

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE COAHUILA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



TESIS:

**PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA TANIN-ACIL HIDROLASA POR
FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO USANDO RESIDUOS DE TÉ
VERDE Y PULPA DE CAFÉ COMO SOPORTE**

Que presenta:

ERICK MAURILIO PEÑA LUCIO

Para obtener el título de:

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Saltillo, Coahuila, México

Agosto, 2020





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE COAHUILA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS
GRUPO DE BIOPROCESOS Y BIOPRODUCTOS

La Facultad de Ciencias Químicas a través del comité de tesis hace constar que la tesis titulada:

Producción de la enzima tanin-acil hidrolasa por fermentación en estado sólido usando residuos de té verde y pulpa de café como soporte

Presentado por:
Q.F.B. ERICK MAURILIO PEÑA LUCIO.

Ha sido aceptada como requisito para obtener el Título de:
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

El trabajo presentado ha sido dirigido por el siguiente comité:

Co-directores:

Dra. Mónica Lizeth Chávez González

Dr. Cristóbal Noé Aguilar González

Asesores Internos:

Dr. Héctor Arturo Ruiz
Leza

Dr. José L. Martínez Hernández

Dra. Mayela Govea Salas

Asesores Externos:

Dra. Liliana Londoño Hernández
Universidad Nacional Abierta y a Distancia,
Colombia

Dr. Abdulhameed Sabu
Kannur University, India



RESUMEN

La presente tesis se centró en la producción de la enzima tanin-acil hidrolasa utilizando residuos de té verde y pulpa de café como soporte y substrato en la fermentación en estado sólido, el objetivo general fue la optimización del proceso de fermentación en estado sólido para la producción de tanasas utilizando cepas fúngicas endémicas de los "Western Ghats" en India y de los suelos de Cuatro Ciénegas, Coahuila. Los "Western Ghats" son un ecosistema particular con plantas ricas en taninos y temperaturas muy altas en el día y en la noche muy bajas, debido a esto, las cepas pertenecientes a estos ambientes tienen gran capacidad de adaptación. Cuatro Ciénegas es una zona única por los ecosistemas que ahí se encuentran, los cuales son similares a los de hace millones de años.

El aprovechamiento de residuos agroindustriales de té verde y pulpa de café es una alternativa para la obtención de metabolitos de interés mediante la fermentación en estado sólido (FES), la cual consiste en el crecimiento de microorganismos sobre soportes sólidos húmedos en ausencia o casi ausencia de agua libre. Debido a que actualmente los residuos de té verde y pulpa de café, representan una problemática ambiental, pues, generalmente son depositados a los mantos acuíferos y a los suelos y representan una problemática ambiental, La obtención de enzimas hidrolíticas (tanasa) por medio de residuos agroindustriales es una alternativa para disminuir el impacto ambiental que tienen estos productos. La tanin-acil hidrolasa (TAH) comúnmente conocida como tanasa (EC. 3.1.1.20) es la responsable de la degradación de los taninos, los cuales son polifenoles que se producen naturalmente como metabolitos secundarios de plantas; esta enzima es capaz de hidrolizar los enlaces éster presentes en los galotaninos, elagitaninos y taninos complejos y producir ácido gálico y glucosa. La TAH es



ampliamente utilizada en la industria alimentaria, farmacéutica y fotográfica, por ejemplo, como clarificante de bebidas, conservante de alimentos, en la obtención de ácido gálico, el cual es ampliamente utilizado como intermediario necesario en la síntesis de trimetoprim con sulfametoxazol, en tintas de fotografía e impresión

Los Hojas gastadas del té verde y la pulpa de café, adquiridos de un supermercado local de Saltillo, Coahuila y de Xilitla, San Luis Potosí, México, respectivamente, fueron utilizados para su uso como soporte en la FES con el objetivo de producir enzima tanasa. Se determinaron las mejores condiciones de producción de enzima tanasa utilizando un diseño experimental Hunter & Hunter para conocer el efecto de variables en rangos amplios de exploración, se eligieron tres variables (temperatura, tamaño de inóculo y humedad), las cuales fueron evaluadas en dos niveles (+/-) y después se procedió a realizar la optimización del bioproceso con el objetivo de encontrar las mejores condiciones de producción de enzima tanasa debido a que el diseño Box-Benkhen permite evaluar las interacciones que existe entre diferentes variables y determinar los niveles idóneos para la producción de enzima tanin acil hidrolasa, de acuerdo a los resultados se obtuvo que una temperatura de 30°C, humedad de 80% y tamaño de inóculo de 1×10^8 fueron los valores óptimos para la producción enzimática. Los resultados arrojaron que se obtuvo una actividad de 246.82 ($U\ g^{-1}$) a las 48 h de la cinética de fermentación. La purificación parcial de la enzima tanasa se realizó para obtener mayores rendimientos de actividad enzimática e incrementar los valores de actividad específica, se llevaron a cabo tres técnicas, alcanzando una actividad específica de 81.93 $U\ mg^{-1}$. La enzima se mostró mejor actividad a niveles de pH cercanos a 5.0, temperatura 30 °C, obteniendo niveles de actividad enzimática alrededor de 240.36 $U\ g^{-1}$. El análisis del efecto de los iones metálicos indicó que los iones Mg^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{3+} , promovieron una mayor actividad tanasa.



ABSTRACT

The present project focuses on the production of the tannin-acyl hydrolase enzyme using green tea residues and coffee pulp as support for solid-state fermentation, the overall objective was the optimization of the fermentation process for obtaining tannases using endemic strains from "Western Ghats" in India and "Cuatrociénegas", Coahuila, México. The "Western Ghats" are a particular ecosystem with plants rich in tannins and very high temperatures during the day and very low at night, due to this, the strains belonging to these environments have a great capacity for adaptation. Cuatro Ciénegas is a unique area because of the ecosystems found there, which are similar to those of millions of years ago.

The use of agro-industrial residues of green tea and coffee pulp is an alternative for obtaining metabolites of interest Solid-state fermentation, it which has been defined as a bioprocess that is performed in the absence of free water was used to Obtain hydrolytic enzymes (tannase) by agro-industrial wastes (coffee pulp and green tea). Tannin-acyl hydrolase (TAH) commonly known as tannase (EC. 3.1.1.20) is responsible for the degradation of tannins, this enzyme can hydrolyze the bonds present in the gallotannins, ellagitannins and complex tannins to produce gallic acid and glucose. TAH is widely used in the food, pharmaceutical, and photographic industries, for example, as a beverage clarifier, food preservative, in obtaining gallic acid, which is widely used as a necessary intermediary in the synthesis of trimethoprim with sulfamethoxazole, in photography inks and printing (Govindarajan y col. 2016). The residues of green tea and coffee pulp, which are high in tannins and phenolic compounds (Sánchez y col., 2013), were used as support in SSF to produce tannase. An experimental Hunter & Hunter design was used to determine the best production conditions for tannase enzyme, three variables (temperature, inoculum size, and moisture) were



evaluated, in two levels (+/-), in two levels (+/-), in two degrees to perform the bioprocess optimization employing a Box-Benken experimental design. It was obtained that a temperature of 30 °C, the moisture of 80%, and inoculum size of 1×10^8 , were optimal values for enzymatic production. The results showed that it was obtained an optimal tannase activity of 246.82 (U g⁻¹) at 48 h; The pre-purification of the tannase enzyme was performed with three different techniques, obtaining that, along with the pre-purification steps it was increased the yields of specific activity, the best specific activity levels were 81.93 (U mg⁻¹). The optimal pH and temperature of the tannase enzyme were 5.0 and 30 °C, respectively; Mg²⁺, Cu²⁺, and Fe³⁺ ions promoted the enzymatic activity.