

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE
PRODUCCIÓN TANASA POR

Rhizomucor pusillus

EN FERMENTACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO

TESIS

PRESENTADA POR:

MARÍA DEL ROSARIO TORRES LARA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO.

DICIEMBRE DE 2015.

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

EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE PRODUCCIÓN TANASA POR
Rhizomucor pusillus EN FERMENTACIÓN DE MEDIO LÍQUIDO

TESIS

PRESENTADA POR:

MARÍA DEL ROSARIO TORRES LARA

COMO requisito parcial para obtener el GRADO de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACION DEL H. JURADO EXAMINADOR:



Dr. Armando Robledo Olivo

PRESIDENTE



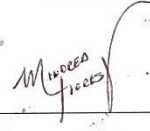
Dr. Mario Alberto Cruz Hernández

VOCAL



Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

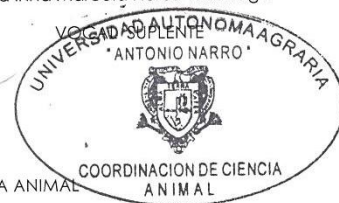
VOCAL



Mildred Inna Marcela Flores Verastegui



Dr. José Durán Alanís
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO

DICIEMBRE DE 2015.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE PRODUCCIÓN TANASA POR *Rhizomucor pusillus* EN FERMENTACIÓN DE MEDIO LÍQUIDO

PRESENTADA POR:

MARÍA DEL ROSARIO TORRES LARA

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

DIRIGIDO POR EL SIGUIENTE COMITÉ ASESOR:

DIRECTOR: Dr. Armando Robledo Olivo

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro



Co-Director: Dr. Mario Alberto Cruz Hernández

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

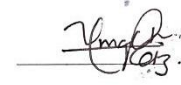
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro



Asesor: Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Departamento de Producción Animal

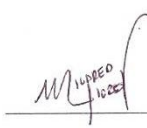
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro



Asesor: Mildred Inna Marcela Flores Verastegui

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro



DEDICATORIA



De manera especial ésta tesis se las dedico:

*A ti oh Dios, Mamá y Papá, a ustedes Abuelitos, mi Mamá Biga linda y
preciosa, Lalita, Lupita, Luz y claro a mí querido Joel. Los amo*

AGRADECIMIENTOS



Existe una cita bíblica que dice: Todo tiene su tiempo, y todo lo que se quiere debajo del cielo tiene su hora. Eclesiastés 3: 1

Y el tiempo llegó para culminar con este trabajo. Por eso primero te doy gracias Dios porque has hecho esto posible al darme fuerzas, motivos, sueños y ganas de ser mejor para ti, y permitiéndome llegar a culminar con una meta más en esta etapa de mi vida, gracias por todo, lo bueno y lo malo, porque se aprende. Sabes cuánto batalle y allí estuviste conmigo, gracias por la paciencia que has formado en mí. Te amo Dios y seguimos en contacto....

Gracias Dr. Armando Robledo Olivo por haber aceptado ser mi director de tesis, es un honor haber trabajado con usted. Imagíneme riéndome como siempre, pero de verdad le agradezco toda la orientación, sabiduría, su apoyo y consejos para la realización de esta tesis. Además quiero que quede plasmado mi agradecimiento por su comprensión en circunstancias difíciles, por otorgarme la motivación necesaria de no rendirme y sobre todo por la confianza y amistad que siempre me demostró.

Y también a usted Dr. Mario Hernández, contar con su apoyo fue bajo el mismo plan del Dr. Armando de culminar con este proyecto. Considero que usted es una pieza clave al igual que la Dra. Ana Verónica Rodríguez y M.C. Sarahi Rangel, gracias por su amistad, confianza y asesoría. Y también el haber dado su consentimiento por el material que me proporcionaron, sepan que me facilitaron el trayecto de esta investigación. Muchas gracias

Papá gracias por todo tu apoyo incondicional, tu amor, tu amistad, tu confianza, tus regaños, que fueron pocos verdad pero allí estuvieron presentes, tu consejos, sabes recuerdo mucho estas frases “uno es arquitecto de su propia vida y uno decide que tan lejos quiere llegar”. Aunque el tiempo y la distancia no fueron nuestros mejores aliados, atesoro todo lo que vivimos.

Mami tú no te quedas atrás siempre has sido mi motor, una inspiración de ser así, bien trabajadora, luchona, bondadosa, fuerte y valiente, ¡hay Dios! creaste una mujer maravillosa. Quiero agradecer todo tu apoyo en el trayecto de mi vida y de esta locura de estudiar, recuerdo que así te lo decía. Agradecer tu amor, tus consejos, tu comprensión, amistad, confianza, el hecho de creer en mí, bueno porque esto continua, y también por ser mi cómplice, de no haber sido así, no hubiese sido posible este triunfo de las dos. Gracias, muchas gracias Mami.

Lalita, Lupita, Lucesita y Mamá Biga, hablándoles con mucho amor como siempre. Quiero agradecerles también por todo su apoyo, amor y confianza, y principalmente a ti Lupita, que has estado conmigo todo este tiempo presencialmente, te has convertido en más que mi hermana, mi amiga, gracias por tus palabras motivacionales, eras también mi psicóloga entonces. Y también recuerdo que estabas allí apoyándome con las curvas patrón, cuando me preguntan algo respecto a eso ya tu les respondes mejor.

A ti mamá Lupita por haber abierto las puertas de su casa, y también por brindarme un cariño sincero, jamás olvidare su gentileza, amabilidad, ternura y dulzura. La quiero mucho. Y a ti Abi también te quiero, gracias por ofrecerme tu amistad y hermandad, y por compartir a mamá y a papá.

A ustedes Nancy, Rox, Ángeles, Rafa, Benja, Ricardo, Juanito, Idalia, Luky, Isa, Dulce, gracias por su amistad, por ser siempre mis cómplices, mis herman@s, gracias por su apoyo y buenos deseos, ¡A! y ánimos de terminar la tesis, por sus abrazos que sepan que l@s extraño, pero no quiero llorar, los quiero mucho, son una gran bendición en mi vida.

Alex gracias por tu amistad y apoyo al explicarme algunos detalles de la tesis y de cómo usar algunos equipos del laboratorio, Zule también gracias por estar allí cuando lo necesite, te doy "like" por tu buena actitud tú siempre tan amable. Y a usted Magda por facilitarme el material de laboratorio, le confieso tenía miedo de quebrarlos, hay no que angustia, pero ya pasó.

A ti Chava (Gaby) por tu amistad y confianza y darme también un apoyo enorme, tu tesis. Solo imagínate lo mucho que me ayudo.

Henry gracias por darme tu apoyo y motivación, me hiciste mucho bien, tus fotos son lo máximo y no es sarcasmo, aclarado. Ok. Un beso y abrazo.

A ti Eduardo por creer en mí y estar allí, mostrándome tu apoyo incondicional, tendré presente los libros que pediste por mí en la biblioteca. Sabes que te quiero y aprecio.

Valeria, Dios me bendijo al llevarte al trabajo gracias por tu amistad, apoyo y complicidad. Aparte somos el mejor equipo. P.D..Las chicas superpoderosas por Rummy.

A mi Alma Terra Mater, ¡GRACIAS!, mira que te pongo en alto, y soy buitre de corazón, y como dice una parte la canción Buitres, Buitres, al ataque!, Es que de ti llevo la formación que en tus aulas recibí.

María del Rosario Torres Lara

Índice

RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN.....	2
2 JUSTIFICACIÓN	5
3 HIPÓTESIS	6
4 OBJETIVOS	6
4.1 OBJETIVO GENERAL	6
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
5 ANTECEDENTES	7
5.1 ENZIMAS.....	7
5.1.1 Nomenclatura	9
5.1.2 Especificidad	11
5.1.3 Sitio activo	12
5.1.4 Determinación de la actividad enzimática	13
5.1.5 Factores que afectan la velocidad de las reacciones enzimáticas	14
5.1.6 Inhibición enzimática	19
5.1.7 Explotación industrial de las enzimas.....	20
5.2 TANASA.....	22
5.2.1 Fundamentos	22
5.2.2 Fuentes de obtención.....	23
5.2.3 Producción en Fermentación en Medio Sólido (FMS)	25
5.2.4 Producción en Fermentación de Medio Líquido (FML).....	26
5.2.5 Aplicación de la tanasa.....	27
5.3 TANINOS.....	29
5.3.1 Definición.....	29
5.3.2 Clasificación	30
5.3.3 Función de los taninos unión taninos -proteína	33
5.3.4 Propiedades biológicas (Físico-Químicas de los taninos)	34
5.3.5 Efectos anti-fisiológicos	36

5.3.6	Degradación de los taninos por microorganismos.....	36
5.4	PHYLUM ZYGOMYCOTA.....	36
5.4.1	Taxonomía de los zigomicetos	37
5.4.2	Estructura y fisiología de los zigomicetos.....	38
5.4.3	Orden mucorales.....	39
5.4.4	Familia <i>Mucoraceae</i>	40
5.4.5	Género <i>Rhizomucor</i>	41
6	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	42
6.1	MICROORGANISMO.....	42
6.1.1	Propagación del microorganismo.	42
6.1.2	Preservación del microorganismo en glicerol- leche descremada.....	43
6.2	PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE ESPORAS	44
6.2.1	Modo de fermentación o medio de cultivo	45
6.2.2	Obtención del extracto crudo enzimático (Biomasa)	49
6.2.3	Determinación de Actividad tanasa (Sharma y col. 2000)	49
6.2.4	Cuantificación de fenoles hidrolizables totales	52
6.3	Potencial de hidrógeno (pH) óptimo de la enzima	53
6.4	TEMPERATURA ÓPTIMA DE LA ENZIMA	54
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
7.1	Producción en Fermentación en Medio Líquido (FML) de tanasa por <i>Rhizomucor pusillus</i>	57
7.1.1	Biomasa	57
7.1.2	Determinación de actividad tanasa.....	59
7.1.3	Cuantificación de fenoles hidrolizables totales	61
7.2	Determinación de actividad enzimática óptima de temperatura y pH.	63
7.2.1	El pH óptimo de la enzima tanasa por <i>Rhizomucor pusillus</i>	63
7.2.2	Temperatura óptima de la enzima tanasa por <i>Rhizomucor pusillus</i> ..	67
8	CONCLUSIONES.....	71
9	BIBLIOGRAFÍA.....	73
10	ANEXOS	82

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama ilustrando la Interacción enzima-sustrato.....	13
Figura 2. Efecto de la concentración del sustrato sobre el índice de la actividad enzimática.....	15
Figura 3. Efecto de la concentración de la enzima en la actividad enzimática. ..	15
Figura 4. Efecto de la concentración de la enzima en la actividad enzimática	16
Figura 5. Efecto de la de la temperatura sobre la actividad de una enzima.	17
Figura 6. Clasificación de los taninos (Aguilar y Gutiérrez Sánchez, 2001)	30
Figura 7. Estructura básica de los taninos condensados	31
Figura 8. Componentes básicos de los taninos hidrolizables, (A) Ácido gálico y (B) Ácido elágico.....	32
Figura 9. Estructura morfológica del orden mucorales (Wainwright, 1992).	39
Figura 10. Esporangióforo, columelas y rizoides primitivas de <i>Rhizomucor pusillus</i>	41
Figura 11. Cajas Petri con siembra de <i>Rhizomucor pusillus</i> SOC- 4A.....	43
Figura 12. Microscopio y cámara de Neubauer.....	44
Figura 13. Matraz Erlenmeyer en agitación con sales Czapek-Dox.....	46

Figura 14. FML de <i>Rhizomucor pusillus</i> en Incubadora con agitador (Innova® 44).	47
Figura 15. Filtración para obtener la biomasa y el extracto enzimático.	48
Figura 16. Recolección de extracto enzimático en tubos tipo Falcón de 50 ml (Identificados previamente).	48
Figura 17. Biomasa retenida y guardada en incubadora (Riossa E-71).	49
Figura 18. Reacción catalizada por la tanasa y posterior reacción del ácido gálico con la rodanina.	50
Figura 19. Lectura de la reacción con el extracto enzimático a 520 nm en el espectrofotómetro (UV/VIS Velab 5600 UV).	51
Figura 20. Esquema del ensayo enzimático propuesto por Sharma et al. (2000).	52
Figura 21. Reacción con Folin-Ciocalteu (medido en absorbancia a 790 nm), ...	53
Figura 22. Soluciones de los pH 4.0, 4.6, 5.0, 5.6, 6, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0	54
Figura 23. Filtración del extracto enzimático.	55
Figura 24. Reacción del extracto enzimático mediante el método de (Sharma y col. 2000) en baño María (Thermo Scientific Presicion 3166198).	56
Figura 25. Observación de cambio de color ascendente a fucsia, en la reacción enzimática por <i>Rhizomucor pusillus</i> SOC 4A.	61
Figura 26. Observación de la reacción del extracto enzimático con el reactivo de Folin- Ciocalteu.	63

Índice de gráficas

Gráfica 1. Producción de Biomasa del extracto obtenido en FML por <i>Rhizomucor pusillus</i> (SOC -4A).	58
Gráfica 2. pH del cultivo por <i>Rhizomucor pusillus</i> SOC-4A.	59
Gráfica 3. Cinética de crecimiento de tanasa por <i>Rhizomucor pusillus</i> en FML... ..	60
Gráfica 4. Curva de fenoles hidrolizables totales.	62
Gráfica 5. El pH del extracto a las 36 horas del monitoreo de la FML.....	64
Gráfica 6. El pH del extracto del monitoreo a las 48 horas de la FML.....	65
Gráfica 7. El pH del extracto del monitoreo a las 60 horas.	66
Gráfica 8. Temperatura óptima del monitoreo de 36 h dl extracto enzimático por <i>Rhizomucor pusillus</i> SOC 4A.....	68
Gráfica 9. Temperatura óptima del monitoreo de las 48 h del extracto enzimático por <i>Rhizomucor pusillus</i> SOC 4A.....	69
Gráfica 10. Temperatura óptima del extracto enzimático por <i>Rhizomucor pusillus</i> SOC 4A al monitoreo de las 60 h.....	70
Gráfica 11. Curva de calibración para la cinética de tanasa.	82
Gráfica 12. Curva de calibración para cuantificación de Fenoles Hidrolizables Totales.	82

Índice de tablas

Tabla 1. Nomenclatura y clasificación	11
Tabla 2. Microorganismos utilizados para la producción de tanasa.....	24
Tabla 3. Clasificación taxonómica de los hongos a la clase <i>Zygomycetes</i>	38
Tabla 4. Familia <i>Mucoraceae</i> (Weitzman <i>et al.</i> , 1995).....	40
Tabla 5. Material para medio de cultivo mínimo en sales Czapek- Dox.	45
Tabla 6. Relación de tiempo y periodo en el modo de repeticiones.....	47

RESUMEN

En esta tesis se evaluaron las condiciones óptimas de pH y temperatura para la estabilidad de la enzima tanasa por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A en Fermentación de Medio Líquido. La enzima tanasa (E.C.3.1.1.20) que cataliza la hidrólisis de los éster presentes en taninos hidrolizables, taninos complejos y ésteres del ácido gálico. Sus principales aplicaciones se encuentran en la elaboración de té instantáneo y en la producción de ácido gálico a partir de fuentes vegetales. El empleo de la enzima tanasa es una opción natural y conveniente, para reducir los efectos indeseables de los taninos en alimentos y en el ambiente. Sin embargo, su alto costo de producción ha limitado severamente su uso a gran escala. Es por esto que en años recientes se han realizado una serie de esfuerzos por mejorar los procesos de producción, recuperación, purificación y aplicación de la tanasa. Los microorganismos como especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* son la fuente más importante de tanasa. En el presente documento se analizan los aspectos fundamentales como el comportamiento cinético de la biomasa y el producto en la fermentación de medio líquido; así como el pH y temperatura óptima de la enzima en el extracto. Para la evaluación cinética de la producción de esta enzima, las condiciones de cultivo fueron: inóculo de 3×10^7 esporas/ml; 50 ml de medio de cultivo; temperatura de 50°C controlada a 120 rpm; tiempo de incubación de 60 horas; con ácido tánico como única fuente de carbono. Los resultados por el método de rodanina metanólica arrojan que a las 60h hay una producción máxima de tanasa de 181.092 UI/ml, y ésta enzima se le encontró reacción a un pH óptimo de 7.0 a una temperatura óptima de 60°C en el extracto.

Correo electrónico; Maria del Rosario Torres Lara, rosm_tl_07@hotmail.com

Palabras claves: *Rhizomucor pusillus*, tanasa, FML, ácido gálico.

1 INTRODUCCIÓN

La biotecnología ofrece una alternativa interesante para la síntesis de derivados de productos naturales, usando microorganismos y enzimas (Gargouri *et al.* 2004). Esta a su vez produce una gran cantidad de enzimas usando una combinación de herramientas de la tecnología de la fermentación y de la genética moderna. Esta producción se lleva a cabo empleando cultivos líquidos sumergidos (CML) y cultivos en medio sólidos (CMS). La fermentación en estado líquido (FEL) o fermentación sumergida (FS) hace referencia a aquella en donde hay por lo menos la misma concentración de agua y de sustrato sólido (nutrientes en el proceso, es decir que hay una solución, Rodríguez-Couto, S. *et al.* 2006). Este el tipo de fermentación más utilizado en la industria debido a que es más sencillo, pueden controlarse muchas más variables que en la fermentación en estado sólido (FES) y el producto final es mucho más fácil de recuperar (Creguer & Crueguer, 1993). La FES se define como proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos que tienen la propiedad de absorber y contener agua, con o sin nutrientes solubles (Viniestra-González, 1997).

La mayoría de las enzimas microbianas que son producidas para su aplicación en la industria alimentaria proceden de un reducido número de microorganismos, debido principalmente a que éstos son seguros para la salud. Por otra parte debido a razones de índole energética la mayoría de las reacciones enzimáticas de la industria no son de síntesis, si no de hidrólisis.

Por la hidrólisis, se hace énfasis en las hidrolasas, estas son enzimas que realizan la ruptura de un gran número de biomoléculas usando como cosustrato a la molécula de H₂O. La subclase específica el tipo de enlace que rompe (éster, éter, glicosídico, peptídico), y la subclase indican los átomos involucrados en esos enlaces. Las hidrolasas más comunes incluyen a las lipasas o esterases, glicosidasas, proteínasas, fosfatasas. Las esterases hidrolizan triglicéridos en condiciones acuosas pero también pueden participar en reacciones de

esterificación y transesterificación en presencia de solventes orgánicos, por lo que es muy importante tener en cuenta su estabilidad en estas condiciones.

El interés industrial por la tanasa que pertenece al grupo de las hidrolasas, se enfoca en los sectores de los alimentos, bebidas, farmacéutica y química (Lekha y Lonsane, 1997; Belmares y *et al.*, 2004). Actualmente existe una búsqueda de microorganismos capaces de degradar altas concentraciones de taninos y en mayores títulos de producción de la enzima, así como procesos que incrementen los niveles de obtención. Es por ello, que en la presente investigación se realizó una producción de enzima tanasa fúngica mediante una fermentación en medio líquido (FML) con el hongo termófilo *Rhizomucor pusillus* SOC- 4A. Existen registros de producción de tanasa en medios sólidos (FES) y líquidos (FEL) con el hongo *Aspergillus niger*, como principal productor. Aun no se tienen datos relevantes de producción de tanasa por el hongo *Rhizomucor pusillus* por lo cual es un trabajo de investigación innovador.

La enzima Tanasa (tanin- acil- hidrolasa, E.C. 3.1.1.20) cataliza los enlaces presentes en galotaninos, taninos complejos y ésteres de ácido gálico. Es ampliamente utilizado como agente clarificante en la fabricación de té instantáneo, cerveza, jugos de frutas y algunos vinos, en tratamiento de efluentes industriales tanino contaminantes y desechos agroindustriales. Además, la tanasa juega un papel importante en la producción de ácido gálico, siendo este último un compuesto intermediario importante en la síntesis del fármaco antibacteriano, trimetoprim, utilizado en la industria farmacéutica (Sitting, 1988) y también en la industria alimentaria; el ácido gálico es un sustrato para la síntesis química o enzimática de galato de propilo, un potente antioxidante.

La tanasa fue descubierta por Tieghem (1867) en un experimento de formación de ácido gálico en una solución acuosa de taninos, donde se destacó el crecimiento de dos especies de hongo, más tarde identificados como *Penicillium glaucum* y *Aspergillus niger* (Lekha y Lonsane, 1997). Durante los próximos cien años, se encontró que ciertos hongos filamentosos, principalmente las especies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Trichoderma* llevan a cabo la producción de

tanasa (Bajpai *et al.*, 1996; Ramos *et al.* 2011). Actualmente la tanasa se comercializa por Biocon (India), Kikkoman (Japón), ASA enzima especial GmbH (Alemania), y JFC GmbH (Alemania) con diferentes unidades catalíticas, dependiendo de la presentación del producto. Kikkoman y Biocon producen tanasa mediante FES (Aguilar *et al.*, 2007).

2 JUSTIFICACIÓN

El uso de enzimas o biocatalizadores es uno de los avances más significativos en el área de la biotecnología blanca, donde esta hace referencia a la rama de la biotecnología dedicada a optimizar los procesos industriales, buscando reemplazar a las tendencias contaminantes por otras más limpias o amigables con el ambiente.

Las enzimas son biodegradables y muchas de ellas pueden funcionar en solventes orgánicos, alta concentración de sales y otras condiciones extremas. Las enzimas hoy se aplican a prácticamente todas las industrias, incluyendo la farmacéutica, alimenticia, química, textil, de detergentes, del papel, etc. Actualmente se investiga gran cantidad de microorganismos termófilos, los cuales actúan de manera óptima a temperaturas muy altas, incluso arriba de los 100°C aunque no son frecuentes. Las enzimas termófilas extremas tienen un potencial de aplicación en el campo alimentario si consideramos que se necesitan enzimas que resistan condiciones drásticas de operación.

Según investigadores del Laboratorio de Enzimas Vegetales del Departamento de Biotecnología el Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional, en México, las tendencias actuales en el desarrollo de productos funcionales o nutraceuticos con la incorporación de la tecnología enzimática abre el abanico existente de ingredientes activos cuyo uso confiere valor agregado al producto alimentario final". Elena Piñeiro (2009)

La ventaja de utilizar hongos aislados de los subproductos agroindustriales es que ya estarían adaptados al sustrato para la producción de las enzimas, por ejemplo de la tanasa. Actualmente hay pocos hongos que sintetizan tanasa a altas temperaturas o tanasa con resistencia y actividad enzimática a elevadas temperaturas.

En el presente trabajo se evaluó la producción de la tanasa producida por la cepa de *Rhizomucor pusillus* SOC 4A, usando ácido tánico como inductor de la actividad tanasa, en un sistema de producción a nivel matraz en fermentación de

medio líquido (FML) a una temperatura 50°C en un monitoreo de 60 horas. Lo anterior fue llevado a cabo en las instalaciones del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

3 HIPÓTESIS

El ácido tánico como sustrato, inducirá la producción de tanasa por *Rhizomucor pusillus* SOC- 4A en fermentación de medio líquido.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluación de las óptimas condiciones de pH y temperatura par allevar a cabo la producción de tanasa por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A en fermentación líquida utilizando el ácido tánico como sustrato.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar de actividad tanasa extracelular por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A.
- Evaluar cinéticamente la producción de tanasa en fermentación de medio líquido por *Rhizomucor pusillus* SOC- 4A.
- Determinar los parámetros óptimos de pH y temperatura con respecto a la actividad enzimática.

5 ANTECEDENTES

5.1 ENZIMAS

Las enzimas se han convertido en herramientas insustituibles para la obtención de productos de índoles muy diversa. Enzimas de distinta naturaleza son utilizadas por muchas industrias de alimentos, químicas y farmacéuticas. Determinadas especies de hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Mucor*, se cuentan entre los principales organismos productores de enzimas industriales, aunque también se obtienen enzimas a partir de bacterias, plantas y animales.

Siguiendo los criterios de la evolución natural de las enzimas de organismos termófilos se han ido haciendo termo-resistentes. El estudio de este complejo comportamiento actividad-temperatura y su posible solución constituye uno de los hitos más interesantes de la biotecnología enzimática pues permitiría el uso masivo de estas enzimas, con una excelente termo-resistencia, para todo tipo de aplicaciones analíticas e industriales.

Las enzimas poseen tres características importantes: son proteínas, son catalizadores y exhiben selectividad frente a los sustratos, también son responsables de los procesos vitales y están implicadas en funciones metabólicas, de síntesis, recambio y de señalización.

Básicamente, una enzima es una molécula proteica cuya estructura le permite ligarse a una clase específica de compuestos (sustratos), una vez finalizada la unión con dichos sustratos, las enzimas modifican y ellas permanecen con la misma estructura. Por ello, desde el punto de vista estricto, es un catalizador, ya que no se consume durante la reacción y al final de ella permanece invariable, tal y como se alimentó al inicio. Su nombre “enzima”, proviene del griego y significa “en levadura” y un catalizador es una sustancia que aumenta la rapidez o velocidad de una reacción química, sin verse alterada ella misma en el proceso global.

Todas las enzimas son proteínas y las proteínas son polímeros de los L-aminoácidos que existen en la naturaleza. Las enzimas tienen masas moleculares de entre ~8kDa (alrededor de 70 aminoácidos, como por ejemplo algunas tiorredoxinas y glutarredoxinas) y 4.600 kDa (el complejo de piruvato Descarboxilasa). Las enzimas más grandes están constituidas por múltiples cadenas polipeptídicas o subunidades y poseen estructura cuaternaria.

Al igual que las proteínas, les hay de muy diferentes tamaños y requerimientos; algunas necesitan para desarrollar su actividad tan solo su estructura aminoacídica, mientras que otras requieren la presencia de un cofactor. Este compuesto puede ser, sencillamente un ión inorgánico, Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} o Zn^{2+} ; o una molécula orgánica más o menos compleja, que si se encuentra unida covalentemente se denomina grupo prostético, y si establece uniones de naturaleza débil y reversible se denomina coenzima. Muchas vitaminas, derivados de las mismas, funcionan como *coenzimas*. A la enzima completa junto a su cofactor se denomina *haloenzima* y su parte exclusivamente proteica *apoenzima*.

La actividad catalítica de las enzimas depende de la integridad de su conformación proteica nativa. Si se desnaturaliza o disocia una enzima en sus subunidades, se pierde normalmente la actividad catalítica. Así la integridad de la estructura primaria, secundaria terciaria y cuaternaria de las proteínas enzimáticas es esencial para su actividad (Lehninger, 1991).

Las enzimas corresponden a dos clases generales:

- Proteínas simples: solo contienen residuos de aminoácidos, ejemplo enzimas extracelulares, 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 tiene 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).

5.1.1 Nomenclatura

En general, se ha mencionado a las enzimas de manera empírica y poco sistemática; ya que en algunos casos se ha tomado como raíz del nombre el del sustrato que reconoce la enzima y se le agrega el sufijo –asa. Por ejemplo, a una enzima que degrada proteínas se le llama proteinasa o proteasa. Algunas enzimas tienen nombres asignados antes de adoptar esta convención, por ejemplo, tripsina, papaína, invertasa, diastasa. Posteriormente, hubo la necesidad de asignarles un nombre sistemático. Miembros de la IUPAC (International of Pure and Applied Chemistry) y del IUB (International Union of Biochemistry) y posteriormente de la IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) idearon un sistema de identificación en el que cada enzima se le asigna una serie de cuatro dígitos, al que se ha llamado número de la EC (Enzyme Comission). El primer dígito está relacionado con la reacción química que cataliza la enzima, indicando el grupo al que pertenecen, dividiéndose así en seis grandes grupos y subgrupos que definen sus funciones con mayor precisión, las principales clases son las siguientes:

1. *Oxidoreductasas* que catalizan reacciones de oxidación- reducción. Entre las subclases de este grupo se encuentran deshidrogenasas, oxidasas, oxigenasas, reductasas, peroxidadasas.
2. *Transferasas* que catalizan transferencias de grupos funcionales de una molécula donadora a una aceptora. Entre los ejemplos d estos grupos están amino, carboxilo, carbonilo, metilo, fosforilo y acilo (RC=O), los nombres comunes triviales suelen incluir el prefijo trans. Entre los que están son las transcarboxilasas, transmetilasas y transminasas.

3. *Hidrolasas* que catalizan reacciones en las que se produce la ruptura de enlaces por la adición de agua. Entre las hidrolasas están las esterasas, fosfatasas y peptidasas.
4. *Liasas* que catalizan eliminaciones de un grupo o adiciones de un grupo a un doble enlace, u otras rupturas que implican un reordenamiento electrónico. Los ejemplos son liasas, descarboxilasas, hidratasas, deshidratasas, desaminasas y sintasas.
5. *Isomerasas* se trata de un grupo heterogéneo en enzimas, las cuales catalizan varios tipos de reordenamientos intramoleculares. Las epimerasas catalizan la inversión de átomos de carbono asimétrico. Las mutasas catalizan la transferencia intramolecular de grupos funcionales.
6. *Ligasas* promueven la unión covalente de dos moléculas acopladas con la ruptura de un enlace pirofosfato, proveniente de ATP, UTP o CTP, como fuente de energía. El término ligasa es sinónimo de sintetasa.

El segundo dígito de la nomenclatura corresponde a la subclase de enzima, por ejemplo, en el caso de las hidrolasas se refiere al tipo de enlace que hidroliza: el 3.1 de enlaces éster. El 3.2 de enlaces glucosídicos, el 3.4 de enlaces peptídicos, etcétera.

El tercer dígito es una subdivisión y ofrece más información con respecto al sustrato que utiliza la enzima. Por lo tanto, si se tiene una hidrolasa de uniones éster (3.1) el tercer número indicará si se trata de un enlace éster carboxílico (3.1.1), tioéster (3.1.2), monofosfato (3.1.3), etcétera.

Finalmente, el cuarto dígito indica el número serial de la enzima en el grupo correspondiente.

Los seis grupos de enzimas indicados corresponden a reacciones importantes en el metabolismo celular; no todas de igual importancia para la industria, el procesamiento o el deterioro de los alimentos. Es claro que el grupo de enzimas más importante, en términos de su aplicación en la tecnología de alimentos, es el de las hidrolasas.

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
EC 2 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 hidrólisis	$AB + H_2O \rightarrow OH + BH$	Lipasa, amilasa, peptidasa
EC 4 Liasas	Eliminación de grupos para formar enlaces doble. Pueden romper enlaces C-C, C-N, C-O, C-S.	$RCOCOOH \rightarrow RCOH + CO_2$	Descarboxilasa
EC 5 Isomerasas	Isomerización de una molécula.	$AB \rightarrow BA$	Isomerasa, mutasa
EC 6 Ligasas	Formación de enlaces acoplados con hidrólisis de ATP, de nuevos enlaces C-O, C-S, C-C con la rotura simultánea de ATP.	$X + Y + ATP \rightarrow XY + ADP + pi$	sintetasa

Voet. Voet. 2006.

5.1.2 Especificidad

Las enzimas tienen la capacidad de catalizar reacciones químicas de manera muy específica: es decir, su intervalo de acción se limita a un determinado tipo de compuesto que debe reunir ciertas características estructurales 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 la 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.

5.1.3 Sitio activo

La molécula o moléculas a modificar se sitúan en una región concreta de la enzima denominada centro o sitio activo. Esta zona de la enzima es responsable de las dos propiedades básicas de la molécula: la especificidad y la acción catalizadora de la proteína.

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 lleva 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. 2006).

Más tarde, Koshland (1958) postuló que la enzima presenta cierta flexibilidad después de que el sustrato interacciona con la enzima, se induce un cambio en el sitio activo de tal manera que se ajusta a la molécula de sustrato, lo que provoca la formación de un intermediario entre ambos, y da lugar a la formación del producto. Este es el proceso representado en la figura siguiente:



Figura 1. Diagrama ilustrando la Interacción enzima-sustrato.

5.1.4 Determinación de la actividad enzimática

La actividad catalítica de las enzimas se mide en condiciones estándar, con concentración saturante y temperatura de 37°C. La unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μM de producto por minuto. Las medidas de concentración de enzima que en medios naturales son del orden de 10^{-8} a 10^{-12} M pueden también expresarse como unidades enzimáticas por unidad de volumen (U/ml).

La utilización del Sistema Internacional ha dado lugar a una unidad que se conoce con el nombre de katal (kat) que es la cantidad de enzima que transforma un mol de sustrato por segundo, al ser una unidad excesivamente grande no tiene una aplicación muy extendida.

En último término, y aunque no sea una unidad de medida directa, la actividad específica, se define como el número de unidades de actividad enzimática que hay

por miligramos de proteína (U)/mg de proteína, y sirve para cuantificar la pureza de una preparación enzimática.

5.1.5 Factores que afectan la velocidad de las reacciones enzimáticas

Las enzimas son proteínas que funcionan en un determinado medio, bien sea intracelular o extracelular, donde las condiciones pueden variar, y por lo tanto el nivel de actividad de la molécula puede verse modificado a lo largo del tiempo. La velocidad a las 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.

5.1.5.1 Concentración de la enzima y el sustrato

Una enzima funciona de manera más eficiente cuando la concentración de sustrato está en exceso en relación con la concentración de la 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.

En la figura se observa el efecto de la concentración del sustrato sobre el índice de la actividad enzimática. El índice aumenta rápidamente con incremento inicial en el sustrato; incrementos posteriores en las concentraciones del sustrato no tienen efecto sobre el índice; ya que este se vuelve independiente de la concentración del sustrato, el mismo efecto ocurre con un incremento de la concentración de la enzima, como se aprecia en la Fig.2.

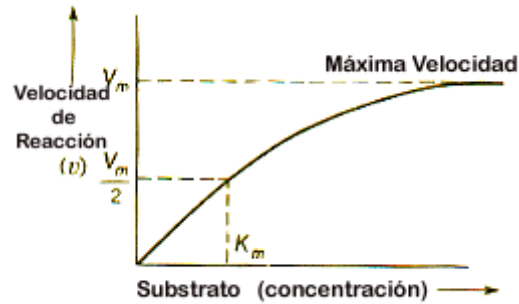


Figura 2. Efecto de la concentración del **sustrato** sobre el índice de la actividad enzimática.

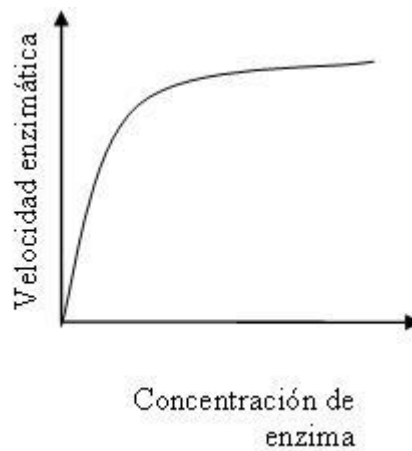


Figura 3. Efecto de la concentración de la **enzima** en la actividad enzimática.

5.1.5.2 Efecto 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 ionizables), o del complejo enzima-sustrato.

La mayoría de las enzimas presentan un rango de pH relativamente estrecho en el que presentan una actividad óptima, desactivándose en pH's extremos; sin embargo existen excepciones, como la catalasa bovina o la α -amilasa que presentan un rango de actividad óptima muy amplio.

Aunque la mayoría de las enzimas poseen un pH característico en el cual la actividad es máxima; por encima o por debajo de este pH la actividad disminuye, los perfiles de las curvas de actividad en función del pH de muchas enzimas son acampanados pero pueden variar considerablemente de forma (Fig. 4). La relación entre el pH y la actividad de cualquier enzima depende del comportamiento ácido – base de la enzima y del sustrato, ya que este afecta el grado de ionización de los aminoácidos del sitio activo tanto del sustrato como del complejo enzima-sustrato, e influyendo en la afinidad que tenga la enzima por el sustrato (Badui, 2000).

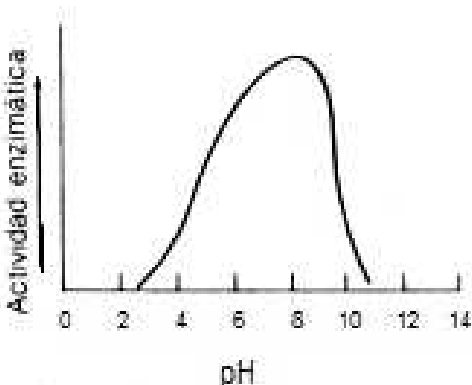


Figura 4. Efecto de la concentración de la enzima en la actividad enzimática

5.1.5.3 Efecto de la temperatura

Cada enzima tiene una temperatura óptima a la que actúa con su máxima eficacia. Debido a que las enzimas son proteínas, los valores de temperatura óptima dependen del pH y la fuerza iónica.

Como sucede con cualquier otra reacción química, la velocidad de las reacciones enzimáticas se incrementa con la temperatura, al aumentar la energía cinética de las moléculas, pero el intervalo en que las enzimas es estable y retiene su capacidad catalítica; en casos extremos, cuando el incremento es muy grande, se favorece la desnaturalización y consecuentemente la proteína pierde su capacidad catalítica. Existen varios factores que, además de la estabilidad conformacional,

también afectan la actividad enzimática al aumentar la temperatura, y son: la solubilidad de gases (oxígeno), el pH de la solución amortiguadora, la afinidad de la enzima por el sustrato, por activadores o inhibidores, así como la presencia de reacciones de competencia. Por esta razón cada enzima tiene un intervalo óptimo de temperatura en el cual se logra la mayor actividad, para la mayoría está entre 30 y 45°, 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. Aunque algunas enzimas son completamente estables y conservan su actividad a temperaturas muy superiores (Peretó Julio G. 2007).

Aunque las reacciones catalizadas por las enzimas parecen con frecuencia, poseer una temperatura óptima como se muestra en la figura 5, donde se representa la actividad catalítica frente a la temperatura, estas enzimas al ser proteínas, se desnaturalizan por la acción del calor y se inactivan cuando la elevación de temperatura sobrepasa un cierto punto.

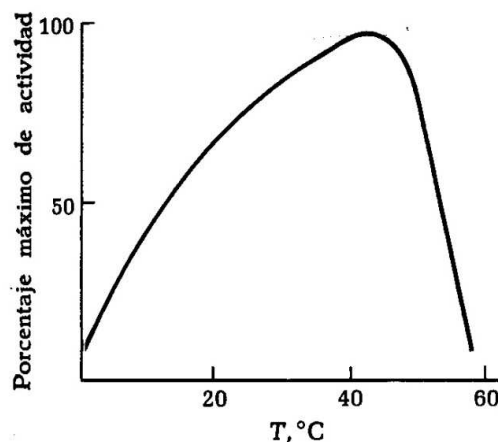


Figura 5. Efecto de la de la temperatura sobre la actividad de una enzima.

Una enzima o proteína se llama termoestable, cuando tiene una larga vida media a una alta temperatura seleccionada. Una temperatura alta debe ser una que se

encuentre por encima de los límites termófilos para el crecimiento [$>55^{\circ}\text{C}$]. La mayoría, pero no todas, de las proteínas de los termófilos son termoestables (Turner, 2007). Razones fundamentales para elegir enzimas termoestables para el bioprocesamiento, es su termoestabilidad intrínseca, lo que implica posibilidades para el almacenamiento prolongado (a temperatura ambiente), una mayor tolerancia a disolventes orgánicos (Kristjansson, 1989) y mayores aplicaciones en diversos procesos.

El estudio de nuevos microorganismos extremófilos y sus enzimas ha tenido gran impacto en el campo de la biocatálisis, ya que están adaptados para sobrevivir en nichos ecológicos en donde prevalecen valores extremos de temperatura y pH, concentraciones salinas y presiones altas, entre otras condiciones extremas (Vieille & Zeikus, 2000). Asimismo las enzimas termoestables producidas entre los 45 y 100°C por los microorganismos termotolerantes, termófilos e hipertermófilos son generalmente resistentes a la desnaturalización química y proteolítica (Jaenicke, 1991).

5.1.5.4 Efecto de la actividad del agua

Los alimentos se deshidratan para evitar el crecimiento microbiano; sin embargo, aun en estas condiciones perdura la acción de muchas enzimas. Algunas enzimas llegan a actuar con un mínimo de agua, como ocurre con las lipasas que contienen los aceites puros. En casos, la amplia disponibilidad del sustrato hace que las reacciones se logren aún en condiciones de baja actividad del agua (a_w). De hecho, existe evidencia, obtenida por resonancia magnética nuclear (RMN), de enzimas globulares fijan de 0.2 a 0.3 g de agua en los grupos polares de la superficie, a partir de la cual pueden empezar a funcionar como catalizadores.

Para alcanzar valores de a_w bajos, la enzima liofilizada se puede equilibrar en un ambiente con menor a_w , como podría ser en disolventes orgánicos no miscibles con el agua (por ejemplo, n-butanol, hexano, ciclohexano, etcétera), o reemplazar agua con disolventes no miscibles con agua como el glicerol.

Algunas de las aplicaciones más importantes de enzimas en medios no acuosos incluyen la producción de aspartamo; la reestructuración de triacilgliceroles, por reacciones de transesterificación, para la obtención de lípidos con mejores características industriales (fusión, solubilidad) y nutricionales (como ácidos grasos insaturados). También en medio orgánico es posible sintetizar alquilglucósidos u otros agentes tensoactivos para mejorar las propiedades espumantes y emulsificantes en los alimentos o para facilitar la incorporación de aditivos insolubles, como algunos saborizantes, colores o agentes antioxidantes.

5.1.6 Inhibición enzimática

Una forma de influir sobre la actividad de las enzimas, aparte de los factores de pH y temperatura descritos anteriormente, estriba en los efectos que tienen algunas moléculas al unirse a las enzimas. Al conjunto de moléculas que disminuyen la actividad enzimática se les denomina inhibidores, y en las reacciones químicas del organismo *in vivo* son utilizados para controlar el grado de actividad de una enzima concreta.

Dependiendo del tipo de unión que establezcan con la enzima hay dos grandes grupos de inhibidores:

1) INHIBICIÓN REVERSIBLE

Dentro de los inhibidores reversibles hay tres grupos dependiendo del lugar y forma de unión a la enzima:

- ⇒ Los **inhibidores competitivos**, denominados así porque compiten con el sustrato por ocupar el centro activo. Estas moléculas presentan una semejanza estructural con el sustrato que les permite situarse en el centro activo y bloquear la catalización enzimática, lo que desde el punto de vista cinético supone un descenso en la velocidad de reacción.
- ⇒ Los **inhibidores no competitivos** se unen a la enzima en puntos distintos al centro activo, su unión incapacita a la enzima para desarrollar su acción catalítica, y en este caso, el aumento en la concentración de sustrato no revierte la inhibición.

⇒ Los **inhibidores acompetitivos o incompetitivos**, no presentan afinidad por la molécula de enzima libre, sino que se unen a la enzima cuando ésta se encuentra formando el complejo enzima- sustrato (ES), inhabilitándole para continuar el proceso y formar producto.

2) INHIBICIÓN IRREVERSIBLE

Los inhibidores irreversibles son los que se unen a la enzima mediante enlaces covalentes, bien en el centro activo o en cualquier otro lugar, causando una inactivación permanente.

5.1.7 Explotación industrial de las enzimas

Las enzimas se encuentran en todos los seres vivos y son piezas esenciales en su funcionamiento. Las enzimas tienen muchas aplicaciones en diversos tipos de industrias, entre las que se destaca la alimenticia. La producción de enzimas para su uso industrial tuvo sus orígenes en Dinamarca y Japón, a finales del siglo XIX, cuando se produjeron las primeras preparaciones de renina a partir del estómago de terneros y de amilasa de origen fúngico. Las enzimas son productos de las células y por lo tanto pueden obtenerse a partir de tejidos animales, tejidos vegetales o mediante procesos de fermentación empleando microorganismos seleccionados (Carrera Jorge, 2002).

El empleo de las enzimas tiene muchas ventajas:

- a) Son muy específicas en su manera de actuar, por lo que no propician reacciones secundarias indeseables.
- b) Funcionan en condiciones moderadas de temperatura y pH y no requieren de condiciones de procesamiento drásticas que puedan alterar la naturaleza del alimento, ni de equipo muy costoso.
- c) Actúan en muy bajas concentraciones, entre 10^{-8} y 10^{-6} M.
- d) Su velocidad puede ser controlada al ajustar el pH, la temperatura y la concentración de enzima.
- e) Son fácilmente inactivadas una vez alcanzado el grado de transformación deseado.

A partir de los años ochenta que se desarrollan nuevas herramientas fermentativas para la producción y comercialización de enzimas a gran escala.

Una de las ventajas que ofrece la obtención de enzimas por fermentación es que muchos microorganismos las producen extracelularmente, es decir, las segregan de la célula, lo que hace que su recuperación sea sencilla. Sin embargo, en otros casos las enzimas son intracelulares y es preciso romper las células para su extracción. En ambos casos el extracto crudo se disuelve en un amortiguador acuoso y las enzimas se precipitan por la adición de disolventes orgánicos, como el etanol o acetona, o secan al vacío o se liofilizan. La recuperación de las enzimas se debe llevar a cabo en condiciones tales que no provoquen pérdida de la actividad catalítica. Cuando se desea obtener enzimas más puras se recurre a métodos cromatográficos mediante los cuales las proteínas se separan de acuerdo con su carga, tamaño, interacciones hidrofóbicas e incluso su especificidad.

Dado a que la presencia de la enzima no necesariamente implica que esté activa (puede estar presente en forma desnaturalizada), los productos enzimáticos se comercializan de acuerdo con su potencia catalítica; generalmente se estandarizan a una cierta actividad y se les añaden agentes estabilizantes (propilenglicol, sorbitol, glicerol). También se les pueden adicionar cloruro de sodio o benzoatos para evitar el crecimiento microbiano y conservarlos en el almacenamiento.

Actualmente, con el desarrollo de áreas como la genómica y la proteómica y de herramientas útiles para el análisis y la manipulación de la estructura de proteínas, es posible no solamente tener acceso a un extenso universo de nuevas actividades enzimáticas de diferente origen, sino también manipular, diseñar y mejorar las actividades enzimáticas nuevas y tradicionales.

5.2 TANASA

La tanasa (tanin acil-hidrolasa), son un grupo importante de biotecnología relevante de enzimas que se han utilizado en un número industrial de aplicaciones, incluyendo la manufactura de té instantáneos, cerveza, jugo de frutas, algunos vinos y la producción de ácido gálico. Las tanasas por lo general pueden ser obtenidas a partir de fuentes vegetales, animales y de los microorganismos; donde la fuente microbiológica es la más importante y a la cual pertenecer especies como *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Lactobacillus* y *Bacillus*.

Las tanasas se producen generalmente sobre el ácido tánico, el salvado de trigo, el té y el extracto de cáscara de café. Las tanasas microbianas inducen en su mayoría enzimas extracelulares y producidas en fermentación sumergida y fermentación en estado sólido. La enzima es más comúnmente purificada por cromatografía de interacción hidrófoba, además de revertir micela. La mayoría de tanasas pueden actuar en una amplia gama de temperatura y pH, aunque tanasas con pH ácidos óptimos son más comunes. Una clasificación basada en la secuencia de tanasas se extiende en muchas familias que reflejan así la variedad de moléculas (Yao Jian, *et al.*, 2013).

5.2.1 Fundamentos

La enzima tanin acil-hidrolasa (E.C. 3.1.1.20), comúnmente conocida con el nombre de tanasa; ésta enzima actúa sobre galotaninos, elagitaninos y taninos complejos, pero sólo rompe enlaces éster sin afectar la uniones carbono- carbono, por lo cual no actúa sobre taninos condensados. (Haslam y Stangroom. 1996).

La tanasa es una glicoproteína con actividad esterasa y depsidasa. Su alto contenido de azúcares (principalmente azúcares neutros) que oscila entre el 11 y 64%, puede estar relacionado con la resistencia de la TAH a ser precipitada por los taninos, como la mayoría de las proteínas (Aoki *et al.*, 1976a; Albertse, 2002; Zhong *et al.*, 2004; Kasiaczka-Burnecka *et al.*, 2007).

La tanasa juega un papel importante en la producción de ácido gálico (Coggon *et al.* 1975; Chae y Yu 1983; Pourrat *et al.* 1985; Lekha y Lonsane 1997; García-

Nájera *et al.* 2.002; Belmares *et al.* 2004), siendo este último un compuesto intermediario importante en la síntesis del fármaco antibacteriano, trimetoprim, utilizado en la industria farmacéutica (Sitting, 1988) y también en la industria alimentaria; el ácido gálico es sustrato para el uso químico o de síntesis enzimática en galato de propilo, como un potente antioxidante. Sin embargo, el uso práctico de esta enzima está limitado en la actualidad debido a un conocimiento insuficiente acerca de sus propiedades, la expresión óptima y aplicación a gran escala.

La tanasa fue descubierta por primera vez por Tieghem (1867) en un experimento de formación de ácido gálico en una solución acuosa de taninos, donde crecieron dos especies de hongos más tarde identificados como *Penicillium glaucum* y *Aspergillus niger* (Lekha y Lonsane, 1997). Durante los próximos cien años, ciertos hongos filamentosos, principalmente las siguientes especies: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Trichoderma* fueron encontrados como productores de tanasa (Bajpai, 1996; Ramos E.L. *et al.*, 2011).

En la última década, se han producido una serie de esfuerzos para mejorar la producción, la recuperación y purificación de los procesos de la enzima. Estos esfuerzos incluyen el desarrollo de nuevos sistemas de fermentación, la optimización de condiciones de cultivo, la producción de la enzima por microorganismo recombinante y diseño de protocolos eficientes para la recuperación y purificación de tanasa (Rodríguez-Duran L.V *et al.*, 2011).

5.2.2 Fuentes de obtención

La tanasa (TAH) puede ser obtenida a partir de fuentes vegetales, animales y de los microorganismos; donde la fuente microbiológica es la más importante.

Obtención de TAH de origen animal: se puede extraer de la mucosa ruminal del 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 Gutiérrez- Sánchez, 2001), y algunos insectos producen la enzima durante el estado larvario (Nierenshtein, 1930).

Obtención de TAH de origen vegetal: la enzima está presente en los vegetales ricos en taninos principalmente en sus frutos, hojas, ramas y en cortezas de los árboles, como el “mirobolano” y el “badúl”, en corteza de Brasil (*Heamatoxylon 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 *et al.*, 2004).

Obtención de TAH vía microbiana: El origen microbiano, principalmente bacterias y hongos, representa la mayor cantidad de enzimas utilizadas en aplicaciones biotecnológicas. La producción de TAH fue reportada en levaduras (Aoki *et al.*, 1976). Las bacterias son generalmente consideradas como altamente sensibles a los tanino, pero al aislar algunas se observó que son capaces de sobrevivir en presencia de taninos e incluso degradarlos (Basaraba, 1966).

Como se mencionó anteriormente la TAH puede ser extraída de fuentes animales y vegetales, pero para su producción comercial se prefiere utilizar fuentes microbianas, ya que las enzimas producidas por microorganismos suelen ser más estables que sus análogas de origen vegetal o animal. Además, los procesos fermentativos pueden producir grandes cantidades de enzimas en forma constante y pueden ser controlados con mayor facilidad (Lekha y Lonsane, 1997). Aunque se sabe que los taninos inhiben el crecimiento microbiano, existen especies que han desarrollado los mecanismos necesarios para degradarlos, entre ellos la producción de la enzima tanasa (Banerjee y Pati, 2007).

En el tabla 2 se enumeran los microorganismos que se han utilizado para la producción de la enzima tanasa.

Tabla 2. Microorganismos utilizados para la producción de tanasa

<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Aspergillus niger van Tieghem</i>	<i>Penicillium frequentans</i>
<i>Enterobacter cloacae</i> MTCC 9125	<i>Aspergillus niger</i> GH1	<i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>Serratia ficaria</i> DTC	<i>Aspergillus niger</i> MTCC2425	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IIB 8914
<i>Selenomonas ruminantium</i>	<i>Aspergillus tamaris</i> IMI388810	<i>Fusarium subglutinans</i>
<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Aspergillus tamaris</i>	<i>Fusarium solani</i>
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	<i>Aspergillus awamori</i> MTCC 9299	<i>Fusarium spp.</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i> CECT 748 ^T	<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Arxula adenivorans</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Aspergillus gallonyces</i>	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>
<i>Lactobacillus sp. ASR- S1</i>	<i>Aspergillus foetidus</i>	<i>Doratomyces stemonitis</i>
<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Aspergillus aculeatus</i> DBF 9	<i>Rhizopus oryzae</i>
<i>Bacillus cereus</i> KBR9	<i>Aspergillus fumigatus</i> MA	<i>Trichoderma spp.</i>
<i>Bacillus licheniformis</i> KBR9	<i>Aspergillus japonicus</i>	<i>Trichoderma viride</i>
<i>Weissella paramesenteroides</i>	<i>Aspergillus ruber</i>	<i>Verticillium sp. P9</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Hyalopus sp.</i>
<i>Leuconostoc fallax</i>	<i>Paecilomyces variotii</i>	<i>Candida sp.</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Penicillium variable</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lonepinella koalarum</i>	<i>Penicillium spp.</i>	<i>Mycotorula japónica</i>
<i>Achromobacter sp.</i>	<i>Penicillium canescens</i>	<i>Syncephalastrum racemosum</i>
<i>Klebsiella planticola</i>	<i>Penicillium zacinthae</i>	<i>Raffaelea quercivora</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Penicillium purpurogenum</i>	
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium spinulosum</i>	

Adaptado de: Aguilar *et al.*, 2007.

5.2.3 Producción en Fermentación en Medio Sólido (FMS)

La fermentación en estado sólido (FES) es caracterizada por un proceso de fermentación sobre un soporte sólido, el cual tiene un bajo contenido de humedad (límite inferior $\approx 12\%$) y ocurre en estado no aséptico natural (Nigam and Singh, 1994). La FES produce una alta concentración de producto con un relativamente bajo requerimiento energético (Mudgett *et al.*, 1992; Yang and Yuan, 1990). La FES ha sido explotada para la producción de alimentos (Bhumiratana *et al.* 1980;

Heseltine, 1983), alimentos para animales (Gumbina Said, 1996; Nigam and Singh, 1996a; Dandhu and Joshi, 1997), combustible (Hinman *et al.*, 1992; Ingram *et al.* 1999; Lapadatescu and Bonnarme, 1999) y enzimas (Gombert *et al.* 1999; Nigam and Singh, 1996b) y además degradación de colorantes (Nigam *et al.*, 2000: Robinson *et al.*, 2000), etc.

Debido a la ausencia de agua libre, se emplean fermentadores pequeños para la FES y por tanto se requiere menos esfuerzo para los procesos de separación (downstream). Las cepas nativas o silvestres de bacterias y hongos tienden a un mejor comportamiento en condiciones de FES que los microorganismos genéticamente modificados, reduciendo además costos de energía y de requerimientos (Barrios- González *et al.* 1993).

La fermentación en estado sólido (FES) se ha usado exitosamente para la producción de enzimas y metabolitos secundarios. Estos productos están asociados con la fase estacionaria de crecimiento microbiano y son producidos a escala industrial para su uso en agricultura y en el tratamiento de enfermedades.

5.2.4 Producción en Fermentación de Medio Líquido (FML)

La fermentación en estado líquido o fermentación sumergida (FEL) es aquella en la cual hay por lo menos la misma concentración de agua y de sustrato sólido (nutrientes) en el proceso, es decir que hay una solución de nutrientes (Cuoto y Sanromán 2006; Fazenda, Seviour *et al.* 2008). Es el tipo de fermentación más utilizado en la industria debido a que es sencillo, pueden controlarse muchas más variables que en la fermentación en estado sólido (FES) y el producto final es mucho más fácil de recuperar (Crueger y Crueger 1993). En ella los microorganismos se desarrollan flotando en el medio de cultivo y en el caso de los hongos miceliales, éstos pueden formar pequeñas esferas de micelio denominadas “pellets” cuando hay agitación, de otra forma, crecen en la superficie. En la FEL el desarrollo del microorganismo se presenta de una forma típica, dando origen a una fase de latencia, una de crecimiento (fase logarítmica), una fase estacionaria y la última, la fase de muerte.

Industrialmente, los metabolitos secundarios son principalmente producidos bajo condiciones sumergidas (FLS) principalmente porque los procesos asociados con el escalamiento son más simplificados. La fermentación líquida permite más control de los parámetros tales como el pH, calentamiento, condiciones nutricionales, etc.

5.2.5 Aplicación de la tanasa

Los usos de la tanasa se concentran en las industrias de la piel, farmacéutica y de alimentos. Hasta el momento, las principales aplicaciones de la tanasa están en la elaboración de té 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 Gutiérrez-Sánchez, 2001; Belmares *et al.*, 2004).

El ácido gálico se utiliza en la industria farmacéutica como 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 en la revelación fotográfica. Diversos estudios han encontrado que el ácido gálico y compuestos relacionados tienen propiedades terapéuticas importantes (Abdelwahed *et al.*, 2007; Banerjee *et al.*, 2007; Yu y Li, 2008).

Los usos de 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 acomplejamiento con la cafeína. Los procesos químicos para eliminar los precipitados del té pueden eliminar

Las altas concentraciones de taninos en bebidas, como té helado, cerveza, vino, jugos de algunas frutas y bebidas refrescantes con sabor a café, pueden ocasionar la formación de precipitados formados por la interacción de los

polifenoles con algunas otras moléculas presentes en dichas bebidas. Estos efectos indeseables de los taninos pueden ser reducidos o eliminados mediante un tratamiento enzimático (Lekha y Lonsane, 1997). El empleo de la enzima tanasa para degradar los taninos de bebidas y alimentos tiene un doble propósito, eliminar los efectos indeseables causados por estos compuestos, incrementando la calidad de los productos; y liberar los monómeros de los polifenoles, conservando la capacidad antioxidante de los alimentos.

Los principales taninos en los vino son la catequina y epicatequina, que pueden estar acompañadas de galocatequina y otros derivados galoiles. La cantidad de catequina en vinos blancos es del orden de 10 a 50 mg/L, mientras que en vinos tintos puede ser de hasta 800 mg/L (Ribéreau-Gayon, 1973). El 50% del color de los vinos tintos se debe a estos compuestos, sin embargo, si son oxidados a quinonas por contacto con el aire pueden formar cierta turbidez no adecuada. Por otro lado si la cantidad de taninos es excesiva puede darse también precipitados o demasiada astringencia de los vinos, estos problemas han sido solucionados con el uso de tanasa.

También se ha descubierto que la cerveza tiene cierta cantidad de taninos, sobre todo antocianidinas. Cuando la cantidad de proteínas presente en la cerveza es demasiado elevada se puede dar la formación de precipitado y turbidez (Chapon, 1961), este problema representa un uso potencial para la tanasa.

Se han descrito compuestos que son combinaciones de los tipos de taninos; por ejemplo, el galato de teoflavina, posible producto intermediario encontrado en la fermentación del té (Fennema, 1985). Al respecto existen varias patentes, las primeras registradas en el año 1977 (United States Patents No 4639375, 1977) donde se describen procesos para el tratamiento de las hojas de té con tanasa, de forma tal que, el té obtenido como producto final no forma turbidez al ser refrigerado y el té instantáneo obtenido a partir de las hojas tratadas con tanasa es de mejores características de solubilidad (United States Patents USP No 5445836, 1995; USP No 5258188, 1993; USP No 4639375, 1987). Además, se reporta que la actividad antioxidante de extractos acuosos de hojas de té negro se incrementa,

tratando dichos extractos con tanasa. Estos extractos son posteriormente incorporados en alimentos susceptibles a la oxidación de lípidos (USP No 4925681, 1990; USP No 4891231, 1990).

5.3 TANINOS

Los taninos son el segundo grupo de fenoles más abundante en la naturaleza y cumplen diversas e importantes actividades biológicas en la planta que los produce: actúan como defensa contra enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus protegen los tejidos contra el ataque de insectos y herbívoros (Swain, 1997; Scalbert, 1991). Se caracterizan por su capacidad para formar fuertes complejos con macromoléculas (proteínas, celulosa y almidón, entre otros) y minerales, causando su precipitación por su interacción con las proteínas. (Frutos *et al.*, 2004; Aguilar *et al.*, 2007).

5.3.1 Definición

Después de ligninas, taninos son el segundo grupo más abundante de polifenoles de las plantas. Que se encuentran en todo el mundo en muchas familias diferentes de las plantas superiores, tales como tara, biliar, roble, mirobálano, zumaque y así sucesivamente. Y las altas concentraciones de taninos se encuentran en casi todas las partes de la planta incluyendo la raíz, corteza, madera, hojas, frutos y semillas. Una de las principales características de taninos es su capacidad para formar complejos fuertes con proteína, almidón, celulosa, minerales y enzimas digestivas, incluyendo pectinasa, amilasa, lipasa, proteasa, celulasa y B-galactosidasa.

Los taninos son sustancias no nitrogenadas, de estructura polifenólica, solubles en agua, alcohol, acetona, pocos solubles en éter, de sabor astringentes y con la propiedad de curtir la piel, haciéndola imputrescible, fijándose sobre sus proteínas (distinto del curtido al cromo donde se utiliza alúmina y cromo).

Los taninos, dada su composición, dan por hidrólisis total una molécula de hidrato de carbono y un número más o menos grande de moléculas de ácido gálico.

5.3.2 Clasificación

La clasificación de taninos más acertada que se ha realizado y que todavía se emplea actualmente es la realizada por Freudenberg (1920) y que considera dos grupos fundamentales basándose en el tipo de estructura base del tanino: taninos condensados y taninos hidrolizables. Más recientemente los análisis realizados por diversos autores (Haslam 1981; Nonaka 1989) mediante CP-MAS y C-NMR han permitido realizar una clasificación (Fig. 6) en la que además de distinguir taninos condensados e hidrolizables, se distingue un tercer grupo de taninos complejos, en los que se incluyen aquellos taninos que presentan en su composición moléculas identificadas tanto como propias de taninos condensados como hidrolizables. (Peña Rodríguez Cristina, 2007).

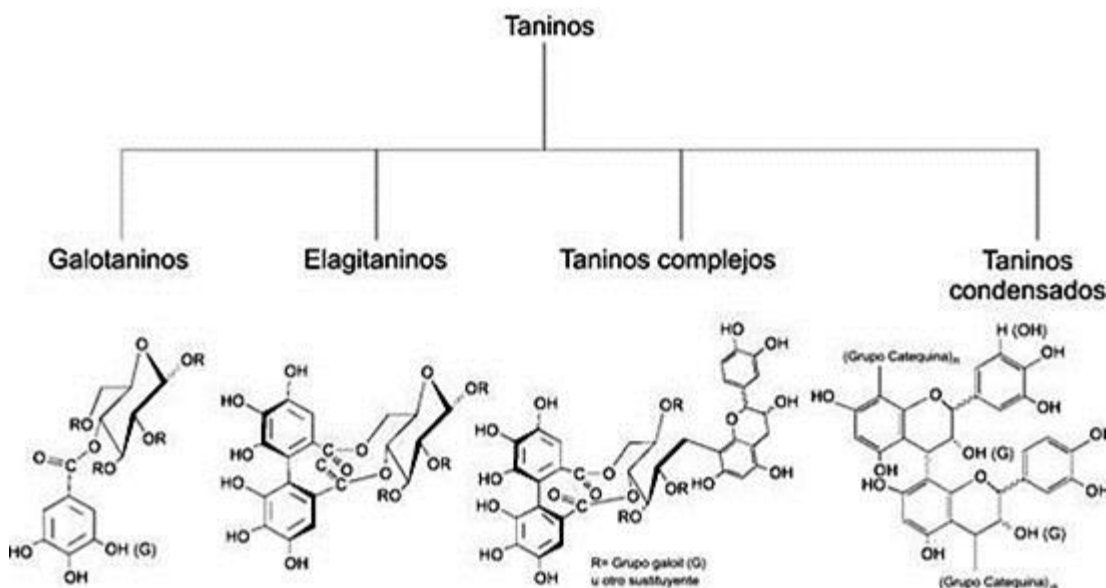


Figura 6. Clasificación de los taninos (Aguilar y Gutiérrez Sánchez, 2001)

<http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%204/AQM4quimica.html>

5.3.2.1 Taninos condensados

Los taninos condensados conocidos genéricamente como poliflavonoides o proantocianidinas están constituidos por flavonoides con diferentes grados de condensación (flava-3-ol y flavan-3,4-diol) así como otros flavonoides análogos, carbohidratos y trazas de amino e imino ácidos. La estructura básica de los

taninos se presenta en la figura 7. (Hon y Shiraishi 2001; De Bruyn et al. 1999; Samil et al. 2005; Santana et al 1996).

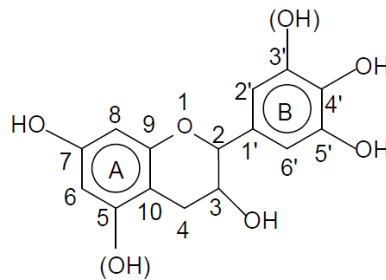


Figura 7. Estructura básica de los taninos condensados

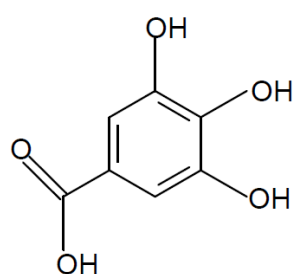
Las estructuras básicas que componen los taninos están unidas con otras mediante enlaces C_4-C_6 y C_4-C_8 (Roux et al. 1975 y 1980).

Estas sustancias no son hidrolizables por los ácidos ni por las enzimas. Los ácidos fuertes en caliente o los agentes de oxidación los convierten en sustancias rojas u oscuras, insolubles en la mayor parte de los solventes, llamados “Flobafenos”. Estos taninos no son derivados del ácido gálico sino que derivan de los catecoles, a los que se los considera protaninos. Poseen estructura relacionada con los flavonoides y por ser no glucídicos son poco solubles en agua y en lugar de hidrolizarse cuando se los hace hervir en ácido diluido, se transforma en producto de condensación. Las catequinas se consideran precursores de los taninos condensados. Los taninos presentes en las uvas son catequinas y sobre todo leucoantocianidinas.

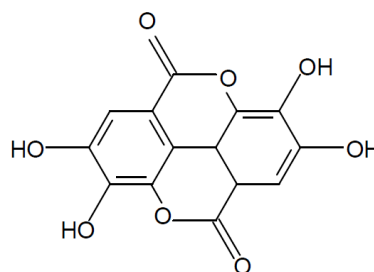
5.3.2.2 Taninos hidrolizables

Los taninos hidrolizables son éteres, habitualmente formados por una molécula de azúcar (en general glucosa), unidos a un número variable de moléculas de ácidos fenólicos (ácido gálico o su dímero, el ácido elágico), 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 por ácidos, bases y enzimas, en fragmentos simples. Este tipo de taninos pueden ser subdivididos en: galotaninos y elagitaninos, dependiendo si su estructura está formada por ácido gálico (Figura 8A) o ácido elágico (Figura 8B).



(A) Ácido gálico



(B) Ácido elágico

Figura 8. Componentes básicos de los taninos hidrolizables, (A) Ácido gálico y (B) Ácido elágico.

El tanino hidrolizable, también denominado, ácido tánico, está formado por unidades de α - D- glucopiranososa esterificada en todos los oxidrilos, por ácido gálico. Son ésteres de ácidos fenoles y de osas, que denominan así por ser fácilmente hidrolizables por ácidos, bases y enzimas. Se diferencian dos grupos, los galotaninos y los elagitaninos.

Los galotaninos: son ésteres del ácido gálico y del ácido digálico unidos entre sí por funciones ésteres entre el $-\text{COOH}$ de uno de ellos y el $-\text{OH}$ del otro. A su vez unidos a osas como glucosa, a veces la hamamelosa (derivada de la ribosa). Y los elagitaninos: o taninos elágicos. Son sustancias complejas, que dejan un depósito insoluble durante el curtido de las pieles (tanado), ello es debido a la precipitación del ácido elágico (dilactona, unión de dos ácidos gálicos) que en el vegetal vivo estarían unidos a azúcares. Esta dilactona se formaría durante la extracción del tanino en agua hirviente. Su hidrolisis produce glucosa, ácido elágico y ácido gálico.

Las relaciones típicas entre las moléculas de estos polifenoles y las de los albuminoides no se limitan a las albúminas de la piel, sino que se extienden a numerosas proteínas solubles en agua que son precipitadas por la adición de estas sustancias curtientes.

5.3.3 Función de los taninos unión taninos -proteína

Los taninos tienen gran afinidad por las proteínas. Esa interacción se da por medio de puentes de hidrogeno entre el oxígeno del carboxilo 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 hidrógenos, es independiente en el intervalo de pH de 2 a 8, pero a pH mayor, los puentes de hidrógenos 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.

El efecto neto determina la estabilidad del complejo tanino- proteína, y dependen de factores tales como: el número, el tipo y el arreglo especial de los grupos cargaos sobre los taninos y 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 taninos se favorecen particularmente en los taninos hidrolizables, que tienen numerosos grupos carboxílicos (*McLeod, 1974*).

Los grupos fenólicos de los taninos reaccionan por os mecanismos: unos 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 de 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).

5.3.4 Propiedades biológicas (Físico-Químicas de los taninos)

En las plantas, los taninos pueden estar en las vacuolas o incorporadas 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 amino 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

resultaos 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. En 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 organismo 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 e 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 e esta manera a proteger la planta. Efecto tóxico contra patógenos potenciales por resistencia de ciertos tejidos de la planta al ataque de virus y microorganismo.

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).

5.3.5 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 pérdida 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).

5.3.6 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 las 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).

5.4 PHYLUM ZYGOMYCOTA

Los hongos son organismos eucariotas, no fotosintéticos con estructuras hifales y esporas de diversos tipos. Los hongos forman un grupo coherente filogenéticamente. Se reconocen tres grandes grupos: mohos u hongos filamentosos, las levaduras y las setas (Carlile y Watkinson, 1996).

Los hábitats de los hongos son diversos. Algunos son acuáticos. Aunque la gran mayoría de ellos son de medios terrestres, crecen en suelos o sobre materia orgánica en descomposición y contribuyen a la mineralización del carbono orgánico, muchas especies pueden nitrificar y desnitrificar, oxidar azufre, hierro y manganeso (Wainwright, 1992).

El phylum Zygomycota está formado por organismos terrestres, algunos son parásitos de plantas, hongos y animales. Todos los zigomicetos se reproducen sexualmente mediante esporas diploides de paredes gruesas llamadas cigoesporas, que se dispersan en el aire y germinan en unas estructuras negras llamadas esporangios. (Schübler *et al.*, 2001).

5.4.1 Taxonomía de los zigomicetos

La clase *Zygomycetes* se divide en dos órdenes principales: mucorales u entomoftorales. Los hongos del orden Mucorales se distribuyen en seis familias diferentes: *Mucoraceae*, *Cunninghamellaceae*, *Mortierellaceae*, *Saksenaceae*, *Syncephalastraceae* y *Thamnidaceae*.

Los géneros y especies de la familia *Mucoraceae* los más comunes son *Rhizopus arrhizus (oryzae)*, *Rhizopus microsporus var. Rhizopodiformis*, *Rhizomucor pusillus*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Apophysomyces elegans*, *Saksenaea vasiformis*, *Mucor amphibiorum*, *Mucor circinelloides*, *Mucor hiemalis* *Mucor indicis*, *Mucor racemosus* y *Mucor ramosissimus* (González, *et al.*, 2000).

En la Tabla 3 se puede distinguir la clasificación antes mencionada.

Tabla 3. Clasificación taxonómica de los hongos a la clase Zygomycetes.

Reino	Fungi						
Phylum (división)	Ascomycota	Basidiomycota	Zygomycota	Glomerulomycota	Chytridiomycota		
Clase	Zygomycetes				Trichomycetes		
Orden	Mucorales	Entomoftorales	Dimargaritales	Endogonales	Harpellales	Kickellales	Microsporidia
Familia	Mucoraceae	Cunninghamellaceae	Mortierellaceae	Syncephalastraceae	Salsenacca	Thamnidaceae	
Género	<i>Absidia</i>	<i>Cunninghamella</i>	<i>Mortierella</i>	<i>Syncephalastrum</i>	<i>Saksenaea</i>	<i>Cokeromyces</i>	
Especie	<i>A. Corymbifera</i> <i>A. Apophysomyces</i> <i>A. elegans</i> <i>Actinomucor</i> <i>Ambomucor</i> <i>Circinella</i> <i>Gongronella</i> <i>Mucor</i> <i>M. circillenoides</i> <i>M. hiemalis</i> <i>M. racemosus</i> <i>M. ramosissimus</i> <i>M. recurvus</i> <i>Rhizomucor</i> <i>R. miehei</i> <i>R. pusillus</i> <i>R. variabilis</i> <i>Rhizopus</i> <i>Zygorhynchus</i>	<i>C. bertholletiae</i>		<i>S. racemosum</i>	<i>S. vasiformis</i>	<i>C. recurvatus</i>	

5.4.2 Estructura y fisiología de los zigomicetos

Los zigomicetos son hongos filamentosos que presentan una serie de elementos fenotípicos que apoyan en gran medida su identificación microbiológica, crecen bien y rápidamente tanto en medios no selectivos como selectivos, formando elementos miceliares que se expanden rápidamente y cubren toda a placa en pocos días. Producen colonias algodonosas blancas, grisáceas o marrones, son bordes definidos. La caracterización del género es microscópica y se basa en la presencia de hifas grandes y no tabicadas, anchas, similares a cintas, con un tamaño de 10 a 20 micras de diámetro y con ramificaciones que se separan de la principal en ángulos próximos a los 90°, con producción de esporangiosporas

dentro de los esporangios. La variación inter-especies se da en altura, índice de crecimiento y grado de pigmentación. La diferenciación entre especies se consigue cuando se estudian elementos tales como los rizoides, los estolones y las columelas.

5.4.3 Orden mucorales

Los representantes de este orden son a menudo llamados mohos negros, cuando a la vejez desarrollan un pigmento moreno. En muchos casos algunas de las hifas se introduce al sustrato para fijarlas sustancias nutritivas (Toro *et al.*, 1993).

Las especies de estos géneros desarrollan estolones, rizoides (*Rhizopus*, *Absidia* y *Rhizomucor*) y el esporangio contiene en su extremo esporangiosporas entre 3-6 μ m de diámetro cada una, que sirve como forma de diseminación.

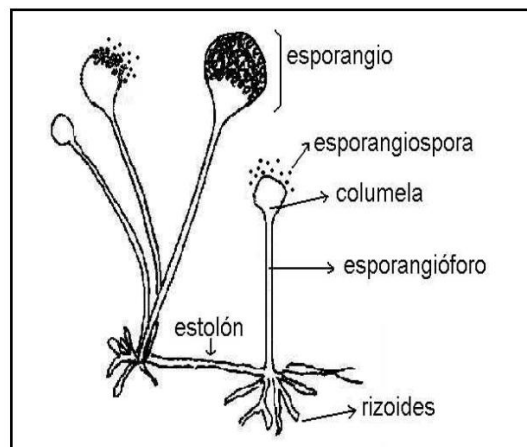


Figura 9. Estructura morfológica del orden mucorales (Wainwright, 1992).

Presenta formas irregulares, hifas con características largas y con ancho de 10 a 30 μ m, no septadas, que adoptan a menudo formas curvas o cintas ramificadas en ángulo recto disposición que permite el libre flujo de núcleo y organelos citoplasmáticos; por esta razón se desarrollan rápidamente en los medios de cultivo habituales (Patrick *et al.*, 2006), como se muestra en la figura 11.

5.4.4 Familia *Mucoraceae*

Hongos con esporangios provistos de columela, formada por la pared transversal que separa el esporangióforo del esporangio hacia el interior, a fin de constituir una estructura vesicular o con forma de cúpula, zigósporas desnudas o ligeramente cubiertas por apéndices, caracterizados por tener el talo no segmentado o ramificado. Los géneros incluyen a:

- *Absidia*
- *Apophysomyces*
- *Mortierella*
- *Mucor*
- *Rhizopus*
- *Rhizomucor*

Las cuales poseen una temperatura óptima de crecimiento tal como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Familia *Mucoraceae* (Weitzman et al., 1995).

Genero	Crecimiento óptimo	Esporangióforo	Columella	Esporangio	Rhizoid	Stylo-spore
<i>Absidia</i>	45°C	Ramificadas, hialino-	En forma de cúpula	En forma de pera	indistinto	-
<i>Apophysomyces</i>	≥42°C	Normalmente no ramificado de color marrón-grisáceo	Por lo general en forma de cúpula, rara vez alargada	En forma de pera	+	-
<i>Mortierella</i>	40°C	Ramificado, hialina	-	Esférica	+	+/-
<i>Mucor</i>	<37°C	Ramificados o no, hialina	+, En diferentes formas	Esférica	-	-
<i>Rhizomucor</i>	54°C	Ramificado, de color marrón	Formas esféricas	Esférica	+	-
<i>Rhizopus</i>	45°C	La mayoría marrón no ramificado	Formas esféricas y elongadas	Esférica	+	-

5.4.5 Género *Rhizomucor*

El género *Rhizomucor* se distingue de *Mucor* por la presencia de estolones y rizoides poco desarrollados en la base de los esporangióforos y por la naturaleza termófila de sus 3 especies: *R. miehei*, *R. tauricus* y *R. pusillus*. *Rhizomucor pusillus* es cosmopolita y ambos *R. miehei* y *R. pusillus* han sido reportados como patógenos para los seres humanos y los animales, este último en mayor medida.

5.4.5.1 *Rhizomucor pusillus*

Este zigomiceto termófilo es fácilmente reconocible por su característica compacta, bajo (2-3 mm de alto), de micelio de color gris y por el desarrollo de la típica forma ramificada, esporangióforos amarillo-marrón (8-15 μm de diámetro), siempre con un septo por debajo del esporangio. Los esporangios son globosos (40-60 μm de diámetro), cada una con una columela ovalada o en forma de pera (20-30 μm). Las esporangiosporas son transparentes de paredes lisas, de globosas a subglobosas, ocasionalmente ovaladas (3-5 μm) y a menudo se mezclan con restos cristalinos de la pared de esporangios. Los Clamidoconidios están ausentes. Las zigosporas son de paredes ásperas, de color marrón rojizo a negro, 45-65 μm de diámetro y pueden producirse a lo largo de las hifas aéreas en apareamientos entre aislamientos compatibles. Estas aluden un rango de crecimiento en temperaturas de: 20-27C mínimo; 35-55C óptima; máxima 55-60C.

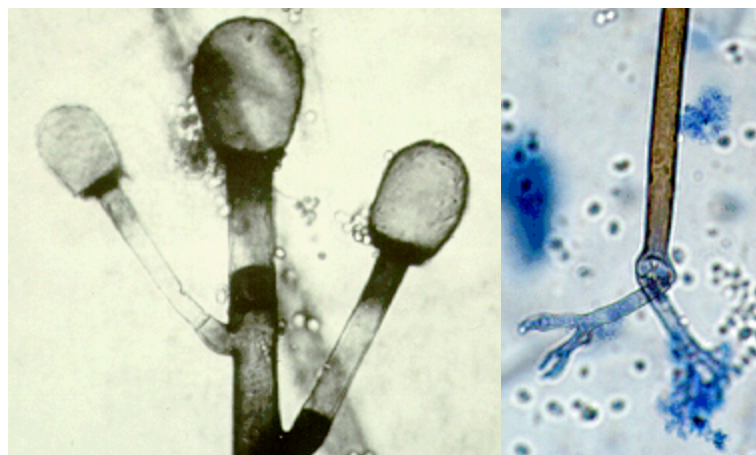


Figura 10. Esporangióforo, columelas y rizoides primitivas de *Rhizomucor pusillus*.

6 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El presente trabajo se desarrolló en tres etapas experimentales que se describen a continuación:

Etapa I-. Propagación y conservación del microorganismo *Rhizomucor pusillus* SOC-4A.

Etapa II-. Producción de tanasa por *Rhizomucor pusillus* SOC 4A en fermentación de medio líquido (FML).

Etapa III-. Determinación de los parámetros óptimos de pH y temperatura en relación con la actividad enzimática.

ETAPA I. PROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN DE *Rhizomucor pusillus* SOC 4A

6.1 MICROORGANISMO

El microorganismo empleado fueron cepas del hongo *Rhizomucor pusillus* SOC-4A, pertenecientes a la colección del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Coahuila (DIQ-UAdeC).

6.1.1 Propagación del microorganismo.

Para la propagación, se realizó el cultivo del microorganismo *Rhizomucor pusillus* SOC-4 en PDA Bioxon (Potato Dextrose Agar), donde se preparó 4.68 g en 120 ml de agua destilada en un matraz de 250 ml, el cual se calentó hasta ebullición durante 1 minuto y se esterilizó a 121°C (15 psi) por 15 minutos. Se dejó enfriar en una campana de flujo laminar (Scorpion Scientific- A8000) para proceder al llenado en cajas Petri estériles, colocando aproximadamente 22 ml en cada una.

Una vez solidificado el medio se realizó la propagación de las cepas fúngicas dentro de la misma campana de flujo laminar (Scorpion Scientific- A8000) con un mechero para evitar una posible contaminación, realizada la siembra en la cajas Petri, se colocaron en la incubadora (Yamato IC403C) durante 5 días a 50 °C con la tapa hacia abajo, para evitar la condensación.

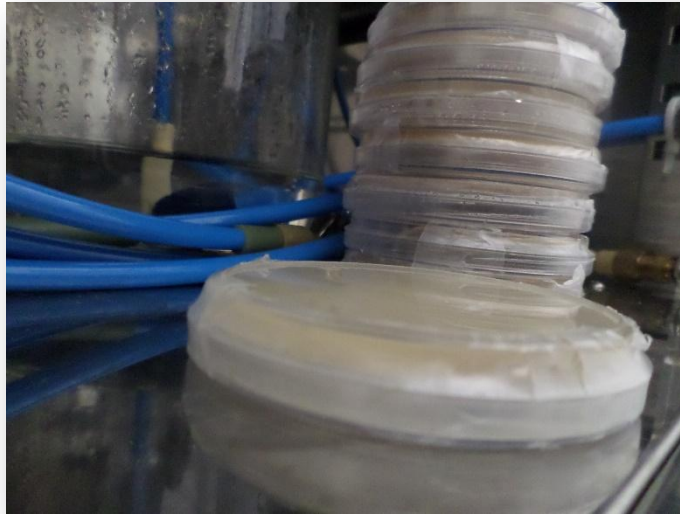


Figura 11. Cajas Petri con siembra de *Rhizomucor pusillus* SOC- 4A.

6.1.2 Preservación del microorganismo en glicerol- leche descremada

La conservación de las cepas fue efectuada con el hongo que presentó esporulación completa y se incubó a 50 °C en cajas Petri con PDA por 5 días.

Para la preservación del microorganismo se preparó una solución con glicerol (10% v/v) y leche descremada (Svelty® 5% p/v), y se homogenizó en 100 ml de H₂O destilada, se esterilizó a 121 °C (15 psi) durante 15 minutos. La solución se dejó enfriar y se tomó 20 ml de la mezcla preparada la cual se agregó al medio que contenía la cepa, se distribuyó con ayuda de un asa aséptica de manera uniforme. De allí se tomó 500 µL de la solución de esporas para poder colocarlos en tubos de microcentrífuga (Eppendorf) estériles con capacidad de 1.5 ml, identificados se almacenaron a -20 °C como un conjunto de viales. Este método de almacenamiento permite la conservación de células en congelación por hasta 5 meses. El proceso de congelación- descongelación puede ocasionar lisis celular, por lo que se recomienda descongelar por más de 2 ocasiones.

ETAPA II. PRODUCCIÓN DE TANASA POR *Rhizomucor pusillus* SOC- 4A EN FERMENTACIÓN DE MEDIO LÍQUIDO

6.2 PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE ESPORAS

El recuento de esporas se basa en una cuenta directa 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.

Para la suspensión de esporas fúngicas se preparó añadiendo 20 ml de agua destilada estéril que contiene 0,1 (v/v) de Tween 80, del cual se vació al medio con el microorganismo. Las esporas fueron desalojadas utilizando un asa de siembra estéril. De allí se tomó 0.1 ml y se diluyó en 20 ml de agua destilada no estéril. Las esporas se contaron usando la cámara de Neubauer, bajo observación microscópica, utilizando el aumento 40x.



Figura 12. Microscopio y cámara de Neubauer.

El número de conidias por ml y el número total de conidias fue determinado mediante la siguiente fórmula: Conidias/ml= (promedio) (250,000) (factor de dilución), donde el factor de dilución es 200 porque fueron en 20 ml. El volumen que se utilizó fue de 1 ml de la suspensión de esporas preparada que contiene 3×10^7 esporas por inóculo.

6.2.1 Modo de fermentación o medio de cultivo

6.2.1.1 Medio Czapek- Dox

Para la producción de enzima fúngica se necesita un medio de cultivo de sales Czapek-Dox (**Tabla 5**) para la degradación de ácido tánico y la preparación del medio de cultivo, que en este caso fue por Fermentación en Medio Líquido en matraces Erlenmeyer de 250 ml.

Tabla 5. Material para medio de cultivo mínimo en sales Czapek- Dox.

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

Los reactivos se pesaron y se adicionó a un matraz Erlenmeyer de 1000 ml, posteriormente se agregó agua destilada, se procedió a una agitación durante 30 minutos, pasado el tiempo se esterilizó a 120°C (15 psi) durante 15 minutos. Se dejó enfriar para mezclar la fuente de carbono requerida, para evitar su desnaturalización.



Figura 13. Matraz Erlenmeyer en agitación con sales Czapek-Dox.

6.2.1.2 Fermentación en Medio Líquido y condiciones de cultivo

Desde el punto de vista biotecnológico, la fermentación se entiende como el proceso en que los microorganismos producen biomasa y metabolitos a partir de la utilización de sustancias orgánicas, en ausencia o presencia de oxígeno. La descomposición de los sustratos es llevada a cabo por enzimas producidas para tal fin por los microorganismos (Hernández 2003).

El cultivo del hongo se llevó a cabo por Fermentación en Medio Líquido (FML) en matraces Erlenmeyer de 250 ml previamente esterilizados a 120°C (15 psi) por 15 minutos, utilizando 50 ml de Medio de sales Czapek Dox esterilizado y adicionado con ácido tánico (Sigma- Aldrich) a una concentración de 1% como única fuente de carbono, y luego se le añadió el inóculo preparado (1%v/v) de 3×10^7 esporas a cada matraz Erlenmeyer y se incubaron en un agitador (Innova[®] 44) controlado a una temperatura de 50 °C a 120 rpm. Cada cinética fue monitoreada cada 12 horas durante un tiempo de cultivo de 60 horas. Este método se realizó por triplicado ejemplificado en Tabla 6.

Tabla 6. Relación de tiempo y periodo en el modo de repeticiones.



















Tiempo (h) \ Repetición	0	12	24	36	48	60
1						
2						
3						



Figura 14. FML de *Rhizomucor pusillus* en Incubadora con agitador (Innova[®] 44).

La extracción de tanasa de fermentación en estado líquido los microorganismos se desarrollan flotando en el medio de cultivo. Para poder retener el líquido y la biomasa se realizó la filtración por cada 12 horas empezando en la hora cero.

Se empleó un matraz Kitasato y en él se colocó el embudo Büchner con papel filtro #1, posterior se conectó a la bomba de vacío (MILLIPORE) para facilitar la extracción, finalmente se recolectó el extracto obtenido en tubos tipo Falcón de 50 ml y se almacenó a 4°C identificados previamente. Esto se llevó a cabo por triplicado en cada 12 horas.



Figura 15. Filtración para obtener la biomasa y el extracto enzimático.

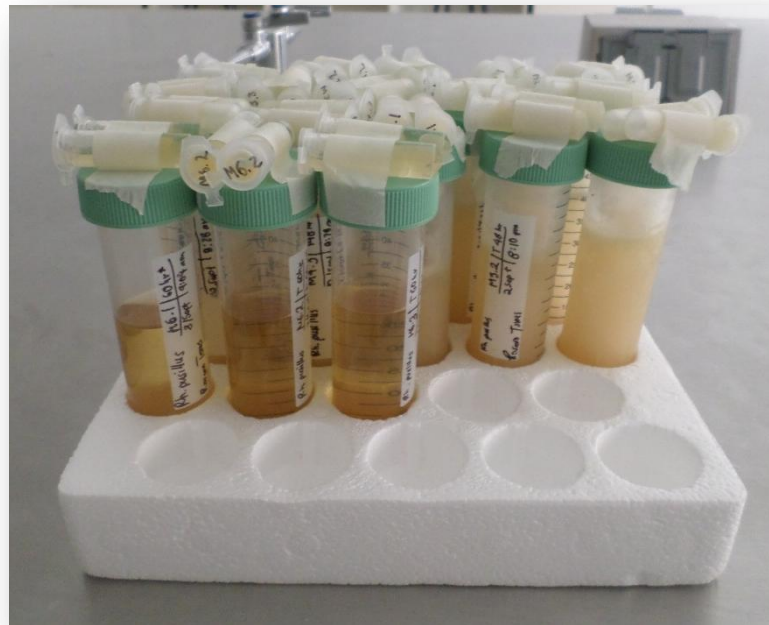


Figura 16. Recolección de extracto enzimático en tubos tipo Falcón de 50 ml (Identificados previamente).

6.2.2 Obtención del extracto crudo enzimático (Biomasa)

En cada muestreo con un periodo de 60 horas, el contenido de cada matraz Erlenmeyer se traspasó en papel filtro del número 1 previamente secados e identificados para separar la masa micelial del sobrenadante, el cual fue considerado como extracto extracelular. La masa micelial retenida se guardó en una incubadora (Riossa E-71) a 75 °C para obtener biomasa por gravimetría. Esto es, la cantidad total de biomasa presente en una muestra que se midió en términos de peso seco por unidad de volumen.



Figura 17. Biomasa retenida y guardada en incubadora (Riossa E-71).

6.2.3 Determinación de Actividad tanasa (Sharma y col. 2000)

Tanasa actividad producida por aislado de *Rhizomucor pusillus* SOC 4A se evaluó por el método rodanina. Este 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. 18. El producto de la reacción enzimática, el ácido gálico forma un complejo colorido con la rodanina metanólica que absorbe a 520 nm.

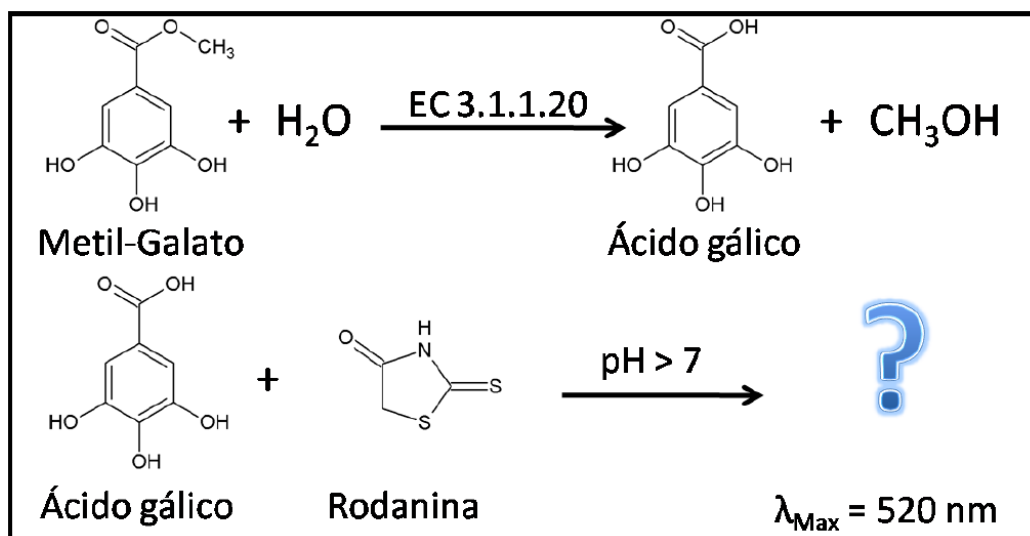


Figura 18. Reacción catalizada por la tanasa y posterior reacción del ácido gálico con la rodanina.

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 0.5N, Ácido gálico 100 ppm en buffer de citratos (50 mM pH 5.0). El Metil-galato, ácido gálico y la rodanina deben protegerse de la luz.

Para la cuantificación de la actividad tanasa en las muestras, se realizó una curva patrón utilizando ácido gálico como estándar.

Ensayo

Las soluciones se pre-incubaron a 30°C durante 5-10 minutos. Se etiquetaron tres tubos de ensayo como blanco, muestra y control, se colocaron 0.25 ml de metil-galato 0.01 M en buffer de citratos 50 mM 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 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 (0.5N) y se incubó otros 5 minutos. Se agrega 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 el espectrofotómetro (UV/VIS Velab 5600 UV). En la Fig. 20 se muestra la técnica.



Figura 19. Lectura de la reacción con el extracto enzimático a 520 nm en el espectrofotómetro (UV/VIS Velab 5600 UV).

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 Ácido gálico en buffer de citratos.

$$\text{Ác. gálico liberado} = (Abs_{muestra} - Abs_{blanco}) - (Abs_{control} - Abs_{blanco})$$

Una unidad (U) de la actividad enzimática se define como la cantidad de enzima requerida para liberar un micromol de ácido gálico formado por minuto bajo las condiciones de reacción definidas.

$$\frac{U}{mL_{EE}} = \left[\frac{mg \text{ A.gálico}}{mL} \right] * \left[\frac{5 \text{ mL}}{0.25 \text{ mL}_{EE}} \right] * \left[\frac{1 \text{ g A.gálico}}{1000 \text{ mg A.gálico}} \right] * \left[\frac{1 \text{ mol A.gálico}}{170.12 \text{ g A.gálico}} \right] * \left[\frac{1 \times 10^6 \mu\text{mol A.gálico}}{1 \text{ mol A.gálico}} \right] * \left[\frac{1}{5 \text{ min.}} \right]$$

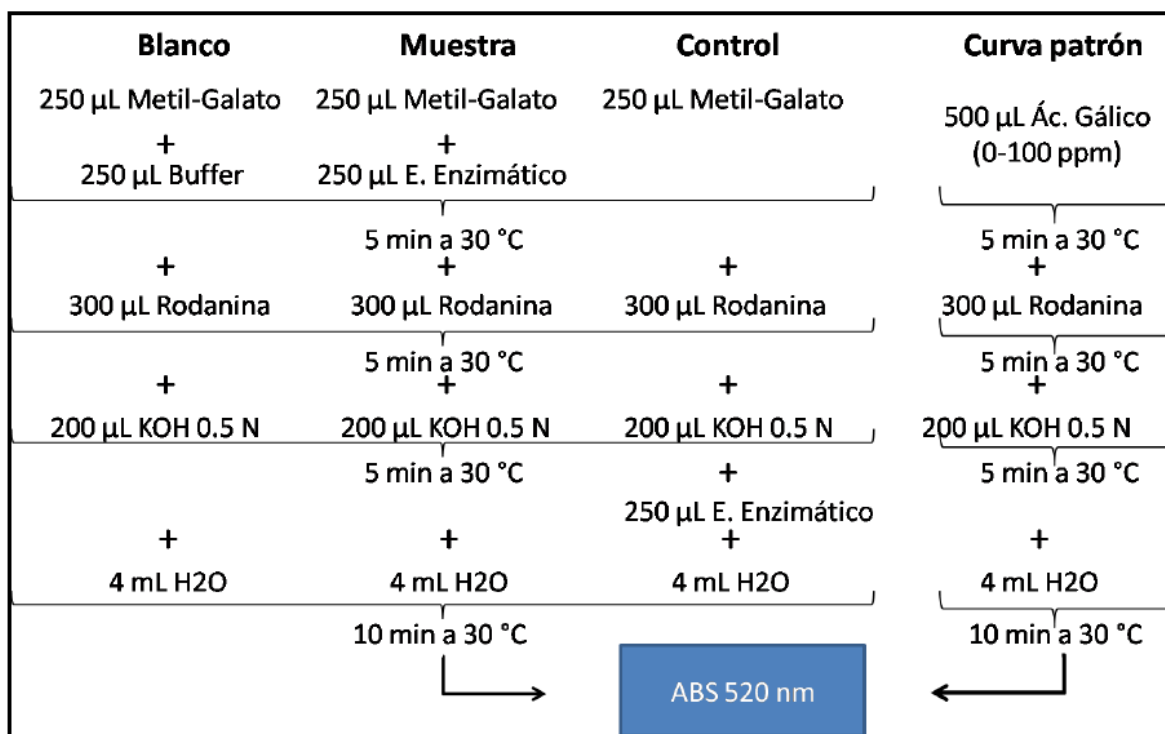


Figura 20. Esquema del ensayo enzimático propuesto por Sharma et al. (2000).

6.2.4 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 (SIGMA ALDRICH). 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 óxido de molibdeno u de tungsteno de coloración azul verde. La concentración producida es proporcional a la concentración de polifenoles presentes en la muestra.

En este método se colocaron 800 μ L de la muestra en un tubo de ensaye, se añadió 800 μ L del reactivo Folin Ciocalteu (Sigma-Adrich) y se mezcló, dejándolos reaccionar por 5 min. Después de este tiempo, se agregó 800 μ L de carbonato de sodio (0.01M) y se mezcló, con un nuevo periodo de reposo de 5 minutos, finalmente; se diluyó a solución con 5 ml de agua destilada y se midió la absorbancia a 790 nm.

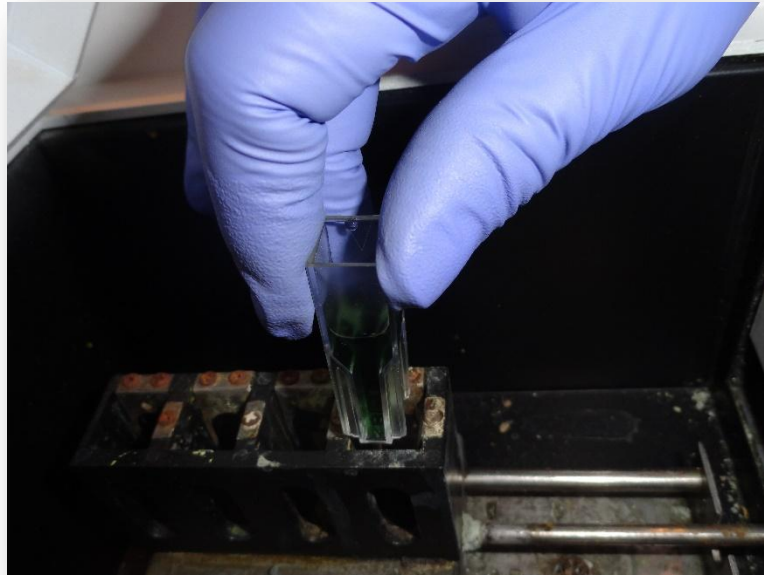


Figura 21. Reacción con Folin-Ciocalteu (medido en absorbancia a 790 nm),

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

Etapa III-. Determinación de la actividad enzimática de temperatura y pH óptimos.

6.3 POTENCIAL DE HIDRÓGENO (PH) ÓPTIMO DE LA ENZIMA

El efecto del pH se realizó con cada uno los extractos durante la reacción enzimática, tomando en cuenta solo los tres últimos monitoreos, estos son a las 36h, 48h y 60h para poder determinar un pH óptimo favorable de la producción de tanasa por *Rhizomucor pusillus* SOC 4A.

Como parte clave de esta etapa, se utilizaron soluciones buffer de Citratos 0.1M para los pH 4.0, 4.6, 5.0, 5.6 y 6.0; buffer de Fosfatos 0.1M para los pH 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0, usando el medidor de pH (Hanna waterproof HI98128) y basándonos

bajo el método de Sharma y col (2000) ver Fig. 21. Las muestras del extracto enzimático fueron filtradas dónde se empleó un matraz Kitasato y en él se colocó el embudo soporte para discos filtrantes con papel Whatman No. 1 (Maciel *et al.*, 2009), posteriormente se conectó a la bomba de vacío (MILLIPORE) para facilitar la extracción, finalmente se recolectó el extracto obtenido en tubos tipo Falcón de 50 ml y se almacenó a 4°C identificados previamente. Esto se llevó a cabo por triplicado en las muestras ya filtradas.



Figura 22. Soluciones de los pH 4.0, 4.6, 5.0, 5.6, 6, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0

La lectura se realizó a 520 nm en el espectro (Velab 5600 UV), el ensayo se realizó por triplicado. El valor óptimo se obtuvo mediante la comparación gráfica de absorbancia y pH.

6.4 TEMPERATURA ÓPTIMA DE LA ENZIMA

Para estudiar el efecto de la temperatura óptima de la enzima se optó por usar diferentes temperaturas de incubación en la reacción enzimática de tanasa, seleccionando el mejor pH obtenido previamente. Para esto se requieren las 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 0.5N, Ácido gálico 100 ppm en buffer de citratos (50 mM pH 5.0). El Metil-galato, ácido gálico y la rodanina deben protegerse de la luz.

Este método se basa en la técnica de Sharma y col (2000) donde en lugar de sólo utilizar 30°C se emplearon temperaturas de 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C y 65°C en baño María (Thermo Scientific Presicion 3166198) durante 5 minutos. Las muestras del extracto enzimático fueron filtradas dónde se empleó un matraz Kitasato y en él se colocó el embudo soporte para discos filtrantes con papel Whatman No. 1 (Maciel *et al.*, 2009), posteriormente se conectó a la bomba de vacío (MILLIPORE) para facilitar la extracción, finalmente se recolectó el extracto obtenido en tubos tipo Falcón de 50 ml y se almacenó a 4°C identificados previamente. Esto se llevó a cabo por triplicado en las muestras ya filtradas.



Figura 23. Filtración del extracto enzimático.



Figura 24. Reacción del extracto enzimático mediante el método de (Sharma y col. 2000) en baño María (Thermo Scientific Presicion 3166198).

El valor óptimo se obtuvo mediante una comparación grafica de absorbancia y temperatura.

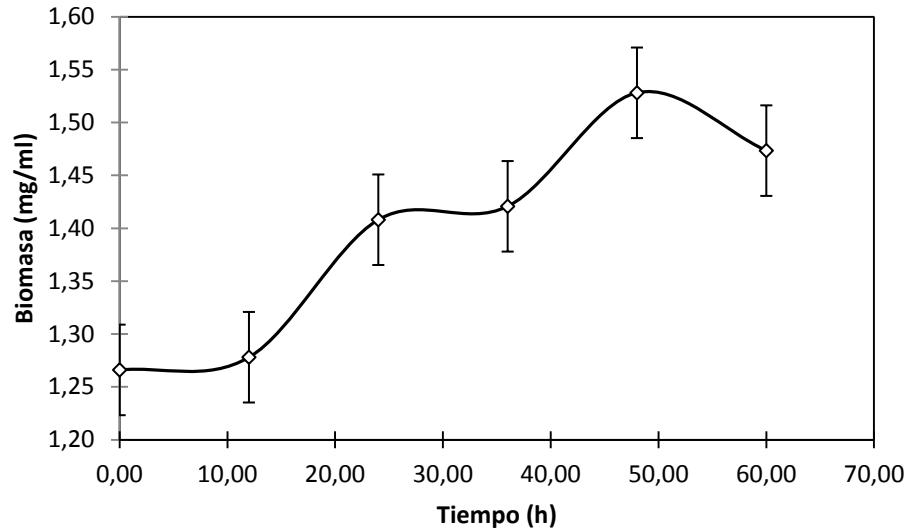
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó el efecto de condiciones óptimas de producción sobre la enzima tanasa con cepas de *Rhizomucor pusillus* (SOC-4A) en un sistema de cultivo sumergido. Donde estas cepas fueron propagadas en PDA (Bioxon) a 50°C y conservadas a -20°C con leche descremada y glicerol. Los resultados y las discusiones se presentan en las etapas consecutivas del desarrollo experimental.

7.1 PRODUCCIÓN DE TANASA EN FERMENTACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO (FML) POR RHIZOMUCOR PUSILLUS SOC 4A

7.1.1 Biomasa

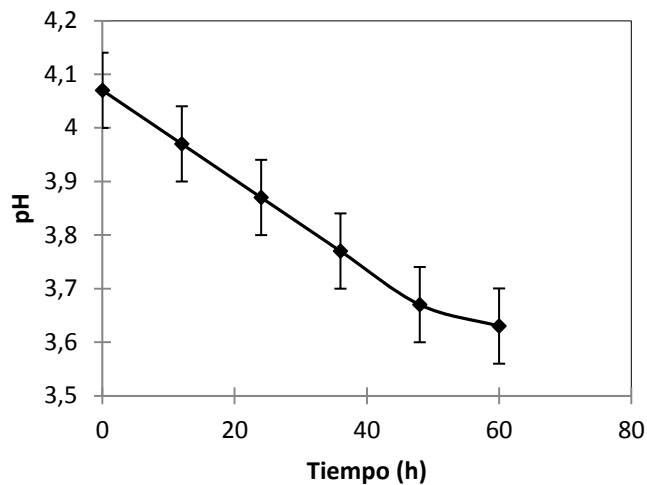
Los valores de biomasa fueron obtenidos por el método directo de gravimetría, basados en tiempo (h) y en mg/ml. La gráfica 1 muestra el comportamiento de la estimación de biomasa (mg/ml) con su respectiva desviación estándar, monitoreada desde las 0 h- 60 h, mostrando primero una fase lag de 0h-12h, con posterior la fase log de 12h- 48h, donde indica que a las 48h presentó crecimiento micelial máximo de 1.53 mg/ml, durante las últimas horas de monitoreo de 48h-60h la velocidad de crecimiento disminuye, porque a las 60 h tiene un producción de 1.47 mg/ml que es mínima en comparación con la de las 48 horas.



Gráfica 1. Producción de Biomasa del extracto obtenido en FML por *Rhizomucor pusillus* (SOC - 4A).

Ardón C. (2007) afirma que un sustrato no funciona como tal cuando no posee las fuentes nutricionales que requieren las cepas de hongos y/o no son capaces de utilizarlos en forma natural sin que hayan sido sujetos a algún proceso de bioquímica o microbiología. En este caso la disminución de producción de biomasa de las 48h-60h la causa puede ser a la complejidad del sustrato, por una falta de nutrientes o el pH presente en el caldo de cultivo, pudiendo influir negativamente en el desarrollo del hongo.

El gráfica 2 se puede ver que se presenta un descenso en el pH del medio de cultivo a lo largo del periodo de fermentación de 0h- 60h, donde el pH inicial (0h) tiene un máximo de 4.07 y el pH final es de 3.63 a las 60h.



Gráfica 2. pH del cultivo por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A.

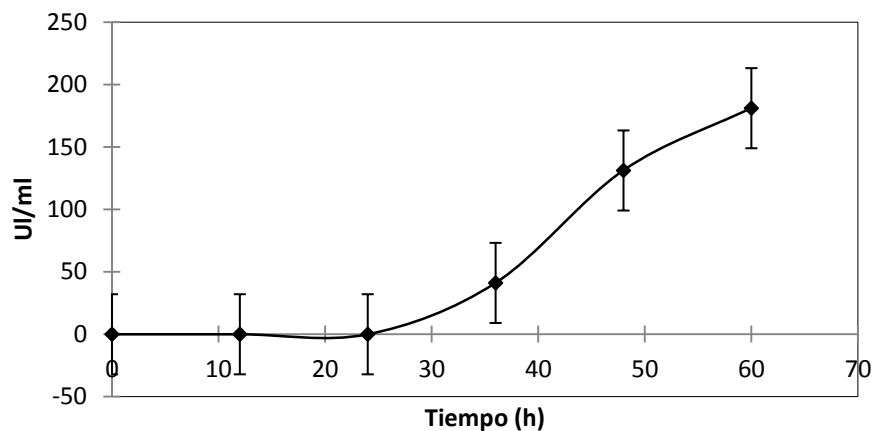
Esta disminución de pH puede deberse a la producción de diferentes ácidos orgánicos por parte del hongo y su excreción al medio.

7.1.2 Determinación de actividad tanasa

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). Y su vez la tanasa ha sido reportada como una enzima inducible por ácido tánico, cuando éste es utilizado como una única fuente de carbono (Aoki *et al.*, 1976; Lekha y Lonsane, 1994; Yamada *et al.*, 1967).

La actividad enzimática para la producción de tanasa fue calculada en UI/ml de Extracto Enzimático con base al periodo de incubación (h) La gráfica 3 se ajustó con la curva de calibración para la cinética de tanasa, ver gráfica 11 en Anexo 1.

En base a los resultados obtenido utilizando el método de Sharma *et al.*, (2000) en la gráfica 3 se aprecia una fase lag de 0h-24h con 0 producción, posterior se distingue una fase exponencial de 24h- 60h, donde se halla una producción continúa, porque a partir de las 24h inicia la producción de 0 hasta 181.092 UI/ml de Velocidad máxima, punto que llega hasta las 60 horas siendo esta la hora final del monitoreo.



Gráfica 3. Cinética de crecimiento de tanasa por *Rhizomucor pusillus* en FML.

Bajo la técnica colorimétrica expuesta por Sharma *et al.*, 2000, con base a los resultados expuestos en la gráfica 3, se logró observar un cambio de color fucsia ascendente, indicando presencia de tanasa físicamente. Ver fig.26



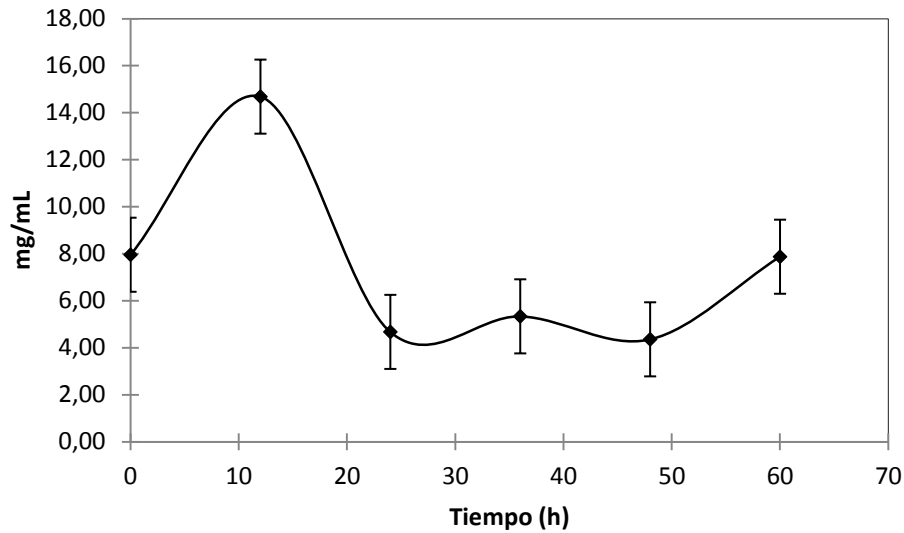
Figura 25. Observación de cambio de color ascendente a fucsia, en la reacción enzimática por Rhizomucor pusillus SOC 4A

7.1.3 Cuantificación de fenoles hidrolizables totales

El método de Folin- Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungsteno de sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico- fosfotúngstico (Peterson G.L., 1979).

Los reactivos se ajustaron bajo la curva de calibración que se observa en la gráfica 12 en el Anexo 2.

El gráfica 4 muestra el comportamiento de reacción en consumo de fenoles hidrolizables totales, donde se observa que de 0h- 12h hay un ligero crecimiento de no absorción de fenoles de 14.68 mg/ml, pero a partir de las 12h- 24h es notorio dicho consumo, llegando a un mínimo de 4.67 mg/ml, posterior de 24h-48h se aprecia una constante de absorción, pero en el rango de 48h- 60h se destaca un ligero crecimiento que va de 4.36 mg/ml a 7.87 mg/ml.



Gráfica 4. Curva de fenoles hidrolizables totales.

En la gráfica 4 se deduce que el comportamiento se debe a que el microorganismo hidroliza los taninos para la obtención de energía, esto es para sus actividades metabólicas (Belmares-Cerda, 2004). Otro punto de observación es que la gráfica no presenta un decrecimiento final ya que se observa que en el rango de 48h- 60h hay un ligero crecimiento de 4.36 mg/ml a 7.87 mg/ml y esto se puede ligar a con la gráfica de producción de tanasa (ver gráfica 3) porque en ella se observa una fase de crecimiento continua y no etapa final.



Figura 26. Observación de la reacción del extracto enzimático con el reactivo de Folin- Ciocalteu.

En la figura 27 se aprecia el cambio de color de la reacción del extracto enzimático del hongo *Rhizomucor pusillus* SOC 4A con el Folin- Ciocalteu, éste tomó una tonalidad amarilla y este color fue descendiendo ligeramente. (Ver gráfica 4).

ETAPA III. DETERMINACION DE LOS PARAMETROS ÓPTIMOS DE pH Y TEMPERATURA EN RELACION CON LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

7.2 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ÓPTIMA DE TEMPERATURA Y PH.

7.2.1 El pH óptimo de la enzima tanasa por *Rhizomucor pusillus*

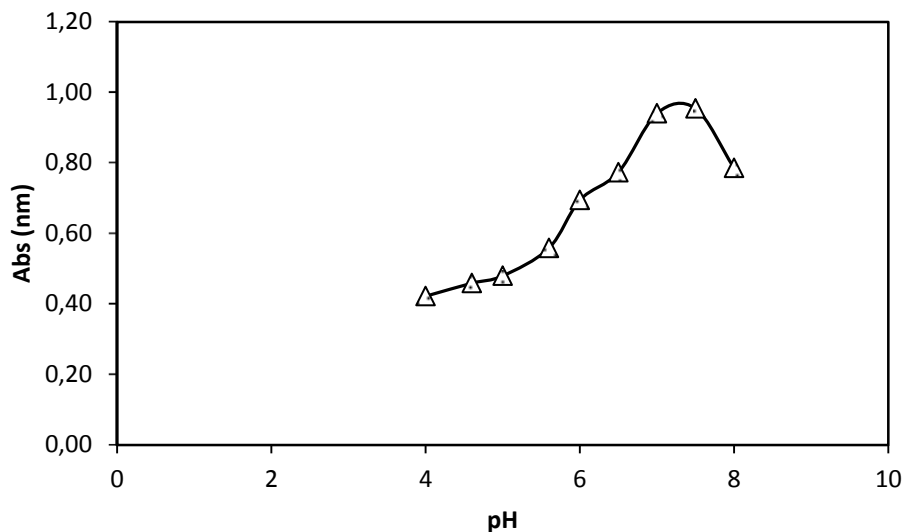
En la conformación de las proteínas depende, en parte, de sus cargas eléctrica, habrá un pH en el cual la conformación será la más adecuada para la activación catalítica, este es llamado pH óptimo.

El efecto del pH en el extracto enzimático se observan en las gráficas 7, 8 y 9 a diferentes horas de la fermentación, dónde se tomaron sólo las muestras de las últimas horas de 36-60 horas. Para efectuar esta determinación se utilizaron soluciones buffer de Citratos 0.1M para los pH 4.0, 4.6, 5.0, 5.6 y 6.0; buffer de Fosfatos 0.1M para los pH 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0.

→ 36 horas

El pH del extracto de las 36 horas del monitoreo, se puede observar una curva al graficarse la variación de la actividad que presento la tanasa en el extracto al ser sometida a varios pH, dando como resultado el comportamiento en forma de campana que produce la enzima con respecto al pH.

Interpretándose la gráfica 5, tiene una forma ascendente que inicia con 0.42 nm en el pH 4.0 hasta 0.95 nm en el pH 7.5, siendo este último el punto máximo de la gráfica, de allí tiene un descenso en el pH 7.5 a 8.0 que llega a 0.79 nm.

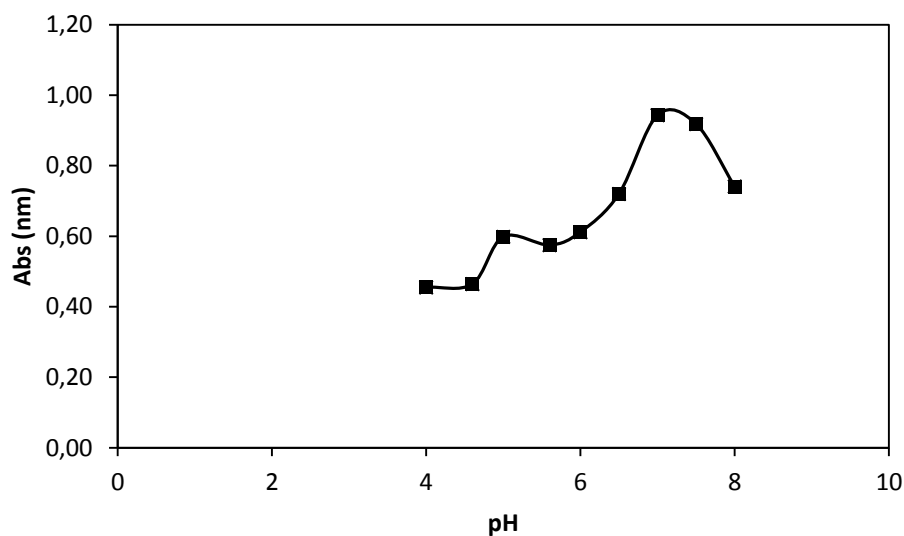


Gráfica 5. El pH del extracto a las 36 horas del monitoreo de la FML.

→ 48 horas

A las 48 horas del monitoreo, de los extractos se toman registros de pH, leídas en absorbancias que se muestran en la gráfica 8, en el cual se interpreta que tiene

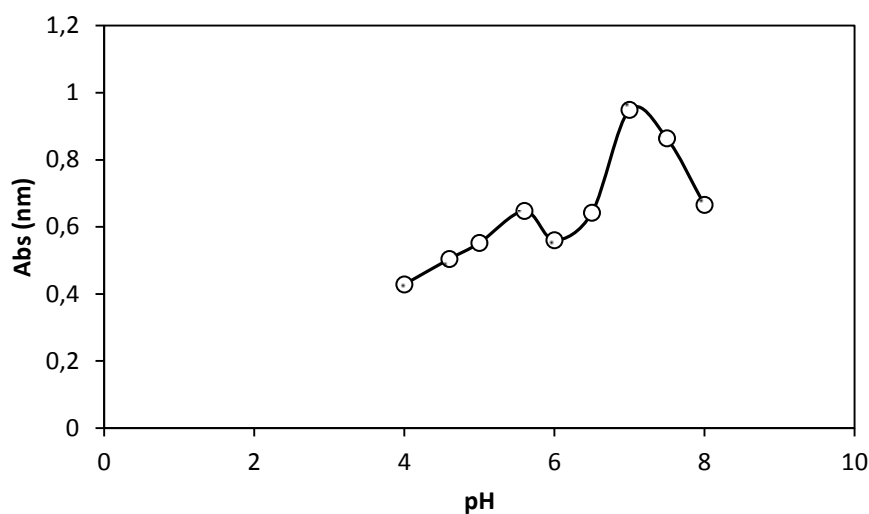
una mínima absorbancia de 0.45 nm en el pH inicial 4.0 y a partir de allí las absorbancias toma una forma ascendente conforme aumenta el pH, llegando a un máximo de 0.94 nm al pH **7.0**. Posterior se observa un declive en la serie que va desde 0.94 nm- 0.74 nm que va desde pH 7.0 hasta el pH 8.0



Gráfica 6. El pH del extracto del monitoreo a las 48 horas de la FML.

→ pH a las 60 horas

Llegando al último análisis de pH del extracto enzimático, que se concretó a las 60 h, se tienen resultados semejantes a la gráfica anterior, donde se logra observar que en el primer pH de 4 se tiene una absorbancia de 0.42 nm y presenta una forma creciente en las absorbancias, que llega a un máximo de 0.94 nm en el pH **7.0**, y de allí se logra ver que este desciende hasta 0.66 nm en el pH de 8.0.



Gráfica 7. El pH del extracto del monitoreo a las 60 horas.

En relación a las descripciones anteriores, se entiende que no todos los pH's coinciden, pero este se podría deber a que el medio empezaba a acidificarse en el pH de las 36 horas porque es el único que presenta un pH alto de 7.5, y para las últimas horas restantes 48h y 60h el medio se torna más ácido debido a la que se tiene una mayor producción de enzima y este se relaciona a que el medio tiende a acidificarse porque el pH bajó a 7.0 y se mantiene durante esas horas.. Entonces se deduce que en la actividad enzimática del extracto se obtuvo un pH óptimo de 7.0 a las 48 y 60 horas que van relacionadas con la producción de la tanasa por *Rhizomucor pusillus* SOC 4A.

La tanasa microbiana tiene un pH óptimo ácido, tal como la tanasa de *Aspergillus niger*, Van Tieghem lo encontró a un pH 6,0, *Bacillus licheniformis* KBR 6 reaccionó a un pH 5,75 (K.C. Mondal *et al.*, 2000), *Enterobacter sp.* a un pH 5,5 (K.P. Sharma and P.J. John, 2011), *Hyalopus sp.* a un pH 6,5 (S. Mahapatra, *et al.*, 2009). Sin embargo, tanasa de *Serratia ficaria* DTC mostró un pH óptimo de 8,9 (P.D. Belur, *et al.*, 2010) y la tanasa de *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917T mostró su pH óptimo en 8,0 (K. Iwamoto, *et al.*, 2008). Generalmente las tanasas poseen estabilidad del pH en un rango de 3,0 a pH 8,0 (S. Sharma, *et al.*, 1999);

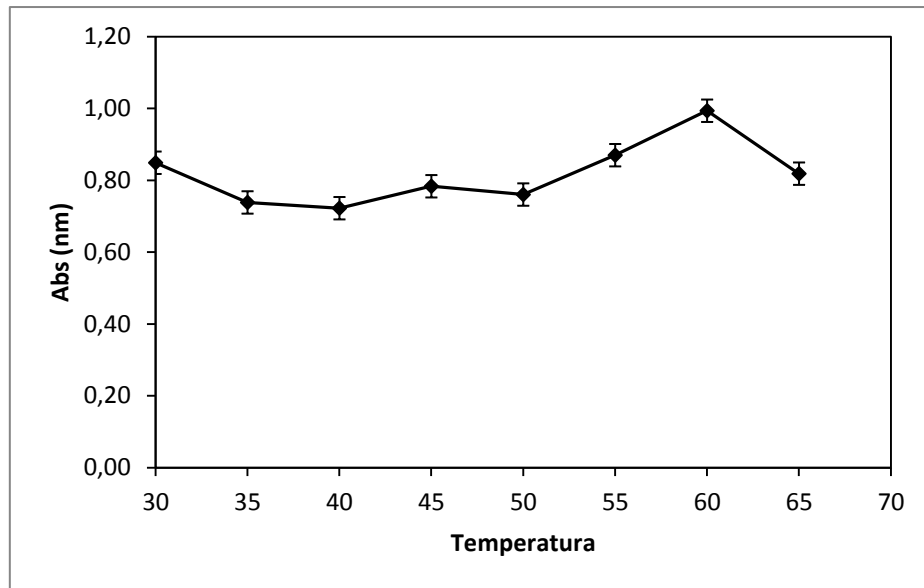
S. Sharma, *et al.*, 2008; M. Kasieczka-Burnecka, *et al.*, 2007; A.M. Costa, *et al.*, 2008).

7.2.2 Temperatura óptima de la enzima tanasa por *Rhizomucor pusillus*

Al valorar la actividad enzimática del extracto con el método de rodanina metanólica (Sharma y col 2000) se evaluó también las condiciones de diferentes valores de temperaturas, el cual sirvió para identificar el valor a partir del cual la enzima empieza a presentar una pendiente de inactivación. Para este estudio se emplearon temperaturas de 30°C hasta 65°C y solo se utilizaron las muestras de monitoreo de las 36h, 48h y 60 h, haciendo referencia a que en estas horas hubo una producción enzimática considerable. En la graficas siguientes se registraron las absorbancias con base a temperaturas antes mencionadas a cierto período del monitoreo, para poder concluir cual es la temperatura óptima de reacción enzimática en el extracto.

→ Temperatura óptima a las 36 horas

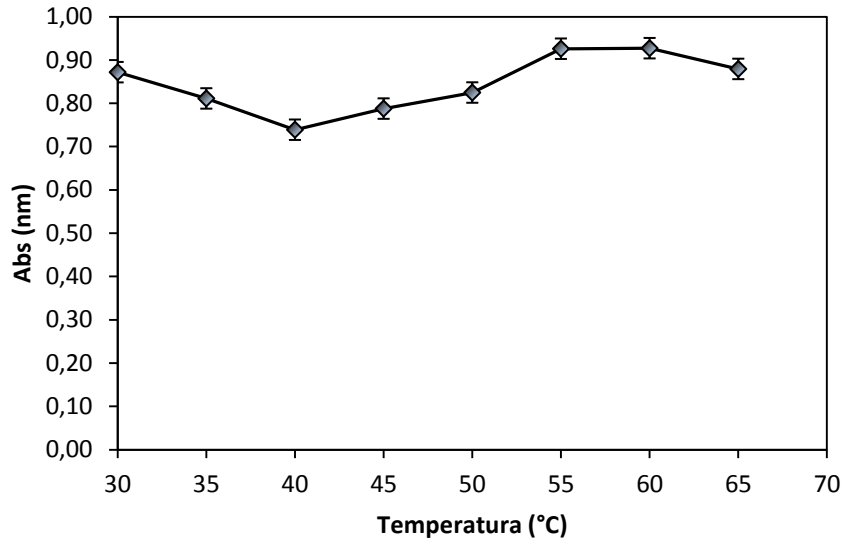
Como primer registro de lectura de las absorbancias se tienen la de las 36 horas. En este periodo de tiempo, los datos se representan en la gráfica 10, dónde se aprecia que a la temperatura inicial (30°C) tiene una absorbancia de 0.85 nm este va disminuyendo al llegar a la temperatura de 35°C, pero a partir de allí se mantienen estable hasta llegar a la temperatura de 50°C, del rango de 50°C hasta 60°C tiene un aumento mostrando absorbancias de 0.76 nm a 0.96 nm, siendo este último el punto máximo, mientras que al llegar a la temperatura de 65°C hubo una disminución a 0.82nm.



Gráfica 8. Temperatura óptima del monitoreo de 36 h dl extracto enzimático por *Rhizomucor pusillus* SOC 4A.

→ Temperatura óptima a las 48 horas

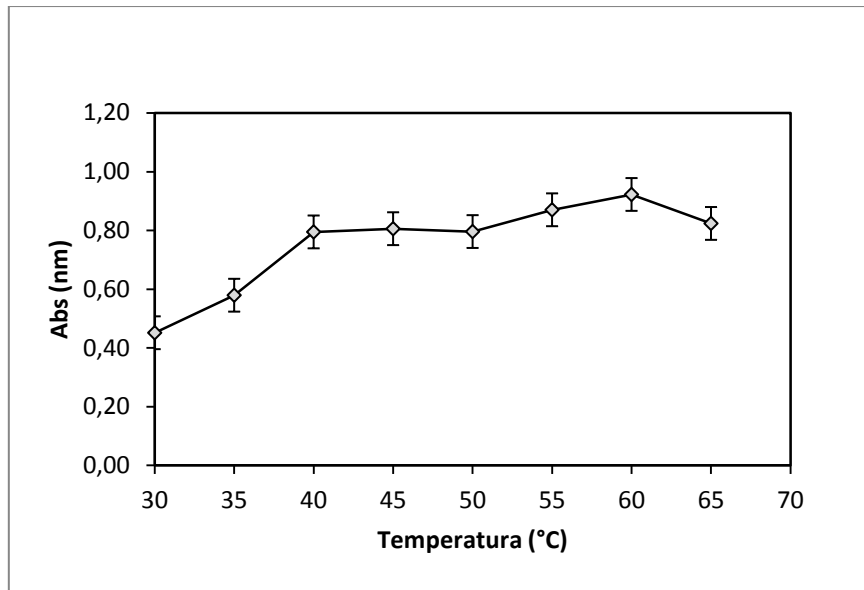
En la gráfica siguiente (11) se han tomado los registros de monitoreo del extracto enzimático a las 48 h. En ella se puede ver que en la temperatura inicial (30°C) tiene una absorbancia de 0.87 nm, a partir de los 30°C tiene un descenso hasta los 40°C con 0.74 nm, pero de allí empieza a subir hasta llegar a temperatura de 55°C con 0.93 nm, de 55°C a 60°C se mantiene en 0.93 nm, pero de 60°C a 65°C tiene un descenso a 0.8 nm.



Gráfica 9. Temperatura óptima del monitoreo de las 48 h del extracto enzimático por *Rhizomucor pusillus* SOC 4A.

→ Temperatura óptima a las 60 horas

Al llegar al último monitoreo de las 60h del extracto enzimático los datos de la gráfica 12 se interpretan de la siguiente manera, al iniciar la curva a los 30°C se tiene una absorbancia de 0,85nm, que a partir de esa temperatura se nota un descenso hasta llegar a 40°C con 0,74nm, de allí se nota que hay una estabilización de 0,79 a 0,80 nm en temperaturas de 40°C a 50°C, posterior se observa un crecimiento en temperaturas de 50°C a 60°C con absorbancias de 0,80 a 0,92 nm, siendo este último, el punto máximo de la gráfica, porque de allí hay un descenso en la temperatura de 65°C con 0,88nm.



Gráfica 10. Temperatura óptima del extracto enzimático por *Rhizomucor pusillus* SOC 4A al monitoreo de las 60 h

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad de tanasa se observa en la graficas (8,9 y 10) que hubo variación desde las 36 horas hasta las 60 horas y dicha reacción aumentó, mostrando la actividad óptima (181.092 UI/ml) a los 60°C y también se observa que el los rangos de 60-65°C la actividad enzimática decrece.

La termoestabilidad de tanasa es principalmente entre 30 y 60°C (S. Sharma, *et al.*, 1999; K.C. A. Batra and R.K. Saxena, 2005; H.B. Goncalves, *et al.*, 2012; H.B. Goncalves, *et al.*, 2011; R.M. Ordoñez, *et al.*, 2011). El resultado de la evaluación de temperatura del extracto enzimático se encuentra dentro del rango mencionado. Debido a la vida larga de la enzima y con una temperatura alta, se le llama enzima o proteína termoestable y el aumento de velocidad de la reacción debida a la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica debido a la desnaturalización térmica, y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse, como ocurrió con las temperaturas de 60-65 °C que se aprecia un decrecimiento.

8 CONCLUSIONES

Los estudios de la producción de tanasa a escala laboratorio también conocidos como Scale- up, son esenciales para establecer la viabilidad del proceso a una escala industrial. Existe una serie de informes sobre la producción, purificación y caracterización de tanasa de diversas fuentes microbianas. El presente estudio resalta las propiedades del hongo *Rhizomucor pusillus* SOC 4A para la producción de la enzima tanasa en una naturaleza de alta temperatura y con medio ácido bajo fermentación en medio líquido (FML) a nivel matraz.

Durante el proceso de la fermentación en medio líquido, el ácido tánico influyó en el hongo *Rhizomucor pusillus* SOC 4A logrando la producción de la enzima. En el transcurso de la fermentación se extrajo la muestra por cada periodo de 12h iniciando en la hora 0 hasta las 60 horas. De esta manera se logró analizar favorablemente el pH así como también su temperatura en términos óptimos de la actividad enzimática, donde el pH transforma la forma y la estructura de una enzima, ya que las alteraciones del pH rompe las delicadas uniones que mantienen la forma de la proteína y la temperatura interviene en la velocidad de la reacción. Al modo en que la producción avanzaba el consumo de fenoles se redujo y el medio se hizo ácido.

En datos concretos la cepa de *Rhizomucor pusillus* SOC 4A presentó la capacidad de crecer a una temperatura de 50° C y se alcanzó una producción máxima de 181.092 UI/ml a las 60 horas, y del extracto se logró analizar que el pH favorable a la actividad enzimática fue de 7.0 y la temperatura favorable fue de 60° C en un periodo de tiempo 36h – 60h.

La tanasa producida por *Rhizomucor pusillus* SOC 4A posee características deseables para aplicaciones industriales. La naturaleza termoestable de la enzima podría ser explotada para el tratamiento de efluentes en curtiduría, además la estabilidad en condiciones ácidas encontrará sus aplicaciones en la industria de procesamiento de alimentos tales como la clarificación de bebidas ácidas.

Algunas aplicaciones potenciales mencionados en la literatura todavía requieren más investigaciones para destacar su valor y la viabilidad económica de modo como para fomentar el uso de tanasa a escala comercial.

.

9 BIBLIOGRAFÍA

A Macedo Gabriela, 2007. Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by *Paecilomyces variotii* DOI: 10.2225/vol10-issue2-fulltext-9

Abdelwahed, A., Bouhleb, I., Skandrani, I., Valenti, K., Kadri, M., Guiraud, P., Steiman, R., Mariotte, A.M., Ghedira, K., Laporte, F., Dijoux-Franca, M.G. & Chekir-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.

Acosta Aranda Janeth Alejandra (2013) Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Págs. 77.

Adachi O, Watanabe M, Yamada H (1971) Physicochemical properties of the tannase from *Aspergillus flavus*. *Agric Biol Chem* 32:1079–1085.

Adachi, O., Watanabe, M. & Yamada, H. (1968). Studies on fungal tannase part II. Physicochemical properties of tannase of *Aspergillus flavus*. *Agricultural and Biological Chemistry* 32 (9): 1079 - 1085.

Aguilar-González Cristóbal Noé, Luis Víctor Rodríguez- Duran, Nadia A. Rodríguez-Duran, Nubia Rocío Rodríguez-Duran, Mario A. Cruz Hernández (2009) Estudio de la inhibición de la enzima tanasa producida por *Aspergillus niger* GH1 en fermentación en estado sólido.

Aguilar Cristóbal N. & Raúl Rodríguez & Gerardo Gutiérrez-Sánchez & Christopher Augur & Ernesto Favela-Torres & Lilia A. Prado-Barragán & Ascensión Ramírez-Coronel & Juan C. Contreras-Esquivel (2007). Microbial tannases: advances and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* DOI 10.1007/s00253-007-1000-2

Aguilar CN, Favela-Torres E, Viniegra-González G, Augur C (2002) Culture conditions dictate protease and tannase production in submerged and solid-state cultures by *Aspergillus niger* Aa-20. *Appl Biochem Biotechnol* 102–103:407–414

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., Augur, C., Favela-Torres, E. & Viniegra-González, G. (2001a). Induction and repression patterns of fungal tannase in solid state and submerged cultures. *Process Biochemistry* 36 (6): 565 - 570.

Aguilar, C.N., Augur, C., Favela-Torres, E., & Viniegra-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.

Aguilar, C. N. 1998. Producción de enzimas en sistemas de fermentación. Reporte interno. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México, D.F.

Aoki K., Shinke R. and Nishira H. 1976 Purification and some properties of yeast tannase. *Agr. Biol. Chem.*, 40, 79-85.

Arnáiz Carmen y col. (2000). Determinación de la biomasa en procesos biológicos.

A.M. Costa, W.X. Ribeiro, E. Kato, A.R.G. Monteiro, R.M. Peralta, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 51 (2008) 399–404.

Badui Dergal S. *Química de los alimentos*. Editorial Addison Wesley. 4ta Edición 2006. 736 pág.

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.

Banerjee, D. & Pati, B.R. (2007). Optimization of tannase production by *Aureobasidium pullulans* DBS66. *Journal of Microbiology Biotechnology* 17 (6): 1049-1053.

Banerjee, D., Mahapatra, S. & Pati, B.R. (2007). Gallic acid production by submerged fermentation of *Aspergillus aculeatus* DBF9. *Research Journal of Microbiology* 2 (5): 462 - 468.

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.

Belmares, R., Contreras-Esquivel, J.C., Rodríguez-Herrera, R., Ramírez-Coronel, A. & Aguilar, C.N. (2004). Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 37 (8): 857- 864.

Belmares Cerda, R.: Reyes Vega, M.L.: Contreras Esquivel, J.C.: Rodríguez Herrera, R.: Aguilar, C. Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de tannasa en dos cepas de *Aspergillus niger*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, vol. 2, núm. 2, 2003, pp. 95-100. Universidad Autónoma de Metropolitana Unidad Iztapalapa. Distrito Federal México.

Benavides Costa Chitunda Pessela (2002). Ingeniería de biocatalizadores y bioprocesos: β - galactosidasa de *Thermus sp.*, cepa T2. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. Págs. 128.

Castillo A. Alicia., Karina Acuache Q., Antonio Osorio L., César Fuertes R. (2009) Obtención de galato de n-propilo mediante transesterificación enzimática con tanino, propanol y tannasa inmovilizada en quitina. *Rev. Soc. Quím Perú.* 75 (4) 2009.

Chae S, Yu T (1983) Experimental manufacture of a com wine by fungal tannase. *Hanguk Sipkum Kwahakoechi* 15:326–332

Chapon L., Chollot B., Urion E. 1961. In Les tanins des végétaux (eds. Metche M. and Girardin M.). Francia, 262-287.

Coggon P, Graham NH, Sanderson GW (1975) UK Patent 1,380,135

Couto, S. R. y M. Á. Sanromán (2006). Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *Journal of Food Engineering* 76(3): 291-302.

Crueger, W. y A. Crueger (1993). *Biotecnología. Manual de Microbiología Industrial.*, Ed. Acribia.

D. Banerjee, K. C. Mondal, B. R. Pati, *Journal Basic Microbiol.*, 2001, 41,313-318.

Fazenda, M. L., R. Seviour, et al. (2008). Submerged Culture Fermentation of "Higher Fungi": The Macrofungi. *Advances in Applied Microbiology* 63: 33-103.

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.

G.L. Peterson, Review of the Folin protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall, *Analytical biochemistry*, Vol.100 No.2, 1979, 201-220

García-Nájera JA, Contreras-Esquivel JC, Rodríguez-Herrera R, Prado-Barragan LA, Aguilar CN (2002) Fungal production of 3,4,5-trihydroxybenzoic acid in submerged culture (in Spanish). Proceedings of the third international symposium on bioprocess engineering, IBT-UNAM, Cuernavaca, Morelos, Mexico

García-Peña I, Augur C, Favela-Torres E (1999) Partial purification of *Aspergillus niger* tannase produced by solid state culture (in Spanish). In: Prado A, Huerta S, Rodríguez G, Sancedo G (eds) *Advances in enzyme purification and applied biotechnology*. Ediciones UAM-Iztapalapa, Mexico, DF, pp 247–261, 2207–2212.

García Peña Elvia Inés (1996) Producción, purificación y caracterización de tanasa producida por *Aspergillus niger*, en fermentación en medio sólido. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. Págs. 75.

Gargouri, M., Smaali, I., T. Maugard, Legoy M.D. and N.Marzouki. 2004. Fungus β -glycosidases: immobilization and use in alkyl- β - glycoside synthesis. *Journal of Molecular Catalysis b: Enzymati.* 29:89-94

Gutiérrez Avella Dora Marina, Christopher Alberto Ortiz García y Arturo Mendoza Cisneros (2008). Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas en alimentación animal.

H.B. Gonc, alves, A.J. Riul, A.C. Quiapim, J.A. Jorge, L.H.S. Guimarães, *Electron. J.Biotechnol.* (2012), doi: 10.2225/vol15-issue5-fulltext-5.

H.B. Gonc, alves, A.J. Riul, H.F. Terenzi, J.A. Jorge, L.H.S. Guimarães, *J. Mol. Catal.B-Enzym.* 71 (2011) 29–35.

Hargerman A. Rice M. Ritchard N. (1998). Mechanism of protein presipitation for two tannins, Pentagaloylglucose and Epicatechin 16 (4-8) Catechin (Procyanidin). *J. Agric. Food. Chem.*, 46:2590-2595

Hernández Hdez. Lorena (2014) Evaluación de cepas fúngicas aisladas del semi-desierto para producción de enzima tanasa en fermentación de medio sólido. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Págs. 124.

Hernández, A. (2003). *Microbiología Industrial*. Costa Rica, Ed. EUNED

K.C. A. Batra, R.K. Saxena, *Process Biochem.* 40 (2005) 1553–1557.

K.C. Mondal, B.R. Pati, *J. Basic Microbiol.* 40 (2000) 223–232

K. Iwamoto, H. Tsuruta, Y. Nishitani, R. Osawa, *Syst. Appl. Microbiol.* 31 (2008)269–277.

K.P. Sharma, P.J. John, *Process Biochem.* 46 (2011) 240–244.

Lekha P.K. y Lonsane B.K. 1997. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Adv. Appl. Microbiol.* 44, 2 15-260.

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.

Albert I. Lehninger (1991). Principios de Bioquímica. Ediciones Omega

Lewis JA, Starkey RL (1969) Decomposition of plant tannins by some.

M. COSTA ANDRÉA Y Col. 2008. Production of tannase by *Aspergillus tamaris* in submerged cultures. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132008000200021>

Mariano García, Rodolfo Quintero Ramírez, Agustín López- Munguía Canales (). Biotecnología alimentaria.

M. Kasieczka-Burnecka, K. Kuc, H. Kalinowska, M. Knap, M. Turkiewicz, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77 (2007) 77–89.

McLeod M.N. (1974). Plant tannins - their role in forage quality. *Nutrition Abstract and review*, 44 (1 1): 803-815.

Montoya Villafañe H.H, (2008). Microbiología básica para el área de la salud y afines. Antioquia.

Morcillo Ortega G. (2013); Cortes Rubio E.; García López J.L. (2013). Biotecnología y alimentación. Madrid.

Mudgett R.E. 1986. Solid State Fermentation. In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* (eds. Demain A.L. and Solomon N.A.) American Society for Microbiology. USA, 66-83.

Nierenstein, M. (1930). *Nature* 125: 348 –342. Nigam and Singh, 1994).

P.D. Belur, M. Gopal, K.R. Nirmala, N. Basavaraj, *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(2010) 732–736.

Pandey A.2003. Solid-State Fermentation.Biochemical Engineering Journal.13: 82-84.

Patrick, Schwarz., Stephane, Bretagne., Jean-Charles, Gantier., Dea, Garcia., Olivier, Lortholary., Francoise, Dromer., and Eric, Dannaoui. (2006). "identificacion molecular de *Zygomycetes* de cultura". Journal of clinical microbiology, p.340.349 Vol. 44, No.2

Resvista Eroski Consumer por Peña Piñeiro, 21 abril de 2009, (<http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/tendencias/2009/04/21/184759.php>)

Ribereau-Gayon M. 1973. In Les tanins des vegataux (eds. Metche M. and Girardin M.). Francia, 262-287.

Roux D.G. and Evelyn S.R. 1985. *J. Chromatography*, 1, 537-542 (cited by Mc Leod M.N. 1974. Plant tannins-their role in forage quality. *Nutrition Abstracts and Reviews*, 44, 803-815).

R.M. Ordoñez, I. Colombo, M.R. Alberto, M.I. Isla, World J. Microbiol. Biotech-nol. 27 (2011) 2325–2333.

S. Mahapatra, D. Banerjee, J. Gen. Appl. Microbiol. 55 (2009) 255–259.

Saval Susana, Biotecnología aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, pesente y futuro, 2012, Vol. 16 No. 2

Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30 (12): 3875 - 3883.

Schübler, A., Schwarzott, D., &Walker, C. (2001). A new fungal, phylum, the Glomeromycota: plylogeny and evolution. *Mycol. Re.* 105:1413- 1421.

S. Sharma, L. Agarwal, R.K. Saxena, Bioresource Technol. 99 (2008) 2544–2551.

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

S. Sharma, T.K. Bhat, R.K. Dawra, World J. Microb. Biotechnol. 15 (1999) 673–677.

Sittig M (1988) Trimethoprim. In: Sittig M (ed) Pharmaceutical manufacturing encyclopedia. William Andrew/Noyes, New Jersey, pp 282–284

Smiderle, F. R., L. M. Olsen, et al. (2008). Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1→3),(1→6)-linked β -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. European Journal of Pharmacology 597(1–3): 86-91. Strumeyer y Malin, 1970).

Suarez Arango Carolina (2012) Utilización de la fermentación líquida de *Lentinula edodes* (Shiitake), para la producción de metabolitos secundarios bioactivos y evaluación de su potencial empleo en la producción de un alimento funcional. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Págs.122.

Swain, T. (1977). Secondary compounds as protective agents. *Annual Review of Plant Physiology* 28 (1): 479 - 501

T. Robinson, D. Singh y P. Nigam. (2002) Fermentación en estado sólido: una tecnología microbiana promisorio para la producción de metabolitos secundarios.

Tieghem, P (1867) Sur la fermentation gallique. CR Acad Sci (Paris) 65:1091-1094

Toro, M Díaz, A. & Piazze, F. (1993). Microhongos filamentosos y levaduriformes asociados a pimienta negra (*Piper nigrum* L.) Boletín Micológico 8:77-83

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

Viniegra-González G. 1997. Strategies for the selection of molds strains geared to produce enzymes on solid substrates. In E.Galindo & O.T.Ramirez (Eds), *Advances in Bioprocess Engineering II*, 123-135. Kluwer Academic Publishers. Printed in The Netherlands

Wainwright, M. (1992). Introducción a la biotecnología de los hongos, Zaragoza, Ed. Acribia S.A.

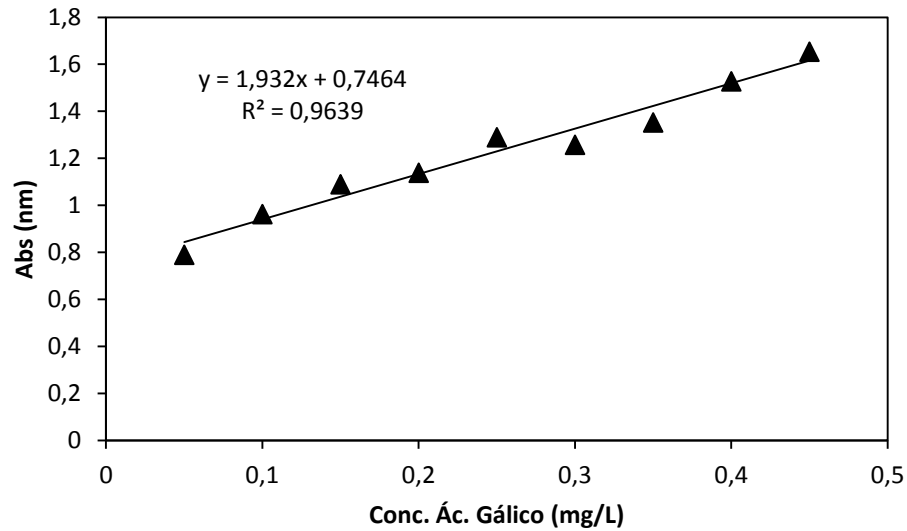
Weitzman, I., S. Whittier, J.C. Mckitrich, and P. DELLA-LATTA. (1995). Zygosporos: the last Word in identifiaation of rareo r atypical zygomycetes isolated from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. Vol. 33; p. 781-783

Yao Jian, Geng Shan Guo, Guang Hui Ren & Yu Huan Liu (2014). Production, characterization and applications of tannase.

Yu, X.W. & Li, Y.Q. (2008). Expression of *Aspergillus oryzae* tannase in *Pichia pastoris* and its application in the synthesis of propyl gallate in organic solvent. *Food Technology and Biotechnology* 46 (1): 80 - 85.

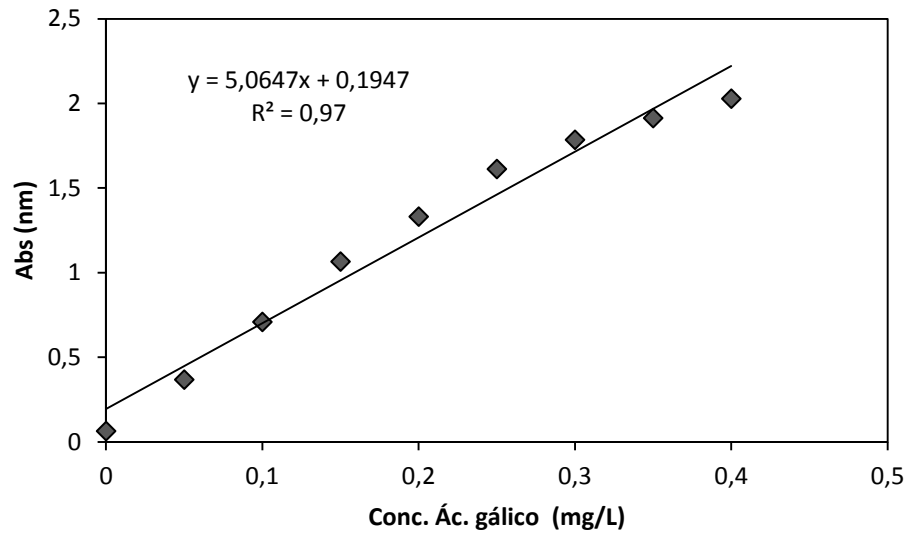
10 ANEXOS

Anexo 1. Curva de calibración para la cinética de tanasa.



Gráfica 11. Curva de calibración para la cinética de tanasa.

Anexo 2. Curva de calibración para la cuantificación de Fenoles hidrolizables totales.



Gráfica 12. Curva de calibración para cuantificación de Fenoles Hidrolizables Totales.