

Isolamento e seleção de microrganismos de fontes naturais da região de São Roque, SP, para produção da enzima tanase

Isolation and selection of microorganisms from natural sources around São Roque region, São Paulo State, Brazil, to produce the tannase enzyme

Camila Fernandes Soares ⁽¹⁾
Caroline Kie Ishimoto ⁽²⁾
Vânia Battestin ⁽³⁾

Resumo. Tanino acil hidrolase conhecida como tanase (E.C: 3.1.1.20) é uma enzima que hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis produzindo glicose e ácido gálico. A tanase é uma enzima extracelular, induzível, produzida por fungos, bactérias e leveduras através da fermentação sólida, líquida ou submersa. O meio de produção é simples, utiliza resíduos vegetais ou subprodutos como farelo de trigo, arroz ou aveia, acrescidos de ácido tânico. O Brasil ocupa uma posição privilegiada tanto em termos de biodiversidade quanto em sua capacidade de gerar recursos renováveis em grande escala. O uso e produção de enzimas em diferentes áreas mostram perspectivas futuras promissoras devido às várias características inerentes à ação das enzimas que são compostos naturais, biodegradáveis, capazes de desempenhar reações específicas sem produzirem produtos secundários. A tanase tem vasta aplicação na indústria de alimentos, sucos, cervejaria e indústria farmacêutica. O objetivo deste trabalho foi isolar e selecionar microrganismos de fontes naturais da região de São Roque/SP para produção da enzima tanase através de fermentação sólida. A primeira etapa da seleção foi realizada utilizando como substrato farelo de trigo suplementado com 5% (p/v) de ácido tânico. Dentre as 30 linhagens testadas, 27% das linhagens fúngicas produziram a enzima tanase. As linhagens com maior potencial produtor de tanase foram as de número LAB6VW, LAB7VW e LAB29VW com valores de atividade de 0,0012, 0,0231 e 0,0173 U respectivamente.

Palavras-chave: tanase, fermentação sólida, microrganismos.

Abstract. Tannin acyl hydrolase (E.C: 3.1.1.20) or tannase is an enzyme which hydrolyses ester and depside bonds of hydrolysable tannins releasing gallic acid and glucose. Tannase is an extracellular, inducible enzyme, produced by fungi, bacteria and yeast. The tannase is produced by solid-state, liquid surface and submerged fermentation. The production is simple, using vegetable residues or by-products as wheat bran, rice or oats, to which tannic acid, is added. Brazil occupies a privileged position in terms of biodiversity and in its capacity to generate renewable resources on a large scale. The use and production of enzymes in different areas show promising prospects due to several characteristics inherent to the action of enzymes which are natural compounds, biodegradable, able

to perform specific reactions without producing secondary products. Tannase enzyme has several applications on food, juices and pharmaceutical industries. The aim of this study was to isolate and select microorganisms from natural sources in the region of São Roque / SP for tannase production by solid fermentation. The first stage of the selection was carried in solid-state fermentation using as substrate wheat bran supplemented with 5% of tannic acid. Among the 30 tested lineages, 27% of the fungi produced the enzyme. The lineages that showed the best activities were: LAB6VW, LAB7VW e LAB29VW with 0,0012, 0,0231 e 0,0173 U activities values.

Keywords: tannase, solid fermentation, microorganisms.

⁽¹⁾ Graduanda em Ciências Biológicas, bolsista de Iniciação Científica CNPq-IFSP, *campus* São Roque

⁽²⁾ Aluna do curso Técnico em Agroindústria, bolsista de Iniciação Científica CNPq-IFSP, *campus* São Roque

⁽³⁾ Professor Adjunto do IFSP *campus* São Roque (orientador). Correspondência: Rod. Prof. Quintino de Lima, 2.100 – São Roque, SP – CEP 18136-540; e-mail de contato: vbattestin@gmail.com

Recebido em: 28 mai. 2013
Aceito em: 31 mai. 2013
Publicado em: 15 jun. 2013

1 Introdução

Os microrganismos têm sido utilizados pelo homem em diferentes processos e de diferentes maneiras. Muitas substâncias de considerável valor econômico são produtos do metabolismo microbiano, desde a produção industrial de materiais importantes incluindo, as enzimas, químicos finos (farmacêuticos) e aqueles produzidos em grandes quantidades que serão utilizadas como matéria-prima. Os microrganismos hoje representam uma fonte alternativa para vários processos industriais. Em diversas áreas, suas funções são extremamente importantes e requisitadas. Na área da enzimologia, infinitos metabólitos, incluindo importantes enzimas, são obtidas através de processos biotecnológicos utilizando esses microrganismos, quer sejam, fungos, bactérias ou leveduras (BATTESTIN, 2007).

O isolamento de microrganismos da natureza é o primeiro passo para o Screening em busca de produtos de metabolismo, enzimas, ou espécies de microrganismos a serem estudados. Não existe, entretanto, um método simples e universal que revele o número total e a diversidade de microrganismos presentes em uma amostra. É possível isolar os microrganismos usando técnicas de enriquecimento, meios de cultura variados e condições de cultivo distinto (EGUCHI *et al.*, 1997).

Tanino acil hidrolase conhecida como tanase (E.C: 3.1.1.20) é uma enzima que hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis (BANERJEE *et al.*, 2001). O ácido tânico é um típico tanino hidrolisável, que pode ser hidrolisado por tanase em glicose e ácido gálico (HELBIG, 2000) (Figura 1). A tanase pode ser obtida a partir de fontes vegetal, animal e microbiana (BANERJEE *et al.*, 2000). O meio microbiológico é a fonte mais importante de obtenção da tanase, uma vez que as enzimas produzidas desta forma são mais estáveis do que aquelas obtidas por outros meios. Além disso, microrganismos podem produzir TAH em altas quantidades e de maneira contínua, com conseqüente aumento de rendimento (BANERJEE *et al.*, 2000).

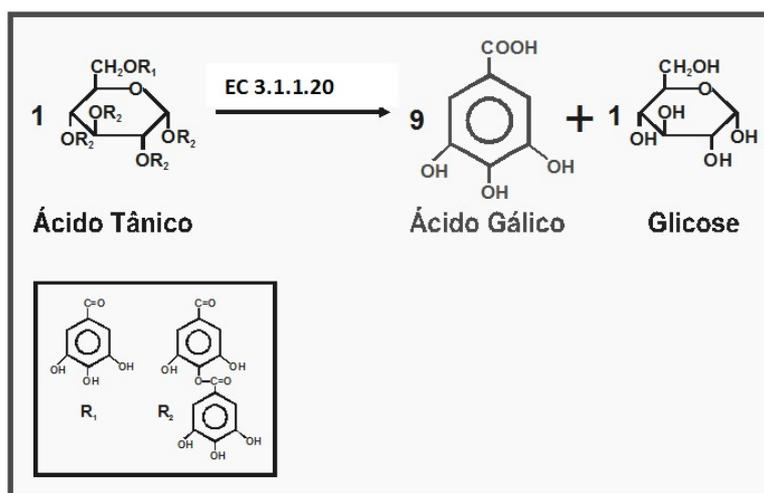


Figura 1. Hidrólise do ácido tânico segundo Aguilar *et al.* (1999).

A tanase é uma enzima extracelular, induzível, produzida na presença de ácido tânico por fungos, bactérias e leveduras (BATTESTIN *et al.*, 2008). A primeira etapa para o desenvolvimento do processo de produção de enzimas microbianas é a seleção da linhagem. Enzimas extracelulares são preferidas, pois são mais facilmente extraídas e dispensam métodos de extração mais dispendiosos (COURI, 1998; AGUILAR, 1999). Existem estudos de produção da tanase por fermentação sólida, líquida e submersa (LEKHA & LONSANE, 1994).

2 Materiais e Métodos

2.1 Microrganismos

Todas as linhagens fúngicas foram isoladas de diferentes fontes naturais como solo, madeiras, cascas e folhas de árvores. Foram isoladas e testadas 30 linhagens fúngicas, pertencentes ao laboratório de Bioquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – Campus São Roque. As linhagens fúngicas foram conservadas em tubos de ensaio com meio de Agar de batata dextrosado (PDA), inclinados a 4°C.

2.2. Preparação do Inóculo

As linhagens fúngicas foram repicadas em meio inclinado PDA (Potato Dextrose Agar) com suplemento de 0,2% (p/v) de ácido tânico (C₇₆H₄₂O₅₆) e incubadas em estufa (Solab) à 32°C por 72 horas.

2.3. Meio de Fermentação

Em frascos Erlenmeyers de 250 mL foram adicionados 10g de farelo de trigo e 10 mL de solução de sais na concentração (g/L): NH₄Cl 0,1; (NH₄)₂SO₄ 0,1; CaCl₂.2H₂O 0,01; K₂SO₄ 0,01; MnSO₄.H₂O 0,002; FeSO₄.7H₂O 0,002. O indutor ácido tânico foi adicionado ao meio de fermentação na concentração final de 5%. O meio de cultivo foi esterilizado a 120°C por 20 minutos, com umidade relativa 60% (BU) e pH 5,8. Após a esterilização os frascos foram inoculados com 2,5 mL de solução de esporos e incubados a 32°C em estufa, por 7 dias. Após fermentação, foram adicionados 70 mL de solução tampão acetato pH 5,0 - 20mM e agitados a 150 rpm por 1 hora e 30 minutos. A solução foi filtrada em algodão e o filtrado centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos. No sobrenadante foi medida a atividade enzimática de tanase (LEKHA & LONSANE, 1994).

2.4. Medida da Atividade Enzimática da Tanase

A solução de substrato foi preparada pela adição de 0,12 % (p/v) de ácido tânico em tampão Acetato pH 5,5 - 0,2 M. A reação foi realizada adicionando 0,3 mL da solução de substrato com 0,5 mL de extrato enzimático bruto e incubado a 60°C por 10 minutos. Após a incubação, a reação foi paralisada pela adição de 3 mL de solução de BSA preparada na concentração de 1 mg/mL de albumina de soro bovino (BSA) e 0,17 M de cloreto de sódio em tampão acetato pH 5,0 , 0,2 M. Em seguida a solução foi centrifugada a 10000 rpm por 15 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 3 mL de solução SDS-trietanolamina acrescido de 1 mL de solução de FeCl₃. A absorbância foi medida após 15 minutos em 530 nm (MONDAL *et al.*, 2001). A curva padrão foi elaborada utilizando quantidades de ácido tânico comercial variando entre

0,01% e 0,15%. A atividade enzimática foi calculada pela diferença da leitura de absorvância medida a 530 nm entre amostra e tubo controle. Uma unidade de atividade de tanase foi definida como a quantidade de ácido tânico hidrolisado por mL de enzima empregada por minuto de reação: $Abs_{530} = Abs_{controle} - Abs_{teste}$.

2.5. Efeito de diferentes concentrações do indutor sobre a síntese de tanase

Ao meio de fermentação sólida utilizando farelo de trigo foram adicionadas diferentes concentrações de ácido tânico para verificar a influência desse indutor na síntese da enzima. Concentrações de 2%, 5% e 8% foram adicionadas ao meio de fermentação nas condições do teste.

3 Resultados e discussão

3.1 Seleção de linhagens fúngicas

A seleção de linhagens fúngicas produtoras de tanase foi realizada em meio de fermentação sólida utilizando como substrato farelo de trigo suplementado com 5% de ácido tânico. A Figura 2 mostra os dados da produção da enzima com os microrganismos isolados.

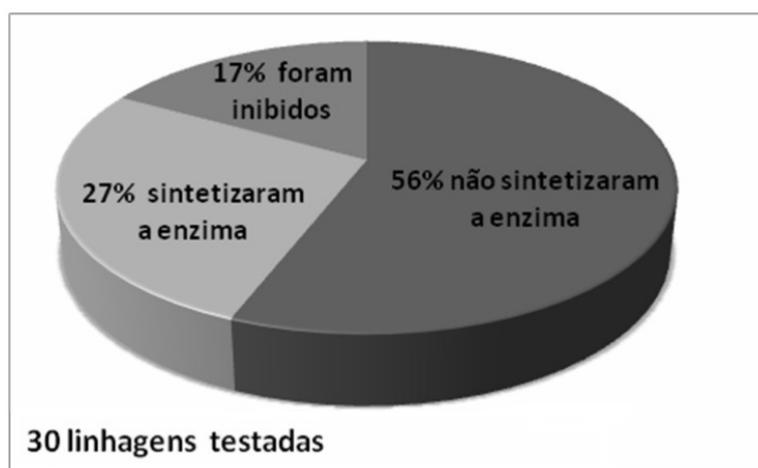


Figura 2. Perfil de produção da enzima pelos microrganismos testados.

Dentre as 30 linhagens testadas, 27% das linhagens fúngicas produziram a enzima tanase, 56% dos fungos não sintetizaram a enzima e 17% dos fungos foram inibidos na etapa de pré-inoculação, quando se utilizou o meio PDA com 0,2% (p/v) de ácido tânico, comprovando o efeito de inibição que os taninos podem exercer sobre o crescimento de microrganismos. Em relação às propriedades antimicrobianas dos taninos, muitos fungos, bactérias e leveduras são resistentes aos taninos e podem crescer e se desenvolver na presença destes, como: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium* sp, *Candida* sp e *Pichia* sp (BHAT *et al.*, 1998). Os resultados da seleção indicaram que 27% das linhagens testadas são capazes de sintetizar Tanino acil hidrolase nas condições do teste de atividade da tanase.

Com o objetivo de selecionar os melhores fungos produtores da tanase, optou-se pela escolha das linhagens com atividade superior ou igual a 0,01 U (Tabela 1).

Tabela 1. Linhagens pré-selecionadas como produtoras de tanase em farelo de trigo com 5% (p/v) de ácido tânico após sete dias de fermentação.

Linhagem	U ($\mu\text{mol}/\text{mim. ml}$ enzima)
LAB6VB	0,0012
LAB7VB	0,0231
LAB29VB	0,0173

As linhagens com maior potencial produtor de tanase foram as de número LAB6VW, LAB7VW e LAB29VW com valores de atividade de 0,0012, 0,0231 e 0,0173 U respectivamente. Todas as linhagens foram testadas em meio de fermentação com farelo de trigo acrescentando diferentes concentrações de ácido tânico. A Figura 3 mostra os dados obtidos.

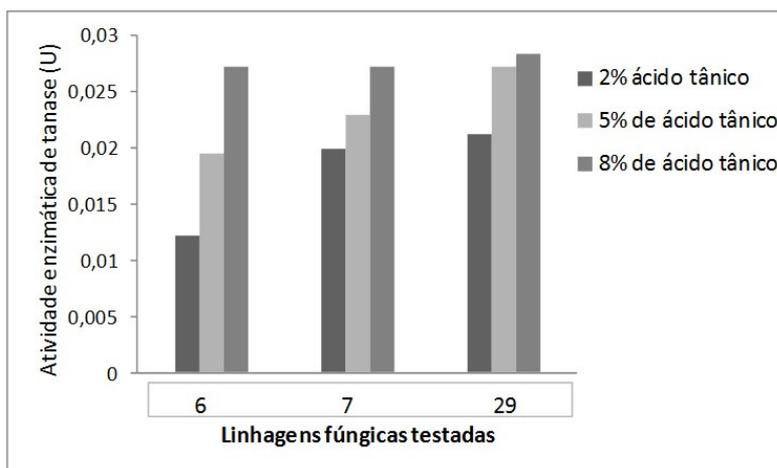


Figura 3. Influência do ácido tânico na produção da enzima tanase.

O farelo de trigo tem sido até hoje o substrato mais estudado para produção de tanase por fermentação sólida. Todas as linhagens testadas neste resíduo foram capazes de produzir a enzima conforme mostra Figura 3. As linhas LAB6VW, LAB7VW E LAB29VW apresentaram valores de atividade de 0,0272, 0,0273 e 0,028 U quando se adicionou 8% de ácido tânico ao meio de fermentação, resultando em aumentos de 2,2; 1,4 e 1,3 vezes se comparados à atividade enzimática com 2% de ácido tânico.

A produção da enzima mostrou estar diretamente relacionada com a concentração de ácido tânico que é adicionada ao meio de fermentação, esta fonte de carbono favorece a produção rápida de tanase que, por sua vez, cliva os taninos fornecendo suprimento contínuo de

fonte de carbono. Em estudo realizado por MONDAL *et al.*, (2001) quando se utilizou *Bacillus cereus* KBR9 para a produção da tanase adicionando 10 g/L de ácido tânico ao meio de fermentação submersa, obteve-se valores para a atividade enzimática de 0,22 U/mL. De acordo com Lekha & Lonsane (1997), Bajpai & Patil (1997) e Pinto (2003), o ácido tânico desempenha o papel de fonte de carbono para o microrganismo, bem como de indutor da síntese. Dessa maneira, a presença de ácido tânico é imprescindível para a síntese de tanase. Em trabalho realizado por Pinto (2003) em experimento preliminar onde não se adicionou ácido tânico ao meio de fermentação, não foi observada atividade de tanase em nenhum tempo de fermentação.

Os resultados atuais indicam que a concentração de ácido tânico é importante na indução da tanase pelos fungos estudados. Demonstrou-se que a concentração de ácido tânico no meio de cultura é fator chave na produção da tanase, sendo objeto de mais estudos em andamento.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Referências bibliográficas

- AGUILAR, C.; AUGUS, C.; GONZÁLEZ, G. V.; FAVELA, E. A comparison of methods to determine Tannin Acyl Hydrolase Activity. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 42, p. 355-361, 1999.
- AGUILAR, C. N. & GUTIÉRREZ-SANCHEZ, G. Review: Sources, Properties, Applications and Potential uses of Tannin Acyl Hydrolase. *Food Science Technology International*, 7, p.373-382, 2001.
- BAJPAI, B. & PATIL, S. Induction of tannin acyl hidrolase (EC 3.1.1.20) activity in some members of fungi imperfecti. *Enzyme and Microbial Technology*, 20, p.612-614, 1997.
- BANERJEE, D.; KAR, B. Biosynthesis of tannin acyl hydrolase from tannin-rich forest residue under different fermentation conditions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 25, p. 29-38, 2000.
- BANERJEE, D.; MONDAL, K. C.; PATI, B. R. Production and characterization of extracellular and intracellular tannase from newly isolated *Aspergillus aculeatus* DBF 9. *Journal Basic Microbiology*, 41, p. 313-318. 2001.
- BATTESTIN, V. B.; MACEDO, G. A.; DE FREITAS, V. A. P. Hydrolysis of epigallocatechin gallate using a tannase from *Paecilomyces variotii*. *Food Chemistry*, 108, p. 228-233, 2008.
- BATTESTIN, V.; MACEDO, G. M. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. *Bioresource Technology*, 98, p. 1832-1837, 2007.

BHAT, K. T.; SINGH, B.; SHARMA, P. O. Microbial degradation of tannins – A current perspective. *Biodegradation*, 9, p. 343-357, 1998.

COURI, S.; TERZI, S. C.; SILVA, F. D.; FREITAS, S. P.; PINTO, G. A. S. Seleção de linhagens mutantes de *Aspergillus niger*, para síntese de enzimas hidrolíticas por fermentação em meio semi-sólido. *Ciência e Engenharia*, 7, p. 29-31, 1998.

EGUCHI, S. Y.; VARIANE, S. F. *Técnicas Microbiológicas de Manuseio e Caracterização de Bactérias*. Campinas, SP: Fundação tropical de Pesquisas e Tecnologia Andre Tosello, 1997.

HELBIG, E. *Ação da maceração prévia ao cozimento do feijão-comum (Phaseolus vulgaris L.) nos teores de fitatos e taninos e conseqüências sobre o valor protéico*. Campinas, SP. 2000 – 67p (Dissertação de mestrado).

LAGEMAAT, J. V.; PYLE, D. L. Slid-state fermentation and bioremediation: development of a continuous process for the production of fungal tannase. *Chemical Engineering Journal*, 84, p. 15-123, 2001.

LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Production and Application of Tannin Acyl Hidrolase: State of the Art. *Advances in Applied Biochemistry and Microbiology*, 44, p. 215-260, 1997.

_____. Comparative Titres, location and properties of Tannin Acyl Hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. *Process Biochem*, 29, p.497-503, 1994.

MONDAL, K. C.; BANERJEE, D.; JANA, M.; PATI, B. R. Colorimetric Assay Method for determination of the Tannin Acyl Hidrolase activity. *Analytical Biochemistry*, 295, p. 168-171. 2001.

PINTO, G. A. S. *Produção de Tanase por Aspergillus niger*. Tese (Doutorado-UFRJ). RJ, 2003. p. 213.

SHONS, P. F.; RIES, E. F.; BATTESTIN, V.; MECEDO, G. A. Effect of enzymatic treatment on tannins and phytate in sorghum (*Sorghum bicolor*) and its nutritional study in rats. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, p.1253-1258, 2011.

Como citar este artigo

SOARES, C. F.; ISHIMOTO, C. K.; BATTESTIN, V. Isolamento e seleção de microrganismos de fontes naturais da região de São Roque, SP, para produção da enzima tanase. *Scientia Vitae*, vol. 1, n. 1, jun. 2013, p. 43-49. Disponível em: <www.revistaifpsr.com/>; acesso em: __/__/__.