

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y ALIMENTOS**



TESIS

**PRODUCCIÓN FÚNGICA DE LA ENZIMA TANASA EN CULTIVO
SUMERGIDO Y EN ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO *Larrea tridentata* Cov.
COMO FUENTE DE CARBONO Y ENERGIA.**

**PRESENTA
MIGUEL LUIS CRUZ**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA

NOVIEMBRE, 2002.

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y ALIMENTOS

Producción Fúngica de la Enzima Tanasa en Cultivo Sumergido y en Estado Sólido Utilizando *Larrea tridentata* cov. como Fuente de Carbono y Energía.

POR:

MIGUEL LUIS CRUZ

T E S I S

**Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como
Requisito Parcial para Obtener el Título de:**

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

APROBADA.

Q.F.B. ANTONIO FRANCISCO AGUILERA CARBO
PRESIDENTE

Dr. CRISTÓBAL N. AGUILAR GONZÁLEZ
HERRERA

SINODAL

Dr. RAUL RODRÍGUEZ

SINODAL

ING. JOSÉ RODOLFO PEÑA ORANDAY.
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL.

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA

NOVIEMBRE, 2002.

Este trabajo de tesis forma parte del proyecto de investigación sobre la producción de enzimas degradantes de taninos y obtención de nutraceuticos por cultivos microbianos en fermentación en medio sólido, que se desarrolla dentro de la línea de Biotecnología Alimentaria del Departamento de Investigación en Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila. El presente proyecto cuenta con financiamiento de la Secretaria de Educación Pública (SEP-PROMEP) y del Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (COECYT).

INDICE GENERAL

RESUMEN

Pagina

i

ABSTRACT	ii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo General.	3
2.2 Objetivos Específicos.	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA.	4
3.1 Producción de enzimas.	4
3.1 Microorganismos más usados en la producción de enzimas.	5
3.2 Tanin Acil Hidrolasa.	6
3.2.1 Generalidades.	6
3.2.2 Obtención de la TAH.	7
3.2.3 Mecanismo de acción.	9
3.4 Regulación y biosíntesis de la TAH.	9
3.5 Propiedades de la TAH.	11
3.6 Evaluación de la actividad TAH.	12
3.2.7 Producción microbiana de la TAH.	13
3.2.8 Purificación de la TAH.	15
3.3 Gobernadora.	19
3.3.1 Distribución geográfica.	19
3.3.2 Características morfológicas de la planta.	19
3.3.3 Composición botánica de la gobernadora.	20
3.3.4 Composición química de la gobernadora.	20
3.4 Procesos biotecnológicos.	21
3.4.1 Cultivo en Fermentación en Medio Líquido.	21
3.4.2 Cultivo en Fermentación en Medio Sólido.	22
3.4.3 Diferencias entre Medio de Cultivo Líquido y Sólido.	24
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1 Equipos y Materiales de laboratorio.	25
4.2 Microorganismo.	26

4.3 Etapa I. Recolección, Transformación y Caracterización de la Materia prima.	26
4.3.1 Recolección de la Materia prima.	26
4.3.2 Deshidratación de las muestras.	26
4.3.3 Caracterización fisicoquímica del polvo de gobernadora.	26
4.3.3.1 Potencial de hidrógeno.	26
4.3.3.2 Humedad.	27
4.3.3.3 Sólidos totales.	27
4.3.3.4 Proteínas.	27
4.3.3.5 Azúcares totales.	27
4.3.3.6 Azúcares reductores.	27
4.3.3.7 Azúcares no reductores.	28
4.3.3.8 Grasas.	28
4.3.3.9 Fibra cruda.	28
4.3.3.10 Cenizas.	29
4.3.3.11 Cuantificación de fenoles totales o polifenoles.	29
4.4 Etapa II. Propagación y conteo de esporas, fermentaciones y evaluación de la actividad enzimática.	30
4.4.1 Propagación de esporas.	30
4.4.2 Conteo de esporas.	31
4.4.3 Fermentación en medio líquido.	31
4.4.4 Fermentación en medio sólido.	31
4.4.5 Evaluación de la actividad enzimática.	32
4.5 Etapa III. Evolución del pH, consumo de sustratos (azúcares totales y fenoles totales).	33
4.5.1 Evolución del potencial de hidrógeno.	33
4.5.2 Cuantificación de consumo de azúcares totales.	33
4.5.3 Cuantificación consumo de fenoles totales.	33
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	34
5.1 Composición fisicoquímica del polvo de gobernadora.	34
5.2 Actividad máxima de tanasa extracelular e intracelular obtenida en fermentación en medio líquido.	35

5.3 Actividad máxima tanasa extracelular e intracelular obtenida en fermentación en medio sólido.	37
5.4 Evolución del pH en fermentación en medio líquido y sólido.	38
5.5 Consumo de sustrato (azúcares totales) en fermentación en medio líquido y sólido.	39
5.6 Consumo de sustrato (catequina) en fermentación en medio líquido y sólido.	40
5.7 Consumo de sustrato (ácido gálico) en fermentación en medio líquido y sólido.	42
VI. CONCLUSIONES.	44
VII. RECOMENDACIONES.	45
VIII. LITERATURA CITADA.	46

INDICE DE TABLAS

Tabla	Pagina
1. Propiedades de la TAH de <i>A. Niger</i> producida por fermentación líquida.	16
2. Resumen de algunas características de la TAH microbiana producida por fermentación líquida y sólida.	18
3. Composición botánica de la gobernadora en base seca.	20
4. Composición química de la gobernadora.	20
5. Equipos de laboratorio utilizados en la investigación.	25

6.	Medios de cultivo basada en la composición reportada por Kar y Barnerjee (2000).	30
7.	Composición fisicoquímica del polvo de gobernadora.	34
8.	Actividad tanasa extra e intracelular en fermentación en medio líquido.	35
9.	Actividad tanasa extra e intracelular en fermentación en medio sólido.	37

INDICE DE FIGURAS

Figura	Pagina	
1.	Reacción de hidrólisis de ácido tánico (tanino hidrolizable), R1 galoil y R2 digaloil.	6
2.	Evolución del pH en fermentación en medio líquido.	38
3.	Evolución del pH en fermentación en medio sólido.	38
4.	Consumo de sustrato (azúcares totales) en fermentación en medio líquido.	39
5.	Consumo de sustrato (azúcares totales) en fermentación en medio	39

	sólido.	
6.	Consumo de sustrato (catequina) en fermentación en medio líquido.	41
7.	Consumo de sustrato (catequina) en fermentación en medio sólido.	41
8.	Consumo de sustrato (ácido gálico) en fermentación en medio líquido.	42
9.	Consumo de sustrato (ácido gálico) en fermentación en medio sólido.	42



Capítulo 1

INTRODUCCION

La enzima tanin acil hidrolasa o tanasa (EC, 3.1.1.2) hidroliza los enlaces éster presentes en las moléculas de los taninos hidrolizables y de los ésteres del ácido gálico (Lekha y Lonsane, 1997). Los productos finales de la hidrólisis enzimática del ácido tánico son el ácido gálico y glucosa en una proporción (9:1) (Haworth y col.,1958). La tanasa es producida por diferentes géneros de mohos, principalmente de *Aspergillus*, *Penicilium*, *Fusarium*, *Rhizopus* y *Trichoderma* (Libuchi y col., 1967; Bajpai y Patil, 1997), además se ha reportado que algunas bacterias y levaduras son capaces de producirla (Deschamp, 1983; Aoki y col., 1976). La tanasa también puede extraerse de fuentes vegetales y animales (Sourlangas, 1947; Begovic y Duzic, 1977).

En la actualidad la tanasa se emplea en la elaboración del té instantáneo, en la clarificación de algunos vinos y jugos de frutas y en la producción de ácido gálico; este último es un compuesto intermediario necesario en la síntesis del compuesto antibacteriano conocido como trimetoprim (Lekha y Lonsane, 1997; Pourrat y col., 1985; Coggon y col., 1975; Chae y Yu, 1983). Además el ácido gálico se usa en la producción de un aditivo de amplio uso en la industria, el propilgalato (Lekha y Lonsane, 1997).

Sin embargo, el uso de la tanasa a gran escala está severamente limitado, debido a diferentes factores, entre los cuales, el costo de su producción y el insuficiente conocimiento sobre la enzima. Por lo que la presente investigación tiene como finalidad la producción de esta enzima empleando residuos vegetales ricos en taninos obtenido de zonas semidesérticas, a menor costo y mayor producción. Se han llevado a cabo estudios de producción de la tanasa utilizando diferentes residuos agroindustriales, tales como las frutas de mirabolano

(*Terminalia chebula*), Tejidos de divi divi (*Caesalpinia coriaria*), Hojas de dhawa (*Anogeissus latifolia*), troncos de los árboles: Konnam (*Cassia fistula*), Badúl (*Acacia arábica*), Avarum (*Cassia auriculata*) (Pourrat y col. 1985) y recientemente el Gilo (*Caesalpinia digyna*) (Kar y Banerjee, 2000). Sin embargo no existen reportes sobre la producción de tanasa empleando residuos vegetales ricos en taninos obtenido de zonas semidesérticas, como la gobernadora (*Larrea tridentata*).

Este trabajo incluyó la evaluación cinética de la producción de la enzima tanasa tanto intracelular como extracelularmente por *Aspergillus niger*, además se evaluó el consumo de taninos condensados e hidrolizables, ya que estos son los inductores naturales de la actividad tanasa.

El presente, trabajo inicialmente, presenta los objetivos de la tesis, posteriormente una descripción de los antecedentes mas relevantes y actualizados sobre el tema, seguido de la metodología utilizada. En la sección de resultados se presentan éstos y su discusión. Finalmente se presentan las conclusiones y prospectivas de este trabajo.



OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la producción de la enzima tanasa producida por *Aspergillus niger* Aa-20 usando como fuente de inductor, carbono y energía, residuos de gobernadora (*Larrea tridentata* Cov.).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Realizar la caracterización fisicoquímica incluyendo fenoles totales de la planta gobernadora.
- Evaluar la producción de la actividad extra e intracelular de la enzima tanasa de *Aspergillus niger* Aa-20, en CSm y CS.
- Evaluar el consumo de sustratos (azúcares y fenoles totales) durante el crecimiento fúngico en CSm y CS.



3.1 PRODUCCIÓN DE ENZIMAS.

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

El desarrollo de fermentaciones de enzimas industriales fue iniciado por Boidin y Effront en España y Alemania respectivamente, quienes en 1917 patentaron el empleo de *Bacillus subtilis* y *Bacillus mesentericus* para obtener amilasas y diastasas también, mediante técnicas de cultivo en superficie. Los métodos de cultivo en superficie para la producción de enzimas fúngicos se utilizaron en E.E.U.U. en los años 50's y aún hoy continúan empleándose, especialmente en Japón. Las fermentaciones fúngicas sumergidas se utilizaron en E.E.U.U. y Europa para la producción de enzimas basándose en la experiencia conseguida con las fermentaciones sumergidas en el desarrollo del proceso de producción de *Penicillium*, en los Northern Regional Research Laboratories (NRRL) de E.E.U.U. (Aguilar, 1998).

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

también ha impulsado el aislamiento o modificación de otras enzimas con estabilidad elevada (Aguilar, 1998).

3.1.1 Microorganismos más usados en la producción de enzimas.

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

Actualmente se están realizando importantes investigaciones sobre la producción de la enzima tanasa. Esta enzima es producida por diferentes géneros de mohos, principalmente de *Aspergillus*, *Penicilium*, *Fusarium*, *Rhizopus* y *Trichoderma* (Libuchi y col., 1967; Bajpai y Patil, 1997), además se ha reportado que algunas bacterias y levaduras son capaces de producirla (Deschamp, 1983; Aoki y col., 1976). La tanasa también puede extraerse de fuentes vegetales y animales (Sourlangas, 1947; Begovic y Duzic, 1977).

3.2 TANIN ACIL HIDROLASA

3.2.1 Generalidades

La enzima tanasa es una hidrolasa (EC; 3.1.1.20) que actúa sobre algunos taninos (Figura 1). Su nombre correcto es tanin acil hidrolasa (TAH) y desempeña un papel importante en la formación de los taninos complejos en las plantas, los cuales por definición son un grupo de compuestos fenólicos hidrosolubles con diferentes pesos moleculares que dependerán de los enlaces que posean con proteínas, polisacáridos (ejemplos la celulosa y la pectina) y

gelatina (Swain y Bate-Smith, 1962), variando entre 500 y 20,000 D; además, la TAH está involucrada en la maduración de las frutas, debido a que desestereifica algunos ésteres formados a partir de los ácidos quebulínico, gálico y hexahidrofenólico con la glucosa (Madhavakrishna y col., 1960).

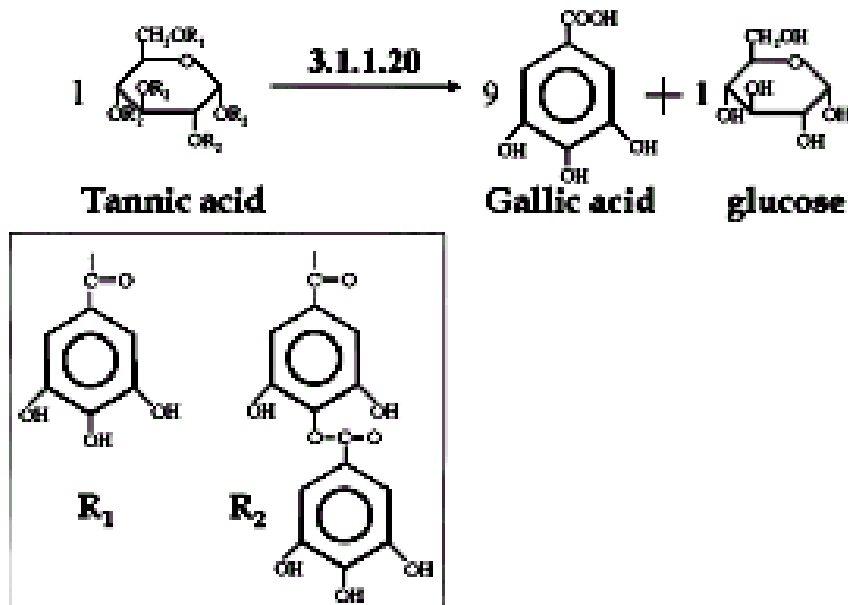


Figura 1. Reacción de hidrólisis de ácido tánico (tanino hidrolizable). R_1 , galloil y R_2 , digalloil.

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

flavolanos (Nishira y Joslyn, 1968; Garcia-Peña y col., 1999; Lekha y Lonsane, 1997).

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

3.2.2 Obtención de la TAH.

La TAH puede obtenerse de fuentes vegetales, animales y microbianas. En el caso de las fuentes vegetales, la enzima está presente en plantas con alto contenido de taninos, localizándose tanto en frutas, hojas, vainas, ramas y cortezas de árboles como el “Konnam”, “el mirobolano” y el “badul” (Madhavakrisna y col, 1960; Pourrat y col, 1985; Lekha y Lonsane, 1997).

A partir de fuentes animales, la TAH puede extraerse de mucosa ruminal e intestino delgado de bovinos (Bejovic y Duzic, 1976 y 1977). Además, se ha reportado que algunos insectos producen la enzima durante el estado larvario (Nierenstein, 1930).

La fuente más importante de la enzima es por vía microbiana, debido a que las enzimas producidas son más estables que sus análogas obtenidas de otras fuentes (Lekha y Lonsane, 1997); así también, los microorganismos pueden producirla en grandes cantidades en forma constante. Adicionalmente, éstos son los que mejor se prestan para someterse a nuevas técnicas, tales como la manipulación genética, dando como resultado un incremento en los títulos de actividad TAH. Es importante resaltar que aún no se han reportado

estudios relacionados con el mejoramiento de la producción de la enzima usando estas herramientas.

La TAH puede ser producida por bacterias de los géneros: *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Klebsiella* (Deschamp y col., 1983), por la enterobacteria *Streptococcus bovis* (Osawa y Walsh, 1993) y por la bacteria ruminal *Selenomonas ruminantium* (Skene y Brooker, 1995). Se acepta generalmente que las bacterias son organismos muy sensibles a la presencia del ácido tánico, pero las bacterias referidas fueron capaces de crecer sobre este compuesto y degradarlo. En el caso de las levaduras, Aoki y col., (1976) reportaron que una cepa del género *Candida* produjo la TAH, siendo hasta el momento el único reporte publicado. Los hongos filamentosos son los microorganismos que más han sido estudiados, entre los que se incluyen especies de los géneros: *Ascochyta*, *Aspergillus*, *Chaetomiu*, *Mucor*, *Myrothecium*, *Neurospora*, *Rhizopus*, *Trichothecium* y *Penicillium*, según lo reportado por Lekha y Lonsane (1997); adicionalmente , Bajpai y Patil (1996 y 1997) también reportaron a los géneros: *Fusarium* y *Trichoderma*.

Bajpai y Patil (1996 y 1997) llevaron a cabo una serie de estudios comparativos relacionados con la producción de la enzima TAH por varias especies fúngicas, encontrando que *Fusarium solani*, *Trichoderma viride* y *Aspergillus fischerii* fueron mejores productores de TAH. Hay que considerar que para usos industriales de producción de TAH, los microorganismos seleccionados deben contar con el certificado de cepa GRAS (Generally Recognized As Safe), y no deben producir antibióticos.

3.2.3 Mecanismo de acción.

Como se mencionó anteriormente, la TAH cataliza la hidrólisis de los enlaces éster presentes en los taninos hidrolizables y en los ésteres del ácido gálico (Lekha y Lonsane, 1997). Sobre el ácido tánico (un tanino hidrolizable), la TAH genera glucosa y ácido gálico como productos finales de la reacción (Haworth y col., 1958). Los compuestos intermediarios de esta hidrólisis son:

1,2,3,4,6-pentagalactil-glucosa, 2,3,4,6-tetragalactil-glucosa y dos tipos de monogalactil-glucosa. Cuyo sustrato de la reacción es el metil éster del ácido tánico o el metil galato, la TAH genera ácido gálico y alcohol metílico como productos finales (Libuchi y col., 1972).

La Figura 1, muestra la reacción catalizada por la TAH sobre el ácido tánico, el cual puede o no estar metilado; si no lo está, la molécula de glucosa puede unirse a través de enlaces tipo éster a radicales R_2 (ácido digálico) sobre los carbonos 1,2,3, y 4. Y al radical R_1 (ácido gálico) sobre el carbono 6. Si el ácido tánico está metilado, el radical R_2 será remplazado en todas las posiciones por un radical R_3 (m-digalato metilado) (García-Peña y col., 1999).

3.2.4 Regulación y Biosíntesis de la TAH.

Los pocos estudios relacionados con los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión de la TAH en los microorganismos ha provocado que en la actualidad existan grandes controversias sobre este tópico. Knudson (1913) reportó que la tanasa se induce únicamente cuando el microorganismo crece en presencia de ácido tánico, dando como productos finales de la hidrólisis el ácido gálico y la glucosa (Nishira y Mugibayashi, 1953); esto no concuerda con lo reportado por Seiji y col., (1973) quienes mencionaron que la actividad TAH se expresa cuando el microorganismo crece únicamente sobre glucosa. Recientemente Bradoo y col., (1997) demostraron que la enzima TAH puede expresarse aún en ausencia del ácido tánico cuando el microorganismo se hace crecer sobre otros sustratos, tales como algunos monosacáridos, disacáridos, polisacáridos o incluso sobre peptona y caseína, considerando que la enzima se expresa en forma constitutiva. Estos niveles de actividad pueden ser considerados como los niveles basales de expresión, de los cuales depende que el microorganismo utilice eficientemente a los taninos hidrolizables como fuente de carbono y energía.

Bajpai y Patil, (1997) reportaron que la TAH puede inducirse por diversos compuestos, tales como: pentagalactil-glucosa, metil galato, ácido gálico y el pirogalactil, además, sugieren que la regulación de la tanasa no puede ser

controlada por inhibición de retroalimentación, debido a que el ácido gálico es el producto final de muchos sustratos empleados como inductores de la actividad TAH, ni tampoco por represión catabólica.

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

Por otra parte, también se ha cuestionado que el ácido tánico sea el inductor de la actividad TAH, debido a que es una molécula de gran tamaño y muy reactiva, lo que implica que este compuesto no puede atravesar la membrana celular del microorganismo. Esto lleva a pensar que probablemente uno de los intermediarios formados sea en realidad el inductor de la actividad. Sobre este aspecto, Lekha y Lonsane (1997) proponen que la inducción de la tanasa se ejecuta de forma similar a la involucrada en la inducción de las celulasas, en donde se requiere de ciertos niveles basales de la enzima necesarios para iniciar la hidrólisis del sustrato y generar de esta forma al inductor real de la actividad.

Sin embargo, es un hecho que faltan estudios relacionados con este aspecto que permitan aclarar cuáles son los mecanismos involucrados en la biosíntesis de la TAH y cuál es su inductor natural, de tal forma que pueda establecerse desde la ruta de degradación de los sustratos hasta como se regula la actividad TAH.

3.2.5 Propiedades de la TAH.

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

Se sabe que la TAH fúngica es una glicoproteína (Aoki y col., 1976; Rajakumar y Nandy, 1983) formada por una esterasa y una dehidrogenasa (Toth, 1944; Haslam y col., 1961; Beverini y Metche, 1990) cuya estabilidad al pH se encuentra en un rango de 3.5 a 8.0, posee un pH óptimo de 5.5 a 6.0, una estabilidad a la temperatura entre 30 y 60⁰C, una temperatura óptima de 30 a 50⁰C, un punto isoeléctrico de 4.0 a 4.5 y un peso molecular entre 186 a 300 kDa. La actividad TAH es inhibida por Cu²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺ y Mg²⁺ e inactivada por o-fenantrolina, EDTA, 2-mercaptoetanol, tioglicolato de sodio, sulfato de magnesio y los cloruros de calcio y magnesio; por supuesto que estos valores pueden variar en función de la cepa usada y de las condiciones de producción y purificación empleadas (Yamada y col., 1968; Adachi y col., 1971; Barthomeuf y col., 1994; Libuchi y col., 1972; Chae y Yu., 1983; Rajakumar y Nandy, 1983; Aoki y col., 1976).

3.2.6 Evaluación de la actividad TAH.

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

Los métodos para evaluar la actividad TAH han sido brevemente revisados por Lekha y Lonsane (1997), así como también por Madhavakrishna y col., 1960; Jean y col., 1981 y Bajpai y Patil, 1996. El debate se centraba en

el hecho de que los sustratos usados en los ensayos específicos existentes para evaluar la actividad TAH no son los adecuados, existen variaciones en las lecturas lo que lleva a grandes discrepancias en los valores de actividad observados, algunos no son específicos o presentan problemas para determinar el punto final de la reacción; incluso, las longitudes de onda, en el caso de los ensayos espectrofotométricos, varían de un autor a otro haciendo muy difícil una comparación de los resultados obtenidos. Otros métodos presentan desventajas tales como, largos tiempos de reacción y uso de sustratos poco disponibles. Además en el método descrito por Sanderson y col., 1974, la actividad TAH no puede expresarse en unidades internacionales.

Recientemente, Aguilar y col., (1999b) llevaron a cabo un estudio comparativo de seis métodos para determinar la actividad TAH producida por *Aspergillus niger* Aa-20 en cultivos de estado sólido, encontrando que no todos los métodos analizados son capaces de evaluar la actividad enzimática intracelular y recomendaron el uso de la técnica reportada por Beverini y Metche (1990) y el método modificado de Bajpai y Patil., (1997). Aguilar y col., 1999b adicionalmente demostraron que los valores de TAH son subestimados cuando el pH en el proceso de extracción enzimática es menor que 5.5 o superior a 6.0. Aun así, es necesario remarcar la necesidad de conducir experimentos que permitan establecer un punto de comparación entre los diferentes métodos mencionados, ya que por el momento los valores obtenidos por un autor para la actividad TAH no pueden compararse con otros generados con una técnica diferente.

3.2.7 Producción microbiana de la TAH.

La producción a escala comercial de la TAH es a través de cultivos sumergidos utilizando hongos filamentosos, en los cuales la enzima se expresa en forma intracelular debido a que se localiza en el periplasma celular. Beverini (1987) demostró que la enzima se encuentra inmovilizada en la pared celular del hongo, por esta razón, es muy importante contar con un método de recuperación apropiado para extraer la enzima de forma activa. Algunos estudios han reportado que los procesos de extracción de la TAH empleando

proteínas hidrofílicas pueden favorecer el proceso de extracción (Golden y Hattón, 1987; Grovenco y col., 1987; Yokoyama y col., 1988). En adición, Yamada y col., (1968) reportaron que la TAH siempre se expresa de forma extracelular a bajos niveles.

La producción de la TAH es inducida, formándose durante las etapas iniciales del crecimiento, ya que es un metabolito asociado al crecimiento (García- Peña, 1996; Doi y col., 1973). Las condiciones generales para la producción de la TAH por cultivos sumergidos son: temperatura, de 30 a 33⁰C, pH de 4.5 a 5.8 y una velocidad de agitación entre 160 y 250 rpm (Adachi y col., 1968; Doi y col., 1973; Rajakumar y Nandy, 1983; Lekha y Lonsane, 1994; Barthomeuf y col., 1994; Bajpai y Patil, 1997).

En 1994, Hadi., llevó a cabo una serie de estudios de optimización de la biosíntesis de la TAH usando una cepa de *Rhizopus oryzae*, encontrando una actividad de 6.12 U/ml cuando el hongo se cultivó en un medio Czapek-Dox con 2% de ácido tánico, 1% de glucosa, 0.05% de nitrato de sodio, un pH inicial de 5.0 y un periodo de incubación de 4 días. Otro estudio similar fue desarrollado por Bradoo y col., (1997) usando una cepa de *A. japonicus*, reportando que la TAH se produce constitutivamente sobre azúcares simples y complejos, aunque los títulos se aumentan cuando se cultiva en presencia de ácido tánico. Dicho reporte involucró una optimización paramétrica que condujo a un incremento de 13% en la producción de la enzima a condiciones de 30⁰C, pH 6.6, con 0.2% de glucosa en un medio mínimo y ácido tánico al 1% . Adicionalmente, Bajpai y Patil (1997) recomendaron el uso del metil galato como indicador sobre el empleo del ácido tánico para la producción a nivel industrial de la TAH.

Por otra parte, la información disponible sobre la producción de la TAH a través de otros procesos de producción es escasa. Un ejemplo de dichos procesos es el cultivo en estado sólido (Lekha y Lonsane, 1994; Chaterjee y col., 1996), sobre el cual se han reportado atractivas ventajas para la producción de la TAH. En este tipo de cultivo la TAH se caracteriza por expresarse de forma

extracelular en altos títulos cuando se compara este proceso con el cultivo líquido (Aguilar y col., 1999c). Esto es importante si se consideran aspectos económicos. Además, se ha reportado que la TAH producida por este sistema es estable en un rango amplio tanto de temperaturas como de pH, lo que hace a un más atractivo el cultivo sólido para la producción de la TAH. Sin embargo, es necesaria la realización de más esfuerzos y de investigación básica y aplicada para poder optimizar un proceso de producción de TAH por este tipo de cultivo.

3.2.8 Purificación de la TAH.

Existen reportes desde los 70' s sobre la purificación de la TAH a partir de fuentes vegetales y microbianas (Aoki y col., 1976).

Beverini y Metche (1990) purificaron y caracterizaron una TAH a partir de un producto comercial de *A. oryzae*. En la primera etapa de purificación se utilizó acetona en el proceso de precipitación (pH 3.6), una etapa de filtración para eliminar los derivados oxidados del ácido gálico, y dos pasos de cromatografía para fraccionar la proteína. En dicho estudio se alcanzó un grado de pureza similar al reportado por Aoki y col., (1976) incrementando la actividad TAH de 2990 a 6153 U.

Barthomuef y col., (1994) purificaron una TAH de *A. niger*, producida en cultivo sumergido; tal vez este trabajo es uno de los más importantes publicados sobre el tema, debido a que proporcionó información valiosa sobre algunas propiedades de la TAH de origen fúngico (Tabla 1). Todas las características enlistadas son las mismas para *A. niger* y *A. flavus*, excepto la temperatura óptima para *A. flavus* es de 70 °C (Adachi y col., 1968). El proceso de aislamiento y purificación de la TAH usado por Bartomeuf y col., (1994) consistió en cuatro etapas. El extracto enzimático crudo se obtuvo por ruptura mecánica de la masa micelial congelada en presencia de concavalina A. Los materiales insolubles fueron removidos por centrifugación, y el sobrenadante se filtró en una membrana de nylon y se sometió a una ultrafiltración tangencial.

La enzima pura se obtuvo por cromatografía líquida de alta presión usando una columna de protein.pak 30⁰, seguida de una ultrafiltración en centricon 100 kDa.

Tabla 1. Propiedades de laTAH de *A. niger* producida por fermentación líquida.

CARACTERÍSTICAS	VALOR
Punto isoelectrico	4.3
Peso molecular	186,000 Dts
Contenido de azúcares	43.0%
pH óptimo	
Actividad tanasa	6.0
Actividad esterasa	5.0
Estabilidad al pH	3.5 – 8.0
Temperatura óptima	35 °C
Estabilidad a la temperatura	4.0 – 45.0 °C
Inhibidores	DPF, ZnCl ₂ , FeCl ₃ , CuSO ₄
Inactivadores	o-fenantrolina, P.M.S.F., EDTA, 2-mercaptoetanol, tioglicolato de sodio, MgSO ₄ , CaCl ₂ , MnCl, CoCl ₂ .

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

Farías y col., (1994) purificaron una TAH de *Cryphonectria parasitica*, lavando y homogeneizando la masa micelial con una solución amortiguadora de acetatos fría y fluoruro de fenilmetilsulfonilo como inhibidor de proteasas. Posteriormente, el extracto se centrifugó y la enzima se precipitó con sulfato de amonio, redisolviéndola y dializándola con la misma solución amortiguadora. En este trabajo se obtuvo un factor de purificación de 142 con un 10% de recuperación y una actividad específica de 170 U/mg. Recientemente, Gupta y col., (1997) emplearon una mezcla de ácido tánico y polietilenglicol 6000 para

proteger la actividad de la TAH durante la precipitación de la misma, obteniendo una recuperación de 50.3% de la actividad enzimática.

Sobre fermentación en estado sólido, Lekha y Lonsane (1994) llevaron a cabo un estudio de purificación parcial de la TAH producida por *A. niger* PKL104, usando una precipitación con sulfato de amonio al 50 y 80% (p/v) de saturación, una diálisis, una representación con acetona (50% v/v) y una etapa final de recuperación por centrifugación. En otro estudio de purificación de la TAH en fermentación en estado sólido, García-Peña (1996) centrifugó el extracto obtenido 120 h de cultivo usando la cepa de *A. niger* N888, lo filtró en membrana de nylon y lo dializó para purificarla, usando una cromatografía de baja presión (BIO-RAD) y caracterizarla por isoelectroenfoque y cromatografía de permeación en gel. Sus resultados mostraron que la TAH posee un punto isoelectroenfoque de 3.8, un peso molecular de 80-85 kDa, un pH óptimo de 6.0 y una temperatura óptima de 70 °C. La Tabla 2 muestra un resumen de algunas de las características de la TAH fúngica producida por fermentación líquida y por fermentación sólida.

Como ya ha mencionado se han llevado a cabo estudios de producción de la tanasa utilizando diferentes residuos agroindustriales Sin embargo no existen reportes sobre la producción empleando residuos vegetales ricos en taninos obtenido de zonas semidesérticas, como la gobernadora (*Larrea tridentata*).

Tabla 2. Resumen de algunas características de la TAH microbiana producida por fermentación líquida y sólida.

Sistema de fermentación	Microorganismo	Punto isoeléctrico	Peso Molecular (Da)	pH Óptimo	Temperatura Óptima (°C)	Referencia
Líquido	A. flavus	—	194,000	5.0-5.5	50 – 60	Adachi y col., 1968
Líquido	<i>C. sp K-1</i>	—	—	6.0	50	Aoki y col., 1976
Líquido	<i>A. oryzae</i>	3.5 – 4.0	—	—	—	Beverini y Metche, 1990
Líquido	<i>A. niger</i>	4.3	186,000	6.0	35	Barthomeuf y col., 1994
Sólido	<i>A. niger</i> PKL-104	—	—	5.5	60	Lekha y Lonsane, 1994
Sólido	<i>A. niger</i> N888	3.8	165-kDa	6.0	70	García-Peña, 1999

3.3 GOBERNADORA.

3.3.1 Distribución geográfica.

La gobernadora es un arbusto muy común y se encuentra ampliamente distribuido en el desierto de Norteamérica (Benson y Darrow, 1954). En México, la gobernadora se encuentra localizada en los estados del Norte y se estima que cubre alrededor de 50 millones de hectáreas (González, 1969).

3.3.2 Características morfológicas de la planta.

Se ha observado que el tamaño de la gobernadora varía de un altura de 30 a 60 cm, con una cobertura un poco mayor que su altura. Una planta típica, en condiciones normales mide 45 cm, con una cobertura de 60 cm. Esta planta consiste aproximadamente 50 g, de hojas y tallos que representa alrededor de 3/10 de su peso total (Botkin, 1949). El nombre científico de la gobernadora es *Larrea tridentata*, cov., y pertenece a la familia de las *Zigophyllaceae*, arbusto xerófito de olor fuerte, con hoja persistente, compuestas de dos folículos oblongados unidos a la base de unos 5 a 10 mm, posee frutos de 5 carpelos densamente pilosos (De las Fuentes, 1970). Sus ramas crecen verticalmente u oblicuamente del tronco basal.

A medida que avanza la edad, el tronco se engruesa y el número de ramas aumenta. En plantas adultas el tronco es de 15 a 20 cm.

El follaje está en su mayor parte al final de las ramas y su color varía dependiendo de las condiciones climatológicas. En condiciones extremas de sequía pierde hasta un 80% del área foliar (Sherve, 1964). La fecundación se lleva a cabo por medio de insectos y sus frutos son arrastrados por los animales o por el viento (Wettstein, 1994).

3.3.3 Composición botánica de la gobernadora.

Botkin (1949) analizó la composición botánica de la gobernadora, expresándose en porcentaje del total para cada uno de los componentes en base seca como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición botánica de la gobernadora en base seca.

Parte de la planta,	Peso en g.	Total (%).
Troncos y ramas	180	54
Raíces	75	23
Hojas y ramitas verdes	50	23
Total	305	100

La gobernadora en América se le conoce con diversos nombres tales como: arbusto de cerosota, guamis, falsa alcaparra y hediondilla (Standley, 1961). El rango de adaptabilidad de la gobernadora es mayor que muchas otras plantas xerófitas (Sherve, 1964).

3.3.4 Composición química de la gobernadora.

La literatura reporta la concentración de cuatro componentes de la gobernadora, los cuales se muestran en la Tabla 4 (Duisberg, 1952; De las Fuentes, 1970; Lastra, 1970; Adams, 1970; Ortis, 1972).

Tabla 4. Composición química de la gobernadora.

Componente	Porcentaje.
-------------------	--------------------

Proteína.	15.8
Extracto etéreo.	3.1
Fibra cruda.	15.2
Cenizas.	12.7

3.4 PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS.

3.4.1 Cultivo en Medio Líquido.

Este método emergió en los años 30's, pero se desarrolló con una mejor técnica con el aumento de la industria de los antibióticos.

Mientras los cultivos sumergidos pueden ayudar a la producción celular, el objetivo es usualmente la formación de un producto obtenido por el crecimiento de microbios miceliales. El crecimiento es rápido al principio, notándose el crecimiento a las 24 horas. Este cultivo entonces es más lento dando una concentración de 10 a 30 g de materia por litro después de 5 a 7 días, cuando la fase estacionaria es usualmente alcanzada. El crecimiento entonces es escaso consistiendo de largas o pequeñas partículas o algún tipo de lodo con apariencia y un olor característico. La formación del producto comienza uno o tres días después de la inoculación y continúa por tres o cuatro días más, la cantidad de producto depende de la concentración de células, su actividad específica y su capacidad para formar producto (Aguilar, 1998).

Los componentes del medio son metabolizados en diferente medida, durante un largo período cuando estas condiciones son apropiadas para su crecimiento y metabolismo. Resultados óptimos dependen en gran medida de un inóculo óptimo y en trabajos industriales se le da mucha atención a esto, la producción de cultivos sumergidos puede aproximarse a la obtención de cultivo agitado (Aguilar, 1998).

Un medio químicamente definido puede ser usado para cultivos sumergidos, pero necesita un diseño cuidadoso para evitar fluctuaciones de pH o repentino agotamiento de otros componentes importantes. Estos medios usualmente tiene una base de sacarosa además de tartrato de amonio, fosfato,

sales metálicas, y factores adicionales son necesarios para su crecimiento como son extracto de levadura (1g/L) (Aguilar, 1998).

El tipo de recipiente usado y el tipo de agitación dependen de la naturaleza de la fermentación que se esté investigando. Los cultivos agitados usualmente son aplicados a procesos aerobios los cuales tienden a ser de dos tipos:

1.- Aquellos en los cuales se necesita una gran cantidad de oxígeno para producir una gran cantidad de células, esto es común en el caso de organismos filamentosos.

2.- Aquellos en los cuales las condiciones de aerobiosis son requeridas pero la cantidad de oxígeno necesitada es mucho menor, esto ocurre frecuentemente con las bacterias.

Para el primer tipo, pequeños volúmenes dan buenas tasas de transferencia de oxígeno, para el segundo tipo, volúmenes mayores de medio pueden ser usados con una tasa menor de agitación (Aguilar, 1998).

3.4.2 Cultivo en Medio Sólido.

Las enzimas extracelulares de origen microbiano pueden ser producidas por el cultivo en medio líquido o por el cultivo en medio sólido. Debido al gran desarrollo tecnológico que se generó alrededor de los procesos de cultivo en medio líquido a partir de la segunda guerra mundial, este tipo de cultivos desplazó a los cultivos en medios sólidos (principalmente en los países orientales). Sin embargo, en los últimos años se ha manifestado un gran interés por la utilización de los procesos de cultivos en medio sólido. Cabe mencionar que este interés ha sido el más notable en los países con bajo nivel de instrumentación biotecnológica y con serios problemas económicos, en los que proliferan ciertos sectores tecnológicos de tipo artesanal (Aguilar, 1998).

La concepción y desarrollo de procesos de cultivo en medio sólido no pretende desplazar los procesos de cultivo en medio líquido, se plantean como una opción para que ciertos sectores productivos, bien definidos, se valgan de ellos para la producción de materias primas necesarias para sus procesos, a

través de una utilización racional de los desechos generados en la propia industria (Aguilar, 1998).

La fermentación en medio de cultivo sólido es generalmente definida como el crecimiento de microorganismos en materiales sólidos, en ausencia de agua. El sustrato, sin embargo, debe contener bastante humedad. El desarrollo de la fermentación en cultivo en medio sólido fue iniciada e improvisada en la industria de la comida oriental y en la composta. También se ha comparado la fermentación en cultivo en medio sólido con la fermentación en cultivo en medio líquido (sumergido), por diferentes autores, describiendo sus ventajas y desventajas, (ver 3.4.3) Knapp y Howell (citados por Aguilar, 1998), revisaron la literatura de fermentación en cultivo medio sólido, el punto fundamental que observaron fueron los microorganismos y las complicadas enzimas microbianas, los procesos de fermentación en cultivo en medio sólido son usados comercialmente para la producción de diferentes tipos de alimentos fermentados, metabolitos de tipo fúngico y para la bioconversión de desechos orgánicos en productos útiles (Aguilar, 1998).

La fermentación en medio sólido, se basa principalmente en el tipo de microorganismo, estos procesos pueden ser categorizados dentro de dos principales grupos: 1).- Natural (individual); 2).- El ensilado y composteado, son dos de los mejores procesos de fermentación en cultivo medio sólido que son utilizados con microflora natural. Los medios puros son generalmente utilizados en procesos de fermentación en cultivo medio sólido industriales para mejorar el control de la utilización del sustrato y la formación de producto terminado. La bioconversión de residuos en la agricultura (paja, etc.) para biomasa fúngica (proteína) usando dos diferentes microorganismos, *Chaetomium cellulolyticum* y *Candida utilis*, es un ejemplo típico de medio mezclado en sistemas de fermentación en cultivo medio sólido. Naturalmente la fermentación en medio de cultivo sólido es frecuentemente portador externo por medios mixtos, en la cual varios microorganismos muestran un desarrollo y cooperación simbiótica (Aguilar, 1998).

3.4.3 Diferencias entre medio de cultivo sólido y líquido.

La fermentación en estado sólido presenta ventajas y desventajas en comparación con el proceso de fermentación en estado líquido, se dice que la primera no requiere de mucho control, es económica, con pocos gastos de energía, fácil de implementar y se obtienen altos rendimientos en la producción. Los costos se elevan en el proceso de extracción del producto final y en su purificación, ya que se requiere la aplicación de técnicas caras para reducir los volúmenes. La segunda es más costosa ya que su control es más sofisticado, la solubilidad de O_2 en el agua es poca, lo que hace necesario el uso de equipo para la agitación y la aireación forzada, con mayor necesidad de energía, además ocupa más espacio se debe evitar la contaminación por hongos y levaduras mediante técnicas de esterilización de aire y de los desechos, debido a que muchos metabolitos tales como antibióticos, se producen por un crecimiento lento en medios ricos que pueden ser contaminados. Las concentraciones de reactivos y productos son bajas, los procesos de recuperación son caros al igual que en el cultivo sólido lo que representa un factor en la economía total de ambos procesos (Aguilar, 1998).

Por otro lado, el cultivo en estado sólido parece tener ventajas teóricas sobre la fermentación en estado líquido respecto a los siguientes factores:

1. El bajo contenido de actividad de agua en la fermentación en estado sólido da ventajas ecológicas por el crecimiento lento de hongos, bacterias y levaduras reduciendo las necesidades de operaciones de esterilización.
2. El oxígeno no es factor limitante ya que es soluble en el aire, por lo que tendrá costos más bajos para el suministro de energía comparados en la fermentación en estado líquido (Aguilar, 1998).



Capítulo 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 EQUIPOS Y MATERIALES DE LABORATORIO.

Los equipos empleados en la presente investigación se muestra en la siguiente Tabla.

Tabla 5. Equipos de laboratorio utilizados en la investigación.

EQUIPOS	Marca	Modelo
Molino	–	–
Termobalanza	OHAUS	MB200
Estufa	THELCO	27
Mufla	LINDBERG	51894
Equipo Soxleth	–	–
Aparato de Reflujo	LABCONCO	
Aparato Kjeldhal	LABCONCO	42-01-341
Potenciómetro	CORNING	220
Parrilla Agitadora	THERMOLYNE	SP46925
Agitador Shaker	LAB-LINE	3589
Incubadora	NAPCO	322
Espectrofotómetro	CINTRA 5	C1017
Refrigerador	GE	RG-109-W
Congelador.	REVCO	VLT350-3-ABA
Vortex	GENE MIXER	K-550-5
Autoclave	ALL AMERICAN	25X - 1

Los materiales empleados en este trabajo de investigación son los siguientes: Tubos de ensaye, Gradillas, Matraces erlenmeyer, Vasos de precipitado, Probetas, Pipetas, Micropipetas, Mechero bunsen, Baño de hielo, Baño de ebullición, Mortero, Papel filtro # 5, Embudos, Anillos y Pisetas

4.2 MICROORGANISMO

Se utilizó la cepa de *Aspergillus niger* Aa-20 perteneciente a la colección de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y del Instituto de Investigación para el Desarrollo de Francia. La cepa fue almacenada a –20 grados centígrados y conservada en un medio crioprotector de glicerol-leche descremada.

4.3 ETAPA I. RECOLECCIÓN, TRANSFORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

4.3.1 Recolección de la materia prima.

Se recolectó la planta de gobernadora (*Larrea tridentata*) a 4 kilómetros de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro a los costados de la carretera Saltillo-Zacatecas, municipio el Derramadero.

4.3.2 Deshidratación de las muestras.

Se separaron las hojas de las plantas y estas se secaron en estufa a 55 °C por 24 horas, posteriormente se sometieron a molienda, la muestra molida se tamizó en diferentes mallas, de las cuales el lote comprendido entre 50 y 80 μ fue el más abundante y este se utilizó para la investigación.

4.3.3 Caracterización fisicoquímica del polvo de gobernadora.

4.3.3.1 Potencial de hidrógeno

Se determinó utilizando el método potenciométrico, el cual consiste en colocar 1 g de muestra seca en polvo en 10 ml de agua, agitar durante 10 min y tomar lectura a temperatura ambiente (AOAC, 1980).

4.3.3.2 Humedad

La humedad se estimó utilizando una Termobalanza colocando 1g de muestra a una temperatura de 80 °C por 60 minutos (AOAC, 1980).

4.3.3.3 Sólidos totales

El contenido de sólidos totales se evaluó simultáneamente a la evaluación de contenido de humedad (AOAC, 1980).

4.3.3.4 Proteínas.

La concentración de proteínas se determinó por el método Bradford. Consiste en colocar en tubos de ensaye soluciones de proteína que contenga de 10 a 100 mg de proteína, ajustar el volumen a 0.1 ml con el Buffer apropiado, agregar 1 ml de reactivo de Azul Brillante de Coomasie G-250 preparado adecuadamente, mezclar en vortex y leer a 595 nm después de 2 minutos de agregar el colorante y antes de una hora de iniciada la reacción (Bradford, 1976).

4.3.3.5 Azúcares totales.

El contenido de azúcares totales fue evaluado espectrofotométricamente con el método de Fenol Sulfúrico (Dubois y col., 1956). Se coloca 1 ml de muestra en un tubo de ensaye, añadir 2 ml de fenol sulfúrico lentamente por las paredes, colocar en baño de hielo haciendo una rápida agitación, poner en baño de ebullición durante 5 minutos, enfriar a temperatura ambiente y leer a 480nm.

4.3.3.6 Azúcares reductores.

Se cuantificó por espectrofotometría mediante el método de DNS (Miller, 1959) que consiste en colocar 0.5 ml de muestra en un tubo de ensaye, añadir 0.5 ml de reactivo DNS, colocar en baño de ebullición durante 5 minutos y en baño de hielo por 2 minutos, añadir 5 ml de agua destilada y leer a 540 nm.

4.3.3.7 Azúcares no reductores.

Se obtuvo mediante la sustracción de los azúcares totales y reductores.

4.3.3.8 Grasas

Para esta determinación se utilizó el sistema Soxleth (AOAC 1980)

Consiste en llevar el matraz bola a peso constante con 3-4 perlas de ebullición, colocar 5 g de muestra en un dedal, pasarlo al sifón, fijar éste al condensador de extracción (refrigerante), agregar 200 ml de solvente al matraz, conectar al sifón, llevar al reflujo por 8 horas o más, recuperar el solvente y pesar.

4.3.3.9 Fibra cruda

Se cuantificó por el método gravimétrico (AOAC 1980).

Este método consiste en:

Digestión ácida.

Colocar 2 g de muestra desgrasada en un vaso de Berseleus, agregar ácido sulfúrico 0.255N, llevar a ebullición durante 30 minutos, filtrar en una tela de lino haciendo lavados con agua destilada caliente hasta eliminar el ácido.

Digestión alcalina.

Transferir los sólidos retenidos al vaso de Berseleus, añadir 200ml de NaOH 0.313N, poner a ebullición por 30 minutos, filtrar, hacer tres lavados con agua destilada caliente y realizar un lavado con 25 ml de alcohol 95%.

Secado y calcinación.

Recoger los sólidos retenidos en un crisol, secar a 130 °C por 12 horas, enfriar en un desecador, pesar, calcinar a 600 °C por 30 minutos, enfriar y pesar.

4.3.3.10 Cenizas.

Se estimó mediante el método de Mineralización por vía seca (AOAC 1980).

Consiste en colocar 2 g de muestra seca en un crisol a peso constante, incinerar en un mechero, introducir en la mufla a 600 °C durante una noche o el tiempo necesario y llevar a peso constante.

4.3.3.11 Cuantificación de fenoles totales o polifenoles.

Para esta determinación se llevó a cabo primero la extracción de taninos hidrolizables y condensados.

Extracción de taninos con agua. (Schofield y col, 2001)

Reflujar por 12 horas 5 g de muestra en 20 ml de agua a 60 °C (relación 1:4 p/v), centrifugar a 2500 rpm durante 10 minutos, colocar el sobrenadante en un tubo, cuantificar los taninos (ácido gálico) por el método de Folin Ciocalteu.

Extracción de taninos con acetona. (Schofield y col, 2001)

Reflujar por 12 horas 5 g de muestra en 20 ml de acetona al 70%, centrifugar a 2500 rpm durante 10 minutos, colocar el sobrenadante en un tubo, cuantificar los taninos (catequina) por el método de Folin Ciocalteu.

Metodología de Folin Ciocalteu (Waterman y Mole, 1994)

Colocar en un tubo 0.8 ml del extracto de taninos, añadir 0.8 ml de reactivo de Folin Ciocalteu, agitar, dejar reposar durante 5 minutos, agregar 0.8 ml de Na₂ CO₃ 0.01M, dejar reposar la mezcla durante 1 minuto y leer a 750 nm.

4.4 ETAPA II. PROPAGACIÓN Y CONTEO DE ESPORAS, FERMENTACIONES Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

4.4.1 Propagación de esporas.

El medio 1 (Tabla 6) se inoculó con esporas de *A. niger* Aa-20 almacenado a -20 ° C y conservado en un medio crioprotector de glicerol-leche descremada.

Los matraces se incubaron a 30 ° C por 3 a 5 días y las esporas formadas se cosecharon con 30 a 40ml de Tween 80 estéril al 0.05% agitando en una parilla magnética con un magneto estéril.

Tabla 6. Medios de cultivo, basado en la composición reportada por Kar y Barnerjee (2000).

Componente	Medio para producción de inóculos (%)	Medio para ensayo de la actividad tanasa (%)	Medio para producción de tanasa (%)
NaNO ₃	-	0.25	0.25
KH ₂ PO ₄	-	0.10	0.10
Mg SO ₄	-	0.05	0.05
KCl	-	0.05	0.05
Polvo de gobernadora	-	-	FML (5) FMS (30)
Agar Papa y Dextrosa	2.34g/60ml	-	-
PH	5.6	5.5	5.5
Acido tánico	-	2.0	-

4.4.2 Conteo de esporas.

De la suspensión de esporas obtenida se realizó una dilución 1:20 (se lleva al vortex) para facilitar el conteo. A una cámara de Neubauer limpia, se le añade una pequeña gota de la dilución llevada al vortex, se enfoca en el objetivo de 10 y se localiza la cuadrilla, posteriormente se lleva al objetivo de 40 y se cuentan 13 cuadros de los 25 existentes.

La ecuación para obtener el número de esporas/ml de suspensión es:

$$(\text{Promedio}) (25) (1 \times 10^4) (\text{Dilución}) = \text{Número de esporas} / \text{ml.}$$

4.4.3 Fermentación en medio líquido.

Se llevó a cabo cinéticas de producción de la enzima tanasa, empleando Matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio 3 (tabla 6). Se evaluó una concentración de la fuente de sustrato de 5% (pv). Cada Matraz se inoculó a un nivel de 5×10^6 esporas puras y se incubaron a 30°C en agitación constante durante un periodo de 60 horas con muestras en intervalos de 10 horas. Cada corrida experimental se llevó a cabo por duplicado. La actividad tanasa extracelular se evaluó del sobrenadante obtenido al filtrar cada matraz. Los sólidos retenidos se lavaron con solución fisiológica (tres lavados), se congelaron y se pulverizaron en un mortero y la enzima fue resuspendido con Buffer de acetatos pH 5.5 (0.5M) y se filtró, el sobrenadante se usó para evaluar la actividad intracelular.

4.4.4 Fermentación en medio sólido.

Se llevó a cabo cinéticas de producción de enzima tanasa empleando Matraces Erlenmeyer de 250 ml con 10 ml de medio 3 (tabla 6). Se evaluó una concentración de la fuente de sustrato de 30% (p/v). Cada matraz se inoculó a un nivel de 2×10^7 esporas puras por cada g de soporte seco y se incubaron a 30°C durante un periodo de 60 horas con muestras en intervalos de 10 horas. Cada corrida experimental se llevó a cabo por duplicado. A cada matraz se le agregó 43 ml de agua destilada y se llevó al vortex durante 2 minutos. La actividad tanasa extracelular se evaluó del sobrenadante obtenido al filtrar cada matraz, los sólidos retenidos se lavaron con solución fisiológica (tres lavados), se congelaron y se pulverizaron en un mortero y la enzima fue resuspendida con Buffer de acetatos pH 5.5 (0.5 M) y se filtró, el sobrenadante se usó para evaluar la actividad intracelular.

4.4.5 Evaluación de la actividad enzimática.

Para esta determinación se utilizó el método espectrofotométrico reportado por Sharma y col., 2000.

Soluciones:

A) Sustrato: Metil galato 0.01 ml en buffer de citratos 0.05 ml a pH 5.0

B) Buffer ----- 10 ml 0.184g / 10ml.

C) Extracto enzimático.

Se incubaron las tres soluciones a 30 ° C durante 5-10 minutos. Se etiquetaron tres tubos (blanco, muestra y control). A los tres tubos se le añadió 0.25 ml de (A), 0.25 ml de (B) al tubo blanco y 0.25 ml de (C) al tubo muestra y se incubaron a 30 ° C durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo se añadió 0.3 ml de rodanina en metanol (0.67 %) a los tres tubos y también se agregó 0.2 ml de KOH (0.5 N) a los tres tubos y se incubaron a 30 ° C durante 5 minutos.

Después de la incubación se añadieron 0.25 ml de (C) al tubo control y se agregó 4 ml de agua destilada a los tres tubos y se incubaron nuevamente a 30 ° C por 10 minutos. Se tomó la lectura a 520 nm y se tomó como blanco el agua.

4.5 ETAPA III. EVOLUCIÓN DEL pH, COSUMO DE SUSTRATOS (AZÚCARES TOTALES Y FENOLES TOTALES).

Para llevar a acabo estas determinaciones se realizó primeramente la metodología de la segunda etapa a excepción de la evaluación de la actividad enzimática.

4.5.1 Evolución del Potencial de hidrógeno.

Esta determinación se realizó por el método potenciométrico del sobrenadante obtenido al filtrar cada matraz (AOAC, 1980)

4.5.2 Cuantificación de Azúcares totales.

El contenido de azúcares totales se determinó por el método de Fenol Sulfúrico (Dubois, 1956) descrito en la segunda etapa.

4.5.3 Cuantificación de Fenoles totales.

Los fenoles totales se estimaron utilizando el método de Folin Ciocalteu (Waterman y Mole, 1994) descrito en la segunda etapa.



Capítulo 5

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos en esta investigación se analizaron estadísticamente utilizando la media aritmética y desviación estándar.

5.1 COMPOSICIÓN FISICOQUÍMICA DEL POLVO DE GOBERNADORA.

La literatura únicamente reporta la concentración de cuatro componentes químicos como se indican en la Tabla 4. Estos datos concuerdan con los obtenidos en esta investigación, a excepción de la concentración de proteínas como se puede apreciar en la Tabla 7, que muestra los resultados de la composición físico-química de la gobernadora, esta discrepancia puede ser debida al método utilizado para la determinación de este parámetro, el cual no cuantifica los compuestos de nitrógeno no proteico.

Tabla 7. Composición fisicoquímica de la gobernadora.

Componente.	Porcentaje.
Humedad.	5
Sólidos totales.	95
Azúcares reductores.	1.9
Azúcares no reductores.	12
Proteínas.	0.01
Lípidos.	3.4
Fibra cruda.	12.3
Cenizas.	10.7
Taninos condensados	39.04
Taninos hidrolizables.	22.8
Total	91.54

Estos resultados muestran que la gobernadora tiene ventajas considerables en su utilización como fuente de carbono y energía para la producción de la enzima tanasa por su alto contenido de taninos hidrolizables, ya que estas moléculas inducen la síntesis enzimática de la tanasa, así mismo pudiera ser que esta enzima sea producida en la presencia de los taninos condensados.

Por otra parte, la desventaja que puede presentarse al utilizarse la gobernadora para la producción de la enzima tanasa es el contenido de azúcares totales, siendo éstos, los compuestos de fácil asimilación para los microorganismos por su peso molecular bajo.

5.2 ACTIVIDAD MÁXIMA DE TANASA EXTRACELULAR E INTRACELULAR OBTENIDA EN FERMENTACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO.

Los resultados obtenidos en esta investigación se presentan en la Tabla 8. en donde se muestra que la máxima actividad tanasa extracelular, se obtiene en un tiempo de fermentación de 64 horas y 30 minutos con un valor de 276.7 U/L, esto coincide con la investigación llevada a cabo por Aguilar y col.,

(2001a), utilizando la misma cepa fúngica y ácido tánico a una concentración de 50 g/L como fuente de carbono y energía, en donde obtienen una actividad máxima de tanasa extracelular de 2500 U/L en un tiempo de fermentación mayor de 40 horas, mientras que la actividad tanasa intracelular fue de 250 U/L, siendo 10 veces mayor la actividad tanasa extracelular.

Sin embargo al comparar los valores de actividad tanasa tanto extra como intracelular obtenidos en esta investigación con los resultados mencionados por otros autores, podemos observar que los títulos de actividad tanasa obtenidas son bajos.

Observamos similar comparación con lo reportado por Seht y Chand (2000) en donde utilizaron la cepa de *Aspergillus awamori* en su investigación y una concentración de 35 g/L de ácido tánico como fuente de carbono y energía, obteniendo los niveles más altos de actividad tanasa intracelular de 5497.2 U/L en un tiempo de fermentación de 60 horas.

Tabla 8. Actividad máxima de tanasa extracelular e intracelular en fermentación en medio líquido.

Tiempo (h)	Extracelular (U/L)	Intracelular (U/L)
64.5	276.9	N. D.

N. D. : No Detectada.

Las diferencias entre los valores obtenidos de actividad tanasa en esta investigación en comparación a otros estudios, se deben al sistema utilizado, la composición del medio y las condiciones de cultivo. Los resultados reportados en la literatura, son obtenidos bajo sistemas modelos de fermentación a diferencia de lo reportado por Kar y Banerjee (2000), en donde utilizan la cepa *Rizopus oryzae* y el gilo (*C. digyna*) a una concentración de 10% (pv) como única fuente de carbono y energía, obteniendo una máxima actividad tanasa extracelular de 23.86 U/ml en un tiempo de 48 horas de fermentación.

5.3 ACTIVIDAD MÁXIMA DE TANASA EXTRACELULAR E INTRACELULAR OBTENIDA EN FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO.

En la Tabla 9, se presentan los resultados de la actividad máxima de tanasa extracelular e intracelular en fermentación en medio sólido, en donde podemos notar que la máxima actividad tanasa extracelular es de 434.3 U/L, obtenida en un tiempo de 51 horas y 30 minutos, además la actividad máxima de tanasa intracelular fue de 165.5 U/L en un tiempo igual de fermentación, obteniéndose 2.5 veces más de actividad tanasa extracelular, esto concuerda con lo reportado por Aguilar y Col., (2001a), en donde obtienen 1.5 veces mas actividad tanasa extracelular que intracelular, con valores de 11500 U/L y 7000 U/L respectivamente en un tiempo de 50 horas, utilizando la misma cepa fúngica y ácido tánico a una concentración de 50 g/L.

Pero comparando los valores obtenidos en esta investigación con los reportados por Aguilar y col., (2001a) los valores son bajos. Igualmente al compararlos con los resultados obtenidos en una investigación llevada a cabo por Kar y Barnerjee (2000), en donde reportan 18.0 U/ml de actividad tanasa extracelular en un tiempo de fermentación de 72 horas, los valores obtenidos en esta investigación son bajos.

Tabla 9. Actividad máxima de tanasa extracelular e intracelular en fermentación en medio sólido.

Tiempo (h)	Extracelular (U/L)	Intracelular (U/L)
-------------------	---------------------------	---------------------------

51.5	434.3	165.1
------	-------	-------

Los títulos bajos de actividad tanasa obtenidos en la presente investigación, se relaciona con el tipo de sistema utilizado, siendo las condiciones y la composición del medio igual que en el sistema de fermentación sumergida, mientras que los valores reportados en la literatura son obtenidos utilizando sistemas modelos.

5.4 EVOLUCIÓN DEL pH EN FERMENTACIÓN EN MEDIO LIQUIDO Y EN MEDIO SÓLIDO

En los sistemas de fermentación el potencial de hidrógeno desempeña una función muy importante, ya que la actividad enzimática se expresa mejor cuando este factor es el óptimo en el medio de fermentación. La estabilidad al potencial de hidrógeno de la enzima tanasa se encuentra en un rango de 3.5 a 8.0 y posee un pH óptimo de 5.5 a 6.0.

La Figura 2 muestra el comportamiento de este factor en fermentación en medio líquido, el cual se mantuvo entre 5.5-5.2, mientras que en la fermentación en medio sólido el rango fue de 5.7-5.9 como se ilustra en la

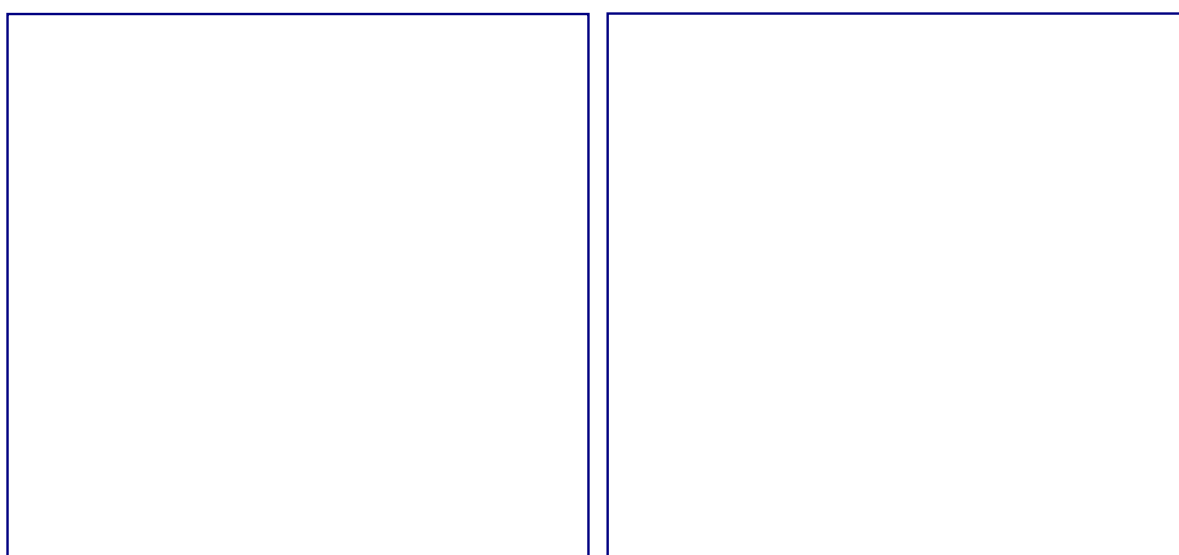


Figura 3.

Figura 2. Evolución del pH en fermentación en medio líquido.

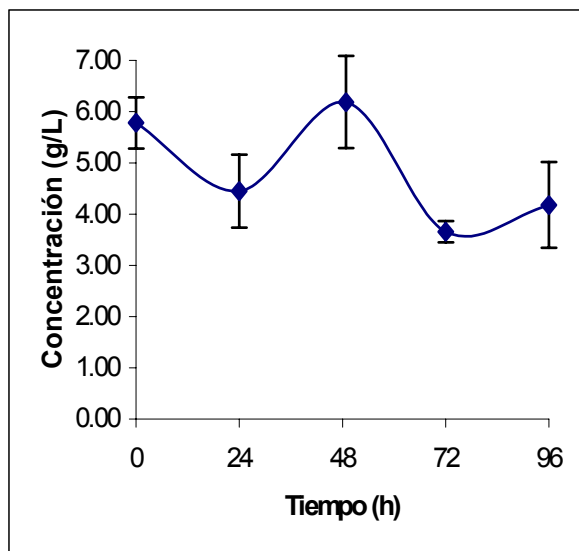
Figura 3. Evolución del pH en fermentación en medio sólido.

El comportamiento de pH en esta investigación en ambas fermentaciones concuerda con lo reportado por Kar y Barnerjee (2000), en donde obtienen que el rango de pH para la producción de la enzima tanasa es de 3.0-6.5 , tanto en fermentación en medio líquido como en medio sólido, por lo tanto el rango en el que se mantiene el pH en esta investigación en ambas fermentaciones se encuentra dentro del óptimo.

Por otra parte en una investigación llevada por Seth y Chand (2000), reportan que la mayor síntesis enzimática de la tanasa, se favorece a pH 5.0, al igual que lo reportado por Barnerjee y col., (2001) al obtener una mayor actividad tanasa a un pH 5.0 tanto extracelular como intracelular.

5.5 CONSUMO DE SUSTRATO (AZÚCARES TOTALES) EN FERMENTACIÓN EN MEDIO LIQUIDO Y EN MEDIO SÓLIDO.

La fuente de energía inmediata para el desarrollo de los microorganismos en los sistemas de fermentación es a través de los compuestos de bajo peso molecular, posteriormente los compuestos de peso molecular alto. En la Figura 4 se observa el consumo de los azúcares totales en un tiempo de 24 horas en fermentación en medio líquido y un mayor consumo a las 72 horas, sin embargo en la fermentación en medio sólido el consumo de azúcares totales fue mayor en un tiempo también de 24 horas como se muestra en la Figura 5, pero la degradación de este compuesto se



mantiene igual a las 72 horas.

Figura 4. Consumo de azúcares totales (g/L)
en fermentación en medio líquido.

en fermentación en medio líquido.
sólido.

Fig. 5 Consumo de

en fermentación en medio

El mayor consumo de azúcares totales en el sistema de fermentación en medio sólido, se asocia a las condiciones estáticas de cultivo, ya que los hongos degradan los compuestos disponibles más inmediatos, a diferencia de la fermentación en medio líquido la agitación le permite al microorganismo la posibilidad de degradar otros nutrientes presentes en el medio.

5.6 CONSUMO DE SUTRATO (CATEQUINA) EN FERMENTACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO Y EN MEDIO SÓLIDO.

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran los niveles más altos de degradación de la catequina en fermentación en medio líquido en un tiempo de 24 horas como se ilustra en la Figura 6, posteriormente los niveles de consumo son relativamente bajos hasta la etapa final, mientras que en el sistema de fermentación en medio sólido se observa que la degradación de la catequina fue mucho mayor en un tiempo igual y los niveles de consumo posteriores son relativamente más altos que en fermentación en medio líquido como se presenta en la Figura 7.

Esta observación concuerda con lo reportado por Belmares y col., (2002), al obtener una producción de la enzima tanasa de 445 U/L en un tiempo de fermentación de 24 horas, utilizando un tanino condensado (catequina) como única fuente de carbono y energía para el microorganismo.

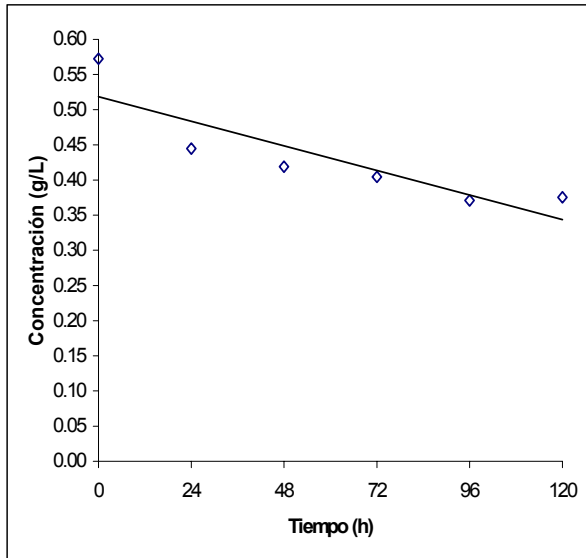


Figura 6. Consumo de catequina (g/L) en fermentación en medio líquido.

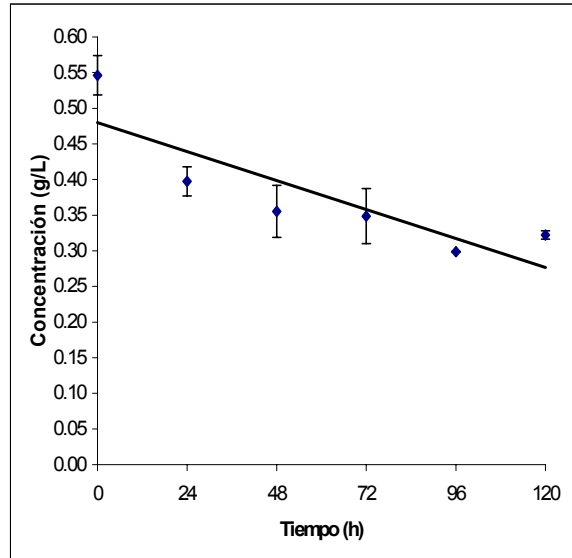


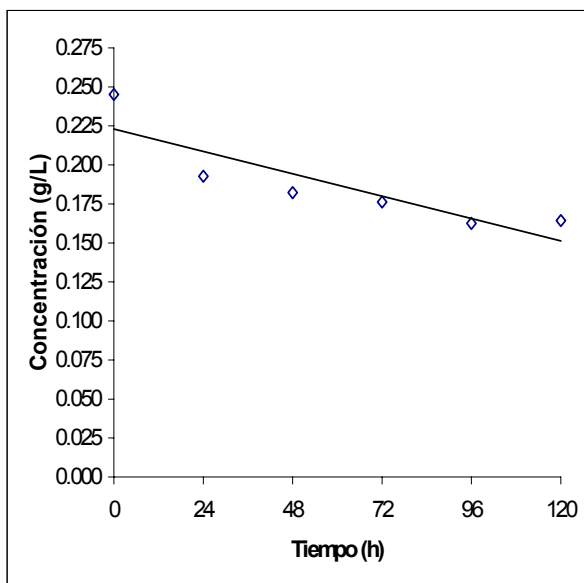
Figura 7. Consumo de catequina (g/L) en fermentación en medio sólido.

Estos resultados indican que la enzima tanasa no solamente degrada los taninos hidrolizables. Se ha reportado que la enzima tanasa puede hidrolizar otro tipo de sustratos (Ramirez-Coronel, 2000).

La degradación de la catequina en el sistema de fermentación en medio líquido disminuyó de 0.57 g/L a 0.44 g/L en un tiempo de 24 horas y a las 96 horas fue de 0.37 g/L, por lo tanto el porcentaje de consumo total de este sustrato fue de 36 %, mientras que en fermentación en medio sólido la degradación decreció de 0.55 g/L a 0.40 g/L en 24 horas y 0.30 g/L en 96 horas, teniendo 45 % del consumo total.

5.7 CONSUMO DE SUSTRATO (ACIDO GÁLICO) EN FERMENTACIÓN EN MEDIO LIQUIDO Y MEDIO SÓLIDO.

Los resultados mostrados en las Figuras 8 y 9 son valores obtenidos del consumo de ácido gálico en fermentación en medio líquido y en fermentación en medio sólido. En la Figura 8 se muestra una mayor degradación del sustrato en un tiempo de 24 horas, disminuyendo relativamente durante el resto de la fermentación. La degradación de este compuesto en el sistema de fermentación en medio sólido se presenta de forma similar, pero es mayor el consumo del ácido gálico como se presenta en la Figura 9. Esto se debe a la disponibilidad de este compuesto para el microorganismo por las condiciones estáticas de cultivo, similarmente se obtiene una mayor producción de enzima



tanasa en este sistema.

Figura 8. Consumo de ácido gálico (g/L) en fermentación en medio líquido.

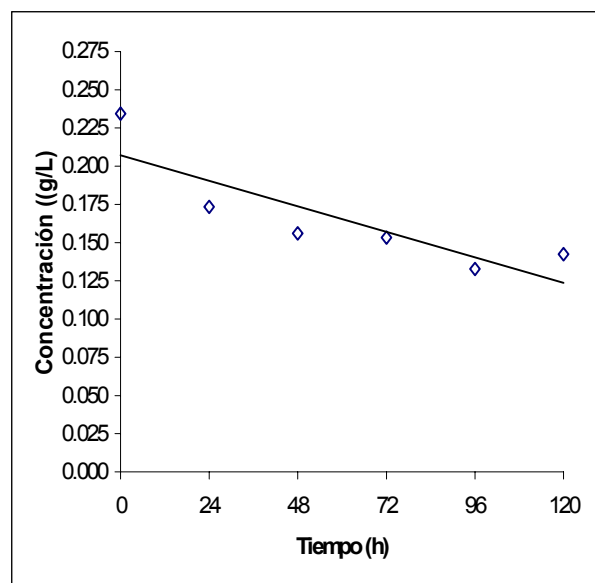


Figura 9. Consumo de ácido gálico (g/L) en fermentación en medio sólido.

Los resultados obtenidos de la degradación de ácido gálico en esta etapa de la investigación eran los esperados, ya que los taninos hidrolizables inducen la síntesis de la enzima tanasa, esta enzima hidroliza los enlaces

éster presentes en las moléculas de los taninos hidrolizables y de los esteres de ácido gálico (Lekha y Lonsane, 1997).

Por otro lado tenemos el consumo de ácido gálico en fermentación en medio líquido, éste disminuyó de 0.245 g/L a 0.193 g/L en 24 horas y 0.162 g/L en un tiempo de 96 horas, por consiguiente el porcentaje de degradación de este sustrato fue de 34 %, sin embargo el consumo en fermentación en medio sólido descendió de 0.234 g/L a 0.173 g/L a las 24 horas y en 96 horas fue de 0.133 g/L, en donde tenemos un consumo total de 43.2 %.



Capítulo 6

CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados y los resultados obtenidos en la presente investigación se puede establecer las siguientes conclusiones:

La planta gobernadora es una buena fuente de carbono, energía e inductor para la producción de la enzima tanasa en sistemas de fermentación en medio líquido y en medio sólido.

La producción de la enzima tanasa es mayor en Cultivo Sólido , que en Cultivo Líquido, tanto a nivel intra y extracelular (165.1 y 434.3, y 0.0 y 276.9 U/L respectivamente).

La degradación de taninos hidrolizables y taninos condensados fue mayor en el sistema de fermentación en medio sólido.

El sistema microbiano fúngico en cultivo sólido sobre residuos de gobernadora es una atractiva alternativa para la producción de tanasa la cual se obtiene en una relación de 2.7 extracelular que intracelular.



Capítulo 7

RECOMENDACIONES

Considerando los resultados obtenidos en la presente investigación, se recomienda evaluar el efecto de diferentes concentraciones de gobernadora sobre el metabolismo fúngico de *Aspergillus* y especialmente sobre la biodegradación de taninos condensados e hidrolizables.

Emplear otras cepas fúngicas para la obtención de la enzima tanasa, utilizar el medio Czapek-Dox modificado suplementado con polvo de gobernadora y poner especial atención en las condiciones de fermentación en medio líquido y medio sólido.



Capítulo 8

LITERATURA CITADA

Adachi O., M. Watanabe.and H. Yamada (1968). Studies on fungal tannase Part.II.Agricultural and Biological Chemistry 32 :1079 –1085.

Adams, D.W. 1970. A study of the possibilities of treating creosotebush with NaOH to make a good livestock feed. Alpine (Texas). Tesis presentada al Consejo de Graduados de Sul Ross State College.

Adachi O., M.Watanabe and H. Yamada (1971). Physicochemical properties of the tannase from *Aspergillus flavus*. *Agricultural and Biological Chemistry* 32 :1079 –1085.

Aoki K., R. Shinke and H. Nishira (1976). Purification and some properties of yeast tannase. *Agricultural and Biological Chemistry* 40 :79 –85.

AOAC (1980). *Methods of Analysis Association of Official Analytical Chemists*, Ed. William Horwitz.

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

Aguilar C. N., C. Augur, E. Favela and G. Viniegra-González (1999a). Effect of the gallic and tannic acids on tannase production from *Aspergillus niger* Aa-20. In: *Memorias del IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería*. Huatulco, Oax, México. pp.14.

Aguilar C. N., C. Augur, E. Favela and G. Viniegra-González (1999b). A comparison of methods to determine tannin acyl hydrolase activity. *Archives of Biology and Technology* 42 :355 –361.

Aguilar C. N., C. Augur, E. Favela and G. Viniegra-González (1999c). Production of fungal tannase by liquid and solid cultures. In: *Memorias del IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería* . Huatulco, Oax, México. pp.14.

Aguilar, C. N., C. Augur, E. Favela and G. Viniegra-González (2001a). 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 Biotecnology* 26: 296-302.

Aguilar, C. N. and G. Gutiérrez-Sánchez (2001b). Review: Sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. *Food Science and Technology International* 5: 373-382.

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

Botkin, C. W., and P. C. Duisberg, (1949). The Nordihydroguajaretic Acid Content of the Creosotebush. *Bulletin*, 349, New México State College. 15 p.

Benson, L. and R. A. Darrow (1954). The trees and shrubs of the south and western Deserts. Alburquerque (New México), The University of New México Press p.25.

Begovic S. and E. Duzic (1976). *Vetenaria* 25: 421–428. In: Lekha P. and Lonsane B. (1997). Production and application of tannin acyl hydrolase:state of the art. *Advances Applied Microbiology* 44 :215 –260.

Begovic S. and E. Duzic (1977). *Vetenaria* 26: 227 –233. In: Lekha P. and Lonsane B. (1997). Production and application of tannin acyl hydrolase:state of the art. *Advances Applied Microbiology* 44: 215 –260.

Beverini M. (1987). Title?. PhD Thesis. Institut National Polytechnique. Nancy France. M. Beverini and M. Metche (1990). Identification, purification and physicochemical properties of tannase of *Aspergillus oryzae*. *Science of Aliments* 10 :807 –816.

Beverini M. and M. Metche (1990). Identification, purification and physicochemical properties of tannase of *Aspergillus oryzae*. *Science of Aliments* 10: 807 –816.

Barthomeuf C., F. Regeat and H. Pourrat (1994a). Production, purification and characterization of a tannase from *Aspergillus niger* LCF 8. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 77 (3):137 –142.

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.

Bajpai B. and S. Patil (1997). Induction of tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity in some members of fungi imperfecti. *Enzyme Microbial Technology* 20: 612 –614.

Bradoo S., R. Gupta and R.K. Saxena (1997). Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tannase from *Aspergillus japonicus*. *Process Biochemistry* 32: 135 –139.

Banerjee, D., C.M. Keshab and R.P. Bikas (2001). Production and characterization of extracellular and intracellular tannase from newly isolated *Aspergillus aculeatus* DBF 9. *J. Basic Microbiol.* 41, 6, 313-318.

Belmares, C. (2002). Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de tanasa por especies de *Aspergillus niger*. Tesis de nivel Licenciatura. Universidad Autónoma de Coahuila. México.

Coggon P., N. Graham and G. Syerson (1975). Cold water-soluble tea .UK Patent 2,610,533.

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

Chen T. (1969). The induction of tannase in *Aspergillus niger* . PhD. Thesis, University of California, Berkeley, USA.

Chatterjee R., A. Dutta, R. Banerjee and M. Bhattacharya (1996). Production of tannase by solid state fermentation. *Bioprocess Engineering* 14 :159 –162.

Deschamps A., G. Otuk and J. Lebeault (1983). Production of tannase and degradation of chestnut tannin by bacteria. *Journal of Fermentation Technology* 61 : 55 –59.

Doi S., A. Shinmyo, T. Enatsu and G. Terui (1973). Growth-associated production of tannase by a strain of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Fermentation Technology* 51: 768 –774.

Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers y F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugar relates substances. *Anal. Chem.* 28:(3) 350-356.

Diusberg, P. C. (1952) Development of a Feed from the Creosotebush and the determination of its Nutritive Value. *J. Of Animals Science*. Vol., 11: 174-180.

De las Fuentes, V., 1970. Utilización de la gobernadora (*Larrea tridentata*, cov.) como forraje en comparación con alfalfa (*Medicago sativa* L.). Monterrey, I.T.E.S.M. Tesis 41 p.

Freudenberg K., F. Bummel, and T. Frank (1927). Tannin acyl hydrolase. *Zeitschrift fur Physiologische Chemie* 164: 262 –270.

Farias G.M., C. Gorbea, J.R. Elkins and G.J. Griffin (1994). Purification, characterization and substrate relationships of the tannase from *Cryphonectria parasitica*. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 44: 51 –63.

García-Peña, I., C. Augur, E. Favela-Torres, (1999). Purificación parcial de la tanasa producida por *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido. En: *Avances en Purificación y Aplicación de Enzimas en Biotecnología* (Prado, A., Huerta, S., Rodríguez, G., Saucedo, G. Eds.) pp. 247-261. México. Ediciones UAM-Iztapalapa.

Goodwin, T. and E. Mercer (1983). Introduction to Plant Biochemistry. Vol 1. New York. Pergamon. pp. 529–566.

George, E. and S. Sen, (1960). Bulletin of Central Leather Research Institute 6: 421–428.

Golden, T. and T.A. Hatton, (1987). Separation Science and Technology 22: 831 –841.

Grovenco, S. and F. Vergegehém, (1987). Enzyme and Microbiology and Technology 22: 470 –473.

García-Peña, I. (1996). Producción, purificación y caracterización de tanasa producida por *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido. M.Sc. Thesis. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. México.

Gupta R., S. Bradoo, and E. K. Saxena, (1997). Rapid purification of extracellular tannase using polyethylene glycol-tannic acid complex. Letters in Applied Microbiology 24: 253 –255.

González, M. H. (1969). Ecología y Distribución de la gobernadora. Sumario de la Conferencia sobre Gobernadora (*Larrea tridentata*). Sul Ross State College, Alpine Texas. P., 9.

Haworth R., K. Jones and H. Rogers (1958). Ion-exchange chromatography of *Aspergillus niger* extract. Proceedings of the Chemical Society Vol?: 8 –9.

Haslam, E., R. Haworth, K. Jones and H. Rogers (1961). Gallotannins. Part I. The fractionation of tannase. Journal of the Chemical Society Vol?: 1829 –1835.

Haslam, E. and J. Stangroom (1966). The esterase and depsidase activities of tannase. Biochemistry 99: 28 –31.

Haslam, E. and R. Tanner (1970). Spectrophotometric assay of tannase. Phytochemistry 90: 2305 –2309.

Hadi, T.A. (1994). M. Tech. Thesis, IIT Kharagpur.

Jean, D., H. Pourrat, A. Pourrat and A. Carnat, (1981). Assay of tannase (tannin acylhydrolase EC 3.1.1.20) by gas chromatography. Analytical Biochemistry 110: 369 –372.

Kar, B. and R. Barnerjee (2000). Biosynthesis of tannin acyl hidrolase from tannin-rich forest residue under different fermentation conditions. J. of Industrial Microbiology and Biotechnology. 25: 29-38.

Knudson, L. (1913). Journal of Biological and Chemistry 14: 159 –207.

Lekha, P. and B. Lonsane (1997). Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. Advances Applied and Microbiology 44: 215 –260.

Libuchi, S., Y. Monida and K. Yamada (1967). Studies on tannin acylhydrolase of microorganisms Part III. Purification of enzyme and some properties of it. Agricultural and Biological Chemistry 32: 803 –809.

Libuchi, S., Y. Minoda and K. Yamada (1972). Hydrolyzing pathway, substrate specificity and inhibition of tannin acyl hydrolase. *Agricultural and Biological Chemistry* 36: 1553 –1568.

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

Lastra, N. 1970. La gobernadora (*Larrea tridentata*, cov.). Procesada como forraje para caprinos. Monterrey. I.T.E.S.M. Tesis. p., 61.

Miller, G. L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31:426-428.

Madhavakrishna, W., S. Bose, and Y. Nayudamma (1960). Estimation of tannase and certain oxidising enzymes in Indian vegetables tanstuffs. *Bulletin of Central Leather Research Institute* 7: 1 –11.

Nishira, H. and M. Joslyn (1968). *Phytochemistry* 7: 2147 –2156.

Nierenstein, M. (1930). *Nature* 125: 348 –342.

Nishira, H. and N. Mugibayashi (1953). Tannin decomposing enzyme of molds. XI Formation of tannase by various molds on wheat branmedium. *Hyogo, Noka, Diagaku, Kenkyu, Hokoku, Nogeikagaku, Hen 4* :113 –116.

Nishira, H. (1961). *Hakko Kogaku Zasshi* 39: 137 –146.

Ortiz, C. 1972. Procesado de la planta de gobernadora (*Larrea tridentata*, cov.) con cal Ca(OH)_2 para posibles usos en alimentación del ganado. Monterrey, I.T.E.S.M. Tesis. p., 51.

Osawa, R. and T.P Walsh. (1993). Visual reading method for detection of bacterial tannase. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 1251 –1252.

Parmentier, F. (1970). *Archives Internationales de Physiologie et de Biochemie* 78: 131 –133.

Pourrat, H., F. Regerat, A. Pourrat and D. Jean (1985). Production of gallic acid from taratannin by a strain of *A.niger*. *Journal of Fermentation Technology* 63: 401 –403.

Rajakumar, G. and S. Nandy (1983). Isolation, purification and some properties of *Penicillium chrysogenum* tannase. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 525 –527.

Ramirez Coronel A. (2000) Purificación y Caracterización de la Tanasa de *Aspergillus Níger* Aa-20, producida por fermentación en medio sólido. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, México, D.F.

Sourlangas, S. (1947). Enzymes in the pyrogallol tannins and the decomposition products yielded. *Journal of the International Society Leather Trades and Chemistry* 31: 13 –23.

Swain, T. and E. Bate-Smith (1962). *Comparative Biochemistry*, Vol.3. New York: Academic Press. pp.755 –809.

Skene, I. and J. Brooker (1995). Characterization of tannin acylhydrolase activity in the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Anaerobe* 1: 321 – 327.

Seiji, D., S. Atsuhiko, E. Toshio and T. Gyoza (1973). *Hakko Kogaju Zasshi* 51: 768 –771.

Sanderson, G., N. Englewood, P. Coggon and N. Orangeburg (1974). Green tea conversion using tannase and natural tea leaves. U.S. Patent 3, 812, 266.

Sherve, F. and I. L. Wiggins (1964). *Vegetation and Flora of the Sonora-Desert*. Stanford University Press, copia 1. pp. 165-167.

Standley, P. C. 1961. *Trees and Shrubs of México*.

Seth, M. and S. Chand (2000). Biosynthesis of tannase and hydrolysis of tannins to gallic acid by *Aspergillus awamori* – optimisation of process parameters. *Process Biochemistry* 36: 39-44.

Schofield, P., D. M. Mbugua and A. N. Pell (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Tachnology*. 91: 21-40.

Toth, G.B. (1944).Uber die Chromatographie der Tannase. *Enzymologia* 11: 19 –23.

Waterman, P. G., S. Mole (1994) *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*, Blackwell Scientific Publications: Oxford, U. K.

Westtstein, R. (1994). *Tratado de Botánica Sistemática*. Editorial Labor, S. A. P., 767.

Yamada, K., O. Adachi, M. Watanabe And K. Ogata (1967). Tannase (tannin acyl hidrolase) a typical serine esterase. *Agricultural and Biological Chemistry*. 32: 257-258.

Yamada, K., S. Iibuchi And Y. Minoda (1968). Studies on tannin acyl hidrolase of microoganisms. Isolation and identification of molds and studies on the conditions of cultivation. Agricultura and Biological Chemistry. 45: 233-240.

Yokoyama, S., A. Ogama and A. Obayashi (1988). Enzyme Microb Technol 10: 52-55.

RESUMEN

En el presente estudio, se evaluó la producción de la enzima tanin acil hidrolasa o tanasa por una cepa de *Aspergillus niger* Aa-20 en Cultivos Sumergido (CSm) y Sólido (CS). En CSm se evaluó una concentración de la fuente de sustrato (*Larrea tridentata* Cov) de 5% (p/v) y en CS ésta fue de 30% (p/v). El estudio cinético involucró la cuantificación de la actividad enzimática intra y extracelular por el método espectrofotométrico de la rodanina metanólica, mientras que el consumo de taninos se determinó con el método espectrofotométrico de Folin Ciocalteu. Los resultados obtenidos demostraron una mayor producción de la enzima tanasa en CS, que en CSm, tanto a nivel intra y extracelular (165.1 y 434.3, y 0.0 y 276.9 U/L respectivamente). El consumo de taninos fue ligeramente mayor en CS que en CSm, siendo mayor el consumo de taninos condensados (catequina) que el de taninos hidrolizados (ácido gálico). El sistema microbiano fúngico en cultivo sólido sobre residuos de gobernadora es una atractiva alternativa para la producción de tanasa la cual se obtiene en una relación de 2.7 extra/intra.

ABSTRACT

In this study,, tannase production by *Aspergillus niger* Aa-20 was evaluated in Submerged (CSm) and Solid Cultures (CS). In CSm a substrate (*Larrea tridentata* Cov) concentration of 5% (p/v) was evaluated, while a level of 30 (p/v) was used in CS. Kinetic study included intra and extracellular tannase activity with the methanolic rhodanine method and the tannin uptake was determined by the spectrophotometric method of Folin Ciocalteu. Results showed that tannase production demonstrated a higher tannase production in CS was higher than CSm, either intracellular as extracellularly (165.1 and 434.3; 0.0 and 276.9 U/L respectively). Tannin uptake was lightly higher in CS than CSm, being uptake condensed tannins (catechine) higher than hydrolysable tannins (gallic acid). Fungal system in CS on residues of gobernadora is an attractive alternative for tannase production in which it is possible to reach a 2.7 extra/intracellular activity ratio.