

# EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE TANASAS, UN RELEVANTE COADYUVANTE ALIMENTARIO

Marcos S. Ortega<sup>(1)</sup>, Fabián F. Nigro<sup>(1)</sup>, Giuliano Degrassi<sup>(2)</sup>, Mariela V. Catone<sup>(1)</sup>.

<sup>(1)</sup>Dto. Bioprocesos-DT Biotecnología-SOAC-GODTel-INTI, <sup>(2)</sup>ICGEB, International Center of Genetic Engineering and Biotechnology, Trieste, Italia  
e-mail: [marcosortega@inti.gob.ar](mailto:marcosortega@inti.gob.ar)

**Palabras claves:** tanasas recombinante, coadyuvante, alimentos, biotecnología

## **INTRODUCCIÓN**

Las enzimas son catalizadores biológicos que aceleran las reacciones químicas con alta eficiencia y especificidad. Estas características son aprovechadas por diversos sectores industriales para la mejora de sus procesos, no solo en rentabilidad sino también en sustentabilidad. Según lo reportado por la *Asociación de Productores y Formuladores de Productos Enzimáticos* (AMPEF, por sus siglas en inglés), la industria alimenticia pasó de 160 enzimas, en los 2000, a 225 en 2015 [2]. Cabe destacar que, el porcentaje de enzimas recombinantes, se incrementó de un 22 a un 43%, mientras que la producción nativa disminuyó porcentualmente. Esto se debe principalmente, a la revolución de la tecnología del ADN recombinante (iniciada en 1980); la cual ha permitido expandir la posibilidad de producir nuevas y mejores enzimas. Esta estrategia consiste en insertar la información genética necesaria para producir una enzima proveniente de un organismo donante, en lo que se denomina un sistema de expresión. En la diversidad de las plataformas para la producción recombinante de enzimas, *Pichia pastoris*, se destaca por la posibilidad de liberar al exterior de la célula la enzima de interés, lo cual facilita y disminuye los costos de purificación y consecuentemente de producción.

Las tanasas, o tanino acil hidrolasas, son un tipo de enzima capaz de hidrolizar taninos, el cuarto componente natural más abundante en el planeta. Esta es una enzima extensamente utilizada como coadyuvante tecnológico en la elaboración de bebidas frutales, vinos, cervezas, café y té frío [1]. A pesar de que varios autores han reportado la caracterización bioquímica y genética de la tanasa, todavía pertenecen al grupo de enzimas que se producen industrialmente, de manera nativa, es decir, sin la asistencia de la ingeniería genética [1, 3]. Este proyecto, surge mediante el interés de cultivadores de té de Misiones, en

desarrollar un producto nuevo para nuestro mercado, el té helado o ready to drink tea.

## **OBJETIVOS**

Aislamiento y selección de microorganismos como potenciales donantes para la producción recombinante de tanasas utilizando *Pichia pastoris* como sistema de expresión.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Aislamiento y selección:** Para el aislamiento y selección de potenciales microorganismos productores naturales de tanasas, se trabajó con 4 muestras naturales (bagazo, lúpulo, compost casero y tierra de monte virgen). Luego, se procedió mediante prácticas microbiológicas de enriquecimiento de las muestras, diluciones seriadas y siembra en medio sólido. Posteriormente, los respectivos aislamientos fueron evaluados para su producción de tanasas en medio sólido con ácido tánico, sustrato de la tanasa, como fuente de carbono. La identificación positiva se estableció por la formación de un halo transparente alrededor de la colonia.

**Cuantificación de la actividad enzimática:** Se tomaron 52 µl de las muestras, se añadieron 8 µl de una solución de ácido tánico 2,5 mM, y se incubaron por 5 min a 30 °C. Luego, se añadió 60 µl de una solución metanólica de rodanina 0,67%, y se incubó 5 min a 30°. Finalmente, se adicionó 80 µl de KOH 0,5 M, y se incubó por 10 min a 30 °C, posterior se midió la absorbancia a 520 nm.

**Identificación molecular:** Para el caso de hongos filamentosos, se utilizó la secuenciación del fragmento ITS (espaciador transcrito interno), ubicado entre los genes 18S rRNA, mientras que, para bacterias, el gen 16S rRNA, y posterior búsqueda de homología en base de datos.

**Obtención de la secuencia codificante de la tanasa:** Se realizó un programa de PCR en gradiente de temperatura con cebadores específicos para amplificar la secuencia

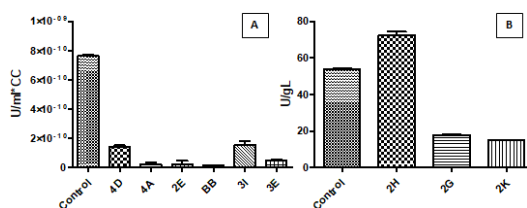
codificante de la tanasa, utilizando como molde material genético genómico, previamente extraído mediante kit comercial.

## RESULTADOS

**Identificación y selección de aislamientos:** Se aislaron 95 microorganismos, de los cuales, 6 bacterias y 4 hongos filamentosos fueron identificados positivamente para la producción de tanasas mediante los ensayos en placa. La cuantificación y validación de la actividad tanasa se realizó mediante la técnica en líquido descrita previamente y se presentan los resultados en la Figura 1.

Los aislamientos de bacterias fueron identificados como pertenecientes al género *Bacillus* y *Klebsiella*, mientras que los hongos filamentosos aislados pertenecen al género *Aspergillus*.

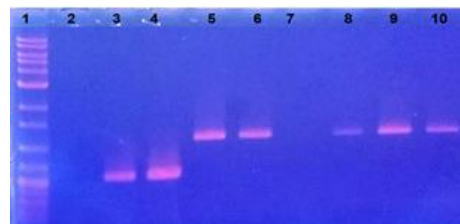
Posteriormente ensayos se realizaron con el control y 2H, mediante el uso de esporas, para mejorar la reproducibilidad. Se obtuvieron los siguientes valores de actividad tanasa, control (32,58 U/ml/1x10<sup>7</sup>esporas/ml, 24 horas) y 2H (21,06 U/ml/1x10<sup>7</sup>esporas/ml, 48 horas).



**Figura 1.** Cuantificación de la actividad tanasa. **A.** Actividad tanasa de los aislamientos bacterianos (4D, 4A, 3E, BB, 3I y 3E). La actividad fue normalizada en función de la concentración celular. **B.** Actividad tanasa de los aislamientos de hongos filamentosos. La actividad fue normalizada en función de masa seca. Todos los ensayos se realizaron por triplicado biológico

**Obtención de la secuencia codificante del gen de tanasas:** A partir de los resultados de actividad obtenidos, se procedió a la búsqueda de la secuencia del gen codificante para la tanasa de *Aspergillus awamori* CECT 2905. A partir de análisis bioinformática de secuencias depositadas en el NCBI (Centro Nacional de Información para la Biotecnología), dicha secuencia tendría un tamaño de aproximado

de 1,8 kb, se obtuvo en una primera etapa, un segmento de 1,2 kb (Figura 2).



**Figura 2.** Gel de agarosa 1%. **Calles:** 1-Marcador de peso molecular, 2-control negativo, 3 y 4-control positivo, 5 a 10-muestras a diferentes temperaturas 53,8 °C, 54 °C, 54,3 °C, 55,7 °C, 57 °C y 60 °C.

## CONCLUSIONES

En conclusión, el método de aislamiento y selección demostró ser una técnica rápida y eficaz para la selección de microorganismos productores de tanasa, por lo que podrían aislarse y utilizarse para la caracterización y explotación de nuevas tanasas. El hongo *Aspergillus awamori* CECT 2905 mostró la mayor actividad de tanasa, por lo que se seleccionó para la obtención de la secuencia codificante para el gen correspondiente. A partir de los resultados obtenidos, se diseñarán nuevos protocolos para la obtención del segmento restante de la tanasa. Asimismo, el posterior clonado y transformación en *Pichia pastoris*. La producción recombinante de esta enzima, facilitaría la producción local de productos nuevos como el té helado o *ready to drink tea*, al disminuir costos relacionados a la importación de la tanasa.

## REFERENCIAS

1. Aharwar, Amitabh et al. Tannases: Production, properties, applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, 322-334, 2018.
2. Amfep\_List\_of\_Enzymes\_update\_May\_2015. [https://amfep.org/library/files/Amfep\\_List\\_of\\_Enzymes\\_update\\_May\\_2015.pdf](https://amfep.org/library/files/Amfep_List_of_Enzymes_update_May_2015.pdf). Accedido 24 de mayo de 2022.
3. Jean-Paul Ouedraogo and Adrian Tsang. Production of Native and Recombinant Enzymes by Fungi for Industrial Applications. *Encyclopedia of Mycology*, 222-232, 2021.