

## Obtención de ácido gálico a partir de *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) “tara” producto de la fermentación en estado sólido

### Obtaining gallic acid from *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) “tara” product of solid state fermentation



**José Antonio Saldaña Jiménez**

Departamento Académico de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, PERÚ

jsaldana@unitru.edu.pe

<https://orcid.org/0000-0001-6111-0869>

**Jaime Enrique Agreda Gaitán**

Departamento Académico de Microbiología y Parasitología, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, PERÚ

jagreda@unitru.edu.pe

<https://orcid.org/0000-0003-2005-085X>

Recibido: 12-XII-2023; aceptado: 10-I-2024; publicado online: 30-IV-2024

## Resumen

Esta investigación se realizó con el fin de obtener ácido gálico por la acción de las enzimas hidrolíticas de *Aspergillus niger* que degradan los taninos presentes en *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) “tara”, utilizando un biorreactor de estado sólido. Las fermentaciones se realizaron durante 2, 4 y 6 días a temperatura ambiente, con un pH inicial de 7,0 y un inóculo microbiano de 10<sup>9</sup> esporas/ml. La máxima producción se obtuvo 4 días después del proceso de fermentación con una pureza de 28,71% de ácido gálico, según las lecturas proporcionadas por el espectrofotómetro UV-Vis con lector de microplacas. Según el análisis estadístico, los diferentes tiempos de exposición presentan diferencias significativas. Se determinó que existe una relación directa entre el tiempo de fermentación y la absorbancia.

**Palabras clave:** Acido gálico, *Aspergillus niger*, *Caesalpinia spinosa*, biorreactor, estado sólido

## Abstract

This research was carried out in order to obtain gallic acid by the action of the hydrolytic enzymes of *Aspergillus niger* that degrade the tannins presents in *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) “tara”, using a solid state bioreactor. The fermentations were carried out for 2, 4 and 6 days at room temperature, with an initial pH of 7.0 and a microbial inoculum of 10<sup>9</sup> spores/ml. The maximum production was obtained 4 days after the fermentation process with a purity of 28.71% gallic acid, according to the readings provided by the UV-Vis spectrophotometer with microplate reader. According to the statistical analysis, the different exposure times present significant differences. It was determined that there is a direct relationship between fermentation time and absorbance.

**Keywords:** Gallic acid, *Aspergillus niger*, *Caesalpinia spinosa*, bioreactor, solid state

**Citación:** Blas, W.; W. Blas; G. Zavaleta; H. Robles; J. Saldaña & J. Ágreda. 2024. Obtención de ácido gálico a partir de *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) “tara” producto de la fermentación en estado sólido. *Arnaldoa* 31 (1): 139-150 doi:<http://doi.org/10.22497/arnaldoa.311.31107>

## Introducción

*Caesalpinia spinosa* “tara” es un vegetal perteneciente a la familia Fabaceae, proviene del Perú, cuya vaina contiene la mayor concentración de taninos utilizados en la industria (Chambi *et al.*, 2013), principalmente en la fabricación de plásticos y adhesivos, galvanizados, vinos, clarificación, sustituto de la malta en la producción de cerveza, en la industria farmacéutica por su amplio uso terapéutico, en curtiduría por su capacidad de cambiar la estructura dérmica del cuero (Ballesteros *et al.*, 2021; Lasso *et al.*, 2020; Terán *et al.*, 2018). Otro elemento que se obtiene de los taninos de *C. spinosa*, es el ácido gálico (3,4,5-trihidroxibenzoico) un polifenol que pertenece a los taninos hidrolizables, los cuales tienen propiedades antimicrobianas y anticancerígenas debido a su gran capacidad antioxidante que permiten atrapar fácilmente radicales libres (Wang *et al.*, 2018).

El ácido gálico se produce por hidrólisis ácida a partir del ácido tánico, pero los problemas de costos relacionados con su bajo rendimiento y pureza deben llevar a nuevas opciones, como la utilización de tanasas de un microorganismo (Terán *et al.*, 2018). Las hidrolasas del ácido tánico, comúnmente conocidas como tanasas, son una de las enzimas hidrolíticas microbianas más importantes, que fue descubierta accidentalmente por Van Teighem (1987) quien llegó a demostrar la formación de ácido gálico durante la fermentación de taninos por *Aspergillus niger* (Prigione *et al.*, 2018; Dhiman & Mukherjee, 2020).

De hecho, se desarrollaron muchos sistemas de fermentación para la producción de enzimas por parte de hongos; entre ellas se pueden mencionar: fermentación líquida superficial, fermentación sumergida

y fermentación en estado sólido. La fermentación en estado sólido (FES) consiste en hacer crecer un microorganismo sobre el sustrato, utilizando una fuente de nitrógeno y nutrientes minerales bajo ciertas condiciones como humedad, pH, aireación y temperatura. FES no presenta agua libre en su estructura, pero llega requerimiento de humedad (Gmoser *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019).

En los últimos años, los procesos de fermentación sobre sustrato sólido han recibido gran atención por parte del mundo científico; como resultado, se realizaron muchas investigaciones para su aplicación en la obtención de enzimas, ácidos orgánicos colorantes y otras sustancias de interés en las industrias alimentarias (Wang *et al.*, 2019). Este proceso tiene la capacidad de mostrar un alto rendimiento en la transformación de sustrato en producto con menor inversión, comparando su costo de producción con la tradicional fermentación sumergida. Además, esta es una alternativa para el aprovechamiento de materiales de desecho provenientes de la agroindustria (Sandhu & Punia, 2017; Lasso *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020; Melnichuk *et al.*, 2020).

Los FES utilizan sustratos naturales que sirven como fuente de nutrientes y soporte físico para los microorganismos; el bajo contenido de humedad no permite que se desarrolle un grupo de microorganismos, especialmente levaduras y hongos. La FES implica que específicamente se pueden cultivar hongos filamentosos, porque tienen ciertas características que los hacen más adecuados para su crecimiento, especialmente *A. niger* (Arora *et al.*, 2018; Khanahmadi *et al.*, 2018). *A. niger* se caracteriza por su rápido desarrollo y por excretar una gran cantidad de enzimas en un ambiente de fermentación sólido, además

crece en forma de micelio permitiendo la separación y extracción del producto. En la mayoría de los casos, los productos son ácidos orgánicos que se utilizan como aditivos alimentarios con función de conservación (Li *et al.*, 2020).

Muchas investigaciones, muestran que la producción de ácidos orgánicos por biosíntesis depende de la forma microbiana y, también, de las condiciones de operación del proceso. Parecía, que el nivel de oxígeno en la fermentación es un parámetro clave de producción para la FES. Se realizaron investigaciones sobre la influencia de la aireación forzada en este sistema y, se concluyó que la producción de ácido orgánico a partir de *A. niger*, se ve favorecida por la limitada producción de biomasa que ocurre cuando se aplican bajas velocidades de aireación y, como consecuencia, baja disponibilidad de oxígeno (Lopes *et al.*, 2019).

Los procesos de FES pueden ser realizados por muchos tipos de biorreactores que presentan determinadas características para determinados objetivos y cuyo diseño depende del tipo de proceso. El diseño de un biorreactor para la FES presenta ciertos problemas, como la resistencia a transferir la cantidad de movimiento, la apariencia del gradiente térmico y la concentración de gas en la capa media. De lo contrario, en este proceso es difícil comparar parámetros de pH, temperatura, biomasa, humedad, para ir más allá de las dificultades se han utilizado sistemas de aireación (Arora *et al.*, 2018; Khanahmadi *et al.*, 2018).

Se han reportado algunos trabajos de investigación relacionados, como el trabajo de Lopes *et al.* (2019) quienes hicieron los estudios en FES como alternativa biotecnológica para la producción de

alimentos no convencionales. Sandhu & Punia (2017) realizaron estudios sobre fermentación en estado sólido utilizando los subproductos de la agroindustria utilizando *A. niger* sobre el sustrato sólido. Marzo *et al.* (2019) analizaron el metabolismo de *A. niger* en un sustrato sólido utilizando diferentes fuentes de carbono. Teles *et al.* (2019) aislaron y optimizaron la producción de tanasas de *A. niger*. Wu *et al.* (2018) trabajaron en la producción de xilanasas a partir de tocón de *A. niger* en medio sólido, utilizando como sustrato "avena" y salvado de "trigo". Carboué *et al.* (2018) propusieron un método para la producción de ácido gálico utilizando ácido tánico para *A. fischeri*. Lopes *et al.* (2019) trabajaron en la producción de tanasas para *A. niger* HA37. Lasso *et al.* (2020) obtuvieron ácido gálico de *A. niger* en un medio sumergido.

La cuantificación de taninos en productos naturales se realiza mediante análisis volumétrico, colorimétrico, HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución) y por el método de luz ultravioleta visible. El último método nos permite cuantificar los taninos, y sustenta la confiabilidad de los resultados (Gallego *et al.*, 2017).

Teniendo en cuenta la importancia comercial del ácido gálico, el uso de *C. spinosa* como tanino de recurso, la capacidad de *A. niger* en la producción de tanasas y el reconocimiento del biorreactor para la FES, esta investigación tiene como objetivo obtener ácido gálico por *A. niger* a partir de *C. spinosa* (Fabaceae) "tara" utilizando un biorreactor en estado sólido; y evaluar la producción de ácido gálico con el tiempo de exposición en el biorreactor para fermentación en estado sólido y establecer la reacción entre el tiempo de fermentación y la absorbancia.

## Material y métodos

### Objeto de estudio

*Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) “tara”, fue recolectada del Jardín Botánico de la Universidad Nacional de Trujillo; El cultivo puro de *Aspergillus niger* estuvo fue proporcionado por el Laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo.

### Obtención del sustrato a partir de *Caesalpinia spinosa* “tara”

Se obtuvieron 6 Kg de vainas secas de “tara” sin contaminantes. Luego se quitaron las semillas. Las vainas de cáscara se colocaron en un horno a 40°C de temperatura durante 36 horas con el fin de eliminar de manera eficiente la humedad (Cholán *et al.*, 2019).

La muestra seca se molió utilizando un mortero hasta obtener un polvo homogenizado, el cual fue tamizado y esterilizado; se tomaron 500 g por cada uno de los biorreactores (Ballesteros *et al.*, 2021).

### Reactivación de la cepa de *Aspergillus niger*

La reactivación de la cepa de *A. niger*, se llevó a cabo haciéndola crecer hasta la esporulación, en un tubo de ensayo con medio de cultivo sólido agar Sabouraud, luego se colocó a temperatura ambiente durante cinco días hasta su crecimiento. Se conservó a 4 °C de temperatura, obteniéndose la cepa viable (Arshad *et al.*, 2019). Las esporas de *A. niger*, fueron separadas de la superficie de las colonias contenidas en dos placas de Petri utilizando 30 ml de agua destilada estéril, y luego se trasladó a un vaso aforando hasta 600 ml con el mismo solvente, finalmente se agregó

una solución de Tween 0,1% (v/v), hasta obtener la suspensión (Chávez *et al.*, 2018).

### Construcción de biorreactores de Fermentación en Estado Sólido (FES)

Para la construcción de los biorreactores se utilizaron 9 botellas de plástico transparente de 3 litros y en ellas se colocaron 500 g de sustrato producto de la molienda de las vainas secas de “tara”, más 200 ml de inóculo de esporas de *A. niger* y 200 ml de agua destilada estéril mezclando hasta obtener una mezcla homogénea. Los biorreactores fueron acondicionados con un sistema de aireación húmeda utilizando bombas a 0.5 vvm. Los biorreactores se colocaron a temperatura ambiente y se cerraron herméticamente dejando un orificio para la salida de CO<sub>2</sub> (Chávez *et al.*, 2018; Arshad *et al.*, 2019). Los datos de temperatura y pH se tomaron durante todo el proceso.

### Producción de ácido gálico

Luego de 2, 4 y 6 días, el fermento en estado sólido se retiró del biorreactor, para obtener ácido gálico. Se agregaron 500 ml de agua destilada estéril para disolver los grumos formados durante el proceso, la misma que se realizó por trituración en una fuente plástica y luego por comprensión manual, utilizando tela de tocuyo previamente humedecida. En un vaso de precipitado se recibió el extracto y luego se puso en frascos de vidrio para su posterior centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos. El extracto se mantuvo en refrigeración a 4 °C hasta su cuantificación, la cual se realizó en el Laboratorio Multifuncional de Farmacia y Facultad de Bioquímica, utilizando el espectrofotómetro UV-Vis con lector de microplacas, marca Fisher Scientific (Saeed *et al.*, 2020, 2021).

## Cuantificación del ácido gálico

Para la cuantificación de la producción de ácido gálico (mg/ml), se aplicó el método de Folin-Ciocalteu mediante espectrofotómetro UV-Vis por triplicado, utilizando 1 ml de la muestra de cada biorreactor según el tiempo establecido (Gallego *et al.*, 2017).

## Diseño experimental

Este estudio se ajusta a un diseño experimental completamente al azar (DECA), donde los tratamientos son los diferentes tiempos de fermentación (2, 4, y 6 días) para la producción de ácido gálico. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones y cada repetición estuvo constituida por tres biorreactores de FES. Asimismo, se representaron las unidades experimentales para los valores promedio de la producción de Ácido Gálico en cada repetición por tratamiento (Arshad *et al.*, 2019).

## Análisis estadístico

Los datos obtenidos en la producción de ácido gálico por *A. niger*, se organizaron en tablas y se aplicaron métodos estadísticos de Análisis de Varianza y la Prueba de Comparación de Promedios Múltiples descrito por Duncan, con probabilidad de error de 0,05 (5%), según Saeed (2021). Los métodos estadísticos fueron procesados en el Programa Stratigraphic Plus, Versión 5.1.

## Resultados y discusión

La validación de un método, es un proceso que se obtiene mediante estudios de laboratorio cuya capacidad se expresa en términos de parámetro de análisis, donde se debe tener en cuenta la linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad, especificación y sensibilidad, según el objetivo que se persigue. Actualmente, la validación de métodos permite una mayor confiabilidad de los resultados experimentales, especialmente cuando se trabaja con productos naturales (Gallego *et al.*, 2017).

La espectrofotometría se ha convertido en una ayuda muy importante para determinar la concentración de algunas sustancias cuyo análisis se puede aplicar de acuerdo con la Ley de Lambert-Beer. Esta ley establece una proporcionalidad directa entre la absorbancia y la concentración de un metabolito secundario, cuya lectura debe estar dentro de un rango. de 0,02 y 0,08 (Arshad *et al.*, 2019). Valores que coinciden con los resultados hallados, cuyas absorbancias se encontraron entre 0,275 y 0,779 (Tabla 1).

**Tabla 1.** Absorbancias promedio (700 nm) del extracto fermentativo de *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) obtenida por *Aspergillus niger* utilizando un biorreactor en estado sólido a diferentes tiempos de exposición.

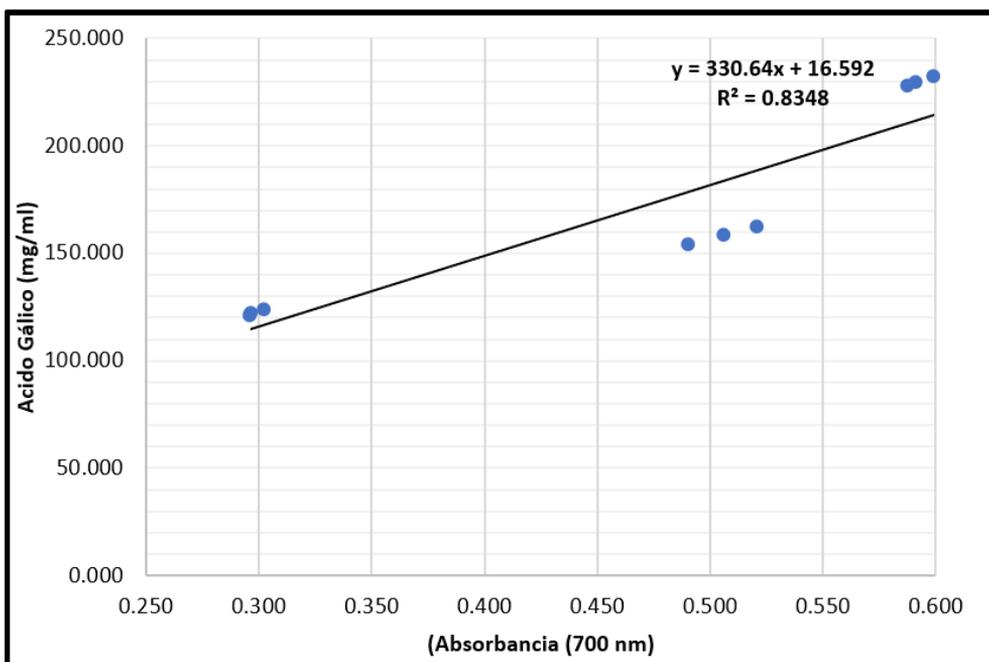
Tiempo de exposición (días)	Promedio absorbancia
I-2	0.408
II-2	0.895
III-2	0.284
I-4	0.773
II-4	0.592
III-4	0.482
I-6	0.392
II-6	0.505
III-6	0.302

I, II, III: Número de repeticiones

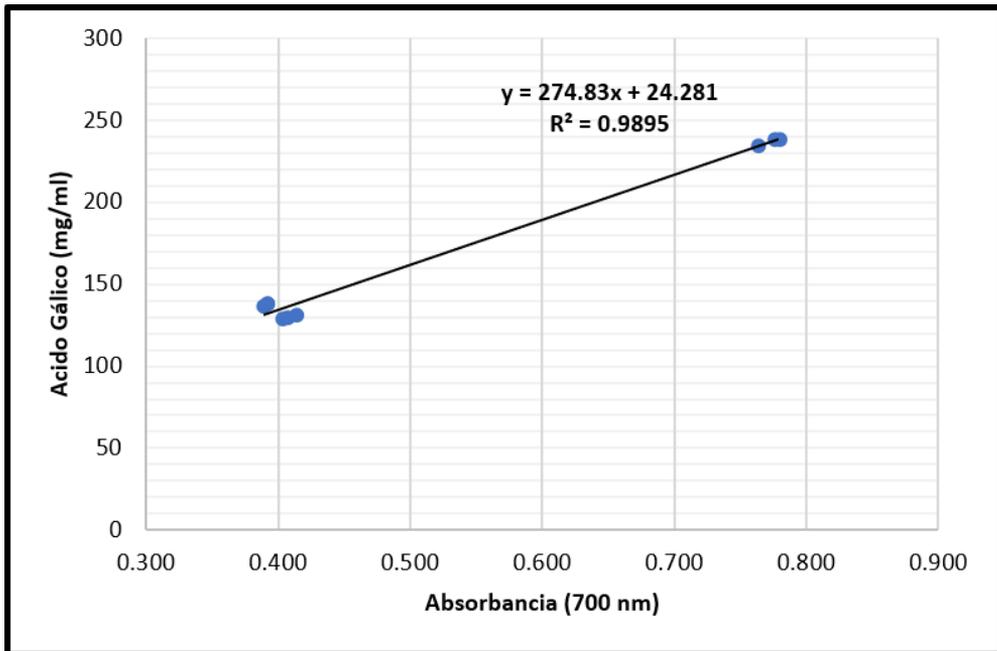
**Tabla 2.** Concentración promedio del ácido gálico (mg/ml) y coeficiente de variación del extracto fermentativo de *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) obtenida por *Aspergillus niger* utilizando un biorreactor en estado sólido a diferentes tiempos de exposición.

Tiempo de exposición (días)	Promedio mgEAG/ml	CV%
I-2	130.17	0.94
II-2	122.62	1.03
III-2	166.84	2.94
I-4	237.08	1.00
II-4	230.06	1.00
III-4	287.14	2.71
I-6	137.89	0.52
II-6	158.67	2.73
III-6	177.96	2.18

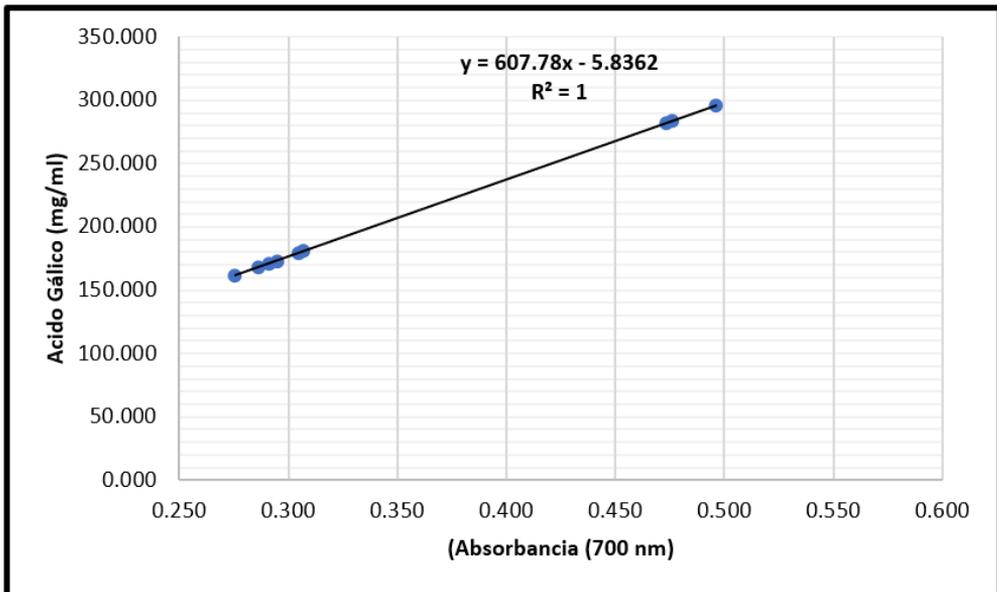
I, II, III: Número de repeticiones



**Figura 1.** Curva de producción del ácido gálico (mg/ml) según las absorbancias (700 nm) obtenida del extracto fermentativo de *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) obtenida por *Aspergillus niger* utilizando un biorreactor en estado sólido a los dos, cuatro y seis días de exposición (Primera repetición).



**Figura 2.** Curva de producción del ácido gálico (mg/ml.) según las absorbancias (700 nm) obtenida del extracto fermentativo de *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) obtenida por *Aspergillus niger* utilizando un biorreactor en estado sólido a los dos, cuatro y seis días de exposición (Segunda repetición).



**Figura 3.** Curva de producción del ácido gálico (mg/ml.) según las absorbancias (700 nm) obtenida del extracto fermentativo de *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) obtenida por *Aspergillus niger* utilizando un biorreactor en estado sólido a los dos, cuatro y seis días de exposición (Tercera repetición).

**Tabla 3.** Porcentaje del ácido gálico producido a partir de la fermentación de *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) obtenida por *Aspergillus niger* utilizando un biorreactor en estado sólido a diferentes tiempos de exposición.

Tiempo de exposición (días)	Porcentaje de ácido gálico (%)
I-2	13.02
II-2	12.26
III-2	16.68
I-4	23.71
II-4	23.01
III-4	28.71
I-6	13.80
II-6	15.87
III-6	17.80

Para establecer el porcentaje de ácido gálico, producto de la fermentación de *C. spinosa* por *A. niger* utilizando un biorreactor en estado sólido a dos, cuatro y seis días de exposición, se utilizó la ecuación de la línea recta en la curva de calibración, alcanzando su valor más alto de 28,75% (tabla 3) de ácido gálico, por debajo de lo señalado por Pérez & Pisconti (2010), quienes lograron obtener un 49,88% de ácido gálico. Es necesario resaltar que los máximos se encontraron a los 4 días de proceso fermentativo, llegando a los mínimos a los 6 días; esto se explica por el comportamiento nutricional de *A. niger*.

*Aspergillus niger* tiene las enzimas para producir ácido gálico a partir del tánico contenido en la "tara"; este proceso se debe a la alimentación propia; es decir, primero se produce ácido gálico y luego lo utiliza. Lo produce en la etapa trofásica, donde las enzimas de producción están en su nivel máximo. Sin embargo, en la etapa idiofásica las enzimas de producción disminuyeron su expresión, predominando las enzimas digestivas hidrolíticas (Gallego *et al.*, 2017; Arshad *et al.*, 2019; Saeed *et al.*, 2020).

Los diferentes resultados en la producción de ácido gálico indicados por sus promedios porcentuales, fueron

confirmados mediante análisis de varianza que es un método estadístico riguroso, incluso sobre T-Student; sin embargo, también es genérico. Por lo tanto, fue necesario aplicar una prueba más específica como la Prueba de Comparación de Promedios de Duncan, para determinar entre que tratamientos existen esas diferencias (Saeed, 2021). Por lo tanto, es necesario señalar que al utilizar el ANOVA de Fisher y el T-Student, esta investigación cumple con el parámetro de precisión que incluye repetibilidad y reproducibilidad (Gallego *et al.*, 2017).

Actualmente no se han reportado investigaciones similares, por lo que no es posible contrastar los resultados de esta investigación con otros autores. En este sentido se ha creído conveniente fundamentar los procesos para indicar la valoración de los mismos.

Se sugiere incrementar el uso de biorreactores de fermentación en estado sólido para su aplicación en la obtención de metabolitos secundarios importantes para la industria y complemento alimenticio, debido a que este proceso tiene la capacidad de proporcionar alto rendimiento de conversión de sustrato a producto con menor costo de inversión. Por otro lado, la fermentación en estado sólido se ha convertido en una alternativa para aprovechar materiales de desecho y subproductos de la agroindustria; además es necesario desarrollar la producción de ácido gálico ya que es una sustancia con propiedades antimicrobianas y capacidad antioxidante que le permite capturar radicales libres evitando enfermedades como el cáncer.

La utilización de *C. spinosa* como fuente de taninos, la capacidad de *A. niger* para producir taninas y el conocimiento de biorreactores de fermentación en estado

sólido para la producción de ácido gálico, se enmarcan en el marco del desarrollo sustentable; para eso es importante comenzar a desarrollar algunas estrategias que nos permitan implementar reglas y políticas para su uso.

### Conclusiones

Se logró obtener ácido gálico por *Aspergillus niger* a partir de *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) "tara" mediante un biorreactor de estado sólido. La producción máxima de ácido gálico se produjo a los 4 días del proceso fermentativo con una pureza del 28,71%. Existe una relación directa entre el tiempo de fermentación y su absorbancia.

### Agradecimientos

.....

### Contribución de autores

W. B. & A. B.: Concepción y diseño del estudio, adquisición de datos, análisis e interpretación de datos, elaboración del borrador del contenido intelectual y aprobación definitiva de la versión a presentar. G. Z.: Adquisición de datos, análisis e interpretación de datos, elaboración del borrador del contenido intelectual y aprobación definitiva de la versión a presentar. H. R. & J. S.: Ejecución, análisis e interpretación estadística de los datos obtenidos. J. A.: Elaboración del borrador del contenido intelectual y aprobación definitiva de la versión a presentar.

### Conflicto de intereses

Declaramos que no tenemos conflicto de intereses.

### Literatura Citada

- Arora, S.; R. Rani & S. Ghosh.** 2018. Bioreactors in solid state fermentation technology: Design, applications and engineering aspects, *Journal of Biotechnology*, (269):16-34.
- Arshad, R.; A. Mohyuddin; S. Saeed & A. Hassan.** 2019. Optimized production of tannase and gallic acid from fruit seeds by solid state fermentation, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 18(5): 911-918.
- Ballesteros-Ramírez, R.; M. Durán & S. Fiorentino.** 2021. Genotoxicity and mutagenicity assessment of a standardized extract (P2Et) obtained from *Caesalpinia spinosa*, *Toxicology Reports*, 8, 258-263.
- Carboué, Q.; M. Claeys-Bruno; I. Bombarda; M. Sergent; J. Jolain & S. Roussos.** 2018. Experimental design and solid state fermentation: A holistic approach to improve cultural medium for the production of fungal secondary metabolites, *Chemo-metrics and Intelligent Laboratory Systems*, (176): 101-107.
- Chambi, F.; R. Chirinos; R. Pedreschi; I. Betalleluz-Pallardel & D. Campos.** 2013. Antioxidant potential of hydrolyzed polyphenolic extracts from tara (*Caesalpinia spinosa*) pods. *Industrial Crops and Products*, (47): 168-175.
- Chávez-González, M.; S. Guyot; R. Rodríguez-Herrera; A. Prado-Barragán & C. Aguilar.** 2018. Exploring the Degradation of Gallotannins Catalyzed by Tannase Produced by *Aspergillus niger* GH1 for Ellagic Acid Production in Submerged and Solid-State Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 185(2), 476-483.
- Cholán, K.; G. Zavaleta; J. Saldaña & W. Blas.** 2019. Efecto del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) sobre el crecimiento de *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*, *Arnaldoa*, 26(2): 699-712.
- Dhiman, S. & G. Mukherjee.** 2020. Prospects of Bacterial Tannase Catalyzed Biotransformation of Agro and Industrial Tannin Waste to High Value Gallic Acid, In Book: Biorefinery Production Technologies for Chemicals and Energy, pp. 129-143.
- Gallego, M.; M. Skowrya & M. Gordon.** 2017. Effect of leaves of *Caesalpinia decapetala* on oxidative stability of Oil-In-Water emulsions, *Antioxidants*, 6(1): 19.
- Gmoser, R.; C. Sintca; M. Tahezardeh & P. Lennarts-**

- son. 2019. Combining submerged and solid state fermentation to convert waste bread into protein and pigment using the edible filamentous fungus *N. intermedia*, *Waste Management*, 97, 63-70.
- Gutiérrez, Y.; M. Miranda; N. Varona & A. Rodríguez.** 2000. Validación de 2 métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en *Psidium guajaba*, L, *Revista Cubana de Farmacia*, 31(1):50-5.
- Khanahmadi, M.; I. Arezi; M. Amiri; A. Motahhareh-Sadat & M. Miranzadeh.** 2018. Bioprocessing of agro-industrial residues for optimization of xylanase production by solid- state fermentation in flask and tray bioreactor. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13(C): 272–282.
- Lasso, P.; A. Gomez-Cadena; C. Urueña; A. Donda; A. Martínez-Usatorre; P. Romero; A. Barreto & S. Fiorentino.** 2020. An Immunomodulatory Gallotanin-Rich Fraction From *Caesalpinia spinosa* Enhances the Therapeutic Effect of Anti-PD-L1 in Melanoma, *Frontiers in Immunology*, (11): 1-13.
- Li C.; J. Zhou; G. Du; J. Chen; S. Takahashi & S. Liu.** 2020. Developing *Aspergillus niger* as a cell factory for food enzyme production. *Biotechnology Advances*, 44, 107630.
- Lopes-Perez, C.; F. Casciatori & J. Thoméo.** 2019. Strategies for scaling-up packed-bed bioreactors for solid-state fermentation: The case of cellulolytic enzymes production by a thermophilic fungus. *Chemical Engineering Journal*, (361): 1142-1151.
- Marzo, C.; A. Díaz; I. Caro & A. Blandino.** 2019. Valorization of agro-industrial wastes to produce hydrolytic enzymes by fungal solid-state fermentation. *Waste Management and Research*, 1-8.
- Melnichuk, N.; M. Braia; P. Anselmi; M. Meini & D. Romanini.** 2020. Valorization of two agroindustrial wastes to produce alpha-amylase enzyme from *Aspergillus oryzae* by solid-state fermentation. *Waste Management*, (106):155-161.
- Pérez, I. & Z. Pisconte.** 2010. Cuantificación espectrofotométrica de taninos en el fruto de *Caesalpinia spinosa* “taya” procedente del distrito del Porvenir-Trujillo. Tesis de bachiller. Universidad Nacional de Trujillo-Perú.
- Prigione, V.; F. Spina; V. Tigin; S. Giovando & G. Varese.** 2018. Biotransformation of industrial tannins by filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(24): 10361-10375.
- Saeed, S.; I. Bibi; T. Mehmood & R. Naseer.** 2020. Valorization of locally available waste plant leaves for production of tannase and gallic acid by solid-state fermentation, *Biomass Conversion and Biorefinery*.
- Saeed, S.; S. Aslam & T. Mehmood.** 2021. Production of Gallic Acid Under Solid-State Fermentation by Utilizing Waste from Food Processing Industries, *Waste and Biomass Valorization*, 12(1): 1-9.
- Sandhu, K. & S. Punia.** 2017. Enhancement of bioactive compounds in barley cultivars by solid substrate fermentation, *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(3), 1355–1361.
- Teles, A.; D. Chávez; R. Oliveira; E. Bon; S. Terzi; E. Souza; L. Gottschalk & R. Tonon.** 2019, Use of grape pomace for the production of hydrolytic enzymes by solid-state fermentation and recovery of its bioactive compounds, *Food Research International*, (120): 441-448.
- Terán-Hilares, R.; R. Chrinos; R. Pedreschi & D. Campos.** 2018. Enhanced antioxidant properties of tara (*Caesalpinia spinosa*) gallotannins by thermal hydrolysis and its synergistic effects with  $\alpha$ -tocopherol, ascorbyl palmitate, and citric acid on sachu inchi (*Plukenetia volubilis*) oil, *Journal of Food Process Engineering*, e12613.
- Wang, F.; L. Xu; L. Zhao; Z. Ding; H. Ma & N. Terry.** 2019. Fungal laccase production from lignocellulosic agricultural wastes by solid-state fermentation: A review, *Microorganisms*, 7(12): 665.
- Wang, Z.; Y. Guillen; S. Hwang; H. Zuo & S. Lim.** 2018. Pistafolin B is the major aldose reductase inhibitor of the pods of tara [*Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze], *Industrial Crops and Products*, 122, 709-715.
- Wu, C.; F. Zhang; L. Li; Z. Jiang; H. Ni & A. Xiao.** 2018. Novel optimization strategy for tannase production through a modified solid-state fermentation system, *Biotechnology for Biofuels*, 11, 92.

## ANEXO

