



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PRODUCCIÓN DE TANASAS A PARTIR DE RESIDUOS
VINÍCOLAS**

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

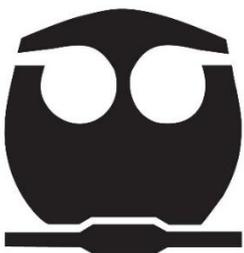
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

VARSOVIA RIVERA HERNÁNDEZ

ASESORA

CARMINA MONTIEL PACHECO



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

AÑO 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MARIA AMANDA GALVEZ MARISCAL

VOCAL: Profesor: FRANCISCO RUIZ TERAN

SECRETARIO: Profesor: CARMINA MONTIEL PACHECO

1er. SUPLENTE: Profesor: EDUARDO BONILLA ESPINOSA

2° SUPLENTE: Profesor: EDUARDO BARZANA GARCIA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 314. DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA,
CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Carmina Montiel Pacheco

SUSTENTANTE:

Varsovia Rivera Hernández

ÍNDICE

Contenido

Resumen	1
El vino y sus generalidades	3
Origen del vino	3
Los viñedos y la uva	4
Producción de vino	5
Cosecha	7
Despalillado	7
Estrujado	7
Fermentación	8
Maceración	8
Prensado	8
Sedimentación y decantación	9
Fermentación maloláctica	9
Clarificación y estabilización	9
Embotellado y etiquetado	9
Producción de vinos en México	10
Datos mundiales	13
Residuos de la industria vinícola	14
Composición de los residuos vinícolas	15
Uso de las enzimas en la industria vitivinícola	23
Producción de compuestos de valor agregado a partir de residuos vinícolas	24
Taninos	24
Estructura y clasificación de los taninos	25
Tanasas	29
Actividad y estructura	29
Microorganismos utilizados para la producción de tanasas	33
Aspergillus niger	33
Fermentación en estado sólido y sumergida	39
Propuesta de metodología	40

Aislamiento y purificación de cepas de <i>Aspergillus niger</i>	41
Aislamiento de <i>Aspergillus niger</i>	41
Purificación de <i>Aspergillus niger</i>	43
Producción de tanasas	44
Preparación del sustrato	44
Fermentación sumergida	45
Cuantificación de taninos	47
Separación y purificación de tanasas	48
Purificación enzimática	49
Caracterización del extracto enzimático	51
Cuantificación de proteínas	51
Cuantificación de la actividad enzimática de la tanasa	53
Determinación de condiciones óptimas de la actividad enzimática	54
Conclusiones	55
Referencias bibliográficas	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido

Figura 1. Anatomía de los viñedos y de la uva	4
Figura 2. Diagrama de bloques del proceso de elaboración del vino blanco y rojo	6
Figura 3. Mapa de las empresas vinícolas mexicanas	11
Figura 4. Datos de consumo, producción del vino en México (OIV, 2013)	12
Figura 5. Datos de consumo, producción del vino en el mundo (OIV, 2013)	14
Figura 6. Diagrama de productos obtenidos de residuos de la industria vinícola	24
Figura 7. Hidrólisis del ácido tánico tomada de Chávez <i>et al.</i> , 2018.	26
Figura 8. Clasificación de taninos	26
Figura 9. Estructuras de los subgrupos de taninos	27
Figura 10. Estructura de compuestos flavan-3-ol	28
Figura 11. Hidrólisis de taninos con la enzima tanasa (Chávez <i>et al.</i> , 2012)	29
Figura 12. Reacciones de la enzima tanasa (Aguilar <i>et al.</i> , 2007)	30
Figura 13. Estructura tridimensional de tanasa obtenida a partir de <i>Lactobacillus plantarum</i>	32
Figura 14. Línea del tiempo de los avances científicos sobre <i>Aspergillus niger</i>	38
Figura 15. Cuadro comparativo de la fermentación en estado sólido y sumergida	40
Figura 16. Toma de muestra y aislamiento de <i>Aspergillus niger</i>	43
Figura 17. Purificación de <i>Aspergillus niger</i> y almacenamiento	44
Figura 18. Diagrama para el pretratamiento del orujo	45
Figura 19. Diagrama para la fermentación sumergida, utilizando el orujo como sustrato	47
Figura 20. Diagrama para la determinación de taninos	48
Figura 21. Diagrama para la precipitación del complejo enzimático	49
Figura 22. Diagrama para la purificación del complejo enzimático	51

Figura 23. Reacción de biuret que ocurre en el método de Lowry antes de añadir el reactivo de Folin-Ciocalteu	52
Figura 24. Diagrama para la cuantificación de proteínas, empleando la metodología de Lowry	53
Figura 25. Diagrama para cuantificar la actividad mediante dos métodos	54

ÍNDICE DE TABLAS

Contenido

Tabla 1. Composición de mosto antes del proceso de fermentación	8
Tabla 2. Composición de residuos vinícolas	16
Tabla 3. Composición del orujo obtenido a partir de distintos vinos tintos	19
Tabla 4. Enzimas empleadas en el proceso de elaboración del vino	23
Tabla 5. Microorganismos utilizados para la obtención de tanasa a partir de residuos	35
Tabla 6. Tipos de columna Sephadex	50

Resumen

En la actualidad la producción de vino genera una gran cantidad de desechos, aproximadamente de 15 millones de toneladas por año, debido a esto a partir del año 2000 se han propuesto alternativas para utilizar los desperdicios o tratamientos para generar un menor impacto ambiental. Sin embargo, las alternativas no siempre pueden ser empleadas en modelos industriales o en algunos casos la implementación suele ser limitada. La nueva tendencia de la bioconversión se basa en utilizar los residuos para volver a incorporarlos al proceso de elaboración. Este proceso tiene gran importancia económica para las industrias alimentarias y con un enfoque significativo para la química verde. Esta tendencia tiene como propósito utilizar los residuos para reducir el impacto ambiental que generan en el proceso de elaboración de los alimentos, al mismo tiempo obtener aditivos alimentarios que son integrados al mismo proceso del que se obtuvieron los desechos.

Los residuos vinícolas se han empleado como materia prima para obtener compuestos que sean empleados en la industria agrícola, cosmética y alimentaria. A lo largo del proceso de la elaboración del vino se generan distintos tipos de residuos, orgánicos, inorgánicos, sólidos y/o acuosos. Debido a la gran diversidad y cantidad de bioactivos que ofrecen estos desechos, se han investigado distintos compuestos como: polifenoles con una actividad antioxidante elevada, aceites, celulosa, fibra dietética, ácido láctico, ácido tartárico, ácido málico, así como las enzimas celulasas, hemicelulasas, y tanasas por mencionar algunos.

A pesar de que las tanasas pueden ser de gran utilidad para la industria alimentaria y cosmética, la investigación de estas enzimas en comparación con las celulasas, hemicelulasas y pectinasas ha sido poca. Por tanto, el objetivo de esta investigación es reunir información bibliográfica actualizada para conocer a fondo las características fisicoquímicas de las enzimas tanasas, su importancia en la industria alimentaria y condiciones o factores que afectan o favorecen su estabilidad.

Debido al alto costo de las enzimas, se busca utilizar sustratos provenientes de los residuos vinícolas cuyo potencial permitiría usar la enzima tanasa dentro del proceso de producción del vino. En diversos artículos se ha reportado la obtención de tanasas de distintos residuos alimenticios con resultados positivos, sin embargo, aún no se

conocen las condiciones óptimas para la extracción de estas enzimas a partir de residuos vinícolas mexicanos.

En vista de que los residuos obtenidos dependen del tipo de proceso que se utilice en las industrias vinícolas, se propone emplear los residuos de industrias mexicanas procedentes del mismo proceso de elaboración de vino para proponer un método para la obtención de enzimas empleando fermentación en estado sólido.

Para el método de fermentación, se han utilizado microorganismos de distintas fuentes. Así mismo en este trabajo se sugerirá el método para aislar un microorganismo específico que se encuentre en las condiciones de los viñedos mexicanos para lograr un rendimiento destacado en la obtención de la enzima tanasa.

El vino y sus generalidades

Origen del vino

La definición de la uva destinada para la elaboración de vinos de acuerdo al Código Internacional de Prácticas Enológicas de la OIV (Organización internacional de la viña y la vid) es la siguiente: “Uva fresca que, por sus características, es destinada esencialmente a la vinificación. Puede estar sobremadura, ligeramente pasificada o afectada de podredumbre noble, a condición de que pueda ser estrujada o prensada usando los procedimientos ordinarios de cada bodega y produzca espontáneamente una fermentación alcohólica”

De la uva *Vitis vinífera sylvestris* se tiene registro de que los humanos tuvieron contacto con el fruto durante el periodo paleolítico alrededor de hace 60,000 a 100,000 años, en lo que ahora se conoce como el país del Líbano (MacNeil, 2015). La jarra con evidencia del proceso de vinificación más antigua fue encontrada en Georgia que data del periodo Neolítico (Jhonson, 2005). La *Vitis vinífera* (**Fig. 1**) se cultivaba en Medio Oriente en el año 4000 a.C. y probablemente antes. Los registros egipcios, que datan del 2500 a.C., mencionan el uso de la uva para la elaboración de vino, y las numerosas referencias bíblicas al vino indican el origen temprano y la importancia de la industria en Oriente Medio. Un ejemplo de este registro es en la tumba de Ptah-Hotep en donde se muestran escenas de la viticultura y el cultivo de la uva en la cultura egipcia (Laufer, 1940).

El intercambio del vino está registrado durante el periodo clásico de la cultura griega cuando los vinos de Asia Menor fueron importados a través de Marsella a la zona de la Galia (actualmente, Francia). Los griegos no consumían el vino como hoy en día, diluían el vino; una parte de vino y tres partes de agua.

Los griegos mantuvieron un activo comercio de vino y plantaron uvas en sus colonias desde el Mar Negro hasta España. Los romanos llevaron el cultivo de la uva a los valles del Rin y el Mosela (que se convirtieron en las grandes regiones vinícolas de Alemania y Alsacia), el Danubio (de Rumanía, Serbia, Croacia, Hungría y Austria) y el Ródano, el Saona, el Garona, el Loira y el Marne (que definen las grandes regiones francesas del Ródano, Borgoña, Burdeos, Loira y Champaña, respectivamente) (Amerine, 2021).

Los viñedos y la uva

La uva crece en racimos que están unidos por pedicelos y luego el pedúnculo es la estructura que lo une al tronco. En la **Fig. 1** se ilustra la anatomía del viñedo y de la uva. El viñedo se puede clasificar en dos partes: los órganos vegetativos y los órganos reproductivos. Los órganos vegetativos son las raíces, el tronco, las hojas y las ramas. Y los órganos reproductivos son los racimos (Keller, 2015).

Este fruto tiene una forma de circular a ovoide. La piel es una capa delgada que cubre el interior del fruto, esta puede ser de tonos morados, azules y verdes. La pulpa tiene una consistencia casi gelatinosa color verde muy claro, puede contener de 0 a 4 semillas.

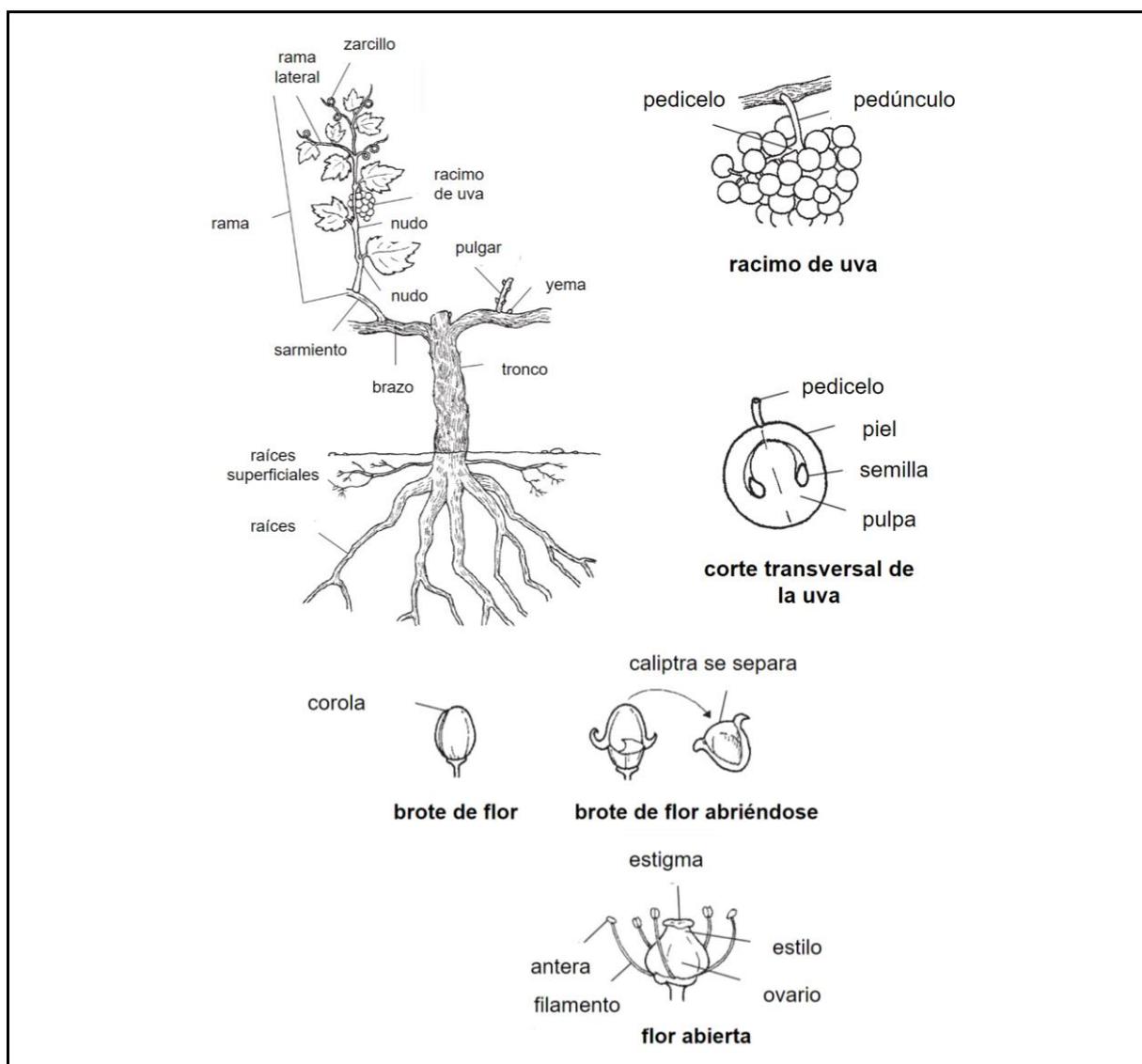


Figura 1. Anatomía de los viñedos y de la uva, adaptado de Cox, 2015

Producción de vino

La ubicación geográfica de los viñedos, tipo de suelo, época de recolección de la uva, grado de madurez de los frutos, tipo de fertilizantes utilizados, métodos de transporte, condiciones climáticas, los pasos del proceso de la elaboración del vino, tiempo de fermentación, tiempo de maduración, el material en el que se deja madurar el vino (Maamoun, 2022); son algunos de los factores que dictan la calidad y la composición del producto terminado.

El proceso de elaboración del vino tiene dos vertientes: vino blanco y vino tinto **Fig. 2**. De ahí, para producir distintos vinos se modifican algunos ingredientes o condiciones en el paso de fermentación, maceración y maduración (Venema, 2017).

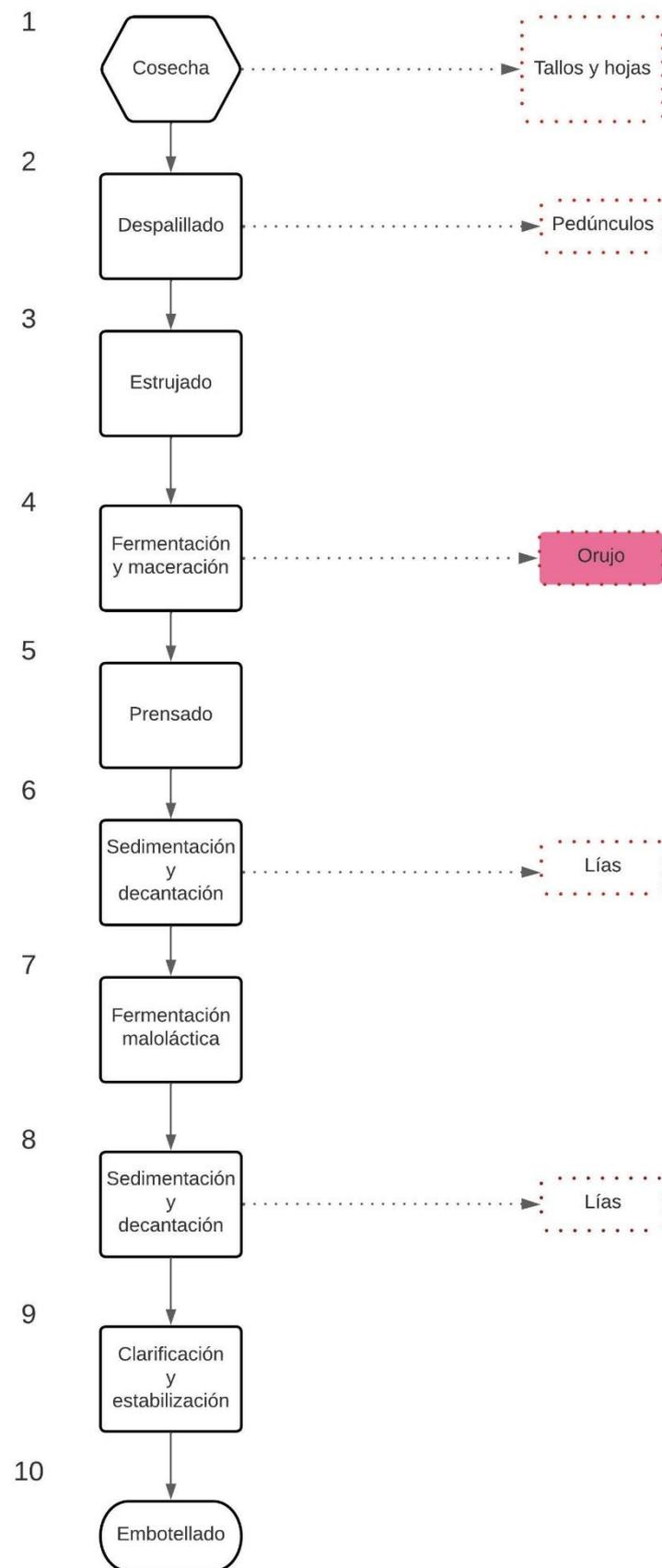


Figura 2. Diagrama de bloques del proceso de elaboración del vino rojo

El proceso de producción de vino se describe en los siguientes puntos:

Cosecha

La uva utilizada para la producción del vino es la *Vitis vinifera*, L. ssp. El tamaño, color y forma depende del lugar donde se cultiva, de las condiciones climatológicas y de la composición del suelo. La recolección de la uva depende del nivel de madurez, esta se elige en función del estado máximo de madurez, ya que esta contiene un alto porcentaje de azúcares para el proceso de fermentación (Zoecklein, *et al.*, 2020).

Una vez que se eligen los racimos de uvas en su estado de madurez deseado, se separan las uvas verdes o con nivel de madurez menor (**Fig. 2.1**).

Despalillado

Para la producción de vino rojo, los frutos se separan de los pedúnculos antes de pasar por el proceso de extracción. Este proceso tiene distintos objetivos: 1. prevenir la difusión de compuestos fenólicos no deseados y de otras sustancias solubles que afectan la estabilización de la bebida como catequinas, epicatequinas y ácido gálico, 2. evitar que los tallos obstruyan el flujo de la materia de los reactores, y 3. mejorar la distribución de sulfitos que se adicionan en el proceso de maceración (**Fig. 2.2**).

Estrujado

Una vez que se despalillan las uvas, estas pasan por un proceso mecánico en donde son aplastadas. La fruta pasa por un equipo que está conformado por rodillos para obtener el mosto, el cual es la mezcla que está conformada por jugo de la uva, semillas y piel. Los rodillos deben tener una presión suficiente para obtener el máximo jugo posible, no obstante, la presión no debe ser tan grande para evitar que las semillas y los tallos se trituren, debido a que proporcionan ácidos grasos y sabor amargo al mosto (**Fig. 2.3**). El mosto tiene un porcentaje de sólidos muy elevados, alta densidad y viscosidad elevada. Como se observa en la **Tabla 1.**, los sólidos cambian inclusive entre la misma variedad de uva. En el artículo de Bagher *et al.*, llevaron a cabo el análisis del mosto en Sudáfrica a partir de dos cosechas del 2012 y 2013, obteniendo resultados diferentes en °Brix, pH y concentración de ácido tartárico. Así mismo Košmer *et al.* 2013, analizaron el mosto de dos variedades tintas

de Montenegro dando como resultado valores diferentes en los parámetros de ácido tartárico y pH.

Tabla 1. Composición de mosto antes del proceso de fermentación (elaboración propia)

Variedad	Parámetro			Referencia
	°Brix	pH	Ácido tartárico (g/L)	
Cabernet Sauvignon	20-25	3.3-3.6	2.3-5.4	Bagheri <i>et al.</i> , 2016
Vrnac	n.r	3.6	5.5-5.9	Košmerl <i>et al.</i> , 2013
Krstac	n.r	3.3-3.5	3.7-4.3	
Valores general de vino tinto	n.r	3-4.5	3.6-5.8	Moreno <i>et al.</i> , 2012

Nota: n.r. no reportado

Fermentación

En algunos casos, el mosto se lleva a 50°C para favorecer la extracción de las antocianinas; en otros casos simplemente se evita este paso debido a que se realiza en el proceso de maceración.

El reactor se llena a 85-90% de su volumen y la temperatura alcanza de 20-23°C. Se inocula con cepas de *Saccharomyces* como de las especies: *apiculatus*, *exiguus verecisiae var. ellipsoides* o *pastorianus* (Millis *et al.*, 2008). En este reactor, los azúcares se transforman en etanol. La fermentación se detiene aproximadamente a una concentración de etanol de 12-15% (v/v), dependiendo de la cepa utilizada (**Fig.2.4**).

Maceración

El mosto obtenido de la fermentación se deja reposar de 4 a 10 días a una temperatura de 20-27°C, con el fin de extraer compuestos aromáticos, minerales y pigmentos. Para evitar el crecimiento de microorganismos o evitar reacciones de oxidación que produzcan sabores amargos u olores indeseados, se adiciona dióxido de azufre.

Prensado

Una vez que ha terminado la primera fermentación y se han liberado los pigmentos y compuestos aromáticos a la fase acuosa, el mosto se pasa al proceso de prensado;

se presan los sólidos para desprender la mayor cantidad de compuestos para el desarrollo de sabores y olores, el vino se conserva para continuar con el proceso. A la materia sólida seca resultante de este proceso se le denomina orujo y es descartada (**Fig. 2.5**).

Sedimentación y decantación

Para separar la materia sólida del vino se utilizan centrifugas para eliminar la turbidez y mejorar el aspecto visual de la bebida. Así mismo, este proceso favorece la oxigenación, útil para el desarrollo de compuestos sensoriales positivos para el aroma y gusto (**Fig. 2.6**).

Fermentación maloláctica

Existe una segunda fermentación o fermentación maloláctica, es el proceso que ocurre debido al metabolismo de las bacterias ácido lácticas presentes en las uvas, usualmente hay de 10 UFC/mL a 10⁴ UFC/mL. Este paso puede ser opcional, con la adición de dióxido de azufre. Si se desea la fermentación maloláctica, el dióxido se agrega en el paso de maduración (**Fig. 2.7**). Esta fermentación se lleva a cabo debido a que brinda mayor estabilidad microbológica al disminuir la concentración de ácido málico y se sintetizan compuestos antimicrobianos, además favorece el desarrollo de aromas y sabores en el vino (Lucio *et al.*, 2017).

Clarificación y estabilización

A pesar de realizar el proceso de sedimentación y decantación, el vino es una disolución coloidal que tiende a sedimentarse. Para evitar la sedimentación de las partículas de un coloide no basta con un proceso mecánico, sino que se deben añadir estabilizantes o clarificantes. “La clarificación implica la formación de un precipitado flocular en el vino, que absorbe o arrastra los constituyentes naturales que forman turbidez y/o las partículas coloidales” (Reynolds, 2021). Los agentes más utilizados para la clarificación y estabilización son las bentonitas y tanasas (**Fig. 2.9**).

Embotellado y etiquetado

El vino se vacía en botellas de vidrio, usualmente los vinos rojos son embotellados en vidrio ámbar para evitar oxidación de los pigmentos por la radiación de la luz. En caso

de utilizar corchos, se debe dejar un espacio entre la superficie del líquido y la del corcho, debido a que en el almacenamiento se pueden producir gases que provocan la salida de la bebida. El etiquetado del vino debe ser de acuerdo con la NOM-199-SCFI-2017, Bebidas alcohólicas-Denominación, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba (**Fig. 2.10**).

Producción de vinos en México

En México, las industrias dedicadas a la elaboración de vino se ubican principalmente en los estados del centro y norte del país como son Baja California, Chihuahua, Coahuila, Guanajuato, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora y Zacatecas, estos estados cuentan con las condiciones adecuadas para el cultivo de la vid como una temperatura media de 19.8 °C durante el ciclo de crecimiento del fruto en los meses de abril a octubre y durante la maduración de la uva en el mes de septiembre a una temperatura media de 20.4 °C (Valenzuela *et al.*, 2014); en Baja California se encuentran la mayoría de los viñedos debido a que tiene un mesoclima con brisas frías provenientes del mar (Gibson, 2010) como las condiciones en las que se encuentran los viñedos del Mediterráneo. (**Fig. 3**). Las empresas ubicadas en estos estados son principalmente españolas, francesas y mexicanas.

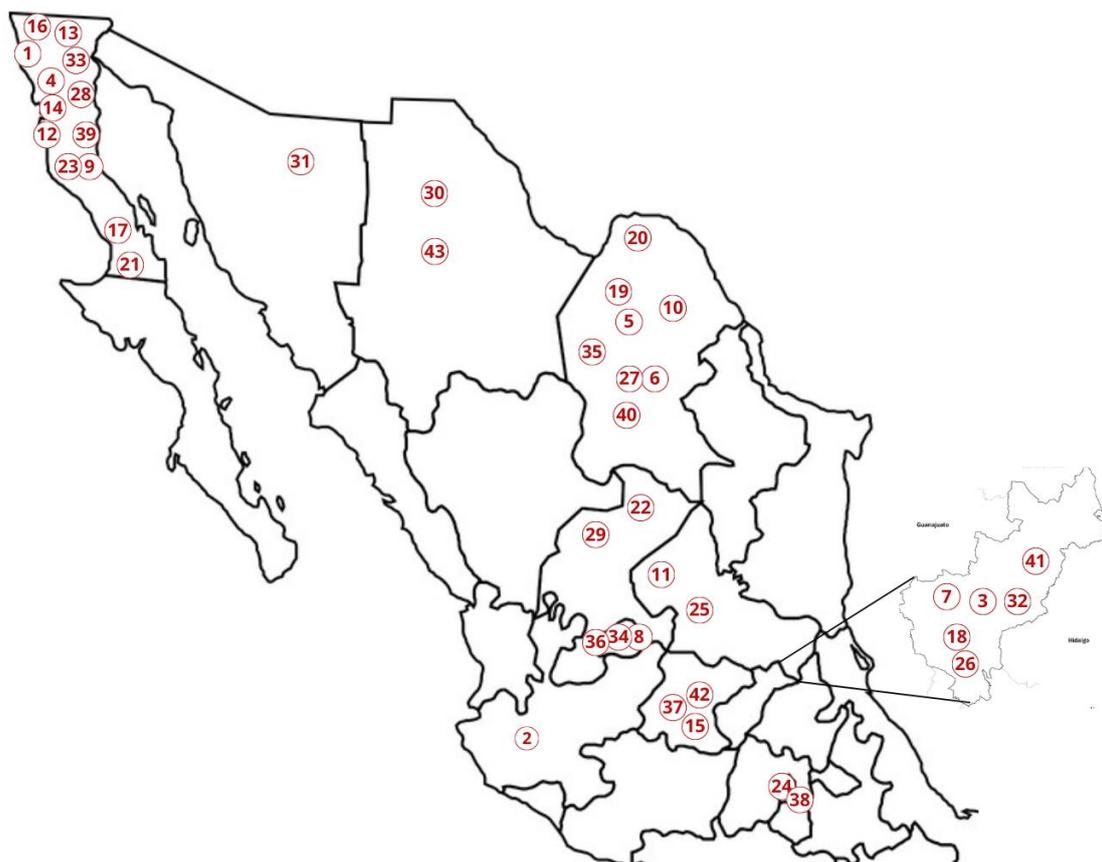


Figura 3. Mapa de las empresas vinícolas mexicanas (elaboración propia)

Empresas vinícolas mexicanas: 1.Adobe Guadalupe, Baja California; 2.Altos Norte Vinícola, Jalisco; 3.Bodegas de Cote, Querétaro; 4.Bodegas de Santo Tomás, Baja California; 5.Bodegas del Viento, Coahuila; 6.Bodegas Ferriño, Coahuila; 7.Bodegas Jacques & CIE, Querétaro; 8.Bodegas Origen, Aguascalientes; 9.Bruma Vinícola, Baja California; 10.Casa Madero, Coahuila; 11.Cava Quintanilla, San Luis Potosí; 12.Chateau Camou, Baja California; 13.Clos de Tres Cantos, Baja California; 14.Concierto Enológico, Baja California; 15.Cuna de Tierra, Guanajuato; 16.El Cielo, Baja California; 17.Finca La Carrodilla, Baja California; 18.Freixenet México, Querétaro; 19.Hacienda del Marques, Coahuila; 20.Hacienda La Florida, Coahuila; 21.Hacienda la Lomita, Baja California; 22.Lopez Rosso Cavas, Zacatecas; 23.Monte Xanic, Baja California; 24.Pedro Domecq, Ciudad de México; 25.Pozo de Luna, San Luis Potosí; 26.Puerta del Lobo, Querétaro; 27.Rancho el Fortín, Coahuila; 28.Rancho Llano Colorado, Baja California; 29.Tierra Adentro, Zacatecas; 30.Tres Ríos, Chihuahua; 31.Uvas de Altura, Sonora; 32.Vinaltura, Querétaro; 33.Vinícola Regional de Ensenada, Baja California; 34.Vinícola Santa Elena, Aguascalientes; 35.Vino Zapa, Coahuila; 36.Vinos Cu4tro Soles, Aguascalientes; 37.Vinos Guanamé, Guanajuato; 38.Vinos Trasiego, Ciudad de México; 39.Viñas del Sol/Santos Brujos, Baja California; 40.Viñedos Don Leo Coahuila; 41.Viñedos San Juanito, Querétaro; 42.Viñedos San Miguel, Guanajuato; 43.Viñedos y Bodegas Encinillas, Chihuahua.

El vino procedente de Baja California Norte, es el vino con mayor aceptación en el mercado nacional e internacional, en razón de encontrarse en condiciones climatológicas parecidas a las del Mediterráneo, produciendo vinos sensorialmente similares a las bebidas europeas (Larousse, 2009). Algunas de las casas vinícolas más importantes en México son: Bodegas de Santo Tomás, L.A. Cetto, Allied Domecq México, Cavas Valmar, Chateau Camou, Mogor Badán, Viña Liceaga, Monte Xanic,

Casa de Piedra, Adobe Guadalupe, Vinisterra, Bodega San Rafael y Bodegas Barón Balché (Covarruvias *et al.*, 2015).

De acuerdo con un estudio de mercado del gobierno español (2021), se pronosticaba que para el año 2020 la producción de vino aumentaría 12.5% con respecto al año de 2019, es decir, 22.5 millones de litros. Así mismo, en este reporte declaran que en los últimos 10 años la producción ha aumentado en un 65% en volumen y 37% en valor en México (España Exportación e inversiones, 2021).

La Organización Internacional de la Viña y el vino (OIV) reportó en 2017 que anualmente en México se producen 200 000 hectolitros de vino. Esta misma fuente registra que en el 2018 fue el año con mayor consumo de vino (1.19×10^6 hL) . Como se observa en la **Fig. 4** la producción, el consumo y la importación van en aumento desde el año 2010 hasta el 2019.



Figura 4. Datos de consumo, producción del vino en México (OIV, 2013)

La uva cultivada en México se consume principalmente en fresco, el 22.93% es el insumo para el sector vinícola de acuerdo al informe de planeación agrícola Nacional 2017-2030 (2017) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).

La producción de la uva, de acuerdo al atlas agroalimentario de SAGARPA-SIAP (2018), divide la producción de uva en tres categorías: uva fruta 75%, uva industrial 22% y uva pasa 3% (Franco *et al.*, 2017). La uva fruta o también conocida como uva de mesa es producida principalmente por los estados de: Sonora, Zacatecas, Aguascalientes, Baja California, Guanajuato, Coahuila, San Luis Potosí, Durango, Baja California Sur y Puebla.

La uva pasa se destina para la elaboración del fruto seco. Se utilizan frutas medianas, tintas o blancas, sin semilla, el secado natural tarda entre dos o tres semanas.

Por su parte, la uva industrial se cultiva en mayor volumen en los estados de Baja California, Zacatecas, Sonora, Aguascalientes, Coahuila, Querétaro, Chihuahua, Guanajuato, San Luis Potosí y Nuevo León. Como el nombre lo indica, es utilizada para productos industriales como jugos concentrados, vinos y licores como el brandy (CEDRSSA, 2017).

Para la producción de vino tinto en México existen diferentes cepas, tales como Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot, Pinot (s), Syrah, Garnacha o Grenache, Nebbiolo y Tempranillo. Las cepas blancas que se producen en el país son Chardonnay, Chenin, y Moscatel (es) de acuerdo a la investigación interna del Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (CEDRSSA, 2017).

Datos mundiales

Los productores más importantes de vino a nivel mundial se encuentran en el continente Europeo en países como Italia, Francia y España. En el continente Americano se han destacado países de Sudamérica como Argentina y Chile. En Norteamérica, en la costa oeste de los Estados Unidos, cuenta con un gran número de viñedos y producción vitivinícolas.

Comparando los datos de México con los de nivel mundial (**Fig. 5**), el volumen de consumo, de producción y de exportación son menores. Como se observa en la gráfica de vino en México (**Fig. 4**), el volumen de consumo se incrementa conforme pasan los años, no obstante, cabe destacar que el volumen de producción va en decremento, por lo que hay mayor importación de vino y el volumen de exportación del vino mexicano es cada vez menor. A pesar de que a nivel mundial el consumo per cápita es elevado, el volumen de producción es aún mayor. De esta forma México se abastece de vino favoreciendo las importaciones.

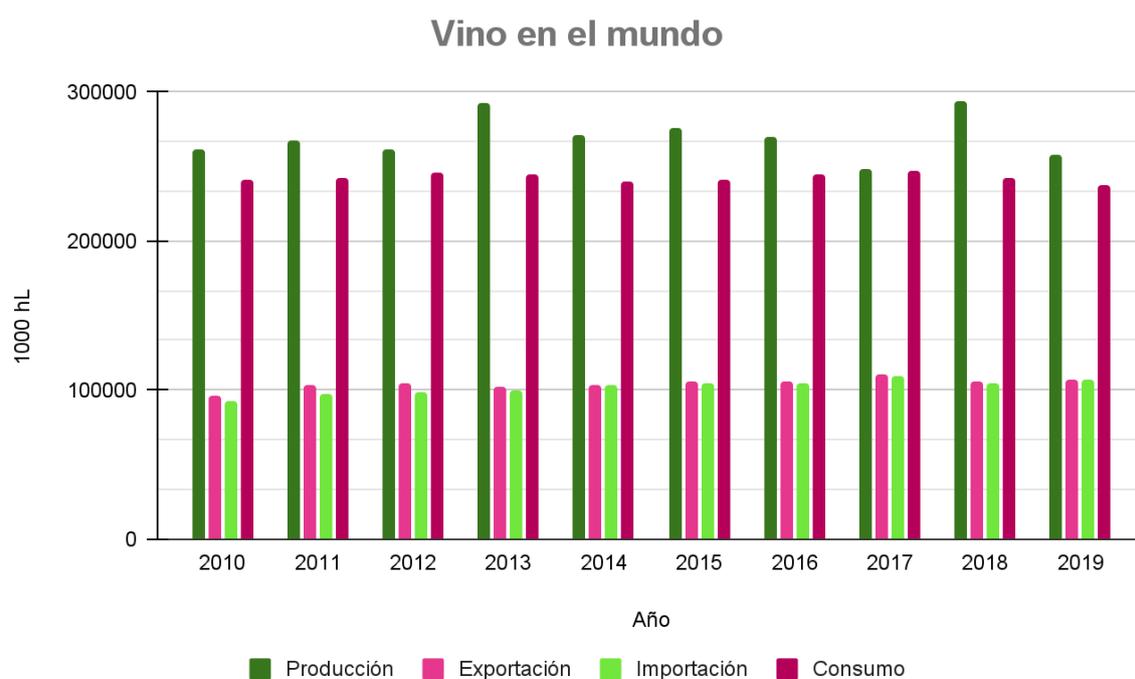


Figura 5. Datos de consumo, producción del vino en el mundo (OIV, 2013)

Residuos de la industria vinícola

La industria vinícola genera aproximadamente de 1.3-1.5 kg de residuos al producir un litro de vino (Ioannou *et al.*, 2015). Bustamante y colaboradores (2008) al analizar estos desechos reportaron una alta concentración de macronutrientes, así como una alta concentración de polifenoles (1.2–19.0 g/kg) y una baja concentración de micronutrientes y de metales pesados.

Debido a la crisis climática, actualmente la industria está enfrentando una gran demanda para el desarrollo e implementación de nuevas técnicas sustentables para

la obtención de alimentos de alta calidad e inocuos, manteniendo al mismo tiempo una alta eficiencia durante el procesamiento (Neethirajan, 2010).

Composición de los residuos vinícolas

Los residuos vinícolas representan del 25-35% (Nanni *et al.*, 2021) de la producción del vino y estos residuos están compuestos por pedúnculos, piel de uvas, semillas, lías (que son la materia orgánica que se produce después de filtrar y clarificar el vino) y el orujo (Nanni *et al.*, 2021) que se detallan en la **Tabla 2**. Los pedúnculos son los tallos que unen el fruto al árbol, su mayor composición son los polisacáridos como la celulosa, hemicelulosa y lignina. La piel y las semillas no son trituradas por completo en el proceso de estrujado debido a que prensarlos completamente libera compuestos amargos indeseables. La piel es el epicarpio de la uva que contiene un gran porcentaje de fibra dietética insoluble (98%). De igual manera las semillas tienen un alto porcentaje de fibra y un alto porcentaje de lípidos (13-15%). Uno de los residuos finales del proceso son las lías, este residuo está compuesto principalmente por los microorganismos inoculados en el proceso de fermentación y las proteínas que se precipitaron a lo largo del proceso de elaboración del vino.

La composición del orujo está reportada por Moreno *et al.*, (2020) en la **Tabla 2**. El orujo es el residuo que se obtiene después de prensar el mosto para separar la materia sólida de la acuosa. Dependiendo con la eficiencia con que se separe el residuo será la composición química de este deshecho. Además de tener un alto porcentaje de agua, este residuo contiene fibra dietética, proteínas, lípidos, una gran diversidad de compuestos fenólicos, entre ellos, los taninos. Como se muestra en la **Tabla 2** en donde se reportan los valores de análisis químico proximal de distintas variedades de vino tinto, los taninos, son compuestos que producen las plantas como un mecanismo de defensa ante condiciones de estrés, protegiéndolas de rayos UV y de radicales libres (Corral *et al.*, 2021), es por esto que se encuentran en los pedúnculos y en el orujo.

En la **Tabla 3** se recopilan datos de la composición química más específica del orujo de distintos vinos tintos provenientes de diversos lugares. Como se observa en esta tabla el mismo tipo de vino tinto se obtiene un análisis químico proximal singular. Uno de los vinos más consumidos es el Cabernet Sauvignon, de esta variedad de vino se

reportan distintos valores de cenizas, proteínas, polifenoles y fibra dependiendo de la región de origen.

De los vinos mexicanos descritos en la tabla, los de Baja California cuentan con un mayor contenido de polifenoles. Como se mencionó anteriormente, existen factores intrínsecos y extrínsecos que determinan la composición de la uva y por lo tanto del vino. La mayor producción de vinos de Baja California se encuentra en el Valle de Guadalupe. El crecimiento de la uva es óptima en esta región ya que el clima es extremadamente seco y árido con una temperatura promedio de 30°C en el verano y de 5°C en invierno (Covarrubias *et al.*, 2015). Dadas estas condiciones climatológicas, la planta produce mayores compuestos benéficos para su protección como en este caso los compuestos polifénolicos. De los nueve vinos analizados de Baja California, el vino Petit verdot contiene el mayor porcentaje de polifenoles, ácido gálico y taninos.

Tabla 2. Composición de residuos vinícolas, Moreno *et al.*, 2020

Residuos vinícolas	Composición
<p data-bbox="411 1066 580 1099">Pedúnculos</p> 	<p data-bbox="979 1088 1222 1122">20-30% celulosa</p> <p data-bbox="948 1144 1254 1178">15-20% hemicelulosa</p> <p data-bbox="995 1200 1206 1234">17-26% lignina</p> <p data-bbox="900 1256 1302 1290">6-16% taninos condensados</p> <p data-bbox="1018 1312 1184 1346">(insolubles)</p> <p data-bbox="1007 1368 1195 1402">6% proteínas</p> <p data-bbox="1007 1424 1195 1458">6-9% cenizas</p> <p data-bbox="919 1480 1283 1514">1-3% polifenoles solubles</p>
<p data-bbox="408 1771 584 1805">Piel de uvas</p>	<p data-bbox="983 1637 1219 1671">5-12% proteínas</p> <p data-bbox="1007 1693 1195 1727">2-8% cenizas</p> <p data-bbox="1015 1749 1187 1783">2-5% lípidos</p> <p data-bbox="919 1805 1283 1839">1-2% polifenoles solubles</p> <p data-bbox="919 1861 1283 1895">1-70% azúcares solubles</p> <p data-bbox="967 1917 1235 1951">60% fibra dietética</p> <p data-bbox="903 1973 1331 2007">98.5% fibra dietética insoluble</p>



1.5% fibra dietética soluble
4-6% pectinas

Semillas



48% fibra dietética
11.5% proteínas
13-15% lípidos
5-8% compuestos polifenólicos
6-70% carbohidratos

Lías



Fase sólida:
Levadura y bacteria
Celulosa, hemicelulosa y lignina
Proteínas
Sales orgánicas
2-6 % Pectinas
1.2% Pigmentos
Fase líquida:
4-6% etanol
Ácidos orgánicos (láctico, acético,
tartárico)

Orujo



Alto contenido en agua 55%-75%
fibra dietética 43%-75%
proteínas 6%-15%
lípidos,
taninos
y una gran diversidad
de compuestos fenólicos

Tabla 3. Composición del orujo obtenido a partir de distintos vinos tintos (elaboración propia)

País	Unidades	Información general				México											
Región; estado; ciudad y/o empresa						Baja California, Valle de Guadalupe, Grupo Alximia S.A. de C.V.							Noreste del país				
Variedad de vino de origen		Sin especificar	Cabernet Sauvignon	Merlot	Pinot Noir	Barbera	Carignan	Cabernet Sauvignon	Grenache	Merlot	Petit Vedot	Syrah	Tempranillo	Zinfandel	Cabernet Sauvignon	Grenache noir	Petite Syrah
Análisis químico proximal																	
Agua	1														4.44	4.94	2.04
Cenizas		1.73-9.1	7.59	7.19	6.17										6.94	8.02	6.83
Carbohidratos		12.20-40.53															
Proteínas		3.57-14.17	12.34	11.26	12.3										13.49	13.16	14.3
Lípidos		1.14-13.9													8.01	7.46	9.6
Polifenoles																	
Contenido total de polifenoles	3	0.28-8.70 g/100 g en peso seco				102.7	109.6	118.3	131.7	119.9	123.6	93.9	111.6	101.1	2.62	1.55	2.35
Ácidos hidroxibenzoicos																	
Ácido gálico	2					10.82	6.65	14.23	9.62	24.33	27.2	6.53	7.28	9.18			
Ácido siríngico						4.21	4.72	6.85	3.08	9.1	6.52	2.81	3.92	5.69			
Galloil glucosido						ND	2.66	8.44	ND	7.41	14.59	ND	ND	ND			
Flavonoides																	

Flavonoides totales	4												
Flavonoides solubles totales				56.24	77.45	74.12	86.47	71.7	73.39	53.2	68.62	72	
Antocianinas													
Antocianinas totales	5												
Antocianinas monoméricas	6			1.49	1.64	0.82	0.51	1.58	1.44	1.55	1.5	1.72	
Flavonoles													
Kaempferol	2			11.94	6.11	ND	2.72	2.57	ND	2.42	2.47	ND	
Quercetina				45.06	17.28	10.22	12.27	14.39	ND	15.1	13.9		
Isoquercetina				6.51	7.75	3.87	6.09	ND	7.12	15.6	9.82	ND	
Laricitin-3-O-glucósido				1.81	ND	ND	2.33	ND	ND	2.96	ND	ND	
Syringetin-3-O-glucósido				2.88	ND	ND	4.63	ND	6.77	4.81	2.92	ND	
Flavan-3-oles													
Catequina	2			ND	8.95	27.57	8.75	27.42	76.71	3.06	10.03	6.56	
Epicatequina				ND	9.56	25.71	8	32.08	60.83	5.67	12.14	7.85	
Taninos solubles													
Taninos solubles totales	4			7.23	10.27	13.24	20.54	17.01	23.48	10	9.98	9.54	
Elagitaninos	2			16.77	12.13	5.76	8.94	ND	ND	8.18	ND	7.14	
Taninos condensados													

Galato de catequina	2				ND	2.31	4.55	ND	7.135	12.71	ND	3.62	2.95		
Procianidina B dímero 1					ND	7.25	10.12	5.06	6	10.87	ND	ND	ND		
Procianidina B dímero 2					ND	9.41	12.22	9.58	11.76	29.13	ND	ND	ND		
Procianidina B trímero 1					ND	ND	3.61	ND	ND	6.07	ND	ND	ND		
Procianidina B trímero 2					ND	ND	5.27	ND	ND	12.27	ND	ND	ND		
Fibra															
Fibra dietaria	1	17.28-88.70	6.33	3.35	4.74								69.3	59.3	67.1
Insoluble		16.44-36.70											62.2	52.7	60
Soluble		0.72-12.78											7.1	6.6	6.8
Azúcares solubles															
Fructosa	1	0.38-8.91											1.21	4.71	0.92
Glucosa		0.21-26.34											0.77	2.8	0.59
Sacarosa													0.07	0.07	0.4
Minerales															
Na	9	87-277											30.7	28.2	33.4
K		1184-2718											2425.7	2784.5	2616.1
Mg		92-644											94.6	99.7	103.3
Ca		91-961											316.9	361.9	431
Mn		6-1356											2	2.1	2.3
Fe		5-5468											13.6	14.1	9.5
Zn		2-2254											1.2	1.1	2.7
Cu		39-130											0.5	1.2	0.7
P		4-3157											183.1	185.1	210.3

Galactosa	1				8.2x10 ⁻⁵	8.5x10 ⁻⁵	1.5x10 ⁻⁴
Xilosa					3.5x10 ⁻⁵	1.4x10 ⁻⁴	3.5x10 ⁻⁴
Trehalosa					2.4x10 ⁻⁵	1.2x10 ⁻⁴	2.7x10 ⁻⁴
Arabinosa					2.5x10 ⁻³	2.0x10 ⁻³	3.1x10 ⁻⁴
Referencia		<i>Antonić et al., 2020</i>	Deng, Q <i>et al.</i> , 2011	Muñoz-Bernal <i>et al.</i> , 2021	Martínez-Téllez <i>et al.</i> , 2021		

Notas: 1. g/100 g en peso seco 2. porcentaje de cada área de pico con respecto al área total de pico identificado, 3. mg ácido gálico/g en peso seco, 4. mg catequina/g en peso seco, 5. mg cianidina-3-glucósido/g en peso seco, 6. mg maldivina-3-glucósido/g en peso seco, 7. mg proantocianidina/g en peso seco, 8. mg procianidina B2/g en peso seco, 9. mg/100 g en peso seco, 10. ácido tartárico/100 g en peso seco 11. g/100 g en peso húmedo 12. mg/100 g en peso seco; N.D.: no detectado

Uso de las enzimas en la industria vitivinícola

Cada vez la industria vitivinícola emplea más enzimas durante el pretratamiento de la uva, en la fermentación, la maduración y en el almacenamiento, en razón de que ayuda en el incremento del rendimiento del jugo de la uva, mejora el color del vino, favorece el desarrollo de compuestos aromáticos, acelera el proceso de clarificación y filtración y acorta el tiempo de fermentación (Yang *et al.*, 2021). A pesar de que las frutas cuentan con enzimas endógenas, éstas no logran catalizar las reacciones necesarias para la hidrólisis de compuestos indeseados o para favorecer el desarrollo de compuestos aromáticos en razón de que no resisten las condiciones de la producción del vino (Claus *et al.*, 2018). Algunas de las enzimas utilizadas son pectinasas, hemicelulosas, glucosidasas, glicosidasas, proteasas, ureasas y tanasas (Mojsov *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2021). Estas enzimas empleadas en el sector vitivinícola están descritas en la Tabla 4. de Mosov *et al.*, (2015) donde se señala su función y su aplicación.

Tabla 4. Enzimas empleadas en el proceso de elaboración del vino

Enzima	Función	Aplicación
Pectin metilesterasas	Desesterificación y gelificación de pectinas	Romper los grupos metil éster de ácidos poligalacturonicos y por lo tanto se libera metanol y convertir la pectina en pectato
Poligalacturonasas	Tiene una función sinérgica con la pectina	Romper los enlaces glucosídicos que une las moléculas de ácido galacturónico con otra con la absorción de una molécula de agua
Pectin liasas	Despolimerización de pectinas altamente esterificadas	Minimizar el etanol liberado por el ácido poligalacturónico metilado

		durante la producción del vino
Enzimas de maceración (celulasas, hemicelulasas y pectinasas)	Hidrólisis de los polisacáridos de la pared celular de materia vegetal	Mejorar la extracción de color y maceración de las pieles de uva Mejorar la calidad, estabilización, filtración y clarificación de los vinos.
B-glucodiasas	Modificación de los residuos aromáticos	Mejorar el aroma en los vinos

Producción de compuestos de valor agregado a partir de residuos vinícolas

Taninos

Debido a la composición de los residuos vinícolas, desde el agua hasta las semillas, estos pueden emplearse para producir compuestos de valor agregado (2017) como se muestra en la **Figura 6**.

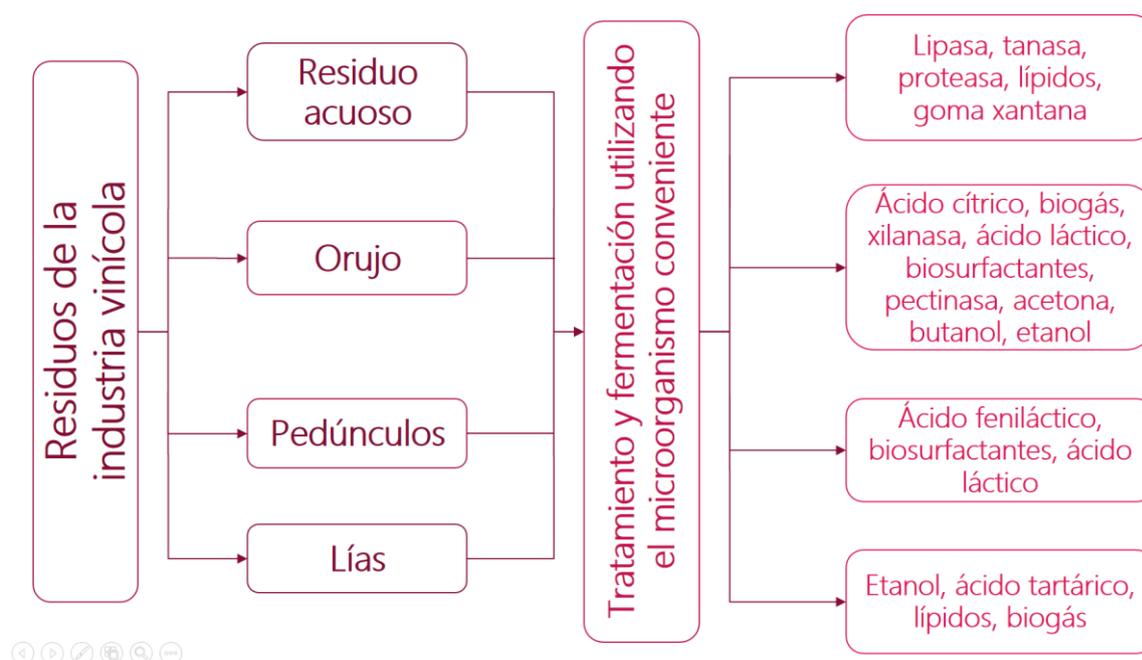


Figura 6. Diagrama de productos obtenidos de residuos de la industria vinícola (modificado de Bharathiraja *et al.*, 2017)

Los taninos tienen la capacidad de precipitar pectinasas, lipasas, proteasas, β -galactosidasa, celulasas y otras macromoléculas. En razón de lo cual se ha observado un efecto indeseable en su uso como alimento de ganadería, clasificando estos compuestos como anti-nutritivos (Sharma K. P. 2019).

De igual manera, en la industria de bebidas como jugos, tés y bebidas alcohólicas, los taninos son un producto indeseable, debido a que provocan la precipitación de proteínas provocando sedimentación a corto y largo plazo. Sensorialmente los taninos están asociados con la astringencia y sabores amargos.

Aunque algunos de estos compuestos polifenólicos brindan un beneficio a la salud como: prevención de problemas cardiovasculares, son considerados anti-carcinogénicos y tiene propiedades antiinflamatorias y antioxidantes brindando un valor en la industria farmacéutica (Ayed y Hamdi, 2020) en la industria alimentaria son compuestos que generan problemas de carácter tecnológicos porque causan la precipitación de proteínas.

Estructura y clasificación de los taninos

Los taninos son compuestos polifenólicos que se categorizan en dos grupos generales: hidrolizables y condensados. Estos polifenoles se encuentran en materia vegetal como frutas, verduras, tallos, hojas y plantas. Sirven de protección a las plantas contra invasión microbiana y evitan ser consumidos por sus depredadores.

Algunos taninos (**Fig. 7**) son fácilmente hidrolizados por la enzima tanasa produciendo ácido gálico, glucosa o ácido quínico. Estos compuestos son ésteres del ácido gálico y ácido elágico. Los ácidos antes mencionados rodean una molécula de un carbohidrato que se encuentra esterificada, principalmente D-glucosa. En la **Fig. 7** se muestra la hidrólisis del ácido tánico a ácido gálico y glucosa a través de la 2,3,4,6-tetragaloil glucosa y dos tipos de mono-galoil glucosa (Chávez *et al.*, 2018).

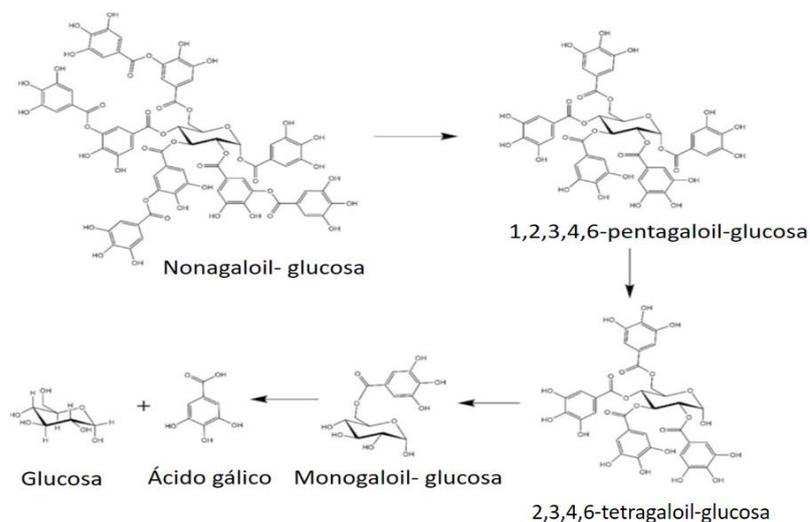


Figura 7. Hidrólisis del ácido tánico tomada de Chávez *et al.*, 2018.

Los taninos se dividen en cuatro grupos de acuerdo a su estructura: galotaninos, elagitaninos, taninos complejos y condensados (**Fig. 8**).

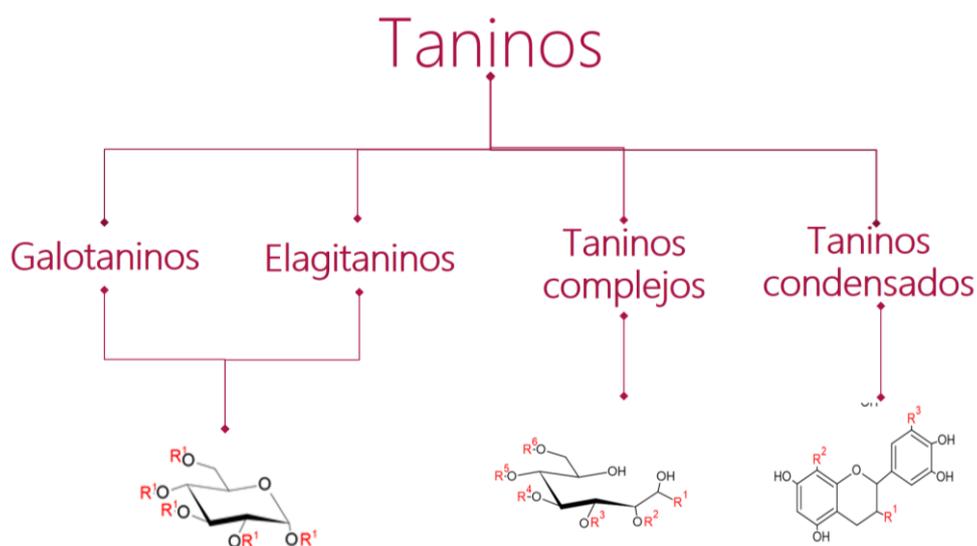


Figura 8. Clasificación de taninos, Aguilar *et al.*, 2007

Así mismo, los taninos también se clasifican de acuerdo a la hidrólisis. Existen dos tipos de taninos hidrolizables: galotaninos y elagitaninos. Los galotaninos (**Fig. 9, A**) más simples están formados de residuos polifenólicos y de polialcoholes. En la **Fig. 9** se muestra con flechas rojas los ésteres hidrolizables (Ristinmaa *et al.*, 2022). Este grupo de taninos es importante debido a que la enzima tanasa cataliza la reacción de

hidrólisis para producir compuestos de valor agregado. Un ejemplo importante es el ácido gálico que es empleado en la industria farmacéutica, textil y en la producción de pigmentos.

En comparación con los taninos hidrolizables, los taninos condensados (**Fig. 9, D**) no cuentan con un carbohidrato en el centro de la molécula, sino que están compuestos por 2-50 unidades de flavonoides (e.g. flavon-3-ol o flavon-3,4-diol) (Sharma, 2019). Los taninos complejos (**Fig. 9, D**) son el conjunto de galotaninos y elagitaninos unidos con unidades de flavon-3-ol (**Fig. 10**).

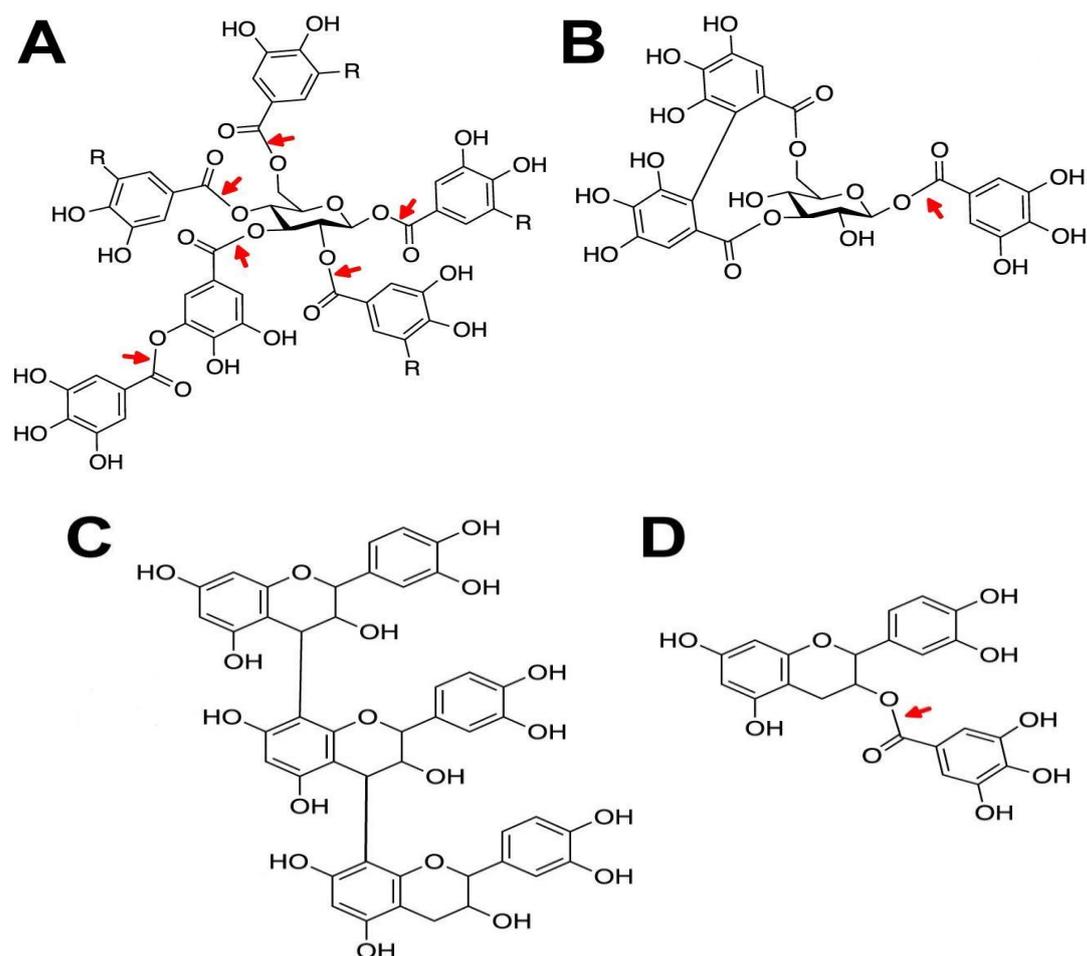
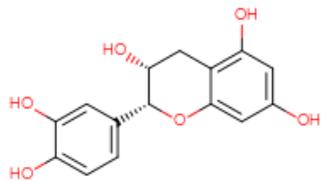
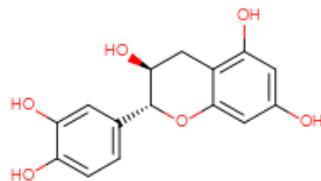


Figura 9. Estructuras de los subgrupos de taninos

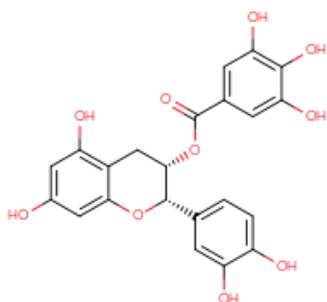
Nota: A) Galotanino: 27 hexa-galoil glucosa, B) elagitanino: corilagina, C) tanino condensado: proantocianidina C1, D) tanino complejo; galato de epicatequina (Ristinmaa *et al.*, 2022)



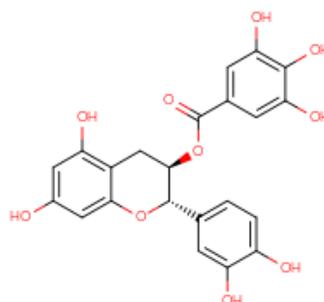
a)
(-)Epicatequina



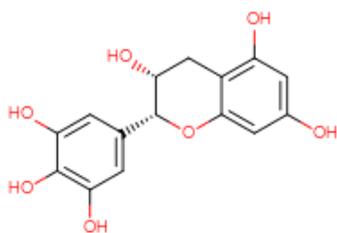
b)
(+)Catequina



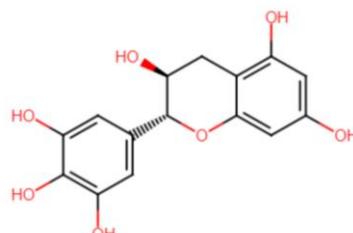
c)
(-)Galato de epicatequina



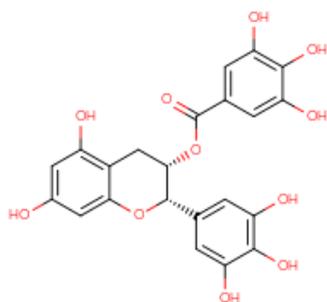
d)
(+)Galato de catequina



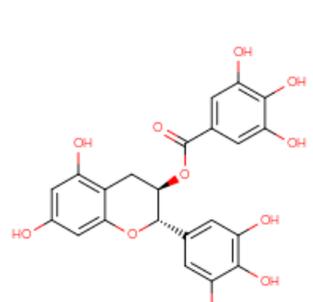
e)
(-)Epigalocatequina



f)
(+)Galocatequina



g)
(-)Galato de epigalocatequina



h)
(+)Galato de galocatequina

Figura 10. Estructura de compuestos flavan-3-ol (elaboración propia)

Tanasas

Las tanasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los taninos, son producidas por bacterias, hongos y levaduras. Esta enzima tiene gran importancia en diversas industrias como la farmacéutica, en la producción de tintes, la alimentaria, la química y en producción de cuero (Biswas, 2020).

Actividad y estructura

La tanin acil hidrolasa (E.C.3.1.1.20) o comúnmente conocida como tanasa es una enzima que pertenece al grupo de las serin esterases debido a que el sitio activo de esta enzima contiene la secuencia Gly-X-Ser-X-Gly, típico de las serin hidrolasas (Ren *et al.*, 2013). Esta enzima cataliza la hidrólisis del enlace éster (galoil) y el enlace dépsido (enlace éster que se forma entre dos ácidos gálico) para liberar ácido gálico. El proceso de hidrólisis como se muestra en la **Fig. 11** produce moléculas de ácido gálico y 1 molécula de glucosa por una de ácido tánico (Kumar *et al.*, 2019).

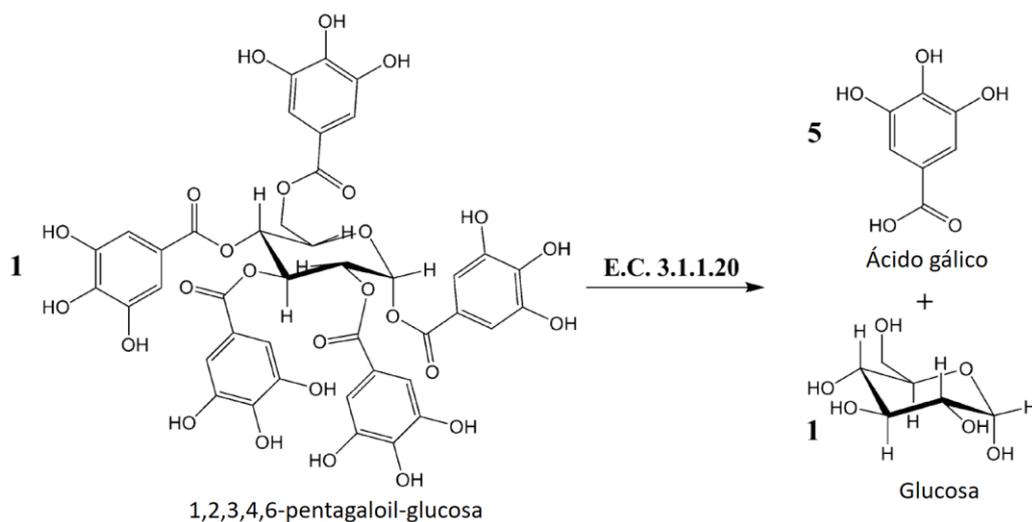


Figura 11. Hidrólisis de taninos con la enzima tanasa (Chávez *et al.*, 2012)

Esta enzima cataliza dos reacciones distintas: 1. la actividad esterasa que lleva a cabo la hidrólisis de los enlaces del ácido gálico, 2. la actividad dépsidasa que es la separación del ácido digálico, galotaninos, elagitaninos, etc., como se muestra en la **Figura 12**.

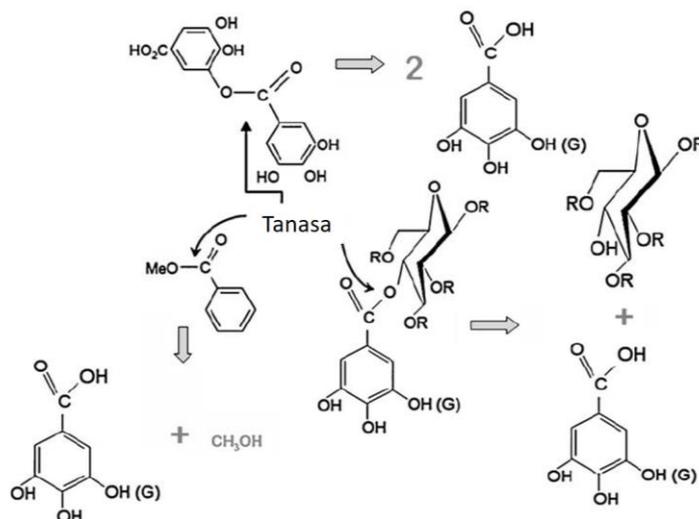
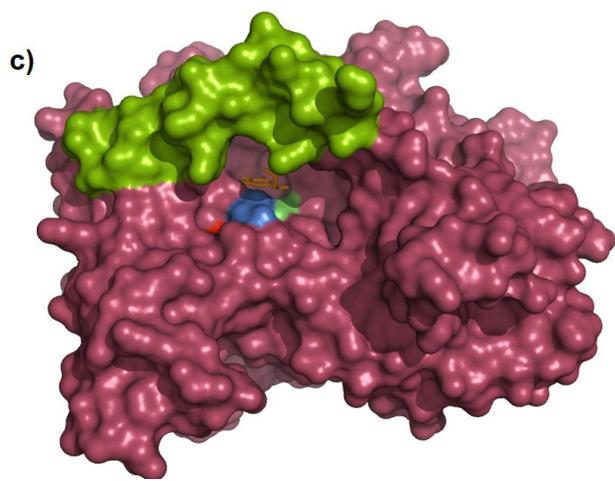
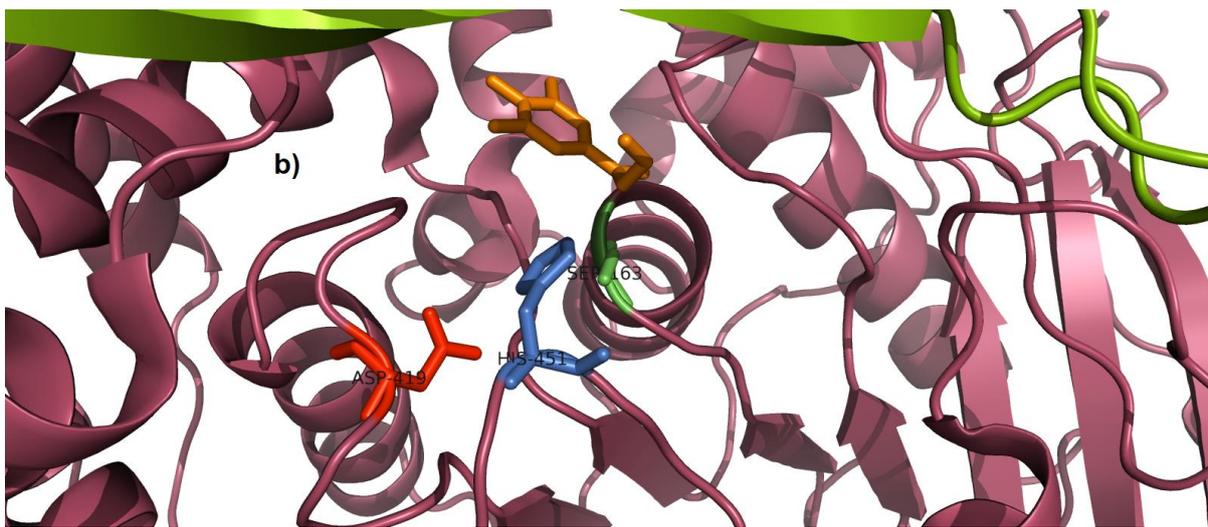
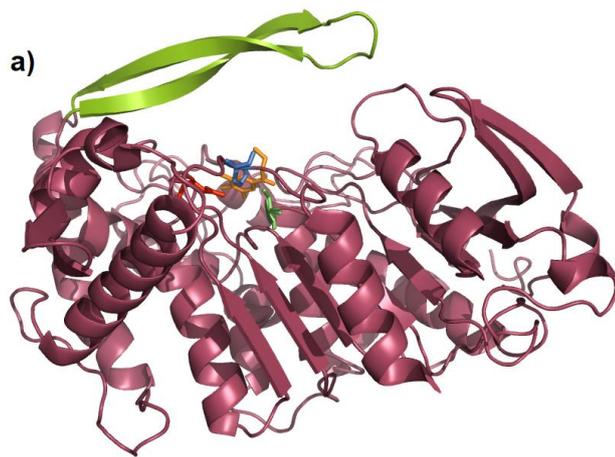


Figura 12. Reacciones catalizadas por la tanasa (Aguilar *et al.*, 2007)

La tanin acil hidrolasa fue descubierta accidentalmente por el científico francés Tieghem en 1876 (Aguilar, *et al.*, 2007). Esta enzima se ha extraído de distintas fuentes microbiológicas y en todas se ha observado que la enzima producida depende de las características del microorganismo, por lo tanto, cada tanasa tiene diferentes condiciones para su actividad óptima.

Ren, B., *et al.* (2013), reportaron la estructura tridimensional de la tanasa obtenida a partir de *Lactobacillus plantarum* (4JOC). Como se muestra en la **Fig. 13a** se observa el asa de color verde que consta de dos hebras largas, $\beta 8$ y $\beta 9$, que forman una lámina β antiparalela. Esta asa es de gran importancia debido a que es muy flexible y está cercana al sitio activo, lo que puede indicar que esta se abre y cierra al relacionarse con el sustrato. Así mismo, en esta imagen se observan los aminoácidos Ser 163 (verde), His 451 (azul) y Asp 419 (rojo) que conforman la tríada catalítica. Los autores postulan en su artículo que, durante la catálisis, el grupo hidroxilo de Ser 163 es desprotonado por His 451, que al mismo tiempo se estabiliza con un hidrógeno de Asp 419. En el centro se observa el sustrato ácido gálico (naranja). En la **Figura 13c** y **d** se exhibe la enzima tanasa con superficie de distintos ángulos en donde se observa el sitio activo.



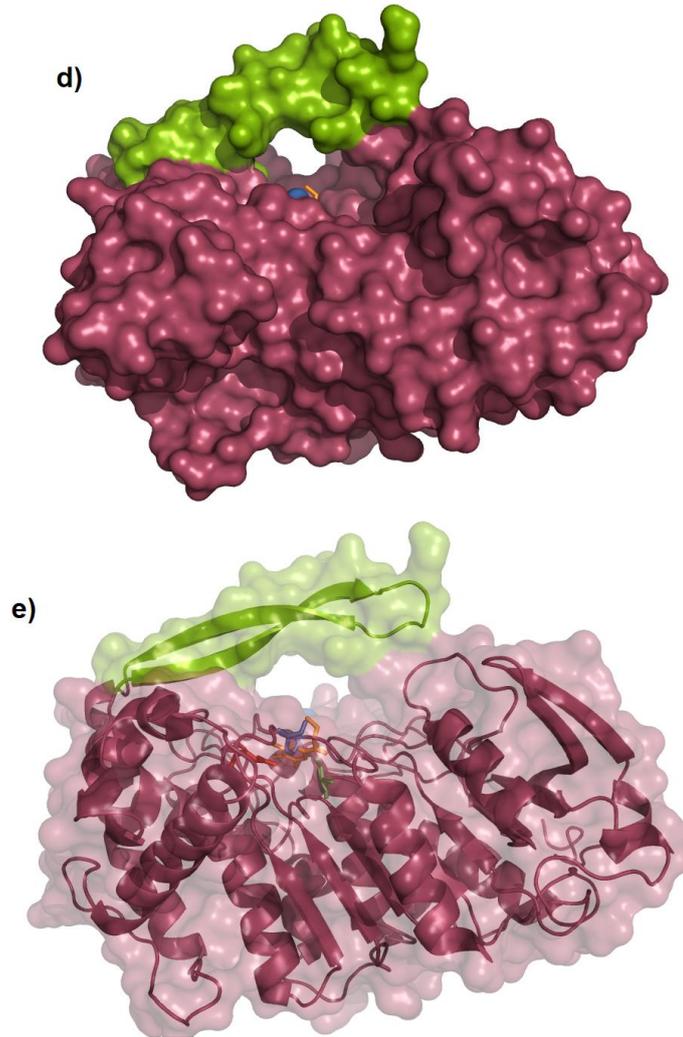


Figura 13. Estructura tridimensional de tanasa obtenida a partir de *Lactobacillus plantarum* código PDB 4J0C (elaboración propia).

La tanasa tiene distintas aplicaciones en la industria alimentaria: clarificación de bebidas alcohólicas y de jugos de frutas, para la elaboración de bebidas frías de café así como para la producción de té instantáneo. La alta concentración de taninos presentes en las frutas, en el vino y la cerveza provoca la precipitación de las proteínas, cuando esto ocurre, la bebida se observa turbia dando un aspecto y textura indeseable; por este motivo el proceso de clarificación es necesario en la elaboración de bebidas.

Esta enzima tiene una diversidad de posibles aplicaciones en la industria, sin embargo, es poco utilizada por su alto costo de producción. El ácido tánico y el ácido

gálico, son empleados como sustratos para producir la enzima. Sin embargo, su costo es alto por lo que existe la necesidad de buscar alternativas, ya que estos ácidos se encuentran en abundancia en diferentes partes de las plantas como: flores, hojas, cortezas y semillas y ofrecerían la oportunidad de reducir costos.

Microorganismos utilizados para la producción de tanasas

En un estudio realizado en 2021, los investigadores Afolayan *et. al*, utilizaron cepas de hongos aisladas de muestras de tierra para la producción de tanasas con el método de fermentación en estado sólido, utilizando como sustrato sorgo. En esta investigación observaron que los microorganismos *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* y *Aspergillus flavipes* son los que brindan mayor rendimiento en la producción de tanasas.

En años recientes se ha estudiado la producción de tanasas a partir de residuos agroindustriales como de la cascarilla de café, cáscara de coco, polvo de semillas de tamarindo y cáscara de gandul, en donde *Aspergillus* es empleado para tal fin (Bharathiraja *et al.*, 2017). En la **Tabla 5** se muestran los resultados de distintos artículos que emplean residuos de la industria alimentaria utilizando como método fermentación en estado sólido o sumergido. Estos estudios eligieron únicamente aquellos residuos con mayor rendimiento para determinar las condiciones óptimas.

Aspergillus niger

Aspergillus niger es un hongo utilizado ampliamente en la industria alimentaria y farmacéutica debido a su gran capacidad de producir metabolitos secundarios y enzimas con múltiples aplicaciones. La sustancia con la que comúnmente se asocia con este hongo, es el ácido cítrico que es utilizado en una gran variedad de productos alimenticios. El científico James Currie publicó hace más de 100 años (1917) su estudio sobre las propiedades de *Aspergillus niger* y su gran capacidad para biosintetizar grandes cantidades de ácido cítrico en soluciones con pH bajos y altas concentraciones de azúcares (Lima *et al.*, 2019,). Como se muestra en la **Fig. 14**, los resultados del artículo del científico estadounidense impulsaron a que se investigara profundamente sobre las propiedades de este hongo. Así mismo, en la línea del tiempo que se ilustra en el artículo de revisión (Cairns *et al.*, 2020) (con motivo de la conmemoración de los 100 años de la primera publicación del hongo), se mencionan

algunos de los avances en la investigación del hongo y algunos compuestos producidos aparte del ácido cítrico como el ácido glucónico y glucoamilasas.

Tabla 5. Microorganismos utilizados para la obtención de tanasa a partir de residuos (elaboración propia)

Tipo de microorganismo	Microorganismo	Fuente de sustrato	Método de producción	Actividad enzimática (U/g)	Condiciones óptimas	Referencia
Bacteria	<i>Bacillus velezensis</i> TA3	Epicarpio de granada	Fermentación en estado sólido	32	57 h de incubación 72.5% humedad 0.68% ácido tánico	Lekshmi <i>et al.</i> , 2020
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KP715242	Hojas de grosella (<i>Phyllanthus emblica</i>)	Fermentación sumergida	0.0415 U/mL	pH 5.5 39.72 °C 91.82 h de incubación 2.17% de taninos	Kumar <i>et al.</i> , 2016
		Hojas de ciruela negra (<i>Syzygium cumini</i>)	Fermentación sumergida	0.029	-	
		Hojas de eucalipto (<i>Eucalyptus glogus</i>)	Fermentación sumergida	0.027	-	
		Hojas del árbol de la goma arábica (Babul, <i>Acacia nilotica</i>)	Fermentación sumergida	0.019	-	
	<i>Aspergillus oryzae</i> FCBP-	Hojas de ciruela negra	Fermentación en estado sólido	138.34	relación 1:2 de sustrato y agua	Saeed <i>et al.</i> , 2020

Hongo	PTF-1202	(<i>Syzygium cumini</i>)			pH 5.5 30 °C 72 h de incubación	
	<i>Talaromyces verruculosus</i> ATT281	Cortez del árbol <i>Acacia nilotica</i>	Fermentación en estado sólido	8.22	pH 8 60 °C presencia de iones Mn, ácido gálico y SDS	Aharwar y Parihar, 2020
	<i>Aspergillus niger</i> PN1	Salvado de arroz	Fermentación en estado sólido	148.7	15 días en incubación 17.86 mg glucosamina/g	Mansor <i>et al.</i> , 2019
		Arroz cervecero	Fermentación en estado sólido	140.8	15 días en incubación 14.6 mg glucosamina/g	
		Café molido	Fermentación en estado sólido	116.52	12 días en incubación	
	<i>Aspergillus niger</i> SCSGAF0145	Cáscara de cacahuete	Fermentación sumergida	21.55 U/mL	35 °C pH 5.5	Olaleye <i>et al.</i> , 2022
	<i>Aspergillus tubingensis</i> CICC 2651	Tallos de té	Fermentación en estado sólido	245	7.49% de taninos 8.11% de glucosa 9.26% (NH ₄) ₂ SO ₄ 2.25% extracto de levadura	Wu <i>et al.</i> , 2018

					pH 5.5 6.4x10 ⁷ espora/g 96 h	
	<i>Aspergillus niger</i> NRRL3	Orujo de la producción de vino	Fermentación sumergida	3-4.5 U/mL	48 h 6% de ácido tánico (m/v)	Meini <i>et al.</i> , 2020
Levadura	<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281	Orujo de la producción de aceite de oliva	Fermentación en estado sólido	664.3 sin purificación 1026.12 con purificación	pH 4.5 y 8.5 35 °C	Mahmoud <i>et al.</i> , 2018

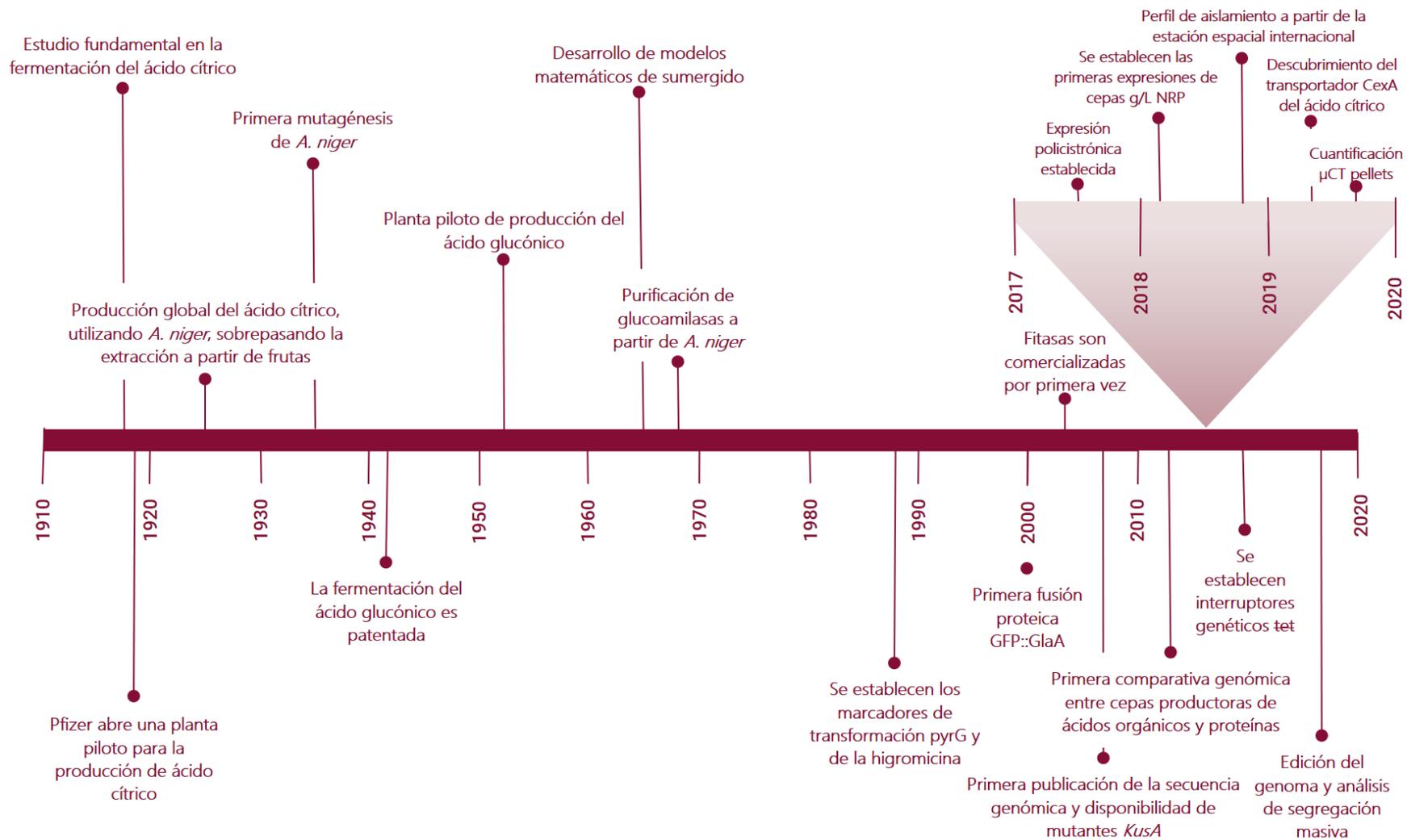


Figura 14. Línea del tiempo de los avances científicos sobre *Aspergillus niger*, Cairns et al., 2020

Aspergillus corresponde a la familia *Aspergillaceae*, se tienen registradas 492 especies en el Centro Nacional para la información biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés). Es un hongo ubicuo, se ha encontrado en tierra, cuerpos de agua, el ártico, árboles, líquenes, esponjas marinas, y en animales como camarones, inclusive recientemente se aisló *Aspergillus niger* en la estación espacial internacional.

Como se ha explicado anteriormente, *Aspergillus niger* tiene una variedad amplia de aplicaciones en diferentes industrias como se menciona a continuación:

1. Utilización para producir alimentos fermentados: vinagre, vinos, salsas y productos cárnicos;
2. Metabolitos secundarios: piranones, alcaloides, ciclopéptidos, policétidos y esteroides (Li *et al.*, 2020);
3. Productos empleados en la industria alimentaria y farmacéutica: ácido cítrico, ácido glucónico y ácido gálico
4. Enzimas: celulasas, pectinasas, amilasas, xilanasas, manasas, glucosa oxidasas, lipasas, triacilglicerol lipasas, fosfolipasas, fucosidasas, fitasas, trealasa, prolil endopeptidasa, proteasas y tanasas (Papadaki *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2021);

La FDA (United States Food and Drug Administration por sus siglas en inglés) reconoce este microorganismo como seguro (GRAS por sus siglas en inglés).

Fermentación en estado sólido y sumergida

La producción de enzimas a partir de microorganismos se obtiene mediante la fermentación. Existen dos tipos de fermentación: en estado sólido y sumergida.

La fermentación en estado sólido se utiliza ampliamente debido a los altos rendimientos y bajos costos de producción, esto se observa en distintos artículos en los que se obtiene un mayor rendimiento comparada con la fermentación sumergida (Cruz-Hernández *et al.*, 2006). Sin embargo, este método se limita al momento de escalar a nivel industrial debido a su dificultad de extraer las enzimas. La fermentación se lleva a cabo en placas o bandejas, cilindros y matraces de vidrio.

Por otro lado, la fermentación sumergida es utilizada en la industria debido a que es un sistema más homogéneo y es fácil extraer las enzimas porque se encuentra en una fase continua. Los fermentadores más utilizados son los biorreactores de columna de burbujas y de agitación convencional (Vandenberghe *et al.*, 2017). En la **Fig. 15** se enuncian algunas de las ventajas y desventajas de ambos métodos, esta información fue recabada de diferentes autores (Lekshmi *et al.*, 2020; Aharwar y Parihar, 2018; Papadaki, *et al.*, 2020).



Figura 15. Cuadro comparativo de la fermentación en estado sólido y sumergida (elaboración propia)

Propuesta de metodología

Los métodos más investigados para la producción de tanasas son fermentación en estado sólido y sumergido. En donde se emplean los residuos alimentarios o partes de árboles que no son aprovechadas en su totalidad que contienen un alto porcentaje de taninos como sustrato como se observa en la **Tabla 5**. En estas investigaciones se evalúan distintos microorganismos, sustratos y métodos de fermentación con el objetivo de conocer las condiciones óptimas para obtener un alto rendimiento en la actividad enzimática. Los resultados obtenidos de los artículos, dependerá

ampliamente del sustrato empleado, por lo que cambiará dependiendo de las condiciones y del origen del residuo.

Como se mencionó en la sección de la Producción de vino en México, tanto la producción y el consumo de esta bebida alcohólica va en aumento, por lo que los residuos producidos por el sector vitivinícola cada vez serán mayores.

Debido a que no hay investigaciones en México para la producción de tanasas a partir de residuos vinícolas, en esta sección se propone una metodología. La metodología se divide en dos etapas: 1. aislamiento y purificación de cepas de *Aspergillus niger*, y 2. producción de tanasas.

Aislamiento y purificación de cepas de *Aspergillus niger*

Aislamiento de *Aspergillus niger*

La enzima tanasa puede ser producida a partir de distintas fuentes microbiológicas, como se ha mencionado anteriormente, de bacterias, levaduras y hongos. Los hongos que han sido más investigados debido a su alto rendimiento y sobre la ventaja de ser seguros para su aplicación en la industria alimentaria, denominados GRAS, son *Aspergillus* y *Penicillium*. Entre estos dos géneros de microorganismos, *Aspergillus* ha sido mayormente utilizada comercialmente para la producción de tanasas (Chandrasekaran *et al.*, 2013) y además para una gran cantidad de aditivos y metabolitos secundarios (Li *et al.*, 2020).

Aspergillus niger es un hongo saprófito, es decir que obtiene sus nutrimentos a partir de materia en descomposición, por lo que es usual encontrarlo en el suelo (Padrón *et al.*, 2013), que es donde hay mayor probabilidad de encontrar restos de materia vegetal. Así mismo, se ha aislado de distintas fuentes como alimentos, cuerpos de agua y aire (Gautam *et al.*, 2011). El aislamiento de este hongo se lleva a cabo en medios de cultivo como agar papa dextrosa, agar extracto de malta y agar Czapek (Li *et al.*, 2020). Y se incuba de 48 a 72 h a 25 ± 2 °C.

Al inicio del crecimiento del hongo en el medio de cultivo, las colonias se observan de color amarillo, al transcurrir el tiempo se forman las conidias, las que le dan el aspecto café oscuro (George *et al.*, 2013). Las colonias en las placas de Petri se observan de

color café oscuro a negro y al reverso la colonia se observa incolora o amarilla (Gautam *et al.*, 2011).

La identificación de colonias productoras de tanasas se realiza mediante métodos de actividad enzimática cualitativa. Existen dos métodos utilizados en las primeras etapas de aislamiento para determinar si el microorganismo produce la enzima tanasa o carece de la habilidad de hidrolizar ácido tánico. El primer método es por Bradoo *et al.*, (1996) en donde se siembra por picadura el microorganismo en un medio de cultivo con ácido tánico. Las colonias que hidrolizan el ácido tánico se identifican por un halo transparente.

Kumar *et al.*, (2010) aíslan el microorganismo en un medio de cultivo con ácido tánico al 2% (m/v) y con cloruro de hierro, la reacción de estos dos compuestos transforma el agar en color café. Después de incubar por 48 a 72 h, las colonias se observan con un halo blanco.

Para obtener una cepa con características específicas para el orujo obtenido a partir de residuos vinícolas mexicanos, se tomarían muestras provenientes de los viñedos mexicanos. La metodología se muestra en la **Figura 16**. En tubos falcon estériles de 100 mL se tomaría muestras de tierra, debajo de 10 cm de la superficie. Los tubos serían transportados en refrigeración a 4 °C para evitar alguna proliferación de microorganismos indeseables. Una vez que se tendrían las muestras se prepararía una dilución, adicionando 10 g de muestra en 100 mL de una solución salina. Para homogeneizar se mezcla a agitación constante a temperatura ambiente. Después de 10 minutos se dejaría en reposo para que se sedimente la tierra y posteriormente se tomaría una alícuota de 100 µL que es transferida al agar papa dextrosa que fue previamente esterilizado a 121 °C por 15 minutos.

Algunos de los medios de cultivos utilizados para el aislamiento de *Aspergillus niger* son: agar papa dextrosa, agar extracto de malta, agar de levadura autolizada Czapek y agar Czapek. Como fuente de carbono, este hongo puede alimentarse de distintas fuentes como glucosa, maltosa, xilosa, sorbitol, lactosa y ácido tánico.

El crecimiento de este hongo en el medio de cultivo de papa dextrosa tarda aproximadamente de 3 a 5 días a una temperatura de 28±2 °C.

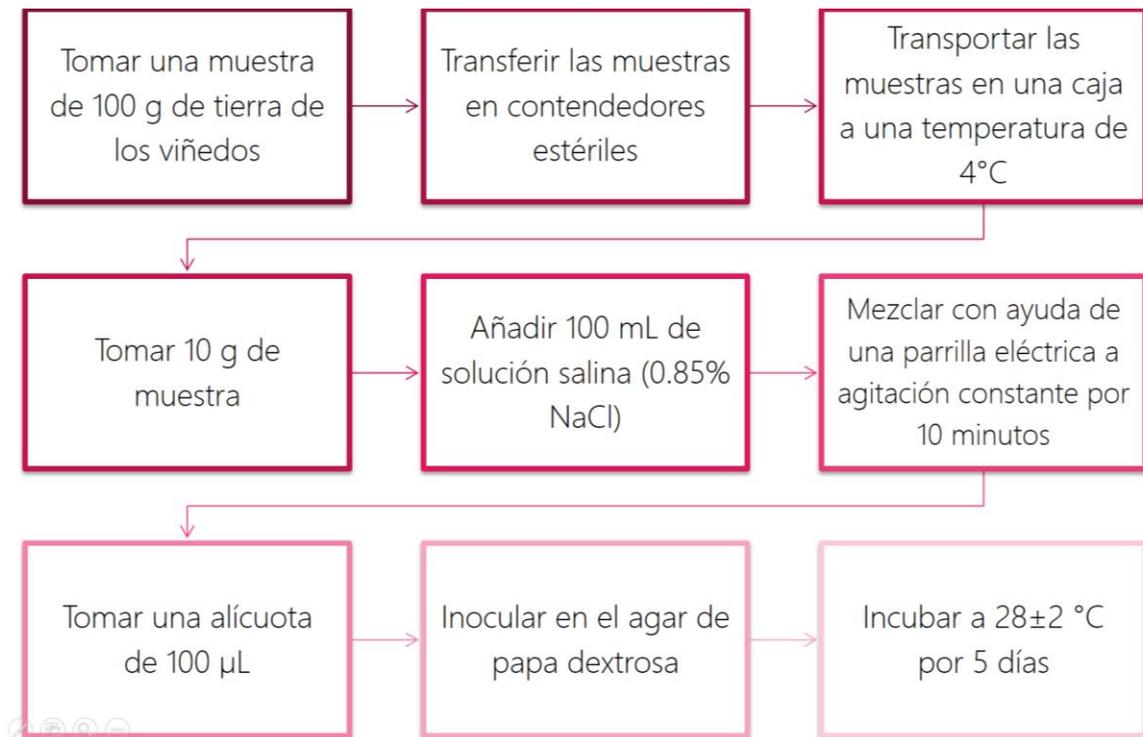


Figura 16. Toma de muestra y aislamiento de *Aspergillus niger* (elaboración propia)

Purificación de *Aspergillus niger*

Las colonias de *Aspergillus niger* en el agar papa dextrosa se observan de color negro o marrón y en la parte posterior se observa un color amarillo en el centro. Después de identificar las colonias y observar su morfología en el microscopio, se prepararía una dilución de esporas como se muestra en la **Fig. 17**, ajustando con la cámara de Neubauer a 1×10^6 esporas/mL en una solución de Tween 80 al 0.1% (v/v).

Posteriormente se inocularía en la superficie del agar Czapek. La composición del medio Czapek es la siguiente (g/L): 2.19 K_2HPO_4 , 4.38 $(NH_4)_2SO_4$, 0.44 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.044 $CaCl_2 \cdot 7H_2O$, 0.009 $MnCl_2$, 0.004 $NaMoO_4 \cdot H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ y 1 % de ácido tánico a pH 5.2. Se utiliza como fuente de carbono al ácido tánico para purificar las cepas de *Aspergillus niger* que servirá en el método de fermentación sumergida para la producción de la tanasa con adición de cloruro de hierro. El sulfato de amonio sería utilizado como única fuente de nitrógeno.

Después de obtener las cepas de *Aspergillus niger* puras, se continuaría con el proceso de confirmación en el cual se realizarían pruebas bioquímicas para corroborar con la bibliografía que la cepa aislada es la deseada. En la determinación de fuente de carbono se inoculan caldos de rojo de fenol con distintos carbohidratos:

glucosa, lactosa, sacarosa, almidón y sacarosa, la prueba es positiva si cambia el color a amarillo. En la prueba de catalasa se determina el tipo de respiración, el microorganismo previamente suspendido entra en contacto con peróxido de hidrógeno en un portaobjetos, si se observan burbujas la prueba se considera positiva.

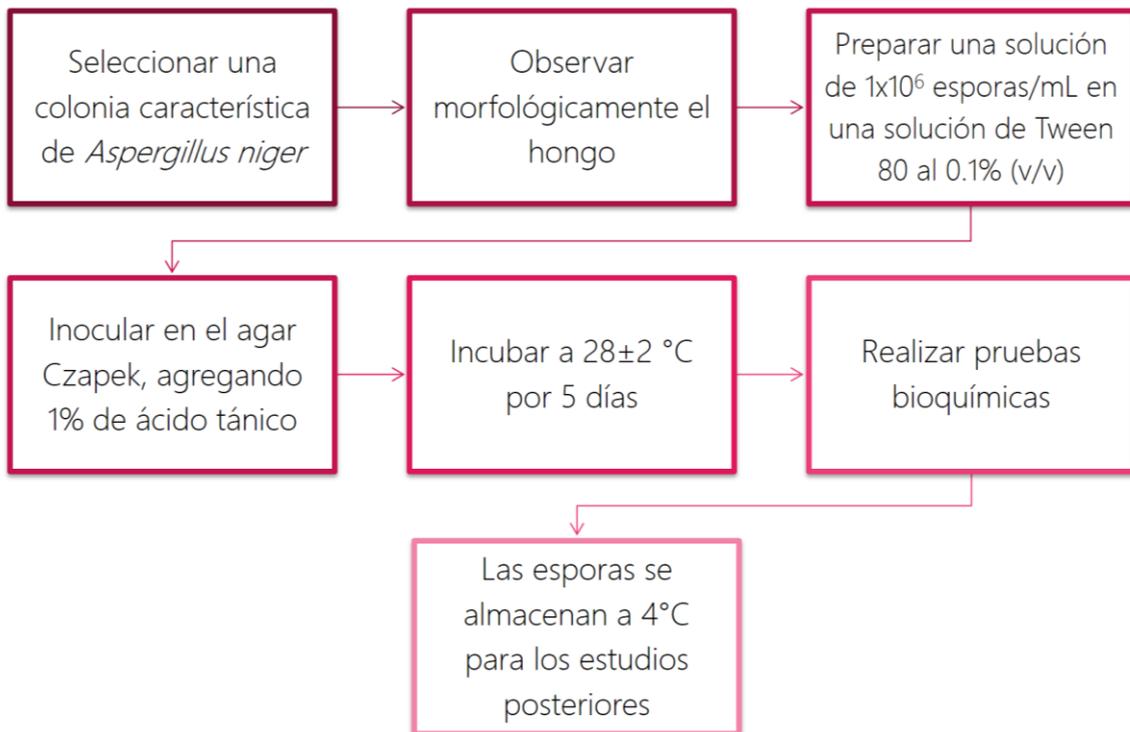


Figura 17. Purificación de *Aspergillus niger* y almacenamiento (elaboración propia)

Producción de taninas

Preparación del sustrato

Para la preparación de muestra, el orujo se sometería a un baño ultrasónico asistido por enzimas celulolíticas y ligninolíticas para facilitar la liberación de taninos al medio, en el cual las cepas de *Aspergillus niger* lo utilizarían como única fuente de carbono en el proceso de fermentación. El objetivo de este paso es facilitar la liberación de taninos al medio para disminuir el tiempo de fermentación sumergida y obtener un medio más homogéneo.

El orujo se transferiría a matraces de 500 mL con agua destilada (**Fig. 18**) y 5 mL de la solución enzimática. El pretratamiento se llevaría a cabo a una alta frecuencia de 40 kHz por 10 minutos. Después del tratamiento mecánico y enzimático, se centrifugaría la muestra a 10 000 rpm por 20 min, el sobrenadante se descartaría y el

precipitado se secaría a 65 °C por 24 horas. El sustrato se molería hasta obtener un polvo fino y se tamizaría con una malla del número 3. El polvo se almacenaría en bolsas de polipropileno estériles en un lugar seco y a temperatura ambiente.



Figura 18. Diagrama para el pretratamiento del orujo (elaboración propia)

Fermentación sumergida

La producción de enzimas a partir de fermentación se realiza mediante estado sólido y sumergido. El método en estado sólido es el más investigado debido a que brinda mayor rendimiento y por lo tanto es económicamente más rentable.

En el estudio comparativo que hace Renovato *et al.*, (2011) sobre las características de la tanin acil hidrolasa bajo fermentación en estado sólido y sumergido demuestran que dependiendo del método de producción se obtiene una enzima con características propias. La producción que obtuvieron en estado sólido fue 126 veces más alta que en el método sumergido. Sin embargo, la enzima producida a partir del método sumergido es termotolerante con un pH óptimo más amplio de 6-7. Bajo condiciones de 4°C, incubando por 24 h, la enzima obtenida bajo estado sólido mantuvo su actividad enzimática a un 85-100%, comparado con la tanasa obtenida por inmersión en el cuál a un pH de 5-7 mantuvo su actividad del 90-100%. Así mismo en este estudio se determinó la importancia del sustrato, en el cual determinaron que

la enzima producida bajo estado sólido es más afín al metil galato en contraste con la tanin acil hidrolasa obtenida bajo estado sumergido que es más afín al ácido tánico. Por otra parte, en el estudio de Lekha y Lonsane (1994) reportaron que la enzima producida bajo fermentación sumergida, en las primeras 48 h era intracelular y conforme pasa el tiempo se producía la enzima extracelular, en contraste con el estado sólido en el cuál es totalmente extracelular.

Como se describe en los artículos arriba citados, la enzima exhibe distintas características dependiendo si el método es en estado sólido o sumergido. En este trabajo se sugiere emplear el método sumergido en razón de que se busca obtener una enzima con características químicas que respondan a una amplia aplicación en la industria química y proporcionar mayor información sobre las características de la enzima tanasa a través de la investigación y su aplicación.

En términos generales el método de fermentación sumergida consiste en inocular un microorganismo con un sustrato, y un medio de cultivo líquido para obtener compuestos o enzimas de valor agregado para las industrias de alimentos, farmacéuticas y químicas.

La primera parte de la fermentación sumergida consistiría en preparar el inóculo como se describe a continuación: de las cepas que se obtendrían de *Aspergillus niger*, se inocularían en agar papa dextrosa y después de incubaría a 28 ± 2 °C por 6 días. Una vez que se obtendrían las colonias en el agar, se inocularían a una concentración de 1×10^6 esporas/mL en una solución de Tween 80 al 0.1% (v/v). La segunda parte es inocular 100 mL del microorganismo en el medio Czapek con el orujo (10 g/L), La muestra se incubaría a 30°C con agitación constante. Cada 6 horas de tomaría una muestra desde el tiempo cero. Cada muestra se filtraría con papel Whatman No.1. La solución se centrifugaría a 95000 rpm por 15 minutos. Finalmente, el sobrenadante que se obtendría se almacenaría a 4 °C.



Figura 19. Diagrama para la fermentación sumergida, utilizando el orujo como sustrato

Cuantificación de taninos

El objetivo de este proceso es determinar la concentración de taninos del sustrato empleado para conocer la eficiencia para la producción de las enzimas tanasas.

La cuantificación de taninos presente en el orujo se realizaría mediante el método de Folin-Denis que describen los autores Varadharajan, *et al.*, en el artículo de *Fermentación en estado sólido utilizando Aspergillus oryzae* (2017) como se muestra en la **Figura 20**.

Para determinar la concentración de taninos, primero se realizaría una curva patrón, preparando distintas disoluciones de ácido tánico de 10, 20, 30, 40 y 50 µg/mL. Después se añadiría 0.5 mL del reactivo Folin-Denis y 1 mL de carbonato de sodio. Las disoluciones se llevarían a un volumen de 10 mL con agua destilada para posteriormente incubar por 20 minutos a temperatura ambiente en un lugar oscuro. Una vez que la reacción llega al equilibrio, se lee a 750 nm.

Después de que se obtendría la curva a partir de la solución estándar, se repetiría la metodología para las muestras.

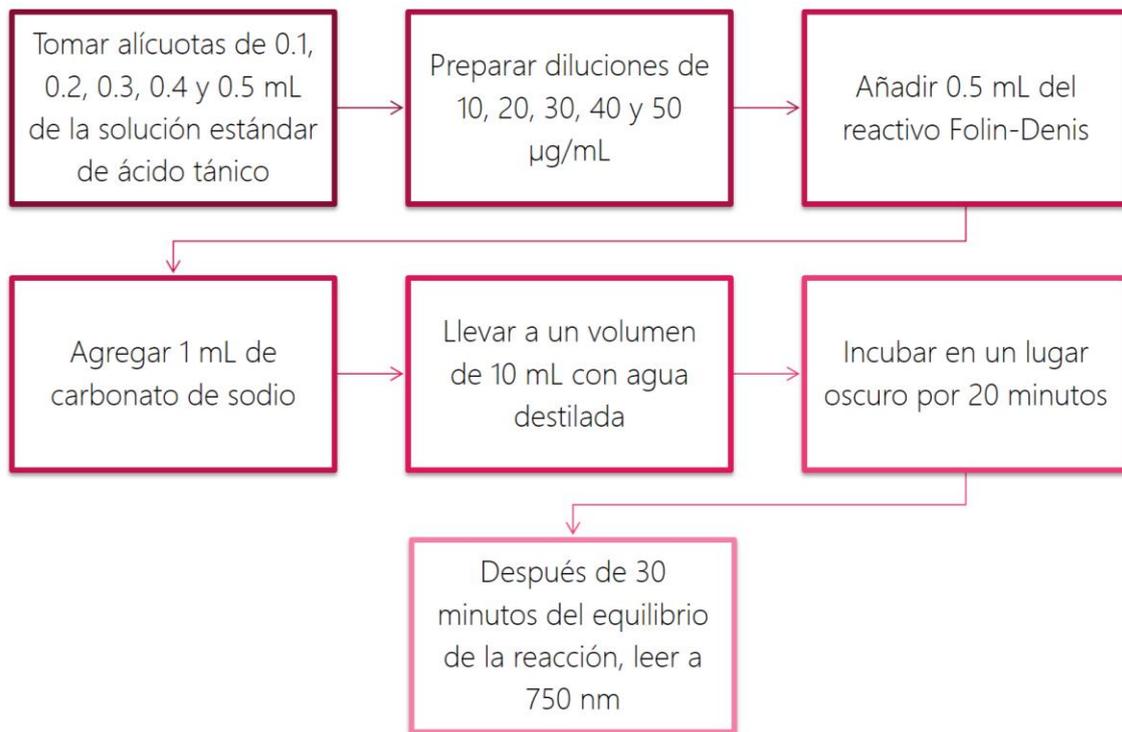


Figura 20. Diagrama para la determinación de taninos

Separación y purificación de taninas

Las taninas se separarían del medio de cultivo mediante una precipitación con sulfato de amonio como lo reporta Al-Mraai *et al* (2019). En el proceso de fermentación se podrían obtener diferentes enzimas además de las taninas que interferirían con los resultados para la determinación de actividad enzimática, como son las celulasas y hemicelulasas. Por ello, se realizaría una purificación para trabajar únicamente con tanin acil hidrolasas.

En una probeta graduada se mediría el volumen de extracto crudo obtenido para posteriormente realizar la precipitación con sulfato de amonio como se observa en la **Fig. 21**. A la solución se le añade sulfato de amonio previamente pulverizado hasta obtener una saturación del 80% a agitación constante con ayuda de un agitador magnético a velocidad baja hasta observar la precipitación completada, la precipitación se llevaría a cabo en un baño de hielo para evitar el calentamiento. La solución se transferiría a los tubos de la centrifuga, asegurando que se balanceen correctamente los tubos y después la muestra se centrifuga a 9 000 rpm por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recolectaría y el precipitado se resuspendería en un buffer de acetatos 0.02 M (pH=5), mínimo de uno a dos volúmenes del producto obtenido.

Una vez que se purifica el complejo enzimático se sugiere llevar a cabo una diálisis para retirar el exceso de sal presente en la solución enzimática. La solución obtenida de la precipitación con sulfato de amonio se vertería en una bolsa de diálisis asegurando que se cierre completamente. La bolsa se colocaría en un vaso de precipitados con agua destilada hasta cubrir completamente la bolsa. El agua destilada se cambiaría cuatro veces cada seis horas.

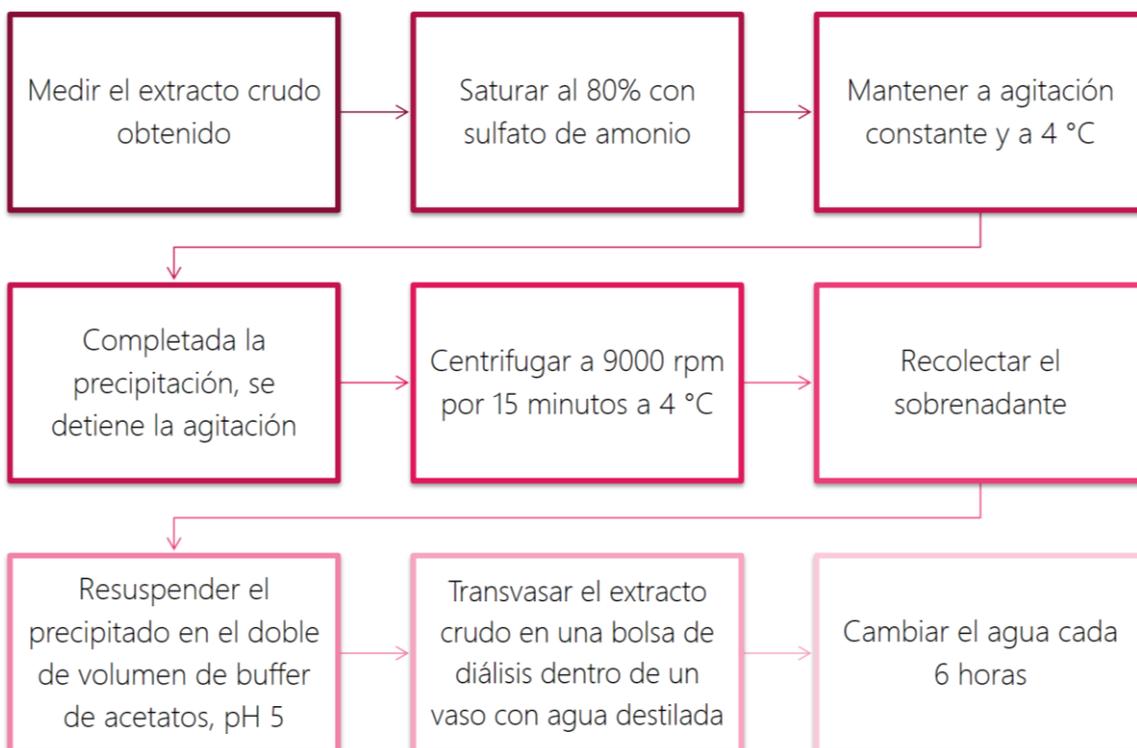


Figura 21. Diagrama para la precipitación del complejo enzimático

Purificación enzimática

La cromatografía de exclusión molecular se emplea para separar sustancias solubles en disoluciones acuosas como proteínas, enzimas, polisacáridos y ácidos nucleicos (Wan, 2021) con peso molecular de $1-2.5 \times 10^7$ Da (Masoodi *et al.*, 2021). En la cromatografía de exclusión molecular, el material de la fase estacionaria puede ser un gel semi rígido o suave (Ismail *et al.*, 2010). Sephadex, es un gel suave el cual está constituido por redes de dextrano, material utilizado ampliamente con el principal propósito de eliminar la sal de una muestra (Hagel *et al.*, 2010). Una de las ventajas más destacables de la cromatografía por exclusión molecular es que se trabaja en condiciones similares a las fisiológicas (Voedisch *et al.*, 2010), favoreciendo la

estabilización de la estructura evitando que la enzima se desnaturalice, y por lo tanto previendo a la enzima de alguna alteración mayor en su actividad enzimática para posteriormente realizar estudios de interacción proteína-proteína (Beattie, 1998).

El peso molecular de tanasas obtenido de fuentes bacterianas y fúngicas es de 38 a 420 kDa (Chávez-González *et al.*, 2018). De *Aspergillus niger*, se han aislado tanasas con diferentes características, dentro de ellas, el peso molecular con un amplio rango de 66 kDa (Lal *et al.*, 2012) 95.45 kDa (Al-Mraai *et al.*, 2019), 90 y 180 kDa (Ramírez-Coronel *et al.*, 2003) 186 kDa (Barthomeuf *et al.*, 1994).

Al seleccionar una fase estacionaria se debe tomar en cuenta el peso molecular de la proteína a separar, es por esto que en la mayoría de los artículos que obtienen tanasas a partir de fuentes fúngicas, eligen un gel suave con tamaño de exclusión de $> 1 \times 10^5$ o mayor como se muestra en la **Tabla 6**, donde utilizan Sephadex G-100, G-150 o G-200 (Al-Mraai *et al.*, 2019; da Costa *et al.*, 2012).

Debido a que en la presente propuesta metodológica se plantea un aislamiento de una cepa de *Aspergillus niger*, obtenida a partir de tierra de viñedos mexicanos, para obtener la tanasa, de la cual no se tiene información, se sugiere tomar de referencia las fases estacionarias utilizadas en estudios previos que se han hecho a partir de cepas de *A. niger* extraídas de otros sitios.

Tabla 6. Tipos de columna Sephadex

Tipo de Sephadex	Tamaño de exclusión (proteínas globulares)	Límite de fraccionamiento	pH estable
G-25 (medio)	$> 8 \times 10^3$	$800 - 5 \times 10^3$	2-13
G-50 (medio)	$> 3 \times 10^4$	$3 \times 10^3 - 2 \times 10^4$	2-12
G-75	$> 8 \times 10^4$	$4 \times 10^3 - 5 \times 10^4$	2-10
G-100	$> 1 \times 10^5$	$5 \times 10^3 - 6 \times 10^5$	

Retomado de las especificaciones de Cytiva (2023)

La purificación se llevaría a cabo (**Fig. 22**) mediante una cromatografía de exclusión molecular, basándose en la separación de proteínas de acuerdo a su tamaño, en

donde las proteínas más pequeñas migran más rápido o más lento a través de la columna dependiendo de la composición de ésta.

Se emplearía una columna Superdex GL 200 10/300 de dimensiones aproximadas de 1.0 x 30.0 cm. Esta se equilibraría con buffer de acetatos (100 mM; pH= 5.0) a un flujo de 10 mL/h. Posteriormente se inyectaría la muestra (0.5 mL). Una vez que la muestra pase por la columna, la columna se lava con el buffer de equilibrio, y finalmente se van recolectando las fracciones. La fracción obtenida se filtra en una membrana Millipore 0.22 µmol.

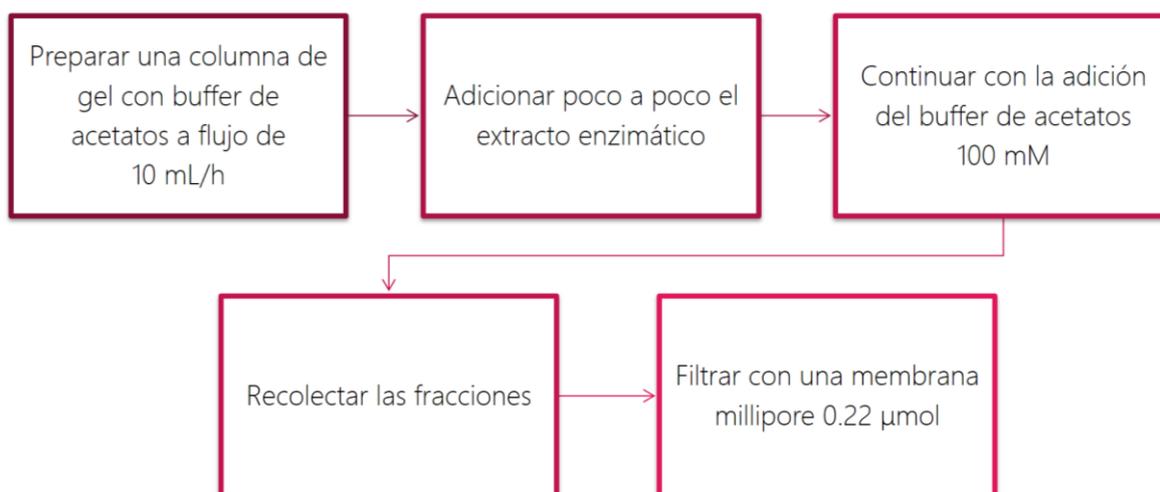


Figura 22. Diagrama para la purificación del complejo enzimático (elaboración propia)

Caracterización del extracto enzimático

Cuantificación de proteínas

La cuantificación enzimática se puede realizar mediante distintos métodos analíticos como son: cromatografía, espectrofotometría, titulaciones, colorimetrías por mencionar algunos. Uno de los métodos más específicos para analizar la actividad de la tanasa es mediante la cromatografía líquida de alta eficiencia en la cual se cuantifican los ésteres obtenidos de la hidrólisis de los taninos. Sin embargo, esta tecnología requiere de instrumentos de alto costo, trabajadores especializados o con una capacitación continua y el tiempo de análisis es mayor que la espectrofotometría o valoración, lo que lo hace inadecuado para un análisis rutinario (Dhiman *et al.*, 2022).

Por otro lado, las valoraciones empleadas para determinar la actividad enzimática han sido sustituidas debido a la imprecisión del punto final que se tenía al utilizar el ácido

gálico como menciona Sherma *et al.* (2000). En dicho trabajo se inclinan por el método espectrofotométrico, modificando la metodología de Skene, el cual se basa en la formación del cromóforo formado por la rodanina y los galatos formados por la hidrólisis enzimática. En esta metodología se determinan las condiciones óptimas para las tanasas obtenidas de *Aspergillus oryzae* y *A. niger*, en el cual modifican el pH del medio, ajustan tiempos en el cual determinan la mayor actividad enzimática y eliminan el reactivo del ácido sulfhídrico y nitrógeno. La mayor desventaja de este método es que se utiliza un sustrato no específico, metil galato (Dhiman *et al.*, 2022). El extracto enzimático que previamente sería purificado se analizaría para conocer su concentración inicial y realizar estudios posteriores para conocer su actividad enzimática. Debido a que la tanasa en su estructura contienen aminoácidos aromáticos como tirosina y triptófano (Ren *et al.*, 2013), las proteínas se pueden cuantificar mediante el método de Lowry.

En el método de Lowry en condiciones alcalinas el ion cobre (II) forma complejos con cuatro enlaces peptídicos presentes en las proteínas (**Fig. 23**). Después de la reacción de complejación, el ácido fosfomolibdico y el ácido fosfotúngstico que conforman el reactivo Folin-Ciocalteu se reducen debido al cobre (I) que se formó anteriormente catalizada por los aminoácidos aromáticos como tirosina, triptófano y cisteína dando como producto el azul de molibdeno (heteropoli-molibdeno) el cual se lee a 600-750 nm.

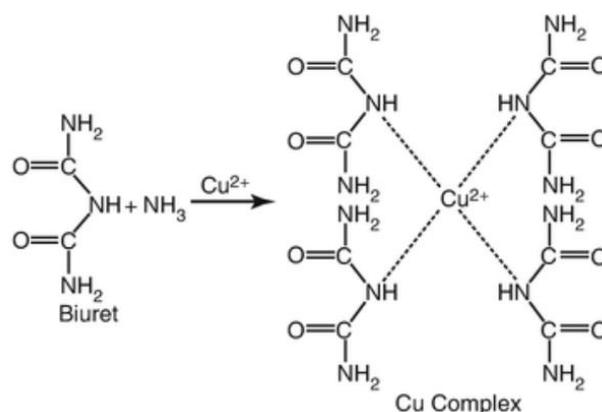


Figura 23. Reacción de biuret que ocurre en el método de Lowry antes de añadir el reactivo de Folin-Ciocalteu

Nota: El ion de cobre forma complejo con el nitrógeno del grupo amida del enlace peptídico de las proteínas.

La metodología que se seguiría es de acuerdo a Noble y Bailey (2009) para la cuantificación de proteína con base al ensayo de Lowry *et al.*, 1951, tomando en cuenta las modificaciones de Noble y Bailey para estabilizar el color producido y aumentar la velocidad de reacción.

En la **Figura 24** se describe la metodología para la cuantificación de proteínas. De la muestra enzimática que se obtendría se tomaría 1 mL y se mezclaría con 1 mL de solución alcalina de cobre (sulfato de cobre, SDS al 5% e hidróxido de sodio al 3.2%; 1:1:2). Después se añadiría 0.5 mL del agente Folin-Ciocalteu fenol, agitando con un vortex y se incubaría por 30 min. La muestra se dejaría enfriar hasta temperatura ambiente y se lee en el espectrofotómetro a 750 nm.

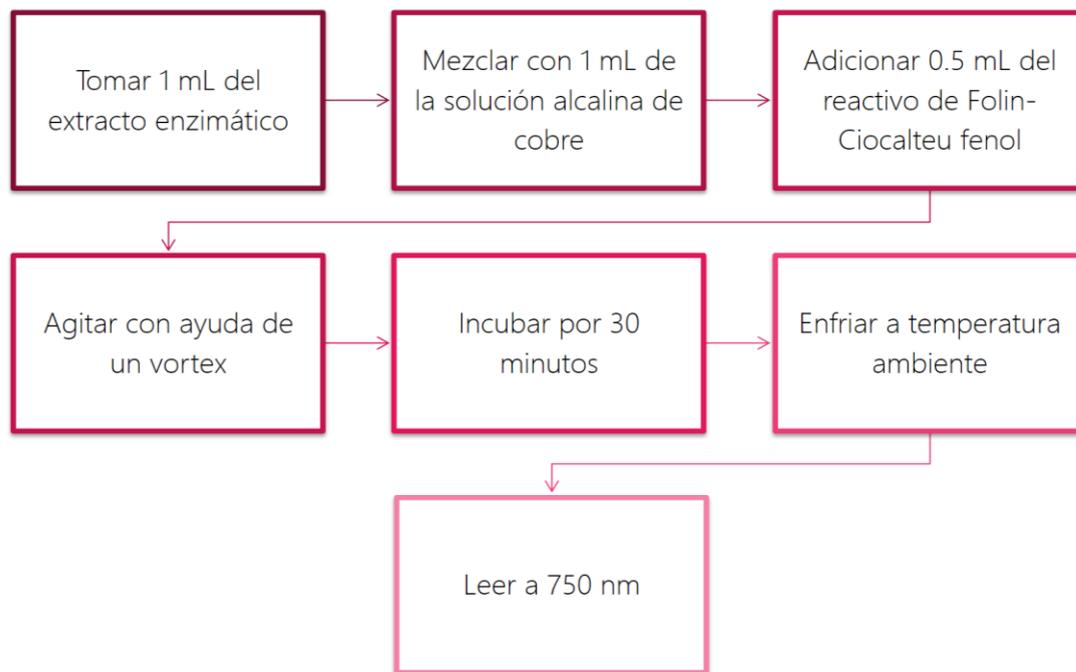


Figura 24. Diagrama para la cuantificación de proteínas, empleando la metodología de Lowry

Cuantificación de la actividad enzimática de la tanasa

En el capítulo de Mateo *et al.*, (2013) describen el método para cuantificar la actividad enzimática como se describe a continuación (**Fig. 25**).

Reacción de ácido gálico y rodanina

Se mezclan 100 μ L de la disolución enzimática con 100 μ L de galato de metilo a 25 mM (en buffer de acetatos a pH 5). Posteriormente la disolución se incubaba a 37 °C

por 10 minutos. Pasado el tiempo, se añaden 150 μL de rodanina al 0.6% (m/v) y se incuba a 30°C por 5 minutos. Se le adiciona una solución alcalina de hidróxido de potasio con una concentración de 500 mM. Después de adicionar 100 μL de KOH, se diluye con 900 μL de agua destilada. Nuevamente se incuba de 5-10 minutos, finalmente se lee en el espectrofotómetro a 520 nm.

El resultado se reporta como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de ácido gálico por minuto.



Figura 25. Diagrama para cuantificar la actividad mediante dos métodos (elaboración propia)

Determinación de condiciones óptimas de la actividad enzimática

Determinación de temperatura óptima

Para establecer la temperatura óptima de las enzimas a estudiar se sigue la misma metodología para la actividad enzimática, incubando a diferentes temperaturas (28-40°C) en intervalos de 5 °C con galato de etilo como sustrato para la enzima.

Determinación de pH óptimo

Para preparar las muestras se adicionarían distintos buffers a una concentración de 50 mM: citrato pH 4-6, buffer de fosfatos pH 7-8 y glicina-NaOH pH 9-10. Las muestras se analizarían de pH 4-10, posteriormente se incubarían y serían sometidas al mismo tratamiento que al de la actividad enzimática.

Conclusiones

Debido a que la industria alimentaria está en un continuo estado de producción y desarrollo para la elaboración de productos comestibles que abastecen a miles de millones de personas y animales, también deben responsabilizarse de las toneladas de residuos que se generan en cada etapa del proceso. En la actualidad se utilizan los residuos vegetales principalmente como fertilizantes, sin embargo, se ha demostrado que hay ciertos residuos que no deben ser empleados con este fin debido que, como en el ejemplo del orujo, tiene una cantidad importante de taninos, que forman complejos con metales dando una función anti nutritiva para el crecimiento de la vid. Recientes investigaciones han demostrado que los taninos se han utilizado como sustrato para la producción de enzimas tanasas con una actividad enzimática significativa, que son utilizadas para la clarificación de bebidas.

Siendo el orujo un ejemplo de residuo vinícola con un gran potencial en la misma industria alimentaria, existen miles de residuos de alimentos que no son reutilizados para obtener metabolitos secundarios, aditivos o enzimas que lograrían tener un gran impacto en la economía de industrias alimentarias mexicanas y un peso considerable para la disminución de contaminación de tierras y cuerpos de agua.

La mayoría de las investigaciones que llevaron a cabo fermentación en estado sólido o sumergidas, utilizando el orujo como sustrato y *Aspergillus niger* como microorganismo, son resultados específicos para la región de donde se obtuvo el orujo y de donde se aisló *A. niger*, debido a que, dependiendo de estos factores será el desempeño que tendrá la enzima en el proceso de clarificación. De ahí la importancia del desarrollo de la investigación de los viñedos específicamente de México para la clarificación de vinos elaborados en la República.

Referencias bibliográficas

- Afolayan T.V., Adah M.E., Ibidapo O.I., Orotupe M.O., Orji F.A., Famotemi A.C., Ehiwuogu-Onyibe J., y Lawal A.K. (2021) *Screening and Optimization of Culture Conditions for Local Production of Tannase from Fungal Species*. Tropical Journal of Natural Product Research, 4(12), pp. 1178-1181.
- Aguilar, C. N., Rodríguez, R., Gutiérrez-Sánchez, G., Augur, C., Favela-Torres, E., Prado-Barragan, L. A., Ramírez-Coronel, A., y Contreras-Esquivel, J. C. (2007). *Microbial tannases: advances and perspectives*. Applied Microbiology and Biotechnology, 76(1), pp. 47 <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1000-2>
- Aharwar, A., y Parihar, D. K. (2019). *Talaromyces verruculosus tannase production, characterization and application in fruit juices detannification*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 18(101014), párr. 1. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.052>
- Aharwar, A., & Parihar, D. K. (2018). *Tannases: Production, properties, applications*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 15, 322–334. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.005>
- Al-Mraai, Al-Fekaiki y Al-Manhel(2019). *Purification and characterization of tannase from the local isolate of Aspergillus niger*. Journal of Applied Biology & Biotechnology, 7(1), pp. 30-33. <https://doi.org/10.7324/jabb.2019.70106>
- Amerine, M. A. (2021, August 26). *Wine*. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/topic/wine>
- Antonić, B., Jančíková, S., Dordević, D., & Tremlová, B. (2020). *Grape pomace valorization: A systematic review and meta-analysis*. Foods (Basel, Switzerland), 9(11), 1627. <https://doi.org/10.3390/foods9111627>

- Ayed, L., M'hir, S., y Hamdi, M. (2020). *Microbiological, biochemical, and functional aspects of fermented vegetable and fruit beverages*. Journal of Chemistry, 2020, pp. 1–12. <https://doi.org/10.1155/2020/5790432>
- Bagheri, B., Bauer, F. F., & Setati, M. E. (2016). *The diversity and dynamics of indigenous yeast communities in grape must from vineyards employing different agronomic practices and their influence on wine fermentation*. South African Journal of Enology and Viticulture, 36(2). <https://doi.org/10.21548/36-2-957>
- Barthomeuf, C., Regerat, F., & Pourrat, H. (1994). *Production, purification and characterization of a Tannase from Aspergillus niger LCF 8*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 77(3), 321–323. [https://doi.org/10.1016/0922-338x\(94\)90242-9](https://doi.org/10.1016/0922-338x(94)90242-9)
- Beattie, J. (1998). *Size-Exclusion Chromatography*. In: Clegg, R.A. (eds) Protein Targeting Protocols. Methods in Molecular Biology™, vol 88. Humana Press. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1385/0-89603-487-9:65>
- Bharathiraja, B., Iyyappan, J., Jayamuthunagai, J., Kumar, R. P., Sirohi, R., Gnansounou, E., y Pandey, A. (2020). *Critical review on bioconversion of winery wastes into value-added products*. Industrial Crops and Products, 158, 112954. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112954>
- Bharathiraja, S., Suriya, J., Krishnan, M., Manivasagan, P., y Kim, S. K. (2017). *Production of Enzymes From Agricultural Wastes and Their Potential Industrial Applications*. Marine Enzymes Biotechnology: Production and Industrial Applications, Part III - Application of Marine Enzymes, 125–148. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.11.003>
- Biswas, I., Mitra, D., Bandyopadhyay, A. K., & Das Mohapatra, P. K. (2020). *Contributions of protein microenvironment in tannase industrial applicability: An in-silico comparative study of pathogenic and non-pathogenic bacterial*

tannase. *Heliyon*, 6(11),

e05359.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05359>

Bradoo, S., Gupta, R., & Saxena, R. K. (1996). Screening of extracellular tannase-producing fungi: Development of a rapid and simple plate assay. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 42(4), 326-327.

Briscoe, J. (2022). *Crush: The triumph of California wine*. University of Nevada Press.

Bustamante, M., Moral, R., Paredes, C., Pérez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J., y Pérez-Murcia, M. (2008). *Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry*. *Waste Management*, 28(2), pp. 372–380.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.01.013>

Cairns, T. C., Barthel, L., & Meyer, V. (2021). *Something old, something new: challenges and developments in Aspergillus niger biotechnology*. *Essays in Biochemistry*, 65(2), pp. 214. <https://doi.org/10.1042/EBC20200139>

CEDRSSA. (2017, Junio). *La vid en México*. Gob.Mx.
<http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/9VidMexico.pdf>

Chandrasekaran, M., & Beena, P. S. (2013). *Tannase: source, biocatalytic characteristics, and bioprocesses for production*. In *Marine Enzymes for Biocatalysis* pp. 270. Elsevier.

Chávez-González, M., Rodríguez-Durán, L. V., Balagurusamy, N., Prado-Barragán, A., Rodríguez, R., Contreras, J. C., & Aguilar, C. N. (2012). *Biotechnological advances and challenges of tannase: An overview*. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), pp. 453. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0608-5>

Chávez-González, M. L., Rodríguez-Duran, L. V., Buenrostro-Figueroa, J. J., Sepúlveda-Torre, L., Ascacio-Valdés, J. A., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar,

- C. N. (2018). *Tannin degrading enzymes: Catalytic properties and technological perspectives*. In *Enzymes in Food Technology* Springer Singapore pp. 129.
https://doi.org/10.1007/978-981-13-1933-4_7
- Chávez, M., Rodríguez, L., Buenrostro, J., Sepúlveda, L., Ascacio, J., Rodríguez, R., y Aguilar, C. (2018). *Tannin Degrading Enzymes: Catalytic Properties and Technological Perspectives*. En Kuddus, M. (Ed.) *Enzymes in food technology: Improvements and innovations* (1a ed, pp. 128-129). Springer.
https://doi.org/10.1007/978-981-13-1933-4_7
- Claus, H., & Mojsov, K. (2018). *Enzymes for Wine Fermentation: Current and Perspective Applications*. *Fermentation*, 4(3), 52.
<https://doi.org/10.3390/fermentation4030052>
- Corral, M., Otero, P., Echave, J., Garcia-Oliveira, P., Carpena, M., Jarboui, A., Nuñez-Estevez, B., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2021). *By-products of agri-food industry as tannin-rich sources: A review of tannins' biological activities and their potential for valorization*. *Foods* (Basel, Switzerland), 10(1), pp. 137.
<https://doi.org/10.3390/foods10010137>
- Covarrubias, J., & Thach, L. (2015). *Wines of Baja Mexico: A qualitative study examining viticulture, enology, and marketing practices*. *Wine Economics and Policy*, 4(2), pp. 112. <https://doi.org/10.1016/j.wep.2015.11.001>
- Cox, J. (2015). *From vines to wines, 5th edition: The complete guide to growing grapes and making your own wine* (5th ed.) pp. 36 Storey Publishing.
- Cruz-Hernández, M., Augur, C., Rodríguez, R., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. (2006). *Evaluation of Culture Conditions for Tannase Production by Aspergillus niger GH1*. *Food Technology & Biotechnology*, 44(4), pp. 542.
- Cytiva *Sephadex G-100*. (n.d.). Recuperado el 17 de enero del 2023, de:
<https://www.cytivalifesciences.com/en/us/shop/chromatography/resins/size-exclusion/sephadex-g-100-p-05625>

- da Costa, A. M., Kadowaki, M. K., Minozzo, M. C., de Souza, C. G. M., Boer, C. G., Bracht, A., & Peralta, R. M. (2012). *Production, purification and characterization of tannase from Aspergillus tamaraii*. African Journal of Biotechnology, 11(2), 392. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1752>
- Deng, Q., Penner, M. H., & Zhao, Y. (2011). *Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins*. Food Research International (Ottawa, Ont.), 44(9), pp. 2712–2720. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.026>
- Dhiman, S., & Mukherjee, G. (2022). *A comparative analysis for selection of appropriate tannase assay method*. Materials Today: Proceedings, 48, pp. 1536. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.09.440>
- España Exportación e inversiones. (2021, junio). *El mercado del vino en México*. Oficina Económica y Comercial de la Embajada de España en México.
- Espejo, F. (2021). *Role of commercial enzymes in wine production: a critical review of recent research*. Journal of Food Science and Technology, 58(1), 9–21. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04489-0>
- Franco-Bañuelos, A., Contreras-Martínez, C. S., Carranza-Téllez, J., y Carranza-Concha, J. (2017). *Total phenolic content and antioxidant capacity of non-native wine grapes grown in Zacatecas, Mexico*. Agrociencia, 51(6), pp. 661-671. Recuperado en 10 de octubre de 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952017000600661&lng=es&tlng=en
- Gautam, A. K., Sharma, S., Avasthi, S., & Bhadauria, R. (2011). *Diversity, pathogenicity and toxicology of A. niger: an important spoilage fungi*. Research Journal of Microbiology, 6(3), pp. 271. <https://doi.org/10.3923/jm.2011.270.280>

- George, D. S., & Ong, C.-B. (2013). *Improvement of tannase production under submerged fermentation by Aspergillus niger FBT1 isolated from a mangrove forest*. *BioTechnologia*, 4, pp. 452. <https://doi.org/10.5114/bta.2013.46415>
- Hagel, L., & Haneskog, L. (2010). *Size-exclusion Chromatography*. In eLS. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0002676.pub2>
- Ioannou, L., Puma, G. L., y Fatta-Kassinos, D. (2015). *Treatment of winery wastewater by physicochemical, biological and advanced processes: A review*. *Journal of Hazardous Materials*, 286, pp. 343–368. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.12.043>
- Ismail, B., & Nielsen, S. S. (2010). *Basic principles of chromatography*. *Food analysis*, 27, 485-488. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1478-1_27
- Jin, Q., O’Hair, J., Stewart, A. C., O’Keefe, S. F., Neilson, A. P., Kim, Y.-T., McGuire, M., Lee, A., Wilder, G., & Huang, H. (2019). *Compositional characterization of different industrial white and red grape pomaces in Virginia and the potential valorization of the major components*. *Foods (Basel, Switzerland)*, 8(12), pp. 667. <https://doi.org/10.3390/foods8120667>
- Keller, M. (2015). *Botany and Anatomy*. En *The Science of Grapevines*. Elsevier (2nda ed.) pp. 24. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-419987-3.00001-7>
- Košmerl, T., Bertalanič, L., Maraš, V., Kodžulović, V., Šučur, S., & Abramovič, H. (2013). *Impact of yield on total polyphenols, anthocyanins, reducing sugars and antioxidant potential in white and red wines produced from Montenegrin autochthonous grape varieties*. *Food Science and Technology*, 1(1), pp. 7–15. <https://doi.org/10.13189/fst.2013.010102>
- Kumar, M., Singh, A., Beniwal, V., & Salar, R. K. (2016). *Improved production of tannase by Klebsiella pneumoniae using Indian gooseberry leaves under*

submerged fermentation using Taguchi approach. AMB Express, 6(1), pp. 1-9.
<https://doi.org/10.1186/s13568-016-0217-9>

Kumar, R., Kumar, A., Nagpal, R., Sharma, J., & Kumari, A. (2010). *A novel and sensitive plate assay for screening of tannase-producing bacteria*. Annals of Microbiology, 60(1), pp. 178.

Kumar, S. S., Sreekumar, R., y Sabu, A. (2019). *Tannase and its applications in food processing*. En Parameswaran, B., Varjani, S., & Raveendran, S. (Eds.). Green bio-processes: Enzymes in industrial food processing (1a ed.) (pp. 357–381). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3263-0_19

Lal, D., & Gardner, J. J. (2012). *Production, characterization and purification of tannase from Aspergillus niger*. European Journal of Experimental Biology, 2(5), 1430-1438.

Lekha, P. K., & Lonsane, B. K. (1994). *Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by Aspergillus niger PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations*. Process Biochemistry (Barking, London, England), 29(6), 497–503. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)85019-4](https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)85019-4)

Li, C., Zhou, J., Du, G., Chen, J., Takahashi, S., & Liu, S. (2020). *Developing Aspergillus niger as a cell factory for food enzyme production*. Biotechnology Advances, 44(107630), 107630.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107630>

Jhonson, H. (2005). Historia del Vino. Blume.

John. (2017, Septiembre 12). *Wine lees explained* [Imagen de tabla 1]. WineTastingBliss.Com. <https://winetastingbliss.com/2017/09/wine-lees-explained/>

Larousse. (2009). *El Pequeño Larousse de los Vinos* (1.^a ed.). Ediciones Larousse.

- Laufer, B., (1940). *Sino-Iranica: Chinese contributions to the history of civilization in ancient Iran, with special reference to the history of cultivated plants and products*. J.R. Asiat. Soc. 52(4), 653–655.
- Lekshmi, R., Arif Nisha, S., Kaleeswaran, B., y Alfarhan, A. H. (2020). *Pomegranate peel is a low-cost substrate for the production of tannase by Bacillus velezensis TA3 under solid state fermentation*. Journal of King Saud University. Science, 32(3), pp. 1831–1837. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.01.022>
- Li, C., Zhou, J., Du, G., Chen, J., Takahashi, S., & Liu, S. (2020). *Developing Aspergillus niger as a cell factory for food enzyme production*. Biotechnology Advances, 44(107630), 107630. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107630>
- Lima, M. A., de Oliveira, M. da C., Pimenta, A., & Uchôa, P. (2019). *Aspergillus niger: A hundred years of contribution to the natural products chemistry*. Journal of the Brazilian Chemical Society. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190080>
- Lucio, O., Pardo, I., Heras, J. M., Krieger-Weber, S., y Ferrer, S. (2017). *Use of starter cultures of Lactobacillus to induce malolactic fermentation in wine*. Australian Journal of grape and wine research, 23(1) pp. 15. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12261>
- Maamoun, M. A. I. (2022). *An insight into the brilliant benefits of grape waste*. En Ramadan, M. F., y Farag, M. A. (Eds.). Mediterranean Fruits Bio-wastes. Springer International Publishing. pp. 433–465 https://doi.org/10.1007/978-3-030-84436-3_18
- Masoodi, K. Z., Lone, S. M., & Rasool, R. S. (2021). *Gel-filtration or size-exclusion chromatography*. In Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology pp. 147–149. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824449-4.00026-8>

MacNeil, K., (2015). *The Wine Bible*, 1. Workman Publishing, New York.

Mahmoud, A. E., Fathy, S. A., Rashad, M. M., Ezz, M. K., y Mohammed, A. T. (2018). *Purification and characterization of a novel tannase produced by Kluyveromyces marxianus using olive pomace as solid support, and its promising role in gallic acid production*. International Journal of Biological Macromolecules, 107, pp.2342–2350. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.117>

Maicas, S., y Mateo, J. J. (2020). *Sustainability of Wine Production*. Sustainability, 12(2), 559. <https://doi.org/10.3390/su12020559>

Mansor, A., Ramli, M. S., Abdul Rashid, N. Y., Samat, N., Lani, M. N., Sharifudin, S. A., y Raseetha, S. (2019). *Evaluation of selected agri-industrial residues as potential substrates for enhanced tannase production via solid-state fermentation*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 20(101216), párr. 21, 22 <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101216>

Martínez-Téllez, M. Á., de la Rocha, R. V., Sañudo-Barajas, A. J., y Quintana-Obregón, E. A. (2021). *Characterization of Cabernet, Grenache, and Syrah grape marc powders produced in Northwestern Mexico*. Emirates Journal of Food and Agriculture. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2021.v33.i10.2767>

Mateo, C., Fernandez-Lorente, G., Rocha-Martin, J., Bolivar, J. M., & Guisan, J. M. (2013). *Oriented covalent immobilization of enzymes on heterofunctional-glyoxyl supports*. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 1051, pp. 76-78. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_6

Meini, M.-R., Ricardi, L. L., & Romanini, D. (2020). *Novel routes for valorization of grape pomace through the production of bioactives by Aspergillus niger*. Waste and Biomass Valorization, 11(11), 6047–6055. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00844-1>

- Mills, D.A., Phister, T., Neeley, E., Johannsen, E. (2008). *Wine Fermentation*. En: Cocolin, L., Ercolini, D. (eds) *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*. Food Microbiology and Food Safety. Springer, New York, NY, pp. 160-165. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74520-6_6
- Mojsov, K., Andronikov, D., Janevski, A., Jordeva, S., & Zhezhova, S. (2015). Enzymes and wine—the enhanced quality and yield. *Advanced technologies*, 4(1), 96-98.
- Moreno, A. D., Ballesteros, M., y Negro, M. J. (2020). *Biorefineries for the valorization of food processing waste*. In *The Interaction of Food Industry and Environment* (pp. 155–190). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816449-5.00005-9>
- Moreno, J. y Peinado, R. (2012). *Composition of Grape Must*. En *Enological chemistry* (pp. 14, 22). Elsevier Inc.
- Muñoz-Bernal, Ó. A., de la Rosa, L. A., Rodrigo-García, J., Martínez-Ruiz, N. R., Sáyago-Ayerdi, S., Rodríguez, L., Fuentes, E., & Alvarez-Parrilla, E. (2021). *Phytochemical characterization and antiplatelet activity of Mexican red wines and their by-products*. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 42(1). <https://doi.org/10.21548/42-1-4450>
- Nanni, A., Parisi, M., y Colonna, M. (2021). *Wine By-Products as Raw Materials for the Production of Biopolymers and of Natural Reinforcing Fillers: A Critical Review*. *Polymers*, 13(3), pp. 381. <https://doi.org/10.3390/polym13030381>
- Noble, J. E., & Bailey, M. J. (2009). Chapter 8 *Quantitation of protein*. *Methods in enzymology*, 463, 73–95. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(09\)63008-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(09)63008-1)
- Olaleye, O. N., Omotayo, M. A., Oni, R. M., & Orisadare, T. J. (2022). *Purification and Partial Characterization of Tannase produced by Aspergillus niger SCSGAF0145 using Arachis hypogaea (Groundnut) Shell*. *European Journal of*

Organización Internacional de la viña y el vino. *El sector vitivinícola mexicano, con grandes ambiciones de cara al futuro*. (2017). oiv.int. Recuperado el 28 de marzo de 2022, de <https://www.oiv.int/es/actualidad-de-la-oiv/el-sector-vitivinicola-mexicano-con-grandes-ambiciones-de-cara-al-futuro>

Padrón, M., Yuef, H., Delgado, S. H., Reyes Méndez, C. A., & Carrillo, G. V. (2013). *The Genus Aspergillus and their Mycotoxins in Maize in Mexico: Problems and Perspectives*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(2) pp. 128.

Papadaki, E., Kontogiannopoulos, K. N., Assimopoulou, A. N., y Mantzouridou, F. T. (2020). *Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using Aspergillus niger in an integrated citric acid-enzymes production process*. *Bioresource Technology*, 309(123317), 123317. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123317>

Ramírez-Coronel, M. A., Viniegra-González, G., Darvill, A., & Augur, C. (2003). *A novel tannase from Aspergillus niger with beta-glucosidase activity*. *Microbiology (Reading, England)*, 149 (Pt 10), 2943–2945. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26346-0>

Ren, B., Wu, M., Wang, Q., Peng, X., Wen, H., McKinstry, W. J., & Chen, Q. (2013). *Crystal structure of tannase from Lactobacillus plantarum*. *Journal of Molecular Biology*, 425(15), pp.2737–2751. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.04.032>

Renovato, J., Gutiérrez-Sánchez, G., Rodríguez-Durán, L. V., Bergman, C., Rodríguez, R., & Aguilar, C. N. (2011). *Differential properties of Aspergillus niger tannase produced under solid-state and submerged fermentations*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(1), 382–395. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9258-3>

- Reynolds, A. G. (2021). *Managing Wine Quality*: Volume 2: Oenology and Wine Quality (Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition) (English Edition) (2.^a ed., Vol. 2). Woodhead Publishing.
- Ristinmaa, A. S., Coleman, T., Cesar, L., Weinmann, A. L., Mazurkewich, S., Brändén, G., Hasani, M., y Larsbrink, J. [Imagen. 9] (2022). *Structural diversity and substrate preferences of three tannase enzymes encoded by the anaerobic bacterium Clostridium butyricum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 298(4), pág. 2 <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101758>
- Saeed, S., Bibi, I., Mehmood, T., Naseer, R., y Bilal, M. (2020). *Valorization of locally available waste plant leaves for production of tannase and gallic acid by solid-state fermentation*. *Biomass Conversion and Biorefinery*, párr. 20 <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00989-3>
- Sabater, V. (2022, enero) [Imagen de tabla 1]. *8 beneficios curativos de las semillas de uva*. Mejorconsalud.as. <https://mejorconsalud.as.com/8-beneficios-curativos-de-las-semillas-de-uva/>
- SAGARPA. (2017). *Planeación agrícola nacional 2017-2030, uva mexicana*. Gob.Mx. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257085/Potencial-Uva.pdf>
- SAGARPA-SIAP. (2018). *Atlas agroalimentario*. Gob.Mx. https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018
- Sharma, K. P. (2019). *Tannin degradation by phytopathogen's tannase: A Plant's defense perspective*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21(101342), (párr. 2) <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101342>
- Sharma, S., Bhat, T. K., & Dawra, R. K. (2000). *A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine*. *Analytical Biochemistry*, 279(1), pp. 85–89. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4405>

Sousa, E. C., Uchôa-Thomaz, A. M. A., Carioca, J. O. B., Morais, S. M. D., Lima, A. D., Martins, C. G., ... y Rodrigues, L. L. (2014). *Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (Vitis vinifera L.), Benitaka variety, grown in the semiarid region of Northeast Brazil*. Food Science and Technology, 34(1), 135-142. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612014000100020>

Techpress, S.L. *Diversificación del aprovechamiento de los orujos de la uva* [Imagen de tabla 1]. (2016, enero 19). Techpress, T. L. <https://techpress.es/noticias/57431>

Vandenberghe, L., Rodrigues, C., de Carvalho, J., Medeiros, A., y Soccol, C. (2017). *Production and Application of Citric Acid*. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, 559–560. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63662-1.00025-7>

Varadharajan, V., Vadivel, S. S., Ramaswamy, A., Sundharamurthy, V., y Chandrasekar, P. (2017). *Modeling and verification of process parameters for the production of tannase by Aspergillus oryzae under submerged fermentation using agro-wastes: Optimization of Tannase Production*. Biotechnology and Applied Biochemistry, 64(1), 100–109. <https://doi.org/10.1002/bab.1451>

Valenzuela, S. C., Ruiz, C. J. A., Ramírez, O. G., y Hernández, M. R., (2014). *Effects of climate change on the wine production potential of Baja California, Mexico*. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 5(spe10), 2047-2059. Recuperado en 21 de octubre de 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342014001402047&lng=es&tlng=en.

Voedisch, B., & Thie, H. (2010). *Size Exclusion Chromatography*. In Antibody Engineering (pp. 607–612). Springer Berlin Heidelberg.

- Wan, Q.-H. (2021). *Separation Modes*. In *Mixed-Mode Chromatography* pp. 71–120. Springer Singapore https://doi.org/10.1007/978-981-16-5485-5_3
- Wineleather: *cuero vegetal hecho con desechos del proceso de producción del vino* [Imagen de tabla 1]. (2019, mayo 8). EcoInventos. <https://ecoinventos.com/wineleather-cuero-vegetal-vino/>
- Wu, C., Zhang, F., Li, L., Jiang, Z., Ni, H., & Xiao, A. (2018). *Novel optimization strategy for tannase production through a modified solid-state fermentation system*. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1). pp. 2,10,11 <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1093-0>
- Wu, J., y Cesaretti, S. (2019). *Characteristics of Business Models, Business Diversification and Price Segmentation Strategies of Wineries in the Wine Route of Baja California, Mexico*. *International Journal of Business Administration*, 10(2), pp. 147–157. <https://doi.org/10.5430/ijba.v10n2p147>
- Yang, H., Cai, G., Lu, J., & Gómez Plaza, E. (2021). The production and application of enzymes related to the quality of fruit wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(10), 1605–1615. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1763251>
- Yu, R., Liu, J., Wang, Y., Wang, H., & Zhang, H. (2021). *Aspergillus niger as a Secondary Metabolite Factory*. *Frontiers in Chemistry*, 9, 701022. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.701022>
- Zhang, N., Hoadley, A., Patel, J., Lim, S., & Li, C. (2017). *Sustainable options for the utilization of solid residues from wine production*. *Waste Management (New York, N.Y.)*, 60, pp. 174–175. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.01.006>
- Zoecklein, B. W., & Gump, B. H. (2022). *Practical methods of evaluating grape quality and quality potential*. In *Managing Wine Quality* Elsevier. pp. 136. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102067-8.00003-8>