



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**“PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE
UNA TANASA DE *Aspergillus niger* Aa20,
PRODUCIDA POR FERMENTACION EN MEDIO
SOLIDO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

“MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL”

P R E S E N T A

MA. ASCENCION RAMIREZ CORONEL

TUTOR: DR. CHRISTOPHER AUGUR (IRD, UAM-I)

ASESORES: DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZALEZ (UAM-I)

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL (UAM-I)

MEXICO, D. F.

2000

LA MAESTRIA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL, DE LA UNIVERSIDAD
AUTONOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA, SE ENCUENTRA,
DENTRO DEL PADRON DE EXCELENCIA DEL CONSEJO NACIONAL DE
CIENCIA Y TECNOLOGIA CON NUMERO DE REGISTRO: 309-0.

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO GRACIAS A LA BECA-CREDITO
OTORGADA POR EL CONACyT CON NUMERO DE REGISTRO 124739.

A mis padres

y

A mis profesores

MARCO DEL PROYECTO.

El IRD, ha trabajado en colaboración con la UAM-I, desde hace 16 años en los programas de Biotecnología y es en este marco, en que se desarrolla esta tesis. La cual trata, sobre la purificación y caracterización, de una tanasa de *Aspergillus niger* Aa20, para la destoxificación de la pulpa del café, particularmente para la eliminación de los taninos que se encuentran en ésta, como parte de un gran proyecto, que es Biopulca (# IC18*CT970185), en colaboración del IRD – UAM - Universidad de Reading (Inglaterra) - Universidad de Paraná (Brasil), financiado por la Comunidad Económica Europea.

Los trabajos experimentales de esta tesis de maestría, fueron realizados en la UAM-Iztapalapa en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos Filamentosos.

RECONOCIMIENTOS:

Quiero agradecer al Dr. Christopher Augur, con el cargo de investigador del IRD y co-director del laboratorio de Biología Molecular de Hongos Filamentosos de la UAM- Iztapalapa, México, por haberme dejado participar en este proyecto y por darme todo su apoyo.

A mis asesores el Dr. Gustavo Viniegra González, Investigados de la UAM-I y director del laboratorio de Biología molecular de hongos filamentosos, quien permitió que realizara este trabajo en su laboratorio.

Al Dr. Octavio Loera, investigador de la UAM-I, por sus comentarios objetivos durante la elaboración del presente documento.

Muy especialmente a la Dra. Concepción Gutiérrez Ruiz, coordinadora de la Maestría en Biología Experimental en la UAM - Iztapalapa, por brindarme su punto de vista y consejos, para el buen desarrollo de este trabajo, en cada una de mis presentaciones.

También quiero agradecer al Ingeniero Bernard Remi Río, por sus consejos prácticos y técnicos en el trabajo experimental, y por brindarme su amistad y de la misma manera a los estudiantes del laboratorio, Sergio, Gerardo, Mehdi, Florence, Saúl y Cliserio, quienes hicieron agradable mi estancia en este lugar.

INDICE.

	Página
Lista de figuras	8
Lista de tablas	9
Lista de abreviaturas	10
1.0. Introducción	13
2.0. Análisis bibliográfico	18
2.1. Definición de los taninos	18
2.2. Clasificación de los taninos	18
2.2.1. Los taninos condensados (prociandinas)	19
2.2.2. Los taninos hidrolizables	21
2.2.3. Los florotaninos	22
2.3. Fuentes de taninos y su distribución en plantas.....	24
2.4. La unión tanino – proteína	25
2.5. Efectos antifisiológicos de los taninos	26
2.6. Degradación de los taninos por microorganismos	26
2.7. Tanasa.....	27
2.7.1. Fuentes de tanasa	27
2.7.2. Producción de la tanasa	28
2.7.3. Propiedades de la tanasa	29
2.7.4. Inhibidores de la tanasa	31
2.7.5. Mecanismos de acción de la tanasa	32
2.7.6. Usos de la tanasa	33
2.8. Los hongos filamentosos	34
2.8.1. El género <i>Aspergillus</i>	35
2.8.1.1. Producción de enzimas por los <i>Aspergilli</i>	36
2.9. La fermentación en medio sólido	36
2.9.1. Tipos de soporte sólido	37
2.9.1.1. Espuma de poliuretano.....	37
2.10. Conclusión	38
3.0. Hipótesis y Objetivos	40

3.1. Hipótesis	40
3.2. Objetivo general.....	40
3.2.1. Objetivos particulares.....	40
4.0. Materiales y métodos.	42
4.1. Variable.....	42
4.2. Producción y obtención de la enzima.....	43
4.2.1. Microorganismo	43
4.2.2. Medio de propagación y conservación de la cepa.....	43
4.2.3. Medio de fermentación.....	44
4.2.4. Preparación del soporte sólido (Espuma de poliuretano).....	44
4.2.5. Condiciones de la fermentación.....	45
4.2.5.1. Cosecha de esporas.....	45
4.2.5.2. Impregnación del poliuretano con el medio de cultivo y el inoculo.....	45
4.2.6. Obtención del extracto enzimático extracelular.....	45
4.3. Clarificación del extracto enzimático extracelular.....	46
4.4. Concentración del extracto enzimático (Ultrafiltración).....	46
4.5. Técnica analítica para determinar actividad tanasa.....	47
4.5.1. Ensayo enzimático.....	47
4.6. Cuantificación de proteínas.....	48
4.7. Detección de la actividad tanasa sobre SDS-PAGE.....	48
4.8. Etapas de purificación	49
4.8.1. Focalización Isoeléctrica.....	51
4.8.2. Cromatografía de Intercambio aniónico.....	52
4.8.3. Cromatografía de Filtración en Gel.....	53
4.9. SDS-PAGE	54
4.10. Caracterización de la tanasa purificada.....	55
4.10.1. pH Optimo.....	56
4.10.2. Temperatura Optima.....	56
4.10.3. Técnica cualitativa para la detección de la degradación de los taninos hidrolizables y condensados.....	56

4.10.4. Secuenciación de la tanasa de <i>A. niger</i> Aa20.....	57
4.10.5. Cuantificación de la actividad β -D-glucosidasa.....	59
4.10.6. Análisis de la actividad tanasa y β -D-glucosidasa.....	60
5.0. Resultados.....	62
5.1. Producción de la tanasa	62
5.2. Resultados de la concentración del extracto enzimático.....	63
5.3. Purificación	63
5.3.1. Purificación por iso-electroenfoque.....	63
5.3.2. Purificación por intercambio aniónico.....	65
5.3.3. Filtración en Gel G-100	68
5.4. 1. Electroforesis tipo SDS-PAGE	70
5.4.2. Gel de actividad.....	72
5.6. Caracterización de la Tanasa.....	73
5.6.1. Secuencia interna de la proteína de 85 KDa	73
5.6.1.1. Homologías de la tanasa con la β -D-glucosidasa, de <i>A. kawachii</i>	74
5.6.1.2. Actividad de β -D-glucosidasa de la Tanasa.....	76
5.6.2. pH Optimo de la tanasa.....	78
5.6.3. Temperatura Optima de la tanasa.....	80
5.7.1. Las similitudes y diferencias de la tanasa de <i>A. niger</i> Aa20 con otras tanasas.....	82
5.7.2. Degradación de los taninos condensados e hidrolizables con la tanasa.....	83
6.0. Discusión	86
7.0. Conclusiones y perspectivas.....	91
8.0. Referencias Bibliográficas.....	94

Lista de figuras

	Página
Figura 2.2.1 : Catequina y Epi-catequina.....	19
Figura 2.2.2 : Galato de catequina y Galato de Epi-catequina.....	20
Figura 2.2.3 : Galato de galocatequina y Galato de Epi-galocatequina.....	20
Figura 2.2.4 : Procianidina.....	21
Figura 2.2.5 : Acido tánico.....	22
Figura 2.2.6 : Galato de metilo.....	22
Figura 2.2.7 : Floroglucinol.....	23
Figura 2.2.8 : Florotanino.....	23
Figura 2.7.1 : La Actividad esterasa.....	33
Figura 2.7.2 : La Actividad dehidrasa.....	33
Figura 4.8.1 : Producción y etapas de preparación y purificación de la tanasa.....	50
Figura 5.3.1 : Isoeléctroenfoque preparativo de la fracción concentrada de Tanasa.....	64
Figura 5.3.2 : Cromatografía de intercambio aniónico de las fracciones de Rotofor.....	66
Figura 5.3.3 : Actividad de la tanasa en las fracciones de cromatografía de intercambio aniónico.....	67
Figura 5.3.4 : Actividad de la tanasa después de Filtración en Gel (G-100).....	68
Figura 5.3.5 : Perfil de elución de proteínas en la cromatografía de Filtración en gel G-100.....	69
Figura 5.4.1 : SDS-PAGE de las diferentes etapas de purificación.....	70
Figura 5.4.2 : SDS- PAGE teñido con plata y de actividad, incubado en ácido tánico.....	72
Figura 5.6.1 : Celulosa.....	77
Figura 5.6.2 : pH Optimo de la tanasa en amortiguador de citratos 0.1 M	79
Figura 5.6.3 : Actividad tanasa sobre amortiguador de acetatos 0.1M	79
Figura 5.6.4 : Temperatura Optima de la tanasa.....	80

Lista de tablas

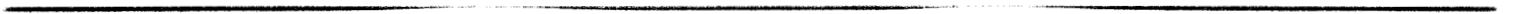
	Página
Tabla 2.7.1: Características de las tanasas reportadas en la literatura desde 1968 hasta 1997, producidas por diferentes microorganismos.....	31
Tabla 2.7.2: Inhibidores e inactivadores de la tanasa.....	32
Tabla 4.1.1: Taninos utilizados como substratos de la tanasa.....	42
Tabla 4.2.1: Composición del medio de fermentación.....	44
Tabla 4.8.1: Marcadores de P.M. para cromatografía de Filtración en Gel.....	54
Tabla 4.9.1: Marcadores de P.M. para tinción con plata.....	55
Tabla 4.9.2: Soluciones de tinción con AgNO ₃	55
Tabla 4.10.1: Abreviación de los aminoácidos.....	58
Tabla 4.10.2: Soluciones de tinción con azul de Coomassie.....	59
Tabla 5.1.1: Actividad de la tanasa con dos concentraciones diferentes de ácido tánico.....	62
Tabla 5.3.1: pH de las fracciones de rotofor.....	64
Tabla 5.6.1: Secuencias internas de la tanasa de 85 KDa.....	73
Tabla 5.6.2: Secuencias internas de la tanasa de 170 KDa.....	73
Tabla 5.6.3: Homologías entre proteínas de 85 y 170 KDa.....	74
Tabla 5.6.4: Comparación de las secuencias 170 KDa y 85 KDa.....	75
Tabla 5.6.5: Actividad β -D-glucosidasa de la tanasa.....	77
Tabla 5.6.6: Inhibición de la β -D-glucosidasa por ácido tánico.....	78
Tabla 5.7.1: Similitudes y diferencias de la tanasa de <i>A. niger</i> Aa20 con las enzimas producidas en FML y con la tanasa de plantas.....	82
Tabla 5.7.2: Degradación de taninos condensados e hidrolizables.....	83

Lista de abreviaturas

BSA	: Albúmina sérica bovina
PDA	: agar dextrosa papa
m.o	: Microorganismo
A.	: <i>Aspergillus</i>
SDS-PAGE	: Gel de electroforesis de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
F.M.S	: Fermentación en medio sólido
PUF	: Espuma de poliuretano
F.M.L	: Fermentación en medio líquido
FPLC	: Cromatografía líquida de baja presión
HPLC	: Cromatografía líquida de alta presión
FR	: Fracción retenida
N.R	: No retenida
A.I	: Antes de la inyección
U.I	: Unidades internacionales
P.M.	: Peso molecular
Da	: Daltons
KDa	: Kilodaltons
pl	: Punto isoeléctrico
g	: gramos
nm	: nanometros
rpm	: revoluciones por minuto
h	: hora
hrs	: horas
min	: minuto
seg	: segundos
cm	: centímetros
TCA	: ácido tricloroacético
MeOH	: Metanol

I.A	: Intercambio aniónico
EC	: Epicatequina
GC	: Galato de catequina
GEC	: Galato de Epi-catequina
GGC	: Galato de galocatequina
GEGC	: Galato de Epi-galocatequina
GM	: Galato de Metilo
PGG	: Pentagaloilo de glucosa
AG	: Acido gálico
M	: Molar
mM	: mili molar
N	: Normal
EDTA	: Etilendiamino tetra acético
DFP	: Difluoro fosfato
50 MWCO	: Corte de 50 KDa de peso molecular
S.U	: Subunidades
AD	: Azul dextran
ADH	: Alcohol deshidrogenasa
AC	: Anhidrasa carbónica
Cc	: Citocromo c

Introducción



1. INTRODUCCION

Los taninos, son compuestos polifenólicos muy diversos, que se integran en una familia de estructura química diferente, pero con una función fisiológica similar. Se encuentran en gran variedad de plantas y en algas cafés (Hagerman y Carlson, 1998). En general, los taninos pueden ser divididos en tres grupos: los florotaninos que se han encontrado únicamente en algas cafés; los taninos hidrolizables, cuya distribución está más restringida en plantas superiores y los taninos condensados (procianidinas) que están ampliamente distribuidos en las plantas superiores (Hagerman y Carlson, 1998).

Los florotaninos se componen de grupos de floroglucinol, con diferentes patrones de polimerización y, se encuentran exclusivamente en algas marinas cafés (Hagerman y Carlson, 1998; Waterman y Mole, 1994).

Los taninos hidrolizables se componen de ácido gálico y glucosa y están formados por ésteres de ácido gálico. Incluyen galotaninos simples, como el galato de metilo y el ácido elágico (Hagerman y Carlson, 1998).

Los taninos condensados, en cambio, forman estructuras complejas que son las procianidinas las cuales son polímeros de catequina. Estos taninos son comunes en la planta del té verde o negro, o en las semillas de uvas y en las cortezas de árboles como el Quebracho o la Acacia. Taninos como el galato de epicatequina, pueden inhibir la formación de cáncer (Jankun *et al*, 1997).

La abundancia de los taninos en los vegetales, se ha asociado con un sistema de defensa contra microorganismos (Lewis y Starkey, 1968). Tienen diversos efectos sobre los sistemas biológicos, siendo potentes queladores de iones metálicos, agentes precipitantes de proteínas, y antioxidantes biológicos (Hagerman y Carlson, 1998). Los taninos, cuando se encuentran en altas concentraciones, en productos de origen vegetal como; jugos, tés, café y vinos, causan astringencia (Bajpai y Patil, 1996).

Los taninos se encuentran en productos agrícolas que son destinados a la alimentación de ganado (Jiménez *et al*, 1994). Su alto contenido en forrajes, se ha asociado con baja disponibilidad de proteínas, lo cual causa desnutrición; siendo este uno de los efectos fisiológicos no deseados más importantes causados por los taninos (McLeod, 1974). Por otra parte, el tanino se ha utilizado en la industria de la curtiduría, para el tratamiento de pieles, aprovechando su característica de unirse a las proteínas (Scalbert, 1991). Sin embargo, los desechos de estos taninos impiden el tratamiento de aguas residuales por microorganismos. Son estos tres efectos: astringencia, disminución de la digestibilidad y el impedimento del tratamiento de aguas, lo que justifica esta tesis, que tiene como objetivo buscar enzimas que controlen y eliminen la astringencia de los taninos, que se piensa asociada con las moléculas de ácido gálico y sería reducida al eliminar estos grupos.

La tanasa es una enzima que producen algunos microorganismos para poder utilizar los taninos como fuente de carbono. Dentro de los microorganismos que utilizan los taninos se encuentran: levaduras (Aoki *et al*, 1976 a y b, Deschamps y Leulliette, 1984), bacterias (Deschamps *et al*, 1980; Deschamps *et al*, 1983; Osawa y Walsh, 1993; Skene y Brooker, 1995), y especies de hongos como los *Aspergillus* (Ibuchi *et al*, 1972, Barthomeuf *et al*, 1994a) y *Penicillium* (Suseela y Nandy, 1983).

Los hongos que mejor degradan los taninos, como el ácido tánico son pertenecientes a la especie *Aspergillus niger*, que es capaz de crecer sobre fuentes en las que se encuentran concentraciones de hasta 20% de ácido tánico en el medio (van Diepeningen, 1999).

El mecanismo de acción de la tanasa es la hidrólisis de los enlaces éster del ácido gálico que en los taninos hidrolizables puede ser de dos tipos: esterasa; cuando la hidrólisis se da entre una molécula de ácido gálico y glucosa, o bien entre un grupo metilo y una molécula de ácido gálico y, depsidasa; cuando la hidrólisis se da entre dos moléculas de ácido gálico y la enzima actúa despolimerizando la molécula, como ocurre en el ácido tánico (Beverini y Metche, 1990).

La pulpa de café ha sido estudiada para ser utilizada en la alimentación de los animales, pero se ha encontrado que para poder ser utilizada, ésta debe primero ser destoxificada. Esto implica, la eliminación de cafeína y compuestos polifenólicos (Ramírez- Martínez, 1988).

La degradación de taninos por el uso de enzimas, como la tanasa, es el propósito principal de este trabajo, que se desarrolló como parte de un proyecto financiado por la Comunidad Económica Europea orientado a la destoxificación de la pulpa del café, la cual tiene un elevado contenido de proteínas pero también una alta concentración de taninos. Se sabe que la tanasa degrada los taninos hidrolizables (Yamada *et al*, 1968), pero se conoce poco acerca de la degradación de los taninos condensados por esta enzima. Aunque existen patentes registradas en los E.U.A, sobre el uso de la tanasa en la extracción de té y clarificación (Agbo y Joseph, 1995; Lehmborg *et al*, 1999, y en Europa, Yamada y Tanaka, 1972; Tenko y Bow, 1971).

El principal objetivo de este trabajo fue purificar y caracterizar la tanasa de *Aspergillus niger* Aa20, producida por fermentación en medio sólido y probar su actividad sobre diferentes taninos como sustratos de la tanasa. Para lo cual, se escogieron algunos taninos hidrolizables y condensados.

En este trabajo, se desarrolló un estudio experimental para estudiar la posible actividad de la tanasa sobre una serie de taninos hidrolizables y condensados. En unos se encuentra ácido gálico y en otros no. Para poder determinar el mecanismo de acción de la tanasa a través de los productos generados, y ver si la tanasa era capaz de actuar en algún lugar diferente del enlace éster del ácido gálico, como por ejemplo en la catequina y el grupo pirrogalol del galato de catequina, ya que el pirrogalol es un compuesto muy parecido al ácido gálico, con la diferencia de que el pirrogalol no contiene el grupo carboxílico.

En general se trató de ver si la tanasa aquí estudiada era capaz de hidrolizar ésteres muy diversos del ácido gálico, ya sea con glucosa, con otros ésteres de ácido gálico o con taninos condensados. Pues se sabe poco de la especificidad de este tipo de enzima.

Para poder desarrollar este estudio, se produjo la tanasa por una cepa de *Aspergillus niger* de la colección IRD-UAM, previamente aisladas por (Roussos, 1985) y Aquiahuatl-Ramos (1992), y ensayada posteriormente por Ramírez-Coronel, (1996). La producción se hizo por fermentación en medio sólido utilizando como soporte espuma de poliuretano, que ofrece la cualidad de ser inerte. El sistema de fermentación sólida ofrece entre sus cualidades; multiplicar la producción de la tanasa extracelular a diferencia de la producción en medio líquido (Lekha y Lonsane, 1994), y que según estudios del laboratorio es un sistema libre de proteasas a diferencia de la fermentación en medio líquido. Este sistema además favorece la extracción de las enzimas, ya que estas son excretadas al medio en tanto que cuando se produce en medio líquido, la tanasa es intracelular (Lekha y Lonsane 1994).

Una vez establecido el medio de fermentación se produjo la tanasa, para después establecer un protocolo de purificación, dividido en tres grandes etapas: la *obtención* de la enzima extracelular, la *concentración* del extracto enzimático y su *purificación*. Con la cuantificación de la actividad enzimática por HPLC y la técnica de zimografía desarrollada, se pudo llevar un control en las etapas de purificación, de esa forma la enzima pura pudo ser caracterizada y enviada a secuenciar en forma parcial en la Universidad de Harvard en los EUA. Además con muestras de la enzima purificada se pudo hacer un estudio de la actividad de la enzima usándo una amplia gama de sustratos puros obtenidos de fuentes diversas.

Las secuencias de aminoácidos obtenidas de la tanasa purificada, tienen 100% de homologías con una β -D-glucosidasa de *A. kawachii*, y la tanasa de *Aspergillus niger* Aa20 tiene actividad β -D-glucosidasa, lo cual la hace la primera tanasa bifuncional reportada.

Los resultados principales de esta tesis, indican que la tanasa obtenida es muy poco específica y además, se encontró un resultado inesperado que fue la presencia de una segunda actividad catalítica como celobiasa.

Análisis Bibliográfico



2. Análisis bibliográfico

El presente análisis bibliográfico, trata sobre la importancia de entender la estructura de los taninos y el origen e importancia de sus efectos antifisiológicos. Se analiza con detalle, el mecanismo de acción de la tanasa y las características de la tanasa producida por diferentes microorganismos. Finalmente, se lleva a cabo un análisis de la fermentación en medio sólido, para la producción de enzimas y la utilización de la espuma de poliuretano, a diferencia de los soportes biodegradables de origen agrícola, como el bagazo de caña.

2.1. Definición de los taninos

Los taninos son compuestos fenólicos, solubles en agua, que tienen un peso molecular entre 500 y 3,000. Tienen propiedades especiales para precipitar alcaloides, colágeno y otras proteínas (Hagerman y Carlson 1998).

Recientemente se ha sustituido el término polifenoles por taninos, en un esfuerzo para enfatizar la multiplicidad de grupos fenólicos, característicos de estos compuestos (Hagerman y Carlson, 1998). Scalbert (1991), los definió como polifenoles solubles en agua, que difieren de otros compuestos fenólicos por su habilidad para precipitar proteínas.

2.2. Clasificación de los taninos

Todos los taninos son polifenólicos, pero se forman de grupos químicos diferentes y, de acuerdo al grupo del cual se componen, se clasifican en tres grandes grupos diferentes: los taninos condensados, los taninos hidrolizables y los florotaninos (Hagerman y Carlson, 1998).

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

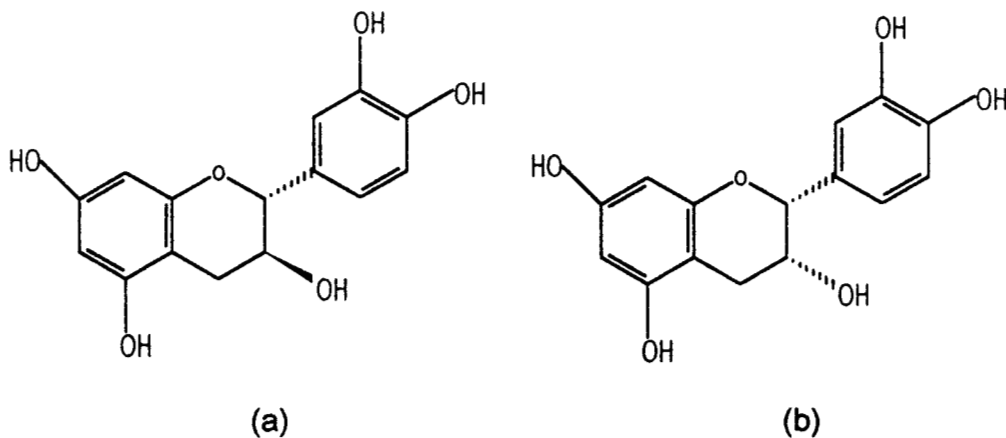


Figura 2.2.1. Catequina (a); Epi-catequina (b).

Los taninos condensados no contienen carbohidrato central a diferencia de los taninos hidrolizables. Los taninos más complejos son las prociandinas que han sido modificadas por esterificación o por oxidación (Scalbert, 1991).

Existen diversas formas para los taninos condensados, pero sus estructuras básicas son la catequina o epicatequina, y el grupo pirrogalol; que es una molécula muy parecida al ácido gálico: un benceno al que se unen tres grupos hidróxilos en las posiciones 3,4,5, pero sin el grupo carboxilo. Estas formas básicas forman el galato de catequina y el galato de epi-catequina (Fig. 2.2.2).

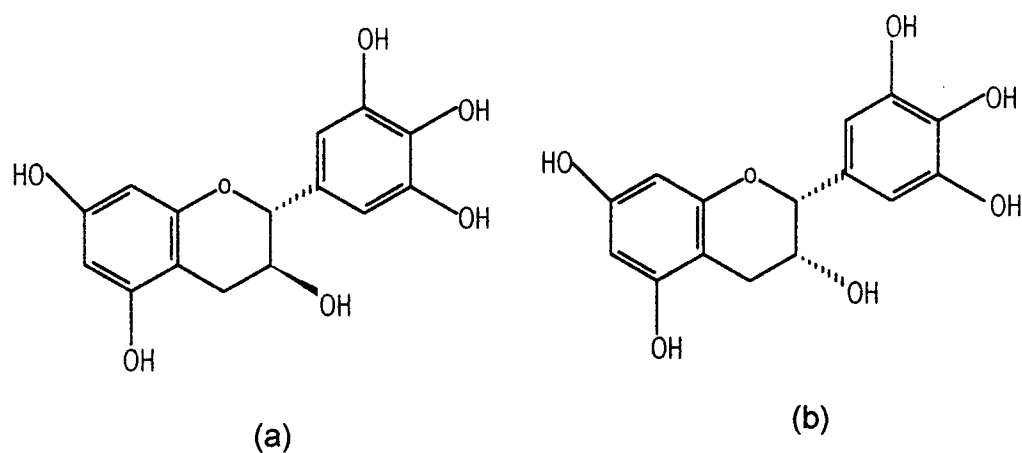


Figura 2.2.2. Galateo de catequina (a); Galateo de Epi-catequina (b)

Quando estas moléculas se esterifican con ácido gálico, se forma el galateo de galocatequina o el galateo epi-galocatequina (Fig. 2.2.3), y se producen oligómeros de estas moléculas que se conocen como procianidinas, las cuales pueden o no, estar esterificadas con ácido gálico (Fig. 2.2.4)

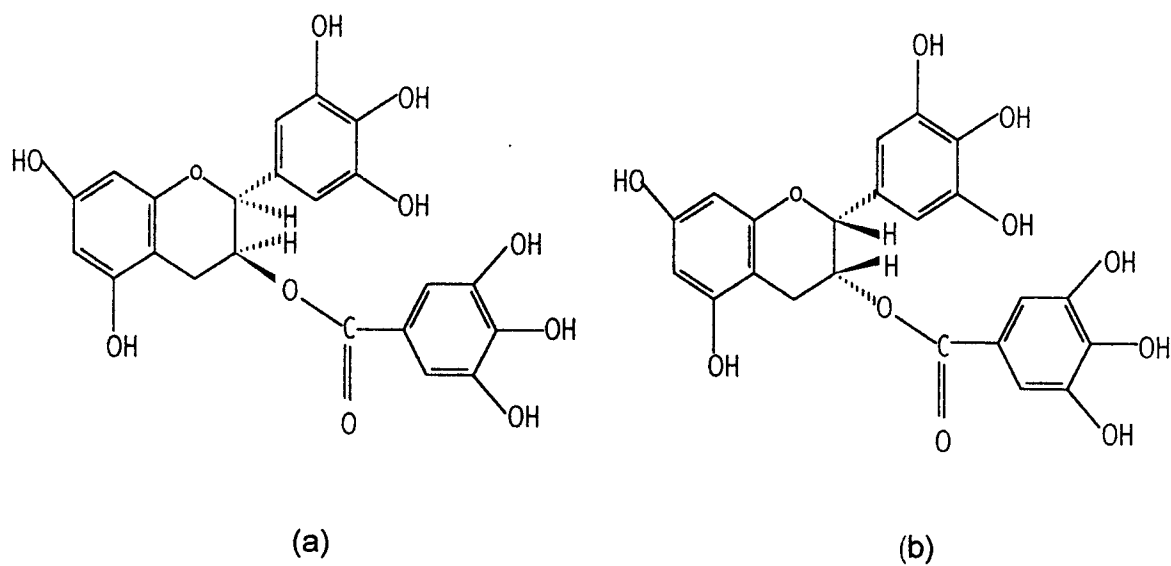


Figura 2.2.3. Galateo de galocatequina (a); Galateo de Epi-galocatequina (b).

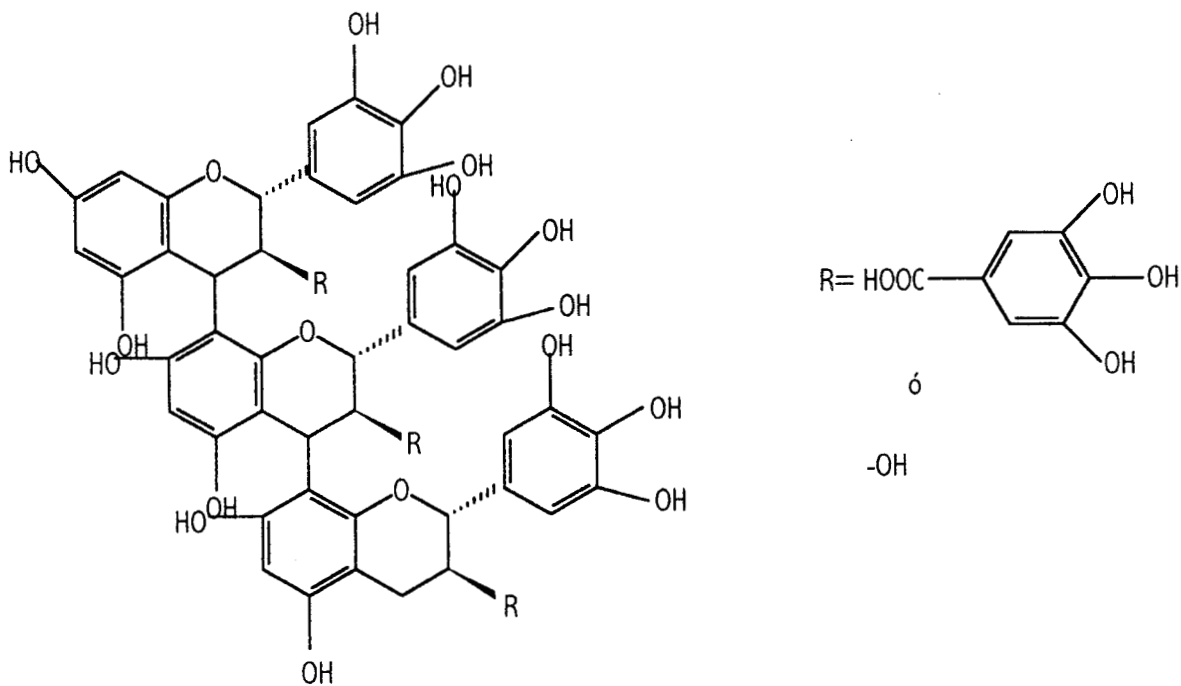


Figura 2.2.4. Procianidina

2.2.2. Los taninos hidrolizables; se componen de ácido gálico (3,4,5-ácido trihidroxibenzoico) y una molécula de glucosa. La unión de dos moléculas de ácido gálico hace el ácido elágico. El ácido tánico (Figura 2.2.5), es un galotanino, formado por ésteres del ácido gálico y la glucosa. Contiene cinco moléculas de ácido gálico unidos directamente a la molécula de glucosa (pentagalatoilo de glucosa), a estos ácidos gálicos centrales se esterifican otras moléculas de ácido gálico, para componer el ácido tánico. El enlace entre las moléculas de ácido gálico se conoce como enlaces depsídicos a pesar de ser un enlace éster.

Otros tipos de taninos hidrolizables más simples son el ácido elágico y el galato de metilo. El primero, se compone de dos moléculas de ácido gálico y el segundo, es una molécula de ácido gálico metilada en el grupo carboxilo (Fig.2.2.6).

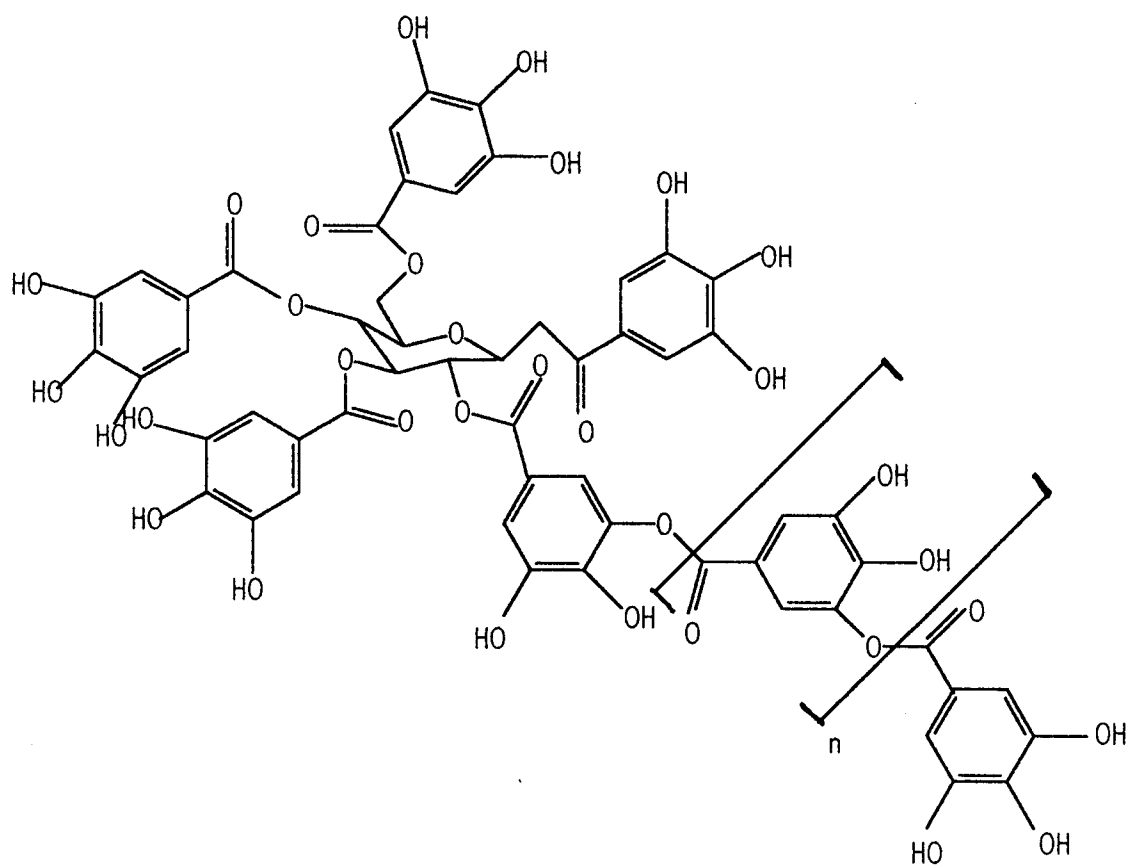


Figura 2.2.5. Acido tánico

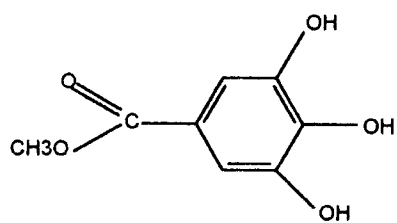


Figura 2.2.6. Galato de Metilo

2.2.3. Los florotaninos; Son taninos que se encuentran en algas marinas cafés y se componen de subunidades de floroglucinol (1,3,5- trihidroxibenceno), Figura 2.2.7.

Sus enlaces son de tipo aril-aril o éter entre; carbono – oxígeno o carbono - carbono, (Figura 2.2.8) Los florotaninos siguen diferentes patrones de polimerización en diferentes especies (Hagerman y Carlson, 1998).

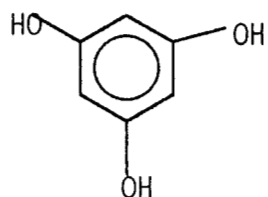


Figura 2.2.7. Floroglucinol

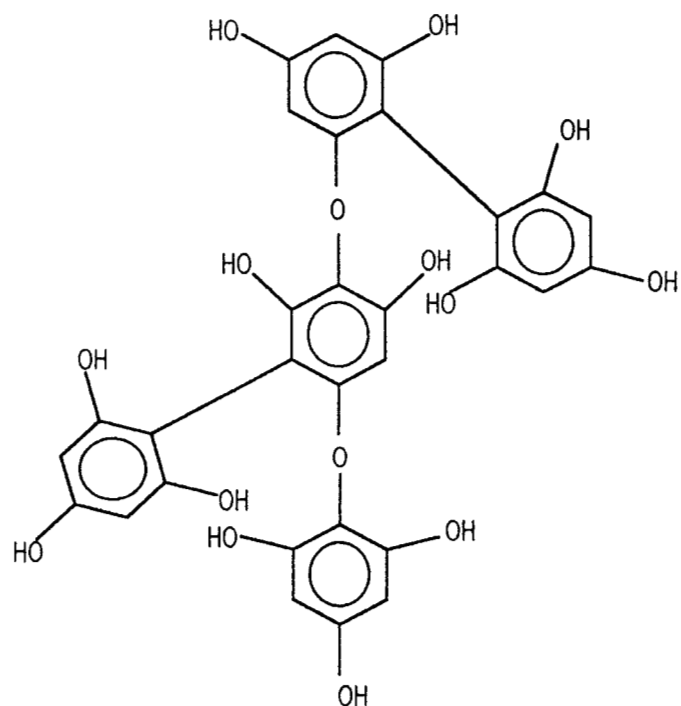


Figura 2.2.8. Florotanino

2.3. Fuentes de taninos y su función en las plantas

Los polifenoles, las procianidinas y los ésteres del ácido gálico, constituyen un grupo de metabolitos secundarios en las plantas (Ozawa *et al*, 1987). Los taninos tienen un significado importante en el suelo y plantas porque de su habilidad para unirse a las proteínas resulta su resistencia a muchos organismos fitopatógenos. Además los taninos de ciertas plantas participan en la formación del humus del suelo. También el alto contenido de taninos en plantas se ha asociado con la protección al ataque microbiano, y su durabilidad se ha relacionado con su alto contenido de taninos (Dellus *et al*, 1997). También se cree que los taninos inhiben la peroxidación de lípidos de la membrana celular, de las semillas expuestas a irradiación disminuyendo la formación de radicales libres (Osawa *et al*, 1985).

En fin, los taninos son uno de los cuatro grupos de componentes más abundantes de las plantas, junto con la celulosa, la hemicelulosa y las ligninas y junto con las ligninas, son los polímeros polifenólicos más ampliamente distribuidos en la naturaleza (Lewis y Starkey, 1968).

Los taninos se encuentran en una gran variedad de especies de plantas superiores, herbáceas y leñosas (Okuda *et al*, 1993). Pudiéndose acumular en cantidades de hasta más del 10% de su peso seco (Scalbert, 1991). Las plantas acumulan una amplia variedad de compuestos secundarios, incluyendo alcaloides, terpenos y fenólicos, que no participan en el metabolismo primario pero funcionan como agentes tóxicos, protegiendo a las plantas de los herbívoros y de muchas enfermedades (Hagerman y Carlson, 1998). Los cultivares de sorgo (con altos contenidos de taninos), se aprovechan en todo el mundo, porque son resistentes a la depredación de los pájaros, favoreciéndose su cosecha. Sin embargo, cuando los granos son utilizados como alimento para animales, los efectos son tóxicos: se reduce la tasa del crecimiento, decreciendo la asimilación de las proteínas, y de los aminoácidos (Jiménez *et al*, 1994).

2.4. La unión tanino – proteína

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

Los grupos ionizados sobre el complejo tanino - proteína, pueden introducir fuerzas de atracción o de repulsión entre las moléculas que pueden reforzar o debilitar el efecto de los puentes de hidrógeno. El efecto neto determina la estabilidad del complejo tanino proteína, y dependen de factores tales como: el número, el tipo y el arreglo espacial de los grupos cargados sobre los taninos y de las proteínas, así como de las propiedades del solvente tales como: pH y constante dieléctrica.

Hay tres posibilidades de interacción de los taninos con las proteínas: la formación de puentes de hidrógeno, que es reversible e independiente del pH, cuando el pH es menor de 8.0. En cambio las interacciones iónicas dependen del pH y son reversibles pudiendo debilitar o reforzar los puentes de hidrógeno dependiendo de las condiciones (McLeod, 1974).

Los puentes de hidrógeno y las interacciones iónicas, entre las proteínas y los taninos se favorecen particularmente en los taninos hidrolizables, que tienen numerosos grupos carboxilos (McLeod, 1974). Los grupos fenólicos de los taninos reaccionan por dos mecanismos: uno por acoplamiento oxidativo, que es irreversible y otro, por puentes de hidrógeno que es reversible (McLeod, 1974). Esta propiedad llamada a veces astringencia, es la razón por la cual los taninos se han usado para curtir pieles animales (Scalbert, 1991).

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

Es muy importante aquí destacar, para el propósito de la tesis, que la habilidad de los taninos hidrolizables de precipitar proteínas, ha sido relacionada con su grado de esterificación (Hagerman y Carlson, 1998) y por lo tanto la ruptura de esos enlaces, por la acción de esterasas como la tanasa disminuirá la capacidad astringente de estos polifenoles. De ahí el interés de buscar enzimas relativamente inespecíficas que rompan gran cantidad de ésteres de ácido gálico.

2.5. Efectos antifisiológicos de los taninos

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

2.6. Degradación de los taninos por microorganismos

Los taninos varían en su susceptibilidad al ataque microbiano, y son transformados sólo por ciertos hongos, principalmente por especies que pertenecen a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Lewis y Starkey, 1968). Los taninos hidrolizables son descompuestos por hongos como los *Aspergillus*, y los *Penicillium* y las bacterias de la especie *Achromobacter*, en tanto que, los condensados, son utilizados por especies como los *A. fumigatus* (Lewis y Starkey, 1969) y *Calvatia gigantea* (Galiotou y Macris, 1986). La tolerancia en la concentración de taninos entre las diferentes especies, es de hasta 20% para los *Aspergillus*. Pero para especies como

A. fischerii la tolerancia es del 3% solamente. Sin embargo, la concentración óptima es del 10% para los primeros y de 2% para los últimos (Bajpai y Patil, 1997).

2.7. Tanasa

La *tanin acil hidrolasa* EC. 3.1.1.20, es una enzima que reconoce el enlace éster entre el azúcar y el ácido gálico o el enlace entre dos moléculas de ácido gálico. A la primera se conoce como actividad esterasa y a la segunda, se le llama actividad depsidasa (Beverini y Metche, 1990). Nierenstein (1936), ya había propuesto un mecanismo de reacción de la tanasa sobre los taninos del té verde, asignándoles a estos una fórmula provisional. Al tratar estos taninos con la enzima, esta tenía dos actividades, por lo cual supuso que eran dos tanasas, a una la llamó 3-galoil-l-acatequintanasa y a la segunda galotanasa. La tanasa actúa sobre taninos como el galato de epicatequina y el 3-galato de epicatequina-galato, produciéndose con esta enzima, ácido gálico (Nierenstein 1936; Bradfield y Penney 1948).

Se sabe que la tanasa producida por los hongos, puede estar en el micelio unida a la membrana (Bradfield y Penney, 1948; Barthomeuf *et al*, 1994b) o secretarse fuera de la célula (Lekha y Lonsane, 1994; Bradoo *et al*, 1997) y que es una enzima inducible formada por el micelio de los hongos de diferentes especies (Bradoo *et al*, 1996). En la presencia de diferentes inductores, los hongos muestran crecimiento y producción de tanasas de diferente tipo (Bajpai y Patil, 1997).

2.7.1. Fuentes de las tanasas

En los microorganismos, se ha reportado estudios de producción de tanasa por levaduras (Aoki *et al*, 1976a y b; Deschamps y Leulliette, 1984), por bacterias (Deschamps *et al*, 1980; Deschamps *et al*, 1983; Skene *et al*, 1995; Osawa y Walsh, 1993) y por hongos filamentosos de diferentes especies, siendo los *Aspergillus*,

como ya se mencionó, los que toleran mejor elevadas concentraciones de taninos (Yamada *et al*, 1968; Vermeire y Vandame, 1988; Bajpai y Patil, 1996; Bradoo *et al*, 1996; Bajpai y Patil, 1997; Barhomeuf *et al*, 1994a).

En algunas plantas se ha encontrado una tanasa con actividad de esterasa y depsidasa (Niehaüs y Gross, 1997). Esta tanasa es inactiva con valores de pH menores de 3.8 y arriba de pH 7.8, con un intervalo de mejor actividad con valores de pH entre 4.3 y 5.0 con un amortiguador de citratos- fosfato monobásico de potasio, la máxima actividad fue a pH 4.3 y 6.3. La temperatura de reacción es mejor en el intervalo de 35°C y 40°C. A 50°C, comienza a perder su actividad y entre 70 y 80°C, pierde toda su actividad. El peso evaluado en una columna de Sephadex G-200 previamente calibrada es de 300 KDa y sobre un gel de electroforesis (técnica PAGE y teñido con plata) reveló tener 2 bandas. En un sistema llamado SDS-PAGE solamente encontraron una banda con peso molecular de 75 KDa. Niehaüs y Gross (1997), concluyen que esa tanasa puede ser un tetrámero de subunidades idénticas en condiciones ácidas el cual, se disocia, parcial o completamente, en dímeros reactivos bajo las condiciones alcalinas empleadas en el sistema PAGE. Esta tanasa también tuvo actividad esterasa y depsidasa.

2.7.2. Producción de la tanasa

Actualmente la tanasa es casi siempre producida por fermentación en medio líquido y la mayoría de los estudios sobre las características de la enzima, están hechos usando fermentación en medio líquido (Lekha y Lonsane, 1997). De esa forma, se han obtenido estudios muy interesantes e importantes en cuanto a la producción de la enzima, así como en la optimización de la purificación de la tanasa producida. Pourrat *et al*, (1982), reportaron la presencia de la tanasa asociada al micelio, lo cual coincide con un número de autores (Adachi *et al*, 1968; Yamada *et al*, 1968). Beverini

y Metche en (1990), encontraron dos tanasas: una con actividad esterasa y otra con actividad depsidasa, ambas tanasas fueron intracelulares.

Barthomeuf *et al*, (1994b), desarrollaron una técnica para la obtención de la tanasa intracelular, con el uso de micelas inversas y Hatamoto *et al*, (1996), clonaron el gen de una tanasa intracelular de *A. oryzae*, producida por fermentación en medio líquido.

En general, la producción de la tanasa de los hongos se favorece a una temperatura entre 30 y 35°C, así como a un pH entre 5.5 y 6.0. Por otra parte, la presencia del oxígeno es importante en la producción de la enzima (Hadi *et al*, 1994). Pourrat *et al*, (1982) y Barthomeuf *et al*, (1994a) indicaron las condiciones óptimas de producción de la enzima, lo cual se favorece en presencia de una fuente adicional de carbono que puede ser glucosa, además del ácido tánico. Por lo general la tanasa se produce en períodos largos de hasta 7 a 8 días de cultivo (Lekha y Lonsane, 1994; Bradoo *et al*, 1997).

Se han publicado pocos estudios de producción de tanasa por fermentación en medio sólido (Vermeire y Vandamme, 1988; Lekha y Lonsane 1994; Bradoo *et al*, 1997). Lekha y Lonsane (1994), en un estudio comparativo de la producción de la enzima de *Aspergillus niger*, en medio líquido (FML) y en medio sólido (FMS), sobre bagazo de caña encontraron que por FMS la tanasa tiene 4.8 veces más actividad volumétrica, que por FML. Por otro lado por FMS la enzima es completamente extracelular, a diferencia de la tanasa producida por FML. Esto facilita y economiza su obtención (Lekha y Lonsane, 1994).

2.7.3. Propiedades de la tanasa

Yamada *et al*, (1968), encontraron que la tanasa es inducible en presencia de taninos, y tiene un papel primordial en el crecimiento de los hongos, sobre el ácido tánico como única fuente de carbono.

Los primeros estudios de purificación de la tanasa son los trabajos de Yamada *et al*, (1968) y Adachi *et al*, (1968), dando las primeras características de la tanasa producida en medio líquido por *Aspergillus flavus* y utilizando ácido tánico como inductor y fuente de carbono. Ellos indicaron que la tanasa es una enzima asociada al micelio y que contenía 25.4% de hexosas, lo cual confiere a la enzima una alta solubilidad. El análisis N-terminal de la tanasa de *A. flavus*, mostró que la enzima tiene dos extremos N-terminal (uno empieza con alanina y otro con arginina) por el método de Sanger, lo cual sugiere que la enzima puede consistir de dos cadenas polipeptídicas diferentes, con pesos moleculares similares (Adachi *et al*, 1968).

En trabajos posteriores de purificación se obtuvieron tanasas con diferentes pesos moleculares. La más grande, descrita por Farías *et al* (1994), de un peso molecular de 240 KDa formada por 4 subunidades, seguida por la descrita por Hatamoto en (1996), con un peso molecular de 200 KDa con 8 subunidades, formando un heterooctámero. Adachi *et al*, (1968), reportaron una tanasa de *A. flavus* de 194 KDa, formada por dos subunidades y Aoki *et al*, (1976), también encontraron una tanasa formada por dos subunidades con P.M de 250 KDa. En general, las tanasas de diferentes microorganismos son multiméricas; variando sin uniformidad en el número de subunidades y en el peso molecular y posiblemente, el número de sus subunidades dependa del pH en el cual se encuentran.

El pH óptimo y el punto isoeléctrico de las tanasas producidas por FML y purificadas, es cercano a 5.0 y 4.0, respectivamente. La temperatura óptima para las tanasas producidas por fermentación medio líquido es entre 30°C y 40°C, y para la tanasa producida por FMS es de 60°C (Lekha y Lonsane, 1997).

La tabla siguiente (2.7.1) resume las características de las tanasa purificadas, producidas por diferentes microorganismos en medio líquido, y las características de la tanasa reportada por Lekha y Lonsane en 1994, producida por fermentación en medio sólido (analizada sobre un extracto crudo).

Tabla 2.7.1. Características de las tanasas reportadas en la bibliografía desde 1968 hasta 1997, de diferentes m.o y plantas.

Referencia m.o / planta	Peso Molecular (KDa)	Subunidades	Glicosilación (%)	Punto Isoeléctrico	Temperatura Optima °C	pH Optimo
Adachi <i>et al</i> , 1968 <i>A. flavus</i>	194	2 heterodímero	25.4	4.0		
Barthomeuf <i>et al</i> , 1994 <i>A. niger</i>	186		43	4.3	35	6.0
Farias <i>et al</i> , 1994 <i>C. parasitica</i>	240	4 (58)		4	30	5.5
Sussela <i>et al</i> , 1983 <i>P. chrisogenum</i>					30-40	5.0
Hatamoto <i>et al</i> , 1996 <i>A. ozyae</i>	200	8 (hetero- octámero)	22.7			
Aoki <i>et al</i> , 1976 <i>Candida</i>	250	2	62			
Skene <i>et al</i> , 1995 <i>Selomonas</i>					30-40	7.0
Lekha y Lonsane, 1994 <i>A. niger</i>					60	5.5
Niehaüs y Gross, 1997. <i>Pedunculata oak</i>	300	4(75)			35-40	4.3-5.0

En esta tabla se pueden ver resumidas las características de las tanasas intracelulares producida en FML. También, puede observarse que la única tanasa extracelular reportada en la tabla, producida en medio sólido, es la reportada por Lekha y Lonsane en (1994), analizada sobre un extracto crudo. Como la enzima tanasa producida por FMS no se purificó, se desconocen muchas de sus características moleculares.

2.7.4. Inhibidores de la tanasa

Ibuchi *et al*, (1972), encontraron que el sitio activo de la tanasa puede reaccionar con los grupos hidróxilo de compuestos fenólicos e inhibir la formación del complejo

enzima-sustrato. Sussela y Nandy, (1983), encontraron que la tanasa es inhibida hasta en un 53% por iones metálicos como: Cu^{2+} , Zn^{2+} y Fe^{2+} y hasta en un 17 % por Mg^{2+} a 20 mM, similar a lo que encontró Ibuchi *et al*, 1972. Farías *et al*, (1994), demostraron que el ácido gálico es un fuerte inhibidor de la tanasa (Tabla 2.7.2).

Por su parte Barthomeuf *et al*, (1994a), reportaron como inhibidores de la tanasa al di-isopropil fluorofosfato (DFP), el cobre, el hierro y el zinc. Sin embargo, esta acción es atenuada con 20 mM de EDTA. También describieron los siguientes reactivos, como inactivadores de la tanasa: o-fenantrolina, PMSF, EDTA, 2-mercaptoetanol, tioglicolato de sodio, MgSO_4 , CaCl_2 , MnCl_2 , CoCl_2 (Tabla 2.7.2)

Tabla 2.7.2. Inhibidores e inactivadores de la tanasa

Inhibidores	Ácido gálico, DFP, ZnCl_2 , FeCl_2 , CuSO_4 .
Inactivadores	o-fenantrolina, PMSF, EDTA, 2-mercaptoetanol, tioglicolato, MgSO_4 , CaCl_2 , CoCl_2 .

2.7.5. Mecanismo de acción de la tanasa

La tanasa hidroliza el enlace éster y depsídico de la molécula del ácido tánico, produciendo ácido gálico y glucosa. También, ataca a la molécula galato de metilo (Yamada *et al*, 1968). El ácido tánico es completamente hidrolizado en ácido gálico (3,4,5-ácido trihidroxibenzoico) y glucosa. En la degradación del ácido tánico, se forman intermediarios, como son el 1,2,3,4,6-pentagalato de glucosa, 2,3,4,6-tetragalato de glucosa y dos tipos de monogalato de glucosa (Ibuchi *et al*, 1972). Por lo tanto, la tanasa, tiene dos actividades: una como esterasa, sobre taninos simples como el galato de metilo o metil galato (Fig. 2.7.1) y una segunda como depsidasa, sobre los enlaces del ácido tánico (Fig. 2.7.2), (Beverini y Metche, 1990, Lekha y Lonsane 1997).

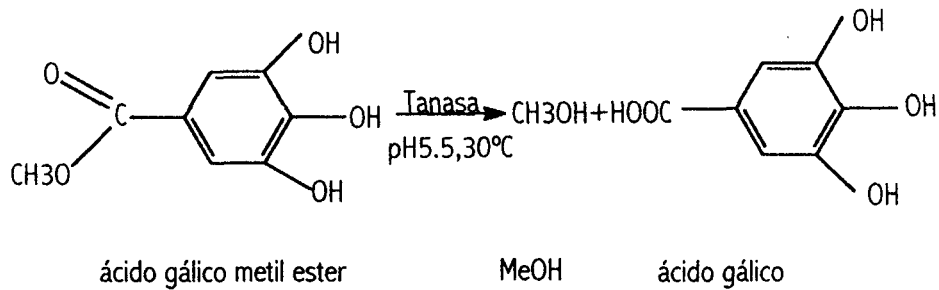


Figura 2.7.1. La actividad esterasa de la tanasa.

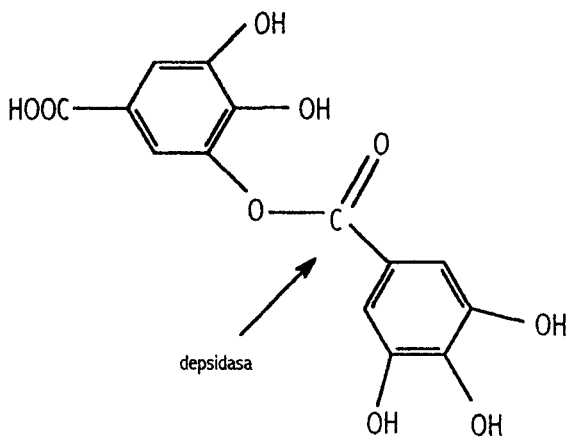


Figura 2.7.2. La actividad dehidrogenasa de la tanasa.

2.7.6. Usos de la tanasa

La tanasa es usada en la manufactura de té instantáneo y otros productos también de origen vegetal, principalmente para eliminar o al menos disminuir la astringencia de productos como el té, el café y los jugos de frutas. También, es utilizada para clarificar productos como los jugos y hacerlos más apetitosos (Lehmberg *et al*, 1999; Barmiento *et al*, 1993) y en la preparación de procianidinas las cuales tienen aplicación en la industria farmacéutica (Ariaga *et al*, 1998), así como en la clarificación de productos vegetales (Agbo *et al*, 1995).

2.8. Los Hongos filamentosos

Los hongos son organismos eucarióticos quimioorganotróficos, y su pared celular contiene quitina, celulosa o ambas. Se reproducen por medio de esporas. Las esporas son muy importantes en la clasificación de los hongos; sus clases se diferencian principalmente por las características morfológicas de los estadios sexuales de las esporas. Los hongos no tienen clorofila y sus cuerpos son alargados. La morfología del talo y las esporas asexuales están en segundo lugar de importancia en la taxonomía de los hongos (Pelczar *et al*, 1990).

Los hongos filamentosos viven en muy diferentes hábitats terrestres, en los suelos, las plantas y los insectos (Burgstaller, 1990). Los hongos toleran y pueden desarrollarse en concentraciones de acidez relativamente elevadas. Soportan escalas de pH entre 2 a 9.0 pero el pH óptimo para casi todas las especies es de 5.6. Si bien, necesitan humedad para su desarrollo y pueden obtener agua de la atmósfera y del medio los hongos pueden sobrevivir en ambientes deshidratados.

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

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

Los hongos son heterótrofos y saprófitos, ya que obtienen su alimento de materia orgánica muerta y muchos de ellos son parásitos cuando se alimentan de huéspedes vivos. Como saprófitos, destruyen plantas y restos orgánicos degradándolos a formas simples que constituyen la materia orgánica del suelo.

Los hongos filamentosos típicamente son saprófitos. Secretan una gran cantidad de enzimas encargadas del rompimiento y utilización de complejos poliméricos de tejidos de plantas y animales (MacKenzie *et al*, 1993). Dichas enzimas son liberadas a través de la membrana plasmática en el espacio periplásmico, en donde en algún momento, pueden ser secretadas al medio externo (Pelczar *et al*, 1990)

2.8.1. El género *Aspergillus*

Los *Aspergilli* están ampliamente distribuidos en la naturaleza: creciendo sobre frutas vegetales y otros sustratos que les sirven de alimento. Tienen importancia económica porque se les usa en la industria de la fermentación, que incluye la producción del ácido cítrico y el glucónico que son elaborados en abundancia por *A. niger*. Su clasificación sigue el siguiente esquema.

Reino → FUNGI

División → MYCOTA

Subdivisión → EUMYCOTA

Clase → DEUTEROMYCES

Subclase → PLECTOMYCETIDAE

Orden → EUROTIALES

Familia → EUROTIACEAE

Género → *Aspergillus*

Los *Aspergilli* producen micelio tabicado y ramificado. Se desarrollan en concentraciones altas de azúcar y sales; lo que indica que pueden tomar el agua que necesitan de sustancias relativamente secas (Pelczar *et al*, 1990). Los *Aspergilli* negros, son hongos filamentosos asexuales. El *Aspergillus* con esporas negras *Aspergillus niger*, es un hongo capaz de degradar los taninos de las plantas como fuente de carbono. Por ello el ácido tánico es un medio de selección y aislamiento de

cepas de *A. niger* (sobre 20% de ácido tánico), mientras que los *Aspergillii* no negros pueden crecer en medios con un máximo de 10% de taninos (van Diepeningen, 1999).

2.8.1.1. Producción de enzimas por los *Aspergillii*

Se pueden contar un gran número de enzimas producidas por los *Aspergillus*, como las pectinasas, celulasas, amilasas, glucosa oxidasa, catalasa, poligalacturonasas, glucanasas, xilanasas y glucosidasas y por ello, son muy usadas por las empresas productoras de enzimas como Novo.

2.9. La fermentación en medio sólido

La fermentación en medio sólido, es un proceso microbiano que ocurre principalmente sobre la superficie de materiales sólidos, que tienen la propiedad de absorber o contener agua con o sin nutrientes solubles y los materiales pueden ser o no biodegradables (Roussos *et al*, 1997). La fermentación en estado sólido, se lleva a cabo sobre soportes inertes, que difieren en el crecimiento de los microorganismos en que, no se encuentran flotando en el medio líquido (Zhu *et al*, 1994).

En los años recientes se han reconocido las ventajas de la fermentación en medio sólido, sobre la fermentación en medio líquido, sobre todo en la producción de metabolitos fúngicos y en la producción de enzimas (Roussos *et al*, 1997).

Lekha y Lonsane (1994), y Acuña *et al*, (1995), han comparado la producción de enzimas por fermentación en medio sólido y líquido, sugiriendo que la fermentación en medio sólido es más productiva que la fermentación en medio líquido.

2.9.1. Tipos de soporte sólidos

Se han utilizado como soportes desechos agrícolas como el bagazo de caña (Lekha y Lonsane, 1994). Sin embargo, una de las críticas que pone en desventaja a la fermentación sólida es el uso de materiales biodegradables, porque no se pueden medir con facilidad la biomasa (Zhu *et al*, 1996) producida que es un parámetro para medir el crecimiento de los microorganismos. Auria *et al*, (1990), desarrollaron un proceso usando resinas de intercambio iónico; Amberlita IRA 900, como soporte inerte de *A. niger*. En este proceso la biomasa fue medida directamente.

El poliuretano (PUF), fue usado por Fujishima *et al*, (1972), para la producción de enzimas de hongos (Zhu *et al*, 1994 y 1996) y fue el material seleccionado para producir la tanasa, en esta tesis.

2.9.1.1. Espuma de poliuretano

La espuma de poliuretano ha sido usada como soporte sólido en la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger* (Yong *et al*, 1989), ácido fumárico por *Rhizopus arrhizus* (Petruccioli *et al*, 1996) y en la producción de enzimas (Zhu *et al*, 1996; Kenneth *et al*, 1990).

La enzima nucleasa P1, se produce mejor en fermentación por medio sólido, que en medio líquido. A la vez, que su producción es mejor, sobre espuma de poliuretano que sobre salvado de trigo (Zhu *et al*, 1994).

En la fermentación sólida utilizando espuma de poliuretano se utiliza un exceso de agua, y la pureza que ofrece el poliuretano en comparación con productos biodegradables es la principal ventaja de este soporte. También, este soporte permite cuantificar la biomasa, y por otro lado se pueden controlar efectivamente los nutrientes. Esto hace que los resultados sean reproducibles (Zhu *et al*, 1994 y 1996).

2.10. Conclusión

Después del análisis bibliográfico podemos comentar lo siguiente: Los taninos son compuestos que se encuentran en abundancia en muchos vegetales, y tienen efectos antifisiológicos que deben ser controlados, preferiblemente por el uso de enzimas hidrolíticas. Estos efectos son: la astringencia y la mala absorción de proteínas, pero se sabe poco acerca de la degradación de los taninos condensados por la acción de tanasas. Es por esta razón que se realizó este trabajo, para determinar con una tanasa pura, el posible mecanismo de acción, sobre diferentes taninos. Las especies de *Aspergillii* son los mejores degradadores de taninos y la tanasa es una enzima inducible con la presencia de taninos que ha sido producida por fermentación en medio líquido (FML), pero, no hay estudios de caracterización y purificación de la tanasa producida en fermentación en medio sólido. Las tanasas reportadas en la literatura, son multiméricas. Tienen pH óptimo cercano a 5.0 y temperatura óptima entre 30 y 40°C.

La FMS, produce mejores rendimientos de tanasa en comparación con la producida en FML (Lekha y Lonsane, 1994), por esta razón hemos tenido el interés de producir nuestra tanasa por FMS, además también elegimos como soporte de la fermentación, al poliuretano, un soporte que como hemos podido ver es un soporte inerte.

Es en este marco en que se desarrolla este trabajo, que busca por un lado, purificar la tanasa producida por FMS y caracterizarla, y por otro, determinar la posible acción de la tanasa sobre los taninos condensados y, de esta manera ampliar más la información de las tanasas producidas en FMS.

Hipótesis y Objetivos



3.1. Hipótesis

La tanasa de *A. niger* Aa20, tiene baja especificidad y es una enzima de amplio espectro, capaz de degradar al menos parcialmente taninos hidrolizables y condensados.

3.2. Objetivo general

Purificar y caracterizar la tanasa extracelular de *Aspergillus niger* Aa20 producida por fermentación en medio sólido.

3.2.1. Objetivos particulares

1. Obtener, pura, la enzima extracelular utilizando ácido tánico como inductor
 2. Determinar si la actividad de esta enzima es esterasa o depsidasa
 3. Determinar las características bioquímicas óptimas de acción (Temperatura y pH).
 4. Determinar si la tanasa extracelular de *A. niger*, es capaz de degradar taninos hidrolizables y taninos condensados.
 5. Caracterizar parcialmente su estructura primaria.
-

Materiales y Métodos



4.0 Materiales y métodos

4.1. Variable

Se utilizaron diferentes taninos como sustratos de la tanasa para determinar si la tanasa de *A. niger* Aa20, es capaz de degradar taninos hidrolizables y condensados y para determinar su mecanismo de acción.

A continuación se muestran en la tabla 4.1.1, los taninos utilizados como sustratos de la tanasa. Los estándares fueron comprados a Sigma, a excepción del pentagaloilo de glucosa, que es un compuesto sintetizado en el centro de Biotecnología del Instituto Politécnico y Universidad del Estado de Virginia, en los Estados Unidos.

Tabla 4.1.1. Taninos utilizados como sustratos de la tanasa

TANINOS HIDROLISABLES	TANINOS CONDENSADOS
Ácido tánico	Catequina
Galato de metilo	Epi-catequina
Acido elágico	Galato de catequina
Pentagaloilo de glucosa	Galato de Epi-catequina
Galato lauril éster	Galato de galocatequina
	Galato de Epi-galocatequina
	Procianidina B3

Entre los taninos hidrolizables se encuentran taninos muy simples como el galato de metilo, que es una molécula de ácido gálico metilada y en la cual los enlaces son de tipo éster y, taninos con un carbohidrato central como el ácido tánico, con enlaces depsídicos entre las moléculas de ácido gálico y el pentagaloilo de glucosa, con enlaces de tipo éster.

Entre los taninos condensados, se pueden distinguir tres grupos; en el primero se encuentran aquellos como la catequina y su isómero la epi-catequina. En el segundo grupo están el galato de catequina y su isómero, los cuales contienen un grupo pirrogalol, para ver si la tanasa podría actuar sobre este grupo. También en este grupo se encuentra la procianidina, la cual es el polímero de la galato de catequina.

El tercer grupo de los taninos condensados son la galato de galocatequina y su isómero, los cuales contienen una molécula de ácido gálico en su estructura.

4.2. Producción y obtención de la enzima

4.2.1. Microorganismo

La cepa utilizada para la producción de la enzima es una cepa de *Aspergillus niger*, que forma parte de la colección UAM- IRD (ex ORSTOM), que viene de Checoslovaquia (Roussos, 1985), y caracterizada en 1997, en el "Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences" , Barn, Holanda.

La cepa fue escogida por medio de una selección de cepas, en donde se encontraban especies diferentes de hongos, utilizando tres diferentes concentraciones de ácido tánico (1%, 5% y 10%) como única fuente de carbono en un medio mínimo (Ramírez-Coronel, 1996). Mientras 25 cepas crecieron sobre 1% de ácido tánico, solamente cinco, fueron capaces de crecer sobre 10 % de ácido tánico. Estas cinco cepas resultaron ser *Aspergillus niger*. Para seleccionar la cepa que se usaría en este trabajo, se escogió la cepa Aa20 por tener la más alta actividad específica (Ramírez-Coronel, 1996).

4.2.2. Medio de propagación y conservación de la cepa

La propagación de la cepa de *Aspergillus niger* Aa20 se realizó siempre sobre PDA (papa agar dextrosa), en matraces Erlenmeyer de 250 ml, esterilizando a 121°C, por un tiempo de 15 minutos. El tiempo de incubación fue entre 72 y 96 hrs a 30°C.

La conservación de la cepa fue hecha con el hongo crecido por 96 hrs sobre PDA estéril, en tubos microbiológicos, puestos a 4°C, en el refrigerador. La cepa se resembró cada tres meses.

4.2.3. Medio de fermentación

El medio de fermentación utilizado es una modificación del descrito por Lekha y Lonsane, (1994), para la producción de la tanasa por *A. niger* PKL 104. La formulación se muestra a continuación:

4.2.1. Composición del medio de fermentación

Compuesto	g/L
KH_2PO_4	5
NH_4NO_3	10
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.02
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.125
Acido tánico	1
Glucosa	2.5
pH 5.5	

El pH fue ajustado con una solución de NaOH 1M. Las sales y la glucosa se esterilizaron por separado a 121°C por 15 minutos. El ácido tánico se esterilizó por filtración, con membranas de 0.22 μm .

4.2.4. Preparación del soporte sólido (Espuma de poliuretano)

El poliuretano se obtuvo de una fuente comercial etiquetado como de "baja densidad" (17 kg / m³) fue cortado en cubos de 0.5 cm por arista. Los cubos fueron lavados con agua hirviendo por 10 minutos, y dos veces con agua destilada fría. Los cubos de poliuretano fueron secados a 60°C por dos días en una charola dentro de una estufa. Posteriormente, 15 gramos de poliuretano seco fueron pesados y puestos en botellas de vidrio de aproximadamente 10 litros.

4.2.5. Condiciones de la fermentación

4.2.5.1. Cosecha de esporas

Se pusieron 10 mililitros de una solución de tween 80 al 0.02% a cinco matraces con la cepa Aa20 propagada por 96 hrs, a 30°C. Dentro de los matraces, se colocó una barra magnética estéril y se agitó suavemente para desprender las esporas. Posteriormente se contaron las esporas sobre una cámara de Neubauer, y se hizo el cálculo correspondiente para tener un inóculo de 5×10^7 , esporas por gramo de fuente de carbono.

4.2.5.2. Impregnación del poliuretano con el medio de cultivo y el inóculo

Se prepararon cuatro botellas con cubos de poliuretano seco y estéril (15 g / botella), y se agregaron a este 25 ml de medio de cultivo estéril por gramo de poliuretano. El medio de cultivo se mezcló justo antes de la impregnación con un inóculo de 5×10^7 esporas por gramo de fuente de carbono. Las botellas fueron agitadas manualmente, hasta que el medio se absorbió completamente en la PUF. La cantidad de medio de cultivo debe ser la necesaria para que se quede absorbida en el poliuretano. Cuando el medio de cultivo estuvo dentro de la botella con el poliuretano, esta se agitó suficientemente para que el poliuretano absorbiera todo el medio con las esporas y no cayera sobre la superficie de la botella. Una vez que todo el medio quedó absorbido al poliuretano, las botellas se metieron a incubación a 30°C, por un tiempo de 96 hrs y se agitaron manualmente cada 24 hrs.

4.2.6. Obtención del extracto enzimático extracelular

El extracto enzimático fue recuperado presionando el poliuretano después de 96 hrs de cultivo, sobre un embudo que permitió retener el poliuretano y dejaba pasar el

extracto que era a su vez colectado en un matraz quitasato conectado a una bomba de vacío. El poliuretano fue exprimido por la parte de arriba del embudo y una bomba de vacío facilitó la extracción del líquido.

Luego de esta extracción el poliuretano de cada botella fue lavado con amortiguador de citratos - fosfatos 0.1M, pH 7, en frío. Cuando se obtuvo el extracto, se cubrió con papel aluminio para evitar que le diese la luz y así prevenir las reacciones de oxidación, de los residuos del ácido tánico. La incubación se hizo en una estufa que no permitía pasar la luz.

4.3. Clarificación del extracto enzimático extracelular

El extracto enzimático debió ser clarificado para eliminar las esporas que estaban suspendidas, y para eliminarlas, se procedió de la manera siguiente:

La primera etapa; consistió en centrifugar el extracto a 7 000 rpm, y 4°C, por 20 minutos. La segunda etapa; consistió en filtrar el extracto enzimático en papel Watman # 4, por medio del vacío.

Las condiciones de manipulación y almacenamiento del extracto enzimático fueron: una temperatura de 4°C, en botellas cubiertas con papel aluminio.

4.4. Concentración del extracto enzimático (ultrafiltración)

Esta técnica consiste en concentrar el extracto, eliminando proteínas de peso molecular menores a la tanasa.

El extracto enzimático fue concentrado por ultrafiltración en un concentrador de "ultrafiltration Cells, modelo 8200, Amicon" con membranas de corte de 50 000 Da de peso molecular (XM50). El extracto fue puesto en agitación, a una presión de 70 psi (4.7atm) con nitrógeno. La concentración se llevó a cabo sobre hielo. El extracto fue concentrado 10 veces de su volumen original y se determinó su actividad enzimática por HPLC.

4.5. Técnica analítica para determinar la actividad tanasa

La actividad tanasa fue cuantificada por la liberación de ácido gálico, producto de la hidrólisis del ácido tánico y medida por HPLC, por medio del fraccionamiento y por la determinación del área bajo el pico correspondiente al ácido gálico. Una unidad de actividad se definió por la cantidad de enzima necesaria para producir un μmol de ácido gálico por minuto.

Se usaron las siguientes condiciones de cromatografía:

Columna: Prodigy phenomenex ODS-3, 5μ , 100\AA de 250×4.6 mm de largo. La fase móvil se componía de una mezcla de una solución polar y una no polar, utilizando un gradiente de 10% a 100% de metanol.

La composición de la fase móvil fue la siguiente: ácido fórmico al 1% en agua y mezclada con metanol en un gradiente de 0 a 10% de metanol por 5 minutos. La velocidad de flujo fue 1.5 ml / min . El tiempo de corrida o de separación es de 5 minutos. El ácido gálico tuvo un tiempo de retención próximo a 3.0 min (entre 2.7 min y 3.3 min).

La detección se hizo a 280 nm en un HPLC de "thermo separation of products", por medio de un programa llamado PC1000 y fue utilizado para la integración del área bajo la curva. Se realizó una curva estándar de referencia, la cual se utilizó para relacionar el área resultante de ácido gálico con la concentración del mismo.

El metanol y el agua utilizados fueron grado HPLC. Las soluciones de ácido fórmico y de metanol fueron filtradas por membranas de $0.22 \mu\text{m}$ y desgasificadas en un sonicador durante 15 minutos antes de ser utilizadas.

4.5.1. Ensayo enzimático

La preparación del ensayo enzimático fue de la siguiente manera: en un tubo Eppendorf con 1ml de solución de ácido tánico (0.3 mM) en amortiguador de

acetatos 0.1 M a pH 5.5, se añadieron 50 μ l de extracto enzimático. Después de incubar a 30°C por 30 minutos, la reacción fue parada con 200 μ l de ácido clorhídrico 2 N. La mezcla de reacción fue filtrada con filtros de 0.22 μ m y se inyectaron 20 μ l a la columna de HPLC.

Se detectó la presencia de ácido gálico, como resultado de la actividad tanasa sobre el ácido tánico. La actividad fue determinada en todas las etapas de purificación.

Una muestra de ácido tánico más ácido clorhídrico sin enzima, fue utilizada como control negativo.

4.6. Cuantificación de proteínas

El contenido de proteínas fue determinado por el sistema de Bio- Rad de acuerdo a los procedimientos señalados, basados en el método de Bradford, 1976. Se estableció una curva estándar de BSA para determinar la concentración de proteínas en el extracto enzimático.

4.7. Detección de la actividad tanasa sobre SDS-PAGE

La detección de la actividad tanasa sobre geles SDS-PAGE, es una modificación de la técnica reportada por Aoki *et al*, (1979), para la tanasa de *Penicillium*. Esta técnica está basada en la localización de la enzima sobre un gel de poliacrilamida, utilizando ácido tánico como sustrato, después de hacer una separación de la enzima del resto de las proteínas por electroforesis. Posteriormente el gel se incuba en ácido tánico. La enzima se revela con una solución de quinina. Esta interactúa con el ácido tánico y forma complejos blancos, insolubles en agua, lo cual favorece la localización de la enzima, debido a que la enzima impide la formación del complejo blanco, hidrolizando el ácido tánico en ácido gálico y glucosa y la enzima se detecta por bandas transparentes (incoloras) en el gel. La preparación de las soluciones para los

geles se hizo de acuerdo al protocolo de Laemmli, (1970). Los geles se hicieron con una concentración de 10% de poliacrilamida.

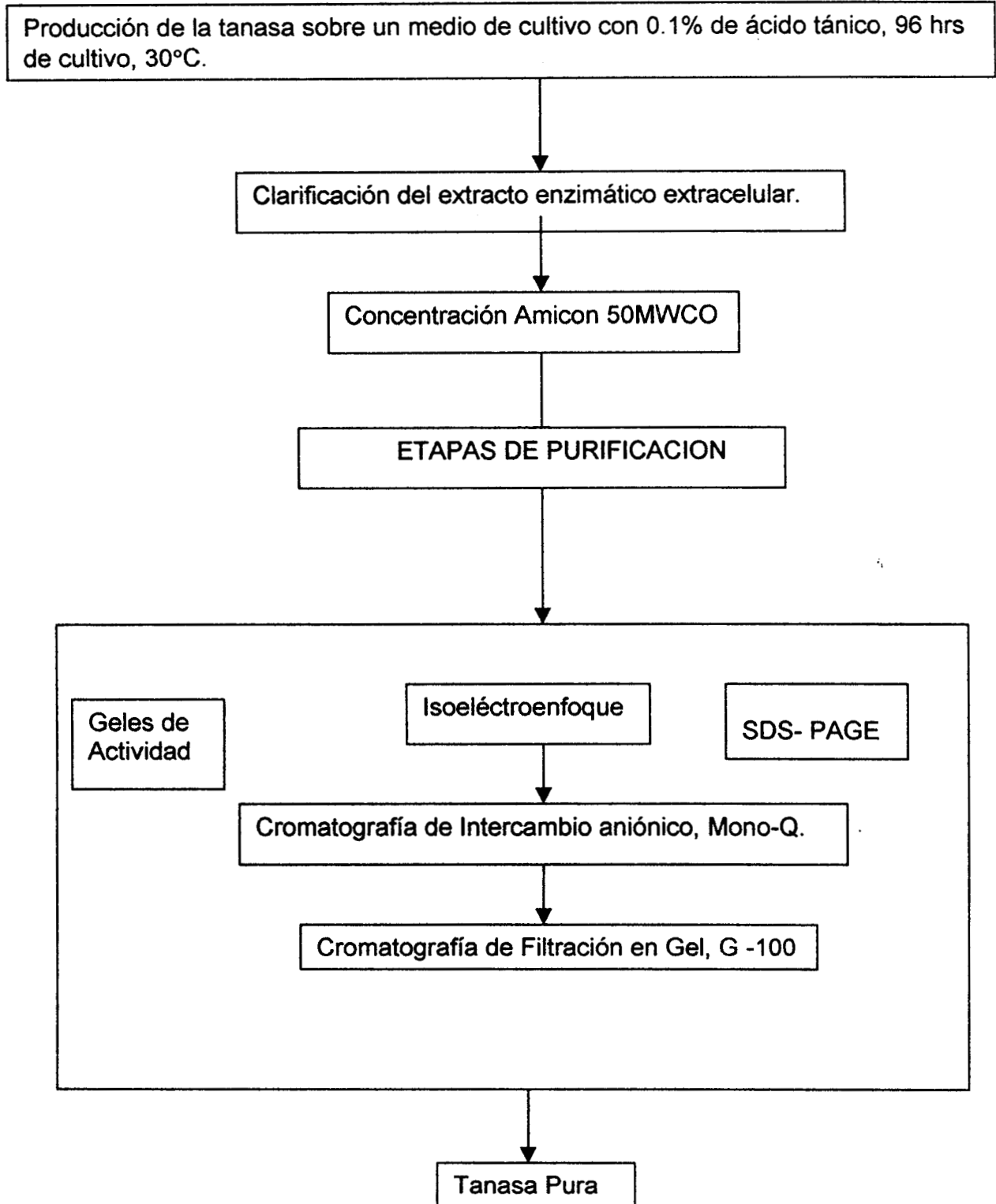
En un Eppendorf, la muestra de extracto enzimático fue mezclada con azul de bromofenol, SDS y libre de β -mercaptoetanol, y calentada a 40°C por 5 minutos. La migración se hizo a 70V constantes por gel y dentro del refrigerador a 4°C. Las electróforesis se hicieron en una cámara de BioRad (Mini Protean).

Para la revelación de la actividad, el gel de electróforesis fue puesto en un recipiente de plástico y lavado durante una hora con 100 ml de una solución de Triton X-100 al 2.5% (v/v) en agua, seguido de dos períodos de lavado de 45 minutos cada uno, con amortiguador de acetatos 0.01M, pH 5.5, para remover el SDS. Estos lavados se efectuaron a temperatura ambiente con agitación permanente. Después de los lavados el gel fue incubado a 35°C durante 30 minutos en una solución de ácido tánico al 0.5%, en amortiguador de acetatos 0.1 M, pH 5.5 con agitación constante. Pasados 30 minutos, el ácido tánico se decantó y se agregó, en su lugar al gel, la solución de quinina al 0.5%, la cual formó el complejo blanco con el ácido tánico. De esta manera se detecta la actividad tanasa de manera inmediata (con un peso molecular aproximado de 85 KDa), y en un tiempo de aproximado de 4 horas más tarde se detectó una segunda banda (con un peso molecular aproximado de 170 KDa), menos marcada que la primera. Con la localización de la tanasa y con la presencia de marcadores de peso molecular preteñidos, pudimos inferir que el peso de la tanasa era superior de 50 KDa, en un extracto crudo. Esta técnica fue utilizada en las distintas etapas de purificación como una medida de control cualitativo.

4.8. Etapas de purificación

La purificación de la tanasa se llevó a cabo en tres etapas después de producirla y concentrarla. Estas etapas se presentan a continuación de manera de diagrama (Figura 4.8.1), y a continuación se describen cada una de ellas.

Figura 4.8.1. Producción y etapas de preparación y purificación de la tanasa.



4.8.1. Focalización isoeléctrica

El equipo llamado Rotofor cell (BioRad), es un aparato que separa a las proteínas por su punto isoeléctrico, permitiendo determinar el punto isoeléctrico de la proteína de interés. La actividad de las proteínas se mantiene, porque éstas están en solución y conservan su estructura nativa.

El Rotofor-cell tiene incorporada una cámara cilíndrica, con un tubo en el interior que enfría la muestra y gira de manera continua (la rotación es de 1 rpm). La cámara se encuentra dividida en 20 compartimentos y cada uno corresponde a una fracción del extracto. Después del electroenfoque, cada fracción es rápidamente colectada en 20 tubos diferentes. La separación es posible, ya que se establece un gradiente de pH, entre el cátodo y el ánodo con anfolitos (electrolitos) en la muestra. Cuando se aplica un voltaje, los anfolitos y las proteínas migran y se detienen cuando alcanzan su punto isoeléctrico.

El extracto enzimático concentrado, fue dializado en 4 litros de agua destilada con membranas de 12-14,000 MWCO (Spectra/Por), en el refrigerador a 4°C, durante 12 hrs, con cuatro cambios de agua. Una vez libre de sales, el extracto fue mezclado con anfolitos de 3-10 de pH (Biolyte 3 / 10 BioRad) en una concentración final de 1% (v / v). Las condiciones de isoelectroenfoque fueron las siguientes: temperatura de 4°C, a 15 Wats constantes, durante 4 hrs.

Posteriormente las 20 fracciones fueron extraídas en tubos y se les midió el pH de inmediato. Las fracciones de 2.5 ml se dializaron en 2 litros de agua destilada por un periodo de 4 hrs y 2 cambios de agua en el refrigerador, para eliminar los anfolitos.

A las fracciones así obtenidas se les midió la concentración de proteína y la actividad tanasa por HPLC, así como también se analizaron las fracciones sobre SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

4.8.2. Cromatografía de intercambio aniónico

La cromatografía de intercambio iónico, separa las moléculas de acuerdo a las cargas de éstas en su superficie. La técnica puede ser usada con moléculas cargadas que sean solubles en sistemas acuosos. La cromatografía de intercambio iónico es usada para la purificación de proteínas porque conserva la actividad de las enzimas.

Esta técnica está basada en la atracción entre moléculas de la muestra y las moléculas en el empaque en la fase estacionaria. Si el empaque consiste de moléculas con cargas positivas es una columna de intercambio aniónico, y se usan para separar moléculas (proteínas) cargadas negativamente. Las interacciones electrostáticas entre las moléculas hacen que las moléculas interactúen y se retengan en el empaque de la columna y de esta manera algunas proteínas se retengan y otras no. Las moléculas retenidas en la columna son eluidas con sales como el NaCl que hace que las proteínas retenidas eluyan a una concentración de sal determinada.

El pH afecta la carga de las proteínas, por lo que es importante conocer el punto isoeléctrico de la proteína que se quiere purificar. Si el pH es superior al punto isoeléctrico la proteína es negativa, y si el pH es inferior del punto isoeléctrico la proteína es positiva.

Las fracciones del isoelectroenfoque con actividad de tanasa, se mezclaron y se equilibraron a pH 5.5 con amortiguador de acetatos 50 mM, por diálisis. Una vez equilibrada la muestra a pH 5.5 se filtraron por una membrana de 0.45 μm , después se pusieron sobre una columna de intercambio aniónico, Mono-Q, de Bio-Rad. La columna se lavó antes de inyectar la muestra de la siguiente forma: con una velocidad de flujo de 2 ml / min se lavó con aproximadamente 20 ml de agua desionizada y filtrada en membranas de 0.45 μm y desgasificada, después, con 20 ml de NaCl 1M en amortiguador de acetatos 50 mM, una segunda vez con agua y por

último, con 20 ml de amortiguador de acetatos 50 mM, pH 5.5 para equilibrar la columna.

Una vez lavada y equilibrada la columna, se inyectó la muestra y se creó un gradiente lineal para eluir las proteínas desde 0.1 M de NaCl hasta 1 M de NaCl en 50 mM de amortiguador de acetatos pH 5.5, a temperatura ambiente, con las condiciones controladas automáticamente en un aparato de cromatografía tipo FPLC binario (BioRad) con un detector de UV, a 280 nm, y un detector de conductividad, a una velocidad de flujo de 1.5 ml/min. La colección de las fracciones obtenidas se hizo manualmente, cada pico se colectó en fracciones diferentes.

Se ensayó la actividad de las fracciones no retenidas y retenidas. También se cuantificaron las proteínas y la actividad enzimática a la vez, que se hicieron geles SDS-PAGE y de actividad. Las fracciones con actividad fueron dializadas y concentradas para separarlas por peso molecular.

4.8.3. Cromatografía de Filtración en Gel.

La cromatografía de filtración separa moléculas de acuerdo a su tamaño. Esta técnica es más utilizada en las etapas finales de purificación. El mecanismo de separación, requiere tasas de flujo muy lentas, a la vez que la muestra debe estar lo más concentrada posible. Esta técnica se basa en la migración de las moléculas, a través de una fase estacionaria, que tiene un tamaño de partículas determinadas. Las moléculas pequeñas, penetran en los poros de la fase estacionaria, en tanto que las moléculas más grandes no se detienen y son las primeras en eluir, haciendo una separación de acuerdo al tamaño de la molécula. Las proteínas más grandes saldrán primero y las más pequeñas al final. Sin embargo moléculas de muy similar masa molecular no podrán separarse por esta técnica.

Las fracciones con actividad después de la cromatografía de intercambio aniónico se mezclaron y concentraron en un dispositivo centriprep de corte de 10,000 Da centrifugándose a 7,000 rpm a 4°C, hasta 400 μ l y la muestra se pasó por una

columna de filtración (Sephadex G-100), que separa moléculas de 4,000 hasta 150,000 Da.

Las condiciones de la cromatografía fueron las siguientes; la velocidad de flujo fue de 0.7 ml/min con amortiguador de acetatos 50 mM, pH 5.5 a temperatura ambiente. Las condiciones fueron controladas automáticamente por un aparato FPLC binario de BioRad, y un detector de UV a 280nm.

Previo a la separación de la muestra se calibró la columna con estándares de peso molecular (Sigma; kit, MW-GF-200). El azul de dextran fue usado para determinar el volumen muerto de la columna, y los marcadores de peso para determinar el peso molecular de la tanasa (Tabla 4.8.1).

Tabla 4.8.1. Marcadores de Peso Molecular para cromatografía de Filtración en Gel.

Azul dextran	2,000 000 Da
Alcohol deshidrogenasa	150 000 Da
Albúmina sérica Bovina	66 000 Da
Anhidrasa carbónica	29 000 Da
Citocromo c	12 000 Da

4.9. SDS-PAGE

Los geles SDS-PAGE fueron hechos con una concentración de poliacrilamida de 10%, siguiendo el protocolo de Laemmli (1970). Los estándares de peso molecular fueron de BioRad (cat, 161-0315) para plata (Tabla 4.9.1). La técnica de revelación de proteínas con plata se muestra con detalle en la tabla 4.9.2.

Tabla 4.9.1. Marcadores de peso molecular para plata

Miosina	200 000 Da
β -galactosidasa	116 250 Da
fosforilasa b	97 400 Da
Albúmina sérica bovina	66 200 Da
Ovoalbúmina de huevo	45 000 Da

Tabla 4.9.2. Soluciones de tinción con plata

TCA 12%	1h
MeOH 5%	20min (3 veces)
Na ₂ S ₂ O ₃ 2g/L	1min
H ₂ O	20seg (3 veces)
Impregnación (100ml)	20min
AgNO ₃ (0.2g)	
HCHO (37%) 75 μ l	
Desarrollo (100ml)	2-5min
Na ₂ CO ₃ (6g)	
HCHO (37%) 50 μ l	
Na ₂ SO ₃ -5H ₂ O (0.2g/L)	
H ₂ O	20seg (2 veces)
CH ₃ COOH 5%	10min
MeOH 5%	10min

4.10. Caracterización de la tanasa purificada

Las características bioquímicas de la tanasa purificada fueron determinadas obteniendo el pH óptimo, la temperatura óptima y el peso molecular. Por otra parte se obtuvo parte de las secuencias internas de las tanasas purificadas en este trabajo (por contrato con William S. Lane, en Microchemistry Facility, Harvard University, 16 Divinity Avenue, Cambridge, USA), y se compararon con las secuencias de aminoácidos de otras proteínas en la dirección de Internet; <http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query>, con el programa logístico BLAST 2 sequences, en la misma dirección de Internet.

También se ensayó la tanasa sobre los diferentes taninos mostrados en la tabla 2.7.4.

4.10.1. pH Optimo

Se determinó el pH óptimo de la tanasa purificada, en una solución de ácido tánico 0.3mM, en amortiguador de citratos-fosfatos 0.1 M, a diferentes valores de pH: 3.5, 4.0, 4.5, 6.0, 6.5 y 7.0. La enzima fue adicionada y la reacción fue incubada a 30°C por 30 minutos. Se paró la reacción con 200 µl de HCl 2 N. Veinte µl de la reacción fueron inyectados a la columna de HPLC, para determinar la actividad de la enzima, en los diferentes ensayos. Por otro lado también se hicieron los mismos ensayos con amortiguador de acetatos 0.1 M en valores de pH de: 4.0, 4.5, 5.0 y 5.5, debido a que el rango del amortiguador no va mas allá de estos valores, como el amortiguador citratos - fosfatos, que tiene un mayor rango de amortiguamiento.

4.10.2. Temperatura Optima

La temperatura óptima se obtuvo al efectuar ensayos de la actividad enzimática a diferentes temperaturas: 30°, 40°, 50°, 60°, 70°, 80° y 90°C. Utilizando una solución de ácido tánico 0.3 mM en amortiguador de acetatos 0.1 M, pH 5.5. Veinte microlitros de la mezcla de reacción fueron inyectados a la columna de HPLC, para determinar la actividad.

4.10.3. Técnica cualitativa para la detección de la degradación de los taninos hidrolizables y los condensados

La técnica utilizada para determinar la actividad de la tanasa sobre los taninos de Sigma, consistió en el análisis del tiempo de retención de los estándares y de la

modificación del cromatograma por la aparición de algún producto, por adición de la tanasa. Se determinó el tiempo de retención de cada compuesto, en dos métodos distintos, uno con duración de 5 minutos y un segundo con duración de 10 minutos de corrida en el HPLC, de los cuales el segundo fue el mejor, debido a que permitía salir completamente la muestra y se obtuvo una mejor resolución.

Una vez estandarizado el tiempo de elución, se hicieron los ensayos de actividad para cada uno de los taninos referidos en la tabla de sustratos, y se inyectaron en la columna de HPLC los ensayos con enzima y sin enzima. La concentración del sustrato fue de 1 mg/ml en amortiguador de acetatos 0.1 M, pH 5.5, más 20 μ l de enzima pura y se incubó por 30 minutos a 30°C. La reacción fue parada con hielo para inactivar la enzima y 20 μ L de la mezcla de reacción fueron inyectados a la columna de HPLC. La actividad fue determinada por los cambios en los cromatogramas del sustrato, sin la enzima y con la enzima.

4.10.4. Secuenciación de la tanasa de *A.niger* Aa20

Esta técnica de secuenciación consiste en la hidrólisis trípica de las proteínas que libera péptidos, que son detectados por espectroscopía de masas y microcapilaridad en fase reversa por HPLC. La sensibilidad es de <<<10 femtomoles. Como ya se mencionó en la sección 4.10, una muestra de la enzima purificada fue secuenciada en la Universidad de Harvard.

La secuencia de aminoácidos está representada por una letra, donde cada letra representa un aminoácido, la letra es la correspondiente a la sigla con la que se representa el nombre de cada aminoácido en inglés (Lehninger, 1990), y se reportaron así por razones de comodidad.

Tabla. 4.10.1. Abreviación de los aminoácidos.

Sigla	Aminoácido
A	Alanina
V	Valina
L	Leucina
I	Isoleucina
P	Prolina
F	Fenilalanina
W	Triptofano
M	Metionina
G	Glicina
S	Serina
T	Treonina
C	Cisteína
Y	Tirosina
N	Asparagina
Q	Glutamina
D	Acido aspártico
E	Acido glutámico
K	Lisina
R	Arginina
H	Histidina

Una muestra de la enzima fue puesta en un minigel SDS-PAGE, de 0.7 mm de grosor y puesta a electróforesis a 100V constantes. Después de la electróforesis, el gel fue puesto en un recipiente de plástico y teñido con azul de Coomassie (Tabla 4.10.2) por media hora, después se decantó la solución de tinción y se destiñó el gel en una mezcla metanol: acético: agua (10%:10%:80%), v:v:v (Bolay y Edelsteir, 1994).

Tabla 4.10.2. Soluciones para tinción con azul de Coomassie.

Solución de tinción
1.0 g Azul de coomassie R-250
450 ml metanol
450 ml H ₂ O
100 ml ácido acético glacial
Solución de destinción
100 ml metanol
100 ml ácido acético glacial
800 ml H ₂ O

La proteína fue cortada directamente del gel y puesta en un tubo Eppendorf. El trozo de gel fue lavado dos veces con acetonitrilo al 50% en agua, por 2 a 3 minutos, se eliminó el acetonitrilo decantándolo y se puso la muestra en el congelador. Las muestras de 85 y 170 KDa, se mandaron a secuenciar directamente del gel, a la Universidad de Harvard para obtener la secuencia interna de ambas bandas.

Nota: Es importante no tocar el gel con las manos ni tampoco ninguno de los materiales utilizados, por lo cual debe usarse guantes todo el tiempo.

4.10.5. Cuantificación de la actividad β -D-glucosidasa

La celulosa es un polisacárido cristalino compuesto de uniones $\beta(1,4)$ D-glucopiranosil. Es el constituyente estructural mayoritario de la pared celular de las plantas y es el biopolímero, más abundante sobre la tierra. Aproximadamente 10^9 toneladas son sintetizadas y degradadas cada año, por microorganismos celulolíticos. La mayoría de estos microorganismos son bacterias y hongos (Armand *et al*, 1997).

Las celulasas se clasifican en tres tipos: las endoglucanasas (1,4- β -D-glucan 4-glucohidrolasa EC. 3.2.1.4), las exoglucanasas (β -1,4-D-glucancelobiohidrolasa), y las β -D-glucosidasas (β -D-glucosidoglucohidrolasa, EC.3.2.1.21). Las endoglucanasas actúan, en el interior de los enlaces β -1,4-glicosídicos de la

celulosa. Las exoglucanasas hidrolizan la celulosa removiendo las unidades de celobiosa en las que está presente un grupo no reductor al final. Las β -glucosidasas parten la celobiosa y oligosacáridos a glucosa (Jun *et al*, 1995).

Como las secuencias obtenidas de las tanasas purificadas mostraron tener 100% de homologías con la secuencia de una β -D-glucosidasa de *A. kawachii* (ver sección de resultados) por lo cual se sospechó que estas tanasas tendrían posiblemente actividad de β -D-glucosidasas, y para saberlo y probarlo, se efectuaron ensayos de actividad β -D-glucosidasa sobre celobiosa, de la forma siguiente: 100 μ g de celobiosa se disolvieron en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 5.5 y se agregó la enzima, desarrollando la reacción según las instrucciones del un Kit enzimático para determinar glucosa (Kit enzimático de glucosa oxidasa, Spinreact GOD-PAP, código 1001191).

4.10.6. Análisis de actividad tanasa y β -D-glucosidasa

En un ensayo en paralelo se mezclaron ácido tánico y celobiosa (50 mM, solución equimolar), y se puso en incubación la mezcla de los dos sustratos y la enzima por 30 minutos a 30°C. Una fracción del ensayo fue preparada para determinar si había actividad tanasa y otra fracción del mismo ensayo fue preparada para analizar la actividad β -D-glucosidasa con el Kit enzimático específico para glucosa.

Resultados



5.0. Resultados.

5.1. Producción de la tanasa

Al inicio de este trabajo la tanasa fue producida utilizando una concentración de 100 gramos por litro de ácido tánico, porque esta es la concentración a la cual, la cepa Aa20 fue seleccionada (Ramírez- Coronel, 1996). Se trató de purificar la tanasa producida con esta concentración, pero no fue posible, debido a que el ácido tánico interfería con la purificación, porque formaba precipitados con las proteínas del extracto. Por este motivo, se buscó bajar la concentración de ácido tánico hasta 100 veces, comparando la actividad enzimática de la tanasa producida con 100 gms / L y 1 g / L. El ácido tánico fue usado como inductor de la tanasa en una fermentación puesta en paralelo, con dos concentraciones diferentes de ácido tánico; 0.1% (1g / L) y 10% (100 g / L) durante 96 hrs.

Comparativamente la actividad de la tanasa producida al final de la fermentación, con 0.1% de ácido tánico fue 10 veces menor a la actividad de la tanasa producida con 10% de ácido tánico. Aunque la diferencia de concentraciones del inductor es de hasta 100 veces, la diferencia entre las actividades es unicamente de 10 veces (Tabla 5.1.1).

Tabla 5.1.1. Actividad de la tanasa con dos concentraciones diferentes de ácido tánico.

10% ácido tánico	0.1% ácido tánico
1.84 U.I / ml	0.24 U.I / ml

El ácido tánico tiene la propiedad, como todos los taninos de unirse inespecíficamente a las proteínas, de manera que una elevada concentración, este

interfería en la búsqueda de un protocolo de purificación, debido a que no había manera de eliminarlo de las muestras. Por lo cual se decidió bajar la concentración del inductor a 0.1% (1 g/L) en el medio de cultivo y producir la tanasa con esta concentración de ácido tánico ya que así se obtuvieron muestras de tanasa prácticamente libre de ácido tánico.

5.2. Resultados de la concentración del extracto enzimático

EL extracto enzimático se concentró 10 veces por ultrafiltración, manteniéndose la actividad en la fracción con proteínas mayores de 50 KDa. Esto nos hizo suponer que la tanasa de *A. niger* Aa20, tendría un peso molecular superior a 50 KDa. También nos permitió eliminar del extracto crudo, las proteínas con peso molecular inferior a la tanasa y quedarnos con la tanasa y las proteínas con pesos moleculares superiores a 50 KDa, que serían eliminadas en posteriores separaciones, para quedarnos al final con la tanasa purificada.

5.3. Purificación.

5.3.1. Purificación por Isoelectroenfoque.

El extracto concentrado (100 ml), se dividió en dos fracciones que fueron sometidas por separado al Rotofor, para conocer el punto isoeléctrico de la tanasa de *A. niger* Aa20. A 50 ml del extracto se agregaron anfolitos con pH de 3-10 BioRad. Las condiciones de temperatura de 4°C con una potencia de 15 Wats constantes por 4 horas.

Se obtuvieron 20 fracciones diferentes de 2.5 ml, a las que se les midió el pH (Tabla 5.3.1). En ambos ensayos, el perfil de separación fue prácticamente el mismo que se muestra en la tabla 5.3.1. Al determinar la actividad en las 20 fracciones, se

encontró que esta se encontraba concentrada entre las fracciones 1 a 6, principalmente (Figura 5.3.1).

Tabla 5.3.1. pH de las fracciones del Rotofor

Fracción	pH medido
1	2.8
2	3.1
3	3.8
4	3.9
5	4.5
6	4.8
7	5.2
8	5.7
9	6.1
10	6.2
11	6.5
12	6.7
13	7.1
14	7.3
15	7.6
16	7.8
17	7.9
18	8.3
19	9.1
20	9.2

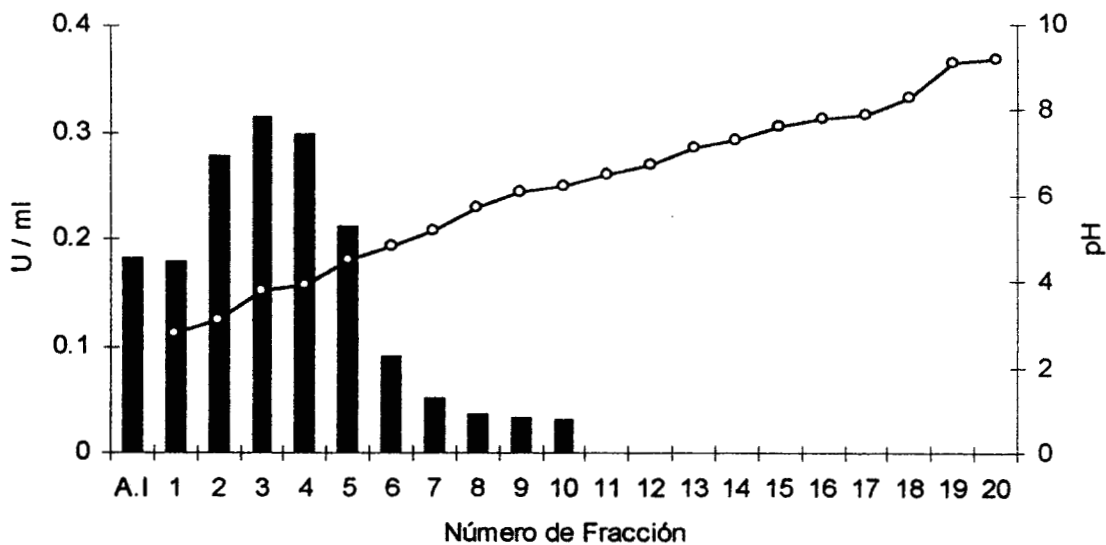


Figura 5.3.1. Iso-eléctroenfoque preparativo de la fracción concentrada de tanasa. Actividad Tanasa, volumétrica (U/ml, ■) y pH (O), en las diferentes fracciones de Rotofor. A.I: antes de la inyección. Las fracciones 2 a 7 de 2.5 ml cada una, fueron mezcladas, para separarlas por cromatografía de intercambio aniónico.

En esta gráfica pueden apreciarse la actividad antes de la separación y las fracciones con actividad. En el eje de abscisas está el número de las fracciones, en el eje de las ordenadas de la izquierda está la actividad de las fracciones que se muestran con barras y en el eje de ordenadas de la derecha los valores de pH de cada una de las fracciones en la muestra separada por punto isoeléctrico sobre Rotofor.

Puede apreciarse muy bien cómo la enzima estuvo presente en las fracciones con valores de pH ácidos (alrededor de 3.0), y que la fracción con mayor actividad volumétrica es la número 3, la cual tiene un pH de 3.8, por lo cual el punto isoeléctrico de la tanasa es alrededor de 3.8 (Tabla 5.3.1 y Figura 5.3.1).

La fracción número uno fue descartada para la siguiente etapa (a pesar de mostrar actividad), debido a que en esta fracción se concentró gran parte del ácido tánico residual, que pudo distinguirse de las otras fracciones por la presencia de precipitados y por su coloración café, ya que en las otras fracciones no hubieron precipitados y no estuvieron coloreadas. Por tanto se mezclaron solamente las fracciones: 2 a 7, por mostrar actividad y cuyo pH esta por debajo de 5.5 (pH del amortiguador de la separación siguiente).

Esta técnica fue de gran importancia porque permitió conocer el punto isoeléctrico de la tanasa y fue de utilidad para saber qué tipo de cromatografía de intercambio iónico debía utilizarse para purificarla. Además esta técnica eliminó gran número de proteínas sin interés, y concentró la enzima en un número reducido de fracciones.

5.3.2. Purificación por intercambio aniónico.

La muestra enzimática dializada se equilibró en amortiguador de acetatos 50 mM, pH 5.5 y fue separada por cromatografía de intercambio aniónico. La lixiviación o elución se hizo con una solución NaCl 1M, disuelto en un amortiguador de acetatos 50 mM, pH 5.5. La tanasa se retuvo en la columna de intercambio aniónico (Mono-Q,

BioRad), y lixivió a una concentración de 0.3 M de NaCl, el cual fue utilizado como intercambiador. El perfil de lixiviación de la proteína se muestra a continuación en la siguiente figura (5.3.2).

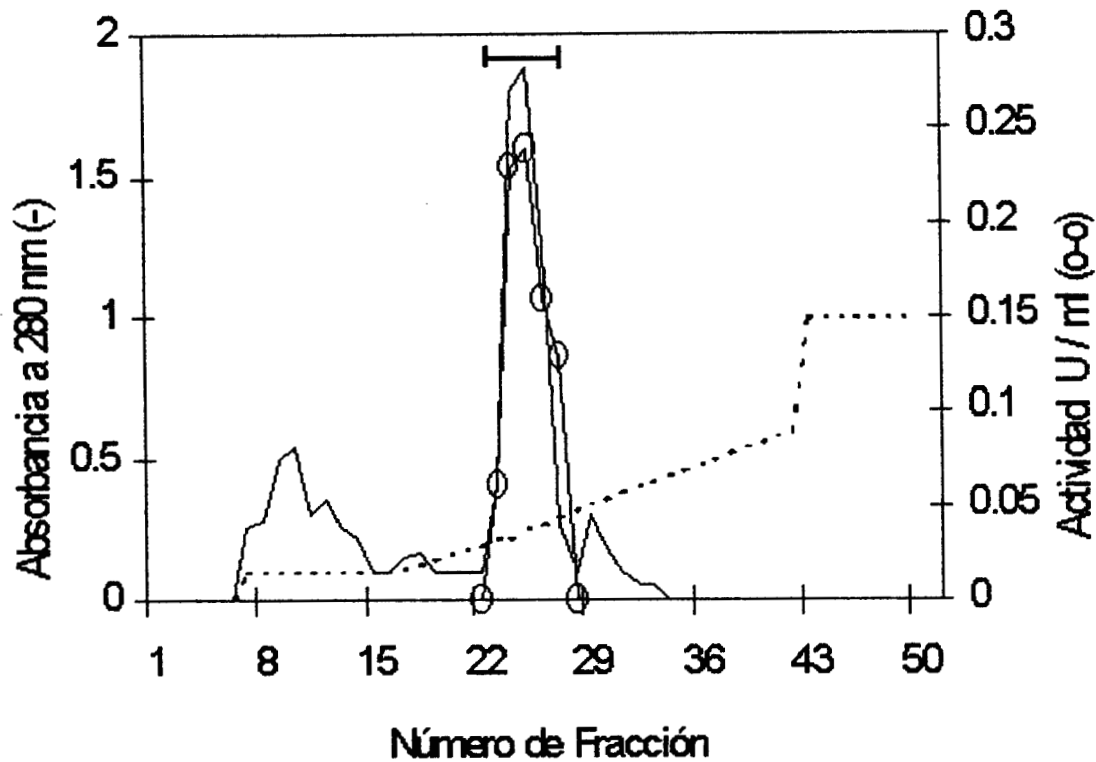
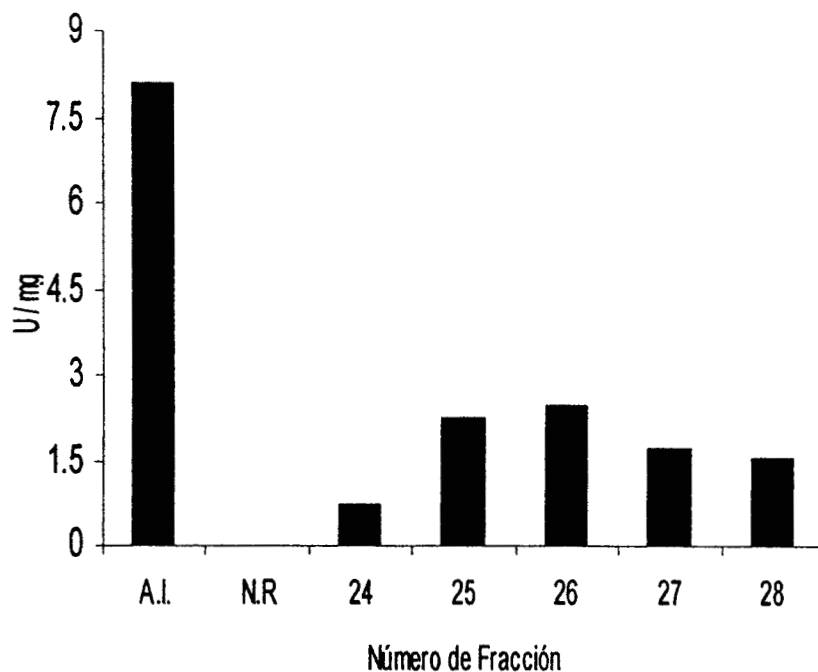


Figura 5.3.2. Cromatografía de intercambio aniónico de las fracciones del Rotofor (de la 2 a la 7 de la Figura 5.3.1, con actividad tanasa. La actividad Tanasa fue ensayada como se describe en materiales y métodos. Las fracciones 24 a 28, fueron dializadas para cromatografía de Filtración en Gel.

En el eje de las abscisas, están las fracciones colectadas, en el eje de las ordenadas de la izquierda se muestra la absorbencia de las proteínas a 280 nm. En el eje de las ordenadas de la derecha, la actividad de las fracciones. La línea continua (-) es el

perfil de separación de las diferentes proteínas de la muestra. Con línea discontinua (- -), el gradiente de NaCl, y la línea por debajo de las proteínas con puntos, son las fracciones con actividad tanasa. La actividad enzimática se determinó por HPLC en las fracciones colectadas, incluyendo en la no retenida en la que no se encontró actividad. Después de determinar la actividad de la tanasa, en todas las fracciones colectadas, se encontró dicha actividad en cinco fracciones (24, 25, 26, 27 y 28), las cuales eluyen alrededor de una concentración de 0.3 M de NaCl.

En la figura 5.3.3, se muestra la actividad específica en las cinco fracciones con actividad.



Gráfica 5.3.3. Actividad específica de la tanasa en las fracciones con actividad de la cromatografía por intercambio aniónico, (U / mg proteína ■), A.I: antes de la inyección; NR: no retenido.

En esta gráfica puede verse la actividad específica de la tanasa después de ser pasada en una columna de intercambio aniónico. Puede verse que las fracciones con mejor actividad fueron las del centro, aunque las fracciones de los extremos tuvieron actividad se tomaron únicamente las del centro (25, 26 y 27) para la siguiente etapa. Las fracciones de los extremos no se utilizaron (24 y 28). La mezcla fue analizada en un gel tipo SDS-PAGE y en un gel de actividad con quinina, detectando dos bandas de proteína, ambas mostraron actividad de tanasa.

5.3.3. Filtración en gel G-100

Las fracciones 25, 26 y 27, de la cromatografía de intercambio aniónico, se juntaron y concentraron para someterse a la última etapa de purificación, por peso molecular en una Sephadex G-100. La figura 5.3.4, muestra el perfil de elución de las fracciones en esta cromatografía.

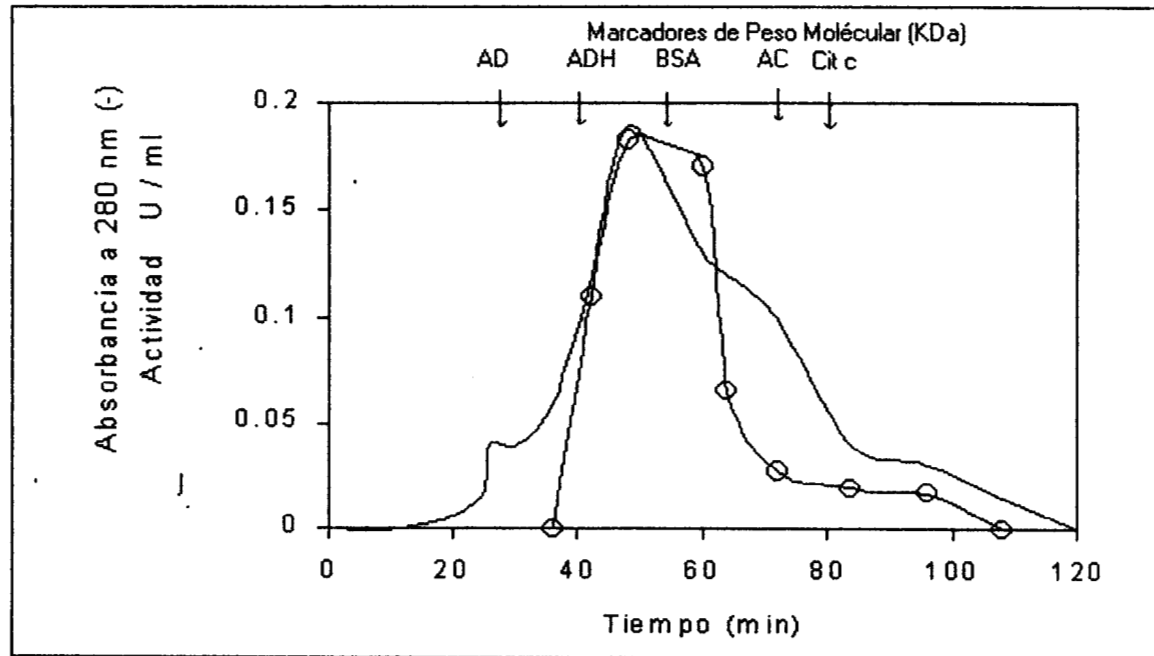


Figura 5.3.4. Perfil de elución de proteínas en la cromatografía de Filtración en Gel Sephadex (G-100). La actividad fue ensayada en cada fracción colectada. Los estándares de calibración de la columna, fueron los siguientes: A.D: Azul

Dextran (2 000 KDa, Volumen muerto de la columna); ADH: Alcohol deshidrogenasa, (150 KDa); BSA: Albúmina Sérica Bovina (66 KDa); AC: Anhidrasa carbónica (29 KDa); Citocromo c (12 KDa). La línea con puntos muestra la actividad en las fracciones. En las abscisas está el tiempo de elución de las proteínas y en el eje ordenadas la absorbancia de las proteínas. En el eje superior de abscisas, están los marcadores de peso molecular, con los cuales se calibró la columna. El perfil de elución de las proteínas, en línea continua, muestra que la actividad tanasa se encuentra en las proteínas con peso molecular superior a 100 KDa pero hay una buena actividad en las proteínas con peso molecular de 85 KDa.

Hay un solo pico que es muy amplio, sin embargo sí observamos la parte donde se encuentra la mejor actividad, podemos decir que la tanasa es de las proteínas de mayor peso molecular en la muestra. Estas fracciones fueron analizadas en un SDS – PAGE, para determinar el grado de purificación en las fracciones y para obtener el peso molecular de la tanasa (Figura 5.4.1). La colección de las fracciones se hizo manualmente. Se colectaron 8 fracciones, de 6 ml cada una. A la izquierda, se muestra la absorbancia a 280 nm y la actividad volumétrica. Se hizo el correspondiente ensayo de actividad por HPLC, en las 8 fracciones colectadas, encontrándose los siguientes resultados indicados en las figuras (Figura 5.4.1 y 5.4.2).

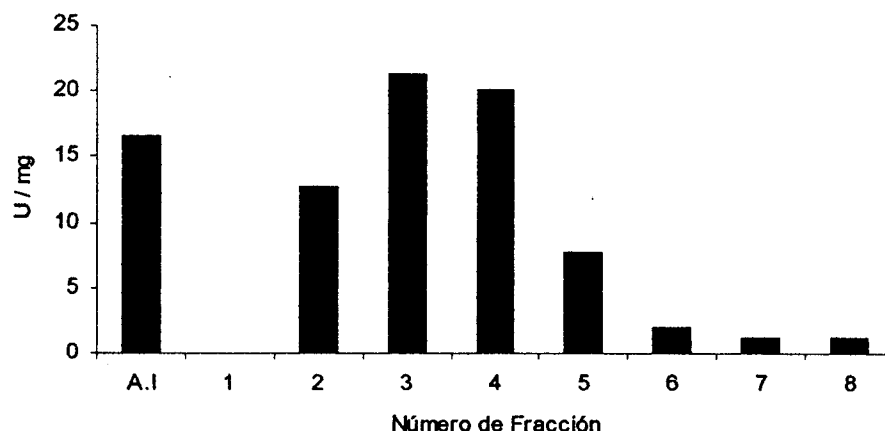


Figura 5.3.5. Actividad específica de la tanasa (U / mg proteína ■) después de Filtración en Gel. A.I: antes de la inyección.

En las abscisas está el número de fracciones colectadas y en las ordenadas, la actividad específica de las fracciones con actividad. En esta etapa fue muy evidente el aumento de la actividad específica. Las fracciones con mejor actividad específica fueron las fracciones 2,3 y 4. Estas fracciones se pusieron en SDS-PAGE, y mostraron el mismo grado de purificación, así que se juntaron para pasar a la etapa de caracterización y secuenciación, después de someterse a un ensayo de actividad sobre un gel de actividad. Esta misma muestra fue utilizada para determinar su actividad sobre taninos hidrolizables y condensados.

5.4.1. Electroforesis tipo SDS -PAGE

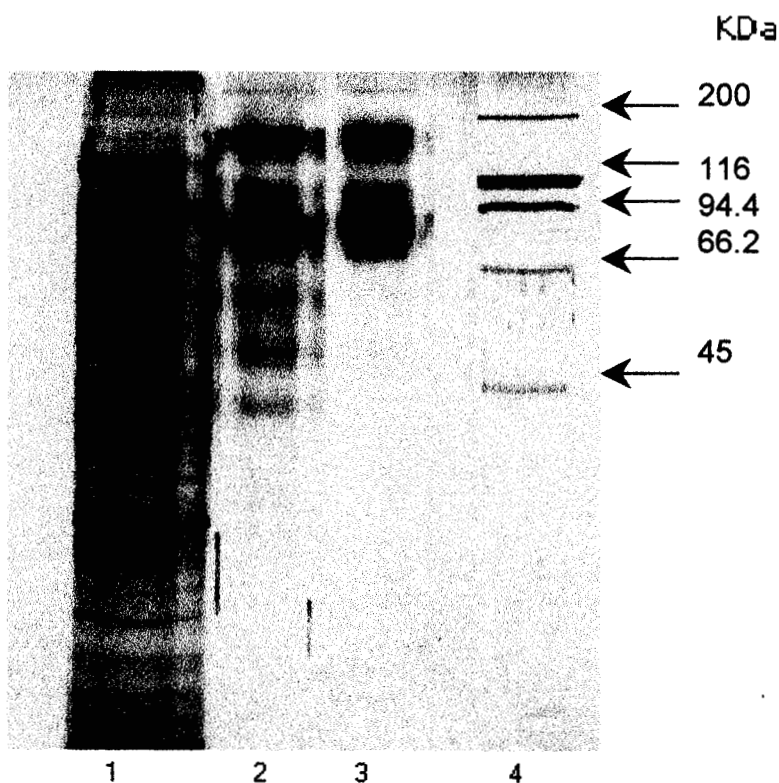


Figura 5.4.1. SDS- PAGE de las diferentes etapas de purificación de la tanasa.

- 1: Extracto crudo concentrado
- 2: Fracciones separadas por cromatografía de intercambio aniónico
- 3: Fracciones separadas por cromatografía de Filtración en Gel
- 4: Marcadores de peso molecular

En la figura 5.4.1, se muestra un SDS-PAGE, este gel hace evidentes las etapas de purificación; el extracto crudo, la muestra purificada por intercambio aniónico y la muestra purificada por filtración en gel. Se colocaron estándares de Peso Molecular (BioRad cat, 161-0315) para determinar el peso molecular de la tanasa purificada. Se aplicaron 100 Volts constantes, por 45 minutos aproximadamente para la separación y la tinción se hizo con plata.

Este gel muestra el grado de purificación de la enzima. Puede verse que en el carril número 3, hay dos bandas muy fuertes y gruesas que corresponden a un peso molecular aproximado, para la de abajo de 85 KDa, y la de arriba corresponde a 170 KDa.

Cuando se obtuvo el gel de actividad se observó que ambas bandas mostraron actividad, por lo cual se procedió a hacer un segundo SDS-PAGE y un segundo gel de actividad pero, esta vez con una migración muy lenta y además se dejó salir del gel el azul de bromofenol, para separar mejor las dos bandas. Ambos geles fueron corridos al mismo tiempo a 70 Volts constantes, por 2.5 horas aproximadamente.

5.4.2. Gel de actividad

Se procedió de la siguiente manera, para determinar la actividad en un gel:

Las fracciones con actividad, después de la cromatografía de filtración en gel, fueron puestas en una electróforesis, dejándola por dos horas y media, a 70 Volts constantes, de manera que los marcadores y las bandas de actividad pudieran separarse bien, como puede verse en los siguientes geles de proteínas y de actividad, que fueron corridos al mismo tiempo.

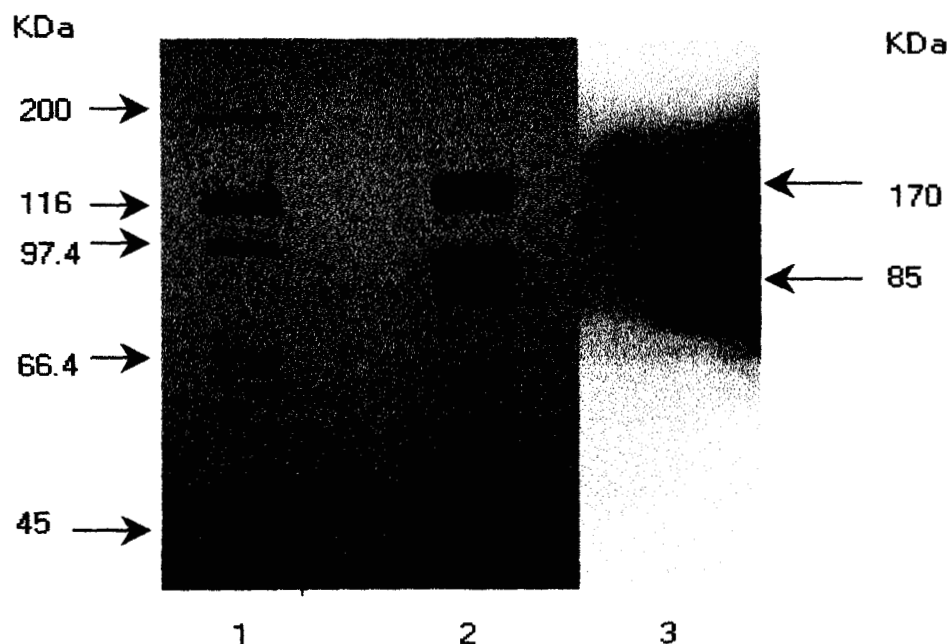


Figura 5.4.2. Geles de SDS-PAGE teñido con plata y de actividad, incubado en ácido tánico.

- 1: Marcadores de peso molecular
- 2: Tanasa purificada por cromatografía de filtración en gel
- 3: Bandas con actividad tanasa

Las dos bandas de proteínas que se revelaron con plata, corresponden a las dos bandas con actividad. En este gel de actividad puede verse la formación del complejo blanco producto de la reacción del ácido tánico y la quinina. Las dos regiones sin colorearse en el gel de la derecha, corresponden a la actividad de la tanasa, que impide la formación del complejo ácido tánico – quinina, por lo cual hay dos tanasas. Una con peso molecular de 85 KDa y una segunda con peso molecular de 170 KDa. Cada una de las bandas de proteína, después de ser reveladas con azul de Coomassie (para tener suficiente proteína), fueron cortadas del gel y se enviaron a secuenciar parcialmente. Obteniéndose los siguientes resultados de sus secuencias internas.

5.6. Caracterización de la tanasa

Tabla 5.6.1. Secuencia parcial interna de la tanasa de 85 KDa

Secuencia	Referencia
GKAMGQEFSDK	gi 2077896
M*VFGSSSR	gi 2077896

Para la proteína de 85 KDa se obtuvieron solamente 2 secuencias diferentes. Para la proteína de 170 KDa se obtuvieron 21 secuencias diferentes que se muestran en la tabla 5.6.2, junto con las dos secuencias obtenidas de la proteína de 85 KDa. Las dos secuencias remarcadas en negritas en la tabla 5.6.2, son las correspondientes a las secuencias de la proteína de 85 KD que también estuvieron presentes en la proteína de 170 KDa.

Nota: (gi 2077896 significa que estas secuencias tienen 100% de homologías con dicha glucosidasa), con clave AB003470, reportada en el Genbank (<http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query>) y comparada con nuestras secuencias.

Tabla 5.6.2. Secuencias parciales internas de la tanasa 170 KDa

Secuencia	Referencia
NGVFTATDNWAIQIEALAK	gi 2077896
NWEGFSPDPALSGVLF AETIK	gi 2077896
ITLQPSEETKWSTTLTR	gi 2077896
TASVSLV FVNADSGEGYINVDGNLGDR	gi 2077896
VAGDEVPQLYVSLGGPNEPK	gi 2077896
TMHELYLWPFADAIR	gi 2077896
AVDIVSQM*TLAEK	gi 2077896
GIQDAGVATAK	gi 2077896
GKAMGQEFSDK	gi 2077896
TM*HELYLWPFADAIR	gi 2077896
RIGADSTVLLK	gi 2077896
NDGALPLTGK	gi 2077896
M*VFGSSSR	gi 2077896
LWTPPNFSSWTR	gi 2077896
MVFGSSSR	gi 2077896
IMAAYYK	gi 2077896
NLAYLR	gi 2077896
SPFTW GK	gi 2077896
VDDMAVR	gi 2077896
IM*AAYYK	gi 2077896
ASLPTVH	gi 2077896

Tabla 5.6.3. Homologías entre la proteína de 85 KDa y 170 KDa

85 KDa	170 KDa
GKAMGQEFSDK	GKAMGQEFSDK
M*VFGSSSR	M*VFGSSSR

Como se puede ver en las tablas 5.6.2 y 5.6.3, las dos secuencias, de la proteína de 85 KDa, se encuentran dentro de las secuencias de la proteína de 170 KDa. Esto nos hizo sospechar que la proteína 85 KDa, tiene muy probablemente la misma secuencia de aminoácidos que la proteína de 170 KDa. La probabilidad de que una misma secuencia de 20 aminoácidos distintos se encuentre aleatoriamente y exactamente igual, dos veces, en una proteína diferente, es muy baja (es del orden 1×10^{-27}). Esto deja muy claro que no es un evento al azar.

Por otra parte, 170 KDa es exactamente el doble de 85 KDa (peso molecular de las tanasas, según revelan los geles). Lo cual hace pensar que la tanasa tiene una forma monomérica de 85 KDa y una forma dimérica de 170 KDa. Esto último no es de extrañar si recordamos que las tanasas de la literatura tienden a ser multiméricas, (Tabla 2.7.1, capítulo 2).

La segunda cosa muy novedosa de este trabajo es que la tanasa no solamente forma un homodímero, sino que además esta tanasa de 85 KDa, tiene 100 % de homologías con una β -D-glucosidasa de *A. kawachii*. El hecho de que la tanasa tuviera 100% de homologías con dicha glucosidasa nos hizo pensar que la tanasa muy probablemente, tendría actividad β -D-glucosidasa, y de ser así, habríamos encontrado una enzima bifuncional que además de degradar taninos como el ácido tánico, puesto que degradaría compuestos derivados de la degradación de la celulosa, como la celobiosa. Esto es algo de lo que se hablará más adelante.

5.6.1.1. Homologías de la tanasa con la β -D- glucosidasa de *A. kawachii*

La siguiente tabla 5.6.4, muestra la secuencia completa de la β - D- glucosidasa de *A. kawachii* (obtenida del Genbank), que corresponde a la secuencia de aminoácidos

de la referencia citada gi2077896. Esta tabla trata de mostrar las homologías de la tanasa con esta β -D- glucosidasa. Cada letra representa un aminoácido (Ver tabla 4.10.1, capítulo de Materiales y Métodos).

Tabla 5.6.4. Comparación de la secuencia β -D-glucosidasa de *A. kawachii* y la tanasa de 170 KDa y 85 KDa.

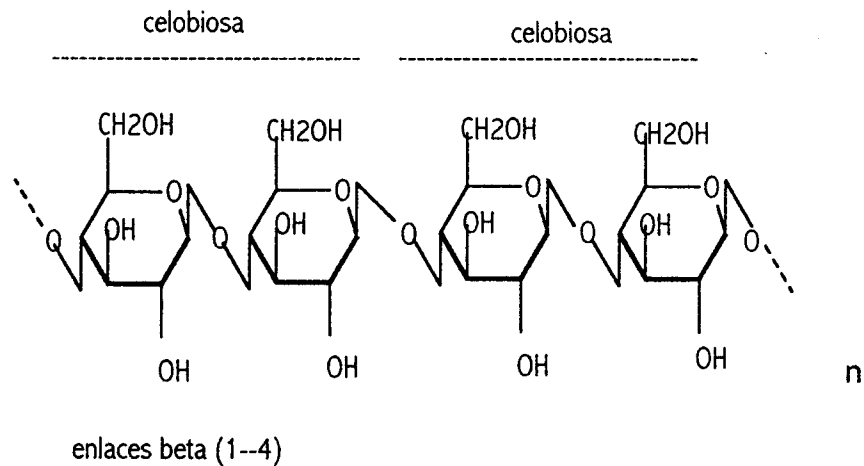
mrftlieava	ltavslasad	elaysppyp	spwangggdw	aqayq r avdi	50
<u>vsqmtlaekv</u>	nlttg t wel	elevgqtggv	prlgvpgmel	qdsplgvrds	100
dynsafpsgm	nvaatw d kn l	<u>aylr</u> g <u>kamgq</u>	<u>efsdk</u> gadiq	lgpaagplgr	150
spdgg r nweg	<u>fspd</u> palsgv	<u>lfaetikgic</u>	<u>dagvvatakh</u>	yiayegehfr	200
qapea q gygf	nisesgsanl	<u>ddktmhelyl</u>	<u>wpfadairag</u>	agavmesynq	250
innsygcqns	ytlnkllkae	lgfqqfvmsd	waahhagvsg	alagldmsmp	300
gdvdydsgts	ywgtnl t vsv	lngtvpq w ry	<u>ddmavrimaa</u>	<u>vykvgrdrlw</u>	350
<u>tppnfsswtr</u>	<u>deygykyyyv</u>	segpyekvnh	yv n qrnhse	lirrigadst	400
<u>vllkndgalp</u>	<u>ltgkerlval</u>	igedagsnpy	gangesdrge	dn g tlamgwg	450
sgtanfpylv	tpeqaisnev	<u>lknkngvfta</u>	<u>tdnwaidqie</u>	<u>alaktasvsl</u>	500
<u>vfynadsgeg</u>	<u>yinvdgnlqd</u>	rknltlwrng	dnvikaaasn	cnntiviihs	550
vgpvlvnewy	dnpnvtailw	gglpggesgn	sladvlygrv	npgak s pftw	600
<u>gk</u> treayqdy	lvtepnngng	apqedfvegv	fidyrgfdkr	netpiyefgy	650
glsyttfnys	nlevqvl s ap	ayepasgete	aaptfgevgn	asnylypdgl	700
qkitkfiypw	lnstdleass	gdasyggdss	dylpegatdg	saqpilpagg	750
qpggnprlyd	elirvsvtik	ntgk v agdev	<u>palyvslgpp</u>	<u>nepkivirqf</u>	800
<u>eritlqpsee</u>	<u>tkwsttltrr</u>	dlanwnvekq	dweitsypk m	<u>vtvqsssrkp</u>	850
plraslptvh					860

La tabla muestra la secuencia de aminoácidos de la β -glucosidasa, de *A. kawachii*, con un total de 860 aminoácidos. Las secuencias subrayadas son las secuencias obtenidas de la tanasa. Las dos secuencias encontradas para la tanasa de 85 KDa, están marcadas en negritas y cursivas. Todas las secuencias están dentro de la secuencia de la glucosidasa de *A. kawachii*.

Es posible que la primera secuencia subrayada sea el extremo N-terminal de la proteína, y que las secuencias ubicadas antes de estas sea parte de la proteína no procesada. En el caso de la tanasa, la primer secuencia subrayada, podría ser su extremo N- terminal ya que siendo una proteína extracelular, es una proteína que ha sido procesada en el Retículo Endoplásmico para poder ser excretada al exterior celular, por lo cual ha perdido la parte que conserva la β - D- glucosidasa de *A. kawachii*, y la última secuencia seguramente corresponde al extremo carboxilo terminal de la tanasa y de la β - D- glucosidasa de *A. niger* Aa20. Si es esto entonces, el peso molecular de ambas, si sacamos el fragmento no procesado de la β -D-glucosidasa y nos quedamos con lo demás tenga un peso molecular cercano a 85 ó 86 KDa. Esto nos hace suponer que la tanasa de *A. niger* y la β -D- glucosidasa de *A. kawachii* son muy posiblemente la misma proteína, ya que no se encontró una sola secuencia que no estuviera en la secuencia de la β -D-glucosidasa.

5.6.1.2. Actividad β -D-glucosidasa de la Tanasa

Todos los resultados anteriores sobre las similitudes entre la tanasa y la β -D-glucosidasa, nos llevan a pensar que seguramente la tanasa tendría una segunda función. Para comprobar y poder relacionar los resultados de las secuencias de aminoácidos con la función, se probó la tanasa sobre la celobiosa (Unidad dimérica de la celulosa), formada por enlaces de tipo $\beta(1,4)$, que al ser hidrolizada por la β -D-glucosidasa libera glucosa como muestra de la actividad de la enzima (Figura 5.6.1).

**Figura 5.6.1. Celulosa**

Al poner la tanasa en celobiosa se determinó si había liberación de glucosa por hidrólisis de la celobiosa. El resultado fue afirmativo, lo cual comprueba nuestra hipótesis de que la tanasa es una enzima bifuncional. El resultado se muestra en la tabla siguiente. En donde se reporta la actividad β -glucosidasa de la tanasa sobre la celobiosa. Es importante decir que también se hicieron ensayos con celulosa y carboxometilcelulosa, pero en este caso no se observó actividad (Tabla 5.6.5).

Tabla 5.6.5. Actividad β -D-glucosidasa de la tanasa

Sustrato	Glucosa liberada ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)
β -celobiosa	23.75
Carboximetilcelulosa	Sin actividad
Celulosa	Sin actividad

Cuando se puso una mezcla de ácido tánico-celobiosa, en concentraciones equimolares (50 mM), la tanasa degradó únicamente el ácido tánico y la actividad β -D-glucosidasa se ve inhibida. En la literatura se ha reportado que el ácido tánico inhibe a la β -D-glucosidasa (Goldstein y Swain, 1965). Si recordamos el ácido tánico

precipita a las proteínas y esta posiblemente sea la principal causa de la inhibición de la actividad enzimática en una solución donde, además de la celobiosa, estuvo presente el ácido tánico (Tabla 5.6.6).

Tabla 5.6.6. Inhibición de la β - D- glucosidasa en presencia de ácido tánico.

Sustrato	Actividad Tanasa (Liberación de ácido gálico) $\mu\text{mol} / \text{ml}$	Actividad β -D-glucosidasa (Liberación de glucosa) $\mu\text{mol} / \text{ml}$
Acido tánico 50mM - Celobiosa 50 mM.	9.3	-----
Acido Tánico 50 mM. (sin celobiosa)	9.6	-----
Celobiosa 50 mM. (sin ácido tánico)	-----	0.253

Cuando el ácido tánico estuvo presente además de la celobiosa, la celobiosa no se hidrolizó, cuando no estuvo presente el ácido tánico la celobiosa pudo ser hidrolizada. En cambio la actividad de la tanasa no se vio afectada e hidrolizó el ácido tánico, generando ácido gálico.

Sin embargo es importante hacer notar que la actividad tanasa no es inhibida por la presencia de la celobiosa. Esto indica que el efecto de los sustratos es asimétrico y será importante para estudios más refinados de esta enzima bifuncional.

5.6.2. pH Optimo de la tanasa

El pH óptimo de la tanasa se determinó en amortiguador de citratos fosfato 0.1 M, a pH diferentes entre 3.5 a 7.0. En este sistema de amortiguador la tanasa presenta actividad, prácticamente en todos los valores de pH ensayados, pero dobla sus valores de actividad a pH 6.0 y después, tiende a bajar la actividad volumétrica en valores superiores a 6.0. Por lo cual el pH óptimo de la tanasa fue de 6.0 sobre amortiguador de citratos-fosfatos (Figura 5.6.2).

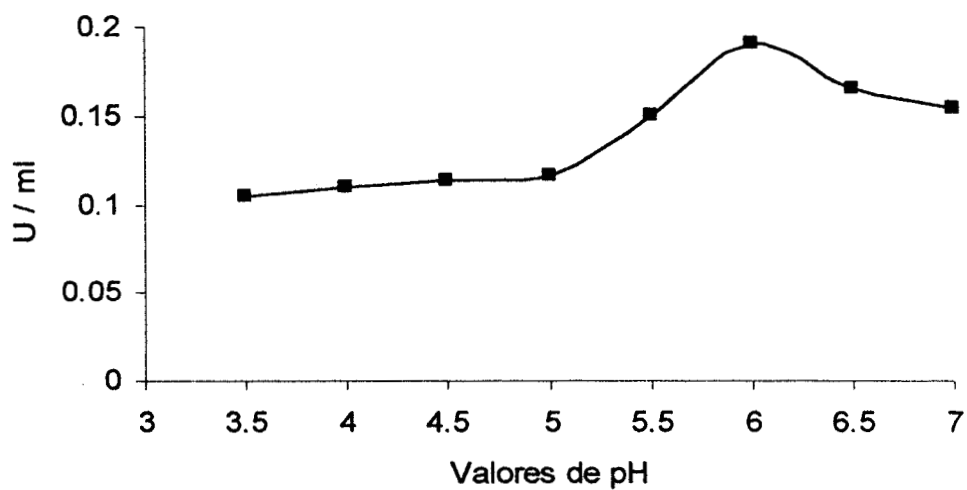


Figura 5.6.2. pH óptimo de la tanasa en amortiguador de citrato 0.1 M (■)

También se ensayó la actividad de la tanasa en amortiguador de acetatos en pH de 4.0 a 5.5 (Figura 5.6.3).

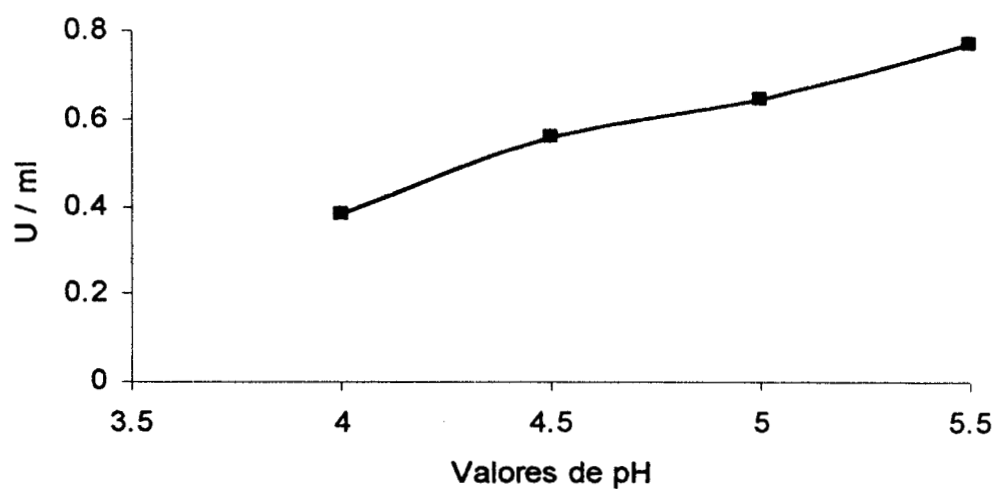


Figura 5.6.3. Actividad tanasa sobre amortiguador de acetatos 0.1 M (■)

Cuando la actividad de la tanasa fue ensayada sobre amortiguador de acetatos (Figura 5.6.3), se encontró que en comparación con las actividades obtenidas en amortiguador de citratos (Figura 5.6.2) la actividad se triplica, sobre acetatos. Esto quiere decir que el sistema de acetato de sodio-ácido acético es mejor amortiguador conviene más a la enzima, que el sistema citratos – fosfatos, esto es muy importante porque esto hace pensar que la el citrato posiblemente esté secuestrando algún metal, que pueda ser necesitado por la tanasa.

En ambas gráficas puede verse que la tanasa es activa a valores de pH relativamente ácidos, pero su actividad se beneficia a valores de pH próximos a 6.0 después de 7.0 esta actividad tiende a caer (Figura 5.6.2).

5.6.3. Temperatura Optima de la tanasa

La tanasa se incubó a diferentes temperaturas desde 30 a 90°C en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 5.5. Obteniéndose la siguiente gráfica (Figura 5.6.4).

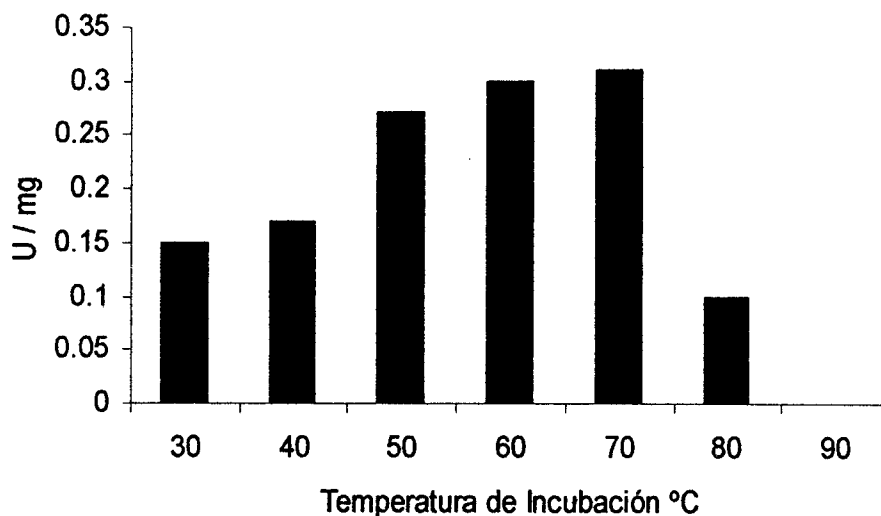


Figura 5.6.4 . Temperatura Optima de la tanasa sobre amortiguador de acetatos 0.1M (■).

La tanasa tiene una temperatura óptima entre 50 y 70°C, y pierde actividad a 80°C. Esta actividad se pierde totalmente a 90°C. No obstante la tanasa de *A. niger* Aa20, es una enzima termoestable. Que también tiene actividad a 30, 40, 50 60 y 70°C, esto implica que esta tanasa puede trabajar a temperatura ambiente y a temperaturas elevadas, lo cual la hace una enzima de interés en procesos Biotecnológicos, para la degradación de los taninos sin preocuparse demasiado por las condiciones de temperatura, ya que puede trabajar a temperaturas ambientales y a temperaturas de hasta 70°C. Esto explica por qué fue posible purificarla a temperatura ambiente, sin que nos preocupáramos en hacer adaptaciones a las columnas de purificación o de conservación en el frío, como sucede con la mayoría de las enzimas, cuando se quieren purificar.

Esto muestra que la tanasa que se produjo por fermentación en medio sólido y que se purificó, en comparación con las enzimas purificadas en la literatura, es la más termoestable de la literatura, en que las tanasas fueron producidas en fermentación en medio líquido. Este resultado coincide con el estudio de Lekha y Lonsane en (1994), quienes ya habían encontrado que la tanasa producida en FMS, era termoestable a 60°C, y la producida en FML, sólo toleraba 40°C.

5.7.1. Las similitudes y diferencias de la tanasa de *Aspergillus niger* Aa20, con otras tanasas.

La siguiente tabla (5.7.1) resume las características bioquímicas de la tanasa que fue purificada en este trabajo y se compara con las características de las tanasas reportadas en la literatura.

Tabla 5.7.1. Similitudes y diferencias de la tanasa de *A. niger* Aa20 con las tanasas producidas en FML.

	<i>A. flavus</i> (1)	<i>Candida sp.</i> (2)	<i>A. niger</i> (3)	<i>A. oryzae</i> (4)	<i>P. chrisogenum</i> (5)	<i>Pedunculate oak</i> (6)	<i>A. niger</i> Aa20 (7)
Punto Isoeléctrico	----	----	4.3	----	----	----	3.8
Peso Molecular (KDa)	194 (2 S.U)	250 (2 S.U)	186	200 (8 S.U)	----	300 (4 S.U)	85 y 170 (2 S.U)
pH Optimo	4.0	----	6.0	----	5.0	4.3-6.0	6.0
Temperatura Optima (°C)	----	----	35	----	30-40	30-40	70

(1) Adachi *et al*, 1968; (2) Aoki *et al*, 1976; (3) Barthomeuf *et al*, 1994; (4) Hatamoto *et al*, 1996; (5) Sussela *et al*, 1983; (6) Niehaüs y Gross, 1997; (7) Resume las características de la tanasa purificada en el presente trabajo. S.U: número de subunidades.

Al comparar la tanasa purificada en este trabajo (producida en FMS), con las tanasas de diferentes microorganismos producida en FML y con la tanasa de planta, podemos ver que la tanasa tiende a ser multimérica, pero no obstante la tanasa purificada en este trabajo es la más pequeña. También, como ya se dijo, es la tanasa que tolera temperaturas mayores a 60°C. El punto isoeléctrico de la tanasa tiende a ser ácido.

Estos son los primeros datos conocidos de caracterización molecular de una tanasa producida por fermentación en medio sólido.

5.7.2. Degradación de los taninos condensados e hidrolizables con la tanasa.

La siguiente tabla (5.7.2) muestra la acción de la tanasa sobre algunos de los taninos hidrolizables y condensados en comparación de los tiempos de retención de los taninos y los tiempos de retención de sus productos, al ser tratados con la enzima.

El ácido gálico tiene un tiempo de retención entre 2.7 y 3.3 minutos. A continuación se muestran los tiempos de retención de los estándares y de los respectivos ensayos con la tanasa.

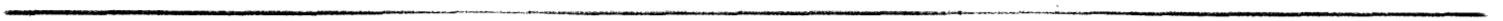
Tabla 5.7.2 . Degradación de taninos condensados e hidrolizables

	Estándar(tr), min	Tanasa (tr), min	Productos
Taninos condensados			
Catequina	5.1	5.1	---
Epicatequina (EC)	6.0	6.0	---
Galato de catequina (GC)	5.2	5.2	---
Galato de Epi-catequina (GEC)	5.1	5.0	---
Catequina galato (CG)	6.6	3.0/5.2	AG+ GC
Epi-catequinagalato (ECG)	6.4	3.0/6.0	AG+ EC
Galato de Galocatequina (GCG)	5.9	3.01	AG+ GC
Galato de Epi-galocatequina (GECG)	5.4	2.78/5.4	AG+ GEC
Procianidina B3	4.84	4.86	---
Taninos hidrolizables			
Galato de metilo (GM)	5.77	2.8/5.78	AG+ GM
Ac. Gálico lauril éster (AGLE)	6.5	3.0/6.5	AG+AGLE
A. Elágico (A.E)	5.5	3.0/5.5	AG+A.E
Pentagaloilo de glucosa (PGG)	2.64/5.18/5.79	1.74/1.79/2.91/4 .70	AG+PGG

EC: Epicatequina; GC: Galato de catequina; GEC: Galato de Epi-catequina; GC: Catequina galato; GCG: Galato de Galocatequina; GECG: Galato de Epi-galocatequina; M:Galato de metilo; AGLE: Acido gálico lauril ester; AE: Acido elágico; PGG: Pentagaloilglucosa; AG: Acido gálico.

La tanasa actuó sobre los taninos condensados que contienen una molécula de ácido galico en su estructura, no así con los taninos que no contienen ácido gálico. Respecto de los taninos hidrolizables, la tanasa fue capaz de reconocer y actuar sobre la molécula de ácido gálico. Actuó sobre la molécula del galato de metilo o metil galato y sobre el ácido tánico, este último fue usado para medir la actividad de la tanasa en las diferentes etapas de purificación, aunque no se muestra en la tabla. Por lo cual se puede concluir que la tanasa tiene actividad esterasa y depsidasa y es una enzima muy con respecto al grupo esterificante ya que utiliza diferentes sustratos esterificados con el ácido gálico.

Discusión



6.0. Discusión

La tanasa es una enzima utilizada para eliminar el efecto de la astringencia en algunos productos de origen vegetal. Se usa ampliamente en la manufactura de té y en la obtención del ácido gálico. Se ha estudiado su producción principalmente por fermentación en medio líquido, pero sólo se ha encontrado asociada al micelio (Lekha y Lonsane, 1997), llegando a suponerse que en ese medio no se excreta al caldo de cultivo (Lekha y Lonsane, 1994). Sin embargo estudios recientes en nuestro grupo, indican que si se excreta al medio, pero es destruida por la acción de proteasas. En cambio, si la tanasa se produce por fermentación en medio sólido, no se destruye por la ausencia de dichas proteasas y esta ausencia de proteasas facilitó mucho este estudio. Por otra parte en FMS, la tanasa tiene mejores rendimientos que en FML (Lekha y Lonsane 1994). Estas características hacen a la FMS un sistema con grandes ventajas para la producción de la tanasa, con lo cual se aumentaría la producción de esta. Estas ventajas seguramente tienen que ver con el hecho de que la tanasa se excreta al exterior celular, donde las condiciones ambientales son muy diversas, por lo cual las proteínas excretadas sufren modificaciones a nivel de retículo endoplásmico, en donde modifican su secuencia de aminoácidos, y en el aparato de Golgi donde son glucosiladas, para ser enviadas al exterior. Seguramente todas estas modificaciones hace que la tanasa de FMS sea termoestable a temperaturas de 60 y 70 °C y estén preparada para actuar a valores de pH cercanos a 3 para degradar compuestos como los taninos.

En cuanto a la producción de la enzima se demostró que *A. niger* Aa20 puede crecer a concentraciones de 10 % de ácido tánico, pero que al comparar con un cultivo con 100 veces menos de ácido tánico, la actividad solamente se perdía en un orden de 10 y no de 100 veces. Esto quiere decir que el hongo tolera elevadas concentraciones de ácido tánico aunque, las elevadas concentraciones del sustrato no son las óptimas para la actividad de la enzima, sin embargo se mantiene activa y cuando se intentó purificar la tanasa producida con 10% de ácido tánico en el medio, se observó la interacción del sustrato residual que precipita a una parte de las proteínas excretadas. Por eso se usó el nivel del 0.1% de ácido tánico, con el cual se

pudo producir la enzima, con menos proteínas precipitadas en las que hubiera podido estar la enzima y esto fue un factor muy importante para su purificación.

Cuando se compararon las características de la tanasa producida por FMS de *A. niger* Aa20, con las de la tanasa producida por FML con diferentes microorganismos y con las de una tanasa de origen vegetal (Tabla 5.7.1), se notó que el punto isoelectrico era de alrededor de 4.0 y que estas enzimas son frecuentemente multiméricas.

En cuanto a la temperatura, las tanasas producidas por FML de diferentes organismos tienen su mejor actividad entre 35°C y 50 °C. En tanto que la tanasa de este trabajo es estable a 70°C y con un nivel óptimo entre 50°C y 70°C. Además fue activa a temperaturas desde 30°C a 70°C (Figura 5.6.8).

Los valores de pH en los cuales se ha observado la actividad de las tanasas son muy parecidos entre las tanasas de microorganismos, de planta y la encontrada en este trabajo. También es importante notar que la tanasa funcionó mejor en un amortiguador de acetatos que con uno de citratos ya que su actividad es tres veces más alto que con el segundo (Figuras 5.6.6 y 5.6.7), por lo que es posible que el citrato esté secuestrando metales que requiere la tanasa para su actividad.

Otras propiedades encontradas en este trabajo fueron: la tanasa resultó ser un homodimero de 170 KDa porque se encontró una homología completa entre dos péptidos distintos del componente de 85 KDa y sus secuencias correspondientes al componente de 170 KDa (Tablas 5.6.1 y 5.6.2) para 20 aminoácidos distintos, lo cual reduce la probabilidad de una coincidencia aleatoria a menos de 10^{-27} . Este dato y la coincidencia que 170 KDa sea extremadamente el doble de 85 KDa apoya fuertemente esta idea.

En segundo lugar, el estudio de las secuencias disponibles de esta tanasa con las de una β -D-glucosidasa de *Aspergillus kawachii* (Tabla 5.6.4) mostró una coincidencia completa en todos los aminoácidos. Lo cual hizo sospechar que está enzima fuese bifuncional y, lo cual fue demostrado por su acción catalítica sobre la hidrólisis de la

celobiosa, pero no de la celulosa (Tabla 5.6.5). Se demostró que el ácido tánico inhibe la actividad de la celobiasa pero la celobiasa no inhibe la actividad de la tanasa. Lo cual podría deberse a una mayor afinidad de la enzima por el ácido tánico y a una interferencia de actividad en los sitios catalíticos. Se desconoce la utilidad de esta bifuncionalidad pero podría estar relacionada con la fijación de la enzima a sustratos complejos: por ejemplo a la pared celular vegetal, compuesta de celulosa y taninos. Pues las enzimas celulasas tienen dominios muy distintos, para la fijación de la enzima al sustrato.

Esta novedad abre nuevas expectativas sobre la acción de las tanasas y sobre su evolución filogenética que van más allá de los límites de esta tesis.

El estudio de la selectividad catalítica de esta enzima mostró algunas novedades importantes. En primer lugar se observó que solamente hidrolizaba los ésteres de ácido gálico (Tabla 5.7.2), pero no generaba producto alguno sobre los taninos condensados sin esterificación con el ácido gálico. Ello demostró que esta enzima tiene una gama amplia de acción como esterasa.

Algo que fue muy importante al poner a la tanasa sobre taninos hidrolizables diferentes del ácido tánico y taninos condensados, fue el hecho de comprobar que la tanasa es capaz de degradar los taninos condensados.

Realmente la parte más novedosa de este trabajo, fue el hecho de encontrar que la tanasa tuviera 100% de homologías en sus secuencias de aminoácidos con una β -D- glucosidasa de *A. kawachii* y que además tuviera la doble función catalítica.

Por un lado degrada los ésteres de los taninos y, por otro, degrada la celobiosa, para completar la degradación de la celulosa. Como ya se dijo, algunos hongos y bacterias degradan la celulosa en un mecanismo en el cuál participan las endoglucanasas y exoglucanasa, para que las β -D-glucosidasas terminen de degradar las unidades finales de la celulosa (celobiosa), para finalmente liberar glucosa, que es utilizada como fuente de energía.

Es muy posible que los hongos utilicen la tanasa, para invadir a las plantas con alto contenidos de taninos (hasta 10% de su peso), y utilicen la celobiosa como fuente de energía para mantenerse como parásitos pues muchas plantas producen y acumulan taninos y tienen una pared compuesta entre otras cosas de celulosa. Ambos constituyentes, protegen a la planta del ataque microbiano. Algunos microorganismos no son capaces de utilizar ni los taninos ni la celulosa pero, otros como los *Aspergillus* y algunas bacterias han desarrollado un sistema de enzimas que les permite utilizar los taninos y la celulosa como fuente de energía. Otra cosa importante es que en presencia de ácido tánico la tanasa no utiliza la celobiosa, esto es otro punto de discusión que podría hacer pensar, que la principal función de la enzima sea la de degradar los taninos y secundariamente la celulosa.

Se podría especular que la tanasa utiliza a la celulosa solamente para quedarse fijada a la pared y comienza a trabajar hidrolizando los taninos. Pero estas preguntas se podrán responder con nuevos estudios de esta enzima en el ámbito molecular.

Es importante señalar que las secuencias de aminoácidos estudiada no es homóloga con la otra tanasa descrita por (Hatamoto *et al*, 1996) y, por lo tanto se trata de una nueva enzima que no está sujeta a la patente reivindicada por esos autores. Sus usos prácticos pueden ser orientados a futuros desarrollos de procesos para disminuir la astringencia de gran variedad de taninos condensados e hidrolizables que forman ésteres como el ácido gálico, gran variedad de taninos condensados o hidrolizables que forman ésteres como el ácido gálico pero que al ser degradados parcialmente se obtienen productos con mejor gusto (menor astringencia) o menos toxicidad y esto demuestra la hipótesis que se enunció al principio de esta tesis. Una revisión de los resultados ya descritos también indica que se obtuvieron puntualmente todos y cada uno de los objetivos señalados en la sección 3.2 de la tesis y que de manera especial se logró la caracterización molecular, a nivel de la estructura primaria parcial de la enzima.

Conclusiones y Perspectivas



7.0. Conclusiones y perspectivas

Se comprobó la hipótesis inicial de este trabajo, de que la tanasa de *Aspergillus niger* Aa20, es una enzima de amplio espectro capaz de degradar, al menos parcialmente, los taninos hidrolizables y condensados.

Se logró purificar y caracterizar la tanasa de *A. niger* Aa20, producida por fermentación en medio sólido.

Se logró establecer un protocolo de purificación de la tanasa de *A. niger* Aa20 producida en fermentación en medio sólido, sobre espuma de poliuretano y utilizando 0.1% de ácido tánico como inductor. Así como también pudo caracterizarse la enzima producida en fermentación en medio sólido.

La tanasa de *A. niger* Aa20 es una enzima con peso molecular de 85,000 Da y forma un homodimero de 170,000 Da.

Las secuencias de la tanasa purificada tiene 100% de homologías con la secuencia de la β -Glucosidasa de *A. kawachii* reportada en el Genbank clave AB003470, REF 2077896. En cambio no tiene ningún parecido con la tanasa de *A. oryzae* (Hatamoto *et al*, 1996).

La tanasa de *A. niger* Aa20, tiene actividad β -D-glucosidasa, sobre celobiosa, (unidad dimérica de la celulosa), rompiendo el enlace $\beta(1,4)$ de la celobiosa y liberando glucosa. La tanasa de *A. niger* Aa20, tiene dos actividades, una como glucosidasa y otra como tanasa, pero en una mezcla de celobiosa – ácido tánico, la actividad glucosidasa se inhibe y la actividad tanasa se mantiene, lo cual hace pensar que el ácido tánico inhibe la actividad glucosidasa.

La tanasa purificada tiene una temperatura óptima entre 50 y 70°C y es una enzima termoestable a 70°C. La tanasa purificada tiene un pI alrededor de 3.8 y un pH óptimo de 6.0.

La tanasa de *A. niger* Aa20, reconoce la unión éster del ácido gálico de taninos condensados e hidrolizables. La actividad de la tanasa de *A. niger* Aa20, es esterasa y depsidasa ya que hidroliza la molécula del metil galato y la del ácido tánico y es una enzima altamente inespecífica que actúa sobre diferentes taninos.

Su carácter bifuncional y su inespecificidad abre nuevas preguntas acerca de la tanasa de *A. niger* Aa20 y posiblemente de otras tanasas, ya que puede ser, que las tanasas en general tengan una segunda función. A esto vienen las preguntas del por qué y para qué esta doble función en las enzimas. En la literatura hay alrededor de 1600, referencias de enzimas bifuncionales y las que más abundaban son precisamente las glucosidasas. Sin embargo, estas referencias hablan de la capacidad de las glucosidasas para degradar la celulosa de manera sinérgica, donde el sustrato de alguna manera es el mismo, la celulosa, sea con actividad endo o exoglucosidasa.

Esto abre un importante panorama en nuevos estudios de esta enzima, además de los previstos con una enzima pura, como clonar el respectivo gene.

Otra cosa que podría estudiarse es el número de sitios activos de la enzima y explicar su bifuncionalidad. Por otro lado podría intentarse utilizar la enzima para disminuir la astringencia de los taninos de productos destinados a ser utilizados como forraje para animales o de productos alimentarios como el té, el café y las uvas.

Finalmente este estudio fue planteado con el objetivo de conocer más las características de la tanasa que se produce en medio sólido, y conocer sus características a nivel de laboratorio, para que finalmente pudiéramos entender mejor el mecanismo de acción de las tanasas en la degradación de los taninos.

Referencias Bibliográficas



8.0. Referencias Bibliográficas

Acuña-Argüelles M. E, Gutiérrez-Rojas M, Viñegra- González G., and Favela-Torres E. (1995). Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid - state fermentation. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 43: 808-814.

Adachi O. Watanabe M. and Yamada H. (1968). Studies on Fungal Tannase. Part II. Physicochemical Properties of tannase of *Aspergillus flavus*. *Agric. Biol. Chem.*, 32 (9):1079- 1085.

Agbo F. and Spradling J. E. (1995). Enzymatic clarification of tea extract. USA Patent 5,445,836. 29 Aug.

Aoki K., Shinke R. and Nishira H. (1976a). Purification and Some Properties of Yeast Tannase. *Agric. Biol. Chem*, 40 (1): 79 – 85.

Aoki K., Shinke R., and Nishira H. (1976b). Chemical Composition and Molecular Weight of Yeast Tannase. *Agric. Biol. Chem.* 40 (2): 297 - 302.

Aoki K., Tanaka T., Shinke R. and Nishira H. (1979). Detection of tannase in polyacrylamide gels. *Journal of Chromatography*, 170: 446 – 448.

Aquihuatl-Ramos, M. A. (1992). Destoxificación de la pulpa del café: Morfología, Fisiología y Bioquímica de hongos filamentosos que degradan la cafeína. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias de la UNAM. pp. 72.

Ariaga T., Hosoyama H. Yausa, K. (1998). Process for improving the property of proanthocyanidins and for preparing an improved proanthocyanidin product. 29 Sept. USA. Patent 5,814,494.

Armand S., Drouillard S., Schülein M., Henrissat B., Driguez H. (1997). A Bifunctional Fluorogenic Tetrasaccharide as a Substrate to Study Cellulases. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (5): 2709-2713.

Auria R., Hernández S., Rimbault M., Revah S. (1990). Ion exchange resin: a model support for solid state fermentation on *Aspergillus niger*. *Biotechnology Techniques*, 4 (6): 391-396.

Bajpai B. and Patil S. (1996). Tannin acyl hydrolase (EC 3. 1. 1. 20) activity of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Trichoderma*. *World Journal of Microbiology de Biotechnology*, 12 : 217- 220.

Bajpai B. and 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: 612 – 614.

Barthomeuf C., Régerat F., and Pourrat H. (1994). Production, Purification and Characterization of a Tannase from *Aspergillus niger* LCF 8. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 3: 320-323.

Barthomeuf C., Régerat F. and Pourrat H. (1994b). Improvement in Tannase recovery using enzymatic disruption of mycelium in combination with reverse micellar enzyme extraction. *Biotechnology Techniques*, 8 (2): 137 - 142

Barmentlo B., Bell W.J., Hoogstad B., Pendlington S., Slater N.K. (1993). Process of preparing a tea product. Nov 2. USA Patent 5,258,188.

Beverini M., and Metche M. 1990. Identification, Purification and Physicochemical properties of tannase of *Aspergillus oryzae*. *Sciences des aliments*, 10: 807- 816.

Bolay M., and Edelsteir S. (1994). Protein Methods. Editorial Willey - Liss. Quinta impresión.

Bradfield A.E. and Penney M. (1948). The catechins of Green Tea. Part II. Journal Chemical Society, 2249-2254.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the pinciple of Protein–Dye Binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

Bradoo S., Gupta R. and Saxena R. K. (1996). Screening of extracellular Tannase producing fungi: Development of a rapid and simple plate assay. J. Gen. Appl. Microbiol, 42: 325-329.

Bradoo S., Gupta R., Saxena R.K. (1997). Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tannase from *Aspergillus japonicus*. Process Biochemistry. 32 (2): 135-139.

Burgstaller W. (1997). Transport of small ions and molecules through the Plasma Membrane of Filamentous Fungi". Critical Review in Microbiology. 23 (1): 1-46.

Cousins B.W., Tanksley T.D., Knabe D.A., Zebrowska T. (1981). Nutrient digestibility and performance of pigs fed sorghums varying in tannin concentration. Journal of Animal Science. 53 (6):1524-1537.

Dellus V., Mila I., Scalbert A., Menard C., Michon V., Herve du Penchoat C.L.M. (1997). "Douglas - Fir polyphenols and Heartwood Formation. Phytochemistry, 45 (8): 1573-1578.

Deschamps A.M., Mahoudeau G., Conti M., Libeault J.M. (1980). Bacteria degrading tannic acid and related compounds. *J. Ferment. Technol*, 58 (2): 93-97.

Deschamps A., Otuk G., and Lebeault J.M. (1983). Production of Tannase and Degradation of Chestnut Tannin by Bacteria. *J. Ferment. Technol*, 6 (1): 55 – 59.

Deschamps A.M., and Leulliette L. (1984).” Tannins degradation by Yeast from Barks”. *International Biodeterioration*. 20 (4): 237-241.

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

Field J., Lettinga G., Habets L.H.A. (1990). Measurement of Low Molecular Weight Tannins: Indicators of Methanogenic Toxic Tannins. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 69 (3): 148-153.

Fujishima T., Uchida K., Yoshino H. (1972). Enzyme production by molds in sponge culture. *J. Ferment. Technol*. 50: 724-730.

Galiotou P. M., Macris B.J. (1986). Degradation of condensed tannins by *Calvatia gigantea*. *Applied Microbiol Biotechnol*, 23: 502 – 506.

Goldstein J., and Swain T. (1965). The inhibition of enzymes by tannins. *Phytochemistry*, 4: 185 – 192.

Hadi T.A. Banerjee R., Bhattacharyya. (1994). Optimization of tannase biosynthesis by newly isolated *Rhizopus orizae*”. *Bioprocess Engineering*, 11: 239-243.

Hagerman A.E., Carlson D. M. (1998). Biological responses to dietary tannins and other polyphenols. *Agricultural and Food Chem.*, 2: 689 - 704.

Hagerman A., Rice M., Ritchard N. (1998). Mechanism of protein precipitation for two tannins, Pentagaloylglucose and Epicatechin₁₆ (4-8) Catechin (Procyanidin). *J. Agric. Food. Chem.*, 46: 2590-2595.

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: 215 – 221.

Ibuchi S., Minoda Y., and Yamada K. (1972). Hydrolyzing Pathway, Substrate Specificity and Inhibition of Tannin Acyl Hydrolase of *A. oryzae*. *Agric. Biol. Chem.*, 36 (9): 1553 – 1562.

Jankun J., Selman S. H., Rafal S. (1997). Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature*, 5 June 387: 561.

Jimenez-R. L., Rogler J.C., Housley T.L., Butler L.G., Elkins R.G. (1994). Absorption and distribution of ¹⁴C-Labeled condensed tannins and related sorghum phenolics in chickens. *J. Agric. Food. Chem.* 42: 963-967.

Jun H.S., Je Y.Y., Sam K.S. (1995). Characterization of Bifunctional Cellulase and Its Structural Gene. The *cel* gene of bacillus sp. D04 has exo – and endoglucanase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (43): 26012-26019.

Kenneth B. S., Duncan J.A., Chakrabarti A.C. (1990). Immobilization of Amyloglucosidase using two forms of polyurethane Polymer. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 23: 221-235.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lehmberg G.L., Balentine D.A., Hang R.S., Gobbo S.A. (1999). Enzyme extraction process for tea. 14 Sept. USA. Patent 5,952,023.

Lehninger A.L. (1990). Bioquímica. Ediciones Omega. Decimocuarta reimpresión. Barcelona. Pag 74.

Lekha P.K., Lonsane B.K. (1994). Comparative Titres, Location and Properties of Tanin Acyl Hydrolase Produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in Solid – State, Liquid Surface and Submerged Fermentations. Process Biochemistry 29: 497- 503.

Lenkha P. K. and Lonsane B.K. (1997). Production and Application of Tannin Acyl Hidrolase: State of the Art. Advances in Applied Microbiology, 44: 215 – 260.

Lewis J.A., and Starkey R.L. (1968). Vegetable Tannins, their decomposition and effects on decomposition of some organic compounds . Soil Science, 106 (4): 241-247.

Lewis J.A. and Starkey R.L. (1969). Decomposition of plant tannins by some soil microoganisms. Soil Science. 107 (4): 235-241.

McKenzie D.A., Jeenes D.J., Belshaw., Archer D.B. (1993). Regulation of secreted protein production by filamentous fungi: recent developments and perspectives. Journal of General Microbiology, 139: 2295-2307.

McLeod M.N. (1974). Plant tannins – their role in forage quality. Nutrition Abstract and review, 44 (11): 803-815.

Niehaüs J.U., and Gross G.G. (1997). A galotannin degrading esterase from leaves of *Pedunculata oak*. Phytochemistry, 45 (8): 1555-1560.

Nierenstein M. (1936). Experimental work on tea tannin. *Analyst*, 61: 294-295.

Okuda T., Yoshida T., and Hatano T. (1993). Classification of oligomeric Hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. *Phytochemistry*, 32 (3): 507– 521.

Osawa R. (1992). Tannin protein complex-Degrading Enterobacteria Isolated from the alimentary Tracts of Koalas and selective Medium for their Enumeration. *Applied and Environ. Microbol.* , May 58 (5): 1754-1759.

Osawa R., and Walsh T.P. (1993). Visual Reading Method for Detection of Bacterial Tannase. *Applied and Environmental Microbiology*, Apr. 59 (4): 1251-1252.

Osawa T., Narasimhan R., Kawakishi S., Namiki M., Tashiro T. (1985). Antioxidative Defense Systems in Rice Hull against Damage Caused by Oxygen Radicals. *Agric. Biol. Chem*, 49 (10): 3085-3087.

Ozawa T., Terence H.L, Haslam E. (1987). Polyphenol interactions: astringency and the loss of astringency in ripening fruit. *Phytochemistry*, 26: 2937-2942.

Pelczar M., Reid R., Chan. E.C. (1990). *Microbiología*. 4^a edición. McGrawHill.

Petruccioli M., Angiani E. & Federic F. (1996). Semi-continuous Fumaric Acid Production by *Rhizopus arrhizus* Immobilized in Polyurethane Sponge. *Process Biochemistry*, 31 (5): 463 – 469.

Pourrat H., Regerat F., Pourrat A. and Jean D. (1982). Production of tannase (Tannin Acyl Hydrolase E. C. 3.1.1.20) By a strain of *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters* 4 (9): 583-588.

Ramírez-Coronel M.A. (1996). Selección de cepas productoras de tanasa en fermentación en medio sólido. Tesis de licenciatura. UAM-I, México. pp. 24.

Ramírez-Martínez J.R. (1988). Phenolic Compounds in Coffee Pulp: Quantitative Determination by HPLC. *J. Sci. Food Agric.* 43: 135 - 144.

Roussos S. (1985). Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide: physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Provence. pp 163.

Roussos S., Lonsane M. Raimbault and Viniegra-Gonzales G. (1997). Advances in solid state fermentation. 2nd international Symposium on Solid State Fermentation. Montpellier, France. Kluwer Academic Publishers pp. 7-10.

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

Skene I.K., and Brooker J.D. (1995). Characterization of Tannin Acylhydrolase Activity in the Ruminal Bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Anaerobe*, 1:321-327.

Suseela G. R., and Nandy S.C. (1983). Isolation, Purification, and Some Properties of *Penicillium chrysogenum* Tannase. *Applied and Environmental Microbiology*, 46 (2): 525- 527.

Tenko B. and Bow D. (1971). Enzymatic solubilization of tea cream. 13 oct. Brit. Patent. 1.249.932.

Van Diepeningen A.D. (1999). Horizontal Transfer of Genetic Elements in the Black *Aspergilli*. Tesis. pp.141.

Vermeire A. and Vandamme E. (1988). Fungal Production of Tannin Acyl Hydrolase. Med. Fac. Landbow. Rijksuniv. Gent. 53(4b):2047-2056.

Waterman P.G. and Mole S. (1994). Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Blackwell Scientific Publications. Methods in Ecology London, pp. 235.

Wrangham R.W., Waterman P.G. (1983). Condensed Tannins in fruits Eaten by Chimpanzees. Biotropica. 15 (3): 217-222.

Yamada H., Adachi Osao., Watanabe M. (1968). Part I. Formation, Purification and Catalytic Properties of Tannase of *Aspergillus flavus*. Agric. Biol. Chem., 32 (9): 1070 - 1078.

Yamada D. and Tanaka T. (1972). "Wine making using tannase in fermentation process". nov. Patent Ger. 2.224.100. Japan Appl. 71,33,151.

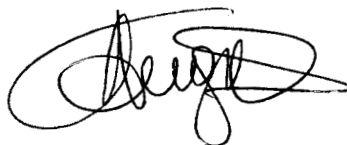
Yong H.L., Chang W.L., Chang H.N. (1989). Citric acid production by *Aspergillus niger* immobilized on polyurethane foam. Appl. Microbiol. Biotechnol, 30: 141-143.

Zhu Y., Knol W., Smits J., and Bol J. (1996). Medium optimization for nuclease P1 production by *Penicillium citrinum* in solid-state fermentation using polyurethane foam as inert carrier. Enzyme and Microbial Technology, 18: 108 - 112.

Zhu Y., Smits J.P., Knol W. and Bol J. (1994). A novel solid-state fermentation system using Polyurethane foam as inert carrier. Biotechnology Letters, 16 (6): 643 - 648.

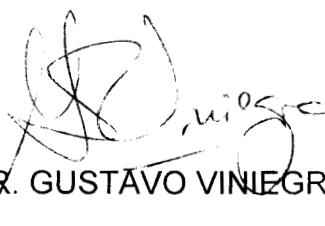
ESTA TESIS FUE APROBADA POR EL JURADO DESIGNADO POR LA DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD EL DÍA 29 DE MARZO DEL 2000.

PRESIDENTE



DR. CHRISTOPHER AUGUR

SECRETARIO



DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZALEZ

VOCAL



DR. OCTAVIO LOERA CORRAL
