

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**



DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**Evaluación De Cepas Fúngicas Aisladas Del Semi-desierto Para
Producción De Enzima Tanasa En Fermentación Medio Sólido**

POR:

LORENA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Junio 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**Evaluación De Cepas Fúngicas Aisladas Del Semi-desierto Para
Producción De Enzima Tanasa En Fermentación Medio Sólido**

Presentado por:

LORENA HERNANDEZ HERNANDEZ

T E S I S

Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como
Requisito Parcial para obtener el grado de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Aprobación de tesis



Dr. Mario A. Cruz Hernández
Presidente



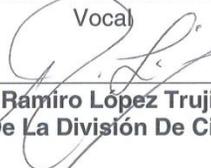
M.C. Armando Robledo Olivo
Vocal



Dra. Susana González Morales
Vocal



Dra. Ruth E. Belmares Cerda
Vocal



Dr. Ramiro López Trujillo
Coordinador De La División De Ciencia Animal



Buenvista, Saltillo, Coahuila, México. Junio 2014

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**Evaluación De Cepas Fúngicas Aisladas Del Semi-desierto Para
Producción De Enzima Tanasa En Fermentación Medio Sólido**

Presentado por:

LORENA HERNANDEZ HERNANDEZ

T E S I S

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Grado de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Comité de tesis



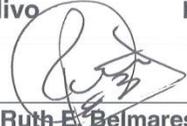
Dr. Mario A. Cruz Hernández
Director de tesis



M.C Armando Robledo Olivo
Co-Director



Dra. Susana González Morales
Asesor



Dra. Ruth E. Belmares Cerda
Asesor Externo

Buenavista Saltillo, Coahuila, México, Junio 2014

Agradecimientos

A **Dios** por su infinita bondad, y por haber estado conmigo en los momentos que más lo necesitaba, por darme salud, fortaleza, responsabilidad y sabiduría, por haberme permitido culminar un peldaño más de mis metas, y porque tengo la certeza y el gozo de que siempre va a estar conmigo para guiar mi vida.

A mis **padres** quienes a lo largo de toda mi vida han apoyado y motivado mi formación académica, que creyeron en mí en todo momento y no dudaron de mis habilidades.

A mis hermanos, **Ebertha, Adrián, Carolina, Norma, Doris, Víctor**, por sus consejos, apoyo y cariño que me brindan.

A mis **abuelos** por haber dado vida a mis padres y ellos a mí.

A mis cuñados **Ismael, Joaquina, Ma. Carmen, Aarón, Fernando**, por el simple hecho de formar parte de la familia.

A mis sobrinos, **J. Luis, Yarlin, Aarón, Daniela, I. Severiano, Vanessa, Dulce, P. Azariel**, a quienes adoro y llenan mi vida de alegrías.

A **Katty**, por ser amiga y hermana para mí, y quedarse aun así conociendo mis defectos; por compartir mis triunfos y fracasos.

A mis amistades y compañeros de ICTA, **Aby, Analy, Ángeles C.V, Ángeles G, Ángeles C., Lourdes G, Rosario, Benjamín, Luky, Rafael**, etc, por su apoyo incondicional.

Al **Sr. Rubén y Sra. Esperanza**, por haberme abierto las puertas de su casa y su enorme gentileza y amabilidad que siempre me ayudaron a sentirme como en casa.

A **Zulema** por su actitud de servicio y estar cuando más la necesite, a **Magda** por su apoyo con los materiales de laboratorio.

A **Mary** por su amable apoyo incondicional y compromiso de trabajo.

A mis profesores de **ICTA**; quienes les debo gran parte de mis conocimientos, gracias a su paciencia y enseñanza; a usted **M.C. Mildred Inna Flores Verastegui** por su amable apoyo, dedicación, y empatía por transmitirme lo mejor de sus conocimientos.

Al **Dr. Mario Alberto cruz Hernández, Dra. Ruth E. Belmares Cerda, Dra. Susana González Morales, M.C Armando Robledo Olivo**, quienes colaboraron para el desarrollo de la presente tesis.

A mi “**Alma Terra Mater**”; prestigiosa universidad, por abrir sus puertas y darme la confianza necesaria para triunfar en la vida y transmitir sabiduría para mi formación profesional y llegar a la meta de ser Ingeniero.

Dedicatoria

Dedico este proyecto de tesis a **Dios** por mostrarme día a día que con fe, humildad, paciencia y sabiduría todo es posible.

A mis extraordinarios **Padres, Sr. Félix y Sra. Cirila** por su noble dedicación y amor, por ser mis amigos, mis consejeros, y por siempre guiarme y ser la voz y bendición de Dios como prioridad en mi vida.

A todos mis hermanos y en especial, A mi hermana, **Carolina**, por ser mi apoyo fundamental e incondicional en los momentos muy difíciles de mi vida profesional y emocional, por haber dedicado tiempo y esfuerzo para culminar una meta más que es un triunfo más tuyo que mío, por ser mi hermana y mi amiga, por ser un ejemplo a seguir y por sobre todas las cosas, por amar a Dios.

Índice

Resumen	- 11 -
Introducción	-12-
Objetivo General	- 15 -
Objetivos Específicos	- 15 -
Hipótesis	- 15 -
Revisión de literatura	- 16 -
Enzimas	- 16 -
Nomenclatura y clasificación	- 16 -
Especificidad	- 18 -
Sitio activo	- 19 -
Determinación de la actividad enzimática	- 21 -
Factores que afectan la actividad enzimática	- 21 -
Explotación industrial de enzimas	- 22 -
Tanin Acil Hidrolasa	- 23 -
Fundamentos	- 24 -
Fuentes de obtención	- 24 -
Propiedades	- 27 -
Inhibidores de la tanasa	- 27 -
Mecanismo de acción	- 28 -
Regulación y Biosíntesis de la TAH	- 29 -
Evaluación de la actividad TAH	- 31 -
Aplicaciones y usos potenciales	- 31 -
Taninos	- 33 -
Clasificación de taninos	- 33 -
Taninos condensados	- 35 -
Taninos hidrolizables	- 35 -
Unión tanino-proteína	- 38 -
Fuentes de obtención Importancia biológica	- 39 -
Efectos anti fisiológicos	- 41 -
Degradación de los taninos por microorganismos	- 42 -
Hongos filamentosos	- 42 -
Características fundamentales	- 42 -
Taxonomía de los hongos	- 43 -
Estructura celular	- 44 -
Morfología	- 45 -
Reproducción	- 48 -
Metabolismo	- 53 -
Nutrientes del medios y efecto crecimiento	- 53 -
Requisito de un microorganismo industrial	- 53 -
Sistemas de producción de enzima fúngica	- 54 -
Sustratos y condiciones de fermentación	- 55 -
Equipo de fermentación	- 58 -
Biorreactor en Columna	- 60 -

Biología molecular	- 62 -
Materiales y métodos	- 64 -
Etapa I: Propagación y conservación de hongos filamentosos purificados.	- 64 -
Siembra en cajas Petri con PDA.....	- 64 -
Caracterización morfológica.....	- 65 -
Conservación de hongos filamentosos	- 65 -
Etapa II:Selección de hongos filamentosos para la producción de enzima tanasa. - 66	- 66 -
Propagación del inóculo	- 66 -
Siembra en cajas Petri con medio ácido tánico	- 66 -
Etapa III:Sistema de producción de enzima fúngica.....	- 67 -
Fermentación medio solido (FMS).....	- 68 -
Determinación de actividad tanasa por el método de rodanina metanólica	- 70 -
Cuantificación de fenoles hidrolizables totales.....	- 72 -
Determinación de azúcares totales por el método de fenol-sulfúrico	- 72 -
Determinación de biomasa por el método de glucosamina	- 73 -
Parámetros cinéticos	- 75 -
Cinética de formación de producto	- 75 -
Etapa IV: Extracción del ADN y amplificación del ADNr 18S	- 76 -
Cuantificación de ADN	- 77 -
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	- 79 -
Electroforesis horizontal de agarosa al 1.5%	- 80 -
Resultados y discusiones.....	- 81 -
Etapa I: Propagación, conservación de hongos filamentosos y caracterización	macroscópica y microscópica.....
Etapa II: Bio-ensayo con medio ácido tánico para la selección de la o las cepas	fúngicas que mayor degradación de ácido tánico presenten.....
Etapa III: Establecimiento del Sistema de Fermentación Medio Solido utilizando un	soporte-sustrato de orégano y la evaluación actividad tanasa, fenoles hidrolizables,
biomasa y azucares totales.....	89
Cinéticas de Fermentación en medio sólido	92
Etapa IV: Identificación molecular de cepas fúngicas de mayor producción de	enzima tanasa.....
Conclusiones	110
Perspectivas de investigación.....	111
Bibliografía.....	112
Anexos.....	118

Índice de figuras

Figura 1. Interacción enzima-sustrato	20 -
Figura 2. Hidrolisis del ácido tánico catalizada por la TAH (Aguilar y Gutiérrez-Sánchez, 2001).	29 -
Figura 3. Clasificación de los taninos (Khanbabaee y Van Ree, 2001).	34 -
Figura 4. Catequina (a); Epicatequina (b).....	35 -
Figura 5. Componentes básicos de los taninos hidrolizables ácido gálico (A) y ácido elágico (B).....	36 -
Figura 6. Acido tánico	37 -
Figura 7. Galato de Metilo	37 -
Figura 8. Estructura microscópica (levadura) y macroscópica (moho).....	46 -
Figura 9. Estructura de hifas cenocíticas y tabicadas de hongos filamentosos.....	46 -
Figura 10. Estructuras microscópicas de un hongo filamentoso.	46 -
Figura 11. Fase micelial y de levadura; con talo reproductor y vegetativo	48 -
Figura 12. Esquema del crecimiento apical del tubo germinativo.	48 -
Figura 13. Tipo de esporas asexuales.	49 -
Figura 14. Reproducción sexual de hongos filamentosos	50 -
Figura 15. Principales características de los hongos verdaderos o Eumycetes.....	51 -
Figura 16. Esquema de la reproducción sexual y asexual en zigomicotina.	52 -
Figura 17. Biorreactor en columna.	61 -
Figura 18. Recuento de esporas	68 -
Figura 19. Reacción catalizada por la tanasa y posterior reacción del ácido gálico con la rodanina.....	70 -
Figura 20. Esquema del ensayo enzimático propuesto por Sharma et al. (2000)	71 -
Figura 21. Diagrama de flujo para la cuantificación de glucosamina.	74 -
Figura 22. Crecimiento en cultivo medio sólido con ácido tánico.....	87
Figura 23. Sistema de FMS en columnas.....	90
Figura 24. Columna A con inoculo (0 hrs) y columna B con crecimiento (48 hrs)	90
Figura 25. Crecimiento de micelio a las 48 horas.....	91
Figura 26. Crecimiento de micelio a las 96 horas.....	91
Figura 27. Cinética de crecimiento de la cepa 7.-HF en FES con soporte de orégano, (◇) experimental, (—) línea continua son valores estimados con la ecuación logística.	93
Figura 28. Cinética de crecimiento de la cepa 16.-HF en FES con soporte de orégano, (◇) experimental, (—) línea continua son valores estimados con la ecuación logística; muestra el comportamiento de la estimación de biomasa (mg/gds) monitoreada durante las 120 h.....	94
Figura 29. Cinética de crecimiento de la cepa 17.-HF en FES con soporte de orégano, (◇) experimental, (—) línea continua son valores estimados con la ecuación logística.	95
Figura 30. Cinética de producto de la cepa 7.-HF.	96
Figura 31. Cinética de producto de la cepa 16.-HF.	97
Figura 32. Cinética de producto de la cepa 17.-HF.	98
Figura 33. Consumo de Fenoles Hidrolizables de la cepa 7.-HF.....	99
Figura 34. Consumo de Fenoles Hidrolizables de la cepa 16.-HF.....	100
Figura 35. Consumo de Fenoles Hidrolizables de la cepa 17.-HF.....	101
Figura 36. Gráfico de comparación del consumo de fenoles hidrolizables de las 3 cepas. ◇16.-HF, □17.-HF, △7.-HF.....	102

Figura 37. Gráfico de comparación de producción de enzima.....	103
Figura 38. Determinación de la calidad de ADN de 3 hongos filamentosos, asignadas con los respectivos nombres para su reconocimiento: carril 1-3: muestras de hongos filamentosos, (7.-HF, 16.-HF, 17.-HF).....	105
Figura 39. Amplifijación del promotor 18S por PCR de las muestras; 7.-HF, 16.-HF, importada a una temperatura de anillamiento de 60 °C.	106
Figura 40. Amplifijación del promotor 18S por PCR; de la muestra 17.-HF, importada a una temperatura de anillamiento de 60 °C.....	106
Figura 41. Descripción obtenida del hongo filamentoso con el programa Blast (primers 518F).	108
Figura 42. Descripción obtenida del hongo filamentoso con el programa blast (primers 800R).....	109
Figura 43. Ensayo con Ácido Tánico.....	120
Figura 44. Curva patrón de actividad tanasa.....	121
Figura 45. Curva patrón de fenoles hidrolizables.	121
Figura 46. Curva patrón de biomasa.....	122
Figura 47. Gráfico de alineación de la cepa 17.-HF (primer 518F).....	123
Figura 48. Gráfico de alineación cepa 17.-HF (primer 800).....	124

Índice de tablas

Tabla 1. Nomenclatura y clasificación.....	- 17 -
Tabla 2. Fuentes microbianas de TAH.....	- 26 -
Tabla 3. Inhibidores e inactivadores de la tanasa.....	- 28 -
Tabla 4. Principales diferencias entre taninos hidrolizables y condensados.....	- 38 -
Tabla 5. Comparación de los sistemas de FMS y FML (Mitchell y col., 2000).....	- 57 -
Tabla 6. Medio de cultivo: Ácido tánico-agar bacteriológico.....	- 66 -
Tabla 7. Medio de cultivo mínimo en sales Czapek-Dox.....	- 67 -
Tabla 8. Composición del medio Czapek-Dox con glucosa al 30 %.....	- 77 -
Tabla 9. Cuantificación del ADN.....	- 78 -
Tabla 10. Coctel para PCR.....	- 79 -
Tabla 11. Observación macroscópica y microscópica de Hongos Filamentosos.....	82
Tabla 12. Cuantificación del ADN.....	104
Tabla 13. Calidad del ADN.....	105
Tabla 14. Secuencias nucleotídicas obtenidas con el programa Blast de la cepa 17.....	108

Resumen

La tanasa o tanin acil-hidrolasa (EC 3.1.1.20) cataliza la hidrólisis de los enlaces presentes en galo taninos, taninos complejos y ésteres de ácido gálico éster que se hallan en los vegetales.

La utilización de residuos agroindustriales como sustratos en procesos de FMS ofrece una vía alternativa y la adición de valor a estos residuos de otro modo insuficientemente o no utilizados; entre esos residuos se encuentra el orégano mexicano del que se extrae aceite esencial; sin embargo la extracción del aceite esencial genera grandes cantidades de residuos; en este trabajo se utiliza como sustrato en el que se seleccionaron 3 cepas de hongos filamentosos por su capacidad de degradación de taninos hidrolizables; en el que se realizaron los ajustes con modelos matemáticos para su mayor entendimiento del comportamiento cinético de biomasa, producto y sustrato. Así también la identificación molecular de una de las cepas con las que se desarrolló el presente trabajo.

Palabras clave: Fermentación en medio sólido (FMS), taninos hidrolizables, ácido gálico, hongos filamentosos,

Introducción

Los alimentos son sistemas complejos que varían en composición y destino biológico. Son fuente de nutrimentos tradicionales como proteínas, carbohidratos y grasas. Además, contienen otra gama de compuestos que al ser ingeridos tienen la capacidad de alterar los procesos metabólicos del organismo (Beecher, 2003). Cuando estos compuestos provienen de fuentes vegetales se les conoce como fitoquímicos (Andrés *et al.*, 2010).

Los compuestos polifenólicos son un grupo diverso de fitoquímicos que no se identifican como nutrientes esenciales, pero se les atribuyen efectos positivos sobre la salud de quienes los consumen habitualmente en la dieta, especialmente por su actividad como antioxidantes (Beecher, 2003; Andrés *et al.*, 2010).

Dada su complejidad y diversidad en estructuras químicas y efectos biológicos, es también importante tener presente que diversos polifenoles, o incluso la mayoría de ellos, poseen también efectos adversos, como la interferencia que causan en la absorción de proteínas, así como su posible efecto pro-oxidante en elevadas cantidades; en particular sobre los compuestos polifenólicos (taninos) que se consideran un producto metabólico secundario de la planta debido a que no tienen un papel importante en el metabolismo.

En base a la gran diversidad y variedad de compuestos bioactivos de origen vegetal conocidos como fitoquímicos (terpenos, fenoles, tioles y 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 con diferente peso molecular que se encuentran principalmente en las plantas, cuya función es el de defensa contra virus, bacterias y hongos e insectos. Los taninos tienen la capacidad para precipitar soluciones de proteínas, por lo tanto son nutricionalmente indeseables así como también concentraciones elevadas de taninos responsables de efectos no deseables en el procesamiento de alimentos, tales como, la turbidez del té instantáneo o de los

jugos de frutas además de generar un sabor astringente o amargo; causa que ha sido debate de investigaciones para la obtención de la enzima tanasa que favorezca la degradación de este.

Las principales fuentes para la producción de enzimas industriales son microorganismos, debido a su diversidad bioquímica, fácil cultivo y su docilidad a ser genéticamente modificado (Treviño et al., 2007). La capacidad de ciertos organismos para la producción de enzimas es muy valiosa debido a la importancia industrial que tienen dichos metabolitos. Las enzimas se obtienen de diversas fuentes: microbianas (bacterias y hongos), animales y plantas (Sandhya y col., 2005).

Los hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* así como bacterias de los géneros *Bacillus* y *Lactobacillus* son los microorganismos que han sido ampliamente utilizados para la producción de la enzima tanasa. Durante mucho tiempo la producción industrial de tanasa se llevó a cabo exclusivamente en sistemas de Fermentación Líquida Sumergida (FLS), sin embargo, en los últimos años una serie de investigaciones han demostrado las ventajas de la Fermentación en Estado Sólido (FES) para producción de ésta y otras enzimas. (Aguilar et al, 2007).

La tanasa es la enzima (E.C. 3.1.1.20) que cataliza la hidrólisis de los enlaces éster presentes en taninos hidrolizables, taninos complejos y ésteres del ácido gálico (Aguilar, C.N, et al, 2007). Debido al alto interés industrial por la tanasa. Actualmente existe una constante búsqueda de microorganismos capaces de degradar altas concentraciones de taninos y en mayores títulos de producción de la enzima.

La tanasa (tanin-acil-hidrolasa. EC 3.1.1-20) es usada extensivamente en la industria de los alimentos, bebidas, farmacéutica y química (Lekha y Lonsane, 1997). La tanasa puede ser utilizada para la producción de ácido gálico a partir de fuentes vegetales, en la clarificación de jugos, cerveza y vinos, en el mejoramiento del alimento animal y en la descontaminación de los efluentes de las curtidurías (Belmares, R. et al, 2004).

La credibilidad en los últimos años en las industrias de biotecnología, debido a sus posibles aplicaciones en la producción de metabolitos con actividad, aparte de la

Hernández Hernández L.

alimentación, combustible, alimentos, productos químicos industriales y farmacéuticos y se ha convertido en una atractiva alternativa a la fermentación sumergida y FES.

La utilización de residuos agroindustriales como sustratos en procesos de Fermentación en Estado Sólido ofrece una vía alternativa y la adición de valor a estos residuos de otro modo insuficientemente o no utilizados.

La innovación es la clave del éxito y es imprescindible para estar al día con las cambiantes demandas de la industria y satisfacer sus necesidades para un mejor producto y servicios. Una mejor comprensión de los aspectos de ingeniería bioquímica, especialmente en el modelado y diseño de biorreactores (fermentadores) ha hecho posible que los procesos FES a escala y algunos diseños se han desarrollado para su comercialización, por lo que la tecnología económicamente viable.

Objetivo General

Evaluar la inducción de enzima tanasa de la o las cepas fúngicas en fermentación Medio Solido; usando orégano como soporte, fuente de carbono y energía.

Objetivos Específicos

- Purificar y caracterizar macroscópicamente y microscópicamente las cepas fúngicas aisladas.
- Seleccionar la o las cepas de producción extracelular de enzima tanasa en Fermentación Medio Solido.
- Evaluar cinética de producción de tanasa en Fermentación en Medio Solido.
- Identificar genéticamente la o las cepas de mayor producción de enzima tanasa.

Hipótesis

Los taninos que están presentes en el orégano inducirán la producción de la enzima TAH por hongos filamentosos; siendo la única fuente potencial de carbono y energía.

Revisión de literatura

Enzimas

Las enzimas son catalizadores biológicos de naturaleza proteica sintetizados por los seres vivos para llevar a cabo las distintas reacciones químicas necesarias, a muy altas velocidades y con un elevado grado de especificidad. Se diferencian de los catalizadores químicos en que son capaces de catalizar una reacción en condiciones de presión atmosférica y temperatura casi ambiente y porque generalmente pueden regularse mediante iones y/o moléculas pequeñas.

Las enzimas corresponden a dos clases generales:

- Proteínas simples: solo contienen residuos de aminoácidos, ejemplo, enzimas digestivas como la tripsina, quimiotripsina y elastasa.
- Proteínas complejas: contienen residuos de aminoácidos y un cofactor no aminoácido.

Aunque la síntesis de toda enzima tiene lugar en el interior de la célula, algunas se excretan a través de la pared celular y pueden funcionar fuera de la misma. Por esto, se consideran dos tipos de enzima:

- Enzimas extracelulares, exocelulares o exoenzimas. Funcionan o tienen su acción catalítica fuera de la célula.
- Enzimas intracelulares, endocelulares o endoenzimas. Cuya acción catalítica se limita al interior de la célula (Montoya Villafañe H.H, 2008).

Nomenclatura y clasificación

La comisión de enzimas de la unión internacional de bioquímica desarrollo un método que identifica cada una con cuatro dígitos.

Se hicieron seis grupos que incluyen todas las enzimas; el primer dígito de la nomenclatura indica al grupo que pertenecen:

Tabla 1. Nomenclatura y clasificación

clasificación	Actividad catalítica	Reacción típica	Ejemplo de enzima
EC.1- Oxidoreductasas	Reacciones de oxidación-reducción, y de transferencia de átomos de O, H o electrones desde una sustancia a otras.	$AH+B \rightarrow A+BH$ (reducido) $A + O \rightarrow OA$ (oxidado)	Deshidrogenasa, oxidasa
EC2.-Transferasas	Transferencia de grupos funcionales El grupo puede ser metil-, acil-, amino- o fosfato.	$AB + C \rightarrow A + BC$	Transaminasa, quinasa
EC 3.-Hidrolasas	Reacciones de hidrolisis	$AB+H_2O \rightarrow OH+BH$	Lipasa, amilasa, peptidasa
EC 4.-Liasas	Eliminación de grupos para formar enlaces dobles Pueden romper enlaces C-C, C-N, C-O, C-S.	$RCO_2COOH \rightarrow RCOH + CO_2$	Descarboxilasa
EC 5.-Isomerasas	Isomerización de una molécula	$AB \rightarrow BA$	Isomerasa, mutasa
EC 6.-Ligasas	Formación de enlaces acopladas con hidrolisis de ATP, de nuevos enlaces C-O, C-S, o C-C con la rotura simultánea de ATP	$X + Y + ATP \rightarrow XY + ADP + pi$	Sintetasa

Voet.voet.Bioquímica.3ra edición. Panamericana 2006

La mayor parte de las enzimas que se emplean hoy en la industria alimentaria son de origen microbiano (López Carracosa, J; Modrego, A. 1993).

El empleo de enzimas tienen muchas ventajas:

- 1) Son de origen natural y por lo tanto no son tóxicas.
- 2) Son muy específicas en su manera de actuar, por lo que no propician reacciones secundarias indeseables.
- 3) Funcionan en condiciones moderadas de temperatura y de pH y no requieren de condiciones de procesamiento drásticas que puedan alterar la naturaleza del alimento, ni de equipo muy costoso.
- 4) Actúan a bajas concentraciones, su velocidad puede ser controlada al ajustar el pH, la temperatura y la concentración de enzimas son fácilmente inactivadas una vez alcanzado el grado de transformación deseado. (Badui Dergal S., 1993).
- 5) La actividad de una enzima depende tanto de su secuencia de aminoácidos como de las estructuras superiores. Si una enzima pierde su forma nativa (se desnaturaliza), generalmente pierde su actividad, si es descompuesta en sus aminoácidos constituyentes siempre se destruye su actividad catalítica.

Todas las enzimas son proteínas, tienen una estructura tridimensional globular, están formadas generalmente que es el sitio activo de una enzima por una sola cadena polipeptídica, y solo logran ser activas cuando los polímeros desarrollan una conformación que permite establecer su centro activo.

Especificidad

La gran mayoría de las enzimas tiene la capacidad de catalizar reacciones más o menos específicas; es decir, su intervalo de acción se limita a un determinado tipo de compuesto que debe reunir ciertas características para que pueda ser utilizado como sustrato.

Su especificidad, propiedad que las hace diferentes a muchos catalizadores no biológicos, se ha dividido en cuatro grupos: especificidad estereoquímica, baja especificidad; especificidad de grupo, y especificidad absoluta.

Especificidad estereoquímica: normalmente utilizan D o L isómeros como sustrato; por ejemplo, casi todos los monosacáridos en la naturaleza son D, mientras que los aminoácidos pertenecen a la serie L; esta especificidad se entiende si se considera que las enzimas son polímeros integrados por L-aminoácidos y que, consecuentemente, tienen una estructura asimétrica.

Baja especificidad. Se presenta cuando las enzimas atacan un determinado tipo de enlace químico sin importar la naturaleza del sustrato; tal es el caso de las lipasas que hidrolizan enlaces éster entre ácidos y alcoholes en una gran variedad de compuestos orgánicos.

Especificidad de grupo. Se presenta cuando las enzimas actúan sobre un sustrato que contiene un determinado enlace y un grupo químico específico al lado de este (tripsina).

Especificidad absoluta. Es la más común, y consiste en que la enzima utiliza como sustrato una sola sustancia muy específica.

Sitio activo

El sitio activo de una enzima es aquella porción de la proteína que participa directamente en la unión y la transformación del sustrato; está integrado por ciertos aminoácidos selectos que integran un microambiente característico dentro de la propia cadena y que llevan a cabo la reacción; generalmente solo existe uno por molécula de enzima.

Las enzimas adquieren su poder catalítico cuando presentan una estructura secundaria y terciaria muy específica, de tal manera que los aminoácidos correspondientes del sitio activo se encuentran en posición vecinal estableciendo el microambiente (Badui Dergal S.1999).

En el año1958, Koshland sugiere que el sitio activo de la enzima puede cambiar ligeramente su conformación, al unirse el sustrato. De esta manera, la enzima puede realizar su acción catalítica, luego de la cual se libera el producto, y el

sitio activo vuelve a su conformación original. Este es el proceso representado en la figura que sigue:

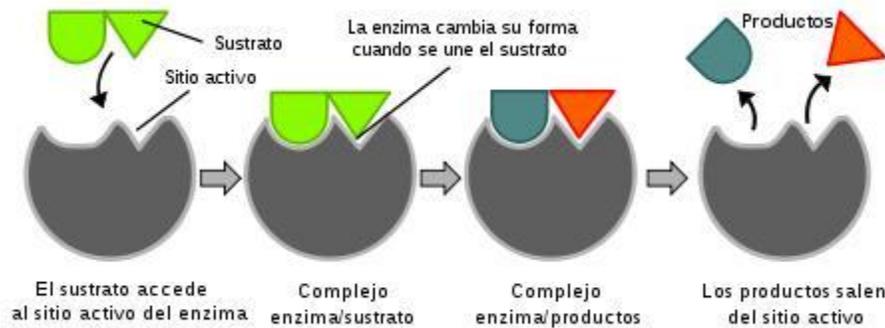


Figura 1. Interacción enzima-sustrato

Una de las empresas que produce y suministra enzimas alimentarias es la danesa Novo-Nordisk que utiliza, fundamentalmente, la bacteria *Bacillus Subtilis* y el hongo *Asergillus Oryzae* como fuentes de las mismas, disponiendo de distintas cepas especializadas en la producción de los distintos compuestos que esta empresa comercializa. Según datos de los fabricantes de enzimas casi el 80 % son obtenidas a partir de microorganismos (Morcillo et al, 2013).

El mercado mundial de las enzimas industriales se calculaba el año pasado en unos \$65 millones. Aproximadamente el 62 % de las enzimas producidas se emplean en la industria alimentaria, 33% en detergentes y 5 % en textiles.

Casi sin excepción, las enzimas que se emplean en alimentación son hidrolasas: hidrolizan carbohidratos, grasas y proteínas. Con frecuencia la hidrólisis de estas moléculas complejas facilita el procesado de los alimentos: predice viscosidad de los zumos, mejora las propiedades reológicas de la masa (panificación) o facilita el desarrollo del sabor.

Determinación de la actividad enzimática

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

La comisión internacional de enzimas sugirió la definición de unidad de actividad como la cantidad de enzima que transforma 1 μmol de sustrato por minuto bajo condiciones definidas de pH, temperatura; la concentración de sustrato deberá ser aquella en que la enzima se encuentre actuando con su velocidad máxima, es decir, en condiciones de saturación.

Factores que afectan la actividad enzimática

La velocidad a la que las reacciones enzimáticas proceden depende de varios factores, dentro de los que destacan el pH del medio de reacción, la temperatura, la concentración de sustrato y de enzima, y el agua disponible en el medio, entre los más importantes.

- **Influencia de la temperatura:** cada enzima tiene un intervalo óptimo de temperatura en el cual se logra la mayor actividad, para la mayoría está entre 30 y 45°C, y se inactiva a más de 60°C, a esta temperatura la energía introducida en el sistema sobrepasa la energía de las fuerzas que mantienen la estructura activa de la enzima. Cabe mencionar que actualmente se dispone de enzimas obtenidas de microorganismos extremó-filos y actúan de manera óptima a temperaturas muy altas, incluso arriba de los 100°C que aunque no son frecuentes.

- **Influencia del pH:** La actividad de las enzimas depende fuertemente de la concentración de iones hidronio del medio; esto afecta el grado de ionización de los aminoácidos de la proteína, incluyendo a los del sitio activo, del sustrato (en caso de ser ionizable), o del complejo enzima-sustrato. Todas las enzimas tienen dos valores límites de pH entre las cuales son efectivas, traspasados estos valores, la enzima se desnaturaliza y deja de actuar.
- **Concentración del sustrato:** Una enzima funciona de manera más eficiente cuando la concentración de sustrato está en exceso en relación con la concentración de enzima. Esto se debe a que las colisiones “exitosas” con el reactivo son más frecuentes, asegurando así que la mayor cantidad de enzima se encuentre activa. En estas condiciones, el producto se obtiene a la máxima velocidad posible para la cantidad de enzima presente. En caso de que la concentración de sustrato sea menor, la velocidad de reacción disminuye generalmente.

Inhibidores: Son sustancias que disminuyen la actividad de la enzima. Pueden ser:
Irreversibles: Tienen lugar cuando el inhibidor se fija permanentemente al centro activo de la enzima alterando su estructura.

- **Reversibles:** Tienen lugar cuando no se inutiliza el centro activo, sino que sólo impide temporalmente su normal funcionamiento.
- **Competidores:** Se debe a la presencia de una sustancia similar al sustrato por lo que se puede competir en la fijación al centro activo.
- **No competidores:** Es debida a un inhibidor que se une a la enzima impidiendo la fija ion del sustrato al centro activo.

Explotación industrial de enzimas

Las enzimas industriales son de origen animal, vegetal y microbiano, pero las más abundantes son las últimas. Los microorganismos que se emplean para este fin, presentan muchas ventajas, ya que incluso se les puede alterar genéticamente para
Hernández Hernández L.

convertirlos en sobre-productores de una determinada enzima. Adicionalmente, la ingeniería genética permite aislar el material genético que codifica para la síntesis de una determinada enzima, e introducirla en otro microorganismo más manejable para su producción en grandes cantidades.

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

El desarrollo de fermentaciones de enzimas industriales fue iniciado por Boidin y Effront en España y Alemania respectivamente, quienes en 1917 patentaron el empleo de *Bacillus subtilis* y *Bacillus mesentericus* para obtener amilasas y diastases también, mediante técnicas de cultivo en superficie. Los métodos de cultivo en superficie para la producción de enzimas fúngicos se utilizaron en E.E.U.U. en los años 50's y aún hoy continúan empleándose, especialmente en Japón.

Las fermentaciones fúngicas sumergidas se utilizaron en E.E.U.U. y Europa para la producción de enzimas basándose en la experiencia conseguida con las fermentaciones sumergidas en el desarrollo del proceso de producción de *Penicillium*, en los Northern Regional Research Laboratories (NRRL) de E.E.U.U. (Aguilar, 1998).

Tanin Acil Hidrolasa

La tanasa o tanin acil hidrolasa (EC. 3.1. 1.20) cataliza la hidrólisis de los enlaces éster presentes en galotaninos, elagitaninos, taninos complejos y ésteres del ácido gálico. (Aguilar y col., 2007; Costa, 2008).

Fundamentos

La TAH se conoce también como tanasa; desempeña un papel importante en la formación de los taninos complejos en las plantas, los cuales por definición son un grupo de compuestos fenólicos; además, la TAH influye en la maduración de las frutas, debido a que desesterifica algunos esteres formados a partir de los ácido quebulinico, gálico y hexahidrofenoico con la glucosa (McMahon et al., 2000).

En relación a los sustratos de la TAH, muchos autores usan la palabra tanino en forma generalizada, más sin embargo esto es impropio, debido a que no solo se trata de un único compuesto. La terminología correcta debe apegarse a la clasificación de los compuestos fenólicos en cuestión, los cuales se dividen en dos grandes grupos: taninos hidrolizables y condensados. (Lekha y Lonsane, 1997).

El primer grupo involucra un alcohol poli hídrico esterificado con ácido gálico o alguno de sus derivados, por lo que se incluyen las familias de galotaninos y elagitaninos; el segundo grupo está formado por fenoles del tipo flavan conocidos como flavanos (Nishira y Joslyn, 1968; García-peña y col., 1999; Lekha y Lonsane, 1997).

El contenido de azúcares y la disponibilidad como sustratos de la TAH son dos de las diferencias entre los taninos hidrolizables y los condensados, se ha reportado que los taninos condensados no poseen residuos de azúcares, solamente son polímeros de flavan-3-ol o del flavan-3,4-diol; que la TAH no actúa sobre este tipo de taninos, únicamente sobre los taninos hidrolizables (Cristobal Noe., 2000).

Fuentes de obtención

Obtención de TAH de origen animal: se puede extraer de la mucosa ruminal e intestino delgado de bovino, probablemente se encuentra en estos animales para hidrolizar el ácido tánico presente en su dieta y convertirlos en fenoles y azúcares

para ser aprovechados con mayor facilidad (Aguilar y Gutierrez-Sanchez, 2001), y algunos insectos producen la enzima durante el estado larvario (Nieresntein, 1930).

Obtención de TAH de origen vegetal: la enzima está presente en cortezas de los árboles como “el mirobolano” y el “badúl”, en corteza de Brasil (*Haematoxylon brasiletto*), quebracho (*Schinosis lorenzii*), encino (*Quercus laurina*), (Pedraza Bucio F.E.; Rutiaga Quiñones J.G.; 2011); hojas de una especie de roble (*Quercus robur*), hojas de dhawa (*Anogeissus latifolia*); de frutas de myrobalan o karitaki (*Terminalia chebula*), vainas de dividivi o cascalote (*caesalpinia coriaria*) (Frutos y col.,2004).

Obtención de TAH vía microbiana: La producción de TAH fue también reportada en levaduras (Aoki et al, 1976). Las bacterias son generalmente consideradas como altamente sensibles a los taninos, pero al aislar algunas se observó que son capaces de sobrevivir en presencia de taninos e incluso degradarlos (Basaraba, 1966).

La producción de TAH fue lograda en *Bacillus pumilus*, *B. polymyxa*, *Corinebacterium* sp. y *Kleibsiella pneumoniae* en extractos de corteza de castaño como única fuente de carbono: la rápida degradación de la estructura de los taninos fue relacionada con la producción de tanasa extracelular (Alain et al, 1983). El ácido gálico fue el único producto de degradación observado con las cepas de *Kleibsiella pneumoniae*, *Corinebacterium* sp y *Bacillus polymyxa*.

Es conocido que la producción de TAH y la degradación de taninos hidrolizables, se dá en medios fúngicos de especies de *Aspergillus*, incluyendo *A. flavus*, *A. orizae*, *A. joponicus*, *A. niger* y también *Penicillium* sp.

Aunque se sabe que los taninos inhiben el crecimiento microbiano, existen especies que han desarrollado los mecanismos para degradarlos, entre ellos la producción de la enzima tanasa. Se han reportado bacterias, mohos y levaduras productores de la TAH (Tabla No 2).

Tabla 2. Fuentes microbianas de TAH

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

Adaptado de : Aguilar y col., 2007

Entre los microorganismos productores, se encuentran levaduras, bacterias, y principalmente hongos de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, siendo en éste último, la especie *Niger* el más ampliamente utilizado como modelo, ya que no es patógeno, es un productor conocido de una gran variedad de enzimas y es considerado como GRAS (Generalmente Reconocido Como Seguro).

Propiedades

Aunque los taninos son conocidos como desnaturalizantes de proteínas, la tanasa actúa sobre estos compuestos, hidrolizando los enlaces éster formados entre grupos y un alcohol polivalente o entre dos grupos galoi (enlace depsidasa) (Aguilar y Gutiérrez Sánchez, 2001; Kasieczka-Bumecka y col., 2007). Se ha propuesto que la tanasa tiene actividad esterasa y depsidasa independientes y que su especificidad depende de las condiciones de cultivo (Farías y col, 1994)

Inhibidores de la tanasa

La tanasa es inhibida competitivamente por ácido gálico, pirogalol, ácidos hidroxibenzoicos y di-hidroxibenzoicos (Libuchi y col., 1972). La inhibición de la tanasa por compuestos como el di-isopropil fluoro fosfato (Adachi y col., 1971; Barthomeuf y col., 1994) y el fenil metil sulfonil fluoruro (Sharma y col., 2008) indican la presencia de un residuo de serina en el sitio activo. Estudios con isótopos radioactivos, sugieren que la secuencia de aminoácidos en el sitio activo puede ser treonina-serina-metionina (Adachi y col., 1971).

El sitio activo de la tanasa puede reaccionar con los grupos hidroxilo de compuestos fenólico e inhibir la formación de enzima-sustrato (Libuchi et al, 1991). La tanasa es inhibida en un 53 % por iones metálicos como: Cu^{2+} , Zn^{2+} y Fe^{2+} y hasta un 17 % por Mg^{2+} a 20mM, di-isopropil fluorofosfato (DFP); e incluso algunos reactivos, como inactivadores de la tanasa: o-fenantrolina, Pmsf, EDTA, 2-mercaptoetanol, tioglicolato de sodio, MgSO_4 , CaCl_2 , MnCl_2 , CoCl_2 (Barthomeuf et al, 1994).

Tabla 3.Inhibidores e inactivadores de la tanasa

Inhibidores	Inactivadores
ácido gálico, pirogalol, ácidos hidroxibenzoicos y di-hidroxibenzoicos DFP , ZnCL ₂ , FeCL ₂ , CuSO ₄	o-fenantrolina, Pmsf, EDTA, 2-mercaptoetanol, tioglicolato, MgSO ₄ , CaCL ₂ , CoCL ₂

Dependiendo de su origen, la TAH puede ser inhibida o estimulada de diferente manera por iones metálicos. En diversos trabajos se ha encontrado un aumento en la actividad tanasa con la adición del ion Mg⁺², sin embargo se desconoce si se debe a que una función de cofactor o a un efecto no específico (Kar y col., 2003; Mukherjee y Banerjee, 2006; Naidu y col., 2008; Hamdy, 2008).

Mecanismo de acción.

La TAH cataliza la hidrólisis de los enlaces éster presentes en los taninos hidrolizables y en los ésteres del ácido gálico (Lekha y Lonsane, 1997). Sobre el ácido tánico (un tanino hidrolizable), la TAH genera glucosa y ácido gálico como productos finales de la reacción (Haworth y col., 1958).

Aunque los taninos son conocidos como desnaturalizantes de proteínas, la tanasa actúa sobre estos compuestos, hidrolizando los enlaces éster formados entre grupos galoil y un alcohol polivalente o entre dos grupos galoil (enlace depsida) (Aguilar y Gutiérrez Sánchez, 2001; Kasieczka-Burnecka y col., 2007). Se ha propuesto que la TAH tiene actividad esterasa y depsidasa independientes y que su especificidad depende de las condiciones de cultivo (Haslam y Stangroom, 1966; Beverini y Metche, 1990; Farías y col., 1994).

La TAH cataliza la hidrólisis del ácido tánico dando como productos nueve moléculas de ácido gálico y una de glucosa por cada molécula de sustrato (Figura 2). Los compuestos intermediarios en esta reacción son: 1,2,3,4,6 penta-galoil-glucosa,

2,3,4,6 tetra-galoil-glucosa y dos tipos de mono-galoil-glucosa (Libuchi y col., 1972; Lekha y Lonsane, 1997). Cuando el sustrato de la reacción es un metil-éster del ácido gálico, la TAH produce ácido gálico y metanol (Aguilar y Gutiérrez-Sánchez, 2001)

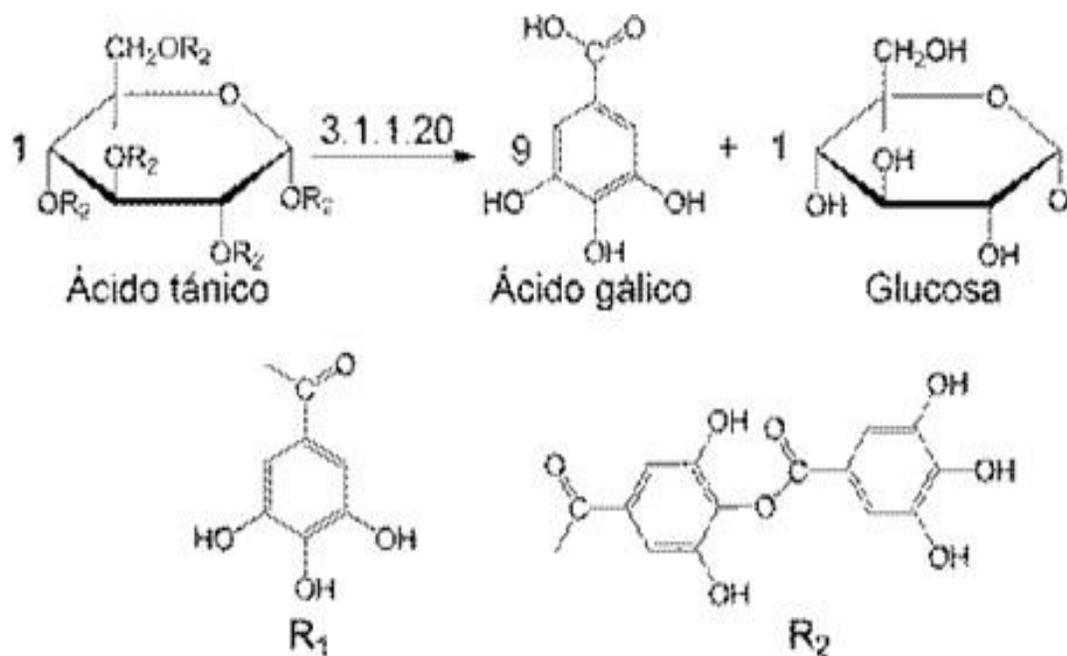


Figura 2. Hidrolisis del ácido tánico catalizada por la TAH (Aguilar y Gutiérrez-Sánchez, 2001).

Para que un éster forme un verdadero complejo enzima-sustrato con la TAH, la parte ácida del éster debe ser ácido gálico, pero no existe restricción para la naturaleza de la parte alcohólica. Cualquier grupo hidroxilo fenólico puede reaccionar con el sitio activo de la TAH, impidiendo que se forme el verdadero complejo enzima-sustrato (Albertse, 2002).

Regulación y Biosíntesis de la TAH

La TAH puede inducirse por diversos compuestos, tales como: pentagaloil-glucosa, metil galato, ácido gálico y el pirogaloil, además, sugieren que la regulación de la tanasa no puede ser controlada por inhibición de retroalimentación, debido a que el

Hernández Hernández L.

ácido gálico es el producto final de muchos sustratos empleados como inductores de la actividad TAH, ni tampoco por represión catabólica (Bajpai y Patil, 1997).

Los mecanismos de regulación de la TAH aún no están claros, y existe cierta controversia acerca del papel que desempeñan algunos compuestos en la inducción y represión de su expresión. Es generalmente aceptado que el ácido tánico no puede actuar directamente como inductor, ya que su molécula es muy grande y reactiva como para atravesar la membrana celular de los microorganismos. Esto sugiere que la producción de la TAH es inducida por algún compuesto intermediario de la hidrólisis de los taninos, el cual es liberado por la acción de la TAH producida constitutivamente (Aguilar y Gutiérrez-Sánchez, 2001).

En base a estas aportaciones puede cuestionarse que el ácido gálico induzca la expresión de la actividad TAH, debido a que dicha enzima por naturaleza es una esterasa, e incluso este ácido ha sido involucrado en el mecanismo de regulación de la actividad por producto final (Bradoo y col., 1997). Existen evidencias que demuestran que los títulos de actividad TAH disminuyen por debajo de los niveles basales cuando el microorganismo crece sobre ácido gálico como única fuente de carbono, lo que implicaría que dicho ácido es un efector negativo de la TAH (Aguilar y col., 1999^a; Bajpai y Patil, 1997; Siegenthaler y col., 1997).

Los mecanismos de regulación de la TAH son muy diferentes en FMS y FLS. Aguilar y col. (2001a; 2001b) estudiaron los patrones de inducción y represión de la producción de TAH en ambos sistemas. Encontraron que mientras la adición de ácido tánico a concentraciones mayores de 25 g/L inhibió fuertemente la producción de TAH en FLS, en FMS la enzima se produjo en concentraciones de ácido tánico de hasta 200 g/L. La adición de pequeñas cantidades de glucosa (12.5 g/L) incrementó los títulos de actividad en FMS, con menor efecto en FLS. Mayores concentraciones de glucosa resultaron en una fuerte represión catabólica en FLS, pero tuvieron un efecto menor en FMS. Por último, utilizando ácido gálico como única fuente de carbono, la producción de TAH fue inferior a los niveles basales de actividad.

Evaluación de la actividad TAH

La actividad TAH, entre los cuales destacan algunos ensayos de titulación potenciométrica (Freudenberg y col., 1927; Nishira, 1961; Haslam y Stangroom, 1966; Yamada y col., 1967), un ensayo fotométrico (Chen, 1969), un colorímetro (Haslam y Tanner, 1970), algunos UV-espectrofotométricos (Parmentier, 1970; Libuchi y col., 1967; Aoki y col., 1976). Todos estos métodos se basan en la liberación del ácido gálico a partir del ácido tánico por la acción de la enzima TAH.

Los métodos para evaluar la actividad TAH han sido brevemente revisados por Lekha y Lonsane (1997), así como también por Madhavakrishna y col., 1960; Jean y col., 1981 y Bajpai y Patil, 1996. El debate se centraba en el hecho de que los sustratos usados en los ensayos específicos existentes para evaluar la actividad TAH no son los adecuados, existen variaciones en las lecturas lo que lleva a grandes discrepancias en los valores de actividad observados, algunos no son específicos o presentan problemas para determinar el punto final de la reacción; incluso, las longitudes de onda, en el caso de los ensayos espectrofotométricos, varían de un autor a otro haciendo muy difícil una comparación de los resultados obtenidos. Otros métodos presentan desventajas tales como, largos tiempos de reacción y uso de sustratos poco disponibles.

Aplicaciones y usos potenciales

La TAH se utiliza como agente clarificante en la elaboración de ciertos jugos y bebidas, como té helado, cerveza, vino, jugos de algunas frutas y bebidas refrescantes con sabor a café. Se utiliza para la producción de ácido gálico, un importante compuesto intermediario en la elaboración del antibiótico trimetoprima y en la elaboración de antioxidantes (Aguilar y Gutiérrez-Sánchez, 2001).

Hernández Hernández L.

El ácido gálico se utiliza en la industria farmacéutica como un importante compuesto intermediario en la síntesis del antibiótico trimetoprima; en la industria química se emplea como sustrato para la síntesis química o enzimática de propil-galato y otros compuestos antioxidantes utilizados en alimentos, cosméticos, productos para el cabello, adhesivos y lubricantes. El ácido gálico es usado en la elaboración de semiconductores, tintas y en la revelación fotográfica. Diversos estudios han encontrado que el ácido gálico y compuestos relacionados tienen propiedades terapéuticas importantes (Abdelwahed y col., 2007; Banerjee y col., 2007; Yu y Li, 2008).

La tanasa en bebidas y alimentos contribuyen a reducir los efectos indeseables de los taninos. En la manufactura del té instantáneo la TAH se utiliza para eliminar precipitados insolubles que se forman cuando la bebida se enfría a temperaturas por debajo de los 4 °C. Estos precipitados se forman por la polimerización de compuestos fenólicos y por su interacción con la cafeína. El tratamiento con TAH rompe los enlaces éster de los poli fenoles, evitando su polimerización y acomplejamiento con la cafeína. Los procesos químicos para eliminar los precipitados del té pueden eliminar una gran cantidad de compuestos aromáticos, en cambio, mediante el tratamiento enzimático se obtiene un té soluble en agua fría con un alto contenido de compuestos aromáticos y un color apropiado (Aguilar y Gutiérrez-Sánchez, 2001).

El tratamiento enzimático para reducir el sabor amargo de jugos de frutas tiene ciertas ventajas que aumentan la calidad de dichas bebidas. La alta concentración de taninos en frutas como arándano, granada y frambuesa, causa la formación de sedimento, coloración y sabor amargo durante el almacenamiento de sus jugos, por lo cual se recomienda el tratamiento enzimático con tanasa (Aguilar y col., 2007). Un tratamiento con tanasa, para reducir la concentración de los factores anti nutricionales y por lo tanto utilizar estas variedades de sorgo como complemento en la alimentación animal (Aguilar y Gutiérrez-Sánchez, 2001). Para biotecnología

Hernández Hernández L.

ambiental, por ejemplo, en el tratamiento de los efluentes de las tannerías, que están contaminadas con polifenoles (Aissam y col., 2005).

La TAH puede ser una solución económica y eficiente para el tratamiento de los efluentes de las curtidurías, los cuales tienen grandes concentraciones de compuestos polifenólicos (Belmares et al, 2004).

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), presentan estructura amorfa, tienen un sabor astringente y son débilmente ácidos. La mayoría de ellos son solubles en agua y sólo unos pocos en solventes orgánicos; pueden ser de color amarillo, rojo o café, y se localizan en el citoplasma o en la vacuola de la célula (Sora, 1984; Esau, 1997; Fahn, 1974).

Se admite que los taninos se forman por una transformación de los sacáridos produciendo derivados cíclicos, que sufren condensaciones y oxidaciones variables (Hon y Shiraishi 2001).

Se encuentran repartidos en la mayoría de las especies vegetales, especialmente en familias como: *Coniferae*, *Ericaceae*, *Labiadas*, *Leguminosae*, *Myrtaceae*, *Poligonaceae*, *Rosaceae* *Rubiaceae*, *Fagaceae*, *fabaceae* (Marcano, et al, 1991; Hernández Ángel, 2003, Germosén-Robineau, 2005).

Clasificación de taninos

De acuerdo a su estructura y actividad se clasifican en taninos hidrolizables y taninos condensados (Haslam, 1975). La clasificación más aceptada, divide a los taninos en cuatro grupos: galotaninos, elagitaninos, taninos condensados y taninos complejos (Figura 3)

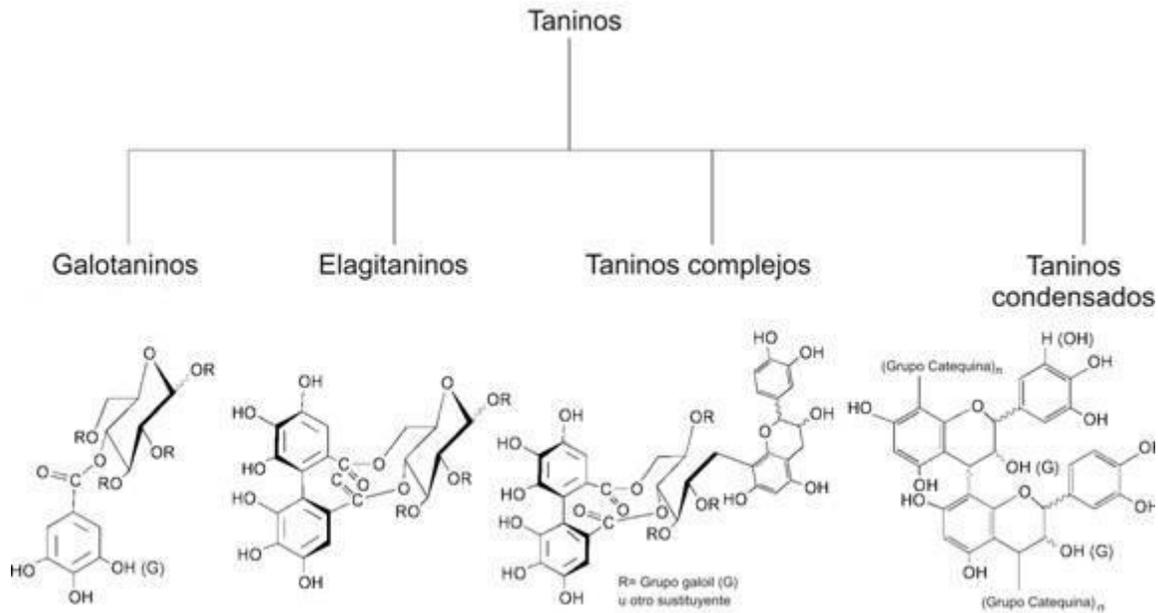


Figura 3. Clasificación de los taninos (Khanbabaee y Van Ree, 2001).

Los galotaninos son los taninos más simples que existen, están formados por unidades galoil o di-galoil esterificadas a un núcleo de glucosa u otro alcohol polivalente. Los elagitaninos son ésteres del ácido hexahidroxidifénico (HHDP); después de la hidrólisis de los elagitaninos, el grupo HHDP se deshidrata y lactoniza espontáneamente, formando ácido elágico. Los taninos condensados son proantocianidinas oligoméricas y poliméricas consistentes en unidades de flavan-3-ol (catequina) o flavan-3-4-ol unidas entre sí por enlaces C-C. La estructura de los taninos complejos está construida sobre una unidad de galotano o elagitano y una de catequina (Belmares y col., 2004; Aguilera-Carbo y col., 2008).

La tanasa actúa sobre galotaninos, elagitaninos y taninos complejos, pero sólo rompe enlaces éster sin afectar las uniones carbono-carbono, por lo cual no actúa sobre taninos condensados (Haslam y Stangroom, 1966).

Taninos condensados

Los taninos condensados (procianidinas); son oligómeros o polímeros de flavan-3-oles de catequina o epicatequina (Fig. 2.2.1). La segunda, es un isómero de la primera, y la única diferencia es la ubicación del **-OH** (al frente o hacia atrás) de la posición 3 del heterociclo. Cuando este hidróxilo está al frente, es una catequina y cuando está detrás es una epi-catequina (Figura 4).

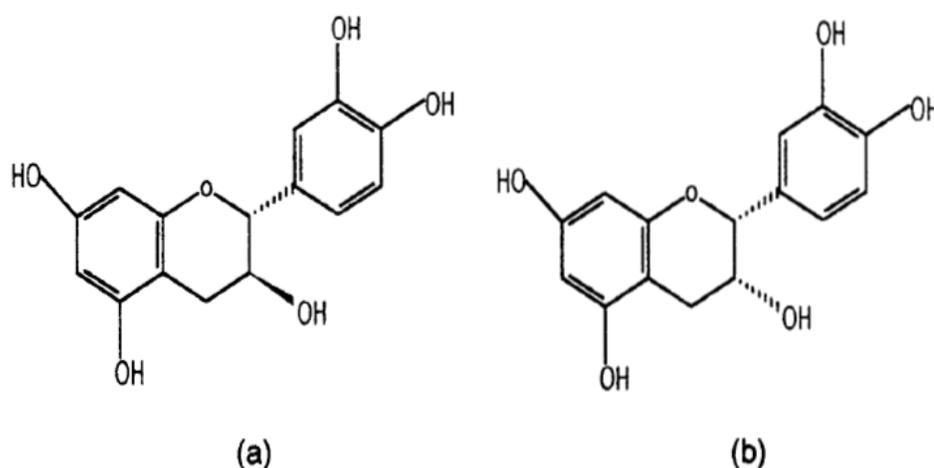


Figura 4. Catequina (a); Epicatequina (b)

Taninos hidrolizables

Los taninos hidrolizables poseen un carbohidrato central, que funciona como poli alcohol, con varios ácidos carboxílicos fenólicos que se unen por enlaces de tipo éster. Por ser una molécula de tipo poliéster puede ser hidrolizada en fragmentos simples. Este tipo de taninos pueden ser subdivididos en; galotaninos y elagitaninos, dependiendo si su estructura está formada por ácido gálico (Figura 3A) o ácido elágico (Figura 5).

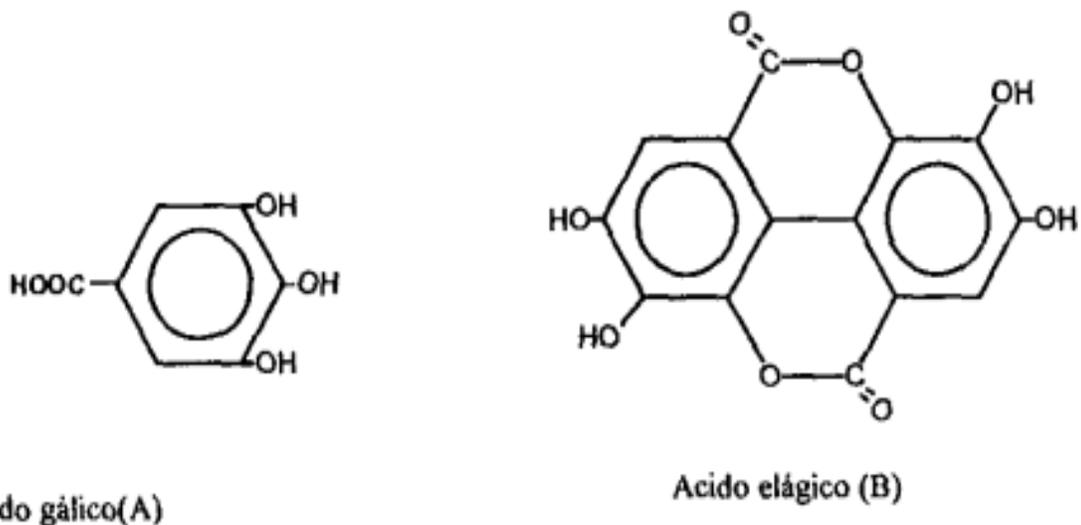


Figura 5. Componentes básicos de los taninos hidrolizables ácido gálico (A) y ácido elágico (B).

Se componen de ácido gálico (3,4,5-ácido trihidroxibenzoico) y una molécula de glucosa. La unión de dos moléculas de ácido gálico hace el ácido elágico.

El ácido tánico (Figura 6) , es un galotanino, formado por ésteres del ácido gálico y la glucosa. Contiene cinco moléculas de ácido gálico unidos directamente a la molécula de glucosa (pentagaloilo de glucosa), a estos ácidos gálicos centrales se esterifican otras moléculas de ácido gálico, para componer el ácido tánico. El enlace entre las moléculas de ácido gálico se conoce como enlaces depsídicos a pesar de ser un enlace éster.

Otros tipos de taninos hidrolizables más simples son el ácido elágico y el galato de metilo. El primero, se compone de dos moléculas de ácido gálico y el segundo, es una molécula de ácido gálico metilada en el grupo carboxilo (Figura 7).

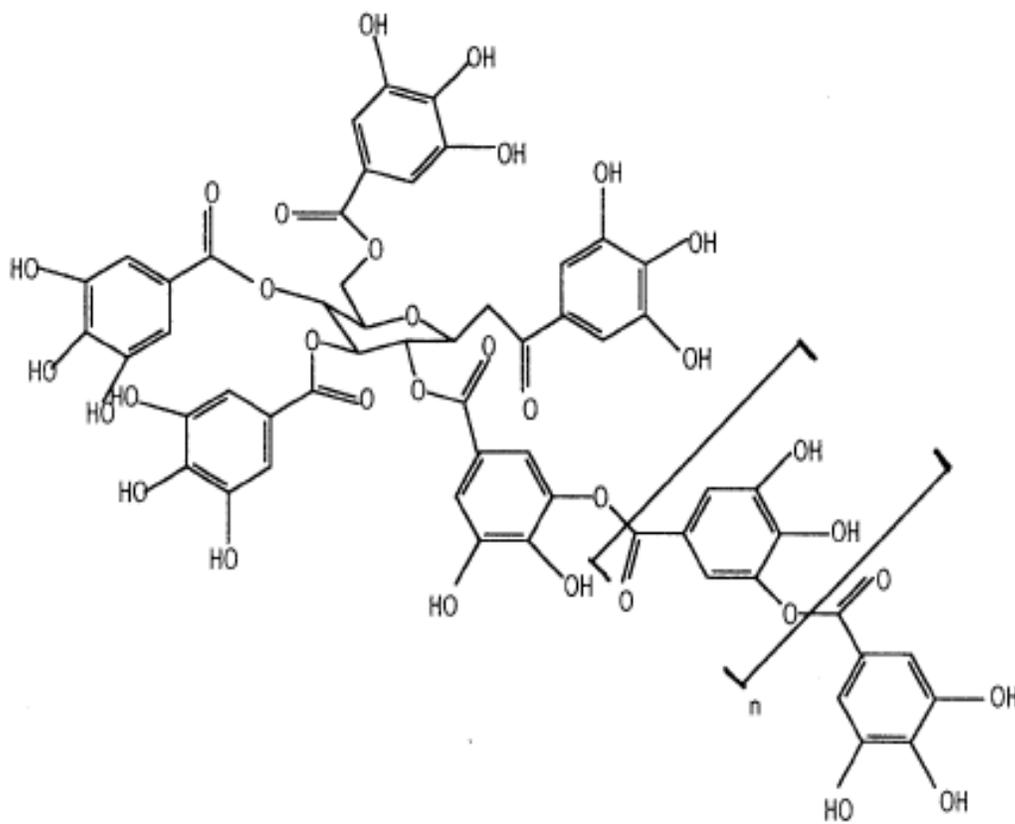


Figura 6. Acido tánico

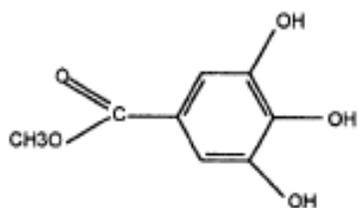


Figura 7. Galato de Metilo

Tabla 4. Principales diferencias entre taninos hidrolizables y condensados.

Taninos hidrolizables	Taninos condensados
Se encuentran en extractos de semillas y vainas.	Este tipo de taninos se encuentra en los extractos de: pino, quebracho, generalmente en cortezas.
Poseen mayor proporción de carbohidratos en su estructura, usualmente glucosa.	Poseen bajas proporciones de carbohidratos, lo cual los hace poco solubles.
Se subdividen en galotaninos y elagitaninos.	Son una familia de varios compuestos diferentes.
Galotaninos; su hidrolisis produce glucosa y ácido gálico, principalmente. Elagitaninos; su hidrolisis produce glucosa y ácido elágico además de ácido gálico y otros.	Están constituidos por tres anillos bencénicos unidos a diferentes radicales, dando origen a varios tipos de compuestos distintos.
Presentan numerosos grupos carboxilos, son muy susceptibles a formar complejos de proteína-tanino.	No presentan grupos carboxilos.
Poseen menos efectos inhibitorios.	Poseen mayores efectos inhibitorios, tanto en enzimas como e microorganismos.

Unión tanino-proteína

Los taninos tienen gran afinidad por las proteínas. Esa interacción se da por medio de puentes de hidrógeno entre el oxígeno del carbonilo de los péptidos y los hidroxilos del ácido gálico. Entre mayor número de grupos fenólicos en el tanino, más se favorecen las oportunidades de reacción entre los taninos y las proteínas para unirse. La formación de los puentes de hidrógeno, es independiente en el intervalo de pH de 2 a 8, pero a pH mayor, los puentes de hidrógeno se rompen por la formación de iones fenolato (McLeod, 1974).

Los grupos ionizados sobre el complejo tanino - proteína, pueden introducir fuerzas de atracción o de repulsión entre las moléculas que pueden reforzar o debilitar el efecto de los puentes de hidrógeno.

Hernández Hernández L.

El efecto neto determina la estabilidad del complejo tanino proteína, y dependen de factores tales como: el número, el tipo y el arreglo espacial de los grupos cargados sobre los taninos y de las proteínas, así como de las propiedades del solvente tales como: pH y constante dieléctrica.

Existen tres posibilidades de interacción de los taninos con las proteínas: la formación de puentes de hidrógeno, que es reversible e independiente del pH, cuando el pH es menor de 8.0. En cambio las interacciones iónicas dependen del pH y son reversibles pudiendo debilitar o reforzar los puentes de hidrógeno dependiendo de las condiciones ; los puentes de hidrógeno y las interacciones iónicas, entre las proteínas y los tanino se favorecen particularmente en los taninos hidrolizables, que tienen numerosos grupos carboxilos (McLeod, 1974).

Los grupos fenólicos de los taninos reaccionan por dos mecanismos: uno por acoplamiento oxidativo, que es irreversible y otro, por puentes de hidrógeno que es reversible (McLeod, 1974). Esta propiedad llamada a veces astringencia, es la razón por la cual los taninos se han usado para curtir pieles animales (Scalbert, 1991).

La estructura juega un papel muy importante en el complejo tanino-proteína. En general, las proteínas ricas en prolina tienen alta afinidad por los taninos, pues fácilmente forman puentes de hidrógeno con los taninos (Hagerman *et al*, 1998).

Fuentes de obtención Importancia biológica

En las plantas, los taninos pueden estar en las vacuolas o incorporados a la pared celular. En muchas especies de plantas los taninos se acumulan y no participan en el metabolismo, las concentraciones acumuladas pueden ser muy altas. Dicha acumulación al parecer se da para proteger las partes vulnerables de las plantas de ataques microbianos, mediante la inactivación de enzimas extracelulares de bacterias u hongos y previene la germinación y crecimiento de esporas (White,

1957). Los taninos también juegan un papel importante en la protección de las plantas contra los herbívoros.

La presencia de taninos en la superficie de la corteza de ciertos árboles y en algunos alimentos para animales confiere a estos tejidos resistencia física, mientras que en frutas su función es la de ayudar a la maduración y lograr un ambiente favorable para la subsecuente germinación y crecimiento en el suelo.

Los taninos naturales son agentes reductores poderosos, que absorben oxígeno, especialmente en soluciones alcalinas, formando productos de oxidación fuertemente coloridos. La oxidación de fenoles produce quinonas, que reaccionan con grupos tales como aminos y sulfidrilos para producir compuestos estables.

Los taninos hidrolizables, por poseer numerosos grupos carboxílicos, son susceptibles a formar puentes de hidrógeno dando origen a los complejos ya mencionados.

El peso molecular y el número de grupos sustituyentes determinan la reactividad de los taninos. Las propiedades biológicas de los taninos son comúnmente el resultado de su habilidad para formar complejos con las proteínas. Dichas características tienen una fuerte influencia en el efecto de la presencia de los taninos en diversas fuentes vegetales. El efecto de los taninos presentes en vegetales se puede agrupar en:

La inhibición enzimática, la inhibición microbiana, efecto de los taninos en forrajes, efecto de los taninos sobre organismos superiores.

La actividad de muchos sistemas enzimáticos es inhibida por los taninos y la actividad de estas enzimas se puede restablecer removiendo los taninos mediante polivinilpirrolidona.

La inhibición de las enzimas es causada por la formación de un complejo enzima-tanino. Las cinéticas de inhibición no competitiva han sido reportadas para; la

inhibición de β -glucosidasa por ácido tánico, para la inhibición de tripsina y α -amilasa por taninos condensados.

La enzima tanasa no inhibe su actividad en presencia de taninos, ya que al ser una glicoproteína forma complejos débiles con los taninos, debido a que los puentes ocurren preferentemente con los carbohidratos que con la proteína (Strumeyer y Malin, 1970).

Algunos organismos son sensibles en diferentes grados al efecto inhibitorio de los taninos sin embargo otros microorganismos pueden tolerar altas concentraciones de taninos y pueden degradar y utilizar los taninos como fuentes de carbono para su crecimiento.

Actúan como repelentes naturales contra predadores y microbios y pueden ayudar de esta manera a proteger la planta. Efecto tóxico contra patógenos potenciales por resistencia de ciertos tejidos de la planta al ataque de virus y microorganismos.

Por su propiedad astringente destruye los tejidos del paladar, en frutos maduros dan o causan astringencia, forma enlaces con las proteínas y otros polímeros, para inhibir enzimas tienen un efecto negativo en la formación de suelo.

Las partes de donde se extraen los taninos son muy variadas, pero principalmente es en la corteza y en la madera de las plantas dicotiledóneas de donde es extraída (Olivares, 1983). Y cuanto más cálido el clima, tanto mayor es la cantidad de extracto curtiente (Revista Chapingo: Serie Zonas Áridas Vol: 1(1): 1-6, 2000).

Efectos anti fisiológicos

Los taninos tienen efectos anti fisiológicos sobre los humanos porque causan astringencia, y en animales causan mala asimilación de las proteínas.

En varios estudios realizados con animales, al proporcionarles dietas ricas en taninos les causan pérdidas de peso, debido a su característica de unirse a las proteínas (McLeod, 1974; Cousins *et al*, 1981; Wrangham y Waterman, 1983). El complejo es resistente a la degradación por enzimas digestivas, lo cual interfiere con la asimilación del nitrógeno in vivo (Osawa, 1992). Los taninos también tienen efectos tóxicos sobre microorganismos metanogénicos (Field *et al*, 1990).

Hernández Hernández L.

Degradación de los taninos por microorganismos

Los taninos varían en su susceptibilidad al ataque microbiano, y son transformados sólo por ciertos hongos, principalmente por especies que pertenecen a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Lewis y Starkey, 1968). Los taninos hidrolizables son descompuestos por hongos como los *Aspergillus*, y los *Penicillium* y las bacterias de la especie *Achromobacter*, en tanto que, los condensados, son utilizados por especies como los *A. fumigatus* (Lewis y Starkey, 1969). La tolerancia en la concentración de taninos entre las diferentes especies, es de hasta 20% para los *Aspergillus*. Pero para especies como *A. fischerii* la tolerancia es del 3% solamente. Sin embargo, la concentración óptima es del 10% para los primeros y de 2% para los últimos (Bajpai y Patil, 1997).

Hongos filamentosos

Los hongos constituyen un grupo muy numeroso de organismos (se han descrito aproximadamente 500.000, pero se estima que pueden existir entre 1 y 1,5 millones de especies) que presentan una amplia distribución en la naturaleza, contribuyendo a la descomposición de la materia orgánica y participando en los ciclos biológicos.

Características fundamentales

Todos son heterótrofos (quimiorganotrofos) por lo que tienen que alimentarse de materia orgánica preformada que utilizan como fuente de energía y de carbono. Son eucariontes, es decir, presentan un núcleo diferenciado con membrana bien organizada. Tienen una pared celular formada por polisacáridos, polipéptidos y quitina; esta pared es rígida, por lo cual no pueden fagocitar partículas alimenticias sino que absorben nutrimentos simples y solubles que obtienen al desintegrar polímeros mediante enzimas extracelulares llamadas despolimerasas.

Hernández Hernández L.

Taxonomía de los hongos

Las divisiones contempladas en el reino fungí según la UGR son:

- *Chytridiomycota*: Contiene los hongos verdaderos más sencillos, conocidos como quitridos, son microscópicos unicelulares, masas multinucleadas o verdaderos micelios. Presentan ciclos de reproducción asexual, mediante zoosporas (esporas flageladas móviles) y sexual generando zigotos que se convierten en esporangios. Son hongos terrestres y acuáticos. Géneros representativos: *Allomyces*, *rhyzophydium*.
- *Zygomycota*: Los hongos de esta división se conocen como zigomicetos, están constituidos por hifas cenocíticas con muchos núcleos haploides. Presentan reproducción asexual, mediante esporas que se producen en esporangios localizados en los extremos de las hifas aéreas y que son dispersadas por el viento y sexual generando zigotos de pared dura y gruesa (zigosporas) que permanecen latentes en ambientes hostiles. Viven mayoritariamente sobre materia vegetal y animal en descomposición en el suelo. Cuyo interés industrial es que se usa para producir alimentos, tempeh, tofu; sustancias anestésicas, ablandadores de carne, colorante amarillo para margarinas, alcoholes industriales, etc. Géneros representativos: *rhizopus*, *mucor*, etc.
- *Glomerulomycota* (incluida en *zygomycota*): Es una división separada recientemente de *zygomycota*. Filogenéticamente más parecida a las *basidiomycota* y *ascomycota*. Carecen de reproducción sexual y son simbióticos obligados de plantas terrestres: son los hongos formadores de endomicorrizas. Tienen hifas no septadas y esporas grandes y multinucleadas. Las hifas del hongo penetran en las células corticales de las raíces originando estructuras arbusculares. Se nutren de carbohidratos

simples y vitaminas proporcionados por las raíces. Géneros representativos, *glomus*, *arqueospora*.

- *Ascomycota*: Es un grupo amplio y variado al que pertenecen especies unicelulares como las levaduras y otras de crecimiento filamentosos; reciben ese nombre por su estructura reproductora característica en forma de saco llamada asca (del griego askos: saco), están constituidos por hifas tabicadas, presentan reproducción asexual, mediante conidiosporas que se disponen en cadena en el extremo del conidióforo; la reproducción sexual conlleva siempre la formación de un asca por la fusión de dos núcleos haploides. Viven en hábitats terrestres y acuáticos, mayoritariamente sobre materia vegetal en descomposición. Los hongos filamentosos que encontramos en este phylum son: *penicillium*, *aspergillus*, *alternaria*, *phoma*, *fusarium*, entre las levaduras encontramos a *saccharomyces cerevisiae*, *schyzosaccharomyces*, *candida* etc.
- *Basidiomycota*: Grupo muy numeroso que incluye más de 30000 especies, entre ellas las setas, alguna levadura y patógenos para el hombre. Tienen en común el basidio, estructura unicelular en la que se forman basidiosporas por meiosis.

La mayoría son saprofitos que descomponen material vegetal, celulosa y lignina, géneros representativos son: *polyporus*, *agaricus*, *russula*, *lactarius*, *amanita*, etc.

Estructura celular

Las células fúngicas son eucariotas, poseen un núcleo y las estructuras propias de estas células, como son el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, las mitocondrias y un cito esqueleto, así como ribosomas, en un citoplasma limitado por una membrana celular, que posee esteroides, recubierta por una pared rígida.

La pared celular de los hongos está formada por capas o extractos constituidos por diversos polímeros polisacáridos fibrilares, como la quitina (polímero β -1,4 de N-

acetilglucosamina), la celulosa (polímero β -1,4 de glucosa) y por estructuras amorfas como otros glucanos (polímeros β -1,6 ramificados de glucosa) y mananos (polímeros α -1,6, ramificados de manosa). La pared de los hongos también contiene proteínas, asociadas a los polisacáridos y lípidos. Las estructuras amorfas, glucanos y mananos, contienen los principales antígenos de la pared. La pared es un exoesqueleto rígido que protege a la célula y condiciona la nutrición absorptiva ya que no permite la endocitosis.

Morfología

Los hongos forman un grupo de organismos heterogéneos desde el punto de vista morfológico. Unos son unicelulares y están constituidos por células aisladas, ovales, de 3-10 μm de diámetro denominadas levaduras. Otros son pluricelulares y están constituidos por células alargadas, cilíndricas, de 3 a 12 μm de diámetro, dispuestas linealmente formando unas estructuras filamentosas denominadas hifas, que pueden alcanzar varios centímetros de longitud. Las hifas crecen por elongación de su extremo distal, y de las porciones viejas emergen ramificaciones laterales.

La estructura fúngica consta de un complejo llamado talo o micelio (Figura 8) que, a su vez, está constituido por múltiples filamentos o hifas (hifomicetos o mohos), por estructuras unicelulares o levaduras (blastomicetos); éstas se reproducen por gemación (*Saccharomyces cerevisiae*) y casi nunca por fisión binaria (*Schizosaccharomyces pombe*); también son una excepción los *Chytridiomycetes* (*chytridiomicetos*), formados por células redondas grandes con rizoides, y los mohos mucilaginosos, que carecen de pared celular y pueden alimentarse por fagocitosis, estos hongos se adaptan a medios acuáticos

Morfología de hongos

La estructura vegetativa de los hongos se llama talo y puede ser más o menos complejo: desde levaduras hasta setas. Una levadura es un hongo unicelular microscópico. Un moho u hongo filamentosos es un hongo constituido por filamentos largos llamados hifas que en conjunto constituyen un micelio.

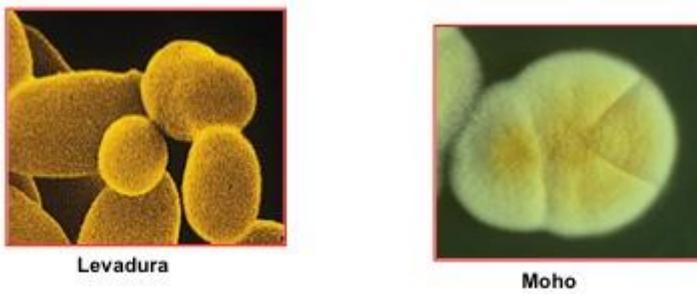


Figura 8. Estructura microscópica (levadura) y macroscópica (moho).

Los mohos se denominan también hongos filamentosos por estar formados por estar formados por hifas que son filamentos que crecen por los extremos que pueden ser cenocíticas o septadas.



Figura 9. Estructura de hifas cenocíticas y tabicadas de hongos filamentosos.

Hay hifas aéreas que constituyen el micelio aéreo y subterráneo, que originan el micelio subterráneo que es el encargado de la nutrición. Las hifas del micelio aéreo forman las esporas. Las esporas de los hongos suelen ser pigmentadas y dan colores diversos a los micelios, negros, marrones, amarillos o verdosos.

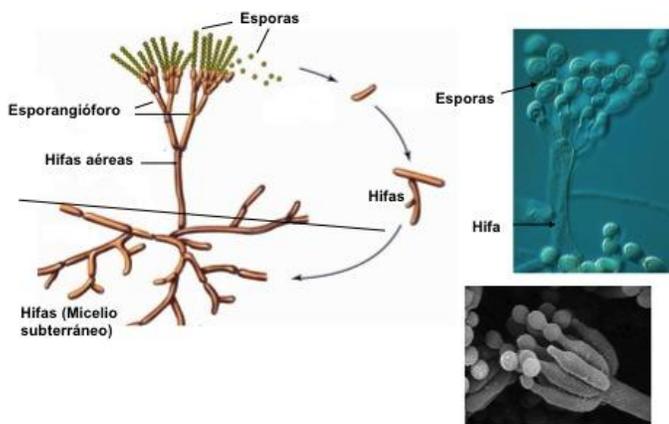


Figura 10. Estructuras microscópicas de un hongo filamentosos.

Hernández Hernández L.

Los hongos filamentosos se dividen en inferiores y superiores, por las características. Los hongos inferiores poseen hifas anchas (5-10 μm), sin o con escasas tabicaciones por lo que contienen muchos núcleos para una misma unidad citoplásmica.

Los superiores están formados por hifas finas (0.5-5 μm), compartimentadas por septos transversales, que constituyen la separación entre las células, sin embargo, se ha observado que estas septos intracelulares poseen poros, por lo que las células tienen también una estructura cenocítica, ya que poseen los citoplasmas comunicados.

En la vida libre o en cultivos, el micelio se diferencia en dos partes, la que penetra en los sustratos nutritivos, denominada micelio vegetativo, y la que se dispone en superficie y contiene las estructuras reproductoras, que constituye el micelio aéreo o reproductor.

Talo

Está constituido por dos partes: 1) talo vegetativo que asegura el desarrollo, la nutrición, la fijación y la edificación de la parte reproductora, y 2) talo reproductor, donde se forman los órganos de reproducción. Puede estar representado por hifas, levaduras o pseudohifas (blastosporas que no se separan) (Figura 11). Si el talo está disociado, se producen colonias de levaduras de crecimiento rápido, consistencia cremosa y que se resiembran como las bacterias en puntos o estrías. Si el talo es filamentosos, da lugar a colonias de mohos de crecimiento centrífugo con filamentos aéreos entremezclados, más o menos largos, o agrupados de manera compacta, con superficie recubierta de vello fino; el crecimiento es lento salvo en los hongos oportunistas.

Los hongos que tienen una fase parasitaria levaduriforme y una saprofitica micelial, y que en respuesta a cambios ambientales pasan de esta última fase a 20 a 25 °C a la fase de levadura a 37 °C, o viceversa, se llaman dimorfos. Algunos hongos producen levaduras y filamentos, y ambas formas pueden existir juntas y no necesariamente determinadas por la temperatura. Estos hongos pueden considerarse polimorfos

(*Candida*). Se conocen como hongos bifásicos aquellos con una fase filamentosa y otra no necesariamente levaduriforme, como la esférula (*Coccidioides* spp.).

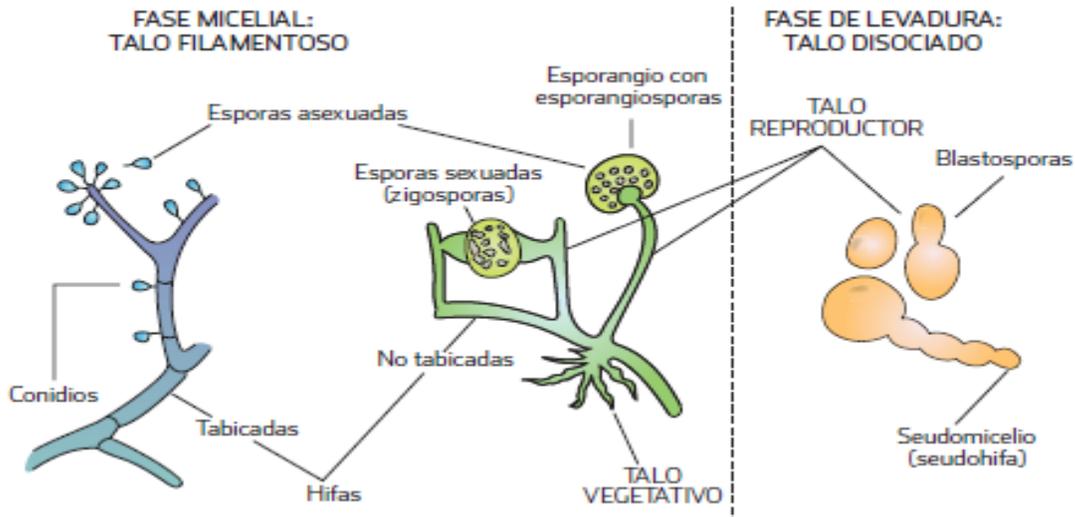


Figura 11. Fase micelial y de levadura; con talo reproductor y vegetativo

Reproducción

La reproducción se realiza por medio de esporas y puede ser sexual (teleomorfa) o asexual (anamorfa). Los hongos que presentan ambas formas se llaman holomorfos. Para conservar su capacidad de adaptación, los hongos deben reproducirse fácilmente. Las hifas se desarrollan a partir de una espora por emisión de un tubo germinativo; la forma más simple ocurre por crecimiento apical de las hifas; no hay crecimiento intercalar, pero las células no terminales pueden emitir ramificaciones (Figura 12).

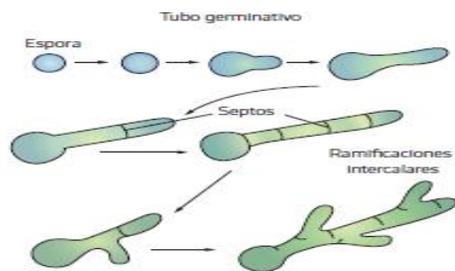


Figura 12. Esquema del crecimiento apical del tubo germinativo.

Los hongos presentan diversas modalidades de reproducción asexual y sexual.

La reproducción asexuada (anamorfa) o imperfecta (hongos mitospóricos), se da a partir de un micelio aéreo o reproductor, sin fusión de los núcleos. Las esporas o elementos celulares que sirven para la dispersión se denominan propágulos; formación de esporas (artrosporas, clamidosporas, esporangiosporas, conidiosporas y blastosporas)



Figura 13. Tipo de esporas asexuales.

Las levaduras se reproducen asexualmente por gemación. Se produce una protrusión citoplasmática que aumenta progresivamente de tamaño, el núcleo celular se divide por mitosis y se reparte el contenido citoplásmico y el genoma en cada una de las dos células que se están formando, que posteriormente se separan.

En los hongos filamentosos la reproducción asexuada tiene lugar mediante la formación de esporas en hifas especializadas.

Según la morfología y mecanismo de generación, las esporas asexuadas pueden clasificarse en internas y externas. Las internas se denominan esporangiosporas y se forman en el interior de una estructura sacular denominada esporangio, situada en el extremo de una hifa especializada, denominado esporangioforo. Cuando el

Hernández Hernández L.

esporangio se abre se dispersan las esporas. Las esporas externas se llaman conidios y surgen directamente del extremo de una hifa especializada llamada conidióforo.

Existe un tipo especial de esporas, que constituyen formas de reproducción, pero también de resistencia, que se denominan clamidosporas y son capaces de soportar largos periodos de quiescencia en condiciones adversas. Se reproducen tanto en los hongos filamentosos como en las levaduras, poseen una pared muy gruesa y resistente y generalmente son pigmentadas (**Figura No 14**).

La reproducción **sexuada** (teleomorfa) o perfecta se produce por la unión de núcleos compatibles mediante fusión de gametos haploides, gametangios o hifas (según especie). Estas fusiones producen zigotos diploides que mediante meiosis generan esporas.



Figura 14. Reproducción sexuada de hongos filamentosos

Los hongos producen millones de esporas, cada una con la capacidad para desarrollar una nueva colonia.

Las esporas sexuales se producen tras la fusión de los núcleos de dos hifas sexualmente compatibles o de dos levaduras y posterior meiosis. La morfología de las esporas sexuales es muy variada y tiene gran interés para la identificación fúngica, ya que presentan diferencias características. (Romero, 2006).

La reproducción sexuada de los hongos consta, en síntesis, de una primera fase de fusión citoplasmática (plasmogamia) de dos células levaduriformes, o en los hongos filamentosos, de dos células distales localizadas en hifas de distinta diferenciación

sexual, seguida de una segunda fase de fusión de los núcleos (cariogamia), recombinación y posterior meiosis. El resultado final es la producción de células que constituyen las esporas sexuales haploides en órganos de reproducción diferenciados. Según la estructura y morfología de los órganos de reproducción sexual, formados tras la fusión de las células gameto, se diferencian tres formas de reproducción: 1) mediante zigosporas, 2) formando ascosporas en el interior de un asca, y 3) formando basidiosporas que se sitúan libres, externamente, en una estructura denominada basidio (Figura 15)

1. Hongos inferiores

Zygomycetes

Organización micelial sin tabiques o septos
Esporas asexuadas dentro de esporangios
La reproducción sexual da lugar a zigosporas

2. Hongos superiores

Ascomycetes

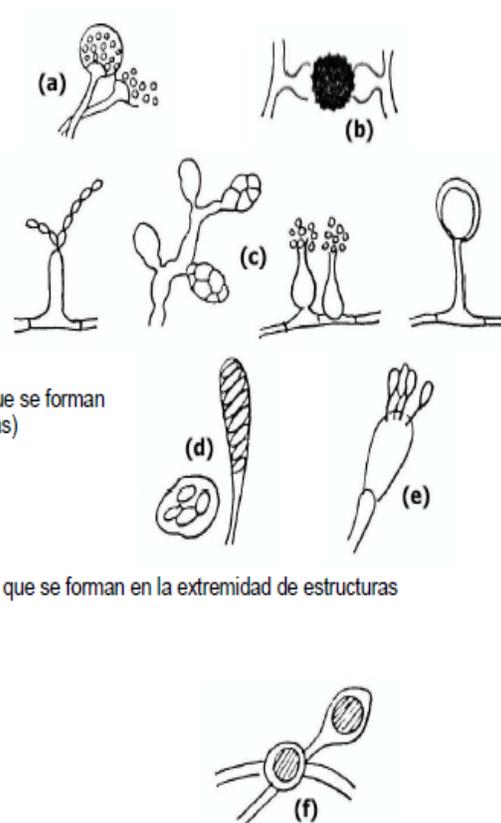
Poseen micelio septado o son levaduras
Esporas asexuadas externas o conidios
La reproducción sexual da lugar a ascosporas, que se forman en el interior de unas estructuras sacciformes (ascas)

Basidiomycetes

Poseen micelio septado complejo o son levaduras
Esporas asexuadas externas o conidios
La reproducción sexual da lugar a basidiosporas, que se forman en la extremidad de estructuras especializadas llamadas basidios

Deuteromycetes

Poseen micelio septado o son levaduras
Esporas asexuadas externas o conidios
Reproducción sexual desconocida



(a) Esporangiosporas, (b) Zigosporas, (c) Diferentes tipos de conidios, (d) Ascas con ascasporas, (e) Basidiosporas, (f) Clamidiosporas

Figura 15. Principales características de los hongos verdaderos o Eumycetes

Reproducción sexual, consta de una serie de fenómenos como: producción de órganos sexuales y gametos; fusión de protoplasma de éstos (plasmogamia) y

fusión nuclear (cariogamia); meiosis en hongos haploides; aparición de factores genéticos, así como desarrollo de cuerpos fructíferos y esporas sexuales.

En ocasiones, la plasmogamia se acompaña de formación de hifas protectoras alrededor del huevo y evoluciona de manera diferente según se trate de hongos inferiores o superiores. En los superiores (ascomicetos o basidiomicetos), la fusión nuclear da lugar a células binucleadas o dicariones, y en los inferiores (zigomicetos) se observan heterocariones, es decir, núcleos distintos desde el punto de vista genético.

El apareamiento puede ser del talo proveniente de una sola espora y se llama homotálico; si los gametos son iguales, la reproducción es isogámica, el elemento de la fusión se denomina cigoto, y la espora, zigospora (Figura 16); ésta es la reproducción sexual en zigomicotina.

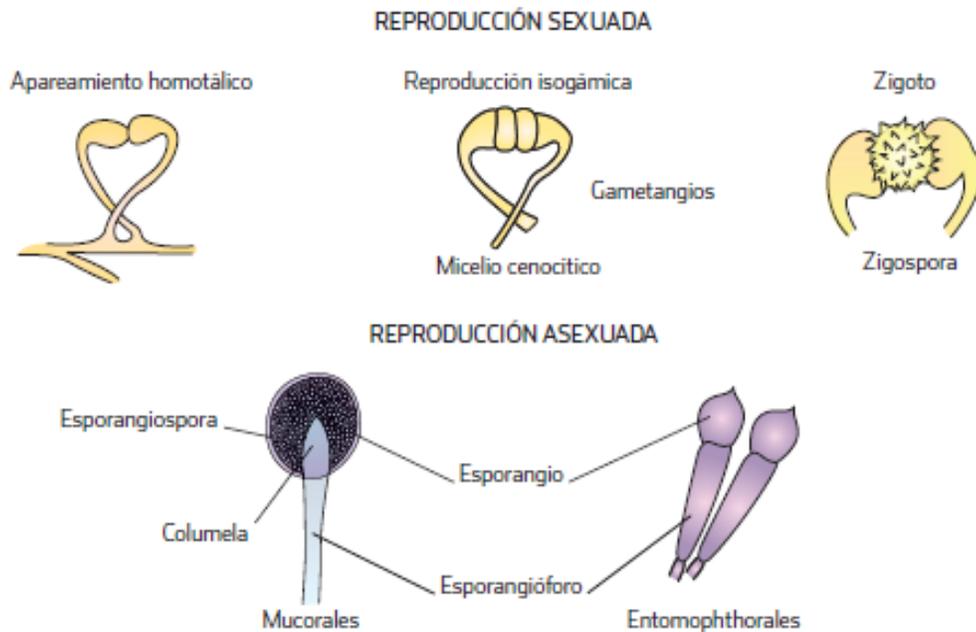


Figura 16. Esquema de la reproducción sexual y asexual en zigomicotina.

Metabolismo

Los hongos obtienen los nutrientes por absorción y tienen un metabolismo químico heterótrofo, ya que obtienen la energía y el carbono de compuestos orgánicos sintetizados por otros organismos.

Nutrientes del medios y efecto crecimiento

Los hongos filamentosos viven en muy diferentes hábitats terrestres, en los suelos, las plantas y los insectos (Burgstaller, 1990). Los hongos toleran y pueden desarrollarse en concentraciones de acidez relativamente elevadas. Soportan escalas de pH entre 2 a 9.0 pero el pH óptimo para casi todas las especies es de 6 en su mayoría.

Si bien, necesitan humedad para su desarrollo y pueden obtener agua de la atmósfera y del medio los hongos pueden sobrevivir en ambientes deshidratados.

Casi todos los hongos son aeróbicos, su crecimiento se incrementa con la presencia de abundante oxígeno. Se desarrollan en condiciones de temperatura muy variada pero, entre 22 y 30°C es la óptima para la mayor parte de las especies (Pelczar et al, 1990).

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

Requisito de un microorganismo industrial

Un microorganismo de uso industrial debe producir la sustancia de interés, estar disponible en cultivo puro; (axénico), ser genéticamente estable, crecer en cultivos a gran escala, que el microorganismo industrial crezca rápidamente, produzca el producto deseado en un corto período de tiempo, crecer relativamente en un medio de cultivo económico y disponible en grandes cantidades; además, un

microorganismo industrial no debe ser patógeno para el hombre o para los animales o plantas. Otro requisito importante es la facilidad de separar las células microbianas del medio de cultivo; la centrifugación es dificultosa o cara a gran escala (Tortorq, Funke, Case, 2007).

Los microorganismos industriales más favorables para esto son aquellos de mayor tamaño celular (hongos filamentosos, levaduras y bacterias filamentosas) ya que estas células sedimentan más fácilmente que las bacterias unicelulares e incluso son más fáciles de filtrar. En gran parte, los microorganismos industriales son especialistas metabólicos capaces de producir específicamente determinados metabolitos y con gran rendimiento. Con el fin de lograr esta elevada especialización, las cepas industriales están alteradas genéticamente, por mutación o por recombinación. Habitualmente se reprimen o se eliminan las vías metabólicas menores y frecuentemente existe en ellas un desequilibrio metabólico (Tortorq, Funke, Case, 2007).

Sistemas de producción de enzima fúngica

La fermentación en medio sólido es una tecnología que tuvo sus orígenes como un arte ancestral. Originalmente, estos procesos fueron aquellos en los que hongos filamentosos invadían ciertos materiales sólidos que luego eran consumidos por las personas, por ejemplo el Koji y el Tempeh que son alimentos tradicionales asiáticos, los quesos camembert y roquefort en Europa (Viniegra-González, 1995).

La FMS se define como la fermentación que involucra medio sólido, en ausencia (o casi ausencia) de agua libre, el crecimiento microbiano y la formación de productos ocurre en la superficie de sustratos o soportes sólidos. Este tipo de fermentación incluye a numerosos procesos microbianos naturales bien conocidos, por ejemplo, el crecimiento de microorganismos en el suelo, el composteo, la pudrición de la madera, el cultivo de hongos comestibles y la producción artesanal de alimentos orientales (Cannel y Moo-Young, 1980).

Sin embargo, debe poseer sustrato suficiente que soporte el desarrollo y metabolismo del microorganismo. Los aspectos de importancia que deben ser considerados, en general, para el desarrollo de bioprocesos en FMS, incluyen la selección del microorganismo y de un sustrato adecuado, la optimización de los parámetros del proceso, la separación y purificación del producto (Pandey, 2003).

La característica esencial de la fermentación sólida es el crecimiento del microorganismo sobre un sustrato insoluble sin una fase libre, el rango de humedad recomendada para la fermentación sólido va de 40 a 70 % y como límite inferior 12%, ya que por debajo de este valor cesa la actividad biológica. Bajo estas condiciones, los microorganismos que se ven favorecidos son los hongos, debido a su capacidad de crecer en medios con actividad de agua superior a 0.80 (Huerta, 2000).

Sustratos y condiciones de fermentación

La adecuada selección del sustrato es un punto clave para la FMS, debido a que en este tipo de fermentación el sustrato es insoluble y actúa como un soporte físico y fuente de nutrientes. Para la selección del sustrato se deben tener en cuenta dos consideraciones de gran importancia; una es que el sustrato sea específico para el microorganismo, evitando seleccionar alguno que no pueda ser utilizado por éste. La segunda está relacionada con la producción, usando preferentemente sustratos adecuados para productos específicos.

Otros aspectos relevantes son la selección de los parámetros del proceso y su optimización. Esto incluye parámetros fisicoquímicos y bioquímicos tales como tamaño de partícula, textura inicial, temperatura de incubación, agitación y aeración, edad y peso del inóculo, suplementación de nutrientes como N, P, elementos traza, fuentes de carbono adicional e inductores, extracción del producto y su purificación (Pandey, 2003).

Una de las características de importancia de la FMS es que se minimiza la represión catabólica, además de que se estimula la producción de moléculas reguladoras que favorecen altas producciones de enzima (Aguilar y col., 2004).

Durante la FMS se genera gran cantidad de calor, que es directamente proporcional con las actividades metabólicas del microorganismo. La temperatura puede llegar a estar 20°C por arriba de la temperatura de incubación requerida.

La FMS para la producción de tanasa implica, generalmente un sustrato sólido con alto contenido de taninos, el cual es humedecido con una solución de sales y es inoculado con el microorganismo. Pero en años recientes, es cada vez más común la utilización de soportes inertes (como la esponja de poliuretano) impregnados con medios nutritivos. La utilización de soportes inertes y medios definidos facilita la medición de la producción y del sustrato consumido.

Entre los soportes naturales que se han utilizado para la producción de tanasa están: bagazo de caña, salvado de trigo, polvo de semilla de tamarindo, hojas de gobernadora (*Larrea tridentata*), corteza de castaño, taninos de tara (*Caesalpinia spinosa*), agallas de roble (*Quercus infectoria*), hojas de zumaque (*Rhus coriaria*), frutos de mirabolano (*Terminalia chebula*), hojas de sorgo (*Sorghum vulgare*), hojas de grosella de la india (*Phyllanthus emblica*), entre otros (Aguilar y col., 2007).

Tabla 5. Comparación de los sistemas de FMS y FML (Mitchell y col., 2000)

FMS	FML
Algunos productos se producen sólo por estas condiciones.	Varios productos se pueden producir por un amplio rango de microorganismos
El medio es relativamente simple y refinado. Puede contener nutrientes necesarios para el desarrollo, únicamente requiere solución mineral. Sin embargo el sustrato puede ser variable.	El medio contiene más ingredientes y esto puede elevar el costo de producción. Algunos ingredientes pueden perder solubilidad por acción de los demás componentes.
La baja disponibilidad de agua evita el desarrollo de contaminantes	La actividad de agua es muy alta y muchos microorganismos pueden desarrollarse.
Mediante la utilización de reactores pequeños se pueden tener grandes producciones.	Se ocupan grandes volúmenes y se obtienen bajas producciones
Altas concentraciones de sustrato permiten altas concentraciones de producto.	Altas concentraciones de sustrato pueden causar problemas reológicos. Puede ser requerida la alimentación de sustratos al sistema.
La aireación en el sistema se facilita teniendo así la cantidad de oxígeno requerida disponible.	Pueden requerirse presiones altas. La transferencia de gas es usualmente limitada en la fase líquida.
El mezclado de partículas es imposible y el desarrollo puede estar limitado por difusión de nutrientes.	Se pueden utilizar mezclas de partículas y la difusión de nutrientes usualmente no es limitada.
La remoción de calor metabólico es restringida, provocando problemas de sobrecalentamiento.	Con la adición de agua se puede controlar la Temperatura
Del proceso pueden obtenerse desde productos simples hasta más concentrados.	El proceso requiere remoción de grandes volúmenes de agua y es caro. La purificación de productos puede ser fácil.
La cantidad de líquido residual es mínima.	Se producen grandes volúmenes de líquido residual.

Existen otros factores que son muy relevantes en la fermentación en medio sólido, tales como los sustratos que se emplean, el oxígeno, la humedad del medio y la actividad de agua.

Substratos: Regularmente los materiales/matrices usados para FMS tienen baja conductividad térmica, por lo que la eliminación del calor del proceso puede ser muy lenta. La temperatura del substrato es crítica en FMS, pudiendo afectar el desarrollo de microorganismos, la formación de esporas y germinación y la formación de producto.

Oxígeno: En fases tempranas de la FMS la temperatura y concentración de oxígeno permanecen constantes, pero cuando progresa la fermentación el oxígeno se transfiere y el resultado es la generación de calor debido al metabolismo del microorganismo.

Humedad del medio: Humedades elevadas pueden resultar en una disminución de la porosidad del substrato, lo que puede afectar a la penetración del oxígeno. Una baja humedad puede favorecer la accesibilidad de los nutrientes por los poros, resultando en un mayor desarrollo microbiano (Pandey, 2003).

Actividad de agua: La relación de agua en FMS debe estar críticamente evaluada, debido a que ésta determina la actividad microbiana. En general, un tipo de microorganismo puede desarrollarse en sistema de FMS con una determinada aW.

La importancia de la aW se le atribuye a los parámetros de transferencia de masa del agua y solutos sobre las células microbianas. El control de este parámetro puede usarse para modificar la producción de metabolitos o la excreción por los microorganismos (Pandey, 2003).

La variación en estos factores puede tener consecuencias en cuanto a la producción del metabolito requerido. La fermentación en medio sólido es un proceso que ha sido ampliamente utilizado para la producción de enzimas. Para dicho propósito se han utilizado una gran variedad de sustratos y cepas, tal y como se puede observar en la tabla 2.8.1 (Pandey, 2003).

Equipo de fermentación

Los avances en el diseño de equipos que permitan el desarrollo de una fermentación en medio sólido han sido pocos y variados en cuanto a sus características, debido
Hernández Hernández L.

limitación y predicción de parámetros trascendentales como el oxígeno y la temperatura.

Siendo de gran relevancia el combinar el desarrollo del biorreactores nobles para FMS con los estudios llevados a cabo para un mayor entendimiento de los fenómenos de transporte que afectan el diseño de los sistemas fermentativos. Por lo tanto, se han desarrollado modelos de sistemas en medio sólido, buscando cuantificar las variables que permitan optimizar al bioproceso sin embargo, aún no han sido aplicados para la construcción de biorreactores a escala industrial (Mitchell et al., 2003).

Los biorreactores son recipientes de reacción, en los que se crean técnicamente las condiciones óptimas para el cultivo y multiplicación de microorganismos, para la formación de productos óptimos; siendo un equipo que permite llevar a cabo un proceso de fermentación, donde se realiza el proceso de cultivo (también comúnmente denominado “fermentador”), sea en estado sólido o líquido. Su diseño debe ser tal que asegure homogeneidad entre los componentes del sistema y condiciones óptimas para el crecimiento microbiano y la obtención del producto deseado. Es importante tomar en cuenta los problemas de transferencia de calor y oxígeno sobre la cama de sustrato, los cuales dependen de las características de la matriz que se esté utilizando para la fermentación, siendo éste, uno los principales factores que afectan el diseño y las estrategias de control.

Los criterios más importantes para el diseño de un biorreactor pueden resumirse del siguiente modo dependiendo del tipo de biorreactor y la fermentación a utilizar (Mitchell et al., 1992):

- El tanque debe diseñarse para que funcione asépticamente durante numerosos días, para evitar la aparición de contaminantes en las operaciones de bioprocesos de larga duración.
- Debe permitir una mayor área de contacto entre las fases biótica y abiótica del sistema, es decir, se debe proporcionar un sistema adecuado de aireación y agitación para cubrir las necesidades metabólicas de los microorganismos.

- El consumo de energía debe de ser el mínimo posible.
- Entradas para la adición de nutrientes y el control de pH.
- El crecimiento microbiano es generalmente exotérmico, por lo que, el biorreactor debe facilitar la transferencia de calor, del medio hacia las células y viceversa, a medida que se produce el crecimiento celular, además de mantener estable la temperatura deseada.
- Mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo.
- Suministrar oxígeno a una velocidad tal que satisfaga el consumo.
- El diseño debe ser tal que permita mantener el cultivo puro; una vez que todo el sistema ha sido esterilizado y posteriormente inoculado con el microorganismo deseado.

Algunos de los biorreactores utilizados a escala laboratorio son cajas petri y matraces Erlenmeyer. Estos son utilizados por su simplicidad, los cuales no operan con aeración ni agitación forzada, en ellos solamente es controlada la temperatura del cuarto de incubación.

Dentro de los procesos de fermentación en medio sólido existen actualmente dos categorías: a escala laboratorio en las cuales se utilizan pequeñas cantidades de medio sólido hasta pocos kilogramos, y el otro que es a escala piloto y escala industrial en donde se utilizan desde kilogramos hasta toneladas (Tabla 1). En la primera categoría existen muchos diseños de biorreactores, los cuales llegan a ser muy sofisticados, mientras que en la segunda categoría es poca la variedad de biorreactores utilizados, solo algunos de los biorreactores a nivel industrial pueden operar en condiciones estériles.

Biorreactor en Columna

Uno de los más interesantes sistemas para fermentación en medio sólido a nivel laboratorio fue el desarrollado y patentado por el grupo del Instituto para la Investigación y Desarrollo (IRD) en Francia (antes ORSTOM), entre 1975 y 1980,

compuesto por pequeñas columnas de cuatro centímetros de diámetro y veinte centímetros de altura, el cual es llenado con un medio previamente inoculado y puesto en un termorregulador de agua (Figura 17). El equipo está conectado a una columna de cromatografía de gases para monitorear la producción de CO₂, resultado de la respiración del microorganismo y de sus reacciones metabólicas. La demanda de oxígeno se cubre por medio de aeración forzada utilizando compresores con sistemas de regulación de presión para evitar la compactación excesiva del lecho.

La geometría y diseño de las columnas permite que sea un equipo barato, debido a que son elaboradas a base de vidrio, por lo que la remoción del calor exotérmico de la fermentación se lleva a cabo de manera eficiente. Requiere de poca cantidad de medio de cultivo y la fácil adaptación del equipo a sistemas más rudimentarios en cuanto a equipamiento y cuantificación de productos, le confiere practicidad de uso. Sin embargo, para llevar a cabo las lecturas de los parámetros cinéticos durante la fermentación es necesario sacrificar una columna completa, ya que el diseño de la misma no permite tomar muestras (Durand et al., 1993; Lliuta et al., 2005). Este equipo es conveniente en las primeras etapas del desarrollo de un bioproceso ya que es adecuado para estudios de caracterización y optimización de la composición del medio de cultivo, y para cuantificar los datos necesarios para llevar a cabo el cálculo de parámetros cinéticos.

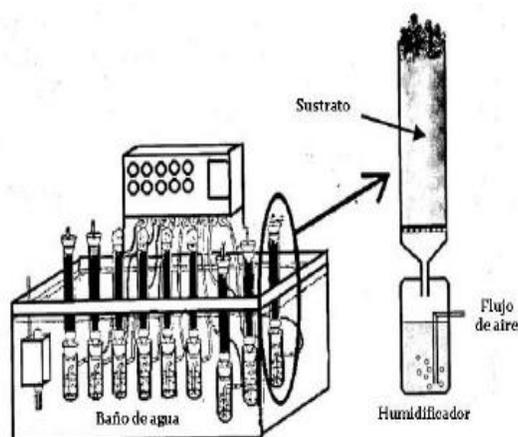


Figura 17. Biorreactor en columna.

Los biorreactores más utilizados a nivel laboratorio aún más a nivel industrial están provistos de mecanismos de agitación, dispersión y aireación así como de sistemas para el control de la temperatura, pH. Los biorreactores deben ser optimizados para obtener la máxima concentración de productos de la fermentación, como lo son la biomasa microbiana y/o metabolitos en un tiempo mínimo y a menor costo de producción.

Biología molecular

En la industria de los alimentos cada vez se incrementa la demanda de más compuestos enzimáticos para sus procesos, producción y de beneficio de los alimentos; causa que es de gran importancia la identificación de hongos filamentosos capaces de producir enzimas que sean completamente seguros para la aplicación en la industria alimentaria (Warnock DW, 2006).

La identificación basada en la morfología presenta en ocasiones un importante grado de dificultad, sobre todo para distinguir especies cercanas, en las que las características fenotípicas son muy similares.

Por otra parte la fiabilidad de la identificación basada en características morfológicas depende de la experiencia del observador y tiene un componente subjetivo. Además, en los casos en que se puede llegar a la identificación de especie, los procedimientos microbiológicos tradicionales llegan a requerir (especialmente en el caso de los hongos filamentosos) días o semanas.

Estas circunstancias la necesidad de desarrollar métodos alternativos, que ofrezcan mayor rapidez en la obtención de resultados y un mayor rango de microorganismos identificables de forma fiable. Las técnicas moleculares son una técnica de las opciones que mejor podrían cumplir estos requisitos, basado en la secuenciación de regiones que permiten una discriminación filogenética, para la identificación de hongos (Warnock DW, 2006).

Actualmente, la genómica contribuye a la biosíntesis de enzimas recombinantes de gran pureza que aportan mayor calidad de producto final y optimizan los procesos de producción de alimentos, de tal forma que se hace necesario contar con nuevos recursos genéticos para solventar esta demanda. La secuenciación de genoma ha permitido la identificación de enzimas., desarrollo de nuevos productos, mejoramiento de cepas e incremento de la eficiencia de procesos (Warnock DW, 2006).

Materiales y métodos

El desarrollo experimental del presente trabajo, se realizó en 4 etapas.

- La primera etapa consistió en la propagación y conservación de hongos filamentosos que incluyó la caracterización macroscópica y microscópica.
- La segunda etapa, se basa en un bio-ensayo con medio ácido tánico para la selección de la o las cepas fúngicas que mayor degradación de ácido tánico presenten.
- La tercera etapa, se estableció el sistema de Fermentación Medio Sólido utilizando un soporte-sustrato de orégano y la evaluación actividad tanasa, fenoles hidrolizables, biomasa y azúcares totales.
- En la cuarta etapa se realizaron los ensayos necesarios para la posterior identificación de cepas fúngicas de mayor producción de enzima tanasa.

Toda la parte experimental se realizó en el Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”.

Etapas I: Propagación y conservación de hongos filamentosos purificados.

Preparar medios de cultivo

Se preparó 39 g de medio PDA en matraces de 1000 ml en agua destilada, se esterilizó en un autoclave () a 15 libras de presión, a 121°C por 15 minutos. Se dejó enfriar un poco el medio y se procedió al llenado de cajas Petri, colocando aproximadamente 25 ml de medio en cada caja.

Siembra en cajas Petri con PDA

La propagación de las cepas fúngicas se realizó en una campana de flujo laminar (Scorpion Scientific-A8000) con un mechero, empleando las cajas Petri estériles con PDA (papa agar dextrosa) se trabajó bajo condiciones de asepsia para evitar una posible contaminación, realizada la siembra las cajas Petri se almacenaron en una incubadora orbital (INO 650V-7) por 120 horas a 32 °C.

Caracterización morfológica

Para la caracterización morfológica se hizo uso de un microscopio (Labomed-CXL) y un microscopio digital para facilitar su enfoque e identificación del hongo filamentoso. Se prepararon los portaobjetos, y se colocó una gota de azul de algodón en un punto céntrico del portaobjetos, con un asa estéril se tomó muestra fúngica y se puso sobre el azul de algodón dispersándola; en seguida se coló el cubre objetos y se procedió a la observación microscópica.

Conservación de hongos filamentosos

La conservación de las cepas fue efectuada con el hongo que presentaba esporulación completa y que se incubo a 32 °C en matraces de 250 ml que contenían PDA estéril.

Para la preservación de las cepas se utilizó glicerol-leche descremada, que permite congelar las células ocasionando el mínimo daño posible por la cristalización del agua, ya que la formación de cristales angulares causa ruptura celular. El glicerol y la leche descremada forman un entramado con los cristales de agua que protegen a las células sin alterar su estructura. Este método logra preservar microorganismos hasta por 6 meses.

Procedimiento: Se preparó una solución en el matraz con 10 %(v/v) glicerol y 5 %(p/v) leche descremada en polvo (Svelty®) y se homogeniza toda la solución. Se esteriliza a 125 psi por 10 min. Se deja enfriar y posteriormente se añaden 10 mL de la mezcla leche-glicerina al medio que contiene el microorganismo, se distribuye la mezcla con ayuda de un asa metálica, para barrer esporas y micelio, enseguida se tomó 0.5 mL de la solución con esporas y se colocan en tubos eppendorf estériles de 0.6 mL de capacidad. Se identificaron y se llevaron a congelación a -20 °C. Este método de almacenamiento permite células viables en congelación por hasta 6 meses. El proceso de congelación-descongelación puede ocasionar lisis celular, por lo que no se recomienda descongelar por más de 2 ocasiones.

Etapa II: Selección de hongos filamentosos para la producción de enzima tanasa.

Este bioensayo se basó en la selección de 3 cepas fúngicas que presentaran mayor degradación del ácido tánico, se procedió a un monitoreo y medición de halo cada 24 horas por 120 horas de incubación a 32°C en un medio ácido tánico (Tabla No 6):

Tabla 6. Medio de cultivo: Ácido tánico-agar bacteriológico

Reactivo	g/Lt
Extracto de levadura	1
Agar bacteriológico	15
Ácido tánico	5
pH : 6-6.5	

Propagación del inóculo**Preparar medio de cultivo ácido tánico-agar bacteriológico**

Se diluyeron los reactivos respecto al orden que se presenta en la tabla No 6. En un matraz Erlenmeyer de 1000 ml en agua destilada y se ajustó al pH (6-6.5); por último se esterilizó a 15 libras de presión, a 121°C por 15 minutos en un autoclave (Evar-EV24).

Se dejó reposar el medio al punto que permita el llenado de cajas Petri estériles, colocando aproximadamente 25 ml de medio en cada caja.

Siembra en cajas Petri con medio ácido tánico

Para la inoculación de cada una de las cepas fúngicas, se realizó un pozo con una puntilla de 1ml en el centro de la caja Petri con medio solidificado. Se inoculó 10µl de muestra de cada cepa, se sellaron las cajas Petri con para film para evitar contaminación y se incubaron a 32°C en una incubadora Orbital (INO 65OV-7).

Se monitoreó crecimiento y halos de degradación a contra luz cada 24 horas por 5 días. Efectuando una comparación con una caja control donde no se colocó ningún

Hernández Hernández L.

microorganismo. Se trabajó y se mantuvo condiciones de asepsia para evitar una posible contaminación. Cada cepa se hizo por duplicado.

Etapa III: Sistema de producción de enzima fúngica.

Para la producción de enzima fúngica se necesita un la preparación de un medio sales Czapek-dox (Tabla No 7) y la preparación del soporte vegetal (orégano), sometido a un tratamiento de residuos establecidas por Mussatto, S.I., Aguilar, C.N., Rodríguez, L.R., Teixeira, J.A. 2009; con el fin de eliminar residuos como pesticidas, insecticidas u otros compuestos presentes de manera libre en la materia prima y dar una estandarización a los componentes vegetales presentes en el mismo, para evitar variaciones en el proceso y obtener un soporte inerte.

Tabla 7. Medio de cultivo mínimo en sales Czapek-Dox

Reactivo	Cantidad
NaNO ₃	7.65 g/L
KH ₂ PO ₄	3.04 g/
MgSO ₄	1.52 g/L
KCl	1.52 g/L

Se pesaron cada una de las sales y se adicionaron al matraz Erlenmeyer, se agregó agua destilada al matraz (1 litro), se adiciono la fuente de carbono requerida, en caso de ser necesario, y se agito durante 30 min.

Recuento de esporas: Se basa en el recuento directo del número de células en un volumen determinado, prefijado en la cámara de recuento, mediante su observación al microscopio. El método no permite distinguir entre células viables y no viables.

Procedimiento: Se agregaron 20 mL de Tween-80 al 0.1% y un agitador magnético estéril al medio con el microorganismo. Posteriormente se tomaron 0.1 mL de la suspensión de esporas y se diluyo en 20 mL de agua destilada. Con una pipeta se llenó la cámara con la suspensión y se cubrió con el cubre objeto. Se realizó la

observación microscópica utilizando el aumento 40x. Se contaron las conidias (esporas) presentes en los cuadrados elegidos (generalmente se cuentan en los cuadrados de la línea superior e inferior y en diagonal uniendo ambas líneas, formando una “ Z ”). También se contaron las conidias que están ubicadas tocando la primera de las tres líneas que se encuentran circundando el cuadrado, las que se encuentran en la parte superior y la derecha del cuadrado; en total se contaron 13 cuadrados, cinco en cada línea (cinco arriba y cinco abajo) y tres de la diagonal que cruza el centro uniendo las líneas (figura No18). Se obtiene el promedio (media aritmética).

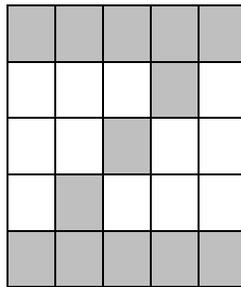


Figura 18. Recuento de esporas

Y se determinó el número de conidias por mL y el número total de conidias mediante la siguiente fórmula: Conidias / mL = promedio x 250,000 x factor de dilución (200).

Fermentación medio solido (FMS)

Procedimiento: se pesó el material vegetal orégano (soporte), se colocó en tubos falcón de 50 ml y se sometió a una esterilización a 121 °C por 15 minutos. Una vez esterilizadas se dejaron atemperar y posteriormente se le agregaron 10 ml de sales Czapek a cada tubo falcón, se procedió a la inoculación de 1×10^7 de microorganismos a cada uno de los tubos falcon y se homogenizo la muestra. Posteriormente pasar el contenido de cada tubo falcón a las columnas; cada columna representa las horas a evaluar que son tiempo 0 hrs, 24 hrs, 48 hrs, 72 hrs,

96 hrs y 120 hrs por lo que se obtendrán 6 extractos durante el proceso de fermentación.

Extracción de tanasa de fermentación en solido con material vegetal: Se basa en la extracción de proteínas empleando un surfactante y un solvente iónico. El surfactante (en este caso el tween-80) sirve para incrementar la permeabilidad de la célula facilitando la extracción de varias moléculas a través de la membrana celular (Silva y col., 2005). Mientras que el solvente iónico (en este caso NaCl) logra liberar la enzima unida a la superficie micelar mediante enlaces iónicos (Fadel, 2001)

Surfactante: Solución NaCl 0.9 % y Tween 80 0.1 %

Procedimiento: se homogenizo el fermentado sólido con 60 mL de solvente de extracción por cada 4.5 g de material, en seguida se agito a 133 rpm en un Shaker (Labnet-Orbit 1900) por 5 min, para Filtrar se empleó un embudo Bushner, en ella se colocó papel Whatman no 1 y se acomodó en un Matraz kitasato, posteriormente se conectó con la bomba de vacío (Millipore) para facilitar la extracción, finalmente se almaceno el extracto obtenido en tubos cónicos 50 ml.

Determinación de actividad tanasa por el método de rodanina metanólica

El método consiste en la medición del ácido gálico liberado durante la reacción enzimática, utilizando como sustrato para la tanasa un éster del ácido gálico (metil-galato). La medición del ácido gálico se basa en la formación de un cromóforo entre dicho ácido y la 2-tio-4- cetotiazolidina, también conocida como rodanina (Figura No 19).

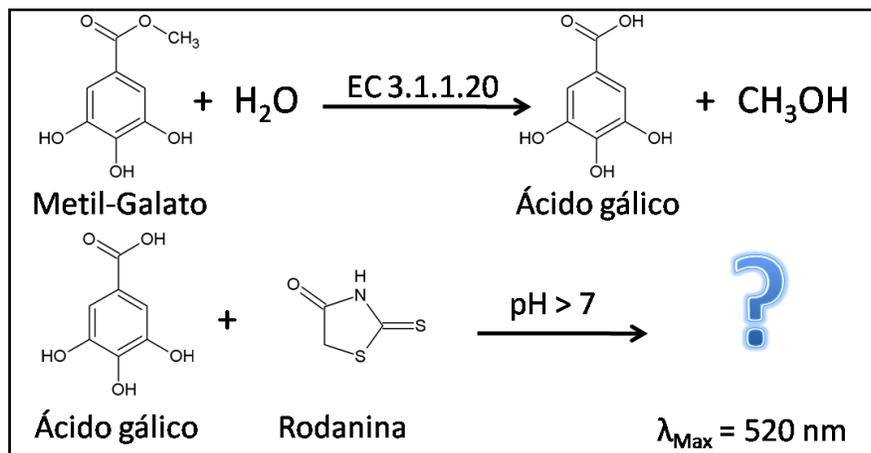


Figura 19. Reacción catalizada por la tanasa y posterior reacción del ácido gálico con la rodanina.

Para la cuantificación de la actividad tanasa se requieren 5 soluciones: Buffer de citratos 50 mM a pH 5.0, Metil-galato 0.01M en buffer de citratos (50 mM pH 5.0), Rodanina 0.667 % p/v en metanol, KOH 0.5 N, Ácido gálico 100 ppm en buffer de citratos (50 mM pH 5.0), *El metil-galato, el ácido gálico y la rodanina deben protegerse de la luz.

Ensayo: Las soluciones se pre-incubaron a 30 ° C durante 5 - 10 minutos. Se etiquetaron tres tubos de ensaye como blanco, muestra y control, se colocaron 0.25 mL de metil-galato 0.01 M en buffer de citratos 50 mM a pH 5.0. Al tubo blanco se le añadieron 0.25 mL de buffer de citratos y al tubo muestra se le agregaron 0.25 mL del extracto enzimático, los tres tubos se incubaron 5 minutos a 30 °C. Después de la incubación, se adicionaron 0.3 mL de rodanina metanólica (0.667 % p/v), se incubó a 30 °C por 5 min, se agregaron 0.2 mL de hidróxido de potasio (0.5 N) y se incubó otros 5 min. Se agrega el extracto enzimático al tubo control. Después se

Hernández Hernández L.

agregaron 4 mL de agua destilada, se agitó el contenido de los tubos y se incubaron durante 10 minutos a 30 °C. Se leyó la absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro. En la figura 2 se muestra un esquema de esta técnica.

Para cuantificar el ácido gálico liberado se restó la absorbancia del tubo muestra a la absorbancia del tubo control (ecuación 1) y se calculó la concentración a partir de una curva estándar de 0 a 100 ppm de A.G. en buffer de citratos.

$$\text{Ác. Gálico liberado} = (Abs_{Muestra} - Abs_{Blanco}) - (Abs_{Control} - Abs_{Blanco})$$

La unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de ácido gálico por min. Y se calculó con la ecuación 2:

$$\frac{UI}{mL_{EE}} = \left[\frac{mgAG.}{mL} \right] \cdot \left[\frac{5mL}{0.25mL_{EE}} \right] \cdot \left[\frac{1gAG.}{1000mgAG.} \right] \cdot \left[\frac{1molAG.}{170.12gAG.} \right] \cdot \left[\frac{1 \times 10^6 \mu molAG.}{1molAG.} \right] \cdot \left[\frac{1}{5 \text{ min}} \right]$$

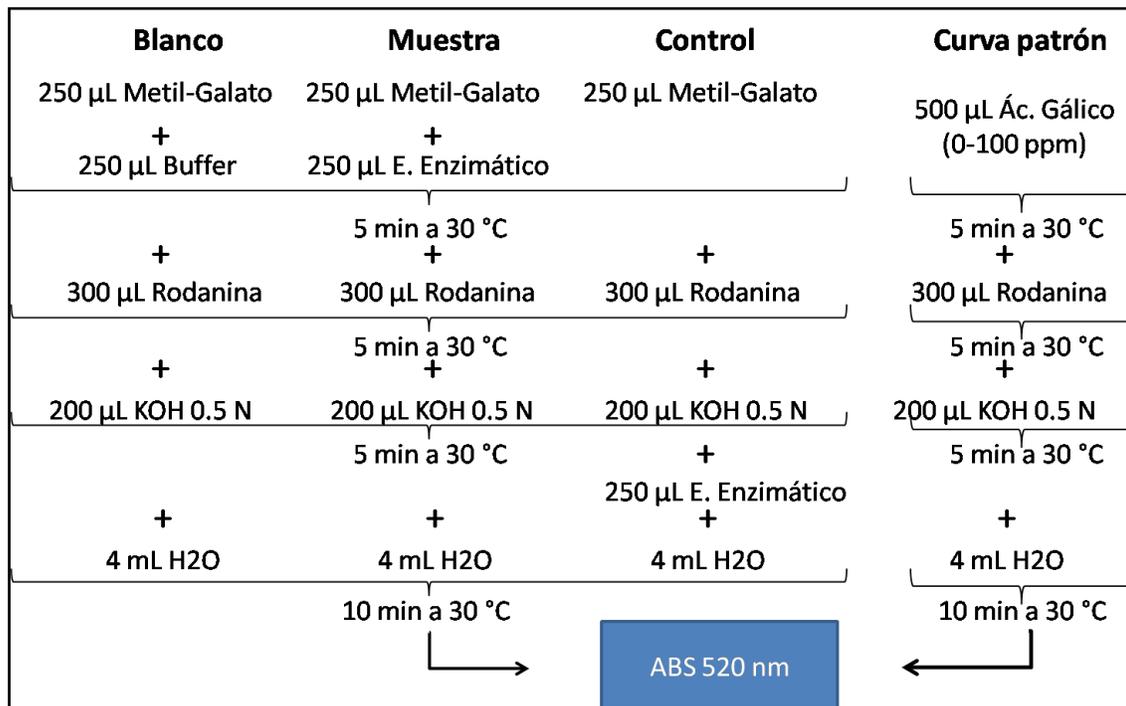


Figura 20. Esquema del ensayo enzimático propuesto por Sharma et al. (2000)

Cuantificación de fenoles hidrolizables totales

El contenido de polifenoles totales puede ser determinado por medio de un método espectrofotométrico con el reactivo de Folin Ciocalteu. Este método se basa en la presencia de los ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico en el reactivo, los cuales se reducen al oxidar a los fenoles debido a la transferencia de electrones a pH básico, dando lugar a la formación de compuestos cromógenos como oxido de molibdeno y de tungsteno de coloración azul-verde. La concentración producida es proporcional a la concentración de poli fenoles presentes en la muestra.

Ensayo: se colocaron 800 μ L de la muestra en un tubo de ensaye, se añadió 800 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu y se mezcló, dejándolos reaccionar por 5 min, después de este tiempo, se agregaron 800 μ L de carbonato de sodio (0.01 M) y se mezcló, con un nuevo periodo de reposo de 5 minutos, finalmente; se diluyo la solución con 5 mL de agua destilada y se midió la absorbancia a 790 nm

Para calcular la concentración de fenoles hidrolizables en la muestra, se realizó una curva patrón utilizando ácido gálico como estándar.

Determinación de azúcares totales por el método de fenol-sulfúrico

El método propuesto por Dubois *et al* en 1956 se fundamenta en que los carbohidratos son particularmente sensibles a ácidos fuertes y temperaturas altas. Bajo estas condiciones una serie de reacciones complejas toman lugar empezando con una deshidratación simple, si se continúa con el calentamiento y la catálisis ácida se producen varios derivados del furano que condensan consigo mismo y con otros subproductos para producir compuestos coloridos producto de la condensación de los compuestos fenólicos y con heterociclos con el nitrógeno como heteroátomo. La condensación más común es con el fenol.

Materiales y métodos

Para la cuantificación de azucares totales se necesita Fenol 5 % en H₂SO₄ concentrado, H₂SO₄ concentrado, Glucosa 500 pp. Se necesita 250 μ l de muestra,

posteriormente se añadió 250 µl de fenol al 5 % en H₂SO₄, se agito en vortex y se dejó en baño de agua con hielo por 5 min, se añadió 1 mL (1000 µl) de ácido Sulfúrico H₂SO₄ concentrado, se agito en vortex cuidadosamente y se sometió a ebullición por 5 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos, se leyó la absorbancia a 480 nm; la curva de calibración se realizó con glucosa.

Determinación de biomasa por el método de glucosamina

Es un método indirecto para determinar biomasa fúngica; la glucosamina (C₆H₁₃NO₅) es un amino azúcar que se encuentra principalmente en el exoesqueleto de crustáceos y artrópodos, formando parte de la pared celular de hongos y muchos organismos, siendo el monosacárido más abundante y, por ende, su cuantificación nos permite tener una estimación del crecimiento de microorganismos en un cultivo.

Para determinar el contenido de glucosamina, se requiere una hidrólisis para liberarla de la pared celular, posteriormente se combina con la acetil-acetona formando un compuesto pirrólico, que al reaccionar con el *p*-dimetilaminobenzaldehído (PDBA) forma un compuesto de color rojo a una absorbancia de 530 nm. Para esta técnica es necesario preparar las siguientes soluciones:

A. Solución de acetilacetona. Disolver 1 mL de acetilacetona en 50 mL de Na₂CO₃ 0.5 N.

B. Reactivo de Erlich. Disolver 1.6 g de *p*-dimetilaminobenzaldehído en 60 mL de sol. HCl-EtOH (1:1).

Nota: Calcular la cantidad de solución a emplear de acuerdo al número de muestras, ya que las soluciones deben ser frescas para evitar error en la cuantificación.

En el siguiente diagrama de flujo se describe primeramente el pre tratamiento de la muestra, mediante el cual se libera la glucosamina, y posteriormente la reacción con la solución A y B para su cuantificación.

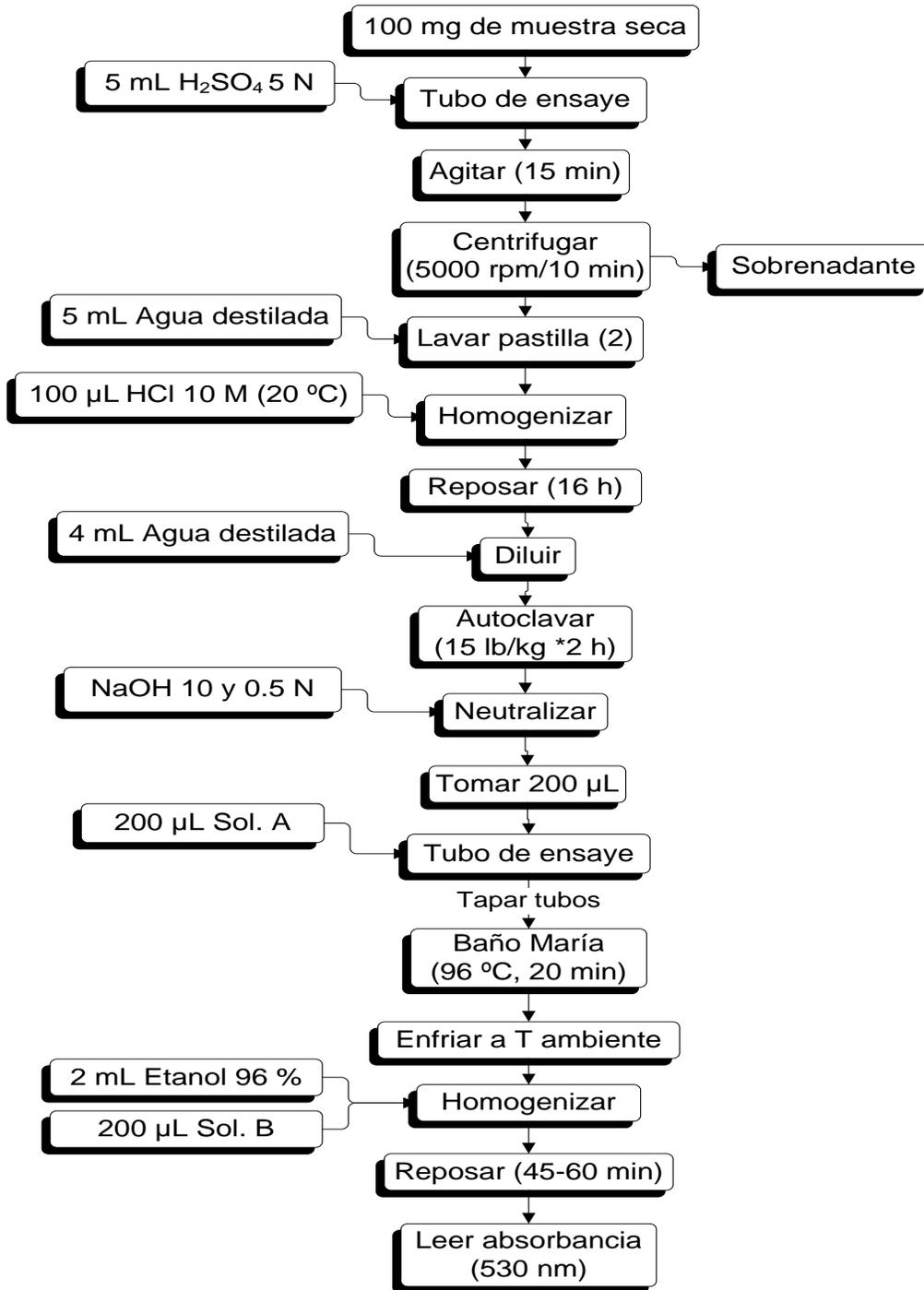


Figura 21. Diagrama de flujo para la cuantificación de glucosamina.

En la determinación de la glucosamina asociada al hongo se utilizó 100 mg de biomasa seca del mismo; y se realizó una curva patrón de 0-200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ con glucosamina como estándar.

Parámetros cinéticos

Cinética de formación de biomasa

La producción de biomasa, fue evaluada mediante la ecuación logística de Velhurst-Pearl (EC. (Gatto *et al.*, 1988; Viniegra *et al.*, 2003).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_M \left[1 - \frac{X}{X_{max}} \right] X$$

Dónde: X es la biomasa (g por L, por cm^2 o por Kg), μ_M es la velocidad máxima de crecimiento específico (h^{-1}) y X_{MAX} es el valor de equilibrio para X donde $dX/dt = 0$, para $X > 0$. La solución de la ecuación anterior es la siguiente:

$$X(t) = X_0 * e^{\mu_{max} * t} / \left(1 - \frac{X_0 * (e^{\mu_{max} * t})}{X_{max}} \right)$$

Dónde: X_0 es la condición inicial para X , la ecuación 12 sirve para ajustar los datos experimentales de la ecuación 11, minimizando la suma de errores al cuadrado como función de los parámetros cinéticos X_0 , X_{max} y μ_M .

Cinética de formación de producto

La cinética de formación de producto fue modelada empleando la ecuación de Luedeking y Piret (1959) (Viniegra *et al.*, 2003).

$$\frac{dP}{dt} = Y_{p/x} \frac{dX}{dt} + kX$$

$$Y_{PS} = \frac{P_2 - P_1}{S_1 - S_2} q_P = \mu Y_{E/S} \quad Y_{PX} = \frac{P_2 - P_1}{X_2 - X_1}$$

$$P_C(t) = P_{C,0} + \alpha_C \cdot (X(t) - X_0) + \beta_C \cdot \frac{X_{\max}}{\mu_{\max}} \cdot \ln\left(1 - \frac{X_0 \cdot (1 - e^{\mu_{\max} \cdot t})}{X_{\max}}\right)$$

Dónde: P , es la concentración de producto; C , es la enzima de interés (tanasa); $Y_{P/X}$, es el rendimiento de producto en términos de biomasa (unidades de producto por unidades de biomasa) y k , es el coeficiente secundario de formación o destrucción de producto.

Análisis estadístico

Para las determinaciones de biomasa, tanasa y sustrato se llevaron a cabo los experimentos por triplicado, los resultados mostrados en las cinéticas presentan los promedios obtenidos de dichos experimentos. Las pruebas de medias se realizaron con Minitab 16 y se empleó el análisis de Tuckey con un alfa = 0.05 cuando fue necesario.

Etapa IV: Extracción del ADN y amplificación del ADNr 18S

Metodología: La identificación de las cepas se llevó a cabo por medio de la amplificación y secuenciación del gen 18S ADNr. Para ello, se propagaron las cepas en medio Czapek-Dox con glucosa al 30 % (Tabla 8) por 4 días hasta la obtención biomasa, la cual fue filtrada y mantenida a -70°C hasta la extracción del ADN fúngico.

Tabla 8. Composición del medio Czapek-Dox con glucosa al 30 %

Componente	g/L
KH ₂ PO ₄	3.04
MgSO ₄	1.52
KCl	1.52
NaNO ₃	0.32
Glucosa	30.00

La biomasa se transfirió a un mortero con mano estéril y se le agregó N₂ líquido para macerar la muestra. Una vez obtenido un polvo blanco y fino, se transfirió a un tubo Falcón de 50 mL estéril y se le agregaron 2 volúmenes de búfer de extracción TES. Se dio un ligero vortex y se dejó incubar a -20 °C durante 10 minutos.

Posteriormente se dejó descongelar y la muestra se distribuyó (1.5 mL) en tubos Eppendorf de 2.0 mL estériles, adicionándoles acetato de potasio 5 M (200 µL) y cloruro de sodio 5 M (150 µL). Se incubó la muestra en el congelador (-20 °C) durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 14800 rpm por 20 min a 4°C; se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo estéril. Se adicionó fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a 14800 rpm por 10 min a 4°C. Nuevamente se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo estéril y se agregó 0.1 volúmenes de acetato de amonio 7.5 M y 2 volúmenes de etanol frío al 70%. Se incubó en el congelador (-20 °C) durante toda la noche.

Posteriormente, se centrifugó a 14800 rpm por 10 min a 4°C, se decantó y se dejó evaporar el etanol. Después, se agregaron 50 µL de buffer TE 0.1X para disolver la pastilla.

Cuantificación de ADN

Para cuantificar el ARN se utilizó un espectrofotómetro marca Thermo Scientific con el método para medir ácidos nucleicos, se midió el blanco (agua milli Q) y

posteriormente las muestras. Para medir la muestra se agregaron 2 µl de muestra y 198 µl de agua milli Q, y se tomaron los datos de Absorbancia a λ 260, Absorbancia λ 280, y el valor R.

Tabla 9. Cuantificación del ADN

MUESTRA	260λ	280λ	R=A260/A280	µg/ml	µg totales (50 µl)=(µg/ml)(0.05)
Código de la muestra	Abs	Abs			

CALIDAD DEL ADN: Electroforesis horizontal de agarosa al 1%.

En un vaso de precipitado se disolvieron 0.45 g de agarosa en 45 ml de buffer TAE 1x (Trizma base, ácido bórico, EDTA 0.5M), mediante una parrilla de calentamiento (300°C) hasta que la mezcla se tornó transparente. Se dejó enfriar la agarosa hasta una temperatura de 45°C.

La solución se vertió en un portagel al cual se le agregó un peine, evitando dejar burbujas en el gel.

Se dejó solidificar el gel de 15 a 20 minutos y se removió el peine. Sobre una tira de parafilm se colocó una gota (1 µl) de buffer de carga (50% de glicerol, 1 mM EDTA, 0.2% azul de bromofenol y 60 µg/mL de red gel), se colocaron 5 µl del ADN de una muestra (4 µl de marcador molecular 100 pb marca Axygen) y se mezcló succionando y expulsando de 5 a 10 veces. La mezcla se colocó en un pozo del gel, se colocó en la cámara de electroforesis y se agregó un volumen de buffer TAE 1x hasta cubrir completamente el gel. Las muestras se fraccionaron a 90 volts por 45 minutos. En el Transiluminador de luz UV, se visualizó la banda correspondiente a cada gen.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez que se obtuvo ADN íntegro, se llevó a cabo amplificación del gen 18S ADNr empleando los iniciadores PN3 (5'- CCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATC -3') y PN10 (5'-TCCGCTTATTGATATGCTTAAG -3').

La reacción se llevó a cabo empleando un sistema PCR Thermal Cycler Px2 (Thermo Electron) con el siguiente programa: 95 °C por 10 min; 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 54 °C por 1 min, 72 °C por 1 min; seguido de una extensión final a 72 °C por 5 min.

Se etiquetaron microtubos de 0.2 ml para las muestras. Se sacaron las muestras y reactivos del refrigerador y congelador, se colocaron en baño de hielo 8 minutos para que se descongelaran gradualmente, después se sometieron a un pequeño paso de vortex (5 segundos).

Tabla 10.Coctel para PCR

Reactivos	Cantidad (para 1 muestra)
Agua destilada desionizada estéril	18 µl
Buffer para PCR 10x	2.5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 µl
dNTPS (25 mM)	0.2 µl
Iniciador 5'-3' (15 pM)	0.83 µl
Iniciador 3'-5' (15 pM)	2.0 µl
Enzima Taq-Polimerasa (5 U/ml)	0.2 µl
TOTAL	24 µl

Se mezclaron los reactivos con la micro pipeta, el tubo se depositó en un recipiente con hielo, posteriormente se depositaron 24 µl del coctel en un tubo de 0.2 µl, luego se adicionó 1 µl del ADN de la muestra y se mezclaron con la micro pipeta. Los tubos

se introdujeron al Termociclador marca Labnet donde las condiciones de PCR fueron las siguientes: 10 minutos a 95°C, 30 ciclos (30 segundos a 95°C, 30 segundos de la TM del iniciador, 1 minuto a 72°C) y 10 minutos a 72°C. Una vez terminado el tiempo de corrida las muestras se guardaron a -20°C en el congelador.

Una vez obtenido el producto de la PCR, se realizó una electroforesis horizontal para verificar la presencia del amplificado de cada gen (banda), y comprobar con un marcador molecular las pares de bases de cada banda.

Electroforesis horizontal de agarosa al 1.5%

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5% y su secuencia se obtuvo utilizando el equipo 3730XL DNA Automatic Sequencer por el método Terminator Cycle Sequencing, utilizando el kit BigDye®. La búsqueda de homología de secuencias se llevó a cabo empleando la herramienta BLAST de la base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information).

En un vaso de precipitado se disolvieron 4.5 g de agarosa en 150 ml de buffer TAE 1x (Trizma base, ácido bórico, EDTA 0.5M), mediante una parrilla de calentamiento (300°C) hasta que la mezcla se tornó transparente. Se dejó enfriar la agarosa hasta una temperatura de 45°C. La solución se vertió en un portagel al cual se le agregó un peine, evitando dejar burbujas en el gel. Se dejó solidificar el gel de 15 a 20 minutos y se removió el peine. Sobre una tira de parafilm se colocó una gota (1 µl) de buffer de carga (50% de glicerol, 1 mM EDTA, 0.2% azul de bromofenol y 60 µg/mL de red gel), se colocaron 5 µl del ADN de una muestra (4 µl de marcador molecular 100 pb marca Axygen) y se mezcló succionando y expulsando de 5 a 10 veces. La mezcla se colocó en un pozo del gel, se colocó en la cámara de electroforesis y se agregó un volumen de buffer TAE 1x hasta cubrir completamente el gel. Las muestras se fraccionaron a 90 volts por 45 minutos. En el Transiluminador de luz UV, se visualizó la banda correspondiente a cada gen.

Para la identificación de los hongos filamentosos se utilizó la base de datos NCBI y el programa blast para las alineaciones, en el que se empleó los primers 518 y 800.

Resultados y discusiones

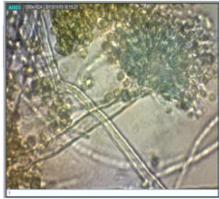
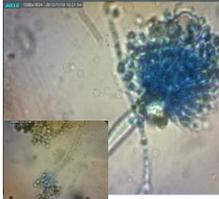
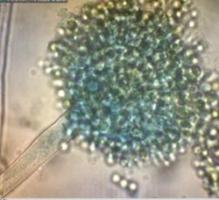
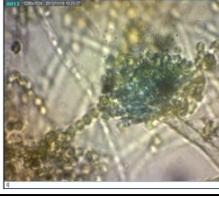
Los resultados y las discusiones del desarrollo experimental se presentan según las etapas de la investigación.

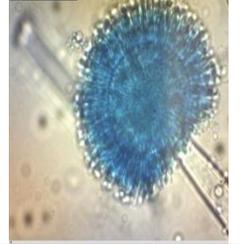
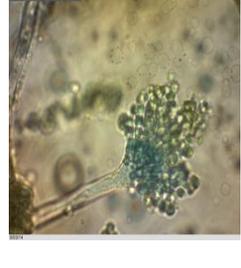
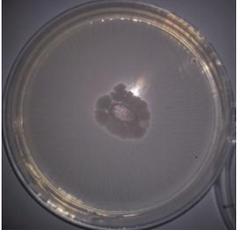
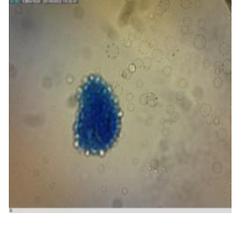
Etapas I: Propagación, conservación de hongos filamentosos y caracterización macroscópica y microscópica.

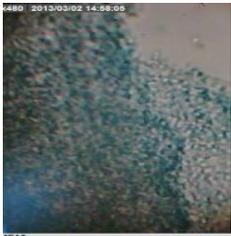
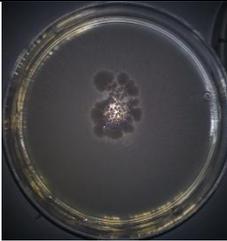
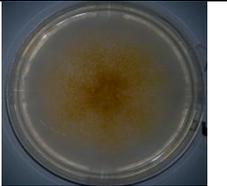
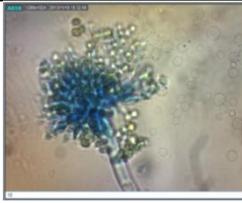
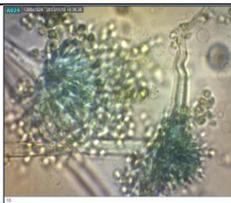
Se obtuvieron 22 cepas puras, que se conservaron en leche descremada con glicerol y se mantuvieron en congelación. Esta colección se encuentra en el laboratorio de Ciencia Y Tecnología De Alimentos de la UAAAN, las cuales se usaron para el desarrollo de las posteriores etapas que conforman esta investigación.

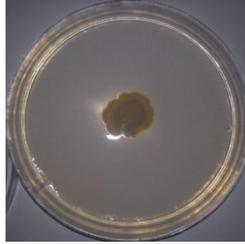
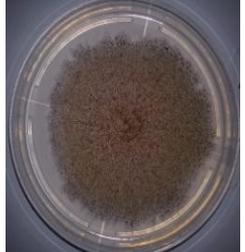
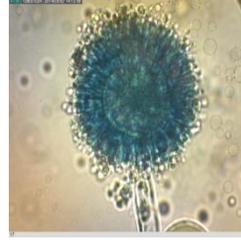
En la tabla se muestran las cepas fúngicas con el respectivo nombre que se le asigno para su reconocimiento; observaciones macroscópicas y microscópicas.

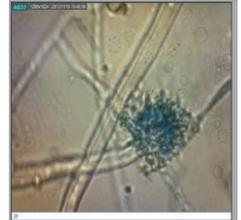
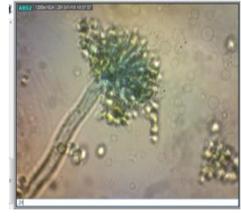
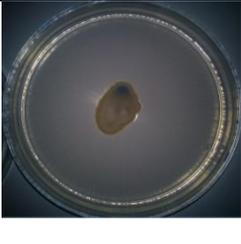
Tabla 11. Observación macroscópica y microscópica de Hongos Filamentosos

HONGOS FILAMENTOSOS	OBSERVACION MACROSCOPICA	DESCRIPCION	OBSERVACION MICROSCOPICA	DESCRIPCION
1.-HF		Colonias que van del amarillo al anaranjado oscuro.		Hifas: hialinas no septadas Conidióforo: hialino, recto de aspecto grueso Vesícula: globosa ligeramente elipsoidal Conidias: globosas, lisas
2.-HF		Colonias que se torna aun color más intenso (amarillo-naranja)		Hifas: hialinas no septadas Conidióforo: hialino, grueso Vesícula: elipsoidal poco evidente Conidias: globosas y lisas
3.-HF		Colonias inicialmente amarillo y con el lapso del tiempo toma un color verdes		Hifas: hialinas, ausencia de septos Conidióforo: hialino, recto de grosor amplio Vesícula: globosa redonda Fialides: uniseriadas Conidias: globosas, lisas
4.-HF		Colonias con bordes regulares, formación de anillo concéntrico blanco		Hifas: hialinas sin septos Conidióforo: hialino recto Vesícula: globosa elipsoidal Conidias: globosas y lisas
5.-HF		Colonia que se torna aun color más intenso (amarillo-verde-limón)		Hifas: hialina no septadas Conidióforo: hialino, recto Vesícula: globosa redonda Fialides: uniseriadas Conidias: globosas

6.-HF		Colonias cremosas con bordes irregulares, presencia de olor desagradable		levaduras, esféricas de estructura pseudoparenquima
7.-HF		Colonias de crecimiento rápido con micelio aéreo inicialmente blanco y finalmente negro, con bordes regulares		Hifas: hialinas septadas Conidióforo: hialino, aspecto grueso Vesícula: ovoide, globosa Fialides: uniseriadas y biseriadas Conidias: lisas, globosas y en cadena
8.-HF		Colonias de crecimiento rápido de color amarillo-verde limón, bordes regulares.		Hifas: hialinas sin septos Conidióforo: hialino Vesícula: elipsoidal, globosa Fialides: uniseriadas Conidias: globosas, lisas y en cadena
9.-HF		Colonias de color crema, presencia de bordes irregulares, olor desagradable		levaduras, esféricas de estructura pseudoparenquima

10.-HF		Colonias cremosas con bordes irregulares, presencia de olor desagradable		levaduras, esféricas de estructura prosénquima
11.-HF		Colonias de color crema inicialmente tornándose más oscuras con el tiempo, presenta bordes irregulares y olor desagradable		levaduras, esféricas de estructura prosénquima
12.-HF		Colonias que van del amarillo-anaranjado, bordes regulares crecimiento rápido		Hifas: hialinas no septada Conidióforo: hialino recto Vesícula: no visible compacta de las fialides Fialides: uniseriadas Conidias: globosas, lisas
13.-HF		Colonias que van del amarillo a anaranjado. bordes regulares		Hifas: hialinas sin septos Conidióforo: hialinos rectos Vesícula: globosa, ovoide Fialides: uniseridas Conidias: ovoides, equinuladas
14.-HF		Colonias que van del amarillo a anaranjado-verde. Bordes regulares anillo claro con centro amarillo tornándose a verde		Hifas: hialinas no septadas Conidióforo: hialinos rectos Vesícula: ovoide, globosas Conidias: globosas, lisas

15.-HF		Colonias con bordes irregulares, de color amarillo-verde, formación de anillos concéntrico, de textura aterciopelada		Hifas: septadas Conidióforo: hialinos largos Métulas: ramificadas, de constitución gruesa Fialides: forma de botella, con cuello angosto agrupado Conidias: esféricas, lisas
16.-HF		Colonias al principio blancas y posteriormente negras, textura similar a la pimienta		Hifas: hialinas, septadas Conidióforo: hialino recto, aspecto grueso Vesícula: globosa, redonda Fialides: uniseriadas y biseriadas Conidias: globosas equinuladas
17.-HF		colonias densas presentan 1crecimiento a los 3 días de color blanco al principio y luego crema de textura algodonosa		Hifas: hialinas, septadas Conidióforo: hialino con septos Vesícula: no visible Conidias: dentro del esporangio
18.-HF		Colonia con bordes regulares, formación de anillos concéntricos de color amarillo que van disminuyendo hasta el último anillo.		Hifas: septadas Conidióforo: hialinos largos Métulas: ramificadas, de constitución delgada Fialides: lisas Conidias: esféricas, lisas

19.-HF		Colonias de color crema tendiendo posteriormente a verde claro plana y aterciopelada		Hifas: septadas Conidióforo: hialinos largos Métulas: ramificadas, de constitución gruesa Fialides: forma de botella, con cuello angosto agrupado Conidias: esféricas, lisas
20.-HF		Colonias que van del amarillo a anaranjado de bordes regulares, y rápido crecimiento		Hifas: hialinas sin septos Conidióforo: hialino, amplio grosor Vesícula: globosa, elipsoidal Fialides: uniseriadas Conidias: lisas, globosas
21.-HF		Colonias que van del amarillo a anaranjado-verde. Bordes regulares micelio aéreo abundante		Hifas: hialinas no septadas Conidióforo: hialino, recto de aspecto grueso Vesícula: elipsoidal, globosas Fialides: uniseridas Conidias: lisas
22.-HF		Colonias de color beige tornándose a verde, plana y aterciopelada presencia de anillos concéntricos		Hifas: septadas Conidióforo: hialinos largos Métulas: ramificadas, de constitución gruesa Fialides: forma de botella, con cuello angosto agrupado Conidias: esféricas, lisas

*Las descripciones se realizaron según Leonor Carrillo, 2003; Dr Fungus, 2014; Reviakina V, 2005.

Etapa II: Bio-ensayo con medio ácido tánico para la selección de la o las cepas fúngicas que mayor degradación de ácido tánico presenten.

Para la Selección de hongos filamentosos que produzcan la enzima tanasa se emplearon las 22 cepas puras mencionadas en la etapa 1; las cepas se sembraron en un medio solido con ácido tánico al 0.5 % como única fuente de carbono en un medio mínimo a un pH de 6-6.5 a 32°C ; posteriormente se monitorearon por 120 horas midiendo el halo de degradación cada 24 horas y de esta forma se determinaron que cepas producen más enzima tanasa, y así proseguir a la inoculación en una Fermentación En Medio Sólido.

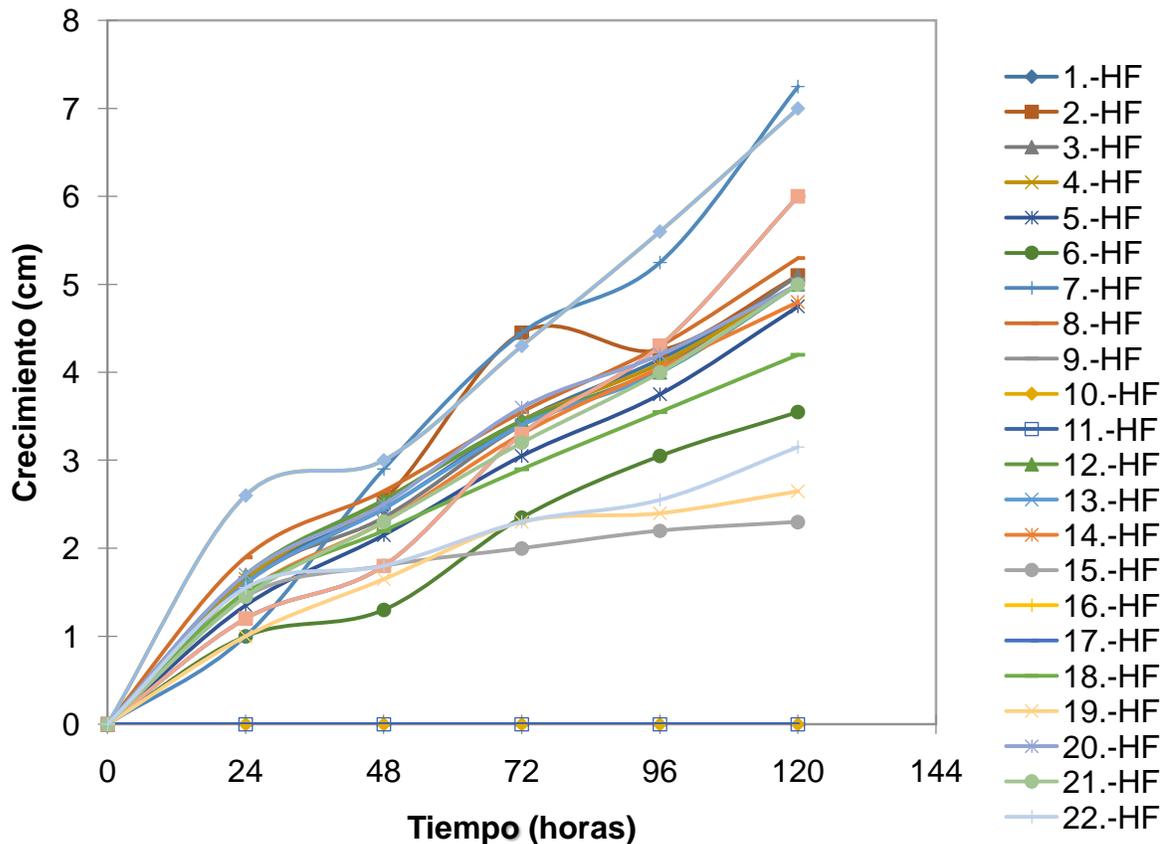


Figura 22. Crecimiento en cultivo medio solido con ácido tánico.

En base a la figura 22 se logró escoger los hongos filamentosos en su mayoría crecieron uniformemente, se seleccionaron 3 cepas, de ellas las muestra son: 7.-HF que a las 48 horas mostraba un crecimiento de 2.9 cm de diámetro llegando a medir 7.25 al llegar a las 120 horas; la 16.-HF presento un diámetro de 3 cm a las 48 horas y a las 120 horas midió 7 cm; la 17.-HF a las 48 horas tenía un diámetro de 1.8 cm, a las 120 horas midió 7cm; cuyo crecimiento fue incrementando con el lapso del tiempo y llego a medir 6 cm a las 120 horas superando otras cepas; teniendo también que las cepas 9.-HF; 10.-HF; 11.-HF que son de estructura levaduriforme no presentaron crecimiento.

Considerando criterios de crecimiento, medición de halo de degradación, crecimiento constante, etc; en anexos se puede apreciar una tabla con cepas fúngicas destacando observaciones macroscópicas de cada uno de los hongos cultivados en medio ácido tánico.

La medición de los halos de degradación fue basada en la metodología descrita por Pedroza *et al.* (2001). Para la selección de los hongos filamentosos capaces de degradar el ácido tánico se empleó el protocolo utilizado por (Osawa *et al.*, 2000); quien reporto bacterias lácticas *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum* y *Lb. pentosus*, que crecieron sobre placas con ácido tánico formando zonas claras y transparentes alrededor de las colonias (formación de halos de degradación); se incluye también las bacterias *Citrobacter fieundii*, quien fue crecida en el medio sólido con 5 gL" de ácido tánico (Ajay-Kumar *et al.*, 1999) y *Bacillus lichenarriis* que creció en 10 g-L" de ácido tánico (Mondal y Pati 2000).

Los hongos filamentosos capaces de crecer y degradar el ácido tánico al 0.5%, son cepas que producen la enzima tanasa, siendo las óptimas las que presentan el halo de degradación conforme van propagándose; dependiendo de la capacidad de degradar el ácido tánico es como se va presentando la formación del halo (Ramírez coronel, 1996). La producción de la enzima tanasa de los hongos filamentosos es óptima a una temperatura entre 30 y 35 °C, así como a un pH entre 5.5 y 6.5; la fuente adicional de carbono que puede ser glucosa, además del ácido tánico, (Ramírez coronel, 1996; Sharma *et al.*, 2000).

Hernández Hernández L.

La formación de los halos se debe a la presencia de enzimas tanasas las cuales hidrolizan el ácido tánico; si no hay crecimiento hay ausencia de enzima tanasa o bien presente efecto inhibitorio sobre el crecimiento. Por lo que el crecimiento y la formación de halos que fueron observados en el mediosólido son un indicativo de que los hongos filamentosos seleccionados poseen la enzima tanasa para hidrolizar el ácido tánico y obtener carbono y energía a partir de los productos hidrolizados (en este caso, la glucosa y el ácido gálico) (Aguilar y Gutiérrez-Sánchez, 2001).

La producción de tanasa se ha demostrado en cepas bacterianas de *Bacillus pumilus*, *B. polymyxa*, *Corynebacterium sp.* y *Klebsiella pneumoniae*. Por otra parte, algunos hongos producen enzimas necesarias para degradar algunos taninos hidrolizados, específicamente el ácido tánico mediante la producción de tanasa. Esta capacidad ha sido demostrada en levaduras del género *Candida* (Deschamps y col., 1980) y en los hongos filamentosos es atribuida frecuentemente a hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium* (Lekha y Lonsane, 1997; Aguilar y Gutiérrez-Sánchez, 2001).

Etapas III: Establecimiento del Sistema de Fermentación Medio Sólido utilizando un soporte-sustrato de orégano y la evaluación actividad tanasa, fenoles hidrolizables, biomasa y azúcares totales.

Se realizó una fermentación en medio sólido; el sistema de fermentación está compuesto por pequeñas columnas de cuatro centímetros de diámetro y veinte centímetros de altura, el cual se llenó con un medio previamente inoculado y conectados a un termorregulador de agua (Figura 23). La demanda de oxígeno se cubrió por medio de aeración forzada utilizando un compresor que tiene un sistema de regulación de presión para evitar la compactación excesiva del lecho.



Figura 23. Sistema de FMS en columnas



Figura 24. Columna A con inoculo (0 hrs) y columna B con crecimiento (48 hrs)

A partir de las 48 horas la columna inoculada presentaba crecimiento de micelio de color blanco (Figura 25) y tendía a negro conforme iba creciendo (Figura 26)



Figura 25. crecimiento de micelio a las 48 horas.



Figura 26. Crecimiento de micelio a las 96 horas.

Cinéticas de Fermentación en medio sólido

Para la obtención de los extractos y llevar a cabo las lecturas de los parámetros cinéticos durante la fermentación fue necesario sacrificar una columna completa, ya que el diseño de la misma no permite tomar muestras.

Este equipo es conveniente en las primeras etapas del desarrollo de un bioproceso ya que es adecuado para estudios de caracterización y optimización de la composición del medio de cultivo, y para cuantificar los datos necesarios para llevar a cabo el cálculo de parámetros cinéticos.

Para la evaluación de la producción de enzima tanasa se determinó biomasa, producto y sustrato que se ajustaron a la ecuación logística y de esta forma se obtuvieron los parámetros cinéticos.

Cinéticas de biomasa

La medición de biomasa se determinó en miligramos por gramo de soporte mg/gds). La figura 27 muestra el comportamiento de la estimación de biomasa (mg/gds) monitoreada durante las 120 h; a las 24 horas de fermentación que presento crecimiento micelial considerable, ajustándose al modelo matemático, se obtuvo una μ de 0.16, y una X_{max} de 622.24 mg/gds por lo que se determinó que el crecimiento está ligado a la degradación del sustrato.

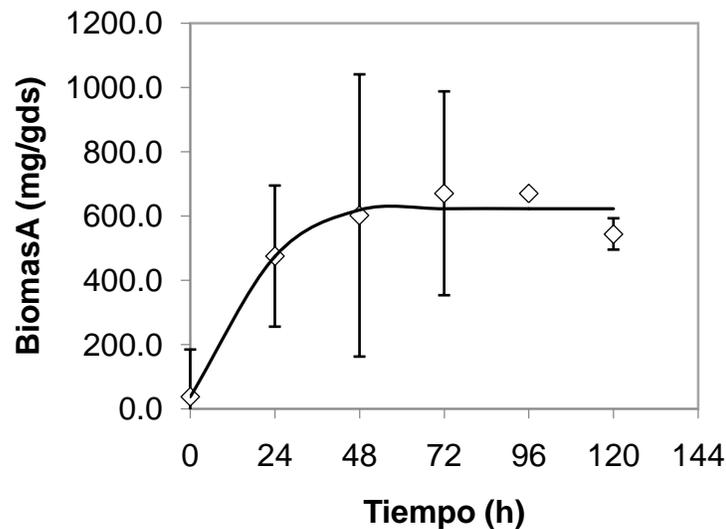


Figura 27. Cinética de crecimiento de la cepa 7.-HF en FES con soporte de orégano, (◇) experimental, (—) línea continua son valores estimados con la ecuación logística.

En la figura 28 muestra el comportamiento de la estimación de biomasa (mg/gds) monitoreada durante las 120 h; se observó que a las 24 horas de fermentación ya había crecimiento micelial, siendo más notorio a las 48 horas alcanzando un nivel de biomasa de 1349.3 mg/gds y disminuyendo hacia las 120 horas. En base al modelo matemático se obtuvo un μ de 0.12 mg/gds por lo que se consideró que el crecimiento está estrechamente ligado a la degradación del sustrato para su crecimiento, debido a que se observó con más exactitud la fase exponencial y una fase estacionaria; representando una X_{max} de 1101.82 mg/gds a las 48 horas por lo que se dedujo que el hongo filamentoso aun presentaba condiciones adecuadas que permitieron su crecimiento.

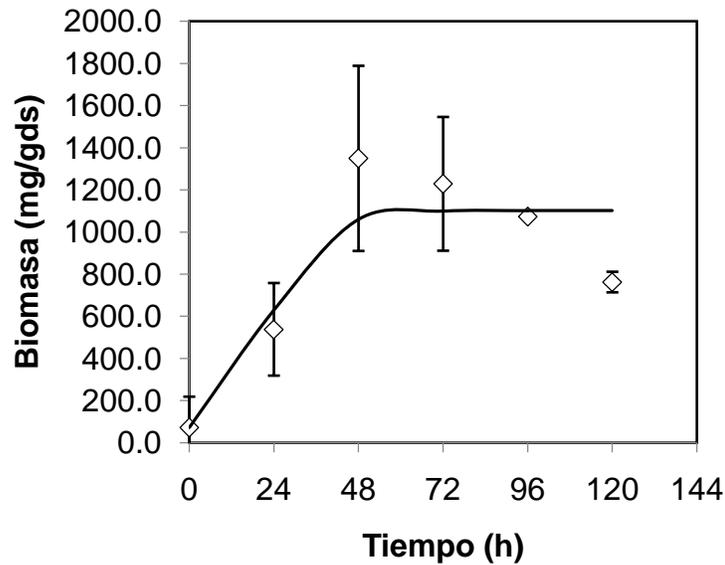


Figura 28. Cinética de crecimiento de la cepa 16.-HF en FES con soporte de orégano, (◇) experimental, (—) línea continua son valores estimados con la ecuación logística; muestra el comportamiento de la estimación de biomasa (mg/gds) monitoreada durante las 120 h

En la figura 29 se observó un comportamiento de biomasa (mg/gds) monitoreada durante las 120 h; que a las 24 horas de fermentación presentó crecimiento micelial, a las 48 horas alcanzó un nivel de biomasa de 855 mg/gds adaptándose más al modelo matemático haciéndose notorio las fases crecimiento y estacionaria; se obtuvo una μ de 0.15 mg/gds, y una X_{max} de 751.01 mg/gds y se comprendió que el crecimiento está relacionado con la degradación del sustrato.

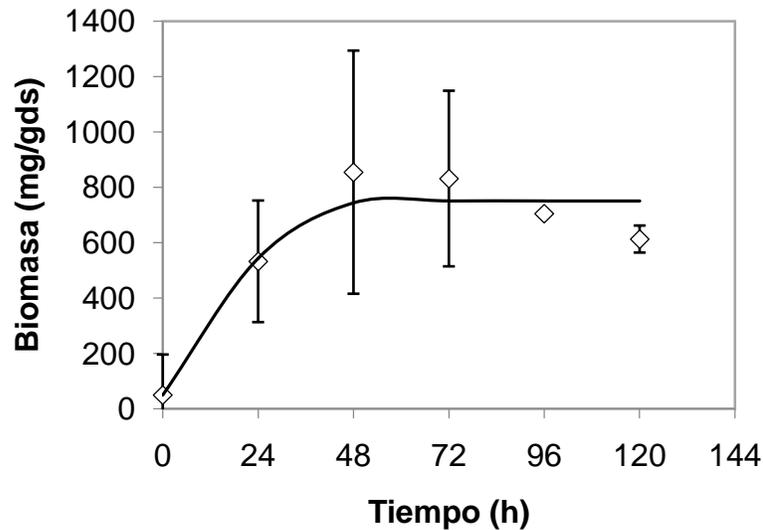


Figura 29. Cinética de crecimiento de la cepa 17.-HF en FES con soporte de orégano, (◇) experimental, (—) línea continua son valores estimados con la ecuación logística.

En las 3 cinéticas de biomasa de las cepas presentaron crecimiento micelial a las 24 horas y como punto más alto de biomasa se presentó a las 48 horas y fue disminuyendo sucesivamente; esto se debe a que los hongos filamentosos ya no tenían carbohidratos monoméricos de fácil asimilación en el sustrato que favoreciera su crecimiento (Banerjee et al, 2005, Medina et al, 2010, Melendez-Renteria P. et al, 2012).

Cinéticas de Producto

La determinación de actividad tanasa se calculó mediante unidades por gramo de soporte (U/gds).

En la figura 30 se muestra una producción continua de tanasa a partir de las 24 horas, teniendo como máximo 81 U/gds a las 120 horas, punto hasta el que termino el monitoreo; la cantidad de producto se va generando en relación al crecimiento del hongo filamentosos que sintetiza la enzima tanasa, para degradar los compuestos fenólicos presentes en el sustrato debido que en esta cepa se obtuvo una k de 0.008.

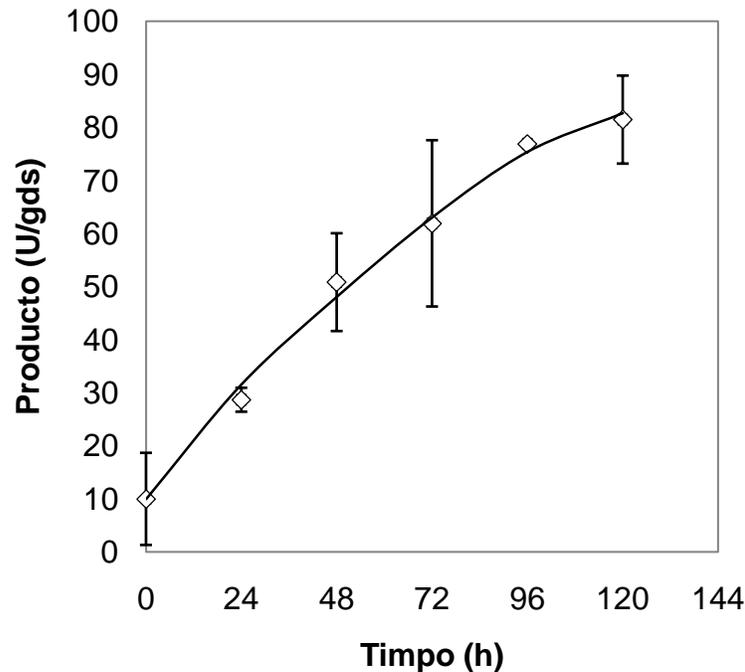


Figura 30. Cinética de producto de la cepa 7.-HF.

La figura 31 muestra una producción de tanasa a partir de las 24 horas, teniendo como máximo 72 U/gds a las 48 horas, y a las 72 horas va disminuyendo la formación de producto, esta diferencia en la producción se puede deber a la geometría de la columna que no permite una buena distribución del soporte por lo tanto el crecimiento de los hongos es lento, y disminuye la producción de tanasa, además de que se aprovecha el consumo de glucosa liberado (Assamoi y col., 2008).

En base al modelo matemático se obtiene un valor de k igual a $7.0E-06$ esto indica que la tasa específica secundaria de inestabilidad de la enzima puede estar relacionada con la tasa de producción de la enzima asociada al crecimiento vegetativo del microorganismo además de que en la figura presenta una curva convexa.

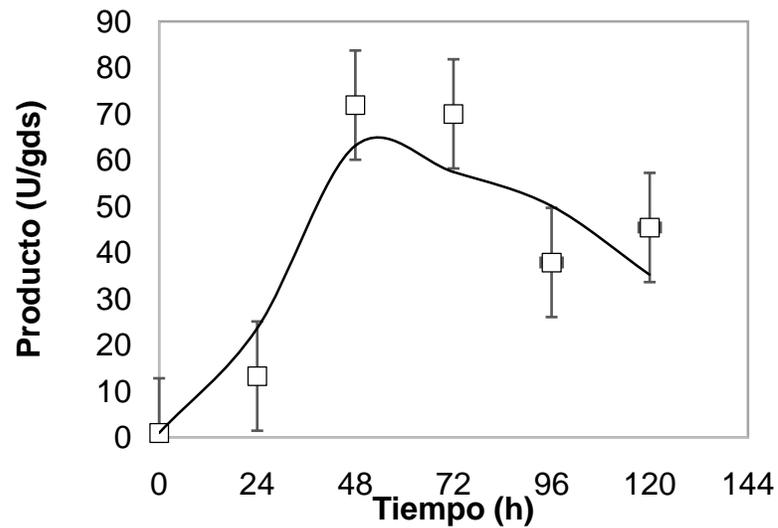


Figura 31. Cinética de producto de la cepa 16.-HF.

En la figura 32 muestra la producción de tanasa obtenida a partir de las 24 horas, teniendo como máximo 29 U/gds a las 48 horas, a las 72 horas disminuyó la generación de producto, esto se debe a la formación de biomasa y utilización de la glucosa liberada y posteriormente el incremento del producto.

En relación al ajuste de la ecuación logística se obtuvo una k de 0.0001, aunque es un valor muy pequeño es positivo por lo que se deduce que la producción de la enzima tanasa está estrechamente relacionada a la producción de biomasa.

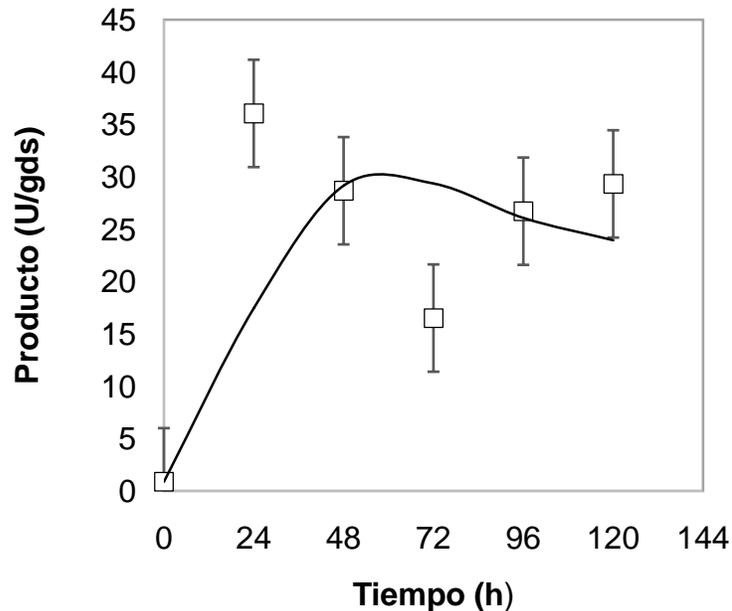


Figura 32. Cinética de producto de la cepa 17.-HF.

La formación de producto en las 3 cepas si se obtuvo; la cepa que presento mayor productividad de la enzima tanasa es la 7.-HF ya que la formación de producto se relaciona con el crecimiento que es lo que se pudo observar en la figuras 31, mientras que la cepa que genera mayor producto a las 24 horas es la 17.-HF, misma que se pudo observar el comportamiento en la figura 32 y como disminuye a las 72 horas y vuelve a incrementar.

Cinéticas de Sustrato

La figura 33 muestra el comportamiento de consumo de fenoles hidrolizables, a partir de las 48 horas de la fermentación, es notorio el consumo de fenoles hidrolizables que de acuerdo al modelo aplicado el nivel máximo de consumo es del 68.57 %.

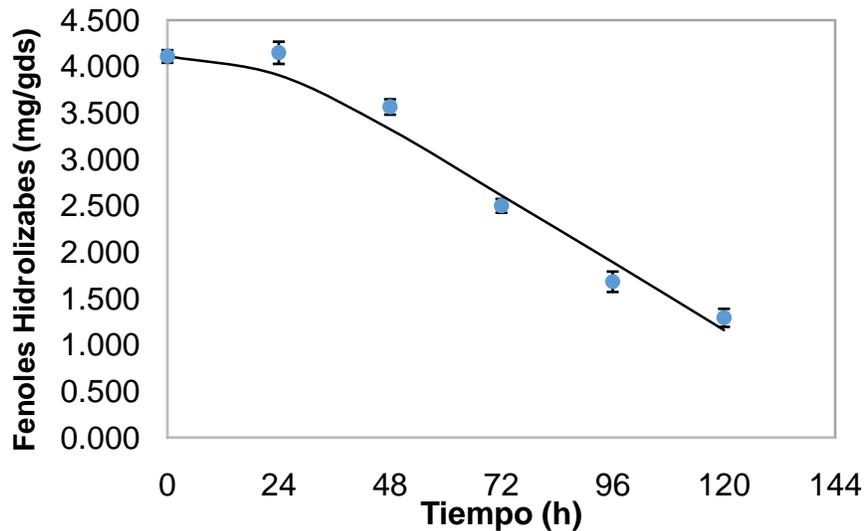


Figura 33. Consumo de Fenoles Hidrolizables de la cepa 7.-HF.

En la figura 34 se observa poca disminución dentro de las 24 horas iniciales de la fermentación, que en el que puede notarse como la cinética se mantiene constante.

En relación con el modelo aplicado represento un valor de m igual a $3.15E-06$ siendo un valor que indica que no hay una aplicación de energía significativa para la degradación de fenoles hidrolizables.

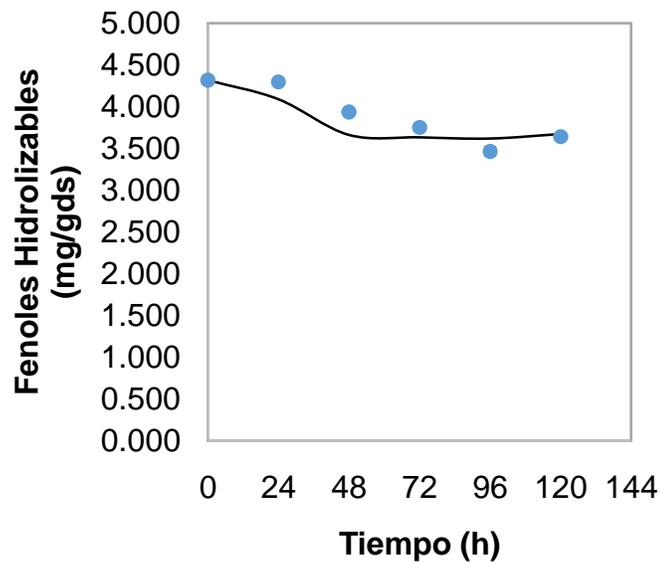


Figura 34. Consumo de Fenoles Hidrolizables de la cepa 16.-HF.

En la figura 35 muestra el consumo de fenoles hidrolizables desde las 24 horas iniciales de la fermentación, Posteriormente, puede observarse valores significativos de consumo en el sustrato, una vez que se comienzan a sintetizar enzimas capaces de degradar la matriz compleja. De acuerdo al modelo aplicado represento un 73.70 % de consumo de fenoles hidrolizables.

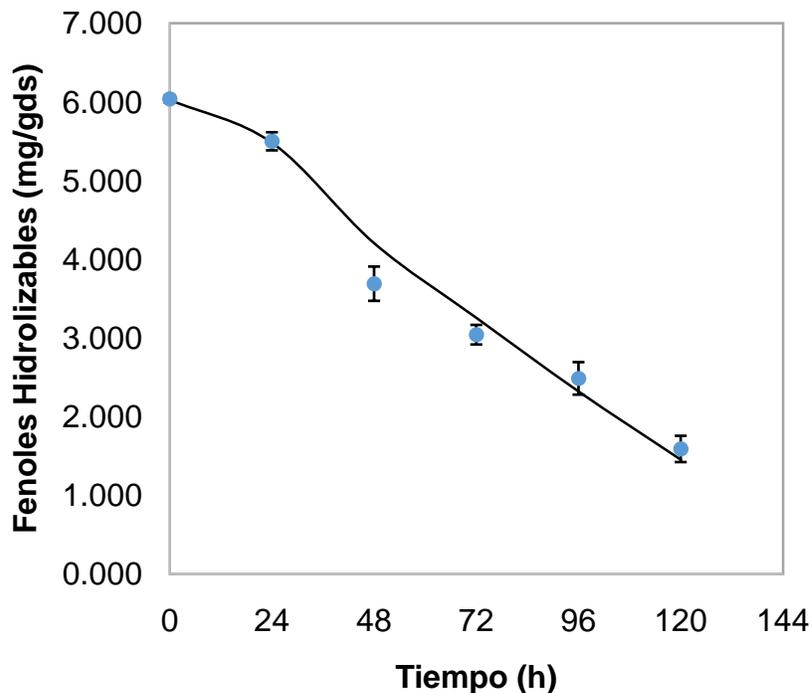


Figura 35. Consumo de Fenoles Hidrolizables de la cepa 17.-HF.

La cepa 7-HF, se muestra que a las 48 horas decrecía, presento un consumo de 87% a las 48%, y a las 120 horas alcanzo un consumo de 31% y relacionado con la generación de producto se va generando de forma constante se deduce que hay un consumo constante y que está estrechamente ligado con la formación de biomasa.

En la figura 36 se muestran las 3 cepas con él % de consumo de fenoles hidrolizables; se puede observar que la cepa \diamond 16.-HF a las 48 horas tiene un consumo de 91 %, a las 120 horas que fue el último de día de monitoreo presenta un consumo de 84 %; este comportamiento indica que se está generando la enzima que viene siendo el producto de interés de una forma mínima ya que en la figura 37 se observa que alcanza un punto de 71.91 U/gds en las 48 horas e inicia un decremento.

Para la cepa 17.-HF se muestra que a partir de las 24 horas inicia un consumo de fenoles hidrolizables del 91 % que va decreciendo hasta las 120 horas alcanzando

un consumo de 24%; considerando que el consumo de fenoles hidrolizables está relacionado con la formación de producto y generación de biomasa.

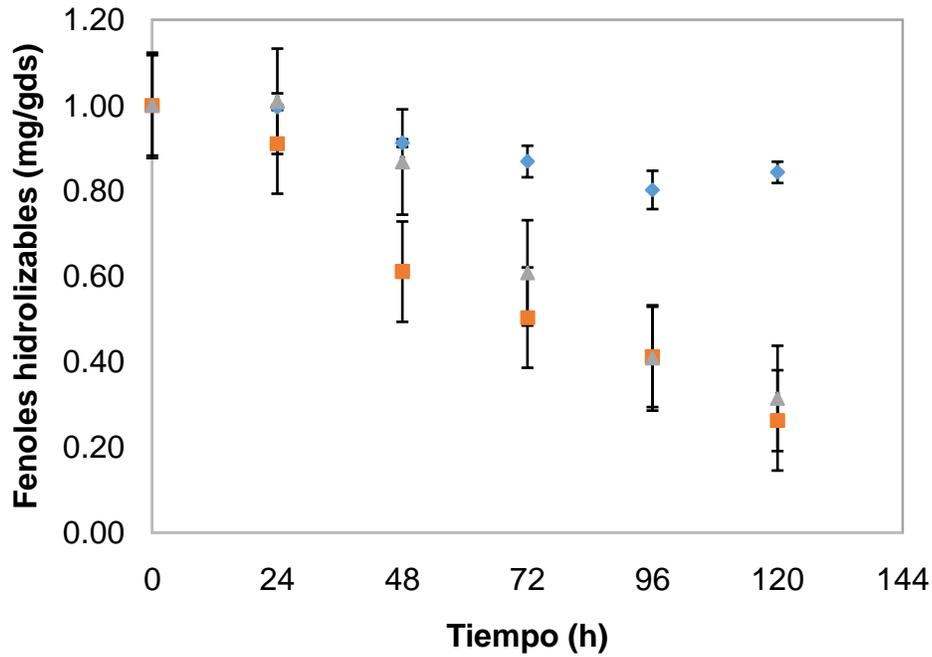


Figura 36. Gráfico de comparación del consumo de fenoles hidrolizables de las 3 cepas.
 ◊16.-HF, ◻17.-HF, ◻7.-HF.

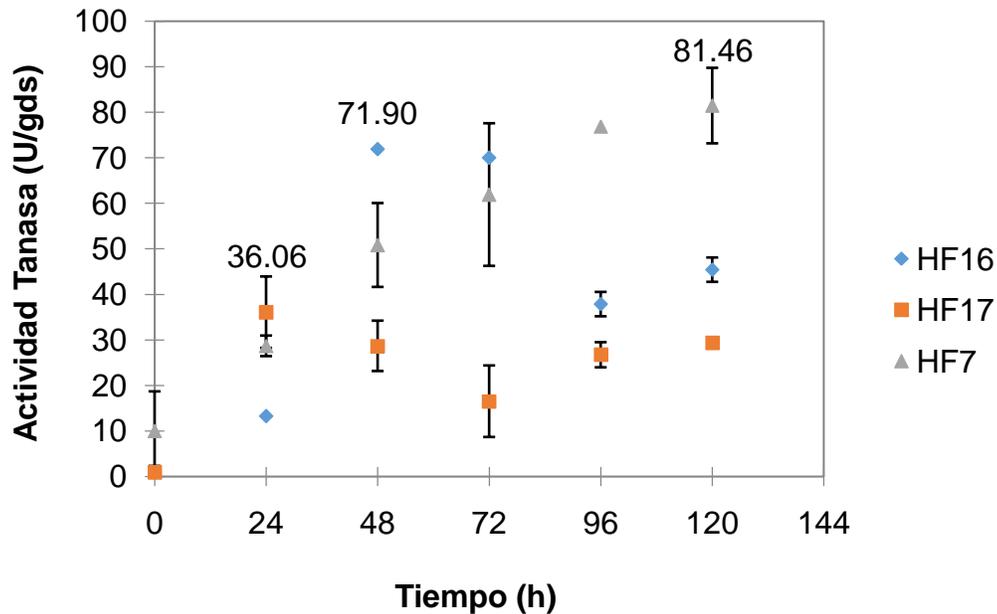


Figura 37. Gráfico de comparación de producción de enzima.

El propósito de los microorganismos al hidrolizar los taninos es la obtención de energía para sus actividades metabólicas, ya que la mayoría de los sustratos orgánicos sólidos disponibles en la naturaleza son polímeros (polisacáridos, proteínas y ligninas) que pueden satisfacer las necesidades nutricionales de los hongos, empleándose los extractos de plantas en fermentaciones ya sea en medio sólido o medio líquido como soporte para el crecimiento microbiano o también como inductores enzimáticos (Belmares-Cerda, 2004).

Se han cuantificado la cantidad de ácido elágico que contienen algunos vegetales como Cáscara de granada *Punica grantum* estado intermedio, Candelilla *Euphorbia antisyphylitica*, Gobernadora *Larrea tridentata*, Hojasén *Flourensia cernua* para ser utilizados como soporte y sustrato en CMS o bien en FMS (Aguilera-Carbo, 2009), encontraron que los taninos hidrolizables, como los galotaninos o elagitaninos, provienen de la esterificación de compuestos polifenólicos no flavonoides, como el ácido gálico o elágico, respectivamente y que se encuentran en la totalidad de la

planta de la que provienen: semillas, frutos, madera, raíz, hojas (Vázquez-Flores, A. A., y col 2012).

Lippia berlandieri Schauer o *Lippia graveolens* HBK es la especie de orégano más distribuido en México y se ha reportado que hongos filamentosos de la especie *A. niger* PSH, *A. niger* GH1 presentaron crecimiento en el residuo de orégano mexicano (Melendez-Renteria, y col, 2012), que concuerda con los datos obtenidos en este trabajo siendo que las 3 cepas seleccionadas son una especie de *Aspergillus S.*

Etapa IV: Identificación molecular de cepas fúngicas de mayor producción de enzima tanasa.

En esta etapa se realizó la inoculación de las 3 cepas de interés (7.-HF, 16.-HF, 17.-HF); en un cultivo medio líquido Czapek-dox y glucosa para favorecer el crecimiento y así obtener el micelio necesario para la extracción del ADN. El crecimiento de las 3 cepas fúngicas seleccionadas como las mejores para la producción de la enzima tanasa; fueron tomadas con 4 días de crecimiento con la finalidad de utilizar un micelio joven y de buen rendimiento.

Para la extracción del ADN se trabajó con 100 mg de muestra fresca de micelio, la cual se obtuvo macerando el micelio con nitrógeno líquido.

Para cuantificar el del ADN (relación de absorbancia 260/280), se realizó mediante espectrofotometría

Tabla 12. Cuantificación del ADN

MUESTRA	260 λ	280 λ	R =A260/A280	$\mu\text{g/ml}$ =(A260)(100)(50)	μg totales (50 μl) =($\mu\text{g/ml}$)(0.05)
07.-HF	0.055	0.044	1.250	275	13.75
16.-HF	0.012	0.011	1.091	60	3
17.-HF	0.032	0.025	1.280	160	8

CALIDAD DEL ADN

Cimentando los datos de tabla anterior, se procedió a realizar la Tabla 13, facilitando de esta manera hacer de nuestro conocimiento las cantidades adecuadas de reactivos y muestra requerida y efectuar la electroforesis.

Posterior a la cuantificación del ADN, se determinó la calidad del mismo mediante una electroforesis con agarosa al 3%.

Tabla 13. Calidad del ADN

<i>MUESTRA</i>	<i>μL MUESTRA</i> <i>2 μg</i>	<i>AGUA MILLI</i> <i>Q</i>	<i>BUFFER DE</i> <i>CARGA μL</i>	
<i>07.-HF</i>	7.27	10.0	0.0	2.0
<i>16.-HF</i>	33.33	10.0	0.0	2.0
<i>17.-HF</i>	25.0	10.0	0.0	2.0

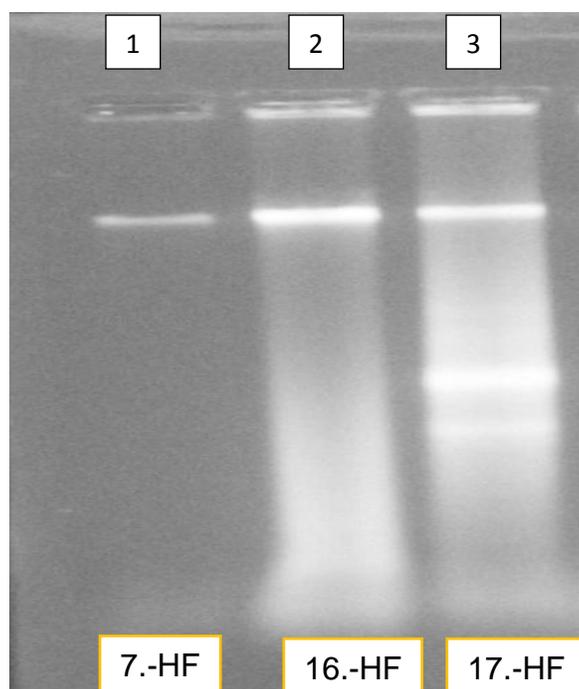


Figura 38. Determinación de la calidad de ADN de 3 hongos filamentosos, asignadas con los respectivos nombres para su reconocimiento: carril 1-3: muestras de hongos filamentosos, (7.-HF, 16.-HF, 17.-HF).

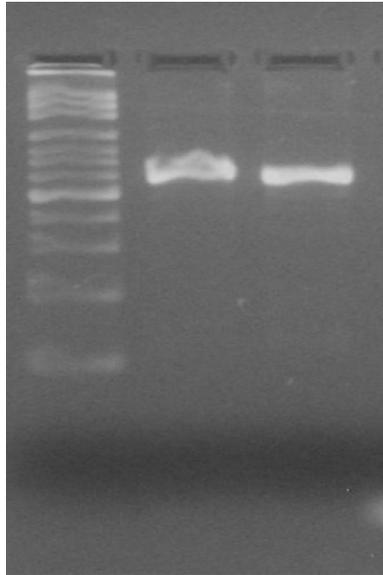


Figura 39. Amplifijación del promotor 18S por PCR de las muestras; 7.-HF, 16.-HF, importada a una temperatura de anillamiento de 60 °C.

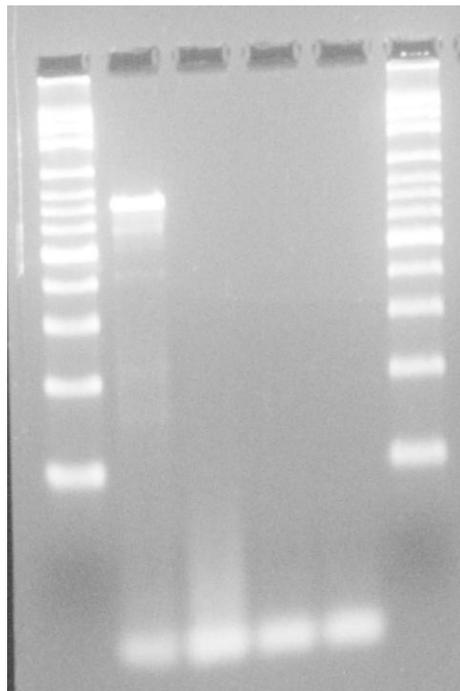


Figura 40. Amplifijación del promotor 18S por PCR; de la muestra 17.-HF, importada a una temperatura de anillamiento de 60 °C.

El carril 1: representan el patrón de pesos moleculares en ambas figuras; en general el protocolo empleado para la extracción del ADN mostro resultados satisfactorios; teniendo que solo una muestra se degrado o contenía una gran cantidad de proteínas y lípidos que causa que se formen macro-agregados y no migra en la electroforesis.

Los métodos moleculares se han convertido en herramientas importantes para el estudio de los hongos filamentosos; un pre-requisito para estos estudios es el aislamiento del ADN de buena calidad en forma eficiente y rápida (Wessel, 2001).

La extracción de ADN a partir de hongos filamentosos es compleja debido a: la alta cantidad de polisacáridos (80-90) a la dureza de la pared celular, el tiempo requerido que toman los protocolos y las etapas que la conforman surgen problemas de degradación o contaminación (Wessel, 2001).

En la mayoría de los protocolos de extracción de ADN genómico para hongos filamentosos se recomienda utilizar fenol-cloroformo-isoamilico para limpiar el ADN de proteínas y lípidos (Van Burik et al, 1998) y así evitar contaminación o degradación.

Identificación molecular de hongos filamentosos

Se logró obtener una amplia coincidencia en cuanto a genero y especie al analizar las secuencias nucleóticas y compararla con la base de datos NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) y el programa blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Tabla 14).

La secuenciación se realizó en la empresa Macrogen USA, mediante los primers 518F y 800R.

Tabla 14. Secuencias nucleotídicas obtenidas con el programa Blast de la cepa 17.

CEPA	INICIADOR	SECUENCIA
17.-HF	518F	ANNANNNNNNNNCNNNNNCTTNNNGCNTACCTCCCNTCCGTGTC TATTATACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGCTTGTCCGGCCG CCGGGGGGGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAG ACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGAT TGAATGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGTTCC GGCATCCATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAAT TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGC CCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCT GCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTGCGCGTCCCCCTCTC CGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCG ATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACATGCTCTGTAGGATTGG CCGGCGCCTGCCGACGTTTTCCAACATTTTTCCAGGTTGACC TCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATNANAAA GCGGAAAGGNNNNNNNNNNNAAAAAAAAANNNNNNNANNAAAA AAAAANNNNNNNNANNNNNNANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
	800R	TCCGNNNNTCGNNNNNNNTGGACNAACCTCCNATCCGTGTCTAT TATACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGCTTGTCCGGCCGCCG GGGGGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACC CCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGA ATGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGTTCCGGC ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGC AGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCC CTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC CTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTGCGCGTCCCCCTCTCCGG GAGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGNCCGATCC TCGAGCGTATGGGGCTTTGTACATGCTCTGTAGGATTGGCCG GCGCCTGCCGACGTTTTCCAACATTTTTCCAGGTTGACCTCG GATCAGGCAGGGATACCCGCTGAACTTCANCATATNAANAAAAAN NNAANAAANNANNNNNNNNAANNNNNNNNANNNN

Blast

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Aspergillus tubingensis strain 1234 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosome	981	981	83%	0.0	99%	KF435033.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus niger isolate sun-3 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RN	981	981	83%	0.0	99%	FJ517551.1

Figura 41. Descripción obtenida del hongo filamentoso con el programa Blast (primers 518F).

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Aspergillus tubingensis isolate F4-04 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcri	959	959	89%	0.0	99%	JN561261.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus niger strain SCAU-F-99 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcrib	957	957	89%	0.0	99%	KF881765.1

Figura 42. Descripción obtenida del hongo filamentoso con el programa blast (primers 800R).

Se pudo identificar molecularmente solo la cepa 17.-HF, contemplando los resultados de la alineación (anexos); descripción del microorganismo (figura 41), el score, cobertura y % de identificación, con los dos primers; se obtuvo el mismo % de identificación relacionandolo con el máximo score, por lo cual se determinó que la cepa pertenece al género y especie de ***Aspergillus tubingensis Strain 1234*** con el código de acceso **KF435033.1** que fue el que mostro el máximo score con el primer 518F, con un % de identificación de 99% según datos obtenidos en Blast.

El ***Aspergillus tubingensis*** es una especie de ***Aspergillus*** que pertenece a la sección de *Aspergillus Nigri* que incluye especies que se asemejan morfológicamente al *Aspergillus niger*.

La sección Nigri es una de las más complejas del género y está basada fundamentalmente en criterios morfológicos. En una de las últimas revisiones se creó el agregado *A. niger*, constituido por dos especies, seis variedades y dos formas. En un intento de clarificar la taxonomía del agregado, se ha propuesto la división del agregado en dos especies, morfológicamente indistinguibles, denominadas ***A.nigery*** ***A.tubingensis*** atendiendo a patrones de RFLP obtenidos del DNA total.

Estas especies son características por su rápido crecimiento en piensos y materias primas, generalmente es ***Aspergillus tubingensis*** se encuentra en ciruela pasa y pimienta (Silva, D. M., Batista, et al. 2011).

Conclusiones

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



Se conservaron 22 de hongos filamentosos que en su mayoría presentaron degradación de ácido tánico y que servirán para otras investigaciones.



Se obtuvieron 3 cepas 7.-HF, 16.-HF, 17.-HF que producen mayor halo de degradación de la enzima tanasa en CMS con ácido tánico.



Se estableció el protocolo de la FMS con orégano, y se comprobó la hipótesis teniendo que, los hongos filamentosos, utilizaron el orégano como fuente de carbono y energía, además de carbohidratos y proteínas que se encuentran el soporte vegetal. La cepa más adecuada para la producción de enzima tanasa es la 7.-HF y 17.-HF.



Se logró identificar molecularmente la cepa 17.-HF; asignándole el nombre de ***Aspergillus tubingensis Strain 1234*** con el código de acceso **KF435033.1** y un porcentaje de identificación del 99.

Perspectivas de investigación



Aplicaciones de las cepas purificadas, para la generación de enzimas útiles en la industria alimentaria y de otras cepas que se presentan en este trabajo que presentaron también halo de degradación.



Purificación y caracterización total de la enzima tanasa.



Es recomendable optimizar las condiciones de producción de la enzima tanasa en FES utilizando el soporte vegetal (orégano), y de esa manera obtener mejores resultados de actividad enzimática.



Sería de gran relevancia evaluar la estabilidad de la enzima, condiciones de pH, aw del sustrato, entre otros factores.



Producción, purificación y caracterización de alguna otra enzima

Bibliografía

- Banerjee, R., G. Mukherjee and K.C. Patra, 2005. Microbial transformation of tannin-rich substrate to gallic acid through co-culture method. *Bioresource Technol.*, 96: 949-953. DOI:10.1016/j.biortech.2004.08.004.
- Medina, M.A., R. Belmares, A. Aguilera-Carbo, R. Rodriguez-Herrera and C.N. Aguilar, 2010. Fungal culture systems for production of antioxidant phenolics using pecan nut shells as sole carbon source. *Am. J. Agric. Biol. Sci.*, 5: 397-402. DOI:10.3844/ajabssp.2010.397.402
- Melendez-Renteria, P., Nevarez-Moorillon, V., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2012). Solid state fermentation of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) waste. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, 7.
- Lekha P.K y Lonsane B.K (1997) production and application of tannin acyl hydrolase: state of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Adv. In App Microb.*, Vol.44.
- Deschamps A.M., Mahoudeau G., Conti M. y Lebeault 3-M (1980) bacteria degrading tannic acid and related compounds. *J. ferment. Technol.*, vol. 58, No.2.
- Ajay K.R., Gunasekaran y Lakshmanan (1999). Biodegradation of tannin acid by *Citrobacter freundii* isolated from tannery effluent. *J. Basic Mic.*, Vol. 39, No.3.
- Osawa R., Kuroise K., Goto S., y Shimizu A. (2000) isolation of tannin-degrading *Lactobacilli* from humans and fermented foods. *Appl and Envir Microb.* Vol 66, No.7.
- Pedroza, A. M., Matiz, A., Gomez, D. (2001) Manual de laboratorio: Introducción a la biotecnología. Pontificia Universidad Javeriana. 27-32p.
- Aguilar, C.N. y Gutiérrez-Sánchez, G. (2001). Sources, properties, and potential uses of tannin acyl hydrolase (3.1.1.20). *Food Science and Technology International* 7, 373-382.
- Sharma, S., Bhat, T.K. y Dawra, R. (2000). A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. *Analytical Biochemistry* 279, 85-89.
- Mondal, K.C and Pati, B.R. (2000) Studies on the extracellular tannase from newly isolated *Bacillus licheniformis* KBR 6.J. *Basic Microbiol.*, 40 (4); 223-232.
- Ramirez-coronel, M.A (2000) Purificación y caracterización de una tanasa de *Aspergillus niger* Aa-20, producida por fermentación en medio sólido. Tesis De Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa
- Abdelwahed, A., Bouhlel, I., Skandrani, I., Valenti, K., Kadri, M., Guiraud, P., Steiman, R., Mariotte, A.M., Ghedira, K., Laporte, F., Dijoux-Franca, M.G. & Chekir-
- Adachi O., M.Watanabe and H. Yamada (1971). Physicochemical properties of the tannase from *Aspergillus flavus*. *Agricultural and Biological Chemistry* 32:1079 –1085.
- Aguilar, C.N. y Gutierrez-Sanchez, G. 2001. Sources, properties and uses of tannin acyl hydrolase. *Food Science and Technology International*. 7 (5), 373-382.

- Aguilar G. C. N., J. C. Contreras, R. Rodríguez, L. A. Prado y O. Loera. 2004. Differences in fungal enzyme productivity in submerged and solid state.
- Aguilar, C.N. & Gutiérrez-Sánchez, G. (2001). Review: sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. *Food Science and Technology International* 7 (5): 373 - 382.
- Aguilar, C.N., Rodríguez, R., Gutiérrez- Sánchez, G., Augur, C., Favela-Torres, E., Prado-Barragán, et al. (2007). Microbial tannases: advances and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76 (1): 47 - 59.
- Aguilar, CN, Rodríguez R, Gutiérrez-Sánchez G, Augur C, Favela-Torres E, Prado-Barragán LA, Ramírez- Coronel A y Contreras-Esquivel JC. (2007). Microbial tannases:advances and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* Vol. 76, No. 1, pp. 47 – 59.
- Aissam, H., Errachidi, F., Penninckx, M.J., Merzouki, M. & Benlemlih, M. (2005). Production of tannase by *Aspergillus niger* HA37 growing on tannic acid and olive mill waste waters. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21 (4): 609 - 614.
- Albertse, E.H. (2002). Cloning, expresion and characterization of tannase from *Aspergillus* species. Magister Thesis: Faculty of Natural and Agricultural Sciences Department of Microbiology and Biochemistry. University of the Free State Bloemfontein. South Africa.
- Aoki K., R. Shinke and H. Nishira (1976).Purification and some properties of yeast tannase.*Agricultural and Biological Chemistry* 40:79 –85.
- Badui Dergal S. (1993). *Química de los Alimentos*. México.
- Bajpai B. and Patil S. (1 997). Induction of tannin acyl hydrolase (EC 3. 1. 1. 20) activity in some members of fungi imperfecti. *Enzyme and Microbial Technology*, 20: 612 - 614.
- Bajpai B. and S. Patil (1996).Tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Trichoderma*.*World Journal of Microbiological and Biotechnology* 12: 217 – 220.
- Barthomeuf C., F. Regeat and H. Pourrat (1994a). Production, purification and characterization of a tannase from *Aspergillus niger* LCF 8. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 77 (3):137 –142.
- Begovic S. and E. Duzic (1977).*Vetenaria* 26: 227 –233. In: Lekha P. and Lonsane B. (1997). Production and application of tannin acyl hydrolase:state of the art. *Advances Applied Microbiology* 44: 215 –260.
- Belmares R, Contreras-Esquivel JC, Rodríguez-Herrera R, Ramírez- Coronel A y Aguilar CN. (2004). Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry. *Lebensm.Wiss.U.- Technol.* 37. pp. 857 – 864.
- Beverini M. and M. Metche (1990).Identification, purification and physicochemical properties of tannase of *Aspergillus oryzae*.*Science of Aliments* 10: 807 –816.
- Bonifaz A. *Micología medica básica*. 3ª ed. México. McGraw-Hill 2009:8-30.
- Bradoo S., R. Gupta and R.K. Saxena (1997).Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tannase from *Aspergillus japonicus*.*Process Biochemistry* 32: 135 –139.
- Hernández Hernández L.

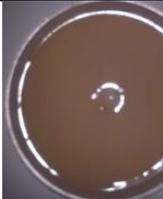
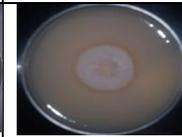
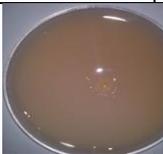
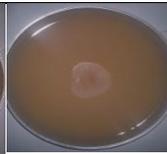
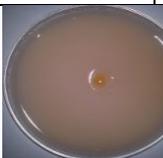
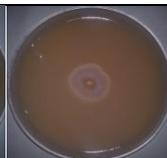
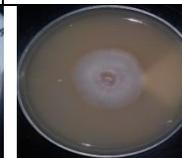
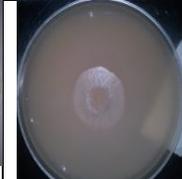
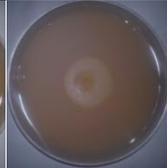
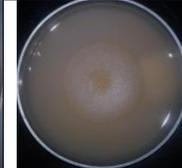
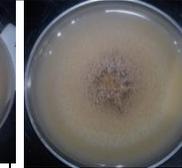
- Cannel E. and Moo-Young M. 1980. Solid-State fermentation systems. *Procc. Biochem.*, 15, 2-7.
- Costa M.A., Ribeiro X.W., Monteriro A.R. y Peralta R.M. 2008. Production of tannase by *Aspergillus tamaritii* in submerged cultures. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 51:399 – 404.
- Cristobal Noe A.G, 2000, inducción y represión de la síntesis de la tanasa de *aspergillus niger* Aa-20 en cultivo medio líquido y sólido. *cultures. Food Science Biotechnology*. 13: 109-113.
- Durand, A., Renaud, R., Almanza, S., Maratray, J., Diez, M., y Desgrangesm C. (1993). Solidstate fermentation reactors: from lab scale to pilot plant. *Biotechnology Advances* 11, 591-597.
- Esau, K. 1977. *Anatomy of seed plants*. 2ª ed. Wiley, New York. Fahn, A. 1974. *Plant Anatomy*. 2ª ed. Pergamon Press, Oxford.
- Farias, G.M., Gorbea, C., Elkins, J.R. & Griffin, G.J. (1994). Purification, characterization and substrate relationships of the tannase from *Chryphonectria parasitica*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 44 (1): 51 - 63.
- Field J., Lettinga G., Habets L.H.A. (1990). Measurement of Low Molecular Weight Tannins: Indicators of Methanogenic Toxic Tannins. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 69 (3): 148-1 53.
- Freudenberg K., F. Bummel, and T. Frank (1927). Tannin acyl hydrolase. *Zeitschrift fur Physiologische Chemie* 164: 262 –270.
- Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F.J. & Mantecón, A.R. (2004). Review. Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research* 2 (2): 191 - 202.
- García –Peña, I., Augur, C., and Favela-Torres, E. 1999. Purificación de tanasa producida por *Aspergillus Niger* en fermentación en medio sólido. En: *Avances En Purificación Y Aplicación De Enzimas En Biotecnología* (prado, A., Huerta, S., Rodriguez, G., Saucedo, G. eds.) pp.247-261. México. Ediciones UAM-Iztapalapa.
- García-Peña, I. (1996). Producción, purificación y caracterización de tanasa producida por *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido. M.Sc. Thesis. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. México.
- Germosén-Robineau, L. ed. "Farmacopea Vegetal Caribeña" 2a ed. Enda-caribe Santo Domingo 2005.
- Ghedira, L. (2007). Study of antimutagenic and antioxidant activities of Gallic acid and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus* confirmation by microarray expression profiling. *Chemico-Biological Interactions* 165 (1): 1 - 13.
- Hagerman A., Rice M., Ritchard N. (1 998). Mechanism of protein presipitation for two tannins, Pentagaloylglucose and Epicatechin16(4-8) Catechin (Procyanidin). *J. Agric. Food. Chem.*, 46: 2590-2595.
- Hamdy, H.S. (2008). Purification and characterisation of a newly isolated stable long-life tannase produced by *F. subglutinans* (Wollenweber and Reinking) Nelson et al. *Journal of Pharmaceutical Innovation* 3 (3): 142-151.
- Haslam, E. & Stangroom, J.E. (1966). The esterase and depsidase activities of tannase. *Biochemical Journal* 99 (28): 28 - 31.
- Hernández Hernández L.

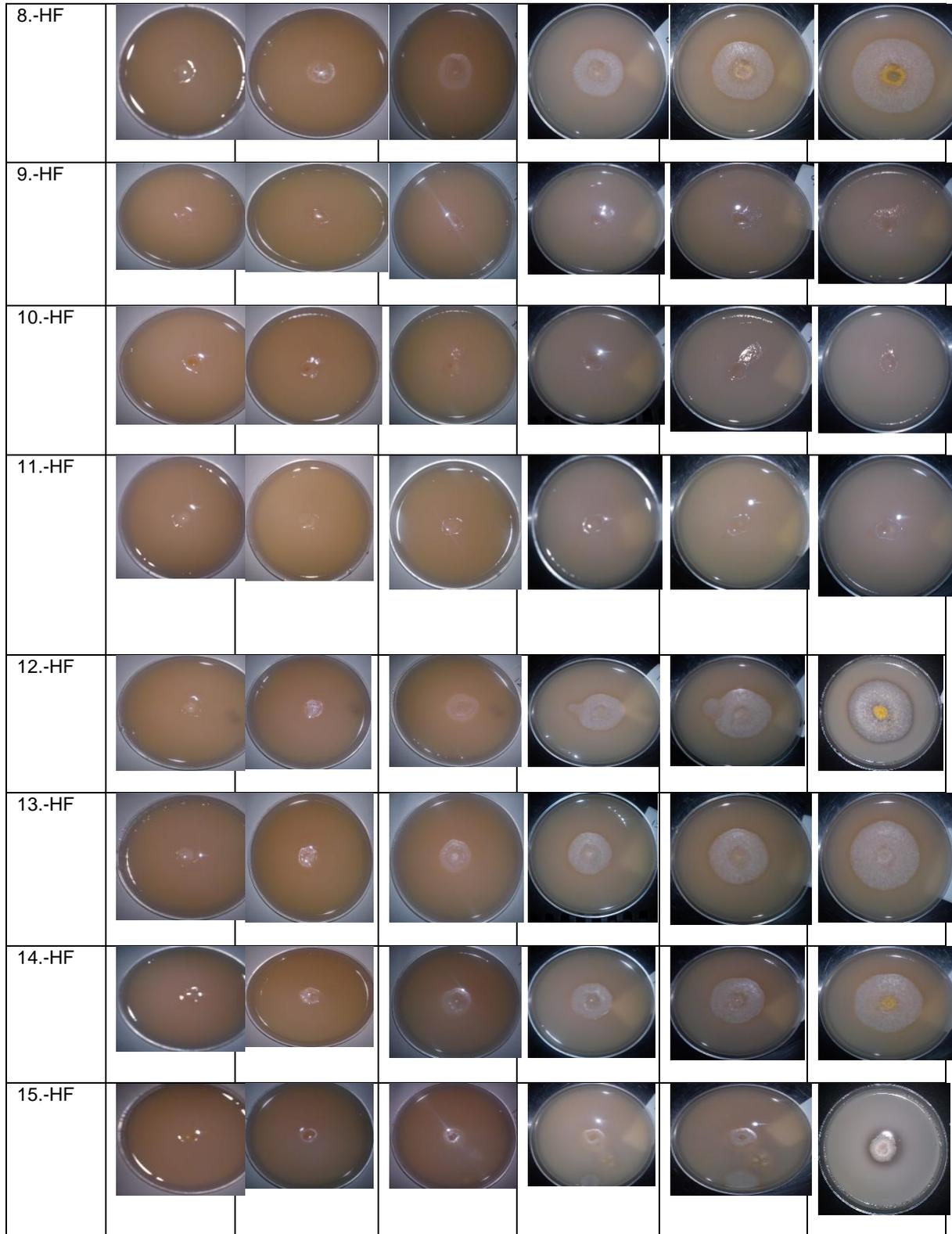
- Haslam, E. and R. Tanner (1970). Spectrophotometric assay of tannase. *Phytochemistry* 90: 2305 – 2309.
- Hernández Ángel, M. L. García Bacallao, D. M. Rojo Domínguez y D. Olivares
- Huerta, O. S. 2000. Temperatura, contenido de humedad, Aw, pH. Memorias del curso teórico-práctico de fermentación en medio sólido. Iztapalapa, México, D. F.
- Iliuta, I., Iliuta, M. C., Larachi, F. (2005). Hydrodynamics Modeling of Bioclogging in Waste Gas Treating Trickle-Bed Bioreactors. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 44 (14), 5044-5052.
- Kar, B., Banerjee, R. & Bhattacharyya, B.C. (2003). Effect of additives on the behavioural properties of tannin acyl hydrolase. *Process Biochemistry* 38 (9): 1285 - 1293.
- Kasieczka-Burnecka, M., Kuc, K., Kalinowska, H., Knap, M. & Turkiewicz, M. (2007). Purification and characterization of two cold-adapted extracellular tannin acyl hydrolases from an antarctic strain *Verticillium* sp. P9. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77 (1): 77 - 89.
- Khanbabaee K. and van Ree t: Tannins 2001: Classification and definition. *Nat. Prod. Rep.* (18) 641-649.
- Knudson, L. (1913). *Journal of Biological and Chemistry* 14: 159 –207.
- Laukevics J.J., Apsite A.F: Viesturs H.E. and Tengerdand R.P. 1984. Solid substrate fermentation of wheat straw to fungal protein. *Biotechnol Bioeng.*, 26, 1465-1480.
- Lekha, p., and Lonsane, B. 1997. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Adv Appl Microbiol* 44:215-260.
- Libuchi, S., Y. Minoda and K. Yamada (1972). Hydrolyzing pathway, substrate specificity and inhibition of tannin acyl hydrolase. *Agricultural and Biological Chemistry* 36: 1553 –1568.
- López - Martínez R, Méndez-Tovar U, Hernández -Hernández F, Castañón-Olivares R. *Micología médica*. México. Trillas 2004:25-30.
- López Carracosa, J; Modrego, A. (1993). *La biotecnología y su aplicación industrial en España*. Printed in Spain.
- Madhavakrishna, W., S. Bose, and Y. Nayudamma (1960). Estimation of tannase and certain oxidising enzymes in Indian vegetables tanstuffs. *Bulletin of Central Leather Research Institute* 7: 1 –11.
- Marcano, D. y M. Hasegawa “Fitoquímica orgánica” Universidad Central de Venezuela, Caracas 1991.
- McLeod M.N. (1974). Plant tannins - their role in forage quality. *Nutrition Abstract and review*, 44 (1): 803-815.
- McMahon, Lr.; McAllister. T.A.: Berg, B. P.; Majak, W.; Acharva, S.N.; Popp, J.D.; Coulman, B.E.; Wang, Y. and Cheng, K-J. 2000. A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. *Canadian Journal of plant Science*, 80, 469-485.

- Méndez T. Reproducción Asexual: Conidiogenesis Y Esporangiosporogenesis. En: López-Martínez R, Méndez-Tovar Lj, Hernández -Hernández F. Actualidades En Micología Medica 4ª Ed. México. UNAM 2008:33-37.
- Mitchell D. A., M. Berobic y N. Krieger. 2000. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*. 68:65-69.
- Mitchell, D. A., von Meien, O. F., Krieger, N. (2003). Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bio-reactors. *Biochemical Engineering Journal* 137-147.
- Montoya Villafañe H.H, (2008). Microbiología básica para el área de la salud y afines. Antioquia.Aguilar, C. N. 1998. Producción de enzimas en sistemas de fermentación. Reporte interno. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México, D.F.
- Morcillo Ortega G. (2013); Cortes Rubio E.; García López J.L. (2013). Biotecnología y alimentación. Madrid.
- Mukherjee, G. & Banerjee, R. (2006). Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by a co-culture of *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus foetidus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22 (3): 207 - 212.
- Naidu, R.B., Saisubramanian, N., Selvakumar, D., Janardhanan, S. & Puvanakrishnan, R. (2008). Partial purification of tannase from *Aspergillus foetidus* by aqueous two phase extraction and its characterization. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* 2 (1): 201 - 207.
- Nierenstein, M. (1930). *Nature* 125: 348 –342.
- Nishira, H. and N. Mugibayashi (1953). Tannin decomposing enzyme of molds. XI Formation of tannase by various molds on wheat bran medium. Hyogo, Noka, Diagaku, Kenkyu, Hokoku, Nogeikagaku, Hen 4:113 –116.
- Nishira, H. 1961. *Hakko Kogaku Zasshi*. 39:137-146.
- Okamura S., Mizusawa K., Mamori K., Takei K., Imai Y. and Ito S. Fermentative manufacture of tannase. Japan Patent 62394981, 1987.
- Osawa R. (1992). Tannin protein complex-Degrading Enterobacteria Isolated from the alimentary Tracts of Koalas and selective Medium for their Enumeration. *Applied and Environ. Microbol.*, May 58 (5): 1754-1759.
- Padilla, Rev Cubana Invest Biomed; 22(1). (2003)
- Pandey A. 2003. Solid-State Fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13: 82-84.
- Pedraza Bucio F.E.; Rutiaga Quiñones J.G.; 2011, *Ciencia Y Tecnología*, ISSN-e 1405-5597, N°. 42, 2011, págs. 36-41.
- Rajakumar, G. and S. Nandy (1983). Isolation, purification and some properties of *Penicillium chrysogenum* tannase. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 525 –527.
- Revista Chapingo: Serie Zonas Aridas Vol: 1(1): 1-6, 2000
- Romero, B. 2006. Avances en la taxonomía y sistemática de los hongos: una revisión general. 66.
- Hernández Hernández L.

- Sanderson, G., N. Englewood, P. Coggon and N. Orangeburg (1974). Green tea conversion using tannase and natural tea leaves. U.S. Patent 3, 812, 266.
- Scalbert A. (1991). Antimicrobial Properties of Tannins. *Phytochemistry*, 30 (1 2):3875 -883.
- Seiji, D., S. Atsuhiko, E. Toshio and T. Gyozo (1973). *Hakko Kogaju Zasshi* 51: 768–771.
- Sora, M.E. 1984. Algunas consideraciones nutricionales y químicas de sorgos con diferente contenido de taninos. Tesis M.C. México.
- Strumeyer D.H. and Malin M.J. 1970. Resistance of extracellular yeast invertase and other glycoproteins to denaturation by tannins. *Biochem. J.*, 118, 989-991.
- Viniegra González, G. (2003). Producción de enzimas por *Aspergillus*. *Revista Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería* 8, 18-30.
- Warnock DW. Fungal diseases: an evolving public health challenge. *Med Mycol.*2006;44:697–705
- White T. 1957. Tannins their occurrence and significance. *J. Sci. Food Agric.*, 8, 377-384.
- Wrangham R.W., Waterman P.G. (1 983). Condensed Tannins in fruits Eaten by Chimpanzees. *Biotropica*. 15 (3): 21 7-222.
- Yamada H., Adachi. O., Watanabe..M..and Sato N,1968. Studies on fungal tannase,Part I. *Agric. Biol. Chem.*..32. 1070-1078.
- Yamada, K., S. Iibuchi And Y. Minoda (1968). Studies on tannin acyl hidrolase of microorganisms. Isolation and identification of molds and studies on the conditions of cultivation. *Agricultura and Biological Chemistry*. 45: 233-240.
- Belmares-Cerda, 2004. Composición y degradación fúngica de algunos compuestos polifenólicos presentes en plantas del semidesierto mexicano. Tesis nivel maestría U A de C
- VÁZQUEZ-FLORES, A. A., ALVAREZ-PARRILLA, E. M. I. L. I. O., & LÓPEZ-DÍAZ, J. A. (2012). Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo.
- Melendez-Renteria, P., Nevarez-Moorillon, V., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2012). Solid state fermentation of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) waste. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, 7
- Silva, D. M., Batista, L. R., Rezende, E. F., Fungaro, M. H. P., Sartori, D., & Alves, E. (2011). Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *nigri* using polyphasic taxonomy. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(2), 761-773.

Anexos

HONGO	0	1	2	3	4	5
1.-HF						
2.-HF						
3.-HF						
4.-HF						
5.-HF						
6.-HF						
7.-HF						



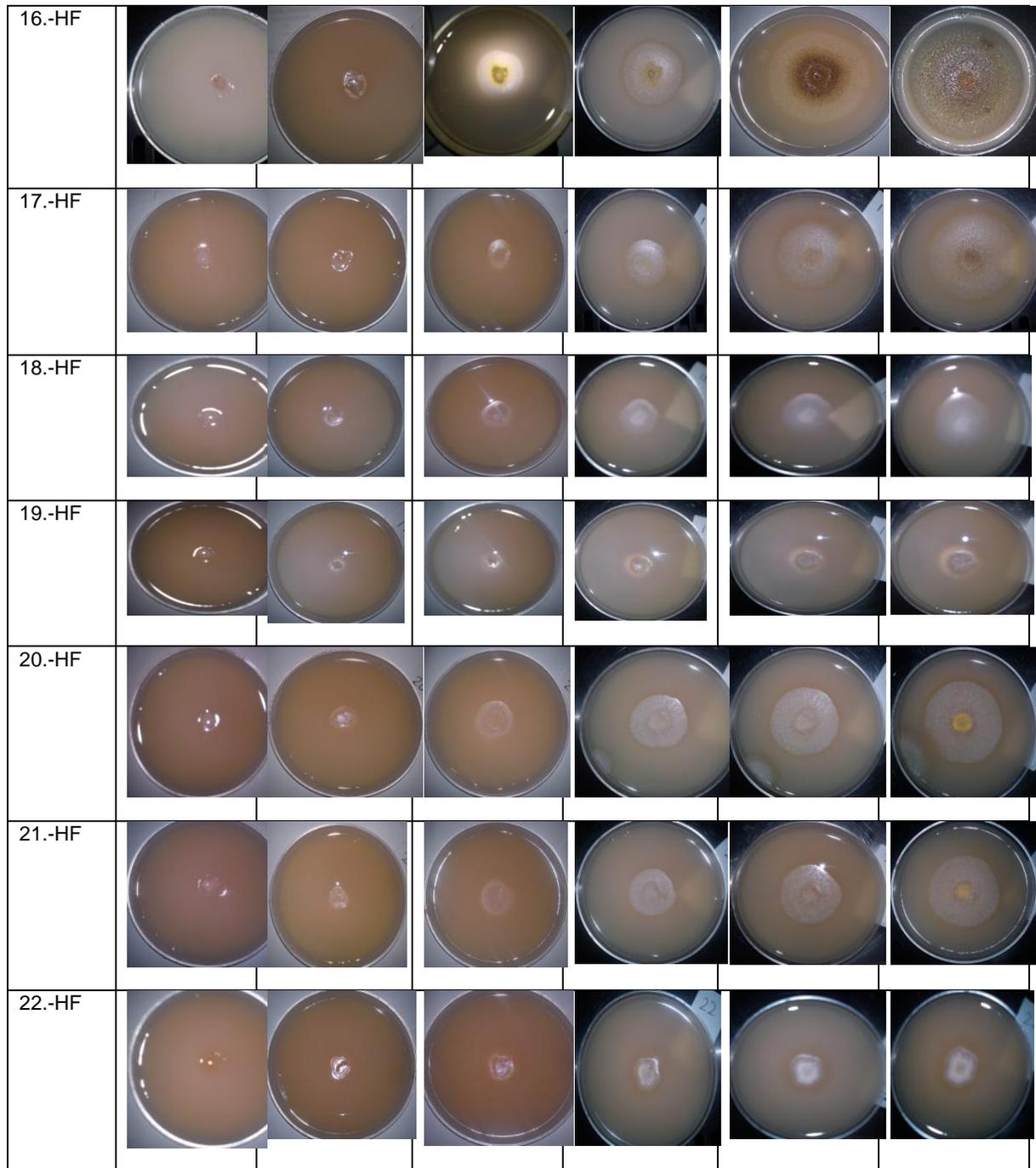


Figura 43. Ensayo con Ácido Tánico

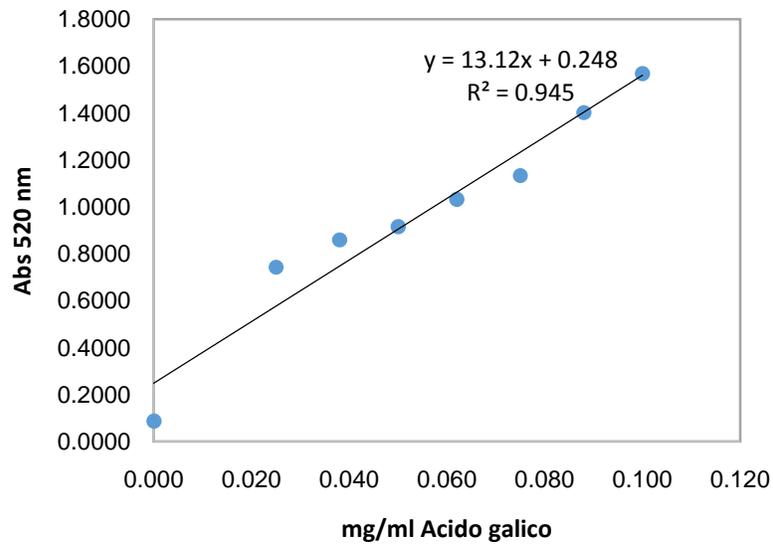


Figura 44. Curva patrón de actividad tanasa

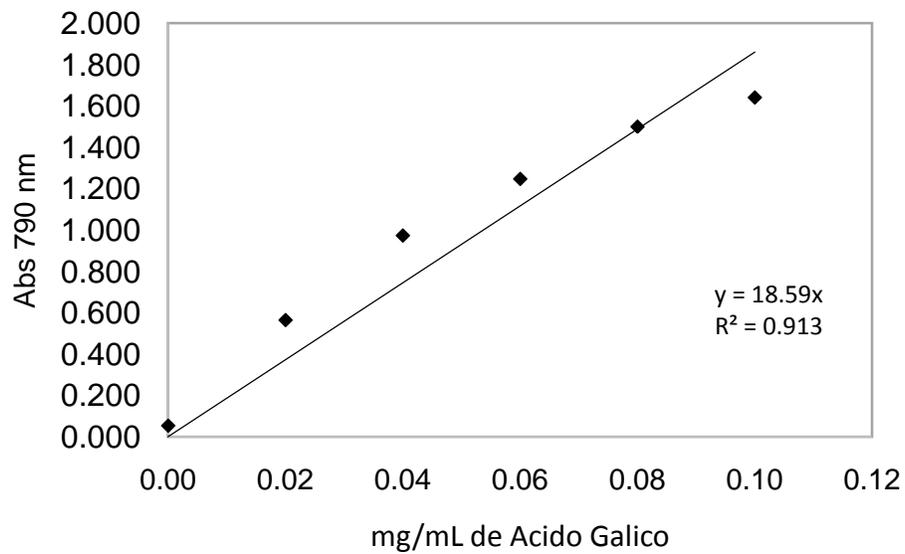


Figura 45. Curva patrón de fenoles hidrolizables.

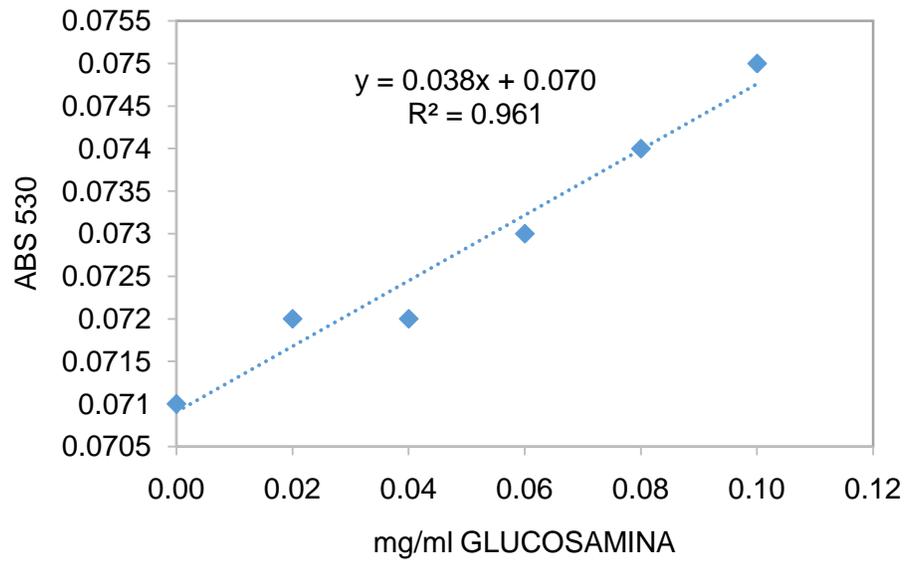


Figura 46. Curva patrón de biomasa

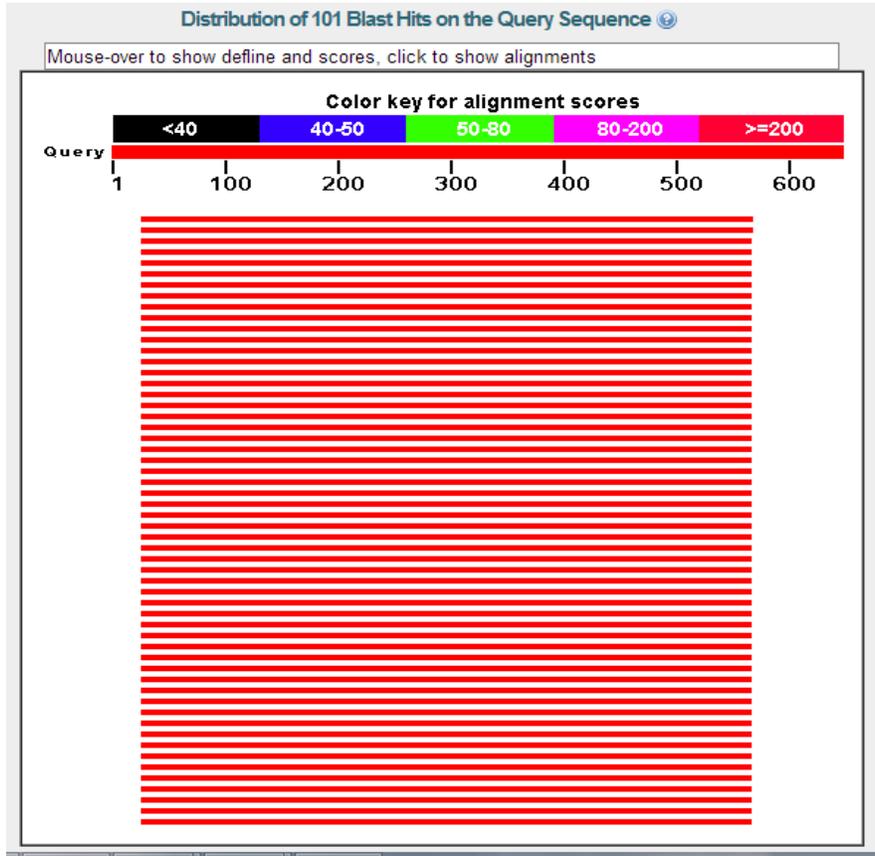


Figura 47. Gráfico de alineación de la cepa 17.-HF (primer 518F)

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Aspergillus tubingensis strain 1234 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA	981	981	83%	0.0	99%	KF435033.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus niger isolate sun-3 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA	981	981	83%	0.0	99%	FJ517551.1

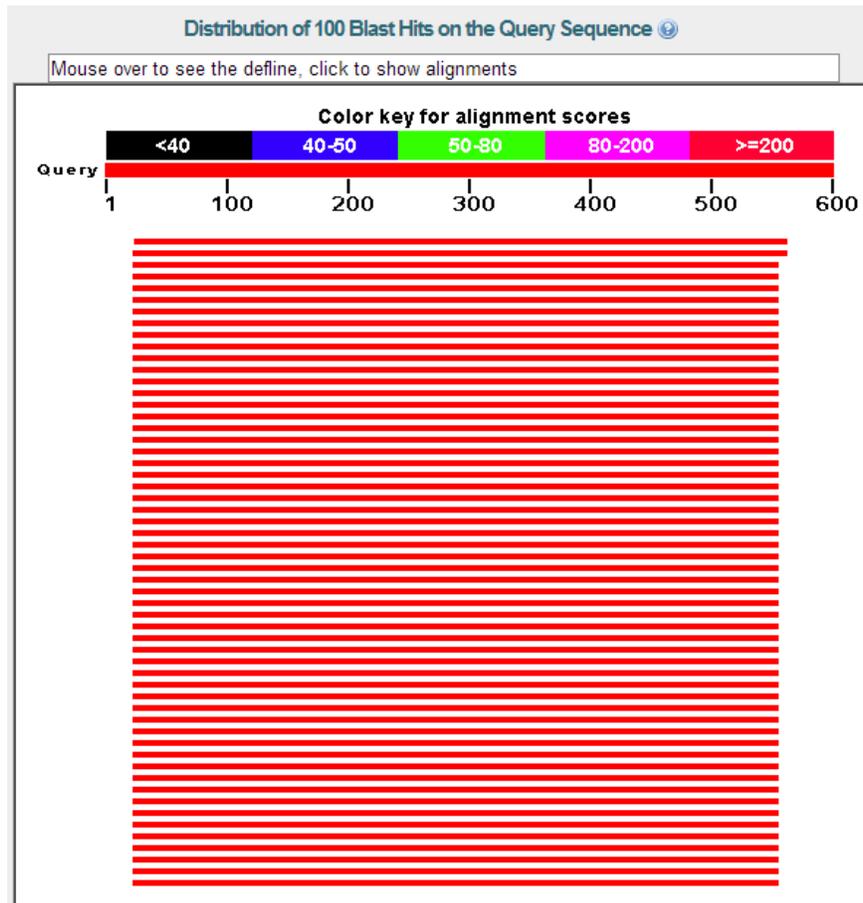


Figura 48. Gráfico de alineación cepa 17.-HF (primer 800)

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Aspergillus tubingensis isolate F4-04 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcri	959	959	89%	0.0	99%	JN561261.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus niger strain SCAU-F-99 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcrib	957	957	89%	0.0	99%	KF881765.1