

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Avaliação da Atividade da Enzima Tanase produzida por *Fusarium* sp. e *Aspergillus* sp. isolados a partir da Casca de Café.

Isabela Teresa Santos Corrêa¹, Boutros Sarrouh¹

¹Universidade Federal de São João del-Rei. Campus Alto Paraopeba - DQBIO- Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos.
Rod. MG 443, KM 7 Fazenda do Cadete - Ouro Branco - MG
Caixa Postal: 131, CEP: 36420-000 - E-mail: isabela.tscorrea@gmail.com

RESUMO

*Tradicionalmente, as enzimas mais estudadas são aquelas de origem animal ou vegetal, contudo as de origem microbiana apresentam grande potencial para a aplicação industrial, já que podem ser produzidas em larga escala, via processos fermentativos. Contudo a produção destas exigem o isolamento e identificação de micro-organismos capazes de produzir de forma eficiente o bioproduto de interesse. O objetivo deste trabalho foi a avaliação da atividade enzimática da tanase produzida por fungos do gênero *Fusarium* e *Aspergillus* isolados a partir da casca de café. Segundo os resultados obtidos observou-se que, o fungo *Fusarium* sp. apresentou uma atividade tanásica de $1,5 \pm 0,032$ U/mL após 10 dias de fermentação, enquanto o fungo *Aspergillus* sp. alcançou valores máxima de $1,2 \pm 0,003$ U/mL após 5 dias de cultivo. Sendo assim conclui-se que os fungos em estudo apresentam um potencial promissor para a produção da enzima tanase, utilizada em diferentes processos biotecnológicos indústrias.*

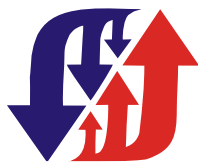
Palavras-chave: Casca de café; Atividade enzimática; Tanase, *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp.

INTRODUÇÃO

Com a evolução da ciência em seus diversos setores, inúmeras metodologias biotecnológicas têm sido sistematizadas, aumentando seus benefícios econômicos, sociais e ambientais. A descoberta da utilidade dos microrganismos trouxe a primeira revolução biotecnológica, a qual ocorreu com a descoberta das primeiras vacinas. Desde então, as técnicas e produtos biotecnológicos vem possuindo aplicações nas mais diferentes áreas como a da saúde, indústria, ambiente, agropecuária e cientista.

As enzimas, por exemplo, são excelentes bioprodutos que podem ser originados dos mais diversos tipos de animais, vegetais, micro-organismos, e são utilizados nos mais variados processos biológicos existentes. Elas são catalisadores biológicos de longas cadeias de pequenos fragmentos de moléculas de aminoácidos, e são caracterizadas por viabilizar a atividade das células para formar novos compostos. (NELSON, 2002).

A tanase é uma enzima que hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis, como o ácido tânico, gerando glicose e ácido gálico (GONÇALVES, 2010; MACEDO; MATSUDA; BATTESTIN, 2004). Ela pode ser isolada de vegetais, animais e micro-organismos, podendo eles ser dos mais diversos gêneros, como *Bacillus*,



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Corynebacterium, *Klebsiela*, *Streptococcus* e *Selenomonas*, e também por fungos filamentosos, principalmente das espécies: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Trichoderma*. (GONÇALVES, 2010; BATESTTIN 2007).

A tanase possui potencial para aplicação em diversos setores industriais, como a indústria alimentícia, de tratamento de efluentes, de nutrição animal e na indústria farmacêutica.

Na natureza encontra-se uma ampla gama de fungos capazes de produzir enzimas de interesse biotecnológico. Essas enzimas microbianas são obtidas tanto por cultivo superficial em substratos sólidos, quanto por cultivo submerso com emprego de substratos líquidos. (FELLOWS, 1994).

Observa-se então que esses fungos de interesse biotecnológico permitem o isolamento e seleção de linhagens fúngicas com grande potencial biotecnológico. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi a avaliação da atividade enzimática da tanase produzida por fungos filamentosos isolados a partir da casca de café.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismos

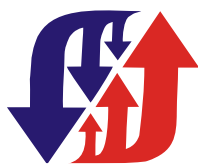
Neste estudo, foram utilizados fungos previamente isolados a partir da casca de café que obtiveram formação de halos translúcidos em volta das colônias indicando a degradação do ácido tânico. As culturas de *Fusarium* sp. e *Aspergillus* sp. foram inoculadas em placas contendo o meio BDA (Ágar Batata Dextrose), incubadas por sete dias a 28 °C e posteriormente armazenadas a 4 °C.

Produção de extratos enzimáticos por fermentação submersa

Os fungos preparados foram inoculados retirando discos com diâmetros de 7 mm de cada placa e colocados em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido mineral e ácido tânico 1% (p/v) como única fonte de carbono. O meio mineral foi composto de KH_2PO_4 0,7% (p/v), NaH_2PO_4 0,4% (p/v), MgSO_4 0,02% (p/v), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1% (p/v) e extrato de levedura 0,06% (p/v) (SINGH et al, 2007) o qual foi previamente autoclavado a 120 atm por 15 min. Os frascos foram colocados em um agitador sob temperatura de 28 °C e rotação de 180 rpm. As amostras da fermentação foram coletadas com o auxílio de uma micropipeta, em intervalos de, aproximadamente, 24h durante 10 dias de fermentação. As mesmas foram transferidas para um microtubo tipo eppendorf, e centrifugadas a 10.000 xg durante 5 min. O extrato enzimático bruto foi obtido a partir do sobrenadante e encaminhado para análise posterior.

Quantificação da atividade da enzima tanase

A atividade tanásica dos extratos enzimáticos brutos foi quantificada utilizando a técnica de precipitação de proteína modificada (DESCHAMPS; OTUK; LEBEAULT, 1983). A mistura da reação foi formada por 250 µL de ácido tânico 1% (p/v) (em tampão de fosfato, pH 6,0), 500 µL de tampão de fosfato (pH 6,0) e 250 µL do extrato enzimático da cultura. A mistura foi incubada a 40°C durante 30 min em um banho Maria. A reação foi parada adicionando uma solução de 1 mL de 2% (c/v) de albumina de soro bovino (BSA) antes da incubação. Todos os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 20 min, para precipitar os taninos residuais, e centrifugados a 3.000 xg durante 20 min. Posteriormente, a leitura da



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

absorbância do sobrenadante foi feita em espectrofotômetro, Bioespectro SP 22®, a 260 nm. As concentrações do ácido gálico, produzido pela hidrólise do ácido tânico, foram calculadas utilizando uma curva padrão de ácido gálico previamente construída. Uma unidade de enzima (U) corresponde a liberação de 1 μmol de ácido gálico por mL por min sob condições padrões de ensaio. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O método da fermentação submersa foi utilizado para os estudos cinéticos, tendo como parâmetros o crescimento celular e a quantidade de enzima produzida pelos microrganismos. Iniciou-se o experimento determinando a atividade da enzima tanase dos fungos *Fusarium* sp. e *Aspergillus* sp. presentes no meio de crescimento. No perfil da curva de crescimento dos fungos, figuras 1 e 2, observa-se uma rápida adaptação dos mesmos no meio líquido enriquecido com ácido tânico utilizado.

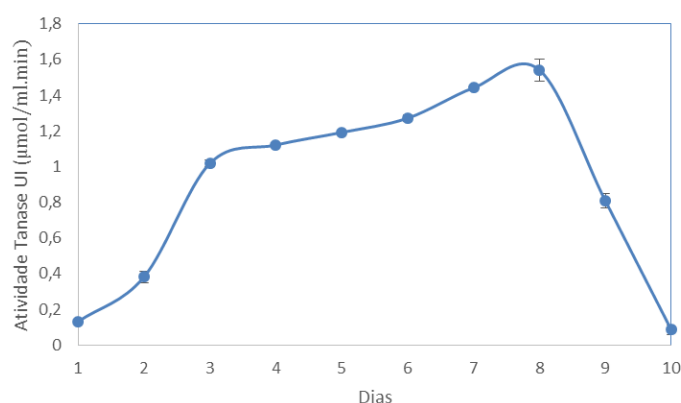


Figura 1 – Produção de tanase por *Fusarium* sp. em função do tempo de cultivo.

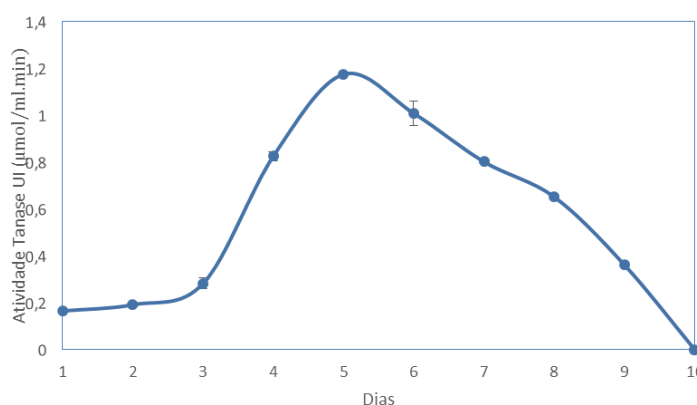
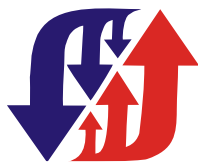


Figura 2 – Produção de tanase por *Aspergillus* sp. em função do tempo de cultivo.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Segundo as Figuras 1 e 2 observou-se que, a produção da enzima tanase pelo fungo *Fusarium* sp. foi máxima após 8 dias de fermentação, sendo que a sua atividade enzimática foi de $1,5 \pm 0,032$ U/mL. Da mesma forma, a máxima atividade de tanase produzida pelo fungo *Aspergillus* sp. foi alcançada após 5 dias do cultivo, apresentando um valor de $1,2 \pm 0,003$ U/mL. A partir dos resultados obtidos observou-se que, o fungo *Fusarium* sp. obteve uma atividade tanásica 25% maior que a atividade máxima observada no caso do fungo *Fusarium* sp. Por outro lado a atividade tanásica máxima do *Aspergillus* sp. foi observada no 5 dia de cultivo.

CONCLUSÕES

Conclui-se que os fungos *Fusarium* sp. e *Aspergillus* sp., isolados de uma fonte lignocelulósica, a casca de café, apresentaram uma atividade tanásica promissora após 10 dias e 5 dias de fermentação, respectivamente. Futuros trabalhos serão necessários para a caracterização da enzima produzida visando alcançar condições ótimas de atividade.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal de São João Del Rei pela oportunidade em realizar este trabalho e a FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Book

Battestin, V; Matsuda, L. K.; Macedo, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. Alim. Nutr, Araraquara, v. 15, n. 1, p.63-72, 2004.

Electronic Resources

Battestin, V. Produção, purificação, caracterização e aplicação da tanase de *Paecilomyces Variotii*. 2007. 99 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

Electronic Resources

Deschamp, A., Otuk, G. and Lebeault, J. (1983). Production of tannase and degradation of chestnut tannin by bacteria. J. Ferment. Technol. 61,55-59.

Book

Fellows, P. Tecnologia del Procesado de Los Alimentos: Principios e Práticas. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994. p.172-177.

Electronic Resources

Gonçalves, H. B. Produção de tanases por *Emericella nivea*: purificação e caracterização bioquímica. 116 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2010.

Book

Nelson, D. L.; COX, M. Lehninger – Princípios de Bioquímica. 3ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

Book

Singh, A.; Srivastava, S.; Singh, H.B. Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases. Bioresource Technology, v.98, p.470-473, 2007.