

PURIFICACIÓN PARCIAL DE TANASA PRODUCIDA POR *Apergillus niger* EN FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

Elvia Inés García Peña, Ernesto Favela Torres, Christopher Augur*
*Departamento de Biotecnología, CBS, Universidad Autónoma
Metropolitana-Iztapalapa, México y *ORSTOM, Francia*

RESUMEN

La tanasa es una enzima inducible (Doi y col., 1973; Beverini y Metche, 1990), cuya producción con especies fúngicas ha sido ampliamente estudiada en medio líquido (FmL) (Iibuchi y col., 1967; Pourrat y col., 1982). En fermentación en medio sólido (FMS) la enzima es extracelular (Lekha y Lonsane, 1994; Chaterije y col., 1996). Durante el presente estudio se confirmó esto último, obteniendo la mayor actividad enzimática de la cepa N888 de *A. niger* con 10% de ácido tánico en FMS. Posteriormente, la enzima fue purificada parcialmente y caracterizada usando dos etapas de electroenfoque y métodos cromatográficos convencionales. Después de cuatro etapas se obtuvo un factor de purificación de 60 y un porcentaje de recuperación de 15.5. La temperatura óptima de actividad de la enzima fue de 70°C y un pH óptimo de 6.0. Aparentemente, la enzima está compuesta por dos subunidades de pesos moleculares de aproximadamente 80-85 kDa y tiene un pI alrededor de 3.8.

INTRODUCCIÓN

La tanasa (tannin acyl hydrolase E.C. 3.1.1.20) es una enzima capaz de hidrolizar los enlaces éster del ácido tánico produciendo nueve moléculas de ácido gálico y una de glucosa (Yamada y col., 1968). Los extractos con actividad tanasa son actualmente usados en la industria alimenticia para remover taninos responsables de efectos no deseables en el procesamiento de alimentos, tales como, la turbidez del té instantáneo o de los jugos de frutas. La tanasa tiene posibles aplicaciones en la industria del vino, durante el proceso de fermentación y también podría ser usada para disminuir los taninos presentes en forrajes, ya que estos últimos tienen efectos antinutricionales. En la industria farmacéutica es útil para la producción de trime-tropin, producto que se obtiene en base a ácido gálico. En México se usan volúmenes relativamente grandes de ácido gálico, importado de Asia que no es de muy buena calidad.

Actualmente, todos los extractos de tanasa se producen en FmL, donde la principal desventaja es que la enzima se encuentra fuertemente asociada al micelio

Fonds Documentaire ORSTOM



010020390

Fonds Documentaire ORSTOM

Cote: Bx 20390 Ex: 1

del microorganismo, lo cual obliga a desarrollar algunos métodos de aislamiento de elevados costos económicos. Esto encarece mucho el proceso de producción, por lo cual no se han podido explotar comercialmente todos los usos potenciales de la enzima. La FMS puede ser una alternativa, ya que se ha demostrado que en este sistema de fermentación la tanasa es completamente extracelular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo

Se usó la cepa N888 de *Aspergillus niger*, cuya característica principal es la de crecer hasta en 20% de ácido tánico.

Esta cepa donada por el Laboratorio de Biología Molecular y Genética, Universidad de Landbouw, Wageningen, Holanda, fue obtenida y utilizada para estudiar y mejorar su característica de usar el ácido tánico como sustrato. Bos y col. (1989) obtienen las cepas N888, N920 y T_{2A} de *A. niger*, a partir de la cepa N402, una mutante con conidiosporas cortas. Las cepas y su genotipo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 Cepa original, cepas mutantes y cepa transformante de <i>A. niger</i> capaces de crecer en presencia de ácido tánico	
Cepa	Genotipo*
N402	cspA 1
N888	csp A1, fwn A1, pyr A5, phe A1, tan X
N920	csp A1, fwn A1, pyr A5, phe A1, tan X
T _{2A} (cepa transformante)	csp A1, fwn A1, pyr A5, phe A1, tan X

* La definición de las abreviaturas es la siguiente: cspA1 mutantes de conidiosporas cortas, fwnA1 coloración café de las conidiosporas, pyrA5 auxotrofia a uridina, pheA1 auxotrofia a fenilalanina, tanX capacidad de crecer en altas concentraciones de ácido tánico.

Conservación

La cepa fue conservada en matraces de 250 ml con el medio de propagación a 4°C y sembradas cada 15 días. Por otro lado, se conservó una suspensión de esporas en glicerol 40% a -70°C, durante periodos más largos.

Medios de cultivo

Se utilizaron dos tipos de medios de cultivo, el de propagación de la cepa y el de producción de la tanasa. El medio de propagación estaba constituido por (g/l): NaNO₃ 6,0; Sacarosa 3,0; KH₂PO₄ 1,5; MgSO₄.7H₂O 0,5; KCl 0,5; FeSO₄.7H₂O

0.001; $MnCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.001; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.001; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001; Agar 15; Peptona de caseína 1.0; Extracto de levadura 1.0; Solución de vitaminas (2ml/l de medio); Fenilalanina 0.1 ml/l; Uridina 0.1 ml/l. El medio de producción por (g/l): NH_4NO_3 2.0; Glucosa 0.05; Ácido tánico 10.0; KH_2PO_4 1.0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0025; $MnCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.004; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.02; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.002 y peptona de caseína, extracto de levadura, solución de vitaminas, fenilalanina, uridina en las mismas proporciones que en el medio de propagación.

Solución de vitaminas. La solución de vitaminas contenía los siguientes compuestos (g/l): tiamina 0.1, rivo flavina 1.25, PABA 0.1, nicotinamida 1.0, piridoxina 0.5, biotina 0.002, ácido pantoténico 0.1. En cuanto a las soluciones de factores de crecimiento, las concentraciones utilizadas fueron: fenilalanina 0.2 g/l y uridina 0.25 g/l. Tanto la solución de vitaminas como las soluciones de aminoácidos fueron previamente esterilizadas, mediante filtración en membrana de 0.2 micras.

En ambos medios de cultivo el pH se ajustó a 5.8, con NaOH 1M y se esterilizaron a 15 lb/pulg², durante 15 min. Una vez que el medio estaba estéril y a temperatura ambiente, se agregaron las soluciones de vitaminas, fenilalanina y uridina.

Antes de iniciar la purificación se incrementó la actividad enzimática, modificando el medio de cultivo para la producción enzimática, como se observa en la Tabla 2.

	Control (g/l)	2 C (g/l)	5 C (g/l)	10 C (g/l)
KH_2PO_4	1.0	2.0	5.0	10.0
NH_4NO_3	2.0	4.0	10.0	20.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	0.4	1.0	2.0
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.02	0.04	0.1	0.2
$MnCl_2 \cdot 6H_2O$	0.004	0.008	0.02	0.04
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.002	0.004	0.01	0.02
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.0025	0.005	0.125	0.025
Ácido tánico	20*	40*	100*	200*
Glucosa	5.0	10.0	25.0	50.0
Peptona de caseína	1.0	1	1	1
Extracto de levadura	1.0	1	1	1
Solución de vitaminas	2*	2*	2*	2*
Fenilalanina	1**	1**	1**	1**
Uridina	1**	1**	1**	1**

Nota: C corresponde al medio usado como control, * equivale a un porcentaje de 2, 4, 10 y 20 % de ácido tánico, respectivamente, * se usaron 2 ml/l de medio de cultivo, ** 1ml/100 ml de medio.

Producción

Producción del inóculo

Matraces de 125 ml con 30 ml de medio de cultivo para propagación, fueron inoculados con el microorganismo e incubados durante cinco días a 30°C. Posteriormente, las esporas fueron suspendidas, utilizando una solución 0.05% de Tween 80.

Fermentación

La fermentación en medio sólido (FMS) se realizó usando como soporte inerte, bagazo de caña, el cual fue lavado, secado y tamizado en mallas 20 y 30 (tamaño de partícula de 0.59 mm). El bagazo de caña tratado fue esterilizado a 1.2 kg/cm² con 10 ml de solución de ácido tánico durante 15 minutos y posteriormente mezclado con 150 ml de medio de cultivo de producción, con el volumen restante de solución de ácido tánico y con la suspensión de esporas, obteniendo una humedad inicial de 70% y una concentración de inóculo de 2×10^7 esporas/g de bagazo de caña seco.

Columnas de vidrio (19 x 2.3 cm) fueron llenadas con el bagazo inoculado a una densidad de empaque de 0.2 g/cm³. Las columnas se incubaron a 30°C en un baño con temperatura controlada y se les inyectó aire saturado de agua por medio de un burbujeador a un flujo de 0.2 cm³/min. Para las cinéticas se tomaron muestras cada 24 horas, durante 96 horas de fermentación.

Obtención del extracto

El bagazo de caña fermentado se desempacó, obteniéndose en total 11 g por columna. A 10 gramos de éste se les agregaron 10 ml de agua destilada (1:1), prensándolos a 142.86 kg/cm² para obtener el extracto (Solis-Pereira y col., 1993) y un gramo fue separado para determinar humedad por diferencia de peso en cada una de las muestras, también se determinó el pH. Las muestras fueron almacenadas a 4°C, para posteriormente determinarles actividad enzimática.

Técnicas analíticas

Actividad enzimática

La actividad enzimática se desarrolló de acuerdo al método reportado por Beverini y Metche (1990). Se agregaron 50 µl de extracto enzimático a tubos de ensaye con 1 ml de solución de ácido tánico 0.51 g/l (p/v) en solución amortiguadora de acetatos 0.1M pH 5.0. Los tubos fueron incubados en un baño con temperatura controlada a 30°C, durante 30 minutos. Para detener la reacción enzimática se utilizaron 200 µl de solución de HCl 2 N.

Para el análisis de ácido gálico producido por reacción enzimática se utilizó un equipo de HPLC (*Thermo Separation Products*) con las características que se enlistan a continuación: bombas *Constametric 3200* y *3500* (*Thermo Separation Products*), integrador *Lctalk HPLC Software*. Se usó una columna *Spherisorb ODS2 5µl* y como fase móvil metanol-ácido fórmico 1% (v/v) en relación 5:95 a una velocidad de flujo 2 ml/min. La detección se realizó a 280 nm en detector *Spectromonitor 5000* (*Thermo Separation Products*). Se realizó la curva de referencia, la cual nos permitió relacionar el área resultante de gálico con la concentración de este ácido. La unidad de actividad enzimática se definió como los mmoles de ácido gálico producidos/ml min, bajo las condiciones de análisis.

Purificación

Tratamiento del extracto enzimático crudo

El extracto enzimático obtenido después de 120 horas de fermentación en medio sólido (con 10% de ácido tánico) fue centrifugado a 7000 rpm, durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, fue filtrado en membrana de 0.45 micras y dializado en agua desionizada para realizar el electroenfoque.

Electroenfoque

El extracto enzimático crudo (40 ml) dializado se diluyó hasta 50 ml con agua destilada y fue usado para realizar un electroenfoque en un Rotofor de cámara cilíndrica (*BioRad*) con una capacidad máxima de 50 ml. Dicha cámara se encuentra dividida por membranas de intercambio iónico en 20 compartimientos.

Se adicionaron Anfólitos (moléculas cargadas) en un rango de pH entre tres y nueve (*Biolyte 3/9*, *BioRad*) a la solución enzimática en relación 1% (v/v). La cámara del Rotofor fue estabilizada a temperatura de -5°C con ayuda de un sistema refrigerante, llevando a cabo un electroenfoque a 15W de potencia constante, durante cuatro horas, usando una fuente de poder modelo 3000 X (*Power Pac*, *BioRad*). Una vez finalizado el electroenfoque, el contenido de la cámara fue colectado en 20 fracciones de 2.5 ml, utilizando una bomba de vacío.

Se midió el pH en cada fracción, inmediatamente después del análisis y, posteriormente, las fracciones fueron almacenadas a 4°C para determinarles actividad enzimática por el método de HPLC, proteína por el método de Bradford (1976) y electroforesis. Las fracciones que mostraron actividad enzimática después del primer electroenfoque fueron mezcladas (10 ml) y diluidas a un volumen final de 50 ml para realizar un nuevo electroenfoque en el Rotofor, sin adición de anfólitos, en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Después de cuatro horas se volvieron a colectar 20 fracciones con un volumen de 2.5 ml, midiéndoles nuevamente el pH, la actividad enzimática y la proteína.

Técnicas cromatográficas

Todos los análisis cromatográficos fueron realizados en equipo de FPLC, cromatografía líquida de baja presión, *Biologic Work Station (BioRad)*, con colector de fracciones *BioRad*, modelo 2128. La detección de la proteína eluida se llevó a cabo en línea con un detector (*BioRad*), mediante celda UV a 280 nm.

Cromatografía de intercambio aniónico

Las fracciones que mostraron actividad enzimática después de los electroenfoques se usaron para realizar una cromatografía de intercambio aniónico, en columna BioQ (*BioRad*) aplicando un gradiente de NaCl entre 0 y 0.3 M, con un flujo de 0.5ml/min y colección de fracciones cada minuto. Posteriormente, la actividad enzimática fue evaluada en cada una de las fracciones obtenidas.

Cromatografía de filtración en gel o tamizaje molecular

Este tipo de cromatografía se llevó a cabo también en el FPLC. El extracto enzimático con actividad tanasa obtenido en la anterior etapa fue concentrado tres veces por ultrafiltración en membranas Filtron 10K e inyectado en columna Superdex 75 (*Pharmacia Biotech*) de 60 x 2.6 cm, con un rango de separación entre tres y 70 kdaltons, la cual fue estabilizada con la fase móvil antes de realizar la inyección. La fase móvil fue una solución amortiguadora de acetatos 0.1M pH 5.5. Se aplicó un flujo isocrático de 1 ml/min, tomando fracciones cada minuto. Al igual que en todos los casos se obtuvo una gráfica del perfil de elusión de proteínas a una absorbancia de 280 nm y se determinó actividad enzimática en cada una de las fracciones. Las fracciones con actividad tanasa se usaron para realizar un gel de electroforesis.

Caracterización

Temperatura óptima

La temperatura óptima de la enzima se evaluó desarrollando la actividad enzimática a 30, 40, 50, 60, 70 y 80°C, según la técnica descrita previamente.

pH óptimo

Para determinar el pH óptimo de la enzima se desarrolló la actividad enzimática en un rango de pH entre dos y nueve. Se usaron las siguientes soluciones amortiguadoras: solución amortiguadora de citrato 0.5 M en un rango de pH entre tres y seis, solución amortiguadora de acetatos 0.1 M en un rango entre cinco y siete y solución amortiguadora de fosfatos en un rango de pH entre siete y nueve.

Electroforesis

Se corrieron geles unidimensionales bajo condiciones desnaturalizantes, 0.1% de SDS. Se usaron geles de 0.75 mm x 14 cm x 14 cm, a una concentración final de poliacrilamida de 12.5 %, de acuerdo a la técnica reportada por Laemmli (1970).

RESULTADOS

Incremento de la actividad enzimática

Los resultados obtenidos con cada uno de los medios evaluados se muestran en la Figura 1.

A medida que se incrementó la concentración de ácido tánico como sustrato la actividad enzimática se fue incrementando. Usando 2% del ácido se pudo observar un pequeño aumento y la producción de la enzima se inició a las 24 horas de fermentación a diferencia de lo obtenido con 1% de ácido tánico donde la actividad enzimática se detectó a partir de las 48 horas de fermentación. Con 4% de sustrato e incrementando la concentración de los componentes del medio al doble, la actividad enzimática aumentó nuevamente en todos los puntos, alcanzando un valor de aproximadamente tres veces en relación con los resultados obtenidos con 1% de ácido tánico. Para los dos últimos niveles de ácido tánico mencionados, es decir, 2

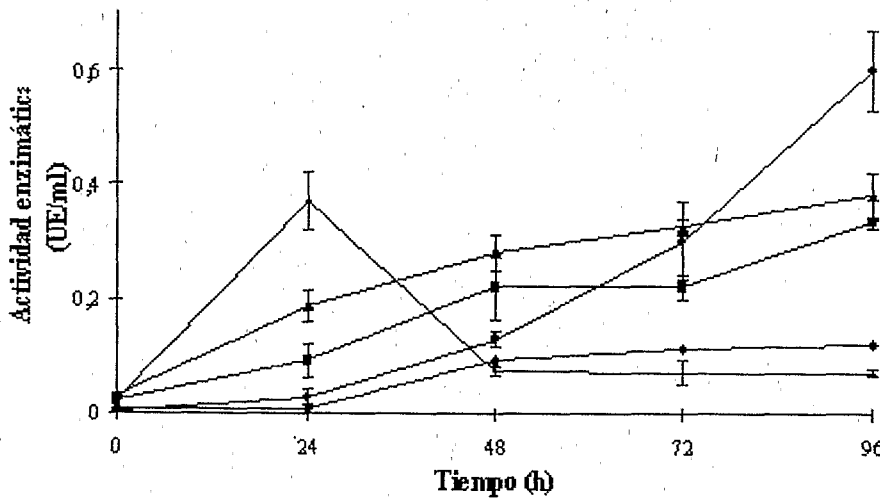


Figura 1. Efecto del incremento del ácido tánico sobre la actividad tanasa. Las concentraciones de ácido tánico usadas fueron: 1% (◆), 2% (■), 4% (▲), 10% (●), 20% (+).

y 4% los perfiles de actividad enzimática fueron similares, la producción de la enzima se inició a las 12 horas de fermentación y fue prácticamente constante a partir de las 48 horas de fermentación. Para 10% de ácido tánico y los componentes del medio incrementados cinco veces, la actividad enzimática se inició más tarde, a las 48 horas de fermentación y mostró una curva ascendente con un máximo a las 96 horas de fermentación (0.64 UE/ml), el cual fue cinco veces mayor que el obtenido usando 1% de ácido tánico (0.12 UE/ml). Contrariamente a la tendencia del incremento de la actividad enzimática observada con los anteriores niveles de ácido tánico, al usar 20% del mismo y los componentes del medio incrementados 10 veces, no se detectó mayor actividad enzimática, ya que se alcanzó un máximo a las 24 horas de fermentación y después la actividad enzimática decayó rápidamente a niveles menores a los obtenidos con 1% de ácido tánico. Probablemente la concentración tan alta de todos los componentes del medio resultó tóxica para el microorganismo o bien la actividad enzimática se vió afectada por el importante descenso de pH que se observó después de las 24 horas de fermentación, cuando se usó esa concentración tan alta de ácido tánico y de los demás componentes del medio.

Electroenfoque

La Figura 2, muestra los resultados obtenidos durante el primer electroenfoque. Se estableció un gradiente lineal de pH entre 2.4 y 10.2. La actividad enzimática se concentró en las cuatro primeras fracciones cercanas al cátodo del Rotofor en un rango de pH entre 2 y 4, con un máximo (1.25 UE/ml) en la tercera fracción en un valor de pH de 3.8. Esto sugiere que el pI de la tanasa se encuentra alrededor de este valor de pH. La actividad enzimática no se detectó en una sola fracción debido a que al extraer las proteínas separadas durante el análisis algunas de ellas difunden.

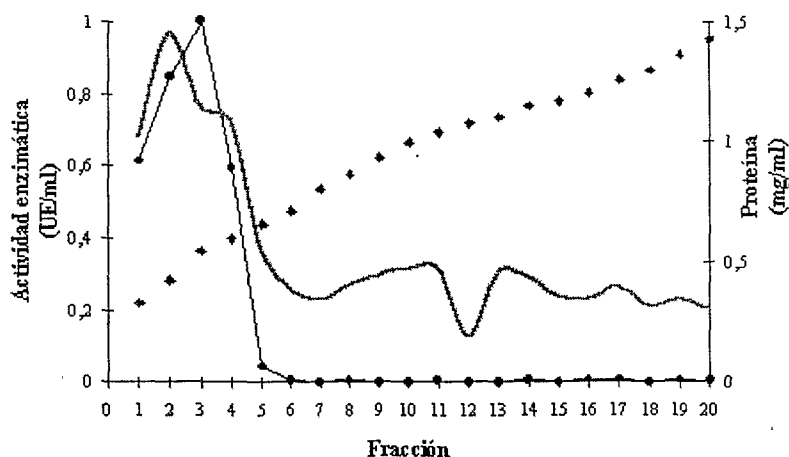


Figura 2. Perfil de actividad enzimática (●), proteína (-) y gradiente de pH (◆), las fracciones resultantes del primer electroenfoque.

Segundo electroenfoque

Las fracciones de la 2 a la 4 con actividad tanasa se mezclaron, obteniendo un volumen final de 10 ml con una actividad enzimática de 1.25 UE/ml. Con dicha mezcla se realizó un nuevo electroenfoque, en las mismas condiciones que el primero pero sin la adición de anfolitas. Durante este análisis, el gradiente que se estableció con las anfolitas no fue completamente lineal, mostró valores casi constantes entre pH 4 y 5. Sin embargo, se inició en un valor de pH 2 y se alcanzó un pH de 9 en las últimas fracciones. Esto se debió a que en estas fracciones existían solamente anfolitas en un rango de pH entre dos y cinco ya que no se añadieron más anfolitas. Durante esta etapa se buscaba hacer un refraccionamiento de proteínas en un rango de pH más pequeño.

La actividad enzimática se detectó nuevamente en un rango de pH entre dos y cuatro, en las cuatro primeras fracciones, observando un máximo en la segunda fracción (1.27 UE/ml), en este punto el valor de pH fue de 3.78, lo cual coincide con lo obtenido en el primer electroenfoque. De la misma forma las proteínas, se concentraron en estas cuatro fracciones.

Cromatografía de intercambio aniónico

En la Figura 4, se observa el perfil de elusión de proteínas, determinadas espectrofotométricamente a 280 nm y la actividad enzimática.

Se obtuvieron cuatro picos de proteína a lo largo del gradiente entre 0 y 0.3M de NaCl y un pico eluido con 1M de NaCl, usando un flujo de 0.5 ml/min. La

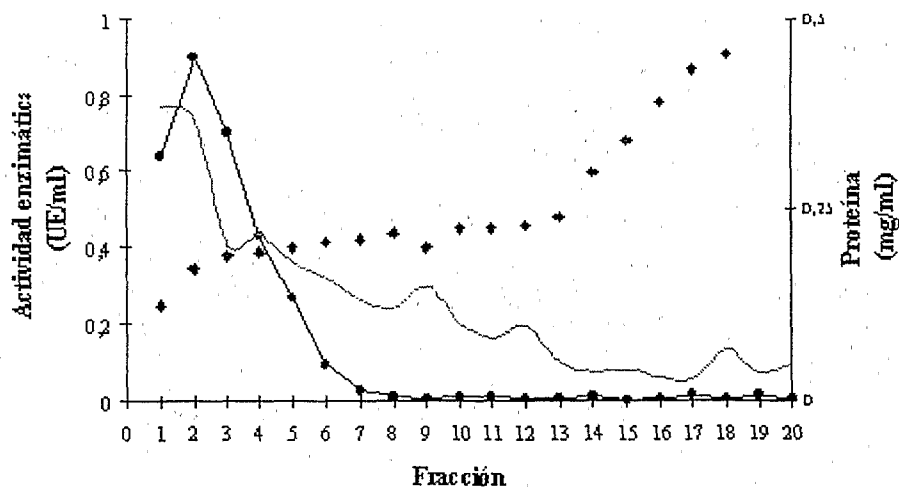


Figura 3. Perfil de actividad enzimática (●), proteína (—) y gradiente de pH (◆), en las fracciones resultantes del segundo electroenfoque.

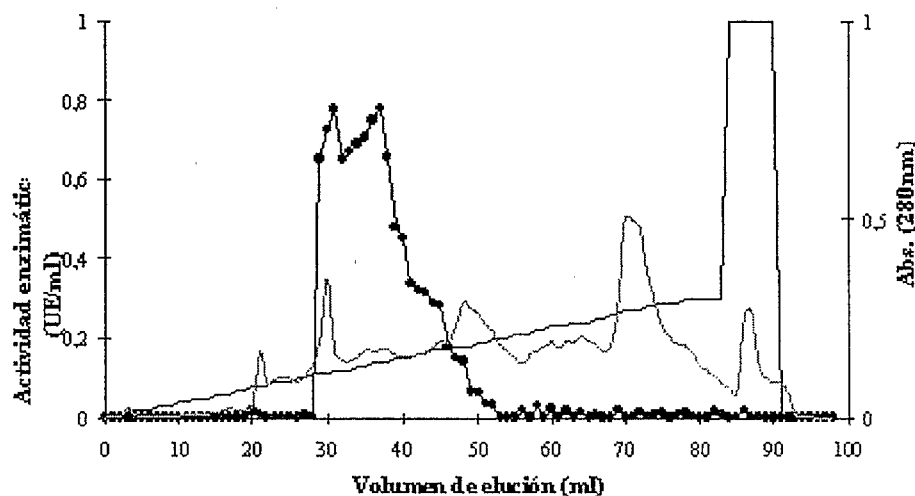


Figura 4. Perfil de actividad enzimática (●), proteína (-) y gradiente de NaCl, en las fracciones obtenidas columna de intercambio aniónico BioQ. Se observa el gradiente entre 0-0.3 M de NaCl desde el inicio del análisis hasta los 83 minutos y después se aplicó un flujo isocrático de 1M de NaCl de los 85 hasta los 90 minutos del análisis.

actividad enzimática se encontró en 10 fracciones de 0.5 ml en el segundo y tercer pico de elución, con máximos (1.3 UE/ml) que eluyeron a una concentración de 0.12 y 0.13 M de NaCl, respectivamente.

Las fracciones con actividad enzimática fueron usadas para realizar un gel de electroforesis con 12.5% de poliacrilamida, observando aproximadamente cinco bandas proteicas en las fracciones de la 29 a la 38 y un mayor número de bandas en las fracciones posteriores a esta última, lo cual se debió probablemente a que los picos donde se detectó actividad enzimática no están perfectamente separados. Las nueve fracciones que mostraron actividad tanasa durante esta etapa, fueron mezcladas y utilizadas para continuar la purificación.

Cromatografía de permeación en gel o tamizaje molecular

Las fracciones con actividad enzimática resultantes de la anterior etapa, se concentraron tres veces y fueron inyectadas en columna de tamizaje molecular, obteniendo tres picos de proteína (Figura 5) determinada a 280 nm, siendo únicamente el primero el que presentó actividad enzimática.

El hecho de que la actividad enzimática se encontrara en un único pico simétrico, sugería la posible pureza de la enzima.

La Tabla 3 resume los resultados durante las etapas de purificación. La purificación se inició con una concentración de proteína de 0.76 mg/ml. Durante el primer electroenfoque la pérdida de proteína no fue tan grande como la que se tuvo durante el segundo electroenfoque, donde se perdió casi 50% de proteína

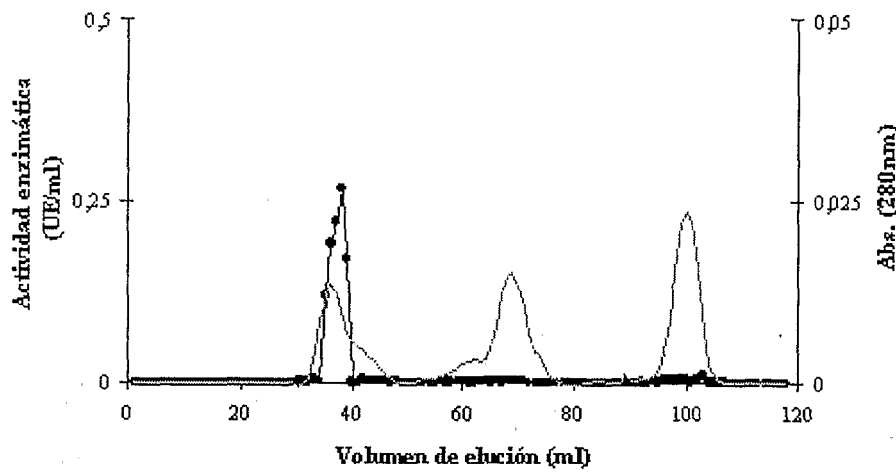


Figura 5. Perfil de actividad enzimática (●), proteína (-) a 280 nm. La elución se llevó a cabo aplicando un flujo isocrático de solución amortiguadora de acetatos 0.1 M, pH 5.5.

presente en el extracto, sin embargo, la actividad enzimática específica se duplicó obteniendo un factor de purificación de 4.8.

Los porcentajes de recuperación durante estas etapas de electroenfoque (40.3% y 40.9%) fueron mayores a los reportados (Yamada y col., 1968; Rajakumar y Nandy, 1983; Barthomeuf y col., 1994b). Los extractos obtenidos después del electroenfoque fueron dializados en solución amortiguadora de acetatos 0.1M pH 5.5, con el fin de eliminar las anfóliticas, ya que se demostró que estas causaban interferencia en la determinación de la actividad enzimática. Por otra parte, con la diálisis también se logró llevar el extracto al pH adecuado para cuantificar la actividad enzimática, ya que éste se encontraba en un rango de pH entre 2.8 y 4.

Tabla 3
Etapas de purificación de la tanasa producida por *Aspergillus niger* en FMS

Etapas de purificación	Volumen (ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad total (U)	Recuperación (%)	Actividad específica (U/mg p.)	Factor de purificación
EE crudo	50	0.76	0.62	31.00	100.00	0.81	1
EE dializado	51	0.74	0.82	41.81	100.00	1.10	
M1 electroenfoque	10	0.69	1.25	12.50	40.32	1.84	2.2
M2 electroenfoque	10	0.37	1.27	12.70	40.96	3.43	4.3
M3 intercambio aniónico	10	0.33	1.30	13.00	41.93	3.92	4.8
Tamizaje molecular	5	0.02	0.97	4.80	15.50	48.50	59.9

EE= Extracto enzimático.

M= Mezcla de fracciones con actividad enzimática después de cada etapa de purificación.

Después de la tercera etapa de purificación, la actividad específica se incrementó en menor proporción, obteniendo un valor de 3.92 UE/mg proteína. El incremento más importante de la actividad enzimática específica se obtuvo después de la última etapa de purificación, ya que ésta alcanzó un incremento de 12 veces, con un factor de purificación de 59.9 y un porcentaje de recuperación de 15.5. Tanto el porcentaje de recuperación como el factor de recuperación son buenos comparados con los que se encontró en la literatura (Yamada y col., 1968; Rajakumar y Nandy, 1983; Barthomeuf y col., 1994b).

Caracterización

Determinación del peso molecular

Para determinar el peso molecular de la enzima se realizó un gel de electroforesis SDS, con 12.5% de poliacrilamida, según la técnica reportada por Laemmli en 1970.

Efecto de la temperatura

Al evaluar la actividad enzimática en un rango de temperatura entre 30 y 80°C, se encontró la actividad enzimática máxima a 70°C (Figura 6).

La temperatura óptima para la enzima obtenida en este trabajo fue diferente a la reportada por Lekha y Lonsane en 1994, para la tanasa producida por *A. niger*

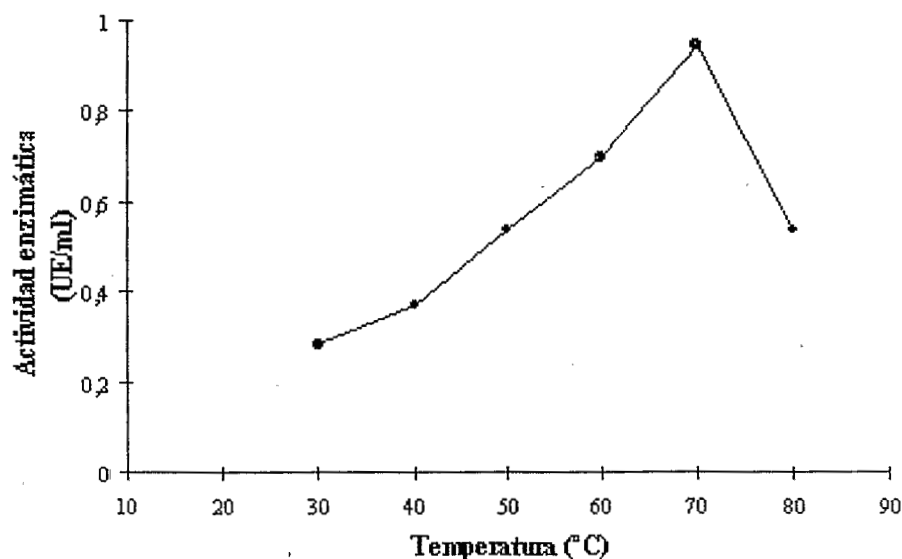


Figura 6. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la tanasa.

en fermentación en medio sólido (FMS). Ellos encontraron una temperatura óptima de 60°C y a temperaturas superiores a ésta, la actividad enzimática comenzaba a decrecer rápidamente, contrariamente a lo observado en el presente estudio ya que la actividad decrece después de los 70°C. En cuanto a la tanasa producida en fermentación en medio líquido (FML), las temperaturas óptimas para la acción de la enzima, reportadas por distintos autores muestran grandes diferencias. Para la tanasa de *A. flavus* obtuvieron la actividad enzimática máxima entre los 50 y 60°C, después de los 60°C la actividad enzimática decrecía rápidamente (Yamada y col., 1994). Bartheuf y col. (1994 b), determinaron una temperatura óptima de acción de la tanasa producida por *A. niger* de 35°C, lo cual difiere ampliamente con el primer trabajo mencionado. Por otro lado, para la tanasa producida por otro tipo de microorganismos, *Cándida sp* K-1, mostró tener una temperatura óptima de actividad de 50°C.

En lo que se refiere a la estabilidad de la enzima para la tanasa producida en FmL, la mayoría de los autores reportan que la enzima es estable en un rango de temperatura entre 20 y 45°C, mientras que la enzima producida en FMS mostró ser estable en un rango entre 20 y 60°C (Lekha y Lonsane, 1994). La diferencia en la estabilidad de la tanasa obtenida en FMS comparada a la producida en FmL, podría deberse a que la enzima producida en FMS es completamente extracelular, ya que se ha reportado que la adición de carbohidratos a la molécula de proteína, durante el proceso de excreción de enzimas extracelulares a través de la pared celular, le confiere estabilidad a la estructura proteica y por tanto a su sitio catalítico (Bull, 1972). Además las modificaciones estructurales durante la excreción han mostrado proveer una barrera protectora contra la acción de varios agentes desnaturizantes (Strumeyer y Malin, 1970).

Efecto del pH

El efecto del pH sobre la actividad se observa en la Figura 7. La enzima mostró tener un pH óptimo de acción de 6.0. Este resultado coincide con el trabajo realizado por Lekha y Lonsane (1994), ya que ellos reportan un pH óptimo de acción de la enzima de 5.5 para tanasa producida en FMS. El pH óptimo de actividad para la tanasa obtenida en FmL con *A. flavus* fue reportado en un rango de pH entre 5.0 y 5.5 (Yamada y col., 1968). Bartheuf y col. (1994b), obtienen un pH óptimo de acción enzimática de 5.0 cuando se usa como sustrato metil galato y un pH de 6.0 cuando desarrollaron la reacción enzimática con ácido tánico. El pH óptimo reportado para la tanasa de *Cándida sp* K-1 fue de 6.0 (Aoki y col., 1976).

También se encontró que existe un efecto de la solución amortiguadora que se usa para desarrollar la actividad enzimática, ya que al usar un amortiguador de citrato y un amortiguador de acetatos, en los mismos valores de pH, se obtuvo mayor actividad con el primero, debido probablemente a que establece condiciones más favorables para la actividad de la enzima, este efecto se puede observar en la Tabla 4.

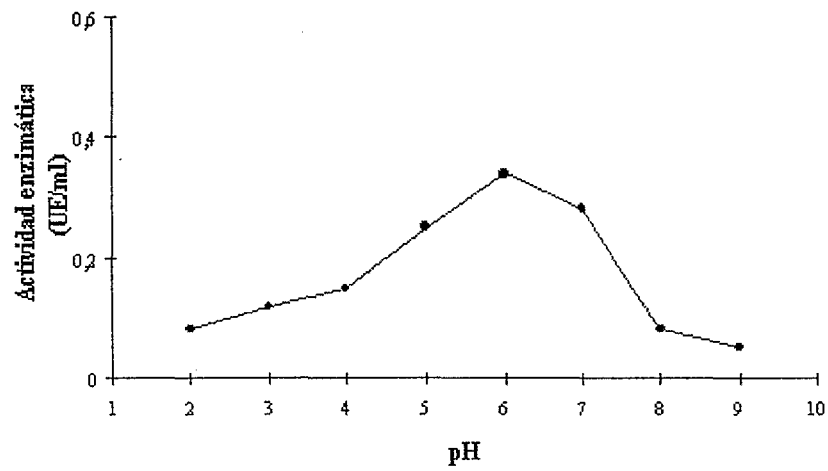


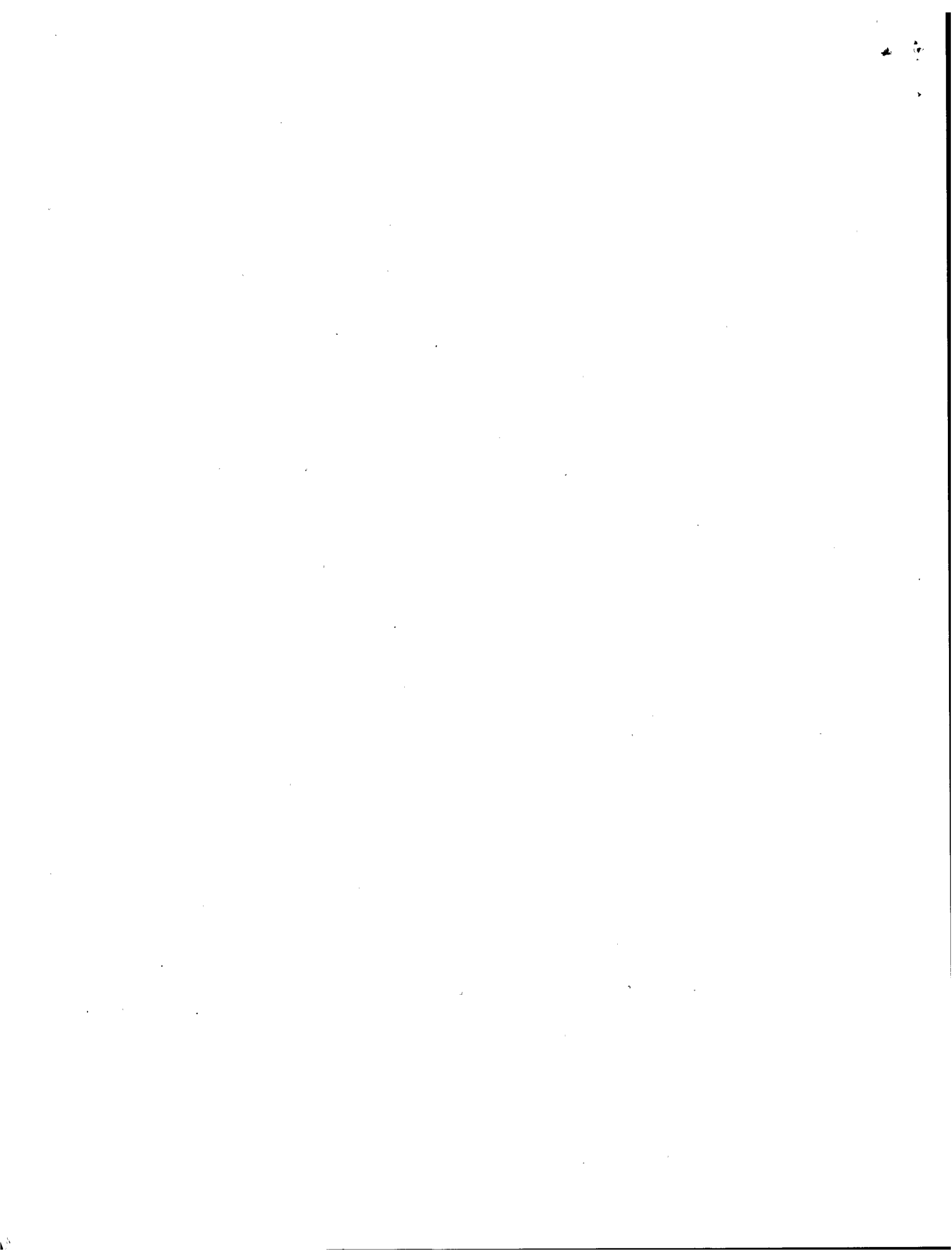
Figura 7. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la tanasa.

Tabla 4		
Efecto de la solución amortiguadora sobre la actividad enzimática (U)		
Valor de pH	Solución amortiguadora de citrato	Solución amortiguadora de acetatos
2	0.08	
3	0.12	
4	0.15	
5	0.25	0.2
6	0.34	0.287
7	0.29	0.043

BIBLIOGRAFÍA

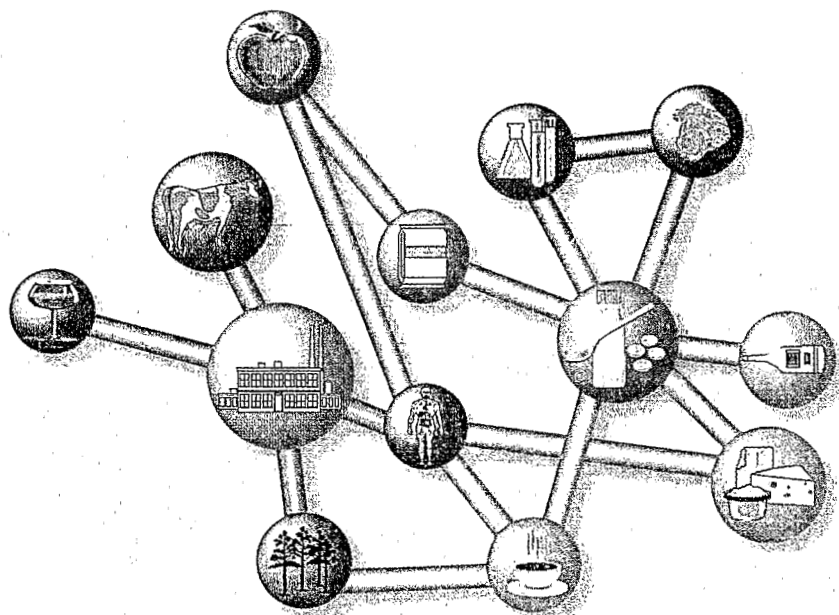
- Aoki K., R. Shinke y H. Nishira. 1976. "Purification and some properties of yeast tannase". *Agr. Biol. Chem.* **40**: 79-85.
- Barthomeuf Ch., F. Regerat y H. Pourrat. 1994a. "Improvement in tannase recovery using enzymatic disruption of micelium in combination with reverse mycellar enzyme extraction". *Biotechnol. Techn.* **8**: 137-142.
- Barthomeuf Ch., F. Regerat y H. Pourrat. 1994b. "Production and characterization of a tannase from *Aspergillus niger* LCF 8". *J. Ferm. Bioeng.* **77**: 320-323.
- Beverini, M. y M. Metche. 1990. "Identification, purification and physicochemical properties of tannase of *Aspergillus oryzae*". *Sciences des Aliments.* **10**: 808-816.
- Bradford, M. 1976. "A rapid and sensitive method for the cuantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dande binding". *Anal. Biochem.* **72**: 28-254.
- Chaterjee R., A. Dutta, R. Banerjee y Bhattacharyya. 1996. "Production of tannase by solid-state fermentation". *Bioproc. Eng.* **14**: 159-162.

- Doi S., A. Shinmyo, T. Enatsu y G. Terui. 1973. "Growth-associated production of tannase by a strain of *Aspergillus oryzae*". *J. Ferment. Technol.* **51**: 768-774.
- Iibuchi S., Y. Minoda y K. Yamada. 1967. "Studies on tannin acyl hydrolase of microorganism". *Agr. Biol. Chem.* **31**: 513-524.
- Laemmli. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature.* **227**: 680-685.
- Lekha P.K. y B.K. Lonsane. 1994. "Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations". *Proc. Biochem.* **29**: 497-503.
- Pourrat H., F. Regerat, A. Pourrat y D. Jean. 1982. "Production of tannase by a strain of *Aspergillus niger*". *Biotechnol. Lett.* **4**: 583-588.
- Rajakumar S.G. y S.C. Nandy. 1983. "Isolation, purification and some properties of *Penicillium chrysogenum* tannase". *Appl. Env. Microbiol.* **46**: 525-527.
- Solis Pereira S., E. Favela Torres, G. Viniestra González G. y M. Gutiérrez Rojas. 1993. "Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 36-41.
- Yamada H., O. Adachi, M. Watanabe y N. Sato. 1968. "Studies on fungal tannase. Part I". *Agric. Biol. Chem.* **32**: 1070-1078.



FDO
Tópicos en Biotecnología

Avances en Purificación y Aplicación de Enzimas en Biotecnología



Lilia Arely Prado Barragán
Sergio Huerta Ochoa
Gabriela Rodríguez Serrano
Gerardo Saucedo Castañeda

Editores



Vigésimo quinto aniversario

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Rector general

Dr. José Luis Gázquez Mateos

Secretario general

Lic. Edmundo Jacobo Molina

Rector de la Unidad

Dr. Luis Mier y Terán Casanueva

Director de la División

Dr. José Luis Arredondo Figueroa

Secretario Académico de la División

M. en C. Arturo Preciado López

Jefe del Departamento

Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda

Colección Tópicos en Biotecnología

Avances en Purificación y Aplicación de Enzimas en Biotecnología

Diseño y cuidado de la edición:

Jacqueline Ochoa Méndez y Federico Valdovinos Tapia

Primera Edición 1999

ISBN 970-654-489-5

D. R. Todos los derechos reservados conforme a la ley

Impreso y hecho en México

Printed and made in Mexico