



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Influência de Diferentes Fontes de Carbono e Nitrogênio na Produção de Tanase por Fungo Isolado de Cacau no Sul da Bahia

Priscilla Macedo Lima Andrade<sup>1,2</sup>, Julyana Stoffel Britto<sup>2</sup>, Camila Oliveira Bezerra<sup>2</sup>,  
Ana Paula T. Uetanabaro<sup>2</sup> e Andrea Miura da Costa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Federal da Bahia- Campus Porto Seguro - E-mail: piu\_priscilla@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Santa Cruz – Depto. de Ciências Biológicas, Laboratório de Microbiologia da Agroindústria, Ilhéus – BA - E-mail: amcosta@uesc.br

#### RESUMO

*A produção de tanase por fungo filamentoso isolado de cacau e a influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio foram avaliadas nesse estudo. A melhor produção de tanase foi verificada com 48 horas de cultivo. Dentre as fontes de carbono testadas, ácido gálico e ácido tânico promoveram as mais altas atividades tanásicas ( $p < 0,05$ ), enquanto que a utilização de metil galato e glicose como indutores resultaram em menor produção enzimática. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) na atividade enzimática entre as fontes de nitrogênio analisadas. O fungo em estudo apresentou potencial biotecnológico, sendo capaz de produzir em tempos iniciais de fermentação, grandes quantidades de tanase utilizando apenas o ácido tânico ou ácido gálico como substrato.*

Palavras-chave: tanase, fermentação, fungo filamentoso, cacau

#### INTRODUÇÃO

Dentre as enzimas de importância industrial e com potencial de produção no Brasil, encontram-se a tanino acil hidrolase, conhecida como tanase. A tanase (EC 3.1.1.20) catalisa a hidrólise de ligações ésteres e depsídicas em taninos hidrolisáveis liberando glicose e ácido gálico (BEENA et al., 2011).

Tanase é utilizada em diversas aplicações industriais, incluindo fabricação de chá instantâneo, clarificação industrial de bebidas e na produção de ácido gálico. Uma das principais aplicações comerciais de tanase é a hidrólise de ácido tânico ao ácido gálico, um precursor intermediário necessário para a síntese do antibiótico trimetoprim, e usado para produção de propil galato, utilizado principalmente como um antioxidante em gorduras, óleos e bebidas (SHARMA et al., 2015).

A região do sul da Bahia ainda é pouco explorada em relação aos estudos da microbiota existente, especialmente sobre fungos com potencial para produção de enzimas de interesse biotecnológico e industrial.

Nesse sentido, o presente estudo investigou um fungo isolado de cacau da região sul da Bahia quanto à produção de tanase e a influência de fontes de carbono e nitrogênio na atividade da enzima.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### MATERIAL E MÉTODOS

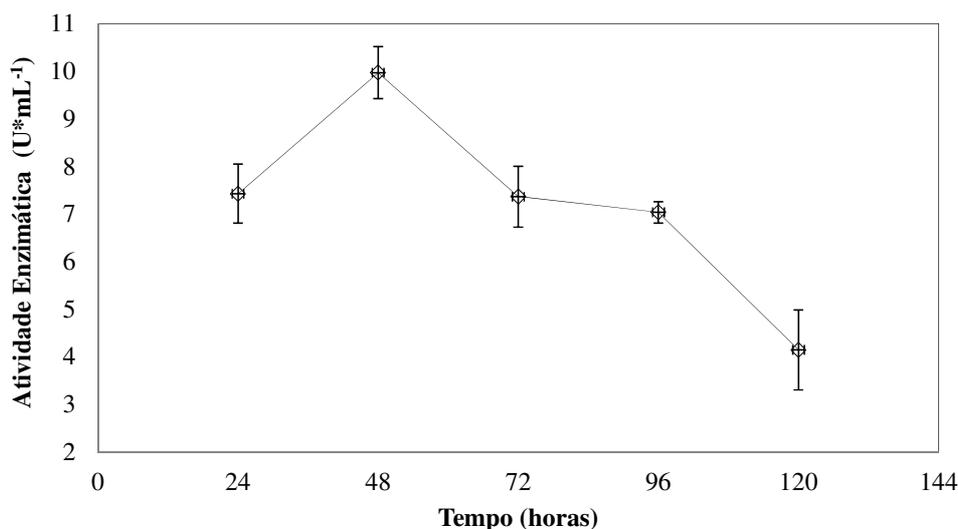
O fungo filamentoso utilizado nesse estudo foi isolado de cacau do sul da Bahia e pertence a Coleção de Culturas de Microrganismos do Laboratório de Microbiologia da Agroindústria. O cultivo foi realizado inoculando-se 6 plugs de micélio do fungo em 25 mL de meio mínimo de sais Czapeck com adição de 1% de ácido tânico, e posterior incubação à 30°C por 120 horas, sob agitação a 150 rpm. Para a definição do melhor tempo de fermentação, a atividade de tanase foi avaliada por espectrofotometria a cada 24 horas, de acordo com a metodologia de Sharma et al. (2000).

Ao meio de fermentação foram adicionadas diferentes fontes de carbono à 1% (ácido tânico, ácido gálico, metil galato e glicose) para verificar a influência dessas na síntese da enzima. Para avaliar o efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de tanase pelo fungo, após a seleção da fonte de carbono, novas fermentações foram feitas acrescentando-se separadamente ureia, fosfato de amônio, sulfato de amônio e nitrato de sódio, nas concentrações de 1 %.

Para as análises de fonte de carbono e nitrogênio, o experimento foi conduzido seguindo um delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos fatores comparadas utilizando-se o teste F e de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

A maior atividade enzimática (9,97 U.mL<sup>-1</sup>) foi obtida durante 48 horas de cultivo (Figura 1). Tal resultado indica que o isolado de cacau apresenta um bom potencial para produção da enzima, uma vez que, obteve maior atividade de tanase em períodos iniciais de fermentação, em condições não otimizadas.

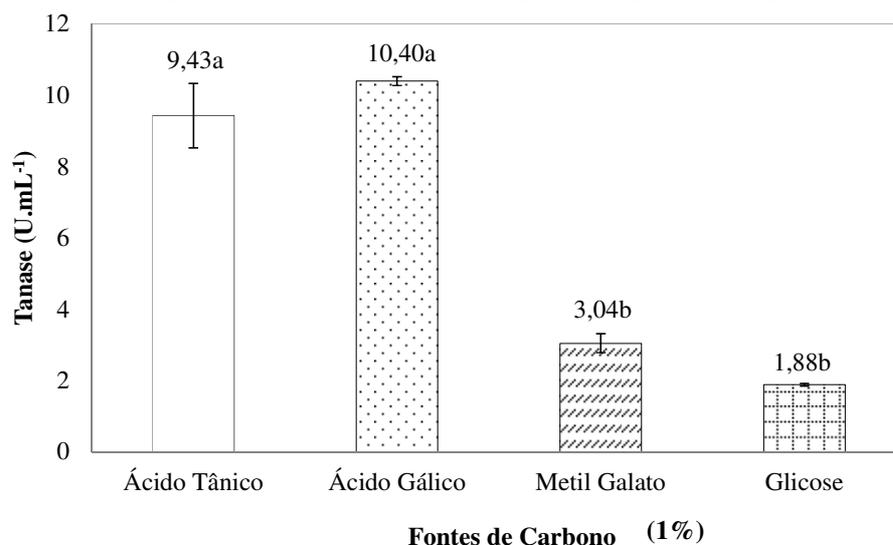


**Figura 1:** Atividade de tanase por fungo isolado de cacau em meio Czapeck com 1% de ácido à 30°C, 150 rpm por até 120 horas.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Como a maior produção da enzima foi obtida em 48 horas de cultivo, determinou-se esse tempo para avaliar a influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na atividade de tanase pelo fungo. Não houve diferença estatística ( $P>0,05$ ) na atividade enzimática quando utilizados ácido tânico e ácido gálico como fontes de carbono. As mesmas promoveram as maiores produção de tanase ( $P<0,05$ ), com valores de  $9,43 \text{ U.mL}^{-1}$  e  $10,40 \text{ U.mL}^{-1}$ , respectivamente, quando comparadas a metil galato e glicose (Figura 2).



**Figura 2:** Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de tanase durante 48 hs de fermentação.

<sup>a-b</sup> médias seguidas por uma mesma letra, na coluna, não diferem ( $P>0,01$ ) entre si pelo teste de Tukey.

Resultados semelhantes foram reportados por Costa et al. (2008) em estudos realizados com *Aspergillus tamaritii* em fermentação submersa, onde obtiveram atividades tanásicas de  $13,1 \text{ U.mL}^{-1}$ , quando o organismo foi crescido em ácido gálico e de  $9,3 \text{ U.mL}^{-1}$  com a utilização de ácido tânico, sendo que entre as fontes de carbono testadas as mais elevadas atividades de tanase foram observados com ácido gálico, metil galato e ácido tânico.

Adicionalmente, o fato do fungo avaliado nesse estudo apresentar uma elevada atividade de tanase quando cultivado apenas com ácido gálico sugere que a produção da enzima pode continuar mesmo com um aumento na concentração do produto no meio. De Melo et al. (2014) analisando a produção de tanase em fermentação submersa, também verificaram que *Aspergillus* sp. GM4 produziu tanase usando ácido gálico como única fonte de carbono no meio. Nesse mesmo estudo foi observado que ácido tânico 2%, metil galato 1% e ácido gálico 1% promoveram as maiores atividade da enzima, respectivamente.

Corroborando com os resultados apresentados no presente trabalho, Gonçalves et al. (2012) também observaram níveis basais de produção de tanase por *Aspergillus ochraceus*, quando o fungo foi cultivado apenas na presença de glicose.

A partir desses resultados, o ácido tânico foi utilizado como fonte de carbono para testar o efeito da suplementação de fontes de nitrogênio na atividade da enzima. Não houve diferença ( $P>0,05$ ) na atividade enzimática entre as fontes de nitrogênio estudadas (Tabela 1). Em contradição, diversos trabalhos relatam que o tipo de fonte de nitrogênio influencia de forma significativa na produção de tanase (ABOUBAKR et al. 2013; SHARMA et al., 2015).



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

**Tabela 1:** Comparação entre diferentes fontes de nitrogênio na atividade de tanase.

Fonte de Nitrogênio	Atividade Enzimática (U.mL <sup>-1</sup> )*
Sulfato de Amônio	10.06 ± 2.18 <sup>a</sup>
Fosfato de Amônio	9.99 ± 0.15 <sup>a</sup>
Nitrato de Sódio	9.32 ± 1.26 <sup>a</sup>
Ureia	7.01 ± 1.98 <sup>a</sup>

\*média ± desvio padrão

<sup>a-b</sup> médias seguidas por uma mesma letra, na coluna, não diferem (P>0,01) entre si pelo teste F.

### CONCLUSÕES

O fungo utilizado para o estudo foi capaz de produzir grandes quantidades de tanase apenas com o ácido tânico ou ácido gálico como substrato em tempos iniciais de cultivo e as fontes de nitrogênio na concentração testada parecem não influenciar na produção de tanase. Entretanto, estudos mais aprofundados são de grande importância, devido à potencialidade da estirpe e da utilização dessa enzima em diferentes setores industriais.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUBAKR, H. A.; EL-SAHN, M. A.; EL-BANNA, A. A. Some factors affecting tannase production by *Aspergillus niger* Van Tieghem. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44 (2), p.559-567, 2013.

BEENA, P.S.; BASHEER, S.M.; BHAT, S.G.; BAHKALI, A.H.; CHANDRASEKARAN M. Propyl gallate synthesis using acidophilic tannase and simultaneous production of tannase and gallic acid by marine *Aspergillus awamori* BTMFW032. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.164 (5), p.612-28, 2011.

COSTA, A. M.; RIBEIRO, W.X.; KATO, E.; MONTEIRO, A.R.G.; PERALTA, R.M. Production of tannase by *Aspergillus tamarii* in submerged cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.51, p.399-404, 2008.

DE MELO, A. G.; PEDROSO, R.C.F.; GUIMARÃES, L.H.S.; ALVES, J.G.L.F.; DIAS, E. S.; RESENDE, M.L.V.; CARDOSO, P.G. The optimization of *Aspergillus* sp. GM4 tannase production under submerged fermentation. **Advances in Microbiology**, v.4, p.143-150, 2014.

GONÇALVES, H. B.; RIUL, A. J.; QUIAPIM, A. C.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of a thermostable extracellular tannase produced under submerged fermentation by *Aspergillus ochraceus*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.15, p.1-12, 2012.

SHARMA, P.; CHATURVEDI, A.; SHARMA, L. Parametric optimization for extracellular tannase production in submerged fermentation by isolated *Aspergillus* species. **International Journal of Current Microbiology and Applied Science**, v.4 (4), p.232-239, 2015.

SHARMA, S.; BHAT, T. K.; DAWRA, R. K. A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. **Analytical Biochemistry**, v.279, p.85-89, 2000.