

Obtención de ácido gálico a partir de tara (*Caesalpineia spinosa* L.) por fermentación en sustrato-sólido con *Aspergillus*

Gallic acid obtained from tara (*Caesalpineia spinosa* L.) by solid-substrate fermentation with *Aspergillus*

Marcial Ibo Silva Jaimes¹, Patricia F. Fernández Pérez¹

RESUMEN

Objetivo: Obtener ácido gálico a partir de la fermentación en sustrato sólido de tara (*Caesalpineia spinosa* L.) trillado, producto con un bajo contenido de taninos (alrededor de 36%) y alto contenido de fibra. **Métodos:** Las muestras se acondicionaron en tres niveles de humedad (50%, 65% y 80%), con y sin suplementación de nutrientes a las que se inocularon 03 cepas de hongos (*Aspergillus niger* ATCC 16888 *Aspergillus carbonarius* NRRL 67 A. *niger* NRRL 3), se incubaron a una temperatura de 25°C. El proceso fermentativo fue seguido mediante las determinaciones de ácido gálico. **Resultados:** No se observaron diferencias estadísticas significativas ($\alpha=5\%$) entre los tratamientos con y sin suplementación de nutrientes ($\bar{x}=7,7$ g/100g PT; $\bar{x}=7,3$ g/100 g PT). El proceso fue más eficiente cuando el polvo de tara trillado fue acondicionado con un contenido de humedad de 65% donde el rendimiento promedio de 7,9 g/100g PT es superior, y estadísticamente diferente ($\alpha = 5\%$), al de las muestras con de 50% y 80% (promedio = 7,3 g/100 g PT; $\bar{x}=7,2$ g/100 g PT). Existieron diferencias estadísticas significativas ($\alpha = 5\%$) en el rendimiento de ácido gálico producido, al séptimo día de fermentación, por las tres cepas utilizadas siendo el *A. niger* ATCC 16888 el de mayor rendimiento ($\bar{x}=8,9$ g/100g PT), seguido por el *A. niger* NRRL 3 y *A. carbonarius* NRRL 67 ($\bar{x}=7,3$ g/100 g PT; $\bar{x}=6,4$ g/100 g PT). **Conclusiones:** El *A. niger* es un buen fermentador de sustratos ricos en taninos para la producción de ácido gálico.

Palabras clave: Tara, *Caesalpineia spinosa* L., ácido gálico, fermentación en sustrato sólido, *Aspergillus niger*.

ABSTRACT

Objective: Get gallic from trite solid substrate fermentation of tara (*Caesalpineia spinosa* L.) product with a low tannin content (about 36%) and high in fiber acid. **Methods:** Samples were conditioned in three moisture levels (50%, 65% and 80%), with and without supplementation of nutrients to which 03 strains were inoculated fungi (*Aspergillus niger* ATCC 16888 *Aspergillus carbonarius* NRRL 67 A. *niger* NRRL 3), incubated at a temperature of 25 ° C. The fermentation process was followed by the determination of gallic acid. **Results:** Statistically significant differences ($\alpha = 5\%$) between treatments with and without nutrient supplementation ($\bar{x}=7.3$ g/100 g LP $\bar{x}=7.7$ g/100g PT) were not observed. The process was more efficient when the threshing tara powder was conditioned with a moisture content of 65% with the average of 7.9 g/100g PT is higher and statistically different ($\alpha = 5\%$), the samples with 50% and 80% (mean = 7.3 g/100 g PT; $\bar{x}=7.2$ g/100 g PT). There were statistically significant differences ($\alpha = 5\%$) in the yield of gallic acid produced, the seventh day of fermentation, the three strains used will be the *A. niger* ATCC 16888 the highest yield ($\bar{x}=8.9$ g/100g PT), followed by the *A. niger* NRRLA. *carbonarius* NRRL 3 and 67 ($\bar{x}=7.3$ g/100 g PT, $\bar{x}=6.4$ g/100 g PT). **Conclusions:** *A. niger* is a good fermenter tannin rich substrates for the production of gallic acid.

Keywords: Tara, *Caesalpineia spinosa* L., gallic acid, solid substrate fermentation, *Aspergillus niger*.

¹ Universidad Nacional Agraria La Molina .

INTRODUCCIÓN

La tara (*Caesalpinia spinosa* L.) es una planta ampliamente distribuida en el Perú, siendo los departamentos de Cajamarca, La Libertad, Ayacucho, Huancavelica, Apurímac, Ancash y Huánuco los principales centros de producción. Generalmente se encuentra al estado silvestre y posee un inmenso potencial médico, alimentario e industrial (Reátegui y Nakasone, 1987).

De las semillas se obtiene una goma de gran valor comercial, de uso alimenticio, proveniente del endospermo y de la vaina molida se puede obtener el ácido tánico y el ácido gálico, utilizado como antioxidante en la industria del aceite y en la industria cervecera como decolorante. La vaina molida es un extraordinario producto de exportación como materia prima, especialmente para la obtención de ácido gálico. La vaina representa el 62% del peso de los frutos y es la que posee la mayor concentración de taninos, que oscila entre 40 y 60%.

Los taninos que pueden estar presentes en hojas, frutos, cáscaras y maderas, pudiendo acumularse en grandes cantidades en órganos o tejidos vegetales. Son parte del mecanismo de defensa de los vegetales contra microorganismos, animales herbívoros y enfermedades (Hagerman, 2002).

Basado en su estructura molecular, los taninos pueden ser hidrolizables y condensados (las proantocianidinas). Los taninos hidrolizables son derivados del ácido gálico (3,4,5- ácido trihidroxi benzoico), que está esterificado en el centro de un poliol, generalmente glucosa, donde los radicales hidroxilo pueden estar parcial o totalmente esterificados con grupos fenólicos para formar taninos hidrolizables más complejos. Dependiendo del tipo de ácido que se produce por la reacción, se subdividen en galotaninos (ácido gálico y elagitaninos) y ácido elágico (dilactona estable del ácido hexahidroxidifénico). Los galotaninos son fácilmente hidrolizables por la acción de la enzima tanasa, ya que son simples ésteres de poligaloil de glucosa. El prototipo de galotanino es el pentagaloil glucosa (β -1,2,3,4,6-pentagaloil -O-D-glucopiranososa), que tiene 5 ésteres idénticos unidos que envuelven grupos hidroxil alifáticos del centro del azúcar (Hagerman, 2002).

Lekha y Lonsane (1997) menciona que la importancia Industrial del ácido gálico radica en el amplio campo donde puede aplicarse. Se ha demostrado que el galato de etilo es más eficiente que el ácido ascórbico en la conservación de la leche en polvo; los galatos de acilo, *dodecilo* y *tetradecilo* se utilizan como antioxidantes de grasas. Antioxidantes como el *Galato de propilo*, *galato de octilo* y *galato de dodecilo* se derivan del ácido gálico, requeridos por proteger del calentamiento a aceites de fritura o alimentos sometidos a un calor fuerte durante su fabricación. Se utilizan, mezclados con BHA (E 320) y BHT (E 321) para la protección de grasas y aceites comestibles.

Tienen además múltiples aplicaciones en otras actividades de la industria química como revelador fotográfico, para la curtiembre en la industria del cuero, manufactura del papel, en productos de farmacia y otros relacionados al grabado, litografía y en la fabricación de tintas de imprenta.

Actualmente el ácido gálico es producido por hidrólisis química de galotaninos, siendo la más utilizada la hidrólisis con ácido sulfúrico 1M durante 24 h. Se han ensayado también métodos de ultrasonido que producen ondas planas progresivas oscilantes, que al pasar por un medio generan una perturbación que resulta en la ruptura de enlaces, produciendo la hidrólisis. Sin embargo, el método que está siendo intensamente investigado es el enzimático, donde el ácido tánico es sometido a la acción de la tanasa esterasa. La tanasa (taninacil hidrolasa EC 3.1.1.20) es una enzima con un gran potencial para su aplicación en la industria farmacéutica y de alimentos, pero su utilización a gran escala se ha limitado principalmente por los altos costos de producción, recuperación y purificación, sobre la que muchos investigadores vienen trabajando (Rodríguez, Valdivia-Urdiales, Contreras-Esquivel, Rodríguez-Herrera y Aguilar (2010); Saavedra (2003).

Una alternativa interesante es la utilización de organismos productores de la enzima tanasa (hongos, bacterias o levaduras), directamente sobre el sustrato, proceso llamado fermentación (Antonio, 1992), que puede ser sumergida (FS) o en sustrato sólido (FSS) (Carrasco, Valiño, Medina y Ravelo, 1999).

En general, según Carrasco (1999), la FSS es un sistema que consiste de: una fase gaseosa estática, un soporte insoluble, una fase acuosa donde las sustancias solubles del sustrato se disuelven y una fase biótica (formada por el microorganismo). En este proceso la materia sólida actúa como fuente de carbono, nitrógeno y otros componentes; también como soporte para el crecimiento de las células microbianas. En esta matriz el aire atraviesa los intersticios del medio a presiones relativamente bajas; para ello, el sustrato no debe presentar aglomeraciones de partículas individuales o por el micelio fúngico. El crecimiento microbiano ocurre en condiciones parecidas a sus hábitats naturales. El medio presenta alta heterogeneidad y los sustratos no están completamente accesibles a los microorganismos. La matriz sólida puede ser un material biodegradable y debe presentar gran superficie específica. Comúnmente se utilizan residuos vegetales.

Los hongos filamentosos son los microorganismos más adaptables a este tipo de proceso fermentativo. Los hongos son capaces de crecer a bajos valores de actividad de agua y altas presiones osmóticas. La combinación de la generación de nuevas hifas y el crecimiento de la región apical permite una rápida colonización de los sustratos sólidos y por ende, una mejor utilización de los nutrientes disponibles.

En nuestro país las empresas dedicadas a la obtención de la goma, tienen como residuo la vaina, la cual es molida y exportada como polvo de tara. Este polvo de tara contiene alrededor de 60% de taninos, siendo este una fuente de ácido gálico. El método tradicional de la hidrólisis ácida permite obtener ácido gálico pero no de grado alimenticio, siendo la hidrólisis enzimática, usando tanasa, otra posibilidad.

La tanasa que se obtiene de fuentes microbianas es aún escasa y cara, por lo que una hipótesis válida es llevar a cabo la hidrólisis del ácido tánico con el uso de microorganismos mediante un proceso de fermentación en sustrato sólido (FSS), a fin de obtener ácido gálico de calidad alimenticia.

Por ello el objetivo de la investigación es estudiar el efecto de las cepas del género *Aspergillus* (*A. niger* ATCC 16888, *A. carbonarius* NRRL 67, *A. niger* NRRL 3), los

niveles de humedad (50%, 65% y 80%) y la suplementación de nutrientes durante el proceso de fermentación en sustrato sólido sobre la obtención de ácido gálico a partir del polvo de tara (PT).

MATERIAL Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en la Universidad Nacional Agraria La Molina. El sustrato fue polvo trillado de la vaina de tara (*C. spinosa* L.), proporcionado por la empresa exportadora Argos Export S.A. de Lima- Perú. Cabe mencionar que el polvo de tara trillado es un producto industrial obtenido de una primera molienda. Se realizó el análisis proximal de la materia prima. El monitoreo del proceso fermentativo se realizó, principalmente, mediante la determinación de ácido gálico y ácido tánico; por lo que los métodos para su determinación fueron previamente validados. Para la determinación de ácido gálico se usó el Método de la rodanina metanólica descrito por Sharma, Bhat, y Dawra (2000), y para el ácido tánico el método descrito por Lastra (2000).

La germinación de las esporas y el desarrollo de la forma vegetativa del hongo, se realizó siguiendo las indicaciones del manual (ATCC, 2000). La adaptación se hizo enfrentado a las cepas de hongos a concentraciones crecientes de ácido tánico, como única fuente de carbono, para ello se prepararon placas petri con agar tanino y se inocularon 10^7 esporas del hongo por dispersión y se incubó a 25°C por 72 h (Antonio, 1992).

A fin de contar con cantidades suficientes de esporas para iniciar el proceso de fermentación en sustrato sólido, alrededor de 10^7 /mL, cada cepa de hongo fue sembrada en agar sabourau con 5% de taninos, incubados a 25°C por 5 - 7 días, para luego cosechar los esporos mediante lavados con solución salina fisiológica conteniendo Tween 80 al 1% (Antonio, 1992).

Tomando en cuenta las recomendaciones de Carrasco (1999), los experimentos se ajustaron a un rango de humedad entre 30 - 85%. Para ello se ajustó la humedad, mezclando 100 g de polvo de tara (tamaño de partícula 6 mm), en matraces, con agua destilada estéril, hasta conseguir niveles de humedad de 50%, 65% y 80%.

Con respecto al contenido de nutrientes, la estandarización se efectuó tomando en cuenta la composición natural del polvo de tara (PT) y las necesidades nutritivas óptimas de los hongos (Antonio, 1992) tal como se indica en la Tabla 1.

Para el desarrollo de la fermentación en sustrato sólido, la mezcla estandarizada de polvo de tara, en bandejas de acero inoxidable

de 60 cm x 40 cm x 5 cm, en una proporción de 500 g/bandeja (hasta alcanzar aproximadamente una altura de 1 cm), fue inoculada, dispersando 10^7 - 10^8 esporos, para luego ser incubado por 7 días a una temperatura de 25°C, realizando controles diarios de ácido gálico, Acido tánico, pH, temperatura y humedad.

Tabla 1. Nutrientes necesarios para biomasa seca (10 g /L)

Nutrientes	Necesidades para producción de biomasa (ppm)	Contenido en polvo de tara (ppm)	Cantidad a añadir (ppm)
KH ₂ PO ₄	: 1000,0	3,2 x 10 ⁻³	999,99
MgSO ₄ ·7H ₂ O	: 1000,0		100,00
FeSO ₄ ·7H ₂ O	: 1,0	0,480	0,52
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	: 1,0	0,362	0,638
CuSO ₄ ·5H ₂ O	: 0,4	0,232	0,168
MnSO ₄ ·H ₂ O	: 0,4		0,4

Fuente: Antonio (1992)

RESULTADOS

Los análisis proximales del polvo de tara trillado arrojaron los valores de pH 3,4; humedad 11,20% y ceniza 3,77%; proteínas 3,90%, carbohidratos 73,24%, cenizas 0,56% y fibra 7,33%.

El contenido de ácido tánico fue de 36% y ácido gálico 1%.

El proceso de fermentación en sustrato sólido se realizó usando polvo de tara, sin realizar una extracción previa de ácido tánico en donde se evaluaron las siguientes variables.

Efecto de la adición de nutrientes

Con suplementación de nutrientes se obtuvo un promedio de 7,7 g/100g PT y sin suplementación de nutrientes un promedio de 7,3 g/100 g PT. Estadísticamente el factor nutriente no produce diferencias estadísticamente significativas en los rendimientos de ácido gálico (Ver Tabla 2) ni en el consumo de ácido tánico (Ver tabla 3).

Tabla 2. Análisis de varianza de las mediciones de ácido gálico en las muestras durante los 7 días de Fermentación en sustrato sólido del polvo de tara ($p < 0.05$ hay diferencias significativas, Fc = estadístico F calculado).

Fuente de variación	Grados de libertad	Día 0		Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5		Día 6		Día 7	
		Fc	P	Fc	P	Fc	P	Fc	P	Fc	P	Fc	P	Fc	P	Fc	P
Humedad	2	0,99	0,38	1,27	0,29	6,3	0,00	0,918	0,41	4,751	0,02	8,234	0,00	7,844	0,00	7,859	0,00
Cepa	2	1,41	0,26	4,04	0,03	3,4	0,04	11,81	0,00	10,45	0,00	36,13	0,00	60,75	0,00	75,45	0,00
Nutriente	1	0,15	0,71	0,04	0,84	2,12	0,15	4,647	0,04	0,78	0,38	2,584	0,12	0,196	0,66	1,156	0,29
Humedad * cepa	4	0,89	0,48	1,00	0,42	1,3	0,29	0,424	0,79	3,178	0,03	2,519	0,06	2,043	0,11	1,883	0,14
Humedad * nutriente	2	0,1	0,91	0,02	0,98	5,62	0,01	19,36	0,00	14,9	0,00	13,21	0,00	1,282	0,29	1,333	0,28
Cepa * nutriente	2	0,05	0,95	1,74	0,19	1,09	0,35	3,004	0,06	1,519	0,23	2,218	0,2	4,605	0,02	1,437	0,25
Humedad * cepa * nutriente	4	0,04	1,00	0,65	0,63	1,44	0,24	3,165	0,03	0,939	0,45	0,584	0,68	0,81	0,53	2,05	0,11
Error	36																
Total	53																

Tabla 3. Análisis de varianza de las mediciones de ácido tánico en las muestras durante los 7 días de Fermentación en sustrato sólido del polvo de tara ($P < 0.05$ hay diferencias significativas, Fc = estadístico F calculado)

Fuente de variación	Grados de libertad	Día 0		Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5		Día 6		Día 7	
		Fc	P	Fc	P	Fc	P	Fc	P	Fc	P	Fc	P	Fc	P	Fc	P
Humedad	2	1,05	0,36	2,15	0,13	2,79	0,08	3,515	0,04	8,676	0,00	13,73	0,00	19,99	0,00	28,84	0,00
Cepa	2	0,34	0,72	1,05	0,36	0,46	0,63	0,769	0,47	6,524	0,00	18,51	0,00	56,32	0,00	99,74	0,00
Nutriente	1	2,63	0,11	4,39	0,04	6,65	0,01	23,52	0,00	34,79	0,00	41,92	0,00	28,25	0,00	1,872	0,18
Humedad * cepa	4	1,23	0,32	1,14	0,35	1,4	0,25	1,519	0,22	2,662	0,05	3,373	0,2	5,258	0,00	2,728	0,04
Humedad * nutriente	2	1,00	0,38	1,82	0,18	2,66	0,08	5,747	0,01	9,43	0,00	9,627	0,00	8,585	0,00	1,795	0,18
Cepa * nutriente	2	0,01	0,41	0,63	0,54	0,78	0,47	3,9	0,03	7,709	0,00	11,7	0,00	20,71	0,00	27,89	0,00
Humedad * cepa * nutriente	4	0,51	0,73	0,45	0,77	0,78	0,55	1,318	0,28	1,447	0,24	0,997	0,42	2,156	0,09	1,413	0,25
Error	36																
Total	53																

Los análisis demostraron que la presencia o ausencia de nutrientes en la fermentación en sustrato sólido es indiferente para la producción de ácido gálico, a partir del polvo trillado de tara. (Figura 1).

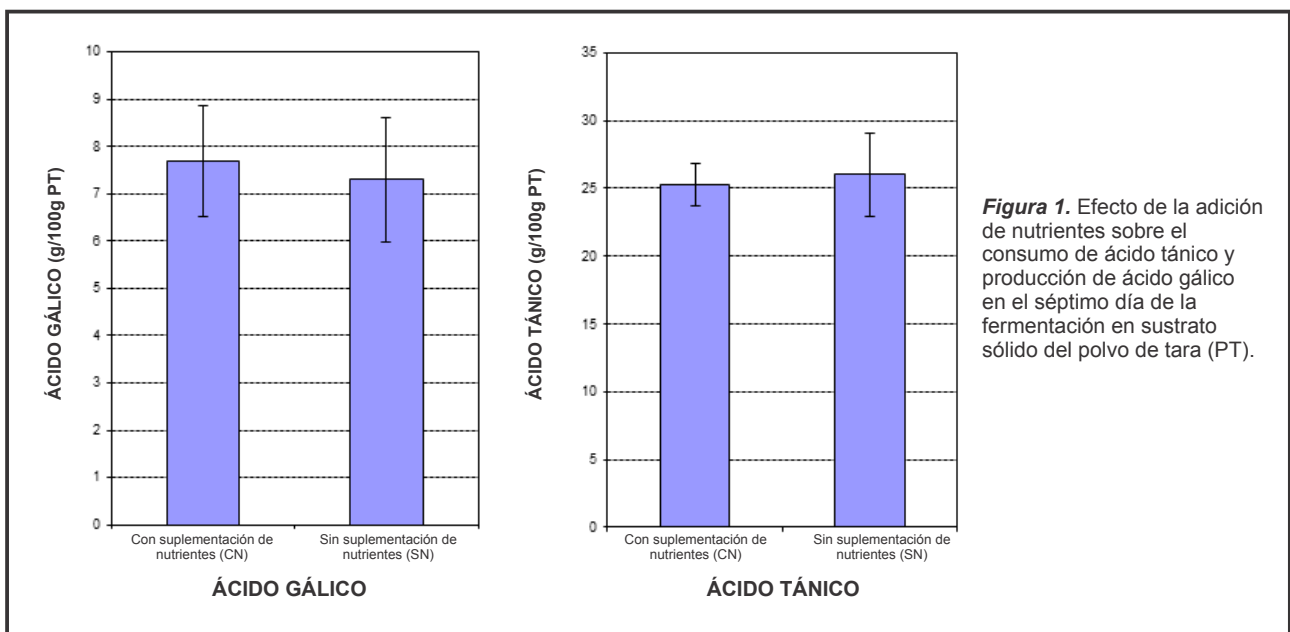


Figura 1. Efecto de la adición de nutrientes sobre el consumo de ácido tánico y producción de ácido gálico en el séptimo día de la fermentación en sustrato sólido del polvo de tara (PT).

Efecto de la humedad del sustrato

Se produjo un crecimiento fúngico diferenciado en los tres niveles de humedad teniéndose a 65% un rendimiento promedio de 7,9 g/100g PT, seguida por la de 50% con un promedio de 7,3 g/100 g PT y finalmente por la de 80% con un promedio de 7,2 g/100 g PT. Se observó que en los sistemas con 50% de humedad el hongo se desarrolló lenta pero homogéneamente, mientras que a 65% se desarrolló rápidamente y a 80% hubo un crecimiento acelerado con una posterior licuación del sustrato (Figura 2).

El análisis de varianza, demostró que a partir del quinto día de fermentación, el factor humedad, generó rendimientos de ácido gálico estadísticamente diferentes en forma significativa (Ver Tabla 2). La comparación múltiple de promedios, en el séptimo día de fermentación, demostró que la humedad que produjo mayor rendimiento en la producción de ácido gálico fue el de 65%, seguida por el de 50% y finalmente por el de 80%.

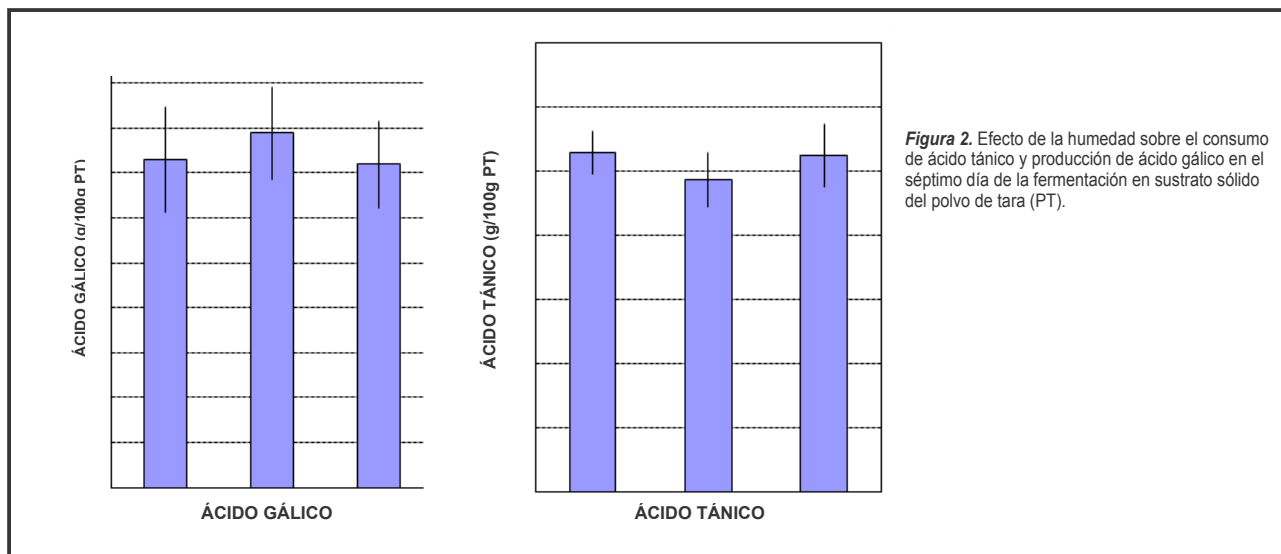


Figura 2. Efecto de la humedad sobre el consumo de ácido tánico y producción de ácido gálico en el séptimo día de la fermentación en sustrato sólido del polvo de tara (PT).

Efecto de las cepas de hongos

Se observó que la cepa *A. niger* ATCC 16888 presentó un rendimiento de ácido gálico de 8,9 g /100 g P.T, seguido por *A. niger* NRRL 3 con un promedio = 7,3 g/100 g PT y finalmente *A. carbonarius* NRRL 67 con un promedio de 6,4 g/100 g PT (Figura 3).

Se realizó un análisis de varianza de los datos referente al rendimiento de ácido tánico y ácido gálico en las que se observó la existencia de diferencias estadísticas significativas, en ambos, desde el cuarto día de fermentación. Lo mismo se observó en las pruebas estadísticas de comparación múltiple de promedios ($\alpha=5\%$).

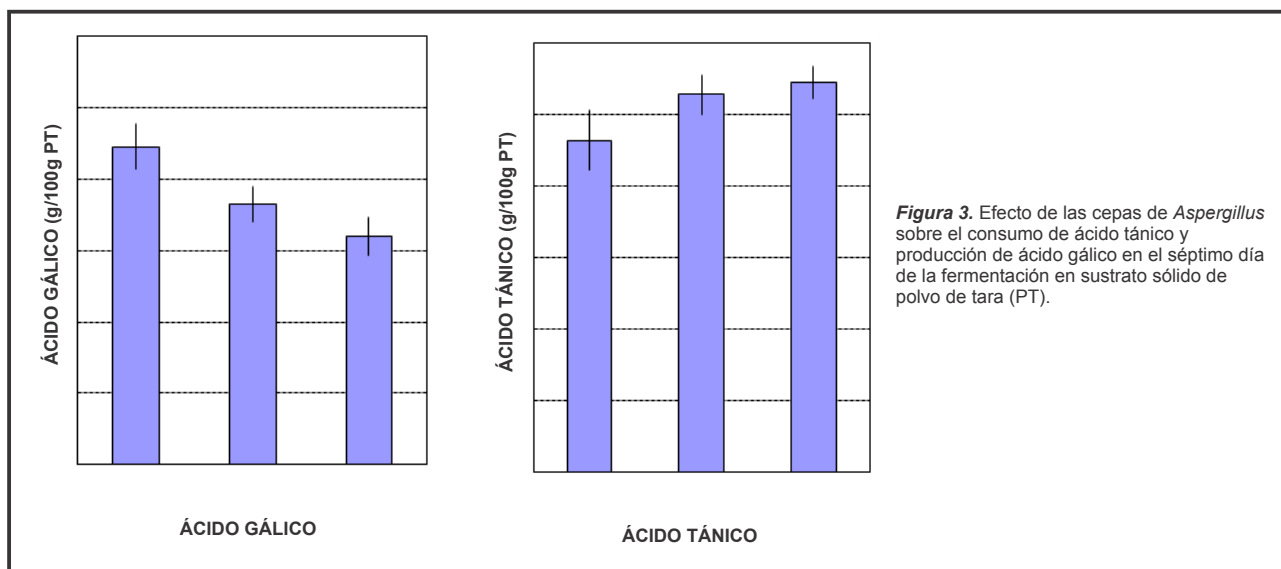


Figura 3. Efecto de las cepas de *Aspergillus* sobre el consumo de ácido tánico y producción de ácido gálico en el séptimo día de la fermentación en sustrato sólido de polvo de tara (PT).

DISCUSIÓN

De los resultados del análisis proximal hay diferencias significativas con el contenido de proteína obtenido por Antonio (1992) que fue de 0,72% frente a nuestro resultado (3,90%), eso mismo se observa en el contenido de fibra de 7,33% y el de Antonio fue 0,19%.

Referente al contenido ácido tánico (36%) es mejor a lo obtenido por este autor (52%). Estas diferencias se deberían a que el polvo trillado de tara es el que se obtiene de una primera molienda, donde el porcentaje de taninos es menor, de ahí también su alto contenido en fibra. Antonio (1992) en cambio, reporta resultados de análisis sobre un polvo de tara fracción 20/200 y Malla <100 lo cual arroja

porcentajes muy altos de taninos (52%), similar al 55% de ácido tánico encontrado por Garro, Rield y Conner (1997). Trabajando sobre un polvo de tara con un tamaño de partícula de 6 mm. Se considera que el polvo trillado fue una buena alternativa ya que proporciona un porcentaje de ácido tánico de alrededor de 36%, adecuado, tras el acondicionamiento de humedad y la presencia de fibra adecuada para el crecimiento fúngico y su hidrólisis.

Efecto de la adición de nutrientes

Saavedra (2003), mencionó que las fuentes de fósforo ejercen una influencia en la síntesis de la enzima, aumentándola. Sin embargo Lekha y Lonsane (1997), en lo que se refiere a las fuentes de nitrógeno como sulfato de amonio, nitrato de amonio y peptona, indican que no se debe esperar ningún efecto en su desarrollo ya que el sustrato por sí mismo contiene todos los requerimientos nutricionales que los hongos necesitan.

Tomando en cuenta lo referido por los investigadores se podría decir que el sustrato Polvo de Tara posee los nutrientes necesarios para estimular el desarrollo y producción de metabolitos por parte del microorganismo, aunque también posee componentes que pueden inhibir dicho crecimiento, esta heterogeneidad de sustancias hace suponer que se trataría de un medio equilibrado para el desarrollo normal del microorganismo y que la adición de nutrientes sería innecesaria.

Efecto de la humedad del sustrato

Moreno, Woolcott, y Gutiérrez-Correa (1999) explican que un requerimiento esencial en la FSS es que el líquido no se encuentre en exceso, y que la actividad de agua y la humedad del sustrato dependen de la naturaleza del sustrato y de las materias solubles que contenga. El mismo autor describe que utilizando cáscara de yuca como único sustrato, determinaron que la humedad óptima para la producción de pectinasa fue de 55%, observando una disminución cuando la humedad inicial se elevó a 75%. Observaciones similares fueron reportadas por otros autores como aportados por Aguilar, Favela-Torres, y Viniegra-González (2001) y Carrasco (1999).

La baja producción de ácido gálico a 80% de humedad podría deberse a un consumo de

ácido gálico, según indicios encontrados por Pourrat, Regerat y Pourrat, Jean (1985), quienes señalan que los bajos rendimientos de ácido gálico en un proceso fermentativo, usando hongos, podría deberse a que éste es metabolizado por el hongo.

Pudiéndose observar una diferencia notoria en el efecto de los tres niveles de humedad sobre la producción del ácido gálico y la hidrólisis del ácido tánico, encontrando en promedio que los rendimientos más altos de ácido gálico se lograron con 65% humedad, donde fue posible una producción de 7,9 g ácido gálico/100g PT.

Efecto de las cepas de hongos

Las diferencias en la producción de ácido gálico por las tres cepas se debería a la producción especializada de tanasa, enzima fundamental para incrementar la producción de ácido gálico. Según menciona la ATCC (2000), *A. niger* ATCC 16888 es una cepa especializada en metabolizar sustratos ricos en ácido tánico para la producción de ácido gálico, lo que no ocurre con las otras dos cepas trabajadas (NRRL 3 y NRRL 67), las que requieren de un mayor tiempo de adaptación al sustrato para luego pasar a una fase de producción de ácido gálico. En las cepas NRRL 3 y NRRL 67, adaptadas al metabolismo del ácido cítrico, al enfrentar un sustrato rico en ácido tánico, deben experimentar importantes cambios en su metabolismo, antes de adaptarse y producir tanasas.

La producción de ácido gálico se inició lentamente y al tercer o cuarto día aumentó considerablemente, este fenómeno fue observado también por Roehr et al. (1981), mencionado por Antonio (1992), quien lo atribuye a un proceso natural de adaptación de la cepa al medio. Igualmente Saavedra (2003), encontró que las cepas estudiadas presentaron mayor producción sólo a partir de las 24 h y Lekha y Lonsane (1994) observaron que la mayor producción se daba entre las 48 y 72 horas, confirmando así la existencia de esta fase de adaptación.

El rendimiento más alto encontrado, en el séptimo día de fermentación (9,87% con respecto al polvo de tara trillado), utilizando la cepa ATCC 16888, en una muestra acondicionada a una humedad de 65% y con suplementación de nutrientes, difiere con lo

reportado por Reátegui y Nakasone (1987), quienes obtuvieron 19,27% usando el método de hidrólisis química. Seth, Chand, (2000) obtuvo un rendimiento máximo de ácido gálico de 4,01% a las 30 horas de fermentación bajo condiciones óptimas, a partir de un medio enriquecido con ácido tánico químicamente puro y Antonio (1992) obtuvo 23,7% respecto al polvo de tara usando el método de fermentación sumergida, Garro (1997) mediante hidrólisis ácida y al vacío, pudo obtener un rendimiento de 25% de ácido gálico con respecto al polvo de tara.

Un factor que podría estar afectando el nivel de producción de ácido gálico sería el consumo de ácido gálico por parte del hongo como fuente de carbono en su metabolismo. Este hecho ya fue observado por Antonio (1992) y hoy se conocen mayores detalles del flujo metabólico por la que el ácido gálico puede ser transformado en ácido pirúvico o cis aconitato e ingresar al ciclo de Krebs para producir Acetil Co A (ATP) (Lekha y Lonsane, 1997).

Se podría concluir que no existen diferencias estadísticas significativas ($\alpha = 5\%$) en la producción de ácido gálico de polvo de tara trillado (PT), entre los tratamientos con suplementación de nutrientes (promedio = 7,7 g/100g PT) y sin suplementación de nutrientes (promedio = 7,3 g/100g PT).

Que existen diferencias estadísticas significativas ($\alpha = 5\%$) en el rendimiento de ácido gálico producido, en el séptimo día de fermentación, por los tres niveles de humedad, siendo la de 65% que produjo un mayor rendimiento (promedio = 7,9 g/100g PT) seguida por la de 50% (promedio = 7,3 g/100g PT) y finalmente por la de 80% (promedio = 7,2 g/100g PT).

Que existen diferencias estadísticas significativas ($\alpha = 5\%$) en el rendimiento de ácido gálico producido, en el séptimo día de fermentación, por las tres cepas utilizadas siendo el *A. niger* ATCC 16888 el de mayor rendimiento (promedio = 8,9 g/100g PT), seguido por el *A. niger* NRRL 3 (promedio = 7,3 g/100 g PT) y finalmente el *A. carbonarius* NRRL 67 (promedio = 6,4 g/100 g PT).

La investigación realizada muestra el comportamiento de *Aspergillus* ante un sustrato rico en taninos, así como los factores de

crecimiento para la producción a niveles industriales que servirán de base para la instalación de plantas productoras de ácido gálico a partir de un insumo propio del Perú.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, C., Augur, C., Favela-Torres, E. & Yiniegra - Gonzalez, G. (2001). *Induction and repression patterns of fungal tannase in solid – state and submerged cultures*. *Process Biochem.* 36, 565-570.
- Antonio, S. (1992). *Obtención de Ácido Gálico por fermentación sumergida en Batch del Polvo de Tara (Caesalpinia spinosa L.) por una cepa de Aspergillus niger*. Tesis para Optar el Título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. La Molina: Universidad Nacional Agraria La Molina.
- American Type Culture Collection ATCC. (2000). *Product Information Sheet for ATCC 16888*. 10801 University Blvd. Manassas, V. A. 20110-2209. Washington D.C.: Leading Biological Standards.
- Carrasco, T., Valiño, E., Medina, I. & Ravelo, D. (1999). Diseño y Evaluación de un Biorreactor para fermentación en estado Sólido. *Rev. Cubana científica agrícola*, 33, 429-435.
- Garro, J., Rield, B. & Conner, A. (1997). Analytical studies on Tara tannins. *Holzforchung* 5, 235-243.
- Hagerman, A. (2002). *Tannin Chemistry*. Department of Chemistry and Biochemistry. Miami University Oxford. 129p.
- Lastra, H., Rodríguez, E., Ponce, H. & Gonzales, L. (2000). Método Analítico para la cuantificación de Taninos en el Extracto Acuoso de Romerillo. *Rev Cubana Plant* 5(1), 17-22.
- Lekha, P. & Lonsane, B. (1997). Production and application of tannin acyl hydrolase: State of the art. *Adv. Appl. Microbiol.* 44, 215–260.

- Moreno, P. Woolcott, D. & Gutiérrez-Correa, M. (1999). Producción de pectinasa por *Aspergillus niger* en Fermentación en Sustrato Sólido. *Biota*. 99, 32-40.
- Pourrat, H., Regeat, F., Pourrat, A., Jean, D. (1985). Production of gallic acid from by a strain of *Aspergillus niger*. *Journal of Fermentation Technology*. 63(4), 401-403.
- Reategui, G. & Nakasone, R. (1987). Obtención de Ácido gálico a partir de Taninos extraídos de la *Caesalpinia spinosa* Kunz (Tara). Tesis para optar el Título de Ingeniero Químico. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia.
- Rodríguez, L., Valdivia-Urdiales, B., Contreras-Esquivel, J., Rodríguez – Herrera, R. & Aguilar, C. (2010). Química y Biotecnología de la Tanasa. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. México*. 2(4), 1-10.
- Saavedra, G. (2003). *Producción de tanase por Aspergillus niger*. Tesis para optar el Grado de Doctor en Ciencias. Rio de Janeiro: Universidad Federal de Rio de Janeiro.
- Seth, M. & Chand, S. (2000). Biosynthesis of tanase and hydrolisis of tannins to gallic acid by *Aspergillus awamori* – optimization of process parameters. *Process Biochem*. 36, 39-44.
- Sharma, S., Bhat, T. & Dawra, R. (2000). A spectrophotometric Method for Assay of Tannase Using Rhodanine. *Analytical Biochemistry*. 279(1), 84 – 89.

Correo electrónico: misilva@lamolina.edu.pe

Revisión de pares:

Recibido: 25-01-2014

Aceptado: 10-06-2014