

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



“PRODUCCIÓN DE TANASA DE *Aspergillus niger* MEDIANTE UN SISTEMA DE FERMENTACIÓN POR ADHESIÓN A SUPERFICIE (FAS)”

Presentada por:

PAOLA MARLENE CORTÉS AVENDAÑO

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAGISTER SCIENTIAE EN
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Lima - Perú

2015

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Marcial I. Silva Jaimes, por su patrocinio, del presente trabajo de investigación, por las sugerencias, consejos, paciencia y enseñanzas en mi formación profesional, GRACIAS....
- A los miembros del jurado: Dr. Manuel Canto Sáenz, Dra. Patricia Glorio Paullet, Mg.Sc. Elva Ríos Ríos, por sus orientaciones y sugerencias al trabajo, por su amistad.
- Al Dr. Cristóbal Aguilar Gonzales y Mg.Sc. Luis Rodríguez, por sus enseñanzas, paciencia y por estar muy dispuestos en cada momento a solucionar mis dudas.
- Al Mg.Sc. Víctor Sarmiento Casavilca, por sus orientaciones, paciencia, enseñanza y su amistad.
- Al Mg.Sc. Vicente Rojas Rojas, por su gran apoyo y su amistad.
- Al Mg. Sc. Francisco Salas Valerio, por su apoyo y confianza.
- A la Sra. Silvia, por constante apoyo incondicional y su rol de madre. Y al Sr. Gricerio y la Sra. Marina, por su apoyo emocional, y su constante empuje.
- A ti amiga Deyli, por tú apoyo incondicional y en toda la parte logística.
- A los Técnicos de los laboratorios: Sr. Max, Sra. Delfilia, Yelena y Zahara, por su gran apoyo, en todo momento de la realización de esta tesis.
- A los Señores de la BAN (Mario y Jesús), quienes siempre estuvieron dispuestos a facilitar la información requerida.
- A todas mis amistades que apoyaron de algún modo, en forma individual o colectiva al desarrollo de esta investigación.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. La biotecnología y sus productos.....	4
2.2. Enzimas.....	5
2.2.1. Clasificación de las enzimas.....	6
2.2.2. Producción y aplicación de las enzimas industriales.....	8
2.3. Sistemas de producción de enzimas.....	9
2.3.1. Fermentación sumergida	11
2.3.2. Fermentación por adhesión a superficie (FAS).....	11
2.3.2.1. Fermentación en sustrato sólido (FSS).....	12
2.3.2.2. Fermentación por biopelículas.....	12
2.4. Tanasa.....	16
2.4.1. Propiedades fisicoquímicas de la tanasa.....	16
2.4.2. Mecanismo de acción de tanasa.....	21
2.4.3. Sustrato de la enzima.....	24
2.4.4. Fuentes de obtención de la enzima tanasa.....	27
2.4.5. Aplicaciones y usos potenciales de la enzima tanasa.....	30
2.4.5.1. Aplicación industrial.....	32
2.4.6. Producción industrial de la enzima tanasa.....	36
III. MATERIALES Y MÉTODOS	39
3.1. Lugar de ejecución.....	39
3.2. Microorganismos.....	39
3.3. Soporte para el desarrollo de biopelículas	39
3.4. Equipos, materiales y reactivos.....	39
3.4.1. Equipos e instrumentos.....	39
3.4.2. Materiales.....	40
3.4.3. Reactivos.....	41
3.5. Métodos de análisis.....	42

3.5.1. Determinación de biomasa.....	42
3.5.2. Actividad enzimática.....	42
3.5.3. Proteína soluble.....	43
3.5.4. Fenoles hidrolizables totales.....	44
3.6. Procedimiento experimental.....	44
3.6.1. Conservación y propagación del microorganismo.....	44
3.6.2. Preparación del inóculo.....	46
3.6.3. Preparación del medio de producción.....	46
3.6.4. Preparación del soporte.....	46
3.6.5. Fermentación por Adhesión a superficie.....	47
3.6.6. Recuperación de la enzima extracelular.....	47
3.6.7. Concentración de la enzima tanasa extracelular.....	47
3.6.7.1. Diálisis.....	47
3.6.7.2. Concentración con polietilenglicol 6000.....	48
3.7. Diseño experimental y análisis estadístico.....	48
3.7.1. Diseño experimentales.....	48
3.7.2. Análisis estadístico.....	48
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	50
4.1. Efecto de la concentración de inóculo y concentración de ácido tánico...	50
4.1.1. Sobre el crecimiento fúngico.....	50
4.1.2. Sobre la adsorción específica de biomasa.....	54
4.1.3. Sobre el ácido tánico residual.....	55
4.1.4. Sobre el rendimiento de biomasa respecto al consumo de ácido tánico.....	57
4.1.5. Sobre la Actividad enzimática.....	58
4.1.6. Sobre la proteína soluble extracelular.....	65
4.1.7. Sobre la actividad enzimática específica de la tanasa.....	67
V. CONCLUSIONES.....	69
VI. RECOMENDACIONES.....	71
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
VIII. ANEXOS	85

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1:	Clasificación internacional de enzimas.	7
Cuadro 2:	Propiedades estructurales de algunas tanasas caracterizadas.	17
Cuadro 3:	Propiedades fisicoquímicas de algunas tanasas caracterizada.	19
Cuadro 4:	Fuentes vegetales y animales de tanasa.	27
Cuadro 5:	Fuentes microbianas de tanasa.	29
Cuadro 6:	Patentes seleccionadas de la aplicación de tanasa publicada durante los últimos 10 años.	31
Cuadro 7:	Adsorción específica de biomasa en sistema FAS.	54
Cuadro 8:	Rendimiento de biomasa respecto al consumo de ácido tánico en FAS.	57
Cuadro 9:	Actividad específica del cultivo en sistema FAS.	67
Cuadro 10:	Parámetros técnicos obtenidos en producción de tanasa por el sistema FAS.	68
Cuadro 11:	Resultados de la producción de biomasa.	89
Cuadro 12:	Resultados de la producción de enzima.	93
Cuadro 13:	Resultados de la producción de proteína soluble.	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Clasificación de la enzima tanasa según número de clase, código y tipo de reacción.	8
Figura 2:	Principales categorías del sistema de fermentación. Fermentación en adhesión a superficie comprende ambas fermentaciones Biopelículas y Estado sólido.	10
Figura 3:	Proceso de adhesión de hongos filamentosos a superficies, mostrando las etapas comunes del proceso tanto para fermentación en biopelículas como en fermentación en estado sólido.	15
Figura 4:	Actividad dehidrogenasa y esterasa de la tanasa.	21
Figura 5:	Degradación de los taninos hidrolizables (ácido tánico, metil galato, etil galato, n propilgalato y isosamil galato) por acción de la tanasa.	22
Figura 6:	Estructura química del ácido tánico e hidrólisis.	23
Figura 7:	Clasificación de los taninos.	26
Figura 8:	Reacción enzimática entre la enzima tanasa y el sustrato (metil galato).	42
Figura 9:	Flujo de operaciones para la producción de enzima tanasa.	45
Figura 10:	Esquema experimental para la producción de enzima tanasa.	49
Figura 11:	Cinética de producción de biomasa.	51
Figura 12:	Biopelículas desarrolladas por <i>Aspergillus niger</i> , A. 0 horas, B. 48 horas y C. 96 horas de fermentación.	53
Figura 13:	Ácido tánico residual en sistema FAS.	56
Figura 14:	Cinética de producción de tanasa extracelular en sistema FAS.	59
Figura 15:	Producción de tanasa extracelular en el sistema FAS mediante biopelículas: A. Vista frontal; B. Vista inferior.	64
Figura 16:	Proteína soluble extracelular en sistema FAS.	66

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo I:	Curva estándar de ácido gálico para el ensayo de actividad enzimática A 520 nm.	86
Anexo II:	Curva estándar de albumina sérica bovina para el ensayo de proteína soluble a 550nm.	87
Anexo III:	Curva estándar de ácido tánico para el ensayo de fenoles hidrolizables totales a 725nm.	88
Anexo IV:	a. Análisis de variancia para la producción de biomasa de (0 – 96 HORAS).	90
	b. Prueba de tukey (P<0.05) para concentración de inóculo en la producción de biomasa.	90
	c. Prueba de tukey (P<0.05) para la concentración de ácido tánico en la producción de biomasa.	90
	d. Prueba de tukey (P<0.05) para el tiempo en la producción de biomasa.	91
	e. Prueba GLM en interacción concentración de inóculo*ácido tánico en la producción de biomasa.	91
	f. Prueba GLM en la interacción de concentración de inóculo*tiempo para la máxima producción de biomasa (96 horas de fermentación).	91
	g. Prueba GLM para la interacción de concentración de AT*tiempo para la máxima producción de biomasa (96 horas de fermentación).	92
	h. Prueba GLM para la interacción de concentración de AT*inóculo*tiempo para la máxima producción de biomasa (96 horas de fermentación).	92
Anexo V:	a. Análisis de varianza para la producción de enzima.	94
	b. Prueba de tukey (P<0.05) para concentración de inóculo en la producción de enzima.	94
	c. Prueba de tukey (P<0.05) para la concentración de ácido tánico en la producción de enzima.	94
	d. Prueba de tukey (P<0.05) para el tiempo en la producción de enzima.	95
	e. Prueba GLM para interacción concentración de inóculo*ácido tánico en la producción de enzima.	95
	f. Prueba GLM para la interacción de concentración de inóculo*tiempo para la máxima producción de enzima (96 horas de fermentación).	95
	g. Prueba GLM para la interacción de concentración de AT*tiempo para la máxima producción de enzima (96 horas de fermentación).	96
	h. Prueba GLM para la interacción de concentración de AT*inóculo*tiempo para la máxima producción de enzima (96 horas de fermentación).	96

Anexo VI:	a.	Análisis de varianza para la producción de proteína soluble.	98
	b.	Prueba de tukey ($P < 0.05$) para concentración de inóculo en la producción de proteína soluble.	98
	c.	Prueba de tukey ($P < 0.05$) para la concentración de ácido tánico en la producción de proteína soluble.	98
	d.	Prueba de tukey ($P < 0.05$) para el tiempo en la producción de proteína soluble.	99
	e.	Prueba GLM para interacción concentración de inóculo*ácido tánico en la producción de proteína soluble.	99
	f.	Prueba GLM para la interacción de concentración de inóculo*tiempo para la máxima producción de proteína (96 horas de fermentación).	99
			100
	g.	Prueba GLM para la interacción de concentración de AT*tiempo para la máxima producción de enzima (96 horas de fermentación).	100
	h.	Prueba GLM para la interacción de concentración de AT*inóculo*tiempo para la máxima producción de enzima (96 horas de fermentación).	
ANEXO VII		Abreviaturas	101

PRODUCCIÓN DE TANASA DE *Aspergillus niger* MEDIANTE UN SISTEMA DE FERMENTACIÓN POR ADHESIÓN A SUPERFICIE (FAS).

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo la producción de enzima tanasa a partir de *Aspergillus niger* ATCC 10864 mediante un sistema de Fermentación por Adhesión a Superficie (FAS), con las siguientes condiciones de cultivo: 40 ml de medio de cultivo; temperatura 28 °C; tiempo de incubación 96 horas; pH inicial 5.5; velocidad de agitación 175rpm.

Se estudió tres concentraciones de inóculo (10^5 , 10^6 y 10^7 esp/ml) y tres concentraciones de ácido tánico (3, 5 y 7%) durante 96 horas de fermentación (0, 24, 48,72 y 96), los resultados se analizaron estadísticamente en un DCA con arreglo factorial de $3 \times 3 \times 5$ con tres repeticiones. Para cada tratamiento se midió la actividad enzimática extracelular en mg/ml de ácido gálico (U/L), biomasa del sistema (g/L), producción de proteína soluble extracelular (g/L), absorción específica de biomasa (g/g), porcentaje de ácido tánico residual (%), rendimiento de biomasa por consumo de ácido tánico y la actividad enzimática específica (UI/mg) como principales para metros de comparación.

Los resultados muestran que a una concentración de inóculo de 10^7 (esp/ml) y a una concentración de ácido tánico de 3% se obtuvo la máxima actividad enzimática de tanasa extracelular de 125.646 U/L, la mayor producción de biomasa fue de 6.22g/L, proteína soluble extracelular 0.126g/L, absorción específica de biomasa 0.849 g/g, porcentaje de ácido tánico residual 84.61% y rendimiento de biomasa por consumo de ácido tánico fue de 2.8. Por otro lado a una concentración de inóculo de 10^6 (esp/ml) y a una concentración de ácido tánico de 3% se obtuvo la mayor actividad enzimática específica de 1.064 UI/mg, durante 96 horas de fermentación.

Palabras claves: Tanasa, *Aspergillus niger*, Fermentación por adhesión a superficie, taninos.

PRODUCTION OF TANNASE FROM *Aspergillus niger* IN A SURFACE ADHESION FERMENTATION (SAF)

ABSTRACT

The present research aimed at the production of tannase enzyme by *Aspergillus niger* ATCC 10864 in a Surface Adhesion Fermentation (SAF) system, with the following culture conditions: 40 mL culture medium; temperature 28 ° C; incubation time 96 hours; initial pH 5.5; stirring velocity 175rpm.

Three inoculum concentrations (10^5 , 10^6 and 10^7 spores/ml) and three concentrations of tannic acid (3, 5 and 7%) for 96 hours of fermentation (0, 24, 48, 72 and 96) was evaluated, results were analyzed statistically as a Completely Randomized Design (CRD) 3x3x5 with factorial arrangement and three replications. For each treatment it were measured extracellular enzymatic activity (U/L), biomass (g/L), extracellular soluble protein (g/L), specific absorption of biomass (g/g), residual tannic acid (%), biomass yield and specific enzymatic activity (U/mg) as the main comparative parameters. and specific enzyme activity 1.064 U/mg.

The results show that using inoculum concentration of 10^7 spores/ml, an initial tannic acid concentration of 3% a maximum of extracellular tannase activity was obtained (125.646 U/L) at 96 hours of fermentation. Moreover the amount of biomass was 6.22g/L, extracellular soluble protein 0.126g/L, specific absorption of biomass 0.849 g/g, residual tannic acid of 84.61%, biomass yield of 2.8. Furthermore using inoculum concentration of 10^6 (spores/ml) at a concentration of tannic acid of 3% greater specific enzyme activity of 1,064 IU/mg was obtained for 96 hours fermentation.

Keywords: Tannase, *Aspergillus niger*, Surface Adhesion Fermentation (SAF), tannins.

I. INTRODUCCIÓN

Los avances en los diversos campos de la biotecnología, están transformando el panorama de los procesos industriales y medioambientales. Los microorganismos, y sus productos (incluyendo sus enzimas) están reemplazando a los procesos dependientes de químicos. El uso de enzimas en la producción de bienes para el consumo humano se remonta por lo menos a los 2000 años, cuando se utilizaron microorganismos en procesos como la elaboración del pan de levadura y la sacarificación del arroz en la producción de koji (Demain y Fang, 2000).

El mecanismo de acción de las enzimas era desconocida hasta que en 1877, Moritz Traube propuso que los compuestos similares a proteínas catalizaban la fermentación y otras reacciones químicas. Actualmente se conocen alrededor de 5500 enzimas (BRENDA, 2012). Como se sabe las reacciones enzimáticas son muy específicas y actúan bajo condiciones suaves de reacción comparado con los procesos químicos tradicionales. Además, son fácilmente biodegradables y por lo general no son tóxicas, cuando llegan al medio ambiente, después de su uso en la producción industrial (Kirk-Othmer, 2005; Soetaert y Vandamme, 2010; Kenthorai y Per, 2013).

Dentro de los microorganismos, los hongos filamentosos como el *Aspergillus niger* constituyen uno de los grupos más utilizados en la producción de enzimas industriales, principalmente por sus altos niveles de secreción de proteínas, y su estatus GRAS (Generalmente Reconocidos Como Seguros) (Ward *et al.*, 2006). Las enzimas producidas por estos microorganismos resultan ser más estables que las proteínas análogas obtenidas a partir de plantas o animales. Además, los microorganismos pueden ser sometidos a manipulación genética más fácilmente que los animales y plantas (Headon y Walsh, 1994). En la actualidad, las enzimas más utilizadas en la biotecnología son las hidrolasas, representando aproximadamente el 75% de las enzimas industriales (Bhat, 2000; Saha *et al.*, 2009).

Dentro de ellas se encuentra la Tanino acil hidrolasa, comúnmente conocida como tanasa (E.C.3.1.1.20), que es una enzima inducible producida por hongos, levaduras y bacterias. La aplicación comercial de la tanasa es la elaboración del te instantáneo, licor de bellota, clarificante de vinos, zumos de frutas y bebidas refrescantes con sabor a café y durante la fabricación de cerveza para evitar la turbidez indeseable producida por el acoplamiento de las proteínas con los taninos (Lekha y Lonsane, 1997; Belmares *et al.*, 2004; Aguilar *et al.*, 2007).

Siendo la principal aplicación, la producción de ácido gálico, que es un compuesto intermediario importante en la síntesis del fármaco antibacteriano trimetoprim usado en la industria farmacéutica, y en la industria alimentaria como un sustrato para la síntesis de propilgalato, un potente antioxidante. Es obtenido de los vegetales ricos en taninos dentro de ellos principalmente la tara (*Caesalpinia spinosa*), el cual es muy demandada por los países industrializados, quienes convierten el polvo de tara en sus derivados (ácido gálico) mediante procesos químicos, estos procesos liberan una gran cantidad de efluente tóxicos que causan peligros ambientales (Banerjee *et al.*, 2007a). Actualmente en nuestro país es importado por la industria alimentaria con mucha frecuencia y a un costo muy alto (Basurto, 2002).

Durante muchos años, la producción industrial de tanasa fue llevado a cabo exclusivamente en sistemas de fermentación sumergida (FS), este sistema no desarrolla la condición natural de los hongos filamentosos, lo cual motiva una baja producción de enzimas. Sin embargo, se han reportado ampliamente su obtención mediante fermentación en sustrato sólido (FSS) (Lekha y Lonsane, 1994) cuya aplicación industrial es muy limitada por ser un proceso que trabaja en un sistema muy heterogéneo y difícil de controlar (Durand, 2003). Y por último la fermentación por inmovilización de células tiene ventajas operativas como la reutilización de la biomasa, la facilidad para la recuperación del producto y también una mayor productividad, pero requiere equipamiento muy costoso.

Por las razones antes mencionadas se propone un proceso alternativo para la producción de tanasa a partir de *Aspergillus niger* ATCC 10864 mediante un sistema de Fermentación por Adhesión a Superficie (FAS), el cual conjuga las características fisiológicas determinantes de la FSS y las condiciones de operación de la FS, considerando para ello los siguientes objetivos:

- Evaluar el efecto de la concentración de inóculo en un sistema de fermentación por adhesión a superficie (FAS) para la producción de tanasa.
- Evaluar el efecto de la concentración de ácido tánico en un sistema de fermentación por adhesión a superficie (FAS) para producción de tanasa.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. LA BIOTECNOLOGÍA Y SUS PRODUCTOS

La ciencia de la vida ofrece oportunidades para revolucionar actividades de bienestar humano enriquecido por las aportaciones de la investigación genómica, la biotecnología es una fuerza importante para el desarrollo en todos los países (Da Silva *et al.*, 2002). Para ello utiliza un conjunto de tecnologías que permite la manipulación de los organismos vivos o de sus componentes subcelulares para desarrollar productos y procesos de utilidad (Fennema, 2010). Es un motor de avance tecnológico tanto en los países desarrollados y en desarrollo, aunque en diferentes niveles de alcance y contenido.

La simple producción de quesos y alimentos fermentados a la producción industrial de antibióticos, la elaboración genética de productos farmacéuticos y los cultivos nuevos ilustran la amplitud y la profundidad de la actividad y las prácticas de biotecnología en todo el mundo (Da Silva *et al.*, 2002). Por ejemplo en los EE.UU, los ingresos, para la industria de la biotecnología aumentó de \$ 8 mil millones 1992 a \$ 25 mil millones en 2000, un aumento de más del 300% durante este período (Ademola *et al.*, 2012).

Entre las biotecnologías, el procesamiento enzimático es visto como una de las alternativas prometedoras y sostenibles para el procesamiento convencional. Las enzimas son proteínas producidas por todos los organismos vivos, que actúan como un catalizador de numerosas reacciones bioquímicas. Aparte de ser catalizadores *in vivo*, las enzimas también pueden ser catalizadores *in vitro* para diversas reacciones, incluso a escalas industriales (Raman y Henning, 2013). El mercado mundial de enzimas creció en una tasa de dos dígitos en los últimos siete años y fue alrededor de \$ 5,1 mil millones en 2009 (Sánchez y Demain, 2010).

2.2. ENZIMAS

Son proteínas que tienen la función de acelerar reacciones químicas en sistemas biológicos, actuando como catalizadores. Un catalizador incrementa la velocidad de reacción química sin cambiar el mismo durante el proceso. La enzima puede unirse temporalmente de forma covalente a la molécula que se está transformando durante los pasos intermedios de la reacción, pero al final de la misma la enzima se regenera en su forma original al liberarse del producto (Devlin, 2004). El que una proteína tenga actividad catalítica, es decir enzimática, depende de la secuencias de aminoácidos que determina la conformación de la cadena, sólo unos pocos grupos reactivos de la proteína enzimática, que se sitúan en el llamado centro activo, son responsables de la catálisis (Bruchmann, 1980).

El centro activo se compone del centro catalítico y el centro de enlace (separados espacialmente). El primero es el responsable de la naturaleza química de la reacción catalizada (especificidad de acción), el segundo de la afinidad por el sustrato (especificidad de sustrato). Mientras que el centro catalítico puede ser relativamente inespecífico, la especificidad de enlace es extremadamente alta, de tal forma que solo unas pocas sustancias de naturaleza química muy parecida pueden ser empleadas como sustrato (Bruchmann, 1980).

Los métodos enzimáticos han sustituido a numerosos procesos químicos convencionales, y han ofrecido medios prácticos para los productos que estaban sin precedentes para la química convencional. En la actualidad, cientos de enzimas se utilizan industrialmente, a medida que el mercado de enzimas industriales se expande a un ritmo de alrededor de 10 % al año, las enzimas microbianas han sustituido en gran medida a la producción tradicional de origen vegetal y animal, la mayoría de ellos se producen por recombinación, utilizando tecnologías de ADN para modificar la especificidad por sustrato y mejorar las propiedades de estabilidad para aumentar los rendimientos de las reacciones catalizadas.

Los procesos enzimáticos son favorables para el medio ambiente; ya que ellos trabajan en condiciones moderadas de temperatura, pH y presión, rara vez forman productos secundarios (desperdicios).

Las proteínas son en sí mismas biodegradable y generalmente no representan una amenaza para el medio ambiente (Saha *et al.*, 2009).

2.2.1. Clasificación de las enzimas

Según el sistema recomendado por la Comisión Internacional de Enzimas (IEC), el nuevo sistema divide a las enzimas en seis grandes clases y subclases, conforme al tipo de reacción que catalizan. A cada enzima se le asigna un nombre, adecuado para su uso diario, un nombre sistemático que identifica al tipo de reacción que cataliza y un número de identificación de cuatro dígitos. En el Cuadro 1 se muestra la clasificación de las enzimas y en la Figura 1 se presenta la clasificación de la enzima tanasa según número de clase, código y tipo de reacción.

Cuadro 1: Clasificación internacional de enzimas

Nombre de clase	Nombre de código	Tipo de reacción catalizada
1. Oxidoreductasa	1.1. Actúa sobre CH-OH	Reacciones oxidación - reducción
	1.2. Actúa sobre C=O	
	1.3. Actúa sobre CH=CH-	
	1.4. Actúa sobre CH-NH ₂	
	1.5. Actúa sobre CH-NH-	
	1.6. Actúa sobre NADH; NADPH	
2. Transferasas	2.1. Grupos de un átomo de carbono	Transferencia de grupos funcionales
	2.2. Grupos aldehídico o cetónicos	
	2.3. Grupos acilo	
	2.4. Grupos glucósilos	
	2.5. Grupos fosfato	
	2.6. Grupos que contienen azufre	
3. Hidrolasas	3.1. Esteres	Reacción de hidrólisis
	3.2. Enlaces glucosídicos	
	3.3. Enlaces peptídicos	
	3.4. Otros enlaces C-N	
	3.5. Anhídridos de ácido	
4. Liasas	4.1. C=C	Adición a los dobles enlaces
	4.2. C=O	
	4.3. C=N-	
5. Isomerasas	5.1. Racemasas	Reacciones de isomerización
6. Ligasas	6.1. C-O	Formación de enlaces con escisión de ATP
	6.2. C-S	
	6.3. C-N	
	6.4. C-C	

FUENTE: Elaborado en base a Mosier y Ladisch (2009)

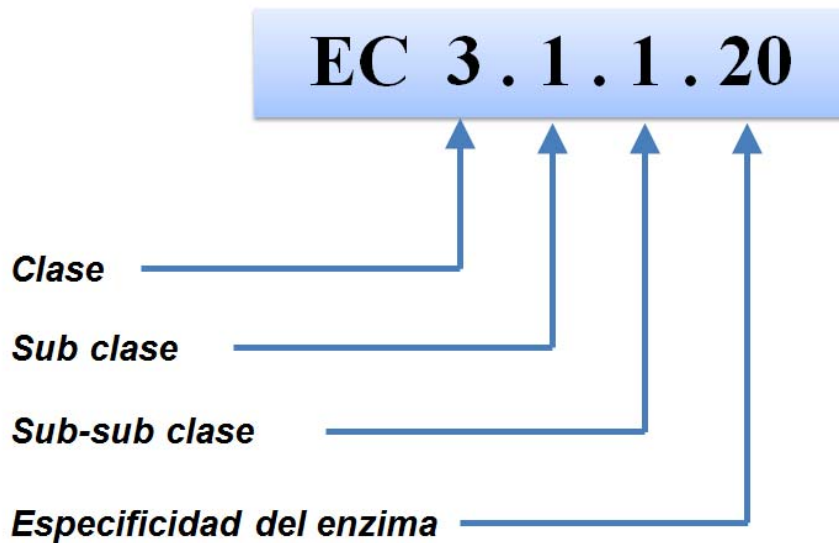


Figura 1: Clasificación de la enzima tanasa según número de clase, código y tipo de reacción.

FUENTE: Elaborado en base a Mosier y Ladisch (2009)

2.2.2. Producción y aplicación de las enzimas industriales

La producción de enzimas para 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 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.

Hoy en día las enzimas son indispensables en la tecnología moderna de producción de alimentos y ejercen una variedad de funciones. Durante la próxima década, la industria agroalimentaria operará en un entorno global sometido a rápidos cambios debido a la creciente competitividad, la progresiva globalización de precios, y a la mayor demanda de alimentos de calidad por parte del consumidor. Además de la industria alimentaria, está creciendo el empleo de enzimas en síntesis química. A diferencia de los catalizadores inorgánicos como son los ácidos, bases, metales y óxidos metálicos las enzimas son muy específicas (Fennema, 2010).

2.3.SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE ENZIMAS

La producción de enzimas es llevada a cabo por fermentación, dentro de ella el sumergido y estado sólido, considerando a la inmovilización biocatalítica una de las primeras formas. Siendo la diferencia entre ellas la cantidad de agua libre del sistema, y el elemento común el uso de microorganismos como biocatalizadores. Una de las características biológicas importantes de las células hace referencia a los procesos de señalización. La señalización microbiana se produce como una respuesta a un estímulo o como medio de comunicación entre células dentro de una población. Por otro lado la adhesión celular es una característica encontrada en casi todos los tipos de células a través de los reinos biológicos. La adhesión a las superficies no es un proceso aleatorio pero está guiado genéticamente a través de varios marcadores moleculares de superficie, así como de estructuras de células especializadas, una vez que las células se adhieren a una superficie se emiten varias etapas de señalización produciéndose varios cambios moleculares, fisiológicos y morfológicos de las células, dando lugar a biopelículas.

Una biopelícula es un conjunto de células microbianas que se asocia de forma irreversible (no se elimina mediante un lavado suave) con una superficie y encerrado en una matriz de material principalmente de polisacáridos. Por lo tanto, el concepto de biopelícula supone ya sea una población o una comunidad de microorganismos que viven unidos a una superficie. Las biopelículas pueden desarrollarse en cualquiera de las superficies bióticas o abióticas de una sola especie o como una comunidad derivada de varias especies, esta forma de crecimiento es el estilo de vida predominante de los microorganismos incluyendo bacterias, levaduras, hongos filamentosos e incluso protozoarios.

Los sistemas de producción de enzimas se clasifican de acuerdo a las propiedades biológicas de las células. Se considera tres categorías: (i) Fermentación celular sumergida (FS) comúnmente conocida como “fermentación sumergida, (ii) Fermentación por adhesión a superficie (FAS) y (iii) Fermentación de células inmovilizadas como se puede mostrar en la Figura 2 (Gutiérrez y Villena, 2010).



Figura 2: Principales categorías del sistema de fermentación. Fermentación en adhesión a superficie comprende ambas fermentaciones Biopelículas y estado sólido.

FUENTE: Gutiérrez y Villena (2010).

2.3.1. Fermentación Sumergida (FS)

Este es el sistema de fermentación más común que se utiliza en la industria de la fermentación (Gutiérrez y Villena, 2010), implica el crecimiento del microorganismo como una suspensión en un medio líquido en el que varios nutrientes están disueltos o suspendidos en forma de partículas sólidas (Frost y Moss, 1987). Además, la percepción clásica de microorganismos como las formas de vida unicelulares se basan casi enteramente en el modo de cultivo puro de crecimiento; desde suspensiones microbianas se pueden diluir a una sola célula y ser estudiadas en un cultivo líquido, este modo de crecimiento tiene tradicionalmente predominado en el estudio de la fisiología microbiana, la patogénesis y las aplicaciones industriales de investigación de laboratorio. Sin embargo, este tipo de fermentación dio lugar después de la producción de la penicilina industrial en la década de 1940 hasta la ingeniería biológica y de los enormes avances en todos los campos de tecnología de fermentación sumergida (Gutiérrez y Villena, 2010).

2.3.2. Fermentación por adhesión a superficie (FAS)

Es una nueva categoría de fermentación descrita por primera vez por Gutiérrez y Villena (2003), es un proceso en el que las esporas de los hongos filamentosos se adsorben al soporte sólido (natural o sintético), y las células crecen de manera uniforme para formar una biopelícula. La adsorción natural sobre soportes sólidos es una técnica de inmovilización que se ha utilizado con hongos filamentosos (Gutiérrez y Villena, 2003), estos hongos están naturalmente adaptados a crecer en superficies; demuestran un comportamiento fisiológico, que es diferente al cultivo sumergido. Las ventajas de esta forma de crecimiento han sido explotados industrialmente en la fermentación en estado sólido (SSF) y sistemas inmovilizados (Martínez *et al.*, 2010).

Se resume el conocimiento básico sobre la fermentación en estado sólido y la formación de biopelículas, y se relaciona con los procesos de adhesión celular, cubriendo puntos de vista de ingeniería y de biología molecular.

Contrariamente a la creencia común, la ventaja de la fermentación en estado sólido está relacionada a la adhesión de los hongos a partículas sólidas y no al bajo contenido de agua, por lo tanto, la fermentación en estado sólido y la fermentación en biopelículas (erradamente conocida como inmovilización por adsorción) son variantes técnicas del mismo proceso biológico y deben ser referidas como Fermentación por Adhesión a Superficie, Gutiérrez y Villena (2003) consideran esta categoría puede ser dividida en dos: (i) Fermentación en estado sólido, y (ii) Fermentación por biopelículas.

2.3.2.1. Fermentación en sustrato sólido (FSS)

Es un proceso utilizado para la producción de alimentos fermentados, alimentos para animales, combustible, enzimas y productos farmacéuticos (Gutiérrez y Villena, 2010), lo que implica el cultivo de microorganismos sobre sustratos sólidos, húmedos en ausencia de una fase acuosa libre, es una técnica muy antigua que se remonta a las tradiciones de los pueblos orientales. Actualmente se adapta a nuevos propósitos, a partir de la cual se han generado nuevas propuestas para áreas específicas como la microbiología, la farmacéutica y la bioquímica (Fernández, 2006). Las ventajas de la FSS incluyen la simplicidad, menores costos de producción y alta producción de enzimas (Da Costa *et al.*, 2012).

2.3.2.2. Fermentación por biopelículas

Para muchas bacterias, el compromiso a la superficie de fijación y el crecimiento posterior en forma de biopelícula es un evento altamente regulado. Cabe señalar que la adhesión y la posterior expresión diferencial de genes para generar fenotipos distintos de los organismos de vida libre son dos procesos unificadores del concepto de biopelícula. Aunque las biopelículas bacterianas se han estudiado ampliamente en los diferentes niveles, las biopelículas fúngicas han recibido poca atención. Los hongos filamentosos se adaptan de forma natural al crecimiento en superficies y en estas condiciones muestran un comportamiento fisiológico particular que es diferente al cultivo sumergido, el comportamiento fisiológico diferencial de los hongos adheridos corresponde principalmente a un aumento de la producción y secreción de enzimas y también a una diferenciación morfológica que está ausente en los cultivos sumergidos, ya que se ha encontrado en cultivos de estado sólido (Villena *et al.*, 2001).

a. Biopelículas

En muchos ambientes naturales, existen microorganismos predominantes en biopelículas - comunidades de organismos adheridos a superficies (Donlan y Costerton, 2002). Una biopelícula es un agregado de células en la que, los microorganismos se adhieren entre sí y con una superficie, estas células se adhieren frecuentemente incrustados en una matriz de producción propia de sustancias poliméricas extracelular, las biopelículas se caracterizan principalmente por la presencia de canales internos, mostrando similitud con el crecimiento en fermentación en sustrato sólido mientras que son notoriamente distintos a la morfología de pellet, característica de la fermentación sumergida (Villena, 2006).

Actualmente se acepta que los microbios en la naturaleza rara vez sobreviven como células solitarias, sino que crecen como biopelículas, la estructura de las células individuales no se altera significativamente, pero los individuos se organizan en una comunidad estructural, envuelta en baba, mostrando características y fenotipos nuevos. Uno de los cambios con frecuencia medible en el fenotipo de las células de una biopelícula, en comparación con sus contrapartes planctónicas, destaca el incremento significativamente de la tolerancia a agentes químicos, biológicos o físicos. De hecho uno de los rasgos más llamativos y sistemáticamente presente en las poblaciones microbianas de crecimiento como las biopelículas es su aumento a la resistencia intrínseca a los agentes antimicrobianos (Harding *et al.*, 2011).

b. Formación de biopelículas

En general se supone que los hongos filamentosos, algunos de los cuales tienen un impacto significativo en nuestra salud o nuestra economía, no forman biopelículas. En contraste con este supuesto, aquí hablamos de los hallazgos recientes de apoyo a la hipótesis de que los hongos filamentosos asociados a la superficie pueden formar biopelículas (Harding *et al.*, 2011).

Muchos hongos filamentosos están naturalmente adaptados al crecimiento sobre superficies, requieren un contacto cercano con el sustrato debido a su nutrición heterótrofa, secreción de enzimas extracelulares, absorción de nutrientes a través de la pared celular y el crecimiento apical de sus hifas. Muchas especies además, condicionan su supervivencia

a una adecuada adhesión de estructuras de dispersión, principalmente esporas, para una posterior colonización del sustrato (Jones, 1994), la adhesión de esporas de hongos depende tanto de su superficie rugosa y sustancias adhesivas que forman una almohadilla entre las esporas y el soporte (Troung *et al.*, 2004 y Verma *et al.*, 2010), está influenciada por factores físicos, químicos y medio ambientales, los microorganismos tanto como las superficies tienen un potencial negativo que generarían repulsión electrostática, la cual podría contrarrestarse con fuerzas de atracción temporales tipo Van der Waals o atracción hidrofóbica. Sin embargo, no está completamente definido para el caso de hongos, el mecanismo exacto de adhesión (Jones, 1994).

En condiciones adecuadas la espora arriba al sustrato y se adhiere para iniciar la germinación, las superficies naturales son comúnmente hidrofóbicas y la adhesión y germinación de las esporas está determinada por la presencia de proteínas hidrofóbicas de pared denominadas hidrofobinas. Las hidrofobinas son pequeñas proteínas, moderadamente hidrofóbicas, caracterizadas por conservar 8 residuos de cisteína y patrones hidropáticos típicos, producidas por especies de Ascomycetos, Basidiomycetos y Zigomicetos, las cuales desempeñan diversas funciones en su crecimiento y desarrollo, incluyendo en primer lugar, la adsorción de esporas o hifas a superficies hidrofóbicas produciendo señales morfogenéticas, y la formación de estructuras hidrofóbicas aéreas como micelio y cuerpos fructíferos (Wosten y Willey, 2002).

La propiedad característica de estas proteínas es la formación de una membrana anfipática en contacto con una interfase hidrofílica-hidrofóbica lo cual permite cambiar la naturaleza de la superficie. Así, superficies hidrofóbicas líquidas como gotas de aceites o sólidas como teflón pueden hacerse hidrofílicas si se ponen en contacto con hidrofobinas, de la misma manera se puede revertir la naturaleza hidrofílica de las superficies, esta extraordinaria capacidad de las hidrofobinas las convierte en moléculas de aplicación potencial en distintos campos (Scholtmeijer *et al.*, 2001).

La formación de las biopelículas ocurre en tres fases: la adhesión, la cual es fuertemente favorecida por la hidrofobicidad de las esporas de *Aspergillus*; la fase de crecimiento inicial y desarrollo, que se inicia con la germinación de las esporas entre las 4 y 10 horas y continúa hasta las 24 horas cuando ya se percibe la colonización casi total de la superficie;

y finalmente la fase de maduración, en la cual la densidad de biomasa se incrementa notablemente desde las 48 horas hasta las 120 horas como se muestra en la Figura 3 (Villena *et al.*, 2001).

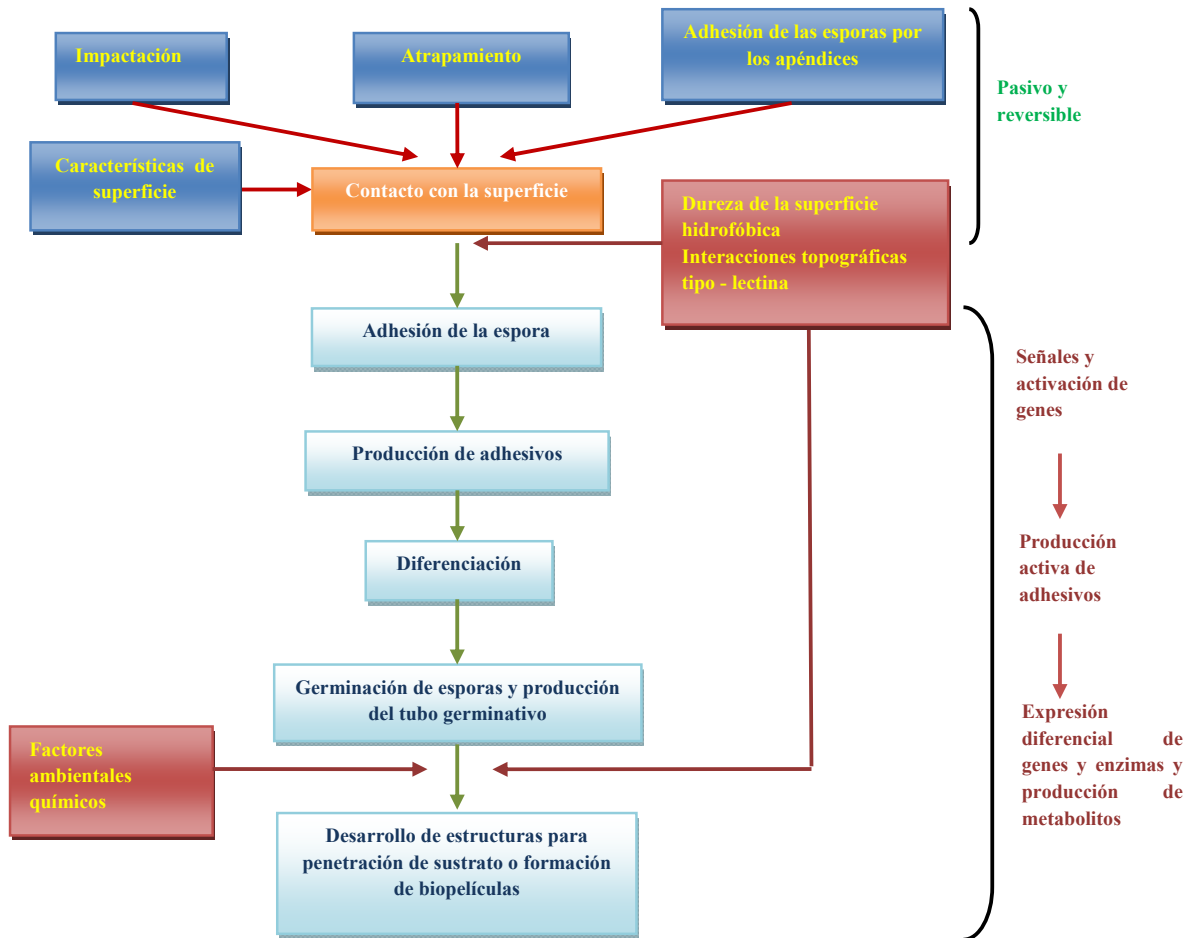


Figura 3: Proceso de adhesión de hongos filamentosos a superficies, mostrando las etapas comunes del proceso tanto para Fermentación en biopelículas como en Fermentación en estado sólido.

FUENTE: Gutiérrez y Villena (2003).

2.4.TANASA

Tanino acil hidrolasa (TAH) (EC 3.1.1.20) comúnmente conocida como tanasa, enzima descubierta accidentalmente 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).

2.4.1. Propiedades fisicoquímicas de la tanasa

Uno de los temas más estudiados de la enzima tanasa es en relación a sus propiedades físico-químicas, varias tanasas de hongos, bacterias y plantas han sido purificadas y caracterizadas, se han encontrado diferencias importantes entre tanasas caracterizadas. Estas diferencias están relacionadas con el organismo que produce la enzima, la fuente del organismo, y las condiciones de producción (Aguilar y Gutiérrez, 2001). Debido a ello la literatura revela que la tanasa es muy diversa en sus propiedades estructurales como se muestra en el Cuadro 2.

El peso molecular de las tanasas caracterizadas se encontró en un rango de 50 a 320kDa (Boer *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2008; Iwamoto *et al.*, 2008; Hatamoto *et al.*, 1996; Iibuchi *et al.*, 1968) dependiendo de la fuente, se han reportado tanasas formadas por dos o más sub-unidades. Hatamoto *et al.* (1996) concluyeron que la tanasa nativa de *Aspergillus oryzae* consiste en cuatro pares de dos tipos de sub-unidades de 30 y 34kDa, respectivamente unidas entre sí por enlaces disulfuro, formando un hetero-octámero de unos 300kDa, del mismo modo Ramírez *et al.* (2003) purificó y caracterizó tanasa de *Aspergillus niger* que es activa en sus isoformas monoméricas y diméricas de 90 y 180 kDa respectivamente.

Su alto contenido de azúcares, principalmente azúcares neutros como manosa, galactosa, y hexosaminas (Albertse, 2002) que oscila entre el 11 y 64%, puede estar relacionado con la resistencia de la tanino acil hidrolasa a ser precipitada por los taninos, como la mayoría de las proteínas (Strumeyer y Malin, 1970; Lekha y Lonsane, 1997; Zhong *et al.*, 2004; Kasieczka-Burnecka*et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2010).

Cuadro 2: Propiedades estructurales de algunas tanasas caracterizadas.

Microorganismos	Sistema de cultivo	Peso molecular (kDa)	Subunidades	% de azúcares	Referencias
<i>Arxula adenivorans</i>	FS	320	4 × 80	31.2	Boer <i>et al.</i> , 2009
<i>Aspergillus awamori</i>	FS	230	6 × 37.8	8.0	Beena <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus niger</i>	FS	225	50 + 75 + 100	n.d.	Mata <i>et al.</i> , 2009
<i>Aspergillus oryzae</i>	FS	310	4 × (30 + 33)	22.7	Hatamoto <i>et al.</i> , 1996
<i>Candida</i> sp	FS	250	2 × 120	64	Aoki <i>et al.</i> , 1976
<i>Enterobacter</i> sp	FS	90	1 × 90	0	Sharma y John, 2011
<i>Lactobacillus plantarum</i>	FS	50	1 × 50	0	Iwamoto <i>et al.</i> , 2008
<i>Quercus robur</i>	Planta	150	2 × 75	n.d.	Niehaus y Gross, 1997
	Hojas	300	4 × 75		
<i>Selenomonas ruminantium</i>	FS	59	1 × 59	0	Skene y Brooker, 1995.

n.d: no determinado

FUENTE: Rodríguez *et al.* (2011)

La función biológica de este alto contenido de carbohidratos es desconocida, pero puede estar relacionado con la capacidad de tolerar la desnaturalización de los taninos (Lekha y Lonsane, 1997), el recubrimiento de los carbohidratos probablemente protege el esqueleto del polipéptido, lo cual haría menos accesibles a las moléculas de taninos, por consiguiente la unión de los taninos con la glicoproteína, probablemente se produce con los hidratos de carbono en lugar de la proteína, tal vez se crea un complejo más débil y más fácilmente reversible. A pesar de las diferencias estructurales entre las tanasas conocidas, hay algunas propiedades fisico-químicas que son más o menos similares, como se muestra en el Cuadro 3.

La mayoría de las tanasas caracterizadas tienen su temperatura óptima de actividad entre 30 y 40 °C Aguilar *et al.* (2007), Sin embargo, hay algo de información sobre la caracterización de tanasas psicrófilas y termófilas, por ejemplo, Ramírez *et al.* (2003) y Battestín *et al.* (2007a) informaron sobre la producción de tanasas termoestables por *Aspergillus niger* y *Paecilomyces variotii* en FSS, estas enzimas tienen su actividad óptima a 70°C, por otro lado Kasieczka-Burnecka *et al.* (2007) purificaron y caracterizaron dos tanasas psicrófilas de una cepa de *Verticillium sp* Antártico, con una temperatura óptima de 20 y 25 °C, respectivamente.

En el caso de pH óptimo, la mayoría de las tanasas estudiadas muestran su máxima actividad a valores de pH ácidos de 4.3 - 6.5, con un punto isoelectrico que va de 4.3 a 5.1, en la mayoría de los casos se encuentran estables en un amplio intervalo de pH 2.0 a 8.0 (Albertse, 2002; Barthomeuf *et al.*, 1994; Abdel-Naby *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2011). Recientemente, se ha informado que varias tanasas son altamente activas en condiciones extremas de pH Beena *et al.* (2010) y se ha caracterizado tanasas acidófilas con una actividad óptima de pH 2.0; también la enzima retiene alrededor del 80% de su actividad máxima a pH 1.0. Por otra parte, la tanasa de *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 tiene un pH óptimo de 8.0 y retiene aproximadamente el 88% de su máxima actividad a pH 9.0 (Iwamoto *et al.*, 2008). Se ha informado que los valores de Km de tanasa para diferentes hongos con ácido tánico son diferentes como se muestra 0.28, 0.95, 1.05, 0.048 y 0.00061 para tanasa de *Aspergillus niger*, *Cryphonectria parasitica*, *Verticillium sp.*, *Penicillium chrysogenum* y *Paecilomyces variotii*, respectivamente (Kasieczka-Burnecka *et al.*, 2007; Battestín y Macedo, 2007a; Rodríguez *et al.*, 2011).

Cuadro 3: Propiedades fisicoquímicas de algunas tanasas caracterizadas.

Microorganismos	Sustrato	Temperatura óptima (°C)	Temperatura Estable (°C)	pH óptimo	pH estable	PI	K _M (mM)	V _{Max} (umol/min.m g)	Referencia
<i>Arxula Adeninivorans</i>	Metil galato	40	≤50	6.0	5.0–7.0	n.d.	4.4	n.d.	Boer <i>et al.</i> , 2009
<i>Aspergillus awamori</i>	Metil galato	30	≤30	2.0, 8.0	2.0	4.4	1.9	830	Beena <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus flavus</i>	Ácido tánico	50–60	≤60	5–5.5	5.0–5.5	n.d.	0.05	n.d.	Adachi <i>et al.</i> , 1968 Yamada <i>et al.</i> , 1968
<i>Aspergillus niger</i>	Metil galato	30	≤60	5.0–6.5	4.5–6.5	n.d.	0.6	5	Rana y Bhat, 2005
<i>Aspergillus niger</i> Aa20	Ácido tánico	60–70	≤90	6.0	3.5–7.0	3.8	n.d.	n.d.	Ramírez <i>et al.</i> , 2003
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16620	Metil galato	30–40	≤65	6.0	4.0–8.0	n.d.	103	4.25	Sabu <i>et al.</i> 2005
<i>Aspergillus niger</i> GH1	Metil galato	60	≤50	6.0	4.0–6.0	3.5	0.041	11.03	Mata <i>et al.</i> , 2009
<i>Aspergillus niger</i> LCF8	Ácido tánico	35	≤45	6.0	3.5–8.0	4.3	n.d.	n.d.	Barthomeuf <i>et al.</i> , 1994
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	Metil galato	60	≤60	6	4.5–7.5	n.d.	0.2	5	Sharma <i>et al.</i> , 1999
<i>Aspergillus oryzae</i>	Ácido tánico	40	≤45	5.5	4.5–6.0	n.d.	7.35	83	Abdel-Naby <i>et al.</i> , 1999
<i>Candida</i> sp.	Ácido tánico	50	≤70	6.0	3.5–7.5	n.d.	n.d.	n.d.	Aoki <i>et al.</i> , 1976
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Metil galato	40	≤45	8.0	7.5–9.0	n.d.	0.62	n.d.	Iwamoto <i>et al.</i> , 2008
<i>Paecilomyces variotii</i>	Ácido tánico	55	≤55	5.5	4.5–6.5	n.d.	6.1x10 ⁻⁴	5.6	Battestín y Macedo, 2007.
<i>Penicillium variable</i>	Ácido tánico	50	≤80	5.0	3.0–8.0	n.d.	32	1.11	Sharma <i>et al.</i> , 2008
<i>Verticillium</i> sp.(TAH 1)	Ácido tánico	25	≤30	5.5	4.5–6.0	5.8	1.05	n.d.	Kasieczka-Burnecka <i>et al.</i> , 2007
<i>Verticillium</i> sp.(TAH 2)	Ácido tánico	20	≤30	5.5	5.0–7.5	6.2	1.05	n.d.	Kasieczka-Burnecka <i>et al.</i> , 2007

n.d: no determinado

FUENTE: Rodríguez *et al.*, (2011)

Las técnicas de biología molecular se emplean para mayor entendimiento de la tanasa y mejor rendimiento de la producción. Hatamoto *et al.* (1996) informaron por primera vez la secuencia completa de un gen tanasa, ellos reportaron la ausencia de los intrones en el gen de tanasa de *Aspergillus oryzae* que codifica para una secuencia de 588 aminoácidos con una señal y un peso molecular de alrededor de 64 kDa. Hipotetizaron que la tanasa consiste en dos sub-unidades de 30 y 33 kDa unidas por un enlace disulfuro. El gen de la tanasa fue transcrito como una sola cadena polipeptídica, después la señal de 18 aminoácidos fue cortada y la cadena polipeptídica se dividió en dos subunidades, se reportó que la única cadena polipeptídica fue cortada por una proteasa como KEX-II en dos cadenas de aminoácidos. Ellos concluyeron que la tanasa nativa consiste en cuatro pares de las dos sub-unidades, formando un hetero-octámero con un peso molecular de alrededor de 300 kDa. Desde entonces, el gen de tanasa de un número de microorganismos ha sido identificado por homología estructural, pero sólo pocos se confirmaron con nivel de proteína.

Recientemente León *et al.* (2011) clonaron y secuenciaron el cADN del gen de tanasa a partir de *Aspergillus niger* el marco de lectura abierta (ORF) encontró 1833bp. La 5' región no traducida (UTR), la región consiste de 1822bp y 3' UTR de 1015bp, ambas regiones son sustancialmente largas que los reportes previos para el gen de tanasa de *Aspergillus Oryzae*. Los análisis de homología de tanasa ORF desplegaron un 75% de identidad con *Aspergillus Oryzae*.

Beena *et al.* (2010) aislaron y secuenciaron el gen de tanasa a partir de cepas marinas de *Aspergillus awamori* y encontraron un ORF de 1,222bp, estudios homólogos revelan similitud alta entre el gen de *Aspergillus awamori* (77% identidad) y el gen de *Aspergillus niger* (identidad 82%). Por otro lado Boer *et al.* (2009), identificaron el gen que codifica la tanasa a partir de levaduras dimórficas *Arxula adenivorans*, el gen tiene un ORF de 1764bp y codifica una proteína de 587 amino ácidos, precedido por una secuencia de secreción N-terminal que comprende 28 residuos, la secuencia de aminoácidos deducida fue similar a la de tanasas a partir *Aspergillus oryzae* (50% de identidad) y *Aspergillus niger* (48%).

2.4.2. Mecanismo de acción de tanasa

La tanino acil hidrolasa cataliza la hidrólisis de los enlaces éster y depside (Figura 4) presentes en los galotaninos, elagitaninos, taninos complejos y los esteres del ácido gálico (Figura 5), (Mata *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2009; Chávez *et al.*, 2011b), pero sólo rompe enlaces éster sin afectar las uniones carbono-carbono, por lo cual no actúa sobre taninos condensados (Haslam y Stangroom, 1966). La función esterasa de la tanasa es cuando cataliza la hidrólisis del ácido tánico dando como productos nueve moléculas de ácido gálico y una de glucosa por cada molécula de sustrato (Figura 6). Cuyos compuestos intermediarios de esta reacción son el 1, 2, 3, 4,6-pentagaloi-glucosa; 2, 3, 4,6 tetragaloi-glucosa y dos tipos de mono-galoi glucosa (Iibuchi *et al.*, 1972; Lekha y Lonsane, 1997) y cuando el sustrato de la reacción es un metil-éster del ácido gálico o el metil galato, la tanasa produce ácido gálico y metanol (Aguilar y Gutierrez, 2001). Mientras que la función depsidasa de la tanasa es cuando la hidrólisis se da entre dos moléculas de ácido gálico (Beverini y Metche, 1990).

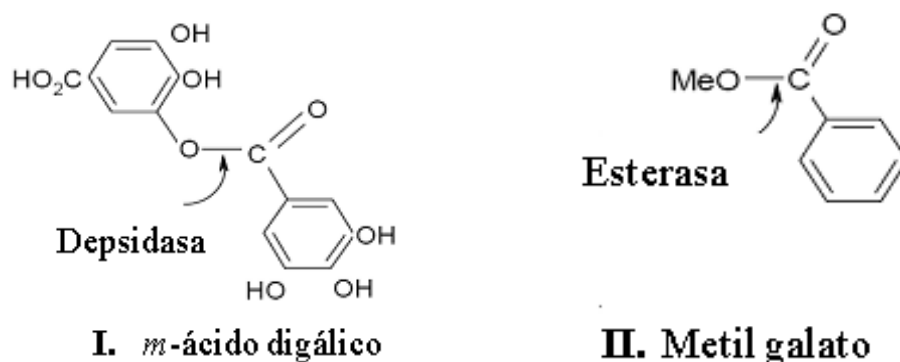


Figura 4: Actividad depsidasa y esterasa de la tanasa

FUENTE: Haslam y Stangroom (1966).

La actividad de la tanasa es secuencial, primero ocurre la escisión de los enlaces depside seguido por la hidrólisis de los enlaces éster (Belur y Mugeraya, 2011).

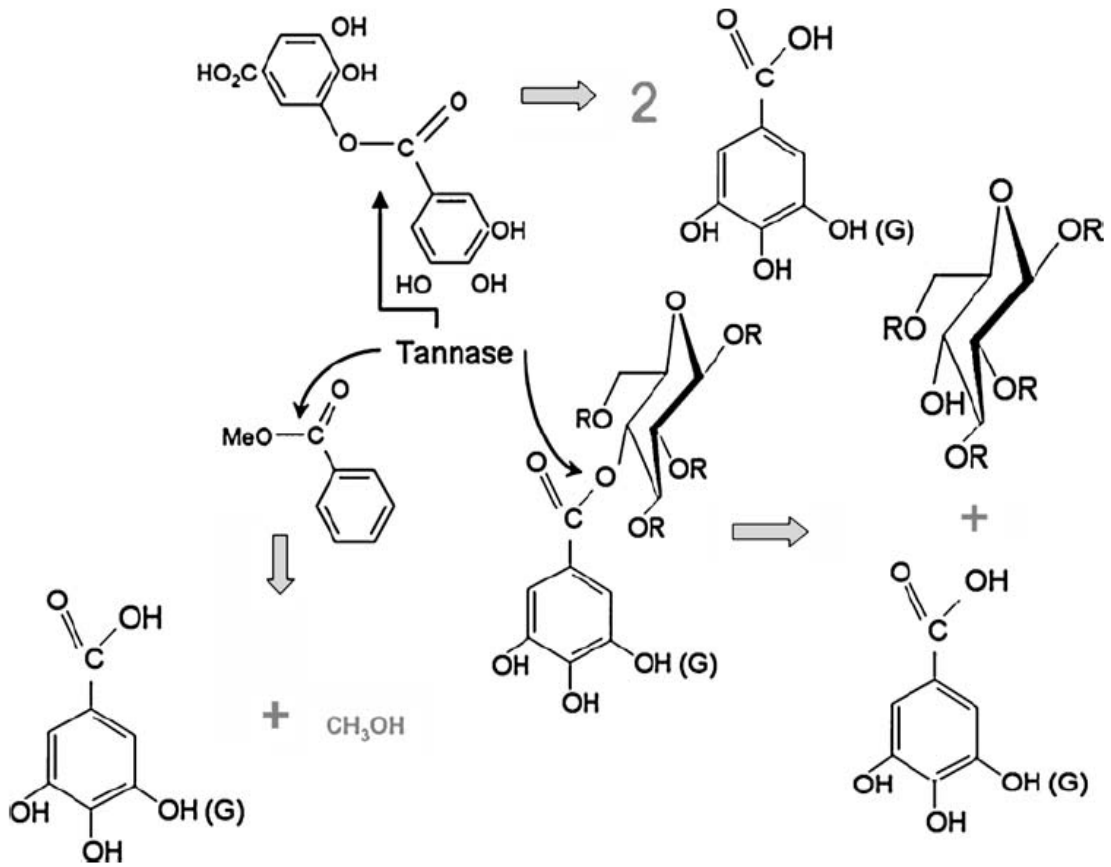


Figura 5: Degradación de los taninos hidrolizables (ácido tánico, metil galato, etil galato, n propilgalato e isosamil galato) por acción de la tanasa.

FUENTE: Aguilar (2007).

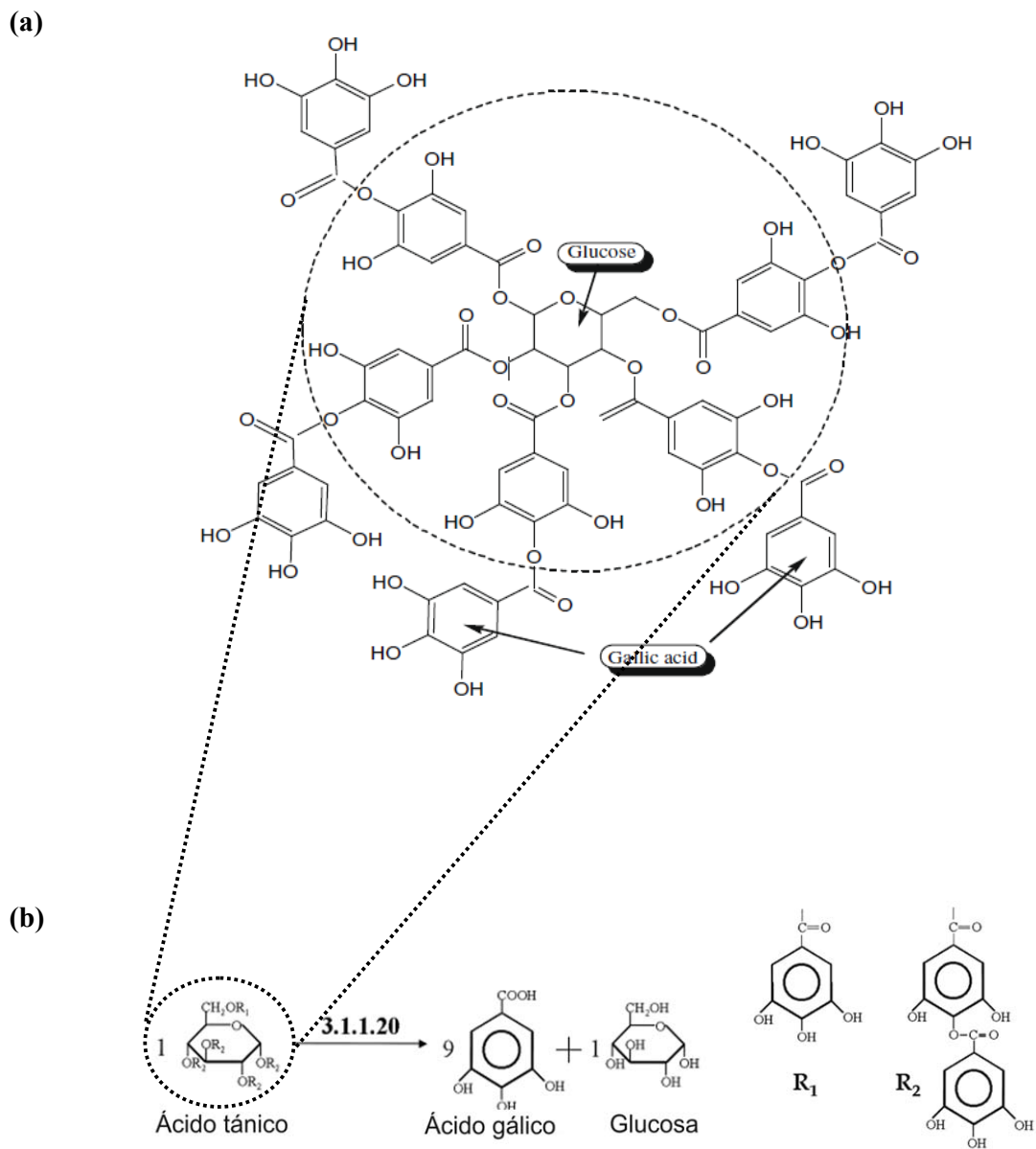


Figura 6: Estructura química del ácido tánico e hidrólisis. (a) Estructura química de ácido tánico, una glucosa deca-galoil que consta de una molécula de glucosa central esterificada a cinco hidroxilos y el resto con dos moléculas de ácido gálico. El círculo sombreado destaca la pentagaloil glucosa y la estructura del núcleo de ácido tánico, (b) hidrólisis del ácido tánico catalizada por la THA.

FUENTE: Gülçin *et al.* (2010); Aguilar y Gutiérrez (2001).

2.4.3. Sustratos de la enzima

Los sustratos de la enzima tanasa pueden ser de origen natural y sintético

- El metil galato (MG) se puede obtener de diversas plantas utilizadas en medicina tradicional, como *Toona sinensis*, *Caesalpineia ferrea* Mart, *Sapium sebiferum*, y también se puede producir de manera sintética. Estructuralmente, es un ácido benzoico metilado y triplemente sustituido con grupos hidroxilo en las posiciones 3, 4 y 5 del anillo aromático. Se ha demostrado que el metil galato tiene propiedades antioxidantes en eritrocitos humanos y en células Madin-Darby de riñón canino (MDCK). Este compuesto previene el stress oxidativo capturando especies reactivas de oxígeno intracelular, inhibiendo la peroxidación lipídica y previniendo la disminución de glutatión (Morales *et al.*, 2007)
- Los taninos son compuestos polifenólicos naturales ampliamente distribuidos en varias partes de las plantas vasculares (Pepi *et al.*, 2010) con un rango de peso molecular de 0.5-3KDa (Krishnasamy, 2009; Chávez *et al.*, 2011b), son considerados productos secundarios del metabolismo de las plantas, porque no juegan ningún papel directo en este proceso bioquímico, después de la lignina los taninos son el segundo grupo más abundante de los compuestos fenólicos (Aguilar, 2007 y Gutiérrez, 2001) tienen varias actividades biológicas importantes, tales como un mecanismo de defensa contra enfermedades causadas hongos, bacterias y virus, protegen el tejido de las plantas del ataque de insectos y herbívoros (Chávez *et al.*, 2011).

Estos compuestos fenólicos no nitrogenados Khanbabae y Van Ree (2001) se diferencian de los demás por tener la capacidad de formar complejos fuertes con el almidón, proteínas, celulosa, minerales (Gutiérrez, 2001; Aguilar, 2007; Bele *et al.*, 2010) y enzimas digestivas incluyendo pectinasa, amilasa, lipasa, proteasa, celulasa y β -galactosidasa. Estas propiedades de los taninos los hacen tóxicos o anti-nutricionales para los animales rumiantes, reduciendo el consumo de alimento, la disponibilidad de nutrientes y la digestibilidad de la proteína (Yao *et al.*, 2013).

El grupo fenólico de un tanino es un excelente donante de hidrógeno, forma enlaces fuertes de hidrógeno con el grupo carboxilo de la proteína, por esta razón, los taninos tienen mayor afinidad por la proteína que por el almidón (Maity *et al.*, 2009).

La masa molar de las moléculas de taninos afecta las características del tanino directamente, se ha encontrado que cuanto mayor es la masa molar de las moléculas de taninos, los efectos antinutricionales son más fuertes y las actividades biológicas más bajas (Chung *et al.*, 1998).

Los principios activos de las plantas medicinales son frecuentemente compuestos polifenólicos, actualmente se ha incrementado un interés científico por este grupo de compuestos, porque ellos tienen propiedades antioxidantes y anticancerígenas, cuyo mecanismo de acción es la precipitación de minerales (metales pesados y algunos alcaloides, excepto la morfina), debido a estas características los taninos se pueden utilizar en el tratamiento de envenenamiento causado por estas sustancias (Khanbabaee y Van Ree, 2001).

Clasificación de los taninos

En la actualidad, la clasificación más aceptada, dividen a los taninos en cuatro grupos: Galotaninos, elagitaninos, taninos complejos y taninos condensados como se muestra en la Figura 7 (Khanbabaee y Van Ree, 2001).

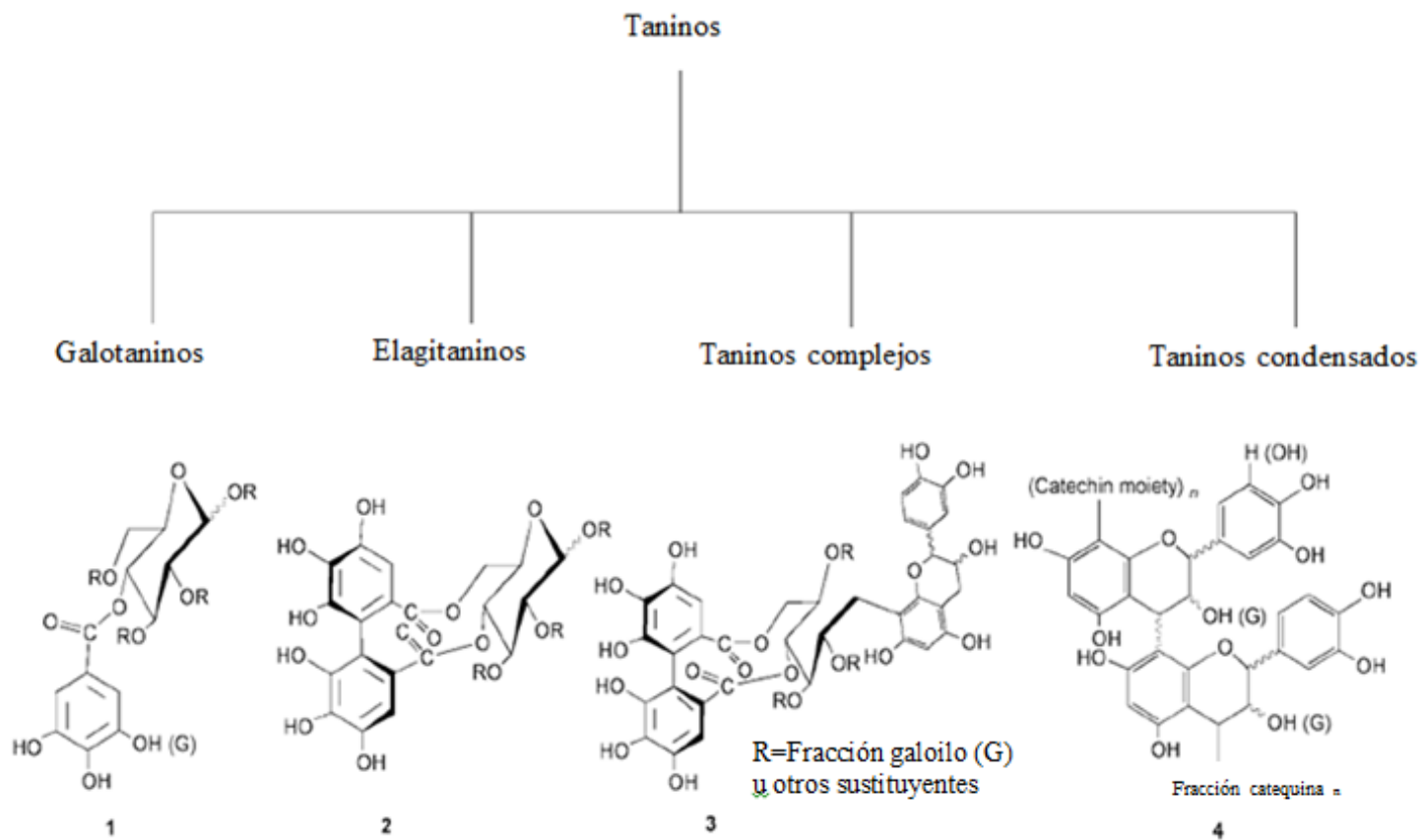


Figura 7: Clasificación de los taninos

FUENTE: Khanbabaee y Van Ree (2001).

Galotaninos son ésteres de ácido gálico ligado a un núcleo de azúcar, usualmente glucosa, mientras que los elagitaninos son ésteres de ácido elágico también vinculados a un núcleo de azúcar (Aguilar *et al.*, 2007). Taninos complejos consisten de una unidad de galotanino o elagitanino y una catequina. Taninos condensados, son proantocianidinas oligoméricas y que contienen flavan-3-ol (catequina) o flavan-3,4-diol enlazados por C-C (Belmares *et al.*, 2004).

2.4.4. Fuentes de obtención de la enzima tanasa

La enzima tanasa puede ser obtenida a partir de plantas, animales y fuentes microbianas. En las plantas, la enzima está presente en los vegetales ricos en taninos (frutos, hojas, ramas y cortezas de los árboles) como konnam, mirobolano y badul, también se encuentra en los animales como se muestra en el Cuadro 4 (Murugan *et al.*, 2007).

Cuadro 4: Fuentes vegetales y animales de tanasa

Fuentes plantas	
Myrobolan (<i>Terminalia chebula</i>)	Frutos
Dhawa (<i>Anogeissus latifolia</i>)	Hojas
Konnam (<i>Cassia fistula</i>)	Corteza
Babul (<i>Acacia arabica</i>)	Corteza
Avaram (<i>Cassia auriculata</i>)	Corteza
Pedunculate oak (<i>Quercus ruber</i>)	Hojas
Pods of divi-divi (<i>Caesalpinia coriaria</i>)	Frutos
Fuentes animales	
Ganado bovino	mucosa del Rumén
	mucosa de la membrana

FUENTE: Treviño *et al.* (2007).

Desde los años 1970 ha habido algunos informes sobre la purificación de tanasa a partir de fuentes vegetales y microbianas (Abdulhameed *et al.*, 2005) la fuente más importante para la obtención de la enzima es la vía microbiana (Cuadro 5) (Lekha y Lonsane, 1997; Aguilar *et al.*, 2007), son más estables que las obtenidas por otras fuentes (Murugan *et al.*, 2007). A través de los procesos de fermentación se pueden producir grandes cantidades de enzimas en forma constante siendo controlados más fácilmente (Lekha y Lonsane, 1997), dentro de la vía microbiana los productores son bacterias, levaduras (Lekha y Lonsane, 1996; Bhat *et al.*, 1998) y hongos filamentosos (Seth y Chand, 2000), principalmente *Aspergillus*, *Penicillium* (Lekha y Lonsane, 1997), *Fusarium* y *Trichoderma* Aguilar *et al.*, (2001a), también se ha expresado en *Pichia pastoris* recombinante de *Aspergillus oryzae* (Abdulhameed *et al.*, 2005). De todos los microorganismos capaces de producir tanasa, *Aspergillus sp.* Son los productores más eficientes de esta enzima (Hendrik, 2002).

El hongo *Aspergillus* fue reconocido por primera vez como un organismo en 1729 por Micheli, tiene más de 180 especies reconocidas oficialmente, y comprende en particular un grupo importante de especies ascomicetos filamentosos entre ellos, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger* y se encuentran dentro de los Generalmente Reconocimos como Seguros (GRAS) en la lista de la FDA de los Estados Unidos, estas especies de *Aspergillus* se utilizan en la producción comercial de enzimas y muchos productos valiosos, sus genes y genomas están siendo ampliamente investigados, para ello se hace muchos esfuerzos para comprender los mecanismos celulares asociados, y ampliar estas aplicaciones, *Aspergillus niger* es huésped natural en la industria y la biotecnología para la producción de proteínas fúngicas, mamíferas y metabolitos (Ward *et al.*, 2006).

La enzima tanasa producida por hongos, puede estar presente en el micelio unida a la membrana (intracelular) (Barthomeuf *et al.*, 1994) o secretarse fuera de la célula (extracelular) (Lekha y Lonsane, 1994), esta enzima es inducible, formada por el micelio de los hongos de diferentes especies (Bradoo *et al.*, 1997) en presencia de diferentes inductores, muestran un gran crecimiento y producción para la obtención de diferentes tipos de tanasa (Bajpayi Patil, 1997).

Cuadro 5: Fuentes microbianas de tanasa

Microorganismos	Referencias
Hongos filamentosos	
<i>Aspergillus awamori</i>	Beena <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus niger</i>	Mata <i>et al.</i> , 2009
<i>Aspergillus oryzae</i>	Hatamoto <i>et al.</i> , 1996
<i>Aspergillus aculeatus</i>	Banerjee <i>et al.</i> , 2007
<i>Aspergillus aureus</i>	Bajpai and Patil, 1997
<i>Aspergillus awamori</i>	Beena <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus candidus</i>	Murugan and Al-Sohaibani, 2010
<i>Aspergillus ficuum</i>	Lu y Chen, 2009
<i>Aspergillus fischeri</i>	Bajpai y Patil, 1997
<i>Aspergillus flavus</i>	Yamada <i>et al.</i> , 1968
<i>Aspergillus foetidus</i>	Naidu <i>et al.</i> , 2008
<i>Aspergillus gallomyces</i>	Belmares <i>et al.</i> , 2004
<i>Aspergillus heteromorphus</i>	Chhokar <i>et al.</i> , 2010
<i>Mucor sp.</i>	Belmares <i>et al.</i> , 2004
<i>Paecilomyces variotii</i>	Battestin y Macedo, 2007a
<i>Penicillium glabrum</i>	Van de Lagemaat y Pyle, 2001
<i>Penicillium glaucum</i>	Lekha and Lonsane, 1997
<i>Verticillium sp.</i>	Kasieczka-Burnecka <i>et al.</i> , 2007
Levaduras	
<i>Arxula adenivorans</i>	Boer <i>et al.</i> , 2009
<i>Candida sp</i>	Aoki <i>et al.</i> , 1976
<i>Candida utilis</i>	Shi <i>et al.</i> , 2005
<i>Mycotorula japonica</i>	Belmares <i>et al.</i> , 2004
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Zhong <i>et al.</i> , 2004
Bacterias	
<i>Bacillus cereus</i>	Mondal <i>et al.</i> , 2001
<i>Enterobacter sp</i>	Sharma y John, 2011
<i>Enterococcus faecalis</i>	Goel <i>et al.</i> , 2005
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Iwamoto <i>et al.</i> , 2008
<i>Lactobacillus brevis</i>	Mattews <i>et al.</i> , 2006
<i>Lactobacillus buchneri</i>	Mattews <i>et al.</i> , 2006
<i>Lactobacillus casei</i>	Mattews <i>et al.</i> , 2006
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Mattews <i>et al.</i> , 2006
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Mattews <i>et al.</i> , 2006
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	Mattews <i>et al.</i> , 2006
<i>Microbacterium terregens</i>	Belur <i>et al.</i> , 2010
<i>Oenococcus oeni</i>	Mattews <i>et al.</i> , 2006
<i>Pantonea sp.</i>	Pepi <i>et al.</i> , 2010
<i>Pediococcus acidilacti</i>	Mattews <i>et al.</i> , 2006
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Mattews <i>et al.</i> , 2006
<i>Providencia rettgeri</i>	Belur <i>et al.</i> , 2010
<i>Selenomonas ruminantium</i>	Skene y Brooker, 1995
<i>Serratia ficaria</i>	Belur <i>et al.</i> , 2010a
<i>Serratia marcescens</i>	Belur <i>et al.</i> , 2010a
<i>Serratia sp.</i>	Pepi <i>et al.</i> , 2010
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	Noguchi <i>et al.</i> , 2007
<i>Streptococcus bovis</i>	Belmares <i>et al.</i> , 2004

FUENTE: Rodriguez *et al.* (2011)

2.4.5. Aplicaciones y usos potenciales de la tanasa

La tanasa es una enzima con importantes aplicaciones en varios campos de la ciencia y la tecnología (Rodríguez *et al.*, 2011); liderando la industria alimentaria (remueve los efectos indeseables de los taninos) (Abdel-Nabey *et al.*, 2011), seguida por las bebidas, productos farmacéuticos, tratamiento de la piel, e incluso en biorremediación. La propiedad del complejo catalítico de la tanasa ha mejorado su importancia comercial (Lekha y Lonsane, 1997; Aguilar *et al.*, 2007). Varias patentes sobre los usos de la enzima tanasa se muestran en el Cuadro 6.

Cuadro 6: Patentes seleccionadas de la aplicación de tanasa publicada durante los últimos 10 años.

Año	Representante	Título	Nº de patente
2001	Quest International Nederland	Proceso para la producción de cerveza para mejorar la estabilidad del sabor.	EP 1122303
2002	Unicafe Inc	Estabilización de los extractos de té para su conservación a largo plazo y un método de producción de la misma.	USP 6.365.219
2002	Purdue Research Foundation Pharmanex, Inc.	Formulaciones de catequina de té y procesos para fabricar la misma.	USP 6.428.818
2004	Universidad del Sur de Florida	Compuesto vasodilatadores y método de uso.	USP 6.706.756
2004	Purdue Research Foundation	Composición basada en la sinergia de vaniloide-catequina para la prevención del cáncer.	USP 6.759.064
2004	Lipton, división de Conopco, Inc.	Infusión de té helado.	USP 6.780.454
2004	Hakko Kogyo Co., Ltd.	Proceso para la purificación de oligómeros de proantocianidina.	USP 6.800.433
2004	Lipton, división de Conopco, Inc.	Infusión de hojas de té en agua helada	USP 6.833.144
2006	Nestec SA	Un producto de café soluble.	EP 1726213
2006	Eisai Co., Ltd.	Agente de diagnósticos y método de prueba para cáncer de colon usando tanasa como indicador.	USP 7.090.997
2006	Unilever Bestfoods	Elaboración de Negro del té.	USP 7.108.877
2007	Eisai R&D Man Co. Ltd.	Gen de tanasa nueva y proteína de la misma.	EP 1837400
2008	Probelte Pharma SA	Procedimiento para la preparación de extractos de granada.	EP 1967079
2008	Novozymes, Inc.	Métodos para degradar materiales lignocelulósicos.	USP 7.354.743
2008	Compañía Procter & Gamble	Kit generador de espuma y un dispensador que genera espuma y una composición que contiene un alto nivel de surfactante.	USP 7.402.554
2008	Novozymes, Inc	Métodos para degradar o convertir polisacáridos de la pared celular vegetal.	USP 7.413.882
2009	Kirin Brewery	Método de tratamiento enzimático para hojas de té verde.	. EP 2036440
2009	Kao Corp.	Bebidas envasado en envases de espuma.	EP 2036446
2009	Kao Corp.	Bebida de té verde envasado.	EP 2098121
2009	Colgate-Palmolive Co.	Composición oral antiplaca que contiene enzimas y ciclodextrinas.	USP 7.601.338
2009	Novozymes, Inc.	Métodos para mejorar la degradación o conversión de materiales celulósicos.	USP 7.608.689
2010	Kao Corp.	Proceso para la producción de extracto de té purificado	EP 2225952
2010	Universidad de California	Método para reducir la presión arterial en los prehipertensos y / o las personas con síndrome metabólico.	USP 7.651.707
2010	JM Huber Corporation	Materiales de alta limpieza de sílice y dentífrico que contienen los mismos.	USP 7.670.593
2010	Novozymes, Inc.	Polipéptidos que tienen actividad potenciadora celulolítica y ácidos nucleicos que codifican la misma.	USP 7.741.466
2010	Constellation Brands Inc.	Extractos de uva, suplemento dietético de los mismos, y por lo tanto de los procesos.	USP 7.767.235
2011	Taiyo Kagaku Co., Ltd	Composición para inhibir la trombosis	USP 7.914.830
2011	Danisco EE.UU. Inc.	Poliol oxidasa.	USP 7,919,2

FUENTE: Rodriguez *et al.* (2011)

2.4.5.1. Aplicación Industrial

a. Industria farmacéutica

La mayor aplicación de la enzima tanasa es la producción de ácido gálico (ácido 2, 3,4-trihidroxibenzoico) (Abdulhameed *et al.*, 2005), es un compuesto fenólico y la unidad monomérica de los galotaninos y taninos complejos (Ow y Stupans, 2003). Su uso principal es la fabricación de un medicamento antipalúdico trimetoprim (Lekha y Lonsane, 1997; Van de Lagemaat y Pyle, 2006) el ácido gálico posee un amplio rango de actividad biológica, tal como antioxidante, antibacterial, antiviral y analgésico, así como también muestra actividad citotóxica contra las células cancerígenas, sin dañar las células normales (Ow y Stupans, 2003; Beniwal y Chhokar, 2010). En la industria alimentaria es usado como sustrato para la síntesis química o enzimática Aguilar y Gutiérrez (2001) de los conservantes, tales como galatos, pirogalol y galato de propilo que son antioxidantes muy importantes en los alimentos (grasas, aceites y bebidas) (Srivastava y Kar, 2009; Belur y Mugeraya, 2011).

Por otro lado la enzima tanasa es beneficiosa para facilitar la ruptura de la mancha extrínseca de los dientes y es útil en la hidrólisis de los taninos que alteran el color de la superficie del diente (Du-Thumm, *et al.*, 2005).

b. Industria alimentaria

La producción industrial de enzimas para el procesamiento de alimentos se remonta a 1874, cuando el científico danés Cristiano Hansen extrae renina (quimosina) del estómago de terneros para su uso en la fabricación de queso (Nielsen *et al.*, 1994).

b.1. Producción de jugos, vino y cerveza

Actualmente vienen tomando importancia nuevos jugos de fruta (granada, arándano, frambuesa, etc) por sus beneficios saludables, en particular, por su propiedad antioxidante. Sin embargo, el contenido alto de taninos en los frutos es responsable de la formación de niebla y sedimentos, así como el color, amargor y la astringencia del jugo durante el almacenamiento. El tratamiento enzimático con tanasa puede ayudar a liberar los

monómeros de los taninos y mejorar el estado nutricional y las propiedades antioxidantes de estas bebidas (Aguilar *et al.*, 2007).

Por otro lado Rout y Banerjee (2006), al usar la enzima tanasa eliminaron el amargor del zumo de granada resultando en una degradación del 25% de taninos, mientras que una combinación de tanasa y gelatina (1: 1) dio lugar a 49% de degradación de taninos, este tratamiento no tiene ningún efecto negativo sobre los atributos bioquímicos y de calidad. Cuando se realizó la hidrólisis por tanasa inmovilizada se eliminó hasta 73,6% de los taninos presentes en el jugo de grosella India (*Phyllanthus emblica*) este tratamiento enzimático reduce el contenido de tanino, pero aumentó la concentración de ácido gálico con una reducción mínima en vitamina C (sólo 2%) (Srivastava y Kar, 2009; Srivastava y Kar, 2010) y en bebidas refrescantes con sabor a café actúa como agente clarificante (Belmares *et al.*, 2004), recientemente se ha planteado, un proceso para mejorar las propiedades antioxidantes del café por tanasa y otras enzimas (Bel-Rhlid *et al.*, 2009).

También la enzima es utilizada en los mostos de uva y cebada como tratamiento pre fermentativo, junto con lo convencional para estabilizar el vino y la cerveza (Cantarelli *et al.*, 1989), así mismo en la elaboración de vino de bellota, favoreciendo la producción de una bebida con mejor contenido alcohólico de 10%, azúcares reductores de 7%, pH de 4.0 y un mejor sabor en la bebida (Aguilar y Gutiérrez, 2001).

b.2. Producción de té

Después del agua, el té es la segunda bebida de mayor consumo en todo el mundo (Venditti *et al.*, 2010) es una infusión obtenida a partir de hojas de *Camellia sinensis* (Luczaj y Skrzydlewska, 2005) la bebida de té se asocia con la reducción de colesterol sérico, la prevención de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, la disminución del riesgo de enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Karak y Bhagat, 2010). Durante la producción de bebidas de té caliente e infusiones claras, tienden a formar precipitados turbios después del enfriamiento, estos precipitados llamados crema de té (Lu *et al.*, 2009), se forman por polimerización de compuestos fenólicos y su interacción con la cafeína (Aguilar y Gutiérrez, 2001) la formación de la crema del té es una cualidad problema y puede tener efectos antinutricionales (Lu *et al.*, 2009).

Los procesos químicos para remover los precipitados del té pueden eliminar una gran cantidad de compuestos aromáticos (Aguilar y Gutiérrez, 2001). Sin embargo, por tratamientos enzimáticos, la tanasa puede hidrolizar los enlaces éster de catequinas para liberar ácido gálico libre y compuestos solubles en agua con menor peso molecular, reduciendo la turbidez y aumentando la solubilidad de la bebida de té en agua fría (Albertse, 2002; Su *et al.*, 2009), estos tratamientos dan como resultado un mejor color, menos formación de crema, mejor sabor, mejor sensibilidad en la boca, y la aceptación general (Lu *et al.*, 2009). La hidrólisis de los fenoles principales del té, galato epigalocatequina y galato epicatequina a epigalocatequina y epicatequina, respectivamente, aumenta la actividad antioxidante de la bebida de té (Lu y Chen, 2008). Así mismo el tratamiento enzimático del té verde inhibe los efectos carcinogénicos y mutagénicos de las N- nitrosaminas (Lu y Chen, 2007), mejorando la estabilidad del color y las propiedades organolépticas (Lu *et al.*, 2009).

c. Alimentación animal

Es bien conocido que niveles altos de taninos dietarios tienen efectos negativos en la alimentación animal, estos efectos están relacionados con su capacidad para unirse a macromoléculas formando complejos fuertes con enzimas, minerales y otros nutrientes lo cual interfieren con la digestión, son capaces de inhibir las enzimas digestivas en la saliva y el rumen, por lo tanto reducen la absorción de nutrientes, también son responsables del sabor amargo, lo que reduce considerablemente el consumo de alimento (Belmares *et al.*, 2004). Son muy abundantes en la naturaleza y se encuentran ampliamente en piensos, alimentos balanceados, forrajes y residuos agroindustriales esta presencia de taninos afecta el crecimiento y la producción de leche en diferentes formas (Krueger *et al.*, 2010).

Los efectos antinutricionales de los taninos podrían reducirse mediante un tratamiento con tanasa o producción de tanasa por microorganismos para mejorar la digestibilidad. (Aguilar *et al.*, 2007) Hay algunos cultivares de sorgo con alto contenido de taninos los cuales pueden ser reducido por tratamientos enzimáticos, y este material puede ser utilizado como complemento en la dieta de los animales (Aguilar y Gutiérrez, 2001).

Por otro lado Chávez *et al.* (2011b) Informaron de la producción de un extracto enzimático que contiene tanasa de residuos miceliales de la fabricación de penicilina, esta preparación se aplicó a varias harinas (cebada, salvado, maíz, avena, centeno, soja y trigo) utilizadas para la alimentación animal. El extracto enzimático del residuo micelial libera cantidades

similares de azúcares reductores de todas las harinas cuando se compara con un aditivo enzimático comercial usado en la alimentación animal, estas observaciones indican que la preparación que contiene tanasa tiene un potencial alto como suplemento para la alimentación animal.

d. Biorremediación de aguas residuales con taninos contaminados.

Los taninos se producen comúnmente en los efluentes procedentes de varias agroindustrias, sobre todo de curtiembre y café que pueden resultar en polución ambiental (Bhat *et al.*, 1998), el tratamiento de este tipo de aguas residuales es por lo general difícil, porque los taninos son altamente solubles e inhiben el crecimiento de muchos microorganismos (He *et al.*, 2007), se puede utilizar potencialmente la enzima tanasa para degradar estos compuestos (Belmares *et al.*, 2004).

Kachouri *et al.* (2005) estudiaron la biodegradación y decoloración de aguas residuales de olivo molido por *Aspergillus flavus*. El microorganismo elimina 58% de color y 46% de la demanda de oxígeno químico de las aguas residuales después de 6 días de cultivo, los autores asocian esta degradación con la producción deconcomitante de tanasa, ya que no se detectaron actividad de lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa, siendo esta última menor que la actividad de tanasa. Recientemente, Murugan y Al-Sohaibani (2010) informaron del uso de tanasa inmovilizada a partir de *Aspergillus candidus*, para la eliminación de taninos y el color asociado a los efluentes de curtiduría, el tratamiento enzimático elimina cerca 42% del contenido de tanino y 20% del color de curtiduría de aguas residuales, estos hallazgos sugieren que la tanasa o la producción de tanasa por microorganismos pueden ser utilizados para un tratamiento previo de aguas residuales ricos en taninos. Sin embargo, es necesario realizar más investigaciones para aplicar tratamientos biológicos a gran escala.

e. Otras aplicaciones importantes de la tanasa

La producción de etanol, combustible a partir de residuos agroindustriales ha ganado mucha atención en los últimos años, cuando estos materiales de alimentación son pretratados por deslignificación, se generan compuestos fenólicos simples u oligoméricos y

derivados a partir de la lignina, estos compuestos pueden inhibir la hidrólisis catalizada por las celulasas. La enzima tanasa puede ser utilizada para degradar estos compuestos fenólicos oligoméricos y al hacerlo, mitigar la inhibición en la celulolisis (Tejirian y Xu, 2011). El gen y la actividad de la enzima tanasa se pueden utilizar para la identificación de *Staphylococcus lugdunensis* en los seres humanos como un indicador de cáncer de colon (Noguchi *et al.*, 2007), también ha sido utilizada para la producción de moléculas con aplicaciones terapéuticas, tales como algunos ésteres derivados de prunioside A con actividad anti-inflamatoria (Jun *et al.*, 2007).

Otras aplicaciones de tanasa se encuentran en la fabricación de detergentes de lavandería como aditivos, en cosmetología para eliminar la turbidez de los extractos de plantas, y en la industria de curtiembre para homogeneizar la preparación de taninos para cueros con alto grado de taninos (Lekha y Lonsane, 1997; Dykstra *et al.*, 2011).

2.4.6. Producción industrial de la enzima tanasa

Durante mucho tiempo la producción industrial de tanasa se llevó a cabo exclusivamente en sistemas de Fermentación sumergida (FS), donde la enzima es intracelular implicando costos adicionales de 50-80 % para el downstream processing (corriente de salida) (Belmares *et al.*, 2004; Mata *et al.*, 2009). Sin embargo en los últimos años, una serie de investigaciones han demostrado las ventajas de la Fermentación en sustrato sólido (FSS) para producción de esta y otras enzimas, debido a la completa expresión de la enzima en forma extracelular (Aguilar, 2007; Mata *et al.*, 2009), estas ventajas son: Mayores títulos de actividad, mayor productividad, naturaleza extracelular de la enzima y mayor estabilidad a cambios de pH y temperatura. Además, la FSS permite la construcción de reactores más compactos, con menor gasto energético y causando menos daño al ambiente (Aguilar *et al.*, 2007). Por otro lado, la inmovilización de la enzima tanasa ofrece varias ventajas con respecto a las enzimas libres, tales como la mejora en la estabilidad de la enzima, la reutilización de biocatalizadores, la facilidad de recuperación del producto, y el funcionamiento continuo en biorreactores de lecho compacto (Schons *et al.*, 2011).

Actualmente la tanasa es comercializada por cuatro empresas: Biocon (India), Kikkoman (Japón), ASA special enzyme GmbH (Alemania) y JFC GmbH (Alemania) con diferentes

unidades catalíticas, dependiendo de la presentación del producto. Dentro de ellas Kikkoman y Biocon producen tanasa mediante FES (Aguilar *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2010).

a. Recuperación de la enzima tanasa

El método para la recuperación de la enzima tanasa depende del sistema de producción, el microorganismo utilizado, y el tiempo de extracción. En la FSS se produce principalmente tanasa extracelular y la recuperación se da con mayor facilidad, sólo se tiene que añadir dos o tres volúmenes de agente de extracción (agua destilada o buffer) luego mezclar y comprimir, para obtener un extracto de enzima (Aguilar *et al.*, 2007).

En el caso de la FS la localización de la enzima depende del tiempo de cultivo, generalmente al principio de la fermentación se produce de forma intracelular, por ende la recuperación de la enzima implica la ruptura celular y el tratamiento con algún agente extractor. La ruptura celular se puede conseguir con tratamientos enzimáticos o por ruptura mecánica con mortero o un homogeneizador; en etapas posteriores, la tanasa es excretada al medio y su recuperación es más sencilla, sólo es necesario retirar las células por filtración o centrifugación. Sin embargo, en el momento de mayor concentración de tanasa, más del 80% de la enzima permanece unida al micelio (Barthomeuf *et al.*, 1994).

b. Purificación de la enzima tanasa

La purificación de enzimas se realiza con la finalidad de aumentar su poder catalítico, mejorar la estabilidad, y prevenir reacciones no deseadas (Chávez *et al.*, 2011b) para el caso de la enzima tanasa el proceso de purificación es uno de los aspectos menos desarrollados. La mayoría de publicaciones de protocolos de purificación consisten en procedimientos de varios pasos que pueden obtener una enzima altamente purificada, pero con un bajo rendimiento de recuperación. Probablemente la estrategia más común que se utiliza para la purificación de la enzima tanasa, está basada en la concentración de proteína seguido por intercambio iónico y/o cromatografía de filtración en gel (Mahendran *et al.*, 2006; Chhokar *et al.*, 2010).

Actualmente se viene utilizando una nueva metodología para el aislamiento de la enzima tanasa de su fuente natural, conocidos como los sistemas de dos fases acuosas (ATPS), ellos son formados mediante la mezcla de dos polímeros de cadena flexibles en agua o un polímero y una sal a ciertas concentraciones. Las proteínas se reparten entre las dos fases con un coeficiente de partición que puede ser modificado mediante el cambio de las condiciones experimentales del medio tales como el pH, sales, y la fuerza iónica, entre otras. Se ha utilizado en la primera etapa de purificación ya que tal sistema permite la eliminación de grandes cantidades y diferentes tipos de contaminantes. El método es adecuado para el aislamiento de la enzima tanasa ya que se obtuvo una recuperación de 96 % de la actividad inicial en una sola extracción con un factor de purificación de 7.0, además se elimina el ácido tánico (Rodríguez *et al.*, 2013).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El trabajo de investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Microbiología de alimentos, Análisis Físicoquímicos, Biotecnología e Investigación, envases y embalajes, instalaciones pertenecientes a la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

3.2. MICROORGANISMOS

Se utilizó *Aspergillus niger* ATCC (American Type Culture Collection) 10864.

3.3. SOPORTE PARA EL DESARROLLO DE BIOPELÍCULAS

Tela de tejido punto circular

Filamento: poliéster texturizado (100/1)

3.4. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

3.4.1. Equipos e instrumentos

- Lector de placas (Power wave XS2 BIOTEK)
- Baño María con agitación GLF®1083
- Autoclave Electric Steroclave (SOTU AKL5)
- Cámara de flujo laminar (ULPA –ISOCIDE CLASE II TIPOS A2, LA2-4A3)- 720W)
- Centrifuga (BOECO GERMANY U-320R)
- Bomba de vacío Greffenberger Antriebs technik made in Germany
- Estufa de 30 °C y 90°C FICHER
- Espectrofotómetro UNICO ® UV-2100
- Balanza electrónica ADVENTURER PRO AV812.OHAUS CORPORATION®, USA.
Cap. 810g, d=0.01g.
- Balanza analítica capacidad AND GR-200. 210g.10mg.e=1mg.d=0.1mg.

- Microscopio compuesto (LEYCA DM750)
- Potenciómetro FISHER ACCUMMENT
- Refrigerador-Congelador BOSH KDN49
- Congeladora COLDEX CH10P
- Selladora
- Termómetro (0 – 100° C ± 2°)
- Agitador orbital de rotación circular VELP WIZARD
- Agitador magnético (HANNA HI 200M)
- Micropipetas BRAND (10 a 100 y de 100 a 1000ul)

3.4.2. Materiales

- Membrana de dialysis tubular 4 RC 12,000 Dalton MWCO flat with: 25mm, 16mm x 30.5m Spectrum.
- Camara de Newbauer
- Contómetro
- Placas de 96 micropozos
- Asa de kolle
- Embudo buchner
- Erlenmeyers de 125, 250, 500
- Mechero de gas y alcohol
- Beakers de 10,50, 100, 250, 300, 500, 1000ml
- Fiolas
- Matraces
- Kitasato
- Papel filtro Whatman N° 1, 2, 42
- Pipetas 1, 2, 5, 10, 25 ml
- Pipeteadores de 5 y 10ml
- Pinzas
- Tela poliester
- Tips de 100, 500, 1000ul
- Tubos ependorf de 1, 1.5 y 2ml
- Tubos de centrifuga 15 y 50ml

- Tubos de ensayo de 5 y 10ml
- Placas Petri
- Porta y cubre objeto
- Probetas

3.4.3. Reactivos

- Rodanina metanólica (SIGMA –ALDRICH)
- Acido tánico (MERCK)
- Agar Agar (MERCK)
- Glucosa (MERK)
- Acido gálico 100% (SIGMA-ALDRICH)
- Metil galato (SIGMA –ALDRICH)
- Buffer citrato 0.05M pH 5.5
- Buffer fosfato pH 7
- Hidróxido de sodio 1N
- Ácido clorhídrico 1N
- Reactivo de Folin & Ciocalteu 2N (MERK)
- Solución al 2% de carbonato de sodio en NaOH 0.5M
- Solución de sulfato de cobre al 0.5%
- Solución de tartrato de cobre al 1%
- Tween 80 0.1% (QUIMICA SERVICE)
- Solución estándar de albumina sérica bovina 0.5mg/ml
- Solución de hidróxido de potasio al 0.5M
- Ácido tricloro acético (ATC) al 10% (SIGMA –ALDRICH)
- Solución estándar de ácido tánico 0.1mg/ml
- Sales minerales (g/L): KH_2PO_4 ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

3.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.5.1. Determinación de biomasa.

La producción de biomasa fúngica (biomasa adherida al soporte, y la biomasa no adherida) se determinó por diferencia de peso seco, para la biomasa no adherida se filtró el contenido de cada matraz en papel filtro Whatman N° 42 previamente pesado, luego el papel filtro fue secado a 90°C por 24 horas hasta obtener un peso constante, la biomasa adherida (biomasa en tela) se determinó con la ayuda de una bagueta, el cual se comprimió todo el líquido adsorbido por la tela, posteriormente la tela contenida de biomasa fue secada a 90°C hasta peso constante (Villena y Gutiérrez, 2006).

3.5.2. Actividad enzimática.

La actividad enzimática de tanasa extracelular fue evaluada por el método espectrofotométrico, consiste en la medición del ácido gálico liberado durante la reacción enzimática, utilizando como sustrato metil-galato (es un éster del ácido gálico), la medición del ácido gálico se basa en la formación de un cromóforo entre dicho ácido y la 2-tio-4- cetotiazolidina también conocida como rodanina (Figura 8).

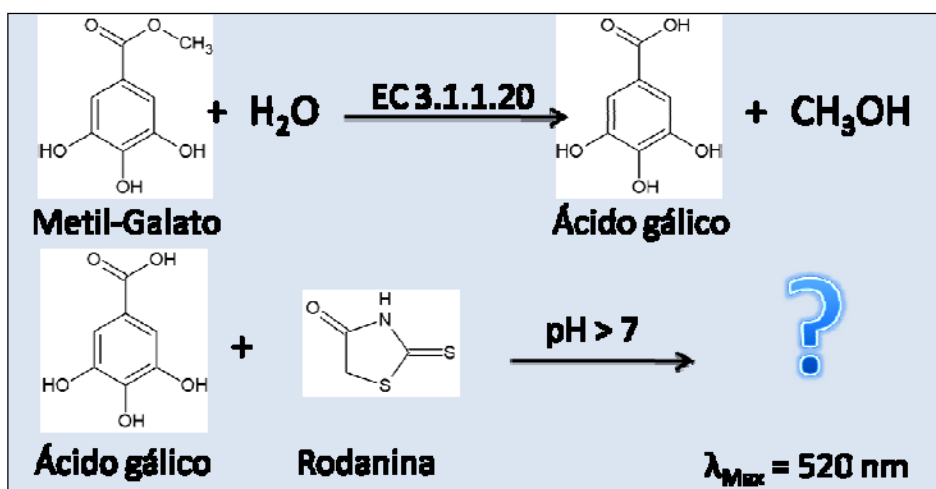


Figura 8: Reacción enzimática entre la enzima tanasa y el sustrato (metil galato).

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 0.01M en buffer de citrato 50 mM a pH 5.0. Al tubo blanco se le añadieron 0.25 mL de buffer citrato y al tubo muestra se le agregaron 0.25 mL del extracto enzimático, los tres tubos se incubaron 5 minutos a 30 °C. Después de la incubación, se adicionaron 0.3 mL de rodanina metanólica (0.667 % p/v), se incubó a 30 °C por 5 min, se agregaron 0.2 mL de hidróxido de potasio (0.5 N) y se incubó otros 5 min. Se agrega el extracto enzimático al tubo control. Después se agregaron 4 mL de agua destilada, se agitó el contenido de los tubos y se incubaron durante 10 minutos a 30 °C. Se leyó la absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro.

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 ácido gálico mg/ml (Anexo I) (Sharma *et al.*, 2000).

$$\Delta A_{520} = (A_{\text{test}} - A_{\text{blank}}) - (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}) \dots (1)$$

3.5.3. Proteína soluble.

La determinación de proteína soluble se realizó por el método de Lowry utilizando como estándar albumina sérica bobina , a un volumen determinado de muestra se le adicionó ácido tricloro acético al 10% para el precipitado de las proteínas, el precipitado se resuspendió con buffer fosfato a pH: 7. Luego se agregó 2 ml de solución preparada a partir de 2% de carbonato de sodio en NaOH 0.5M, 0.5% de sulfato de cobre y 1% de tartrato de sodio en proporción 100:1:1, se permitió la reacción de 10min y luego se adicionó 200 ul de reactivo de Folin & Ciocalteu 1N. Se agitaron vigorosamente las muestras después de 30 minutos se determinó la absorbancia de las mismas a 550nm (Lowry *et al.*, 1951).

La concentración de proteína fue calculada a partir de una curva estándar (Anexo II). Los resultados fueron expresados en mg/ml.

3.5.4. Fenoles hidrolizables totales.

El contenido de Fenoles Hidrolizables Totales (FHT) se determinó con el reactivo de Folin-Ciocalteu, este método se basa en una reacción de óxido-reducción. En un tubo de ensayo se colocaron 50 µl de la muestra, se agregaron 250 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu, se agitó y se dejó reposar durante 5 minutos. Después se agregaron 1250 µl de carbonato de sodio 0.01 M, se agitó y se dejó reposar otros 5 minutos. Se añadieron 450 µl de agua destilada, se agitó nuevamente y se leyó la absorbancia a 725 nm en un espectrofotómetro (Makkar et al., 1993)

El ácido tánico residual fue medido por la diferencia entre el contenido de Fenoles Hidrolizables Totales (FHT) y el contenido de ácido gálico. Para el contenido de fenoles hidrolizables totales se usó una curva estándar, utilizando como estándar ácido tánico (Anexo III).

3.6. Procedimiento experimental

En la Figura 9 se muestra el flujo de operaciones para la producción de tanasa.

3.6.1. Conservación y propagación del microorganismo.

Para la producción de la enzima tanasa se utilizaron cepas de *Aspegillus niger* ATCC (American Type Culture Collection) 10864, los cuales se mantuvieron en tubos de ensayo en agar inclinado de papa dextrosa (PDA) en refrigeración. Para la propagación se tomaron los tubos refrigerados, en el cual se les adicionó una cantidad de solución estéril de tween 80 al 0.1%, luego las esporas en suspensión se agregaron a matraces de 250ml mediante una siembra por incorporación usando agar de papa dextrosa (PDA) como soporte y fueron incubadas durante 72 horas a 28°C hasta que la superficie del agar se cubrió totalmente de esporas (color negro).

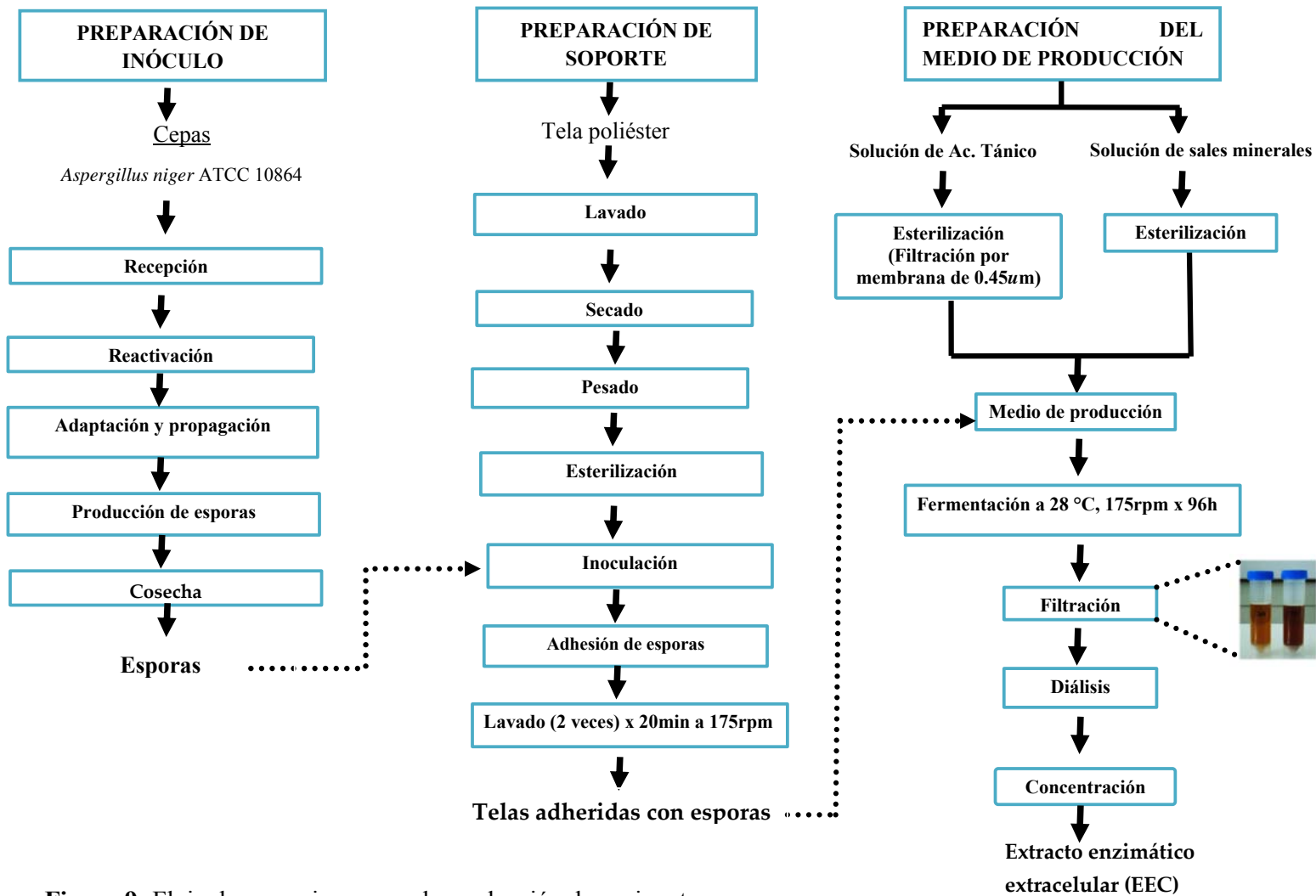


Figura 9: Flujo de operaciones para la producción de enzima tanasa.

3.6.2. Preparación del inóculo

La preparación del inóculo se llevó a cabo en una cámara de flujo laminar manteniéndose las condiciones asépticas, para obtener las concentraciones deseadas de esporas se adicionó una solución de tween 80 (0.1% v/v) a los matracas donde se propagaron las esporas. Las esporas suspendidas se transfirieron a un tubo de centrifuga para luego ser agitadas durante 5 minutos, se tomó una alícuota y se colocó en la cámara de Newbauer para el respectivo conteo, obteniéndose una suspensión con 10^5 , 10^6 , y 10^7 (esp/ml).

3.6.3. Preparación del medio de producción

El medio de cultivo, está compuesto por una solución acuosa de ácido tánico y sales minerales.

Las sales minerales adicionadas tenían las siguientes cantidades, KH_2PO_4 , 2.83g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5.66g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.57g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.057 g/L; $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.012 g/L; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0057g/L y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0077g/L (Belmares *et al.*, 2003), esta solución se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos, seguidamente se agregaron concentraciones de ácido tánico de 3, 5 y 7% previamente esterilizadas por filtración en membranas de nylon de un tamaño de 0.45um, el pH fue ajustado a 5.5 con NaOH y HCL al 1N, el medio se inoculó con 3% (v/v) de la suspensión de esporas 10^5 , 10^6 , y 10^7 (esp/ml).

3.6.4. Preparación del soporte

Para la formación de biopelículas en el sistema FAS se utilizó como soporte tela poliéster 100/1 (65% denier y 35 % poliéster texturizado con tejido circular) (Villena *et al.*, 2001), las telas fueron cortadas en cuadrados con dimensiones apropiadas (2.7cm por lado) para mantener una relación área / volumen de medio constante ($0.1822 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$), fueron lavadas con agua destilada en agitación (275rpm por 10minutos) por tres veces consecutivas, se secaron, a 90°C por 24 horas se tomó el peso de las telas y finalmente fueron esterilizadas (Villena y Gutiérrez, 2006).

3.6.5. Fermentación por Adhesión a Superficie (FAS)

Para la fermentación se utilizaron matraces de 250 ml, cada matraz contenía 40 ml de agua destilada más el soporte (cuadrado de tela), seguidamente fue inoculado con 1.2 ml de suspensión de esporas en proporción de 3% (v/v), seguidamente los matraces fueron puestos en baños agitados a 175 rpm por 20 min a 28°C para permitir la adhesión de esporas. Después de este periodo de contacto, el agua fue eliminada, y las telas inoculadas fueron lavadas con agua destilada dos veces más en agitación a 175rpm por 20 min, las telas adheridas de esporas fueron transferidas a matraces que contenían 40 ml del medio de cultivo para finalmente entrar al proceso de fermentación (incubados a 28°C en baños agitados a 175rpm durante 96 horas), el sistema fue monitoreado cada 24 horas.

3.6.6. Recuperación de la enzima extracelular

Para obtener el extracto enzimático extracelular, se filtró el contenido de cada matraz en papel filtro Whatman N° 42 previamente pesado, por otro lado el líquido adherido a la tela se comprimió con ayuda de una bagueta obteniéndose el extracto enzimático extracelular el cual fue puesto en congelación para los respectivos análisis.

3.6.7. Concentración de la enzima tanasa extracelular

3.6.7.1. Diálisis

Para eliminar las sustancias de bajo peso molecular (azúcares, sales y ácido gálico) los cuales interferían en el análisis de la actividad enzimática, se colocó el extracto enzimático en una membrana de celulosa (SIGMA) de 12 kDa y se dializó contra Buffer citrato 0.05M a pH = 5 por 24 h, con agitación a 4 °C, se cambió el buffer de diálisis cada 12 h.

3.6.7.2. Concentración con Polietilenglicol 6000

Para concentrar la enzima tanasa con Polietilen - glicol (PEG) se utilizó una membrana de celulosa (SIGMA) de 12 kDa, se colocaron los extractos enzimáticos extracelulares en la membrana y se cerraron herméticamente para luego ser puestas en bandejas, posteriormente se cubrió con polietilenglicol 6000 durante 24h hasta que el volumen del líquido dentro de la membrana se redujo considerablemente, y el polietilenglicol fuera de la membrana se disolvió completamente en el líquido extraído. El líquido concentrado se retiró de la membrana y ésta se enjuagó con buffer de citrato 0.05M pH = 5. De esta forma se obtuvo el Extracto Enzimático extracelular Concentrado por Polietilenglicol (EEC_{PEG}) (Sharma *et al.*, 1999).

3.7. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.7.1. Diseño experimental

Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo el esquema experimental mostrado en la Figura 10.

3.7.2. Análisis estadístico

Para evaluar la producción de enzima tanasa, producción de biomasa y proteína soluble se empleó un Diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x3x5x3 (Concentración de inóculo, concentración de ácido tánico y tiempo) con tres repeticiones. Utilizando el programa estadístico SAS 9. Posteriormente se utilizó el procedimiento GLM con el fin de determinar si existe o no diferencias significativas entre las interacciones, además se empleó la prueba estadística de Tukey (Calzada, 1982) para determinar la diferencia entre medias de los factores en estudio. Se realizó el análisis de varianza (ANVA) a un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$. En la etapa de Fermentación se determinó la concentración más adecuada de inóculo (10^5 , 10^6 y 10^7 esp/ml) y ácido tánico (3, 5 y 7%) durante 96 horas de fermentación (0, 24, 48,72 y 96 horas). Esta evaluación se hizo mediante el análisis de varianza, cuyos resultados se muestran en los anexos IV, V y VI.

ETAPAS	ETAPA I. PREPARACIÓN DEL INÓCULO		ETAPA II. PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA			ETAPAPIII: EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS TÉCNICOS EN PRODUCCIÓN DE ENZIMA
OPERACIONES	RECEPCIÓN DE LA CEPA	ACONDICIONAMIENTO DE LA CEPA	INOCULACIÓN	FERMENTACIÓN	FILTRACIÓN	CONCENTRACIÓN
CONTROLES		<ul style="list-style-type: none"> Formación de esporas 	<ul style="list-style-type: none"> Volumen del inóculo C: Concentración de inóculo C1= 10^5(esp/ml), C2= 10^6(esp/ml) y C3= 10^7(esp/ml). AT: ácido tánico AT1=3%, AT2=5% y AT3=7% 	<ul style="list-style-type: none"> Formación de biopelículas producción biomasa 		<ul style="list-style-type: none"> Producción de biomasa Actividad enzimática de tanasa extracelular Proteína soluble Ácido tánico residual Actividad enzimática específica
PARAMÉTROS				<ul style="list-style-type: none"> Tiempo = 96horas Temperatura = 28°C pH = 5,5 Rpm= 175rpm 	<ul style="list-style-type: none"> Presión de vacío 	

Figura 10: Esquema experimental para la producción de enzima tanasa

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE INÓCULO Y CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO TÁNICO:

4.1.1. Sobre el crecimiento fúngico.

En la Figura 11 se muestra que la producción de biomasa se fue incrementando hasta las 96 horas de fermentación, evidenciándose diferencias significativas en cada uno de los tiempos de muestreo ($P < 0.05$) (Anexo IV d). Entre las 0 a 24 horas se puede observar una etapa lenta de crecimiento, que según Reyes (2006) se trataría de la fase lag (fase de retardo) que en los hongos filamentosos termina entre las primeras 15 y 20 horas de fermentación, seguidamente se observa un crecimiento exponencial que se extiende hasta las 50 o 75 horas durante las cuales se producen ramificaciones hifales. Como se puede apreciar en la Figura 12, la producción de biomasa se ve reflejada en la formación de biopelículas que se consolida durante las 96 horas. De acuerdo a Gutiérrez y Villena (2003) la formación de biopelículas ocurriría en tres fases: la adhesión, la cual es fuertemente favorecida por la hidrofobicidad de las esporas de *Aspergillus*; la fase de crecimiento inicial y desarrollo que se inicia con la germinación de la espora entre las 4 y 10 horas y continua hasta las 24 horas cuando ya se percibe la colonización casi total de la superficie; y finalmente la fase de maduración, en la cual la densidad de biomasa se incrementa notablemente desde las 48 hasta las 120 horas.

Se puede observar también, que las muestras tomadas del tratamiento T7 a las 72 horas, tuvieron una producción de biomasa de 4.71g/L, el cual es mayor a lo reportado por Villena y Gutiérrez (2010), quienes obtuvieron 2.1g/L en Fermentación sumergida, 1.7g/L en Biopelículas y 2.4g/L en Fermentación por sustrato sólido. Así mismo este tratamiento T7 a las 96 horas de fermentación, obtuvo la máxima producción de biomasa, siendo significativamente diferente ($P < 0.05$) respecto a otros tratamientos (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T8 y T9) (Anexo IV h).

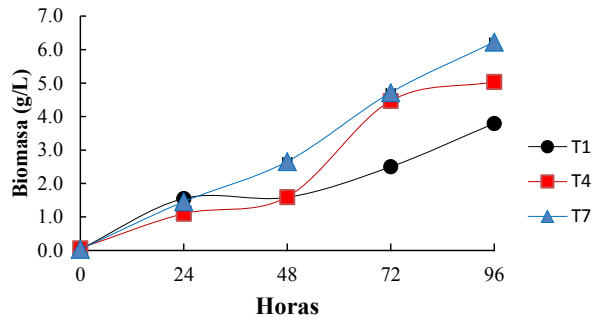
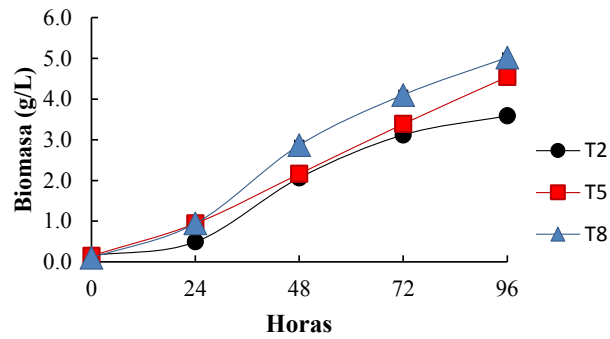
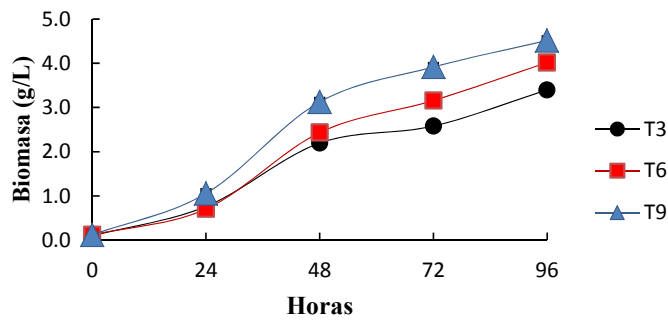
A**B****C**

Figura 11: Cinética de producción de biomasa **A.** T1: 3% AT con 10^5 esp/ml (●), T4: 3% AT con 10^6 esp/ml (■) y T7: 3% AT con 10^7 esp/ml (▲); **B.** T2: 5% AT con 10^5 esp/ml (●), T5: 5% AT con 10^6 esp/ml (■) y T8: 5% AT con 10^7 esp/ml (▲); **C.** T3: 7% AT con 10^5 esp/ml (●), T6: 7% AT con 10^6 esp/ml (■) y T9: 7% AT con 10^7 esp/ml (▲). Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres repeticiones.

La producción máxima de biomasa de 6.22 g/L en este sistema FAS es menor, comparado a resultados de Rana y Bhat (2005), quienes durante la producción de la enzima tanasa, en un tiempo de 96 horas y a una temperatura de 30°C obtuvieron 11g/L en fermentación sumergida sin agitación, 40g/L en fermentación sumergida y 29.4g/L en fermentación en sustrato sólido.

Por otro lado se observa que a mayor concentración de ácido tánico y a menor concentración de inóculo (T3) en 96 horas de fermentación, se da una menor producción de biomasa, siendo significativamente diferente a otros tratamientos (T1, T3, T4, T5, T6, T8 y T9) ($P < 0.05$), excepto al tratamiento T2 ($P > 0.05$) (Anexo IV h). Según Banerjee y Pati (2007), mencionan que la concentración de ácido tánico en el medio de cultivo es crucial para el crecimiento, encontrándose que a una concentración de 1% de ácido tánico se da la mayor producción de tanasa de *Aspergillus pullulans*, y por encima de esta concentración, el crecimiento de la cepa fúngica disminuye gradualmente.

El ácido tánico es un compuesto polifenólico, y en mayor concentración, causa una reacción irreversible con la proteína de la superficie del microorganismo y deteriora el crecimiento del mismo. Además, la inoculación con niveles bajos de inóculo puede no ser suficiente para iniciar el crecimiento (Kashyap *et al.*, 2002). Al respecto Reyes (2006) menciona que durante la germinación de las esporas se observa una respiración lenta, una baja producción de enzimas y una actividad reducida. La producción de algunas sustancias inhibitorias por algunas esporas, es una adición a este fenómeno básico del crecimiento de los hongos filamentosos, estos compuesto inhibitorios previenen el crecimiento prematuro de las hifas en condiciones desfavorables del medio que se desarrollan.

El uso de tela poliéster como soporte sólido también favorece el incremento de biomasa, al respecto Verma *et al.* (2010) mencionan que la tela poliéster proporciona una mejor superficie sólida, gruesa para el crecimiento de biopelículas de hongos bajo condiciones de agitación en comparación con la tela muselina. Desde el punto de vista de la ingeniería los soportes inertes son mejores porque no cambian su geometría y características físicas debido a la proliferación microbiana, permitiendo un mejor control del calor y transferencia de masa (Ooijkaas *et al.*, 2000).

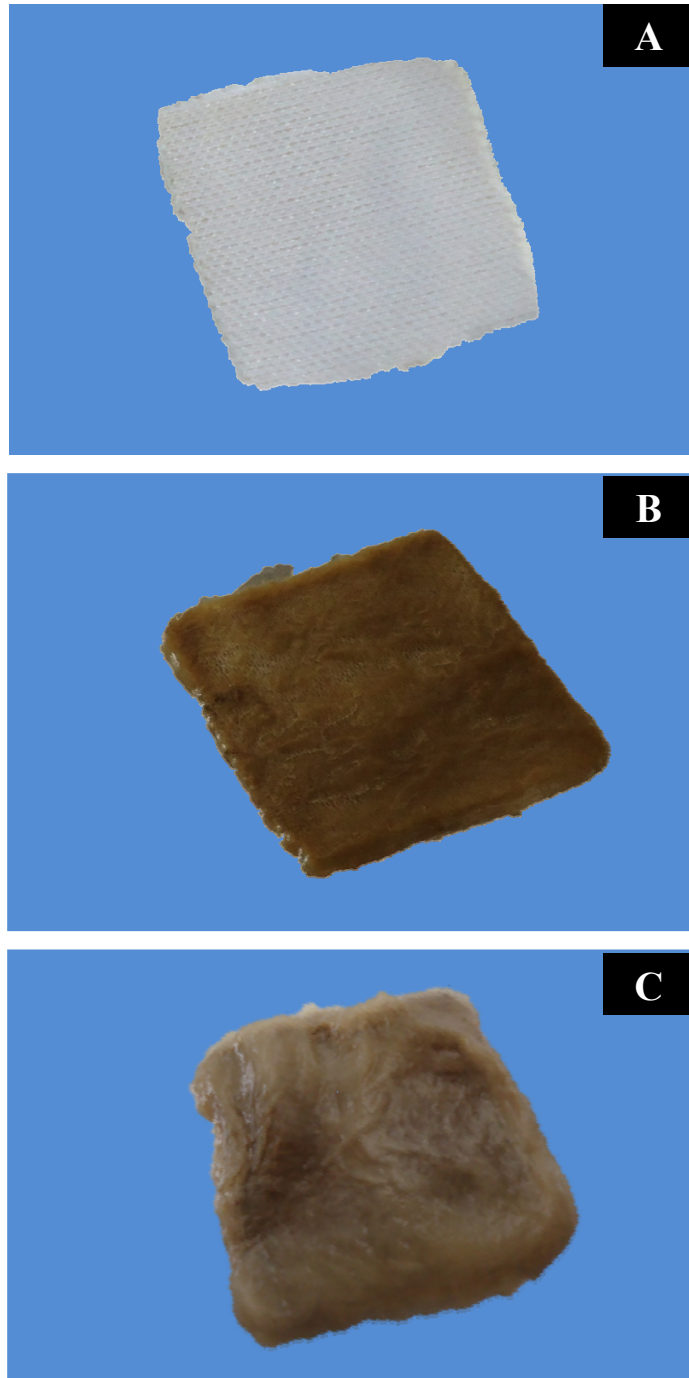


Figura 12: Biopelículas desarrolladas por *Aspergillus niger*, **A.** 0 horas, **B.**48 horas y **C.**96 horas de fermentación.

4.1.2. Sobre la adsorción específica de biomasa.

En el Cuadro 7 se puede observar que la adsorción específica de biomasa es variable, el tratamiento T9 mostro mejor absorción específica durante las 96 horas de fermentación (0.849 g/g), frente a otros tratamientos (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7 y T8), esto refleja que la cantidad de biomasa contenida en el soporte (biomasa adsorbida) representa el mayor porcentaje respecto a la biomasa total, respecto a ello Villena y Gutiérrez (2007) mencionan que la mayoría de los microorganismos, dentro de ellos los hongos filamentosos, están naturalmente adaptados a crecer adheridos a superficies sólidas, y esta condición es importante para la absorción de nutrientes, secreción de enzimas y el crecimiento apical de las hifas.

Cuadro 7: Adsorción específica de biomasa: Biomasa adsorbida / biomasa total (g/g)

Concentración de ácido tánico									
3% Ácido tánico			5% Ácido tánico			7% Ácido tánico			
Horas	Concentración de inóculo (esp/ml)								
	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
24	0.287	0.433	0.395	0.393	0.341	0.597	0.789	0.426	0.569
48	0.259	0.693	0.668	0.395	0.533	0.524	0.547	0.532	0.596
72	0.690	0.621	0.843	0.271	0.804	0.796	0.621	0.673	0.810
96	0.751	0.614	0.803	0.634	0.788	0.807	0.651	0.822	0.849

4.1.3. Sobre el ácido tánico residual.

En la Figura 13 se muestra que el porcentaje de ácido tánico residual fue disminuyendo hasta las 96 horas de fermentación. Entre las 0 a 48 horas se puede observar un porcentaje alto de ácido tánico residual. Una vez finalizada la fermentación, el tratamiento T3 evidencio un menor consumo de ácido tánico respecto a otros tratamientos, (T1, T2, T4, T5, T6, T7, T8 y T9) trayendo como consecuencia un porcentaje alto de ácido tánico residual (99.29%).

Seguidamente, al incrementar la concentración de inóculo de 10^5 (esp/ml) a 10^6 (esp/ml) y a la vez reducir la concentración de ácido tánico de 5 a 3 %, se pudo observar un mayor consumo de ácido tánico y por ende se dio la disminución del porcentaje de ácido tánico residual (84.61%), estos resultados muestran un comportamiento similar a lo señalado por Rodrigues *et al.*, (2008), quienes indican que el incremento de la concentración de inóculo promueve aceleradamente el crecimiento y la biosíntesis enzimática, que consecuentemente acelera el consumo de glucosa y ácido gálico. Según Banerjee y Pati, (2007); Van de Lagemaat y Pyle (2001) la glucosa es la fuente de carbono de fácil disponibilidad, por lo tanto este es el primero en asimilarse por el microorganismo que resulta en un crecimiento rápido. Sin embargo cuando la concentración de glucosa cae, se consume el ácido gálico. El cual es utilizado por los microorganismos como sustrato para la producción de energía (Bhat *et al.*, 1998).

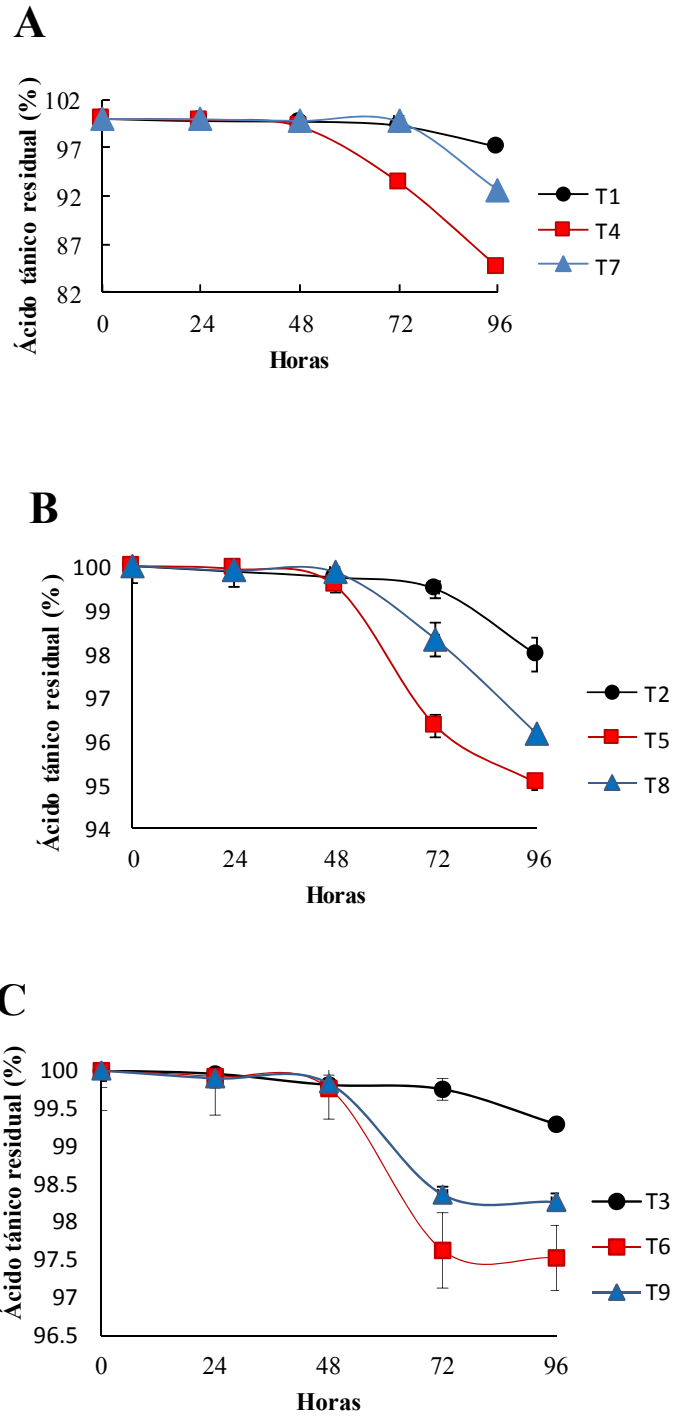


Figura 13: Ácido tánico residual en el sistema FAS. **A.** T1: 3% AT con 10^5 esp/ml (●), T4: 3% AT con 10^6 esp/ml (■) y T7: 3% AT con 10^7 esp/ml (▲); **B.** T2: 5% AT con 10^5 esp/ml (●), T5: 5% AT con 10^6 esp/ml (■) y T8: 5% AT con 10^7 esp/ml (▲); **C.** T3: 7% AT con 10^5 esp/ml (●), T6: 7% AT con 10^6 esp/ml (■) y T9: 7% AT con 10^7 esp/ml (▲). Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres repeticiones.

4.1.4. Sobre el rendimiento de biomasa respecto al consumo de ácido tánico

En el Cuadro 8 se puede observar, que una vez finalizada la fermentación, el tratamiento T3 obtuvo un mayor rendimiento de biomasa por consumo de ácido tánico (2.8), ello muestra que existió un menor consumo de ácido tánico. Por otro lado el tratamiento T4 obtuvo un menor rendimiento de producción de biomasa respecto al consumo de ácido tánico (0.86), reflejando un mayor consumo de ácido tánico, estos resultados complementan lo indicado de la Figura 13.

Cuadro 8: Rendimiento de biomasa respecto al consumo de ácido tánico: Biomasa total / ácido tánico consumido (g/g)

Concentración de ácido tánico									
3% Ácido tánico			5% Ácido tánico			7% Ácido tánico			
Concentración de inóculo (esp/ml)									
Horas	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
24	1.28	0.75	0.96	0.49	1.69	0.95	1.00	0.68	1.27
48	1.29	0.94	1.72	1.90	2.90	2.93	2.62	2.12	3.62
72	1.86	1.34	3.00	2.58	1.44	2.31	2.93	1.19	2.09
96	1.89	0.86	1.72	1.86	1.51	1.73	2.80	1.46	2.33

4.1.5. Sobre la Actividad enzimática.

En la Figura 14 se muestra que la actividad enzimática se fue incrementando. Entre las 0 a 24 horas se puede observar que todos los tratamientos (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8 y T9) presentaron una etapa lenta de actividad enzimática, pasada las 48 horas, los tratamientos (T1, T2 y T3) tuvieron un incremento mínimo frente a los tratamientos (T4, T5, T6, T7, T8 y T9). Posterior a las 72 horas se fueron incrementando los títulos de actividad enzimática hasta las 96 horas, resultando en una producción máxima de tanasa extracelular con diferencias significativas en cada uno de los tiempos de muestreo ($P < 0.05$) (Anexo V d). El tiempo de producción máxima de tanasa (96 horas) resulto superior al reportado por Aissam *et al.* (2005), quienes reportaron que la máxima producción de tanasa por *Aspergillus niger* HA37 fue entre las 12-24 horas, esto posiblemente debido al uso de sustratos como el alpechín natural, que contiene una gran cantidad de taninos hidrolizables fácilmente degradables y utilizables por la cepa. Por otro lado Banerjee *et al.* (2007a), reportaron un pico máximo de producción de tanasa después de 36 h de incubación a partir de *Aspergillus aculeatus* DBF9.

La máxima producción de tanasa fue de 0.1256 U/ml en un tiempo de 96 horas, resultando ser inferior a los reportador por Enemuor y Odibo (2009), quienes obtuvieron una máxima producción de tanasa de 0.9 U/ml durante 144 horas de fermentación, usando como cepa al *Aspergillus tamaris* IMI388810. Respecto a estas diferencias muchos autores consideran la importante influencia de los diferentes períodos de incubación que van desde las 72 a 120 horas logrando la máxima actividad enzimática, esta variación depende de la especificidad de los productores y de las condiciones de fermentación, mostrando diferentes patrones de producción (Sabu *et al.*, 2005a; Banerjee y Pati, 2007; Rodrigues *et al.*, 2008; Enemuor y Odibo 2009).

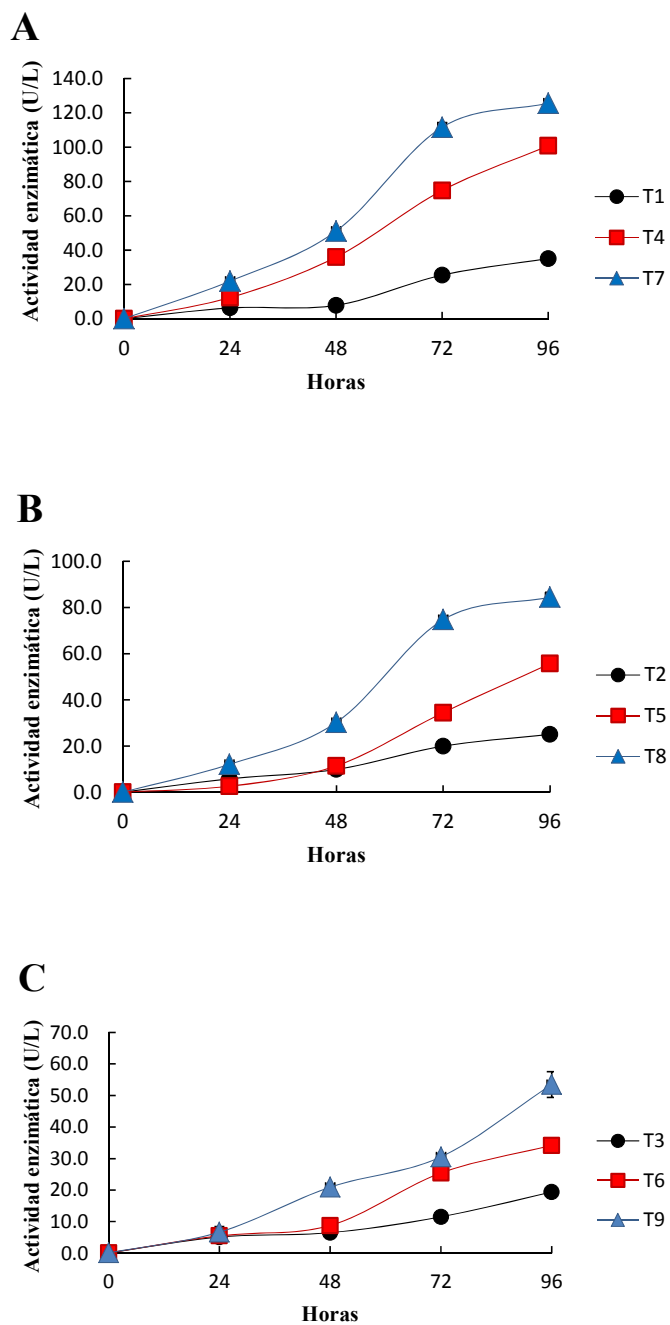


Figura 14: Cinética de producción de tanasa extracelular en el sistema FAS. **A.** T1: 3% AT con 10^5 esp/ml (●), T4: 3% AT con 10^6 esp/ml (■) y T7: 3% AT con 10^7 esp/ml (▲); **B.** T2: 5% AT con 10^5 esp/ml (●), T5: 5% AT con 10^6 esp/ml (■) y T8: 5% AT con 10^7 esp/ml (▲); **C.** T3: 7% AT con 10^5 esp/ml (●), T6: 7% AT con 10^6 esp/ml (■) y T9: 7% AT con 10^7 esp/ml (▲). Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres repeticiones.

Respecto a la concentración de inóculo se observa, que a menor concentración de inóculo 10^5 (esp/ml), se produce menor cantidad de enzima, esta producción asciende a medida que se incrementa la concentración de inóculo a 10^6 (esp/ml) y 10^7 (esp/ml), dándose la máxima producción de tanasa extracelular a concentración de 10^7 (esp/ml) en un periodo de 96 horas con diferencias significativas ($P < 0.05$) (Anexo V f). Al respecto Rodrigues *et al.* (2008), mostraron comportamientos similares en la producción de tanasa dando como resultado el aumento del rendimiento de tanasa a medida que se incrementó el tamaño del inóculo de 10^4 (esp/ml) a 10^7 (esp/ml). Por otro lado Lekha y Lonsane (1997) mencionan que la enzima tanasa es una enzima inducible, para ello el inóculo debe estar preparado en presencia de un inductor para así asegurar la máxima cantidad de tanasa. Además, la inoculación con niveles más bajos de inóculo puede no ser suficiente para iniciar el crecimiento y la síntesis de la enzima. Sin embargo, el aumento del número de esporas en el inóculo asegura la rápida proliferación de la biomasa y de la síntesis enzimática (Kashyap *et al.* 2002). Del mismo modo Sabu *et al.* (2005b) mostraron resultados similares cuando se usó *Aspergillus niger* ATCC 16620 para fermentar torta de palmiste.

Respecto a la concentración de ácido tánico se observa, que a mayor concentración de ácido tánico 7 %, se produce menor cantidad de enzima, cuando se disminuye la concentración de ácido tánico a 5% y 3% se incrementa la producción de enzima, por tanto la máxima producción de enzima tanasa extracelular se da a la concentración de 3% en 96 horas de fermentación con diferencias significativas ($P < 0.05$) (Anexo V g). Estos resultados concuerdan con los reportados por Bradoo *et al.* (1997), quienes mencionan que la producción de tanasa extracelular óptima fue a concentración de 3% de ácido tánico, resultados que dependen de la cepa, condiciones de cultivo y localización de la enzima. Así mismo Seth y Chand (2000) también usaron 3.5% de ácido tánico como concentración óptima para la máxima producción de tanasa por *Aspergillus awamori*. Por otro lado Lekha y Lonsane (1994) observaron un aumento de la síntesis de tanasa de *Aspergillus niger* PKL104 con la adición de ácido tánico, pero encontraron que la mejor concentración fue de 4 %, valores por encima de este nivel pueden inducir la reducción de la actividad de tanasa.

Según El-Fouly *et al.* (2010), el ácido tánico es la fuente de carbono más adecuada para la inducción de tanasa por el hongo experimental, fue entonces necesario probar el efecto de la concentración de ácido tánico en el rango de 1,5 y 12% en el medio para el rendimiento de la enzima, según los resultados se muestra que la óptima concentración de ácido tánico es de 3% para la producción de tanasa de *Aspergillus niger* AUMC 4301, a partir de entonces, la actividad de la enzima disminuye al elevar la concentración de ácido tánico en el medio y casi disminuye en su totalidad al 12%.

Así mismo también Banerjee y Pati (2007) notaron la disminución de tanasa de *Aspergillus pullulans* DBS66 en mayor concentración de ácido tánico, explicaron este hallazgo sobre la base de que el ácido tánico en una concentración más alta causa una reacción irreversible con proteínas de la superficie del organismo, y ello hace que reduzca la producción de enzimas. Esta reducción de la producción de enzima también se ve favorecida por la deposición de ácido gálico en la superficie celular o por la acumulación de metabolitos tóxicos en el medio de fermentación, debido al metabolismo y a la degradación fúngica del ácido tánico que conduce a la autólisis celular de los hongos o desnaturalización enzimática (Kar *et al.*, 1999; Seth y Chand, 2000; Gautam *et al.*, 2002; Battestín y Macedo, 2007b).

La variación de las actividad enzimática entre una u otra investigación puede también estar influenciada por la calidad química de la fuente de carbono (ácido tánico) ya que según Chávez *et al.* (2011a) el ácido tánico presenta diferentes grados de hidrólisis. Muchas literaturas registran que las especies de *Aspergillus* pueden tolerar concentraciones altas de ácido tánico como de 20%, pero tienen efectos deletéreos en el crecimiento y la producción de tanasa (Cruz *et al.*, 2006).

Así como el ácido tánico es considerado una molécula inductora de la enzima tanasa también ha sido cuestionada como inductor, 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 (Aguilar *et al.*, 2001a).

Sobre este aspecto, Lekha y Lonsane (1997) proponen que la inducción de la tanasa se lleve a cabo de forma similar a las celulasas, en donde se requiere de ciertos niveles basales de la enzima, necesarios para iniciar la hidrólisis del sustrato y generar al inductor para la síntesis de la enzima.

Los niveles altos de ácido tánico empleados, involucran un suplemento significativo de productos que pueden participan directamente en el control de la expresión de tal enzima, dichos compuestos son la glucosa y el ácido gálico. La glucosa está involucrada en el fenómeno de represión catabólica y el ácido gálico ha sido relacionado al mecanismo de represión por producto final tanto en condiciones inducidas como constitutivamente y no está involucrado en el mecanismo de regulación de la tanasa (Bajpai y Patil, 1997; Bradoo *et al.*, 1997).

Durante las 96 horas de fermentación, el tratamiento T7 obtuvo la máxima producción de tanasa extracelular de 125.646 U/L, siendo significativamente diferente a otros tratamientos (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T8 y T9) ($P < 0.05$) (Anexo V h). Por otro lado entre los tratamientos T1 y T6 no existe diferencias significativas ($P > 0.05$) (Anexo V h), así mismo entre los tratamiento T5 y T9 no existe diferencias significativas ($P > 0.05$) (Anexo V h). La producción máxima de tanasa extracelular fue menor en comparación a los resultados reportados por Belmares *et al.* (2003) Quienes obtuvieron una producción máxima de tanasa extracelular de 220U/L, utilizando como sustrato ácido tánico puro, evaluaron el efecto de diferentes fuentes de carbono e inductores sobre la actividad tanasa en dos especies de *Aspergillus niger* en un sistema de fermentación sumergida. Las condiciones de fermentación fueron, 3×10^7 (esp/ml) como concentración de inóculo, 30ml de medio de cultivo, 30°C, 48 horas de incubación y pH inicial de 5.5.

Al respecto Pandey (1994); Rodriguez *et al.* (2011) mencionan que esta diferencia se debe a la fuente de la enzima y a la concentración de inóculo. Por otro lado según Kashyap *et al.* (2002) el incremento de esporas en el inóculo asegura la proliferación de la biomasa y la síntesis enzimática.

Otro factor importante es el sistema de cultivo, la diferencia física del sistema de cultivo influye directamente sobre la fisiología que exhiben los microorganismos durante su crecimiento, y demuestran que la composición de la membrana celular de las cepas de *Aspergillus niger* difiere cuando se desarrollan en cultivos sumergidos o cultivos en medio sólido, sobre todo en el tipo y contenido de ácidos grasos, por lo tanto, existen diferencias en los procesos de transporte de los nutrientes Maldonado y Strasser de Saad (1998); Rodriguez *et al.* (2011).

La producción máxima de tanasa extracelular en el sistema FAS (125.646 U/L) es menor a diferentes sistemas de fermentación reportados por Rana y Bhat (2005), quienes durante la producción de enzima tanasa, en un tiempo de 96 horas y a una temperatura de 30°C obtuvieron la siguiente producción de enzima tanasa extracelular e intracelular, 155 U/ml en fermentación sumergida sin agitación, 726 U/ml en fermentación sumergida y 795 U/ml en fermentación en sustrato sólido. Por otro lado Srivastava y Kar (2009), determinaron la producción óptima de tanasa extracelular (28.72 U/ml) por fermentación sumergida, en un tiempo de 72 horas con 4 % (w/v) de cáscara de granada como sustrato, a temperatura de 37 °C, pH 5.0 y un tamaño de inóculo de 10%.

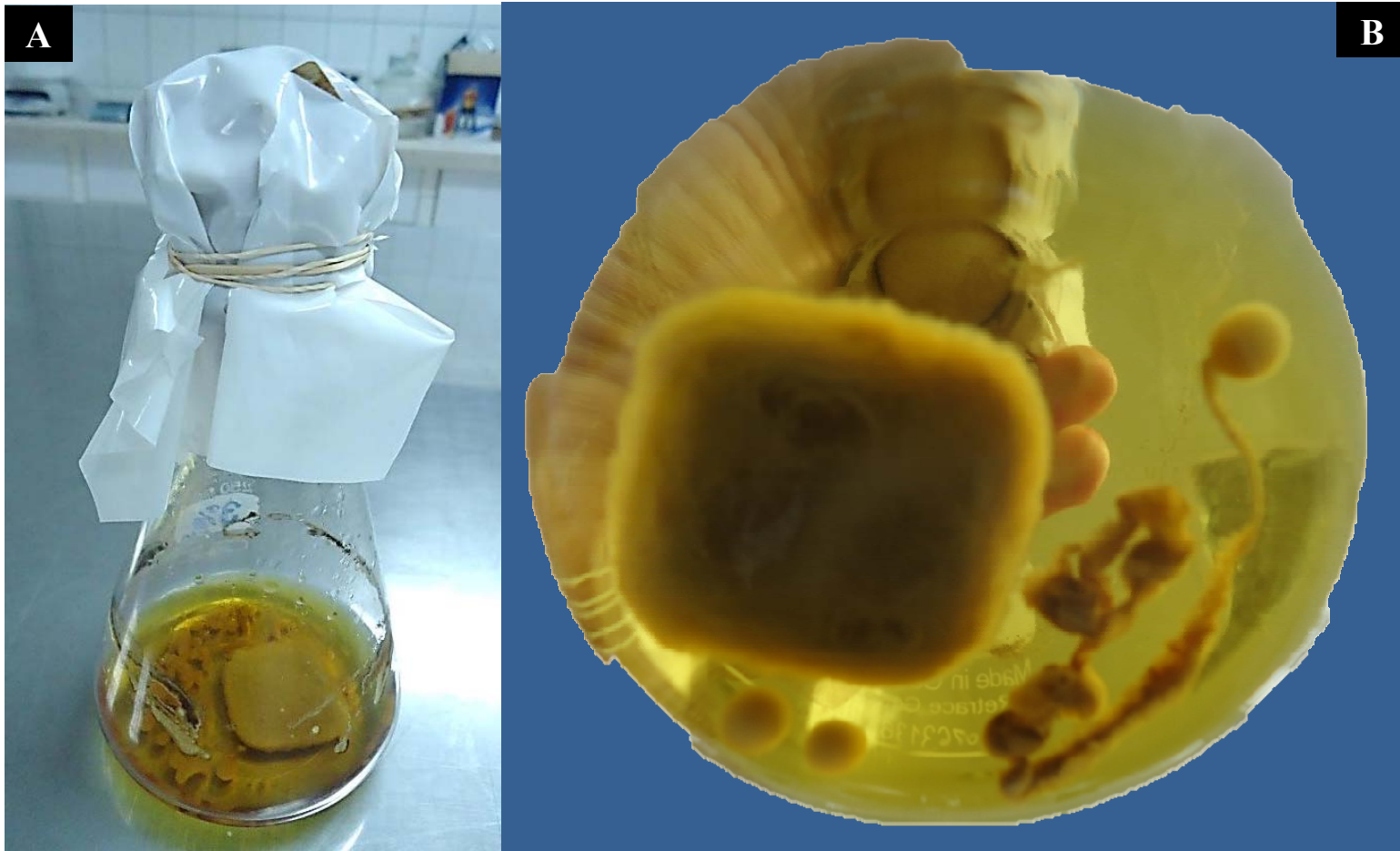


Figura15: Producción de tanasa extracelular en el sistema FAS mediante biopelículas: **A.** Vista frontal; **B.** Vista inferior.

4.1.6. Sobre la proteína soluble extracelular.

En la Figura 16 se muestra que la producción de proteínas extracelular se fue incrementado hasta las 96 horas de fermentación, evidenciándose diferencias significativas en cada uno de los tiempos de muestreo ($P < 0.05$) (Anexo VI d). Por otro lado se observa que a mayor concentración de ácido tánico y a menor concentración de inóculo (T3) en 96 horas de fermentación, se da una menor producción de proteína soluble extracelular, siendo significativamente diferente a otros tratamientos (T1, T2, T4, T5, T6, T7, T8 y T9) ($P < 0.05$) (Anexo VI h).

Del mismo modo se observa que el tratamiento T7 dio como resultado la máxima producción de proteína soluble extracelular de 0.126 g/L a 96 horas de fermentación, siendo significativamente diferente ($P < 0.05$) a otros tratamientos (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T8 y T9) (anexo VI h), este resultado es menor en comparación a lo reportado Villena *et al.* (2001) quienes obtuvieron 0.44 g/L de proteína correspondiente a un cultivo simple de *Aspergillus niger* en Fermentación por Adhesión a Superficie durante la producción de celulasas.

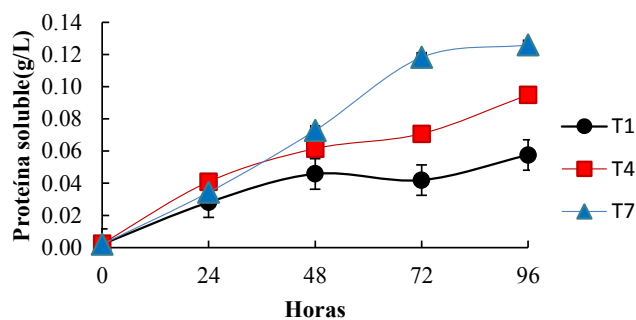
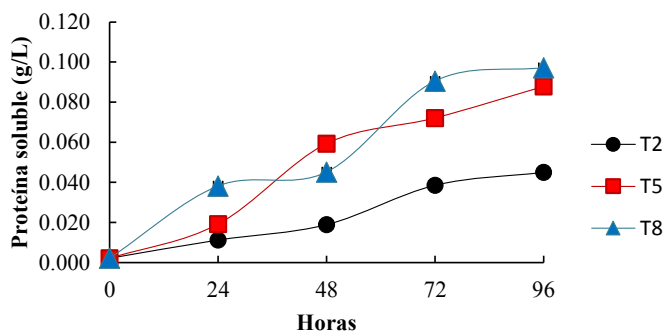
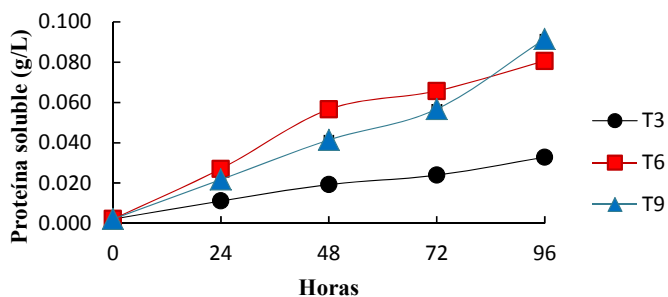
A**B****C**

Figura 16: Proteína soluble extracelular en el sistema FAS. **A.** T1: 3% AT con 10^5 esp/ml (●), T4: 3% AT con 10^6 esp/ml (■) y T7: 3% AT con 10^7 esp/ml (▲); **B.** T2: 5% AT con 10^5 esp/ml (●), T5: 5% AT con 10^6 esp/ml (■) y T8: 5% AT con 10^7 esp/ml (▲); **C.** T3: 7% AT con 10^5 esp/ml (●), T6: 7% AT con 10^6 esp/ml (■) y T9: 7% AT con 10^7 esp/ml (▲). Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres repeticiones.

4.1.7. Sobre la actividad enzimática específica de la tanasa

En el Cuadro 9 se observa, que la actividad enzimática específica se incrementa gradualmente durante las 96 horas de fermentación en todos los tratamientos (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8 y T9). El tratamiento T4 obtuvo la mayor actividad enzimática específica de 1.064 UI/mg durante las 96 horas de fermentación, este resultado es menor al comparar con los resultados obtenido por El-Fouly *et al.* (2010), quienes mostraron la máxima actividad específica de tanasa a partir de *Aspergillus niger* AUMC 430 de $3.3 \pm 0,11$ U I/ mg de proteína.

Cuadro 9: Actividad enzimática específica (UI/mg de proteína soluble).

Horas	Concentración de ácido tánico								
	3% Ácido tánico			5% Ácido tánico			7% Ácido tánico		
	Concentración de inóculo (esp/ml)								
	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
24	0.228	0.306	0.641	0.540	0.140	0.368	0.470	0.204	0.309
48	0.172	0.586	0.703	0.558	0.196	0.673	0.342	0.155	0.511
72	0.611	1.060	0.945	0.522	0.466	0.857	0.484	0.389	0.539
96	0.613	1.064	0.998	0.562	0.627	0.882	0.595	0.425	0.584

Cuadro 10: Parámetros técnicos obtenidos en producción de tanasa por el sistema FAS en el día de máxima producción (96 horas).

Parámetros	3% Ácido tánico			5% Ácido tánico			7% Ácido tánico		
	10 ⁵ esp/ml	10 ⁶ esp/ml	10 ⁷ esp/ml	10 ⁵ esp/ml	10 ⁶ esp/ml	10 ⁷ esp/ml	10 ⁵ esp/ml	10 ⁶ esp/ml	10 ⁷ esp/ml
Act. Enz.	35.116	100.796	125.646	25.133	55.706	84.491	19.392	34.201	53.501
P.S	0.057	0.095	0.126	0.045	0.088	0.097	0.033	0.081	0.092
B.T	3.795	5.038	6.227	3.592	4.545	5.017	3.396	4.017	4.516
A.T.R	97.09	84.61	92.63	97.96	95.01	96.15	99.29	97.53	98.26
Y_{x/A.T}	1.89	0.86	1.72	1.86	1.51	1.73	2.8	1.46	2.33
Y_{E/x}	9.253	20.007	20.178	6.997	12.257	16.841	5.709	8.514	11.847
Y_{P.S/x}	0.015	0.019	0.020	0.013	0.019	0.019	0.010	0.020	0.020
A.E	0.613	1.064	0.998	0.562	0.627	0.882	0.595	0.425	0.584

Act. Enz.	= Actividad enzimática	(UI/L)
P.S	= Proteína soluble	(g /L)
B.T	= Biomasa total	(g/ L)
C. A.T	= Ácido tánico residual	(%)
Y_{x/A.T}	= Biomasa producida por ácido tánico consumido	(g/g)
Y_{E/x}	= Rendimiento de enzima respecto a biomasa	(UI/g)
Y_{P.S/x}	= Rendimiento de proteína soluble respecto a biomasa	(g/g)
A.E	= Actividad específica respecto a proteína soluble	(UI/mg)

V. CONCLUSIONES

- 5.1. La máxima producción de biomasa fue de 6.22g/L a las 96 horas de fermentación, usando una concentración de inóculo de 10^7 (esp/ml) y una concentración de ácido tánico de 3%.
- 5.2. La menor producción de biomasa fue de 3.39 g/L a las 96 horas de fermentación, usando una concentración de inóculo 105 (esp/ml) y una concentración de ácido tánico 7%.
- 5.3. La mayor absorción específica de biomasa fue de 0.849 g/g, a las 96 horas de fermentación, ello se dio a una concentración de inóculo de 107 (esp/ml) y a una concentración de ácido tánico de 7%.
- 5.4. El porcentaje de ácido tánico residual fue 99.29% a las 96 horas de fermentación, ello se dio a una concentración de inóculo de 105 (esp/ml) y concentración de ácido tánico de 7%.
- 5.5. El porcentaje de ácido tánico residual disminuye a 84.61%, a medida que aumenta la concentración de inóculo.
- 5.6. El mayor rendimiento de biomasa por consumo de ácido tánico fue de 2.8, este resultado se dio a concentración de inóculo de 105 (esp/ml) y a concentración de ácido tánico de 7%.
- 5.7. La máxima actividad enzimática de tanasa se obtuvo a una concentración de inóculo de 107 (esp/ml), mostrando una relación directa entre la concentración de inóculo y la actividad enzimática.

- 5.8.** La máxima actividad enzimática de tanasa se obtuvo a una menor concentración de ácido tánico 3%, mostrando una relación inversa entre la concentración de ácido tánico y la actividad enzimática.
- 5.9.** La máxima producción de proteína soluble extracelular fue de 0.126g/L a 96 horas de fermentación, ello se dio a una mayor concentración de inóculo de 107 (esp/ml) y a menor concentración de ácido tánico 3%.
- 5.10.** La mayor actividad enzimática específica fue de 1.064 UI/mg durante las 96 horas de fermentación, ello se dio a una concentración de inóculo de 106 (esp/ml) y a concentración de ácido tánico 3%.

VI. RECOMENDACIONES

- 6.1.** Se recomienda la búsqueda de nuevas fuentes microbianas, productoras potenciales de enzima tanasa.
- 6.2.** Hacer la bioprospección de microorganismos productores de tanasa en ambientes con mayor crecimiento de tara (*Caesalpinia spinosa*).
- 6.3.** Optimizar los parámetros y condiciones de fermentación para la producción de enzima tanasa mediante el Sistema de Fermentación por Adhesión a Superficie (FAS).
- 6.4.** Aislamiento y cuantificación de proteínas obtenidas mediante el Sistema de Fermentación por Adhesión a superficie (FAS) de *Aspergillus niger* 10864.
- 6.5.** Realizar la purificación (Cromatografía de intercambio iónico y de afinidad) de la enzima tanasa obtenida por el Sistema de fermentación por adhesión a superficie (FAS).
- 6.6.** Realizar ensayos de obtención de ácido gálico de taninos de tara (*Caesalpinia spinosa*), usando la enzima tanasa obtenida por el Sistema de fermentación por adhesión a superficie (FAS)

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-NABY, M; SHERIF, A; EL-TANASH, A; MANKARIOS, A.1999. "Immobilization of *Aspergillus oryzae* tannase and properties of the immobilized enzyme," Journal of Applied Microbiology, 87(1): 108–114.
- ABDEL-NABEY, M; SHERIEF, A; EL-TANASH, Z .2011. Tannin Biodegradation and Some Factors Affecting Tannase Production by Two *Aspergillus* sp. Biotechnology 10 (2): 149-158.
- ABDULHAMEED, S; SHEGAL KIRAN, G; PANDEY, A. 2005. Purification and Characterization of Tannin Acyl Hydrolase from *Aspergillus niger* ATCC 16620. Food Technolgy. Biotechnology. 43 (2):133–138.
- ADEMOLA, A; SULAYMAN, SOWE; GOVINDAN, PARAYIL; OBIJIOFOR, AGINAM. 2012. Analysis of open source biotechnology in developing countries: An emerging framework for sustainable agriculture Technology in Society. 34: 256–269.
- AGUILAR, C; GUTIÉRREZ, G. 2001. Review: Sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. Food Science Technology International. 7: 373-382.
- AGUILAR, C; 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: 565–570.
- AGUILAR, C; RODRÍGUEZ, R; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G; AUGUR, C; FAVELA, E; PRADO, L; RAMÍREZ, A; CONTRERAS, J. 2007. Microbial tannases: advances and perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology .76(1): 47-59.
- AISSAM, H; ERRACHIDI, F; PENNINGCKX, M; MERZOUKI, M; BENLEMLIH, M. 2005. Production of tannase by *Aspergillus niger* HA37 growing on tannic acid and olive mill waste waters. World Journal Microbiology Biotechnology, 21: 609-614.

- ALBERTSE, E. 2002. Cloning, expression and characterization of tannase from *Aspergillus* sp. Ms Thesis, Department of Microbiology and biochemistry, faculty of natural and Agriculture Sciences, University of the Free State, Bloemfontein, South Africa.
- BAJPAI, B; PATIL, S. 1997. Induction of tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity in some members of fungi imperfecti. *Enzyme and Microbial Technology* 20(8): 612–614.
- BANERJEE, D; MAHAPATRA, S; PATI, B. 2007a. Gallic acid production by submerged fermentation of *Aspergillus aculeatus* DBF9. *Res. Journal Microbiology* 2(5): 462-468.
- BANERJEE, D AND PATI, B. 2007. Optimization of tannase production by *Aureobasidium pullulans* DBS66. *Journal Microbiology Biotechnology* 17: 1049-1053.
- BARTHOMEUF, C; REGERAT, F; POURRAT, H. 1994. Production, purification and characterization of a tannase from *Aspergillus niger* LCF8, *Journal of Fermentation and Bioengineering* 77(3):320–323.
- BASURTO, L. 2002. Productos Agroindustriales de Exportacion. ALNICOLSA S.A. Pag. Web de ALNICOLSA: www.tanino.tripod.com. Telefono: 5530981. E-mail: alnicolsa@terra.com.pe; lebr7@yahoo.com. Direccion Fisica: Ventanilla – Callao – Peru.
- BATTESTÍN, V; MACEDO, G.2007a. Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by *Paecilomyces variotii*, *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(2):191-199.
- BATTESTIN, V; MACEDO, G. 2007b. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. *Bioresour Technology*. 98(9):1832-1837.
- BEENA, P; SOOREJ, M; ELYAS, K; SARITA, G; CHANDRASEKARAN, M.2010. Acidophilic tannase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20 (10): 1403-1414.
- BHAT, T. K., B. SINGH, AND O. P. SHARMA. 1998. Microbial degradation of tannins. A current perspective. *Biodegradation* 9: 343-357.

- BHAT, M. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advance* 18:355–83.
- BEVERINI, M; METCHE, M. 1990, Identification, purification and physicochemical regulation tannase from *Aspergillus oryzae*. *Sciences Aliments* 10: 807-816.
- BEL-RHLID, R; KRAEHENBUEHL, K; CAVIN, C; RAAB, T; PAGE, N.2009. Compositions for preparing a coffee beverage comprising hydrolysed chlorogenic acid, World Intellectual Property Organization Patent Application, no. WO09132887.
- BELE, A; JADHAV, V; KADAM, V.2010. Potential of tannins: a review,” *Asian Journal of Plant Sciences*. (4) 9: 209-214.
- BELUR, P; MUGERAYA, G. 2011. Microbial Production of Tannase: State of the Art. *Journal of Microbiology* 6 (1): 25-40.
- BELMARES, R; REYES, M; CONTRERAS-ESQUIVEL, J; RODRÍGUEZ-HERRERA, R; AGUILAR, C. 2003. Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de tanasa en dos cepas de *Aspergillus niger*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2(1): 95-100.
- BELMARES, R; CONTRERAS-ESQUIVEL, J; RODRÍGUEZ-HERRERA, R; RAMÍREZ, A; AGUILAR, 2004. Microbial production of tannase: An enzyme with potential use in food industry. *Lebensm. Wiss. Technology*. 37: 857-864.
- BENIWAL, V; CHHOKAR, V. 2010. Statistical Optimization of Culture Conditions for Tannase Production by *Aspergillus awamori* MTCC 9299 under Submerged Fermentation. *Asian J. of Biotechnology*. 2(1): 46-52.
- BOER, E; BODE, R; MOCK, H; PIONTEK, M; KUNZE, G. 2009. Atan1p-an extracellular tannase from the dimorphic yeast *Arxula adenivorans*: molecular cloning of the ATAN1 gene and characterization of the recombinant enzyme *Yeast*. 26 (6):323–337.
- BRADDOO, S; GUPTA, R; SAXENAA, R. 1997. Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tannase from *Aspergillus japonicus*. *Process Biochemistry*, 32: 135-139.
- BRENDA, 2012. Institute of Biochemistry and Bioinformatics at the Technical, University of Braunschweig. Germany. www.brenda-enzymes.org.

- BRUCHMANN, E. 1980. Bioquímica técnica. Editorial ACRIBIA. Zaragoza, España.
- CALZADA J. 1982. Métodos Estadísticos para la Investigación. Editorial Milagritos S. A. Lima, Perú.
- CANTARELLI, C; BRENNAN, O; GIOVANELLI, G; ROSSI, M. 1989. Beverage stabilization through enzymatic removal of phenolics. *Food Biotechnology*, 3(2):203-213.
- CHÁVEZ, M; CONTRERAS, C; PRADO BARRAGÁN, L; RODRÍGUEZ, R; AGUILERA, A; RODRÍGUEZ, L; AGUILAR, C. 2011a. Microbial and enzymatic hydrolysis of tannic acid: Influence of substrate chemical quality. *Chemical Papers*.
- CHÁVEZ, M; RODRÍGUEZ, LUIS; BALAGURUSAMY, N; PRADO, A; RODRÍGUEZ, R; CONTRERAS, J; AGUILAR, C. 2011b. Biotechnological Advances and Challenges of Tannase: An Overview. *Food Bioprocess Technology*.
- CHHOKAR, V; SEEMA, V; BENIWAL. 2010. Purification and characterization of extracellular tannin acyl hydrolase from *Aspergillus heteromorphus* MTCC 8818, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 15(5):793-799.
- CHUNG, K-T; WEI, C; JOHNSON, M. 1998. Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Trends in Food Science & Technology* 9:168–175.
- CRUZ, M; AUGUR, C; RODRIGUEZ, R; CONTRERAS, J; AGUILAR, C. 2006. Evaluation of culture conditions for tannase production by *Aspergillus niger* GH1. *Food Technology Biotechnology*, 44: 541 -544.
- DA COSTA; KADOWAKI, M; MINOZZO, M; MARQUES de SOUZA, C; BOER, C; BRACHT, A; PERALTA, R. 2012. Production, purification and characterization of tannase from *Aspergillus tamari*. *African Journal of Biotechnology*.11 (2):391-398.
- DA SILVA, E; BAYDOUN, E; BADRAN, A. 2002. Biotechnology and the developing world *Electronic Journal of Biotechnology*. 5(8):10717-3458.
- DEMAIN, A; FANG, A. 2000. The natural functions of secondary metabolites. In: Scheper, T., Fiechter, A. (Eds.), *History of Modern Biotechnology*. Springer-Verlag Berlin.
- DEVLIN, T. 2004. Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas. 4 ed. Editorial REVERTÉ S.A. Barcelona, España.

- DYKSTRA, R; BROOKER, A; SOMERVILLE ROBERTS, N. et al., 2011. A catalytic laundry detergent composition comprising relatively low levels of water-soluble electrolyte, U.S. Patent Application No. 2011/0005003, 2011.
- DONLAN, R; COSTERTON, J. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology*. 15:167-193.
- DU-THUMM, LAURENCE; SZELES, L; SULLIVAN, R; MASTERS, J; ROBINSON, R. 2005. Chewable antiplaque confectionery dental composition, US20050008582 dated 01/13/2005.
- DURAND, A. 2003. Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13: 113–125.
- EL-FOULY, M; EL-AWAMRY, Z; SHAHIN, A; EL-BIALY, H; NAEEM, E; EL-SAEED, G. 2010. Biosynthesis and Characterization of *Aspergillus niger* AUMC 4301 Tannase. *Journal of American Science*. 6:12.
- ENEMOUR, S; ODIBO, F. 2009. Culture conditions for the production of a tannase of *Aspergillus tamarii* IMI388810 (B). *African J. of Biotechnol.* 8 (11): 2554-2557
- FENNEMA, O. 2010. *Química de Alimentos*. 3era. Edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.
- FERNÁNDEZ, P. 2006. Obtención de Ácido Gálico a partir de polvo de tara (*Caesalpinia spinosa* L.) mediante fermentación en sustrato sólido usando cepas fúngicas de *Aspergillus* sp. Tesis para optar el grado de MgSc. UNALM. Lima, Peru. pp. 1-150.
- FROST, G; MOSS, D. 1987. Production of enzymes by fermentations In *Biotechnology*. Vol. 7. Rehm HJ and Reed G7 (ed.), pp. 65-211.
- GAUTAM, P; SABU, A; PANDEY, A; SZAKACS, G; SOCCOL, C. 2002. Microbial production of extracellular phytase using polystyrene as inert solid support. *Bioresour. Technology*. 83: 229-233.
- GUTIÉRREZ, M; VILLENA, G. 2003. Surface adhesion fermentation: a new fermentation category. *Revista Peruana biología*. 10(2): 113 – 124.
- GUTIÉRREZ, M; VILLENA, G. K. 2010. In Pandey, A; Soccol, C; Larroche, C; Gnansounou, E; Nigam-Singh, P (Eds.). *Comprehensive Food Fermentation and Biotechnology*. 1:183–227. New Delhi: Asiatech Publisher, Inc.

- GÜLCIN, I; HUYUT, Z; ELMASTAK, M; ABOUL-ENEIN, H. 2010. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arab. J. Chem.* 3:43-53.
- HASLAM, E; STANGROOM, J. 1966. The esterase and depectinase activities of tannase. *Biochemical Journal* 99 (28): 28 - 31.
- HARDING, M; MARQUES, L; HOWARD, R; OLSON, M. 2011. Can Filamentous Fungi Form Biofilms. *Trends in Microbiology* 17 (11).
- HATAMOTO, O; WATARAI, T; KIKUCHI, M; MIZUSAWA, K; SEKINE, H.1996. Cloning and sequencing of the gene encoding tannase and a structural study of the tannase subunit from *Aspergillus oryzae*, *Gene*. 175 (1-2): 215-221.
- HE, Q; YAO, K; SUN, D; SHI, B. 2007. Biodegradability of tannin-containing wastewater from leather industry, *Biodegradation*, 18(4): 465-472.
- HEADON, R; WALSH, G.1994. The industrial production of enzymes. *Biotechnology Advances*. 12(4):635-646
- HENDRIK, E. 2002. Cloning, expression and characterization of tannase from *Aspergillus* sp. By. Tesis para optar el título de MgSc. University of the Free State. Bloemfontein, South África.
- IIBUCHI, S; MINODA, Y; YAMADA, K. 1968. Studies on tannin acyl hydrolase of microorganisms part III. Purification of the enzyme and some properties of it, *Agricultural and Biological Chemistry*, vol. 36, no. 7, pp. 803-809, 1968.
- IWAMOTO, K; TSURUTA, H; NISHITAINI, Y; OSAWA, R.2008. Identification and cloning of a gene encoding tannase (tannin acylhydrolase) from *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917T, *Systematic and Applied Microbiology*. 31(4):269- 277.
- JONES, J. 1994. Fungal adhesion *Mycology. Res.* 98: 961-981.
- JUN, C; YOO, M; LEE, W et al., 2007. Ester derivatives from tannase-treated prunioside A and their anti-inflammatory activities, *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 28(1):73-76.
- KACHOURI, S; HALAOULI, S; LOMASCOLO, A; ASTHER, M; HAMDY, M. 2005. Decolourization of black oxidized olive-mill wastewater by a new tannase-producing *Aspergillus flavus* strain isolated from soil, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.21 (8-9):1465-1470.

- KAR, B; BANERJEE, R; BHATTACHARYYA, B.1999. Microbial production of gallic acid modified solid state fermentation. J. Ind. Microbiology. Biotechnology. 23: 173-177.
- KARAK, T; BHAGAT, R. 2010.Trace elements in tea leaves, made tea and tea infusion: a review, Food Research International, 43(9):2234-2252.
- KASHYAP, P; SABU, A; PANDEY, A; SZAKACS, G; SOCCOL, C.2002. Extra-cellular L-glutaminase production by *Zygosaccharomyces rouxii* under solid-state fermentation. Process Biochem. 38: 307-312.
- KASIECZKA-BURNECKA, M; KUC, K; KALINOWSKA, H; KNAP, M; TURKIEWICZ, M. 2007. Purification and characterization of two cold-adapted extracellular tannin acyl hydrolases from an Antarctic strain *Verticillium* sp. P9. Applied Microbiology and Biotechnology, 77(1):77–89.
- KENTHORAI, J; PER, N.2013. Environmental assessment of enzyme use in industrial production- a literature review. Journal of Cleaner Production 42: 228-240.
- KHANBABAEE, K; VAN REE, T. 2001. Tannins: Classification and Definition. Natural Product Reports 18(6): 641-649.
- KIRK-OTHMER, 2005. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. John Wiley and Sons, New York.
- KRISHNASAMY, L; JAYHANTI, S; PONMURUGAN, P. 2009. Effect of Various Biotic and Abiotic Factors on the Activity of Tannase. European Journal of Applied Sciences 1 (1): 01-05.
- KRUEGER, W; GUTIERREZ-BAÑUELOS, K. CARSTENS ET AL; G.2010. Effects of dietary tannin source on performance, feed efficiency, ruminal fermentation, and carcass and noncarcass traits in steers fed a high-grain diet, Animal Feed Science and Technology, 159(1-2):1-9.
- LEKHA, P; NAGH; LOSANE, B. 1994. Bioprocess engineering. 11:7-15.
- LEKHA, P. 1996. Ph.D. Thesis, University of Mysore.
- LEKHA, P; LONSANE, B. 1997. Production and application of tannin acyl hydrolase: State of the art. Advances in applied microbiology 44:215– 260.

- LEÓN, F; TORRES, I; JIMÉNEZ, F. 2011. Molecular and biochemical characterization of extracellular tannin acyl hydrolase activity from a mexican isolate of *Aspergillus niger*, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 69(12):942-947.
- LOWRY OH. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*.139:265-75.
- LU, M; CHEN, C. 2007. Enzymatic tannase treatment of green tea increases in vitro inhibitory activity against N-nitrosation of dimethylamine. *Process Biochemistry*. 42: 1285-1290.
- LU, M; CHEN, C. 2008. Enzymatic modification by tannase increases the antioxidant activity of green tea, *Food Research International*, 41(2):130-137.
- LU, M; CHU, S; YAN, L; CHEN, C. 2009. Effect of tannase treatment on protein-tannin aggregation and sensory attributes of green tea infusion. *Food Sci. Technol*, 42: 338-342.
- LUCZAJ, W; SKRZYDLEWSKA, E. 2005. Antioxidative properties of black tea, *Preventive Medicine*, 40(6):910-918.
- IIBUCHI, S; MINODA, Y; YAMADA, K. 1972. Hydrolyzing pathway, substrate specificity and inhibition of tannin acyl hydrolase of *Aspergillus oryzae*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 36(9): 1553–1562.
- MAHENDRAN, B; RAMAN, N; KIM, D .2006. Purification and characterization of tannase from *Paecilomyces variotii*: hydrolysis of tannic acid using immobilized tannase,” *Applied Microbiology and Biotechnology*. 70(4):444-450.
- MAITY, C; DAS MOHAPATRA, P; PATI, B; MONDAL, K. 2009. A simple gel detection method of microbial tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25(4):733–735.
- MAKKAR, H; BLUEMMEL, M; BOROWY, N; BECKER, K. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods, *Journal Science Food Agriculture*. 61:161–165.
- MARTÍNEZ, J; MATA, M; AGUILAR, C; ILYINA, ANNA. 2010. A Process to Produce Penicillin G Acylase by Surface-Adhesion Fermentation Using *Mucor griseocyanus* to Obtain 6-Aminopenicillanic Acid by Penicillin G Hydrolysis. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 160:2045–2053.

- MATA, M; RODRÍGUEZ, L; RAMOS, E; RENOVATO, J; CRUZ, M; RODRÍGUEZ, R; CONTRERAS, J; AGUILAR, C. 2009. A novel tannase from the *xerophilic fungus Aspergillus niger* GH1. *Journal Microbiol Biotechnology*. 19(9): 987–996.
- MALDONADO, M; STRASSER DE SAAD, A. 1998. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. *J Ind Microbiol Biotechnol* 20:34–8.
- MICHELI, P. 1729. *Nova Plantarum Genera*. Florentiae.
- MORALES, P; CABRAL, AGUSTÍN; CRUZ, VIRGINIA; GONZÁLEZ, FRANCISCO; ZARCO, A. 2007. Correlation of the radio protective effect of the methyl gallate on the ruptures induction in DNA and it effect in the capture of free radicals. iaea.org
- MOSIER, N; LADISCH, M.2009. *Modern biotechnology connecting innovations in microbiology and biochemistry to engineering fundamentals*. Editor: Wiley John Sons.
- MURUGAN, K; AL-SOHAIBANI. 2010. Biocompatible removal of tannin and colour from tannery effluent using the biomass and tannase enzyme of *Aspergillus candidus* MTTC 9628. *Research Journal of Microbiology* 5(4):262-271.
- MURUGAN, K; SARAVANABABU, S; ARUNACHALAM, M. 2007. Screening of tannin acyl hydrolase (E.C.3.1.1.20) producing tannery effluent fungal isolates using simple agar plate and SmF process. *Bioresource Technology*. 98: 946–949.
- NIELSEN, P; MALMOS, H; DAMHUS, T; DIDERICHSEN, B; NIELSEN, H; SIMONSEN, M; SCHIV, H; OESTERGAARD, A; OLSEN, H.S; EIGTVED, P; NIELSEN, T. 1994. Enzyme applications (industrial). In: fourth ed. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley & Sons, Inc, New York. 9: 567-620.
- NOGUCHI, N; OHASHI, T; SHIRATORI, T. et al., 2007. Association of tannase-producing *Staphylococcus lugdunensis* with colon cancer and characterization of a novel tannase gene, *Journal of Gastroenterology*. 42 (5):346-351.
- OOIJKAAS, L; WEBER, F; BUITELAAR, R; TRAMPER, J; RINZEMA, A. 2000. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends Biotechnology*. 18:356-360.
- PANDEY, A. 1994. *Solid State Fermentation*. Wiley Eastern: New Age International Publishers. pp. 3-48.

- PEPI, M; LAMPARIELLO, L; ALTIERI, R.2010. Tannic acid degradation by bacterial strains *Serratia* spp. and *Pantoea* sp. isolated from olive mill waste mixtures, *International Biodeterioration and Biodegradation*, vol. 64 (1): 73–80.
- RAMAN, K; HENNING, P. 2013. Environmental assessment of enzyme use in industrial production-a literature review. *Journal of Cleaner Production*. 42:228-240.
- RAMÍREZ-CORONEL, M; VINIEGRA-GONZALEZ, G; DARVILL, A; AUGUR, C. 2003. A novel tannase from *Aspergillus niger* with β -glucosidase activity. *Microbiology*, 149(10):2941–2946.
- RANA, N; BHAT, T.2005. Effect of fermentation system on the production and properties of tannase of *Aspergillus niger* van Tieghem MTCC 2425.J. *Gen. Applied Microbiology*.51: 203–212.
- REYES, I. 2006. Difusión y Crecimiento Microbiano de *Aspergillus niger* sobre un Medio Sólido. Tesis para obtener el Grado de Maestra en Ciencias (Ingeniería Química). Universidad Autonoma Metropolitana Unidad Iztapapala- México.
- RODRIGUES, T; PINTO, G; GONCALVES, B. 2008. Effects of inoculum concentration, temperature and carbon sources on tannase production during solid state fermentation of cashew apple bagasse. *Biotechnology and Bioprocess Engineer* 13: 571-576.
- RODRIGUEZ, H; CUIEL, J; LANDETE, J. 2009. Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 132 (3): 79–90.
- RODRÍGUEZ, L; VALDIVIA, B; CONTRERAS, J; RODRIGUEZ, R; AGUILAR, C. 2010. Química y Biotecnología de la Tanasa. *Acta química Mexicana. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila* 2:4.
- RODRÍGUEZ, L; SPELZINI, D; BOERIS, V; AGUILAR, C; PICÓ, G.2013. Partition in aqueous two-phase system: Its application in downstream processing of tannase from *Aspergillus niger*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 101:392- 397.
- RODRÍGUEZ, L; VALDIVIA, B; CONTRERAS, J; RODRÍGUEZ, R; AGUILAR, C.2011. Novel Strategies for Upstream and Downstream Processing of Tannin Acyl Hydrolase. *Enzyme Research*.
- ROUT, S; BANERJEE, R. 2006. Production of tannase under mSSF and its application in fruit juice debittering, *Indian Journal of Biotechnology*. 5(3):346-350.

- SABU, A; KIRAN, G; PANDEY, A. 2005a. Purification and characterization of tannin acyl hydrolase from *Aspergillus niger* ATCC 16620, Food Technology and Biotechnology, 43(2):133-138.
- SABU, A; PANDEY, A; DAUD, M; SZAKACS, G. 2005b. Tamarind seed powder and palm kernel cake: two novel agro residues for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* ATCC 16620. Bioresour. Technol. 96: 1223-1228.
- SAHA, B; JORDAN, D; BOTHAST, R. 2009. Enzymes, Industrial (overview). Encyclopedia of Microbiology. 281-294.
- SANCHEZ, S; DEMAIN, A. 2010. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. Org Process Res Dev. 15:224–30.
- SHARMA, S; BHAT, T; DAWRA, R. 1999. Isolation, purification and properties of tannase from *Aspergillus niger* van Tieghem. World Journal of Microbiology and Biotechnology 15(6): 673–677.
- SHARMA, S; BHAT, K; DAWRA, R. 2000. A Spectrophotometric Method for Assay of Tannase Using Rhodanine. Analytical Biochemistry 279: 85- 89.
- SHARMA, S; AGARWAL, L; SAXENA, R. 2008. “Purification, immobilization and characterization of tannase from *Penicillium variable*,” Bioresource Technology. 99(7):2544-2551.
- SETH, M; CHAND, S. 2000. Biosynthesis of tannase and hydrolysis of tannins to gallic acid by *Aspergillus awamori*-optimisation of process parameters. 36: 39-44.
- SCHONS, P; LOPES, F; BATTESTIN, V; MACEDO, G. 2011. Immobilization of *Paecilomyces variotii* tannase and properties of the immobilized enzyme. Journal of Microencapsulation, 28 (3):211–219.
- SCHOLTMEIJER, K; WESSELS, J; WÖSTEN, H. 2001. Fungal hydrophobins in medical and technical applications. Applied Microbiology and Biotechnology. 56 (1-2):1-8.
- SOETAERT, W; VANDAMME, E. 2010. The scope and impact of industrial biotechnology. In: Soetaert, W; Vandamme, E (Eds.), Industrial Biotechnology. WILEY-VCH Verlag GmbH and Co, Weinheim, pp. 1e16.
- STRUMEYER, D y MALIN, M. 1970. Resistance of extracellular yeast invertase and other glycoproteins to denaturation by tannins. Biochemistry Journal, 118, 899–900.

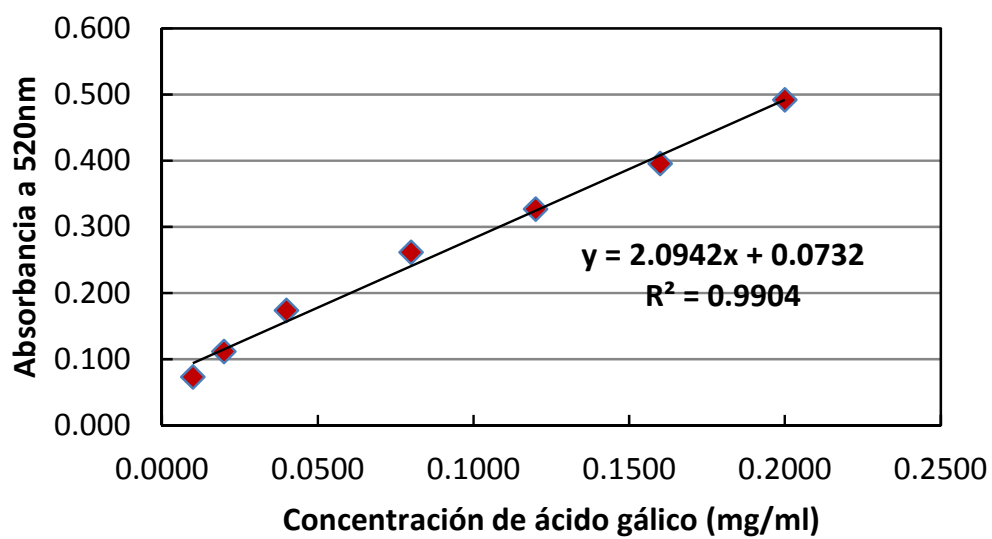
- SRIVASTAVA, A; KAR, R. 2009. Characterization and application of tannase produced by *Aspergillus niger* ITCC 6514.07 on pomegranate rind. Brazilian Journal of Microbiology. 40: 782-789.
- SRIVASTAVA, A; KAR, R. 2010. Application of immobilized tannase from *Aspergillus niger* for the removal of tannin from myrobalan juice, Indian Journal of Microbiology. 50(S1):46-51.
- SU, E; XIA, T; GAO, L; DAI, Q; ZHANG, Z.2009. Immobilization and characterization of tannase and its haze-removing, Food Science and Technology International, 15(6):545-552.
- TEJIRIAN, A; XU, F. 2011. Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds, Enzyme and Microbial Technology. 48(3):239-247.
- TIEGHEM, V. 1867. Sur la fermentation gallique. C.R. Academy. Sciences. (Paris). 65:1091 – 1094.
- TREVIÑO-CUETO, B; LUIS, M; CONTRERAS-ESQUIVEL, J, RODRÍGUEZ, R, AGUILERA, A; AGUILAR, C. 2007. Gallic acid and tannase accumulation during fungal solid state culture of a tannin-rich desert plant (*Larrea tridentata* Cov.). Bioresource Technology 98: 721–724.
- TROUNG, Q; MIYATA, N; IWAHORI, K. 2004. Growth of *Aspergillus oryzae* during treatment of cassava starch processing waste water with high contents of suspended solids. Journal Bioscience and Bioengineering 97:329-335.
- VAN DE LAGEMAAT, J; PYLE, D.2006. Tannase. In: Enzyme Technology, Pandey, A., C. Webb, C.R. Soccol and C. Larroche (Eds.). 1st Edn., Springer, New York, pp: 380-397.
- VENDITTI, E; BACCHETTI, T; TIANO, L; CARLONI, P; GRECI, L; DAMIANI, E.2010. Hot vs. cold water steeping of different teas: do they affect antioxidant activity. Food Chemistry, 119(4):1597-1604.
- VERMA, N; BANSAL, M; KUMAR, V. 2010. Comparative studies on biofilm development by *Aspergillus niger* on polyester sheet and muslin cloth. Journal Biochemistry Technology. 3(2): 187-188.
- VILLENA, G; MORENO, P; GUTIERREZ, M. 2001. Cellulase production by fungal biofilms on polyester cloth. Applied Microbiology. 43: 262-268.

- VILLENA, G. 2006. Fermentación por adhesión a superficies: Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de enzimas. Tesis Ph.D. UNALM. Lima, Perú.
- VILLENA, G; GUTIÉRREZ, M. 2007. Morphological patterns of *Aspergillus niger* biofilms and pellets related to lignocellulolytic enzyme productivities. *Lett Applied Microbiology*. 45:231–237.
- VILLENA, G; GUTIÉRREZ, M.2010. Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations. *Applied Microbiology Biotechnology*. 87:545–551
- WARD, O; QIN, W; DHANJOON, J; YE, J; SINGH, A. 2006. Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in applied Microbiology*. 58.
- WOSTEN, H; WILLEY, J.2002. Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow into the air. *Microbiology*.146:767–773.
- OW, Y; STUPANS, I. 2003. Gallic acid and gallic acid derivatives: effects on drug metabolizing enzymes. *Current Drug Metabolism*, 4(3):241-248.
- YAO, J; SHAN, G; HUI, G; YU, R; LIUB, H. 2013. Production, characterization and applications of tannase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*.
- ZHONG, X; PENG, L; ZHENG, S; SUN, Z; REN, Y; DONG, M. 2004. Secretion, purification, and characterization of a recombinant *Aspergillus oryzae*. tannase in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 36(2):165–169.

VIII. ANEXOS

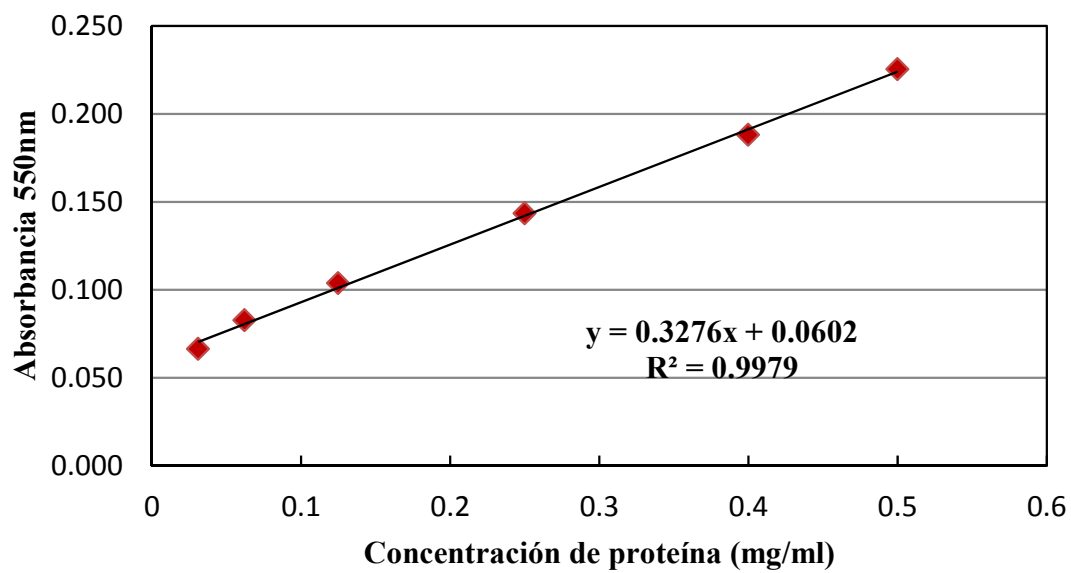
ANEXO I

CURVA ESTÁNDAR DE ÁCIDO GÁLICO PARA EL ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA A 520 nm.



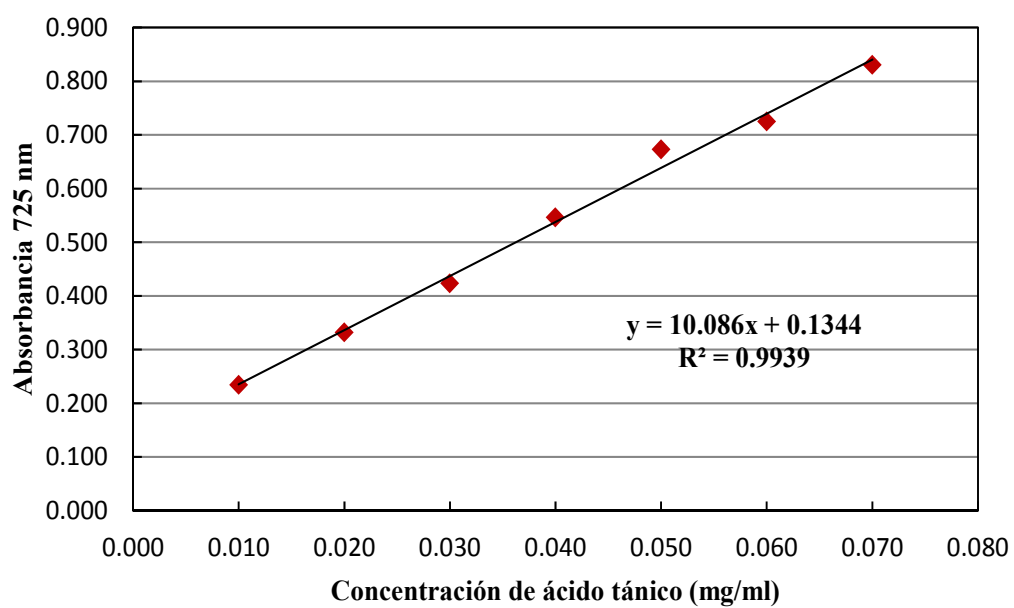
ANEXO II

CURVA ESTÁNDAR DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA PARA EL ENSAYO DE PROTEÍNA SOLUBLE A 550nm.



ANEXO III

CURVA ESTÁNDAR DE ÁCIDO TÁNICO PARA EL ENSAYO DE FENOLES HIDROLIZABLES TOTALES A 725nm.



ANEXO IV

Cuadro 11: Resultados de la producción de biomasa

TRATAMIENTOS / TIEMPO	Biomasa (g/L)			PROMEDIO (g/L)	D.S
3% AT con 10⁵ (esp/ml)	R1	R2	R3		
0	0.025	0.050	0.025	0.033	0.001
24	1.473	1.708	1.478	1.553	0.005
48	1.493	1.700	1.558	1.583	0.004
72	2.503	2.498	2.500	2.500	0.000
96	3.833	3.793	3.760	3.795	0.001
3% AT con 10⁶ (esp/ml)					
0	0.062	0.059	0.071	0.064	0.000
24	0.988	1.075	1.225	1.096	0.005
48	1.453	1.693	1.645	1.597	0.005
72	4.468	4.545	4.398	4.470	0.003
96	5.015	5.060	5.040	5.038	0.001
3% AT con 10⁷ (esp/ml)					
0	0.050	0.050	0.008	0.036	0.001
24	1.553	1.388	1.430	1.457	0.003
48	2.662	2.620	2.688	2.657	0.001
72	5.058	4.810	4.285	4.718	0.016
96	6.298	6.085	6.300	6.228	0.005
5% AT con 10⁵ (esp/ml)					
0	0.155	0.153	0.174	0.161	0.000
24	0.350	0.515	0.623	0.496	0.005
48	1.993	2.163	2.048	2.068	0.003
72	2.763	3.185	3.418	3.122	0.013
96	3.495	3.463	3.818	3.592	0.008
5% AT con 10⁶ (esp/ml)					
0	0.103	0.147	0.212	0.154	0.002
24	0.863	0.562	1.415	0.947	0.017
48	2.013	2.170	2.313	2.165	0.006
72	3.715	3.033	3.423	3.390	0.014
96	4.510	4.378	4.748	4.545	0.007
5% AT con 10⁷ (esp/ml)					
0	0.086	0.124	0.096	0.102	0.001
24	0.713	1.135	0.988	0.945	0.009
48	2.638	2.748	3.220	2.868	0.012
72	3.983	4.110	4.210	4.101	0.005
96	4.943	4.995	5.113	5.017	0.003
7% AT con 10⁵ (esp/ml)					
0	0.100	0.108	0.081	0.096	0.001
24	0.850	0.910	0.523	0.761	0.008
48	2.035	2.235	2.313	2.194	0.006
72	2.498	2.683	2.560	2.580	0.004
96	3.488	3.425	3.278	3.397	0.004
7% AT con 10⁶ (esp/ml)					
0	0.116	0.120	0.116	0.117	0.000
24	0.575	0.898	0.640	0.704	0.007
48	2.500	2.298	2.500	2.433	0.005
72	3.145	3.038	3.290	3.158	0.005
96	3.990	4.215	3.845	4.017	0.007
7% AT con 10⁷ (esp/ml)					
0	0.104	0.134	0.115	0.118	0.001
24	0.750	1.180	1.233	1.054	0.011
48	3.230	3.253	2.893	3.125	0.008
72	4.025	3.833	3.890	3.916	0.004
96	4.685	4.613	4.250	4.52	0.01

*AT: ácido tánico

i. Análisis de variancia para la producción de biomasa de (0 – 96 HORAS).

Fuente de Variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Fcalc.	Signif.
Inóculo	2	16.7388736	8.3694368	288.97	<.0001
AT	2	2.2447119	1.1223559	38.75	<.0001
Tiempo	4	344.6763494	86.1690873	2975.12	<.0001
Inó*AT	4	0.8353579	0.2088395	7.21	<.0001
Inó* tiempo	8	11.1701912	1.3962739	48.21	<.0001
AT*tiempo	8	8.5752443	1.0719055	37.01	<.0001
Inó*AT*tiempo	16	4.0622584	0.2538911	8.77	<.0001
Error	90	2.6066880	0.0289632		
Total	134	390.9096746			

j. Prueba de tukey (P<0.05) para concentración de inóculo en la producción de biomasa.

Inóculo (esp/ml)	Promedio	Agrupación
10 ⁷	2.72389	A
10 ⁶	2.25973	B
10 ⁵	1.86222	C

k. Prueba de tukey (P<0.05) para la concentración de ácido tánico en la producción de biomasa.

Concentración de ácido tánico (%)	Promedio	Agrupación
3	2.45509	A
5	2.24496	B
7	2.14580	C

l. Prueba de tukey (P<0.05) para el tiempo en la producción de biomasa.

Horas	Promedio	Agrupación
96	4.46059	A
72	3.55063	B
48	2.29907	C
24	1.00152	D
0	0.09793	E

m. Prueba GLM en interacción concentración de inóculo*ácido tánico en la producción de biomasa.

Tratamientos *	Promedio	Agrupación
T1	1.89313333	A
T2	1.88773333	A
T3	1.80580000	A
T4	2.45313333	B
T5	2.24033333	C
T6	2.08573333	D
T7	3.01900000	E
T8	2.60680000	F
T9	2.54586667	B F G

n. Prueba GLM en la interacción de concentración de inóculo*tiempo para la máxima producción de biomasa (96 horas de fermentación).

Concentración de inóculo (esp/ml)	Tiempo (horas)	Promedio	Agrupación
5	96	3.59477778	A
6	96	4.53344444	B
7	96	5.25355556	C

- o. Prueba GLM para la interacción de concentración de AT*tiempo para la máxima producción de biomasa (96 horas de fermentación).

Concentración de ácido tánico (%)	Tiempo (horas)	Promedio	Agrupación
3	96	5.02044444	A
5	96	4.38477778	B
7	96	3.97655556	C

- p. Prueba GLM para la interacción de concentración de AT*inóculo*tiempo para la máxima producción de biomasa (96 horas de fermentación).

Tratamientos *	Tiempo (horas)	Promedio	Agrupación
T1	96	3.79533333	A
T2	96	3.59200000	A B
T3	96	3.39700000	B C
T4	96	5.03833333	D
T5	96	4.54533333	E
T6	96	4.01666667	A F
T7	96	6.22766667	G
T8	96	5.01700000	D H
T9	96	4.51600000	E I

ANEXO V

Cuadro 12: Resultados de la producción de enzima

TRATAMIENTOS / TIEMPO	Actividad enzimática (UI/L)			PROMEDIO (U/L)	D.S
	R1	R2	R3		
3% AT con 10⁵ (esp/ml)					
0	0.050	0.050	0.175	0.092	0.072
24	6.040	6.539	6.414	6.331	0.260
48	6.732	8.411	8.411	7.851	0.969
72	25.382	26.380	24.633	25.465	0.876
96	35.615	36.364	33.369	35.116	1.559
3% AT con 10⁶ (esp/ml)					
0	0.037	0.050	-0.075	0.004	0.069
24	12.404	10.283	14.525	12.404	2.121
48	33.743	37.237	36.863	35.948	1.918
72	75.547	71.304	77.544	74.799	3.186
96	98.758	100.380	103.251	100.796	2.275
3% AT con 10⁷ (esp/ml)					
0	0.050	0.050	0.175	0.092	0.072
24	21.638	23.635	20.640	21.971	1.525
48	49.716	50.465	53.210	51.130	1.840
72	113.483	108.492	112.984	111.653	2.749
96	127.010	126.087	123.841	125.646	1.630
5% AT con 10⁵(esp/ml)					
0	0.050	0.050	0.175	0.092	0.072
24	6.289	5.915	5.416	5.873	0.438
48	11.156	9.659	9.035	9.950	1.090
72	20.016	19.018	21.014	20.016	0.998
96	23.261	26.256	25.881	25.133	1.632
5% AT con 10⁶ (esp/ml)					
0	0.050	0.050	0.175	0.092	0.072
24	2.171	2.421	3.544	2.712	0.731
48	10.657	12.030	11.780	11.489	0.731
72	33.244	36.987	33.369	34.533	2.126
96	52.337	56.579	58.202	55.706	3.029
5% AT con 10⁷ (esp/ml)					
0	0.050	0.050	0.175	0.092	0.072
24	11.156	13.402	11.905	12.154	1.144
48	31.122	28.876	30.873	30.290	1.231
72	72.927	76.421	74.923	74.757	1.753
96	82.660	86.778	84.033	84.491	2.097
7 % AT con 10⁵ (esp/ml)					
0	0.050	0.050	0.175	0.092	0.072
24	4.293	5.541	5.541	5.125	0.720
48	4.667	6.789	8.036	6.497	1.703
72	12.154	10.907	11.531	11.531	0.624
96	18.519	19.891	19.767	19.392	0.759
7 % AT con 10⁶ (esp/ml)					
0	0.050	0.050	0.175	0.092	0.072
24	6.289	4.917	5.291	5.499	0.710
48	7.787	9.284	9.284	8.785	0.865
72	25.507	24.009	26.755	25.424	1.375
96	32.246	36.488	33.868	34.201	2.141
7 % AT con 10⁷ (esp/ml)					
0	0.050	0.050	0.175	0.092	0.072
24	8.536	5.041	6.414	6.664	1.760
48	19.891	21.514	21.389	20.931	0.903
72	29.375	31.247	30.998	30.540	1.016
96	56.829	48.967	54.708	53.50	4.07

* AT: ácido tánico

i. Análisis de varianza para la producción de enzima.

Fuente de Variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Fcalc.	Signif.
Inóculo	2	19842.58492	9921.29246	4157.88	<.0001
AT	2	14863.91641	7431.95821	3114.63	<.0001
Tiempo	4	67134.23149	16783.55787	7033.76	<.0001
Inó*AT	4	4872.17135	1218.04284	510.47	<.0001
Inó* tiempo	8	13523.04302	1690.38038	708.42	<.0001
AT*tiempo	8	9978.36616	1247.29577	522.72	<.0001
Inó*AT*tiempo	16	3096.53970	193.53373	81.11	<.0001
Error	90	214.7528	2.3861		
Total	134	133525.6059			

j. Prueba de tukey (P<0.05) para concentración de inóculo en la producción de enzima.

Inóculo (esp/ml)	Promedio	Agrupación
10 ⁷	41.6002	A
10 ⁶	26.8322	B
10 ⁵	11.9037	C

k. Prueba de tukey (P<0.05) para la concentración de ácido tánico en la producción de enzima.

Concentración de ácido tánico (%)	Promedio	Agrupación
3	40.6198	A
5	24.4920	B
7	15.2243	C

l. Prueba de tukey (P<0.05) para el tiempo en la producción de enzima.

Horas	Promedio	Agrupación
96	59.3313	A
72	45.4130	B
48	20.3191	C
24	8.7481	D
0	0.0819	E

m. Prueba GLM para interacción concentración de inóculo*ácido tánico en la producción de enzima.

Tratamientos *	Promedio	Agrupación
T1	14.9710000	A
T2	12.2127333	B
T3	8.5274000	C
T4	44.7900667	D
T5	20.9064000	E
T6	14.8000000	A F
T7	62.0984000	G
T8	40.3567333	H
T9	22.3456000	I

n. Prueba GLM para la interacción de concentración de inóculo*tiempo para la máxima producción de enzima (96 horas de fermentación).

Concentración de inóculo (esp/ml)	Tiempo (horas)	Promedio	Agrupación
5	96	26.5470000	A
6	96	63.5676667	B
7	96	87.8792222	C

- o. Prueba GLM para la interacción de concentración de AT*tiempo para la máxima producción de enzima (96 horas de fermentación).

Concentración de ácido tánico (%)	Tiempo (horas)	Promedio	Agrupación
3	96	87.1861111	A
5	96	55.1096667	B
7	96	35.6981111	C

- p. Prueba GLM para la interacción de concentración de AT*inóculo*tiempo para la máxima producción de enzima (96 horas de fermentación).

Tratamientos *	Tiempo (horas)	Promedio	Agrupación
T1	96	35.116000	A
T2	96	25.132667	B
T3	96	19.392333	C
T4	96	100.796333	D
T5	96	55.706000	E
T6	96	34.200667	A F
T7	96	125.646000	G
T8	96	84.490333	H
T9	96	53.501333	E I

ANEXO VI

Cuadro 13: Resultados de la producción de proteína soluble

TRATAMIENTOS / TIEMPO	Concentración de proteína (g/L)			PROMEDIO (g/L)	D.S
	R1	R2	R3		
3% AT con 10⁵ esp/ml					
0	0.002	0.002	0.003	0.002	0.601
24	0.029	0.027	0.028	0.028	0.917
48	0.046	0.045	0.046	0.046	0.294
72	0.045	0.041	0.040	0.042	2.427
96	0.056	0.058	0.058	0.057	1.022
3% AT con 10⁶ esp/ml					
0	0.002	0.002	0.003	0.002	0.920
24	0.041	0.041	0.041	0.041	0.254
48	0.059	0.065	0.060	0.061	3.326
72	0.072	0.072	0.068	0.071	2.072
96	0.097	0.093	0.094	0.095	1.805
3% AT con 10⁷ esp/ml					
0	0.002	0.002	0.003	0.002	0.601
24	0.033	0.036	0.034	0.034	1.655
48	0.072	0.073	0.073	0.073	0.530
72	0.119	0.117	0.119	0.118	1.109
96	0.128	0.126	0.124	0.126	2.163
5% AT con 10⁵ esp/ml					
0	0.002	0.002	0.003	0.002	0.601
24	0.011	0.012	0.011	0.011	0.530
48	0.015	0.017	0.024	0.019	4.623
72	0.042	0.034	0.040	0.039	3.849
96	0.043	0.049	0.043	0.045	3.454
5% AT con 10⁶ esp/ml					
0	0.002	0.002	0.003	0.002	0.601
24	0.024	0.019	0.014	0.019	4.776
48	0.060	0.064	0.054	0.059	4.842
72	0.076	0.072	0.068	0.072	4.269
96	0.088	0.083	0.092	0.088	4.581
5% AT con 10⁷ esp/ml					
0	0.002	0.002	0.003	0.002	0.601
24	0.037	0.037	0.040	0.038	1.635
48	0.041	0.045	0.049	0.045	3.949
72	0.091	0.088	0.093	0.090	2.611
96	0.097	0.093	0.102	0.097	4.452
7 % AT con 10⁵ esp/ml					
0	0.002	0.002	0.003	0.002	0.601
24	0.010	0.013	0.011	0.011	1.255
48	0.020	0.019	0.018	0.019	0.777
72	0.024	0.025	0.023	0.024	1.202
96	0.032	0.037	0.030	0.033	3.463
7 % AT con 10⁶ esp/ml					
0	0.002	0.002	0.003	0.002	0.601
24	0.026	0.026	0.029	0.027	1.987
48	0.054	0.057	0.059	0.057	2.934
72	0.064	0.070	0.063	0.066	3.998
96	0.083	0.079	0.080	0.081	2.308
7 % AT con 10⁷ esp/ml					
0	0.002	0.002	0.003	0.002	0.601
24	0.021	0.021	0.023	0.022	1.322
48	0.044	0.038	0.042	0.041	3.359
72	0.056	0.058	0.056	0.057	1.202
96	0.094	0.088	0.092	0.09	3.36

* AT: ácido tánico

i. Análisis de varianza para la producción de proteína soluble.

Fuente de Variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Fcalc.	Signif.
Inóculo	2	0.02258744	0.01129372	1742.46	<.0001
AT	2	0.00571166	0.00285583	440.61	<.0001
Tiempo	4	0.09758708	0.02439677	3764.07	<.0001
Inó*AT	4	0.00258896	0.00064724	99.86	<.0001
Inó* tiempo	8	0.01347079	0.00168385	259.79	<.0001
AT*tiempo	8	0.00263612	0.00032951	50.84	<.0001
Inó*AT*tiempo	16	0.00481415	0.00030088	46.42	<.0001
Error	90	0.00058333	0.00000648		
Total	134	0.14997953			

j. Prueba de tukey (P<0.05) para concentración de inóculo en la producción de proteína soluble.

Inóculo (esp/ml)	Promedio	Agrupación
10 ⁷	0.0560222	A
10 ⁶	0.0477556	B
10 ⁵	0.0254000	C

k. Prueba de tukey (P<0.05) para la concentración de ácido tánico en la producción de proteína soluble.

Concentración de ácido tánico (%)	Promedio	Agrupación
3	0.0515111	A
5	0.0419778	B
7	0.0356889	C

l. Prueba de tukey (P<0.05) para el tiempo en la producción de proteína soluble

Horas	Promedio	Agrupación
96	0.0792222	A
72	0.0613704	B
48	0.0466296	C
24	0.0257407	D
0	0.0023333	E

m. Prueba GLM para interacción concentración de inóculo*ácido tánico en la producción de proteína soluble

Tratamientos *	Promedio	Agrupación
T1	0.03506667	A
T2	0.02320000	B
T3	0.01793333	C
T4	0.04873333	D
T5	0.04806667	DE
T6	0.04646667	EF
T7	0.07073333	G
T8	0.05466667	H
T9	0.04266667	I

n. Prueba GLM para la interacción de concentración de inóculo*tiempo para la máxima producción de proteína (96 horas de fermentación).

Concentración de inóculo (esp/ml)	Tiempo (horas)	Promedio	Agrupación
5	96	0.04511111	A
6	96	0.08766667	B
7	96	0.10488889	C

- o. Prueba GLM para la interacción de concentración de AT*tiempo para la máxima producción de enzima (96 horas de fermentación).

Concentración de ácido tánico (%)	Tiempo (horas)	Promedio	Agrupación
3	96	0.09266667	A
5	96	0.07666667	B
7	96	0.06833333	C

- p. Prueba GLM para la interacción de concentración de AT*inóculo*tiempo para la máxima producción de enzima (96 horas de fermentación).

Tratamientos *	Tiempo (horas)	Promedio	Agrupación
T1	96	0.05733333	A
T2	96	0.04500000	B
T3	96	0.03300000	C
T4	96	0.09466667	D
T5	96	0.08766667	E
T6	96	0.08066667	F
T7	96	0.12600000	G
T8	96	0.09733333	D H
T9	96	0.09133333	DE I

* Tratamientos para la interacción

TRATAMIENTOS	Interacción de inóculo y ácido tánico
T1	Concentración de inóculo de 10^5 esp/ml con 3% de AT
T2	Concentración de inóculo de 10^5 esp/ml con 5% de AT
T3	Concentración de inóculo de 10^5 esp/ml con 7% de AT
T4	Concentración de inóculo de 10^6 esp/ml con 3% de AT
T5	Concentración de inóculo de 10^6 esp/ml con 5% de AT
T6	Concentración de inóculo de 10^6 esp/ml con 7% de AT
T7	Concentración de inóculo de 10^7 esp/ml con 3% de AT
T8	Concentración de inóculo de 10^7 esp/ml con 5% de AT
T9	Concentración de inóculo de 10^7 esp/ml con 7% de AT

ANEXO VII

ABREVIATURAS

AT: Ácido tánico

FAS: Fermentación por adhesión a superficie

ATCC: Colección americana de tipos de cultivos

THA: Tanino acil hidrolasa

FDA: Agencia de alimentos y medicamentos

FSS: Fermentación en sustrato sólido

FSL: Fermentación sumergida líquida

GRAS: Generalmente Reconocidos Como Seguros

Esp/ml: Esporas por mililitro

GLM: Modelos lineales generalizados

U I : Unidades Internacional