

EFFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE TANASA EN DOS CEPAS DE *Aspergillus niger*

EFFECT OF CARBON SOURCE ON TANNASE PRODUCTION BY TWO STRAINS OF *Aspergillus niger*

R. Belmares-Cerda, M. L. Reyes-Vega, J.C. Contreras-Esquivel, R. Rodríguez-Herrera y C. N. Aguilar*

Departamento de Investigación en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Unidad Saltillo. Blvd. V. Carranza e Ing. José Cárdenas Valdés S/n, Saltillo Coahuila C.P. 25000., México.

Resumen

En el presente estudio se evaluó la producción de la tanasa por dos cepas de *Aspergillus niger*. Ambas cepas fueron previamente aisladas de suelo y follaje de la región semidesértica de Coahuila, México. Las cinéticas de producción de la tanasa de *Aspergillus niger* PSH y GH1 se evaluaron en un sistema de fermentación en medio líquido. La actividad tanasa extracelular e intracelular se evaluó usando el método de la rodanina metanólica. Las condiciones de cultivo fueron: inóculo, 3×10^7 esporas/reactor; 30 mL de medio de cultivo; temperatura, 30°C; tiempo de incubación, 48h; pH inicial, 5.5; diversas fuente de carbono fueron evaluadas: glucosa, ácido gálico, ácido tánico y catequina, e infusiones de sorgo, cáscara de nuez y gobernadora. Se empleó una relación carbono/nitrógeno de 10. Los resultados obtenidos demostraron que la cepa GH1 de *Aspergillus niger* produjo la tanasa tanto extra como intracelularmente tanto en sustratos puros como en cultivos con infusiones. Sin embargo, la cepa de *Aspergillus niger* PSH fue mejor productora de la actividad tanasa bajo ciertas condiciones de cultivo, por ejemplo, sobre cultivos con infusiones de gobernadora.

Palabras claves: tanasa, cepas de *Aspergillus*, taninos.

Abstract

In the present study, tannase production of two *Aspergillus niger* strains was evaluated. Previously, both strains were isolated from soils and plants of the semiarid region of Coahuila, Mexico. Tannase production kinetics were carried out in submerged cultures of *Aspergillus niger* PSH and GH1. Extracellular and intracellular activities were assayed using the methanolic rhodanine method. Culture conditions were: inoculation level, 3×10^7 spores per reactor; 30 mL of culture medium; temperature, 30°C; incubation time, 48h; initial pH, 5.5; several carbon sources were used: glucose, gallic acid, tannic acid, catechin, and infusions from sorghum, pecan peels and creosote bush. A carbon/nitrogen ratio of 10 was used. Results obtained in this study demonstrated that the *Aspergillus niger* GH1 strain produced higher extracellular and intracellular tannase activity than *Aspergillus niger* PSH in pure substrates and in infusions. However, under certain culture conditions, *A. niger* PSH produced the highest tannase activity, i.e., with infusions of creosote bush.

Keywords: tannase, *Aspergillus* strains, tannins.

1. Introducción

La tanasa (tanin-acil-hidrolasa, EC 3.1.1-20) es usada extensivamente en la industria de los alimentos, bebidas, farmacéutica y química (Lekha y Lonsane, 1997). Esta enzima cataliza la hidrólisis de enlaces tipo éster de taninos hidrolizables y compuestos galatos. Además uno de los principales productos del rompimiento

hidrolítico del ácido tánico es el ácido gálico, el cual tiene aplicaciones en la industria farmacéutica en la síntesis química del trimetoprim que es un potente antioxidante de alto interés en la industria alimentaria (Aguilar y Gutiérrez-Sánchez, 2001).

Debido a las múltiples aplicaciones de la tanasa y el escaso conocimiento sobre la misma, en la actualidad existe una constante búsqueda de nuevas fuentes de esta enzima

* Autor para correspondencia: E-mail: cn_aguilar@yahoo.com
Tel.: (84) 44169213, Fax: (84) 44390511

con propiedades más deseables, tales como mayor estabilidad, mayor capacidad catalítica y bajo costo de producción (Cruz-Hernández, 2002). La producción de tanasa se ha demostrado en cepas bacterianas de *Bacillus pumilus*, *B. polymyxa*, *Corynebacterium sp.* y *Klebsiella pneumoniae*. Por otra parte, algunos hongos producen enzimas necesarias para degradar algunos taninos hidrolizados, específicamente el ácido tánico mediante la producción de tanasa. Esta capacidad ha sido demostrada en levaduras del género *Candida* (Deschamps y col., 1980) y en los hongos filamentosos es atribuida frecuentemente a hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium* (Lekha y Lonsane, 1997; Aguilar y Gutiérrez-Sánchez, 2001).

Previamente, Cruz-Hernández y col., (2001) obtuvieron dos cepas de *Aspergillus* aislados de suelo y follaje de la región semidesértica de México, las cuales degradaron altos niveles de compuestos polifenólicos del tipo tanino, usados como única fuente de carbono, debido a su capacidad de producción de la enzima tanasa.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de diversas fuentes de carbono e inductores sobre la producción de la enzima tanasa en dos especies de *Aspergillus* utilizando un sistema de cultivo sumergido.

2. Metodología experimental

2.1 Microorganismos e inóculo

Los microorganismos empleados fueron las cepas de *Aspergillus niger* PSH y GH1, aisladas de hojas de pino silvestre y de hojas de gobernadora respectivamente y pertenecientes a la colección DIA-UAdeC, las cuales fueron previamente identificadas en base a características microscópicas y fisiológicas por Cruz-Hernández (2002). Las esporas fueron conservadas en un sistema crioprotector (Aguilar, 2000) y fueron propagadas sobre agar papa dextrosa (PDA)

para obtener el inóculo de esporas necesario para la producción de la enzima tanasa.

2.2 Medios de cultivo

El medio mínimo de cultivo utilizado fue (g/L): KH_2PO_4 , 2.83; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5.66; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.57; $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.057; $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.012; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0057 y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0077. Como única fuente de carbono se emplearon sustratos puros e infusiones. Los sustratos puros considerados fueron: glucosa (como sustrato indicador de producción de los niveles basales de enzima), ácido tánico, ácido gálico y catequina. Siguiendo el método de extracción de taninos reportado por (Waterman y Mole, 1994), las infusiones fueron preparadas a partir de extractos acuosos (obtenidos por reflujo, durante 12 horas a 60°C) de gobernadora (*Larrea tridentata* Cov.), cáscaras de nuez (*Carya illinoensis*) y sorgo rojo (*Sorghum virgatum*), complementadas con las sales minerales antes indicadas.

2.3 Condiciones de cultivo

Como reactores del cultivo sumergido se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL con 30 mL de medio de cultivo, variando el tipo de sustrato. Cada reactor se inoculó con un nivel de 3×10^7 esporas por mL y se incubaron a 30°C con agitación controlada en un sistema multi-wrist shaker. Cada cinética fue monitoreada cada seis horas durante un tiempo de cultivo de 48 horas.

2.4 Obtención del extracto crudo enzimático

En cada muestreo, el contenido del reactor se filtró en papel Whatman 41 para separar la masa micelial del sobrenadante, el cual fue considerado como extracto extracelular. La masa micelial retenida se lavó con solución fisiológica, se mezcló en solución amortiguadora de acetatos (0.5M, pH 5.5) y se maceró en un mortero.

El material sólido obtenido se filtró en papel Whatman 41 y el sobrenadante obtenido fue considerado como extracto intracelular.

2.5 Actividad tanasa

Tanto en el extracto extra como en el intracelular la actividad de la enzima tanasa se midió utilizando el ensayo espectrofotométrico reportado por Sharma y col. (2000), en el cual el producto de la reacción enzimática, el ácido gálico forma un complejo colorido con la rodanina metanólica que absorbe a 520 nm.

2.6 Análisis estadístico

Los resultados de las actividades enzimáticas máximas evaluadas bajo diferentes condiciones de sustrato fueron analizados comparando los valores medios y las desviaciones estándar.

3. Resultados y discusión

En el presente estudio se evaluó el efecto de diferentes fuentes de carbono e inductores sobre la actividad tanasa en dos especies de *Aspergillus niger* en un sistema de cultivo sumergido.

La Fig. 1, muestra los resultados obtenidos de actividad tanasa extracelular (Fig. 1a) e intracelular (Fig. 1b) de *A. niger* PSH usando fuentes de carbono e inductores puros. Es importante observar que la cepa fúngica expresó los mayores títulos de actividad tanasa total (suma de la actividad extracelular e intracelular) cuando se empleó el ácido tánico como única fuente de carbono, sin embargo en el caso particular de la actividad extracelular, ésta fue mayor cuando se empleó catequina. El ácido tánico ha sido considerado uno de los inductores naturales de la enzima. La actividad tanasa extracelular se expresó también cuando se utilizó la catequina (Bajpai y Patil, 1997).

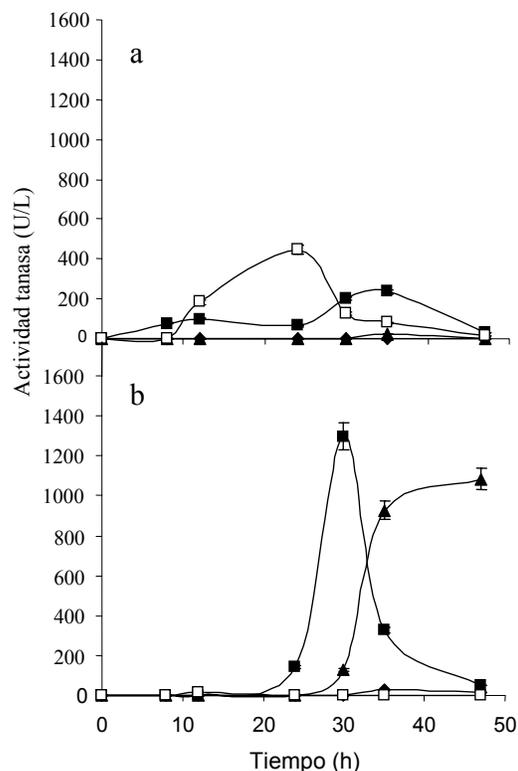


Fig. 1. Actividad tanasa extracelular (a) e intracelular (b) producida por *A. niger* PSH sobre los sustratos puros. (◆) glucosa, (■) ácido tánico, (▲) ácido gálico y (□) catequina.

Mientras que la actividad intracelular fue también inducida por la presencia de ácido gálico. Los resultados obtenidos sugieren la compleja red bioquímica involucrada en la degradación de los taninos, ya que el microorganismo no debería de expresar la actividad tanasa cuando se emplean como sustratos a la catequina y al ácido gálico, debido a que estos no poseen enlaces ésteres, los cuales son los sitios de acción de la enzima. Sin embargo, estos resultados concuerdan con los reportados en la literatura (Bajpai y Patil, 1997).

Los resultados con la glucosa, demuestran la ausencia de la actividad tanasa y demuestran además la característica inducible de la misma, ya que con este sustrato, *A. niger* no produjo la actividad tanasa (Aguilar, 2000; Aguilar y col., 2001a y b).

La Fig. 2 muestra los resultados obtenidos de actividad tanasa extracelular de la misma cepa sobre infusiones ricas en taninos obtenidos de diferentes fuentes vegetales. *A. niger* PSH fue solamente capaz de producir la enzima tanasa sobre la infusión de la gobernadora (*Larrea tridentata*).

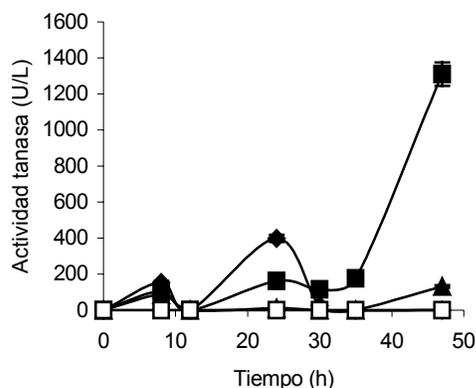


Fig. 2. Actividad tanasa extracelular producida por *A. niger* PSH sobre las infusiones ricas en taninos. (◆) cáscara de nuez, (■) gobernadora con sales minerales, (▲) gobernadora sin sales minerales y (□) sorgo.

La actividad tanasa se incrementó 3.5 veces por la adición de las sales minerales al medio de cultivo, debido a que el extracto obtenido de la gobernadora aparentemente posee los elementos mínimos nutricionales requeridos para el crecimiento fúngico, de tal manera que al incorporar las sales minerales el medio se balancea de tal manera que permite un mejor crecimiento a la cepa y los títulos de actividad tanasa se incrementan mas de tres veces.

Los resultados obtenidos, indican de manera indirecta que los extractos acuosos de gobernadora poseen principalmente taninos hidrolizables, ya que se ha reportado que las cepas fúngicas sólo son capaces de crecer sobre ese tipo de taninos (Lekha y Lonsane, 1997; Aguilar y Gutiérrez-Sánchez, 2001). Esta observación se complementa con lo reportado por Compton (1990) quienes demostraron que el sorgo posee básicamente

taninos condensados, los cuales no inducen la actividad tanasa.

La Fig. 3, muestra los resultados obtenidos de actividad tanasa extracelular (Fig. 3a) e intracelular (Fig. 3b) de *A. niger* GH1 usando fuentes de carbono e inductores puros. La actividad tanasa extra e intracelular sólo se expresó a bajo títulos cuando se emplearon ácido tánico y catequina. Sin embargo, la cepa GH1 produjo altos niveles de la actividad tanasa de manera intracelular cuando se empleo el ácido gálico.

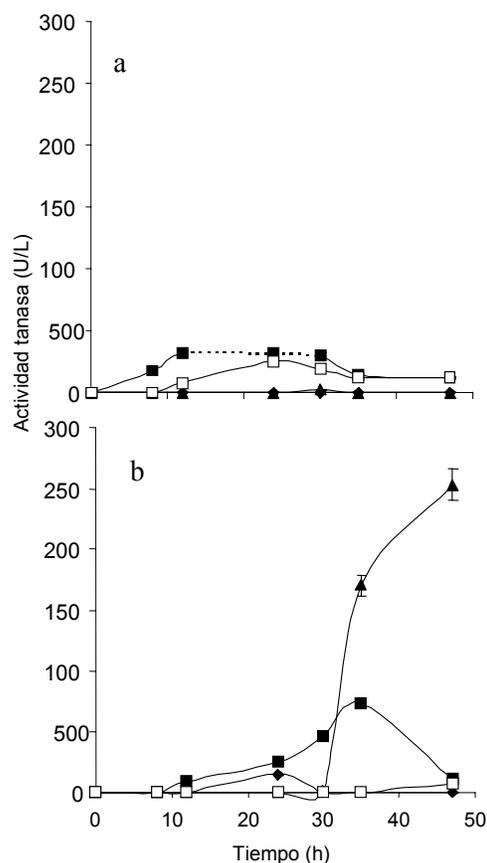


Fig. 3. Actividad tanasa extracelular (a) e intracelular (b) producida por *A. niger* GH1 sobre los sustratos puros. (◆) glucosa, (■) ácido tánico, (▲) ácido gálico y (□) catequina.

Los resultados obtenidos de la actividad intracelular en cultivos de ambas cepas con ácido gálico reflejan que la enzima tanasa no sólo participa en la hidrólisis exocelular de

galotaninos (ácido tánico) sino también tienen un rol importante en el metabolismo de degradación del ácido gálico, tal como lo suponen Zeida y col., (1998), quienes demostraron que este compuesto es llevado hasta pirogalol por la acción de la enzima ácido gálico descarboxilasa.

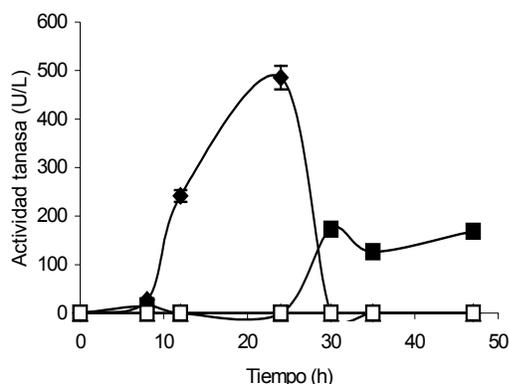


Fig. 4. Actividad tanasa extracelular producida por *A. niger* GH1 sobre las infusiones ricas en taninos. (◆) cáscara de nuez, (■) gobernadora con sales minerales, (▲) gobernadora sin sales minerales y (□) sorgo.

La producción de actividad extracelular de la cepa GH1 fue mayor con la infusión de nuez (485 U/L) en un tiempo de fermentación de 24 horas (Fig. 4). La mayor actividad tanasa intracelular de GH1 se observa con el ácido gálico (2532 U/L) en un tiempo de fermentación de 47 horas (Fig. 3). Los resultados obtenidos demuestran que la cepa GH1 de *A. niger* es capaz de producir la enzima tanasa al proporcionarle como fuente de carbono sustratos ricos en taninos, por lo tanto podemos decir que la cepa GH1 tiene la capacidad de degradar taninos hidrolizables y condensados.

De manera similar a la cepa PSH, *A. niger* GH1 sólo expresó la actividad extracelular cuando se emplearon extractos ricos en taninos. Sin embargo, a diferencia de PSH, GH1 fue capaz de expresar la actividad tanasa durante su crecimiento cuando se emplearon las infusiones de cáscaras de nuez y gobernadora, lo que sugiere que la

composición de los taninos hidrolizables en ambos sustratos es diferente.

Es importante mencionar que los resultados obtenidos sobre la relación de la actividad extracelular e intracelular, concuerda con la literatura, pues se ha reportado que en cultivos sumergidos la tanasa se expresa principalmente de manera intracelular, localizándose en el espacio periplásmico en donde cataliza la hidrólisis de los taninos hidrolizables (Lekha y Lonsane, 1994; 1997, Aguilar y col., 2001a, 2001b). Adicionalmente se sabe que los títulos de actividad extracelular se incrementan hasta 10 veces cuando la enzima se produce en cultivos sólidos, procesos en los cuales el microorganismo expresa la actividad tanasa de manera intracelular en muy bajos títulos.

Por otro lado, es importante considerar que los títulos de actividad enzimática obtenidos en el presente estudio son similares a aquellos reportados para cultivo sumergido por Kar y Banerjee (2000) y Aguilar y col., (2001b), mientras que son hasta 7.5 veces menores que los obtenidos en cultivo en estado sólido (Kar y col., 1999; Aguilar y col., 2001a; Kar y col., 2002)

Conclusiones

Los resultados obtenidos demuestran la gran capacidad de las cepas aisladas del semidesierto mexicano para degradar taninos a través de la producción de la enzima tanasa, sin embargo, hace falta la realización de una serie de estudios que profundicen en el estudio de la biodegradación de los taninos, compuestos caracterizados por ser defensa natural de las plantas a ataques microbianos y de animales.

Agradecimientos

Este trabajo de investigación forma parte del proyecto de investigación sobre producción de enzimas degradantes de taninos y obtención de nutraceuticos por cultivos microbianos en fermentación en medio sólido

y que cuenta con financiamiento de la SEP, el CONACYT y el gobierno del Estado de Coahuila.

Referencias

- Aguilar, C.N. (2000). *Patrones de inducción y represión en la síntesis de la enzima tannasa de Aspergillus niger Aa-20 en cultivos en medio líquido y sólido*. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México, D.F.
- Aguilar, C.N. y Gutiérrez-Sánchez, G. (2001). Sources, properties, and potential uses of tannin acyl hydrolase (3.1.1.20). *Food Science and Technology International* 7, 373-382.
- Aguilar, C.N., Augur, C., Favela-Torres, E. y Viniegra-González, G. (2001a). Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. *Process Biochemistry* 36, 565-570.
- Aguilar, C.N., Augur, C., Favela-Torres, E. y Viniegra-González, G. (2001b). Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid state fermentations: influence of glucose and tannic acid. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26, 296-302.
- Bajpai, B. y 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.
- Compton, L.P. (1990). *Agronomía del Sorgo*. Instituto Internacional para la Investigación en cultivos para los trópicos semiáridos (ICRISAT), Patancheru, Andhra Pradesh, India.
- Cruz-Hernández, M., Rodríguez, R., Aguilar, C.N., Contreras-Esquivel, J.C. y Lara, F. (2001). Aislamiento y caracterización morfológica de cepas microbianas degradadoras de taninos. *Memorias del XXII Encuentro Nacional de la AMIDIQ* 71-72.
- Cruz-Hernández, M. (2002). *Aislamiento y caracterización de cepas fúngicas degradadoras de taninos*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. México.
- Deschamps, A.M., Mahoudeau, G., Leulliette, L. y Lebeault, J.M. (1980). Isolation and identification of bark decaying and utilizing bacteria of various origins. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol* 17, 577-581.
- Kar, B., Banerjee, R., y Bhattacharyya, B. C. (1999). Microbial production of gallic acid by modified solid state fermentation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 23, 173-177.
- Kar, B. y Banerjee, R. (2000). Biosynthesis of tannin acyl hydrolase from tannin-rich forest residue under different fermentation conditions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 25, 29-38.
- Kar, B., Banerjee, R. y Bhattacharyya, B. C. (2002). Optimization of physicochemical parameters for gallic acid production by evolutionary operation-factorial design technique. *Process Biochemistry* 37, 1395-1401.
- Lekha, P., y Lonsane, B. (1994). Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. *Process Biochemistry* 29, 497-503.
- Lekha, P. K. y Lonsane, B.K. (1997). Tannin acyl hydrolase: State of the art. *Advances in Applied Microbiology* 44, 215-260.
- Sharma, S., Bhat, T.K. y Dawra, R. (2000). A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. *Analytical Biochemistry* 279, 85-89.
- Waterman, P.G. y Mole, S. (1994). *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, Reino Unido.
- Zeida, M., Weiser, M., Yoshida, T., Sugio, T. y Nagasama, T. (1998). Purification and characterization of gallic acid esterase from *Pantoea agglomerans* T71. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4743-4747.