

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



Aprovechamiento de los residuos de orégano (*Lippia graveolens*) como soporte en
la producción de tanasa fúngica

Presentado por:

Salvador Vega Vicente

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:
INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo Coahuila, México.
Agosto 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Aprovechamiento de los residuos de orégano (*Lippia graveolens*) como soporte en la producción de tanasa fúngica

Presentado por:

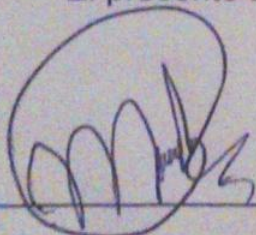
SALVADOR VEGA VICENTE

TESIS

Que Se Somete A Consideración Del H. Jurados Examinador Como Requisito Parcial Para Obtener El Título de:

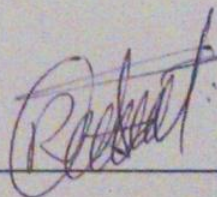
INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

El presente trabajo ha sido dirigido por el siguiente comité:



Dr. Mario Alberto Cruz Hernández

Director



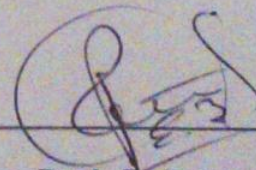
M.C. Armando Robledo Olivo

Co-Director

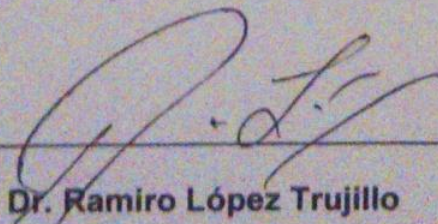


Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez

Asesor



Dra. Ruth Belmares Cerda

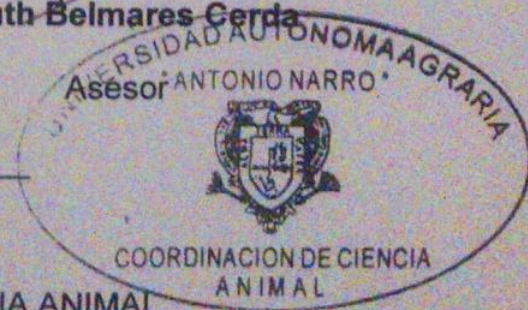


Dr. Ramiro López Trujillo

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Buenavista, saltillo Coahuila

Junio 2014



DEDICATORIAS

A dios por proporcionarme los medios necesarios para hoy terminar un gran
proyecto académico.

A mi familia por todo el apoyo brindado en especial a mi madre por su total apoyo
y confianza.

A mi novia que camino el largo sendero de sacrificios y desvelos para hoy
culminar una de mis más grandes metas.

INDICE

RESUMEN.....	1
OBJETIVOS	4
Objetivo general	4
Objetivos específicos.....	4
HIPÓTESIS	4
JUSTIFICACIÓN	5
REVISIÓN DE LITERATURA	6
Fermentación en medio sólido.....	6
Ventajas y desventajas de la fermentación en estado sólido.....	7
<i>Aspergillus niger</i>	9
Enzimas Extracelulares.....	11
Tanasa (Tanin acil hidrolasa EC 3.1.1.20).....	11
Mecanismos de acción.....	12
Fuentes de obtención.....	13
Producción de tanasa en fermentación en medio sólido.....	14
Aplicaciones de la tanasa.....	15
Taninos.....	15
Definición y clasificación.....	15
Función de los taninos en plantas.....	17
Propiedades biológicas de los taninos.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS	20
ETAPA 1.....	20
Tratamiento de residuos del orégano para uso como soporte inerte.....	20
Medición del índice de absorción de agua (IAA).....	20

Determinación del punto crítico de humedad (PCH)	21
ETAPA 2	21
Selección de cepas fúngicas con mayor actividad tanasa.	21
Determinación de la actividad tanasa	22
ETAPA 3	25
Evaluación de la fuente de carbono en medio sólido.....	25
ETAPA 4	25
Producción estandarizada de crecimiento y actividad tanasa.	25
Evaluación enzimática.....	26
Extracción de enzima tanasa.	26
Determinación de actividad tanasa por el método de rodanina metanólica.	26
Cuantificación indirecta de biomasa fúngica.	27
Determinación de azúcares totales por el método de fenol-sulfúrico	28
Cuantificación de fenoles hidrolizables totales.....	28
Diseño de experimentos	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
ETAPA 1	29
Caracterización del orégano como soporte en FMS.....	29
ETAPA 2	31
Selección de cepas fúngicas con mayor actividad tanasa.....	31
Análisis de biomasa en peso seco.....	32
ETAPA 3.....	33
Evaluación de la fuente de carbono que favorece la producción de tanasa en el residuo de orégano.....	33
ETAPA 4.....	34

Aprovechamiento de los residuos de orégano (*Lippia graveolens*) como soporte en la producción de tanasa
fúngica

Producción óptima de crecimiento y producción.	34
Conclusiones.....	37
ANEXOS.....	38
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	45

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la producción de la enzima tanasa utilizando residuos de orégano (*Lippia graveolens*) como soporte sólido empleando hongos filamentosos. Las cepas con las que se trabajó fueron *Aspergillus niger* LR, *Penicillium* sp. Aisladas del suero de leche en la universidad autónoma agraria Antonio narro, para lo cual, se llevó un análisis de productividad. La producción de enzima tanasa se evaluó mediante la fermentación en medio líquido midiendo la actividad por medio del método de rodanina metanólica, utilizando como sustrato para la síntesis de tanasa un éster del ácido gálico (metil galato). Posteriormente se seleccionó la cepa de mayor actividad y velocidad de producción (*Aspergillus niger* LR) sometiéndola a cinéticas de fermentación en columnas con un 70 % de humedad monitoreando su crecimiento cada 24 horas por 6 días. En los resultados se observó y concluyó que el mejor medio para la producción de actividad tanasa fue aquel medio elaborado a base de sales, A. tánico y melaza como fuente de carbono.

La utilización de residuos de orégano es una alternativa para brindarles un valor agregado y además para aprovechar dichos recursos para la producción fúngica de tanasa ya que es de gran interés industrial.

Palabras claves: *Fermentación en estado sólido, Tanasa, orégano.*

INTRODUCCIÓN

Los productos forestales, generalmente se refieren a la madera que se extrae de los árboles presentes en bosques o selvas, dejando de lado a la mayoría de las especies arbustivas y herbáceas, denominadas recursos forestales no maderables (RFNM). Así mismo, son fuente de alimentos, remedios medicinales y otros productos para el autoconsumo de la población (SEMARNAT, 2009).

En México uno de los RFNM de mayor importancia económica es el orégano. Se aprovechan anualmente más de 6,500 t de hoja seca, actividad que deja una derrama económica superior a los 160 millones de pesos por exportación del 90 % de ésta (SEMARNAT, 2009). La colecta del orégano se realiza en época de lluvias durante los meses de septiembre a octubre. Se corta hasta el 75 % del arbusto que incluye el ramaje con hojas, pero únicamente se comercializa la hoja que representa la variable de interés por su gran valor económico y la cual de acuerdo a García y Ortega (2007) representa aproximadamente el 40 % de la planta. El 60 % restante son tallos y ramas, considerados un material de desecho.

Otro residuo producto del aprovechamiento del orégano es el bagazo, formado por las hojas que quedan después de la extracción del aceite esencial por el método de destilación por arrastre de vapor de agua (Rolando, 2007), que constituye aproximadamente el 95 % en peso seco de su peso inicial (SEMARNAT, 2001). Estos residuos no reciben ningún tipo de aprovechamiento y comúnmente se queman a cielo abierto, se dejan en campo o se depositan en sitios no regulados contaminando el ambiente.

Actualmente los problemas asociados con el manejo y disposición de los residuos son muchos y muy complejos. Los residuos orgánicos como lo son los del orégano, ocupan un lugar sobresaliente en el mundo debido a los impactos ambientales negativos originados por una inadecuada disposición, por el alto contenido en materia orgánica de difícil degradación, que cada vez son más a

causa del incremento de la población, a los procesos de transformación y a los hábitos de consumo de los individuos (Buenrostro, 2006).

Por lo tanto el aprovechamiento de estos residuos y en consecuencia su minimización, contribuye a conservar y reducir la demanda de recursos naturales, a disminuir el consumo de energía, a prolongar la vida útil de los sitios de disposición final y a bajar sus costos.

Existen diversas formas de aprovechar los residuos orgánicos, ya sea como alimento para animales, como fuente de energía, como fuente de abono o como soporte y sustrato en fermentaciones sólidas. Esta última utilizada en este proceso de producción enzimática tanasa, mediante un proceso de oxidación catabólica incompleta también llamada fermentación que da como resultado final a un producto orgánico.

Por todo lo anterior, la finalidad de este trabajo fue aprovechar los residuos generados en el proceso de extracción del aceite esencial del orégano, para producir tanasa fúngica con la finalidad de disminuir costos de producción e impacto ambiental.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el potencial de uso de residuos de orégano como soporte-sustrato en la producción de tanasa fúngica mediante la fermentación en estado sólido en un biorreactor tipo columna.

Objetivos específicos

- Caracterización físico-mecánica del orégano (*Lippia graveolens*) para su uso como soporte-sustrato en FMS.
- Seleccionar la cepa con mayor actividad tanasa empleando los residuos de orégano.
- Evaluar la fuente de carbono que favorece la producción de la tanasa.
- Estandarización de la producción de tanasa fúngica.

HIPÓTESIS

Los residuos generados del proceso de aprovechamiento del orégano podrán ser utilizados como soporte-sustrato para producción fúngica de tanasa con métodos simples de fermentación utilizando un biorreactor de columna.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente México exporta más de 6,500 toneladas de hoja seca de orégano, de las cuales el estado de Coahuila contribuye con 300 toneladas anuales del total nacional, procedente de 15 ejidos de los municipios de Ramos Arizpe, General Cepeda y Parras, generando divisas por alrededor de 40 mdp anuales. Una pequeña cantidad de esta producción, se utiliza para extraer el aceite esencial en diversos equipos; algunos de ellos con una capacidad de procesamiento aproximada de 200 kg de hoja seca por día. De este proceso se generan aproximadamente 98 % de residuos entre bagazo de hoja y tallos, lo cuales comúnmente se queman a cielo abierto o se depositan en sitios no regulados contribuyendo negativamente en el ambiente.

En la actualidad existen diferentes investigaciones de la hoja de orégano, orientadas principalmente a la extracción del aceite esencial y obtención de compuestos con propiedades antimicrobianas, antialérgicas, antiinflamatorias, estrogénicas, entre otras (González, 2007).

Por lo anterior, el Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio narro, desarrollo una investigación con la finalidad de aprovechar los residuos de orégano (hojas), para obtener tanasa fúngica a partir de una fermentación sólida, y que en un futuro cercano repercuta en el ingreso económico de las industrias de las zonas recolectoras de orégano.

REVISIÓN DE LITERATURA

Fermentación en medio sólido.

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

Las fermentaciones de estas características son aquellas en las cuales el sustrato no está disuelto ni en suspensión en un gran volumen de agua.

La fermentación en medio sólido ofrece una serie de ventajas económicas sobre los procesos convencionales de fermentación sumergida para la obtención de productos de alto valor agregado (Castillo *et al.*, 2000), como etanol, enzimas, antibióticos, hongos comestibles, ácidos orgánicos, aminoácidos, pigmentos, metabolitos secundarios, etc. (Holker *et al.*, 2004; Pandey, 1994; Pandey *et al.*, 1999; Pandey *et al.*, 1988; Vandenberghe *et al.*, 2000), debido a los bajos niveles de humedad y a la disminución del volumen del medio por unidad de peso de sustrato, además de que se obtiene una alta productividad, los volúmenes de fermentación son menores a los sistemas sumergidos y el tratamiento del efluente es reducido (Aguilar *et al.*, 2001).

Ventajas y desventajas de la fermentación en estado sólido.

Pérez-Guerra *et al.*, (2003) consideran como ventajas los siguientes aspectos:

- Los medios de cultivo son simples; generalmente subproductos agrícolas que presentan un alto contenido de los nutrientes necesarios.
- La baja actividad del agua es de gran ayuda para evitar las contaminaciones, especialmente de bacterias y levaduras.
- La aireación forzada es facilitada por la porosidad del soporte, lo que permite una alta transferencia de oxígeno al microorganismo.
- El proceso de recobrado es simplificado. Algunos productos son utilizados integralmente como alimento animal, productos para el control biológico, etc.

Entre las principales desventajas se encuentran:

- Su aplicación se limita a microorganismos que crecen en bajos contenidos de humedad. La extracción del calor metabólico puede ser un problema, sobre todo cuando se trabaja a gran escala y no se controla el proceso.
- La naturaleza sólida del sustrato trae problemas al medir los parámetros de la fermentación, tales como el pH, la temperatura, el contenido de humedad y la concentración de sustrato y productos.
- Muchos aspectos ingenieriles como el diseño de reactores y el escalado están muy poco caracterizados.
- El tiempo de fermentación es mayor debido a que generalmente se utilizan microorganismos que presentan bajas velocidades específicas de crecimiento.

En todo proceso hay un equipo crítico donde se forman los productos a obtener, en este caso el equipo donde se lleva a cabo la fermentación es llamado “biorreactor” el cual proporciona las condiciones de operación adecuadas para que el microorganismo produzca el compuesto bioactivo deseado.

Los criterios más importantes para el diseño de un biorreactor pueden resumirse del siguiente modo, dependiendo del tipo y fermentación a utilizar (Mitchell *et al.*, 1992; Ruiz-Leza *et al.*, 2007):

La siguiente tabla (1). Muestra las ventajas y desventajas a nivel laboratorio.

1. 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.
2. 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 del microorganismo.
3. El consumo de energía debe ser el mínimo posible.
4. Entradas para la adición de nutrientes y el control del pH.
5. El crecimiento celular es generalmente exotérmico 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.
6. Mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo.
7. Suministrar oxígeno a una velocidad tal que satisfaga el consumo.
8. 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.

Tabla 1. Clasificación ventajas y desventajas de birreactores a nivel laboratorio.

BIORREACTOR	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Escala laboratorio		
Columna	Económico, fácil montaje, monitoreo y control de humedad, temperatura, biomasa y CO ₂ . Conexión en forma continua de varias columnas.	Canales preferenciales de O ₂ , dificultad en la toma de muestras y problemas en la eliminación de calor.

Aspergillus niger.

Los hongos representan una diversa variedad de microorganismos. Muchas especies fúngicas juegan roles importantes y benéficos, debido a que son fuente de productos farmacéuticos (antibióticos), mientras otros son usados comúnmente en la manufactura de productos alimenticios y aditivos. Sin embargo, también existen especies que ocasionan daños y se consideran microorganismos patógenos de plantas y animales o son agentes de infestación postcosecha.

Aunque los hongos son un grupo grande y muy variado, tres grupos de hongos tienen una gran importancia práctica: las levaduras, las setas y los mohos.

Un hongo filamentos muy conocido es *Aspergillus niger*, el cual pertenece al grupo de *Aspergillus* “negros”. Este grupo de hongos poseen la característica de pigmentación negra en las cabezas conidiales y es probablemente el más común en el género de *Aspergillus*. Una representación esquemática de su morfología se presenta en la Figura 1.

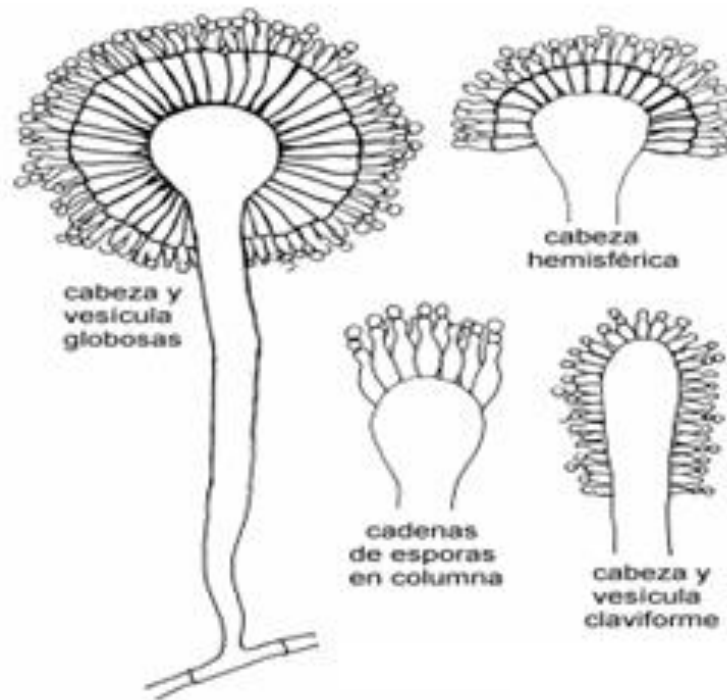


Figura 1. Conidioforos de *Aspergillus*

A. niger está presente en todas partes del mundo y se encuentra en casi todo tipo de sustratos (alimentos, textiles, pieles, plantas, etc.). Se han realizado estudios de la degradación de los taninos y se han encontrado microorganismos resistentes, entre los que se destaca el deuteromiceto *A. niger*, pues se tiene noticia que pueden tolerar hasta 100 g/L de ácido tánico (Aguilar, 2000; Ramírez 2000).

Enzimas.

Una enzima es un catalizador biológico que lleva a cabo reacciones bioquímicas a muy altas velocidades y con un elevado grado de especificidad. En su ausencia la mayoría de las transformaciones químicas requeridas para mantener activas las células tardarían mucho tiempo en efectuarse o simplemente no procederían. (Gacesa P. Y Hubble J, 1990).

Enzimas Extracelulares

Los microorganismos producen una amplia variedad de enzimas potencialmente útiles, muchas de las cuales son excretadas al medio. La mayoría de las enzimas extracelulares son producidas por organismos pertenecientes a dos géneros: *Bacillus* y *Aspergillus*, y que en su mayoría son del tipo hidrolítico. (Godfrey T y Reichelt J, 1983).

La síntesis de enzimas extracelulares es generalmente regulada por una complicada red de relaciones metabólicas y la actividad enzimática puede ser influenciada por algunos compuestos que la inhiben o la inducen para asegurar la coordinación óptima del metabolismo celular. (Cornish-Bowden y Cárdenas, 1987).

Tanasa (Tanin acil hidrolasa EC 3.1.1.20).

Es usada extensivamente en la industria de los alimentos, bebidas, farmacéutica y química (Lekha y Losane, 1997). Esta enzima cataliza enlaces de tipo éster de taninos hidrolizables y compuestos galatos. Además uno de los principales productos del rompimiento hidrolítico del ácido tánico es el ácido gálico, el cual tiene aplicaciones en la industria farmacéutica en la síntesis química del trimetoprim que es un potente antioxidante de alto interés en la industria alimentaria (Aguilar y Gutiérrez-Sánchez, 2001).

Se han realizado numerosos trabajos acerca de la producción, aislamiento, purificación y características de la tanasa producida por especies de *Aspergillus* en fermentaciones. Por su parte (Maldonado y Strasser de Saad 1998) reportaron que la diferencia física del tipo de sistema de cultivo influye directamente sobre la fisiología que exhiben los microorganismos durante su crecimiento, y demostraron que la composición de la membrana celular de *A. Niger* difiere cuando se desarrollan en MCL o MCS, sobre todo en el tipo y contenido de ácidos grasos. Por lo tanto se siguen diferencias en los transportes de nutrientes. Estos

estudios permitieron la obtención de las propiedades de la tanasa producida por *A. niger* que se resumen a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2: Propiedades de la tanasa producida por *A. niger* en fermentación en medio líquido.

Característica.	Valor
Punto isoeléctrico	4.3
Peso molecular	186.000
Azucares	43%
pH óptimo	
actividad tanasa	6.0
actividad esterasa	5.0
pH de estabilidad	3.5-8.0
Temperatura óptima	35 °C
Temperatura de estabilidad	4-45 °C
Inhibidores (% de inhibición)	DPF, ZnCl ₂ , FeCl ₃ , CuSO ₄
Inactivadores	o-fenantrolina, P.M.S.F, EDTA-2-mercaptoetanol-tioglicolato de sodio-MgSO ₄ , CaCl ₂ , MnCl, CoCl ₂

Mecanismos de acción.

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 entre dos grupos galoil (enlace depsida) (Aguilar y Gutierrez Sánchez, 2001; Kaiseczka-Burnecka y col., 2007). Se ha propuesto que la tanasa tiene actividad esterasa y depsida independientes y que su especificidad depende de las condiciones de cultivo (Haslam y Stangroom, 1966; Beverini y metche, 1990; Farias y col., 1994).

Su actividad podría resumirse de la siguiente forma:

Tabla 3. Tipos de actividad enzimática mostrados por la enzima, dependiendo del sustrato presente.

	<i>Tipo de actividad</i>	<i>Actúa sobre:</i>	<i>De la hidrólisis se obtiene:</i>
Tanasa	Actividad despolimerasa	Enlace éster entre glucosa y ácido gálico en el ácido tánico.	- Glucosa. - Acido gálico. - Algunos intermediarios de la hidrólisis.
	Actividad esterasa	Enlace éster del ácido tánico metilado.	- Acido tánico. - Metanol

Fuentes de obtención.

Los primeros trabajos sobre la producción de tanasa de *Aspergillus niger* datan de 1927 (Freudenberg *et al*, 1927), utilizando un medio con sulfato de amonio, fosfato dipotásico y sulfato de manganeso como nutrientes. Haslam *et al*, (1961), lograron purificar parcialmente la enzima del mismo hongo por cromatografía en una columna Dowex-2.

Aunque la tanasa está presente en las plantas, animales y microorganismos, que se producen principalmente por los microorganismos (Ayed y Hamdi, 2002, Belmares *et al.*, 2004). Los hongos filamentosos del genero *Aspergillus*, han sido ampliamente utilizados para la producción de tanasa (Bajpai y Patil, 1996, Banerjee *et al.*, 2001, Pinto *et al.*, 2001). La producción de tanasa por *Aspergillus* sp puede ocurrir en ausencia de ácido tánico, pero estos hongos toleran concentraciones de ácido tánico tan altas como 20 % sin tener un efecto perjudicial tanto en el crecimiento y la producción de enzimas. Los estudios sobre la producción de tanasa por *Aspergillus* sp se puede hacer mediante diversos métodos, tales como la superficie del líquido, sumergido, modificando medios de estado semi-sólido y medios de estado sólido (Bradoo *et al.*, 1997; Belmares *et al.*, 2004).

Producción de tanasa en fermentación en medio sólido.

Debido a las múltiples aplicaciones de la tanasa y el escaso conocimiento sobre la misma, en la actualidad existe una constante búsqueda de nuevas fuentes de esta enzima con propiedades más deseables, tales como mayor estabilidad, mayor capacidad catalítica y bajo costo de producción (Cruz-Hernández, 2002).

Cruz- Hernández y col., (2006), evaluaron el efecto del sistema de cultivo empleado para la producción de tanasa de *Aspergillus niger* GH1, obteniendo una producción de enzimas \pm cuatro veces superior en fermentación en medio sólido comparada con la fermentación en medio líquido. Estos resultados son similares a los obtenidos previamente por Aguilar y col. (2001), con otra cepa de *A. niger*, quienes obtuvieron una actividad y productividad al menos 2.5 veces superior en fermentaciones estado sólido y asociaron la baja productividad de la fermentación en estado líquido a un posible proceso de degradación de la enzima que no está presente en la fermentación estado sólido.

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 *et al.*, 1980) y en los hongos filamentosos, atribuida frecuentemente a hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium* (Lekha y Lonsane, 1997; Aguilar y Gutiérrez-Sánchez, 2001).

Dependiendo de la cepa y las condiciones de fermentación, la producción de la enzima tanasa se puede dar de manera constitutiva o inducida. Knudson (1913) reportó que la producción de tanasa solo ocurre en presencia de ácido tánico, dando como productos finales de la hidrólisis, el ácido gálico y la glucosa. Posteriormente Seiji y col. (1973) observaron la producción de tanasa cuando el microorganismo crece solamente sobre glucosa. Por otra parte, Siegenthaler y col., (1997) demostraron que *Aspergillus japonicus* produce tanasa de manera constitutiva cuando crece en un medio con azúcares simples o complejos, pero

que la producción de la enzima se duplico cuando creció con ácido tánico como única fuente de carbono.

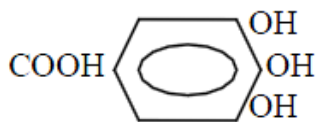
Aplicaciones de la tanasa.

Hasta el momento las, principales aplicaciones de la tanasa están en la elaboración de te instantáneo y licor de bellota así como en la producción de ácido gálico a partir de materiales vegetales con alto contenido de galotaninos. La TAH también es utilizada como agente clarificante en jugos y bebidas refrescantes con sabor a café (Aguilar y Gutierrez-Sánchez, 2001; Belmares y col., 2004).

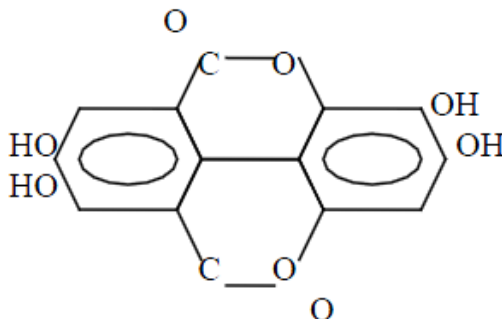
Taninos.

Definición y clasificación.

Los taninos, son compuestos fenólicos presentes en vegetales. Pueden estar constituidos como polímeros complejos de varias unidades. De acuerdo a su estructura y actividad se clasifican en taninos hidrolizables y taninos condensados (Haslam, 1975). 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 2A) o ácido elágico (Figura 2B).



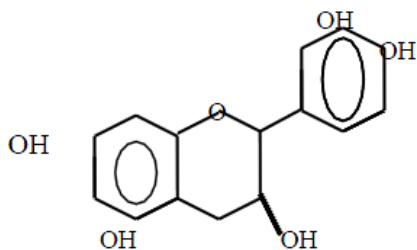
Acido gálico (A)



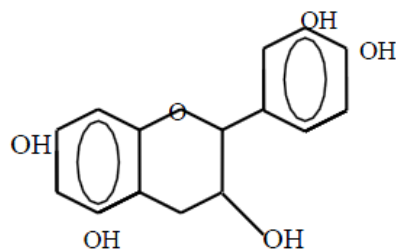
Acido elágico (B)

Figura 2. Componentes básicos de los taninos hidrolizables: Acido gálico (arriba), ácido elágico (abajo).

Los taninos condensados (Figura 3) no tienen un carbohidrato en el centro y son usualmente derivados de la condensación de precursores de flavonoides. Los principales taninos forrajeros son de tipo condensado (Tabla 4) y son principalmente derivados de leucoantocianidinas (flavan-3,4-dioles) (Haslam, 1977).



Catequina (A)



Epicatequina (B)

Figura 3. Estructura de los taninos condensados más comunes. Catequina (A), Epicatequina (B).

Tabla 4. Principales diferencias entre taninos hidrolizables y condensados.

<i>TANINOS HIDROLIZABLES</i>	<i>TANINOS CONDENSADOS</i>
Se encuentran en extractos de Semillas turcas y chinas, Algarrobilla, Divi-divi y Valonea.	Este tipo de taninos se encuentran en los extractos de: Quebracho y Acacia
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 hidrólisis produce glucosa y ácido gálico, principalmente. Elagitaninos; su hidrólisis produce glucosa y ácido elágico (Figura 3), además de ácido gálico y otros	Están constituidos por tres anillos bencénicos unidos a diferentes radicales, dando origen a varios tipos de compuestos distintos. (Figura 4).
Presentan numerosos grupos carboxílicos, son muy susceptibles a formar complejos de proteína-tanino	No presentan grupos carboxílicos.
Poseen menos efectos inhibitorios	Poseen mayores efectos inhibitorios, tanto en enzimas como en microorganismos

Función de los taninos en plantas.

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.

Se le han asignado varias funciones al sistema fenol-fenol oxidasa, concernientes a la respiración, el metabolismo intermediario, la regulación de potenciales redox y el efecto antibiótico.

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 y otras sustancias parecidas constituyen un muy buen mecanismo de defensa contra parásitos (Mahadevan, 1982).

Propiedades biológicas de los taninos.

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 poseen mayor afinidad por las proteínas que por la celulosa, lo cual puede ser atribuido a los fuertes puentes de hidrógeno, con alta afinidad por el oxígeno carboxílico del grupo peptídico.

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

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 productividad de animales alimentados con forraje de plantas que poseen taninos puede ser baja, debido a que estos últimos reducen la calidad y disponibilidad de nutrientes.

Los taninos como limitadores de consumo debido a que son astringentes, se unen a las proteínas salivales y se adhieren a las membranas mucosas de la boca, lo que disminuye la aceptación de la ración. (Jon Lasa, Cristina Mantecón 2012) altas cantidades de taninos condensados pueden producir gastritis e irritación.

Otro efecto negativo de la presencia de taninos en la dieta, que se reporta, es que se nota una disminución de la calidad de los productos animales. Se da un deterioro del sabor y olor de la carne y un color extraño en los huevos.

MATERIALES Y MÉTODOS

ETAPA 1.

Tratamiento de residuos del orégano para uso como soporte inerte.

La eliminación de residuos ajenos al material vegetal, Se llevó a cabo colocando 200 g de orégano en una olla de 5 litros. Se adicionaron 2 litros de agua destilada y se mezclaron los componentes con la ayuda de una cuchara. Se colocaron en un mechero hasta alcanzar la ebullición durante un periodo de 10 minutos, mezclando constantemente. Después de ese periodo se filtró mediante el uso de un colador de acero vertiéndola a otra olla de 5 litros. Se agregó 1 litro de agua destilada, se mezcló durante 1 a 2 minutos y nuevamente se filtró la mezcla a través del colador de acero hacia otra olla de 5 litros. Se repitió en dos ocasiones el filtrado hasta lograr que el agua retirada aclarara lo más posible. Posteriormente el orégano se extendió en charolas de aluminio y se introdujeron en una estufa a una temperatura de 50 a 60 °C por 48 horas.

Medición del índice de absorción de agua (IAA).

Para ello, se colocaron 0.512 g de orégano previamente tratado en un tubo cónico tarado (registrando el peso del tubo), se adicionaron 7.5 mL de agua destilada y se mezcló agitando vigorosamente en una centrifuga a 3,000 rpm por un lapso de 10 min, transcurrido ese tiempo se eliminó el sobrenadante, y se volvió a pesar el tubo con el gel y se restó el peso del tubo. El resultado se reportó como g gel/g soporte seco.

Determinación del punto crítico de humedad (PCH)

La determinación de humedad se obtuvo colocando 1 g gel/g soporte seco (resultado de IAA) sobre una termobalanza, consecutivamente se sometió a calentamiento a 120 °C por 60 min, registrando el porcentaje de humedad y peso final de la muestra indicado en la termobalanza.

ETAPA 2

Selección de cepas fúngicas con mayor actividad tanasa.

Durante esta etapa, se hizo una selección del microorganismo con mayor actividad enzimática tanasa. Las cepas analizadas fueron: *Penicillium* y *A. níger*. Ambas cepas fúngicas fueron incubadas en matraces Erlenmeyer de 250 mL con medio PDA, por un periodo de 7 días a 32 °C. Después de este periodo se realizó un conteo de esporas usando la cámara de Neubauer. Se empleó una solución de tween 80 al 0.1 %, esterilizándola a 121°C por 15 min. Se agregaron 20 mL de esta solución al matraz con el inóculo propagado, agitándola en una parrilla por 15 min empleando una mosca magnética sin calor. Se tomó una alícuota de esta mezcla y se preparó una solución en agua destilada 1:200. Posteriormente se tomó una muestra y se llenó la cámara de Neubauer. En esta se contaron 25 cuadros, empleando el promedio en la siguiente fórmula (1):

$$\text{Números de esporas /mL} = (\text{promedio de células /Cuadros}) (25) (1 \times 10^4) (200) \quad (1)$$

El método preliminar de fermentación para producción de tanasa utilizado, fue en medio líquido. El medio de cultivo para la fermentación fue ácido tánico (25 g/L) y las sales del medio Czapek-Dox.

Para preparar el medio líquido se disolvieron las 7 sales en un litro de agua destilada en el orden que aparecen: KH_2PO_4 (2.191 g), $(\text{NH}_4) \text{SO}_4$ (4.38 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.44 g), $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.044 g), $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.009 g),

NaMoO₄·2H₂O (0.0044 g), FeSO₂·7H₂O (0.06 g). Esta solución se esterilizo en una autoclave a 121 °C durante 15 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 25 g/L de ácido tánico y se ajustó el pH del medio a 5.0 con KOH 1N. El medio preparado se inoculó con la suspensión de esporas con una concentración de 1x10⁶ esporas por cada 25 mL de medio Czapek-Dox (total 50 mL de medio).

Determinación de la actividad tanasa

La actividad tanasa se cuantificó mediante 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 (Fig. 4).

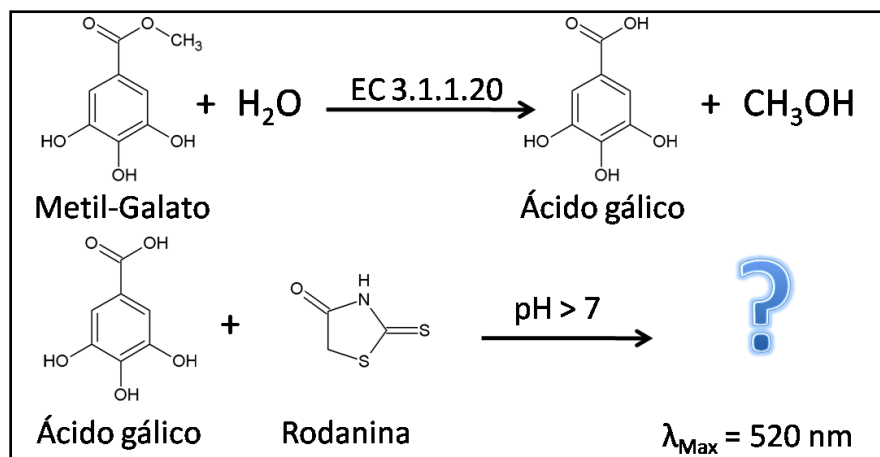


Figura 4. Reacción catalizada por la tanasa y posterior reacción del ácido gálico con la rodanina

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 agrego el extracto enzimático al tubo control. Después se 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 tabla 4, se muestra un esquema de esta técnica.

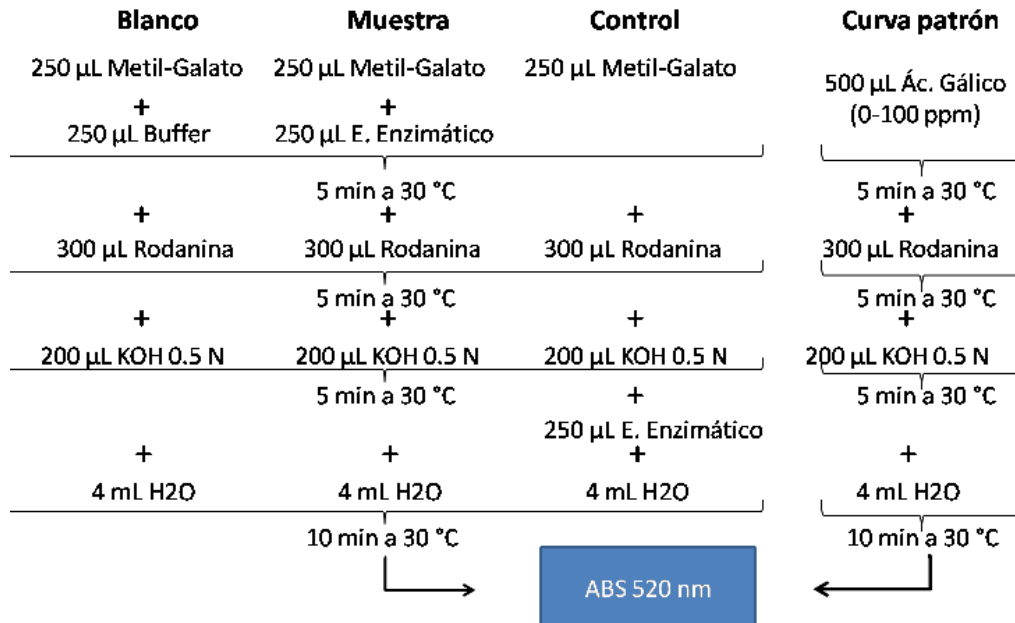
Para cuantificar el ácido gálico liberado, se restó la absorbancia del tubo muestra a la absorbancia del tubo control (ecuación 2) y se calculó la concentración a partir de una curva estándar de 0 a 100 ppm de A.G. en buffer de citratos.

$$\text{Ác. Gálico liberado} = (Abs_{Muestra} - Abs_{Blanco}) - (Abs_{Control} - Abs_{Blanco}) \quad (2)$$

La unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de ácido gálico por mL por min, bajo las condiciones del ensayo. Y se calculó con la ecuación 3:

$$\frac{UI}{L} = \left[\frac{mgA.G.}{L} \right] \cdot \left[\frac{5mL}{0.25mL} \right] \cdot \left[\frac{1gA.G.}{1000mgA.G.} \right] \cdot \left[\frac{1molA.G.}{170.12gA.G.} \right] \cdot \left[\frac{1 \times 10^6 \mu molA.G.}{1molA.G.} \right] \cdot \left[\frac{1}{25 \text{ min}} \right] \quad (3)$$

Tabla 4. Esquema del ensayo enzimático propuesto por Sharma *et al.* (2000)



ETAPA 3

Evaluación de la fuente de carbono en medio sólido.

Para inducir actividad tanasa, se probaron distintas combinaciones de fuentes de carbono (Tabla 5):

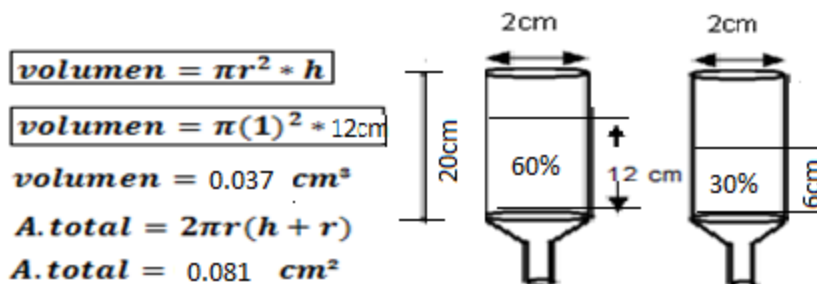
Soporte	2×10^7 Células de <i>A. Níger</i> por gramo de soporte	Fuente de carbono	Inductor	Medio Czape K-Dox 1.5mL por gramo de soporte	Actividad
Orégano (5g)	0.268ml			7.8mL	-
Orégano (5g)	0.268ml	Melaza 0.15g		7.8mL	-
Orégano (5g)	0.268ml	Glucosa 0.05g		7.8mL	-
Orégano (5g)	0.268ml		Ac. Tánico 0.125g	7.8mL	-
Orégano (5g)	0.268ml	Glucosa 0.05g	Ac. Tánico 0.125g	7.8mL	-
Orégano (5g)	0.268ml	Melaza 0.15g	Ac. Tánico 0.125g	7.8mL	+

Tabla 5. Medios sólidos (FMS) analizados para producción de actividad tanasa

ETAPA 4

Producción estandarizada de crecimiento y actividad tanasa.

Para la estandarización se utilizó un birreactor de columna de 20 cm de altura y 2 cm de diámetro, utilizando solo un 60 % Y 30 % del volumen total.



La fermentación se efectuó empleando como fuente de carbono a la melaza con ácido tánico (resultado de etapa 3), controlando factores como temperatura constante de 32⁰C, luz, hidratación y oxigenación manteniendo un flujo de 2.5 L/min.

Evaluación enzimática.

La actividad tanasa se determinó midiendo los azúcares reductores, biomasa y fenoles totales hidrolizables.

Extracción de enzima tanasa.

Para la actividad tanasa se basa en la extracción de proteínas empleando un buffer acetatos para logra retener la enzima en solución mediante enlaces iónicos (Madeira *et al.*, 2012), permitiendo la remoción de otros compuestos del sobrenadante, se colocó el material fermentado en un matraz Erlenmeyer agregando 40 mL del buffer de acetatos 20 mM pH 5.5 agitando orbitalmente durante 1 hora a 200 rpm. Transcurrido este tiempo se filtró la solución con la ayuda de una gasa y un vaso de precipitado de 25 mL, posteriormente se centrifugo el filtrado a 10,000 rpm durante 30 min y se utilizó el sobrenadante como extracto crudo.

Determinación de actividad tanasa por el método de rodanina metanolica.

Se pre-incubaron las soluciones a 30⁰C durante 5-10 min. 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), Extracto enzimático, en tres tubos etiquetados previamente como blanco, muestra y control, se colocaron las soluciones en los tubos de la siguiente forma:

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

Cuantificación indirecta de biomasa fúngica.

Este proceso se realizó agregando 0.100 mL de extracto enzimático (fermentado) más 5 mL de reactivo de Bradford, se agito y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 595 nm.

Para calcular la concentración de proteína en la muestra, se realizó una curva patrón utilizando Albúmina Sérica Bovina (BSA) como estándar.

Determinación de azúcares totales por el método de fenol-sulfúrico

Los azúcares totales, se determinaron en el extracto crudo obtenido de la fermentación del medio sólido. La curva patrón utilizada se presenta en el anexo.

Cuantificación de fenoles hidrolizables totales

En el ensayo, se colocaron 800 μ L del extracto en un tubo de ensaye, adicionando también 800 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu y se mezcló, dejándolo reaccionar por 5 min. Después de este tiempo, se agregaron 800 μ L de carbonato de sodio (0.01 M) y nuevamente se mezcló, en un 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, la cual se muestra en el anexo.

Diseño de experimentos

Los experimentos tanto del cultivo sumergido como del cultivo en estado sólido siguieron un diseño bifactorial completamente al azar. Todos los experimentos fueron conducidos por triplicado. Se reportan los valores promedio con su respectiva desviación estándar. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA, comparando las medias por la prueba de Tuckey ($p \leq 0.05$) en Minitab® 15.1.20.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ETAPA 1

Caracterización del orégano como soporte en FMS.

Los parámetros evaluados en la caracterización de los residuos de orégano sirvieron para conocer su potencial de uso como soporte para la producción de tanasa fúngica, mediante la composición elemental, actividad química y biológica.

Para que un residuo agroindustrial sea considerado un buen soporte de cultivo en estado sólido, este debe de cumplir además del contenido de componentes químicos, con una serie de características físico-mecánicas entre las que se incluyen el índice de absorción de agua (IAA) y el punto crítico de humedad (PCH), parámetros que influyen directamente en la capacidad de invasión y colonización del residuo por parte del microorganismo (Robledo *et al.*, 2008). La Tabla 6 muestra los resultados de la evaluación del uso potencial como soporte en cultivo en medio sólido de los residuos de orégano.

Índice de absorción de agua.

Tabla 6. Resultados de análisis del IAA en orégano tratado.

eso de Tubo	Peso de muestra	7mL de H ₂ O	Peso del tubo con gel	g gel/g Soporte seco.	IAA
Tubo 1 (6.87g)	0.512g	7.5 g	11.651g	4.781	9.33
Tubo 2 (6.88g)	0.517g	7.5 g	11.96g	5.08	9.82
Tubo 3 (6.84g)	0.516g	7.5 g	10.47g	3.63	7.03
Tubo 4 (6.83g)	0.517g	7.5 g	10.71g	3.88	7.50

$$IAA = \frac{[(\text{peso del tubo} + \text{peso del gel}) - \text{peso del tubo}]}{\text{peso de la muestra}}$$

$$8.427\bar{x} = [(6.84g \bar{x} + 4.34g \bar{x}) - 6.84g \bar{x}] / 0.515g \bar{x}.$$

Punto crítico de humedad.

El punto crítico de humedad (PCH), mostrado en la tabla 7, representa la cantidad de agua ligada al soporte.

Tabla 7. Valores encontrados en el PCH en orégano tratado.

Peso inicial	Tempo	Peso final	Temperatura	Porcentaje de humedad
1.00g	60.4min	0.121g	120°C	11.59%
1.00g	60.4min	0.123g	120°C	11.58%
1.004g	60.4min	0.127g	120°C	11.57%
1.01g	60.4min	0.122g	120°C	11.57%

La humedad se determinó con el uso de una termobalanza colocando 1g de la muestra saturada de humedad, resultado del IAA, a una temperatura de 120⁰C por 60 min. Oriol y col., 1988.

ETAPA 2

Selección de cepas fúngicas con mayor actividad tanasa.

Durante este proceso encontramos que la cepa con mayor producción enzimática tanasa en medio líquido es *Aspergillus niger*, encontrando desde las primeras 24 horas una actividad superior a las cepas de *penicillium s.p.* en el periodo de muestreo de 144 hrs. se observó su máximo de expresión con cantidades de 94 U/mL para *Penicillium s.p* y 149 U/mL en respectivamente. Estudios anteriores reportan máximos de 19.7 y 201.234 U/mL, en mismas condiciones que las del presente proyecto. (Sharma *et al.* 2007; Deepanjali y Gardner, 2012). Como se aprecia en la sig. Figura (5).

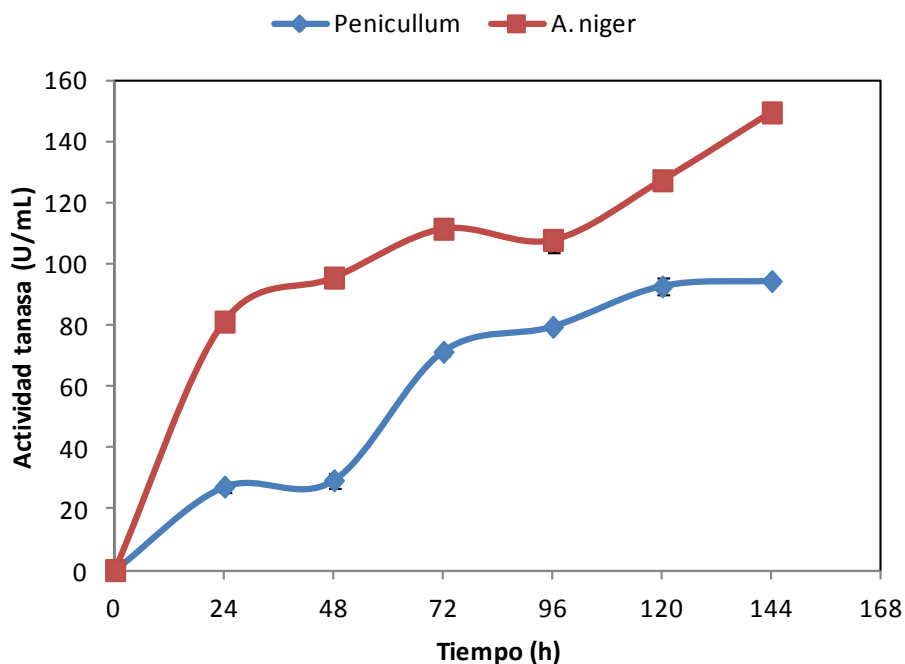


Figura 5. Representación de la actividad enzimática tanasa de *Penicillium* y *A. niger*

Análisis de biomasa en peso seco.

Durante el proceso de fermentación se determinó que en las columnas de *A. Niger* la producción de biomasa fue mayor que las de *Penicillium s.p*, encontrándose en las mismas condiciones. Como se muestra en la figura 6.

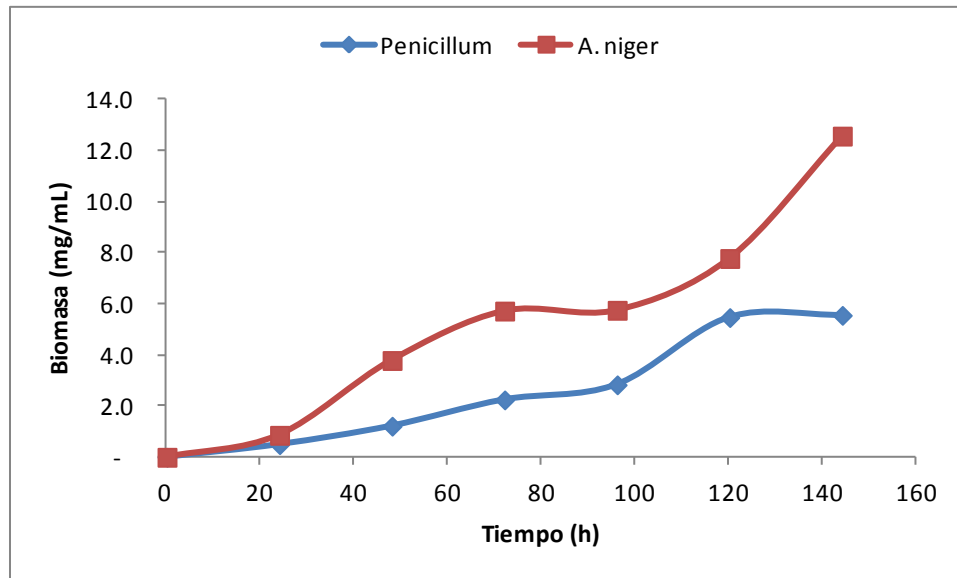


Figura 6. Análisis de biomasa en peso seco.

ETAPA 3

Evaluación de la fuente de carbono que favorece la producción de tanasa en el residuo de orégano.

La mezcla de los sustratos seleccionado, melaza y ácido tánico con las sales mínimas de Czapeck-Dox. Resulto favorable al optimizar la actividad enzimática tanasa durante la fermentación, Con información de estudios anteriores se sabe que el ácido tánico es utilizado por el microorganismo hasta un 98% durante las primeras 24 horas (Luis V. Rodríguez y Nadia A. Rodríguez D. 2007). La figura 7, muestra la actividad enzimática resultante durante las pruebas de melaza y ácido tánico como fuente de carbono producida por *A. Niger*.

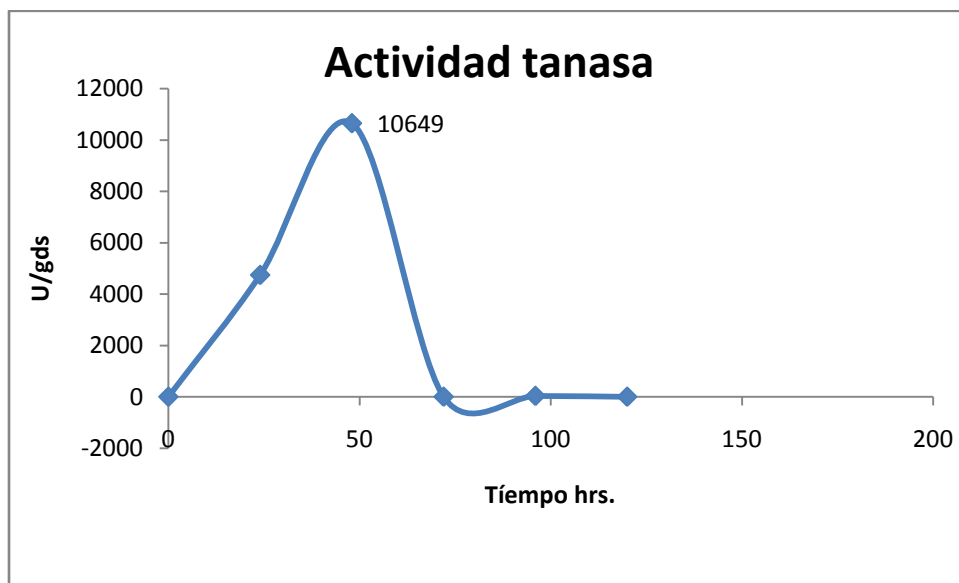


Figura 7. Actividad tanasa sobre los residuos de orégano utilizando melaza, ácido tánico y sales Cpeck dox.

ETAPA 4.

Producción óptima de crecimiento y producción.

El proceso de fermentación muestra mayor actividad enzimática aumentando el contacto entre el soporte al interior de las columnas. De esta manera podemos observar gráficamente ambas columnas (12cm (60%) y 6cm (30%) de su capacidad total por columna), en donde las columnas comprimidas muestran un 10% mayor de producción a diferencia de las columnas de empaque normal.

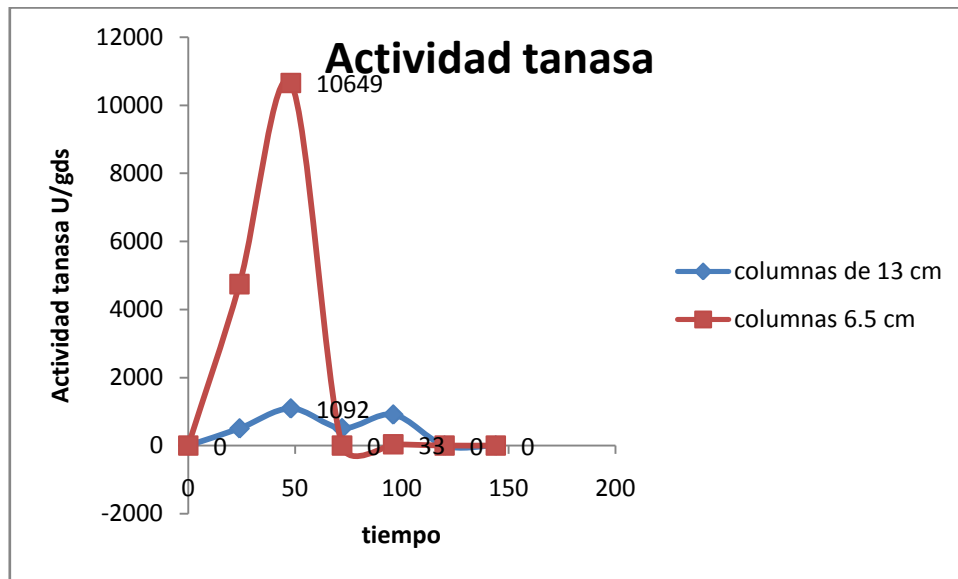


Figura 8. Producción enzimáticas en capacidades de empaque diferente.

En la gráfica anterior se muestra como la capacidad de empaque influye de manera considerable para el crecimiento y desarrollo de las cepas de *A. Niger*, por lo que podemos determinar que aumentar el contacto entre el soporte ayuda a la optimización y producción enzimática de manera favorable hasta 10 veces superior en condiciones de igual de sustratos.

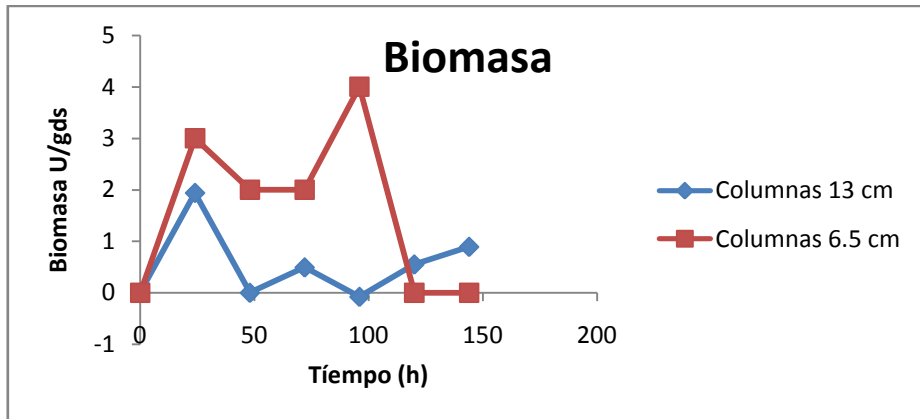


Figura 2. Producción de biomasa en columnas de FMS con capacidad de empaque diferente.

El análisis demuestra que la producción de biomasa no se encuentra directamente ligada a la liberación de la enzima, pero si a la capacidad de empaque demostrado la influencia de mayor contacto entre el microorganismo para la generación de este producto enzimático.

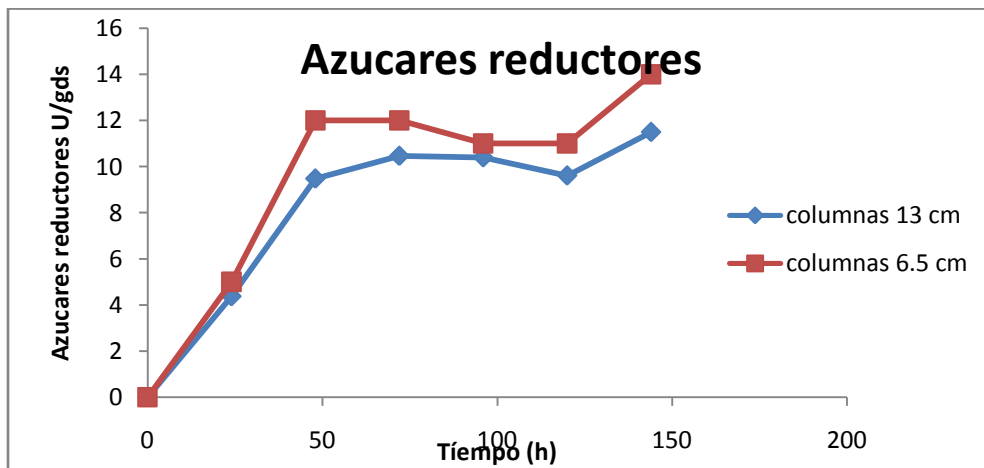


Figura 4. Cinética de azúcares reductores obtenida del soporte utilizado.

Durante la evaluación de la síntesis de los azúcares de cadena larga, se confirma que el diseño de empaque aumenta la efectividad del proceso fermentativo.

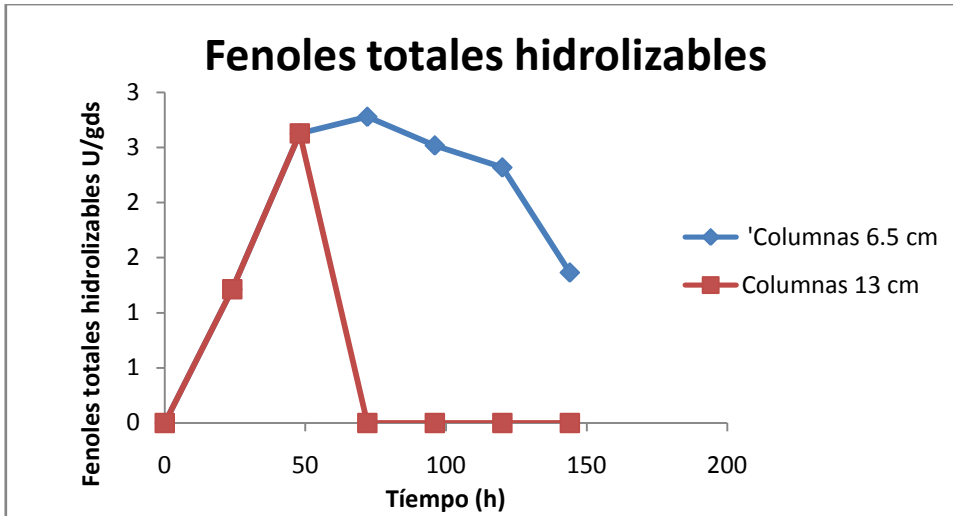


Figura 5. Cinética de fenoles totales hidrolizables en columnas de 13 y 6.5 cm respectivamente.

Otro factor importante a considerar durante este estudio es la degradación de fenoles o compuesto fenólicos (taninos), como se muestra en la gráfica la síntesis es mayor en las columnas de mayor saturación del soporte sólido.

Conclusiones.

- La caracterización y tratamiento para eliminación de impurezas en el orégano es útil, fácil, de bajo costo y de tiempos cortos.
- De acuerdo a la velocidad máxima de crecimiento y producción enzimática tanasa en medio líquido utilizando las cepas de *Aspergillus niger* L.R y *Penicillium* s.p. Se confirmó que las cepas que presentan una mejor producción de tanasa fúngica conforme al tiempo y cantidad son cepas de *Aspergillus niger* L.R.
- Se logró encontrar una fuente de carbono de fácil degradación para el microorganismo en el soporte de residuos de orégano.
- La fuente de carbono debe ser de cadenas simples y con minerales para lograr la producción adecuada de tanasa fúngica, como el producto residual de la industria azucarera la melaza.
- El sistema de fermentación es efectivo siempre y cuando se mantenga la humedad constante, la temperatura entre un rango de 32-35 °C, una oxigenación de 2.5 L/min y protegidos de la luz.
- La mejor producción enzimática ocurre cuando los espacios del soporte son más pequeños entre sí y se efectúa una transferencia de calor de tal forma que la convección resulta positiva en las reacciones ocurridas dentro de la columna.

ANEXOS.

Preparación de soluciones para la cuantificación de la actividad tanasa

1. Buffer de citratos 50 mM a pH 5.0
 - (A) Solución de Ac. Cítrico 0.1 M (21g-1000ml)
 - (B) Solución de citrato de sodio 0.1M (19.41-1000ml)(A) 20.5ml + (B) 29.5ML → pH 5
2. Metil-galato 0.01M en buffer de citratos (50 mM pH 5.0)
0.184g Metil-galato + 100 ml de buffer de citratos
3. Rodanina 0.667% p/v en metanol
0.667g + 100 ml de metanol
4. KOH 0.5 N
2.805g + 100ml → 0.5 M
5. Ácido gálico 100 ppm en buffer de citratos (50 mM pH 5.0)
50mg A. Gálico + 100 ml H₂O (buffer)

i. Preparación del reactivo Buffer acetatos 50 mM pH 5.5

Preparar la solución A, disolviendo 57.2 μ L de ácido acético glacial en 10 mL de agua destilada. Preparar la solución B, disolviendo 0.41 g de acetato de sodio en 50 mL de agua destilada. Mezclar en un vaso de precipitado 4.8 mL de solución A y 45.2 mL de solución B. y adicionar 50mL de agua destilada, para completar 100 mL. Mezclar durante 10 min.

Preparación de curva patrón

Diluciones

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{100 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}}{500 \text{ ppm}} = 2\text{ml de A. gálico} + 8\text{ml de H}_2\text{O}$$

$$V_2 = \frac{80 \text{ ppm} \times 5 \text{ ml}}{100 \text{ ppm}} = 4\text{ml de A. gálico} + 1 \text{ ml de H}_2\text{O}$$

$$V_3 = \frac{60 \text{ ppm} \times 5 \text{ ml}}{100 \text{ ppm}} = 3\text{ml de A. gálico} + 2\text{ml de H}_2\text{O}$$

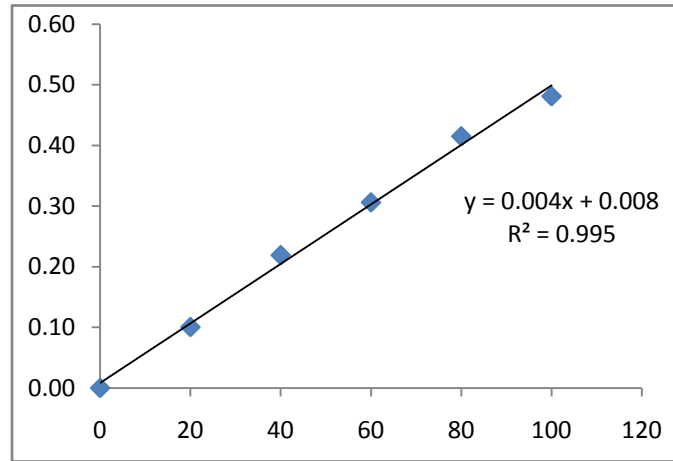
$$V_4 = \frac{40 \text{ ppm} \times 5 \text{ ml}}{100 \text{ ppm}} = 2\text{ml de A. gálico} + 3\text{ml de H}_2\text{O}$$

$$V_5 = \frac{20 \text{ ppm} \times 5 \text{ ml}}{100 \text{ ppm}} = 1\text{ml de A. gálico} + 4\text{ml de H}_2\text{O}$$

$$V_6 = \frac{0 \text{ ppm} \times 5 \text{ ml}}{100 \text{ ppm}} = 0\text{ml de A. gálico} + 5\text{ml de H}_2\text{O}$$

Preparación de curva patrón para biomasa fúngica.

Concentración	Abs promedio
0	1.14
20	1.24
40	1.35
60	1.44
80	1.55
100	1.62



Preparación del reactivo para cuantificación de biomasa fúngica.

Se disuelven 100 mg del colorante Azul de Comassie G-250 en 50 mL de etanol al 95 %. Se agregan 100 mL de ácido fosfórico 85 % (p/v). La solución se diluye en agua destilada y se afora a 1 L. El reactivo debe protegerse de la luz y filtrarse antes de su uso. Este reactivo es estable por al menos un mes a temperatura ambiente.

Preparación de reactivo DNS para cuantificación de azúcares reductores

Fundamento

Se basa en la reducción del ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS) (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor, al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo), cuya presencia puede detectarse por lectura de la Absorbancia en la zona de 540-570 nm.

Procedimiento

Precalentar agua destilada (100 mL) en vaso de precipitado a 50 °C con agitación

Adicionar el DNS, el hidróxido de sodio, el tartrato de sodio y potasio, el fenol y el sulfito de sodio (En ese orden).

Aforar con agua destilada al volumen deseado.

Forrar el contenedor con aluminio y almacenar en refrigeración.

Nota: La disolución obtenida puede usarse durante 2 meses, si se guarda en la oscuridad y en refrigeración.

Metodología.

Etiquetar tubos blanco, muestra y control.

Pre incubar soluciones 30°C- 10 min.

Colocar 0.25ml de metil-galato 0.01M (Control, blanco y muestra)

Añadir 0.25 ml de buffer (blanco)

Adicionar A. gálico 0.25ml (muestra)

Incubar los tubos 5min - 30°C.

Adicionar 0.3ml de rodanina metanolica e incubar 30°C - 5min

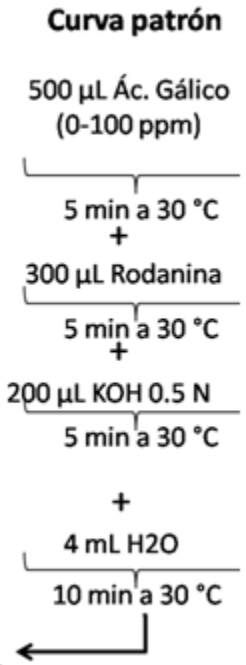
Agregar 0.2ml de KOH 0.5 N incubar 5min-30°C

Agregar 4ml de agua destilada.

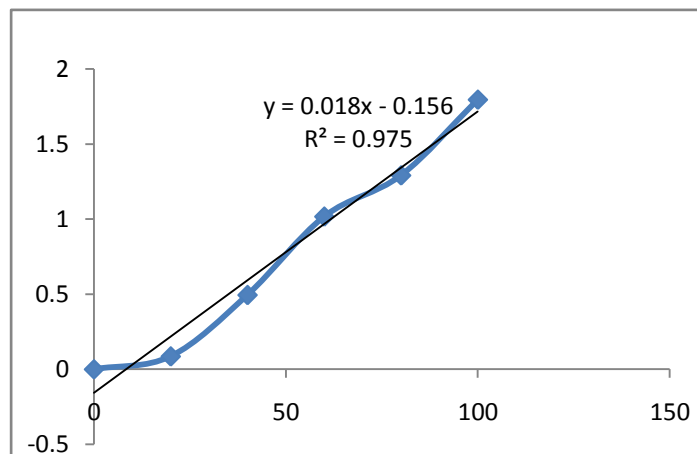
Agitar tubos e incubar 10min- 30°C.

Medir absorbancia a 520 nm en el espectrofotómetro

ABS 520 nm

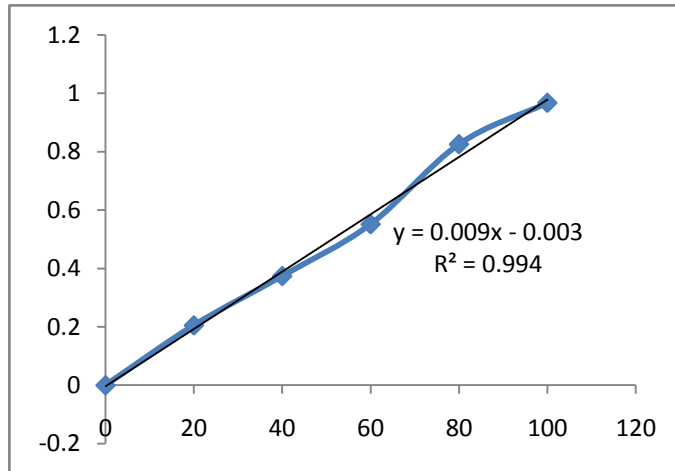


Concentración	Abs promedio
0	0
20	0.086
40	0.4945
60	1.0165
80	1.2905
100	1.7945



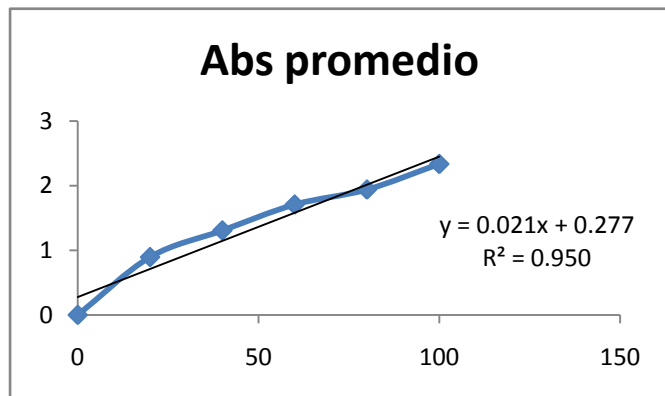
Preparación de curva patrón para azúcares reductores

Concentración	Abs promedio
0	0
20	0.205
40	0.374
60	0.5515
80	0.8255
100	0.967



Preparación de curva patrón para fenoles totales hidrolizables.

Concentración ppm	Abs promedio
0	0
20	0.8945
40	1.306
60	1.7065
80	1.9385
100	2.334



Resultados del conteo de esporas viables en la cámara de Neubauer fue.

Para:

A. Níger: Números de esporas /mL = $(22.84) (25)(1 \times 10^4)(20) = 114,200,000$ cel.
/mL

10×10^6 -----8.75 μ L

Penicillium: Números de esporas /mL= $(9) (25) (1 \times 10^4) (20) = 45,000,000$ cel. /mL

10×10^6 -----22 μ L

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

SEMARNAT. 2001.

Evaluación del riesgo de extinción de *Lippia graveolens* de acuerdo al numeral 5.7 de la NOM-059-SEMARNAT-2001.

INIFAP

García G. y Ortega S. 2007. Aprovechamiento de orégano silvestre en la región de Nazas Durango. Campo experimental la Laguna. XII congreso nacional de la sociedad mexicana de ciencias hortícolas.

Tesis Licenciatura. Universidad Nacional de Luján. Buenos Aires, Argentina.

Rolando A. 2007. Aceite esencial de orégano: tratamiento por digestión anaeróbica de los residuos generados en su obtención. 127 pg.

Conacyt artículos.

Buenrostro, D. 2006. La producción de residuos sólidos municipales y sus implicaciones ambientales. Ciencia y desarrollo en internet. Disponible en línea en: <http://www.conacyt.mx/comunicacion/revista/ArticulosCompletos/pdf/Produccion.df>

Fitotecnia mexicana artículos.

González G., H Soto., K Geoffrey., V Martínez. 2007. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK var. *Berlandieri* Schauer. 30(1):43-49.

Journal article.

Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C.N., Romero-Gómez, S.J., Díaz-Godínez, G. & Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering* 13 (2 - 3): 157 - 167.

Castillo, L. R., Alves, T. L. M., Medronho, R. A. (2000). Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agro-industrial residues with *Aspergillus Niger*. *Bioresource Technology* 71, 45-50.

Holker, U., Hofer, M., Lenz, J. (2004) Biotechnology advantages of laboratory-scale solid state fermentation. Part I. *Process Biochemistry*, 12, 24-27.

Vandenberghe, L. P. S., Soccol, C. R., Pandez, A., Lebeault, J. M. (2000). Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* 74: 175-178.

Viniegra Gonzalez, G. (1997). Advances in solid state fermentation. In S. Roussos, K. Lonsane, M. Raimbault, and G. Viniegra-Gonzalez, (Eds.) Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, 631 p.

Revista Mexicana de biotecnología y bioingeniería.

Viniegra González, G. (2003). Producción de enzimas por *Aspergillus*. Revista Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería 8, 18-30.

Aguilar, C.n., Augur, C., Favela-Torres, E., Viniegra-González, G (2001) Induction and represeeion patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. Process biochemistry 36(6) 565-570.

Jornal article.

Pérez Guerra A., Torrado Agrassar C., López Macias y Pastrana L. 2003. Main characteristics and applications of solid state fermentation, Electron. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2(3): 343–350.

Mitchell, D., Lonsane, B., Durand, R., Renaud, S., Maratray, J., Desgranges, C., Crooke, P., Hong, K., Tanner, R., Malaney, G. (1992). General principles of reactor design and operation for solid substrate cultivation. In Rolz (Ed.), Solid substrate cultivation. Elsevier Applied Science. Amsterdam, pp. 115-139.

Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila.

Ruiz- Leza, H. A. (2004). Desarrollo de un bioproceso para la producción de pectinasa fúngica en medio sólido utilizado pomaza de limón.

Cornish-Bowden A. and Cárdenas M.L. 1987. Chemistry of enzymes. In: Biotechnology (Eds. H.J. Rehm and G. Reed) Vol. 7, VCH Verlagsgesellschaft mbh, Weinhein, Republica Federal de Alemania, 5-33.

Lekha, P. K. y Lonsane, B.K. (1997). Tannin acyl hydrolase: State of the art. Advances in Applied Microbiology 44, 215-260

Food Science and Technology International

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.

Journal article.

Maldonado, M.C. and Strasser de Saad, A. M. (1998), Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus Niger* in submerged and solid state systems. J. Indust. Microbiol. Biotechnology. 20, 34-38.

Journal article.

Aguilar, C.N., Augur, C., Favela-Torres, E., & Vinegra-González, G. (2001b). Production of tannase by *Aspergillus Niger* Aa-20 in submerged and solid-state fermentation: influence of glucose and tannic acid. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26 (5): 296 - 302.

Food Science and Technology International.

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

Journal article.

Haslam, E. & Stangroom, J.E. (1966). The esterase and depsidase activities of tannase. *Biochemical Journal* 99 (28): 28 - 31.

Journal article.

Haslam E., Haworth R.D., Jones K. and Rogers H.J. 1961. Gallotanins. Part I: The fractionation of tannase. *J. Chem. Soc.*, 1829-1835.

Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. México

Cruz-Hernández, M. (2002). Aislamiento y caracterización de cepas fúngicas degradadoras de taninos.

Memorias del XXII Encuentro Nacional de la AMIDIQ.

Cruz-Hernández, M., Rodríguez, R., Aguilar, C.N., Contreras-Esquivel, J.C. y Lara, F. (2001). Aislamiento y caracterización morfológica de cepas microbianas degradadoras de taninos. *Memorias del XXII Encuentro Nacional de la AMIDIQ* 71-72.

Journal article.

Aguilar, C.N., Augur, C., Favela-Torres, E. y Viniegra-González, G. (2001b). Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid state fermentations: influence of glucose and tannic acid. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26, 296-302

Lekha, P., y Lonsane, B. (1994). Comparative titres, location and properties of tanin acyl hidrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. *Process Biochemistry* 29, 497-503.

Journal Ind Microbiol Biotechnology.

Maldonado, Straseer de Saad (1998). Production of pectinesterase and poligalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. 34

Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.
Aguilar, C.N., 2000 “Inducción y presión de la síntesis de la tasa de *Aspergillus niger* Aa20 en cultivo en medios líquidos y sólido”.

Journal article.

Makkar H.P.S., M. Blümmel, N. K. Borowy, K. Becker. (1993). Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods, *J. Sci. Food Agric*, 61:161-165.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2): 248-254

Madeira, Jr. J.V. (2012). A new process for simultaneous production of tannase and phytase by *Paecilomyces variotii* in solid-state fermentation of orange. *Bioprocess Biosyst Eng* 35:477–482. DOI 10.1007/s00449-011-0587-y
Contribución de Luis Víctor Rodríguez

Sharma, S., Bhat, T. K. & Dawra, R. K. (2000). A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. *Analytical Biochemistry* 279(1): 85-89.

Lekha, P.K. & Lonsane, B.K. (1994). Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid state, liquid surface and submerged fermentation. *Process Biochemistry* 29 (6): 497 - 503.

SEMARNAT.

Angulo C., Flores D. J., Tejeida J. y Ocampo R. 2005. Orégano: oro verde del semidesierto. En: La riqueza de los bosques mexicanos más allá de la madera: experiencias de comunidades rurales. México. 60-65 pp.
http://www.alanrevista.org/ediciones/20041/oregano_propiedades_composicion_actividad_biologica.asp.

SEMARNAT.

Angulo C., Flores D. J., Tejeida J. y Ocampo R. 2005. Orégano: oro verde del semidesierto. En: La riqueza de los bosques mexicanos más allá de la madera: experiencias de comunidades rurales. SEMARNAT. México. 60-65 pp.

SEMARNAT.

Angulo C., Flores D. J., Tejeida J. y Ocampo R. 2005. Orégano: oro verde del semidesierto. En: La riqueza de los bosques mexicanos más allá de la madera: experiencias de comunidades rurales. SEMARNAT. México. 60-65 pp.

Arcila L., P Loarca., U Lecona., M González. 2004. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes.
http://www.alanrevista.org/ediciones/20041/oregano_propiedades_composicion_actividad_biologica.asp.

CONACY ARTICULOS.

Buenrostro, D. 2006. La producción de residuos sólidos municipales y sus implicaciones ambientales. Ciencia y desarrollo en internet. Disponible en línea en:
<http://www.conacyt.mx/comunicacion/revista/ArticulosCompletos/pdf/Produccion.pdf>.

Tesis de nivel Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México Cruz, M.L. 2002. *Producción fúngica de la enzima tanasa en cultivo sumergido y en estado sólido utilizando Larrea tridentata cov. Como fuente de carbono y energía*. 19, 20, 24, 25, 26.

Carrizales V. 1983. Producción de enzimas extracelulares en cultivos semisólidos. In: Biotecnología de enzimas (eds. Huitron C.). UNAM, México, D. F, Cannel E. and Moo-Young M. 1980. Solid-State fermentation systems. *Procc. Biochem.*, 15, 2-7.

Tesis de maestría. CIIDIR IPN Durango. Durango, México.

Flores R. 2009. Potencial productivo del orégano (*Lippia graveolens* HBK.) y calidad de su aceite esencial en dos localidades de El Mezquital, Dgo. 130 pp.
<http://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/12690>

Madeira, Jr. J.V. (2012). A new process for simultaneous production of tannase and phytase by *Paecilomyces variotii* in solid-state fermentation of orange. *Bioprocess Biosyst Eng* 35:477–482. DOI 10.1007/s00449-011-0587-y

Mussatto, S.I., Aguilar, C.N., Rodriguez, L.R., Teixeira, J.A. 2009. Colonization of *Aspergillus japonicus* on synthetic material and application to the production of fructooligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 344(6), 795-800.

Sharma, S., Bhat, T. K. & Dawra, R. K. (2000). A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. *Analytical Biochemistry* 279(1): 85-89.

Journal article.

Maldonado M.C. y Strasser de Saad A.M. 1998. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. *J. Ind. Microbiol. Bio/technol.* 20, 34-38.

Anderson R. A., H. F. Conway, V. F. Pfeifer, E. L. Griffin Jr. (1969). Roll and extrusion cooking of grain sorghum grits. *Cereal Sci. Today*. 14: 372

Oriol E., Schettino B., Viniegra-González G., Raimbault M. (1988). Solid-state culture of *Aspergillus niger* on support. *Journal of fermentation Technology*. 66:57-62.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. y Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28:3:350-356.

Robledo A., Aguilera-Carbó Antonio., Rodriguez R., Martinez J. L., Garza Y. and Aguilar C. N. (2008). Ellagic acid production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of pomegranate residues. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 35:507–513. DOI 10.1007/s10295-008-0309-x

Sharma, S; Agarwal, L. y Saxena, RK. (2007). Statistical optimization for tannase production from *Aspergillus niger* under submerged fermentation. *Indian J. Microbiol*. 47. pp. 132 – 138.

Orzua, M.C., S.I. Mussatto, J.C. Contreras-Esquivel, R. Rodriguez and H.D.L. Garza *et al.*, 2009. Exploitation of agro industrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation. *Ind. Crops Prod.*, 30: 24-27. DOI: 10.1016/j.indcrop.2009.02.001

Deschamps AM, Otuk G y Lebeault JM (1983) Production of tannase and degradation of chestnut tannin by bacteria. *J. Ferment. Technol.*, 61. pp. 55 – 59.

Kumar, R A, Gunasekaran, P y Lakshmanan, M. (1999). Biodegradation of tannic acid by *Citrobacter freundii* isolated from a tannery effluent. *J. Basic Microbiol*. 39, 3. pp. 161– 168.

Mondal, KC, Banerjee, R. y Pati, BR. (2000). Tannase production by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology. Lett*, 22. pp. 767 – 769.

Luis V. Rodríguez Durán, Nadia A. Rodríguez D. (2007) Estudio de la Inhibición de la enzima Tanasa producida por *Aspergillus niger* GH1 en Fermentación en Estado Sólido (FES). Pp. 5-6.

Miller G.L., (1989). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem*. 31:426