

**Universidad Católica de Santa María**  
**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y**  
**Biotechnológicas**  
**Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica**



**AVANCES EN LA OBTENCIÓN DE ENZIMA TANASA USANDO  
MÉTODOS BIOTECNOLÓGICOS Y SUS APLICACIONES.**

Tesis presentada por el Bachiller:

**Castro Flores, Luis Eduardo**

para optar el Título Profesional de  
Ingeniero Biotecnólogo

Asesora:

**Mg. López Álvarez, Natalia Paola**

**Arequipa- Perú**

**2022**

UCSM-ERP

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**INGENIERIA BIOTECNOLOGICA**  
**TITULACIÓN CON TESIS**  
**DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR**

Arequipa, 09 de Octubre del 2022

**Dictamen: 004235-C-EPIB-2022**

Visto el borrador del expediente 004235, presentado por:

**2008203181 - CASTRO FLORES LUIS EDUARDO**

Titulado:

**AVANCES EN LA OBTENCIÓN DE ENZIMA TANASA USANDO MÉTODOS BIOTECNOLÓGICOS Y  
SUS APLICACIONES.**

Nuestro dictamen es:

**APROBADO**

**0737 - PAZ ALIAGA CARLOS EITEL IVAN  
DICTAMINADOR**

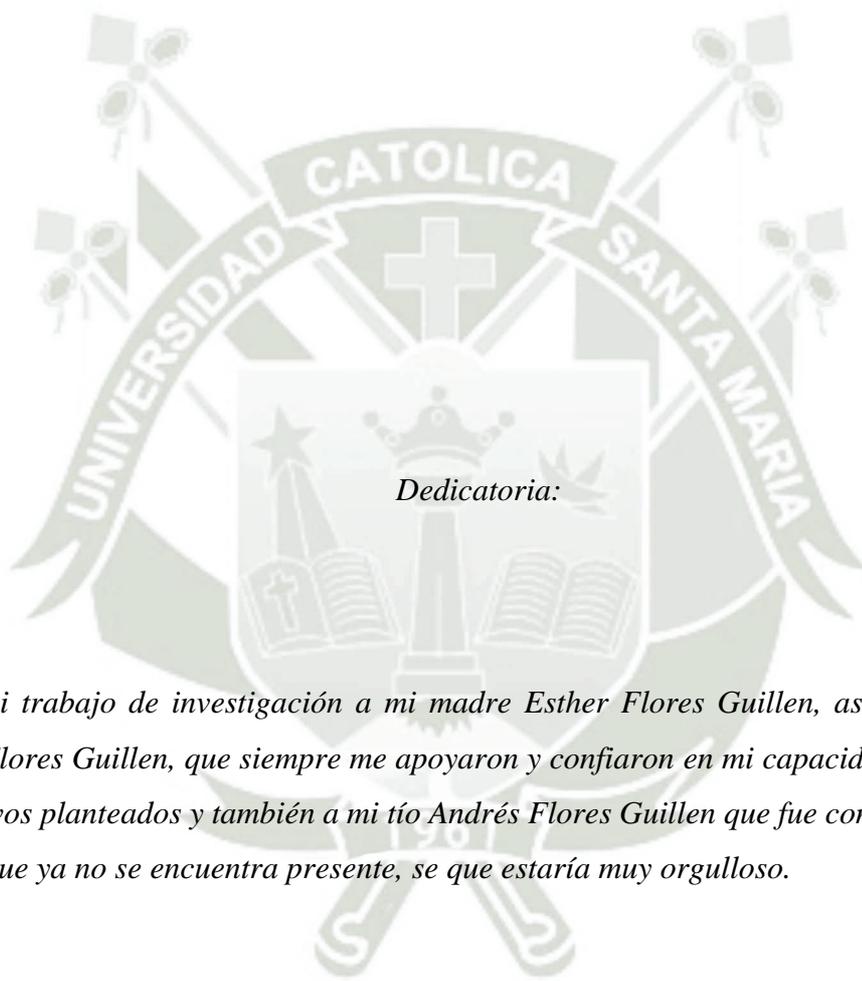


**0838 - CARDENAS GARCIA JAIME DANTE  
DICTAMINADOR**



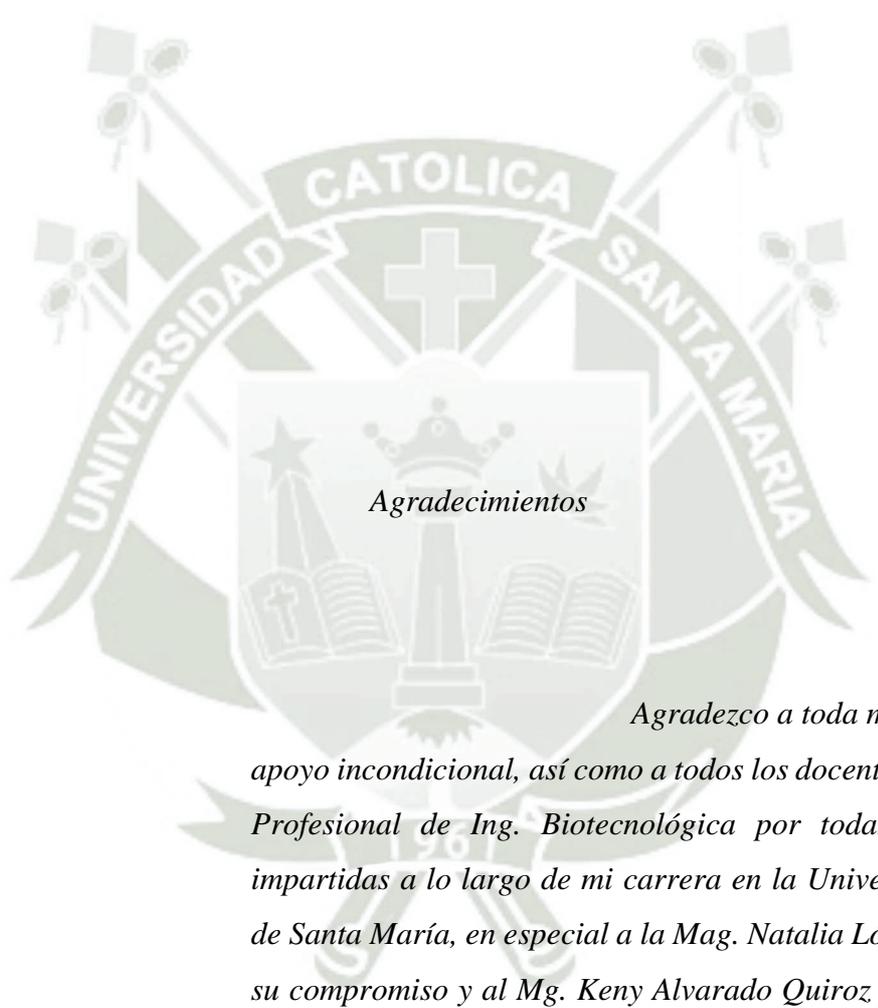
**2394 - CORDOVA BARRIOS CINTHIA CAROL  
DICTAMINADOR**





*Dedicatoria:*

*Dedico mi trabajo de investigación a mi madre Esther Flores Guillen, así como a mi tía Ysmena Flores Guillen, que siempre me apoyaron y confiaron en mi capacidad para alcanzar los objetivos planteados y también a mi tío Andrés Flores Guillen que fue como un padre para mí y aunque ya no se encuentra presente, se que estaría muy orgulloso.*



*Agradecimientos*

*Agradezco a toda mi familia por su apoyo incondicional, así como a todos los docentes de la Escuela Profesional de Ing. Biotecnológica por todas las lecciones impartidas a lo largo de mi carrera en la Universidad Católica de Santa María, en especial a la Mag. Natalia López Álvarez por su compromiso y al Mg. Keny Alvarado Quiroz por ser un gran compañero que me brindo su apoyo desinteresadamente, a mis 3 jurados, Mg. Cinthia Córdova Barrios, Mg. Ivan Paz Aliaga y al Dr. Jaime Cárdenas García por su experiencia, consejos y observaciones para enriquecer este proyecto.*

## RESUMEN

La siguiente investigación se enfocó en la recopilación, análisis y evaluación de los avances más recientes y relevantes respecto a la obtención de la enzima tanasa utilizando métodos biotecnológicos y sus aplicaciones. Se analizaron documentos científicos de los últimos 10 años con el fin de desarrollar una guía con conceptos básicos actualizados, los métodos más utilizados en la obtención de la enzima tanasa, así como una comparativa entre los mismos, con el propósito de determinar el camino más adecuado a seguir para futuras investigaciones. Además, se analizaron algunas de las múltiples aplicaciones de la enzima tanasa, así como su potencial para ser utilizada en procesos industriales, como la elaboración y mejoramiento de productos en la manufactura de alimentos, procesos de biorremediación de efluentes con alto contenido de taninos, producción de ácido gálico, entre muchas otras aplicaciones que se citan en esta investigación.

Luego de las respectivas revisiones bibliográficas, se analizaron métodos para aumentar el rendimiento de la actividad enzimática en la enzima tanasa, tales como la aplicación de procedimientos para la inmovilización enzimática, modelos matemáticos para determinar las variables óptimas del proceso enzimático, el uso de desechos agroindustriales como sustrato y metodologías modernas, en particular la modificación genética a fin de aumentar el rendimiento de la enzima tanasa, ampliar su rango de acción, desarrollando enzimas termoresistentes y capaces de soportar niveles de pH más ácidos.

**Palabras claves:** Ácido gálico, enzimas, inmovilización.

## ABSTRACT

The following research focused on the compilation, analysis and evaluation of the most recent and relevant advances regarding obtaining the tannase enzyme using biotechnological methods and its applications. Scientific documents of the last 10 years were analyzed in order to develop a guide with updated basic concepts, the most used methods in obtaining the tannase enzyme, as well as a comparison between them, in order to determine the most appropriate way. to follow for future research. In addition, some of the multiple applications of the enzyme tannase were analyzed, as well as its potential to be used in industrial processes, such as the elaboration and improvement of products in food manufacturing, bioremediation processes of effluents with a high content of tannins, production of gallic acid, among many other applications that are cited in this research.

After the respective bibliographic reviews, methods were analyzed to increase the yield of enzymatic activity in the tannase enzyme, such as the application of procedures for enzymatic immobilization, mathematical models to determine the optimal variables of the enzymatic process, the use of agroindustrial waste as a substrate and modern methodologies, in particular genetic modification in order to increase the performance of the enzyme tannase, broaden its range of action, developing heat-resistant enzymes capable of withstanding more acidic pH levels.

**Keywords:** Gallic acid, enzymes, immobilization.

## INDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

INDICE DE TABLAS

INDICE DE FIGURAS

LISTADO DE ABREVIATURAS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN

METODOLOGIA

1.	Mercado de enzimas .....	1
2.	Enzimas: .....	2
2.1.	Clasificación de las enzimas .....	2
3.	Microorganismos como fuentes productoras de enzimas .....	3
4.	Enzima Tanasa:.....	5
4.1.	Propiedades bioquímicas de la enzima tanasa .....	6
4.2.	Mecanismo de acción de la enzima tanasa .....	8
5.	Taninos: .....	8
5.1.	Clasificación de los taninos .....	9
5.2.	Funciones de los taninos .....	9
5.3.	Aplicaciones de los taninos.....	9
6.	Ácido Gálico:.....	10
7.	Upstream de la enzima tanasa .....	10
7.1.	Sistemas biológicos productores de enzima tanasa: .....	10

7.1.1.	Algunos microorganismos productores de enzima tanasa:.....	11
7.1.2.	<i>Lactobacillus</i> como productores de tanasa extracelular: .....	12
7.1.3.	Bacterias patógenas como fuentes productoras de enzimas .....	13
7.1.4.	Bacterias endofíticas como fuentes productoras de tanasa.....	14
7.1.5.	Levaduras no convencionales como productoras de enzima tanasa.....	15
7.1.6.	Levaduras probióticas como productoras de enzima tanasa.....	16
7.1.7.	Caracterización de enzimas provenientes de una misma fuente microbiana. .....	17
7.1.8.	Comparación de hongos productores de tanasa aislados de la misma zona y determinación de los hongos de mayor rendimiento.....	19
7.1.9.	Comparación de tanasa comercial vs tanasa producida por <i>Aspergillus terreus</i> . .....	20
7.1.10.	Comparación de los sistemas biológicos analizados .....	21
7.2.	Diseño y preparación del medio de cultivo para la obtención de enzima tanasa: . .....	22
7.2.1.	Métodos de fermentación para la obtención de tanasa microbiana .....	22
7.2.1.1.	Fermentación sumergida.....	23
7.2.1.2.	Fermentación en estado sólido .....	23
7.2.1.3.	Principales aspectos de la fermentación en estado sólido y la fermentación sumergida .....	24
7.3.	Actividad enzimática de la enzima tanasa .....	26
7.3.1.	Métodos de ensayo para determinar la actividad enzimática de la enzima tanasa .....	26
7.3.1.1.	Análisis de reacción enzimática mediante análisis de HPLC.....	29
7.3.2.	Efecto de factores en la actividad enzimática de la enzima tanasa.....	32
7.3.2.1.	Efecto de iones metálicos y quelantes en la actividad de la enzima tanasa: . .....	32

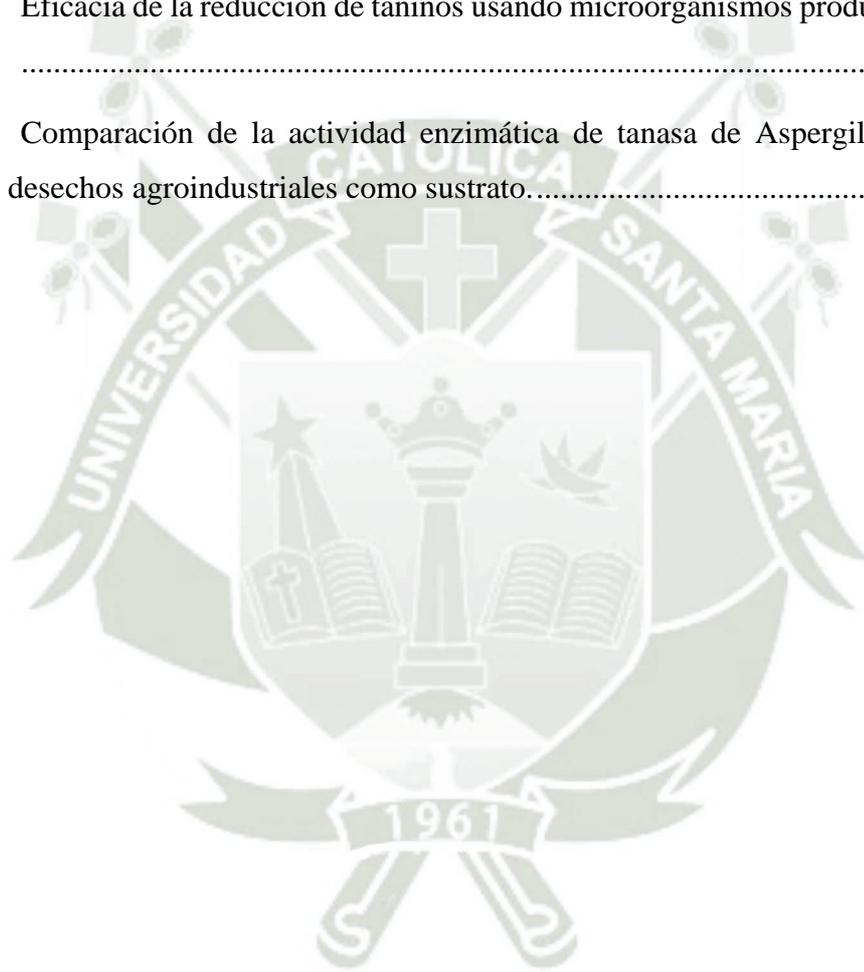
7.3.2.2.	Efecto de compuestos surfactantes e inhibidores en la actividad de la enzima tanasa .....	33
7.3.2.3.	Efecto de solventes orgánicos en la actividad de la enzima tanasa .....	34
8.	Downstream de la enzima tanasa.....	34
8.1.	Recuperación de la enzima tanasa .....	35
8.2.	Purificación de enzima tanasa.....	35
8.2.1.	Precipitación con sulfato de amonio:.....	35
8.2.2.	Cromatografía de intercambio iónico usando una columna de celulosa (DEAE) .....	36
8.2.3.	Cromatografía de filtración en gel.....	36
8.2.4.	Electroforesis en gel (SDS-PAGE).....	37
8.3.	Determinación de la pureza de la enzima tanasa: .....	37
8.4.	Identificación de reacción enzimática de la tanasa usando cromatografía en capa fina (TLC).....	37
9.	Métodos para mejorar el rendimiento de la enzima tanasa: .....	39
9.1.	Método de inmovilización de enzima tanasa .....	39
9.1.1.	Inmovilización de enzima tanasa usando quitosan activado con genipin .	39
9.1.2.	Inmovilización de enzima tanasa usando alginato de calcio .....	39
9.1.3.	Inmovilización de la enzima tanasa usando nanopartículas de tierra diatomea cubierta con polianilina .....	40
9.2.	Modificación genética como método biotecnológico para la obtención de la enzima tanasa .....	42
9.2.1.	Modificación genética para obtener enzima tanasa con mayor termoestabilidad .....	42
9.2.2.	Bacterias endofíticas como fuentes productoras de enzima tanasa usando modificación genética .....	43
9.2.3.	Tanasa estable a niveles de pH extremo producida por microorganismos genéticamente modificada.....	44

9.3.	Aplicación de modelos matemáticos para controlar y optimizar la producción de enzima tanasa.....	45
9.4.	Sistema bifásico acuoso como método alternativo de purificación.....	46
9.5.	Nuevas formas de presentación y almacenamiento de tanasa .....	47
9.5.1.	Tanasa en spray seco .....	47
10.	Aplicaciones de enzima tanasa:.....	48
10.1.	Reducción de taninos en jugo de frutas .....	48
10.1.1.	Clarificación de jugo de fruta de jamun usando la enzima tanasa.....	50
10.1.2.	Reducción de astringencia de jugo de limón usando la enzima tanasa .....	50
10.2.	Mejoramiento de alimento de animales usando ácido tánico hidrolizado con enzima tanasa .....	51
10.3.	Elaboración y mejoramiento del té .....	52
10.3.1.	Elaboración del té negro .....	52
10.3.2.	Reducción de catequinas de té oolon usando enzima tanasa.....	53
10.4.	Enzima tanasa y su aplicación a procesos ambientales .....	54
10.4.1.	Degradación de taninos en aguas residuales de la industria del cuero .....	54
10.5.	Producción de ácido gálico usando enzima tanasa .....	55
10.6.	Producción simultanea de enzima tanasa y ácido gálico .....	56
10.7.	Uso de desechos agroindustriales como sustrato .....	57
10.7.1.	Producción de enzima tanasa usando bagazo de caña de azúcar como sustrato .....	57
10.7.2.	Producción de enzima tanasa usando cáscara de granada como sustrato..	58
10.7.3.	Producción de enzima tanasa usando residuos de arroz, café molido usado y coco desecado como sustrato .....	58
	PERSPECTIVAS FUTURAS:.....	60
	CONCLUSIONES: .....	62
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:.....	65

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación de las enzimas. ....	3
Tabla 2.	Enzimas involucradas de acuerdo al sustrato utilizado.....	4
Tabla 3.	Tipos de enzimas tanasa producidas por microorganismos. ....	5
Tabla 4.	Características más habituales para llevar a cabo la reacción enzimática de la enzima tanasa. ....	7
Tabla 5.	Tabla de referencia de algunos microorganismos productores de enzima tanasa y su fuente de aislamiento.....	11
Tabla 6.	Tabla comparativa de la actividad tanasa de 3 cepas del género Lactobacillus. ...	12
Tabla 7.	Actividad enzimática de Streptomyces sp. AL1L.....	15
Tabla 8.	Actividad enzimática de tanasas de levadura usando ácido tánico como sustrato inductor. ....	16
Tabla 9.	Especificidad por sustratos de 3 enzimas tanasas caracterizadas a partir de Clostridium Butyricum.....	18
Tabla 10.	Tabla comparativa para la elección de microorganismos hiperproductores de enzima tanasa. ....	19
Tabla 11.	Tabla comparativa de la actividad enzimática de sistemas biológicos.....	22
Tabla 12.	Condiciones fisicoquímicas promedio aplicadas en la producción de enzima tanasa en un medio de fermentación sumergida.....	23
Tabla 13.	Condiciones fisicoquímicas promedio aplicadas en la producción de enzima tanasa en un medio de fermentación en estado sólido. ....	24
Tabla 14.	Tabla comparativa de las principales características de un medio de fermentación sumergida y un medio de fermentación en estado sólido.....	25
Tabla 15.	Principales métodos para determinar la actividad enzimática de la enzima tanasa. ....	27
Tabla 16.	Efecto de iones metálicos sobre la actividad enzimática de la Enzima tanasa rAntan1. ....	32

Tabla 17. Efecto de compuestos surfactantes e inhibidores sobre la actividad enzimática de la Enzima tanasa rAntan1.....	33
Tabla 18. Efecto de solventes orgánicos sobre la actividad enzimática de la Enzima tanasa rAntan1. ....	34
Tabla 19. Tabla comparativa de recuperación de la actividad enzimática de enzimas tanasas inmovilizadas después de varios su reúso. ....	41
Tabla 20. Eficacia de la reducción de taninos usando microorganismos productores de enzima tansasa. ....	49
Tabla 21. Comparación de la actividad enzimática de tanasa de Aspergillus niger usando diferentes desechos agroindustriales como sustrato.....	59



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Crecimiento del mercado global de enzimas 2014 – 2028.....	1
Figura 2.	Distribución de las fuentes de producción del mercado global de enzimas....	2
Figura 3.	Microorganismos capaces de producir enzima tanasa. ....	6
Figura 4.	Reacción de hidrólisis de la enzima tanasa sobre el ácido digálico y el metil galato. ....	8
Figura 5.	Clasificación de los taninos.....	9
Figura 6.	Espectro de HPLC de una muestra de ácido tánico antes y después de ser sometida a hidrólisis de usando la enzima tanasa.....	30
Figura 7.	Clasificación de los principales métodos de ensayo para determinar la actividad enzimática de la enzima tanasa. ....	31
Figura 8.	Proceso de purificación de enzima tanasa de Enterobacter cloacae.....	38
Figura 9.	Proceso de purificación de enzima tanasa de Aspergillus Niger. ....	38
Figura 10.	Formula química de catequinas contenidas en el té oolon. ....	54
Figura 11.	Formula química del Ácido Gálico. ....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ac.	Ácido
Al	Aluminio
B	Billones
Ba	Bario
BCA	Ácido bicinconico
Ca	Calcio
CAGR	Crecimiento anual compuesto
CAT	Tanasa asociada a la célula
Cd	Cadmio
Cu	Cobre
DEAE	Dietilaminoetil-celulosa
DOC	Carbono orgánico disuelto
DSMO	Dimetilsulfóxido
E.C.	Comisión de enzimas
ECG	Epigalocatequina
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EGCG	Epigalocatequina galato
et al.	Y otros
FeCl <sub>3</sub>	Cloruro de hierro III
g	Gramo
GG	β-glucogalin
GRAVY	Gran promedio de hidrofiliidad
Hg	Mercurio
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución

K	Potasio
Kcat	Constante para cada enzima (número de recambio)
Kcat/Km	Constante de especificidad
KDa	Kilodalton
Km	Constante de michaelis
M	Molaridad
m/z	Masa/carga
MALDI-TOF	Ionización por desorción de laser asistida por matriz con tiempo de vuelo
Mg	Magnesio
MG	Metil galato
mg/mL	Miligramos por mililitro
Min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
Mn	Manganeso
MS	Espectrometría de masas
mμ	Milimicrón
N	Normalidad
nm	Nanometro
NTU	Unidades nefelométricas de turbides
PG	Propil galato
pH	Potencial de hidrogeno
RE	Eficiencia de remoción
RMN	Metodología de superficie de respuesta
sCOD	Demanda química de oxígeno soluble
SDS	Dodecil sulfato de soio

SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
TF	Teaflavinas
TLC	Cromatografía en capa fina
TSAM	Tannase screening agar médium
U/gds	Unidad por gramo de sustrato seco
U/mg	Unidad por miligramo
U/mL	Unidades por mililitro
UI/Kg	Unidad internacional por kilogramo
USD	Dólar Estadounidense
v/p	Volumen/peso
v/v	Volumen/volumen
Zn	Zinc
%	Porcentaje
%T	Porcentaje de transmitancia
°C	Grados centígrados
µg/mL	Microgramo por mililitro

## INTRODUCCION:

Los taninos son metabolitos secundarios de alto peso molecular que normalmente se encuentran en las plantas como mecanismo de protección contra insectos, animales y patógenos externos. Son reconocidos por tener varios usos industriales como la elaboración de alimentos, curtido de pieles, fabricación de vinos, entre otros, pero también producen un efecto astringente y son considerados como antinutrientes por su capacidad de unir y precipitar proteínas (1).

Los taninos se dividen en 3 grupos, taninos hidrolizables, taninos condensados y taninos complejos, y son considerados como inhibidores microbianos, pero existen microorganismos capaces de protegerse contra su toxicidad, gracias a la producción de enzimas que degradan los taninos en compuestos más simples para ser utilizados como fuentes de alimentación para el microorganismo (2).

La enzima *tanin acil hidrolasa* (EC. 3.1.1.20), comúnmente conocida como enzima tanasa tiene la capacidad de biodegradar taninos, entre ellos el ácido tánico, liberando glucosa y ácido gálico. La enzima tanasa es principalmente producida por microorganismos, concretamente bacterias, levaduras y hongos (3). Siendo los hongos los microorganismos más utilizados en la industria de producción de metabolitos secundarios, particularmente la enzima tanasa (4).

Las enzimas han despertado un gran interés por sus múltiples usos en diversas industrias, provocando que la comunidad científica realice cada vez más investigaciones respecto a la aplicación de enzimas, como la enzima tanasa.

Entre estas investigaciones destaca el artículo denominado, Los hongos filamentosos como agentes prometedores para la degradación de compuestos biosólidos, donde luego de la investigación respectiva se demostró que enzimas provenientes de hongos pueden servir como intermediarios para dar tratamiento a desechos biosólidos, entre las enzimas investigadas se confirmó la aplicación de la enzima tanasa para tratar efluentes contaminados con taninos (5).

Esto permitió enfocar la aplicación de la enzima tanasa a biodegradaciones más específicas, en especial la biodegradación de efluentes con concentraciones altas en taninos como se demuestra en el artículo Caracterización de la tanasa CAS-21 de *Aspergillus fumigatus* con potencial para la síntesis de galato de propilo y el tratamiento de efluentes de curtiduría de la industria del cuero (6).

También es usada en la industria alimentaria para la elaboración y mejoramiento de té, reduciendo el efecto astringente provocado por los taninos, como se demuestra en el artículo Mejoramiento del sabor de té verde de otoño usando la enzima tanasa (7).

Así como su aplicación para el mejoramiento de la calidad de jugo de frutas mediante la degradación de taninos usando la enzima tanasa, como se cita en el artículo, Producción, caracterización y aplicación de tanasa de *Talaromyces verruculosus* en la detanificación de jugos de frutas, donde también evalúan las variables óptimas para la producción de enzima tanasa y su actividad enzimática (8).

Una de las aplicaciones más valoradas de la enzima tanasa, es la capacidad de producir ácido gálico a partir de la hidrólisis de taninos, ya que el ácido gálico es un compuesto muy cotizado en la industria farmacéutica y cosmética, por su capacidad antioxidante y anticancerígena (9).

La producción de enzimas a partir de microorganismos se produce mediante la aplicación del método de fermentación, el cual tiene dos variantes principales conocidas como la fermentación en estado sólido y la fermentación sumergida, cada una de las cuales posee ventajas y desventajas dependientes del microorganismo que se quiere usar, las variables fisicoquímicas que se desea controlar y el costo de producción (10).

Con el fin de mejorar el rendimiento de la enzima tanasa y reducir costes de operación, se han desarrollado nuevos métodos como la inmovilización enzimática con diferentes compuestos. Este procedimiento da la posibilidad al operador de poder reutilizar la enzima, conservando un porcentaje de la actividad enzimática respecto a la actividad inicial del primer ciclo (11).

El conocimiento respecto al mecanismo de acción de las enzimas, así como sus variables, se viene analizando y utilizando con forme van apareciendo nuevas tecnologías que permiten romper las barreras establecidas por la naturaleza, una de las más modernas es la modificación genética para obtener enzimas recombinantes con un mayor rendimiento, más resistentes, estables y con un rango de acción más amplio (12).

Dentro de los procesos de producción de enzimas, uno de los más importantes por su elevado costo, es la purificación, por lo que se busca estandarizar e identificar alternativas que puedan presentar una oportunidad para reducir costes, pero esto dependerá del grado de purificación que se desee alcanzar, según la industria objetivo.

Por lo tanto, en la siguiente investigación se desarrolló una guía actualizada, de los aspectos más relevantes conocidos que facilite la búsqueda de la comprensión de todos los temas respecto a los avances en la obtención de la enzima tanasa usando métodos biotecnológicos,

basándose en la recopilación, evaluación y análisis crítico de bibliografías de fuentes confiables, como revistas indexadas con una fecha de publicación no mayor a 10 años de antigüedad. Así como la sugerencia de nuevos temas de investigación orientados a la búsqueda de crear nuevas oportunidades utilizando los recursos disponibles en nuestro país, como el aprovechamiento de la Tara por su alto contenido de taninos, como sustrato para la producción de enzima tanasa y ácido gálico. (9) (13)



## METODOLOGIA:

La siguiente investigación tiene un enfoque documental que está basado en la recolección de información pertinente y actualizada relacionada a los avances en la obtención de la enzima tanasa usando métodos biotecnológicos, para su posterior evaluación, que permita una selección de la información más relevante y representativa.

La información seleccionada será analizada de manera crítica, imparcial y bajo un punto de vista objetivo, con el fin de asegurar la formulación de conclusiones y recomendaciones que sirvan como base para la elaboración de un documento que pueda ser utilizado como una guía para futuros investigadores, que tengan un interés en la obtención de la enzima tanasa usando microorganismos como fuente de producción.

La recolección de la información se realizó durante el periodo de setiembre del 2021 a marzo del 2022 y los criterios de búsqueda que se tomaron en cuenta para filtrar la información fueron: artículos de preferencia de revistas científicas indexadas en idioma inglés ( ya que la información más actualizada se encuentra en ese idioma) con una antigüedad no mayor a 10 años desde su fecha de publicación, evitando todo tipo de fuentes de baja confiabilidad, dudosa procedencia y que no hayan pasado por una revisión previa para validar sus datos expuestos.

La mayoría de los artículos citados en esta investigación fueron extraídos de la base de datos de revistas indexadas integradas en la biblioteca virtual de la Universidad Católica de Santa María como Scopus, IEEE Xplore Digital Library, Springer, Taylor & Francis, Web of Science, EBSCOhost, Science Direct, Investigación y Ciencia, entre otras, con el fin de asegurar un sistema para la filtración de información más eficaz.

La cadena de búsqueda de referencia utilizada para delimitar la trazabilidad de la información estuvo compuesta por palabras claves como tannase, enzyme, tannins, tannic acid, gallic acid, microorganisms, *Aspergillus niger*, biotechnology, purification, fermentation, inmovilization y genetic modification.

El presente documento corresponde a una investigación de tipo cualitativa no experimental, ya que los datos fueron obtenidos mediante un análisis de observación no cuantificable, de tipo descriptivo. Sin embargo, los datos proporcionados en este documento pueden ser tomados en cuenta como una base para la planificación de futuras investigaciones cuantificables.

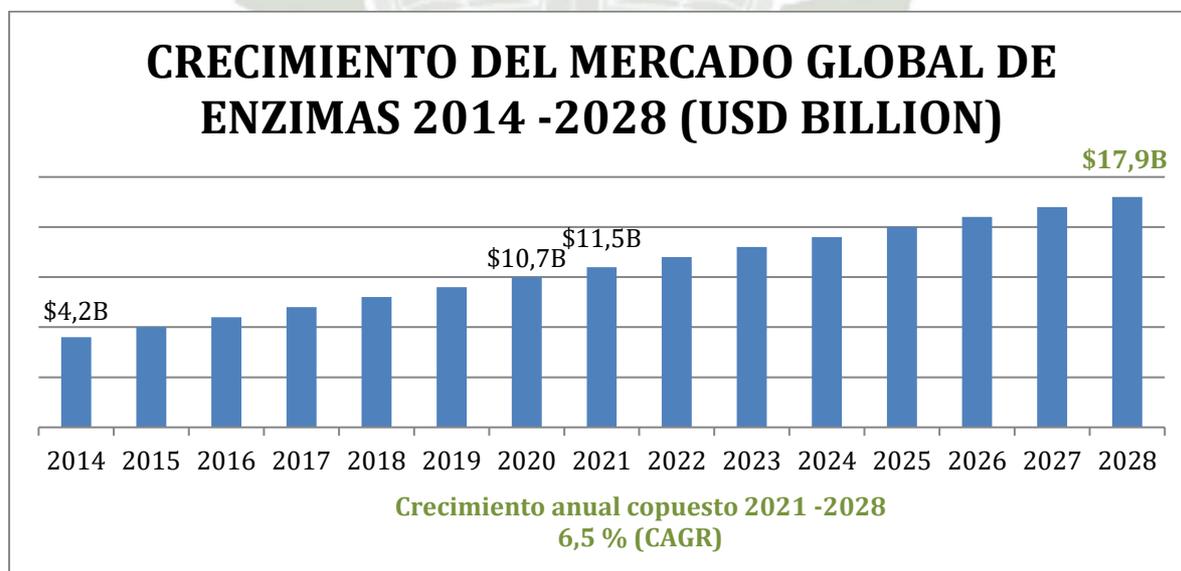
Finalmente, luego de seleccionar y analizar la información de calidad, se procedió a elaborar la bibliografía con todas las fuentes utilizadas a fin de que puedan servir para verificar e interiorizar con más detalle en algunos temas de interés por parte de futuros investigadores.



La Biotecnología ha destacado por dar soluciones innovadoras a múltiples problemas, mejorando la calidad y salud de la vida de las personas. Es por eso que diversos países (como Singapur y China) han desarrollado fuertes iniciativas para incentivar el crecimiento de esta industria, que es relativamente lenta a comparación de otras, como la automotriz y la de comunicación (14).

### 1. Mercado de enzimas

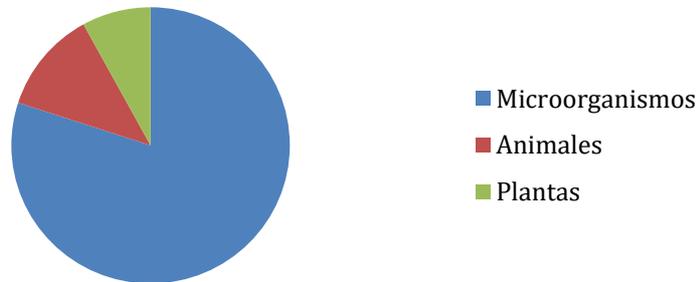
La producción enzimática es un área de la biotecnología, la cual se encuentra en constante expansión y que tiene la capacidad de mover fuertes cantidades de dinero. El año 2014 el mercado de producción de enzimas movió USD 4.2 billones y la proyección estimada para el 2020 fue de USD 7.2 billones (15). Según informes recientes el tamaño del mercado mundial de enzimas para el 2020 se valoró en USD 10.7 Billones, superando las expectativas. Actualmente para el 2021 el mercado de enzimas se valoró en USD 11.47 Billones, y se espera una tasa de crecimiento anual compuesto de 6.5 % entre el año 2021 al 2028, con una previsión de ingresos para el 2028 de USD 17.88 Billones.



**Figura 1.** Crecimiento del mercado global de enzimas 2014 – 2028.

*Nota:* Adaptado de (15) (16)

## FUENTES DE PRODUCCIÓN DEL MERCADO GLOBAL DE ENZIMAS 2020 DE \$ 10,7 B (%)



**Figura 2.** Distribución de las fuentes de producción del mercado global de enzimas.

*Nota:* Adaptado de (16)

Respecto a la fuente de obtención de las enzimas en el 2020, los datos demostraron que existe una preferencia a nivel industrial hacia los microorganismos, ocupando más del 80 % del mercado global de enzimas, en menor cantidad se encuentran las enzimas de origen animal y en último lugar se posicionan las enzimas de origen vegetal, es decir enzimas que son extraídas a partir de las plantas (16).

## 2. Enzimas:

Las enzimas son consideradas biocatalizadores producidas por seres vivos, de gran importancia que permiten regular y controlar las reacciones químicas de diversos procesos.

### 2.1. Clasificación de las enzimas

Según la Comisión de Enzimas (CE), estas se encuentran clasificadas en 7 categorías, basándose en el tipo de reacción catalizada por cada enzima (17).

**Tabla 1.** Clasificación de las enzimas.

<b>Clases de enzimas</b>	
<b>EC 1</b>	Oxidoreductasas
<b>EC 2</b>	Transferasas
<b>EC 3</b>	Hidrolasas
<b>EC 4</b>	Liasas
<b>EC 5</b>	Isomerasas
<b>EC 6</b>	Ligasas
<b>EC 7</b>	Translocasas

*Nota:* Adaptado de (17)

### **3. Microorganismos como fuentes productoras de enzimas**

Como respuesta a la tendencia hacia el cuidado ambiental por parte de las autoridades a nivel mundial y el creciente interés por los usuarios finales de valorar cada vez más la naturaleza, los investigadores se han esforzado en encontrar alternativas a los procesos físicos y químicos que sean más amigables con el medio ambiente, sin elevar el costo de sus procesos.

Es así como despierta la demanda por los procesos biotecnológicos usando enzimas y una de las formas más eficientes de encontrar estas enzimas, es buscarlas en el mismo medio que se desea tratar, es decir identificar microorganismos capaces de sobrevivir en nuestro sustrato de interés usando como mecanismo de supervivencia la producción de enzimas con el fin de poder transformar compuestos complejos nocivos para el propio microorganismo, en compuestos más simples con el propósito de aprovecharlos como fuentes de nutrientes para poder crecer.

El número de enzima por encontrar es inimaginable, como lo muestra un estudio en el que se aislaron hongos a partir de desechos provenientes del proceso de producción de aceite de oliva, para identificar posibles enzimas de interés industrial.

Se aislaron 47 colonias de hongos filamentosos, las cuales fueron inoculadas en medios de cultivo sólido con diferentes fuentes de nutrientes, para determinar su reacción ante cada sustrato y así identificar las enzimas involucradas en su proceso de crecimiento dependiendo del sustrato empleado.

Demostraron que la producción enzimática dependerá del sustrato empleado y la capacidad del microorganismo para adaptarse al medio con el que interactúa. De acuerdo con los resultados se pudo observar que todas las cepas fueron capaces de crecer en sustratos como almidón, glucosa, sacarosa, caseína y carboximetilcelulosa, mientras que solo el 53 % fue capaz de crecer en presencia de ácido tánico.

**Tabla 2.** Enzimas involucradas de acuerdo al sustrato utilizado.

Sustrato	Enzima involucrada
Almidón	Amilasa
Sacarosa	Invertasa
Ácido fítico	Fitasa
Ácido tánico	Tanasa
Tween 80	Lipasa o esterasa
Carboximetilcelulosa	Celulasa

*Nota:* Adaptado de (18)

Este estudio nos da una idea de la diversidad de enzimas que se pueden encontrar tomando muestras de diferentes fuentes naturales, teniendo en cuenta la gran diversidad biológica de nuestro país (18).

#### 4. Enzima Tanasa:

La tanasa o *tanin acil hidrolasa* (EC 3.1.1.20) es una enzima que posee la capacidad de degradar a los taninos a través de la reacción de hidrólisis, liberando ácido gálico y glucosa. Demostrando así su potencial para ser aplicada en muchas industrias, como la alimentaria, farmacéutica, cuero, bebidas entre otras.

Se conocen 2 tipos de tanasa codificadas por diferentes genes. La tanasa extracelular, codificada con el gen tanA, de un tamaño de 60 KDa y la tanasa intracelular codificada por el gen tanB, con un peso molecular de 50 KDa (17).

**Tabla 3.** Tipos de enzimas tanasa producidas por microorganismos.

Tipos de enzima tanasa		
Tipos	Gen codificado	Tamaño
Tanasa extracelular	TanA	60 KDa
Tanasa intracelular	TanB	50 KDa

*Nota:* Adaptado de (17)

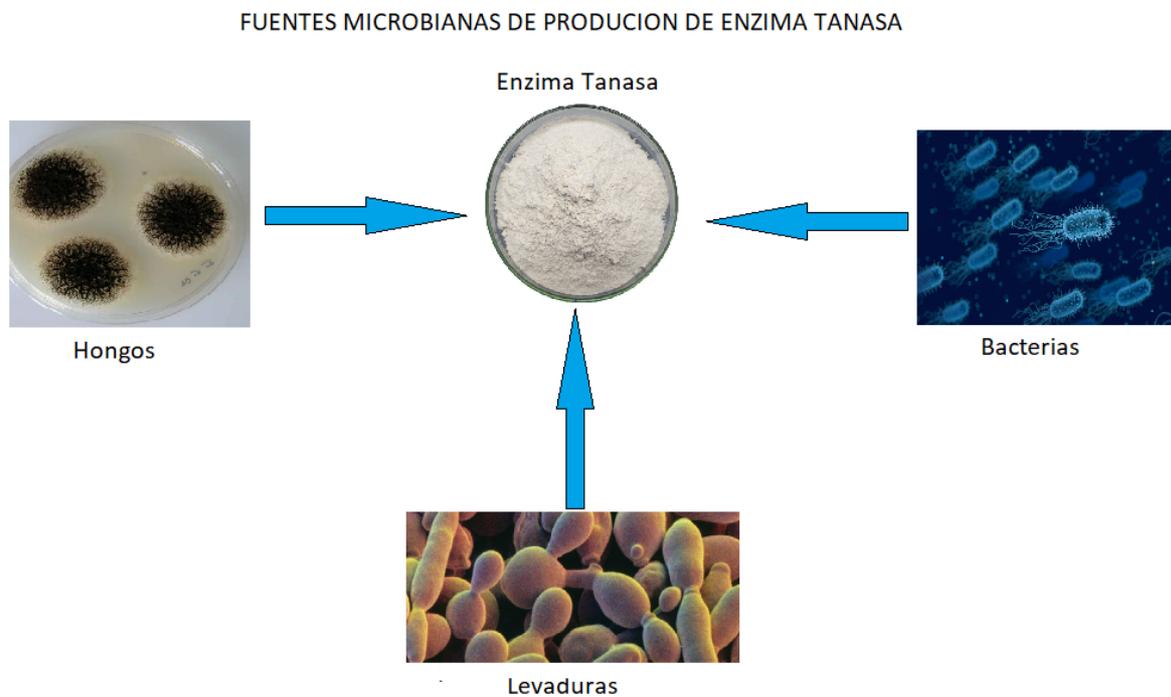
La tanasa fue descubierta por Scheele en 1786, inicialmente se caracterizó a partir de plantas, posteriormente se realizaron diversas investigaciones para determinar su viabilidad de producción, aislamiento y aplicación a partir de fuentes microbianas como los hongos, bacterias y levaduras.

Comprobando que las tres fuentes microbianas eran capaces de producir tanasa, pero que cada una tiene sus propias especificidades.

Se sabe que la tanasa a partir de levadura es muy selectiva en cuanto a su sustrato, teniendo una preferencia por el ácido tánico.

Por otro lado, la tanasa fúngica es bastante versátil en cuanto a su selección de sustrato, demostrando su capacidad para degradar diferentes tipos de taninos, pero muestra una baja afinidad por los taninos naturales.

Finalmente, la tanasa a partir de fuentes bacterianas también es capaz de degradar con eficiencia diferentes tipos de taninos, pero a diferencia de las tanasa fúngica muestra una mayor afinidad hacia los taninos naturales (19).



**Figura 3.** Microorganismos capaces de producir enzima tanasa.

*Nota:* Adaptado de (19)

#### 4.1. Propiedades bioquímicas de la enzima tanasa

Las propiedades bioquímicas de la tanasa son variables y dependientes de las condiciones de cultivo, así como de la fuente de producción.

En cuanto al peso molecular de la enzima tanasa se conoce un rango variado entre 40 y 320 KDa, una tolerancia de temperatura entre 30°C y 50°C, con un rango de temperatura óptima de 30°C a 40°C. Sin embargo, gracias a nuevas actualizaciones e investigaciones recientes, se han reportado nuevos rangos óptimos de temperatura de producción, como es el caso de las enzimas termófilas encontradas que mostraron un rango de temperatura óptima entre 50°C y 70 °C, por

otro lado, se encontró un microorganismo productor psicrófilo aislado de la antártica que mostró una actividad de producción óptima a los 20 °C.

La enzima tanasa según estudios, muestra una actividad óptima en un rango de pH ácido entre 4.3 a 6.5 y un punto isoeléctrico entre 4.3 a 5.1.

Aunque estos son los valores más utilizados, gracias a recientes estudios realizados se ha logrado encontrar enzimas con rangos de pH más amplios, como la tanasa proveniente a partir de *Bacillus sphaericus* que mostró una actividad máxima del 80% a pH alcalino y por otro lado también existen informes de tanasas con un pH óptimo de actividad de 2.0.

Otra de sus propiedades bioquímicas de interés respecto a la actividad tanasa fue la influencia de iones metálicos divalentes. Por lo tanto, se tiene evidencia de que iones divalentes como el  $Mg^{2+}$  potencian la actividad tanasa y se sabe que iones como el  $Hg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Ba^{2+}$  tienen un efecto inhibitorio sobre el rendimiento de la actividad tanasa (20).

**Tabla 4.** Características más habituales para llevar a cabo la reacción enzimática de la enzima tanasa.

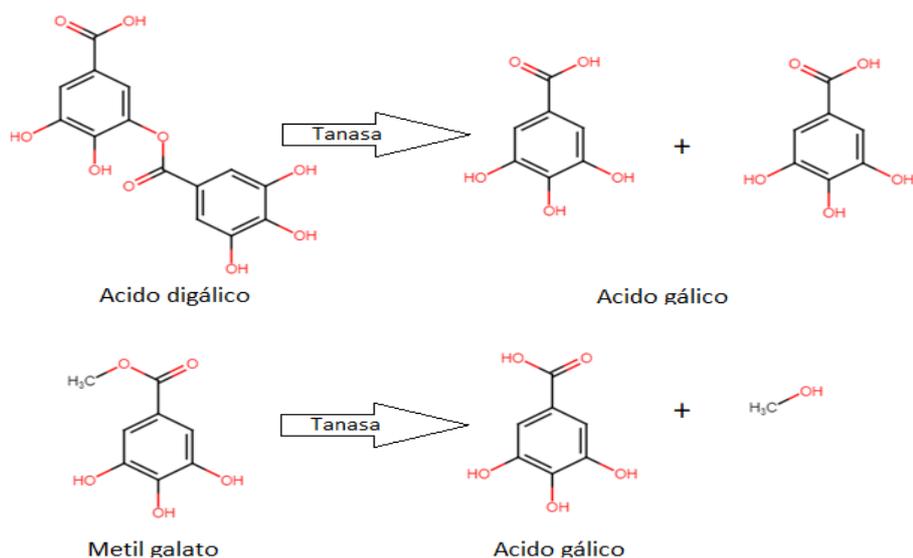
<b>CARACTERÍSTICAS HABITUALES DE LA ENZIMA TANASA</b>	
<b>Características</b>	<b>Rango</b>
Temperatura	30 °C – 40 °C
pH	4.3 – 6.5
Punto Isoeléctrico	4.3 – 5.1
Iones metálicos divalente que aceleran la actividad enzimática	$Mg^{2+}$
Iones metálicos divalentes que inhiben la actividad enzimática	$Hg^{2+}$ , $Zn^{2+}$ , $Ca^{2+}$ y $Ba^{2+}$

*Nota:* Adaptado de (20)

#### 4.2. Mecanismo de acción de la enzima tanasa

La tanasa es una enzima muy versátil conocida por su capacidad de hidrolizar los taninos y esterres de ácido gálico, para obtener moléculas más simples como ácido gálico y la glucosa.

Actualmente se sabe que la enzima tanasa cuenta con dos tipos de mecanismos, la actividad esterasa que cataliza la hidrólisis de enlaces ester de grupos funcionales terminales como el galato de metilo y la actividad depsidasa que divide los enlaces ester centrales de los depsidos como el ácido digálico (21).



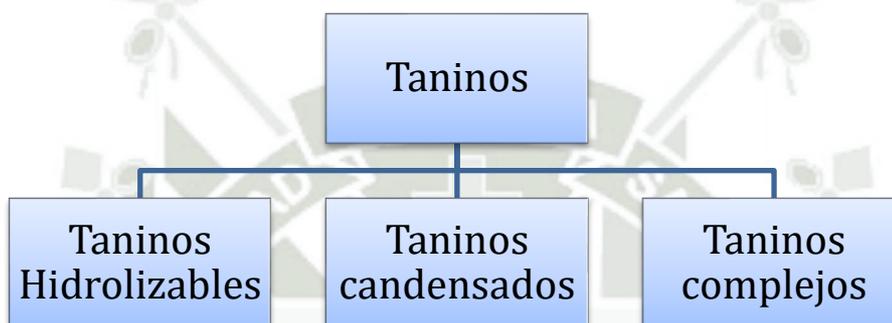
**Figura 4.** Reacción de hidrólisis de la enzima tanasa sobre el ácido digálico y el metil galato. *Nota:* Adaptado de (21)

#### 5. Taninos:

Los taninos son compuestos polifenólicos solubles en agua, normalmente se encuentran en las plantas como metabolitos secundarios y tienen efectos tóxicos para algunos microorganismos, pero gracias a su capacidad de adaptabilidad, estos microorganismos han desarrollado resistencia a la toxicidad de los taninos apoyándose en la producción de enzimas, degradándolos en derivados simples muy útiles como ácido gálico o pirogalloil usando la enzima tanasa (22).

### 5.1. Clasificación de los taninos

Los taninos pueden ser subdivididos en taninos hidrolizables (galotaninos y elagintaninos), taninos flavonoides condensados (proantocianidinas) y taninos complejos (23).



**Figura 5.** Clasificación de los taninos. *Nota:* Adaptado de (23)

### 5.2. Funciones de los taninos

Su función más importante en las plantas es protegerlas de bacterias, hongos, insectos, infecciones o depredadores simples y sus principales características son la complejación, así como la precipitación de proteínas debido a que contienen grupos hidroxilos y anillos aromáticos, lo que les da la capacidad de formar complejos con macromoléculas como membranas celulares bacterianas o carbohidratos (24).

### 5.3. Aplicaciones de los taninos

Son reconocidos y demandados en la industria por su capacidad comprobada de ser fuertes antioxidantes (25).

Existen avances significativos los cuales demuestran que la reacción de los taninos con las macromoléculas de los alimentos, como las proteínas y polisacáridos, al igual que las proteínas salivares están relacionadas con la astringencia y amargor (26).

Los taninos tienen un efecto astringente en los jugos, por consiguiente, el uso de la tanasa es muy demandado en esta industria, debido a su capacidad para atenuar este efecto astringente y dar un valor agregado al producto final (27).

También son muy valorados por su uso en la industria del cuero, fundamentalmente por la tendencia de aplicar procesos amigables con el medio ambiente es que se optó por usar taninos de origen vegetal. La acción de los taninos en el proceso de curtido de pieles está relacionada con la formación de puentes de hidrógeno que se establecen entre los taninos y los grupos funcionales de las proteínas, los cuales estabilizan la piel, para luego convertirla en cuero (28).

## **6. Ácido Gálico:**

El ácido gálico es un compuesto que forma parte del ácido tánico, el cual ha despertado el interés de muchas industrias por sus beneficios y propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antibacteriales, antiinflamatorias, así como su uso para mejorar la calidad de los productos en la industria de bebidas (29).

## **7. Upstream de la enzima tanasa**

### **7.1. Sistemas biológicos productores de enzima tanasa:**

Debido al interés de muchas industrias por los usos de la enzima tanasa para mejorar sus productos es que constantemente se vienen investigando nuevas fuentes de microorganismos productores de enzima tanasa, entre bacterias, hongos y levaduras.

Con el avance de la tecnología en el campo de la genética también se vienen modificando microorganismos para optimizar la producción de tanasa, haciéndolas más eficientes y eficaces (30).

### 7.1.1. Algunos microorganismos productores de enzima tanasa:

**Tabla 5.** Tabla de referencia de algunos microorganismos productores de enzima tanasa y su fuente de aislamiento.

Microorganismos	Fuente de aislamiento
<i>Penicillium notatum</i>	Frutas, pan, queso
<i>Emericella nidulans</i>	Desechos orgánicos en descomposición
<i>Aspergillus phoenicis</i>	Desechos orgánicos en descomposición
<i>Penicillium herquei</i>	Papa, plátano y zanahoria
<i>Aspergillus niger SH 2</i>	Desechos orgánicos en descomposición
<i>Aspergillus oryzae</i>	Desechos orgánicos en descomposición
<i>Aspergillus niger attc 16620</i>	Desechos orgánicos en descomposición
<i>Atopobium parvulum</i>	Cavidad oral humana
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Zumo de tomate, frutas y hortalizas
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	Piel y membranas mucosas
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	Intestinos de rumiantes y flora intestinal humana
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Mucosa oral, vaginal e intestinal
<i>Lactobacillus pentosus</i>	Forraje de maíz
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	Cerveza y heces humanas
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	Intestinos de rumiantes y flora intestinal humana

---

*Streptomyces sviveus*Suelo, estiércol y otras fuentes

---

*Nota:* Adaptado de (30)

### 7.1.2. *Lactobacillus* como productores de tanasa extracelular:

La tanasa es preferentemente producida por bacterias y hongos, sin embargo, estudios demuestran el interés de la comunidad médica por encontrar nuevas fuentes para la producción de enzima tanasa por su capacidad de producir ácido gálico, un antioxidante muy valorado en las terapias médicas. Por lo tanto, se evalúa el potencial de las bacterias ácido-lácticas de sintetizar la enzima tanasa, al ser las más importantes de todos los cultivos probióticos.

Según un estudio de 10 bacterias ácido-lácticas, 3 fueron las que presentaron mayor actividad de tanasa. *Lactobacillus rhamnosus* LB3, *Lactobacillus bulgaricus* LB51 y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *delbruekii*, las cuales luego de 48 horas de incubación mostraron los siguientes resultados:  $0.031 \pm 0.002$  U/mL,  $0.013 \pm 0.001$  U/mL y  $0.03 \pm 0.002$  U/mL, respectivamente (31).

**Tabla 6.** Tabla comparativa de la actividad tanasa de 3 cepas del género *Lactobacillus*.

Cepas de género <i>Lactobacillus</i>	Actividad tanasa (48 horas de incubación)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB3	$0.031 \pm 0.002$ U/mL
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> LB51	$0.013 \pm 0.001$ U/mL
<i>Lactobacillus delbruekii</i> subsp. <i>delbruekii</i>	$0.03 \pm 0.002$ U/mL

*Nota:* Adaptado de (31)

### 7.1.3. Bacterias patógenas como fuentes productoras de enzimas

La alta demanda de enzima tanasa en diferentes áreas industriales han llevado a considerar la investigación de otros tipos de microorganismos que no han sido tomados en cuenta, como es el caso de las bacterias patógenas, con el fin de determinar si estas pueden aportar beneficios mayores que las bacterias no patógenas y si estos mismos pueden ser utilizados de manera segura.

Por este interés, un estudio se enfocó en hacer una comparativa entre las tanasas bacterianas patógenas y las tanasas bacterianas no patógenas.

En este estudio se analizaron 309 secuencias de tanasas bacteriana de ambos grupos y se determinaron sus propiedades fisicoquímicas y evolutivas.

Luego de su respectivo análisis se determinó que la secuencia de tanasa de bacterias patógenas contiene un alto número de residuos formadores de desorden, (las que podrían ser las causantes de algunas enfermedades en los humanos y animales). Y en el caso de la secuencia de tanasas bacteriana no patógenas, estas tiene un elevado número de residuos formadores de orden esto indicaría según la escala de GRAVY que tiene un valor negativo y por lo tanto tiene una naturaleza hidrofílica, es decir que la tanasa bacteriana no patógena tiene afinidad por el agua y podría ser fácilmente mezclada con algún medio líquido o acuoso, una característica muy útil si se desearía ser aplicada a procesos industriales, a diferencia de la tanasa bacteriana patógena que al contar con un bajo número de residuos formadores de orden tienen una naturaleza hidrofóbica.

También se encontró que las tanasas bacterianas no patógenas tienen una alta cantidad de puentes salinos, mucho mayor que la cantidad encontrada en las tanasa bacteriana patógena, propiedad que le confiere una alta estabilidad en condiciones ambientales extremas como elevadas temperaturas y altos contenidos de sal.

Por lo tanto, según este estudio la elección de una tanasa proveniente de bacterias no patógenas sería más conveniente, si se planea introducir la enzima tanasa en procesos industriales a gran escala, pero dependerá de las condiciones requeridas para dicho proceso industrial (32).

#### 7.1.4. Bacterias endófitas como fuentes productoras de tanasa

Las bacterias endófitas son un grupo especial de bacterias que no está muy estudiado en cuanto a su uso como fuente productora de enzima tanasa, pero que por su naturaleza puede contener un gran potencial, debido a que estas crecen y se desarrollan dentro de las plantas, que en su mayoría están compuestas por una amplia variedad de taninos, por lo que la bacteria endófitica, (que no tiene una función antagónica hacia la planta huésped, considerada asintomática) busca la manera de sobrevivir y adaptarse por medio del uso de enzimas.

Al estar en contacto directo con los taninos de la planta huésped existe una alta probabilidad de desarrollar la capacidad de producir la enzima tanasa para hidrolizar los taninos de la planta y usarlos como fuente nutricional para su desarrollo propio.

Por lo tanto, como se demuestra en la siguiente investigación, existe una gran oportunidad de extraer enzima tanasa a partir de actinobacterias endófitas.

Se aislaron 10 bacterias a partir de hojas de *Ailanthus excelsa* bajo la hipótesis de encontrar bacterias con actividad tanasa.

Las cepas fueron inoculadas en un medio sólido de agar con ácido tánico y se identificó la cepa con mayor actividad tanasa basándose en el tamaño de formación de la zona transparente alrededor de la colonia.

Esta cepa fue caracterizada morfológica y bioquímicamente, determinando que se trataba de una actinobacteria gram positiva y mediante su secuenciación genética se encontró una correlación con la bacteria *streptomyces*, por lo que se le denominó *streptomyces sp. ALIL*.

Posteriormente se estudió su capacidad enzimática en 500 mL de medio líquido. Obteniendo una actividad del extracto crudo de 9.96 U/mL y una actividad relativa en la muestra purificada de 15.6 U/mL.

Finalmente, se determinaron sus condiciones óptimas, definiendo un pH de 6, una temperatura de 35°C y una concentración óptima de 100 mg/mL de ácido tánico como sustrato (33).

**Tabla 7.** Actividad enzimática de *Streptomyces sp. AL1L*.

<i>Muestra de Streptomyces sp. AL1L</i>	Actividad enzimática
Extracto crudo	9.96 U/mL
Muestra purificada	15.6 U/mL

*Nota:* Adaptado de (33)

### 7.1.5. Levaduras no convencionales como productoras de enzima tanasa

Existen pocas investigaciones respecto a la oportunidad que pueden brindar las levaduras como productoras de enzima tanasa, debido a que principalmente las enzimas son producidas por hongos y en segundo lugar por bacterias, pero las levaduras tienen algunas características que pueden beneficiar a la producción de enzimas en cuanto a reducción de costo y de tiempo, ya que se evita la fase de adaptación de los hongos y bacterias.

Es por eso que se analizó la capacidad de la actividad enzimática de tanasa de levaduras no convencionales para producir ácido elágico.

Se evaluaron 20 levaduras, de las cuales 9 fueron seleccionadas para su análisis y se utilizó como inductor el ácido tánico a tres concentraciones diferentes de 3%, 2% y 1 %, también se utilizó como control un medio con 0 % de ácido tánico.

Se determinó que, en cuanto a su crecimiento celular, este disminuye en relación con el aumento de ácido tánico por la acidificación del medio, debiéndose mantener a un pH de 5.0 para obtener una mejor reacción.

Respecto a la actividad enzimática, usando el método de rodanina por espectrofotometría, se determinó que existe una relación directa, es decir, a mayor concentración de ácido tánico mayor es la actividad enzimática (34).

**Tabla 8.** Actividad enzimática de tanasas de levadura usando ácido tánico como sustrato inductor.

<b>ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE TANASA (MMOL/MIN MG PROTEÍNA)</b>			
<b>Levaduras</b>	<b>Concentración de Ac. Tánico</b>		
	<b>1%</b>	<b>2%</b>	<b>3%</b>
<i>D. Hansenii</i> PYC 2968	0.2613	0.5832	1.0085
<i>C. Utilis</i>	0.1713	0.4300	0.7262
<i>C. Parapsilosis</i>	0.2532	0.6664	1.0876
<i>P. Kluyvery</i>	0.5744	0.5458	0.5601
<i>I. Terricola</i>	0.4954	0.3781	0.5640
<i>P. Pastoris</i>	0.3642	0.6911	1.3124
<i>D. Hansenii</i> PYC ISA 1510	0.2836	0.8365	1.1521

Nota: Adaptado de (34)

#### 7.1.6. Levaduras probióticas como productoras de enzima tanasa

Otro estudio con relación a la aplicación de levaduras productoras de enzima tanasa que aún no ha sido muy explorado, se centra en la posibilidad de trabajar con levaduras probióticas, ya que la mayoría de los microorganismos probióticos está representada por bacterias.

Para tomar en cuenta esta posibilidad, se evaluó la reacción de la levadura *Sporidiobolus ruineniae* A45.2 usando taninos como sustrato, para determinar su potencial como probiótico multifuncional en acuicultura.

Se aisló la levadura *Sporidiobolus ruineniae* A45.2 a partir de Miang y se evaluaron diferentes variables para determinar su viabilidad como potencial levadura probiótica, iniciando por su capacidad para crecer y la estabilidad de su tanasa asociada a la célula (CAT) bajo condiciones

simuladas del tracto gastrointestinal, dando un resultado positivo, con una retención de la actividad enzimática del 90 %, también fue capaz de adaptarse a un pH de 2 a 3, que es el valor de pH del tracto gastrointestinal de los peces, adicionalmente se probó su adaptabilidad a diferentes variables como sales biliares, peptina y pancreatina a los cuales no mostro un efecto inhibitor significativo.

Luego se midió su habilidad de autoagregación y coagregación, siendo estas necesarias para el buen funcionamiento de un probiótico. La autoagregación, que es su capacidad para colonizar el ambiente intestinal, fue superior a la mayoría de las bacterias patógenas de los peces que oscilan entre un 15% – 35% y la *Sporidiobolus ruineniae* A45.2 dio un resultado de 88.2 %. En cuanto a la coagregación, que es la capacidad para convivir con otras bacterias sin ser inhibida, se mostró un resultado positivo, es decir, no fue afectada por las bacterias patógenas.

Su habilidad para degradar ácido tánico con ayuda de la CAT en ácido gálico y glucosa, también le da capacidad de producir carotenoides, adicionalmente se encontró poder antioxidante en sus células.

Todas estas características le dan la facultad a la levadura *Sporidiobolus ruineniae* A45.2 de ser un potencial probiótico multifuncional, comprobando la amplitud de la aplicación de la enzima tanasa en diferentes campos industriales como la alimentación de animales, en este caso en específico en la industria de los peces (35).

#### **7.1.7. Caracterización de enzimas provenientes de una misma fuente microbiana**

Existe muy poca información acerca de la caracterización de enzimas tanasas provenientes de una misma fuente microbiana, como es el caso de tanasas a partir de *Clostridium butyricum*.

Mediante el análisis de secuenciación se logró identificar 3 tipos de tanasa, las cuales fueron llamadas CbTan1, CbTan2 y CbTan3, se pudo apreciar que CbTan1 y CbTan3 tienen una péptido señal, por lo que se presume que estas enzimas son secretadas y activas fuera de la célula, por otro lado, la enzima CbTan2 al no tener señales de péptidos se puede deducir que se trata de una enzima intracelular.

Se realizó una caracterización mediante la ubicación de las enzimas en su árbol filogenético, descubriendo que tiene una baja similitud en su secuencia, mostrando que las tanasas de *Clostridium butyricum* poseen sitios activos conservados entre ellas, pero también diversas inserciones que reflejan distintos roles biológicos.

Para determinar la comparación respecto a sus parámetros cinéticos, se usaron diferentes sustratos: metil galato (MG), propil galato (PG) y  $\beta$ -glucogalin (GG), como resultado, todas las enzimas presentaron reacciones positivas a la activación de enzima – sustrato.

La enzima CbTan1 mostró un Km para el sustrato GG 3 veces menor y un Kcat/KM 20 veces mayor para GG que los sustratos MG y PG, lo que demuestra su preferencia y especificidad hacia la glucosa de GG.

La enzima CbTan2 mostró un Km y Kcat/Km similar para los 3 sustratos probados, lo que indica que esta enzima puede adaptarse a cualquiera de los 3 sustratos.

La enzima CbTan3 mostró un Km similar tanto para PG y GG, pero un Kcat 30 veces mayor para PG, resultando en un Kcat/Km 24 veces mayor para GG.

Lo que demuestra que CbTan1 y CbTan3 tienen una mayor preferencia por la glucosa, que exhibida por la enzima CbTan2.

**Tabla 9.** Especificidad por sustratos de 3 enzimas tanasas caracterizadas a partir de *Clostridium Butyricum*.

Enzimas caracterizadas a partir de <i>Clostridium butyricum</i>	Sustrato de preferencia
CbTan1	GG
CbTan2	GG
CbTan3	MG, PG y GG

*Nota:* Adaptado de (36)

Todas estas pruebas sirvieron para demostrar que las enzimas caracterizadas provenientes de un mismo microorganismo pueden presentar diferencias entre sí, tanto estructurales como en sus funciones (36).

### 7.1.8. Comparación de hongos productores de tanasa aislados de la misma zona y determinación de los hongos de mayor rendimiento

Una de las ventajas de los hongos en cuanto a la producción de enzima tanasa respecto a las bacterias, es la mayor resistencia a elevadas concentraciones de ácido tánico, por lo tanto, se suele invertir más esfuerzo en investigar y comparar distintos hongos productores bajo diferentes variantes ambientales.

Se aislaron 15 hongos productores de tanasa a partir de la misma zona (suelo bajo hojas de almendro en proceso de deterioro natural y suelo circundante) y se analizó la capacidad productora de enzima tanasa de los 15 hongos, utilizando el método Pinto et al. Se incubaron en placas de agar con medio TSAM (Tannase screening agar médium) a 28°C por 96 horas, luego de la incubación se midieron las zonas de hidrólisis del ácido tánico utilizando FeCl<sub>3</sub> como marcador.

Identificando a las 3 cepas que formaron el mayor halo equivalente a 83 mm, a comparación del resto que formaron halos entre 72 mm a 20 mm, bajo este criterio se identificaron los hongos de mayor capacidad productora utilizando un método cualitativo.

Entre las 3 mayores productoras se identificó el *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* y *Aspergillus flavipes*, para dichos hongos productores de tanasas se determinaron los siguientes resultados usando el método espectrofotométrico sharma et al. con un indicador de rodanina. *Aspergillus niger* (76.632 ± 0.002 U/mL), *Aspergillus flavipes* (71.345 ± 0.001 U/mL) y *Penicillium sp* (73.822 ± 0.002 U/mL).

**Tabla 10.** Tabla comparativa para la elección de microorganismos hiperproductores de enzima tanasa.

Hongos aislados	Zona de tanino hidrolizada (mm)	Microorganismos hiperproductores identificados	Actividad enzimática (U/mL)
Asilado 1	83	<i>Aspergillus niger</i>	76.632 ± 0.002
Asilado 2	83	<i>Aspergillus flavipes</i>	71.345 ± 0.001

---

Asilado 3	83	<i>Penicillium sp.</i>	73.822 ± 0.002
Asilado 4	72	No identificado	No determinada
Asilado 5 – 15	67 – 20	No identificado	No determinada

---

*Nota:* Adaptado de (37)

A partir de este análisis se puede establecer una metodología para comparar cepas y elegir los mejores candidatos productores de enzima tanasa antes ser investigados y aplicados en algún proceso industrial, reduciendo tiempo y costos de investigación que a gran escala pueden presentar una diferencia económica muy grande (37).

#### **7.1.9. Comparación de tanasa comercial vs tanasa producida por *Aspergillus terreus*.**

Los taninos son conocidos por sus múltiples aportes positivos a la salud, pero en la industria alimentaria de animales también se sabe que a elevadas concentraciones puede traer efectos negativos en la digestión de los alimentos por parte de los animales que la ingieren.

Es por eso que se visualiza a la tanasa como una solución a este problema por su habilidad de hidrolizar los taninos.

En un estudio se comparó los resultados de la aplicación de 2 tanasas, una de procedencia comercial y otra nueva tanasa producida por *Aspergillus terreus*, para comprobar su efecto en la digestión de cabras.

Para este estudio se utilizaron 30 cabras como muestra, divididas en 3 grupos de forma aleatoria, que fueron alimentadas y evaluadas durante 9 semanas, adicionando 10 % de cáscara de granada a su alimentación balanceada.

Adicionalmente, a la dieta para el primer grupo de cabras se le agregó la enzima comercial (comprada de Tannase-KTFHR, Ifia Japón, Tokio, Japón) a una concentración de 500 UI/kg de alimento. A la dieta destinada al segundo grupo se le adicionó la nueva enzima tanasa producida a partir de *Aspergillus terreus* a una concentración de 500 UI/Kg de alimento, finalmente a la dieta destinada para el tercer grupo de cabras no se le agregó nada y se le asignó como grupo control.

Los resultados demostraron que ambas tanasas tuvieron efectos positivos en la alimentación de las cabras disminuyendo su consumo de alimento y aumentando su digestión, pero la tanasa producida por el *Aspergillus terreus* proporcionó mayores beneficios que la tanasa comercial.

La nueva tanasa aumentó la digestibilidad de la dieta, respecto a la tanasa comercial, además que incrementó las proteínas totales en sangre y la concentración de glucosa.

En el análisis de las muestras de leche extraídas de las cabras, se pudo apreciar que la leche mejorada por acción de la nueva tanasa producida por *Aspergillus terreus* aumentó su producción y eficiencia alimenticia sin afectar la composición de la leche, ya que redujo los ácidos grasos insaturados totales, aumentó los ácidos grasos poliinsaturados totales y la concentración de ácido linoleico total de la leche.

Por otro lado, la tanasa comercial incrementó el total de ácidos grasos saturados y el índice aterogénico (lo que significa un aumento del colesterol malo y una disminución del colesterol bueno, elevando el riesgo de enfermedades cardiovasculares).

Las dos tanasas tuvieron algunos efectos similares en la leche de cabra, redujeron los aminoácidos esenciales totales, los aminoácidos esenciales no totales, los aminoácidos condicionales totales y los aminoácidos ramificados totales.

Concluyendo que, si bien ambas enzimas tienen efectos positivos tanto en la digestión alimenticia de las cabras, como en su producción y valor nutricional de la leche extraída, la tanasa producida por *Aspergillus terreus* mostró mejores resultados en comparación con la tanasa comercial (38).

#### **7.1.10. Comparación de los sistemas biológicos analizados**

De los microorganismos analizados se pudo evidenciar que los que presentaron mayor actividad enzimática fueron los del género *Aspergillus*, obteniendo una tanasa con actividad enzimática de 76.6 U/mL y siendo las levaduras *P. Pastoris* la que obtuvo la enzima tanasa con menos actividad enzimática, 0.0013 U/mg.

**Tabla 11.** Tabla comparativa de la actividad enzimática de sistemas biológicos.

Tipo de microorganismo	Microorganismo	Actividad enzimática (U/mL)	Referencia
Hongo	<i>Aspergillus niger</i>	76.632	(37)
Hongo	<i>Penicillium sp.</i>	73.822	(37)
Hongo	<i>Aspergillus flavipes</i>	71.345	(37)
Bacteria Endofítica	<i>Streptomyces sp. AL1L</i>	15.6	(33)
Bacteria lactobacillus	<i>Lactobacillus rhamnosus LB3</i>	0.031	(31)
Levadura	<i>P. Pastoris</i>	0.0013 (U/mg)	(34)

## 7.2. Diseño y preparación del medio de cultivo para la obtención de enzima tanasa:

Existen múltiples métodos y variantes para la obtención de la enzima tanasa, pero uno de los más utilizados para su producción, se realiza a través de la fermentación con microorganismos (39).

### 7.2.1. Métodos de fermentación para la obtención de tanasa microbiana

En este método se agrupan principalmente dos variantes:

La fermentación sumergida y la fermentación en estado sólido, llegar a una conclusión generalizada respecto a cuál de estas dos variantes es la mejor es muy complicado, ya que cada una tiene ventajas y desventajas las cuales se acomodan a ciertas circunstancias, que el personal

autorizado deberá tener en cuenta dependiendo del sustrato y microorganismo utilizado, así como el grado de purificación y calidad del producto que se desea obtener (39).

#### 7.2.1.1. Fermentación sumergida

La fermentación sumergida normalmente es aplicada en procesos industriales usando como fuente productora a las bacterias y levaduras, este método se encuentra muy influenciado tanto por los factores nutricionales como fisicoquímicos que se usan en la elaboración de la enzima tanasa, las condiciones promedio para optimizar su producción en un medio de fermentación sumergida suele ser a una temperatura de 30°C a 40°C, un pH de 5.0 a 7.5, una agitación de 100 a 300 rpm y un tiempo de incubación de 24 a 91 horas (39).

**Tabla 12.** Condiciones fisicoquímicas promedio aplicadas en la producción de enzima tanasa en un medio de fermentación sumergida.

<b>FERMENTACIÓN SUMERGIDA</b>	
<b>Condiciones fisicoquímicas en el medio</b>	<b>Rango promedio</b>
Temperatura	30°C – 40 °C
pH	5.0 – 7.5
Agitación	100 – 300 rpm
Tiempo de incubación	24– 91 horas

*Nota:* Adaptado de (39)

#### 7.2.1.2. Fermentación en estado sólido

En el caso de la fermentación en estado sólido, normalmente es aplicada en procesos industriales, pero usando como fuente productora a los hongos, aunque tanto la fermentación sumergida como la fermentación en estado sólido tienen sus propias ventajas y desventajas,

existe cierta preferencia por la fermentación en estado sólido debido a que la mayoría de producción enzimática de la tanasa es de naturaleza extracelular, característica que se ve favorecida en la fermentación en estado sólido ya que facilita el proceso de extracción y purificación a comparación de la fermentación sumergida, adicionalmente a esto la fermentación en estado sólido tiene requerimientos de consumo de agua y energía menores que en el caso de la fermentación sumergida. Las condiciones promedio para una producción óptima de enzima tanasa en un medio en estado sólido suele ser a una temperatura de 25°C a 35°C, un pH de 4.5 a 6.5, un periodo de incubación de 48 a 120 horas, una suspensión de esporas de  $10^6$  a  $10^{10}$  por mililitro y una humedad en proporción de 1:1 a 1:2 o de 40% a 90% (39).

**Tabla 13.** Condiciones fisicoquímicas promedio aplicadas en la producción de enzima tanasa en un medio de fermentación en estado sólido.

<b>FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO</b>	
<b>Condiciones fisicoquímicas en el medio</b>	<b>Rango promedio</b>
Temperatura	25 °C – 35 °C
Ph	4.5 – 6.5
Proporción de humedad	1:1 a 1:2 o de 40% a 90%.
Tiempo de incubación	48 - 120 horas

*Nota:* Adaptado de (39)

### **7.2.1.3. Principales aspectos de la fermentación en estado sólido y la fermentación sumergida**

El siguiente es un cuadro que ayudará a tomar una decisión, dependiendo de las características del proyecto a realizar.

**Tabla 14.** Tabla comparativa de las principales características de un medio de fermentación sumergida y un medio de fermentación en estado sólido.

<b>ASPECTOS CARACTERÍSTICOS</b>	
<b>Fermentación en estado sólido</b>	<b>Fermentación Sumergida</b>
Favorece el crecimiento de biomasa de hongos, al no usar agitación mecánica	Influencia positiva ante el crecimiento de microorganismos como bacterias y levaduras
Favorece la producción de tanasa fúngica	Favorece la producción de tanasa a partir bacterias y levaduras
Es recomendable para la producción de enzimas extracelulares	Es recomendable para la producción de enzimas intracelulares
Para recuperar la tanasa extracelular normalmente se usan métodos físicos y químicos, como diálisis, precipitación o ultra centrifugación.	Es necesario el uso de métodos mecánicos y enzimáticos para romper la pared celular con el fin de poder recuperar la enzima intracelular, como sonicación o el uso de quitinasa
No es recomendable para microorganismos que necesiten alto contenido de agua para crecer.	Dificultad para suministrar oxígeno de forma homogénea en el medio líquido.
La baja transferencia de oxígeno y dióxido de carbono dificulta el control a escala.	--
Esta muy influenciada por el contenido de humedad en el medio	Esta muy influenciada por factores nutricionales y fisicoquímicos
Se pueden usar desechos agroindustriales como fuentes de sustrato. También se	La glucosa, fructosa, maltosa, manitol, arabinosa, xilosa y sacarosa pueden ser usadas como fuentes de carbono

---

puede usar glucosa, ácido gálico, glicerol y lactosa.

El uso de ácido tánico como sustrato adicional para la producción de tanasa se puede desarrollar de manera óptima en un rango del 1% hasta un 12%.

El uso de ácido tánico como sustrato a concentraciones mayores al 1% provoca un decrecimiento en la producción de tanasa

---

*Nota:* Adaptado de (39)

### **7.3. Actividad enzimática de la enzima tanasa**

#### **7.3.1. Métodos de ensayo para determinar la actividad enzimática de la enzima tanasa**

Desde el siglo XVII se vienen realizando y estandarizando métodos de ensayo para determinar la actividad enzimática de la tanasa, pero muchos de ellos muestran deficiencias y limitaciones. Por lo que si se pretende introducir esta enzima a una aplicación industrial se debe hacer una investigación profunda respecto a las variables que afectan su rendimiento y más importante aún, la metodología aplicada para medir dicho rendimiento de la actividad enzimática de la enzima tanasa.

Son varios los métodos utilizados para determinar la actividad de la enzima tanasa, pero la elección de estos dependerá de la finalidad del ensayo al que quiere ser aplicado, los medios económicos disponibles, la sensibilidad del resultado, así como otras variables que deben ser consideradas, ya que cada uno de estos métodos tiene sus ventajas y limitaciones que deben ser tomadas en cuenta.

El siguiente cuadro resume los fundamentos, enfoque y consideraciones de los métodos más utilizados:

**Tabla 15.** Principales métodos para determinar la actividad enzimática de la enzima tanasa.

Método	Fundamento	Enfoque y consideraciones
Libuchi et al	Consiste en agregar etanol 90° a la muestra y medir la densidad óptica del etanol a 310 mμ.	Este método recibió críticas por dar absorciones menores a las óptimas de ácido gálico y ácido tánico
Deschamps et al	En este método se precipita los restos de ácido tánico usando albumina sérica y la actividad de la enzima tanasa se determina cuantificando el ácido gálico liberado a 260 nm.	Fue observado por mostrar resultados de absorción muy estrechos entre los valores de ácido tánico, ácido gálico y albumina sérica
Osawa y Walsh	Se fundamenta en dos bases: la capacidad de la tanasa que hidroliza galato de metilo para liberar ácido gálico y la reacción del ácido gálico liberado que al hacer contacto con el oxígeno en un medio alcalino provoca un cambio de coloración de verde a marrón.	Este es un método de lectura visual, muy simple y sencillo de realizar. Aunque su resultado solo nos da un enfoque cualitativo de la capacidad de producción de tanasa
Bradoo et al.	Se realiza en placa con la adición del indicador azul de bromocresol y sales minerales, a un agar de ácido tánico. Con la finalidad de determinar el cambio de pH del medio por acción de la degradación de ácido tánico que se evidencia en la formación de un halo alrededor de la bacteria u hongo, que representa la zona hidrolizada	Este método tiene carácter cualitativo.

---

Kumar et al.	Tiene como fundamento el cambio de color en placa por reacción de hidrolisis.	Este método realizado en placa da solo información cualitativa
	Es más rápido y eficiente que el método de Bradoo et al., ya que se obtienen resultados claros en 48 horas cuando normalmente los otros métodos presentan resultados en 3 o 4 días	
Sharma et al.	Consiste en la adición de rodanina que reacciona con el ácido gálico liberado, formando un cromógeno, al que luego se le agrega 0.2 ml de KOH 0.5 N y se incuba a 30 °C por 5 minutos. Finalmente se mide la absorbancia a 520 nm, junto con un blanco como control.	Este método tiene un enfoque cuantitativo.  Uno de los inconvenientes de este método es que el ácido tánico presente en esta reacción dificulta la formación del cromógeno, pudiendo alterar las lecturas de las absorbancias finales
Mondal et al.	Este método determina el ácido tánico residual una vez culminada la reacción enzimática, por lo que se usa ácido tánico comercial como sustrato para determinar el inicio y el final de la reacción, basándose en concentraciones conocidas de sustrato. Finalmente, la absorbancia se lee a 530 nm contra blanco.	Al usar el ácido tánico residual como sustrato para medir la actividad tanasa, la medición se ve comprometida por el ácido gálico residual, el cual hace que el blanco muestre niveles de absorbancia un poco más altos de lo normal.
Miller	Se enfoca en la determinación de la glucosa liberada una vez culminada la	Este método tiene carácter cuantitativo.

---

---

reacción enzimática, utilizando el reactivo 3.5-dinitrosalicílico, para finalmente medir su absorbancia a 540 nm.

---

*Nota:* Adaptado de (40)

Estos son algunos de los métodos más utilizados tradicionalmente en laboratorios de mediana implementación, pero en la actualidad se han desarrollado procedimientos para determinar la reacción enzimática de la enzima tanasa usando tecnologías más complejas y de mayor sensibilidad, como el HPLC o la cromatografía de gases, que miden el ácido gálico liberado después de la reacción enzimática. Pero estos métodos tienen la desventaja de ser más costosos y complejos de realizar (40).

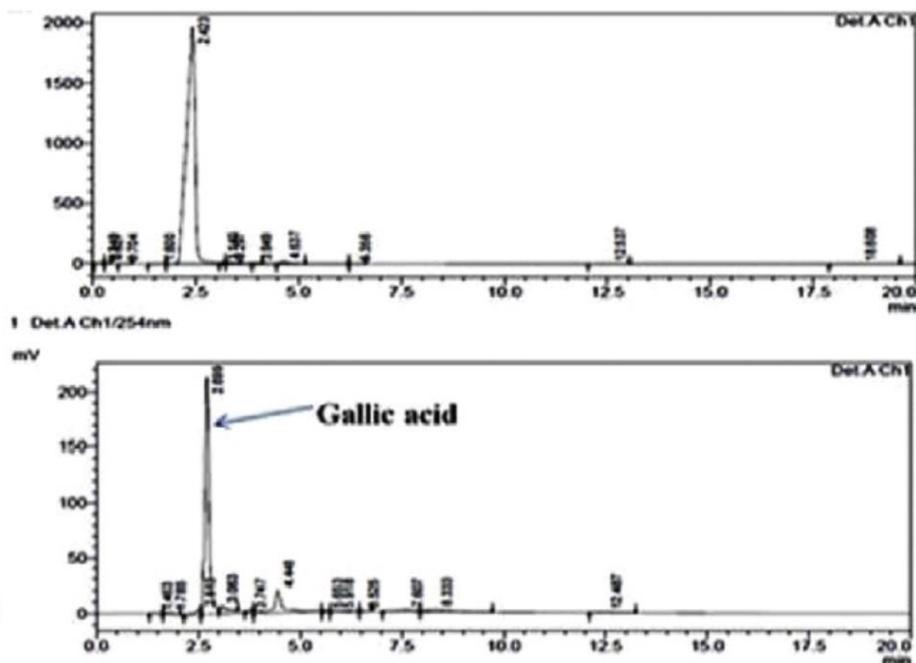
#### **7.3.1.1. Análisis de reacción enzimática mediante análisis de HPLC**

Para determinar la reacción enzimática de la tanasa se aplicó un análisis usando un sistema HPLC 1260 Agilent. Utilizando una columna C-18 pre-empaquetada (250nm, 5mm), a un flujo de 1mL/min y a 254 nm.

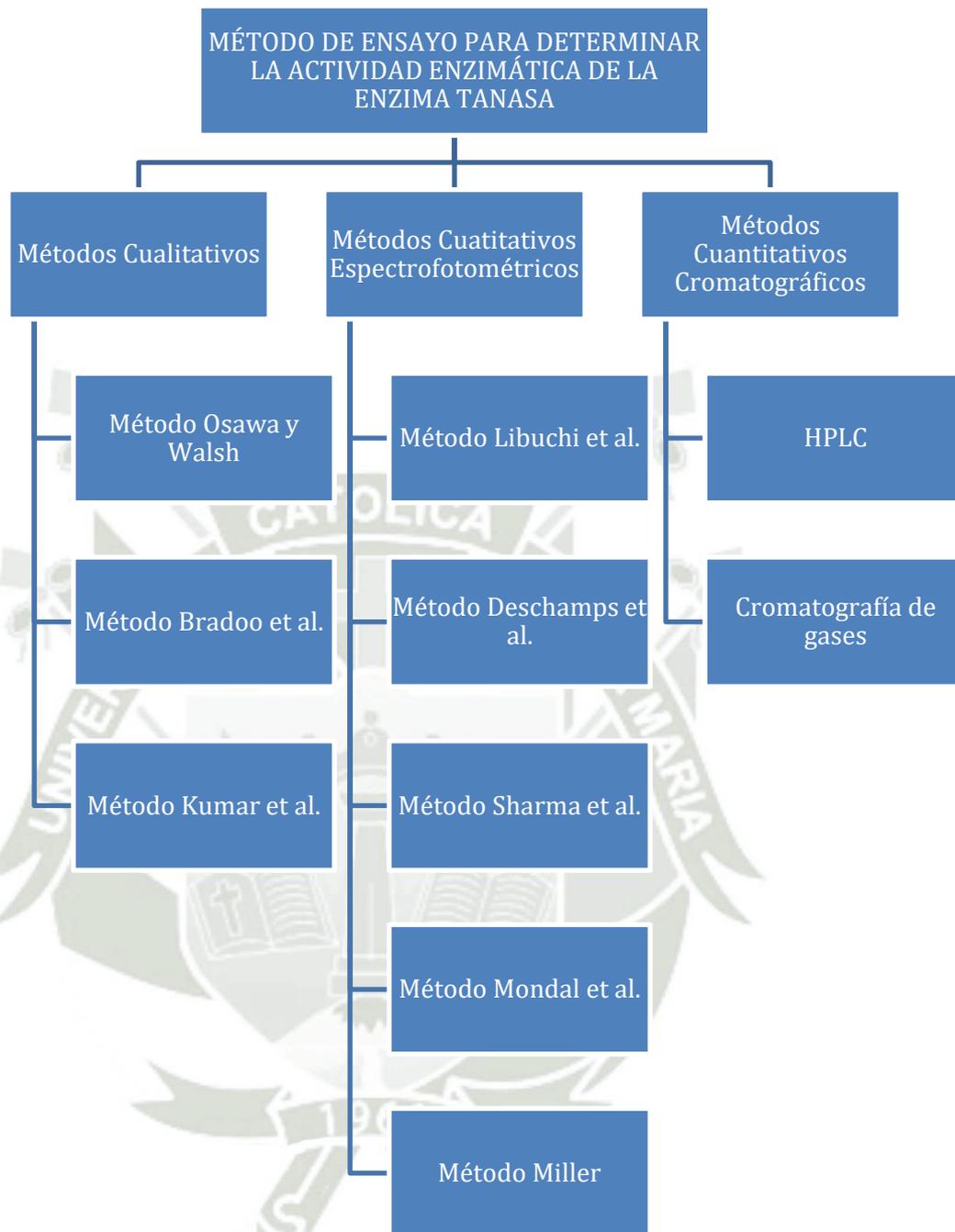
El espectro de HPLC de ácido tánico control mostró picos importantes con un tiempo de retención de 2.4 y 2.5 con una abundancia de 200 y 1500 respectivamente.

Y en el caso de la hidrólisis de ácido tánico con la enzima purificada se mostró un espectro en el que el pico principal correspondiente al ácido tánico al transformarse en ácido gálico, se desplazó a un tiempo de retención de 2.72 min, con una abundancia de 400 y se observaron 3 nuevos picos en los tiempo de retención de 4.5, 9.7 y 13.2 min correspondientes a los subproductos glucosa, galato de metilo y pirogalol formados por la hidrólisis del ácido tánico por acción de la enzima tanasa purificada.

Los resultados mostraron que la *Enterobacter cloacae* pudo hidrolizar ambas moléculas de ester para liberar ácido gálico (41).



**Figura 6.** Espectro de HPLC de una muestra de ácido tánico antes y después de ser sometida a hidrólisis de usando la enzima tanasa. *Nota:* Adaptado de (41)



**Figura 7.** Clasificación de los principales métodos de ensayo para determinar la actividad enzimática de la enzima tanasa. *Nota:* Adaptado de (40)

### 7.3.2. Efecto de factores en la actividad enzimática de la enzima tanasa

#### 7.3.2.1. Efecto de iones metálicos y quelantes en la actividad de la enzima tanasa:

Se realizaron pruebas para determinar el efecto de iones metálicos sobre la actividad tanasa producida por microorganismos, como el caso de la enzima rAntan1, que mostró una disminución en su actividad tanasa de un 32 % en promedio, debido a que los iones metálicos inhiben a la enzima tanasa al unirse con su sitio activo.

Luego de aplicar las pruebas respectivas, se determinó la actividad residual porcentual de la tanasa en comparación con el blanco que equivale a un 100%.

**Tabla 16.** Efecto de iones metálicos sobre la actividad enzimática de la Enzima tanasa rAntan1.

Iones metálicos	Actividad Residual (%)
Control	100
Na <sup>+</sup>	86
Mg <sup>2+</sup>	89
Cu <sup>2+</sup>	74
Ba <sup>2+</sup>	84
Zn <sup>2+</sup>	85
Cd <sup>2+</sup>	78
Ca <sup>2+</sup>	67
Mn <sup>2+</sup>	88
K <sup>+</sup>	107
Al <sup>3+</sup>	70

*Nota:* Adaptado de (42)

Por lo tanto, se pudo determinar que los iones metálicos estudiados redujeron la actividad enzimática en promedio un 32%, a excepción del  $K^+$  que mantuvo y mejoró la actividad levemente en un 7% (42).

### 7.3.2.2. Efecto de compuestos surfactantes e inhibidores en la actividad de la enzima tanasa

Al realizar pruebas para determinar el efecto de compuestos surfactantes e inhibidores, se obtuvo una ligera disminución en la actividad tanasa de un 12 % en promedio, a excepción del  $\beta$ -mercaptoetanol que la inhibió en un 77%, esto se debe a la reducción de los enlaces disulfuros del centro activo, restringiendo la actividad tanasa de la enzima (42).

**Tabla 17.** Efecto de compuestos surfactantes e inhibidores sobre la actividad enzimática de la Enzima tanasa rAntan1.

Surfactantes e inhibidores	Actividad Residual (%)
Control	100
Tween 80	89
Tween 20	86
Triton X-100	92
B-Mercaptoetanol	23
SDS	85
EDTA	89

*Nota:* Adaptado de (42)

### 7.3.2.3. Efecto de solventes orgánicos en la actividad de la enzima tanasa

Se realizaron pruebas para determinar el efecto de solventes orgánicos a 20%, 40 % y 60 % sobre la actividad tanasa de la enzima rAntan1. En esta investigación se muestran los resultados del 40 % que representa el valor promedio del estudio.

Se obtuvieron resultados muy variados entre compuestos, siendo el ciclohexano el de mayor poder de activación enzimática con un 257% y el N-propanol el de mayor efecto inhibitorio con una actividad del 4%.

**Tabla 18.** Efecto de solventes orgánicos sobre la actividad enzimática de la Enzima tanasa rAntan1.

SOLVENTE	ACTIVIDAD RESIDUAL (%)
	Concentración 40 %
Control	100
Dimetil sulfoxido	43
N-hexano	156
N-butanol	45
Ciclohexano	257
N-propanol	4
Alcohol Isoamil	85
Benceno	112
Metanol	23
Triclorometano	85

*Nota:* Adaptado de (42)

Esto demuestra que la elección del solvente puede influir de manera significativa actuando como catalizador o inhibidor en la actividad tanasa de la enzima (42).

## **8. Downstream de la enzima tanasa.**

Además de atenuar la problemática respecto al costo de producción, existe la dificultad de los elevados costos de purificación de la enzima tanasa a partir del medio de fermentación, teniendo en cuenta el grado de purificación que se desea alcanzar.

Para analizar la etapa de downstream se purificó una enzima tanasa producida a partir de la bacteria *Enterobacter cloacae* en un medio líquido por fermentación sumergida (41) y una tanasa producida a partir de *Aspergillus Niger*, asilada a partir de muestra de suelos (43). Se procedió a la purificación de las dos tanasas utilizando los siguientes pasos:

### **8.1. Recuperación de la enzima tanasa**

La fase de recuperación dependerá del tipo de tanasa con la que se está trabajando:

Para el caso de la tanasa intracelular, que normalmente se produce en un medio de fermentación sumergida, es necesario romper la pared celular del microorganismo para poder recuperar la enzima, por lo que se deberá aplicar métodos mecánicos como ultrasonicación, mortero y homogenización o métodos enzimáticos como el uso de quitinasa. Mientras que una tanasa extracelular, será recuperada con mayor facilidad aplicando procesos de lavado con buffer y centrifugación (39).

### **8.2. Purificación de enzima tanasa**

#### **8.2.1. Precipitación con sulfato de amonio:**

Para precipitar la tanasa de *Enterobacter cloacae*, se agregó sulfato de amonio hasta llegar a un 60 % de la muestra de tanasa cruda, posteriormente se centrifugó a 10000 x g, se suspendió con

buffer fosfato (0.2 M y pH 6), finalmente se remueve el sulfato de amonio aplicando el método de diálisis, usando una membrana de un límite de peso molecular de 50 KDa (41).

Luego de varios estudios se pudo concluir que la concentración de sulfato de amonio usada en el primer paso, en el proceso de precipitación de enzima tanasa era un factor decisivo para el rendimiento de la enzima.

Una precipitación de tanasa de *Aspergillus Niger* usando sulfato de amonio de 50% - 70% dio un rendimiento ascendente de hasta 1227.08 (unidades/mg) con una purificación de 4.89 veces y un rendimiento de 50.821 % (43).

### **8.2.2. Cromatografía de intercambio iónico usando una columna de celulosa (DEAE)**

La tanasa de *Enterobacter cloacae* recolectada en el paso previo de diálisis, se cargó y se pasó por una columna de celulosa de 17 cm x 2.5 cm a una velocidad de flujo de 1mL/2min y la fracción recolectada se almacenó a 4°C.

Hasta este punto la tanasa purificada tuvo un aumento de rendimiento de 1.45 veces, una recuperación de 29.97% y una actividad específica de 4.08 U/mg (41).

Para la purificación de tanasa de *Aspergillus Niger* se omitió este paso, pasando de frente a la cromatografía de filtración en gel (43).

### **8.2.3. Cromatografía de filtración en gel**

La proteína de *Enterobacter cloacae* extraída por DEAE se sometió a cromatografía sephadex G-100 con una solución tampón de fosfato 0.2M a pH 6 y a un caudal de 1mL/2min (41).

El siguiente paso para la tanasa de *Aspergillus Niger* fue la filtración en gel usando AKTA Pure 25 Superdex 200 10/300 GL. La muestra de tanasa sometida a filtración en gel se midió a una longitud onda de 280nm para determinar la concentración de proteína, obteniendo el pico más alto representativo de una actividad enzimática de 525.12 (unidades/mL), una purificación de 11.629 veces y un rendimiento de 18.40 % (43).

#### 8.2.4. Electroforesis en gel (SDS-PAGE)

Las fracciones de tanasa de *Enterobacter cloacae* recolectadas se examinaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), adicionalmente se usaron marcadores de peso molecular de 10 KDa a 240 KDa y luego se tiñeron con azul brillante de coomassie R250.

En este proceso la tanasa tuvo un aumento en el rendimiento de 1.96 veces, una recuperación de 20.25 % y una actividad específica de 5.51 U/mg.

A partir de la aplicación de (SDS-PAGE) se determinó la homogeneidad de la enzima purificada, mostrando un peso molecular para la tanasa de 45 KDa, (todos los procesos se realizaron a 4°C) (41).

Finalmente, la tanasa de *Aspergillus Niger* proveniente del proceso de filtración en gel poliacrilamida fue sometida a electroforesis junto a otra muestra de extracto crudo en ausencia de sustancias desnaturalizantes de proteína SDS. En la muestra de extracto crudo se obtuvieron 6 bandas de proteínas y en la muestra filtrada se obtuvo una sola banda de proteína que representa a la enzima tanasa, resultado similar al encontrado en investigaciones citadas en la fuente de esta investigación (43).

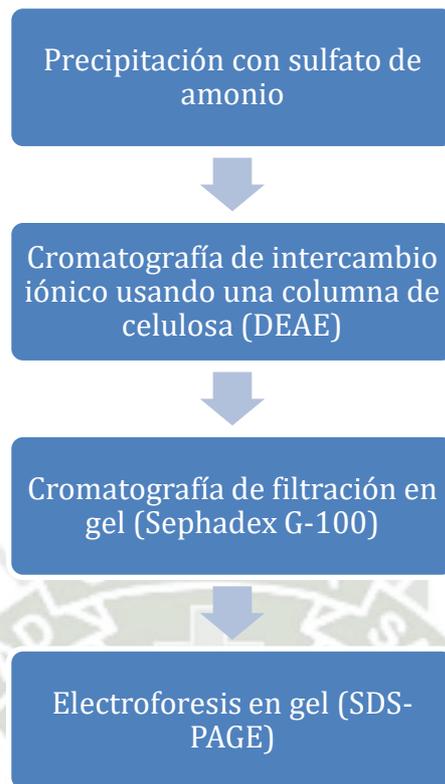
#### 8.3. Determinación de la pureza de la enzima tanasa:

Para determinar el peso molecular de la proteína se usó espectrometría de masas (MS) de ionización por desorción de láser asistida por matriz con tiempo de vuelo (MALDI-TOF).

Dando como resultado una cresta única en m/z 2400, descartando la posibilidad de múltiples proteínas mediadas por la tanasa (41).

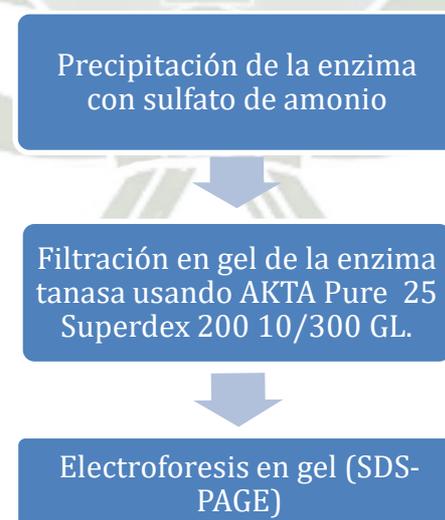
#### 8.4. Identificación de reacción enzimática de la tanasa usando cromatografía en capa fina (TLC)

Se aplicó TLC usando ácido fórmico, benceno y acetato de etilo en proporción (5:4:1) como solvente y terminada la corrida se roció la placa con FeCl<sub>3</sub> al 0.1% en CH<sub>4</sub>O al 30% (41).



**Figura 8.** Proceso de purificación de enzima tanasa de *Enterobacter cloacae*.

*Nota:* Adaptado de (41)



**Figura 9.** Proceso de purificación de enzima tanasa de *Aspergillus Niger*.

*Nota:* Adaptado de (43)

## 9. Métodos para mejorar el rendimiento de la enzima tanasa:

### 9.1. Método de inmovilización de enzima tanasa

Una de las técnicas utilizadas para aumentar la eficiencia de la actividad de las enzimas es el uso de la inmovilización. Como se expone en recientes investigaciones (44).

#### 9.1.1. Inmovilización de enzima tanasa usando quitosan activado con genipin

Se usó quitosan activado con genipin como un transportador natural no tóxico para inmovilizar a la enzima tanasa y se aplicó para mejorar la actividad biológica del té verde. Aumentando su capacidad de adaptabilidad y estabilidad de la enzima tanasa.

Se alcanzó un ratio de actividad y de recuperación de actividad usando la tanasa inmovilizada bajo sus respectivas condiciones óptimas, de 29.2 U/g y 53.6 % respectivamente.

La tanasa inmovilizada retuvo 20.1% de la actividad inicial después de 12 ciclos y conservó 81.12 % de la actividad residual después de 30 días de almacenamiento.

Finalmente, el estudio de la actividad biológica de té verde tratado con tanasa inmovilizada, mostró una actividad antioxidante elevada, un efecto inhibitorio de la alfa amilasa elevado y un bajo efecto inhibitorio de la alfa glucosidasa (44).

#### 9.1.2. Inmovilización de enzima tanasa usando alginato de calcio

La técnica de inmovilización de alginato de calcio ha sido de gran interés, por lo que existen investigaciones para lograr estandarizar el proceso de encapsulamiento de enzima tanasa con alginato de calcio, por su preparación simple, rápida, consistente, económica y que se puede llevar a cabo a temperatura ambiente (45).

Una investigación demostró el aumento de eficiencia de la enzima tanasa, en la que se tomó como fuente al alginato de calcio, para inmovilizar tanasa proveniente de *Aspergillus fumigatus*

CAS21 que sirvió para dar tratamiento biológico a las aguas residuales de la industria de curtido de pieles.

La industria de curtido es una de las más contaminantes en cada una de sus etapas de producción.

El resultado de este estudio concluyó, que tomando como referencia un rendimiento de actividad enzimática del 100% (evaluado por 24 horas, a una temperatura de 50 - 60 °C y a un pH de 5.0), luego de 10 ciclos catalíticos, considerando el reúso de la enzima inmovilizada con alginato de calcio se obtuvo un rendimiento residual del 78%. Finalmente, luego de ser guardado a 4°C por 9 meses el rendimiento de la enzima tanasa fue de un 70% (46).

Otra aplicación de la técnica de inmovilización de enzima tanasa con alginato de calcio está presente en la industria del té boldo, la cual es una planta muy abundante en latino América y reconocida por su uso en la medicina tradicional como tratamiento para problemas hepáticos y digestivos. En esta investigación los resultados obtenidos fueron medidos en sus condiciones óptimas, de 40°C de temperatura y a un pH de 5, obteniendo una actividad enzimática de 170 U/mL. Adicionalmente se midió la eficiencia en cuanto a la retención de la actividad enzimática, el estudio reportó una retención del 50% de la actividad en el sexto ciclo y después de sexto ciclo disminuye gradualmente hasta llegar al 35 %.

Esta enzima inmovilizada fue aplicada satisfactoriamente al té boldo para reducir la turbidez y la amargura causada por los taninos. Mejorando la claridad de un 18.6% a un 21.1%, la actividad antioxidante se multiplico por 5 veces, la amargura también fue reducida y el pH no mostró una variación significativa.

Por lo tanto, la enzima tanasa inmovilizada demostró un comportamiento positivo sobre las pruebas a las que fue sometida, aumentando notoriamente la calidad del té de boldo (47).

### **9.1.3. Inmovilización de la enzima tanasa usando nanopartículas de tierra diatomea cubierta con polianilina**

Otro compuesto utilizado para la inmovilización de enzima tanasa aplicado a la preparación de té, son las nano partículas de tierra diatomea cubierta con polianilina. Este método destaca por su capacidad de ser recuperado de manera simple, utilizando un imán exterior, evitando de esta manera la contaminación del producto final de té.

Aunque el contenido de taninos se redujo solo de un 23 % a 25 %, mantuvo una eficiencia mayor al 66 % después de 10 ciclos de reutilización, su aplicación podría depender de las necesidades específicas y el requerimiento de calidad final que se desee alcanzar (48).

El siguiente cuadro muestra los porcentajes de recuperación de los 4 estudios de inmovilización de enzimas mencionadas en este documento, destacando la inmovilización de enzima tanasa usando alginato de calcio, aplicada en la remediación de efluentes de curtiembres. Reteniendo un 78 % de su actividad inicial luego de ser reutilizada 10 veces (46).

**Tabla 19.** Tabla comparativa de recuperación de la actividad enzimática de enzimas tanasas inmovilizadas después de varios su reúso.

<b>METODOS DE INMOVILIZACIÓN DE ENZIMA TANASA</b>							
<b>Referencias</b>							
<b>(44)</b>		<b>(46)</b>		<b>(47)</b>		<b>(48)</b>	
<b>Quitosan activado con Genipin</b>		<b>Alginato de calcio (Usado en curtiembre)</b>		<b>Alginato de calcio (Usado en te boldo)</b>		<b>Nanoparticulas de tierra diatomea cubierta con polianilina</b>	
<b>Número de ciclos</b>	<b>Recuperación de actividad inicial</b>	<b>Número de ciclos</b>	<b>Recuperación de actividad inicial</b>	<b>Número de ciclos</b>	<b>Recuperación de actividad inicial</b>	<b>Número de ciclos</b>	<b>Recuperación de actividad inicial</b>
1 ciclo	100%	1 ciclo	100%	1 ciclo	100%	1 ciclo	100%
2 ciclos	53.6%	10 ciclos	78%	6 ciclos	50%	10 ciclos	66%
12 ciclos	20.1%	-	-	>7 ciclos	35%	-	-

## 9.2. Modificación genética como método biotecnológico para la obtención de la enzima tanasa

### 9.2.1. Modificación genética para obtener enzima tanasa con mayor termoestabilidad

La formación de complejos estables con polisacáridos y proteínas reduce el valor nutricional de algunos alimentos, según estudios los taninos son unas de las principales causas de este decrecimiento.

Por lo tanto, la degradación de taninos ha despertado un alto interés en los procesos industriales de alimentos. Es aquí donde la enzima tanasa cobra importancia por su capacidad de degradar los taninos mediante hidrólisis, pero uno de los principales obstáculos para su utilización en áreas industriales es su baja termoestabilidad, usualmente de 30 - 40°C.

Se han reportado algunas tanasas resistentes a elevadas temperaturas, como la tanasa rAntan1 a partir de *Aspergillus niger FJ0118* con un tiempo de vida media de 5.4 horas a 60°C, sin embargo, la mayoría de estas no puede ser utilizada en la industria alimentaria por no alcanzar la calidad requerida debido a problemas de seguridad.

Estudios recientes enfocados en solucionar estos problemas, recurrieron a la identificación de un gen llamado tanA a partir de *Aurebasidium melanogenum T9* y mediante modificación genética se expresó en otro microorganismo de grado alimenticio llamado *Yarrowia lipolytica*. Esta nueva tanasa mostró una actividad específica de 941.4 U/mg a los 60°C, a un pH de 6.0, así como una actividad del 61.3% por 12 horas a 55°C.

Estos resultados demuestran la capacidad termoestable que puede alcanzar la enzima tanasa usando modificación genética, en un amplio rango de temperaturas, lo que la convierte en una enzima potencial para la aplicación y reducción de costos en diferentes industrias, como la elaboración de té verde (49).

La búsqueda constante de nuevas fuentes productoras de la enzima tanasa ha llevado a analizar microorganismos productores de tanasas extracelulares en ambientes extremos, como se especifica en una reciente investigación en la que lograron asilar e identificar una enzima tanasa de *Lachnospiraceae bacterium* a partir del tracto gastrointestinal de un rumiante.

El gen productor de esta enzima fue clonado y expresado en una bacteria *E. Coli BC21 (DE3)*, produciendo una nueva enzima bacteriana denominada TanALb.

Esta nueva tanasa mostró una actividad máxima a un pH 7 y a 50°C, retuvo un 70 % de su actividad relativa de 30°C a 55°C y un 80% de su actividad inicial por 2 horas a un pH de 6.5 - 7.5. También se demostró que es resistente a sustancias surfactantes como la SDS, DSMO y TritonX-100, así como una especificidad de sustrato muy amplia.

Estas características también demuestran que esta tanasa puede ser útil para aplicaciones industriales en procesos de degradación y biotransformación de taninos (50).

De manera similar, se encontró una enzima tanasa termoestable de alto rendimiento proveniente de patógenos orales, para la cual se tomó la cadena genética encargada de la producción de enzima tanasa a partir de una bacteria patógeno oral, (*Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum*) y se expresó en una bacteria *E. Coli* dando lugar a una enzima tanasa denominada TanB<sub>Fnp</sub>, que según la investigación destaca por tener una de las actividades específicas más altas, así como una elevada estabilidad térmica, manteniendo el 100% de su actividad a 45°C y mostrando un amplio rango de temperatura de 22°C a 55°C a un 80% de actividad enzimática. Lo que la convierte en una potencial candidata para ser usada en aplicaciones industriales (51).

Por lo tanto, se puede llegar a la conclusión que aún existe una amplia disponibilidad de fuentes de recursos productores de nuevas enzimas por explorar, que pueden presentar características desconocidas, con potencial de contribuir a la salud y bienestar humano (50).

### **9.2.2. Bacterias endofíticas como fuentes productoras de enzima tanasa usando modificación genética**

En este estudio se aislaron bacterias endofíticas gram negativas, *herbaspirillum camelliae* WT00C y WT00F a partir de una planta de té (*Camelliae sinensis L*), mediante procesos genéticos se logró identificar, clonar y purificar el sitio activo encargado de producir la enzima tanasa, para posteriormente expresarla dentro del huésped *E. Coli* dando lugar a una nueva tanasa llamada Tan<sub>Hcw</sub>.

Se probaron 3 sustratos diferentes EGCG (epigallocatequina galato), ECG (epigallocatequina) y MG (metil galato) llegando a la conclusión, que la eficiencia de Tan<sub>Hcw</sub> hacia la EGCG y ECG fue diez veces mayor que la reacción con el MG.

Adicionalmente se determinaron las condiciones óptimas de la Tan<sub>Hcw</sub>, en resumen: para la degradación de MG fueron de 30°C a un pH 6, para la degradación de EGCG y ECG las condiciones óptimas fueron 40°C a un pH 7.

Al analizar la influencia de otras variables se determinó que Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Triton –X100 y Tween 80 incrementan la actividad enzimática de Tan<sub>Hcw</sub> y Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, EMSO, EDTA y β-mercaptoetanol inhiben la actividad enzimática de Tan<sub>Hcw</sub> (52).

### 9.2.3. Tanasa estable a niveles de pH extremo producida por microorganismos genéticamente modificada

Las condiciones requeridas pueden variar dependiendo la industria en la que vaya a ser utilizada, algunas requieren tanasas resistentes a niveles de pH bajos y esto a menudo se convierte en un problema, ya que en promedio el pH óptimo de las tanasas producidas por hongos es alrededor de 6.0 y el valor óptimo de pH de las tanasas producidas por bacterias es de 7.0 a 9.0.

Esto motivó a los investigadores a poner énfasis en la búsqueda de una alternativa que satisfaga esta necesidad, presentándose la levadura *Rhodospordium diobovatum* Q95 como una candidata.

Inicialmente se aislaron 64 cepas de levadura a partir de mangrove, de las cuales, mediante medición de halos de difusión, se identificó la de mayor actividad enzimática, a partir de esta levadura se codificó el gen encargado de producir la tanasa, que luego fue clonado y expresado en *Y. lipolytica* por su elevada capacidad de secreción extracelular.

Esta nueva tanasa nombrada como TanRD mostró una actividad enzimática de 27.3 U/mL, más alta que la de la genero *Aspergillus* que es la que normalmente se usa para la producción de tanasa y una actividad específica al ácido tánico de 676 U/mg.

En cuanto a las condiciones fisicoquímicas de la TanRD, la temperatura óptima fue de 40°C, reteniendo un 60 % de actividad entre 25°C y 60°C. La actividad enzimática retenida en el rango de pH entre 2.5 a 6.5 fue de 60 %, mostrando una elevada estabilidad de más del 70 % de actividad entre el rango de 3.0 a 8.0 de pH.

Estas características la posicionan como una alternativa prometedora para su aplicación en procesos de biodegradación de taninos y producción de ácido gálico con un requerimiento de pH bajo (53).

Por otro lado, de forma opuesta se encuentra el caso de unas tanasas recombinantes, inicialmente producida por *Lactobacillus pentosus* BA-7 y *Lactobacillus pentosus* QA1-5 las cuales fueron codificadas y expresadas en *E. Coli* BL21. El resultado fueron dos enzimas: LpTan QA1-5 estable en un rango de pH de 8 a 10 y con un pH óptimo de 9, en el cual retuvo un 90% de su actividad inicial, así como la segunda enzima LpTan BA-7 con un pH óptimo de 8 y reteniendo un 80% a un pH de 9 (54).

### **9.3. Aplicación de modelos matemáticos para controlar y optimizar la producción de enzima tanasa.**

Uno de los mayores impedimentos que se tenía a la hora de pensar en producir enzimas con aplicación industrial a gran escala, es el elevado costo de producción y purificación. Por lo que es de vital importancia para el proyecto optimizar los procesos para reducir costes y aumentar la rentabilidad.

Es por eso que se vienen aplicando diseños experimentales, como la metodología de superficie de respuesta (RSM) para determinar las variables óptimas que mejoren los procesos analizados y controlar la producción mediante el uso de modelos matemáticos.

Un estudio reciente utiliza modelos matemáticos para controlar la producción de enzima tanasa producida a partir de *bacillus cereus* que previamente fue aislada de una muestra de tracto gastrointestinal de cabra, debido a que las cabras tienen una dieta rica en taninos esto induce al *bacillus cereus* a producir la enzima tanasa para hidrolizar los taninos en compuestos más simples y así poder aprovecharlos como fuente de carbono.

La producción se llevó a cabo en un medio semisólido (semi-SSF) para mantener un contenido alto de humedad y favorecer el crecimiento de las bacterias. Se seleccionó como sustrato a *Triphala* por su alto contenido de ácido tánico.

Con el fin de seleccionar las variables más significativas se utilizó la técnica de un factor a la vez (OFAT) y para optimizarlas se usó el diseño compuesto central de la metodología de superficie de respuesta (RSM).

Para comprender el comportamiento de *bacillus cereus* se utilizaron los siguientes modelos matemáticos para determinar el crecimiento de biomasa, la producción de tanasa y la degradación de ácido tánico, respectivamente.

- Ecuación logística,  $\mu$ : 
$$\frac{dX}{dt} = \mu X_T \left(1 - \frac{X_T}{x_m}\right)$$
- Ecuación de Luedeking-Piret, ' $\alpha$ ' y ' $\beta$ ': 
$$\frac{dP_T}{dt} = \alpha \frac{dX_T}{dt} + \beta X_T$$
- Ecuación de sustrato,  $m$  y  $n$ : 
$$\frac{dS_T}{dt} = m \frac{dX_T}{dt} + n \frac{dP_T}{dt} + m_s X_T$$

Todo esto aplicado en el MATLAB R20 15b sirvió para evaluar los parámetros cinéticos que influyen en la actividad de la enzima tanasa de *bacillus cereus* en medio semi-SSF.

Finalizado el estudio se comprobó la eficacia de la aplicación de modelos matemáticos para controlar y optimizar procesos biotecnológicos. Los resultados mostraron que el proceso optimizado, aumentó su producción 6.1 veces más (0.116 U/gds) que el proceso que se realizó sin optimizar variables.

Por lo que se puede concluir, que los modelos matemáticos son muy útiles para controlar la cinética de crecimiento de producción de la enzima tanasa, su crecimiento microbiano y su utilización de ácido tánico en el proceso. La aplicación de modelos matemáticos puede ser de mayor importancia aplicada en la planificación y optimización a gran escala (55).

#### 9.4. Sistema bifásico acuoso como método alternativo de purificación

Existe una búsqueda continua para reducir costos en los procesos industriales, al identificarse la purificación de la enzima, como el proceso más costoso cuando se trata de producción y extracción de enzima tanasa para su posterior comercialización, es que se evalúan otros métodos, concretamente el sistema bifásico acuoso como un método alternativo para realizar una purificación parcial de la enzima tanasa.

Este proceso consiste en agregar diversos componentes en un tubo graduado con punta cónica, entre estos se encuentra (Polientilen glicol + citrato + extracto crudo y agua) donde el extracto crudo equivale a un 20% de la preparación total del sistema.

Luego se sometió esta preparación a agitación con vórtice durante 1 minuto, para después dejarla reposar por 60 min con el fin de separar la mezcla en dos fases por decantación.

Finalmente se midió el volumen de cada fase, se separaron con el uso de una pipeta y se determinó la cantidad de proteína usando BCA (ácido bicinónico) como detalla el método elaborado por Smith et al. (1985), la actividad tanasa fue determinada utilizando rodanina como detalla el método elaborado por Sharma et al. (2000) en la que una unidad de enzima corresponde a un 1  $\mu\text{mol}$  de ácido gálico producido en un 1 min.

La eficiencia del sistema bifásico acuoso se confirmó mediante la aplicación de cromatografía de exclusión de tamaño superdex-G75 a 215 nm, en el que se pudo visualizar 2 picos a 215 nm y 280 nm, uno de ellos correspondiente a la actividad tanasa. Posteriormente fue necesario una segunda corrida en la misma columna para poder visualizar un solo pico aislado con actividad tanasa.

Lo que demuestra que este método es útil y simple de realizar para extraer enzima tanasa a concentraciones altas y un grado considerable de purificación (56).

## **9.5. Nuevas formas de presentación y almacenamiento de tanasa**

### **9.5.1. Tanasa en spray seco**

Uno de los principales inconvenientes al momento de llevar una enzima al mercado es su almacenamiento, por lo que se han realizado múltiples esfuerzos para encontrar nuevas técnicas que amortigüen esta problemática. Una técnica innovadora es el almacenamiento de tanasa en secado por aspersión.

Usando el secado por aspersión se puede obtener polvo a partir de soluciones líquidas por medio de un proceso de deshidratación, de esta manera el producto final se beneficia de un gran número de ventajas, como mayor estabilidad, mayor duración, fácil transporte, sencilla manipulación y puede ser almacenado a temperatura ambiente.

El proceso de secado por aspersión normalmente se realiza usando un gas a 100 °C de temperatura por lo que se corre el riesgo de que algunas muestras sufran de desnaturalización de proteínas en el proceso de deshidratación, para prevenir este efecto indeseado es que se agregan adjuvantes o carriers que se encargan de proteger la estabilidad de algunas biomoléculas para así evitar la desnaturalización y la pérdida de sus propiedades biológicas.

Esta técnica fue aplicada a la tanasa aislada a partir de *Aspergillus fumigatus* CAS21 para determinar la eficiencia del secado por aspersión, así como la influencia del adjuvante que agrega valor al producto final.

En cuanto a rendimiento la  $\beta$ -ciclodextrina, esta dio el valor más alto con un 53.5% seguida por la lactosa con un 32.2 %.

La actividad enzimática se calculó respecto a la actividad inicial de extracto crudo de enzima (23 U/mL), siendo la  $\beta$ -ciclodextrina la que presentó mayor actividad enzimática, 28.5 U/mL es decir un 23 % más que la del extracto crudo, seguida por la maltodextrina que retuvo el 100 % de la actividad enzimática respecto a la de extracto crudo.

En cuanto al contenido de humedad, es favorable un contenido bajo, para evitar la formación de aglomeración, donde la  $\beta$ -ciclodextrina dio el valor más alto 11.5 % y la lactosa dio el valor más bajo 5.6 % de humedad. De manera similar se evaluó el contenido de agua activa, siendo favorable un valor bajo para aumentar la estabilidad de la enzima, siendo el almidón capsular el más bajo con 0.25, seguido por la  $\beta$ -ciclodextrina con 0.28 de agua activa.

Finalmente se evaluó la actividad enzimática retenida de cada formulación respecto a la actividad antes de ser almacenada y luego de ser almacenados por un año a 4 °C y a 28 °C. A los 4 °C todas las formulaciones presentaron una retención de más del 100% respecto a su actividad inicial antes de ser almacenada, siendo la  $\beta$ -ciclodextrina la de mayor valor (146.3 %) y a los 28 °C la lactosa fue la que presentó mayor retención de actividad enzimática (122.2 %).

A partir de esta investigación se pudo comprobar las múltiples ventajas que brinda el método de secado por aspersión, siendo una alternativa con un gran potencial de aplicación en procesos industriales y como una alternativa a la presentación tradicional ofertada en el mercado (57).

## **10. Aplicaciones de enzima tanasa:**

### **10.1. Reducción de taninos en jugo de frutas**

Los taninos tienen un impacto negativo en las características organolépticas de los jugos de frutas, ya que provocan un color y turbidez no deseado, así como una sensación astringente.

El uso de la enzima tanasa para reducir la concentración de taninos demuestra que es un método eficaz para aumentar el valor del producto final, reduciendo el efecto astringente que producen los taninos.

Aunque existen múltiples factores que influyen en la eficiencia y eficacia de la enzima tanasa, según investigaciones la tanasa producida por *Aspergillus niger* puede reducir la concentración de taninos en un 45.2 % y en un 73.6 % si es aplicada en forma inmovilizada.

**Tabla 20.** Eficacia de la reducción de taninos usando microorganismos productores de enzima tansasa.

Fuente de tanasa	Eficacia en reducción de taninos
<i>Aspergillus Niger</i> (enzima soluble)	45.2% de taninos en jugo de mirobalan
<i>Aspergillus Niger</i> (enzima inmovilizada)	73.6% de taninos en jugo de mirobalan
<i>Aspergillus Foeditus</i>	25% de taninos en jugo de granada
<i>Rihzopus Oryzae</i>	49% de taninos en jugo de granada
<i>Penicillum Montonance</i>	46% de taninos en jugo de uva
<i>Bacillus Subtilis</i>	60% de taninos en jugo de jamun

Nota: Adaptado de (58)

La enzima tanasa al reducir la concentración de taninos también disminuye la turbidez del jugo de frutas, aunque se puede aumentar el nivel de clarificación combinándolo con métodos químicos como la ultrafiltración y agentes clarificantes.

La tabla 20 muestra la eficacia de 6 microorganismos, respecto a su capacidad de reducir los taninos en diferentes muestras de jugos. Siendo el *bacillus subtilis* la de mayor reducción de taninos con un 60%, pero también se puede apreciar como al aplicar método de inmovilización el *aspergillus niger* eleva su eficacia de reducción de taninos de un 45.2% a un 73% (58).

### 10.1.1. Clarificación de jugo de fruta de jamun usando la enzima tanasa

Estudios recientes demuestran que la aplicación de la enzima tanasa para la reducción de los taninos produce un efecto positivo en las propiedades fisicoquímicas de clarificación del jugo de jamun.

Se realizó un análisis para determinar las condiciones de trabajo óptimas de una tanasa producida a partir de *Aspergillus Ficcum* para aclarar el jugo jamun, tomando tres variables independientes como la temperatura, concentración de enzima y tiempo. Los resultados de las pruebas demostraron que los parámetros para optimizar el proceso de clarificación del jugo jamun fueron: 40°C temperatura, a un tiempo de 80 minutos y una concentración de enzima de 0.05 % (peso/volumen).

El estudio llevado a cabo bajo estas condiciones arrojó los siguientes resultados:

Una claridad de 42.39 %T a comparación de -78.3%T inicial y una turbidez de 37.12 NTU a comparación de los 116 NTU inicial (unidades nefelométricas de turbides) (59).

### 10.1.2. Reducción de astringencia de jugo de limón usando la enzima tanasa

El limón es una de las frutas más conocidas y de alta demanda. En el 2018 respecto a la producción total de cítricos, el 22.81% correspondió a la producción de lima y limón. Pero el jugo de limón tiene el inconveniente de presentar una elevada amargura luego de ser almacenado.

Por este motivo se aplicó *Rhizopus oryzae* para disminuir la concentración de taninos. Obteniendo una máxima eficacia de desamargado de un 40.12 % a unas condiciones óptimas de 37°C, en 2 horas de reacción, a un volumen de enzima tanasa de 1.12 % (v/v) en jugo de limón, obteniendo una actividad enzimática de 30 IU/mL (60).

Aunque el autor concuerda que el amargor del jugo de limón es causada por limonina, naringina y taninos, este estableció una relación directa de reducción de taninos con reducción de amargura, pero existen estudios, los cuales indican que el amargor es causado principalmente por acción de la limonina y naringina, así como la astringencia es causada principalmente por la interacción de los taninos con proteínas salivales (61). Por lo tanto, se deduce que la relación

directa que estableció el autor debería ir más enfocada en reducir la astringencia del jugo de limón.

Reduciendo los taninos, también se observó un aumento en los antioxidantes del producto final en un 15.30 % respecto al valor inicial antes del tratamiento con enzima tanasa.

Todos estos ensayos aplicados para mejorar la calidad de jugos de frutas usando un tratamiento de enzima tanasa, demuestran su potencial para reemplazar métodos químicos y su alto valor en el mercado, por su capacidad de aumentar el valor del producto final sin afectar sus propiedades nutricionales (60).

## **10.2. Mejoramiento de alimento de animales usando ácido tánico hidrolizado con enzima tanasa**

La enzima tanasa también puede servir como una herramienta para dar un valor agregado en la alimentación de animales, aplicada sobre el ácido tánico para obtener ácido tánico hidrolizado, que puede ser usado como alternativa al ZnO para la alimentación de lechones recién separados de su madre.

Normalmente se administra ZnO a los lechones para evitar las diarreas próximas al destete de su madre, con el fin de promover el engorde de los animales. Sin embargo, los lechones no son capaces de absorber completamente el zinc administrado, desechándolo en sus heces y causando daños graves al medio ambiente, razón por la cual se está evaluando la prohibición de ZnO para este propósito.

Por lo que resulta interesante el uso de ácido tánico hidrolizado como reemplazo del ZnO. Para evaluar esta alternativa se procedió a dividir una muestra de lechones en dos grupos, para evaluar los resultados luego de que uno de los grupos fuera suplementado con ácido tánico hidrolizado a una concentración de 1899.5 mg/Kg y el otro con ZnO a 1600 mg/ kg.

Los resultados mostraron que la tasa de diarrea de los lechones destetados y suplementados con ácido tánico hidrolizado se redujo significativamente entre los 14 – 21 días. Además, también se determinó que el ácido tánico hidrolizado mejoró la capacidad antioxidante y aumentó la flora bacteriana asociada con la degradación de celulosa y hemicelulosa.

Por lo que se demuestra que una administración de ácido tánico hidrolizado de 1899.5 mg/kg puede reemplazar 1600 mg/Kg de ZnO.

Por lo tanto, la enzima tanasa sirve como catalizador para obtener el ácido tánico hidrolizado necesario para mejorar la alimentación de los lechones recién destetados de su madre (62).

### **10.3. Elaboración y mejoramiento del té**

#### **10.3.1. Elaboración del té negro**

Una de las industrias que más demanda la aplicación de enzima tanasa es la industria encargada de la elaboración de té, por su capacidad de añadir un valor agregado a su producto final.

Tal es el caso de la elaboración de té negro, que es el té más consumido a nivel mundial, cerca de 75% y al que se le otorga su valor monetario dependiendo del brillo del licor y el color total del té negro, atributos claves que dependen de la concentración de teaflavinas (TF) y tearubiginas.

El contenido del TF en el té negro elaborado por métodos tradicionales chinos es de 0.5%, mientras que el té negro elaborado en otros países es de un 2 %.

Se buscó incrementar la concentración de TF usando la enzima tanasa, al mismo tiempo que se determinaron las condiciones óptimas para un proceso eficiente, ya que el contenido de TF es directamente proporcional al tiempo de fermentación, inversamente proporcional a la temperatura de fermentación, también se buscó una relación óptima para el pH empleado y el flujo de oxígeno necesario.

La concentración de TF fue determinada usando el método de HPLC, dando como resultado que la fermentación líquida de hojas de té negro con la adición de extracto de té verde tratado con tanasa a una temperatura de 25°C, una aireación de 0.8 – 1 L/min, por un tiempo de fermentación de 60 min dio un licor de té negro con una concentración de TF muy superior, de unas 4.7 veces (63).

### 10.3.2. Reducción de catequinas de té oolon usando enzima tanasa

El té oolon es muy consumido en Taiwan por sus propiedades antitumorales, antioxidante y por mejorar la función cardiovascular. El principal componente activo del té oolon son los polifenoles, también llamados catequinas, estas catequinas representan un 75% a 80 % de los componentes solubles del té. Distribuidas entre 4 tipos de catequinas: epicatequinas (EC), epigalocatequinas (EGC), galato epicatequinas (ECG) y galato epigalocatequinas (EGCG), siendo la más importante y abundante la EGCG.

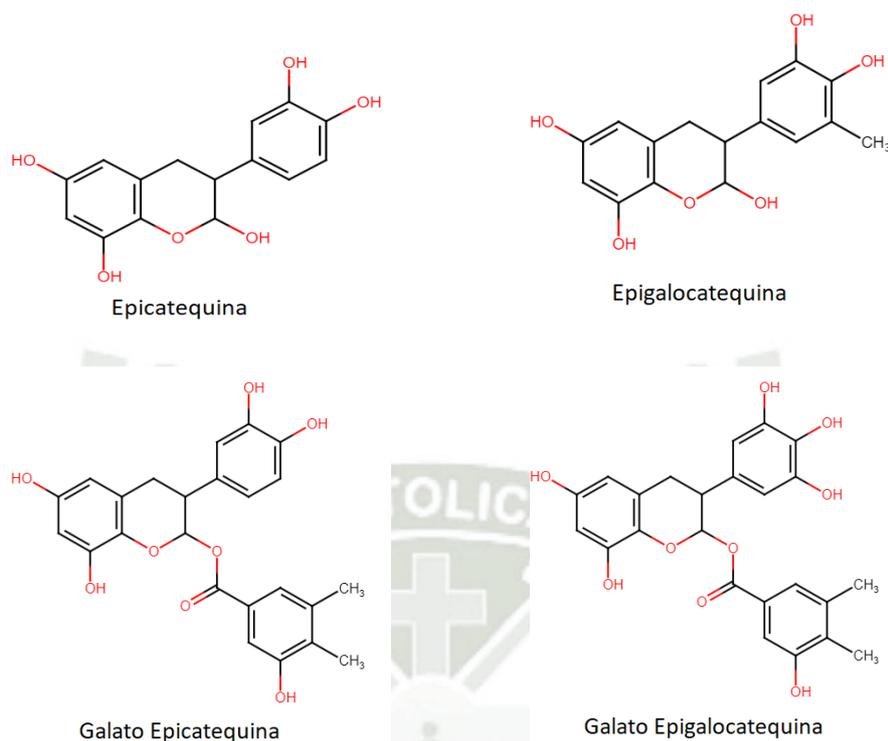
A pesar de todas las ventajas que aportan las catequinas a la salud y que intensifican el sabor del té, como ya se sabe, también son las responsables de la astringencia y turbidez del té.

Se buscó reducir las características indeseables aportadas por las catequinas realizando un tratamiento con tanasa de *Aspergillus tubingensis* CICC2651 a las hojas de oolon antes de realizar el proceso de producción de té, para obtener un producto final de mejor calidad.

Para el tratamiento de las hojas de oolon con tanasa, se aplicó con un pulverizador una cantidad de tanasa de forma homogénea sobre toda la muestra de hojas que posteriormente fueron secadas y molidas.

En una proporción de tanasa a hojas de té de 1:1 (v/p), la EGCG disminuyó de 246  $\mu\text{g/mL}$  a 153.1  $\mu\text{g/mL}$ , el ECG disminuyó de 23.1  $\mu\text{g/mL}$  a 9.9  $\mu\text{g/mL}$  y el ácido gálico aumentó de 21.9  $\mu\text{g/mL}$  a 83.9  $\mu\text{g/mL}$ .

Este método de aspersion de enzima a las hojas de oolon es un método de naturaleza más simple, pero aumentar su proporción puede resultar costosa, por lo que las investigaciones sugieren que una proporción de hojas de té:tanasa de 3:1 sería la ideal (64).



**Figura 10.** Fórmula química de catequinas contenidas en el té oolon.

*Nota:* Adaptado de (65)

#### 10.4. Enzima tanasa y su aplicación a procesos ambientales

##### 10.4.1. Degradación de taninos en aguas residuales de la industria del cuero

La enzima tanasa también puede ser utilizada en la industria ambiental, como removedor de taninos en aguas residuales utilizando hongos. La biodegradación natural de los taninos en el medio ambiente principalmente se asocia más a los hongos que las bacterias y entre los más estudiados se encuentran los *Aspergillus spp.* y *Penicillium spp.* por su capacidad de biodegradar taninos usando la enzima tanasa.

Al degradar los taninos en un ambiente no estéril como los desechos de aguas residuales de la industria de cuero, el crecimiento de otras bacterias y las condiciones de estas puede afectar la proliferación, así como el proceso de degradación de los hongos encargados de reducir los

taninos. Por lo que se buscó modificar variables para evitar estos efectos adversos, como la inmovilización fúngica, que incrementa su estabilidad ante condiciones no favorables y aumenta la eficiencia de los hongos en el proceso de degradación, así como la adición de un cosustrato (extracto de malta) que le permite inhibir a los taninos y mantener su competitividad microbiana dentro de un ambiente no estéril.

Logrando un rendimiento de eliminación estable, con una RE (eficiencia de remoción) de 80 % de DOC (carbono orgánico disuelto) y 90% de sCOD (demanda química de oxígeno soluble) respectivamente (66).

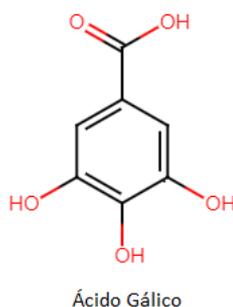
### **10.5. Producción de ácido gálico usando enzima tanasa**

Debido a la demanda creciente de ácido gálico y la constante búsqueda de nuevas vías de producción es que se realizan diversas investigaciones para optimizar el proceso de producción de enzima tanasa y ácido gálico, como el estudio de Rida Arshad.

En el que usando como fuente productora de tanasa al *Aspergillus Oryzae* y mediante el método de fermentación por sustrato sólido, se determinaron los agentes y características óptimas para dicho proceso en específico, obteniendo los siguientes resultados:

Mediante espectrofotometría se determinó que de las muestras candidatas para sustrato, la de mayor concentración de ácido tánico fue la semilla de ciruela negra (191.25 mg/g semillas secas), de igual manera usando rodanina como indicador para el método de espectrofotometría se concluyó que la semilla de ciruela negra es la que presentó mayor actividad tanasa (20.12 U/g) y mayor rendimiento en la producción de ácido gálico (8.16 mg/g).

Adicionalmente se determinaron las condiciones óptimas para este proceso, como se lista a continuación: proporción de 1:3 de agua:sustrato, a un tiempo de incubación de 96 horas, una temperatura de incubación de 30°C, un pH medio de fermentación de 5.5 y una concentración de 0.2% de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno (67).



**Figura 11.** Formula química del Ácido Gálico. *Nota:* Adaptado de (63)

### 10.6. Producción simultánea de enzima tanasa y ácido gálico

En el proceso de producción de enzima tanasa, se libera glucosa y ácido gálico, este último es un compuesto de amplio uso en diversas industrias.

Tomando en cuenta esto se realizaron investigaciones en las que se trata de determinar las condiciones óptimas para obtener el máximo rendimiento tanto de la producción de enzima tanasa como de ácido gálico simultáneamente usando *Bacillus licheniformis* KBR6 a través de fermentación sumergida.

Se probaron diferentes concentraciones de ácido tánico para la producción de enzima tanasa y ácido gálico, a partir de una concentración inicial de 5 g/L, la producción de tanasa y ácido gálico se incrementó de forma proporcional al aumento de concentración de ácido tánico hasta llegar a los 20 g/L, donde observó que el crecimiento bacteriano y la producción de enzima tanasa se fueron inhibiendo conforme la concentración de ácido tánico superaba los 20 g/L, esto debido a la toxicidad del sustrato ya que tiene una elevada cantidad de grupos fenólicos que precipitan las macromoléculas como carbohidratos y proteínas. Mientras la producción de ácido gálico a partir de 20 g/L de ácido tánico no mostro alteraciones significativas.

Como fuente de fosfato adicional se determinó, que la adición de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  mejora la producción de enzima tanasa, así como la adición de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  en el caso de iones metálicos.

En conclusión, se demostró que las condiciones que optimizan la producción enzimática a partir de *Bacillus licheniformis* y la producción de ácido gálico fue: 15g/L de ácido tánico, 2g/L de glucosa, 3g/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.5 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}$  y 0.5 g/L  $\text{MgCl}_2$ .

La búsqueda de las variables óptimas al momento de llevar estos procesos biotecnológicos a una escala industrial será indispensable, así como un estudio detallado para cada caso en particular, ya que pequeños cambios podrían significar un aumento considerable de costos o beneficios (68).

### **10.7. Uso de desechos agroindustriales como sustrato**

Así como se les da una elevada importancia a las nuevas fuentes productoras de enzima tanasa, a la hora de llevar estos procedimientos a escala industrial es importante abaratar costos y una opción que ha venido siendo investigada es la de buscar sustratos más económicos (69).

#### **10.7.1. Producción de enzima tanasa usando bagazo de caña de azúcar como sustrato**

Investigaciones proponen el uso de desechos agroindustriales como sustrato para la producción de tanasa a partir de *Serratia marcescens* IMBL5, aplicada a la clarificación de jugo de manzana.

Luego de probar diferentes fuentes de carbono para la producción de tanasa se determinó que el bagazo de caña de azúcar es el más conveniente de las opciones estudiadas en una investigación, esto debido a su mayor producción de tanasa en comparación con el resto, 34.81 U/mL.

Seguidamente mediante RMN (Metodología de superficie de respuesta) se determinó los valores óptimos de 4 factores que afectan la producción de tanasa (Concentración de bagazo de caña de azúcar, temperatura, pH y tiempo de incubación) obteniendo 2 combinaciones que arrojaron los resultados más elevados (102.7 U/mL y 103.1 U/mL).

En cuanto a la clarificación del jugo de manzana, se usó una mezcla de la enzima tanasa con gelatina en proporción de 1:1, observando una clarificación de 60% en un tiempo de incubación de 3 horas y un 80 % con 5 horas adicionales de incubación. Respecto a la reducción de taninos en el jugo de manzana tratado con la mezcla de enzima y gelatina, fue de un 45 % en cuanto a la reducción de los taninos totales y la cantidad de azúcares reductores luego de 5 horas de tratamiento se incrementó significativamente a una cantidad cercana a 50 ug/mL, esto

incrementó el dulzor del jugo de frutas, consecuentemente su calidad y valor en el mercado (69).

### **10.7.2. Producción de enzima tanasa usando cáscara de granada como sustrato**

Otro desecho que también despertó interés en investigadores es la cáscara de granada por su mayor actividad tanasa respecto a otros sustratos, su fácil acceso y bajo coste.

Para este análisis se seleccionó *Bacillus Velezensis* de 50 bacterias asiladas a partir de muestras de suelos salinos provenientes de la India. Posteriormente estas bacterias fueron sembradas en medios sólidos con 0.5% de ácido tánico y fueron seleccionadas midiendo la zona hidrolizada por la bacteria en el agar de incubación.

La actividad enzimática del *Bacillus Velezensis* fue determinada usando el método de Sharma et al. y también se determinaron las condiciones óptimas para mejorar la actividad enzimática del *Bacillus velezensis* usando la metodología de superficie de respuesta.

Se observó que, de las variables analizadas, una de las que mayor influencia tubo en la actividad tanasa fue la humedad.

Los resultados finales obtenidos para aumentar la actividad de la enzima tanasa usando cáscara de granada como sustrato fueron los siguientes: 57 horas de tiempo de incubación, 72.5 % de humedad y 0.68 % de concentración de ácido tánico. Estos parámetros optimizados aplicados mejoraron en 9 veces el proceso, respecto al proceso sin optimizar sus parámetros (70).

### **10.7.3. Producción de enzima tanasa usando residuos de arroz, café molido usado y coco desecado como sustrato**

Otro estudio se interesó en probar desechos agroindustriales para la producción de tanasa a partir de *Aspergillus niger* en medio sólido (SSF), usando residuos como el salvado de arroz, arroz cervecero, café molido usado y residuos de coco desecado.

Entre los 4 posibles sustratos evaluados, el salvado de arroz fue el que presentó mayor actividad tanasa con 148.7 U/g, seguido por el arroz cervecero con 140.8 U/g, el café molido usado con

116.52 U/g y finalmente el que tuvo menos rendimiento fue el residuo de coco desecado con 88.64 U/g.

Esto demuestra que una correcta planeación puede hacer viable la aplicación de enzimas tanasas en procesos industriales, disminuyendo gastos y generando ingresos económicos (71).

**Tabla 21.** Comparación de la actividad enzimática de tanasa de *Aspergillus niger* usando diferentes desechos agroindustriales como sustrato.

Sustratos evaluados	Actividad tanasa (U/g)
Salvado de arroz	148.7
Arroz cervecero	140.8
Café molido usado	116.52
Residuos de coco desecado	88.64

*Nota:* Adaptado de (71)

## PERSPECTIVAS FUTURAS:

La innovación y desarrollo aplicada en diferentes áreas de la biotecnología y carreras afines, ha permitido desarrollar alternativas novedosas con el potencial de dar solución a diversos problemas que se presentan como obstáculos a la hora de querer llevar al campo muchas ideas innovadoras, optimizando procesos, reduciendo costes, aumentando rendimientos y aportando diversas mejoras con el fin de transformar ideas innovadoras, en innovaciones sostenibles en el mercado y en el tiempo (72).

En el área en particular de las enzimas con aplicación industrial, se han desarrollado nuevas herramientas en el campo de la modificación genética capaces de aumentar el rango de acción y su rendimiento de la enzima de interés.

Las modificaciones genéticas son aplicadas a los microorganismos productores de enzima tanasa, ya sea identificando y transfiriendo genes de interés de un microorganismo portador a otro huésped con mayores ventajas aplicadas a un proceso, así como con un mayor potencial de producción y rendimiento o realizando modificaciones genéticas en el propio microorganismo portador productor de enzima tanasa usando mutación genética para alterar su ADN (73).

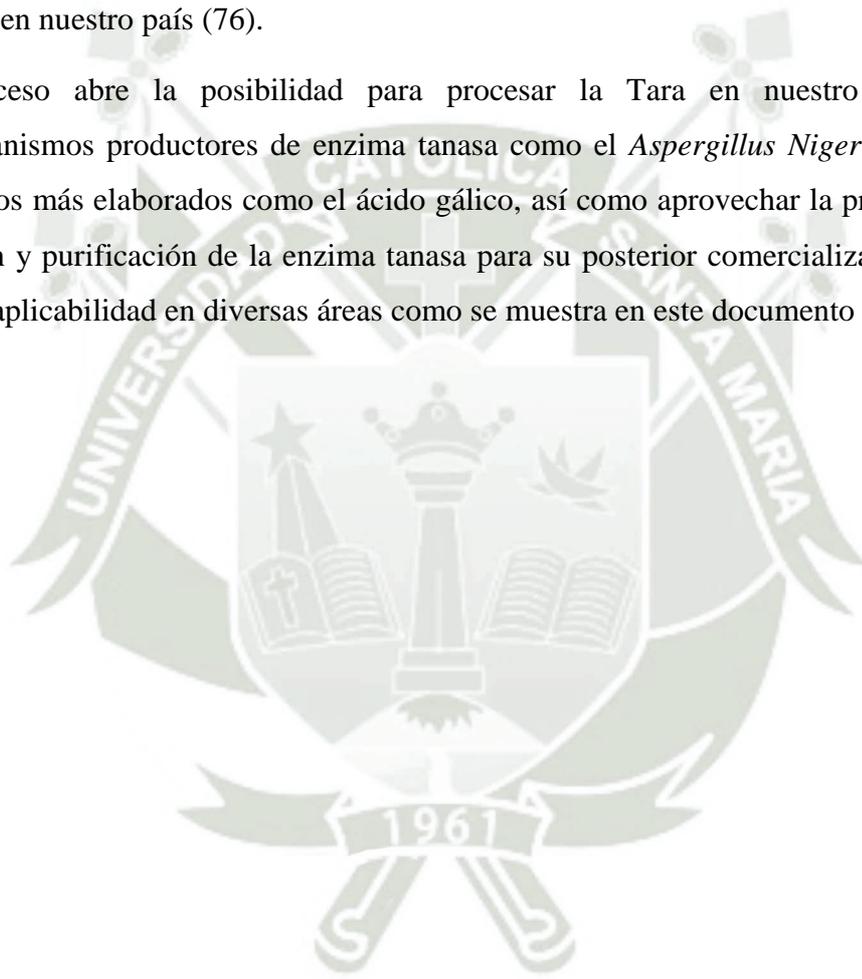
Además de las modificaciones genéticas, existen otros avances tecnológicos para mejorar el rendimiento de la enzima tanasa, como los modelos matemáticos que determinan los parámetros óptimos aplicables con el fin de optimizar un proceso, de esta manera se puede reducir costes en pruebas experimentales (74).

Para mejorar la fase de purificación de la enzima, considerada como la más costosa en esta industria, se han desarrollado nuevos métodos para lograr purificaciones parciales más sencillas y económicas, como el sistema bifásico acuoso que es un modelo alternativo a las técnicas tradicionales, aunque este método produce una purificación parcial, combinada con otros métodos de purificación más complejos y específicos podría presentar una gran oportunidad de mejora (75).

Otras de las técnicas innovadoras que vienen cobrando importancia, son las nuevas formas de almacenamiento, como la presentación de la enzima tanasa en spray, que puede abrir las fronteras de comercialización a un nuevo mercado minorista más específico, por su fácil aplicación y condiciones sencillas de almacenamiento (57).

En cuanto al aprovechamiento de recursos naturales de nuestro país como alternativas a fuentes de sustrato, tenemos una gran variedad de especies con un alto contenido de taninos, ya sea proveniente de desechos industriales o a partir de cultivos como la Tara (*Caesalpinia spinosa*), ya que nuestro país es el principal productor de Tara a nivel mundial, exportándola en presentaciones de tara en polvo utilizada como materia prima de otros procesos. Esta materia prima es procesada y transformada en productos terminados, listos para su comercialización multiplicando por varias veces su precio final a comparación del precio de la materia prima adquirida en nuestro país (76).

Este proceso abre la posibilidad para procesar la Tara en nuestro país utilizando microorganismos productores de enzima tanasa como el *Aspergillus Niger*, para desarrollar compuestos más elaborados como el ácido gálico, así como aprovechar la propia producción, extracción y purificación de la enzima tanasa para su posterior comercialización, por su alto grado de aplicabilidad en diversas áreas como se muestra en este documento (77).



## CONCLUSIONES:

Finalizado el trabajo de investigación se pudo llegar a las siguientes conclusiones:

### **Primera:**

Se pudo culminar de manera exitosa la búsqueda, así como la recopilación de los artículos de investigación más recientes y actualizados sobre los avances en la producción, extracción y aplicación de la enzima tanasa usando métodos biotecnológicos, los cuales fueron obtenidos de bases de datos reconocidas y confiables a nivel mundial, respetando los criterios de inclusión y exclusión planteados en la metodología.

### **Segunda:**

Se pudo culminar de manera satisfactoria el análisis y la selección de los artículos de investigación más relevantes respecto a los avances en la producción, extracción y aplicación de la enzima tanasa usando métodos biotecnológicos, creando una base de información sólida, alineada a la necesidad de dar solución al problema de la transición de la industria tradicional a nuevas tendencias con tecnologías más amigables con el medio ambiente y con procesos cada vez más sostenibles y autosustentables.

### **Tercera:**

Con el fin de atender la necesidad de elaborar una guía que oriente a futuros investigadores, se realizó un análisis crítico de los artículos más relevantes. A continuación, se citan algunas recomendaciones de los aspectos más importantes, que el investigador debe tener en cuenta al momento de abordar proyectos relacionados a la obtención de la enzima tanasa usando métodos biotecnológicos y sus aplicaciones:

Se recomienda el uso microorganismos no patógenos capaces de producir enzima extracelular, ya que esto facilita la extracción de la enzima tanasa, a diferencia de la tanasa intracelular, que para ser extraída necesita pasar por lisis celular.

De manera complementaria se recomienda el método de fermentación en estado sólido, ya que aporta mayores ventajas como el aprovechamiento de sustratos provenientes de desechos agroindustriales, así como menor consumo de agua y energía.

Para identificar la actividad tanasa en microorganismos, se recomienda el uso de un método cualitativo como el método de Kumor et al. por su menor tiempo de espera para obtener resultados. Para la evaluación de la actividad enzimática, se recomienda el uso de un método cuantitativo, el más usado es el método Sharma et al. por su sencillez y costo moderado, para un estudio más detallado que cuente con una mayor disponibilidad de inversión, se recomienda el uso de métodos cuantitativos con mayor precisión como el HPLC y la cromatografía de gases, teniendo en cuenta que también requieren de mano de obra y equipos más especializados.

La aplicación de un proceso enzimático controlando variables fisicoquímicas, así como la adición de inductores pueden multiplicar varias veces el rendimiento de la actividad tanasa respecto al alcanzado en un proceso sin variables controladas, por lo que se recomienda la optimización de las variables más importantes, usando la metodología de superficie de respuesta (RSM) y posteriormente aplicar modelos matemáticos para predecir y controlar la producción de enzima.

Con el fin de aumentar la productividad de la enzima tanasa, se recomienda aplicar el método de inmovilización enzimática usando alginato de calcio, por su proceso de preparación rápido, simple, consistente, de bajo costo y que puede realizarse a temperatura ambiente, llegando a recuperar un 78 % de su actividad inicial después de ser utilizado en 10 ciclos y conserva un 70 % de su actividad después de ser almacenada por 9 meses.

Se recomienda hacer un estudio de mercado para definir la viabilidad económica de aplicar un proceso de purificación según la aplicación de la enzima tanasa, de ser necesaria una purificación parcial, evaluar el uso del sistema bifásico que se caracteriza por tener un proceso menos complejo, por lo tanto, menos costoso,

Como se puede apreciar en esta investigación son muchas las aplicaciones y oportunidades para la enzima tanasa, pero se recomienda su aplicación en procesos que no exijan una fase de purificación como el tratamiento de efluentes industriales con alto contenido de taninos usando microorganismos.

**Cuarta:**

Con el fin de aportar temas de investigación que enriquezcan el conocimiento en la producción, extracción y aplicación de la enzima tanasa, se sugiere aprovechar la gran diversidad en flora y fauna de nuestro país, con el propósito, de aislar cepas nativas productoras de enzima tanasa utilizando los desechos agroindustriales de tara (*Caesalpinia spinosa*) como fuente de sustrato por su alto contenido de taninos.



**REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:**

1. Zhang LL, Li J, Wang YL, Liu S, Wang ZP, Yu XJ. Integrated Approaches to Reveal Genes Crucial for Tannin Degradation in *Aureobasidium melanogenum* T9. *Biomolecules*. 2019; 9(439).
2. Leangnim N, Aisara J, Unban K, Khanongnuch C, Kanpiengjai A. Acid Stable Yeast Cell-Associated Tannase with High Capability in Gallated Catechin Biotransformation. *MDPI*. 2021; 9(1418).
3. Abd El Tawab A, Murad H, Khattab M, Azzaz H. Optimizing Production of Tannase and in vitro Evaluation on Ruminant Fermentation, Degradability and Gas Production. *Int. J. Dairy Sci.* 2019; 14 (2)(53-60).
4. Youssef F, Singab A. An Updated Review on the Secondary Metabolites and Biological Activities of *Aspergillus ruber* and *Aspergillus flavus* and Exploring the Cytotoxic Potential of Their Isolated Compounds Using Virtual Screening. *ECAM*. 2021; 2021(11).
5. Naves L, da Silva L, Cunha E, Almeida V, Ferreira de Sá A, Sena B, et al. Filamentous Fungi as Promising Agents for the Biodegradation of Biosolids Compounds. *Front., J. Soc., Technol. Reinar. ciencia*. 2019; 8(35-51).
6. Farias Cavalcanti R, Atílio Jorge J, Souza Guimarães L. Characterization of *Aspergillus fumigatus* CAS-21 tannase with potential for propyl gallate synthesis and treatment of tannery effluent from leather industry. *3 Biotech*. 2018; 8(270).
7. Caoa QQ, Zoua C, Zhanga YH, Duc QZ, Yina JF, Shid J, et al. Improving the taste of autumn green tea with tannase. *Food Chemistry*. 2019; 277(432-437).
8. Aharwar A, Kumar Parihar D. *Talaromyces verruculosus* tannase production, characterization and application in fruit juices detannification. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2019; 18(101014).
9. JIANG Y, Jin P, ZHENG Y, MIAO Yj, DUAN Bz, HUANG Lf. Gallic Acid: A Potential Anti-Cancer Agent. *Chin J Integr Med*. 2022; 7(661-671).
10. Wu C, Zhang F, Li1 L, Jiang Z, Ni H, Xiao A. Novel optimization strategy for tannase production through a modified solid-state fermentation system. *Biotechnol Biofuels*. 2018; 11(92).

11. Dutta N, Miraz S, Usman Khan M, Charuhas Karekar S, Usman M, Manzoor Khan S, et al. Heterologous expression and biophysical characterization of a mesophilic tannase following manganese nanoparticle immobilization. *Colloids Surf. B.* 2021; 207(112011).
12. Ichikawa K, Shiono Y, Shintani T, Watanabe A, Kanzaki H, Gomi K, et al. Efficient production of recombinant tannase in *Aspergillus oryzae* using an improved glucoamylase gene promoter. *JBB.* 2020; 129(2).
13. Kima MJ, Kima DW, Asmelash Gebrua Y, Kima GY, Kima DH. Partial purification and characterization of a thermostable mushroom tannase induced during solid state fermentation of *Toxicodendron vernicifluum* stem bark by *Fomitella fraxinea*. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2019; 20(101177).
14. Kanpiengjai A, Khanongnuch C, Lumyong S, Haltrich D, Nguyen T, Kittibunchakul S. Co-production of gallic acid and a novel cell-associated tannase by a pigment-producing yeast, *Sporidiobolus ruineniae* A45.2. *Microb Cell F.* 2020; 19(95).
15. Reges de Senaa A, Campos Leitea T, Evaristo da Silva Nascimentob T, Carolina da Silvab A, Souzac C, Mello Vazd A, et al. Kinetic, thermodynamic parameters and in vitro digestion of tannase from *Aspergillus tamarii* URM 7115. *Chem. Eng. Commun.* 2018; 205(10).
16. Grand View Research. Grand View Research. [Online].; 2018.. Disponible en: [https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry?fbclid=IwAR13lXmbwLdM-K\\_8GGFZZdLkBd8NC6lEuyaYIj2WUZx6dMOFHzJLLXz91g](https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry?fbclid=IwAR13lXmbwLdM-K_8GGFZZdLkBd8NC6lEuyaYIj2WUZx6dMOFHzJLLXz91g).
17. TAO Z, DONG B, TENG Z, ZHAO Y. The Classification of Enzymes by Deep Learning. *IEEE ACCESS.* 2020; 8(89804).
18. ZAIER H, MAKTOUF S, ROUSSOS S, RHOUMA A. Filamentous fungi isolated from Tunisian olive mill wastes: use of solid-state fermentation for enzyme production. *Not. Bot. Horti.* 2021; 49(1).
19. Sharma KP. Tannin degradation by phytopathogen's tannase: A Plant's defense perspective. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2019; 21(101342).
20. R L, Nisha A, Thirumalai Vasan P, Kaleeswaran B. A comprehensive review on tannase: Microbes associated production of tannase exploiting tannin rich agro-industrial wastes with special reference tannase exploiting tannin rich agro-industrial wastes with special reference. *Environ. Res. J.* 2021; 201(111625).

21. De Lima J, Cabrera M, De Souza Mottab C, Convertic A, Carvalho Jra L. Hydrolysis of tannins by tannase immobilized onto magnetic diatomaceous earth nanoparticles coated with polyaniline. *Int. Food Res. J.* 2018; 107(470-476).
22. Farag A, Hassan S, El-Says A, Ghanem K. Purification, Characterization and Application of Tannase Enzyme Isolated from Marine *Aspergillus nomius* GWA5. *JPAM.* 2018; 12(4).
23. Chaudhary P, Chhokar V, Choudhary P, Kumar A, Beniwal V. Optimization of chromium and tannic acid bioremediation by *Aspergillus niveus* using Plackett–Burman design and response surface methodology. *AMB Exp.* 2017; 7(201).
24. Zhen L, Lange H, Crestini C. An Analytical Toolbox for Fast and Straightforward Structural Characterisation of Commercially Available Tannins. *MDPI.* 2021; 26(2532).
25. Szczurek A. Perspectives on Tannins. *MDPI.* 2021; 11(442).
26. Soares S, Brandão E, Guerreiro C, Soares S, Mateus N, de Freitas V. Tannins in Food: Insights into the Molecular Perception of Astringency and Bitter Taste. *MDPI.* 2020; 25(2590).
27. García Méndez M, Chávez González M, Flores Gallegos A, Morales Martínez T, Ascacio Valdés J, Sepúlveda L. Application of Lactic Acid Bacteria in Fermentation Processes to Obtain Tannases Using Agro-Industrial Wastes. *MDPI.* 2021; 7(48).
28. Auad P, Spier F, Gutterres M. Vegetable tannin composition and its association with the leather tanning effect. *Chem. Eng. Commun.* 2020; 207(5).
29. Thiyonila B, Kannan M, Reneeta N, Ramya T, Kayalvizhi N, Krishnan M. Influence of tannase from *Serratia marcescens* strain IMBL5 on enhancing antioxidant properties of green tea. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2020; 27(101675).
30. De las Rivas B, Rodríguez B, Anguita J, Muñoz R. Bacterial tannases: classification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019; 103(603-623).
31. Oriabinska L, Dziuba O, Dugan O. *Lactobacillus* AS PRODUCERS OF EXTRACELLULAR TANNASE. *Biotechnol. Acta.* 2018; 11(5).
32. Biswas I, Mitra D, Kumar Bandyopadhyay A, Das Mohapatra P. Contributions of protein microenvironment in tannase industrial applicability: An in-silico comparative study of pathogenic and non-pathogenic bacterial tannase. *Heliyon.* 2020; 6(e05359).

33. Roy S, Parvin R, Ghosh S, Bhattacharya S, Maity S, Banerjee D. Occurrence of a novel tannase (tan BLP) in endophytic *Streptomyces* sp. AL1L from the leaf of *Ailanthus excelsa* Roxb. *3 Biotech.* 2018; 8(33).
34. Márquez-López A, Ramírez-Conejo J, Chávez-Parga M, Valencia Flores D, Zamudio Jaramillo M, González Rodríguez H. Comparative analysis of enzymatic activity of tannase in non-conventional yeasts to produce ellagic acid. *Food Sci. Technol.* 2020; 40(3).
35. Kanpiengjai A, Khanongnuch C, Lumyong S, Kummasook A, Kittibunchakul S. Characterization of *Sporidiobolus ruineniae* A45.2 Cultivated in Tannin Substrate for Use as a Potential Multifunctional Probiotic Yeast in Aquaculture. *J. Fungi.* 2020; 6(378).
36. Sörensen Ristinmaa A, Coleman T, Cesar L, Langborg Weinmann A, Mazurkewich S, Brändén G. Structural diversity and substrate preferences of three tannase enzymes encoded by the anaerobic bacterium *Clostridium butyricum*. *J. Biol. Chem.* 2022; 298(4).
37. Afolayan T, Adah M, Ibidapo O, Orotope M, Orji F, C. Famotemi A, et al. Screening and Optimization of Culture Conditions for Local Production of Tannase from Fungal Species. *Trop J Nat Prod Res.* 2020; 4(12).
38. Azzaza H, Kholifa A, Abd El Tawaba A, Khattaba M, Murada H, Olafadehanb O. A newly developed tannase enzyme from *Aspergillus terreus* versus commercial tannase in the diet of lactating Damascus goats fed diet containing pomegranate peel. *Livest. Sci.* 2020; 241(10422).
39. Aharwar A, Kumar Parihar D. Tannases: Production, properties, applications. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2018; 15(322 - 334).
40. Dhiman S, Mukherjee G. A comparative analysis for selection of appropriate tannase assay method. *Mater. Today.* 2022; 48(1534-1538).
41. Govindarajana R, Mathivananb K, Rameshkumar N, Shyud D, Krishnane M, Kayalvizhia N. Purification, structural characterization and biotechnological potential of tannase enzyme produced by *Enterobacter cloacae* strain 41. *Process Biochem.* 2019; 77(37-47).
42. Shao Y, Zhang YH, Zhang F, Yang QM, Weng HF, Xiao Q. Thermostable Tannase from *Aspergillus Niger* and Its Application in the Enzymatic Extraction of Green Tea. *Molecules.* 2020; 25(952).
43. Al-Mraai S, Al-Fekaiki D, Al-Manhel D. Purification and characterization of tannase from the local isolate of *Aspergillus niger*. *J. appl. biol.* 2019; 7(1).

44. Wang C, Chen PX, Xiao Q, Yang QM, Weng HF, Zhang YH. Chitosan Activated with Genipin: A Nontoxic Natural Carrier for Tannase Immobilization and Its Application in Enhancing Biological Activities of Tea Extract. *Mar. Drugs*. 2021; 19(166).
45. De Lima J, Cabrera M, Casazza A, Fernandes da Silva M, Perego P, Bezerra de Carvalho L. Immobilization of *Aspergillus ficuum* tannase in calcium alginate beads and its application in the treatment of boldo (*Peumus boldus*) tea. *Int. J. Biol. Macromol*. 2018; 118(1989-1994).
46. Farias Cavalcanti R, Chahud Maestrello C, Souza Guimarães L. Immobilization of the Tannase From *Aspergillus fumigatus* CAS21: Screening the Best Derivative for the Treatment of Tannery Effluent Using a Packed Bed Reactor. *Front. bioeng. biotechnol*. 2021; 9(754061).
47. Larosa C, Salerno M, Silva de Lima J, Merijs Meri R, Fernandes da Silva M, Bezerra de Carvalho L. Characterisation of bare and tannase-loaded calcium alginate beads by microscopic, thermogravimetric, FTIR and XRD analyses. *Int. J. Biol. Macromol*. 2018; 115(900-906).
48. Silva de Lima J, Cabrera M, de Souza Mottab C, Convertic A, Carvalho L. Hydrolysis of tannins by tannase immobilized onto magnetic diatomaceous earth nanoparticles coated with polyaniline. *Int. Food Res. J*. 018; 107(470-476).
49. Liu L, Guo J, Zhou XF, Li Z, Zhou HX, Song WQ. Characterization and Secretary Expression of a Thermostable Tannase from *Aureobasidium melanogenum* T9: Potential Candidate for Food and Agricultural Industries. *Front. bioeng. biotechnol*. 2022; 9(769816).
50. Guan L, Wang K, Gao Y, Li J, Yan S, Ji N. Biochemical and Structural Characterization of a Novel Bacterial Tannase From *Lachnospiraceae* bacterium in Ruminant Gastrointestinal Tract. *Front. bioeng. biotechnol*. 2021; 9(806788).
51. Tomás-Cortázar J, Plaza-Vinuesa L, de las Rivas B, Lavín J, Barriales D, Abecia L. Identification of a highly active tannase enzyme from the oral pathogen *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum*. *Microb. Cell Factories*. 2018; 17(33).
52. Lei J, Zhang Y, Ni X, Yu X, Wang X. Degradation of epigallocatechin and epicatechin gallates by a novel tannase TanHcw from *Herbaspirillum camelliae*. *Microb. Cell Factories*. 2021; 20(197).

53. Pan J, Wang NN, Yin XJ, Liang XL, Wang ZP. Characterization of a Robust and pH-Stable Tannase from Mangrove-Derived Yeast *Rhodosporidium diobovatum* Q95. *Mar. Drugs*. 2020; 18(546).
54. Kanpiengjaia A, Unbanb K, Nguyenc TH, Haltrichc D, Chartchai K. Expression and biochemical characterization of a new alkaline tannase from *Lactobacillus pentosus*. *Protein Expr. Purif. Protein Expr. Purif.* 2019; 157(36-41).
55. Selvaraj S, Natarajan K, Nowak A, Ramachandra Murty V. Mathematical modeling and simulation of newly isolated bacillus cereus M1GT for tannase production through semi-solid state fermentation with agriculture residue triphala. *S. Afr. J. Chem. Eng.* 2020; 35(89-97).
56. Albuquerque K, Albuquerque W, Costa R, Batista J, Marques D, Pedrosa Bezerra R. Biotechnological potential of a novel tannase-acyl hydrolase from *Aspergillus sydowii* using waste coir residue: Aqueous two-phase system and chromatographic techniques. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2020; 23(101453).
57. Farias Cavalcanti R, Lombardi Martinez M, Pereira Oliveira W, Souza Guimarães L. Stabilization and application of spray-dried tannase from *Aspergillus fumigatus* CAS21 in the presence of different carriers. *3 Biotech.* 2020; 10(177).
58. Prommajak T, Leksawasdi N, Rattanapanone N. Tannins in Fruit Juices and their Removal. *CMU J. Nat. Sci.* 2020; 19(1).
59. Ghosh P, Swaraj N, Chandra Pradhan R. Effect of tannase (*Aspergillus ficcum*) on physicochemical properties of clarified Jamun juice. *CIGR.* 2021; 23(1).
60. Kundu D, Karmakar S, Banerjee R. In silico optimization of enzyme mediated debittering of Assam lemon: biochemical and sensory evaluation studies. *J Food Sci Technol.* 2019; 56(4).
61. Soares S, Brandão E, Guerreiro C, Soares S, Mateus N, de Freitas V. Tannins in Food: Insights into the Molecular Perception of Astringency and Bitter Taste. *Molecules.* 2020; 25(2590).
62. Sun J, Wang K, Xu B, Peng X, Chai B, Nong S, et al. Use of Hydrolyzed Chinese Gallnut Tannic Acid in Weaned Piglets as an Alternative to Zinc Oxide: Overview on the Gut Microbiota. *Animals.* 2021; 11(2000).

63. Liang S, Wang F, Chen J, Granato D, Li L, Yin JF. Optimization of a tannase-assisted process for obtaining teas rich in theaflavins from *Camelia sinensis* leaves. *Food Chem.*: X. 2022; 13(100103).
64. Li J, Xiao Q, Huang Y, Ni H, Wua C, Xiao A. Tannase application in secondary enzymatic processing of inferior Tieguanyin oolong tea. *Electron. J. Biotechnol.* 2017; 28(87-94).
65. \* MWaACB. Applications of Catechins in the Treatment of Bacterial Infections. *J. Pathog.* 2021; 10(546).
66. Spennatia FR, Andrea , Morib G, Siracusac G, Becarellic S, Di Gregorio S. THE ROLE OF COSUBSTRATE AND MIXING ON FUNGAL BIOFILM EFFICIENCY IN THE REMOVAL OF TANNINS. *Environ. Technol.* 2020; 41(26).
67. Arshad R, Mohyuddin A, Saeed S, Hassan A. Optimized production of tannase and gallic acid from fruit seeds by solid state fermentation. *Trop. J. Pharm. Res.* 2019; 18(5).
68. Das Mohapatra P, Biswas I, Mondal K, Pati B. Concomitant yield optimization of tannase and gallic acid by *Bacillus licheniformis* KBR6 through submerged fermentation: An industrial approach. *Acta Biol. Szeged.* 2020; 64(2).
69. Thiyonila B, Kannan M, Abisheik R, Krishnan M. Characterization of Apple Juice Clarified by Tannase from *Serratia marcescens* IMBL5 Produced using Agro-industrial Waste Materials. *J Pure Appl Microbiol.* 2022; 16(1).
70. Lekshmi R, Arif Nisha S, Kaleeswaran B, Alfarhan A. Pomegranate peel is a low-cost substrate for the production of tannase by *Bacillus velezensis* TA3 under solid state fermentation. *J. King Saud Univ. Sci.* 2020; 32(1831-1837).
71. Mansora A, Ramlia M, Abdul Rashida N, N S, Lanid M, Sharifudina S. Evaluation of selected agri-industrial residues as potential substrates for enhanced tannase production via solid-state fermentation. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2019; 20(101216).
72. Tawate S, Gupta R, Jain K. Development of a Technology Commercialization Model for Indian Biotechnology Firms. *IEEE Trans. Eng. Manag.* 2021; 23(41).
73. Fuentes Garibay J. Secuencia de la Tanasa de *Aspergillus niger* GH1 Y Produccion de la enzima en *Pichia pastoris* Doctoral] [, editor. San Nicolás de los Garza: Universidad Autónoma de Nuevo León; 2015.
74. Mendoza D, Niño L, Gelves G. Dynamic Modeling of Tannase Production from *Bacillus cereus*: A Framework Simulation based on Fed Batch Strategy. *J. Phys. Conf. Ser.* 2021; 2049(012091).

75. Reges de Sena A, Barros Oliveira F, Campos Leite T, Da Silva Nascimento T, Aparecida Moreira K, De Assis S. The Application of Aqueous Biphasic Systems as Strategy to Purify Tannase from *Aspergillus tamarii* URM 7115. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2017; 03(08).
76. Sangay-Tucto S, Duponnois R. ECOLOGICAL CHARACTERISTICS OF TARA (*CAESALPINIA SPINOSA*), A MULTIPURPOSE LEGUME TREE OF HIGH ECOLOGICAL AND COMMERCIAL VALUE. En Gorawala P, al. e, editores. In: *Agricultural Research Updates*. Lima: Nova Science Publishers, Inc; 2018. p. 190-208.
77. Siddique S, Kumari A, Kumar Gupta V. A REVIEW: STUDY ON TANNASE PRODUCED BY MICROBIAL SOURCES AND ITS INDUSTRIAL APPLICATION. *IJCRT*. 2020; 8(7).

