estas cepas en la tabla 7 de anexos podemos observar un cuadro donde se destacan las observaciones macroscópicas de cada uno de los hongos cultivados en sales czapek con ácido tánico.

Treviño-Gonzales y col (2002) reportaron que la naturaleza física de la matriz sólida afecta el crecimiento de *A. niger* Aa-20 así como la producción de la tanasa, recomendando como medio de soporte una matriz discontinua pues resulta favorable para conseguir altos rendimientos en fermentaciones sólidas.

El hecho de que una de las dos cepas en este caso muestra X y muestra P pudo crecer y producir la enzima tanasa en cultivo medio sólido es muy importante ya que en los últimos años la biotecnología de las fermentaciones se ha enfocado más a la producción de enzimas en cultivos en medio sólido pues se ha reconocido que en medio sólido los hongos producen la enzima en forma extracelular (Viniestra-González, 1995).

#### **7.1.2.1.- Cinéticas de producción de enzima, consumo de azúcares totales y acumulación de biomasa.**

Se evaluaron las cepas muestra X y P que se escogieron anteriormente para la producción de tanasa en las mismas condiciones, las cuales fueron para el cultivo líquido a temperatura de 30°C con agitación constante de 100 rpp por 120 hrs. los resultados obtenidos de cada cepa se representan en las figuras 18 – 20.

---

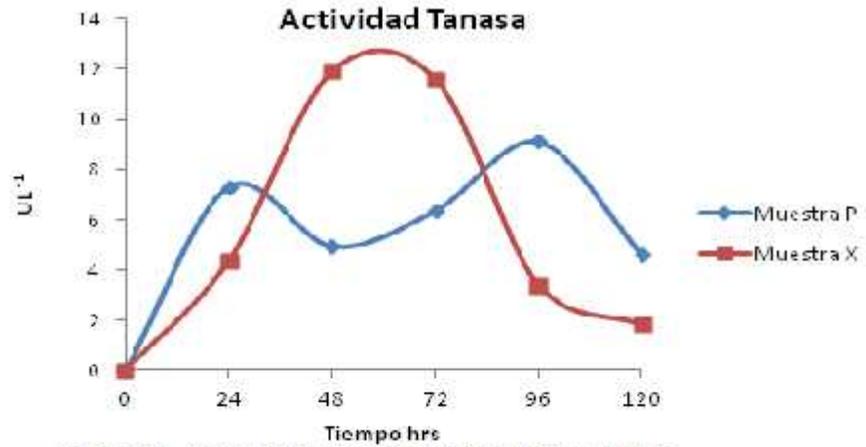


Figura 18.- Actividad Tanasa en cultivo medio líquido.

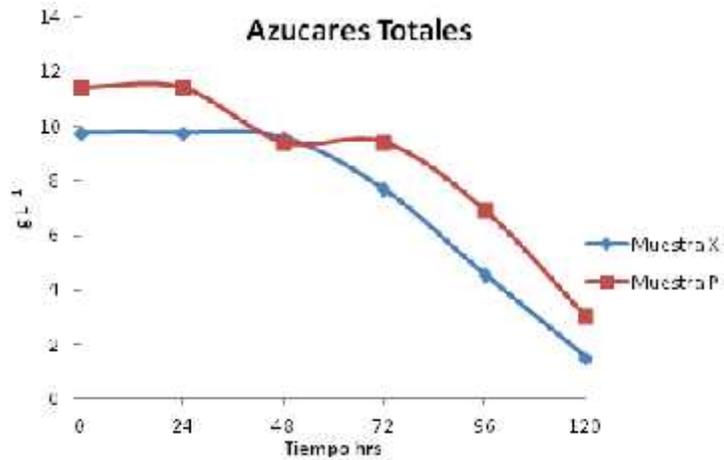


Figura 19.- Consumo de azucres totales

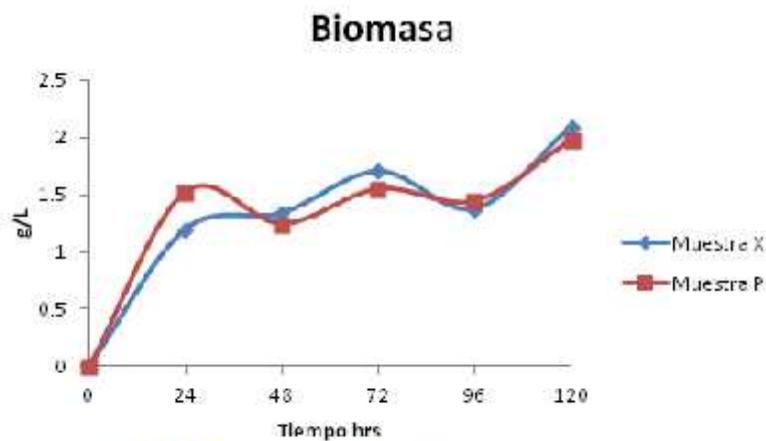


Figura 20.- Producción de Biomasa

En la figura 18 se muestran los valores de producción de tanasa de las dos muestras X y P. Se puede observar que la más alta producción se presenta entre las 48 - 72 horas mostrando una actividad de  $11.92 - 11.62 \text{ U/L}^{-1}$  para la muestra X, y para la muestra P se encuentra la mas alta producción a las 96 horas mostrando una actividad de  $9.13 \text{ U/L}^{-1}$ .

Asiendo una comparación con las muestras X y P, podemos deducir que donde se encuentra una producción mayor de actividad tanasa es en la muestra X con un valor de  $11.92 \text{ U/L}^{-1}$  a las 48 hrs. declinando hasta las 96 hrs con  $3.41 \text{ U/L}^{-1}$ ; la muestra P presenta una producción poco significativa ya que la mayor producción de actividad tanasa se encuentras astas las 96 hrs. con una actividad de  $9.13 \text{ U/L}^{-1}$ , declinando muy rápidamente a las 120 hrs.

Los diferentes cambios sufridos en la concentración de azucares totales durante la cinética de cultivo, se encuentran registrados en la figura 19. El eje de las "x" corresponde al tiempo en horas, mientras que en el eje de las "y" registra los gramos de azúcar presente en 10 gramos del acido tánico.

En la figura 19 se presenta el consumo de azucares totales por las muestras X y P. se puede observar que las tendencias de consumo se aprecian de una mejor manera a las 72 hrs en la muestra X y en la muestra P a las 96 hrs.

El mayor consumo de azucares totales corresponde a la muestra X el cual muestra un consumo de 23.22% de azucares totales a las 72 hrs, seguido por la muestra P que muestra una degradación de 31% de azucares totales a las 96 hrs.

Esto indica que el contenido de azucares totales en las muestras X y P permite un determinado consumo de los mismos ya que se puede observar que a medida de que aumenta el tiempo el porcentaje de consumo decrece. Este comportamiento sugiere que la tasa metabólica de estas muestras permanecen

de forma invariable ya que solo puede consumir una determinada cantidad de estos, aun cuando incremente la cantidad de los azúcares totales.

Este comportamiento, probablemente se debe a la solubilidad de los azúcares que permite utilizarlos de manera implícita por el hongo.

En la figura 20 se muestran los valores de producción de biomasa de las dos muestras X y P.

Se puede observar que la más alta producción se presenta hasta las 120 horas mostrando una producción de biomasa de 1.97 g/L para la muestra P, y para la muestra X se encuentra la más alta producción a las 120 horas mostrando una producción de 2.10 g/L, teniendo un incremento mayor del 0.12 g/L.

Asiendo una comparación con las muestras X y P, podemos deducir que donde se encuentra una producción mayor de biomasa es en la muestra X con un valor de 2.10 g/L a las 120 hrs. aumentando desde las 24 hrs con 1.20 g/L; la muestra P presenta una producción mayor a las 24 hrs con un valor de 1.52 g/L y terminando en las 120 hrs con 1.97 g/L.

Estos resultados parece indicar que mientras hay azúcares totales la actividad tanasa aumenta y se mantiene por un cierto tiempo ya que como van disminuyendo la actividad tanasa va declinando.

También se observa q mientras los hongos tiene nutrientes este crece y se produce más biomasa pero solo por un cierto tiempo ya que cuando este ya no tenga nutrientes este deje de producir biomasa.

## 8. Conclusión

De acuerdo con los objetivos planteados y los resultados obtenidos en la presente investigación:

- ❖ Se purificaron y conservaron 21 cepas de hongos filamentosos de muestras de tierra de la Región Sureste del Estado de Coahuila, que se utilizaron para esta investigación, y se utilizarán para otras investigaciones.
- ❖ Se obtuvieron dos cepas muestra X y muestra P que provienen de la Región Sureste del Estado de Coahuila que producen mayor cantidad de enzima tanasa.
- ❖ Los hongos filamentosos, utilizaron los extractos acuosos del ácido tánico como fuente de carbono y energía. Además de taninos, en los extractos se encuentran presentes carbohidratos y proteínas.
- ❖ Se obtuvo que en la muestra X se produjo mayor cantidad de actividad tanasa que en la muestra P.

## 9. Perspectivas de la investigación

Este estudio es solo un fragmento de una completa línea de investigación del departamento de ciencia y tecnología de alimentos. La misión de este tipo de trabajos es el desarrollo y generación de nuevas aplicaciones de las cepas purificadas.

Algunos de los puntos relacionados con el tema que pueden servir para continuar con la investigación presentada son los siguientes:

- ❖ Identificación de las cepas purificadas.
  
- ❖ Purificación y caracterización total de la enzima tanasa. Con los resultados obtenidos en esta tesis se puede llegar a la purificación y caracterización total de la enzima tanasa, siguiendo las metodologías mostradas aquí y haciendo algunas modificaciones.
  
- ❖ Producción, purificación y caracterización de alguna otra enzima.

## 10. Bibliografía

- 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.
- 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 activity in some members of fungi imperfecti. *Enz Microb Technol* 20: 612- 614.
-

- Banerjee, R. 2000. Biosynthesis of Tannin Acyl Hydrolase from tannin 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. 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.
- Beverini, M., and Metche, M. 1990. Identification, purification and physicochemical properties of tannase of *Aspergillus oryzae*. *Sci Aliments* 10: 807- 816.
- 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.
- Burs, E. R. 1971. Method for estimation of tannin in grain sorhum Agr. D. 63:511-512.
- 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.
- Chen, T. 1969. The induction of tannase in *Aspergillus niger*. PhD. Thesis. University of California, Berkeley, U.S.A.
- Deschamp, A. Otuk, G. and Lebeault, J. 1983. Production of tannase and degradation of chestnut tannin by bacteria. *J. Ferment Technol.* 61-55-59.
-

- Freudenberg, K., Bummel, F., and Frank, T. 1927. Tannin acyl hidrolase. *Z. Physiol Chem*164:262-270.
- 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.
- Guiragossian, B.A.K., Chibber, S.; Van Scoyoc, R.;Jambunathan, E.T.; Mertz and Axtell. J.D. 1978. Characterisitics 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.
- 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.
- Haworth, R., Jones, K., and Rogers, H. 1958. Ion-exchange chromatography of *Aspergillus niger* extract. *Proc Chem Soc* 8-9.
- 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.
- 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.
-

- 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.
- 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., Viniegra-González, G., Raimbault, M. 1988. Solid State culture *Aspergillus* in support. *Journal of Fermentation Technology.* 66:57-62.
- 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.
- Quintanr, 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.* Www.ejb.org.
- Ramesh, M.V. and Lonsane, B.K. (1991). Ability of solid state fermentation technique to

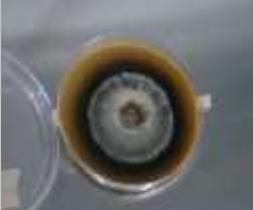
- 
- significantly minimize catabolic repression of  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus licheniformis* M27. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 591-593.
- Rajakumar, G., and Nandy, S. (1983). Isolation, purification and some properties of *Penicillium chrysogenum* tannase. *Appl Environ Microbiol* 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.
- 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 Gyozo, T. 1973. *Hakko Kogaju Zasshi* 51: 768-771.
- Seth, M. and Chand, S. 2000. Biosynthesis of tannase and hydrolysis of tannins to gallic
-

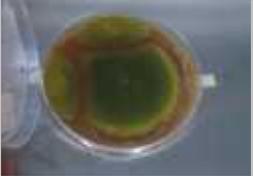
- 
- acid by *Aspergillus awamori* – optimization of Process parameters. *Process Biochemistry*, 36, 39-44.
- Sharm, S.Bhat, T.K. and Dawra, R.K. 1999. Isolation, Purification and Properties of Tanase from *Aspergillus niger* Van Tieghem. *Wourld journal of microbiology and Biotecnology*, 15, 673-677.
- Sharm, S. Bhat, T.K. and Dawra, R.K. 2000. A Spectrophotometric Method For Assay of Tannase Using Rhodanine *Analytical Biochemistry*, 279, 85-89.
- 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 candidans*.
- 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.
- 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 Ruminant*. Ed. O. and B. Book. Inc. New York.
- Vines, R.A. 1960. *Trees shrubs and woody 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.

## 11. Anexos

**Tabla 7.-** Observaciones de las cepas puras cultivadas en sales czapek- acido tánico.

CEPAS CULTIVADAS EN SALES CZAPEK CON ACIDO TANICO		
Nombre de cepa	Observaciones macroscópicas	Foto
Pino Arteaga 2.1 CYA	Cepa de poco crecimiento de color blanco de aspecto algodonoso con un halo muy visible	
Contaminación x v	Cepa de mucho crecimiento de color gris con blanco y negro de aspecto medio algodonoso con un halo muy visible, cambio el color de medio de cultivo.	
Contaminación 1.2 CYA	Cepa de color verde y amarillo con mucho crecimiento de aspecto polvoso y con un halo muy visible, cambio el color del medio de cultivo.	
Chile 3.1.2 MEA3	Cepa de color verde con amarillo con un halo visible aspecto polvoso y cambio de color del medio de cultivo.	
Hormiga/araña 1.1 G25N	Cepa de color verde oscuro con amarillo con aspecto polvoso con un halo visible y cambio de color del medio de cultivo.	
Hormiga 1.1 G25N	Cepa de color verde con amarillo con aspecto polvoso un halo visible y cambio de color del medio de cultivo.	

<b>Chile 1.1 CYA</b>	Cepa de color crema con aspecto cremoso con un halo visible y cambio de color del medio de cultivo.	
<b>Chile 1.2 MEA3</b>	Cepa de color verde con amarillo de aspecto polvoso con un halo visible y cambio de color del medio de cultivo.	
<b>Chile 1.2 CYA</b>	Cepa de color amarillo con verde de aspecto polvoso teniendo un halo visible y cambio de color del medio de cultivo.	
<b>Chile 2.1.2MEA3</b>	Cepa de color blanco de aspecto algodonoso con un halo visible y cambio el color del medio de cultivo pero muy leve a comparación que los demás.	
<b>Chile 2.1.2MEA3</b>	Cepa de color verde con amarillo de aspecto polvoso con un halo visible y cambio de color del medio de cultivo.	
<b>Chile 1.1 G25N</b>	Sin crecimiento	
<b>1 Chile 3 1.2 MEA3</b>	Esta cepa no creció casi nada solo muy poco y lo que más se observa es el halo.	
<b>Maíz 2.1 CYA</b>	Esta cepa casi no creció solo muy poco de aspecto algodonoso y lo que más se observa es el halo.	
<b>2 Chile 3 1.2 MEA3</b>	Esta cepa casi no creció solo muy poco de aspecto algodonoso y lo que más se observa es el halo.	

Aislamiento de Cepas Fúngicas de la Región Sureste del Estado de Coahuila para la Producción de la Enzima Tanasa

<p><b>Hormiga/araña 2.1 CYA</b></p>	<p>Cepa con poco crecimiento de color café de aspecto algodonoso claro pero con un halo muy visible.</p>	
<p><b>Contaminación</b></p>	<p>Cepa de poco crecimiento de color gris y negro de aspecto algodonoso con un halo muy visible, cambio el color de medio de cultivo.</p>	
<p><b>Contaminación X</b></p>	<p>Cepa de color amarillo con verde de aspecto polvoso teniendo un halo visible y cambio de color del medio de cultivo.</p>	
<p><b>Chile 2 1.1 CYA</b></p>	<p>Cepa de color blanco con un halo visible de aspecto algodonoso y cambio el color del medio de cultivo pero muy leve a comparación que los demás.</p>	
<p><b>Contaminación D</b></p>	<p>Cepa de color negro de aspecto muy polvoso con un halo visible y cambio el color del medio de cultivo pero muy leve a comparación que los demás.</p>	
<p><b>Contaminación P</b></p>	<p>Cepa de color café claro con perímetro blanco de aspecto algodonoso con un halo visible y cambio el color del medio de cultivo a muy negro.</p>	
<p><b>Chile 2 1.1 G25N</b></p>	<p>Cepa de color blanco con un aspecto polvoso con un halo visible y cambio el color del medio de cultivo.</p>	

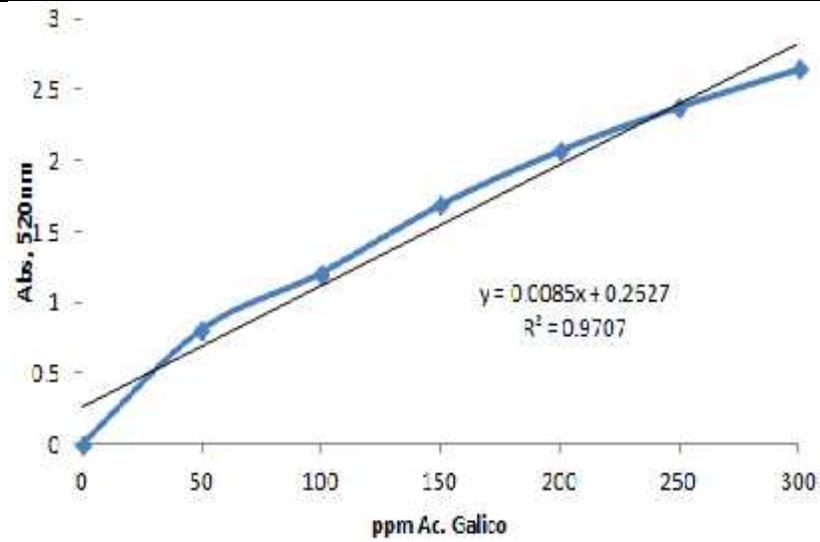


Figura 21.- Curva patrón de actividad tanasa.

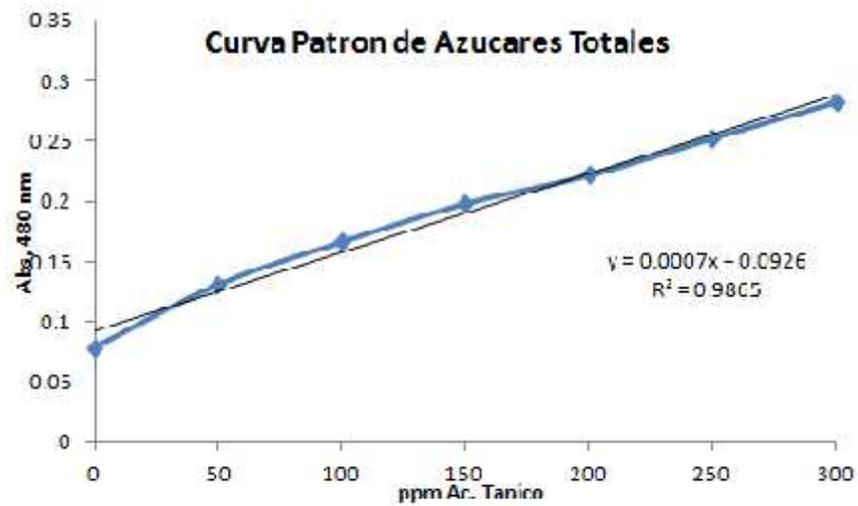


Figura 22.- Curva patrón de azúcares totales