

ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TANASA

Rodríguez-Duran L.V.¹, Rivas E.¹, Cruz-Hernández M.A.¹, Lima N.², Teixeira J.A.², Aguilar C.N.^{1*}

¹ Departamento de Investigación en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Unidad Saltillo, 25280, Coahuila, México. *Correo electrónico: cristobal.aguilar@mail.uadec.mx

² Departamento de Ingeniería Biológica. Universidad de Minho, Campus Gualtar, Braga, Portugal

Palabras clave: tanasa, ensayo enzimático, HPLC

Introducción. La tanin acil hidrolasa (TAH) comúnmente conocida como tanasa, es una enzima (EC 3.1.1.20) que cataliza la hidrólisis de los enlaces éster presentes en ciertos taninos (1). Existen numerosos métodos para la cuantificación de la actividad tanasa, todos basados en la cuantificación del ácido gálico (AG= liberado tras la hidrólisis enzimática de ácido tánico (AT) o metil-galato (MG) (2,3). En el presente trabajo proponemos por primera vez, un método para la determinación de la actividad tanasa basado en la cuantificación, por técnicas cromatográficas (HPLC), del consumo de MG por la acción de la tanasa. El empleo del MG para la cuantificación de la actividad TAH permitirá evitar interferencias causadas por la presencia de AG o AT en los extractos enzimáticos.

Metodología. Se desarrolló un método cromatográfico para cuantificar MG y se utilizó para la determinación de actividad tanasa extracelular producida por *Aspergillus niger* GH1 por fermentación en estado sólido. El extracto enzimático (EE) obtenido se dializó (EED) y se concentró por el método del polietilenglicol (EEDC). Se determinó la actividad tanasa de estos extractos por el método aquí propuesto y por el reportado por Sharma y col. (3). El ensayo enzimático propuesto consistió en lo siguiente: en un tubo (muestra) se colocaron 100 µL de una solución 0.01 M de MG en buffer de citratos (50 mM, pH= 5.0), se agregaron 100 µL de extracto enzimático, se incubó a 30 °C durante 10 min y se agregaron 200 µL de HCl 2N para detener la reacción; el producto se inyectó al cromatógrafo. Se prepararon simultáneamente un blanco en donde el extracto enzimático fue sustituido por buffer y un control, en cual se utilizó buffer en lugar del sustrato. La unidad de actividad tanasa se definió como la cantidad de enzima para degradar 1 µmol de MG por minuto en condiciones estándar del ensayo. Para el análisis cromatográfico se utilizó un equipo de HPLC (Perkin Elmer serie 200) con un detector UV-VIS ajustado a 254 nm y un dosificador de 20 µL. La separación se realizó isocráticamente sobre una columna Phenomenex PRODIGY 5µ ODS 100. La fase móvil utilizada consistió en una mezcla de 35% de metanol, 5% de ácido acético y 60 % de agua con una velocidad de flujo de 1 mL/min durante 7 min a temperatura ambiente y una presión de 2800 psi.

Resultados y discusión. Las condiciones de la separación cromatográfica permitieron obtener señales

bien definidas y separadas para AG y MG, con tiempos de retención de 2.19 y 3.3 min, respectivamente (Fig. 1). La curva de calibración mostró una alta correlación ($r > 0.999$, $r^2 > 0.999$), lo que indica la confiabilidad del método cromatográfico utilizado. Los resultados de actividad tanasa de los diferentes extractos difirieron entre ambas técnicas (Fig. 2). La gran diferencia en el EEC puede deberse a interferencia por la concentración de AG en el extracto. En los extractos dializado y concentrado las diferencias pueden estar relacionadas a la sensibilidad del método.

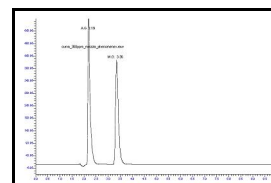


Fig. 1. Cromatograma de una mezcla de metil-galato (MG) y ácido gálico (AG).

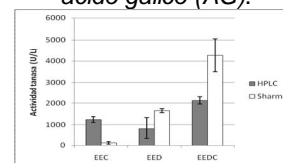


Fig. 2. Comparación de la determinación de la actividad tanasa por ambos métodos.

Conclusiones. Se reportó un método útil para la determinación de la actividad tanasa mediante técnicas cromatográficas. Sin embargo, es necesario trabajar en la validación del análisis cromatográfico y en la optimización de las condiciones de reacción.

Agradecimiento. Los autores agradecen el apoyo financiero de CONACYT.

Bibliografía.

1. Aguilar, C.N., Rodríguez, R., Gutiérrez-Sánchez, G., Augur, C., Favela-Torres, E., Prado-Barragán, L.A., Ramírez-Coronel, A. & Contreras-Esquivel, J.C. (2007). Microbial tannases: advances and perspectives. *Appl. Microb. Biotech.* 76: 47 - 59.
2. Aguilar, C.N., Augur, C., Viniegra-González, G. & Favela, E. (1999). A comparison of methods to determine tannin acyl hydrolase activity. *Braz. Arch. Biol. and Technol.* 42: 355 - 361.
3. Sharma, S., Bhat, T.K. & Dawra, R.K. (2000). A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. *Anal. Biochem.* 279: 85 - 89.