



PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA ENZIMA TANASA PRODUCIDA POR *Aspergillus niger* GH1.

Mario Alberto Cruz Hernández, Marco Arnulfo Mata Gómez, Raúl Rodríguez Herrera,
Juan C. Contreras Esquivel y Cristóbal Noé Aguilar*.

Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Investigación en Alimentos.
Blvd. V. Carranza e Ing. José Cárdenas, Saltillo Coah. CP. 25000. Tel. 01(844)4169213.*E-mail:
cag13761@mail.uadec.mx

Palabras claves: tanasa, purificación, cromatografía.

Introducción. La enzima tanasa o tanin-acil-hidrolasa (EC-3.1.1.20), cataliza hidrólisis de los enlaces éster de taninos, las principales fuentes de tanasa son animales vegetales y microbianas siendo estas últimas de donde se obtienen con mayor actividad y de manera más estable(1). La tanasa también está involucrada en la maduración de las frutas ya que desesterifica algunos ésteres formados a partir de los ácidos quebulónico, gálico, hexahidrofénico con la glucosa(2). Esta enzima es muy utilizada en la industria de los alimentos, para la clarificación de jugos y otras bebidas. Esta enzima también es utilizada en la industria farmacéutica para obtener el ácido gálico que se utiliza en la síntesis del Trimetoprim(3). La enzima tanasa solo se puede encontrar comercialmente en forma de extracto es por eso que la búsqueda de alternativas de purificación tienen gran importancia(4).

Metodología. El extracto enzimático obtenido de la fermentación fue dializado en membrana de celulosa y buffer de citratos 50mM pH 5.0. Para la concentración de proteínas se evaluaron dos métodos, uno utilizando acetona a 4°C y el que presentó mejores resultados fue con membrana de diálisis y polietilenglicol 6000. El extracto concentrado se pasó por cromatografía de intercambio iónico donde se compararon tres columnas con diferentes rellenos cromatográficos (DEAE, Q, ANX). Se empleó un Rotofor para separar las proteínas y conocer su punto isoeléctrico. Cada etapa fue comparada en un gel de electroforesis (SDS-PAGE) para identificar las proteínas que se fueran perdiendo.

Resultados y discusión. De los métodos evaluados para la concentración de proteínas, el de polietilenglicol (PEG) y membrana de diálisis mostró resultados más favorables ya que el extracto al inicio tenía 164.81 mg/L de proteína y el extracto concentrado con PEG 1198.07 mg/L. Para el caso de la cromatografía de intercambio iónico, en los tres rellenos se adsorbió la enzima tanasa y la mejor separación de las proteínas se observó con la columna DEAE (figura 1). En el análisis por rotofor se observaron dos fracciones con actividad tanasa a pH de 4 y 7 respectivamente, esto indica que esta técnica es útil como un paso en la purificación (figura 2). El gel de electroforesis (SDS-PAGE) muestra una

gran cantidad de proteínas en el extracto concentrado y se puede observar que existe una purificación parcial en cada una de las etapas.

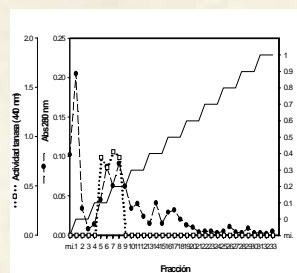
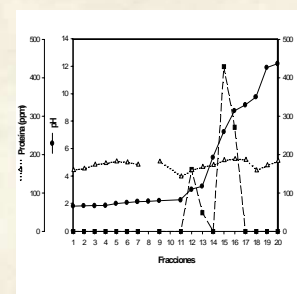


Fig 1 Columna cromatográfica DEAE NaCl (—) () Actividad tanasa, (●) determinación de proteína por absorbancia a 280 nm.



Actividad tanasa () y proteína (●).

Conclusiones La enzima tanasa producida por el hongo *Aspergillus niger* GH1 aislado del semidesierto de México, puede ser purificada parcialmente utilizando para concentrar las proteínas el método de PEG, la columna cromatográfica DEAE para separar las proteínas y el sistema de rotofor también muestra una separación de la enzima tanasa sobre las otras proteínas.

Bibliografía.

- Aguilar, C., Gutiérrez-Sánchez, G. (2001). Review: Sources, Properties, Applications and Potential uses of Tanin Acyl Hidrolase. *Food Science Technology Int.* 7;(5) 373-382.
- Haslam, E., Haworth, R., Jones, K., Rogers, H. (1961). Gallotannins. Part I. The fraction of tannase. *J Chem Soc.* 1829-1835.
- Belmares, R., Contreras-Esquivel, J.C., Rodríguez, R., Ramírez-Coronel, A., Aguilar, C.N. (2004). Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft und-technologie Food Science and Technology.* 37 (8): 857-864.
- Cruz-Hernandez, M., Contreras-Esquivel, J., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C. (2004). Producción y purificación parcial de la enzima tanasa de *Aspergillus niger* GH1. Tesis de Maestría de la Universidad Autónoma de Coahuila.