

ESTUDOS DE PRODUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA ENZIMA TANASE

IAN VITTOR W. T. DE CARVALHO¹, VANIA BATTESTIN WIENDL²

¹ Graduando em Licenciatura em Química, IFSP, Câmpus São José dos Campos, ian.vittor@aluno.ifsp.edu.br.

² Engenheira de Alimentos - Professora Dra, IFSP, Câmpus São José dos Campos, vbattestin@ifsp.edu.br.

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 2.08.05.00-4 Enzimologia

RESUMO: Esse trabalho objetivou estudar o método de produção da enzima tanase e o método colorimétrico para determinação de sua atividade enzimática. Essa enzima tem grande importância industrial por ser capaz de reagir com taninos hidrolisáveis e gerar ácido gálico e glicose, sendo usado por vários tipos de indústrias, porém, apresenta alto custo de produção e baixo rendimento. Assim, buscou-se um método de baixo custo para sua produção, optando, dessa forma, pela fermentação sólida e determinação colorimétrica para sua quantificação. Como seu resultado, obteve-se a média de produção da enzima igual a 0,099772 U/mL, sendo este um método promissor para a produção da enzima tanase.

PALAVRAS-CHAVE: fermentação; colorimétrico; análise.

PRODUCTION STUDIES AND QUANTIFICATION OF ENZYME TANASE

ABSTRACT: This work aimed to study the production method of the enzyme tanase and the colorimetric method to determine its enzymatic activity. This enzyme has great industrial importance because it is able to react with hydrolyzable tannins and generate gallic acid and glucose, being used by several types of industries, however, it has high production costs and low yield. Thus, a low-cost method for its production was sought, thus opting for solid fermentation and colorimetric determination for its quantification. As a result, the average enzyme production was equal to 0.099772 U / mL, which is a promising method for the production of the enzyme tanase.

KEYWORDS: fermentation; colorimetric; analyze.

INTRODUÇÃO

A Tanase (Tanino acil hidrolase) é uma enzima específica que hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis, gerando como produto o ácido gálico e glicose (BATTESTIN, 2007). Dentre todos os constituintes vegetais, os taninos são o quarto mais abundante do Planeta. São usados como mecanismo de defesa para muitos vegetais, de modo que a grande quantidade de taninos está associado a sua resistência microbiana. Assim, a tanase, como composto extracelular, é uma forma de defesa aos taninos por parte de fungos, bactérias e leveduras (PINTO et al., 2015).

Os setores que se utilizam da enzima são vários: químicos, farmacêuticos, alimentos e cosméticos. Porém o alto custo de produção da tanase restringe seu uso para tratamentos de couro, detanificação de alimentos, refrigerantes a base de café, estabilização da cor do vinho, entre outros (NASCIMENTO et al., 2014).

A obtenção, em laboratório, da tanase é estudada por fermentação líquida e sólida, sendo a líquida com presença de água circulante e a sólida não. A fermentação sólida apresenta vantagens sobre a líquida e pode ser realizada com subprodutos agroindustriais, geralmente rejeitados ou subaproveitados, como cascas de frutas ou resíduos. Ademais, a adição de certa porcentagem de ácido tânico no meio de crescimento do fungo aumenta a produção da tanase. Assim, o processo ganha destaque pelo baixo custo (SOARES, 2014).

Contudo, apenas produzir tanase por fermentação sólida não é suficiente para aplicação. É necessário purificá-la antes, e esse processo se reparte em duas etapas: pré-purificação e purificação por métodos cromatográficos. (BATTESTIN, 2007). O presente trabalho se ocupa de estudar a pré-purificação e a influência da concentração de sulfato de amônio, usado no processo, no resultado final.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais e equipamentos utilizados

Resíduos: Foi utilizado neste estudo o farelo de trigo. Este foi adquirido do comércio local de São José dos Campos.

Reagentes químicos e meios de cultura: ácido tânico, SDS-trietanolamina, sais minerais e tampões, PDA (Ágar de Batata Dextrosado), resíduos da indústria cervejeira e de aguardente de Cambuci, proteína BSA (albumina de soro bovino).

Equipamentos: Espectrofotômetro (Metash-Tecnal); Banho termostático (Tecnal); Centrífuga (Kasvi k14-4000); Estufa de Cultura (Tecnal TE-392-1); Incubador Shaker (K-330-Pro); Balança analítica (Mettler Toledo Me 104), pHmetro (Metler Toledo).

Métodos

Obtenção da tanase por fermentação sólida

Inoculação do fungo no reator com substrato e solução de sais e ácido tânico, para fermentação sólida e posterior análise de produção de tanase por método colorimétrico, utilizando o espectrofotômetro.

Microrganismo, conservação e preparo do inóculo

A linhagem fúngica que foi utilizada no presente estudo foi isolada do solo da árvore conhecida popularmente com Ingá. Posteriormente esta linhagem foi identificada como sendo *Aspergillus niger*. Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Química e Bioquímica do IFSP – Câmpus São José dos Campos. A linhagem fúngica foi conservada em tubos de ensaio com meio de ágar batata dextrose (PDA), inclinados e em temperatura de 10°C. A linhagem foi repicada em meio PDA inclinado, com suplemento de ácido tânico 0,2% (p.v⁻¹), pH final do meio igual a 5,2 e incubadas em estufa à 32°C por 120 horas para pré-indução da tanase.

Meio de fermentação sólida para produção da tanase

Em frascos Erlenmeyers de 250 mL foram adicionados 20 g da mistura de resíduo de farelo de trigo mais a solução de sais, na proporção inicial de 1:1, sendo o resíduo acrescido de solução de sais e ácido tânico, ajustável até alcançar concentração final de 10% de ácido tânico. A solução de sais foi preparada segundo as seguintes quantidades (g/L): CaCl 0,02; KH₄PO₄ 1,0; MnSO₄ 0,2; (NH₄)SO₄ 2,0; MgSO₄ 0,2. O meio de fermentação foi esterilizado à 120°C por 15 minutos. Após a esterilização os frascos foram inoculados com 2 mL de solução de esporos. Nesta etapa foi realizada a raspagem do fungo da superfície do meio PDA com alça de inoculação e homogeneizado na água. Após isso, essa solução foi transferida para os reatores e colocada na estufa bacteriológica por 5 dias à 32° C. Após fermentação, foram adicionados 70 mL de solução tampão acetato 0,2M (pH 5), agitados a 200 rpm por 1 hora. A solução foi filtrada em algodão e após filtragem foi levado a centrífuga por 15 minutos a 4.000 rpm. No sobrenadante foi medida a atividade enzimática de acordo com metodologia proposta por Lekha e Lonsane (1994).

Medida da atividade enzimática da tanase – Método colorimétrico

A solução de substrato foi preparada pela adição de ácido tânico 0,2% (p.v⁻¹) em tampão acetato 0,2 M (pH 5,5). A reação foi realizada adicionando 0,3mL da solução de substrato com 0,5 mL de extrato enzimático bruto deixado em banho maria à 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⁻¹ de BSA e de cloreto de sódio 0,17 M em tampão acetato 0,2M (pH 5), e em seguida, centrifugada a 4.000 rpm por 15 minutos. Ao precipitado foi adicionado 3 mL de solução SDS-trietanolamina acrescido de 1 mL de

solução de FeCl_3 . A absorvância foi medida após 15 minutos a 530 nm de acordo com metodologia sugerida por Mondal et al. (2001). A curva padrão foi elaborada utilizando quantidades de ácido tânico comercial variando entre 0,02 e 0,14 mg. A atividade da enzima foi calculada pela mudança na absorvância a 530nm de acordo com a Equação 2 que faz o cálculo da atividade enzimática. Todos os testes foram realizados em duplicata.

$$\text{Abs}_{530} = \text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{teste}} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde:

Abs_{530} = Absorvância medida

$\text{Abs}_{\text{teste}}$ = substrato + enzima ativa

$\text{Abs}_{\text{controle}}$ = substrato + enzima desnaturada

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção e obtenção da tanase por fermentação sólida

A produção da enzima tanase ocorreu utilizando como substrato da fermentação o resíduo de farelo de trigo. A fermentação ocorreu durante 5 dias e observou-se bom crescimento do fungo *Aspergillus niger* sobre este meio (Figura 1).



FIGURA 1. Crescimento do fungo sobre o meio de fermentação.

De acordo ao protocolo de determinação da atividade enzimática, utilizou-se o método colorimétrico. Este método identifica a quantidade de ácido tânico que foi hidrolisado pela enzima. Desta forma, o tubo de reação (com a enzima ativa) e o tubo controle (com a enzima desnaturada) foram analisados no mesmo curso da reação. Ao final do procedimento analítico, observa-se uma diferença entre as cores do tubo controle e tudo de reação, de acordo a Figura abaixo.

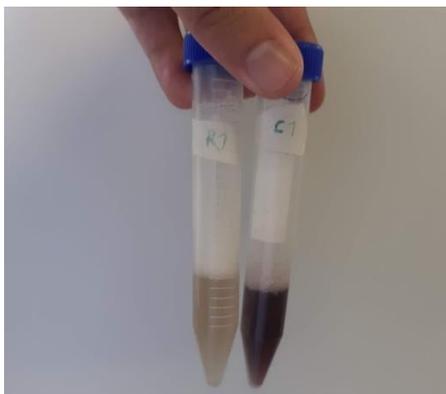


FIGURA 2. Reações da enzima com seu substrato.

De acordo a Figura 2 o tubo R1 representa a reação com a enzima ativa sobre o substrato ácido tânico. O tubo C1 representa o controle da reação utilizando a enzima desnaturada atuando sobre o substrato ácido tânico. Dessa forma, observou-se que no tubo de reação (R1) a enzima reagiu com o substrato resultando ao final da reação colorimétrica um cor muito clara se comparada ao tudo controle (C1), o qual a enzima por estar desnaturada não quebrou seu respectivo substrato (ácido tânico).

Ao final da reação colorimétrica, o ácido tânico complexa com o cloreto de ferro que é adicionado a reação. Quanto mais hidroxilas do ácido tânico estiverem presentes maior será a complexação com este ácido e mais intensa será a cor da reação.

Os valores de atividade enzimática foram realizados em duplicata e ficaram bem próximos: 0,09944 U/mL e 0,10011 U/mL, respectivamente, sendo a média igual a 0,099772 U/mL. Sendo assim, a técnica de produção de tanase por fermentação sólida se mostrou promissora e será continuamente usada para os testes de pré-purificação

CONCLUSÕES

Percebeu-se que o meio de fermentação sólida é um bom mecanismo de produção desta enzima, oferecendo baixo custo pois utiliza-se de resíduos e insumos de baixo custo. O método de detecção da enzima (método colorimétrico) mostrou-se adequado durante as análises e será utilizado nas etapas futuras deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao IFSP pela concessão da bolsa PIBIFSP.

REFERÊNCIAS

BATTESTIN, Vania. Produção, purificação, caracterização e aplicação da tanase de *Paecilomyces variotii*. 2007. 86 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, [S. l.], 2007. Disponível em: http://taurus.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/256633/1/Battestin_Vania_D.pdf . Acesso em: 28 abr. 2020.

KC Mondal, D. Banerjee, M. Jana, BR Pati. Método de ensaio colorimétrico para determinação da atividade de tanino acil hidrolase (EC 3.1.1.20) *Anal. Biochem.*, 295 (2001) , pp. 168 – 171

LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Production and application of tannic acyl hydrolase: State of the art. *Advances in Applied Microbiology*. (44): 215-260, 1997.

NASCIMENTO, Katarina Botelho de Melo; MARTINS, Alex Gabriel Rodrigues; TAKAKI, Galba Maria de Campos; SILVA, Carlos Alberto Alves da; OKADA, Kaoru. Utilização De Resíduos Agroindustriais Para Produção De Tanase Por *Aspergillus Sp* Isolado Do Solo Da Caatinga De

Pernambuco, Brasil. E-exacta, Belo-Horizonte, v. 7, n. 1, p. 95-103, 2014. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/298209023_UTILIZACAO_DE_RESIDUOS_AGROINDUSTRIAS_PARA_PRODUCAO_DE_TANASE_POR ASPERGILLUS SP ISOLADO DO SOLO DA CAATINGA DE PERNAMBUCO BRASIL . Acesso em: 28 abr. 2020.

PINTO, Gustavo Adolfo Saavedra; COURI, Sonia; LEITE, Selma Gomes Ferreira; BRITO, Edy Sousa De. Tanase: Conceito, produção e aplicação. Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, Curitiba, v. 23, n. 2, p. 435-462, Jul./Dez. 2015. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/4475> . Acesso em: 28 abr. 2020.

SOARES, Camila Fernanda. Isolamento de microrganismos para a produção da enzima tanase utilizando técnica de fermentação em estado sólido. 2014. 36 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação no curso de Ciências Biológicas) - Instituto Federal de São Paulo – Campus São Roque, [S. l.], 2014. Disponível em: https://issuu.com/bibliotecaifpsaoroque/docs/tcc_camila_fernanda_soares . Acesso em: 28 abr. 2020.