

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



Obtención de fitomoléculas bioactivas mediante procesos de fermentación fúngica
utilizando como fuente de carbono residuos de nogal pecanero (*Carya
Illinoensis*)

Presentada por:

LAURA RAMOS PERALTA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo Coahuila, México.

Mayo 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

"ANTONIO NARRO"

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

TESIS

Obtención de fitomoléculas bioactivas mediante procesos de fermentación fúngica
utilizando como fuente de carbono residuos de nogal pecanero (*Carya
Illinoensis*).

Presentada

Por:

LAURA RAMOS PERALTA

Que se somete a Consideración del H. Jurado Examinador como Requisito
Parcial Para Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



Dr. Mario Alberto Cruz Hernández

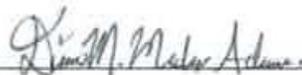
Presidente

APROBADA



Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez

Sinodal



Q.F.B Diana Morales Adame

Sinodal



Dr. Ramiro López Trujillo

Coordinador de Ciencia Animal



DEDICATORIAS

A DIOS por brindarme la oportunidad y la dicha de la vida, al brindarme los medios necesarios para continuar mi formación académica, y siendo un apoyo incondicional para lograrlo ya que sin él no hubiera podido.

Dedico este trabajo a mi esposo Vladimir, por el apoyo y ánimo que me brinda día con día para alcanzar nuevas metas, tanto profesionales como personales.

A mi hija Isabella, por ser la hermosa luz que ilumina todos mis días y quien es la razón para mantenerme firme en pie de lucha y enfrentar los retos de la vida.

A mis padres y hermanos que me acompañaron a lo largo del camino, brindándome la fuerza necesaria para continuar y momentos de ánimo así mismo ayudándome en lo que fuera posible, dándome consejos y orientación, estoy muy agradecida especialmente a mi mamá gracias.

A mis abuelos, tíos, tías y primos, gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida. Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos difíciles.

“ Mi triunfo y mi cariño, para ustedes...”

AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud, principalmente está dirigida a Dios por haberme dado la existencia y permitido llegar al final de mi carrera profesional.

A los docentes que me han acompañado durante el largo camino, brindándome siempre su orientación con profesionalismo ético en la adquisición de conocimientos y afianzando mi formación.

A mi maestro asesor el Dr. Mario Alberto Cruz Hernández quien me ha orientado en todo momento en la realización de este proyecto, por su paciencia y sus valiosas observaciones. Sus apreciaciones logran estimular la madurez científica en mi persona.

Igualmente a la Q.F.B Diana Morales Adame por todos los conocimientos que compartió conmigo y por su valioso tiempo dedicado a este trabajo de tesis, pero sobre todo por su apoyo y amistad.

A todo el personal del Centro de Microbiología Aplicada, por su colaboración y disponibilidad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo financiero durante la elaboración de esta tesis.

A todos y a cada una de las personas que de una u otra forma me han dado su apoyo y ayuda para el logro de esta Tesis.

El presente trabajo forma parte del Proyecto de Investigación: “Obtención de fitomoléculas bioactivas de bajo impacto ambiental para la sustitución de químicos sintéticos en la agricultura a partir de procesos de fermentación fúngica de residuos de nogal pecanero” clave ECO-2010-C01-150074 de la Empresa Fitokimica Industrial de México S.A. de C.V. misma que pertenece al Corporativo BioIndustrial del Norte y que una parte del trabajo fue llevado a cabo en el Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro bajo la responsabilidad del Dr. Mario Alberto Cruz Hernández y otra parte en las instalaciones de la empresa.

CONTENIDO GENERAL

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVOS.....	6
OBJETIVO GENERAL.....	6
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
HIPÓTESIS.....	7
JUSTIFICACIÓN.....	7
CAPÍTULO 1.....	9
REVISIÓN DE LITERATURA.....	9
1. NOGAL PECANERO.....	9
1.1 ORIGEN.....	9
1.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA A NIVEL MUNDIAL.....	10
1.3 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	11
1.4 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS.....	11
1.4.1 Raíz.....	12
1.4.2 Tallo.....	12
1.4.3 Hojas.....	12
1.4.4 Flores.....	13
1.4.5 Fruto.....	13
1.5 FENOLOGÍA DEL CULTIVO.....	14
1.6 SITUACIÓN ACTUAL DE LA PRODUCCIÓN EN MÉXICO.....	14
1.7 USOS Y OPORTUNIDADES POTENCIALES.....	15
1.7.1 Almendras.....	16
1.7.2 Cáscara.....	17
1.7.3 Ruezno.....	18
1.7.4 Tallo.....	18
1.8 PRODUCCIÓN DE NUEZ EN MÉXICO Y EL MUNDO.....	18
1.8.1 Principales países productores.....	18
1.8.2 Superficie y rendimiento en México.....	19
2. FITOMOLÉCULAS.....	21
2.1 COMPUESTOS FENÓLICOS.....	22
2.1.1 Actividad biológica de los polifenoles.....	23
2.2 TANINOS.....	24
2.2.1 Importancia de los taninos.....	25
2.2.2 Taninos como agentes antioxidantes.....	26
2.2.3 Clasificación de los taninos.....	27
2.2.3.1 Taninos Hidrolizables (TH).....	28
2.2.3.2 Taninos Condensados (TC).....	30
2.2.3.3 Taninos Complejos.....	31

2.3 Interacción con las proteínas	32
3. HONGOS.....	33
3.1 IMPORTANCIA DE LOS HONGOS	34
3.2 ASPERGILLUS NIGER	34
3.2.1 Clasificación taxonómica.....	35
3.2.2 Morfología.....	35
3.2.3 Uso comercial.....	36
3.3 TRICHODERMA.....	36
3.3.1 Clasificación taxonómica.....	37
3.3.2 Morfología.....	37
3.3.3 Aplicación industrial.....	38
4. FERMENTACION.....	38
4.1 FERMENTACIÓN LÍQUIDA O SUMERGIDA	39
4.2 BIODEGRADACIÓN DE TANINOS	40
4.2.1 Aspectos generales.....	40
4.2.2 Degradación microbiana de taninos.....	40
4.2.2.1 Degradación bacteriana	40
4.2.2.2 Degradación fúngica	41
4.2.2.3 Rutas de degradación fúngica	42
CAPÍTULO 2	44
MATERIALES Y MÉTODOS	44
ETAPA 1: OBTENCIÓN DE HONGOS	44
1.1 CONSERVACIÓN DE HONGOS	44
ETAPA 2. OBTENCIÓN DE LA MATERIA PRIMA.....	46
2.1 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS VEGETALES	46
2.2 TRATAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS VEGETALES.....	47
ETAPA 3. PRUEBAS DE INVASIÓN FÚNGICA EN RESIDUOS DE NOGAL PECANERO	47
3.1 PREPARACIÓN DEL MEDIO SÓLIDO CON RESIDUOS DE NOGAL.....	47
3.2 PRUEBAS DE INVASIÓN FÚNGICA EN RESIDUOS DE NOGAL.....	48
3.3 CONTEO DE ESPORAS	48
ETAPA 4. CINÉTICA DE CRECIMIENTO.....	49
4.1 PREPARACIÓN DEL MEDIO LÍQUIDO.....	49
4.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA	50
4.2.1 Metodología para determinación de taninos hidrolizables.....	50
4.2.2 Metodología para determinación de Taninos Condensados	51
4.2.3 Metodología para determinación de Taninos Totales	52
4.2.4 Metodología para determinación de Azúcares Totales.....	53
CAPÍTULO 3	55
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55

ETAPA 1. OBTENCIÓN DE HONGOS	55
1.1 AISLAMIENTO.....	55
1.2 PURIFICACIÓN.....	55
1.3 EVALUACIÓN DE LA MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA.	55
1.4 CONSERVACIÓN.....	58
ETAPA 2. PRUEBAS DE INVASIÓN FÚNGICA EN RESIDUOS DE NOGAL PECANERO	59
ETAPA 3. CINÉTICA DE CRECIMIENTO	63
3.1 PREPARACIÓN DEL MEDIO LÍQUIDO.....	63
3.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA DE LOS RESIDUOS FERMENTADOS.....	63
3.2.1 <i>Cuantificación de Taninos Hidrolizables</i>	64
3.2.2 <i>Cuantificación de Taninos Condensados</i>	66
3.2.3 <i>Cuantificación de Azúcares Totales</i>	68
3.2.4 <i>Cuantificación de taninos totales</i>	70
CONCLUSIONES.....	72
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

CONTENIDO DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación Taxonómica de <i>Carya illinoensis</i>	11
Cuadro 2. Clasificación Taxonómica de <i>Aspergillus niger</i> (Kwon-Chung, 1992)	35
Cuadro 3. Clasificación Taxonómica de <i>Trichoderma sp</i>	37
Cuadro 4. Formulación del medio Czapek Dox- Residuo de nogal	47
Cuadro 5. Formulación del medio Czapek Dox (Testigo)	48
Cuadro 6. Formulación del medio líquido Czapek Dox- Residuo de nogal	49
Cuadro 7. Formulación del medio líquido Czapek Doz (Testigo).....	49
Cuadro 8. Descripción macroscópica de <i>Aspergillus niger</i>	56
Cuadro 9. Descripción microscópica de <i>Aspergillus niger</i>	56
Cuadro 10. Descripción macroscópica de <i>Penicillium sp</i>	56
Cuadro 11. Descripción microscópica de <i>Penicillium sp</i>	57
Cuadro 12. Descripción macroscópica de <i>Trichoderma sp</i>	57
Cuadro 13. Descripción microscópica de <i>Trichoderma sp</i>	58
Cuadro 14. Cepas evaluadas.....	58

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. Distribución nativa de <i>Carya illinoensis</i>	10
Figura 2. Ruezno de nogal.....	13
Figura 3. Almendra de la nuez pecanera	16
Figura 4. Principales estados productores de nuez en México.....	19
Figura 5. Rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la del ácido Shiquímico a partir de fosfo enol pirúvico y la de eritrosa 4-fosfato.....	22
Figura 6. Clasificación actual de los taninos (Khanbabae y Van Ree, 2001).....	40
Figura 7. Estructura de un galotanino	29
Figura 8. Estructura de una elagitanino	30
Figura 9. Derivados de los Taninos Hidrolizables	30
Figura 10. Diferentes tipos de cabezas conidiales del género <i>Aspergillus</i>	36
Figura 11. Conidióforos de <i>Trichoderma</i>	38
Figura 12. Curva Patrón para TH.....	51
Figura 13. Curva Patrón para TC.....	52
Figura 14. Curva Patrón para Azúcares Totales	54
Figura 15. Medición Radial en Czapec Dox	60
Figura 16. Medición Radial en Czapec Dox-Ruezno.....	60
Figura 17. Medición Radial en Czapec Dox-Tallos.....	61
Figura 18. Medición Radial en Czapec Dox-Cáscara.....	62
Figura 19. TH de residuos fermentados con <i>Aspergillus niger</i>	65
Figura 20. TH de residuos fermentados con <i>T-25</i>	66
Figura 21. TC de residuos fermentados con <i>Aspergillus niger</i>	66
Figura 22. TC de residuos fermentados con <i>T-25</i>	68
Figura 23. Azúcares Totales de residuos fermentados con <i>Aspergillus niger</i>	69
Figura 24. Azúcares Totales de residuos fermentados con <i>T-25</i>	69
Figura 25. TT de residuos fermentados con <i>Aspergillus niger</i>	70
Figura 26. TT de residuos fermentados con <i>T-25</i>	71

Resumen

En el presente trabajo se evaluó la producción de fitomoléculas con actividad biológica a partir de residuos de nogal pecanero (*Carya Illinoensis*) por fermentación fúngica en medio líquido utilizando hongos filamentosos. Las cepas con las que se trabajó fueron *Aspergillus niger*, *Penicillium sp* y *Trichoderma asperellum* (identificadas como THlo1, THlo2, THlo3, T25 y T. piña), para lo cual, se llevó a cabo la purificación, conservación y caracterización morfológica de las cepas. La medición de la velocidad de crecimiento se evaluó mediante crecimiento radial utilizando como soportes residuos de nogal como fuente de nutrientes para el cultivo fúngico. Se utilizó el medio de cultivo de ruezno, cáscara y tallos de nogal respectivamente a una concentración del 30% (30 g/L) para evaluar la velocidad de crecimiento de las cepas y seleccionar las mejores. La velocidad máxima de crecimiento se obtuvo con las cepas de *Aspergillus niger* y *Trichoderma asperellum T25*. Dichas cepas se sometieron a cinéticas de fermentación con 1×10^6 esporas monitoreando su crecimiento cada 24 horas por 5 días. Los resultados permitieron determinar que el mejor medio para la producción de taninos son los medios elaborados a base cáscara y tallos de nogal. La liberación de los compuestos de interés durante el proceso de fermentación dio como resultado que la cepa de *Aspergillus niger* produce más del 50% de Taninos Totales que el *Trichoderma asperellum*, registrando cantidades de 60,788.89 ppm de estas fitomoléculas, siendo estos los mayores valores obtenidos. También se demostró que el componente que se obtiene en mayor cantidad son los Taninos Condensados. La utilización de residuos de nogal es una alternativa para brindarles un valor agregado y además para aprovechar dichos recursos para la producción fúngica de fitomoléculas con actividad biológica de interés industrial.

Palabras claves: Fitomoléculas, Taninos, hongos filamentosos, nogal pecanero

Abstract

In this paper phytochemicals with biological activity were evaluated from pecan waste (*Carya Illinoensis*) for fungal fermentation in a liquid medium using filamentous fungi. We worked with the following strains *Aspergillus niger*, *Penicillium sp* and *Trichoderma asperellum* (identify as THlo1, THlo2, THlo3, T25 and T. piña) for the experiment, purification, conservation and morphology characterization of the strains were carried out. The measure of the growth rate was evaluated through radial growth using pecan waste as carriers and as nutrient source for the fungal culture. It was used the husk, shell and stems as growth medium to 30% concentration (30g/L) to evaluate the growth rate of the strains and to select the best ones. The maximum growth rate was with the strains of *Aspergillus niger* and *Trichoderma asperellum* T25. Those strains were subjected to fermentation kinetics with 1×10^6 spores monitoring their growth every 24 hours for 5 days. The results allowed us to determine that the best growth medium for tannins production are the ones elaborated with pecan shell and stems. The liberation of the compounds of interest during the fermentation process resulted in 50% more total tannins production in *Aspergillus niger* compared with the one of *Trichoderma asperellum*, recording amounts of 60,788.89 ppm of these phytochemicals with the highest values obtained. It was also demonstrated that the compounds that were gotten in higher amounts are the condensed tannins. The use of pecan waste is an alternative to give extra value and to take advantage of those resources for the fungi production of phytochemicals with biological activity of industrial interest.

Key words: Phytochemicals, Tannins, Filamentous fungi, Pecan waste.

Introducción

El nogal pecanero *Carya Illinoensis*, Koch. pertenece a la familia Juglandaceae del cual obtenemos la nuez más común en México. El árbol de pecan es el único nogal de origen americano, nativo del norte de México y sur de Estados Unidos; se cosecha entre octubre y diciembre, destacando por su producción los estados de Chihuahua y Coahuila.

Dependiendo de la parte analizada de la planta se pueden encontrar diferentes principios activos (Raissouni 2005):

- Hojas: Naftoquinonas (juglona,plumbagina, beta-hidroplumbagina)
- Pericarpio: ácidos orgánicos, taninos y naftoquinonas
- Cotiledones: ácidos grasos insaturados
- Tegumento: polifenoles y taninos
- Nuez: Vitamina A, B, C y E, sales minerales y yodo

Existe en la naturaleza una gran variedad de compuestos bioactivos de origen vegetal conocidos como fitoquímicos; ejemplo de estos tenemos a los terpenos, los fenoles, los tioles y los lignanos, siendo los fenoles o compuestos fenólicos (sustancias con uno o más grupos hidroxilo -OH- unidos a un anillo aromático) uno de los grupos más importantes gracias a la actividad antioxidante que presentan. Dentro de los fenoles o compuestos polifenólicos se encuentran los taninos.

Los taninos son compuestos polifenólicos de origen natural que se encuentran presentes en diversas partes de las plantas vasculares. Se caracterizan por su capacidad para formar fuertes complejos con macromoléculas (proteínas, celulosa y almidón, entre otros) y minerales, causando su precipitación.

Por su interacción con las proteínas, los taninos se han utilizado desde hace miles de años para el curtido de pieles (Frutos y col., 2004; Aguilar y col., 2007).

Actualmente en la agricultura y la industria de alimentos mundial moderna se utilizan diversos agroquímicos sintéticos, por lo que existe una tendencia para crear productos naturales y amigables al medio ambiente. En el presente trabajo se aprovechan los residuos del nogal pecanero (ruezno, cáscara, y corteza-tallos) tradicionalmente no comercializados, para la generación de bioinsumos, mediante el desarrollo de una tecnología de vanguardia, como lo es la biotransformación y biodegradación de fitomoléculas presentes en esta planta.

Los procesos biotecnológicos microbianos más novedosos son llevados a cabo tanto en sistemas de cultivo líquido superficial o sumergido y en cultivos en estado sólido. Una de las principales condiciones del cultivo es que los microorganismos empleados en la producción de metabolitos de interés, exhiban grandes capacidades de invasión de los sustratos y/o soportes (Cruz, 2002). Los microorganismos más empleados en los procesos de cultivo son los hongos filamentosos, cuyo crecimiento involucra la formación de estructuras que se “enredan” en las estructuras del soporte, haciendo difícil su separación y la cuantificación de la biomasa formada.

La medición de la velocidad de crecimiento de hongos filamentosos, indica la capacidad de los mismos, para colonizar algún sustrato empleado en procesos de fermentación sólida. El crecimiento radial y longitudinal son dos métodos propuestos para evaluar la capacidad de los hongos para invadir y adaptarse a los nutrientes sobre un sustrato (Righelato, 1975; Gutiérrez-Sánchez y col. 1999).

Considerando que en México el uso de tecnologías alternativas para el manejo de residuos agroindustriales es insuficiente, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el potencial de diversos residuos de nogal pecanero como fuente de fermentación líquida en función de la capacidad de invasión de

Aspergillus niger y *Trichoderma asperellum* T-25 como un parámetro de selección de residuos de nogal con posibilidad de ser utilizados como sustrato en la producción de fitomoléculas con actividad biológica, como son los taninos.

Objetivos

Objetivo general

Evaluación de la obtención de fitomoléculas con actividad biológica a partir de residuos de nogal mediante fermentación fúngica utilizando cepas de *Aspergillus niger*. y *Trichoderma asperellum*.

Objetivos específicos

- Conservar las cepas de hongos y determinar su viabilidad, pureza y estabilidad morfológica.
- Evaluar pruebas preliminares de invasión fúngica en medios de cultivo elaborados con residuos de nogal pecanero para seleccionar los hongos filamentosos en base al que presente mejor crecimiento.
- Contar con la cinética de crecimiento de los hongos filamentosos en un medio líquido elaborado a partir de residuos de nogal pecanero
- Realizar la caracterización fisicoquímica de la cinética de crecimiento obtenida con los hongos filamentosos en estudio.

Hipótesis

Es posible obtener fitomoléculas con actividad biológica en residuos de nogal pecanero *Carya Illinoensis* mediante procesos de fermentación fúngica utilizando cepas tales como *Aspergillus niger* y *Trichoderma asperellum*, y que puedan ser aplicables al sector agrícola para el desarrollo de nuevos productos amigables con el medio ambiente.

Justificación

Actualmente México es el segundo productor de nuez en el mundo debido a que es el centro de origen de esta planta. Los principales estados productores son: Chihuahua y Coahuila que juntos abarcan el 80% de la producción nacional. A la fecha los residuos del nogal no son aprovechados por los productores nogaleros e industriales de nuestro país, desaprovechando una oportunidad de ingresos que se estima como significativa. Además es bien sabido que tradicionalmente los productores solo explotan la nuez en cáscara y existen muy pocos procesadores para la obtención en almendra, todos los demás componentes de los subproductos del proceso han sido ignorados, subestimados o desechados por los productores e industriales mexicanos, por lo que han dejado a un lado la posibilidad de su aprovechamiento integral de esta especie de gran importancia económica para la generación de nuevos y mayores ingresos tanto en años de alta como baja producción en la zona norte de nuestro país.

Es por eso que en el presente trabajo se pretende el implemento de procesos de fermentación fúngica para lograr una biotransformación de los residuos agroindustriales del nogal pecanero para poder obtener diferentes fitomoléculas que puedan ser utilizadas para la sustitución de productos químicos sintéticos en el desarrollo de nuevas formulaciones que puedan ser utilizadas en el control de plagas y enfermedades de cultivos básicos en la agricultura.

Este desarrollo reflejará la competitividad al incursionar en un tema que actualmente no es aprovechado y que posee innovación; como lo es la biotransformación y biodegradación de compuestos presentes en el nogal pecanero, tales como polifenoles. Dichos compuestos pueden ser degradados por medio de fermentación fúngica hasta moléculas bio-activas de mayor interés y que pueden ser aplicables en el sector agrícola para el desarrollo de nuevos productos con efectividad biológica aplicables a cultivos de importancia económica.

REVISIÓN DE LITERATURA

1. Nogal Pecanero

1.1 Origen

El Nogal es uno de los árboles de frutas comestibles más antiguo del mundo. Originario de Persia, se hallaron referencias de su existencia ya a partir del año 7000 A.C., en la época de los Romanos se le consideraba comida de los Dioses y de ahí su nombre *Junglans Regia* en honor a Júpiter (COMENUEZ, en línea, 2012).

La nuez pecanera tiene sus orígenes en la prehistoria, se han encontrado rastros fósiles en Texas y en el Norte de México indicando su existencia desde antes que los americanos nativos vivieran ahí, estos restos se ubican en los márgenes de los ríos y arroyos, lo que hace pensar que tiene sus orígenes en estas áreas (CONAFRUT, 1975).

La nuez pecanera es originaria de América, específicamente del norte de México y sureste de Estados Unidos (Figura 1). Se le cita con admiración desde las primeras crónicas e informes rendidos al virrey español en México. Entre los datos históricos que hacen referencia a la existencia del nogal pecanero en éstas regiones destacan los de Hernán Cortés hacia 1519, donde relata haber encontrado árboles de nuez nativa en los lugares que visitó. Álvaro Núñez Cabeza de Vaca escribió sobre la nuez pecanera hacia 1529–1535, relatando que el Indio Americano construyó su vida y su existencia nómada alrededor de la nuez pecanera como modo de vida. Los arqueólogos han demostrado que la mayor concentración de campamentos indios en esas regiones, se albergaban en las áreas inmediatas a las concentraciones de árboles nativos (Brisson, 1976).

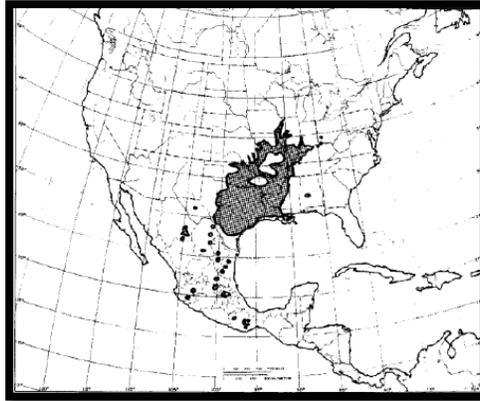


Figura 1. Distribución nativa de *Carya Illinoensis*

En la expedición de coronado se menciona entre esas tribus a los “Guacadome” o “gente de las nueces”, que habitaron en lo que hoy es Coahuila y Nuevo León (Tapia, 1974)

Los colonizadores españoles llamaron “nogal” al árbol pecanero y a su fruto la “pecana” la llamaron “nuez” (Brison, 1992). El nogal que aludían, confundiendo con el pecanero era *Carya illinoensis*.

1.2 Distribución geográfica a nivel mundial

El género *Carya*, a través de sus especies está muy extendido geográficamente, encontrándose en todos los países situados entre los paralelos 10° y 50° del hemisferio norte, bien como espontáneo, formando masas forestales, o introducido y cultivado como productor de fruto o madero, o ambas cosas a la vez. El límite septentrional, en Europa, se sitúa al norte del Cáucaso, Rusia meridional, Polonia Central y Alemania. En América lo podemos encontrar en México, Las Antillas, y sobre todo Estados Unidos, llegando por el Norte hasta la región templada de Canadá y asomándose, por el Sur, a la América Central. (Cerde G. J.A, Monografía, 2001).

1.3 Clasificación taxonómica

El término nogal agrupa especies comprendidas en los géneros *Juglans* y *Carya*, que son los más importantes de la familia Juglandaceae. El nogal de Castilla *J. regia* pertenece al primero y el nogal Pecanero *C. illinoensis* al segundo. La clasificación taxonómica de *Carya illinoensis* se describe a continuación (Cuadro 1) (González A.M, et al, 2010).

Cuadro 1. Clasificación Taxonómica de *Carya illinoensis*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Familia	Juglandaceae
Género	<i>Carya</i>
Especie	<i>Illinoensis</i>

1.4 Características botánicas

El Nogal Pecanero es un árbol caducifolio de gran porte que puede superar los 30 metros de altura, muy vigoroso y longevo, el cual inicia su vida productiva entre los 6 a 10 años de edad y continúa produciendo en niveles óptimos y comerciales durante poco más de 50 años, aún y cuando con un buen manejo técnico adecuado se puede alargar su vida productiva teniendo casos de árboles que duran hasta 100 años.

El Nogal de la nuez pecanera crece comúnmente en suelos arcillo-arenosos bien drenados no sujetos a inundaciones prolongadas. Sin embargo, aparece en suelos de textura pesada, donde se limita a suelos aluviales de origen reciente. Rara vez crece en suelos planos mal drenados. En su área de origen crece en clima húmedo; con precipitaciones medias anuales de 760 mm y un máximo de 2,010 mm. Las temperaturas promedio en el verano que oscilan entre los 27° C, con extremas de 41 a 46° C, las temperaturas promedio en invierno adecuadas son entre 10 y -1° C, con extremas de -18 a 29° C. (COMENUEZ, en línea, 2012).

1.4.1 Raíz

Posee una raíz principalmente pivotante y semifibrosa extendida horizontalmente, la profundidad que ésta alcanza, depende de la profundidad del manto freático (Herrera, 1996); aunque su principal fuente de humedad y nutrientes los recibe de las extensas ramificaciones laterales en el estrato de 0 a 90 cm (Brisson, 1992; Godoy, 2000).

1.4.2 Tallo

Su tallo es leñoso y dependiendo la variedad y la edad del árbol, este produce una corteza corchosa o agrietada y áspera, de color grisáceo (COMENUEZ, en línea, 2012).

1.4.3 Hojas

Las hojas presentan un verde brillante en el haz y un verde mas claro en el envés. Son caedizas, compuestas, imparipinadas, de peciolo corto de 6 a 8 cm de ancho; tienen un eje central con 11 a 15 foliolos lanceolados y aserrados. (Ávila, 2000).

1.4.4 Flores

Posee flores pistiladas (femeninas), y flores estaminadas (masculinas). Las flores pistiladas son producidas en la zona terminal de los brotes del año, apareciendo los frutos en grupos de 2 a 8 nueces. Las flores masculinas se encuentran en la madera que creció el año anterior, organizadas en forma de racimos (amentos). (Ávila 2000).

1.4.5 Fruto

La nuez es la fruta del Nogal y se considera una drupa (fruto carnoso que contiene una sola semilla), la cual consta de pericarpio, mesocarpio y semilla (almendra).

El Pericarpio y el Mesocarpio es una estructura segmentada en 4 partes que al deshidratarse se abre dejando libre al endocarpio y a la semilla (Figura 2). A la porción del mesocarpio y endocarpio se le conoce como ruezno. Las nueces compuestas por el endocarpio y la semilla normalmente miden de 2 a 6 cm. de largo y pesan de 4 a 12 gramos cada una. La semilla presenta dos cotiledones separados por un tabique central, los cuales provienen de los carpelos florales (Puente-González, 2002).



Figura 2. Ruezno y nuez de nogal

Se entiende por fruta seca aquella que una vez madura presenta un grado de deshidratación natural que permite su conservación, con endocarpio más o menos lignificado. La parte comestible es la semilla.

1.5 Fenología del cultivo

Debido a que el nogal es un cultivo de tipo perenne, tiene ritmos de crecimiento o estados fenológicos bien diferenciados. Estos estados son: brotación, floración, polinización, desarrollo del fruto, caída del fruto y defoliación. El conocimiento de este ciclo vegetativo es muy importante, ya que permite al productor programar las actividades propias a efectuar, como son: riego, control de plagas, enfermedades y malezas.

El nogal pecanero es una especie cuyo desarrollo vegetativo comprende desde la germinación de la semilla hasta la producción de la nuez. Este crecimiento se inicia en marzo o principios de abril. El crecimiento de las estructuras es gradual y continúa casi hasta 4 meses después de la polinización.

La producción de nueces empieza con la floración, las flores (estaminadas y pistiladas) generalmente se desarrollan en abril y la polinización se realiza en la última parte de este mes o a principios de marzo (Cerde G. J.A, Monografía, 2001)

1.6 Situación actual de la producción en México

Tradicionalmente los productores obtienen cosechas irregulares debido al fenómeno conocido como “alternancia en producción” causada por efectos varietales, climáticos y de manejo que hacen que el árbol pase de un año de alta producción de nueces (“años ON”) a uno de baja o nula producción (“años OFF”) provocando irregularidad en la inversión e ingresos y en los procesos productivos e industriales así como alteraciones en los precios derivados de la oferta y la

demanda internacional. Los años de alta producción se caracterizan por tener un bajo o menor precio de la nuez y contrariamente los de baja producción (caso en el 2010 una reducción de más del 50 % de la producción en el estado de Coahuila) por ofrecer mayores precios a los productores y la industria.

Los productores regularmente ofrecen su producto en cáscara y desechan todos los remanentes de proceso productivo o bien los emplean como fuente de materia orgánica para sus suelos. Son pocos los productores e industriales que procesan o descascaran la nuez en México y aquellos que lo hacen regularmente desechan la cáscara sin darle un uso alternativo; de igual manera no se emplean los remanentes de las podas ni rueznos ni hojas tanto en años productivos como improductivos.

A la fecha los residuos del nogal no son aprovechados por los productores nogaleros e industriales de nuestro país, desaprovechando una oportunidad de ingresos que se estima como significativa. Además es bien sabido que tradicionalmente los productores solo explotan la nuez en cáscara y existen muy pocos procesadores para la obtención en almendra, todos los demás componentes de los subproductos del proceso han sido ignorados, subestimados o desechados por los productores e industriales mexicanos, por lo que han dejado a un lado la posibilidad del aprovechamiento integral de esta especie de gran importancia económica para la generación de nuevos y mayores ingresos tanto en años de alta como baja producción en la zona norte de nuestro país (López Díaz J.A. & Herrera García E. 2004).

1.7 Usos y oportunidades potenciales

Las industrias que procesan al nogal, aprovechan la mayor parte del árbol como madera y los frutos (nueces), pero cabe mencionar que desaprovechan residuos como la cáscara de la nuez, las hojas, la cubierta del fruto (ruezno) y la

corteza, a los cuales no se le da ningún uso que aumente su valor (López Díaz J.A. & Herrera García E. 2004).

1.7.1 Almendras

Tradicionalmente, las almendras de la nuez pecanera se ha utilizado en industrias tales como panadería y dulcería. La composición de la almendra de la nuez pecanera (Figura 3) hace posible la extracción de aceites y vitamina E, así como también la obtención de productos con un alto valor en proteínas. Los usos potenciales de estos productos están dirigidos principalmente hacia la salud humana y los cosméticos.



Figura 3. Almendra de la nuez pecanera

Hoy en día existen iniciativas mexicanas para dar mayor valor a la nuez, tanto a la almendra como a la cáscara. La vitamina E es un mercado en crecimiento en México, ya que es un componente muy apreciado en cosméticos y como producto encapsulado. Para 2002, las importaciones mexicanas de vitamina E alcanzaron casi 4,230 Ton, con un valor comercial total de USD 10,943,758. Después del proceso de extracción de la vitamina, el polvo es utilizado para enriquecer productos dietéticos. La extracción de la vitamina E podría mejorar el precio de la nuez descascarada en los mercados actuales (López Díaz J.A. & Herrera García E. 2004).

1.7.2 Cáscara

La cáscara representa aproximadamente el 50% de la nuez y tiene poco o nulo valor actualmente. Los descascaradores ven a la cáscara como un costo, más que como una fuente de ingreso. La cáscara tiene usos tales como: material para jardinería, abrasivo, carbón activado y como fuente de pigmentos y taninos, entre otros.

La cáscara de nuez es una fuente excepcional de taninos y pueden ser obtenidos con altos rendimientos (cerca del 40% en base a peso seco) y son más reactivos que aquellos provenientes de *Mimosa*, el estándar industrial para taninos condensados. Esta ventaja puede ser aprovechada en mercados de especialidad química.

El carbón activado proveniente de la cáscara de nuez pecanera tiene características superiores a los carbones activados provenientes de otros materiales. Es utilizado en remediación ambiental, operaciones de purificación y recuperación química, así como en el tratamiento de aguas. Por sus características, el carbón activado de la cáscara de nuez puede también ser utilizado para adsorber sustancias tales como desperdicios nucleares, metales pesados y explosivos. El mercado para este producto es considerado como de especialidad química, por lo que este carbón activado presenta un alto valor comercial. Tan sólo en el mercado estadounidense se consumen al año alrededor de 300 millones de libras de carbón activado, cerca del 50% del mercado mundial.

Actualmente existe una iniciativa de negocio en Chihuahua en la cual se ha desarrollado un proceso muy eficiente de activación y producción que permite obtener un rendimiento cercano al 40% de carbón activado con gran capacidad de adsorción, que aunado al bajo costo para su producción lo hace ser un producto altamente competitivo en los mercados internacionales (López Díaz J.A. & Herrera García E. 2004).

1.7.3 Ruezno

Del pericarpio y mesocarpio (Ruezno), se obtiene un colorante denominado “nogalina”, es un aceite que se utiliza como base de distintos colorantes y tintes. Sirve para teñir muebles (Parra, 2008). Por otro lado, estas dos capas externas del fruto, junto con las hojas, contienen abundantes taninos que le confieren una propiedad fuertemente astringente; así como también, derivados quinónicos, de donde la “glucona” es la más importante. Esta sustancia es amarga lo que le permite tener propiedades antisépticas, cicatrizantes, tonificantes, vermífugas e hipoglucemiantes (Pamplona, 2006).

1.7.4 Tallo

Otro subproducto que se obtiene del nogal es su madera. Ya que ésta, toma tonalidades marrones veteadas de negro según el árbol va envejeciendo; estas características le dan un valor a la madera, pero esto se consigue hasta los 60 a 80 años de vida del árbol (Luna, 1990). En Europa se le conoce como “árbol de oro” y por su alta calidad se encuentra dentro de las maderas nobles más cotizadas a nivel mundial.

1.8 Producción de nuez en México y el mundo

1.8.1 Principales países productores

Estados Unidos de América es el país productor de nuez más grande del mundo (Herrera y Clevenger, 1996). En el 2007 aportó el 36.1% de la producción mundial, seguido de México, quien participó con el 29.4% de las 326,812 toneladas producidas a nivel mundial; y en tercer lugar Australia produjo el 11.6% (ProdSTAT en línea, 2008). El rendimiento promedio a nivel internacional es de 2 toneladas por hectáreas según la misma fuente.

La superficie total cosechada de nogal pecanero en el mundo es de 178,681 hectáreas, donde Estados Unidos de América, México y Australia tienen el 33.6%, 31.9%, y 8.4% respectivamente. (ProdSTAT en línea, 2007).

1.8.2 Superficie y rendimiento en México

Actualmente, México es el segundo productor de nuez en el mundo, debido a que es el centro de origen de esta planta. Según Brison (1992), la primera plantación de nogal pecanero en México se estableció en el estado de Nuevo León en el año de 1904.

Los principales estados productores son Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Sonora y Durango (Figura 4) que juntos abarcan más del 90% de la producción nacional. En las últimas décadas, la superficie nacional sembrada de nogal, ha aumentado considerablemente, aumentando con ello la producción de nuez: En 1980 se sembraron 38,904 hectáreas y la producción fue de 23,882 toneladas de nueces; para 1990 la superficie sembrada incrementó un 11.25% con lo que se obtuvo una producción de 39,605 toneladas de producto. En el año 2000 se sembraron 50,477.86 Ha y se obtuvieron 59,979.69 toneladas de producción; para el 2005 la tendencia continuó obteniendo una superficie sembrada de 68,383.16 hectáreas (SIACON, en línea 2012).



Figura 4. Principales estados productores de nuez en México

Para el 2010 había un total de 88,054.94 hectáreas sembradas en la República Mexicana, de las cuales, 53,028.62 corresponden al estado de Chihuahua que representa el 60% de la superficie nacional; 15,322.77 a Coahuila, 8,691 a Sonora; 4,893.84 a Durango y 3,903.76 a Nuevo León; con porcentajes de 17.4, 9.8, 5.5 y 1.4% respectivamente de la Superficie Nacional sembrada (SIACON en línea 2012).

En menor escala de superficie sembrada están Hidalgo, San Luis Potosí, Aguascalientes, Guanajuato, Jalisco, Oaxaca, Baja California Norte, Puebla, Querétaro, Sinaloa, Tamaulipas y Zacatecas.

La producción nacional de nuez para el 2010 se distribuye de la siguiente manera: Chihuahua con 39,764.97 toneladas, para Coahuila fueron 10,247.51 toneladas, para Sonora, Durango y Nuevo León fueron de 16,102.85, 3,652.15 y 1,678.99 respectivamente del total de la producción nacional para este año que fue de 76,627.01 toneladas (SIACON, en línea 2012).

La producción de nogal pecanero en México, tiene un alto potencial de desarrollo; la calidad del producto obtenido se encuentra dentro de los estándares internacionales. Los principales estados productores anteriormente mencionados actualmente tienen un rendimiento promedio aproximado de 1.1 toneladas por hectárea (SIACON, en línea, 2012).

En Coahuila, el cultivo de nogal es uno de los más antiguos, y se encuentra distribuido principalmente en los municipios de Parras de la Fuente, Saltillo, San Pedro y General Cepeda, que juntos abarcan más del 50% de la producción estatal con 2,609.09, 938.53, 1324.3 y 534.38 toneladas respectivamente. En menor escala de producción se encuentran Zaragoza, Torreón, Cuatro Ciénegas y Ramos Arizpe (SIACON, en línea, 2012).

2. Fitomoléculas

El nogal pecanero es una de las especies mas importantes para nuestro país por su alto contenido de fitomoléculas tales como los taninos ya que estos generan importancia relevante para la aplicación en la agricultura ya que actúan como fungicidas, bactericidas, nematocidas, etc.

Las fitomoléculas son compuestos de origen natural, producidas por las plantas para protegerse a si mismas contra la oxidación, las bacterias, los virus y los hongos. La palabra “fito” griega significa la planta. Las fitomoléculas incluyen flavonoides, saponinas, carotenoides, isotiocianatos, isoflavonas, indoles, compuestos de azufre orgánico, clorofilina y muchos otros.

Algunas fitomoléculas tienen actividad antioxidante, estos son usados principalmente en la industria de la alimentación como aditivos, aunque también representan una fuente primordial en la elaboración de suplementos alimenticios. Otros, tienen actividad antimicrobiana que es aprovechada en la elaboración de remedios farmacológicos. Sin embargo si principal aplicación es para el control de microorganismos fitopatógenos en la agricultura y la obtención de productos reguladores de crecimiento.

Las fitomoléculas se extraen por métodos de extracción sólido-liquido convencionales (infusión, soxhlet) y no convencionales (ultrasonido, microondas) y se utilizan agentes extractantes de acuerdo a la polaridad tales como agua, etanol, metanol, acetona, hexano, entre otros.

2.1 Compuestos fenólicos

Es un grupo muy extenso de sustancias que incluyen diferentes familias de compuestos con estructuras diversas y complejas, como los derivados de ácidos fenólicos, hasta moléculas poliméricas de elevado peso molecular, como los taninos (hidrolizables y condensados), así como las ligninas y sus derivados (Chandra, 2004).

Los polifenoles son compuestos muy complejos que contienen dos o más anillos aromáticos enlazados, se forman a partir de la ruta del ácido shiquímico (Swain 1979), en el retículo endoplásmico liso y rugoso y se depositan dentro de las vacuolas celulares (Figura 5).

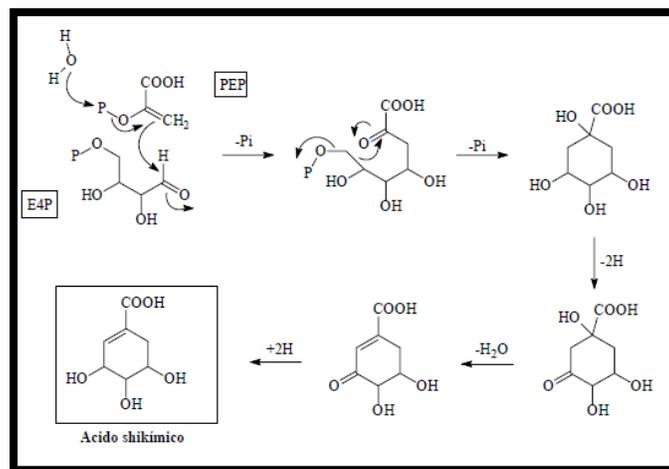


Figura 5. Rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la del ácido Shiquímico a partir de fosfo enol pirúvico y la de eritrosa 4-fosfato

Existen una gran variedad de compuestos fenólicos los cuales son responsables de las propiedades organolépticas de las frutas y hortalizas. Dentro de este mismo grupo existen los pigmentos como antocianos, responsables de los tonos rojos, azules y violáceos característicos de muchas frutas (fresas, ciruelas,

uvas, etc). Algunos polifenoles tienen sabor amargo, como determinadas flavonas (naringina de los pomelos, neohesperidina de las naranjas amargas) o la oleuropeina presente en aceitunas. Los derivados de ácidos hidroxicinámicos como cafeico, ferúlico y sinápico, están presentes en un gran número de hortalizas (Jiménez, 2000).

Los compuestos fenólicos pueden ser clasificados de acuerdo a su estructura química en ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos, estos son los compuestos fenólicos más comunes en el reino *Plantae*, sin embargo, los flavonoides representan el 60%, mientras que los ácidos fenólicos representan el 30% de los fenoles ingeridos en la dieta humana diaria (Strack, 1997).

2.1.1 Actividad biológica de los polifenoles

Desde el punto de vista de actividad biológica muchos polifenoles tiene propiedades captadoras de radicales libres, lo que les confiere actividad antioxidante, que podría estar relacionada con la prevención de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cáncer. Existen también sustancias con actividad estrogénica (fitoestrógenos), como las isoflavonas, los lignanos y el estilbeno resveratrol, mientras que otros, como las taninos, son capaces de fijar metales y proteínas, lo que afecta a la biodisponibilidad de éstos y puede estar en el origen de algunos efectos inespecíficos (por ejemplo, antimicrobianos). La actividad antioxidante de los polifenoles se ha relacionado con su capacidad para prevenir fallas cardíacas, aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares (Morton, 2000).

2.2 Taninos

Los taninos son metabolitos secundarios de las plantas, compuestos fenólicos no nitrogenados con peso molecular que oscila entre 300 y 20,000 Da (Khanbabaee y Ree, 2001), con estructura amorfa, que presentan sabor astringente y son débilmente ácidos. El término “tanino” es un término bastante antiguo que deriva del francés “*tanner*” y que hace referencia al curtido de pieles. Precipitan con sales de metales pesados, proteínas y alcaloides. Se trata de compuestos hidrosolubles, dando a veces disoluciones coloidales en agua, solubles también en alcohol y en acetona e insolubles en disolventes orgánicos apolares. Dentro de los vegetales los taninos suelen encontrarse en las vacuolas celulares, combinados con alcaloides, proteínas, etc.

Se usa la palabra tanino en forma generalizada, pero esto es erróneo, debido a que no es solamente un compuesto, Lekha y Losane (1997) reportaron que la terminología relacionada con los taninos es escasa, sobre todo en la literatura antigua, y sugirieron que el término correcto debe apegarse a la clasificación de los compuestos fenólicos en cuestión. El término tanino fue introducido a finales del siglo XVII para definir sustancias orgánicas solubles en agua, presentes en extractos de hojas, maderas, frutas y agallas de ciertos helechos, gimnospermas y angiospermas; capaces de curtir pieles convirtiéndolas en cueros impermeables que son resistentes al ataque de las bacterias, al calor y a la abrasión. (Swain, 1979).

Pertencen al grupo de los antioxidantes, los cuales pueden retardar o inhibir la oxidación de lípidos o de otras moléculas inhibiendo la iniciación o propagación de cadenas reactivas de oxidación. Se encuentran abundantemente en nuestra dieta y existe evidencia de que juegan un rol importante en la prevención de enfermedades degenerativas como el cáncer y enfermedades cardiovasculares gracias a su actividad antioxidante. La actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos se debe principalmente a sus propiedades redox, las cuales juegan

un papel importante en la absorción y neutralización de radicales libres. En general existen dos categorías básicas de antioxidante: antioxidantes naturales y sintéticos.

Algunas frutas y bebidas como el vino tinto y el té constituyen las principales fuentes de polifenoles. En la mayoría de los casos, los alimentos presentan mezclas complejas de polifenoles (Guyot y col.; 1998, Sanoner y col.;1999).

Los factores ambientales influyen de manera directa en el contenido de polifenoles en los alimentos. Estos factores pueden ser climáticos (tipo de soya, exposición al sol, lluvia) o agronómicos (cultivos hechos en jardines o en campos, cultivos biológicos, etc.) (Macheix y col.; 1990). En general, la concentración de taninos hidrolizables disminuye en las épocas de lluvia, mientras que la concentración de taninos condensados aumenta. Algunos polifenoles, principalmente los ácidos fenólicos, están directamente involucrados con algunos procesos metabólicos en las plantas cuando se someten a estrés, además de que tienen propiedades antimicrobianas y sus concentraciones aumentan después de una infección (Shaidi y col.; 1995, Macheix y col.; 1990, Parra y col.; 2000).

2.2.1 Importancia de los taninos

Los taninos actúan como repelentes naturales contra predadores y microorganismos, pueden ayudar de esta manera a proteger la planta, gracias a su propiedad para combinarse con proteínas y otros polímeros de celulosa y pectina, presentan un efecto tóxico contra patógenos potenciales en ciertos tejidos de la planta, produciendo resistencia al ataque de virus y microorganismos, polimerizándose en forma de barrera protectora insoluble, previniendo a las plantas de los ataques microbianos. Gracias a su astringencia, destruyen los tejidos del paladar a través de la precipitación de las proteínas salivales (Stumpf y Conn; 1981). Limitan la disponibilidad de nutrientes para los animales, inhiben la

acción de algunas enzimas y en general reducen la energía metabolizable (Méndez y Pro, 1984).

En frutos no maduros, promueven la astringencias, pero al madurar se polimerizan y se elimina ese sabor astringente, es decir, es un mecanismo de defensa contra insectos nocivos (Olivares, 1983). Tienen un efecto negativo en el suelo al formar enlaces con las proteínas y otros polímeros, disminuyendo por lo tanto el nitrógeno disponible para los microorganismos del suelo (Olivares, 1983). La concentración de taninos varía el sabor del fruto, por ejemplo, en el sidra y en la vid con una concentración mínima de taninos el sabor es flojo e insípido, y con una concentración mayor proporciona una condición de manera áspera (Stumpf y Conn, 1981).

Por sus propiedades intrínsecas, los taninos se utilizan como tintes (color café, amarillo, rojo), plásticos, conservadores de pesca, para controlar los lodos en los pozos de perforación de petróleo y principalmente para curtir pieles de animales (FAO, 1953).

En curtiduría son importantes por la propiedad de precipitar gelatina y de combinarse con el colágeno y otros materiales proteicos en la piel de los animales, de tal manera que al ponerlos en contacto, éstas se vuelven impermeables e imputrescibles, es decir, se protegen las fibras proteicas de ataques microbianos y abrasión; durante este proceso la piel puede absorber taninos por más de la mitad de su peso (Halsman, 1996; Olivares, 1983, Fernández y Prida, 1977; Solis, 1953). En la industria farmacéutica se utilizan para la producción de antioxidantes de gran interés, como lo es el ácido gálico y el ácido elágico.

2.2.2 Taninos como agentes antioxidantes

Diferentes moléculas reactivas al oxígeno tales como: oxígeno simple y radicales libres de O₂, OH, NO y radicales libres peroxilo son regularmente producidos en nuestro cuerpo, ellos causan daños a los lípidos, proteínas y DNA;

participando en patogénesis y envejecimiento (Kehrer y Smith, 1994). Para contrarrestar estos problemas, el cuerpo está equipado con un sistema de defensa efectivo, el cual incluye: enzimas tales como dismutasa superoxidasa, catalasa, reductasa y peroxidasa; antioxidantes de alto peso molecular tales como albúmina y ferritina; un arsenal de antioxidantes de bajo peso molecular tales como ácido ascórbico y ácido úrico, entre otros (Prior y Cao, 2000; Santos-Buelga y Scalbert, 2000).

Todos los polifenoles son capaces de secuestrar oxígeno simple y radicales libres O_2 , OH, NO a través de la donación de electrones, generando un radical fenoxil relativamente estable. En la mayoría de las proantocianidinas (PAs), el sitio del radical está en el anillo B y la sustitución del anillo A ha sido solo una influencia limitante sobre la producción potencial de radicales (Bors y Saran, 1987).

Las PAs al poseer la carencia de sustratos fácilmente disponibles, han recibido mucho menos atención que sus contrapartes monoméricas. Aunque las PAs observan el atrapamiento de iones O_2 e hidroxilos en solución acuosa (Plimb y col., 1998), la influencia del grado de polimerización no fue clara, dado que no se observó diferencia entre monómeros, dímeros y trímeros (Ricardo da Silva y col., 1991). Dado que los polifenoles pueden tener papeles únicos como antioxidantes y protectores de otros nutrientes que causan daños oxidativos, las investigaciones han sido enfocadas no solo en alimentos y bebidas como fuente de polifenoles, sino también en extractos crudos y compuestos polifenólicos estructuralmente bien definidos (Hagerman y col., 1998). Por ejemplo, hubo una buena correlación entre polifenoles de ciruelos y manzanas y su capacidad antioxidante contra el cromógeno del radical ABTS (Kim y col., 2003).

2.2.3 Clasificación de los taninos

Anteriormente, y de manera un poco simple, los taninos se dividían en dos grandes grupos: Taninos Hidrolizables (TH) y Taninos Condensados (TC). Pero

actualmente una de las clasificaciones más aceptada es la que propone Khanbabaee y Van Ree, (2001) quienes de acuerdo a la estructura molecular que presentan los clasifican en cuatro grupos (Figura 6).

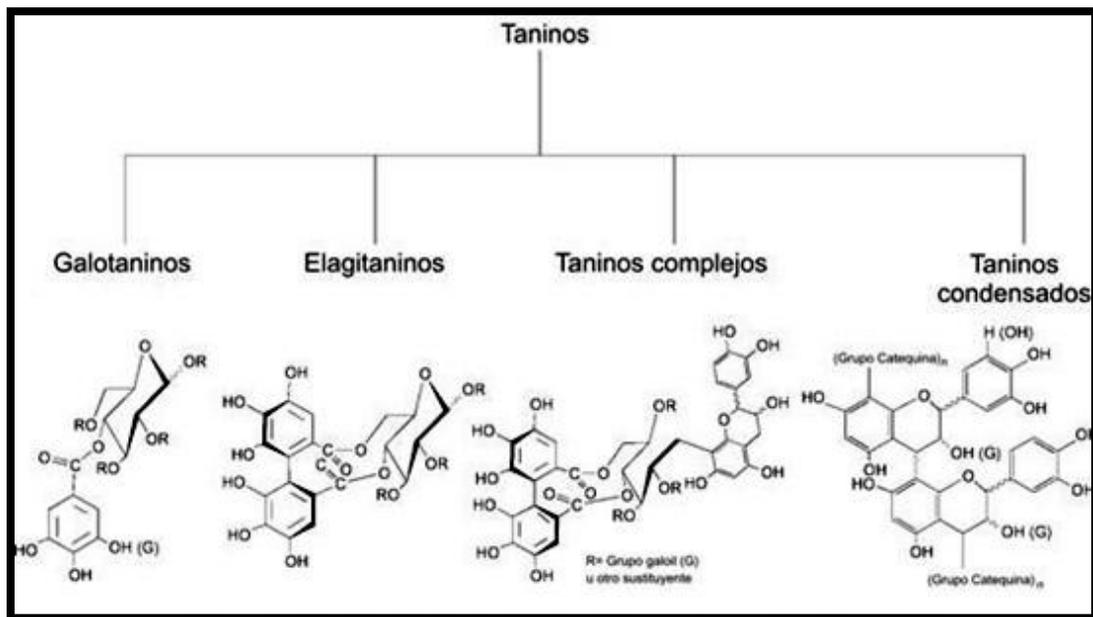


Figura 6. Clasificación actual de los taninos (Khanbabaee y Van Ree, 2001)

2.2.3.1 Taninos Hidrolizables (TH)

Este grupo involucra un alcohol polihídrico esterificado con ácido gálico o alguno de sus derivados. Compuestos por ésteres de glucosa u otros polioles, como pueden ser el ácido gálico, digálico, m-digálico, hexahidroxi-difénico o sus derivados. Los hidroxilos de estos carbohidratos están parcial o totalmente esterificados con grupos fenólicos como el ácido gálico o el ácido elágico, y por hidrólisis con ácidos, bases o enzimas se rompe el enlace glucosídico para liberarse azúcar y otros compuestos fenólicos que lo integran (López;1989). Actualmente existen, dos clases de ácidos fenólicos: galotaninos y elagitaninos principalmente, presentes en las frutas rojas como las fresas, granadas y zarzamoras (Clifford; 2000).

Las cadenas de ésteres de grupos poligaloilos encontrados en los galotaninos están formados ya sea por enlaces dépsidos *meta* o *para*, involucrando más a un hidroxilo fenólico que un grupo hidroxilo alifático.

Los taninos hidrolizables se pueden dividir en los siguientes subgrupos:

- A. *Galotaninos*: Son compuestos que consisten de una molécula de glucosa, la cual se encuentra rodeada por unidades de ácido gálico (Figura 7). La fuente más famosa de galotaninos es el ácido tánico de origen vegetal, el cual tiene una molécula de D-glucosa y de 5 a 9 unidades de galoilos ligados a uno de los centros del núcleo de azúcar. Es fácilmente hidrolizable por la acción de la enzima tanasa (Sánchez, 2001).

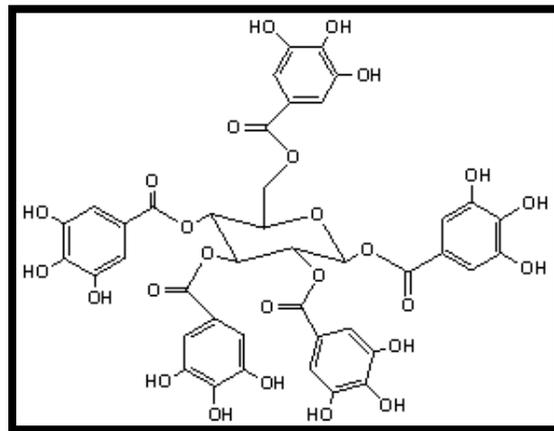


Figura 7. Estructura de un galotanino

- B. *Elagitaninos*: son compuestos derivados del pentagaloilglucosa por reacciones de oxidación entre las unidades de ácido gálico (Muller-Harvey; 2001). Por hidrólisis se libera ácido elágico o sus derivados, como el ácido hexahidroxidifénico, y un azúcar (Figura 8).

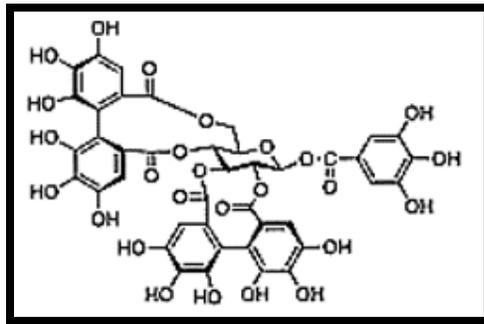


Figura 8. Estructura de un elagitanino

La hidrólisis de los galotaninos y elagitaninos dan como producto el ácido gálico y ácido elágico (Figura 9) y además son compuestos con alto valor en el sector industrial.

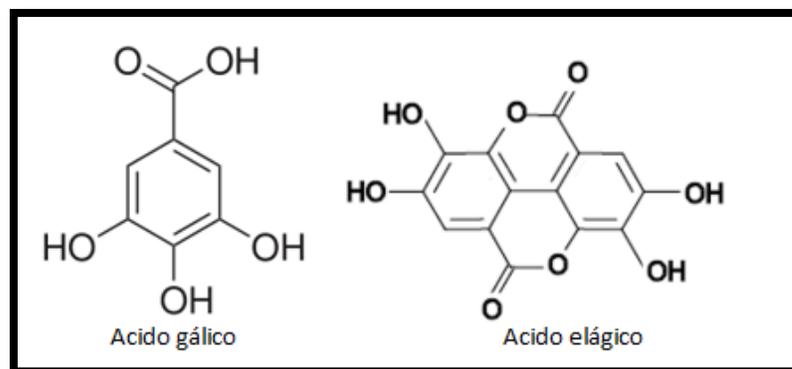


Figura 9. Derivados de los Taninos Hidrolizables

2.2.3.2 Taninos Condensados (TC)

Son polímeros de flavan 3-ol (catequina) y flavan 3-4 diol (leucoantocianidina); carecen de moléculas de glucosa y su hidrólisis es muy difícil, por lo que también son conocidos como no hidrolizables.

Los Taninos Condensados también son conocidos como proantocianidinas (PAS), cuyo término se deriva de la reacción de oxidación que produce antocianidinas (ACS) rojas en soluciones de alcohol-ácido. Tienen una estructura

similar a la de los flavonoides. Estas sustancias no son hidrolizables por los ácidos o enzimas. Son conocidas como proantocianidinas poliméricas y leucoantocianidinas basadas en unidades de flavan, principalmente catequina o epicatequina (Aguilera Carbó *et al.*, 2008).

Los taninos condensados son más abundantes en cortezas y maderas que los elagitaninos y los galotaninos, y son más resistentes al ataque microbiano (Ventura Sobrevilla *et al.*, 2008). Los taninos condensados incluyen los flavonoides; que a su vez se subdividen en antocianidinas y leucoantocianidinas y la catequina (Sánchez, 2001).

Flavonoides: Son un diverso grupo de metabolitos basados en un sistema de anillos heterocíclicos derivados de la biosíntesis de fenilalanina y policétidos. Los principales flavonoides presentes en los alimentos son la catequina y el kaempferol (Macheix y col; 1990). Los flavonoides se encuentran presentes en tomates, en algunas plantas aromáticas como la menta, también se encuentran presentes en grandes concentraciones en los cítricos (Dao y col; 1992). Dentro del grupo de los flavonoides se encuentran:

- a. *Antocianinas.* Son pigmentos presentes en algunas flores y frutas, y les imparten colores rojos, rosas, azules y morados, existen en diferentes formas químicas, y pueden presentar o no color, dependiendo el pH.
- b. *Leucoantocianidinas.* También llamadas flavan 3-4 diol.
- c. *Catequinas.* Son metabolitos vegetales polifenólicos con actividad antioxidante, también se les llama flavan-3-ol. Se encuentran en numerosas plantas.

2.2.3.3 Taninos Complejos

Constituidos por unidades de galotaninos o elagitaninos enlazados a una unidad de catequina.

2.3 Interacción con las proteínas

Los taninos son sustancias vegetales caracterizadas químicamente como polifenoles, con una elevada afinidad por las proteínas con las que pueden formar complejos estables (Xu y Diosady, 2000; Hofmann et al.; 2006).

La elevada afinidad de estos metabolitos por las proteínas se basa en que la molécula de tanino presenta múltiples grupos fenólicos y anillos que proveen numerosos puntos para la formación de cuatro tipos de enlaces con las proteínas (Xu y Diosaday, 2000), siendo los que se presentan con mayor frecuencia los últimos dos (Poncet-Legrand et al.; 2006):

- Enlaces iónicos reversibles entre el grupo aniónico del tanino y el grupo catiónico de la molécula proteica.
- Enlaces covalentes irreversibles formados por la oxidación de los polifenoles o quinonas y su posterior condensación con un grupo nucleofílico de la proteína.
- Interacciones hidrofóbicas entre el anillo aromático del compuesto fenólico y las regiones hidrofóbicas de la proteína. Estos enlaces son de tipo reversibles y se producen generalmente entre los taninos condensados y las proteínas.
- Puentes de hidrógenos reversibles entre los radicales hidroxilo que presentan los taninos y el oxígeno del grupo carbonilo de los péptidos de las cadenas proteicas.

Históricamente, se creyó que los taninos ligaban y precipitaban todas las proteínas de manera no específica, pero ahora se sabe que las interacciones tanino-proteína son específicas y dependen de las características de la proteína y del tanino (Muller-Harvey, 1999; Hofmann et al.; 2006) y de las condiciones del medio donde se lleva a cabo la formación del complejo tanino-proteínas (Hagerman y Butler, 1978). Así, es posible observar que, en el caso de las

moléculas proteicas, una conformación tridimensional abierta, un elevado peso molecular y un alto contenido en aminoácidos tales como la prolina o aminoácidos hidrofóbicos, confiere una mayor afinidad por los taninos (Asquith y Butler, 1986).

El tipo, la estructura, la concentración, la solubilidad y el peso molecular del tanino son también determinante en el grado de afinidad que estos polifenoles muestran por las proteínas (Poncet-Legrand et al., 2006).

Además de las características propias de los taninos y de las proteínas, existen otros factores ligados al medio que pueden influir en la formación y en la precipitación de los complejos tanino-proteína. Entre estos factores, el más importante es el pH (McNabb et al; 1998). En este sentido, se ha demostrado que tanto los TH como los TC forman complejos tanino-proteína que resultan estables en rangos de pH comprendidos entre aproximadamente 3.5 y 8.

3. HONGOS

Los hongos son un gran grupo de organismos vivos que se pueden encontrar en casi todos los nichos ecológicos. Se han descrito hasta la fecha cerca de 70,000 especies, estimando que existan en el planeta alrededor de 1.5 millones de especies (Isabel M. Santos, et al, 1998).

Los hongos son organismos eucariotas, por lo que poseen núcleos verdaderos que contienen varios cromosomas delimitado por una membrana nuclear, con nucléolo rico en ARN y orgánulos citoplásmicos, como mitocondrias, vacuolas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y ribosomas 80 S. Poseen, además, una pared gruesa, semejante en grosor y en composición química a la pared de las células vegetales.

3.1 Importancia de los hongos

Los hongos son la base de muchas fermentaciones y la fuente de muchas enzimas comerciales, como las amilasas y pectinasas; son responsables de la degradación de gran parte de la materia orgánica de la tierra, una actividad enormemente beneficiosa ya que permite el reciclaje de la materia viva (García R. 2008).

Los hongos de uso industrial deben producir la sustancia de interés, estar disponible en cultivo puro; y crecer en cultivos a gran escala, que origine el producto deseado en un corto período de tiempo (Lexur, 2007).

En la etapa de crecimiento o trofofase, el hongo crece exponencialmente. Al consumirse un nutriente, la velocidad de crecimiento disminuye y comienza la fase de almacenamiento en la cual comienza la síntesis de metabolitos secundarios y la fase de mantenimiento donde la producción de metabolitos secundarios disminuye (Forchiassin, F. 1999)

3.2 *Aspergillus niger*

Aspergillus niger es un hongo que produce un moho negro en vegetales - muy común en la lechuga, el tomate o la acelga-. Es una de las especies más comunes del género *Aspergillus*.

El *Aspergillus* es filamentoso (compuesto de cadenas de células, llamadas hifas), y su hábitat natural es el heno y el compostaje.

Los mohos del género *Aspergillus* causan el deterioro de muchos productos alimenticios. Los productos metabólicos de la invasión fúngica suelen ser muy tóxicos, tanto para el hombre como para otros animales. También producen la inhibición de la germinación junto con cambios de color, alentamiento,

amohosado, apelmazado y finalmente podredumbre de las semillas. Algunas especies, por ejemplo *A. niger* o *A. oryzae*, son de interés industrial o se emplean en la fermentación de alimentos en ciertas regiones (Kozakiewicz 1989).

3.2.1 Clasificación taxonómica

El *aspergillus niger* se encuentra en el grupo de los Aspergilos negros, el cual se clasifica de la siguiente manera (Cuadro 2).

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *Aspergillus niger* (Kwon-Chung, 1992)

Reino	Fungi
Filum	Deuteromycota
Clase	Hyphomycetas
Orden	Moniliales
Familia	Moniliaceae
Género	Aspergillus
Especie	Niger

3.2.2 Morfología

El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de *aspergillus*. Poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme (Figura 10) y a simple vista las más grandes suelen parecer diminutas alfileres sobre el substrato (Kozakiewicz 1989).

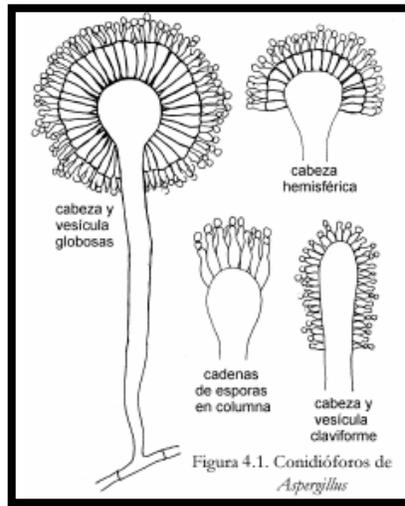


Figura 10. Diferentes tipos de cabezas conidiales del género *Aspergillus*

En los *aspergillus*, los conidios constituyen cadenas que se originan en la célula conidiógena o fiálide. En algunos *aspergillus* hay células adyacentes a las fiálides denominadas métulas o células de soporte. Los *Aspergillus* poseen una o dos series de células sobre la vesícula, o bien presentan simultáneamente cabezas de ambos tipos (Kozakiewicz 1989).

3.2.3 Uso comercial

Se utiliza para la producción de ácido cítrico y glucónico. Produce enzimas como α -amilasa, la cual se utiliza para la fabricación de pan. Pectinasas para procesamiento de frutos. (Saéz Vega Alex, et al, 2002)

3.3 *Trichoderma*

El género *Trichoderma* es un grupo de hongos aislados comúnmente del suelo que se reproducen asexualmente. *Trichoderma* es un hongo filamentoso anamórfico, heterótrofo, aerobio, con una pared celular compuesta de quitina, de rápido crecimiento que puede utilizar una gran variedad de sustratos complejos como celulosa, quitina, pectina y almidón como fuente de carbono. Muchas cepas

crecen eficientemente en medios sólidos o líquidos y en un amplio rango de temperaturas, además es relativamente tolerante a humedades bajas y tiende a crecer en suelos ácidos (Harman *et al.*, 1981).

3.3.1 Clasificación taxonómica

Basándose en la clasificación taxonómica de Alexopoulos y Mims (1979) y Subramanian (1983), el género *Trichoderma* se ubicaría de la siguiente manera (Cuadro 3).

Cuadro 3. Clasificación Taxonómica Del género *Trichoderma*

Reino	Fungi
División	Eumycota
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Hyphomycetas
Orden	Hyphales (Moniliales)
Familia	Moniliaceae
Género	Trichoderma

3.3.2 Morfología

Sus colonias son lanosas y se hacen compactas con el tiempo, toman un color verde brillante debido a los conglomerados que se forman en las puntas de las hifas, también pueden ser de color blanco o amarillo, además se pueden formar a veces anillos concéntricos. Sus características microscópicas son: conidióforos hialinos, ramificados y pueden exhibir de vez en cuando una forma piramidal (Figura 11) Sus fiálides son hialinas en forma de botella inflada en la

base, éstas se unen a los conidióforos perpendicularmente; éstas fiálides pueden encontrarse solitarias o en racimos. (Samson, 1996).

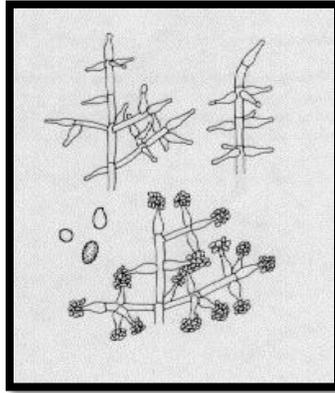


Figura 11. Conidióforos de *Trichoderma*

3.3.3 Aplicación industrial

Se emplean comercialmente para la producción de celulasas y otras enzimas que degradan polisacáridos complejos. Son usadas con frecuencia en la industria textil y alimenticia, formando parte de alimento para aves con el fin de incrementar la digestión de las hemicelulosas de la cebada y otros cereales (Ordóñez, 2000).

4. FERMENTACIÓN

El proceso conocido como fermentación implica el empleo de microorganismos para llevar a cabo transformaciones de la materia orgánica, catalizadas por enzimas. Los productos comercialmente importantes de las fermentaciones industriales pertenecen a cuatro categorías principales: células microbianas, moléculas grandes como enzimas y polisacáridos, productos básicos y metabolitos secundarios que nos son necesarios para el crecimiento celular. Las células utilizadas para obtener estos productos tienen una gran variedad de propiedades bioquímicas y fisiológicas. La producción comercial de productos de

fermentación ha empleado principalmente diversas especies de bacterias, levaduras y hongos (Ward, 1989).

Para que un proceso de fermentación se desarrolle adecuadamente se debe establecer inicialmente el medio óptimo para el crecimiento de microorganismos. Esto incluye la determinación de parámetros tales como pH, temperatura, oxígeno disuelto y nutrientes, entre otros; con el fin de que el microorganismo, ya sea hongo, bacteria o levadura, desarrolle apropiadamente su metabolismo y obtener de esta manera la base de un producto de interés comercial (Forero, 2002.).

Los microorganismos implicados en los procesos de fermentación son principalmente quimiorganótrofos, es decir, que pueden obtener su energía y su fuente de carbono para la oxidación de compuestos orgánicos. Los hongos más importantes implicados en las fermentaciones industriales se clasifican principalmente en dos grupos: los Zygomycotina, con hifas aceptadas como los géneros *Mucor* y *Rhizopus*, y los Deuteromycotina, septados u hongos imperfectos, por ejemplo, los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. En general, la producción masiva de microorganismos biocontroladores puede llevarse a cabo mediante dos técnicas: fermentación líquida o sumergida y fermentación sólida o en superficie (Ward, 1989).

4.1 Fermentación líquida o sumergida

La fermentación líquida o sumergida es definida como la técnica de crecimiento de microorganismos en un medio líquido, donde todos los nutrientes se encuentran disueltos en el medio de cultivo y el proceso se lleva a cabo bajo condiciones fisicoquímicas controladas, éste es el método más usado por la industria biotecnológica. En comparación con la fermentación sólida, presenta las siguientes ventajas: se obtiene un producto más homogéneo, es más sencillo el control de los factores de fermentación como temperatura, aireación, agitación y pH, presenta mejor distribución del oxígeno y del calor suministrado al sistema, y se puede llevar a cabo la medición directa de la biomasa. La fermentación

sumergida se realiza principalmente usando tres métodos de alimentación del sustrato: fermentación en lote, fermentación en lote alimentado y fermentación en cultivo continuo (Crueger, 1989).

4.2 Biodegradación de taninos

4.2.1 Aspectos generales

Las investigaciones se han enfocado en como obtener pequeñas moléculas de taninos con alta actividad biológica que puedan ser utilizados en diversas aplicaciones; por lo que la biodegradación es uno de los caminos más eficientes para lograr degradar moléculas grandes de taninos en pequeñas moléculas con bio-actividades de alto valor por medio del uso de algunos microorganismos o ciertas enzimas (Saxena y col; 1995).

Los hongos, bacterias y levaduras presentan diferente resistencia a los taninos y producen diferentes mecanismos de degradación (Bhat y col; 1998).

4.2.2 Degradación microbiana de taninos

4.2.2.1 Degradación bacteriana

Los monómeros de ácido gálico son utilizados como sustrato después de su rompimiento a simples ácidos alifáticos, los cuales entran al ciclo del ácido cítrico. El ácido gálico es convertido a pirogalol por la enzima galato carboxilasa. La degradación anaeróbica de galotaninos fue reportada por primera vez por Field y Lettinga (1987) quienes observaron el rompimiento tánico por un consorcio de bacterias anaeróbicas. Subsecuentemente se han realizado diversos estudios sobre los mecanismos de degradación anaeróbica de compuestos polifenólicos.

La descomposición anaeróbica de ácido gálico, el monómero de taninos hidrolizables ocurre por diferentes mecanismos. El primer paso es descarboxilación de ácido gálico para formar pirogalol el cual es transformado a floroglucinol por pirogalol floroglucinol isomerasa y a dehidrofloroglucionol por floroglucinol reductasa, la dihidrofloroglucinol es convertida a 3-hidroxi-5-oxohexanoato (HOHN) por dihidrofloroglucinol hidrolasa. El HOHN es degradado por diferentes rutas en sistemas anaeróbicos y ruminales en el sistema anaeróbico, este es convertido a 3,5-dioctohexanoato (triacetato) por la HOHN dehidrogenasa y finalmente a 3 moléculas de acetil-CoA por las acción enzimática secuencial de triacetil-CoA transferasa, triacetato B-ketotiolasa, acetoacetil-CoA B-Ketotiolasa, fosfotransacetilasa y acetato quinasa (Brune y Schink, 1992).

4.2.2.2 Degradación fúngica

La degradación de taninos hidrolizables, particularmente galotaninos, es mejor conocida en sistemas fúngicos (Ventura-Sobrevilla, 2007).

Knudson (1913) fue el primero en reportar que el ácido tánico puede ser degradado por algunas cepas de *Aspergillus niger*. Los hongos filamentosos, especialmente especies de *Penicillium* y *Aspergillus* han sido implicados en la degradación de taninos. Lewis y Starkey (1969) reportaron que cultivos puros de algunos hongos del suelo crecieron en un medio que contenía taninos como única fuente de carbono; se menciona que utilizaron diferentes fuentes de taninos como sustratos, tanto taninos hidrolizables como taninos condensados y observando como resultado que hongos microscópicos *Aspergillus* y *Penicillium* así como hongos macroscópicos como *Fomes*, *Polyborus* y *Trametes* crecían mejor en ácido tánico (galotaninos) que en taninos de castaña (elagitaninos) o taninos de zarzo (taninos condensados).

La mayoría de las especies fúngicas usadas para la degradación de efluentes tánicos, pertenecen a los géneros de *Aspergillus* y *Penicillium*. Otros

hongos incluyendo *Chaetomium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Cylindrocarpon* y *Trichoderma* son capaces de degradar desechos que contengan taninos (Mahadevan y Muthukumar, 1980), además se reporta que *Psallia campestris* puede oxidar catequina y *Aspergillus niger* degradar ácido gálico (Mahadevan y Sivaswamy, 1985). Otros trabajos mencionan que las especies *Aspergillus* y *Penicillium* podrían utilizar la catequina, los galotaninos y el ácido gálico como fuente de carbono. Los galotaninos, además de la catequina, fueron degradados por *A. fumigatus* y se presentó acumulación de ácido gálico de 6 a 8 días.

En algunos sistemas fúngicos, se ha encontrado que los taninos se degradan rápidamente en presencia de otras sustancias metabolizables. Ganga y col. (1977) encontraron que *Aspergillus niger* y especies de *Penicillium* crecieron profusamente en un medio que contenía glucosa y taninos de madera de manzano (TC). En taninos de zarzo al 0.3% y glucosa, el crecimiento de *A. niger* mostró mejoría. Fuentes adicionales de carbono y nitrógeno favorecen la producción más acelerada de tanasa, la cual permite aprovechar los taninos y proveer una fuente continua de carbono.

Reacciones de hidrólisis y oxidación ocurren durante la degradación de taninos, catalizadas por diferentes enzimas producidas por microorganismo. Estas enzimas hacen referencia a la tanasa, polifenoloxidasas y descarboxilasas. Los galotaninos son fácilmente degradados por bacterias, hongos y levaduras, mientras que los elagitaninos son más difíciles de degradar debido a que su estructura es más compleja.

4.2.2.3 Rutas de degradación fúngica

Inicialmente la catequina es degradada hasta fluoroglucinol ácido carboxílico y ácido protocatechuico por catequin oxigenasa. Posteriormente la degradación del floroglucinol ácido carboxílico hasta la formación de floroglucinol, resorcinol e hidroxihidroquinona. La hidroxihidroquinona, que es el último compuesto aromático

de la ruta, es roto por 1,2-dioxigenasa hasta formar acetato de maleil el cual es convertido hasta β -quetoadipato (Mingshu y col; 2006).

El metabolismo del ácido protocatechuico se produce por dos diferentes rutas, ambas conducen a la formación β -quetoadipato. En la primera ruta, éste es convertido protocatechuato 3,4-dioxigenasa hasta β -carboxi-cis, cis-muconato, el cual es transformado hasta β -quetoadipato. En la segunda ruta, el ácido protocatechuico es descarboxilado por protocatechuato descarrboxilasa hasta formar catecol, el cual es roto por catecol 1,2-dioxigenasa hasta cis, cis-muconato y finalmente transformado hasta β -quetoadipato. La β -quetoadipato obtenida de esta ruta es usada para la generación de acetil CoA, de cada molécula formada se obtienen tres moléculas de acetil CoA (Bhat y col; 1998).

Capítulo 2

Materiales y Métodos

Etapa 1: Obtención de hongos

Esta consistió en obtener los hongos con los cuales se va a trabajar, por medio del aislamiento, purificación, caracterización macroscópica y microscópica; y posteriormente su conservación.

1.1 Conservación de hongos

Las cepas de 5 *Trichodermas* (THlo1, THlo2, THlo3, T. piña, T25) y un *Botrytis cinerea*, fueron proporcionados por el Centro de Microbiología Aplicada, la cepa de *Penicillium* y *Aspergillus niger* fueron proporcionados por el Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la UAAAN.

Después se procedió a:

- a) Resembrar dichos hongos en cajas Petri de PDA para verificar su pureza y viabilidad, por triplicado, dos sembrados por explante y uno por estriado invasivo, se incubaron por 7 días a 28⁰C.
- b) Realizar montajes de cada hongo para observar la morfología microscópica en un Microscopio Motic B3 Profesional Series, para verificar que se trataba de dichos hongos.
- c) Inocular los matraces con los hongos respectivos, esto se realizó por duplicado, utilizando matraces de 250 mL que contenían 100 mL de caldo nutritivo, se incubaron en una incubadora con agitación (New Brunswick Scientific Innova 43) a 180rpm y una temperatura de 28⁰C durante 7 días.

Las conservaciones fueron realizadas teniendo en cuenta los siguientes aspectos:

Viabilidad: Se determinó la viabilidad del hongo si este se recuperaba mediante el crecimiento formando colonias típicas en medio de cultivo.

Pureza: Se determinó que un hongo estaba puro cuando únicamente se recuperaban colonias típicas del aislamiento evaluado.

Estabilidad morfológica: Teniendo en cuenta que el concepto de especie que se maneja para los hongos es a nivel morfológico, se consideró que un aislamiento poseía estabilidad morfológica cuando a su evaluación macroscópica y microscópica de estructuras correspondía a la clasificación previa a su mantenimiento.

Para conservar los hongos se utilizaron tres metodologías:

- Leche descremada

Esterilizar a 121⁰C por 15 min en un autoclave tubos de centrifuga, frascos de antibióticos, solución salina (9 gramos/ 1000 ml de agua), leche descremada (2 gramos de leche esterilizada/100 ml de agua). En tubos de centrifuga de 50 ml, llenar a 40 ml tomando la muestra del matraz que contiene el hongo inoculado. Centrifugar 15 min a 4500 rpm. Decantar. Agregar 20 ml de la solución salina estéril. Agitar en vortex. Centrifugar 15 min a 4500 rpm. Decantar. Agregar 20 ml de la solución salina estéril. Agitar en vortex. Centrifugar 15 min a 4500 rpm. Decantar. Agregar 5 ml de leche estéril. Agitar en vortex. Llenar frascos con 500 µL. Ultra congelación. Se realizó por triplicado.

- Glicerol

Esterilizar a 121⁰C por 15 min en un autoclave tubos de centrifuga, viales, solución salina (9 gramos/ 1000 ml de agua), glicerol al 30%. En tubos de centrifuga de 50 ml, llenar a 40 ml tomando la muestra del matraz que contiene el hongo inoculado. Centrifugar 15 min a 4500 rpm. Decantar. Agregar 20 ml de la solución salina

estéril. Agitar en vortex. Centrifugar 15 min a 4500 rpm. Decantar. Agregar 20 ml de la solución salina estéril. Agitar en vortex. Centrifugar 15 min a 4500 rpm. Decantar. Agregar 10 ml de solución salina estéril. Agitar en vortex. En viales, colocar 0.25 ml de la suspensión de células. Agregar 0.75 ml de glicerol estéril. Agitar. Ultra congelación. Se realizó por triplicado.

- Agar papa-dextrosa (PDA)

En tubos con PDA, se colocó un explante de cada uno de los hongos, se incubación por 7 días a 28⁰C y posteriormente se les agregó glicerol al 30% , esto se realizó por duplicado.

Etapa 2. Obtención de la materia prima

2.1 Recolección de las muestras vegetales

El material vegetal fue recolectado por la empresa Mexicana Fitokimica Industrial de México S.A de C.V , siguiendo el procedimiento que se describe a continuación:

El ruezno se recolectó en el Rancho las Esperanzas Km 75 + 8 carretera Saltillo-Monclova, Coahuila. Los tallos del Fracc. La Rosaleda de Saltillo, Coahuila y la cáscara de nuez se recolectó del Rancho Parras localizado en el Km 125 carretera General Cepeda-Parras, Coahuila.

Durante el corte de las plantas se utilizó material para protección personal (guantes) y utensilios para cortar (machete y cuchillo). El tejido vegetal incluía hojas y tallos. Las muestras fueron almacenadas en bolsas plásticas de poliuretano y transportadas al laboratorio de la empresa.

2.2 Tratamiento y almacenamiento de las muestras vegetales

Las muestras fueron almacenadas y etiquetadas en bolsas plásticas, posteriormente los tallos que se derivaron de la poda fueron deshidratados exponiéndolos durante las mañanas sobre bolsas. Una vez secos los materiales se pulverizaron utilizando un molino (Thomas Wiley) con malla de 1 mm, esto con el objetivo de que las muestras quedaran finamente pulverizadas. El polvo se almacenó en frascos color ámbar o botes de plástico secos a temperatura ambiente y en oscuridad para su conservación hasta su uso (Waterman y Mole, 1994).

Finalmente, los residuos (ruezo, tallos y cáscara) previamente molidos se volvieron a tamizar de manera manual por la malla No. 50 con una abertura de 0.0117 pulgadas.

Etapa 3. Pruebas de invasión fúngica en residuos de nogal pecanero

3.1 Preparación del medio sólido con residuos de nogal

Para preparar el medio sólido se siguió la formulación del medio Czapek Dox sustituyendo la fuente de sacarosa por el residuo de nogal (Cuadro 4) y también se utilizó el Czapek Dox como testigo (Cuadro 5).

Cuadro 4. Formulación del medio Czapek Dox-Residuo de Nogal

Sustancia	Cantidad (g/L)
Residuo de nogal	30
Nitrato de sodio	3
Fosfato dipotásico	1
Sulfato de magnesio	0.50
Cloruro de potasio	0.50
Sulfato ferroso	0.01
Agar bacteriológico	15

Cuadro 5. Formulación del medio Czapek Dox (Testigo)

Sustancia	Cantidad (g/L)
Sacarosa	30
Nitrato de sodio	3
Fosfato dipotásico	1
Sulfato de magnesio	0.50
Cloruro de potasio	0.50
Sulfato ferroso	0.01
Agar bacteriológico	15

3.2 Pruebas de invasión fúngica en residuos de nogal

Se vació 30 ml del medio de cultivo (nogal, tallos, cáscara) en cajas Petri, una vez solidificado el medio, se colocó un explante de cada hongo en las cajas Petri que contenían el medio, se realizó por duplicado, incluyendo el testigo para comparar el crecimiento. Se incubaron por 5 días a 28°C para las cepas de *Trichoderma* y para el *Penicillium* por 9 días. Monitoreando el crecimiento micelial utilizando un calibrador vernier digital SR44.

3.3 Conteo de esporas

A la caja que contenía el hongo inoculado, se le agregaron 10 mL de agua estéril, se barrió la caja con ayuda de una varilla de vidrio y se vació el concentrado de esporas a un tubo de centrifuga de 50 mL. Para realizar la dilución se tomaron 100 µL del concentrado de esporas y se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, agregando 900 µL de agua destilada estéril, agitar en vortex. De ésta suspensión se tomó una pequeña alícuota para el llenado de la Cámara de Neubauer, donde se realizó el conteo en el microscopio Motic. La cantidad de esporas se determinó con la siguiente ecuación:

$$\text{Número de esporas/mL} = (\text{promedio de esporas}) (10X4) (25) (\text{Factor de dilución})$$

Etapa 4. Cinética de crecimiento

De las cepas evaluadas por invasión fúngica, se seleccionó la que presentó el crecimiento radial más rápido en el medio de Czapek Dox-Residuo en base al tiempo, siendo el *Trichoderma aperellum* T- 25 el mejor, junto con el *Aspergillus niger*, para posteriormente evaluar una cinética de crecimiento.

4.1 Preparación del medio líquido

Para preparar el medio líquido se siguió la formulación del medio Czapek Dox sustituyendo la fuente de glucosa por el residuo de nogal (Cuadro 6) y también se utilizó el Czapek Dox como testigo (Cuadro 7), eliminando el agar bacteriológico.

Cuadro 6. Formulación del medio líquido Czapek Dox-Residuo de Nogal

Sustancia	Cantidad (g/L)
Residuo de nogal	30
Nitrato de sodio	3
Fosfato dipotásico	1
Sulfato de magnesio	0.50
Cloruro de potasio	0.50
Sulfato ferroso	0.01

Cuadro 7. Formulación del medio líquido Czapek Dox (Testigo)

Sustancia	Cantidad (g/L)
Sacarosa	30
Nitrato de sodio	3
Fosfato dipotásico	1
Sulfato de magnesio	0.50
Cloruro de potasio	0.50
Sulfato ferroso	0.01

Se prepararon 50 ml del medio de cultivo de residuo (Cuadro 3) y testigo (Cuadro 4) en 30 y 10 matraces Erlenmeyer de 150 ml respectivamente. Los

matraces se taparon con tapones de gasa y algodón y se sometieron a esterilización en autoclave a 121⁰C por 15 minutos. Una vez enfriado el medio, se inocularon con 1E6 esporas/ml del hongo *Aspergillus niger* y *Trichoderma asperellum T-25*, y se colocaron en una incubadora con agitación a 180 rpm con una temperatura de 30⁰C durante 5 días. Monitoreando el crecimiento cada 24 horas y sacando un matraz de cada medio (Czapek, Ruezno, Cáscara, Tallos) de los dos hongos, hasta llegar al último día; los cuales fueron guardados en refrigeración a 4⁰C para su posterior uso.

4.2 Caracterización físico química

Una vez obtenidas las fermentaciones, el líquido de cada matraz se filtró con ayuda de un matraz Kitazato y con el líquido filtrado se trabajó para la determinación de azúcares totales, taninos condensados, taninos hidrolizables y polifenoles totales, estas determinaciones se realizaron por triplicado.

4.2.1 Metodología para determinación de taninos hidrolizables

La técnica que se utilizó fue Folin-Ciocalteu (Waterman y Mole, 1994), donde se colocaron 400 µL de la muestra en tubo de ensayo al mismo tubo se le adicionaron 400 µL del reactivo comercial Folin - Ciocalteu, se agitó y se dejó reposar por 5 minutos. Después se adicionaron 400 µL de carbonato de sodio 0.01M, se agitó y dejó reposar por 5 minutos. Posteriormente se diluyó con 2.5 mL de agua destilada y se leyó en un espectro UV/Visible a 725 nm para determinar taninos hidrolizables. Las lecturas obtenidas fueron analizadas por la ecuación obtenida en la correspondiente curva patrón El ensayo se realizó por triplicado.

Preparación de la curva patrón de Taninos Hidrolizables

Se preparó una curva patrón utilizando una solución estándar de ácido gálico a una concentración de 200 ppm (Figura 12). En tubos marcados del 0 al 5 se

agregaron 0, 80, 160, 240, 320 y 400 μL de solución madre de ácido gálico respectivamente, y del tubo 0 al 5 400, 320, 240, 160, 80 y 80 μL de agua destilada hasta tener un volumen final de 400 μL . Después se les añadieron 400 μL de reactivo de Folin–Ciocalteu, se agitaron los tubos y se dejaron reposar 5 min.; luego se agregaron 400 μL de Na_2CO_3 0.01 M, se agitaron los tubos y reposaron 5 min. Posteriormente a cada tubo se les agregaron 2.5 mL de agua destilada para después leer a 725 nm de longitud de onda.

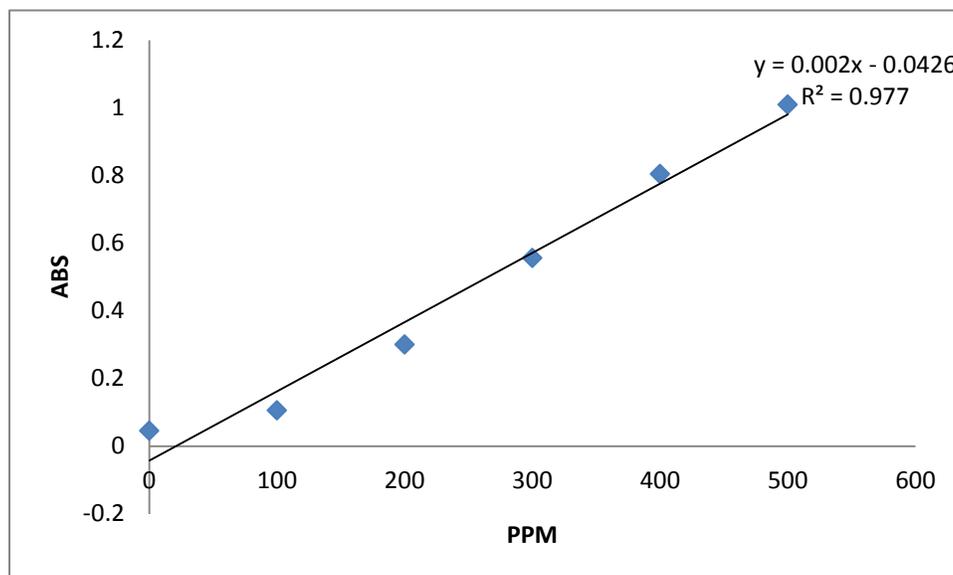


Figura 12. Curva Patrón para Taninos Hidrolizables

4.2.2 Metodología para determinación de Taninos Condensados

La técnica que se utilizó fue (Swann y Hillis 1959), en un tubo de ensaye se colocaron 0.5 mL de la muestra o el estándar, sobre este se agregaron 3 mL de HCl/Butanol (1:9) y 0.1 mL de reactivo férrico. Los tubos se taparon, dentro de los tapones se colocaron empaques, para evitar la evaporación del butanol. Todos los tubos fueron calentados por 1 hora en un baño María a 100 °C. Una vez transcurrido el tiempo, se dejaron enfriar y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro UV/visible a 460 nm.

Curva patrón de Taninos Condensados

Se preparó una curva patrón con una solución estándar de catequina a una concentración de 1.0 g/L (Figura 13). Se etiquetaron 5 tubos del 0 al 4, agregándole a cada tubo 0, 125, 250, 375 y 500 μ L respectivamente de solución madre de catequina; se agregó a cada tubo 500, 375, 250, 25 y 0 μ L de agua destilada para completar el volumen que indica la técnica. Después se le añadieron 3 mL de HCl/Butanol (1:9) y 0.1 mL de reactivo férrico. Los tubos de taparon, dentro de los tapones se colocaron empaques, para evitar la evaporación del butanol y fueron sometidos a baño María a 100°C durante 1 hora. Una vez transcurrido el tiempo se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro UV/visible a 460 nm.

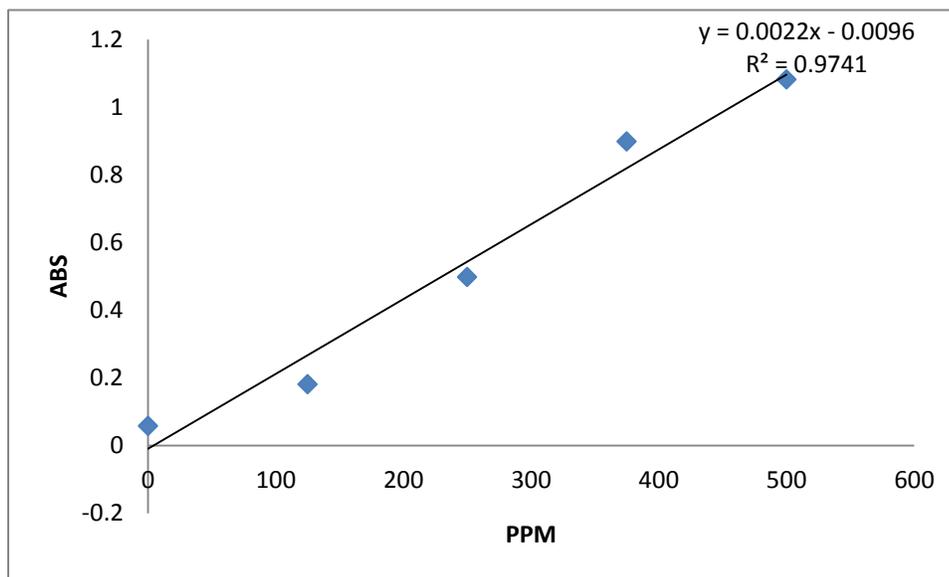


Figura 13. Curva Patrón para Taninos Condensados

4.2.3 Metodología para determinación de Taninos Totales

Los Taninos totales se obtuvieron mediante la suma de los taninos hidrolizables y los taninos condensados.

4.2.4 Metodología para determinación de Azúcares Totales

Se evaluaron por el método de fenol sulfúrico de Dubois, en un tubo de ensayo de 13x100 se colocan 250 μL de la muestra, agregar 250 μL de fenol al 5% (5 g de fenol aforar a 100 ml con agua destilada a 4⁰C) colocar en baño de hielo por 5 minutos, transcurrido el tiempo agregar 1000 μL de H_2SO_4 concentrado (previamente frío a 4⁰) lentamente tratando de caer por las paredes del tubo de ensayo, agitar suavemente en vortex. Dejar reposar 10 minutos, colocar en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos, enfriar en baño de hielo, transferir la muestra a la celdilla y leer a una absorbancia de 488 nm.

Curva patrón de Azucares totales

Se preparó una curva patrón con una solución estándar de sacarosa a una concentración de 1.0 g/L (Figura 14). Se etiquetaron 6 tubos del 0 al 5, colocando 0, 200, 400, 600, 800, y 1000 μL de la solución madre de sacarosa; se agregó a cada tubo 1000, 800, 600, 400, 200 y 0 μL de agua destilada para completar el volumen que indica la técnica. Después se le añadieron 250 μL de fenol al 5%, colocar en baño de hielo por 5 minutos, transcurrido el tiempo agregar 1000 μL de H_2SO_4 concentrado (previamente frío a 4⁰) lentamente tratando de caer por las paredes del tubo de ensayo, agitar suavemente en vortex. Dejar reposar 10 minutos, colocar en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos, enfriar en baño de hielo, transferir la muestra a la celdilla y leer a una absorbancia de 488 nm.

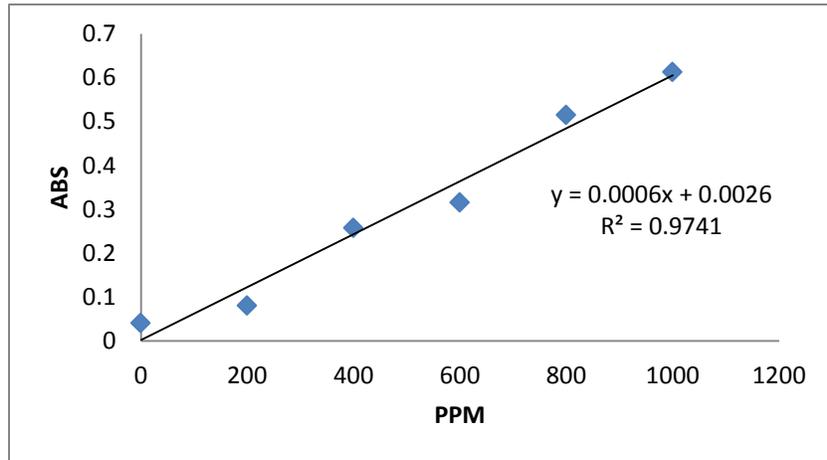


Figura 14. Curva Patrón para Azúcares Totales

Capítulo 3

Resultados y Discusión

Etapa 1. Obtención de hongos

1.1 Aislamiento

Se aislaron microorganismos de la zona semiárida del estado de Coahuila en la región cercana a la ciudad de Saltillo Coahuila. De los microorganismos aislados se obtuvo una cepa identificada como *Penicillium sp.* y una cepa de *Aspergillus niger*.

Las cepas de *Trichoderma asperellum* (THlo1, THlo2, THLo3, T25 y T. piña) y *Botrytis cinérea* fueron proporcionadas por el cepario de la empresa Fitokimica Industrial de México

1.2 Purificación

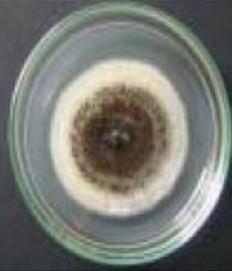
Una vez obtenidas las cepas, se realizaron siembras de los hongos por el método de explante y estriado en cajas Petri con medio Agar Papa-Dextrosa y Czapek, en los cuales no se observaron contaminaciones con otros hongos, por lo cual su pureza fue óptima.

1.3 Evaluación de la morfología macroscópica y microscópica

Teniendo en cuenta las descripciones morfológicas macroscópicas y microscópicas de los hongos reportados bibliográficamente, se procedió a la observación e identificación de cada cepa, determinando así la estabilidad morfológica de cada cepa, de las cuales todas fueron estables, a excepción de

Botrytis cinérea ya que solo presentó producción de estructuras de resistencia (esclerocios) e hifas infértiles.

Cuadro 8. Descripción macroscópica de *Aspergillus niger*

MEDIO	DESCRIPCIÓN DE LAS COLONIAS	
Agar PDA	Colonias al principio blancas y posteriormente negras, textura similar a la pimienta.	

Cuadro 9. Descripción microscópica de *Aspergillus niger*

ESTRUCTURA	DESCRIPCION	
Hifas	Septadas, hialinas	
Conidióforo	Pared lisa, hialinos largos	
Vesícula	Globosa grade, subesferica	
Fiálides	Bisériadas	
Conidias	Globosa negras, subesférica.	

Cuadro 10. Descripción macroscópica de *Penicillium sp.*

MEDIO	DESCRIPCIÓN DE LAS COLONIAS	
Agar PDA	Colonias de color verde-gris planas aterciopeladas fasciculadas. Producción de exudados	

Cuadro 11. Descripción microscópica de *Penicillium sp.*

ESTRUCTURA	DESCRIPCION	
Hifas	Septadas	
Conidióforo	Hialinos, largos hialinos, ramificados	
Métulas	Ramificadas de constitución gruesa.	
Fiálides	Forma de botella con cuello angosto agrupado	
Conidias	Globosas lisas, hialinas, esféricas.	

Cuadro 12. Descripción macroscópica de *Trichoderma sp*

MEDIO	DESCRIPCIÓN DE LAS COLONIAS	
Agar PDA	Colonias al principio blancas y posteriormente verde oscuro, lanosas, formación de anillos concéntricos.	

Cuadro 13. Descripción microscópica de *Trichoderma sp.*

ESTRUCTURA	DESCRIPCION	
Hifas	Hialinas, Septadas hialinas	
Conidióforos	Hialinos, erguidos, bifurcados.	
Fiálides	Tienen forma de botella ancha en la base, se presenta solitaria o en racimos.	
Conidias	Elipsoidales, hialinos. Lisa o equinulada en racimos.	

1.4 Conservación

De las cepas evaluadas (Cuadro 14) se procedió a su conservación utilizando los métodos de Glicerol, leche estéril y tubos de PDA.

Cuadro 14. Cepas evaluadas

<i>Trichoderma THlo1</i>
<i>Trichoderma THlo2</i>
<i>Trichoderma THlo3</i>
<i>Trichoderma T25</i>
<i>Penicillium sp</i>
<i>Aspergillus niger</i>
<i>Botrytis cinérea</i>

Es necesario resaltar que en los tres métodos anteriores, se realizó la prueba de viabilidad la cual consistió en tomar 0.1 ml de la suspensión obtenida en una caja con agar y observar el crecimiento confirmando así su viabilidad y pureza.

Esto se efectuó como mecanismo de verificación de la autenticidad del microorganismo a conservar y por ende, asegurar su calidad.

Etapas 2. Pruebas de invasión fúngica en residuos de nogal pecanero

Las cepas (Cuadro 14) fueron evaluadas en el medio de cultivo sólido que contenía 30% de residuos de nogal pecanero (Cuadro 4) y en el medio Czapek Dox como testigo (Cuadro 5), realizando cinéticas de crecimiento radial cada 24 horas.

En el medio de Czapek Dox, se obtuvieron los mejores resultados con la cepa de *Aspergillus niger*, ya que como se observó en la Figura 15, a las 48 horas el crecimiento es mayor en comparación con las demás cepas, y a las 72 horas presenta el máximo crecimiento radial, cubriendo la totalidad de la caja Petri que contiene el medio. Dentro de los *Trichodermas*, el T25 es el que obtiene el mejor crecimiento en menor tiempo, ya que como lo muestra la misma figura, a las 72 horas obtiene el máximo crecimiento radial, mientras que las cepas THlo1, THlo2, THlo3 y T. piña presentaron su máximo crecimiento a las 96 horas. El hongo que mostró un menor crecimiento fue la cepa de *Penicillium sp*, ya que como se muestra en la figura su máximo crecimiento fue a las 120 horas, el cual fue mucho menor en comparación con las demás cepas.

En esta prueba, también se midió el crecimiento de *Botrytis cinérea*, pero debido al lento crecimiento de la cepa en el medio, no se terminó de correr la cinética para este hongo, ya que a las 120 horas mostraba un mínimo crecimiento, tan pequeño que no era posible medirlo con el calibrador digital, por lo que se eliminó de la prueba.

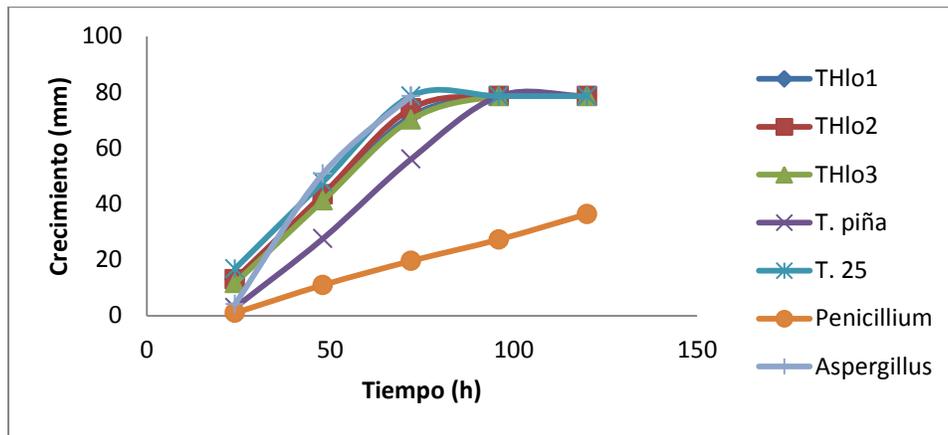


Figura 15. Medición radial en Czapek Dox

En las pruebas de invasión fúngica usando el medio de ruezno de nogal, se obtuvieron los mejores resultados con la cepa de T25, ya que como se puede observar en la figura 16, a las 72 horas obtuvo el máximo crecimiento radial, mientras que las demás cepas de *Trichoderma* lo obtuvieron a las 96 horas. La cepa de *Aspergillus niger*. obtuvo su máximo crecimiento a las 96 horas, mostrando un mejor resultado que la cepa de *Penicillium sp*, ya que este último obtuvo su máximo crecimiento a las 120 horas, y aún así no alcanzó a cubrir toda la superficie de la caja.

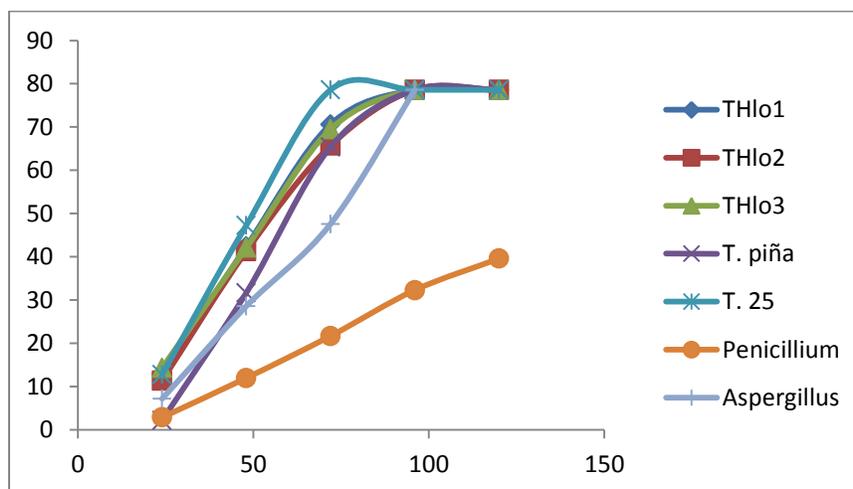


Figura 16. Medición radial en Czapek-ruezno

Las cepas evaluadas en el medio de tallos de nogal, mostraron un resultado similar al del ruezno, ya que como se observa en la figura 17, el hongo que obtuvo un mejor crecimiento fue el T25 obteniendo su máximo crecimiento a las 72 horas, seguido de las cepas THlo1, THlo2, Thlo3 y T. piña que obtuvieron a las 96 horas su máximo crecimiento. La cepa de *Aspergillus niger*. Obtuvo su máximo crecimiento a las 120 horas, y el *Penicillium sp* también a las 120 horas, pero en menor proporción que el *Aspergillus niger*.

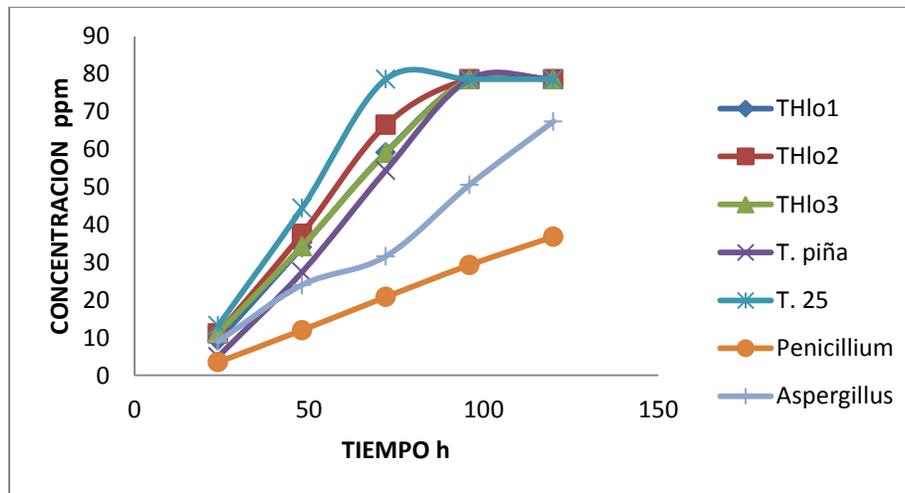


Figura 17. Medición radial en Czapek- Tallos

La evaluación del crecimiento radial en el medio de cáscara de nogal, mostró ciertas diferencias en comparación con los medios de tallos y ruezno, ya que como se observa en la figura 18, el máximo crecimiento se obtuvo a las 96 horas correspondiente a las cepas de T25, THlo1, THlo2 y THlo3; mientras que el T. piña lo alcanzó a las 120 horas con un crecimiento de 56.5 mm, también el *Penicillium sp* obtuvo su crecimiento máximo a las 120 horas.

También podemos observar que la cepa de *Aspergillus niger* obtuvo su máximo crecimiento a las 120 horas con 55.9 mm, lo que mostró que de los tres

medios de residuo de nogal, en el de cáscara es en el que obtiene un menor crecimiento para esta cepa.

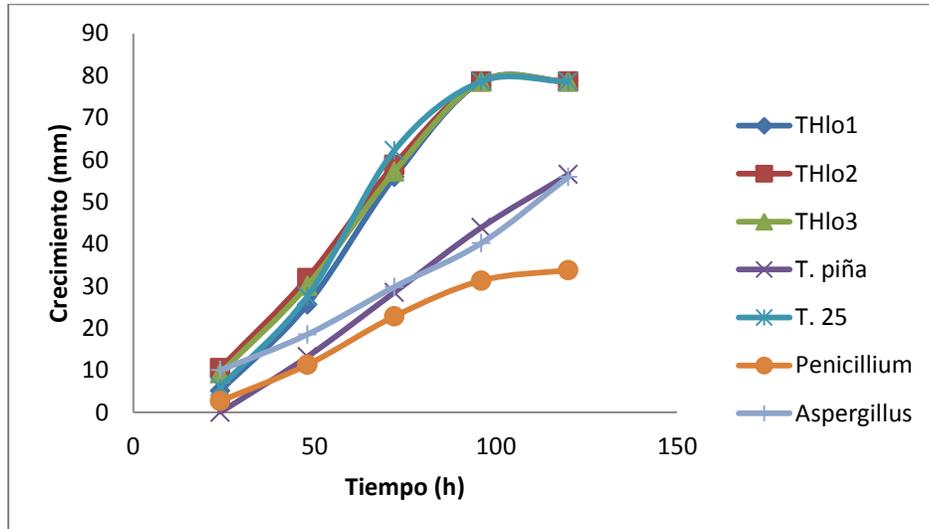


Figura 18. Medición radial en Czapek-Cáscara

Tal y como se observa en las figuras 16,17 y 18, los mejores resultados se obtuvieron con la cepa T25 y *Aspergillus niger*, ya que en los tres medios de residuo de nogal, fueron los que obtuvieron su máximo crecimiento en un menor tiempo, en comparación con las demás cepas. También se puede observar, que de los tres medios de residuos, en el de cáscara fue en el que hubo un menor crecimiento, esto se puede deber principalmente a la composición química de la misma, ya que la cáscara de nuez tiene un alto contenido de carbón activado.

Los medios elaborados usando el tallo y el ruzno de nogal, son los que mostraron tener una mejor fuente de carbono, ya que las cepas obtuvieron su máximo crecimiento a las 72 horas; esto puede deberse debido a las propiedades astringentes del tallo, o también debido a que el ruzno es una fuente importante de taninos.

Los resultados de crecimiento radial en residuos de nogal, muestran que las mejores cepas son *Aspergillus niger* y *Trichoderma asperellum* identificada como T25, esto coincide con lo investigado por López-Guerra (2006), quien reporta el crecimiento de cepas fúngicas sobre materiales vegetales los cuales contienen taninos. Ya que como sabemos estos residuos de nogal son fuentes de taninos.

En investigaciones previas (Cruz-Hernández y col., 2005), se reporta que *A. niger* GH1 y PSH pueden crecer en medios o materiales con concentraciones altas de taninos, estos fueron aislados de materiales vegetales ricos en polifenoles, lo cual indica que estos metabolizan los taninos y así liberar ya sea ácido gálico, ácido elágico o catequina.

Etapas 3. Cinética de crecimiento

Con base en los resultados obtenidos durante las pruebas de invasión fúngica en los residuos de nogal pecanero, se seleccionaron lo que presentaron un mejor crecimiento, siendo el T25 y *Aspergillus niger*, las mejores cepas.

3.1 Preparación del medio líquido

En esta etapa, se observó que las partículas de los residuos de nogal, tenían un gran tamaño, lo que dificultaba la preparación del medio, por lo que se procedió a tamizar de manera manual con la malla No. 50 con una abertura de 0.0117 pulgadas.

3.2 Caracterización físico química de los residuos fermentados

Una vez obtenidas las fermentaciones, el líquido de cada matraz se filtró con ayuda de un matraz Kitazato, y posteriormente se realizó la determinación de Taninos Hidrolizables, Taninos Condensados, Azúcares Totales y Taninos Totales

en cada uno de los residuos de nogal pecanero, mediante fermentaciones fúngicas usando *Aspergillus niger* y *Trichoderma T25*.

3.2.1 Cuantificación de Taninos Hidrolizables

En la figura 19, se puede observar que la concentración de taninos hidrolizables es mayor en el residuo de cáscara y que usando la cepa de *Aspergillus niger* obtenemos la mayor producción de estas fitomoléculas a las 24 horas de la fermentación. En menor cantidad encontramos TH en las fermentaciones de tallos y ruezno, ya que como podemos apreciar en la figura 19, la mayor producción de TH en tallos de obtiene a las 48 horas con una cantidad de 322.63 ppm, mientras que en la fermentación usando el ruezno, se obtiene 216.80 ppm de TH a las 96 horas.

Estos resultados se deben principalmente a que la cáscara de nuez es una fuente excepcional de taninos y pueden ser obtenidos con altos rendimientos (cerca del 40% en base a su peso seco).

De acuerdo a los resultados de la caracterización físico química de la cáscara de nuez (Medina Morales, 2007), esta contiene un 19.12% de taninos totales, de los cuales un 5.43% corresponde a TH y un 14.46% a TC; por lo que nos permite anticipar que puede funcionar como buen soporte para el crecimiento de microorganismos, hongos filamentosos en este caso, Cruz-Hernández y col. (2005) aislaron cepas del semidesierto chihuahuense de plantas con alto contenido de taninos en su composición, la composición fisicoquímica de la cáscara puede variar según el grado de desarrollo de la nuez, o de la estación o temporada en la cual sea recolectada, esta se observa en el contenido de taninos y fibra.

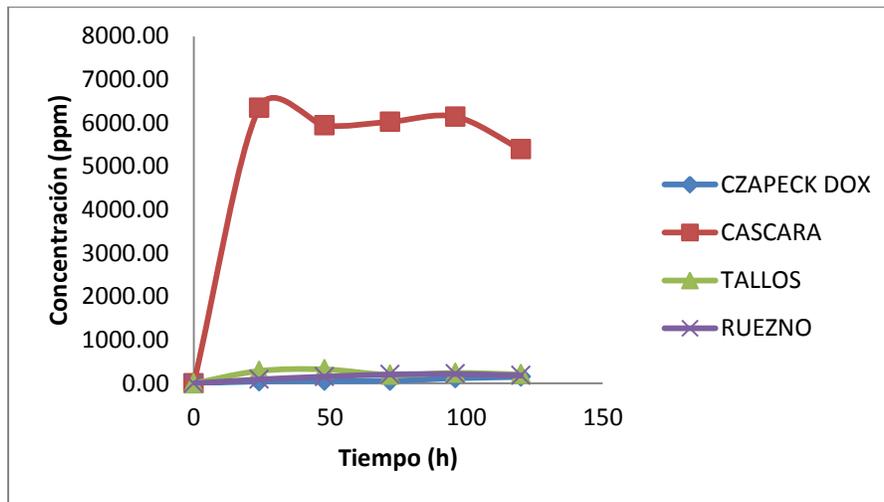


Figura 19. TH de residuos fermentados con *Aspergillus niger*

La baja concentración de taninos hidrolizables presentes en residuos de tallos y ruezno fermentados se debe al proceso de biodegradación que ocurre al utilizar *Aspergillus niger*; ya que de acuerdo con los resultados obtenidos por Mercado y col., (2007), este microorganismo es capaz de transformar dichos compuestos.

En la fermentación usando la cepa de T25, la concentración de TH fue ligeramente mayor en el residuo de tallos, ya que como se observa en la figura 20, a las 24 horas de iniciada la fermentación hubo una producción de 5746.67 ppm de TH, mientras que en el residuo de cáscara la mayor producción se logró a las 72 horas con 5496.67 ppm de TH. La cantidad de TH en la fermentación de ruezno fue muy pequeña en comparación con estos residuos, pero muy superior a la producción de estas fitomoléculas en el de Czapek Dox.

Estos resultados pueden deberse principalmente a la cepa que se utilizó en esta fermentación, ya que como mencionamos anteriormente, la cáscara es una fuente muy importante de taninos.

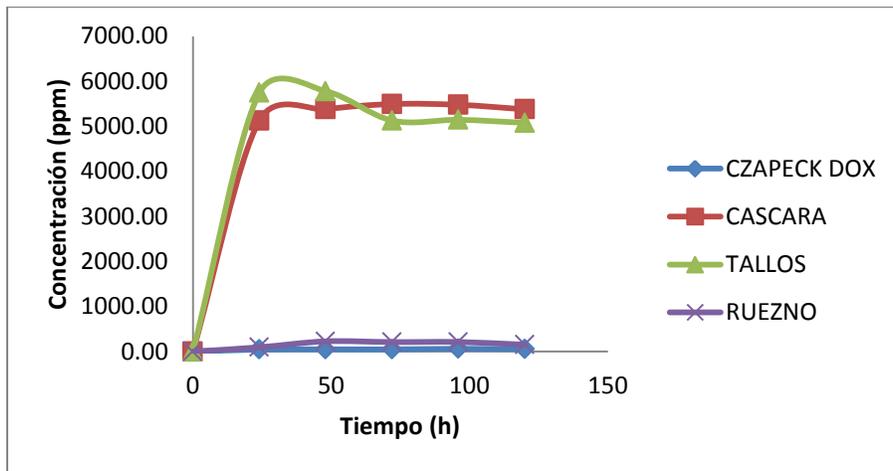


Figura 20. TH de residuos fermentados con T25

3.2.2 Cuantificación de Taninos Condensados

En la figura 21 se puede observar que la concentración de TC en el residuo de cáscara usando una fermentación con *Aspergillus niger* es muy alta, ya que se producen 20,163.64 ppm. de estas fitomoléculas al alcanzar las 96 horas. en segundo lugar de producción de estos taninos se encuentra el medio de tallos, ya que su máxima producción es de 11,496.97 ppm a las 120 horas de la fermentación.

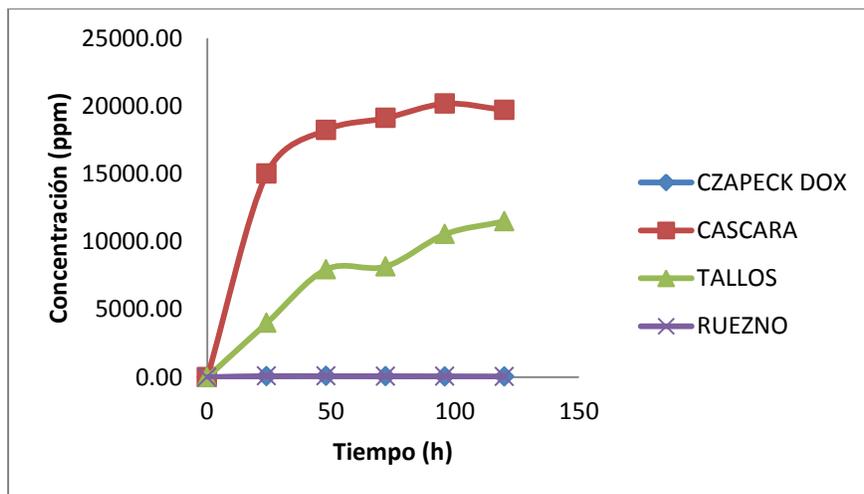


Figura 21. TC de residuos fermentados con *Aspergillus niger*

La producción de TC en el medio de ruezno y Czapek Dox es muy similar, ya que como se observar en la figura 21, su máxima producción es cercana a las 80 ppm en ambos casos.

Estos resultados, se deben a que la cáscara, en cuanto a compuestos de naturaleza polifenólica, los TC se encuentran en mayor proporción, lo cual indica que *A. niger*, es capaz de metabolizar los TC, y generar catequina o epicatequina, y posteriormente degradarlos, Bhat (1998), menciona que los géneros de *Aspergillus* y *Penicillium* consumen TC de diferentes fuentes vegetales, así como los TH, aunque estos se encuentran en menor proporción en cáscara de nuez. Estos géneros hidrolizan ambas estructuras para generar unidades estructurales (catequina, epicatequina y ácido gálico) y es capaz de usarlos como fuente de carbono.

En la figura 22 se observan los resultados de la concentración de TC usando una fermentación con la cepa de T25. La máxima producción de TC se da en el medio de cáscara, seguido del medio de tallos, con una cantidad de 8390.91 y 5027.27 ppm respectivamente. El medio de cáscara sigue siendo el mejor para la producción de TC, ya que no solamente tuvo una producción mayor, sino que también lo hizo en el menor tiempo, con tan solo 96 horas de fermentación. El medio de Ruezno muestra una ligera ventaja en producción de taninos condensados con respecto al Czapek Dox, ya que alcanzó 180.27 ppm. mientras que el testigo solo obtuvo 132.24 ppm.

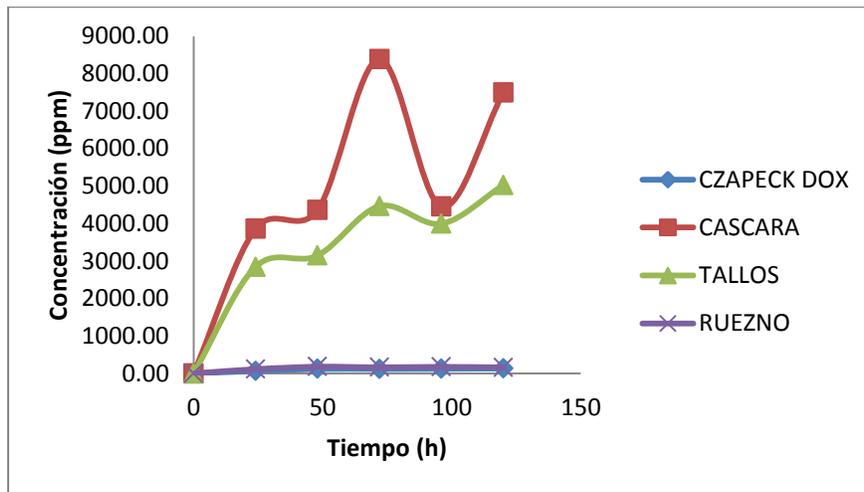


Figura 22. TC de residuos fermentados con T25

Los resultados de las figuras 21 y 22, se debe principalmente a que los taninos condensados son más abundantes en cortezas y maderas y más resistentes al ataque microbiano.

3.2.3 Cuantificación de Azúcares Totales

Los resultados de la fermentación usando la cepa de *Aspergillus niger* en los medios de residuos de nogal, se presentan en la figura 18, donde puede observarse que el medio de ruezno es el mejor sustrato, ya que es de fácil asimilación para el microorganismo, mientras que los medios de cáscara y tallos poseen cadenas más largas de carbohidratos, por lo que el microorganismo le es más difícil transformarlo en cadenas cortas de glucosa.

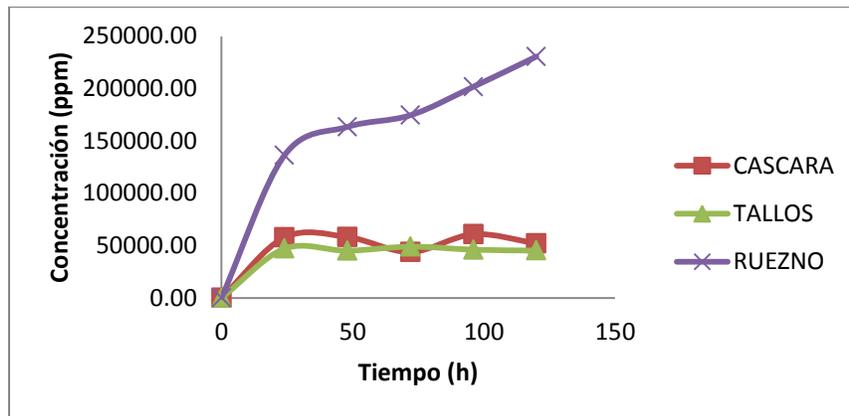


Figura 23. Azúcares Totales de residuos fermentados con *Aspergillus niger* LR

Los azúcares fermentables, son el resultado de la degradación de cadenas largas de carbohidratos a cadenas más cortas, en la figura 24 se presentan los resultados obtenidos mediante la fermentación usando la cepa de *Trichoderma T-25*, donde se muestra claramente que el medio de cáscara es de fácil asimilación para el microorganismo, por lo que es capaz de descomponerlo en azúcares más simples conforme transcurre el tiempo; en cambio el medio de tallos y cáscara presenta una menor producción de azúcares fermentables, debido a la composición de sus carbohidratos.

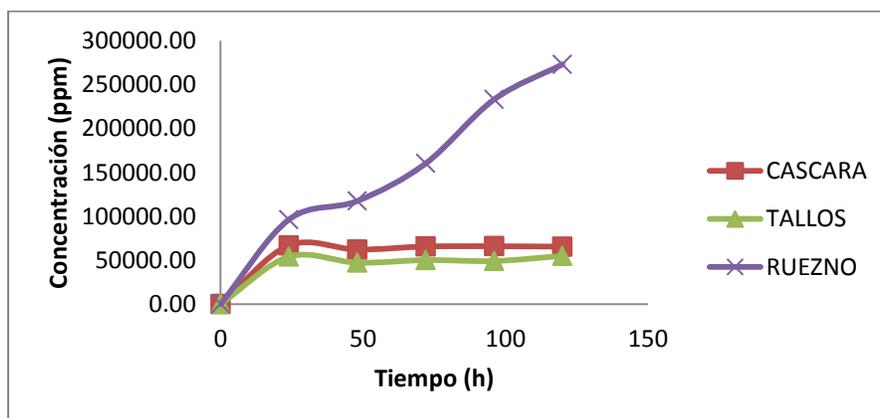


Figura 24. Azúcares Totales de residuos fermentados con T25

3.2.4 Cuantificación de taninos totales

La figura 25 muestra los resultados del contenido total de taninos en los medios de residuos de nogal usando una fermentación con *Aspergillus niger* LR como se puede observar, el medio de Cáscara obtuvo los mejores concentraciones de taninos, ya que fue a las 96 horas hubo una producción de 26,310.30 ppm de TT., mientras que el medio de tallos muestra una tendencia ascendente conforme pasa el tiempo de la fermentación, pues se observar en la figura 25 que a las 120 horas, la producción de TT seguía subiendo.

De los tres medio, nuevamente el de ruezno muestra una producción menor de TT.

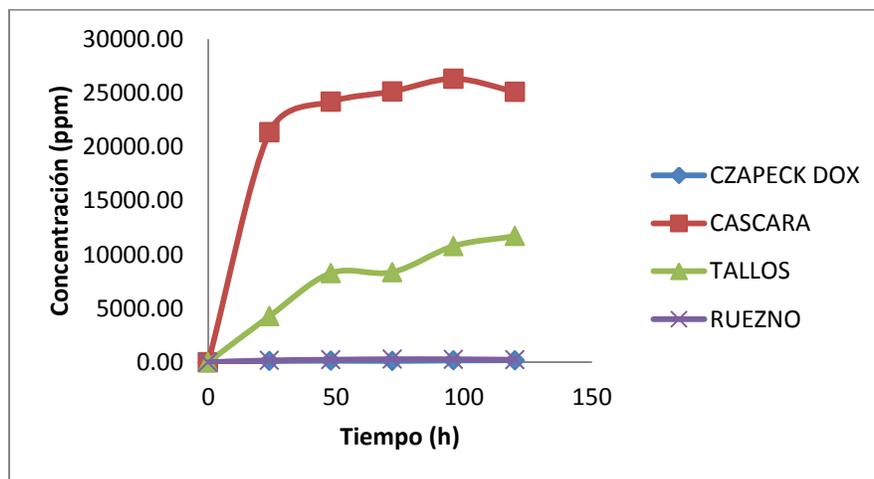


Figura 25. Taninos Totales de residuos fermentados con *Aspergillus niger*

Los resultados de la cuantificación de TT en la fermentación usando la cepa de T25, se muestran en la figura 26, en donde se observa que a las 96 horas, el medio de tallos muestra la máxima producción de TT con 8694 ppm, mientras que el medio de cáscara la presenta a las 96 horas con 8281 ppm de TT. El medio de ruezno muestra una concentración de 407.57 ppm a las 48 horas de iniciada la fermentación.

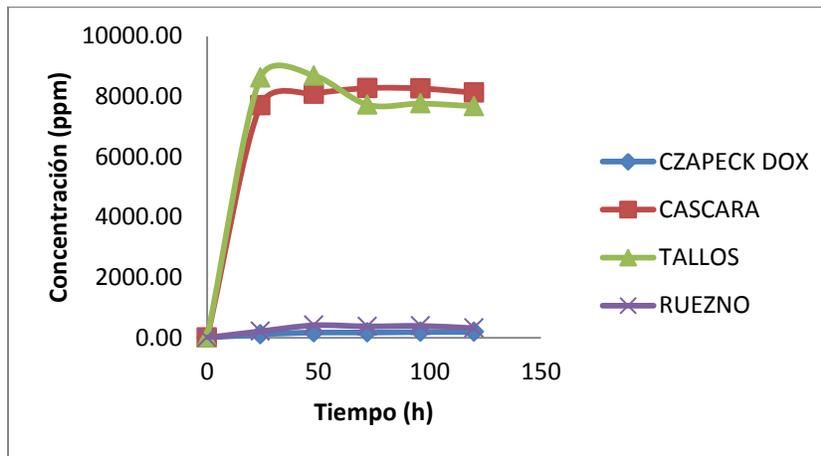


Figura 26. Taninos Totales de residuos fermentados con T25

Los resultados de la fermentación fúngica usando la cepa *Aspergillus niger* coinciden con el estudio realizado por Medina Morales (2007), quien realizó una biodegradación fúngica con *Aspergillus niger* GH1 sobre cáscara de nuez mediante fermentaciones sólidas y sumergidas para la obtención de monofenoles de alto valor agregado como la catequina y los ácidos gálico y elágico.

Ya que como se observa en la figura 25, se obtuvieron más de 25,000 ppm de Taninos totales durante la fermentación usando la cepa de *Aspergillus niger*.

Conclusiones

- Se logró conservar con éxito las cepas de *Trichoderma asperellum*: THlo1, THlo2, THlo3, T-25, T. piña, *Penicillium sp*, *Aspergillus LR*, mediante las técnicas de glicerol, leche descremada y tubos de Agar papa-desxtrosa.
- De acuerdo a la velocidad máxima de crecimiento utilizando como fuente de nutrientes los residuos de nogal pecanero, las cepas que presentan un mejor crecimiento fúngico son *Aspergillus niger LR* y *Trichoderma t-25*.
- En el estudio cinético, el medio líquido de cáscara de nogal pecanero presenta los mejores resultados para ser utilizado como sustrato en la obtención de fitomoléculas con actividad biológica.
- *Aspergillus niger* es la mejor cepa degradadora de polifenoles presentes en los residuos de nogal pecanero bajo las condiciones de ensayo
- El sistema microbiano fúngico en cultivo líquido sobre residuos de nogal pecanero fue una herramienta adecuada para la selección de residuos como fuente de nutrientes para la fermentación en medio líquido, así como para la selección de las mejores cepas.
- La utilización de residuos de nogal pecanero como soportes para fermentación líquida representa una alternativa potencial para brindarles un valor agregado a estos residuos.

Referencias Bibliográficas

- Aguilera-Carbó, A., Augur, C., Prado-Barragán L., A., Favela-Torres, E., Aguilar, C., N., 2008, Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitanins. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:189-199.
- Alexopoulos, C.J., y Mims, C.W. (1979). *Introductory mycology* (3° Ed.) New York. Willey.
- Asquith, T.N., Butler, L.G. (1986). Interactions of condensed tannins with selected proteins. *Phytochemistry*, 25:1591-1593.
- Avila E. (2000). Estudio técnico- económico de prefactibilidad del cultivo del pecano (*Carya illinoensis*). Tesis Ing. Agr. Universidad Iberoamericana. 89 p.
- Belmares, R., 2008, Compuestos polifenólicos presentes en plantas del Semidesierto de México, su transformación microbiana y aplicaciones industriales. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Coahuila unidad Saltillo. México
- Bhat, T. K., Singh B., and Sharma O. P. (1998). Microbial degradation of tannins- A current perspective. *Biodegradation* 9: 343-357.
- Bors, W. and M. Saran. 1987. Radicals scavenging by flavonoids antioxidants, *Free Radic. Res. Commun.* 2: 289-294.
- Brison R F. 1976. Cultivo del nogal pecanero. 1ª. Edición en español. Comisión Nacional de Fruticultura (CONAFRUT). México. 350 p.

- Brison, F. R. 1992. Cultivo del Nogal pecanero. 2ª edición. México. CONAFRUT, 349 P.
- Brune, A., and Schink, B. (1992). Phloroglucinol pathway in the strictly an aerobic *Plelobacter acidigallici*: fermentation of trihydroxybenzenes to acetate via triacetic acid. Arch. Microbiol. 157: 417-424.
- Cerda Garza J.A., Febrero 2001, El cultivo del nogal pecanero (*Carya illinoensis*) en el norte de México. Monografía Licenciatura. U.A.A.A.N. Saltillo, Coahuila.
- Chandra, R. P., Lehtonen, L. k., Ragauskas, A. J., 2004. Modification of high lignin content kraft pulps whit laccase to improve paper strength properties. 1. Laccase treatment in the presence of gallic acid. Biotechnology Progress 20: 255-261.
- Clifford M.N, Scalbert A. 2000. Review: Ellagitannins-nature, occurrence and dietary burden. J. of the Sci. of Food and Agric. 80:1118-1125.
- Comité Mexicano del Sistema Productor de Nuez, A.C., 2012, COMENUEZ en línea, Disponible en: (<http://www.comenuz.org/xoo/modules/tinycontent/index.php?id=77>).
- CONAFRUT. 1975. Reunión de Técnicos Especialistas en nogal y directivos de los productores de nuez. Torreón, Coah., Secretaría de Agricultura y Ganadería. Serie Técnica. Folleto no. 22.
- Conn EE (1981) Cyanogenic glycosides. In PK Stumpf, EE Conn,eds, The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise, Vol 7, Secondary Plant Products. Academic Press, New York, pp 479-500.

- Crueger W & Crueger, A. 1989. Biotecnología. Manual de Microbiología Industrial. Editorial Acribia S.A. Zaragoza-España. Pp 73,115-118.
- Cruz, M.L. 2002. *Producción fúngica de la enzima tanasa en cultivo sumergido y en estado sólido utilizando Larrea tridentata cov. como fuente de carbono y energía*. Tesis de nivel Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México. 19, 20, 24, 25, 26.
- Cruz Martínez L. C., Junio 2007. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Tesis Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. D. C. En línea, Disponible en: (<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis23.pdf>).
- FAO (1953). Proyecto 500. Las posibilidades de producción de materiales tánicos vegetales. Ins. Mex. de Inv. Tec. México.
- Field, J. A. and Lettinga, G., 1987. The methanogenic toxicity and anaerobic degradability of a hydrolysable tannin. *Water Res.* 21: 367-374.
- Forchiassin, F., Magnelli, P., Diorio, L., Mercuri, O. (1999). Manual de Procedimientos. Segunda Edición. Laboratorio de Micología Experimental. Universidad de Buenos Aires. Argentina.
- Forero, M. 2002. Producción masiva de microorganismos biocontroladores. Programa de Manejo Integrado de Plagas MIP. Centro de Investigación Tibaitatá. Corpoica. Publicación.
- González A.M., Salcedo M.S.M., Vargas L.V.R., Pérez Q. J.N., Bonilla M.N. y Fernández., 2010, Cultivo del Nogal Pecanero *Carya Illinoensis* (Wangenheim) K. Koch en Nuevo León., U.A.N.L. pp 1-8.

- Gutiérrez-Sánchez. G., Saucedo-Castañeda. G., Gaime Perraud. I. Augur C. 1999. Comparación de dos métodos para la selección de cepas para su uso en fermentación en medio sólido: crecimiento radial y longitudinal. *Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería A.C.* Huatulco, Oaxaca, México, 12 al 17 de septiembre de 1999, 104. [Http://www.sagarpa.com.mx](http://www.sagarpa.com.mx) . Producción agropecuaria en el 2002.
- Guyot S., Marnet N., Laraba D., Sanoner P., Drielleau J-F. (1998). Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a French cider Apple variety (*Malus domestica* Var. Kermerrien). *J, Agric Food Chem.* 46:1698-1705.
- Hagerman, A. E. Rice, M. E., Ritchard, N. T. (1998). Mecanism of protein precipitation of two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin₁₆(4-8) catechin (procyanin). *J. Agric Food Chem.* 46: 2590-2595.
- Hagerman, A.E., Butler, L.G. (1978). Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry,* 26:809-812.
- Harman, G., Chet, I., Baker, K. 1981. Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seed of biocontrol agent. *Phytopatology.* Vol 71: 579-582.
- Haslam, E. & Stangroom, J.E. (1966). The esterase and depsidase activities of tannase. *Biochemical Journal* 99 (28): 28 - 31.
- Hernández Medina S., Enero 2009, Dinámica de los flujos de energía y de bióxido de carbono sobre una huerta de nogal pecanero (*carya illinoensis koch*) del norte de Coahuila. Tesis Licenciatura. U.A.A.A.N, Saltillo, Coahuila.

- Herrera, E., Clevenger, T. 1996. Importancia Económica de la Industria Nogalera en E.U.A. NMSU. Guía Z-501.
- Herrera, E., Clevenger, T. 1996. Importancia Económica de la Industria Nogalera en E.U.A. NMSU. Guía Z-501.
- Hofmann, T., Glabasnia, A., Schwarz, B., Wisman, K.N., Gangwer, K.A., Hagerman, A.E. (2006). Protein binding astringent taste of a polymeric procyanidin, 1,2,3,4,6-Pentagalloyl-D-glucopyranose, castalagin, and grandinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:9503-9509.
- Isabel M. Santos, Venancio Armando, Lima Nelson, (1998). *Fungos contaminantes na indústria alimentar*. Micoteca Da Universidade do Minho, Centro de Engenharia Biologica. Pag. 9.
- Jiménez, R., López, S. R. Kadmiri, M., Romero, M., Vera, R., Sánchez, M., Vargas, F., O´Valle, F., Zarzuelo, A., Duellñas, M., Santos, B. C. Duarte, L. 2007. Polyphenols restore endothelial function in DOCA-salt hypertension: Role of endoethelin-1 and NADPH oxidase. *Free Radical Biol. Med* 43 (3): 463-473.
- Julio Cesar Lopez Diaz, M.C. y M.B.A. jlopez@uach.mx, Esteban Herrera Aguirre, Ph.D. herrera@nmsu.edu. Comercializacion de la nuez y expectativas 2004.
- Kehrer, J. P. and C. V. Smith. 1994. Free radicals in biology: sources, reactivities and roles in the etiology of human diseases. In *Natural Antioxidants*. Ed by Frei, B. Academic Press, New York, pp 25-62.

- Khanbabaee K. and van Ree t: Tannins 2001: Classification and definition. Nat. Prod. Rep. (18) 641-649.
- Kim, D-O, S. W. Jeong and C.Y. Lee. 2003. Antioxidant capacity of phenolics phytochemical from various cultivars of plums. Food Chem. 81: 321-326.
- Kozakiewicz Z. 1989. *Aspergillus* species on stored products. CAB International Mycological Institute, Kew, Surrey, Kwon-Chung, K.J. and Bennett, Jhon, (1992). Medical Micology. Filadelfia-London: Lea & Febiger, pp. 223-234.
- Lekha, P. K. Lonsane, B. K. (1997) Production and application of tanin acyl hidrolase: State of the art. Advances and Applied Microbiology. 44:215-260.
- Leonor Carrillo, Los hongos en los alimentos y forrajes. Capitulo 4 "Aspergillus". En línea 2012 (<http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/04htextoaspergilos.pdf>).
- Lewis, J. A., Starkey, R. L., (1969) Descomposition of plants tannins by some soil microorganism. Soil Science. 107: 235-241.
- López, 1989. La Nuez Pecanera, Banco Agropecuario del norte, BANAGRO.
- Luna L.F. 1990. EL NOGAL Producción de fruto y de madera. 2ª edición. España. Ediciones Mundi-prensa. 155 p ISSN: 84-7114-239-2.
- Macheix J. J., Fleuriet A. and Billot J. 1990. Fruits phenolics. CRC. Press, Florida, Estados Unidos.
- McNabb, W.C., Petters, J.S., Foo, L.Y., Waghorn, G.C., Jackson, S.J. (1998). Effect of condensed tannins prepared from several forages o the invitro

precipitation of ribulose-1,5-biphosphate carboxilasa (rubisco) protein and its digestion by trypsin (EC 2.4.21.4) and chymotrypsin (EC 2.4.21.1). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77:201-212.

- Méndez, R. A. (1984). Determinación de energía metabolizable y efecto de la utilización de sorgos con diferente contenido de taninos. UACH, México. Tesis.
- Mingshu L., Kai Y., Oiang H., Dongying J., (2006) Biodegradation of gallotannins and ellagitannins. *J. Basic. Microbiol.* 46: 68-84.
- Morton, L. W., Abu-Amsha Caccetta, R., Puddey, I.b., Croft, K. D. 2001. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease., *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 27(3): 152-159.
- Mueller-Harvey I. 2001. Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology* 91:3-20.
- Muller-Harvey, I. (1999). Tannics: their nature and biological significance. In: *Secondary Plant Products Antinutritional and Beneficial Actions in Animal Feeding*, pp 17-39. (Eds.: Caygill, J.C., Mueller-Harvey, I.). Nottingham University Press. Nottingham (Reino Unido).
- Olivares, S. C. (1983). Determinación del contenido de taninos vegetales en acacia *Phosopsis* y *yquercus*. ITEMS. Monterrey, Nuevo León, Méx.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). ProdSTAT [en línea]: FAOSTAT. 2008. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/526/default.aspx> de octubre de 3008).

- Paladino S.C., Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en la semilla de la vid (*Vitis vinifera L.*). Tesis Maestría. Universidades Nacionales de Cuyo, La Rioja, San Juan y San Luis. Sede Mendoza: Facultad de Ciencias Agrarias-UNCuyo. En línea, Disponible en: (http://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/2627/tesispaladino.pdf).
- Pamplona R.J.D. 2006. Salud por las plantas medicinales. España. Safeliz S. L. p. 397. Colección Nuevo Estilo de Vida. ISBN:84-7208-106-0.
- Parra P.A. 2008. Nuez de nogal en Argentina. Desempeño 2000-2007 y perspectiva. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Dirección de Industria Alimentaria.
- Plumb, G. W., S. De Pascual-Teresa, C. Santos-Buelga, V. Cheynier and G. Williamson. 1998. Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: effects of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Radics. Res.* 29: 351-358.
- Poncet-Legrand, C., Edelmann, A., Putaux, J.L., Cartalade, D., Sarni-Manchado, P., Venhet, A. (2006). Poly (L-proline) interactions with flavan-3-ols units: influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. *Food Hydrocolloids*, 20:687-697.
- Prior, R. L., and Cao, G. Antioxidant phytochemicals in fruit and vegetables: Diet and health implications. *Hort. Sci.* 35: 588-592.
- Raissouni, T 2005. Estudio comparativo de la eficacia de varios tratamientos tópicos de la estomatitis aftosa recurrente. Universidad Autónoma de Granada, Facultad de Odontología, p 1-46

- Raper, Keneth and Fennellhe Williams & Willkins company, (1965) pp 293-344.
- Ricardo da Silva, J. M., N. Damon, Y. Fernández and S. Mitjavila. 1991. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *J. Agric. Food Chem.* 39:1549-1552.
- 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.
- Sáez Vega A., Flores Valdéz L., Cadavid R., Caracterización de una cepa nativa de *Aspergillus niger* y evaluación de la producción de ácido cítrico (2002), *Revista Universitaria EAFIT*, Número 128: 33-42, Medellín, Colombia.
- Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C. & filtenborg O. (1996) Methodos for the detection and Isolation of Food-Borne Fungi. *In: Introduction to Food-Borne Fungi*, Samson, R.A. Hoekstra E.S., Frisvad J.C. & Filtemborg O. (Eds.). CBS-Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baarn.
- Santos-Buelga, C. and A. Scalbert. 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds, nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 80:1094-1117.
- Saxena, R. K., Sharmila, P., Singh, V. P. (1995). Microbial degradation of tannins. In Singh, V. P. (ed) *Biotransformations: Microbial degradation of health risk compounds. Process in industrial microbiology.* Vol 32. Pp. 259-270. Elsevier Science Publisher BV. Amstredam.

- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2012. SIAP EN Línea, con información de las delegaciones de la SAGARPA. Disponible en: <http://siap.gob.mx/ventana.php?dLiga=1147&tipo=1>.
- Strack, D., 1997, Phenolic metabolism., In: Dey, P.M., and Harbourne, Eds., Plants Biochemistry. Academic, San Diego, CA. pp. 387-416.
- Swain, R., G. (1979) Tannins and Lignins in herbivores their interaction with secondary plant metabolites (ed) G.A. Rosenthal and D.H. Jasen Academic, Press, New York.
- Tapia Rivera JL. 1974. Análisis químico y fisiológico de tres variedades de nogal (*Carya illinoensis* Koch) en el municipio de Montemorelos, Nuevo León. Tesis inédita Ing. Agrónomo. Facultad de Agronomía, UANL. Monterrey. México. 40 p.
- Ventura, J., Belmares-Cerda, R., Aguilera-Carbo, A., Contreras-Esquivel, J. C., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C. N.. 2007. Fungal biodegradation of tannins from Creosote bush (*Larrea tridentata* Cov.) and tar bush (*Flourenzia cernua*) for gallic and ellagic production. Food Technology and Biotechnology.
- Vera García, Introducción a la microbiología. Pag 85.
- Ward, O. 1989. Biotecnología de las fermentaciones. Editorial Acribia S.A. Zaragoza-España. Pp 173-185.
- Xu, L., Diosaday, L.L. (2000). Interaction between canola proteins and phenolic compounds in aqueous media. *Food Research International*, 33:725-731.

