

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

LUCIANO DOS SANTOS ALMEIDA

**BIOPROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMO COM POTENCIAL PARA
PRODUÇÃO DA ENZIMA TANASE**

Bagé – RS

2014

LUCIANO DOS SANTOS ALMEIDA

**BIOPROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMO COM POTENCIAL PARA
PRODUÇÃO DA ENZIMA TANASE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao programa de Pós-graduação Lato sensu em Especialização em Processos Agroindustriais da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção de do Título de Especialista em Processos Agroindustriais

Área de concentração: Ciências Agrárias

Dissertação defendida e aprovada em:

Banca examinadora:

Prof. Doutora Ana Paula Manera
Orientador
UNIPAMPA

Prof. Doutora Caroline Costa Moraes
Co-orientador
UNIPAMPA

Prof. Doutor Fernando Zocche
UNIPAMPA

Prof. Doutor Paulo Duarte Filho
UNIPAMPA

Dedico este trabalho a minha esposa Candice e nossas filhas Laura e Antonia, pela insistência e paciência.

AGRADECIMENTOS

A minha família, pilar de sustentação, prestimosa esposa Candice e nossas duas eternas alegrias, nossas filhas Laura e Antônia.

Aos meus queridos pais Osmar Almeida e Maria Aparecida, minhas irmãs, minha sogra, e meus saudosos avós (*in memoriam*).

A orientação das professoras Ana Paula Manera e Caroline Costa Moraes, exemplos de pessoas, de dedicação e trabalho a serem seguidos e pela convivência.

Aos amigos, André Godinho, Renato Diaz Santa Helena e Clarisse Colares, pelas Heineken's do dia a dia.

Ao querido Laboratório de Microbiologia e Toxicologia de Alimentos que nos trás alegrias e surpresas diariamente.

Juízes dos Homens Cansados

Os esgotados, sem exceção, amaldiçoam o sol;
O valor das árvores, para eles, reside na sombra!

Friedrich Wilhelm Nietzsche
em A Gaia Ciência

RESUMO

A tanase é uma enzima caracterizada pela hidrólise de ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis produzindo glicose e ácido gálico, é encontrada em uma gama de espécies vegetais assim como na mucosa dos ruminantes, intestino dos bovinos, entretanto, os principais produtores e a maioria dos estudos concentram-se nos micro-organismos, como fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Essa enzima possui inúmeras aplicações como produção de ácido gálico, utilizado na indústria farmacêutica, produção de chás instantâneos, clarificação de sucos, cervejas e processamento de vinhos, no pré-tratamento de rações animais, no tratamento de efluentes de curtume e na indústria de couros. Apesar de inúmeras aplicações a produção da tanase ainda é considerada um processo de alto custo industrial, por passar por um longo período de processos biotecnológicos além da falta de organismos que viabilizem uma maior produção. O conhecimento da biodiversidade e bioprospecção de novos organismos tornaram-se um dos focos principais da era biotecnológica, visto que a utilização destes organismos na busca de soluções nas mais diversas áreas como na de alimentos, saúde, meio ambiente e indústria vem crescendo de forma acelerada, tendo em vista disso, o objetivo do projeto é a bioprospecção micro-organismos com potencial para produção de tanase a partir de fontes naturais vegetais. Foi realizado a bioprospecção de fontes vegetais como cascas de acácia, banana, farelo e casaca de arroz, folha de erva mate e marmelo para isolamento de micro – organismos com potencial produção de tanase. Estas amostras foram higienizadas e incubadas a 25°C em ágar batata por quatro dias, após os micro-organismos que se desenvolveram foram isolados em meio específico Czapek Dox e incubados, os organismos que apresentaram a formação de halo inibitório são identificados como produtores de tanase. Foram identificados sete fungos com potencial para produzir a tanase, demonstrando a viabilidade de fontes vegetais para bioprospecção de organismos produtores de tanase.

Palavras chave: seleção de micro-organismos, enzimas, taninos

ABSTRACT

The tannase is an enzyme characterized by the hydrolysis of esters and lateral connections glucose hydrolysable tannins and gallic acid, is found in a range of plant species as well as in the mucosa of the ruminant intestines of cattle, however, the main producers and most studies focus on micro-organisms, such as filamentous fungi, yeasts and bacteria. This enzyme has many applications such as production of gallic acid, used in the pharmaceutical industry, production of instant teas, clarification of juices, beers and wine processing, pre-treatment of animal feed, in the treatment of effluents from tannery and leather industry . Despite numerous applications of tannase production is still considered a process of high manufacturing cost, by going through a long period of biotechnological processes and the lack of bodies that enable greater production. Knowledge of biodiversity and bioprospecting of new bodies have become a major focus of the biotechnology era, since the use of these organisms in the search for solutions in several areas such as in the food, health, environment and industry is growing at an accelerated rate in view of this, the objective of the project is the micro-organisms with potential for production of tannase from natural plant sources bioprospecting. Organisms with potential production of tannase - bioprospecting of plant sources such as bark acacia, banana, rice bran and tails, leaf yerba mate and quince for isolating micro was performed. These samples were cleaned and incubated at 25 ° C on potato agar for four days after the microorganisms have been isolated that have developed specific Cezapek Dox medium and incubated bodies which showed the formation of inhibitory halo are identified as producers of tannase . Seven manufacturers of tannase fungi were identified, demonstrating the viability of plant sources for bioprospecting of tannase-producing.

Keywords: selection of micro-organisms, enzymes, tannins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Polímeros de flavan.....	15
Figura 2 - Estrutura química de um tanino hidrolisável.....	16
Figura 3 - Ligação depsídica.....	17
Figura 4 - Hidrólise do ácido tânico pela tanase.....	21
Figura 5 - Fluxograma da primeira etapa, higienização da amostras.....	28
Figura 6 - Metodologia para seleção dos micro-organismos.....	30
Figura 7 – Representação da 1° seleção com ramos de oliveira em ágar batata dextrose, com crescimento fúngico.....	32
Figura 8- Representação da 2° seleção, e constatação de halo ao redor de um fungo.....	33
Figura 9 - Fungo filamentososo com formação de halo de degradação, oriundo de uma amostra de noz pecã.....	34
Figura 10 - Micro-organismos com potencial para produzir tanase.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Micro-organismos produtores de tanase.....	25
Tabela 2 - Representa as fontes e respectivas amostras.....	33
Tabela 3 - Fontes vegetais que apresentaram micro-organismos com potencial para produção de tanase.....	34

SUMÁRIO

1. Introdução.....	10
2. Revisão bibliográfica.....	12
2.1 Bioprospecção.....	12
2.2 Taninos.....	13
2.2.3 Utilização dos taninos.....	14
2.2.4 Taninos condensados.....	15
2.2.5 Taninos hidrolisáveis.....	16
2.3 Tanase.....	18
2.3.1 Aplicações da tanase.....	21
2.3.2 Fontes de tanase.....	24
3. Metodologia.....	28
3.1 Seleção das fontes vegetais.....	28
3.2 Bioprospecção de micro-organismos produtores de tanase.....	29
4. Resultados e discussão.....	32
5. Considerações finais.....	37
Referências bibliográficas.....	38

1 INTRODUÇÃO

A tanase ou tanino acil hidrolise (E.C: 3.1.1.20), é uma enzima que se caracteriza pela hidrólise de ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis produzindo glicose e ácido gálico (BANERJEE et al., 2001). Esta enzima pode ser encontrada em uma gama de espécies vegetais como das famílias *Choripetalae* das dicotiledôneas, dicotiledôneas herbáceas e lenhosas (MELLO; SANTOS, 2001), no rúmen dos ruminantes e intestino dos bovinos, entretanto, os principais produtores e a grande maioria dos estudos concentram-se nos micro-organismos, na sua grande maioria fungos filamentosos, leveduras e bactérias, uma vez que as enzimas produzidas por estes organismos são mais estáveis do que aquelas produzidas por outras fontes (BANERJEE et al., 2000).

Tanase possui uma série de aplicações industriais incluindo a produção de ácido gálico, utilizado na indústria farmacêutica para produção de drogas antibacterianas, produção de chás instantâneos, clarificação de sucos, cervejas e processamento de vinhos. A aplicação da tanase em alimentos e bebidas contribui de maneira contundente no processo de remover os efeitos indesejados dos taninos (BELUR et al., 2011).

Essa enzima ainda pode ser empregada no pré-tratamento de rações animais, no tratamento de efluentes de curtume e na indústria de couros, essa ampla utilização se deve em grande parte a estabilidade que esta enzima possui (MUKHERJEE; BANERJEE, 2006).

Os taninos são classificados em dois tipos, hidrolisáveis e condensados, os taninos que sofrem hidrólise por ação da tanase, na qual são denominados taninos hidrolisáveis, são caracterizados por apresentarem ligações esterásicas e depsidásica, além de serem compostos tóxicos e bacteriostáticos, no qual protegem as partes mais vulneráveis das plantas de ataques de micro-organismos como fungos e bactérias (BELUR et al., 2011). Ainda segundo Belur et al. (2011), embora as propriedades antimicrobianas dos taninos, alguns fungos, leveduras e bactérias são resistentes a ação dos taninos, inclusive vindo a crescer e se desenvolver neles (BHAT et al., 1998).

A tanase é uma enzima induzível, ou seja, é produzida em maior quantidade na presença de ácido tânico ou do seu produto final, que é o ácido gálico (COSTA, 2012), ou seja, a utilização do ácido tânico ou outro indutor como fonte carbono se torna fundamental para que o micro-organismo produza a tanase, entretanto outras fontes de carbono até podem

estar presentes no meio, mas a concentração de ácido tânico se torna fator predominante na produção da E.C: 3.1.1.20 (BATTESTIN, 2007).

Apesar de inúmeras aplicações industriais da tanase, a sua produção ainda é considerada um processo de alto custo industrial, por passar por um longos processos biotecnológicos (BELUR et al., 2011), além do seu elevado custo de produção, fatores com matéria prima como fonte de substrato e micro-organismos que viabilizem uma produção contínua são percalços que ainda necessitam serem abolidos.

Uma das alternativas para contornar essa situação seria a utilização de subprodutos agrícolas para servir de substrato para o crescimento de micro-organismos, em face disso a Região da Campanha, na qual compreende municípios do sul do Rio Grande do Sul, entre eles, Bagé. Estes municípios são caracterizados pela vasta produção agroindustrial e conseqüentemente pela geração de subprodutos agrícolas, estes, possuem grande potencial de servirem como substrato para a produção de organismos que possam produzir a tanase.

Outro fator de extrema importância é a seleção de micro-organismos produtores de tanase. O conhecimento da biodiversidade e bioprospecção de novos organismos tornaram-se um dos focos principais da era biotecnológica, visto que a utilização destes organismos na busca de soluções nas mais diversas áreas como na de alimentos, saúde, meio ambiente e indústria vem crescendo de forma acelerada no cenário mundial (DELABONA, 2011).

Tendo em vista do exposto acima, tem-se o objetivo de realizar a bioprospecção micro-organismos com potencial para produção de tanase a partir de fontes naturais vegetais, para compor um banco de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia e Toxicologia de Alimentos da Universidade Federal do Pampa, Campus Bagé.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bioprospecção

O Brasil é reconhecido internacionalmente por ter uma biodiversidade extremamente alta, sendo considerada a mais rica do planeta, no território nacional há duas regiões consideradas **Hotspot**, a Mata Atlântica e o Cerrado, este conceito criado pelo ecólogo Norman Myers, para determinar as áreas mais importantes para a preservação da biodiversidade da Terra. Esta diversidade biológica tem sido extensivamente explorada desde os primórdios da ocupação do território sul-americano, há pelo menos 15.000 anos (FUSELLI et al., 2003).

O homem sempre explorou os recursos naturais, utilizando-os para as mais diversas finalidades primeiramente como alimento, proteção entre outros. Essa utilização se tornou cada vez mais avançada surgindo desta maneira, por exemplo, muitos medicamentos, inseticidas, cosméticos etc. Isso se deve ao fato do homem conseguir domesticar inúmeras espécies, e com isso surgiu a probabilidade de um maior conhecimento e conseqüentemente a possibilidade de utilização, resultando incondicionalmente inclusive, na evolução de nossa espécie. Com isso a bioprospecção é a mais antiga atividade humana já registrada (BERLINCK, 2012).

Contudo, o termo bioprospecção é relativamente novo, de acordo com Berlinck (2012), ele foi descrito primeiramente em 1993, sendo descrito como “a exploração da biodiversidade para a descoberta de recursos genéticos e substâncias bioquímicas comercialmente úteis” (LAIR, 2002).

No Brasil o termo bioprospecção foi definido conforme inciso VII, artigo 7º da medida provisória nº2186/2001, (Brasil, 2001), “bioprospecção é qualquer atividade exploratória que visa identificar componente do patrimônio genético e informação sobre conhecimento tradicional associado com potencial de uso comercial”. Ainda segundo Saccaro Júnior (2011), é a busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e patentes provenientes de seres vivos, que tenham potencial econômico, e eventualmente, levam ao desenvolvimento de um produto.

Estes são apenas alguns de muitos conceitos envolvendo o termo bioprospecção, porém, vale ressaltar que o meio ambiente externo assim como as relações entre seres vivos alteram suas relações e atitudes, este por consequência influencia de maneira significativa o

metabolismo, e estas relações e resultados ainda não são contemplados pelo termo bioprospecção.

Os micro-organismos são fundamentais para o meio ambiente, desempenhando funções únicas e cruciais como a manutenção dos ecossistemas, atuando inclusive nos ciclos biogeoquímicos assim como nas cadeias tróficas (DELABONA, 2001), contudo, o conhecimento sobre o padrão de biodiversidade dos micro-organismos sejam eles fungos e bactérias ainda são escassos. Estima-se que o conhecimento da biodiversidade dos micro-organismos não ultrapasse os 10% (BURKE et al., 2011), no caso dos fungos, são conhecidos aproximadamente cerca de 5% a 15% da estimativa global que gira em torno de 100.000 espécies (KIRK et al., 2008), porém, estimativas propõe que este número seja de pelo menos 1,5 milhões de espécies (HAWKSWORTH, 2006).

Como indicam os dados expostos acima, a probabilidade de um número bem maior de fungos produtores da tanase se torna evidente, justificando desta maneira o acréscimo de pesquisas que identifiquem mais organismos produtores desta enzima. São múltiplos outros exemplos que confirmam o emprego dos recursos microbianos pelo homem, exposto sua importância de utilização nos mais diversos campos, como na produção de compostos comerciais seja na indústria alimentícia, como por exemplo, em alimentos funcionais denominados pré-bióticos e pró-bióticos, na indústria farmacêutica, como no próprio caso da tanase, que ao quebrar o tanino hidrolisável em glicose e ácido gálico, este último é utilizado para a formulação de droga anti-malárica, e produção de enzimas, importantíssimos catalisadores biológicos.

Essa exploração dos micro-organismos pela indústria gera bilhões de dólares ao ano (SÁNCHEZ, 2009). Em relação ao valor dos micro-organismos, como cita Delabona (2001), geralmente estes são avaliados de acordo com o potencial de aplicação direta nos processos biotecnológicos, ou o valor de mercado dos produtos derivados (OLIVEIRA; SETTE; FANTINATTI-GARBOGGINI, 2006, SINGHANIA et al., 2010).

Tendo em vista os dados aqui descritos, a bioprospecção se torna uma ferramenta de extrema importância e necessidade, para que novas pesquisas nas mais diversas áreas possam avançar ainda mais.

2.2 Taninos

O termo “tanino” remonta a antiguidade, segundo relatos foi introduzido por M. Seguin em 1876, e foi o nome dado à infusão de cascas de algumas árvores, na qual as peles

de animais eram tratadas para obtenção de couros maleáveis e de grande durabilidade (CARVALHO, 2011).

De origem vegetal os taninos são encontrados em uma grande gama de vegetais tanto nas angiospermas como nas gimnospermas, principalmente em plantas lenhosas (MELLO; SANTOS, 2001), são considerados compostos metabólicos secundários ou especiais das plantas, exercem importantes funções no que diz respeito nas interações planta - meio ambiente, agindo de diferentes maneiras, seja como antimicrobiano ou atuando como fagoinibidores de seres que praticam herbivoria.

Os taninos são compostos fenólicos de grande interesse econômico e ecológico, apresentam solubilidade em água e peso molecular compreendido entre 500 e 3000 Dalton, possuindo a habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcalóides (MELLO; SANTOS, 2001). Tais compostos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais, devido à precipitação de glucoproteínas salivares, o que ocasiona a perda do poder lubrificante (BRUNETON, 1991). Quimicamente os taninos são classificados como condensados e hidrolisáveis.

2.2.3 Utilização dos taninos

Inúmeros estudos apontam a importância e utilização dos taninos nas mais diversas áreas, sejam na indústria farmacêutica, no tratamento de efluentes, na indústria alimentícia entre outras. Castejon et al. (2011), aponta a importante ação antibacteriana na reparação de tecidos, regulação enzimática e protéica, entre outros. Estes efeitos dependem da dose, tipo de tanino ingerido e período de ingestão. Atividades bactericidas e fungicidas ocorrem por três características gerais comuns aos dois grupos de taninos: complexação com íons metálicos; atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres; habilidade de complexar com outras moléculas, principalmente proteínas e polissacarídeos (MELLO; SANTOS, 2001).

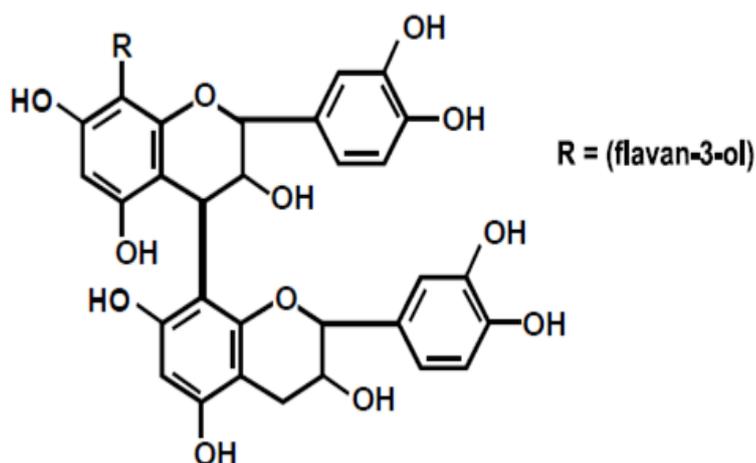
Na área farmacêutica, os taninos são utilizados como antídotos em intoxicações ocasionadas por metais pesados e alcalóides, como cicatrizante, hemostático, antidiarréicos, antioxidantes, anti-sépticos (GUEDES, 2012). Ainda segundo Guedes (2012), a utilização dos taninos na indústria química é ampla, como na fabricação de tintas, produção de espumas de uretano, juntamente com outros compostos ocorre à produção de agentes flocculantes e coagulantes agindo no tratamento da água.

2.2.4 Taninos condensados

Os taninos condensados, ou proantocianidinas, são encontrados em diversos vegetais, principalmente em plantas lenhosas, e são mais vastamente distribuídos no reino vegetal que os taninos hidrolisáveis, também mais comuns na dieta humana do que os taninos hidrolisáveis, e estão presentes em concentrações relativamente importantes em alguns frutos (uvas, maçãs, etc.) e suas bebidas derivadas, no cacau e chocolate (SANTOS-BUELGA; SCALBERT, 2000).

Essa classe de taninos é constituída de polímeros de flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol, como pode ser visualiza na Figura 1. As proantocianidinas são assim denominadas, provavelmente pelo fato de apresentarem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, como cianidina e delphinidina (MELLO; SANTOS, 2001). Os flavonóides são a maior classe de polifenóis, constituídos de dois anéis aromáticos ligados por um anel heterocíclico e podem ser divididos em subclasses como: flavonóides, flavonas e flavanonas (FARIA, 2005).

Figura 1 – Polímeros de flavan que constitui os taninos.



Fonte: Lekha & Losane (1997).

Taninos condensados possuem estrutura química compacta e complexa, são resistente à hidrólise, porem solúveis em solventes orgânicos aquosos, dependendo da estrutura

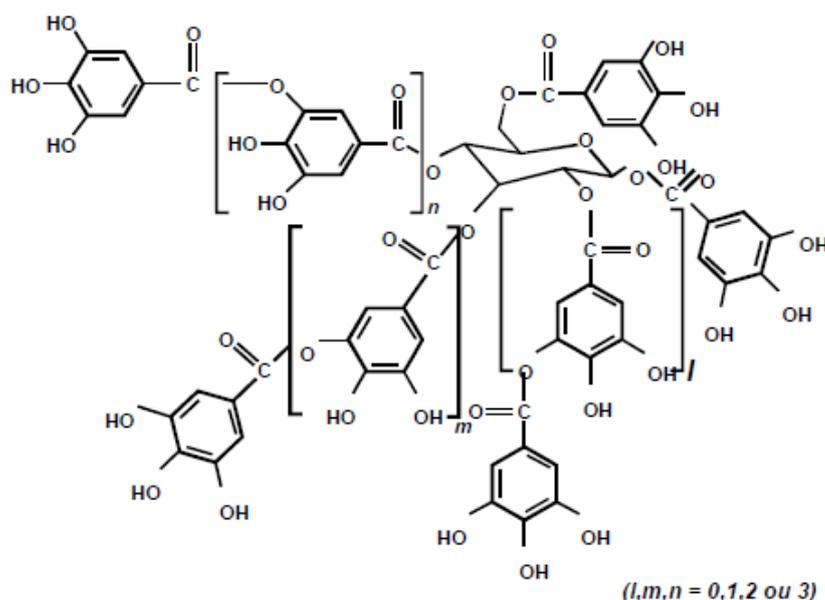
(BATTESTIN, 2007). Em virtude de suas estruturas químicas, sem a presença de ligações éster e depsídica, as proantocianidinas não são susceptíveis a hidrólise pela enzima tanase (PINTO, 2003).

2.2.5 Taninos hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis estão presentes nas famílias *Choripetales* das dicotiledôneas, dicotiledôneas herbáceas e lenhosas (MELLO & SANTOS, 2001). Esses taninos são unidos por ligações esterásicas (ligação entre o grupo anel aromática e glicose) e depsidásica (ligações entre anéis aromáticos), constituídos por poliésteres de ácido gálico e diferentes carboidratos, sendo de imediato hidrolisado por ácidos, bases e enzimas, como a tanase, dando origem à açúcares, alcoóis e ácidos carboxílicos fenólicos (MELO, 2008).

A unidade estrutural básica deste tipo de tanino é um poliol, usualmente glicose, com grupos hidroxilas esterificados pelo ácido gálico ou pelo hexahidroxi-difênico (BATTESTIN, 2007). Na Figura 2, pode ser visualizado a estrutura de um tanino hidrolisável.

Figura 2 - Estrutura química de um tanino hidrolisável.

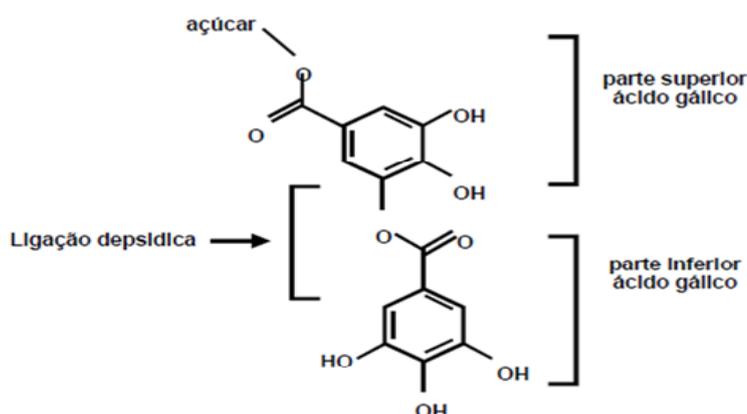


Fonte: Nakamura et al. (2003).

Esses taninos sendo hidrolisáveis por ácidos, bases e enzimas, como no caso da tanase, são também divididos em suas unidades formadoras sendo classificados em galotaninos e elagitaninos.

Galotaninos são os taninos hidrolisáveis mais simples em ocorrência de sua estrutura básica corresponde a um núcleo poliol ligado a moléculas de ácido gálico, compostos por unidades de ácido gálico unidas por ligações depsídicas entre elas, como se pode observar na Figura 3. Segundo Clifford et al. (2000), esses taninos são considerados extremamente raros na dieta humana. Esse tipo de tanino é comumente encontrado em pétalas de rosas vermelhas, castanheiras, carvalhos, tara, amamélis, cravo e na maioria dos frutos como caqui e banana (BENAVIDES, 2011), e atuam como um intermediário para a biossíntese de taninos hidrolisáveis mais complexos (CARVALHO, 2010).

Figura 3 - Ligação depsídica formada entre o grupo fenólico superior e o grupo inferior de uma unidade de ácido gálico.



Fonte: Harvey (2001).

Já os taninos denominados elagitaninos, oriundos do metabolismo secundário das espécies dicotiledôneas das angiospermas (QUIDEAU, 1996), são formados a partir dos galotaninos, mais precisamente da pentagalolilglicose originando polifenóis no qual os grupos fenólicos utilizados são moléculas de ácido hexahidroxidifênico que podem se desidratar espontaneamente para formar sua dilactona estável, o ácido elágico (MELO, 2008).

Segundo Castejon, (2011), na alimentação humana os elagitaninos são encontrados apenas em grupos restritos de alimentos tais como framboesa, morango, castanha, avelã, caju e pistache. Estes taninos foram encontrados, também, em partes não comestíveis de plantas, como as folhas. É possível encontrar taninos elágicos em vinhos envelhecidos em barricas de madeira de carvalho, como resultado da sua difusão da madeira durante o estágio de produção em barricas (CLIFFORD et al., 2000).

2.3 Tanase

O primeiro relato envolvendo indícios da enzima tanase ou tanino acil hidrolase (E.C: 3.1.1.20), se deu no ano de 1786, quando Scheele observou a presença de ácido gálico em um extrato aquoso de amêndoas (KNUDSON, 1913). Ainda segundo Knudson (1913), a partir desta descoberta, outro cientista chamado Robiquet, em 1837, suspeitou que um micro-organismo liberasse ácido gálico durante o processo fermentativo, posteriormente Loraque em (1841), considerou a produção de ácido gálico a partir do ácido tânico através de um processo fermentativo ou oxidativo (BELUR, et al., 2011). Em 1867, Van Teighem, finalmente demonstrou que a formação do ácido gálico era devido à ação de fungos, um deles se tratava do *Penicillium glaucum* e um novo organismo no qual denominou de *Aspergillus niger* (KNUDSON, 1913).

Todavia, os primeiros ensaios extensos sobre as características da tanase como aplicações, mecanismo de reação, especificidade e fontes se deram no início do século XX. Tais estudos ainda revelaram que a tanase é uma enzima induzível a partir da fermentação em estado sólido por fungos filamentosos como *Aspergillus* e *Penicillium* (BELUR, et al., 2011). Com o avanços desses estudos e pesquisas envolvendo produção, e isolamento de organismos produtores de tanase, assim como as aplicações, resultaram em um grande número de publicações científicas e patentes (AGUIAR, et al., 2007).

Estes estudos elucidaram entre outros fatores as propriedades da tanase, comprovando-se a sua atuação sobre os taninos hidrolisáveis, decompondo-os e produzindo a partir disso, ácido gálico e glicose.

Até o fim da década de setenta acreditava-se que somente os fungos tinham a capacidade de produzir a enzima tanase, porém, no início dos anos oitenta constatou-se que algumas bactérias também produziam a enzima em questão (DECHAMPS et al., 1983), mais tarde houve a constatação de que alguns animais ruminantes também tinham a capacidade de

produzir a tanase (LEKHA; LOSANE, 1997). No caso dos animais, pesquisas posteriores indicaram que os micro-organismos colonizadores desses animais são os produtores reais, e não os animais (BELUR, et al., 2011).

Em um estudo realizado em 2011 pelos pesquisadores Belur e Mugeraya (2011), apontaram 35 fungos filamentosos, a maioria dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* produtores de tanase, além de listarem 32 isolados de estirpes de bactérias e quatro espécies de leveduras produtores de tanase.

Ainda na década de setenta teve início à concessão de diversas patentes a respeito do potencial de aplicação da tanase na indústria de alimentos e bebidas, sendo que algumas aplicações já são exploradas comercialmente, devido ao elevado custo da enzima (VAN DE GEMAAT; PYLE, 2006), empresas como a Biocon (Índia), Kikkoman (Japão) e AAS Specilaenzyme GmbH (Alemanha) já produzem em escala comercial a tanase (BELMARES et al., 2004), além de já existirem inúmeras publicações referenciando a produção e aplicação da tanase bem como a bioprospecção de organismos produtores da enzima.

Com a intensificação dos estudos, logo se reconheceu a produção de ácido gálico a partir de materiais que continham tanino (BELUR, et al., 2011). Toth e Barsony (1943) demonstraram que a produção do ácido gálico era proveniente da atividade esterásica e depsidásica.

Enzimas são catalisadores orgânicos produzidos por células vivas, que participam das reações químicas nos processos vitais. Estas moléculas são capazes de atuar em todas as principais macromoléculas biológicas, como as proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucléicos, assim como em moléculas menores, como os aminoácidos, os açúcares e as vitaminas (SOUZA et al., 2001).

A tanase é uma enzima do tipo hidrolase, pois se caracteriza pela ação hidrolítica em complexos polifenólicos, tendo a capacidade de hidrolisar ligações éster e ligações depsídicas em substratos como ácido tânico, epicatequinagalato, epigalocatequinagalato, ácido clorogênico entre outros (BATTESTIN, 2007). Esta enzima pode ser encontrada em uma gama de espécies vegetais como das famílias *Choripetalae* das dicotiledôneas, dicotiledôneas herbáceas e lenhosas (MELLO & SANTOS, 2001), embora os taninos apresentem propriedades antimicrobianas, muitos fungos filamentosos, bactérias e leveduras são bastante resistentes a taninos, podendo crescer e a desenvolver-se neles (BATH et al. 1998). Embora a

tanase possa ser encontrada na mucosa dos ruminantes e intestino dos bovinos, os principais produtores e a grande maioria dos estudos concentram-se nos micro-organismos, na sua grande maioria fungos filamentosos, leveduras e bactérias, uma vez que as enzimas produzidas por estes organismos são mais estáveis do que aquelas produzidas de outra maneira (BANERJEE et al., 2000).

Como os taninos fazem parte do sistema de defesa, sendo um composto de origem secundária nas plantas, Pinto et al. (2005), consideram que a produção de tanase também é considerada como parte do contra-ataque microbiano. A atuação da tanase se dá quando ocorre a invasão da planta hospedeira, por parte da hidrólise dos compostos fenólicos, que ocorrem em tecidos vivos ou em decomposição, mais precisamente nos taninos hidrolisáveis (SCALBERT, 1991). Pesquisas desenvolvidas por Lekha e Losane (1997), assinalam que micro-organismos que habitam o solo e são produtores de tanase, desempenham um papel ativo na decomposição e reciclagem de materiais orgânicos ricos em taninos, sendo assim, estas espécies de micro-organismos apresentam uma vantagem competitiva frente a determinados habitats (PINTO et al., 2005).

Tanase é uma enzima ligada à membrana (intracelular) ou extracelular (GOUVEIA et al., 2012), induzível, produzida na presença de ácido tânico, que catalisa a hidrólise de ligações éster e depsídicas em taninos hidrolisáveis, produzindo glicose e ácido gálico (DESCHAMPS et al., 1983). A indução se dá pela presença do ácido tânico como fonte principal de carbono, apesar de outras fontes de carbono, a concentração de ácido tânico constitui um fator preponderante na produção de tanase (BATTESTIN, 2007).

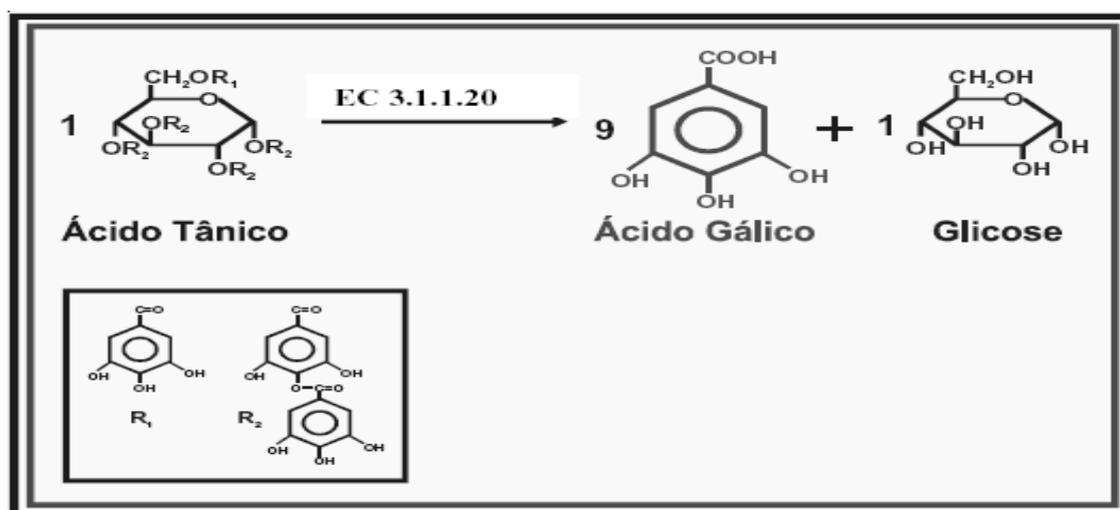
A tanase aplica-se sobre os taninos hidrolisáveis decompondo-os. Beverini e Metche (1990), conseguiram isolar duas isoformas de tanase fúngica, denominadas I e II. A tanase denominada I apresenta atividade sobre a ligação éster (entre o grupo anel aromático e resíduo de glicose) enquanto a II atua na ligação depsídica (entre os anéis aromáticos), conforme Battestin (2007). Entretanto estudos realizados por Haslam e Stragroom (1996), indicam que a proporção entre as duas atividades pode variar de acordo com as condições de cultivo, assim como as duas isoformas podem ser responsáveis pelas duas atividades.

Em relação ao pH ótimo da enzima, se apresenta na faixa de 5,5 - 6,5, porém apresenta estabilidade na faixa de 3,5 a 8,0, com temperatura de estabilidade entre 30°C a 70°C, com faixa ótima de 30°C a 50°C, e massa molecular entre 70kDa e 300kDa (BATTESTIN, 2007).

Tais fatores estão intrinsecamente relacionados com as condições de cultivo empregado, bem como a linhagem utilizada para a produção da tanase.

Abaixo, a Figura 4, demonstra a reação da enzima tanase (EC 3.1.1.20) sobre o ácido tânico, no qual origina ácido gálico e glicose, os dois outros radicais são dois ésteres galoíl e digaloíl.

Figura 4 - Hidrólise do ácido tânico pela tanase.



Fonte: Aguilar et al., 1999

2.3.1 Aplicações da tanase

Apesar das inúmeras aplicações da tanase nas mais diversas áreas, sua utilização ainda é bastante restrita devido basicamente, ao alto custo de produção.

Essa enzima possui uma série de aplicações industriais incluindo a produção de ácido gálico, no qual é utilizado pela indústria farmacêutica na produção de drogas antibacterianas e também na fabricação de uma droga com efeito antimalárico denominado trimetropina, na produção de chás instantâneos, clarificação de sucos, cervejas e processamento de vinhos na indústria de alimentos. Essa enzima pode ser usada também no pré-tratamento de rações animais e no tratamento de efluentes de curtume da indústria de couros (MUKHERJEE; BANERJEE, 2006).

A seguir estão descritas algumas aplicações da enzima tanase.

I. Produção de ácido gálico: a principal utilização do ácido gálico é direcionada a indústria farmacêutica, seu uso se dá na síntese de trimetropina, um antibacteriano normalmente utilizado juntamente com sulfonamida, as duas substâncias juntas apresentam um amplo espectro de ação (PINTO et al., 2005), sendo bastante comum no tratamento da malária.

II. Clarificação de sucos: a aplicação industrial da tanase em alimentos e bebidas contribui para remover os efeitos indesejados dos taninos, como a adstringência, além de atuar na diminuição da turbidez de alguns sucos de frutas e bebidas geladas a base de café, conforme Lekha e Losane (1994) o uso desta enzima atua na remoção de compostos fenólicos que se fazem presentes no material vegetal, a fim de evitar a complexação e precipitação.

III. Estabilização de vinhos: assim como na utilização de sucos de frutas, a tanase tem sido empregada na fabricação de vinhos para a remoção dos compostos fenólicos, assim fornece estabilização e incrementa a qualidade dos vinhos (LEKHA; LOSANE, 1997). A coloração dos vinhos se deve a cerca de 50% à presença de taninos, e sua oxidação pode gerar quinonas, podendo causar turbidez indesejada o que afeta conseqüentemente a qualidade da bebida. A tanase age na redução da turbidez, pois evita a oxidação dos taninos.

IV. Fabricação de chás instantâneos: o chá é considerado uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo, isso se deve a seus padrões de aroma, sabor e efeitos medicinais (KHOKHAR; MAGNUSDOTTIR, 2002). Um dos principais problemas envolvendo chás instantâneos é a formação de um “creme” (precipitado insolúvel em água na qual se forma naturalmente em bebidas a base de chá a 4°C ou temperaturas inferiores). Este creme é um complexo de polifenóis poliméricos presentes nos chás. Na preparação do chá instantâneo pelo método convencional, o extrato solúvel em água quente é resfriado sob agitação e posteriormente centrifugado para a remoção do creme, este usualmente é descartado, representando uma perda considerável no que diz respeito aos componentes do sabor (PINTO et al., 2005).

Muitos consumidores evitam a utilização de pó de chás instantâneos justamente pela perda de sabor ou mesmo por considerar uma bebida com qualidade inferior (BELETINE et al., 2002), pois o método químico para a solubilização do creme envolve a utilização de sulfito, oxigênio molecular e substâncias alcalinas (SMITH, 1968; SANDERSON et al., 1974; LEKHA; LOSANE, 1997).

A implementação da tanase no processamento de fabricação do chá promove a redução da turbidez assim como aumenta a extração de compostos fenólicos e de voláteis

fazendo com que a bebida final (seja ela quente ou fria) apresente uma qualidade superior à obtida pelo método tradicional (TAKINO, 1976; TSAI, 1987). A utilização da enzima na manufatura de chás instantâneos apresenta uma redução de até 82% no teor de sólidos não-solúveis, conforme pesquisas realizadas por Lekha e Losane (1997).

- V. Fabricação de cerveja: como descrito anteriormente, a tanase pode ser empregada para diminuir a turbidez em bebidas que contenham compostos fenólicos, assim, o desenvolvimento da turbidez da cerveja durante a estocagem assim como a descoloração podem ser evitados com a hidrólise dos polifenóis do malte com a utilização da tanase (LEKHA; LOSANE, 1997).
- VI. Tratamento de efluentes: no tratamento de efluentes oriundos do processamento de couro e ácido tânico, esses afluentes possuem uma grande quantidade de taninos, principalmente polifenóis, que são poluentes considerados perigosos e de alto impacto ao meio ambiente além de ser nocivo à saúde. O uso da tanase com o objetivo de decompor os taninos constitui-se um tratamento de reduzido custo e alta eficácia na remoção destes compostos (BATTESTIN, 2007).
- VII. Detanificação de alimentos e rações animais: o emprego de enzimas em rações é comumente utilizado para possibilitar um aumento na assimilação dos nutrientes contidos na formulação de rações, facilitando a digestibilidade de componentes na qual o animal não digeriria facilmente. Os efeitos antinutricionais dos taninos são muito bem conhecidos, como redução da digestibilidade de proteínas, carboidratos e sais minerais, assim como promover a diminuição da atividade de enzimas digestivas, podendo causar danos a mucosa do sistema digestivo além de causar efeitos tóxicos sistêmicos (SREERAMA et al., 2010). A utilização da tanase para reduzir de maneira significativa os efeitos antinutricionais dos taninos, tanto nas rações animais como na própria alimentação humana traz benefícios como aumento da digestibilidade e conseqüentemente facilitando a assimilação do alimento, como Lekha e Losane (1997) descreveram, pois a tanase age hidrolisando os polifenóis, assim evitando a polimerização indesejada (BATTESTIN, 2007).
- VIII. Produção de antioxidantes: a oxidação dos alimentos constitui uma preocupação tanto para a indústria alimentícia como para os consumidores. Os métodos mais difundidos e empregados para se evitar a oxidação lipídica, por exemplo, é o uso de antioxidantes sintéticos, no qual é bastante utilizado para estabilizar óleos de fritura, gorduras, flocos de batata, emulsões cárneas, cereais pré-cozidos, produtos de panificação, leite de soja, produtos de frango, pizza congelada, queijos e alimentos

para animais (MAI et al., 1990). Poucos são os compostos sintéticos permitidos para o consumo humano como o BHT (butilhidroxitolueno) o PG (propilgalato), porém, mesmo os antioxidantes permitidos pela legislação, estão sendo examinados por agências reguladoras (PINTO et al., 2005), em contra partida os antioxidantes de fontes naturais tem recebido mais atenção, com pesquisas aumentando de maneira expressiva. O acréscimo da tanase nas mais diferentes etapas do processo faz com que aumente a característica antioxidante em razão da maior liberação do ácido gálico nos extratos (PINTO et al., 2005). Ainda segundo Pinto et al. (2005), os extratos são incorporados em proporções variadas, de acordo com o tipo de alimento suscetível a oxidação lipídica.

2.3.2 Fontes de tanase

A tanase pode ser encontrada em uma gama de espécies vegetais como das famílias *Choripetalae* das dicotiledôneas, dicotiledôneas herbáceas e lenhosas (MELLO & SANTOS, 2001), embora os taninos apresentando propriedades antimicrobianas, muitos fungos, bactérias e leveduras são bastante resistentes a taninos, podendo crescer e a desenvolver-se neles (BATH et al., 1998). Embora a tanase possa ser localizada na mucosa dos ruminantes e intestino dos bovinos, os principais produtores e a grande maioria dos estudos concentram-se nos micro-organismos, na sua grande maioria fungos filamentosos, leveduras e bactérias, uma vez que as enzimas produzidas por estes organismos são mais estáveis do que aquelas produzidas de outra maneira (BANERJEE et al., 2000).

A produção e aplicações de tanase têm sido extensivamente estudadas, investigações relacionadas com a estirpe, isolamento de micro-organismos melhora no desenvolvimento do processo e as aplicações de tanase resultaram em um grande número de publicações científicas e patentes (AGULIAR et al., 2007).

Embora a tanase possa estar presente em uma gama de plantas, animais e micro-organismos, ela é produzida principalmente por este último, como se pode verificar na Tabela 1.

Quanto à produção de tanase e aplicação, os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* e bactérias do gênero *Bacillus* têm sido amplamente utilizados para produção desta enzima (MONDAL et al., 2001a, b., PINTO et al., 2001).

A Tabela 1 apresenta os micro-organismos produtores de tanase, sendo eles de fontes fúngicas e bacteriana.

Tabela 1 - Micro-organismos produtores de tanase.

Micro-organismos	
Micro-organismo (fungos filamentosos)	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	Bradoo et al. (1996); Rana and Bhat (2005); Cruz-Hernandez et al. (2006); Treviño-Cueto et al.(2007); Murugan et al. (2007)
<i>Aspergillus japonicus</i>	Bradoo et al. (1997)
<i>Aspergillus gallonyces</i>	Belmares et al. (2004)
<i>Aspergillus awamori</i>	Bradoo et al. (1996); Mahapatra et al. (2005)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Batra and Saxena (2005)
<i>Aspergillus versicolor</i>	Batra and Saxena (2005)
<i>Aspergillus flavus</i>	Yamada et al. (1968); Batra and Saxena (2005)
<i>Aspergillus caespitosum</i>	Batra and Saxena (2005)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Bradoo et al. (1996)
<i>Aspergillus aculeatus</i>	Banerjee et al. (2001)
<i>Aspergillus aureus</i>	Bajpai and Patil (1997)
<i>Aspergillus fischeri</i>	Bajpai and Patil (1997)
<i>Aspergillus rugulosus</i>	Bradoo et al. (1996)
<i>Aspergillus terreus</i>	Bajpai and Patil (1997)
<i>Aspergillus foetidus</i>	Banerjee et al. (2005)
<i>Penicillium notatum</i>	Ganga et al. (1977)
<i>Penicillium islandicum</i>	Ganga et al. (1977)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Bradoo et al. (1996)
<i>Penicillium digitatum</i>	Bradoo et al. (1996)
<i>Penicillium acrellanum</i>	Bradoo et al. (1996)
<i>Penicillium caryophilum</i>	Bradoo et al. (1996)
<i>Penicillium citrinum</i>	Bradoo et al. (1996)
<i>Penicillium charlessi</i>	Bradoo et al. (1996); Batra and Saxena (2005)
<i>Penicillium variable</i>	Batra and Saxena (2005)
<i>Penicillium glaucum</i>	Lekha and Lonsane (1997)
<i>Penicillium crustosum</i>	Batra and Saxena (2005)
<i>Penicillium restrictum</i>	Batra and Saxena (2005)
<i>Penicillium glabrum</i>	Van de Lagemaat and Pyle (2005)
<i>Trichoderma aviride</i>	Bradoo et al. (1996)

<i>Trichoderma ahamatum</i>	Bradoo et al. (1996)
<i>Trichoderma aharzianum</i>	Bradoo et al. (1996)
<i>Fusarium solani</i>	Bradoo et al. (1996)
<i>Fusarium oxysporium</i>	Bradoo et al. (1996)
<i>Mucor sp.</i>	Belmares et al. (2004)
<i>Paecilomyces variotii</i>	Mahendran et al. (2005); Battestin and Alves-Macedo (2007)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Hadi et al. (1994); Purohit et al. (2006)
<i>Cryphonectria parasitica</i>	Farias et al. (1994)
<i>Heliocostylum sp.</i>	Bradoo et al. (1996)
<i>Cunninghamella sp.</i>	Bradoo et al. (1996)
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	Bradoo et al. (1996)
<i>Neurospora crassa</i>	Bradoo et al. (1996)
Micro-organismo (bactérias)	Referência
<i>Achromobacter sp</i>	Lewis and Starkey (1969)
<i>Bacillus cereus</i>	Mondal et al. (2001b)
<i>Bacillus lichiniiformis</i>	Mondal et al. (2000)
<i>Bacillus polymyxa</i>	Deschamps et al. (1983)
<i>Bacillus pumilus</i>	Deschamps et al. (1983)
<i>Bacillus thuringiensis</i> BN2	Belur et al. (2009)
<i>Citrobacter freundii</i>	Belmares et al. (2004)
<i>Citrobacter freundii</i>	Kumar et al. (1999)
<i>Corynebacterium sp.</i>	Deschamps et al. (1983)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Goel et al. (2005)
<i>Klebsilla planticola</i>	Deschamps et al. (1983)
<i>Klebsilla pneumoniae</i>	Deschamps et al. (1983)
<i>Lactobacillus acidilactici</i>	Nishitani et al. (2004)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Nishitani et al. (2004); Sabu et al. (2006)
<i>Lactobacillus animalis</i>	Nishitani et al. (2004)
<i>Lactobacillus buchneri</i>	Guzman-Lopez et al (2009)
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	Guzman-Lopez et al (2009)
<i>Lactobacillus murinus</i>	Nishitani et al. (2004)
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	Nishitani and Osawa (2003); Nishitani et al. (2004)
<i>Lactobacillus pentosaceus</i>	Nishitani et al. (2004)
<i>Lactobacillus pentosus</i>	Nishitani et al. (2004); Kostinek et al. (2007)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ayed and Hamdi (2002); Kostinek et al. (2007)
<i>Lactobacillus sp.</i> ASR-S1	Sabu et al. (2006)
<i>Leuconostoc fallax</i>	Kostinek et al. (2007)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Kostinek et al. (2007)

<i>Microbacterium terregens</i>	Belur et al. (2010a)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Nishitani et al. (2004)
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Nishitani et al. (2004)
<i>Providencia rettgeri</i>	Belur et al. (2010a)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sewal et al. (2010)
<i>Pseudomonas solanaceanum</i>	Deschamps et al. (1983)
<i>Selenomona sruminantium</i>	Belmares et al. (2004)
<i>Serratia ficaria</i>	Belur et al. (2010a)
<i>Serratia marcescens</i>	Belur et al. (2010a)
<i>Streptococcus bovis</i>	Belmares et al. (2004)
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	Sasaki et al. (2005)
<i>Weissella confusa</i>	Guzman-Lopez et al (2009)
<i>Weissella paramesenteroides</i>	Kostineket al. (2007)
Micro-organismo (leveduras)	Referência
<i>Candida sp.</i>	Aoki et al. (1976)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Zhong et al. (2004)
<i>Mycotorula japonica</i>	Belmares et al. (2004)
<i>Pichia spp.</i>	Deschamps et al. (1983)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Deschamps et al. (1983)

Fonte: Belur et al. (2011), Aguilar et al. (2007).

Como se pode constatar na Tabela 1, até o presente momento foram identificadas cerca de 41 fontes de tanase de fungos filamentosos, 38 de bactérias e 5 de leveduras. Estes números indicam atualmente a quantidade de organismos produtores da acil hidrólise (E.C: 3.1.1.20), porém este número pode estar muito aquém do verdadeiro número de micro-organismos produtores de tanase, uma vez que as espécies conhecidas de fungos, bactérias e leveduras giram em torno de centenas de milhares, condizendo com a necessidade de mais estudos nesta área.

3. Metodologia

3.1. Seleção das fontes vegetais

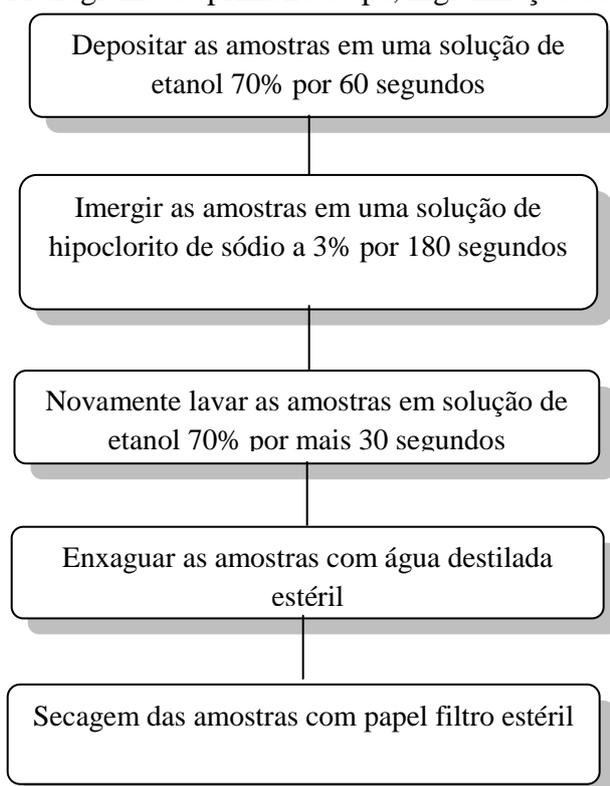
Todas as fases do projeto foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Toxicologia de Alimentos da Universidade Federal do Pampa, Campus Bagé.

A primeira etapa para a bioprospecção foi a escolha das fontes vegetais, no qual se deu de maneira aleatória e de acordo com a disponibilidade das mesmas.

Para a seleção dos micro-organismos foram escolhidas fontes vegetais como cascas, ramos e frutos onde podem ser localizados naturalmente organismos com potencial para produzir a enzima, como fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Neste projeto foram utilizadas cascas de *Acacia sp.* (acácia), *Carya illinoensis* (noz pecã), *Musa sp.* (banana) madura, ramos e frutos de *Olea sp.* (oliveira), folhas de *Ilex paraguaensis* (erva-mate) e cascas e farelo de *Oryza sp.*(arroz), frutos de *Cydonia oblonga* (marmelo), florescência de *Achyrocline satureioides* (macela) e borra de suco de uva.

Primeiramente foi realizada a assepsia do material orgânico visando diminuir a sua microbiota. A técnica incidiu em uma série de lavagens conforme protocolo descrito por Neto et al. (2002), conforme fluxograma a seguir.

Figura 5 - Fluxograma da primeira etapa, higienização da amostras.



3.2 Bioprospecção de micro-organismos produtores de tanase

Após o processo de assepsia, as amostras foram depositadas em placas de petri contendo ágar batata dextrose no qual foram acrescentados ácidos nalidíxico e ampicilina, 2,5 mL de cada. Todo o material utilizado foi devidamente esterilizado em autoclave por 15 min a 121°C.

As amostras foram incubadas em estufa bacteriológica a 25°C por um período de 4 dias. Esta primeira etapa foi designada como 1° seleção, pois o objetivo desta fase foi de selecionar micro-organismos presentes nas amostras vegetais.

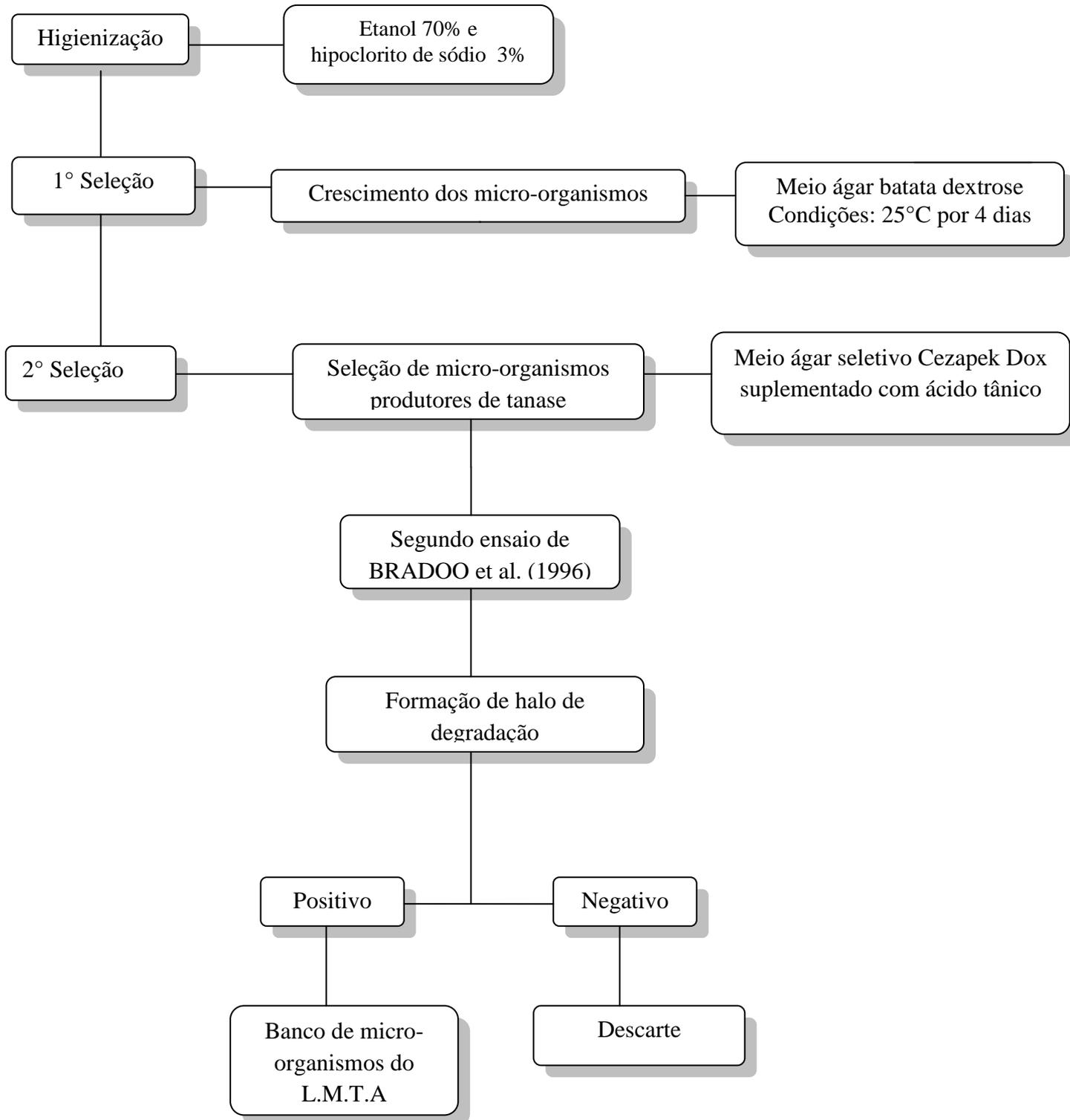
Após a primeira seleção, os micro-organismos que se desenvolveram foram transferidos para outro substrato contendo (g/L): glicose 30, nitrato de sódio 2, fosfato de potássio bibásico 1, sulfato de magnésio 0,5, cloreto de potássio 0,5, sulfato ferroso 0,01, ágar 15, e ácido tânico 1% as amostras forma incubadas em estufa bacteriológica por 4 dias a 25°C. Todo o material utilizado foi devidamente esterilizado em autoclave por 15 min a 121°C com exceção do ácido tânico no qual foi esterilizado por filtração utilizando membrana de 47 mm de diâmetro e 0,22 µm de porosidade.

Esta etapa se denominou como sendo a 2° seleção, cuja finalidade foi de realizar a triagem do micro-organismo com maior potencial para produzir a enzima de interesse, no caso a tanase.

O método utilizado para seleção do micro-organismo produtor de tanase seguiu o ensaio sugerido por Bradoo et al. (1996), que apresenta uma rápida resposta na identificação do organismo produtor de tanase, através da formação de halo de degradação do ácido tânico.

A metodologia de seleção dos micro-organismos com potencial para produção da enzima tanase está representada de forma resumida como ilustra a Figura 6.

Figura 6, metodologia para seleção dos micro-organismos.



Fonte: autor

Os organismos selecionados foram posteriormente acondicionados sob-refrigeração em ágar batata dextrose inclinado, em seguida foi acrescentado óleo mineral a fim de diminuir o metabolismo dos micro-organismos. Todos os micro-organismos selecionados estão compondo o banco de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia e Toxicologia de Alimentos, da Universidade Federal do Pampa, Campus Bagé, Rio Grande do Sul.

4. Resultados e discussão

Foram utilizadas para a realização deste projeto as seguintes fontes vegetais: cascas de *Acacia sp.* (acácia), *Carya illinoensis* (noz pecã), *Musa sp.* (banana), ramos e frutos de *Olea sp.* (oliveira), folhas de *Ilex paraguaensis* (erva-mate) e cascas e farelo de *Oryza sp.*(arroz), frutos de *Cydonia oblonga* (marmelo), florescência de *Achyrocline satureioides* (macela) e borra de suco de uva.

O processo de bioprospecção, após a escolha das fontes vegetais, foi dividido em 1º seleção e 2º seleção.

A primeira seleção incidiu no emprego das fontes vegetais em ágar batata dextrose, para que ocorresse o desenvolvimento de micro-organismos existentes naturalmente nas referidas fontes. Como se pode observar na Figura 7, no qual foram incubadas ramos e folhas de oliveira.

Figura 7 - Representa a 1º seleção com ramos de oliveira em ágar batata dextrose, com crescimento fúngico.

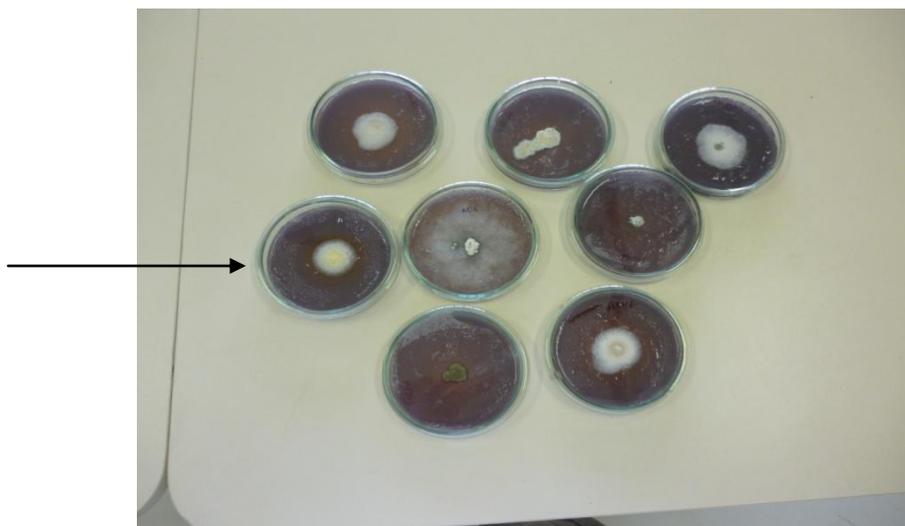


Fonte: autor

Logo após a 1º seleção, os micro-organismos que se desenvolveram foram removidos e acondicionados em meio específico Czapeck Dox, a fim de verificar o potencial dos micro-organismos para a produção da enzima.

A constatação da produção da tanase, por parte do micro-organismo, é verificada quando ocorre à formação de um halo ao seu redor, isso se deve a degradação do ácido tânico como única fonte de carbono, no qual pode se identificar de acordo com a Figura 8.

Figura 8 – Placas de Petri contendo colônias desenvolvidas a partir da 2^o seleção, e constatação de halo ao redor de um fungo (indicado pela seta).



Fonte: autor.

A Figura 8 proporciona a visualização da incubação de ramos de oliveira e cascas de noz pecã. O micro-organismo que apresentou halo foi oriundo de cascas de noz pecã.

No total foram analisadas 56 amostras, de 11 fontes vegetais distintas, como a Tabela 2 ilustra:

Tabela 2 - Representa as fontes e respectivas amostras.

Fonte	Número de amostras
<i>Acacia sp.</i> (acácia) - cascas	8
<i>Carya illinoensis</i> (noz pecã) - cascas	2
<i>Musa sp.</i> (banana) - cascas	4
<i>Olea sp.</i> (oliveira) - ramos	6
<i>Olea sp.</i> (oliveira) - frutos	8
<i>Ilex paraguensis</i> (erva-mate) - folhas	4
<i>Oryza sp.</i> (arroz) - cascas	4
<i>Oryza sp.</i> (arroz) - farelo	4
<i>Cydonia oblonga</i> (marmelo) - frutos	8
<i>Achyrocline satureioides</i> (macela) - florescência	4
Borra de suco de uva	4
Total	56

Fonte: autor

A quantidade de micro-organismos isolados das amostras não apresentou o mesmo número em relação às fontes analisadas, devido à disponibilidade das mesmas.

Do total de amostras, foram selecionados 7 micro-organismos com potencial para produção da enzima E.C: 3.1.1.20. Destes, a fonte que mais apresentou micro-organismos de interesse para produção da tanase foram as folhas de erva mate (*Ilex paraguensis*) com três micro-organismos selecionados, seguido de cascas de acácia (*Acacia sp.*) com dois, e tanto os frutos de azeitona (*Olea sp.*) quanto casca de noz pecã (*Carya illinoensis*) ambos apresentaram um micro-organismos cada, com potencial para produção da enzima, como se verifica na Tabela 3.

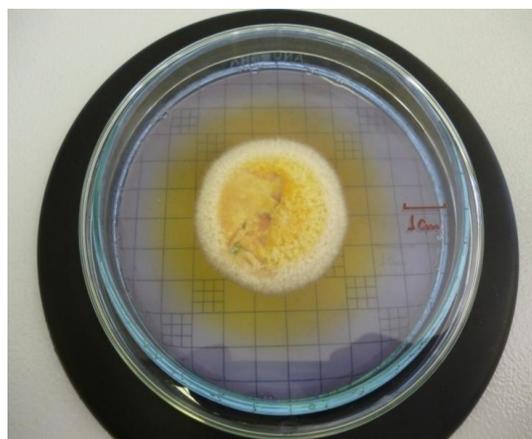
Tabela 3 - Fontes vegetais que apresentaram micro-organismos com potencial para produção de tanase.

Fonte vegetal	Número de isolados com potencial para produção de tanase
<i>Ilex paraguensis</i> (erva-mate) – folhas	3
<i>Acacia sp.</i> (acácia) – cascas	2
<i>Olea sp.</i> (oliveira) – frutos	1
<i>Carya illinoensis</i> (noz pecã) – cascas	1
Total	7

Fonte: autor

De todos os micro-organismos selecionados com potencial para produção da enzima tanase, todos os 7 possuem características de fungos filamentosos. Como descrito anteriormente, a seleção dos micro-organismos com potencial para produção de tanase, seguiu o ensaio proposto por Bradoo et al. (1996), indicando que aquele organismo que produz um halo ao seu redor é caracterizado como provável produtor da enzima. O halo é resultado da degradação do ácido tânico, sendo este a única fonte de carbono, como podemos verificar na Figura 9.

Figura 9 - Fungo filamentoso com formação de halo de degradação, oriundo de uma amostra de noz pecã.



Fonte: autor

Ainda segundo Bradoo et al. (1996), o tamanho do halo produzido pelo micro-organismo tem co-relação com a quantidade de produção da enzima tanase pelo mesmo.

Não foi isolado nenhum micro-organismo com potencial para produzir tanase das fontes de *Musa sp.*(banana) ramos de *Olea sp.*(oliveira), cascas e farelo de *Oryza sp.*(arroz), frutos de *Cydonia oblonga* (marmelo), florescência de *Achyrocline satureioides* (macela) e borra de suco de uva.

Soares, Ishimoto, Batestin (2013) isolaram e testaram 30 linhagens fúngicas, isoladas de diferentes fontes naturais como solo, madeiras, cascas e folhas de árvores, quanto à produção da enzima tanase. Estes autores observaram que 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 micro-organismos.

Os micro-organismos selecionados com potencial para produzir a tanase foram acondicionados sob refrigeração, em torno de 4°C, em ágar batata dextrose inclinado, com cobertura de óleo mineral. Todos os isolados estão em duplicata, e estão compondo o banco de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia e Toxicologia de Alimentos da Universidade Federal do Pampa, Campus Bagé, com o intuito de futuras pesquisas que irão identificar os micro-organismos selecionados assim como a produção e verificação da atividade da enzima tanase.

Na Figura 10, pode-se visualizar os fungos filamentosos com potencial para produção de tanase.

Figura 10– Micro-organismos com potencial para produzir tanase.



Fonte: autor

A maior parte dos estudos envolvendo a tanase seja como fonte, produção, estabilização envolve a utilização de micro-organismos de bancos de referência, o que torna o processo de informação um tanto restrito a estas instituições de pesquisa. Com isso a construção de um banco de micro-organismo com potencial para a produção da tanase se apresenta como a uma alternativa promissora para que mais estudos sejam realizados, nos mais diversos campos sejam na escolha da fonte que maior produz a enzima, seja no estudo da estabilização assim como um substrato que facilite a sua produção e na identificação dos micro-organismos.

5. Considerações finais

Apesar de o termo bioprospecção ter recebido atenção recentemente, a atividade em si é tão ou mais antiga quanto à própria existência humana, este tipo de atividade nos proporcionou inúmeras informações e avanços nas mais diversas áreas do conhecimento humano. No caso da biotecnologia, área do conhecimento humano que abrange a utilização de organismos vivos e/ou produtos do seu metabolismo, nos mais diversos processos, sejam eles na indústria alimentícia, farmacêutica, químicas entre outras, o emprego principalmente de micro-organismos assim como os metabólitos produzidos por estes, principalmente o uso de enzimas, tem se destacado.

A partir disso a bioprospecção de micro-organismos que tenham potencial para a produção da tanase, enzima considerada de extrema importância, uma vez que possui inúmeras aplicações e que a principal fonte produtora é inclusive, os micro-organismos, se tornou de extremo interesse.

A escolha da utilização de fontes naturais vegetais para a seleção de micro-organismos com potencial para produzir a tanase se mostrou promissor, uma vez que foram isolados 7 micro-organismos, todos eles com características de fungos filamentosos, corroborando com os inúmeros trabalhos já realizados.

Com os resultados apresentados, tem-se uma premissa para estudos mais avançados a partir dos micro-organismos já selecionados com potencial para produzir a enzima tanase.

Referências Bibliográfica

AGUIAR, C. N. et al. Micronal tannase: Advances end perspectives. **Applied Microbiology Biotechnology.**; v. 76. p. 47-59, 2007.

AGUILAR, C.N.et al. Comparision of methods to determine tannin acyl hydrolase activity. **Brazilian Archives of Biology and Tecnhnology**, v. 42, n. 3.p. 355-361, 1999.

AOKI, K.; SHINKE, R.; NISHIRA, H. Purification and some proprieties of yeast tanase. **Journal of Agricultural and Biological Chemistry.**; v. 40. p.79-85, 1976.

BAJPAI, B.; PATIL, S. Introduction of tannin acyl hydrolase activity in some members of fungi imperfecti. **Enzyme Microbiolic Technologies.**; v. 20. p.612-614, 1997.

BANERJEE, D.; MONDAL, K. C.; PATI, B. R. Production and characterization of extracellular and intracellular tannase from newly isolated *Aspergillus aculeatus* DBF9. **Journal Basic Microbiologic.**; v. 41. p. 313-318, 2001.

BANERJEE, D.; KAR, B. Biosynthesis of tannin acyl hydrolase from tannin-rich forest residue under different fermentation conditions. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.**; v.25.p. 29-38, 2000.

BANERJEE, R.; MUKHERJEE, G.; PATRA, K. C. Microbial transformation of tannin-rich substrate to gallic acid through co-culture method. **Bioresource Technology.**; v. 96.p.949-953, 2005.

BATH, T. et al. Microbial degradation of tannis - A current perspective. **Biodegradation.**; v. 25. p.343-357, 1998.

BATRA, A.; SAXENA, R.K. Potential tannase producers from genera *Aspergillus* and *Penicillium*. **Process Biochemistry.**; v. 40. p.153-1557, 2005.

BATTESTIN, V. Produção, purificação, caracterização e aplicação da tanase de *Paecilomyces variotii*. **Dissertação de doutorado**, Campinas, São Paulo.; p. 99 2007.

BATTESTINI, V.; MACEDO, G. A. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. **Bioresource Technologic.**;v.98. p. 1832-1837, 2007.

BELAMARES, R. et al. Microbial production of tannase: An enzyme with potential use in food industry. **Lebensmittel Wissenschaftt & Technologie.**; v. 37. p. 857-864, 2004.

BELUR, P. D.; MUGERAYA, G.; NAINEGALI, B. Release of cell-associated tannase of *Serratia ficaria* DTC by sonication, surfactants and solvents. **Asian Journal Biotechnologic.**; v. 3. p. 91-97, 2011.

BELUR, P. D. et al. Production of novel cell-associated tannase from newly isolated *Serratia ficaria* DTC. **Journal Microbiologic Biotechnologic.**; v. 20. p. 722-726, 2010.

BELUR, P. D.; MUGERAYA, G.; SUBBALAXMI, S. Studies on the extracellular tanase from newly isolated *Bacillus thurangiencens* BN2. **Proceeding of International Conference on Chemical, Chemical, Biological and Envarionment Engineering.** Oct. 9-11, Singapore.p: 379-384, 2009.

BELUR, P. D.; MUGERAYA, G. Microbial Production of Tannase: Estate of the Art. **Research Journal of Microbiology.**; v.6. p. 25-40,2011.

BENAVIDES, C. M. J. et al.Fatores Antinutricionais em Alimentos: **Revisão**, Departamento Ciências da Vida, Universidade do Estado da Bahia (UNEB), Segurança Alimentar e Nutricional, Campinas.; v.18. n. 2. P. 67-79, 2011.

BERLINCK, R. G. S. Bioprospecção no Brasil: um breve histórico [Ciência e Cultura](#), **Ciência Cultura** ISSN 0009-6725, São Paulo.; v. 64 n.3, 2012.

BEVERINI, M.; METCHE, M. Identification, purification and physicochemical properties of tannaseof *Aspergillus niger*. **Sciences des Aliments.** v. 10. p. 807-816, 1990.

BRADDOO, S.; GRUPTA, R.; SAXENA, R. K. Parametric optimization and biochemical regulation of estracellular tannase from *Aspergillus niponicus*. **Process Biochemistry.**, v. 32.p.135-139, 1997.

BRADDOO, S.; GUPTA, R.; SAXANE.; R.K. Screening of extracellular tanase producing fungi: Development of a rapid and simple plate assay. **Journal of General Applied Microbiology.**, v.42. p. 325-329,1996.

BRUNETON, J. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. AS/Espanha: **Editora Acribia**, 594p, 1991.

BURKE, J.D. et al. Relationship Between soil enzyme activities, nutrient cycling and soil fungal communities in a northern and soil forest. **Soil Biology & Biochemistry.**; v. 43.n.4.p. 795-803, 2011.

CARVALHO, M. R. “Estudos sobre a síntese de elagitaninos”. **Dissertação de mestrado**, Universidade de São Paulo Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto Departamento de Química Programa de Pós-Graduação em Química 2010.

CARVALHO, R.R. **Veronese Produtos Químicos Ltda.SA**, Espanha, 2011.

CASTEJON, F. V. Taninos e Saponinas, Seminário apresentado junto à disciplina de: **Seminários Aplicados do Programa** de Pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, 2011.

CLIFFORD, M. N.; SCALBERT, A. Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture [online].**; v.80.p.1118-1125, 2000.

COSTA, P. N. Otimização da produção de tanase por *Aspergillus* sp. em fermentação em estado sólido. **Dissertação de mestrado**, Universidade de Lavras – MG 2012, p.73.

CRUZ-HERNÁNDEZ, M. et al. Evaluation of culture conditions for tannase production by *Aspergillusniger* GH1. **Food Technology Biotechnology.**; v. 44. p. 541-544, 2006.

DELABONA, P. S.; Bioprospecção de fungos produtores de celulasas da Região Amazônica para produção de etanol celulósico. **Dissertação de Mestrado**, São Carlos.; p.122, 2011.

DESCHAMPS, A.M.; OTUK, G.; LEBEAULT, J.M. Production of tannase and degradation of chestnut tannins by bacteria. **Journal Fermentation. Technology.**; v. 61. p. 55-59, 1983.

FARIA, A. I. G. Propriedades antioxidantes e biológicas de procianidinas oligoméricas. Caracterização antioxidante de pigmentos antociânicos. **Dissertação de mestrado**, Porto, Portugal. p. 186, 2005.

FARIAS, G. M. et al. Purification, characterization, and substrate relationships of the tannase from *Cryphonectria parasitica*. **Physiological Molecular Plant Pathology.**; v. 44. p. 51-63, 1994.

FUSELLI, S. **Molecular Biology and Evolution.**; v.20. p.1682-1691. 2003.

GANGA, P.S. et al. Effect of environmental factors on the production of fungal tannase. **Leather Science & Technology**.; v. 24.p. 8-12, 1977.

GOEL,G. et al. Interaction of gut microflora with tannins in feeds. **Naturwissenschaften**.; v. 92. p. 497-5030, 2005.

GOUVEIA, M. L.; ARAÚJO, R.S.; MELLO, M. R. F.; SENA, A. R. Isolamento e avaliação qualitativa de bactérias endofíticas e epifíticas quanto à habilidade de utilizar ácido tânico. **VII CONNEPI Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação**, Palmas-tocantins, 2012.

GUZMAN-LOPEZ, O. et al. Microculturesos lactic acid bacteria: Characterization and selection of strains, optimization of nutrients and gallic acid concentration. **Journal Intustrial Microbiology Biotechnology**.; v. 36. p. 11-20, 2009.

HADI, T.A.; BANERJEE, R.; BHATTARCHARYYA, B.C. Optimization of tannase biosynthesis by a newly isolated *Rhizopus oryzae*. **Bioprocess Engeneering**.; v. 11. p. 239-243, 1994.

HARVEY, M. I. Analysis of hydrolysable tannins. **Animal Feed Science Technol.**, v.91.p.3-20, 2001.

HASLAM, E.; STRAGROOM, J.E.The esterase and depsidase activities of tannase. **Biochemical Journal**.; v. 90 p. 28-31, 1966.

HAWKSWORTH, D.L. "The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation".**Mycological Research**.; v. 95. p. 641-55, 2006.

Isolamento e seleção de microrganismos de fontes naturais da região de São Roque, SP, para produção da enzima tanase. Camila Fernandes Soares (1) Caroline Kie Ishimoto (2) Vânia Battestin Scientia Vitae | Volume 1 | número 1 | Junho de 2013

KHOKHAR, S., MAGNUSDOTTIR, S.G.M. Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**.; v. 50. n. 3.p. 565-570, 2002.

KIRK.; et al. **Dictionary of the Fungi**,10ª edição.; 2008.

KNUDSON, L. Tannic acid fermentation. **Journal of Biological Chemistry**.; v. 14. n. 3. p. 159-184, 1913.

MONDAL, K. C. et al. Production and characterization of tannase from *Bacillus cereus* KBR9. **Journal of General Applied Microbiology**; v. 47. p. 263-267, 2001.

MONDAL, K. C.; PATI, B. R. Studies on the extracellular tannase from newly isolated *Bacillus licheniformis* KBR6. **Journal Basic Microbial**., v. 40, p. 223-232, 2000.

MONDAL. K.; BANERJEE. D, R.; Pati B. Production and characterization of tannase from *Bacillus cereus* KBR9. **Journal Gen Appl Microbiol**.; v. 47.p. 263-267, 2001.

MONDAL. K. et al. Distribution of tannic acid degrading microorganisms in the soil and comparative study of tannase from two fungal strains. **Acta Microbiologica Polonica**.; v. 50.p.75-82, 2001.

MUKHERJEE, G.; BANERJEE, R. Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by a co-culture of *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus foetidus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford.; v. 22.p. 207-212, 2006.

MURUGAN, K. SARAVANABABU, S ARUNACHALAM, M. Screening of tannin acyl hydrolase (E.C.3.1.1.20) producing tannery effluent fungal isolates using simple agar plate end SmF process. **Bioresource Technology**.; v. 98. p. 946-949, 2007.

NAKAMURA, Y.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples: Application to tannic acid metabolism in the rat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** [online].; v.51.n.1. p.331-339, 2003.

NETO, P.A.S., AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microorganismos endofíticos interação com plantas e potencial biotecnológico. **Revista Biotecnologia**.; v.29.p.62-76, 2002.

NISHITANI, Y. et al. Genotypic analyses of *Lactobacilli* with a range of tannase activities isolated from human faces and fermented foods. **System Applied Microbiology**., v. 27. p. 109-117, 2004. OLIVEIRA, V. M.; et al. Preservação e prospecção de recursos microbianos. **Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da Unicamp**.; v. 7.p.1-19, 2006.

PINTO, G. A. S. et al. Conceitos, Produção e Aplicação. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos (CEPPA)** Curitiba.; v. 23.n. 2.p. 435-462, jul/dez. 2005.

PINTO, G.A.S. Produção de tannase por *Aspergillus niger*. **Tese de Doutorado**. Rio de Janeiro, RJ. p. 213, 2003.

PUROHIT, J. S. et al. Strain improvement for tannase production from co-culture of *Aspergillus foetidus* and *Rhizopus oryzae*. **Bioresour Technology.**, v. 97, p. 795-801, 2006.

QUIDEAU, F. **Chemical Reviews.**; v. 96. p. 475-503, 1996.

RANA, N.; BHAT, T. Effect of fermentation system on the production and properties of tannase of *Aspergillus niger*, Van Tieghem MTCC 2425. **Journal of General Applied Microbiology.**; v. 51. p. 203-212, 2005.

SABU, A. et al. Tannase production by *Lactobacillus* sp. ASR-S1 under solid-state fermentation. **Process Biochemistry.**, v. 41. p. 575-580, 2006.

SACCARO, J.; NILO, L. A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada:** Brasília, 2011.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances.**; v.27.p. 185-194, 2009.

SANDERSON, G.W. et al. **Green tea conversion using tannase and natural tea enzyme.**U.S. Patent.3.812.266. 1974.

SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture.**; v.80.n.7. p.1097-0010, 2000.

SASAKI, E. et al., Isolation of tannin-degrading bacteria isolated from feces of the Japanese large wood mouse, *Apodemus speciosus*, feeding on tannin-rich acorns. **System Applied Microbiology.**, v. 28. p. 358-365, 2005.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry.**; v. 30. n. 12. p. 3875-3883, 1991.

SINGHANIA,et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology.**; v.46. n.7. p. 541-549, 2010.

SMITH, R.F. Studies on the formation and composition of “cream” in tea infusions. **Journal of Science of Food and Agriculture.**; v. 19, p. 530-534, 1968.

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**.; v.1. n.1, 2013.

SOUZA, L. P.; ASTOLFI F. S.; PEREIRA, J. O. Diversidade bacteriana endofítica de diferentes plantas tropicais. **Resumos da 7ª Reunião Especial da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC)**. Manaus-AM, 2001

SREERAMA, Y. N. et al. Distribution of nutrients and antinutrients in milled fractions of chickpea and horse gram: seed coat phenolics and their distinct modes of enzyme inhibition. **Journal Agriculture Food Chemistry**.; v. 58(7). p. 4322-30, 2010.

TAKINO, Y. **Enzymatic solubilization of tea cream**. U.S. Patent 3.959.497, 1976.

TOTH, G.; BARSONY, G. **Enzimology**.V. 11. p. 19, 1943-1945.

TREVIÑO-CUETO, B. et al. Gallic acid and tanase accumulation during fungal solid state culture of a tannin-rich desert plant (*Larrea tridentate* Cov). **Bioresource Technology** .; v. 98. p.721-724, 2007

TSAI, C.H. **Enzymatic treatment of black tea leaf**.U.S. Patent 4.639.375, 1987.

VAN de LAGEMAAT, J. et al. Tannase. In: **Enzyme Technology**.;p. 380-397, 2006.

VAN DE LALEGEMAAT, J.; PYLE, D. L. Modelling the uptake and growth kinetics of *Penicilliumglabrum* in a tannic acid-containing solid state fermentation for tannase production. **Process Biochemistry**.; v. 40. p.1773-1782, 2005.

VII CONNEPI Congresso Norte Noredeste de Pesquisa e Inovação 2012.

YAMADA, H. et al. Studies on fungal tannase: Formation, purification and catalytic properties of tanase of *Aspergillusflavus*. **Agricultural Biology Chemistry**.; v. 32. p. 1070-1078, 1968.

ZHONG, X. et al. Secretion, purification and characterization of a recombinant *Aspergillus oryzae* tanase in *Pichiapastoris*. **Protein Expression Purification**.; v. 36. p. 165-169, 2004.