

Produção da enzima tanase utilizando técnica de fermentação em estado sólido

Tannase enzyme production with solid fermentation

Caroline Kie Ishimoto ⁽¹⁾
Camila Fernanda Soares ⁽²⁾
Vania 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. 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. A fermentação ocorreu em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 10g de farelo de trigo e 10 mL de solução de sais. A determinação de atividade de tanase seguiu protocolo descrito por Mondal *et al.* (2001). 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. Os resultados atuais indicam que a concentração de ácido tânico é importante na indução da tanase pelos fungos estudados.

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. 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, Sao Paulo State, Brazil for tannase production by solid fermentation. The first stage of the selection was car-

ried in solid-state fermentation using as substrate wheat bran supplemented with 5% of tannic acid. The fermentation took place in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 10g of wheat bran and 10 ml of salt solution. The determination of tannase activity followed the protocol described by Mondal *et al.* (2001). 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. The current results indicate that the tannic acid concentration is important in the induction of tannase by fungi studied.

Keywords: tannase, solid fermentation, microorganisms.

⁽¹⁾ Aluna do curso de Técnico em Agroindústria do IFSP campus São Roque e bolsista de Iniciação Científica CNPq-IFSP.

⁽²⁾ Licencianda em Ciências Biológicas do IFSP campus São Roque bolsista de Iniciação Científica CNPq-IFSP.

⁽³⁾ Docente do IFSP campus São Roque; Correspondência: Rod. Prof. Quintino de Lima, 2.100, São Roque, SP, CEP 18136-540; e-mail: carolinekie.go@gmail.com

Recebido em: 15 ago. 2013

Aceito em: 10 set. 2013

Publicado em: 21 dez. 2013

1 Introdução

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 (TAH), 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). 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).

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).

A fermentação sólida para a produção de enzimas oferece vantagens sobre o método de fermentação submersa e líquida convencional (LAGEMAAT & PYLE, 2001). O meio de produção é simples, podem-se utilizar subprodutos agroindustriais como casca de uva, resíduo do processamento de suco de laranja, resíduo de café ou farelo de trigo, arroz e aveia, acrescidos de ácido tânico. Lekha & Lonsane (1997) produziam tanase de *Aspergillus niger* e *Penicillium glabrum* utilizando farelo de trigo e Lagemaat & Pyle (2001), Aguilar & Sanchez (2001) produziram tanase em espuma de poliuretano e Battestin & Macedo (2007) produziram tanase utilizando resíduos de café misturado com farelo de trigo.

A enzima pode ter vasta aplicação na indústria de alimentos, principalmente sucos, cervejaria, indústria cosmética, farmacêutica e indústria química (LEKHA & LONSANE, 1997). A enzima também é utilizada para produção de chás instantâneos, na estabilização da cor de vinhos, no processo de tratamento de couro, na detanificação de alimentos e para tratamento de efluentes na indústria de couros (SCHONS *et al.*, 2011; BANERJEE *et al.*, 2001).

Atualmente, a enzima é utilizada para a produção de importantes antioxidantes como ácido gálico e epicagalocatequinas (BATTESTIN *et al.*, 2008).

No presente estudo, o objetivo foi selecionar linhagens fúngicas de fontes naturais da região de São Roque - SP para a produção da enzima tanase utilizando técnica de fermentação em estado sólido.

2 Material 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 sólida

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 sete 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 absorbância 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. Esta etapa ocorreu somente para as linhagens que foram selecionadas como melhores produtoras da enzima tanase.

3 Resultados e discussão

3.1. Seleção das 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 Fig. 1 mostra os dados da produção da enzima com os microrganismos isolados.

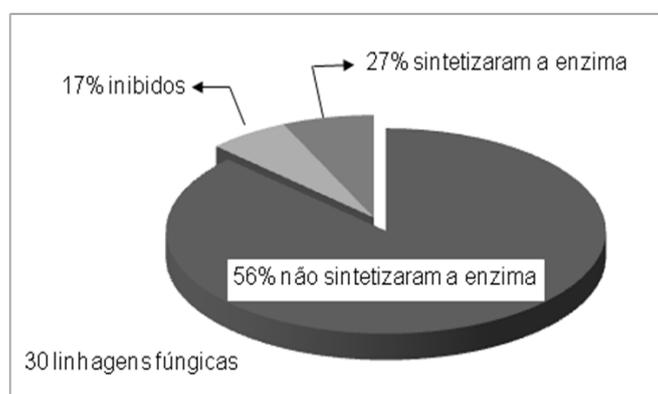


Figura 1 - Perfil de produção da enzima pelos microrganismos testados.

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 utilizou-se 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 (Tab. 1).

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 Fig. 2 mostra os dados obtidos.

Tabela 1 – Linhagens pré selecionadas como produtoras de tanase (atividade enzimática U) 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)
LAB6VW	0,012
LAB7VW	0,0231
LAB29VW	0,0173

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. 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.

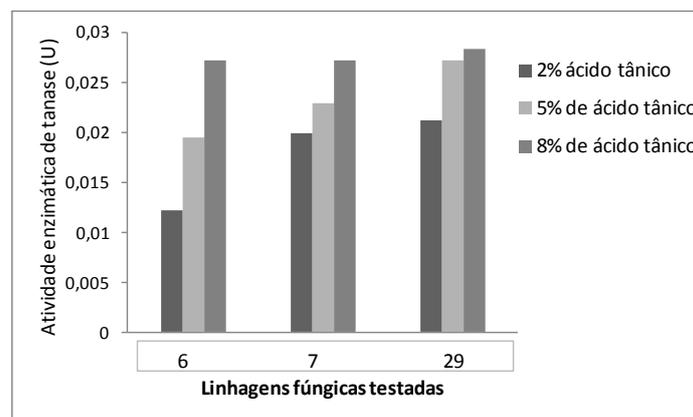


Figura 2 - Influência do ácido tânico na produção da enzima após sete dias de fermentação.

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.

Desta 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.

4 Considerações finais

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

- AGUILAR, C.; AUGUS, C.; GONZÁLEZ, G. V.; FAVELA, E. A comparison of methods to determine Tannin Acyl Hydrolase Activity. 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.; 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. *Dissertação* (Mestrado), 67 p. Campinas – SP, 2000.

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), 213p. Rio de Janeiro: UFRJ, 2003.

Como citar este artigo

ISHIMOTO, C. K; SOARES, C. F.; BATTESTIN, V. Produção da enzima tanase utilizando técnica de fermentação em estado sólido. *Scientia Vitae*, vol. 1, n. 2, ano 1, out-dez. 2013, p. 75-81. Disponível em: <www.revistaifsp.com/>; acesso em: __/__/__.