



ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA TANASA PRODUCIDA POR *ASPERGILLUS NIGER* GH₁ EN FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

Tesis de Calidad
Categoría Licenciatura
Premio Universitario 2008

Por Ing. Luis Víctor Rodríguez Durán, M.C. Nadia A. Rodríguez Durán y M.C. Nubia Rocío Rodríguez Durán,
M.C. Mario A. Cruz Hernández y Dr. Cristóbal Noé Aguilar González, cristobal.aguilar@mail.uadec.mx

INTRODUCCIÓN

La tanasa es la enzima (E.C. 3.1.1.20) que cataliza la hidrólisis de los enlaces éster presentes en taninos hidrolizables, taninos complejos y ésteres del ácido gálico (1). Sus principales aplicaciones se encuentran en la elaboración de té instantáneo y en la producción de ácido gálico a partir de fuentes vegetales (2). La tanasa puede ser utilizada en la clarificación de jugos, cerveza y vinos, en el mejoramiento del alimento animal y en la descontaminación de los efluentes de las curtidurías (3). Sin embargo, su alto costo de producción y el escaso conocimiento de algunas de sus propiedades importantes han causado que su empleo a nivel industrial sea muy limitado (4). Esta enzima es producida por tan sólo cuatro laboratorios a nivel mundial y no existe reporte de su manufactura en el Continente Americano, por lo que además los costos de importación incrementan su precio. Su producción comercial tradicionalmente se ha ob-

tenido en cultivo sumergido. Sin embargo, estudios recientes han demostrado las ventajas de la fermentación en estado sólido (FES) para la producción de enzimas (5). En el presente trabajo se presenta el estudio de la estabilidad química de la tanasa de *Aspergillus niger* GH₁ (nombre de la cepa del microorganismo utilizado [aislado de hojas de gobernadora]) producida por FES y parcialmente purificada por precipitación con polietilenglicol, filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico.

PALABRAS CLAVE

Tanasa, *taninos*, inhibición, estabilidad química.

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción de la enzima. Para la producción de la enzima tanasa en FES se utilizó la cepa GH₁ de *A. niger* perteneciente a la colección UAdeC-DIA (colección de microorganismos perteneciente al Departamento de Investigación en Ali-

mentos de la Universidad Autónoma de Coahuila). La FES se llevó a cabo en matraces *Erlenmeyer* usando cubos de 0.5 centímetros (cm) de ancho de esponja de *poliuretano* (PUF) como soporte sólido y un medio compuesto por las sales de *Czapeck-dox* (medio de cultivo utilizado para crecimiento de hongos) y 25 g/L (gramos por litro) de ácido tánico como fuente de carbono. Se propagó el hongo en matraces con agar papa dextrosa durante siete días a 30 grados centígrados (°C), se inoculó el medio con 8.57×10^6 esporas/mL (mililitros) de medio líquido, se humedeció el soporte sólido con el medio inoculado hasta alcanzar un 70% de humedad, se homogenizó el material dentro del matraz y se incubó a 35 °C durante 12 horas (hrs).

Para obtener el extracto enzimático crudo (EEC) se agregó buffer de ácido acético-acetato de sodio (50 mM [milimolar o milimoles por litro], pH= 5.0 [potencial de hidrógeno]), se homogenizó y se

CUADRO 1. EFECTO DE DIFERENTES ADITIVOS SOBRE LA ACTIVIDAD TANASA DE *A. NIGER* GHI

ADITIVO	CONC.	% A.R.	ADITIVO	CONC.	% A.R.
Control	-	100.00	ZnCl ₂	20 mM	87.75
Acetona	60 % (v/v)	0.00	MgSO ₄	20 mM	78.44
Heptano	60 % (v/v)	196.74	CuSO ₄	20 mM	86.49
Etanol	60 % (v/v)	0.00	FeCl ₃	20 mM	52.32
Éter	60 % (v/v)	173.90	CaCl ₂	20 mM	95.48
Tetrahidrofurano	60 % (v/v)	0.00	MnCl ₂	20 mM	78.24
Tween 80	0.1 % (v/v)	125.41	CoCl ₂	20 mM	116.85
Tween 20	0.1 % (v/v)	101.25	HQ	1 mM	99.27
Triton X-100	0.1 % (v/v)	107.13	PMSP	1 mM	82.35
SDS	0.1 % (v/v)	100.39	ME	1 mM	106.59
EDT	0.1 % (v/v)	80.92	o-F	1 mM	105.24

Abreviaturas utilizadas: actividad residual (AR), dodecil sulfato de sodio (SDS), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), hidroxiquinona (HQ), fenil-metil sulfonil-fluoruro (PMSP), mercaptoetanol (ME), ofenantrolina (O-F).

exprimió el líquido con ayuda de una jeringa de plástico de 60 mL.

Concentración y purificación de la TAH (siglas de tanin acil hidrolasa, nombre técnico de la enzima tanasa). El EEC fue sometido a un proceso de purificación parcial, mediante un protocolo basado en las cuatro operaciones utilizadas por Cruz-Hernández y col. (6): 1. Se dializó el extracto contra buffer de ácido acético-acetato de sodio 50 mM, pH = 5.0 durante 48 horas, con agitación a 4 °C en una membrana de celulosa (SIGMA) para 12 kDa. 2. Se concentró la enzima por el método del polietilenglicol (PEG-6000); en la misma membrana de diálisis se cubrió el extracto enzimático con el PEG-6000 y se dejó en refrigeración (4 °C) durante 48 horas, hasta que el volumen del líquido se redujo al 10 % de su valor original. 3. La muestra concentrada se sometió a una filtración en gel en una minicolumna Hi Trap™ G25 de 5 mL; se colocaron 1,5 mL de muestra y

se eluyó con 16.5 mL de buffer de ácido acético-acetato de sodio 50 mM (pH = 5.0) a un flujo de 1 mL/min (minutos), recuperando fracciones de 2 mL. 4. Por último, la fracción de la filtración en gel que presentó más actividad fue sometida a una cromatografía de intercambio iónico; a una mini columna Hi Trap™ DEAE-FF (contiene dietil-aminoetil-sefarosa) de 1 mL se aplicó 1 mL de muestra y se eluyó con un gradiente escalonado de NaCl (cloruro de sodio) 0 a 1.0 molar en buffer de acetato, recuperando fracciones de 1 mL. La fracción con mayor actividad fue utilizada como enzima parcialmente purificada para los estudios posteriores. Estudio de la inhibición de la TAH. Se estudió el efecto de diferentes aditivos (solventes orgánicos, surfactantes, quelantes, iones metálicos y otros potenciales inhibidores) sobre la actividad de la tanasa parcialmente purificada. Para el estudio del efecto de solventes orgánicos (acetona, heptano, etanol, éter de petróleo y tetrahidrofurano) sobre la

actividad tanasa; se preparó una mezcla de solvente y extracto enzimático (60/40, v/v [volumen/volumen]) y se incubó a 30 °C. Después de cinco minutos de incubación, se determinó la actividad tanasa por un método cromatográfico (7), y se expresó como % de actividad residual (% AR).

De similar manera se evaluó el efecto de surfactantes (Tween 80, Tween 20, Tritón X-100, SDS [dodecil sulfato de sodio]) y el agente quelante EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) a una concentración de 0.1 % (p/v [peso/volumen]) y de algunas sales inorgánicas (ZnCl₂, MgSO₄, CuSO₄, FeCl₃, CaCl₂, MnCl₂, CoCl₂) a la concentración de 20 mM. El efecto de otros inhibidores (hidroxiquinona, fenil-metil-sulfonil-fluoruro, mercaptoetanol y o-fenantrolina) sobre la TAH se estudió incubando 30 min a 30 °C la TAH con 1 mM de inhibidor. En todos los casos se prepararon controles usando buffer de ácido acé-

tico-acetato de sodio 50 mM (pH = 5.0), en lugar de las soluciones de inhibidor.

RESULTADOS

Se estudió la inhibición de la tanasa de *A. niger* GH1 con la finalidad de establecer su estabilidad ante sustancias que pueden entrar en contacto con ella durante su proceso de producción, extracción y purificación, así como para conocer algunos indicios sobre la estructura general de la enzima y del sitio activo (Cuadro 1). La tanasa de *A. niger* es completamente desnaturada por acetona, etanol y tetrahidrofurano, de manera similar a la TAH de *Penicillium variable* (8), por lo cual no se recomienda el uso de estos solventes para la concentración de la enzima. El heptano y el éter de petróleo aparentemente aumentan la actividad tanasa, pero esto puede ser un efecto de la evaporación del solvente y la consecuente concentración de proteína. La tanasa estu-

diada resultó ser altamente estable en la presencia de surfactantes comparada con otras tanasas caracterizadas (8-10). Estos compuestos pueden ser utilizados como aditivos durante la extracción de la enzima. El agente quelante EDTA inhibió considerablemente la actividad, sugiriendo la necesidad de algún ion metálico necesario para la expresión de la actividad catalítica de la enzima. La tanasa de *A. niger* fue inhibida fuertemente por el ion Fe⁺³ [férrico] (11, 12) como previamente ha sido publicado, pero fue incrementada ligeramente por el ión Co⁺² [cobalto]. Por último, la fuerte inhibición por el PMSF sugiere la presencia de un residuo de serina indispensable para la acción de la enzima, como en otras tanasas previamente caracterizadas (8, 12).

CONCLUSIONES

Los estudios sobre la inhibición de la tanasa de *A. niger* GH1 sugieren la pre-

sencia de un residuo serina en el sitio activo y el requerimiento de un cofactor metálico, probablemente Co⁺². La estabilidad de esta enzima ante solventes orgánicos y sales inorgánicas es, en general, tan alta como otras tanasas caracterizadas. Además por su alta actividad en presencia de agentes surfactantes, se puede concluir que la estabilidad química de la tanasa de *A. niger* GH1 la hacen una enzima con potencial comercial.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Investigación en Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila por las facilidades proporcionadas para la realización de parte del trabajo experimental y a la Academia Mexicana de Ciencias por el financiamiento de una estancia de investigación dentro del programa "Verano de la Investigación Científica" en la convocatoria 2007. ||

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar, C.N., Rodríguez, R., Gutiérrez-Sánchez, G., Augur, C., Favela-Torres, E., Prado-Barragán, et al. (2007). Microbial tannases: advances and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76 (1): 47 - 59.
2. Lekha, P.K. & Lonsane, B.K. (1997). Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Advances in Applied Microbiology* 44: 215 - 260.
3. Belmares, R., Contreras-Esquível, J.C., Rodríguez-Herrera, R., Ramírez-Coronel, A. & Aguilar, C.N. (2004). Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 37 (8): 857 - 864.
4. Aguilar, C.N. & Gutiérrez-Sánchez, G. (2001). Review: sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. *Food Science and Technology International* 7 (5): 373 - 382.
5. Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C.N., Romero-Gómez, S.J., & Díaz-Godínez, G. & Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal* 13 (2 - 3): 157 - 167.
6. Cruz-Hernández. (2004). Producción y purificación parcial de la enzima tanasa de *Aspergillus niger* GH1. Tesis Magistral. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila, México.
7. Beverini, M. & Metche, M. (1990). Identification, purification, physicochemical properties of tannase from *Aspergillus oryzae*. *Science des Aliments* 10: 807 - 816.
8. Sharma, S., Agarwal, L. & Saxena, R.K. (2008). Purification, immobilization and characterization of tannase from *Penicillium variable*. *Bioresource Technology* 99 (7): 2544 - 2551.
9. Kasieczka-Burnecka, M., Kuc, K., Kalinowska, H., Knap, M. & Turkiewicz, M. (2007). Purification and characterization of two cold-adapted extracellular tannin acyl hydrolases from an antarctic strain *Verticillium* sp. Pg. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77 (1): 77 - 89.
10. Naidu, R.B., Saisubramanian, N., Selvakumar, D., Janardhanan, S. & Puvanakrishnan, R. (2008). Partial purification of tannase from *Aspergillus foetidus* by aqueous two phase extraction and its characterization. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* 2 (1): 201 - 207.
11. Barthelemy, C., Régerat, F. & Pourrat, H. (1994). Production, purification and characterization of a tannase from *Aspergillus niger* LCF 8. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 77 (3): 320 - 323.
12. Kar, B., Banerjee, R. & Bhattacharyya, B.C. (2003). Effect of additives on the behavioural properties of tannin acyl hydrolase. *Process Biochemistry* 38 (9): 1285 - 1293.