

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Produção de Tanases por *Emericella nivea*: Purificação e
Caracterização Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

Heloísa Bressan Gonçalves

Araraquara

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Produção de Tanases por *Emericella nivea*: Purificação e
Caracterização Bioquímica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Química, UNESP, Araraquara, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia - Área de Concentração Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

Heloísa Bressan Gonçalves

Araraquara

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

G635p Gonçalves, Heloísa Bressan
 Produção de tanases por *Emericella nivea*: purificação e
 caracterização bioquímica / Heloísa Bressan Gonçalves. –
 Araraquara : [s.n], 2010
 90 f. : il.

 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
 Instituto de Química
 Orientador: Luis Henrique Souza Guimarães

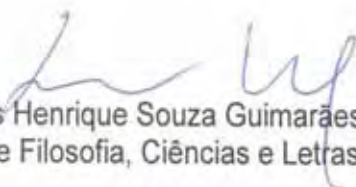
 1. Biotecnologia. 2. Fungos. 3. Fungo termotolerante.
I. Título.

HELOISA BRESSAN GONÇALVES

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 30 de julho de 2010.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães (Orientador)
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – USP, Ribeirão Preto



Prof. Dr. João Atilio Jorge
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – USP, Ribeirão Preto



Profª Drª Rosane Marina Peralta
Centro de Ciências Biológicas - UEM, Maringá

AGRADECIMENTOS

“Uma andorinha só não faz verão”.

(Ditado popular)

Agradeço a Deus, por me proporcionar idéias ou iluminá-las muitas vezes para que pudesse aprender cada dia mais.

Agradeço ao Professor Dr. Luis Henrique Souza Guimarães, que me acolheu para a realização deste trabalho e de alguma forma, acabou por aceitar minhas idéias e minha teimosia, sendo muitas vezes companheiro de momentos desastrosos, e outras vezes criativos. Muito obrigada.

Ao Professor João Atílio Jorge, pelas sugestões e incentivos constantes ao trabalho, e pelos momentos de acolhida em meus desesperos.

Aos Professores Maria de Lourdes Polizelli e Héctor Terenzi, pelos conhecimentos científicos, conselhos e amizade.

Ao professor José Manuel Guisán que abriu as portas de seu laboratório e me recebeu amavelmente no Instituto de Catalisis y Petroleoquímica, Universidad Autonoma de Madrid, España, e também aos investigadores Benevides Costa Pessela e Glória Fernandez Lorente que me ajudaram nos experimentos de imobilização enzimática.

Aos técnicos Ricardo e Maurício, pelo auxílio na preparação do material, equipamentos, e também pela convivência e amizade.

A meus pais que sempre apoiaram minhas decisões e opiniões, por mais malucas que pudessem parecer, me mostrando os melhores caminhos a seguir. Mesmo sem maiores conhecimentos científicos, seus conselhos foram sempre corretos e nunca me deixaram vagar sozinha.

A minha irmã Hortência e cunhado Fernando que apoiaram minha decisão de seguir a carreira científica. Ao meu irmão Hugo, que por vezes tentou me mostrar que fazer ciência é caro, mas de toda forma me apóia, com algumas restrições, sem deixar de me amar.

A minha, praticamente, irmã, Mariana, com quem dividi, todos os momentos do meu mestrado e também da minha vida nesses últimos dois anos. Por estar sempre presente, quando sentimos a falta dos ausentes e por me ajudar na decisão do próximo passo: o Doutorado.

As minhas grandes amigas: Daniela, Talita, Thelma e Patinti, de quem sinto saudades imensas, mas sempre sei que posso dividir os momentos felizes e também os difíceis.

As amigas que considero pessoas importantes na minha vida: Marina e Mariana, que mesmo distante sempre estiveram perto de mim e me apoiaram.

A tia Marina, que se disponibilizou a me ajudar na coleta dos fungos para o screening deste trabalho.

A minha avó Iolanda, por suas orações e resposos, sempre prontos para me ajudar: “Vó reza pra mim”.

Aos amigos de laboratório Alanina, Berabita, Cynthia, Marielle, Marita, Japonesa (quase família), Jeanitos (o capítulo destinado a mim, em seu livro está cada dia maior) e Tati, que passaram comigo estes dois anos de mestrado e que me escutaram em alto e bom som, põe alto nisso, neste período e com quem dividi minha felicidade.

Em especial a Telma, Alana, Jean e Mateus, que me acompanharem na bancada ou fora dela, me incentivando sempre, rindo e chorando nas ocasiões necessárias. Estarão sempre em minha lembrança por mais que os anos passem e os quilômetros nos distancie.

A Iniciação Científica, André, Bianca, Guilherme, Hugo, Ivan, Larissa, Priscila, Magal, Mateus, Matão, e Zé Carlos, não que não sejam amigos, mas merecem um agradecimento especial, por me fazerem sentir, ao mesmo tempo, mais jovem, no entanto, mais responsável.

Aos companheiros da outra facção, Ana, André, Fernanda, Juliana, Lili, Maller, Michele, Simone, Rose e Vivian pelos momentos de distração e conversas sérias e furadas.

Aos amigos do outro lado do Atlântico: Juanma, Andreína, Veria e Claudia, minha família, me cuidaram como “una niña”; Melzita e Roberta, as brasileiras com quem não conseguia falar em português; Marzia, Marco e Fellippo, italianos sem limites de diversão (adorei); Javi, “solo más una pregunta”; Pilar, Fer, Laura, Beni, Mateo, Palomo, Glória, Godoy e Karel.

As secretárias da Pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Química da UNESP-Araraquara, pela atenção dedicada ao meu mestrado a distância. Os meus mais sinceros agradecimentos.

**“A mente que se abre a uma nova idéia,
jamais retorna ao seu tamanho original”.**

Albert Einstein

**Dedico este trabalho aos meus pais, Benjamim e
Nica, por apoiarem, exatamente, todas as decisões
da minha vida e a minha avó Iolanda, por
acompanhar todos os meus passos.**

Heloísa Bressan Gonçalves graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá (2007). Atualmente é membro do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” no curso de mestrado, desenvolveu sua dissertação intitulada “Produção de Tanases por *Emericela nivea*: Purificação e Caracterização Bioquímica” no Laboratório de Biologia Celular e Microbiologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP/SP, sob orientação do Professor Dr. Luis Henrique Souza Guimarães e teve parte do trabalho realizado no laboratório de **Ingeniería de Biocatalizadores y Biotransformaciones do Instituto de Catalisis y Petroleoquimica da Universidad Autonoma de Madrid – Espanha, com auxílio do Professor José Manuel Guisán Seijas**. Tem experiência na área de Microbiologia e Bioquímica, com ênfase em Biologia e Fisiologia dos Microorganismos.

ÍNDICE GERAL.....	I
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
ÍNDICE DE TABELAS.....	XVI
ABREVIATURAS E UNIDADES.....	XVIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 TANINOS	2
1.1.1 <i>Taninos hidrolisáveis</i>	3
1.1.2 <i>Taninos condensados</i>	5
1.2 FONTES DE TANASES	5
1.2.1 <i>Tanases em microorganismos</i>	6
1.3 PRODUÇÃO DE TANASES.....	8
1.4 APLICAÇÕES DAS TANASES	8
1.5 TECNOLOGIA E IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	10
2. OBJETIVOS.....	13
2.1 GERAL	14
2.2 ESPECÍFICOS.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 ISOLAMENTO DE MICROORGANISMOS PRODUTORES DE TANASES.....	16
3.1.1 <i>Composição dos meios de cultivo</i>	16
3.2 MANUTENÇÃO DAS CEPAS EM LABORATÓRIO E OBTENÇÃO DAS CULTURAS	17
3.2.1 <i>Composição dos meios de cultivo</i>	17
3.3 SELEÇÃO DA LINHAGEM PRODUTORA DE TANASES EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA	20
3.3.1 <i>Microorganismo selecionado</i>	20
3.4 PREPARAÇÃO DOS PRODUTOS AGROINDUSTRIAIS E FOLHAS DE VEGETAIS COMO SUBSTRATOS/FONTES DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE TANASES EM FSS	20
3.5 OBTENÇÃO DAS ENZIMAS EXTRACELULAR E INTRACELULAR.....	20
3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	21
3.7 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS	21

3.8 PURIFICAÇÃO DAS TANASES EXTRA E INTRACELULAR EM COLUNA CROMATOGRÁFICA	22
3.9 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR	23
3.10 PROCEDIMENTO ELETROFORÉTICO	23
3.11 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE TANASES	24
3.11.1 <i>Temperatura ótima e estabilidade térmica</i>	24
3.11.2 <i>pH ótimo e estabilidade ao pH</i>	24
3.11.3 <i>Efeito de diferentes compostos químicos na atividade tanásica</i>	24
3.11.4 <i>Determinação das constantes cinéticas</i>	24
3.12 HIDRÓLISE DE DIFERENTES SUBSTRATOS E ANÁLISE DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE DO ÁCIDO TÂNICO	25
3.13 IMOBILIZAÇÃO DE TANASE.....	25
3.13.1 <i>Preparo dos suportes</i>	26
3.13.1.1 Suporte glioxil-agarose.....	26
3.13.1.2 Suporte amino-glioxil.....	26
3.13.1.3 Suporte Q-Sepharose, DEAE-Sepharose e CM-Sepharose	26
3.13.1.4 Suporte bromo-cianogênio	26
3.13.2 <i>Protocolos de imobilização</i>	27
3.13.2.1 Imobilização por adsorção a trocadores iônicos.....	27
3.13.2.2 Imobilização sobre agarose ativada com BrCN	27
3.13.2.3 Imobilização sobre suporte glioxil-agarose	27
3.13.2.4 Imobilização sobre suporte amino-glioxil	28
3.13.3 <i>Medida da atividade enzimática dos derivados</i>	28
3.13.4 <i>Estudo da estabilidade dos derivados</i>	28
3.13.5 <i>Efeito da atividade tanásica do derivado BrCN na análise quantitativa da hidrólise do ácido tânico e síntese de propilgalato</i>	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1 PRODUÇÃO DE TANASES POR <i>EMERICELLA NIVEA</i> EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FSBM) E EM FEMENTAÇÃO EM SUBSTRATO SÓLIDO (FSS)	32
4.1.1 <i>Produção de tanases em Fermentação Submersa (FSbm)</i>	33
4.1.1.1 Miroorganismos coletados e isolados	33

4.1.1.2	Produção de tanases por diferentes linhagens de fungos filamentosos	34
4.1.1.3	Produção de tanases por <i>Emericella nivea</i> em função do meio de cultivo (FSbm) .	36
4.1.1.4	Efeito de fontes de carbono na produção tanásica em FSbm	37
4.1.1.5	Efeito de fontes de nitrogênio e fosfato na produção de tanase em FSbm por <i>Emericella nivea</i>	41
4.1.1.6	Efeito do pH inicial do meio de cultivo na produção de tanases em FSbm.....	43
4.1.1.7	Produção de tanases em FSbm em função do tempo de cultivo	44
4.1.2	<i>Produção de tanases em fermentação em substrato sólido (FSS)</i>	45
4.1.2.1	Influência de diferentes substratos/fontes de carbono na produção de tanases.....	45
4.1.2.2	Produção de tanases em função do tempo de cultivo	47
4.1.2.3	Efeito de diferentes soluções umectantes na FSS sobre a produção de tanases ...	48
4.1.2.4	Efeito da umidificação com água de torneira em diferentes proporções na FSS para produção de tanases	49
4.2	PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS TANASES INTRA E EXTRACELULARES.....	50
4.2.1	<i>Purificação das tanases intracelular e extracelular</i>	51
4.2.2	<i>Determinação da massa molecular nativa e conteúdo de carboidratos</i>	56
4.2.3	<i>Influência da temperatura e do pH sobre a atividade tanásica</i>	57
4.2.4	<i>Efeito de diferentes sais e outros compostos na atividade tanásica</i>	60
4.2.5	<i>Atividades hidrolíticas das tanases sobre o ácido tânico e o metil galato</i>	64
4.2.6	<i>Parâmetros cinéticos</i>	65
4.2.7	<i>Análise dos produtos de hidrólise do ácido tânico</i>	67
4.3	IMOBILIZAÇÃO DA TANASE EXTRACELULAR.....	68
4.4.1	<i>Efeito da temperatura na estabilidade da tanase imobilizada em suportes de troca iônica</i>	70
4.4.2	<i>Efeito de aditivos na estabilidade ao pH da tanase imobilizada em suporte BrCN</i>	73
4.4.3	<i>Efeito do solvente 1-propanol na estabilidade da tanases imobilizadas em suportes de troca iônica</i>	75
4.4.4	<i>Efeito da temperatura na estabilidade da tanase imobilizada em suportes covalentes</i> ..	76
4.4.5	<i>Efeito do solvente 1-propanol na estabilidade da tanase imobilizada em suportes covalentes</i>	78

4.4.6 <i>Análise quantitativa da hidrólise do ácido tânico e síntese de propilgalato</i>	79
5. CONCLUSÕES	81
6. REFERÊNCIAS	83

RESUMO

A tanase (EC 3.1.1.20) é uma enzima induzível que age sobre os taninos hidrolisando suas ligações éster e depsídicas obtendo-se como produtos a glicose e o ácido elágico ou ácido gálico, sendo este último, um importante substrato para as indústrias farmacêutica e química. Entre os diferentes organismos capazes de produzir tanases, os microorganismos, de modo especial os fungos filamentosos, vêm se destacando uma vez que são mais versáteis na degradação de diferentes tipos de taninos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar as tanases intra e extracelulares do fungo filamentoso *Emericella nivea* produzidas em Fermentação Submersa (FSbm) e em Fermentação em Substrato Sólido (FSS), purificando-as e caracterizando-as bioquimicamente, além de imobilizá-las em suportes de agarose. Em princípio, foi realizada a seleção da melhor cepa produtora de tanases, submetendo-se 42 linhagens fúngicas a FSbm em meio de cultura Khanna com 2% de ácido tânico como fonte de carbono, por 3 a 4 dias a 30°C, tendo sido o fungo *Emericella nivea* selecionado para prosseguimento do trabalho. Para este microorganismo os maiores níveis enzimáticos extracelulares foram obtidos em 3 dias de cultivo em FSbm e 8 dias em FSS, sendo para esta última utilizados produtos agroindustriais e folhas de vegetais de diferentes espécies secas trituradas umedecidas com água de torneira (1:1; p/v). As tanases extra e intracelular foram purificadas 61 e 2,5 vezes com recuperação de 30% e 8,8%, respectivamente. Eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE 7%) mostrou a presença de uma única banda protéica revelada por prata e para atividade tanásica com a mesma mobilidade relativa. A forma extracelular possui massa molecular nativa de aproximadamente 322kDa com 50% de conteúdo de carboidratos. Já a enzima intracelular apresentou massa molecular nativa de 258kDa e 17% de carboidratos. A temperatura ótima de atividade foi de 45°C e 50°C para as enzimas extra e intracelular, respectivamente e o pH ótimo para ambas as enzimas foi 5,0. As tanases na forma solúvel se mostraram bastante estáveis a temperaturas elevadas, sendo T_{50} de 72h e 4h a 90°C para as enzimas extra e intracelular, nesta mesma ordem, e também apresentaram estáveis em diferentes pH com T_{50} de 3h e 2h no pH 9,0 para as formas extra e intracelular, respectivamente. A tanase extracelular foi ativada pelos íons Zn^{2+} , Hg^{2+} e Co^{2+} , enquanto que a intracelular teve sua atividade aumentada apenas na presença de Mn^{2+} . Ambas as formas enzimáticas foram capazes de hidrolisar o ácido tânico e o metil galato, com maior preferência pelo primeiro. A análise dos produtos de hidrólise do ácido tânico em TLC revelou a presença de ácido gálico em função do tempo de reação. Os parâmetros cinéticos foram analisados, sendo que as

enzimas mostraram maior afinidade e aumento na eficiência catalítica quando utilizado o metil galato como substrato, sendo os valores de K_m iguais a 4,78mM e 3,20mM, para as formas extra e intracelular, respectivamente. A tanase extracelular produzida em FSbm foi imobilizada em suportes de agarose com ligações covalentes uni e multipontuais (BrCN e glioxil e aminoglioxil, respectivamente), e também em suportes por troca iônica (DEAE-Sepharose, CM-Sepharose e Q-Sepharose), sendo verificadas a estabilização destes derivados quando incubados em temperaturas elevadas entre 65°C e 80°C em pH5,0 e também quando expostos ao solvente orgânico 1-propanol por longos períodos. Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se derivado Q-sepharose. Além da atividade hidrolítica do ácido tânico, a transesterificação de ácido gálico em propilgalato foi avaliada utilizando-se o derivado BrCN. Portanto, conclui-se que as tanases produzidas por *Emericella nivea* possuem bom potencial biotecnológico e são promissoras para o emprego industrial, atuando em uma ampla faixa de pH e temperatura, além de serem produzidas utilizando fontes de nutrientes de baixo custo, e ainda por possuir a capacidade de transesterificação de ácido tânico em propilgalato, propriedade esta, bastante rara e de importância na obtenção deste produto apreciado comercialmente.

ABSTRACT

Tannases (EC 3.1.1.20) are inducible enzymes that catalyze the hydrolysis of ester and depside bonds in hydrolysable tannins releasing glucose and ellagic acid or gallic acid, which is an important compound used in pharmaceutical and chemical industries. Among different organisms able to produce these enzymes, the microorganisms, especially filamentous fungi deserve attention since they can act on different tannins degradation ways. In this context, the aim of this work was to study the intra and extracellular tannases from the filamentous fungus *Emericella nivea* produced in Submerged Fermentation (SbmF) and Solid Substrate Fermentation (SSF), purifying and characterizing them biochemically, as well to immobilize the extracellular enzyme in agarose supports. First of all, it was selected the best tannase producer among 42 strains, in Khanna culture medium with 2% tannic acid as carbon source for 3-4 days at 30°C, and the fungus *Emericella nivea* was selected. This fungus produced high levels of extracellular enzyme at 3 and 8 days when cultivated in SbmF and SSF at 30°C, respectively. FSS was performed with agroindustrial products or crushed dried leaves of different plants umidified with tap water (1:1, w/v). The extra and intracellular tannases were purified 61 times and 2.5-times, with recovery of 30% and 8.8%, respectively. Non-denaturing electrophoresis (PAGE 7%), showed a unique proteic band stained by silver and for activity, both with the same relative mobility. The extracellular enzyme, probably, is a hetero-dimeric protein with native molecular mass of 322 kDa with 50% of carbohydrate content and the intracellular with native molecular mass of 258 kDa and 17% of carbohydrate. The optimum temperature were 45°C and 50°C for the extra and intracellular enzymes, respectively and the optimum pH for both enzymes was 5.0. The soluble tannases were thermostable with T_{50} of 72h and 4h at 90°C, and both were stables at different pH, with T_{50} of 3h and 2h for pH 9.0, for extra and intracellular forms, respectively. The extracellular tannase was activated by Zn^{2+} , Hg^{2+} and Co^{2+} , meanwhile, the intracellular had its activity increased only in the presence of Mn^{2+} . Both intra and extracellular forms were able to hydrolyze tannic acid and methyl gallate with preference by the first one. The hydrolysis products analysis of tannic acid on TLC revealed the presence of gallic acid according to the reaction time. The kinetic parameters were analyzed, and the enzymes showed higher affinity and increased catalytic efficiency when used methyl gallate as substrate, with K_m of 4.78 mM and 3.20 mM for extra and intracellular forms, respectively. The extracellular tannase produced in SbmF was immobilized in agarose supports with single and multipoint covalent bounds (BrCN and glyoxyl and aminoglyoxyl, respectively), and also on ion exchange supports (DEAE-

Sepharose, CM-Sepharose and Q-Sepharose). The stabilization of these derivatives when incubated at high temperatures (between 65°C and 80°C) at pH5.0 and also when exposed to organic solvent 1-propanol for long periods, was verified. In addition, transesterification activity on gallic acid to propyl gallate synthesis using the derivative BrCN was evaluated. In conclusion, the tannases produced by *Emericella nivea* have a good potential for biotechnological application and they are promising for industrial utilization, acting in a wide range of pH and temperature. In addition, nutrients sources of low cost can be used for enzymes production, associated to the capacity for transesterification of gallic acid in propyl gallate observed for extracellular enzyme, an important property to get this product commercially.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hidrólise do ácido tânico (Modificado de Aguilar e Gutiérrez-Sanchez, 2001).....	2
Figura 2. Taninos hidrolisáveis (Queiroz <i>et al.</i> 2002).....	4
Figura 3. Estrutura química do tanino hidrolisável (Modificado de Nakamura, 2003).....	4
Figura 4. Efeito da concentração de ácido tânico na produção de tanases extracelular (■) e intracelular (●) por <i>Emericella nivea</i> . Cultivos realizados em meio Khanna, por 3 dias sob agitação de 100 rpm a 30°C.....	39
Figura 5. Efeito da concentração de extrato de levedura (A) e KH ₂ PO ₄ (B) na produção de tanases extracelular (■) e intracelular (●) por <i>Emericella nivea</i> . Cultivos realizados em meio Khanna, por 3 dias sob agitação orbital de 100 rpm a 30°C.....	42
Figura 6. Produção de tanases extracelular (■) e intracelular (●) por <i>Emericella nivea</i> em função do pH inicial do meio de cultivo. A cultura foi realizada em meio Khanna tendo ácido tânico 2% (m/v) como fonte de carbono, por 3 dias sob agitação orbital de 100 rpm a 30 °C.....	43
Figura 7. Influência do tempo de cultivo do fungo <i>Emericella nivea</i> na produção de tanases extracelular (□), intracelular (●) e total (■). Cultivo realizado em meio Khanna tendo ácido tânico 2% (m/v) como fonte de carbono a 30 °C, sob agitação orbital (100 rpm).....	44
Figura 8. Produção de tanase extracelular pelo fungo <i>Emericella nivea</i> em função do tempo de cultivo em FSS com folhas de romã umidificado com água de torneira (1:1, m/v), sendo o cultivo realizado a 30 °C em atmosfera com umidade relativa de 60%. U totais = U/g substrato x 30.....	47
Figura 9. Produção de tanase extracelular pelo fungo <i>Emericella nivea</i> em FSS tendo folhas de romã como substrato, umidificadas com diferentes soluções (1:1, m/v), sendo o cultivo realizado por 8 dias a 30°C em atmosfera com umidade relativa de 60%.....	48
Figura 10. Produção de tanase extracelular pelo fungo <i>Emericella nivea</i> em FSS tendo folhas de romã como substrato, umidificadas com água de torneira em diferentes proporções (m/v), sendo o cultivo realizado por 8 dias a 30°C em atmosfera com umidade relativa de 60%.....	49
Figura 11. Perfil cromatográfico em DEAE-Celulose para tanase intracelular produzida por <i>Emericella nivea</i> em FSbm. Símbolos: (●) Absorbância 280 nm, (□) Atividade tanásica.....	51
Figura 12. Perfil eletroforético da tanase intracelular em PAGE 7% revelado por prata (A) e para a atividade tanásica (B).....	52

Figura 13. Perfis cromatográficos em colunas DEAE-celulose (A) e Sephacryl S200 (B) da tanase produzida por <i>Emericella nivea</i> em FSS com folhas de romã. Símbolos: (●) Absorbância 280 nm, (□) Atividade tanásica.....	54
Figura 14. Perfil eletroforético da tanase extracelular em PAGE 7% revelado por prata (A), para a atividade tanásica (B) e em SDS-PAGE 12%.....	55
Figura 15. Determinação temperatura ótima aparente (A) e pH ótimo aparente (B) para atividades tanásicas extracelular (■) e intracelular (●).....	58
Figura 16. Estabilidade térmica (A e B) e ao pH (C e D) para as tanases extracelular (A e C) e intracelular (B e D) produzidas por <i>Emericella nivea</i> em FSbm.....	59
Figura 17. Influência de diferentes concentrações de ZnCl ₂ (■) e MnCl ₂ (●) sobre as atividades tanásicas extracelular e intracelular, respectivamente	62
Figura 18. Determinação da hidrólise dos substratos metil galato (■), ácido tânico (●) e metil galato:ácido tânico (1:1; v/v) (▲), em diferentes tempos de reação, pelas tanases extracelular (A) e intracelular (B) produzidas por <i>Emericella nivea</i>	64
Figura 19. Perfil cromatográfico em camada delgada (TLC) do ácido gálico formado a partir da hidrólise do ácido tânico pelas enzimas extra (A) e intracelular (B) em função do tempo de reação. Raias: (1) ácido tânico; (2) ácido gálico; (3) controle negativo; (4) reação de 1 minuto; (5) reação de 10 minutos; (6) reação de 30 minutos; (7) reação de 1 hora e (8) reação de 5 hora.....	67
Figura 20. Estabilidade térmica a 65°C (A), 70°C (B), 75°C (C) e 80°C (D) da tanase imobilizada em suportes de troca iônica (■) Q-sepharose, (●) DEAE-sepharose, (▲) BrCN, e em (▼) enzima solúvel mantidos a pH 5,0.....	71
Figura 21. Estabilidade térmica a 75°C da tanase imobilizada em suportes de troca iônica (■) Q-sepharose, (●) DEAE-sepharose, (▲) BrCN, e (▼) para enzima solúvel e mantidos em pH 7,0.....	72
Figura 22. Estabilidade do derivado BrCN em pH 9,0 (A e B) e pH 10,0 (C e D), mantidos a 4°C (A e C) e 25°C (B e D) adicionado de (●) trealose, (▲) glicerol e (▼) etilenoglicol como protetores e na ausência destes (■).....	74
Figura 23. Estabilidade dos derivados (■) Q-sepharose, (●) DEAE-sepharose, (▲) BrCN, e também da enzima solúvel (▼) a 1-propanol 30% (v/v) (A) e 50% (v/v) (B) a 25°C.....	75

Figura 24. Estabilidade térmica a 75°C (A) e 80°C (B) em pH 7,0 dos derivados (■) Glioxil em 50% de etilenoglicol + 50mM de DTT, (●) aminoglioxil em 50% etilenoglicol e (▲) BrCN obtidos por ligações covalentes.....77

Figura 25 Estabilidade ao 1-propanol 30% (A) e 50% (B) da tanase imobilizada em suportes por ligação covalente em temperatura de 25°C. Símbolos: (■) derivado Glioxil em 50% de etilienglicol + 50mM de DTT, (●) derivado aminoglioxil em 50% etilenoglicol, (▲) derivado BrCN.....78

Figura 26. Reação de hidrólise de ácido tânico (2mM) em função do tempo, utilizando a enzima imobilizada em suporte de agarose ativado com brometo de cianogênio (BrCN) (A) e a enzima solúvel (B).....80

Figura 27. Síntese de propilgalato a partir da esterificação do ácido tânico (2mM) em 50% de 1-propanol utilizando o suporte de agarose ativado com brometo de cianogênio.....80

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Características de algumas tanases fúngicas produzidas por diferentes processos fermentativos (Adaptado de Pinto <i>et al.</i> , 2005).....	7
Tabela 2. Fungos filamentosos coletados e isolados.....	33
Tabela 3. Produção de tanases por diferentes linhagens de fungos filamentosos em FSbm.....	35
Tabela 4. Meios de cultura utilizados para a produção de tanases pelo fungo <i>Emericella nivea</i> em FSbm.....	36
Tabela 5. Fontes de carbono utilizadas para a produção de tanases em FSbm por <i>Emericella nivea</i>	38
Tabela 6. Efeito da concentração de glicose e ácido gálico na produção de tanases em FSbm por <i>Emericella nivea</i>	40
Tabela 7. Substratos utilizados para a produção de tanase por <i>Emericella nivea</i>	46
Tabela 8. Purificação da tanase intracelular produzida por <i>Emericella nivea</i> em FSbm.....	52
Tabela 9. Tabela de purificação de tanase extracelular produzida por <i>Emericella nivea</i> em FSbm.....	55
Tabela 10. Efeito de íons metálicos na atividade tanásica intra e extracelular do fungo <i>Emericella nivea</i>	61
Tabela 11. Efeito de compostos químicos na atividade tanásica intra e extracelular do fungo <i>Emericella nivea</i>	63
Tabela 12. Parâmetros cinéticos para as tanases extra e intracelular produzidas por <i>Emericella nivea</i>	66

ABREVIATURAS E UNIDADES

Abs – absorvância
°C – graus Celsius
BDA – batata dextrose ágar
cm - centímetros
BrCN – suporte agarose ativado com grupos de bromo cianogênio
CM – carboximetil
DEAE - Diethylaminoethyl
EC – Enzyme Commission
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
HPLC – High Performance Liquid Chromatography
FSbm – Fermentação Submersa
FSS – Fermentação em Substrato Sólido
g - grama
g – aceleração da gravidade
h - hora
kDa – mil Daltons
 K_m – constante de Michaelis-Menten
M – Molar
mA – miliampére
mg – miligrama
min - minuto
mL – mililitro
mm – milímetro
mM – milimolar
nm – manômetro
m/v – massa por volume
PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida
pH – potencial hidrogeniônico
p/v – peso por volume
qsp – quantidade suficiente para
rpm – rotações por minuto
SDS – duodecil sulfato de sódio
 T_{50} – tempo de meia vida
TLC – Thin Layer Chromatography
V – volts
 $V_{máx}$ – velocidade máxima
 $V_{máx}/k_m$ eficiência catalítica
v/v – volume por volume
U - unidade de atividade
 μ L - microlitro
 μ mol – micromolar
 λ – comprimento de onda

1. INTRODUÇÃO

A tanase, também conhecida como tanino-acil hidrolase (EC 3.1.1.20), é uma enzima induzível capaz de hidrolisar taninos, levando a liberação de ácido gálico e glicose (Mahedran *et al.*, 2005) (Figura 1). Teighem (1867) foi o primeiro a descrever esta enzima ao examinar duas espécies de fungos, *Penicillium glaucum* e *Aspergillus niger*, que crescem na presença de taninos (Lekha e Lonsane, 1997).

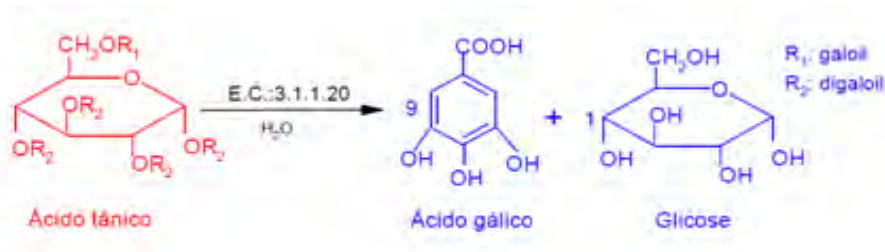


Figura 1. Hidrólise do ácido tânico (Modificado de Aguilar e Gutiérrez-Sanchez, 2001).

A tanase é responsável pela separação do éster e das ligações laterais em taninos liberando os produtos acima citados (ácido gálico e glicose). Os taninos são considerados os substratos naturais para as tanases, mas estas enzimas também são capazes de degradar o ácido gálico (Haworth *et al.*, 1985). Alguns fungos, principalmente os pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são produtores de tanases (Rajakumar e Nandy, 1983). Segundo Yamada *et al.* (1968) a enzima encontra-se em maiores quantidades intracelularmente. No entanto, a enzima também pode ser secretada para o meio de cultura. Até o momento, os fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus oryzae* foram descritos como sendo os melhores produtores de tanases, tanto em ácido tânico, quanto com outras fontes de carbono (Gupta *et al.*, 1997).

1.1 Taninos

Taninos são metabólitos secundários fenólicos produzidos por diferentes vegetais e que possuem massa molecular variando de 300 Da a 3 kDa. Depois da lignina, os taninos formam o segundo grupo mais abundante de compostos fenólicos dos vegetais (Aguilar *et al.*, 2007). Os taninos podem apresentar alguns efeitos negativos para os animais, como o sabor adstringente desagradável, além de se ligarem a moléculas de nutrientes tornando-as indigestas, interferindo assim na nutrição animal (Goel *et al.*, 2005). No entanto, baixas concentrações de taninos elevam a

assimilação de nitrogênio em ruminantes aumentando seu crescimento e produção de leite (Aguilar *et al.*, 2007).

Com base em suas características estruturais, os taninos podem ser divididos em 2 grandes grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Durante a degradação de taninos, ocorrem hidrólise e oxidação, catalisadas por diferentes enzimas produzidas por microrganismos, tais como tanase, fenol-oxidase e decarboxilase.

1.1.1 Taninos hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis são sub-divididos em galotaninos e elagitaninos. Galotaninos são facilmente degradados por bactérias, fungos e leveduras, enquanto que elagitaninos são mais difíceis de serem degradados devido a sua estrutura complexa (Figura 2). Mesmo assim, algumas bactérias e fungos encontrados em solos ricos em elagitaninos, folhas e efluentes contendo taninos podem produzir tanase com alta atividade para degradação deste componente (Mingshu *et al.*, 2006).

Nos galotaninos, os grupos fenólicos que esterificam o núcleo glicosídico são constituídos pelo ácido gálico (ou radical galoil), ou pelo ácido digálico, estando as duas unidades galoil unidas por ligação depsídica. As moléculas são usualmente compostas pelo núcleo de glicose e de 6 a 9 grupos galoil, apresentando massas moleculares em torno de 3 kDa. Há grande abundância de ésteres de glicose mono ou digaloil na natureza que não são considerados taninos. É necessário que pelo menos 3 grupos hidroxil da molécula de glicose estejam esterificados para exibir a capacidade de se ligar e precipitar proteínas para serem considerados taninos. O mais comum dos galotaninos é o ácido tânico (Aguilar e Gutiérrez-Sanchez, 2001).

Nos elagitaninos, os grupos fenólicos utilizados são moléculas de ácido hexaidroxidifênico que podem se desidratar espontaneamente para formar sua dilactona estável, o ácido elágico. Os elagitaninos apresentam massa molecular entre 2 e 3 kDa (Pinto *et al.* 2005).

A decomposição de taninos hidrolisáveis é mediada por duas enzimas. Uma com atividade esterásica sobre a ligação éster entre o grupo anel aromático e o resíduo de glicose, e a outra depsídica sobre a ligação éster entre os anéis aromáticos (Figura 3). Haslam e Stragroom (1966) responsabilizaram a tanase pelas duas atividades. Também relataram que a proporção entre essas duas atividades pode variar de acordo com as condições de cultivo. Beverini e Metche (1990),

utilizando colunas de afinidade, fracionaram duas isoformas de tanase de *Aspergillus oryzae*. Ambas com as duas atividades, sendo que a tanase I apresentou maior característica esterásica e a tanase II atividade depsidásica mais pronunciada.

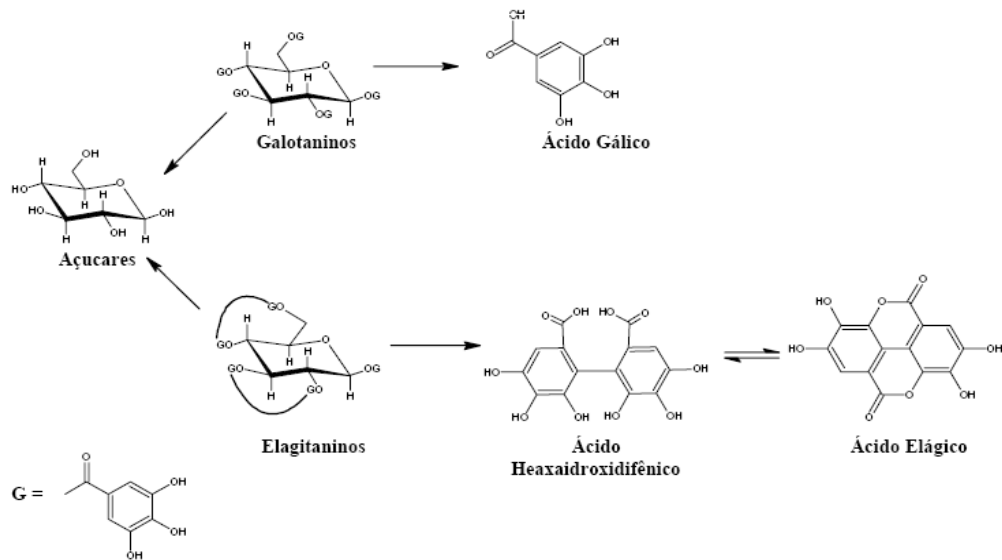


Figura 2. Taninos hidrolisáveis (Queiroz *et al.* 2002).

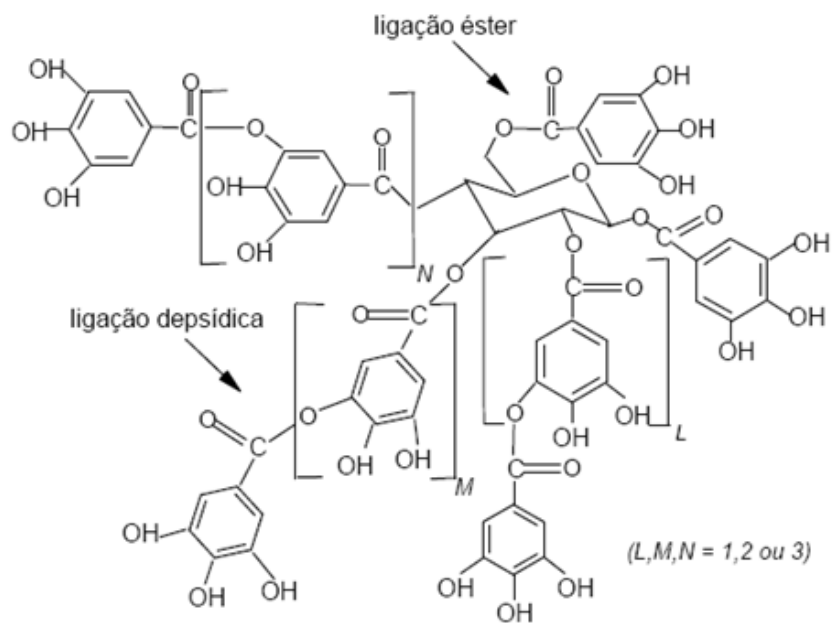


Figura 3. Estrutura química do ácido tânico (Modificado de Nakamura, 2003).

1.1.2 Taninos condensados

Os taninos condensados, também conhecidos como proantocianidinas são mais vastamente distribuídos entre os vegetais do que os taninos hidrolisáveis. São chamados de taninos condensados devido a sua estrutura química compacta. As proantocianidinas resultam do acoplamento de uma unidade flavonil eletrofílica, gerada a partir do flavan-4-ol ou do flavan-3,4-diol, uma unidade flavanil nucleofílica. Desta forma, são oligômeros ou polímeros de unidades flavonóides, como a catequina, unidas por ligações carbono-carbono não suscetíveis à clivagem por hidrólise. Ao contrário dos taninos hidrolisáveis, os condensados não contém resíduos de carboidratos (Deshpande *et al.*, 1986), mas possuem de 2 a 50 ou mais unidades flavonóides, podendo atingir massas moleculares superiores a 20 kDa. As proantocianidinas apresentam grande variedade estrutural devido ao número de grupos hidroxilas presentes em cada unidade, bem como a estereoquímica dos três centros quirais do anel B, a localização das ligações interflavana e, em menor proporção, as possíveis derivações como *O*-metilalação ou *C*- e *O*-glicosilações (Bruyne *et al.*, 1999). Em razão de suas estruturas químicas, sem a presença de ligações éster e depsídica, estes taninos não são suscetíveis a hidrólise pela tanase.

1.2 Fontes de tanases

As tanases podem ser encontradas tanto em procariotos como em eucariotos, como plantas, animais e microorganismos, sendo que entre estes últimos, os fungos filamentosos merecem destaque. Plantas com conteúdo de tanino solúvel como, por exemplo, *Terminalia chebula*, *Caesalpinia coriaria*, *Anogeissus latifolia* ou ainda apresentando taninos insolúveis como, *Cassia auriculata*, *Acacia arabica* e *Cassia fistula* possuem a enzima a qual auxilia no crescimento e maturação de frutos. Em animais ruminantes, baixas concentrações de tanase são encontradas na mucosa do rumem, provavelmente para hidrolisar o ácido tânico presente na dieta rica em fenóis e açúcares, que podem ser rapidamente absorvidos (Lekha e Lonsane, 1997). Já os microorganismos produzem tanases que possibilitam a decomposição e a reciclagem de materiais contendo tanino no ambiente.

1.2.1 Tanases em microorganismos

A maioria dos microorganismos é capaz de produzir tanases, sendo sintetizada no limite da membrana ou dentro da célula (Deschamps *et al.*, 1983). Estas enzimas podem ser produzidas por diferentes microorganismos, incluindo bactérias, como por exemplo, *Bacillus licheniformis* (Mondal *et al.*, 2000) e *Citrobacter freundii* (Ajay Kumar *et al.*, 1999), leveduras (Aoki *et al.*, 1976) e fungos filamentosos tais como *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. e *Paecilomyces variotii* (Mahedran *et al.*, 2005). Contudo, alguns trabalhos têm mostrado que as tanases microbianas não são igualmente ativas para todos os taninos. Tanases de leveduras, por exemplo, são efetivas somente na hidrólise de galotaninos e fracamente ativas na degradação de taninos de alta massa molecular, ao passo que tanases de fungos filamentosos são mais versáteis e podem degradar eficientemente diferentes tipos de taninos (Bhat, 1998; Mingshu *et al.*, 2006). Desta forma, estudos envolvendo a produção de tanases por fungos filamentosos ainda são escassos merecendo maiores investigações.

Ainda que algumas enzimas possam ser obtidas de fontes vegetais e animais, os microorganismos são favoráveis na produção industrial de tanases por apresentarem vantagens econômicas. Microorganismos podem ser cultivados em grandes quantidades em períodos de tempo relativamente curtos, por métodos de fermentação, produzindo quantidades abundantes e regulares de conteúdo enzimático. Além das enzimas de microorganismos serem mais estáveis do que as análogas obtidas de animais e vegetais, eles podem ser manipulados geneticamente aumentando ainda mais a atividade das enzimas (Lekha e Lonsane, 1997).

As tanases favorecem a invasão de microorganismos, principalmente fungos, em plantas hospedeiras devido a hidrólise de parte dos compostos fenólicos presentes em tecidos vivos ou em decomposição, mais especificamente os taninos hidrolisáveis (Scalbert, 1991). Diferentes estudos relatados por Lekha e Lonsane (1997) apontam que microorganismos de solo produtores de tanases desempenham papel ativo na decomposição e reciclagem de materiais vegetais ricos em taninos. Assim, as espécies microbianas que sintetizam esta enzima possuem certa vantagem na competição com outros microorganismos.

As tanases produzidas por fungos apresentam pH ótimo em torno de 5,5. Sua estabilidade em diferentes valores de pH pode variar entre faixas 3,0 a 8,0, como observado para *Aspergillus flavus* IFO 5839, *Aspergillus niger* LFC 8 e *Penicillium chrysogenum* dependendo da fonte de obtenção da enzima (Tabela 1). A temperatura ótima para atividade desta enzima ocorre, em geral,

próxima a 35°C. Contudo, temperaturas mais elevadas (50°C a 70°C) foram observadas para tanases produzidas por *Aspergillus flavus* IFO 5839 e *Aspergillus niger* 3T5B8 (Tabela 1). Para a temperatura, a estabilidade da tanase ocorre basicamente entre 10°C e 60°C (Tabela 1).

Tabela 1. Características de algumas tanases fúngicas produzidas por diferentes processos fermentativos (Adaptado de Pinto *et al.*, 2005).

Microorganismo/ linhagem	Condições de cultivo	pH		Temperatura (°C)		Referência
		Ótimo	Estabilidade	Ótima	Estabilidade	
<i>Aspergillus flavus</i> IFO 5839	submersa	5,5	5,0-5,5	50-60	60	Yamada <i>et al.</i> , 1968 Adachi <i>et al.</i> , 1971
<i>Aspergillus niger</i> LFC 8	Submersa	6,0	3,5-8,0	35	-	Barthomeuf <i>et al.</i> , 1994
<i>Aspergillus niger</i> PKL 104	Submersa	5,5	4,0-7,0	60	10-40	Lekha e Lonsane, 1994
<i>Aspergillus niger</i> PKL 104	Somissólida	5,5	2,0-8,0	35	10-30	Lekha e Lonsane, 1994
<i>Aspergillus niger</i> 3T5B8	Semissólida	5,0	3,0-6,0	60	25-45	Pinto, 2003
<i>Aspergillus niger</i> MTCC 2425	Submersa	4,5-6,0	-	35	-	Sharma <i>et al.</i> , 1999
<i>Aspergillus oryzae</i>	Submersa	5,5	3,0-7,5	30-40	30	libuchi <i>et al.</i> , 1968
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Superfície	5,0-6,0	4,5-6,0	30-40	30-45	Rajkumar e Nandy, 1983

1.3 Produção de Tanases

A produção desta enzima pode ser realizada em fermentação submersa (FSbm) ou em fermentação em substrato sólido (FSS), sendo que neste último a produção e atividade enzimática, geralmente, apresentam-se maiores (Mingshu *et al.*, 2006).

Na produção de tanases em FSbm, o microorganismo fica em suspensão em um meio de cultura líquido no qual estão dissolvidos ou suspensos todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento do organismo. Este tipo de cultivo foi preferido por muitos anos para a produção de diversas enzimas, já que os meios de cultura podem passar por um processo de esterilização rápido e eficiente, bem como pela facilidade de controle das condições ambientais para o experimento. Para o processo de fermentação em substrato sólido, o microorganismo deve se desenvolver em substratos insolúveis sem disponibilidade de fase líquida livre. No entanto, este método de cultivo oferece algumas vantagens econômicas com relação ao cultivo submerso: a produção do meio para crescimento do microorganismo é sempre bastante simples, podendo ser utilizados resíduos agroindustriais, como farelo de trigo, bagaço de cana, farelo de soja e sabugo de milho, entre outros, como substrato/fonte de carbono. Apesar do rendimento da enzima ser menor, pela baixa disponibilidade de água livre, a atividade da enzima produzida geralmente é mais alta com este método de fermentação, além do fato de que, toda a tanase produzida em substrato sólido é encontrada extracelularmente, facilitando sua obtenção, enquanto que nos cultivos líquidos, apenas parte da enzima é de natureza extracelular (Deschamps e Huet, 1983).

A produção de tanases por microrganismos ainda pode ser influenciada pela adição de outros compostos nos meios de cultivos, sejam quais forem, aumentando a produção desta enzima, como é o caso de fontes de carbono ricas em taninos e nitrogênio, íons metálicos e substratos indutores de atividade tanásica.

1.4 Aplicações das tanases

No momento, as tanases vêm sendo empregadas comercialmente na produção de chás instantâneos, eliminando precipitados insolúveis existentes devido a presença de taninos nas folhas desses chás. Estes precipitados são gerados de forma natural quando a bebida atinge temperaturas inferiores a 4°C e quando esses compostos são removidos quimicamente, ocorrendo a diminuição da qualidade do chá. Ao contrário, se as tanases forem empregadas na hidrólise das

ligações ésteres dos polifenóis, a polimerização será evitada e serão preservados os conteúdos aromáticos e coloração apropriada (Sanderson *et al.*, 1974).

As tanases também podem ser empregadas na indústria vinícola. Sua utilização no processo de produção do vinho favorece a melhoria da qualidade desta bebida, reduzindo o conteúdo de açúcares e mantendo o pH em torno de 4,0 (Chae e Yu, 1983). Adicionalmente, esta enzima pode ser empregada como agente clareador em sucos de frutas industrializados e em bebidas alcoólicas com aroma de café retirando compostos fenólicos presentes das plantas utilizadas como matéria-prima (Lekha *et al.*, 1993) ou ainda na produção de cervejas, onde esta enzima removeria os taninos (Aguilar e Gutiérrez-Sanchez, 2001).

Outra aplicação para as tanases se refere ao tratamento de efluentes de curtumes, já que estes apresentam altas concentrações de taninos (Aguilar e Gutiérrez-Sanchez, 2001), os quais são fundamentais no processo de curtimento do couro de bovinos, o que representa um risco ao meio ambiente. Por esta razão, a utilização de tanases representa um modelo de tratamento de baixo custo e bastante efetivo na remoção de polifenóis presentes.

As tanases também podem ser empregadas como complemento na produção de rações animais, uma vez que a utilização de cultivares de cereais que apresentam alto conteúdo de taninos pode reduzir a qualidade do alimento e assim, prejudicar a nutrição de ruminantes (Aguilar Gutiérrez-Sanchez, 2001).

Contudo, a aplicação mais importante das tanases é na produção de ácido gálico a partir de produtos de plantas ricos em taninos. O ácido gálico é um composto intermediário na síntese da droga antibacteriana trimetropina, utilizada pela indústria farmacêutica (Sittig, 1988). Na indústria alimentícia, é utilizado como substrato na síntese química do pirogalato ou ésteres de galatos, que são utilizados como conservantes. O uso de tanases na hidrólise de taninos também encontra vasta aplicação, porque podem ser obtidos outros compostos, como é o caso do propilgalato, que é utilizado como agente antioxidante em gorduras e óleos (Lekha e Lonsane, 1997).

A utilização das tanases em processos industriais pode ser realizada de duas formas: uma com contato direto do extrato enzimático ou da enzima imobilizada em suportes, com o material polifenólico a ser hidrolisado ou, de outra maneira, cultivando o microorganismo produtor de tanase diretamente no material rico em taninos que será degradado em compostos cada vez mais simples (Aguilar e Gutiérrez-Sanchez, 2001).

1.5 Tecnologia e imobilização enzimática

As enzimas são biocatalizadores que atuam nas rotas metabólicas dos seres vivos sobre condições ótimas. Algumas propriedades das enzimas fazem com que estas sejam melhores aproveitadas que os catalisadores químicos tradicionais, tal como a grande eficiência catalítica, considerando que o principal objetivo de qualquer processo de biotransformação é obter uma elevada conversão de substrato em produto a um curto espaço de tempo. Além dessa característica as enzimas apresentam uma elevada especificidade e seletividade dependendo da sua função metabólica, atuando sobre condições suaves de reação como pressão, pH e temperatura. Adicionalmente, minimizam os danos ao meio ambiente por se tratarem de compostos biológicos que podem ser facilmente degradados (Silva, 2009).

Atualmente, são conhecidas mais de 2000 enzimas e apesar da excelente propriedade catalítica que apresentam, pouco mais de 400 são exploradas comercialmente, sendo a maioria enzimas extracelulares e de origem microbiana. A evolução metabólica das enzimas seguiu um processo de otimização segundo a função que desempenha fisiologicamente nos organismos, sem considerar a necessidade de utilização *in vitro* para aplicações industriais. Desta forma, muitas enzimas não são suficientemente estáveis as condições de reações desejadas, tais como a agitação mecânica, aos solventes, as altas temperaturas, pH extremos e a necessidade de cofatores, assim como a inibição por elevadas concentrações de substratos e produtos. Em função dessas adversidades, a tecnologia enzimática surge como uma ferramenta importante que tem como objetivo superar todos os inconvenientes que impeçam a aplicação destas proteínas em processos industriais (Klibanov, 1983).

Considerando as ferramentas existentes, o emprego da enzima imobilizada em suportes pode ser eficiente, evitando tais adversidades e facilitando a aplicação dessas proteínas comercialmente. A imobilização pode ser definida como o movimento não independente das células ou enzimas na parte aquosa do sistema, por estarem alojadas dentro ou na superfície do agente imobilizador (Tampion e Tampion, 1988). Uma outra forma de ser definida é como a fixação de enzimas ou células vivas em um ambiente, de maneira que sua atividade catalítica não seja afetada negativamente (Cantarelli, 1989).

A utilização do processo de imobilização de enzimas se torna interessante quando proteínas com interesses industriais apresentam limitações por falta de estabilidade sobre as

condições exigidas na sua manipulação, e também quando se faz necessário a recuperação e a reciclagem do biocatalizador. Uma vez imobilizada (fisicamente confinada ou localizada em uma região definida no espaço com retenção de sua atividade catalítica), a enzima deixa de ser um catalisador solúvel e passa a apresentar algumas vantagens que só um catalisador heterogêneo possui, tais como a possibilidade de reutilização ou o uso contínuo, fácil separação da mistura de reação, possibilidade de modulação das propriedades catalíticas, prevenção de contaminação do produto com proteínas indesejáveis, prevenção de uma contaminação microbiana e uma possível estabilização da estrutura tridimensional da enzima (Silva, 2009).

As propriedades das enzimas imobilizadas podem ser determinadas tanto pelas características da enzima quanto do suporte sobre o qual estão imobilizadas. A ligação estabelecida entre ambos origina um derivado enzimático com propriedades químicas e mecânicas específicas (Tischer e Kasche, 1999). A velocidade e o rendimento da imobilização são determinados por parâmetros como o tipo de suporte empregado, o método escolhido, a concentração da enzima e dos grupos reativos do suporte, pH, temperatura e tempo de reação (Buchholz, 1979). Os distintos métodos de imobilização são classificados de acordo com a interação físico-química usada na união entre o suporte e a enzima. A adsorção sobre suportes iônicos e a imobilização covalente são as técnicas mais utilizadas e as que são empregadas em maior número nas indústrias (Buchholz *et al.*, 2005).

Na imobilização reversível por adsorção iônica a ligação da proteína com o suporte é do tipo eletrostática (ligação iônica e pontes de hidrogênio) onde essas interações são individualmente fracas. No entanto, são abundantes suficientemente para gerar uma união estável entre a enzima e o suporte, e pode constituir um protocolo conveniente para a imobilização de algumas enzimas industriais. A reversibilidade de um derivado implica na possibilidade de obtenção de uma completa desorção da enzima, com a aplicação de uma força iônica alta, quando a atividade do catalisador não é rentável. O suporte pode ser recuperado livre de proteínas e voltar a ser utilizados em novas imobilizações (Silva, 2009).

Este método de imobilização é muito apreciado em processos industriais em que o suporte representa um valor importante no custo total do catalisador. Um exemplo clássico é a utilização de DEAE-celulose empregada em escala industrial para imobilização de glicose isomerase (Antrim e Auterinen, 1986).

Já na imobilização irreversível por ligação covalente, a união entre a enzima e o suporte ocorre pela formação de ligações fortes e estáveis, o que impede que a enzima seja liberada para o meio reativo (Faber, 1996). Para a obtenção de um elevado rendimento de imobilização é necessário que os aminoácidos essenciais para a catálise não estejam envolvidos na união covalente com o suporte. Uma união covalente forma-se normalmente entre os grupos funcionais presentes no suporte e as cadeias laterais dos aminoácidos disponíveis na superfície da proteína (grupos NH_2 das lisinas, SH das cisteínas, OH das tirosinas e serinas, e COOH dos ácidos aspártico e glutâmico) dando lugar a ligações do tipo amida, tio-éster e éter ou ligações carbamatos (Srere e Uyeda, 1976). A imobilização por união covalente tem permitido modificar as propriedades das enzimas imobilizadas em relação as enzimas solúveis, tais como melhorias na eficiência catalítica e também na sua estabilidade frente a agentes que provocam alteração na estrutura protéica (Guisán *et al.*, 1993).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo geral deste trabalho foi coletar e isolar linhagens de fungos filamentosos produtoras de tanases e em seguida, estudar as enzimas intra e extracelulares do fungo filamentoso *Emericella nivea* produzidas em Fermentação Submersa e em Fermentação em Substrato Sólido, purificando-as e caracterizando-as bioquimicamente, além de imobilizá-las.

2.2 Específicos

- Coletar e isolar diferentes linhagens de fungos filamentosos.
- Determinar e selecionar as cepas com alta produtividade tanásica.
- Padronizar as condições ótimas para produção de tanases por *Emericella nivea* em Fermentação Submersa (FSbm) e em Fermentação em Substrato Sólido (FSS).
- Purificar as tanases intra e extracelulares de *Emericella nivea*.
- Caracterizar bioquimicamente as tanases intra e extracelular produzida por *Emericella nivea*.
- Verificar a influência de diferentes compostos na atividade tanásica.
- Analisar qualitativamente e quantitativamente a hidrólise de ácido tânico pelas tanases de *Emericella nivea*.
- Imobilizar as tanases extracelulares de *Emericella nivea* em suportes de agarose.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento de microorganismos produtores de tanases

Para o isolamento dos fungos produtores de tanases foram utilizadas placas de Petri contendo meio agarificado tendo ácido tânico 2% (m/v) como única fonte de carbono. Após a polimerização do meio de isolamento, as placas foram abertas e expostas as condições ambientais por 10 minutos, fechadas e levadas ao laboratório, sendo incubadas a 30°C por 4 a 5 dias. Os fungos foram coletados nas cidades paulistas de Ribeirão Preto (21°12'42" de latitude sul e 47°48'24" de longitude oeste), Sertãozinho (21°08'17" de latitude sul e 47°59'26" de longitude oeste) e Araçatuba (21°12'32" de latitude sul e 50°25'58" de longitude oeste).

As diferentes linhagens de fungos que se desenvolveram nas placas de Petri foram transferidas, com auxílio de uma alça de platina, para o meio de manutenção Batata Dextrose Ágar (BDA). As cepas de fungos filamentosos foram diferenciadas de acordo com a observação macroscópica das características morfológicas e culturais.

3.1.1 Composição dos meios de cultivo

Meio Batata Dextrose Agar (BDA)

- Batata.....30g
- Glicose.....2g
- Ágar bacteriológico.....2g
- Água destilada.....qsp 100mL

As batatas foram cozidas em água e filtradas com auxílio de gaze, sendo este filtrado utilizado para a preparação do meio.

Meio de cultura para isolamento de cepas produtoras de tanase

- Ágar bacteriológico.....2g
- Ácido tânico.....2g
- Solução de sais de Khanna [20x].....5mL
- Água destilada.....qsp 100mL

3.2 Manutenção das Cepas em Laboratório e Obtenção das Culturas

A manutenção das cepas em laboratório foi realizada em meio sólido de batata (BDA) em tubos de ensaio inclinados, com repiques periódicos em intervalos de aproximadamente trinta dias, mantendo-se as novas cepas em 30°C por 6 a 7 dias para crescimento e posteriormente armazenadas em geladeira a 4 °C.

Para Fermentação Submersa foram utilizados 5 diferentes meios de cultivos: meio Khanna (Khanna *et al.*, 1995), meio Czapeck (Wisemam, 1975), meio SR (Rizzati *et al.*, 2001), meio Vogel (Vogel, 1964) e meio M5 (Peralta *et al.*, 1990). As culturas foram obtidas mediante inóculo de 1mL de uma suspensão de conídios em água destilada estéril em uma concentração final de 10⁵ esporos/mL, em frascos Erlenmeyer de 125mL, contendo 25mL de meio. As culturas foram mantidas a 30°C, sob agitação orbital de 100rpm, por diferentes períodos, como determinado para cada experimento.

As culturas em substrato sólido foram também utilizadas, empregando-se para tanto resíduos agroindustriais tais como bagaço de cana, farelo de trigo, farinha de aveia e palha de arroz, ou folhas de vegetais ricas em taninos como eucalipto, romã, jambolão, jaca, entre outros, como substratos/fontes de carbono umedecidos com água de torneira ou diferentes soluções de sais (Vogel, SR e Khanna) em diferentes proporções (m/v). As FSS foram incubadas a 30°C em estufa com 60% de umidade relativa controlada com termohigrometro, por diferentes períodos.

3.2.1 Composição dos meios de cultivo

Meio de Khanna (Khanna *et al.*, 1995)

- Solução de sais de Khanna [20x].....5mL
- Extrato de levedura.....0,1g
- Ácido tânico.....2g
- Água destilada.....qsp 100mL

Solução de sais de Khanna [20x]

- NH₄NO₃.....2g
- KH₂PO₄.....1,3g
- MgSO₄.7H₂O.....0,362g
- KCl.....0,098g

- $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$0,007g
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$0,0138g
- $\text{Fe}_2(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$0,0066g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$0,0062g
- Água destilada.....qsp 100mL

Meio SR (Rizzati *et al.*, 2001)

- Solução de sais de SR [20x].....5mL
- Peptona.....0,02g
- Extrato de levedura.....0,45g
- Ácido tânico.....1g
- Água destilada.....qsp 100mL

Solução de sais SR [20x]

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,24g
- KH_2PO_40,3g
- $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$1g
- Água destilada.....qsp 100mL

Meio Czapeck (Wisemam, 1975)

- NaNO_30,3g
- KH_2PO_40,1g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,05g
- KCl0,05g
- $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,001g
- Extrato de levedura.....0,1g
- Ácido tânico.....1g
- Água destilada.....qsp 100mL

Meio M5 (Peralta *et al.*, 1990)

- Extrato de levedura.....0,6g
- Peptona.....0,1g
- CaCO₃.....0,1g
- NaCl.....1g
- Ácido tânico.....1g
- CH₃COONH₄.....0,6g
- Água destilada.....qsp 100mL

Meio Vogel [50x] (Vogel, 1964)

- Na₃C₆H₅O₇.2H₂O.....12,5g
- KH₂PO₄.....25g
- MgSO₄.7H₂O.....1g
- NH₄NO₃.....10g
- CaCl₂.2H₂O.....0,5g
- Solução de biotina.....0,5mL
- Solução de traços de elementos.....0,5mL
- Água destilada.....qsp 100mL

Solução de biotina

- Biotina.....0,005g
- Etanol 50% (v/v).....100mL

Solução de traços de elementos

- C₆H₈O₇.H₂O.....5g
- ZnSO₄.7H₂O.....5g
- Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O.....1g
- CuSO₄.5H₂O.....0,25g
- MnSO₄.H₂O.....0,05g
- H₃BO₃.....0,05g
- Na₂MoO₄.2H₂O.....0,05g
- Água destilada.....qsp 100mL

3.3 Seleção da linhagem produtora de tanases em Fermentação Submersa

As cepas fúngicas isoladas como descrito previamente, bem como outras cepas disponíveis na micoteca do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, foram cultivadas em meios de Khanna adicionado de ácido tânico como fonte de carbono, por 72 horas, a 30°C sob agitação orbital de 100rpm.

3.3.1 Microorganismo selecionado

Entre as linhagens fúngicas analisadas quanto a produção tanásica, a que demonstrou melhores rendimentos quanto a produção enzimática foi a de *Emericella nivea*.

Emericella nivea é um fungo filamentosos isolado do solo da cidade de Ribeirão Preto (21°12'42" de latitude sul e 47°48'24" de longitude oeste), São Paulo, Brasil e identificado pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Pernambuco.

3.4 Preparação dos produtos agroindustriais e folhas de vegetais como substratos/fontes de carbono na produção de tanases em FSS

Os produtos agroindustriais como milho, sabugo de milho, farinha de mandioca, fibra de trigo, farelo de soja, bagaço de cana, palha de arroz e farinha de aveia foram adquiridos no comércio local, sendo utilizados diretamente como meio de cultivo, ou no caso do milho e sabugo de milho, triturados com auxílio de multiprocessador doméstico.

Já as folhas dos vegetais foram colhidas no município de Santo Antônio do Aracanguá (latitude 20°56'12" sul e longitude 50°29'44" oeste), secas em estufa a 40°C por 3 ou 4 dias, até atingirem massa seca constante e posteriormente trituradas em gral de porcelana. Tais produtos foram utilizados como substratos/fontes de carbono em Fermentação em Substrato Sólido (FSS) preenchendo 1/5 do volume total em frascos Erlenmeyer de 125mL.

3.5 Obtenção das Enzimas Extracelular e Intracelular

Após o período de incubação, as FSbm foram filtradas à vácuo em funil Büchner, com papel de filtro Whatman nº1, obtendo-se um filtrado livre de células, o qual foi denominado extrato bruto extracelular e utilizado para determinação da atividade enzimática, e o micélio, o qual foi macerado

com areia previamente tratada, em gral de porcelana mantido em banho de gelo e, posteriormente, ressuspensão em solução tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0, e centrifugado a 23 000 *g*, durante 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante, denominado extrato bruto intracelular, foi utilizado para a determinação da atividade tanásica.

No caso das FSS, as mesmas foram adicionadas de 30mL de água destilada gelada e submetidas a intensa agitação com o auxílio de uma barra magnética por um período de 20 minutos a 4°C. Após esse período, as culturas foram filtradas à vácuo em gaze e posteriormente em papel de filtro Whatman nº1 utilizando-se funil Büchner. O filtrado livre de células obtido foi empregado na determinação da atividade enzimática extracelular e os resíduos do meio, juntamente com o micélio, descartados.

3.6 Determinação da Atividade Enzimática

A atividade tanásica foi determinada pelo método da rodanina metanólica, utilizando-se o metil galato 100mM como substrato em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 de acordo com o protocolo descrito por Sharma e colaboradores (2000).

A reação foi composta por 250µL da solução contendo o substrato e 250µL da amostra enzimática, sendo a reação conduzida a 40°C durante 10 minutos. A reação enzimática foi parada pela adição de 300µL de rodanina metanólica 0,667% (m/v). Após 5 minutos, 200µL de hidróxido de potássio 0,5M (m/v) foram adicionados, formando um cromatógeno de coloração violeta. O volume obtido foi diluído adicionando 5mL de água destilada em cada reação. Após 10 minutos procedeu-se a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda $\lambda=520\text{nm}$. A unidade de atividade tanásica (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de ácido gálico por minuto nas condições de ensaio.

3.7 Quantificação de Proteínas e Carboidratos

A quantificação de proteínas foi realizada como descrito por Lowry *et al.* (1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. As amostras de soluções enzimáticas (200µL) foram acrescidas 1mL de uma solução preparada no momento do uso, composta de carbonato de sódio 2% (m/v) em NaOH 0,1N (m/v), sulfato de cobre 1% (m/v) e tartarato de sódio e potássio 1% (m/v), na proporção de 100:1:1 (v/v/v). Após 15 minutos, acrescentou-se 100 µL de Folin Ciocalteu em

água destilada (1:1 v/v). Após 30 minutos foi mensurada a absorvância em comprimento de onda $\lambda=620\text{nm}$. A unidade foi definida como sendo a quantidade em mg de proteína/mL de amostra. A proteína total (mg totais) foi definida como mg de proteína x volume de amostra.

O conteúdo de carboidratos da amostra de tanase purificada foi estimado pelo método fenol-sulfúrico segundo Dubois *et al.* (1956) utilizando-se manose como padrão (0 a 0,1 mg/mL). As amostras enzimáticas (400 μL) foram adicionados a 1mL de ácido sulfúrico concentrado e 10 μL de fenol 80% (v/v). Esta mistura foi agitada e mantida em banho de gelo por 10 minutos e posteriormente incubada a 30°C por 15 minutos. Após este procedimento, a mistura foi novamente agitada e a absorvância foi mensurada em comprimento de onda $\lambda=490\text{nm}$. Para o branco, a amostra enzimática foi substituída pela mesma quantidade de água destilada. A unidade foi definida como sendo a quantidade em mg de carboidrato presente por mL da amostra.

3.8 Purificação das Tanases Extra e Intracelular em Coluna Cromatográfica

Os extratos brutos extra e intracelular foram dialisados contra tampão acetato de sódio 10mM pH 5,0 *overnight* a 4°C e posteriormente tratados com Caulim (40 mg/mL) para remoção dos pigmentos, em banho de gelo, sendo agitado por barra magnética por um período de 2 horas e em seguida centrifugado a 23000 *g*. O sobrenadante foi aplicado em coluna cromatográfica de troca iônica DEAE-celulose (1 x 12 cm) equilibrada previamente em tampão acetato de sódio 10 mM, pH 5,0 e com vazão ajustada para 1 mL/min. A enzima foi eluída mediante a aplicação de um gradiente linear de NaCl (0 a 1,5M). As frações que apresentaram atividade foram reunidas em um único *pool*, dialisadas *overnight* contra tampão acetato de sódio 10mM, pH5,0 e, após este procedimento, a enzima extracelular foi aplicada em coluna de exclusão molecular Sephacryl S-200 (1 x 80 cm), previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 50 mM pH7,5 adicionado 50 mM de NaCl e com fluxo ajustado para 0,33 mL/min. As frações que apresentaram atividade tanásica foram reunidas e dialisadas *overnight* contra água destilada. As frações intra e extracelulares purificadas foram liofilizadas, e aplicadas em eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE 7%) e desnaturantes (SDS-PAGE 12%) como descrito no item 3.10.

3.9 Determinação da massa molecular

A massa molecular nativa foi mensurada utilizando-se uma amostra protéica com atividade tanásica, dialisada *overnight* contra água destilada, liofilizadas e ressuspendida em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 adicionado 100 mM de KCl, foi aplicada em coluna de exclusão molecular Sepharose CB6L (1 x 80 cm), previamente equilibrada com o mesmo tampão e com vazão ajustada para 1,73 mL/min. As frações que apresentaram atividade tanásica foram reunidas e dialisadas *overnight* contra água destilada a 4°C. Desta forma, a massa molecular nativa da tanase extracelular foi determinada utilizando-se β -amilase (200 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa) como marcadores de massa molecular. O volume livre da coluna (V_0) foi de 86,3 mL, determinado com Blue Dextran 2000.

Já a massa molecular da tanase desnaturada foi determinada utilizando-se SDS-PAGE 12% (como descrito no item 3.11) e como marcadores de massa molecular (SDS-PAGE) foram utilizados: fosforilase b (97 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (33 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).

3.10 Procedimento eletroforético

O processo de purificação foi acompanhado através de procedimento eletroforético em gel de poliacrilamida montado entre placas de vidro, em condições não desnaturantes (PAGE 7%) (Davis, 1964) e em condições desnaturantes (SDS-PAGE 12%) (Laemmli, 1970), utilizando-se uma fonte ajustada para 120 V e 40 mA. Após corrida eletroforética o gel foi removido das placas de vidro e corado em Comassie Brilliant-Blue R250 ou submetido ao procedimento de revelação por prata segundo metodologia descrita por Blum e colaboradores (1987) ou ainda, utilizado para determinação da atividade enzimática em gel.

A determinação da atividade tanásica em gel foi realizada lavando-se o gel sob agitação com 100 mL de Triton X-100 2,5% (v/v) durante 1 h e seguida de 2 lavagens com 100 mL de tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,0 por 45 minutos. Depois de lavado, o gel foi submetido a incubação a 40°C com ácido tânico 0,5% (m/v) em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,5. A solução de ácido tânico foi descartada depois de 24 horas, e substituída por 100 mL de solução de hidrocloreto de quinina 0,5% (m/v) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5 a temperatura ambiente para revelação. A atividade tanásica aparece como uma banda clara no gel.

3.11 Caracterização bioquímica de tanases

3.11.1 Temperatura ótima e estabilidade térmica

A temperatura ótima para a atividade tanásica foi determinada em diferentes temperaturas que variaram entre 25°C e 90°C com intervalos de 5°C. A estabilidade térmica foi determinada incubando-se alíquotas de enzima em diferentes temperaturas (22°C a 90°C) por diferentes intervalos de tempo. A cada intervalo, alíquotas da enzima incubada eram retiradas, mantidas em banho de gelo e depois ensaiadas para atividade tanásica.

3.11.2 pH ótimo e estabilidade ao pH

O pH ótimo para a atividade tanásica foi determinado utilizando-se diferentes soluções tampões (100mM) com pH variando entre 3,0 e 8,0. Para pH 3,0 - 4,0 foi utilizado tampão ácido cítrico, para pH 4,5 - 6,0 tampão acetato de sódio, e pH 7,0 e 8,0 tampão Tris-HCl. Todos os tampões foram preparados em concentração de 100mM. A estabilidade ao pH das tanases foi verificada incubando-se as enzimas, em banho de gelo, em diferentes soluções tampões a 100mM. Para o pH entre 2,5 - 6,0 foi utilizado o tampão ácido cítrico, pH 7,0 - 9,0 o tampão Tris-HCl e pH 10,0 e 11,0 o tampão CAPS. As amostras enzimáticas foram adicionadas na proporção 1:1 (v/v) e após incubação, alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos de tempo e a atividade enzimática residual foi determinada.

3.11.3 Efeito de diferentes compostos químicos na atividade tanásica

O efeito de vários compostos sobre a atividade tanásica foi determinado. Os compostos foram utilizados em concentrações finais de 1mM para diferentes sais, β -mercaptoetanol e EDTA, 0,01% (v/v) para os detergentes SDS (m/v) e Triton X - 100 e 1% (v/v) para os solventes orgânicos (metanol, acetonitrila, etanol, acetona, isopropanol, n-butanol e glicerol). Em cada intervalo de tempo, alíquotas foram retiradas e ensaiadas para a atividade tanásica como descrito anteriormente.

3.11.4 Determinação das constantes cinéticas

As constantes cinéticas (K_m , V_{max} e V_{max}/K_m) das tanases intra e extracelulares foram determinadas pela representação gráfica do duplo-recíproco de acordo com Lineweaver-Burk

(1934) utilizando o programa Enzyplot (Leone *et al.* 1995). Os substratos utilizados foram ácido tânico e metil galato em concentrações que variaram entre 0,25 – 10 mM, sendo atividade tanásica determinada pelo método da rodanina metanólica.

3.12 Hidrólise de diferentes substratos e análise dos produtos de hidrólise do ácido tânico

As atividades esterásica e depsidásica das tanases intra e extracelular foram determinadas utilizando-se ácido tânico e metil galato como substratos, respectivamente. Ambos substratos foram diluídos em tampão acetato de sódio 100mM, pH 5,0 e as reações foram finalizadas em diferentes intervalos de tempo. A mistura de ambos os substratos (1:1, v/v) foi também submetida a ação das tanases com o intuito de se verificar se os sítios de hidrólise para estes substratos eram comuns.

A análise qualitativa do ácido gálico obtido a partir da hidrólise do ácido tânico foi determinado por cromatografia em camada delgada (TLC) utilizando como fase móvel uma solução de benzeno:acetato de etila:ácido fórmico (18:15:1, v/v/v). A mistura de reação contendo tanase e ácido tânico em tampão acetato 100 mM pH 5,0 (1:1, v/v) foi incubada a 40°C por diferentes períodos tomando-se alíquotas que foram aplicadas em TLC. Para o controle negativo foi utilizada tanase desnaturada (fervida por 10 minutos) nas mesmas condições e como padrões foram utilizados ácido tânico e ácido gálico. Após a corrida e secagem das placas de camada delgada, o ácido tânico residual e o ácido gálico formado foram revelados com FeCl₃ 1% (m/v) em água destilada.

3.13 Imobilização de tanase

A tanase extracelular produzida por *Emericella nivea* em FSbm foi utilizada nos ensaios de imobilização enzimática. Toda essa etapa do trabalho foi desenvolvida no Instituto de Catalisis y Petroleoquímica, Universidad Autonoma de Madrid, Espanha, sob a supervisão do Professor José Manuel Guisán Seijas e dos investigadores Benevides Costa Pessela e Glória Fernandez Lorente.

3.13.1 Preparo dos suportes

3.13.1.1 Suporte glioxil-agarose

O gel glioxil-agarose com grau de ativação de 75mM de grupos gliceril/mL de suporte foi preparado segundo Guisán (1993) a partir de agarose comercial 6BCL contendo 15µmols de diols oxidáveis por grama de resina. Neste procedimento 150mL do gel agarose foi suspenso em 30mL de água destilada e 50mL de NaOH 1,7N contendo 28,5mg/mL de borohidreto de sódio (BH₄Na). Sobre essa solução adicionou-se lentamente 2M de glicidol, e essa mistura foi mantida sob agitação constante em agitador de rolos por 18 horas. A seguir, o gel foi lavado com água destilada abundante e depois oxidado com adição de 112mL de periodato de sódio 0,1M sob agitação constante por 2 horas. Para finalizar, o gel foi novamente lavado com água destilada abundante e então armazenado a 4°C.

3.13.1.2 Suporte amino-glioxil

Este suporte foi preparado segundo Fernandez-Lafuente *et al.* (1999), sendo que 27,07mL de etilenodiamina 2M foi dissolvido em 100mL de água destilada, o pH da solução foi corrigido para 10,0 e o volume acertado para 200mL com água destilada. A seguir, a solução de etilenodiamina foi adicionada sobre 35g de glioxil-agarose e o gel foi deixado sob agitação constante em agitador de rolos por 2 horas. Em seguida, 2g de borohidreto de sódio (BH₄Na) foram adicionados sob agitação constante por mais 2 horas. O passo final consistiu em lavar o gel com 1L de tampão acetato de sódio 100mM pH 4,0 e 1L de solução de borato de sódio 100mM pH 9,0.

3.13.1.3 Suporte Q-Sepharose, DEAE-Sepharose e CM-Sepharose

Quantidades de 5g de cada suporte: Q-Sepharose, DEAE-Sepharose e CM-Sepharose foram adicionados em 100mL de água destilada e depois de 12 horas lavados exaustivamente com água destilada para total remoção dos conservantes, conforme especificação do fabricante.

3.13.1.4 Suporte bromo-cianogênio

A quantidade de 1g de agarose 4B ativada com brometo de cianogênio foi hidratada com 100mL de água destilada e o pH ajustado para 2,0, por 30 minutos, sob agitação constante em agitador de rolos conforme a indicação do fabricante.

3.13.2 Protocolos de imobilização

Em todos os casos, o curso de imobilização foi controlado pela medida de atividade enzimática do sobrenadante em diferentes tempos. Os sobrenadantes foram obtidos utilizando-se filtros de ponteiros ou centrifugação da suspensão enzimática, sendo descartado a porção precipitada. O extrato bruto da tanase extracelular dialisado contra tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,0 por 3 horas com três trocas de fase intercambiadora foi utilizado para a realização de todos os experimentos de imobilização. A atividade enzimática da suspensão no tempo zero foi empregada como controle e a diminuição da atividade do sobrenadante foi diretamente relacionada com a quantidade de enzima imobilizada no suporte.

3.13.2.1 Imobilização por adsorção a trocadores iônicos

Foram adicionados 10mL de solução de tanase em tampão fosfato de potássio 5mM pH 7,0 (1:10 v/v) em 1g de cada um dos suportes de troca iônica (DEAE-Sepharose, Q-Sepharose e CM-Sepharose) sob agitação constante em rolos. Durante o processo de adsorção, alíquotas de suspensão e do sobrenadante foram tomadas para medida de atividade enzimática. As suspensões foram deixadas sob agitação *overnight*, e então filtradas e lavadas com água destilada. Os derivados foram conservados a 4°C.

3.13.2.2 Imobilização sobre agarose ativada com BrCN

A 1g do suporte comercial previamente ativado, foram adicionados 10mL da solução enzimática em tampão fosfato de potássio 5mM pH 7,0 (1:10 v/v). A suspensão foi deixada sob agitação *overnight*, e então filtrada e lavada com água destilada. O derivado foi conservado a 4°C.

3.13.2.3 Imobilização sobre suporte glioxil-agarose

A 1g de suporte foram adicionados 10mL da solução enzimática, na presença de tampão bicarbonato de sódio 100mM pH 10,5, DTT (DL-Diitiothreitol) 50mM e etilenoglicol 50% (v/v). Essa mistura foi mantida em agitador de rolos por 3 horas. Uma vez imobilizadas, todas as ligações formadas entre os grupos glioxil e os grupos aminos (NH₂ das lisinas) foram reduzidas com borohidreto de sódio. Essa suspensão foi mantida sob agitação com barra magnética durante 30

minutos a temperatura ambiente e depois o derivado foi lavado com água destilada e armazenado a 4°C.

3.13.2.4 Imobilização sobre suporte amino-glioxil

A 1g de suporte foram adicionados 10mL da solução enzimática na presença de tampão fosfato de potássio 10mM pH 7,0 e etilenoglicol 50% (v/v). Essa mistura foi mantida em agitador de rolos por 3 horas e alíquotas do sobrenadante foram tomadas para mensurar a imobilização enzimática. Após este período, o pH foi ajustado para 10,5 e a suspensão foi mantida em agitação por mais 1 hora. As ligações entre o suporte e as proteínas foram reduzidas com borohidreto de sódio por 30 minutos em agitação utilizando barras magnéticas a temperatura ambiente e então o derivado foi lavado com água destilada e armazenado a 4°C.

3.13.3 Medida da atividade enzimática dos derivados

A atividade tanásica foi mensurada utilizando uma suspensão de 0,7g de cada um dos derivados em 1mL de água destilada. Destas suspensões foram retiradas alíquotas de 100µL sob agitação, as quais foram utilizadas no ensaio enzimático como descrito no item 3.6.

3.13.4 Estudo da estabilidade dos derivados

A estabilidade foi expressa como o declínio da atividade enzimática de cada derivado enzimático nas condições de incubação. O fator de estabilização foi determinado comparando as atividades residuais do derivado e da enzima livre. Os derivados enzimáticos foram incubados em diferentes temperaturas e condições de pH, e também de concentrações do solvente orgânico 1-propanol.

3.13.5 Efeito da atividade tanásica do derivado BrCN na análise quantitativa da hidrólise do ácido tânico e síntese de propilgalato

Para a analisar quantitativamente a hidrólise do ácido tânico em ácido gálico e a síntese do propilgalato a partir da transesterificação do ácido gálico com 1-propanol 50% (v/v), foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, RP-HPLC (Spectra Physic SP 100 acoplado com um detector UV Spectra Physic SP 8450) equipado com uma coluna C8 5µm (150x4,6mm). Como

fase móvel foi utilizada uma solução de metanol 35% (v/v) e tampão fosfato amônico 10mM pH 8,0 65% (v/v) a 25°C. Como padrões foram utilizados ácido gálico 1mM e propilgalato 1mM.

Para a hidrólise do ácido tânico foi preparada uma suspensão de 0,5g de derivado BrCN em tampão acetato de sódio 100mM pH 5,0 e diglime 30% (v/v) (V_f 2mL) e também, paralelamente foi feita a reação controle com enzima solúvel utilizando o extrato bruto extracelular, sendo preparada uma solução com 1mL de enzima solúvel em mesmo tampão e diglime 30% (v/v) (V_f 3mL). As amostras coletadas da reação com extrato bruto foram tratadas previamente com sulfato de zinco 5% (m/v) e hidróxido de bário 4% (m/v), antes de serem aplicadas em HPLC, para retirada da proteína, sendo que depois de agitadas, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi então utilizado.

A síntese de propilgalato foi realizada apenas com a enzima imobilizada, sendo que a mesma quantidade de derivado BrCN foi adicionado ao mesmo volume final de suspensão, como descrito para a hidrólise, em tampão fosfato de potássio 100mM pH7,0, contendo 1-propanol 50% (v/v).

Para as duas reações, ácido tânico 2mM foi utilizado como substrato, e tais suspensões foram mantidas sob agitação a temperatura ambiente, retirando-se alíquotas do sobrenadante em diferentes intervalos de tempo e então, aplicadas em HPLC.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor entendimento dos resultados, estes foram separados em 3 seções a saber:

4.1 Produção de tanases por *Emericella nivea* em Fermentação Submersa (FSbm) e em Fermentação em Substrato Sólido (FSS).

4.2 Purificação e caracterização das tanases intra e extracelulares

4.3 Imobilização da tanase extracelular

4.1 Produção de tanases por *Emericella nivea* em Fermentação submersa (FSbm) e em Fementação em substrato sólido (FSS)

4.1.1 Produção de tanases em Fermentação Submersa (FSbm)

4.1.1.1 Miroorganismos coletados e isolados

Os fungos filamentosos coletados nos municípios de Ribeirão Preto, Sertãozinho e Araçatuba, no Estado de São Paulo, depois de isolados foram catalogados (Tabela 2) e testados quanto a produção de tanases extracelulares em FSbm. As cepas isoladas do município de Araçatuba foram coletadas em curtume local, ambiente rico em compostos fenólicos. Outras linhagens já existentes na micoteca do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da FFCLRP-USP, também foram analisados quanto a produção de tanases.

Tabela 2. Fungos filamentosos coletados e isolados em diferentes localidades do Estado de São Paulo.

	Linhagem	Característica macroscópica	Município da coleta
Produtores	Bege H01	Bege claro	Araçatuba
	Branco H01	Branco	Araçatuba
	Branco H02	Branco	Araçatuba
	Branco H03	Branco	Araçatuba
	Verde H03	Verde amarronzado	Araçatuba
Não produtores	Cilagem 05	Bege escuro	Ribeirão Preto
	Cinza 01	Cinza	Sertãozinho
	Cinza 05C	Cinza escuro	Sertãozinho
	Cinza N01	Cinza chumbo	Ribeirão Preto
	Preto 01	Preto	Ribeirão Preto
	Preto 03	Preto	Sertãozinho
	Preto Vi	preto	Sertãozinho
	Verde 03	Verde musgo	Ribeirão Preto
	Verde 071	Verde claro	Ribeirão Preto
	Verde claro 07	Verde claro	Sertãozinho
	Verde H01	Verde musgo	Araçatuba
	Verde H02	Verde escuro	Araçatuba
	VA 02	Bege	Sertãozinho
	VI 02	Preto	Ribeirão Preto

4.1.1.2 Produção de tanases por diferentes linhagens de fungos filamentosos

Considerando os fungos isolados e os já existentes na micoteca do Laboratório de Biologia Celular e Microbiologia da FFCLRP-USP, 42 cepas linhagens fúngicas foram testadas quanto a produção de tanases, sendo que apenas 26 foram apresentaram tal característica. Dentre os fungos identificados, os que apresentaram maiores produções enzimáticas extracelulares foram *Emericella nivea* (0,342 U/mL), *Aspergillus ochraceus* (0,211 U/mL) e *Aspergillus terreus* (0,170 U/mL), respectivamente e entre os fungos não identificados merecem destaque Q verde (0,522 U/mL), Verde Claro 02 (0,432 U/mL) e Verde H03 (0,392 U/mL). Já quanto a atividade intracelular, os que mais se destacaram foram Q verde (0,643 U/mL), Verde Claro 02 (0,629 U/mL) e *Aspergillus oryzae* (0,380 U/mL) (Tabela 3). Desta forma, considerando o rendimento da tanase extracelular dentre os microorganismos identificados, *Emericella nivea* foi o fungo escolhido para a continuidade dos estudos, apesar de existirem outras linhagens com produções elevadas de tanases. Este microorganismo apresentou produção elevada de tanase extracelular. No entanto, a produção da forma intracelular foi reduzida 3,5 vezes se comparada a extracelular (Tabela 3).

A capacidade de produzir tanases já foi observada em muitos outros microorganismos, como apresentado por Aguilar *et al.* (2007), destacando-se entre os fungos filamentosos os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Mucor* e *Rhizopus*, e entre as bactérias os gêneros *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, e *Pediococcus*. Nas leveduras merecem destaque os gêneros *Candida*, *Saccharomyces* e *Pichia*.

Os fungos e bactérias dos gêneros *Aspergillus* e *Bacillus*, respectivamente, são os mais utilizados para a produção de tanases. A produção de tanases por *Aspergillus* sp. já foi observada tanto em Fermentação Submersa quanto em Fermentação em Substrato Sólido, na presença ou ausência de ácido tânico. Dependendo da linhagem e das condições cultivo, a enzima é induzida e expressa com diferentes níveis, mostrando diferentes padrões de produção (Aguilar *et al.*, 2007).

Tabela 3. Produção de tanases por diferentes linhagens de fungos filamentosos em FSbm.

	Atividade tanásica (U/mL)		Proteínas Intracelular (mg/mL)
	Extracelular	Intracelular	
<i>Aspergillus caespitosus</i>	0,086	0,157	0,761
<i>Aspergillus flavus</i>	0,137	0,187	1,556
<i>Aspergillus niger</i>	0,079	0,288	0,214
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0,211	0,151	1,701
<i>Aspergillus phoenicis</i>	0,072	0,127	1,309
<i>Aspergillus oryzae</i>	0,152	0,385	0,598
<i>Aspergillus terreus</i>	0,170	0,111	0,629
<i>Aspergillus versicolor</i>	0,014	0,105	2,142
Bege H01	0,171	0,100	0,180
Branco H01	0,089	0,161	2,022
Branco H02	0,239	0,069	0,218
Branco H03	0,169	0	0,099
Cinza cavaco	0,211	0,099	0,512
Cinza escuro H01	0,161	0	0,106
<i>Emericella nivea</i>	0,342	0,092	0,358
<i>Humicola grisea</i>	0,089	0,196	1,219
<i>Humicola insolens</i>	0,074	0,363	0,654
LH 05-A	0,241	0,099	0,343
<i>Neurospora crassa</i>	0,065	0,282	1,585
<i>Penicillium purpurogenum</i>	0,164	0,237	0,345
Preto 02	0,170	0,161	0,531
Q verde	0,522	0,643	0,760
<i>Scytalidium thermophilum</i>	0,064	0,187	1,454
Verde 05	0,280	0,145	0,409
Verde claro 02	0,432	0,629	0,710
Verde H03	0,392	0,096	1,979

Cultivos realizados em meio de Khanna tendo ácido tânico 2% (m/v) como fonte de carbono, por 3 dias sob agitação orbital de 100 rpm a 30°C. As linhagens não apresentadas na tabela, não produziram tanases.

4.1.1.3 Produção de tanases por *Emericella nivea* em função do meio de cultivo (FSbm)

O meio de fermentação deve proporcionar ao microorganismo todos os nutrientes que ele necessita. O meio deve conter basicamente, fontes de carbono e nitrogênio, e alguns minerais.

Para suprir a quantidade de carbono necessária para a produção de tanases deve ser utilizada uma fonte de taninos, sendo o ácido tânico o mais usual. Dos meios de cultura testados, foi avaliada a quantidade de tanases totais produzidas pelo fungo quando inoculado nos diferentes meios de cultura, sendo que para foi padronizado 19 mL para o extrato extracelular e 9 mL para o intracelular. O meio Czapeck adicionado de ácido tânico proporcionou uma maior produção da enzima extracelular (6,657 Utotais). Entretanto, a produção da enzima intracelular foi bastante reduzida (0,117 Utotais). Desta forma, optou-se pelo uso do meio Khanna, no qual foram produzidas tanto tanase extracelular (6,327 Utotais), quanto intracelular (0,864 Utotais) (Tabela 4), sendo a produção total (intra+extra) superior as obtidas com os demais meios testados. Entre os meios analisados o M5 foi o que menos favoreceu a produção enzimática, sendo a produção cerca de 5 vezes menor se comparada a obtida com o meio Khanna.

Tabela 4. Meios de cultura utilizados para a produção de tanases pelo fungo *Emericella nivea* em FSbm.

Meio de cultura	Atividade Tanásica (U totais)		
	Extracelular	Intracelular	Extra+intra
SR	2,090	1,161	3,251
Vogel	4,731	0,261	4,992
Czapeck	6,657	0,117	6,767
M5	1,368	0,027	1,395
Khanna	6,327	0,864	7,191

Cultivos realizados em meio de cultura tendo ácido tânico 2% (m/v) como fonte de carbono, por 3 dias sob agitação orbital de 100 rpm a 30°C.

4.1.1.4 Efeito de fontes de carbono na produção tanásica em FSbm

Na tabela 5 pode ser observada a influência de diferentes fontes de carbono sobre a produção de tanases pelo fungo *Emericella nivea* em fermentação submersa em meio Khanna.

O ácido tânico foi a fonte de carbono mais eficiente para a produção de tanases extra e intracelular, sendo os valores para atividades tanásicas de 0,325 U/mL e 0,097 U/mL, respectivamente. Para todas as demais fontes testadas, a produção foi diminuída. O ácido tânico foi, a partir desses dados, utilizado como fonte de carbono para os demais experimentos, sendo que esta fonte já havia sido descrita por Aoki *et al.* (1976) como um indutor para esta enzima, além de fonte de carbono para o microorganismo.

Considerando-se a maior produção enzimática obtida com ácido tânico, a influência de diferentes concentrações deste composto foi analisada. Nas concentrações de 2% (m/v) e 2,5% (m/v) foram obtidos os maiores níveis enzimáticos extra e intracelular, com produções máximas de 0,325 U/mL e 0,153 U/mL, sendo estas maiores cerca de 16 e 9 vezes, respectivamente, quando comparadas ao meio controle, ou seja, sem a presença de ácido tânico (Figura 4).

Em adição, meios contendo ácido tânico como principal fonte de carbono foram também suplementados com diferentes concentrações de ácido gálico e glicose, produtos de hidrólise do ácido tânico. Para ambos os compostos utilizados, até uma concentração de 0,5% (m/v), a produção de tanases extracelulares não sofreu grandes alterações. No entanto, em concentrações maiores, a produção foi diminuindo, sendo que na presença de 5% (m/v) a produção foi cerca de 4 vezes e 15 vezes menor se comparado ao controle, para adição de ácido gálico e glicose, respectivamente. Já para a forma intracelular a produção foi 2,5 vezes maior com adição de 0,75% (m/v) de ácido gálico e 2 vezes com adição de 0,1% (m/v) de glicose (Tabela 6).

No passado, acreditava-se que apenas o ácido tânico fosse capaz de induzir a tanase em microorganismos. Em 1997, Bradoo demonstrou que a tanase poderia ser expressa inclusive na ausência deste, ou também na presença de outros substratos como monossacarídeos, dissacarídeos, polissacarídeos, peptona ou caseína.

Bajpai e Patil (1997) demonstraram que outros compostos como metil galato, ácido gálico e pirogalol também podem induzir a produção de tanases, além do ácido tânico. No entanto, o mecanismo de indução ainda não está totalmente elucidado e existem controvérsias a respeito da função de alguns componentes dos taninos hidrolisáveis na síntese das tanases (Belmares *et al.*,

2004). Bajpai e Patil (1997) sugerem que a tanase não deve ser controlada por retroalimentação negativa, porque o ácido gálico, que é um produto final, também pode induzir a produção da enzima. Bradoo (1997) sugere que o ácido gálico está envolvido em algum mecanismo de regulação da atividade enzimática pelo produto final.

No caso da enzima produzida por *Emericella nivea* em FSbm, a produção significativa ocorre somente em presença de ácido tânico. Outras fontes de carbonos podem ser adicionados ao meio favorecendo sua produção. No caso dos meios de cultura suplementados com ácido gálico, infere-se que em determinadas concentrações ocorra uma retroalimentação positiva, especialmente para a forma intracelular, uma vez o que produto é capaz de estimular a produção tanásica. No entanto, não se observa um aumento significativo da secreção da enzima. No caso da glicose é possível que esteja ocorrendo repressão catabólica quanto utilizada altas concentrações deste sacarídeo.

Tabela 5. Fontes de carbono utilizadas para a produção de tanases em FSbm por *Emericella nivea*.

Fontes de carbono	Atividade tanásica (U/mL)	
	Extracelular	Intracelular
Maltose 1%	0,018	0,009
Fibra de trigo 1%	0,016	0,005
Sacarose 1%	0,010	0,013
Farinha de aveia 1%	0,018	0,012
Farinha de mandioca 1%	0,019	0,011
Palha de arroz 1%	0,019	0,010
Glicose 2%	0,025	0,020
Sabugo de milho 1%	0,016	0,006
Milho moído 1%	0,018	0,009
Bagaço de cana 1%	0,012	0,012
Amido 1%	0,018	0,008
Lactose 1%	0,025	0,007
Ácido tânico 2%	0,325	0,097

Cultivos realizados em meio de Khanna por 3 dias sob agitação orbital de 100 rpm a 30°C.

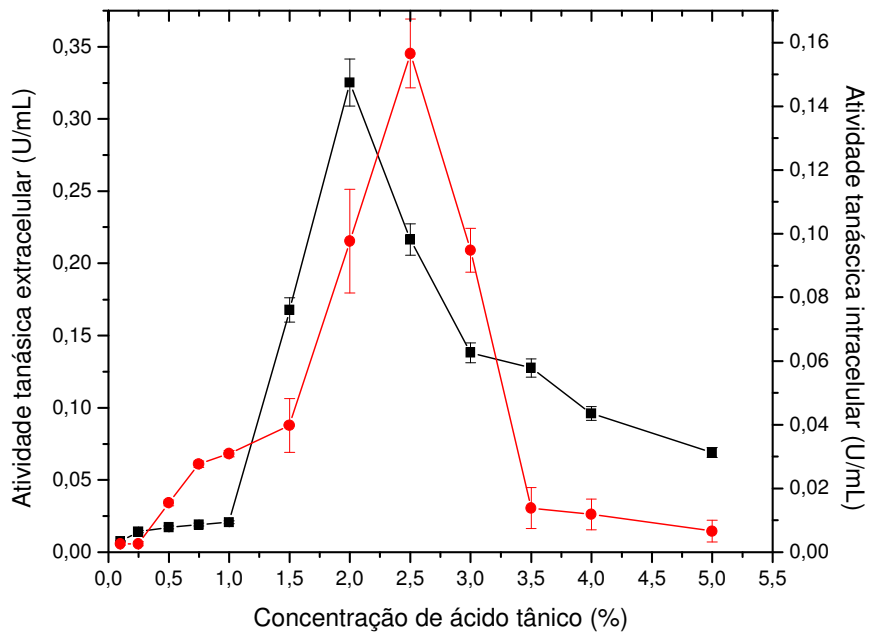


Figura 4. Efeito da concentração de ácido tânico na produção de tanases extracelular (■) e intracelular (●) por *Emericella nivea*. Cultivos realizados em meio Khanna, por 3 dias sob agitação de 100 rpm a 30°C.

Tabela 6. Efeito da suplementação do meio de cultivo com diferentes concentrações de glicose e ácido tânico na produção de tanases em FSbm por *Emericella nivea*.

Concentração ácido gálico e glicose (%)	Atividade tanásica (U/mL)			
	Ácido gálico		Glicose	
	Extracelular	Intracelular	Extracelular	Intracelular
0	0,310	0,102	0,366	0,139
0,1	0,291	0,159	0,399	0,300
0,25	0,321	0,165	0,352	0,193
0,5	0,296	0,243	0,355	0,186
0,75	0,259	0,255	0,204	0,178
1,0	0,212	0,185	0,177	0,087
2,0	0,208	0,165	0,077	0,040
5,0	0,076	0,080	0,024	0,006

Cultivo realizado em meio de Khanna tendo ácido tânico 2% (m/v) como fonte de carbono, por 3 dias sob agitação orbital de 100 rpm a 30°C.

4.1.1.5 Efeito de fontes de nitrogênio e fosfato na produção de tanase em FSbm por *Emericella nivea*

Na tentativa de maximizar a produção de tanases pelo fungo *Emericella nivea* foi realizado um experimento com adição de concentrações crescentes, 0,01% a 2% (m/v), de extrato de levedura e KH_2PO_4 como fontes adicionais de nitrogênio e fosfato, respectivamente.

A maior produção enzimática para a forma extracelular e intracelular foi obtida na ausência e com 1% (m/v) de extrato de levedura com produções máximas de 0,365 U/mL e 0,097 U/mL, respectivamente (Figura 5A), enquanto que as concentrações de KH_2PO_4 que proporcionaram maiores produções foram 0,01% e 0,75%, com valores máximos de 0,538 U/mL e 0,151 U/mL para a forma extra e intracelular, respectivamente (Figura 5B).

Do ponto de vista industrial, a utilização da forma extracelular é mais vantajosa e, considerando este aspecto, foram escolhidas as condições que melhor favoreceram a obtenção desta forma enzimática. sendo assim, nem a fonte de nitrogênio e tampouco a fonte de fosfato (que favoreceu o aumento de apenas algumas unidades tanásicas) foram adicionadas nos demais experimentos.

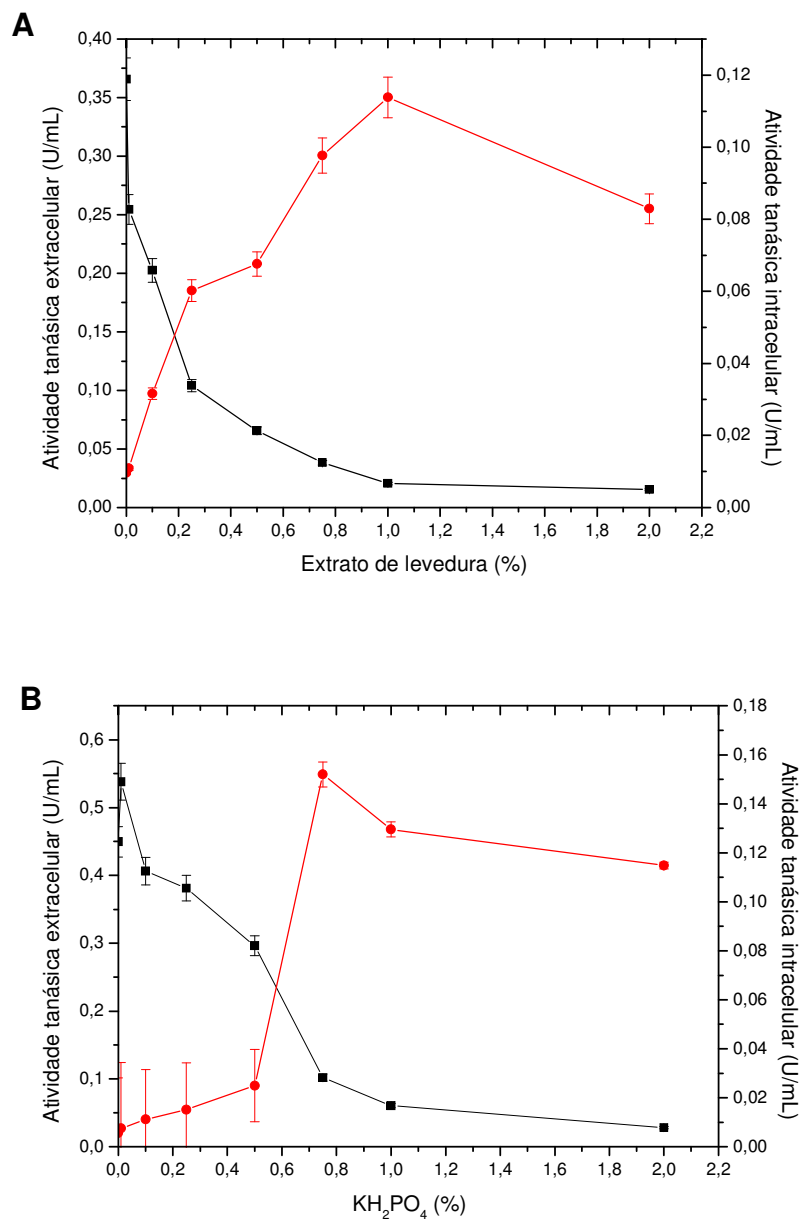


Figura 5. Efeito do extrato de levedura (A) e KH₂PO₄ (B) na produção de tanases extracelular (■) e intracelular (●) por *Emericella nivea*. Cultivos realizados em meio Khanna, por 3 dias sob agitação orbital de 100 rpm a 30°C.

4.1.1.6 Efeito do pH inicial do meio de cultivo na produção de tanases em FSbm

Na figura 6 pode-se observar que os maiores níveis enzimáticos extracelular (0,345 U/mL) e intracelular (0,185 U/mL) foram obtidos quando o pH inicial do meio de cultivo foi ajustado para 6,0. Foi observada também uma queda dos valores de pH ao longo dos dias de cultivo, sendo aferido os pH dos filtrados extracelulares (não mostrado). Provavelmente, isso se deve a produção de metabólitos ácidos. Barthomeuf *et al.* (1994) demonstraram que para tanases produzidas por *Aspergillus niger*, em pH abaixo de 3,5 a enzima é instável. No entanto, a hidrólise do substrato e a difusão da enzima no meio são melhoradas quando o microorganismo é cultivado em valores de pH acima de 5,5.

O pH do meio de cultura pode afetar a estrutura e a função das enzimas, sendo que estas proteínas podem conter grupos ionizáveis. Muitas enzimas microbianas aumentam seu rendimento quando produzidas em um pH em torno do seu máximo para a atividade. No caso da maioria das tanases cultivadas em fermentação submersa, o pH inicial ótimo se encontra entre 4,5 e 6,5 (Bathomeuf *et al.*, 1994). No entanto, nem sempre o pH inicial se mantém até o fim da cultura, sendo que para esta estabilidade seria necessário a utilização de um fermentador onde o pH possa ser constantemente verificado e corrigido.

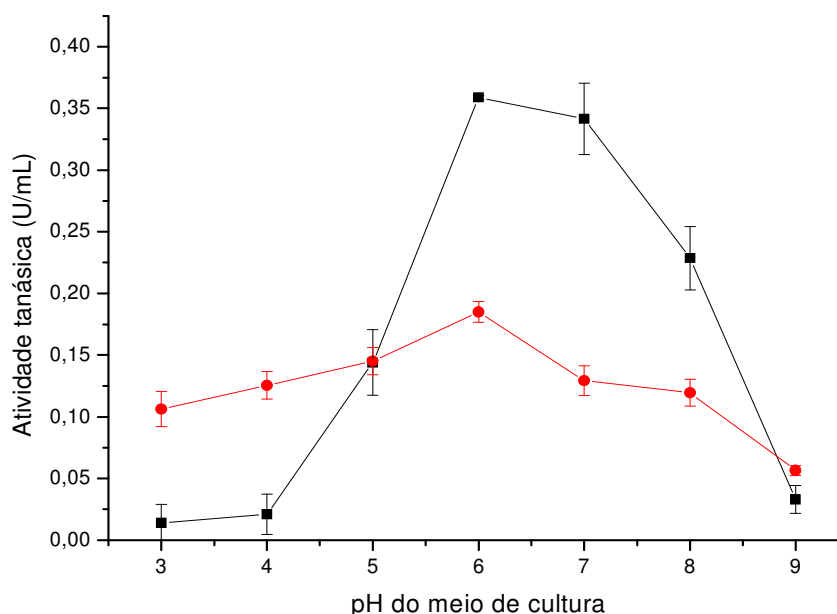


Figura 6. Produção de tanases extracelular (■) e intracelular (●) por *Emericella nivea* em função do pH inicial do meio de cultivo. A cultura foi realizada em meio Khanna tendo ácido tânico 2% (m/v) como fonte de carbono, por 3 dias sob agitação orbital de 100 rpm a 30 °C.

4.1.1.7 Produção de tanases em FSbm em função do tempo de cultivo

Analisando a produção tanásica em função do tempo de cultivo (Figura 7) pode-se perceber que os maiores níveis enzimáticos foram obtidos em 1 dia e 3 dias para as formas extracelular (0,406 U/mL) e intracelular (0,054 U/mL), respectivamente e entre os dias 1 e 2 quando foi aferida a produção total (intracelular + extracelular) de tanases pelo fungo (0,431 e 0,426 U/mL). Os dados mostram que a secreção das tanases ocorre principalmente em períodos iniciais de cultivo. Como o meio é rico em taninos, provavelmente o fungo gasta energias iniciais para secretar a enzima na intenção de utilizar esta fonte de carbono.

Os resultados encontrados são coincidentes com os já apresentados por outros autores. No caso da tanase extracelular produzida por *Aspergillus tamaritii* em fermentação submersa, o tempo ótimo para a produção da enzima foi de 2 dias (Costa *et al.*, 2008). Já para as tanases intracelulares de *Aspergillus niger* MTCC 2425, a produção máxima ocorreu em 5 dias para os cultivos em superfície líquida (Rana e Bhat, 2005).

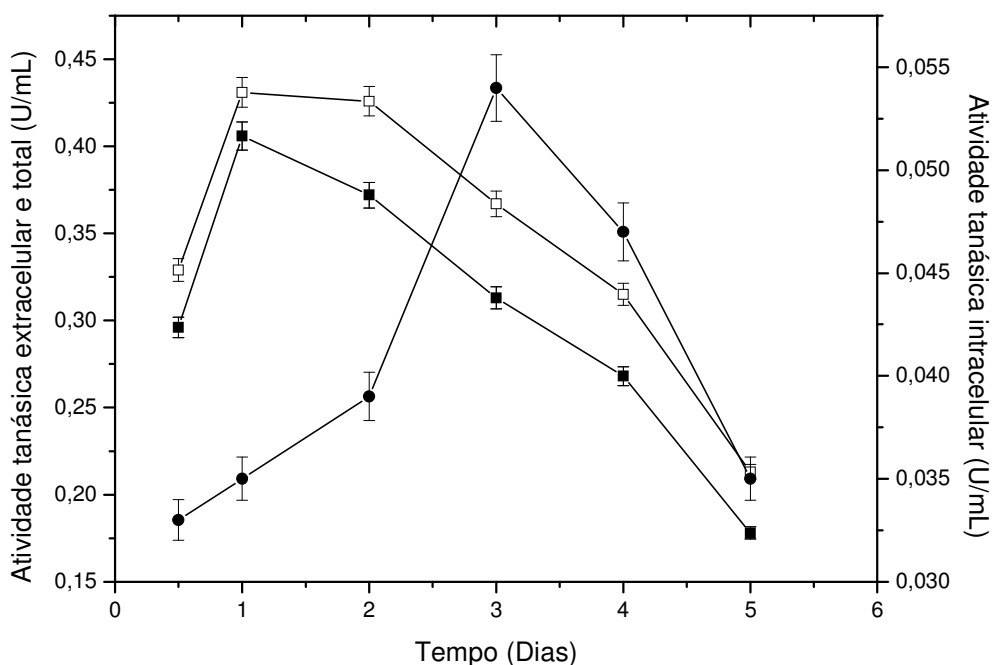


Figura 7. Influência do tempo de cultivo do fungo *Emericella nivea* na produção de tanases extracelular (■), intracelular (●) e total (□). Cultivo realizado em meio Khanna tendo ácido tânico 2% (m/v) como fonte de carbono a 30 °C, sob agitação orbital (100 rpm).

4.1.2 Produção de tanases em fermentação em substrato sólido (FSS)

4.1.2.1 Influência de diferentes substratos/fontes de carbono na produção de tanases

Vários substratos sólidos/fontes de carbono umedecidos com água de torneira (1:1, m/v) foram utilizados para produção de tanases pelo fungo *Emericella nivea*.

O substrato que proporcionou melhores condições para a produção de tanases foi a folha de romã (2,24 U totais), seguido da folha de graviola (1,44 U totais) (Tabela 7). No entanto, folhas de abacate e folhas de eucalipto, mesmo sendo muito ricas em taninos, não induziram a produção da enzima, assim como as folhas de guaco e mandioca. De modo geral, as folhas de árvores frutíferas se mostraram melhores indutoras de tanases que os outros resíduos analisados. Isto se deve ao fato da maior distribuição de taninos nas folhas do que nas partes maduras dos vegetais, uma vez que nesses locais, o taninos já foram hidrolisados em glicose e ácido gálico.

Considerando a dosagem de proteínas dos extratos brutos em FSS foi realizada segundo o protocolo de Lowry, como descrito no item 3.7. No entanto este método é capaz de detectar, além das proteínas, os compostos fenólicos que estejam presentes no extrato, o que pode ter superestimado os valores de concentração proteica apresentados na Tabela 7.

Vários trabalhos já mostraram as vantagens da produção enzimática em fermentação em substrato sólido, incluindo-se as tanases (Aguilar e Gutiérrez-Sanchez, 2001; Lekha e Lonsane, 1994). Agro-resíduos e produtos florestais são geralmente considerados os melhores substratos para este tipo de cultivo (Mukherje e Banerjee, 2004). Alguns substratos já foram descritos para FSS incluem pó de semente de tamarindo e torta do cerne de palmeira pelo fungo *Aspergillus niger* ATCC 16620 (Sabu *et al.*, 2005) e folhas de jambolão por *Aspergillus ruber* (Kumar *et al.* 2006).

Comparando-se a produção de tanases em FSS utilizando folhas de romã com a obtida em FSbm, esta última apresenta-se levemente elevada, no entanto a utilização da FSS pode ser preferida por utilizar substratos menos onerosos. Para continuidade dos estudos, a folha de romã foi selecionada como substrato.

Tabela 7. Substratos utilizados para a produção de tanase por *Emericella nivea* em FSS.

Substrato semi-sólido	Atividade total (U totais)	Proteína (mg/mL)
Milho moído	0,391	1,356
Sabugo de milho	0,419	0,379
Farinha de mandioca	0,740	0,246
Fibra de trigo	0,934	1,038
Farelo de soja	0,411	1,413
Bagaço de cana	0,069	0,174
Palha de arroz	0,074	0,131
Farinha de aveia	0,067	0,699
Folha de pitanga (<i>Eugenia uniflora</i>)	0,781	2,007
Folha de goiaba (<i>Psidium guajava</i>)	1,131	2,550
Folha de abacate (<i>Persea americana</i>)	0	0,473
Folha de manga (<i>Mangifera indica</i>)	0,574	6,220
Folha de jambolão (<i>Syzygium jambolanum</i>)	0,601	1,330
Folha de graviola (<i>Annona muricata</i>)	1,497	1,512
Folha de romã (<i>Punica granatum</i>)	2,245	5,560
Folha de caju (<i>Anacardium occidentale</i>)	0,562	1,401
Folha de jaca (<i>Artocarpus interglifoliam</i>)	0,206	1,752
Folha de jambo (<i>Syzygium malaccense</i>)	0,050	7,345
Folha de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>)	0	2,123
Folha de seriguela (<i>Spondias purpurea</i>)	0,092	0,763
Folha de abiu (<i>Lucuma caimito</i>)	0,011	0,231
Folha de eucalipto (<i>Eucaliptus spp</i>)	0	4,252
Folha de guaco (<i>Mikania glomerata</i>)	0	1,670

Substrato umidificado com água de torneira (1:1, m/v), sendo o cultivo realizado por 10 dias a 30 °C em atmosfera com umidade relativa de 60%.

4.1.2.2 Produção de tanases em função do tempo de cultivo

Para se verificar qual o melhor tempo de cultivo para a produção máxima de tanases, meios com folhas de romã como substrato/fonte de carbono umedecidos com água de torneira (1:1, m/v) foram utilizados. Neste caso, a maior produção enzimática (4,23 U totais) foi obtida no oitavo dia de cultivo como mostrado na figura 8. Em tempos superiores, a produção foi diminuída, o que pode ser explicado pelo aumento de fontes de carbono prontamente assimiláveis, como a glicose obtida da hidrólise dos taninos, bem como o aumento de proteases que degradariam a tanase.

Treviño-Cueto *et al.* (2007) descreveram que o tempo de produção máxima para a tanase de *Aspergillus niger* Aa-20 em FSS utilizando folhas de *Larrea tridentata* foi de apenas 43,5 horas enquanto que para a tanase intracelular produzida por *Aspergillus niger* MTCC 2425, foi de 4 dias (Rana e Bhat, 2005). Ambas as enzimas descritas requerem menor tempo para a produção média se comparada a utilização de folhas de romã feita neste estudo. Tal fato pode estar relacionado a menor disponibilidade de taninos hidrolisáveis, ou ainda, por conterem outros compostos que precisariam ser degradados por inúmeras outras enzimas antes que a tanase pudesse agir sobre os taninos.

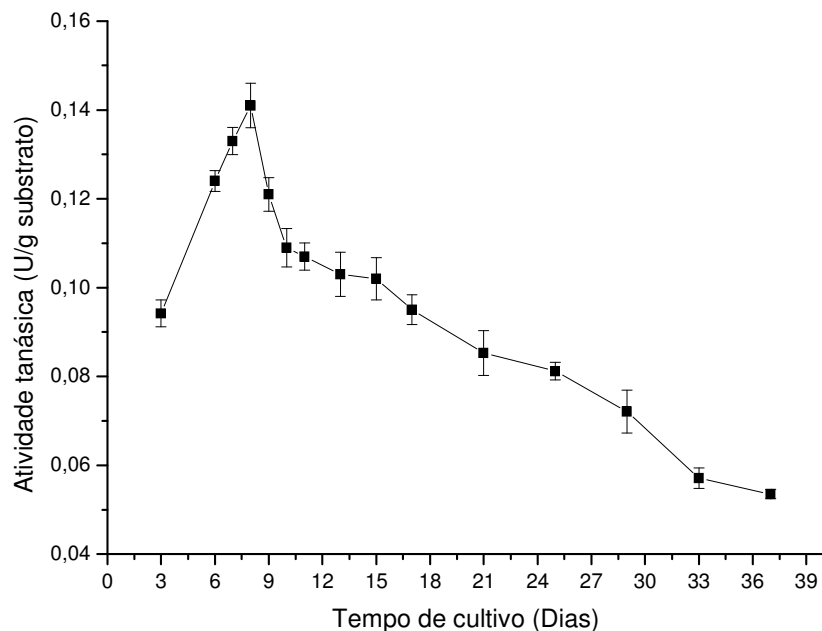


Figura 8. Produção de tanase extracelular pelo fungo *Emericella nivea* em função do tempo de cultivo em FSS com folhas de romã umidificado com água de torneira (1:1, m/v), sendo o cultivo realizado a 30 °C em atmosfera com umidade relativa de 60%. U totais = U/g substrato * 30.

4.1.2.3 Efeito de diferentes soluções umectantes na FSS sobre a produção de tanases

A solução umectante do meio de cultura na FSS é de importância fundamental para o crescimento do fungo e produção de enzimas. No caso da FSS utilizando folhas de romã como substrato/fonte de carbono para produção de tanases pelo fungo *Emericella niva* foram testadas 4 diferentes soluções para umidificar o meio: sais de Vogel, sais de SR, sais de Khanna e ainda água torneira, todas na proporção de 1:1 (m/v). A água de torneira é uma solução que contém sais e íons em baixas concentrações, como ppm (partes por milhão). Para a reprodução de tais concentrações, seria necessário a análise química desta água e ainda a utilização de equipamentos de pesagem muito precisos, sendo praticamente inviável. Mesmo que a água de torneira apresente diferenças regionalmente, ainda assim, pode possuir semelhanças em suas composições.

Os meios de cultura contendo as diferentes soluções umectantes praticamente proporcionaram, de forma muito semelhante, a produção de tanase extracelular por *Emericella nivea*, sendo que a variação ocorreu entre 2,78 U totais (sais SR) e 2,85 U totais (sais de Vogel). A produção de tanases quando o substrato/fonte de carbono foi umedecido com água de torneira foi de 2,61 U totais (Figura 9), e por não apresentar diferenças significantes com relação as demais, esta solução foi escolhida para os demais experimentos por ser de fácil acesso e baixo custo.

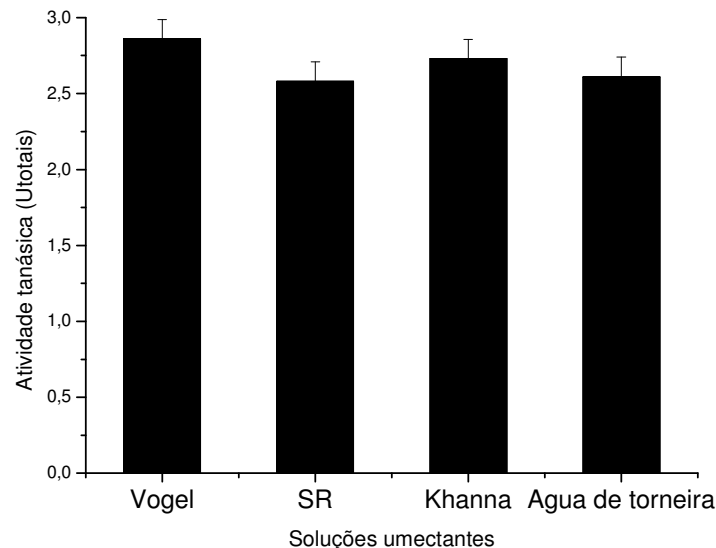


Figura 9. Produção de tanase extracelular pelo fungo *Emericella nivea* em FSS tendo folhas de romã como substrato, umidificadas com diferentes soluções (1:1, m/v), sendo o cultivo realizado por 8 dias a 30°C em atmosfera com umidade relativa de 60%

4.1.2.4 Efeito da umidificação com água de torneira em diferentes proporções na FSS para produção de tanases

Depois que a água de torneira foi escolhida umidificante para a FSS utilizando como substrato/fonte de carbono folhas de romã, foi verificada a proporção que favorecia a melhor produção de tanases por *Emericella nivea*. Foram testadas as proporções de 1:0,5, 1:1, 1:2 e 1:3 (m/v). A proporção que mais favoreceu a produção de tanases foi a de 1:1 (m/v) com 3,45 U totais, sendo que as demais proporções praticamente não apresentaram diferenças quanto ao rendimento na produção da enzima, em média 2,43 U totais (Figura 10).

A umidade do substrato/fonte de carbono é fundamental para a produção enzimática pelo fungo. Em casos onde o meio está sem umidade, além da produção ser reduzida, a exteriorização da enzima pelo fungo pode ser dificultada, tornando praticamente impossível sua obtenção. No entanto, se existe quantidade excedente do umidificante, isso pode dificultar a aderência do fungo ao substrato, e este por falta de acesso a sua fonte de nutrientes não poderá produzir a enzima para degradá-lo.

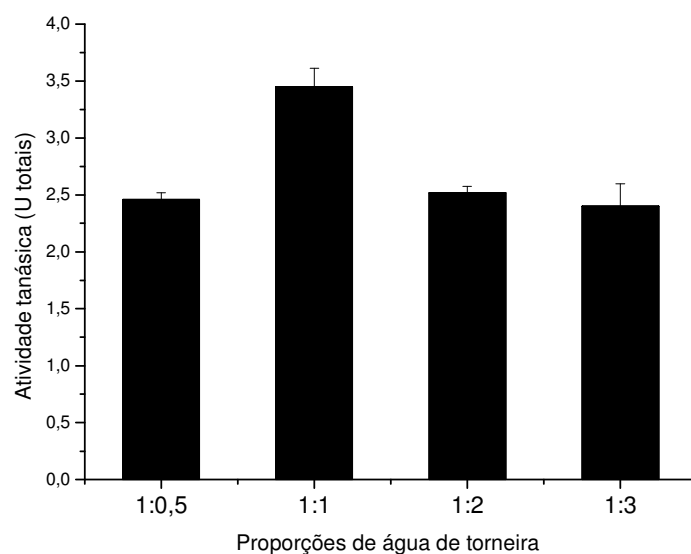


Figura 10. Produção de tanase extracelular pelo fungo *Emericella nivea* em FSS tendo folhas de romã como substrato, umidificadas com água de torneira em diferentes proporções (m/v), sendo o cultivo realizado por 8 dias a 30°C em atmosfera com umidade relativa de 60%

4.2 Purificação e caracterização bioquímica das tanases intra e extracelulares

4.2.1 Purificação das tanases intracelular e extracelular

O extrato bruto intracelular obtido em FSbm tendo ácido tânico 2% como fonte de carbono e agitação de 100 rpm foi dialisado contra tampão acetato de sódio 10mM pH 5,0 e tratado com Caulim , e posteriormente aplicado em coluna cromatográfica de troca iônica DEAE-Celulose equilibrada previamente com o mesmo tampão (Figura 11). A atividade tanásica foi eluída como única forma com 1,09 M de NaCl através de um gradiente linear (0 - 1,5M), sendo coletadas frações de 4,0 mL e vazão mantida em 1 mL/min. As frações contendo atividade tanásica foram reunidas em um único *pool*, o qual foi dialisado contra água destilada overnight a 4°C e posteriormente, liofilizado. Desta forma, a enzima intracelular foi purificada 2,54 vezes com recuperação de 8,85% (Tabela 8). O processo de purificação foi acompanhado por eletroforese em condições não desnaturantes sendo observada uma única banda protéica revelada por prata (Figura 12A) e uma única banda de atividade (Figura 12B) as quais tiveram a mesma mobilidade relativa.

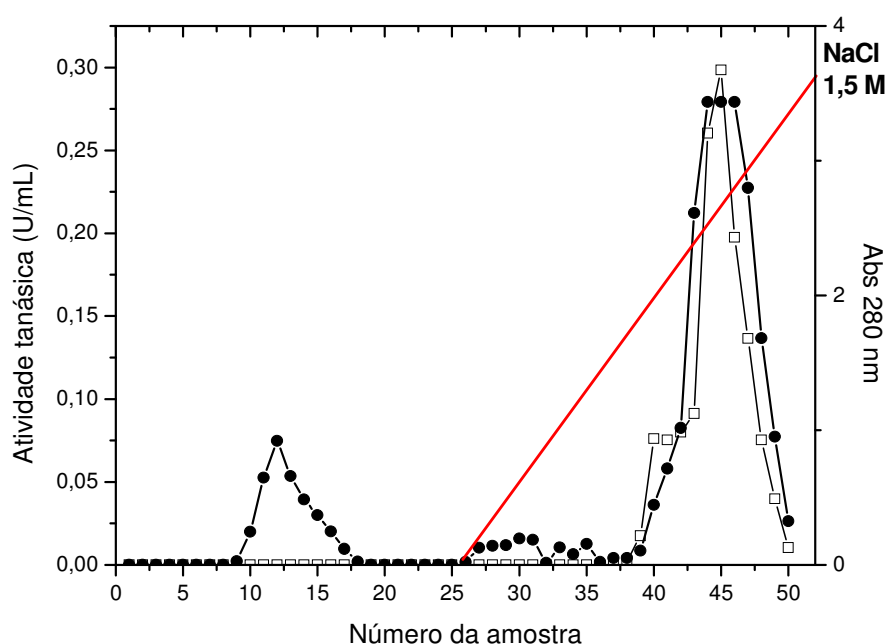


Figura 11. Perfil cromatográfico em DEAE-Celulose para tanase intracelular produzida por *Emericella nivea* em FSbm. Símbolos: (●) Absorbância 280 nm, (□) Atividade tanásica.

Tabela 8. Purificação da tanase intracelular produzida por *Emericella nivea* em FSbm.

Passo	Volume (mL)	Proteína (mg totais)	Atividade (U totais)	Atividade específica (U/mg)	Purificação (vezes)	Recuperação (%)
Extrato bruto	20	28,12	8,58	0,305	1,0	100
Caulim	18,5	14,13	8,39	0,593	1,94	97,78
DEAE - Celulose	20	0,98	0,76	0,775	2,54	8,85



Figura 12. Perfil eletroforético da tanase intracelular em PAGE 7% revelado por prata (A) e para a atividade tanásica (B).

O extrato extracelular obtido em FSS com folhas de romã como substrato/fonte de carbono foi submetido ao mesmo procedimento utilizado para a enzima intracelular como descrito anteriormente, sendo a enzima eluída, em DEAE-Celulose como única forma com 0,58 M de NaCl aplicado através de um gradiente linear (0-2M) (Figura 13A). As frações que apresentaram atividade tanásica foram reunidas em um único *pool* e dializadas *overnight* a 4 °C, contra água destilada e em seguida submetido ao processo de liofilização. A enzima foi ressuspensa em tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,5 adicionando de NaCl 50mM e aplicada em coluna de filtração Sephacryl S-200 sendo eluída com o mesmo tampão (Figura 13B). A tanase extracelular foi purificada 61,61 vezes com recuperação de 29,95% (Tabela 9). O processo de purificação foi acompanhado por eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE 7%) sendo observada uma única banda protéica revelada por prata (Figura 14A) e uma única banda de atividade (Figura 14B) as quais tiveram a mesma mobilidade relativa. Em condições desnaturantes (SDS-PAGE 12%) pode-se observar 2 bandas proteicas corada por Comassie Blue R250 (Figura 14C). A purificação da tanase extracelular foi mais eficiente e também apresentou maior rendimento quando comparada a intracelular.

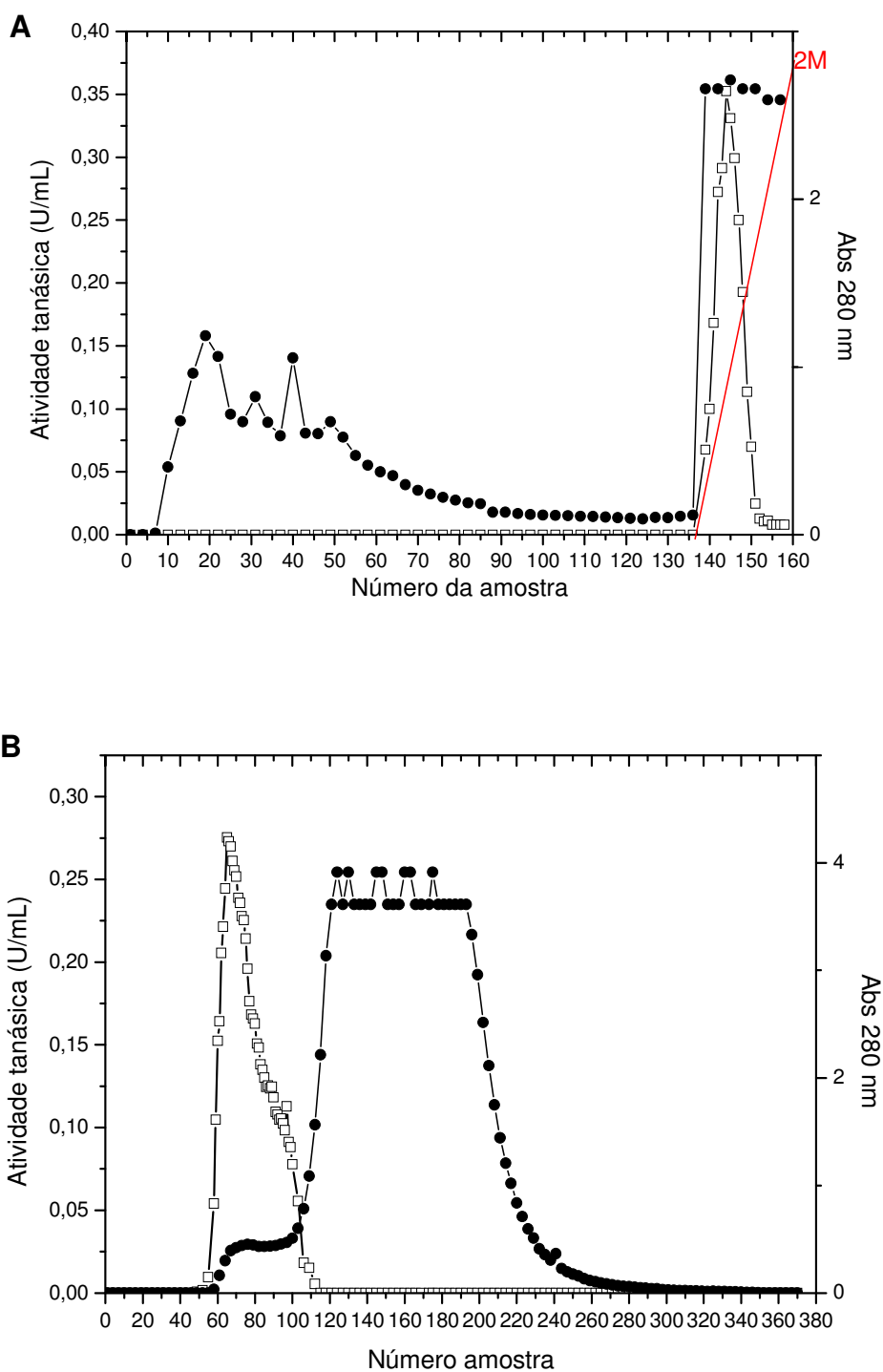


Figura 13. Perfis cromatográficos em colunas DEAE-celulose (A) e Sephacryl S200 (B) de tanase produzido por *Emericella nivea* em FSS com folhas de romã. Símbolos: (●) Absorbância 280 nm, (□) Atividade tanásica.

Tabela 9. Tabela de purificação de tanase extracelular produzida por *Emericella nivea* em FSS.

Passo	Volume (mL)	Proteína Total (mg totais)	Atividade total (U totais)	Atividade específica (U/mg)	Purificação (vezes)	Recuperação (%)
Extrato bruto	35	395,5	12,25	0,031	1	100
Caulim	33	365,64	10,99	0,030	0,967	89,71
DEAE-Celulose	31	56,73	7,62	0,134	4,32	62,20
Sephacryl S200	27	1,92	3,67	1,91	61,61	29,95

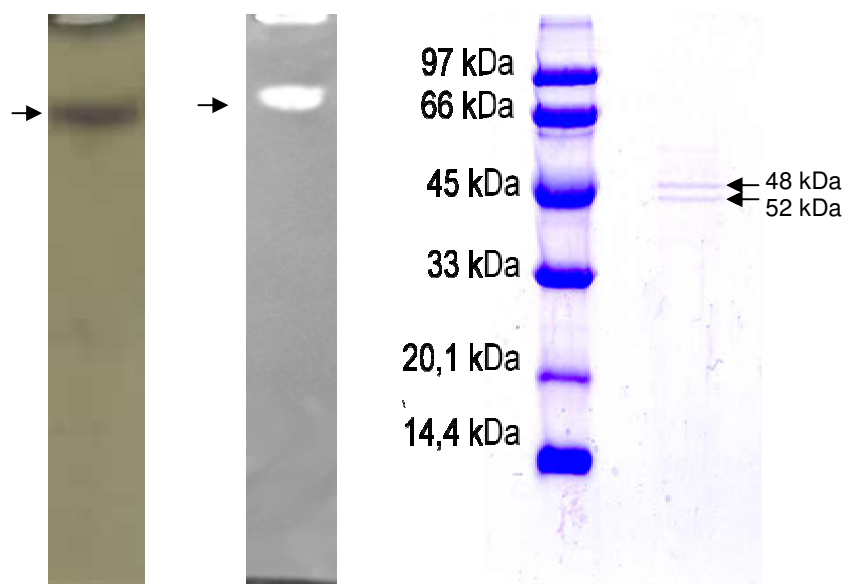


Figura 14. Perfil eletroforético da tanase extracelular em PAGE 7% revelado por prata (A), para a atividade tanásica (B) e em SDS-PAGE 12% (C).

4.2.2 Determinação da massa molecular nativa e conteúdo de carboidratos

A massa molecular nativa da tanase extracelular produzida em FSbm por *Emericella nivea* foi de 322 kDa determinada por coluna de filtração Sepharose CL6B com conteúdo de carboidratos de aproximadamente 50%, no entanto, quando avaliada a massa molecular da molécula desnaturada em SDS-PAGE 12%, o valor encontrado foi de 48kDa e 52kDa (Figura 14), supondo-se um possível heteropolímero. Já a forma intracelular produzida em FSbm apresenta massa molecular nativa, determinada na mesma coluna de 258,9 kDa com 16,6% de carboidratos. A maioria das tanases produzidas por fungos filamentosos possuem massa molecular entre 168kDa e 310kDa (Ramirez-Coronel *et al.*, 2003; Aguilar e Gutiérrez-Sanchez, 2001), sendo que algumas tanases podem ser multiméricas. Costa *et al.* (2007) descreveram tanases produzidas pelo fungo *Aspergillus tamaritii* com massa molecular nativa de 180 kDa, sendo composta por 2 subunidades de 90 kDa, contendo 40,5% de carboidratos. De acordo com Hatamoto *et al.* (1996), a tanase de *Aspergillus oryzae* é formada de por dois tipos de subunidades uma de 30kDa e outra de 33 kDa. No entanto, a tanase nativa é um octâmero com massa molecular de 300kDa, constituída por 4 pares dessas subunidades. A massa molecular da enzima de *Aspergillus niger* MTCC 2425 foi de 185kDa com duas cadeias polipeptídicas de massa molecular aparente de 102kDa e 83kDa (Bhardwaj *et al.*, 2003).

A glicosilação em tanases é bastante comum como já descrito previamente (Lekha e Lonsane, 1997). O conteúdo de carboidratos da enzima produzida por *Aspergillus niger* foi de 43% (Barthomeuf *et al.*, 1994), enquanto que para a enzima de *Penicillium crysogenum* foi de 68,1% (Rajkumar e Nandy, 1983). O significado para um conteúdo tão alto de carboidratos ainda não foi elucidado, no entanto, é conhecido que os taninos se associam fortemente a proteínas, formando pontes de carbono entre as hidroxilas do composto fenólico e grupo carboxila das ligações peptídicas das proteínas, e isso conduz a precipitação deste complexo. As tanases fúngicas, além de conseguirem escapar do efeito inibitório desses taninos hidrolisáveis, ainda clivam tais taninos em produtos inertes, glicose e ácido gálico, e isto sugere que a glicosilação proteja a cadeia polipeptídica, tornando-a menos acessível aos efeitos de precipitação dos taninos e ainda oferecendo seu o sítio ativo ao substrato (Lekha e Lonsane, 1997).

4.2.3 Influência da temperatura e do pH sobre a atividade tanásica

A temperatura ótima aparente de atividade foi de 45°C e 50°C para as enzimas extra e intracelular, respectivamente (Figura 15A) e o pH ótimo ficou estabelecido em 5,0 para ambas as enzimas (Figura 15B). Tais dados estão em acordo com os observados para outras tanases já descritas com ótimos de temperatura variando entre 50°C e 60°C e pH entre 5,0 e 6,0 (Adachi *et al.*, 1968; Aoki *et al.*, 1976; Lekha e Lonsane, 1994; Costa *et al.*, 2008; Mahapatra *et al.*, 2005; Batra e Saxena, 2005; Sabu *et al.*, 2005). Entretanto, outras tanases foram descritas apresentando temperaturas ótimas inferiores tais como 35°C para a enzima de *Aspergillus niger* (Barthomeuf *et al.* 1994) e 30°C para a tanase produzida por *Aspergillus tamaritii* (Costa *et al.*, 2008).

A forma extracelular foi estável por até 70 horas entre 22°C e 50°C, sendo sua atividade decrescente após este período, com T_{50} de aproximadamente 72 horas a 90°C (Figura 16A). Já a forma intracelular manteve-se estável por até 3 horas entre 22°C e 50°C, com T_{50} de aproximadamente 5 e 4 horas nas temperaturas de 70°C e 90°C, respectivamente (Figura 16B).

As tanases produzidas por *Emericella nivea* foram mais estáveis em pHs ácidos, de forma especial para a primeira hora. A medida que os valores de pH foram aumentando, as atividades diminuíram, chegando praticamente a zero no pH 10,0 após 60 horas e 2 horas para as formas extra e intracelular, respectivamente (Figura 16C e D).

Os resultados obtidos estão em acordo com os dados já descritos no que diz respeito as faixas temperaturas e pH em que as tanases são estáveis. Com relação a termoestabilidade das tanases, esta ocorre basicamente entre 10°C e 60°C (Barthomeuf *et al.*, 1994; Lekha e Lonsane, 1994; Pinto *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2008), diferindo grandemente do observado para as tanases produzidas por *Emericella nivea*, as quais permanecem estáveis por longos períodos. No entanto, considerando-se a termoestabilidade em função do tempo, as tanases produzidas por *Emericella nivea* apresentaram desempenho superior, inclusive em 70°C e 90°C. Esta propriedade pode estar associada a glicosilação das tanases, atuando como uma proteção a proteína, ainda não se conhece a função deste processo pós-transcricional, mas muitas das tanases fúngicas o apresentam (Lekha e Lonsane, 1997). A estabilidade da tanase de outros fungos ao pH ocorre em faixas bem mais estreitas (5,0 a 5,5; e 4,5 a 6,0) para *Aspergillus flavus* IFO 5839 (Yamada *et al.*, 1968) e *Penicillium chrysogenum* (Rajkumar e Nandy, 1983)

respectivamente. Tais características aqui descritas para as tanases produzidas por *Emericella nivea* são extremamente interessantes e atrativas para o emprego industrial destas enzimas.

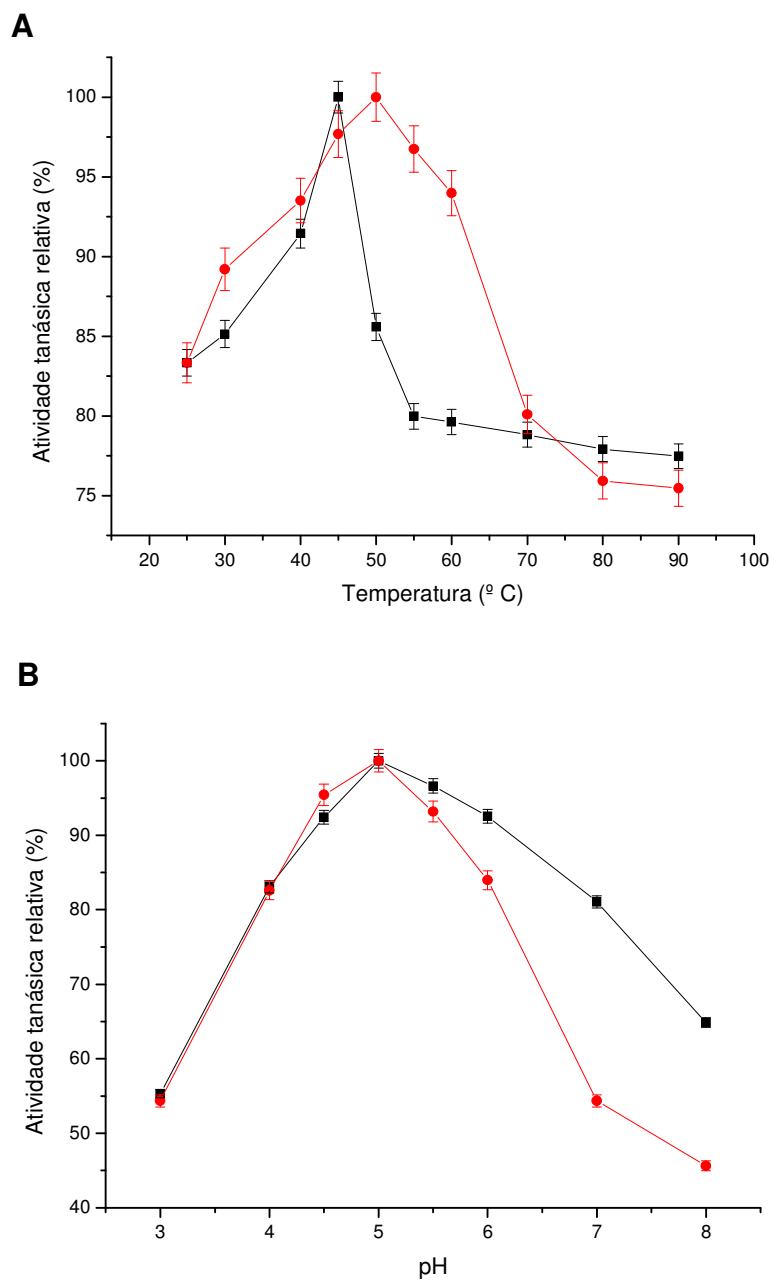


Figura 15. Determinação temperatura ótima aparente (A) e pH ótimo aparente (B) para atividades tanásicas extracelular (■) e intracelular (●).

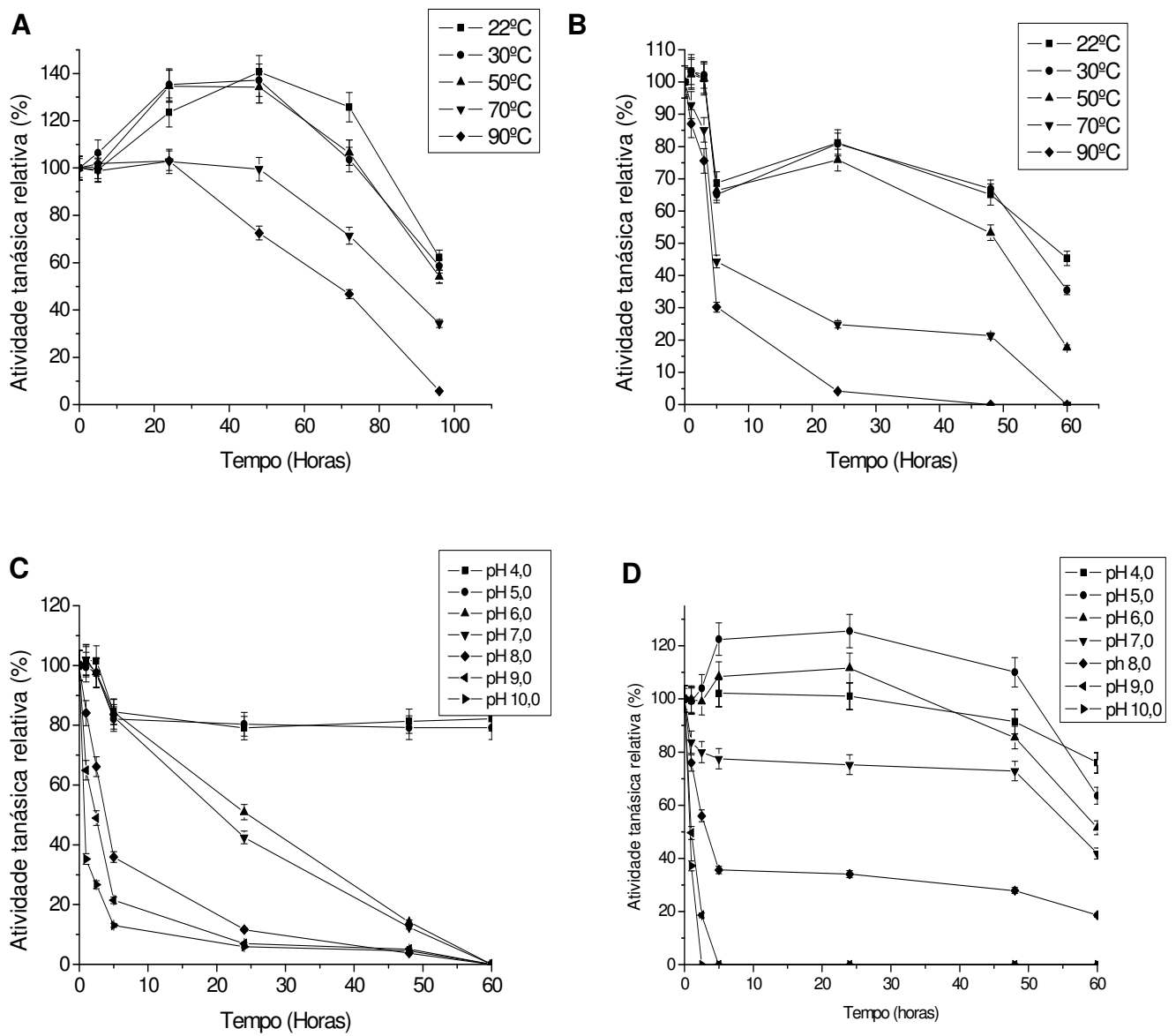


Figura 16. Estabilidade térmica (A e B) e ao pH (C e D) para as tanases extracelular (A e C) e intracelular (B e D) produzidas por *Emericella nivea* em FSbm.

4.2.4 Efeito de diferentes sais e outros compostos na atividade tanásica

Inicialmente, considerando-se a influência dos diferentes íons, a forma extracelular foi ativada por Zn^{2+} (42,09%), Hg^{2+} (37,73%) e Co^{2+} (33,59%), entre outros (Tabela 10). Já a tanase intracelular teve sua atividade aumentada apenas na presença de Mn^{2+} (52,40%), tendo sido inibida pelos demais íons testados, chegando a zero na presença de Co^{2+} (Tabela 10). Para a forma extracelular foi observada inibição da atividade na ordem de 2-25% apenas na presença de Fe^{3+} , Al^{3+} e Ag^+ . Avaliando-se as atividades enzimáticas em função de diferentes concentrações dos principais íons ativadores, ou seja, Zn^{2+} e Mn^{2+} , para enzimas extra e intracelular, respectivamente, as maiores ativações tanásicas foram obtidas com 1mM de Zn^{2+} (34,41%) para forma extracelular e 7,5 mM de Mn^{2+} (72,29%) para forma intracelular (Figura 17). Algumas enzimas requerem um íon metálico como ativador para que a eficiência catalítica seja totalmente alcançada, mas outros íons e compostos orgânicos podem inibir a atividade da enzima. A inibição de tanases fúngicas por íons metálicos é bastante comum e pode estar relacionada a sua ligação em sítio não-específico (Costa, 2007). A atividade tanásica de *Penicillium chrysogenum* foi inibida por Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} e Mg^{2+} (Rajakumar e Nandy, 1983). Já tanase de *Aspergillus niger* ATCC 16620 foi inibida por Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} e Fe^{2+} , e apenas K^+ foi capaz de ativar a enzima (Sabu *et al.*, 2005). Barthomeuf *et al.* (1994) descreveram que sais como $ZnCl_2$, $FeCl_3$ e $CuSO_4$ são inibidores da atividade tanásica enquanto que 1,0 mM dos sais $MgCl_2$, $HgCl_2$, $NaBr$ e $Na_2S_2O_3$ ativaram a enzima de *Aspergillus niger*.

Outros compostos químicos importantes que podem interferir sobre a atividade tanásica são os surfactantes, quelantes, detergentes e solventes orgânicos. Quando verificada a influência de detergentes e solventes orgânicos, a forma extracelular foi ativada por todos os compostos analisados, com aumento de 50% na presença de isopropanol. Já a forma intracelular não sofreu grandes variações quando tais compostos foram adicionados a reação enzimática, mas sofreu total inibição com adição de EDTA (Tabela 11). Os dados contradizem os dados apresentados por Kar *et al.* (2003) que mostraram que 0,01% SDS e Triton X-100 inibem a atividade enzimática de *Aspergillus aculeatus* assim como 1mM β -mercaptoetanol. Belmares *et al.* (2004), descreveram que a maioria das tanases fúngicas são total, ou parcialmente inibidas por estes compostos. Contudo, Chhocar *et al.* (2010) mostraram que a tanase produzida por *Aspergillus awamori* MT9299 teve sua atividade aumentada na presença de butanol e benzeno.

Tabela 10. Efeito de íons metálicos na atividade tanásica intra e extracelular do fungo *Emericella nivea*.

Compostos (1mM)	Atividade relativa (%)	
	Extracelular	Intracelular
NaCl	124,69 ± 5,97	78,58 ± 3,65
AgNO ₃	98,77 ± 3,13	26,19 ± 3,32
CaCl ₂	109,51 ± 3,00	53,97 ± 4,14
MgCl ₂	118,25 ± 3,96	74,61 ± 4,14
MnCl ₂	115,80 ± 2,94	152,40 ± 3,65
KCl	115,18 ± 5,46	95,25 ± 3,65
NH ₄ Cl	110,74 ± 3,87	83,34 ± 2,39
AlCl ₃	75,15 ± 3,92	47,62 ± 4,97
CuCl ₂	108,44 ± 4,93	56,35 ± 4,78
ZnCl ₂	142,09 ± 3,96	84,93 ± 2,39
CoCl ₂	133,59 ± 3,96	0,00 ± 0
FeCl ₃	85,74 ± 4,28	91,28 ± 4,97
HgCl ₂	137,73 ± 3,96	2,38 ± 3,01
BaCl ₂	117,94 ± 2,99	36,51 ± 1,38
Controle	100,00	100,00

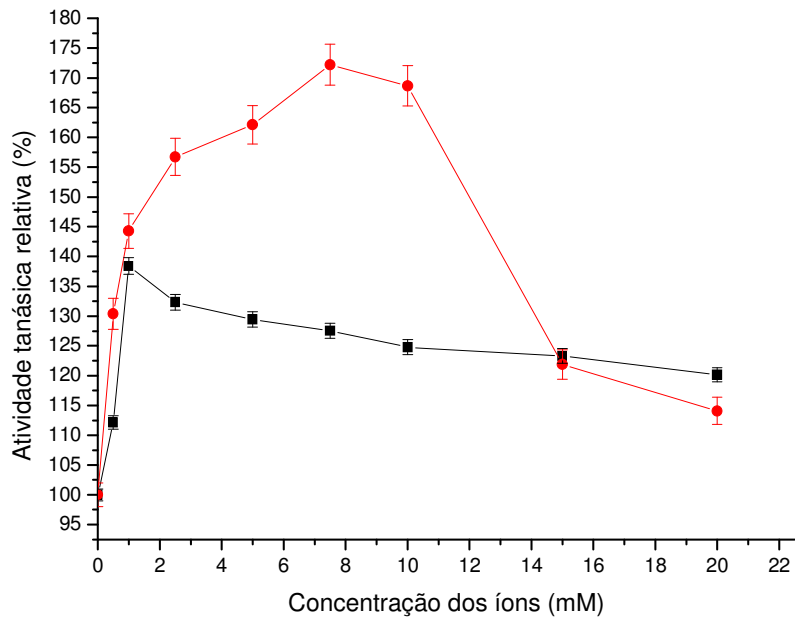


Figura 17. Influência de diferentes concentrações de ZnCl₂ (■) e MnCl₂ (●) sobre as atividades tanásicas extracelular e intracelular, respectivamente.

Tabela 11. Efeito de compostos químicos na atividade tanásica intra e extracelular do fungo *Emericella nivea*.

Compostos	Atividade relativa (%)	
	Extracelular	Intracelular
β -mercaptoetanol (1mM)	110,12 \pm 0,56	100,80 \pm 6,01
EDTA (1mM)	109,51 \pm 0,98	0,00 \pm 0
SDS (0,01%)	138,96 \pm 4,28	111,92 \pm 2,39
Triton X-100 (0,01%)	121,63 \pm 2,59	100,01 \pm 4,78
Metanol (1%)	139,57 \pm 1,13	103,18 \pm 5,52
Acetonitrila (1%)	149,85 \pm 2,04	98,42 \pm 4,97
Etanol (1%)	148,47 \pm 2,59	94,45 \pm 4,97
Acetona (1%)	130,37 \pm 2,47	84,14 \pm 2,39
Isopropanol (1%)	150,00 \pm 6,87	92,07 \pm 3,65
N-butanol (1%)	140,95 \pm 1,96	90,49 \pm 3,65
Glicerol (1%)	138,50 \pm 2,94	90,45 \pm 4,14
Ausente	100,00	100,00

4.2.5 Atividades hidrolíticas das tanases sobre o ácido tânico e o metil galato

Como pode ser observado na figura 18, ambos os substratos foram hidrolizados pelas enzimas intra e extracelulares produzidas por *Emericella nivea*. Ambas as formas enzimáticas hidrolizaram preferencialmente o substrato ácido tânico. Quando analisada a hidrólise da mistura de ambos os substratos, valores intermediários entre as hidrólises dos substratos em separado foram obtidos. Tal fato sugere a existência de um mesmo sítio catalítico para a hidrólise tanto do ácido tânico como do metil galato. Caso tais catálises ocorressem em sítios diferentes, os valores de atividade tanásica obtidos para a mistura deveriam ser maiores, correspondendo aproximadamente aos valores hipotéticos obtidos pela soma das hidrólises em separado.

Yamada *et al.* (1968) descreveram o ácido tânico como o melhor substrato para a atividade tanásica se comparado ao metil galato e outros substratos, sendo estes menos reativos. O ácido tânico é um substrato de origem natural enquanto o metil galato deve ser processado sinteticamente.

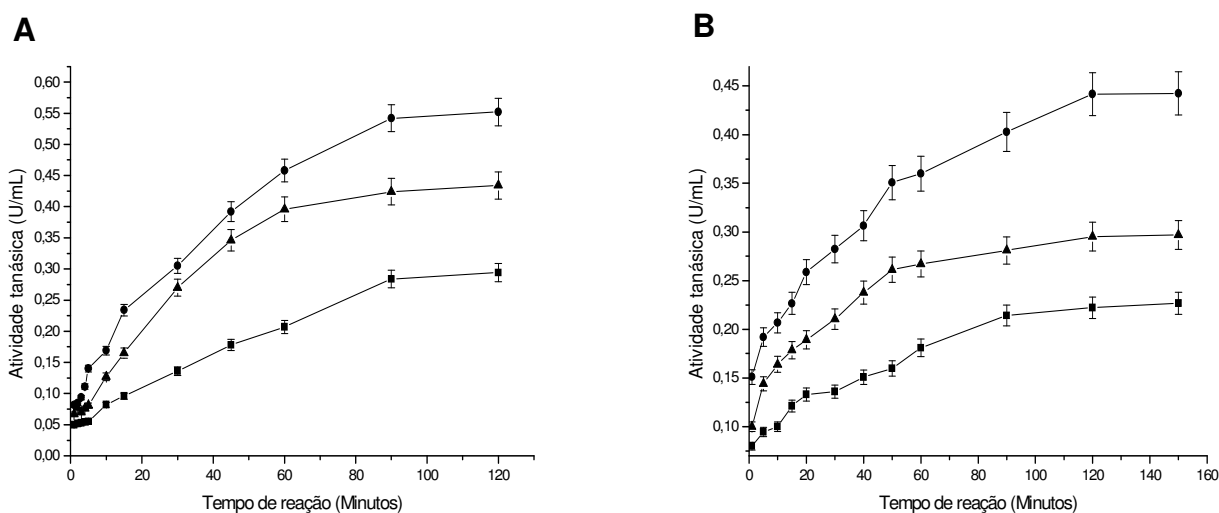


Figura 18. Determinação da hidrólise dos substratos metil galato (■), ácido tânico (●) e metil galato:ácido tânico (1:1; v/v) (▲), em diferentes tempos de reação, pelas tanases extracelular (A) e intracelular (B) produzidas por *Emericella nivea*.

4.2.6 Parâmetros cinéticos

As propriedades cinéticas das tanases intra e extracelulares foram investigadas utilizando os substratos metil galato e ácido tânico. Como mostrado na tabela 12, para ambas as formas enzimáticas, os valores de K_m foram maiores, sendo 14,01mM e 8,23mM para as enzimas extra e intracelular, respectivamente, quando utilizado o ácido tânico como substrato, com relação ao metil galato, sendo os valores na presença deste de 4,78mM e 3,20mM para as formas extra e intracelular respectivamente, demonstrando claramente uma maior afinidade de ambas as enzimas pelo metil galato.

O mesmo ocorre quando analisada a V_{max} e eficiência catalítica (V_{max}/K_m) das enzimas, sendo que tanto a enzima extra quanto a intracelular foram capazes de degradar com maior velocidade e com maior eficiência (cerca de 3 vezes) o ácido tânico se comparado ao metil galato (Tabela 12).

A eficiência catalítica de uma enzima é descrita como o número de renovações da proteína em determinado tempo, ou seja, quantas vezes a enzima é capaz de se ligar ao substrato, formando o complexo enzimático, em seguida liberar novamente ao meio a enzima e o produto da reação (Nelson e Cox, 2005)

Outros valores de K_m já foram descritos para tanases de outros microorganismos utilizando como substrato metil galato, entre eles *Aspegillus flavus* (Yamada *et al.* 1968), *Selenomonas ruminantium* (Skene e Brooker, 1995), e *Aspergillus tamaris* (Costa, 2007), *Cryphonectria parasitica* (Farias *et al.*, 1994) com valores de 0,86mM, 1,6mM, 0,77mM e 7,49mM, respectivamente. Farias *et al.* (1994) também descreveram que a tanase produzida por *Cryphonectria parasitica* apresenta K_m de 0,94mM quando o substrato utilizado foi o ácido tânico.

Tabela 12. Parâmetros cinéticos para as tanases extra e intracelular produzidas por *Emericella nivea*.

Tanase	Substrato	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)	V_{max}/K_m (Umg⁻¹mM⁻¹)
Extracelular				
	Ácido tânico	14,01	2,63	0,18
	Metil galato	4,78	0,29	0,06
Intracelular				
	Ácido tânico	8,23	2,82	0,34
	Metil galato	3,20	0,30	0,09

4.2.7 Análise dos produtos de hidrólise do ácido tânico

A análise qualitativa dos produtos de hidrólise do ácido tânico por cromatografia de camada delgada (TLC) obtidos pela ação das enzimas intra e extracelulares mostra que o produto formado, ou seja, o ácido gálico aumenta em função do tempo da reação (Figura 19), no entanto, para a enzima intracelular, no tempo de 30 minutos, pode ser observada um aumento na banda de ácido gálico, com leve diminuição após este período de incubação. Isto pode estar relacionado ao fato de uma possível degradação do produto por ação enzimática (Figura 19B).

O mesmo método foi utilizado para a identificação do ácido gálico formado após 3 horas de incubação do ácido tânico com a tanase produzida por *Aspergillus tamaritii*, obtendo-se os mesmos resultados (Costa *et al.*, 2008). Uma das principais razões para se estudar os fungos produtores de tanases é o seu uso em potencial no processo de produção de ácido gálico (Hadi *et al.*, 1994), uma vez que tal composto é muito apreciado na indústria farmacêutica servindo como precursor de inúmeros fármacos. Como é conhecido, além de ácido gálico, a glicose também é um produto de hidrólise obtido nesta reação. Contudo, esta não é detectada pela metodologia utilizada e os respectivos *spots* não podem ser visualizados.

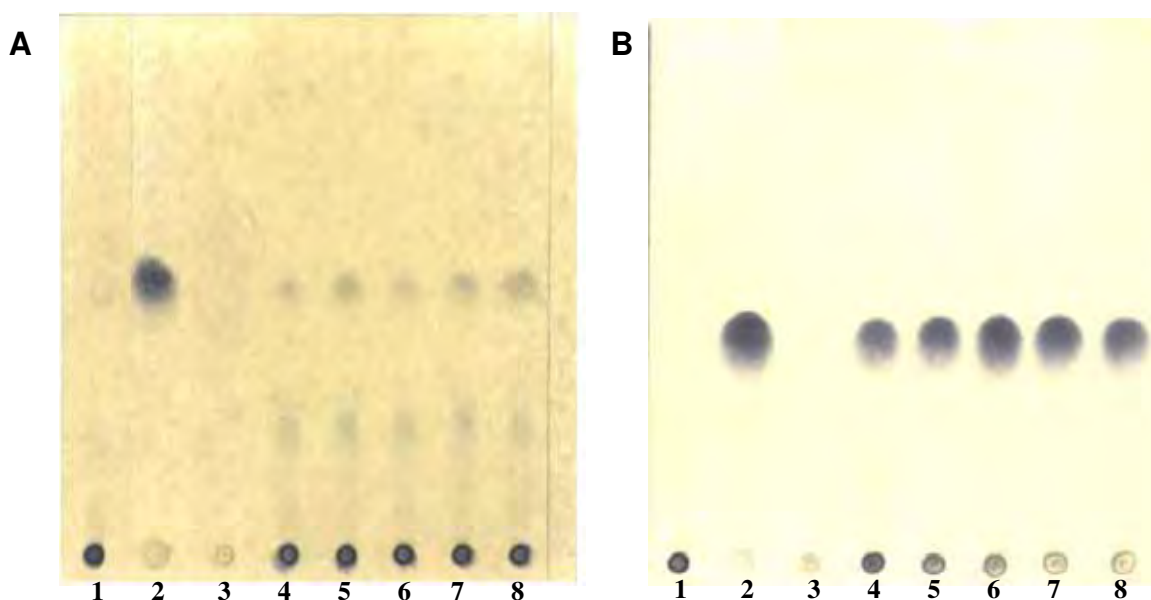


Figura 19. Perfil cromatográfico em camada delgada (TLC) do ácido gálico formado a partir da hidrólise do ácido tânico pelas enzimas extra (A) e intracelular (B) em função do tempo de reação. Raias: (1) ácido tânico; (2) ácido gálico; (3) controle negativo; (4) reação de 1 minuto; (5) reação de 10 minutos; (6) reação de 30 minutos; (7) reação de 1 hora e (8) reação de 5 hora.

4.3 Imobilização da tanase extracelular

Nesta etapa do trabalho a tanase extracelular produzida em FSbm foi imobilizada em diferentes suportes: DEAE-sepharose, Q-sepharose, Glioxil-agarose, Aminoglioxil-agarose e agarose 4BCL ativada com brometo de cianogênio (BrCN).

A preocupação em imobilizar a tanase produzida por *Emericella nivea* tem origem nas desvantagens da utilização de enzimas solúveis em processos industriais, uma vez que pode ser limitada devido ao elevado custo de isolamento e purificação, e também pela dificuldade de recuperar a enzima ativa depois do processo catalítico ocorrido (Kennedy *et al.*1987). Ainda como vantagem da utilização de enzimas imobilizada estão o baixo custo de reaproveitamento da proteína, aumento da sua estabilidade, prevenção de respostas alérgicas e ainda, interações entre a enzima e componentes específicos da reação, excluindo-se a possibilidade de contaminação do produto final com a enzima (Lekha e Lonsane, 1997).

O primeiro registro de imobilização de tanases foi feito por Weetal e Detar (1974) sendo que uma tanase comercial foi ligada covalentemente a sílica alquilamina porosa ativada com glutaraldeído. Este derivado foi comparado com a enzima solúvel quanto a diversos parâmetros como cinética enzimática, pH, temperatura e estabilidade funcional, sendo que todos mostraram vantagens quando utilizada a tanase imobilizadas. Em seguida, tanase de *Aspergillus niger* foi imobilizada utilizando este mesmo método, sendo utilizada na esterificação do ácido gálico em soluções contendo solventes orgânicos. Quando comparado o rendimento desta reação, a síntese de propilgalato foi 41,4% quando utilizada a enzima imobilizada e 3,5% no caso da enzima solúvel (Lekha e Lonsane, 1997).

Outra tanase imobilizada foi por Sanderson *et al.* (1974) para a conversão de chá verde utilizando folhas de chá e tanase imobilizada em suporte de esferas de vidro com ligações diazo e depois, Coggon *et al.* (1975) também descreveram um processo utilizando tanase imobilizada neste mesmo suporte para a produção de chás instantâneos (Lekha e Lonsane, 1997)

4.4.1 Efeito da temperatura na estabilidade da tanase imobilizada em suportes de troca iônica

Os derivados obtidos utilizando suportes de troca iônica DEAE-sepharose e Q-Sepharose, foram incubados em temperaturas de 65°C, 70°C, 75°C e 80°C e alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos de tempos. Como controle foram utilizados a enzima extracelular solúvel e o derivado BrCN, e as alíquotas dos controles foram incubadas nas mesmas condições que os derivados de troca iônica.

O derivado BrCN foi utilizado como controle para este e demais experimentos que serão descritos, pois este suporte de agarose ativado com grupos de brometo de cianogênio se une covalentemente a proteína, em sua porção aminoterminal, por uma ligação unipontual, e esta ligação única, permite que a enzima continue com a mesma conformação e não perca a mobilidade, ao mesmo tempo que afasta possíveis interferências de proteases, evitando ainda, a agregação proteica, sendo possível estudar suas propriedades praticamente sem interferências.

As tanases imobilizadas em DEAE-sepharose e Q-sepharose se mostraram bastante estáveis até mesmo em temperaturas elevadas, quando incubadas em pH 5,0, com atividades acima de 70% por 25 horas para temperaturas de 65°C, 70°C e 75°C (Figura 20 A, B e C) e acima de 60% por 24 horas para temperatura de 80°C (Figura 20D).

A tanase solúvel, assim como já havia sido apresentada no item 4.3.1, apresenta estabilidade de 100% por todo período analisado, enquanto que a tanase imobilizada em BrCN tem sua estabilidade reduzida para todas as temperaturas estudadas com T_{50} de 16 horas para 65°C-75°C e 11 horas para 80°C. Esta estabilidade elevada da tanase solúvel está, provavelmente, relacionada a sua glicosilação, o que pode levar a um agregamento protéico, criando dessa forma, uma proteção térmica para essa tanase, o que causaria a diferença significava entre as estabilidades observadas para a enzima solúvel e o derivado BrCN.

No entanto, com o pH da suspensão em 7,0, a tanase não mostrou a mesma estabilidade, sendo que 4 horas de incubação a 75°C foram suficientes para reduzir a atividade do derivado BrCN a zero, e 12%, 24% e 25% para os derivados Q-sepharose e DEAE-sepharose e para a enzima solúvel, respectivamente (Figura 21). Considerando a diminuição na estabilidade em pH básicos, experimentos utilizando aditivos foram realizados a fim de aumentar o tempo de exposição da enzima em tais condições.

Considerando que a enzima imobilizada em BrCN apresenta as características reais do polipeptídeo isolado, sem influência de agregação, os dados mostram que as tanases em suportes de Q-sepharose e DEAE-sepharose foram estabilizadas após serem adsorvidas por estes suportes aumentando a vida útil dessas enzimas em temperaturas elevadas.

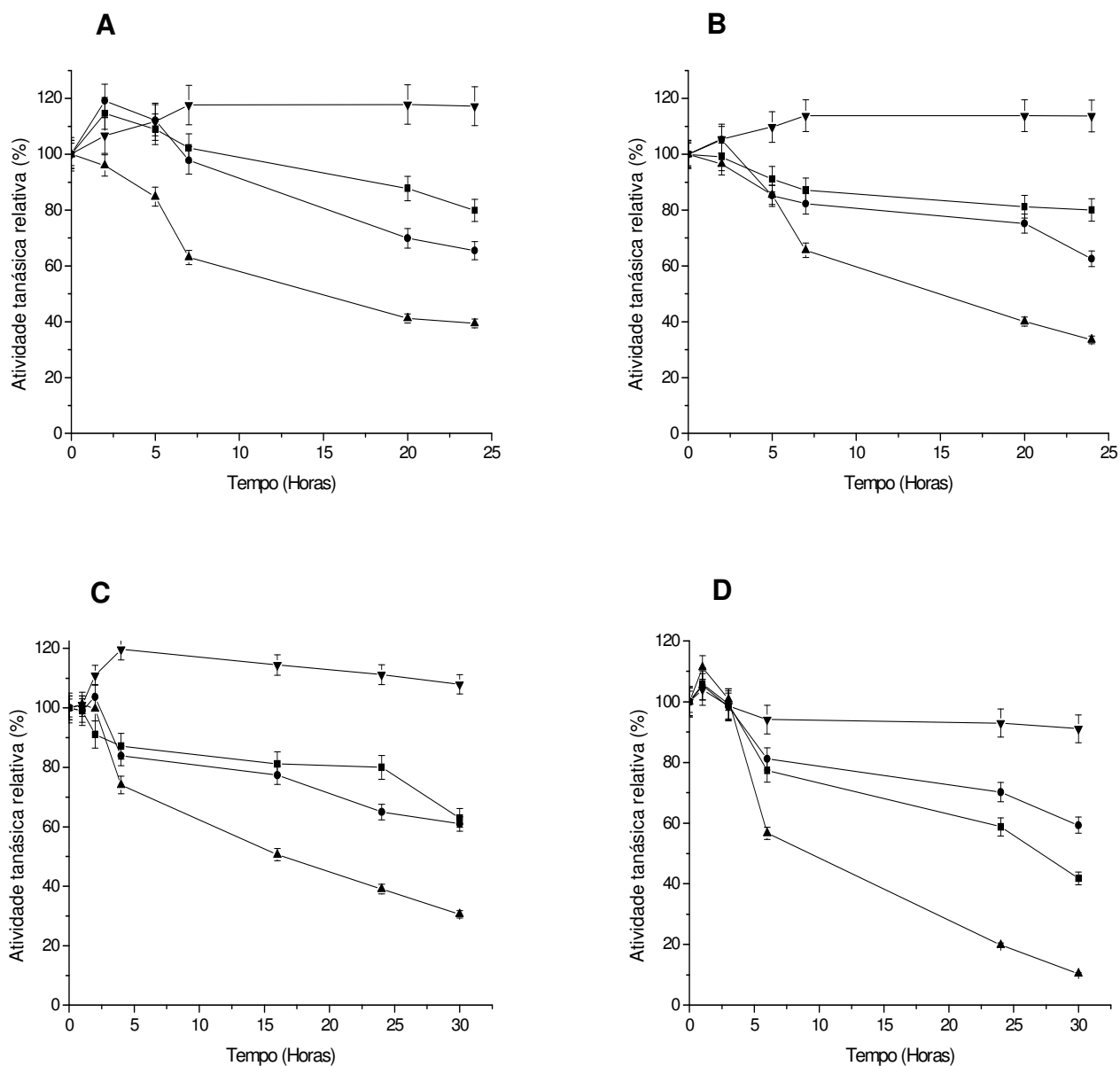


Figura 20. Estabilidade térmica a 65°C (A), 70°C (B), 75°C (C) e 80°C (D) da tanase imobilizada em suportes de troca iônica (■) Q-sepharose, (●) DEAE-sepharose, (▲) BrCN, e em (▼) enzima solúvel mantidos a pH 5,0.

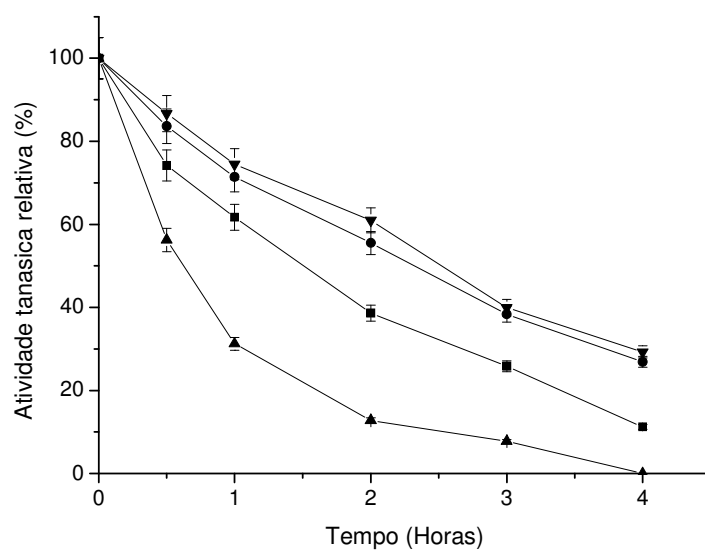


Figura 21. Estabilidade térmica a 75°C da tanase imobilizada em suportes de troca iônica (■) Q-sepharose, (●) DEAE-sepharose, (▲) BrCN, e (▼) para enzima solúvel e mantidos em pH 7,0.

4.4.2 Efeito de aditivos na estabilidade ao pH da tanase imobilizada em suporte BrCN

Na tentativa de elevar o tempo de exposição no qual derivados de tanase poderiam estar em contato com pH básicos sem perder drasticamente sua atividade, foram adicionados a estas suspensões de derivado BrCN, em tampão bicarbonato de sódio 50mM pH 9,0 e 10,0, aditivos como glicerol 50% (v/v), etilenoglicol 50% (v/v) e trealose 30% (m/v), além do controle sem adição de compostos. Os testes foram realizados com variação de temperatura, 4°C e 25°C, sendo que alíquotas das amostras foram retiradas em intervalos diferentes de tempo.

Dentre os aditivos testados, o etilenoglicol foi o que proporcionou melhores condições para a manutenção da atividade tanásica nos pH e temperaturas testados, com atividades residuais ao redor de 90% por longos períodos de tempos (em todos os casos, mais de 5 horas) (Figura 22), seguido dos protetores glicerol e trealose para os pH 9,0 e 10,0, respectivamente.

A estabilidade ao pH é importante e se faz necessária para a imobilização da proteína em suportes com ligações covalentes. Se a enzima não suporta a longa exposição aos pH básicos, como é o caso da tanase extracelular de *Emericella nivea*, então faz-se necessário encontrar um protetor que permita a exposição em pH acima de 10,5 para a imobilização por ligações covalentes.

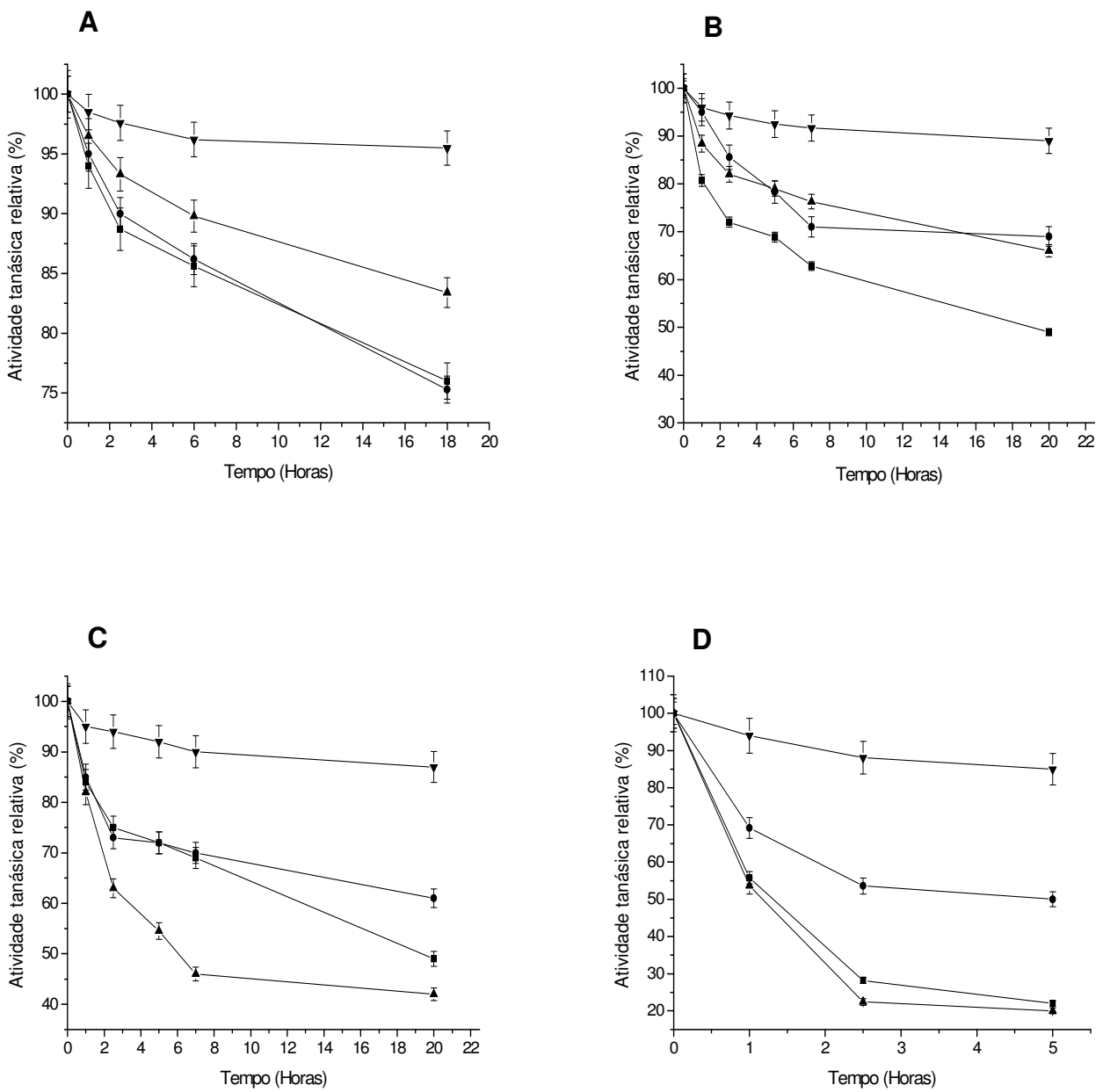


Figura 22. Estabilidade do derivado BrCN em pH 9,0 (A e B) e pH 10,0 (C e D), mantidos a 4°C (A e C) e 25°C (B e D) adicionado de (●) trealose, (▲) glicerol e (▼) etilenoglicol como protetores e na ausência destes (■).

4.4.3 Efeito do solvente 1-propanol na estabilidade da tanases immobilizadas em suportes de troca iônica

Os derivados da tanase extracelular de *Emericella nivea* obtidos em suportes de troca iônica, bem como a enzima solúvel, se mostraram bastante ativos, com atividades residuais acima de 85% por até 100 horas (Figura 23), na presença de 1-propanol, sendo que a diminuição da atividade tanásica não foi observada, nem mesmo após mais 24 horas de exposição as mesmas condições (dados não mostrados). Este aumento da estabilidade em enzimas immobilizadas em trocadores iônicos com relação ao derivado BrCN, pode estar relacionada a grande força iônica que fez com que a proteína permanecesse adsorvida ao suporte em uma posição que favoreceu a catálise enzimática.

A análise da estabilidade enzimática ao 1-propanol é importante, uma vez que, este solvente é utilizado amplamente no processo de transesterificação do ácido tânico pela tanase, para a síntese de propilgalato. Quanto maior a proporção de 1-propanol na reação enzimática de transesterificação, maior será a produção deste produto, utilizado como antioxidante de bebidas e alimentos.

A síntese de propilgalato tem sido conduzida utilizando-se tanases produzidas por *Aspergillus niger* (Yu e Li, 2006; Sharma e Gupta, 2003) e também por *Aspergillus oryzae* (Yu *et al.*, 2004), entre outros.

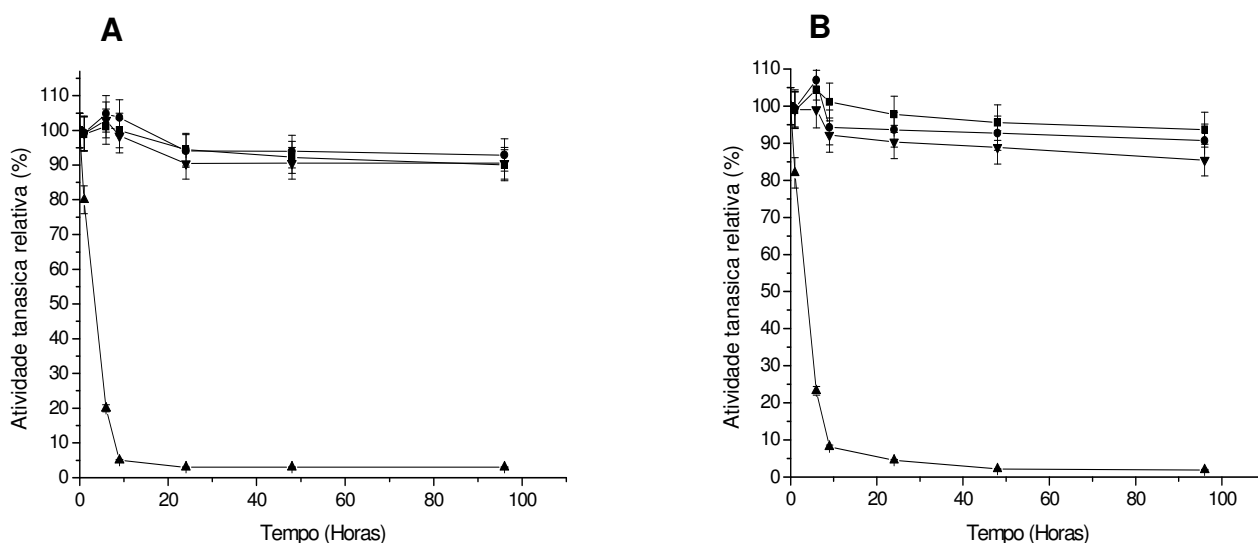


Figura 23. Estabilidade dos derivados (■) Q-sepharose, (●) DEAE-sepharose, (▲) BrCN, e também da enzima solúvel (▼) a 1-propanol 30% (v/v) (A) e 50% (v/v) (B) a 25°C.

4.4.4 Efeito da temperatura na estabilidade da tanase imobilizada em suportes covalentes

Para que fossem possíveis as obtenções de derivados em suportes covalentes (gloxil e aminogloxil) foi adicionado DTT para preservar as atividades enzimáticas após a elevação do pH, além da utilização de compostos orgânicos como protetores protéicos (50% etilenoglicol) para estabilização.

Em ambos os derivados, a estabilidade a temperaturas altas (75°C e 80°C) foi satisfatória no período analisado (3 horas), com atividade residual de 75% para do derivado gloxil. No caso do derivado aminogloxil, a estabilidade foi ainda maior, ou seja, acima de 90% (Figura 24). Os derivados mantiveram-se estáveis, com atividades acima de 50%, por mais 7 horas (dados não mostrados).

Quando comparadas as estabilidades da enzima em suportes de troca iônica e covalentes, foi possível observar, para estes últimos, que os derivados se mostraram mais estáveis. Isso pode ser percebido na incubação sob as mesmas condições, ou seja, 75°C e pH 7,0, os derivados Q-Sepharose e DEAE-Sepharose apresentaram T_{50} de 90 minutos e 150 minutos, respectivamente (Figura 20), enquanto que para os derivados obtidos por ligação covalente, os valores de T_{50} foram verificados somente após 10 horas de exposição a tais condições (dados não mostrados).

Tais resultados indicam que os suportes nos quais a tanase extracelular de *Emericella nivea* foi imobilizada covalentemente proporcionam melhores condições para que a enzima se mantivesse estável por períodos prolongados de tempo, mesmo em condições desfavoráveis, um dado que pode ser importante para seu emprego comercial.

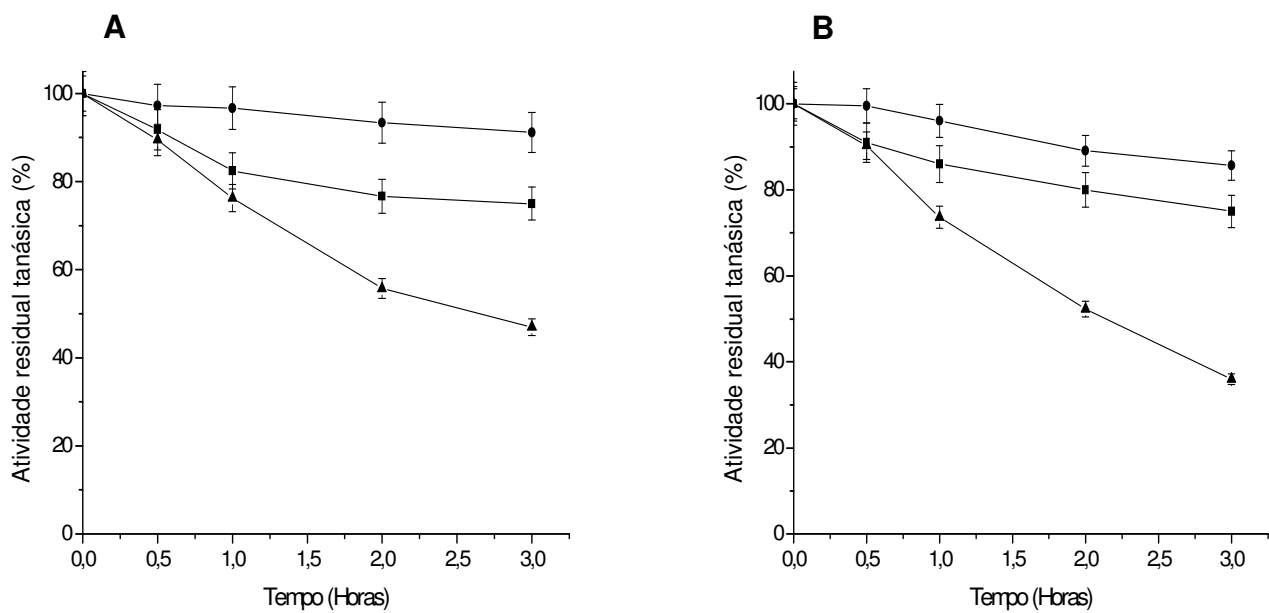


Figura 24. Estabilidade térmica a 75°C (A) e 80°C (B) em pH 7,0 dos derivados (■) Gloxil em 50% de etilenoglicol + 50mM de DTT, (●) aminogloxil em 50% etilenoglicol e (▲) BrCN obtidos por ligações covalentes.

4.4.5 Efeito do solvente 1-propanol na estabilidade da tanase imobilizada em suportes covalentes

Os derivados glioxil em 50% de etilenoglicol + 50mM de DTT e aminoglioxil em 50% etilenoglicol mostraram-se estáveis com atividade residual de 50% quando expostos por 4 horas de ao 1-propanol, mantidos a 25°C. As estabilidades tanto do derivado glioxil quanto do aminoglioxil se mantiveram acima da estabilidade do BrCN por todo o período analisado (Figura 25).

Os derivados covalentes, apesar de se mostrarem mais estáveis termicamente que os trocadores iônicos, não mostraram a mesma propriedade quanto a estabilidade ao solvente orgânico 1-propanol, uma vez que os derivados de troca iônica apresentaram T_{50} acima de 100 horas (Figura 23), e os derivados covalentes tiveram sua estabilidade bastante reduzida ao longo do tempo de exposição. No entanto, um derivado que apresenta, uma meia-vida de 4 horas ainda pode ser proposto para muitos processos industriais, e desta maneira, os derivados glioxil e aminoglioxil, podem ter utilidade comercial.

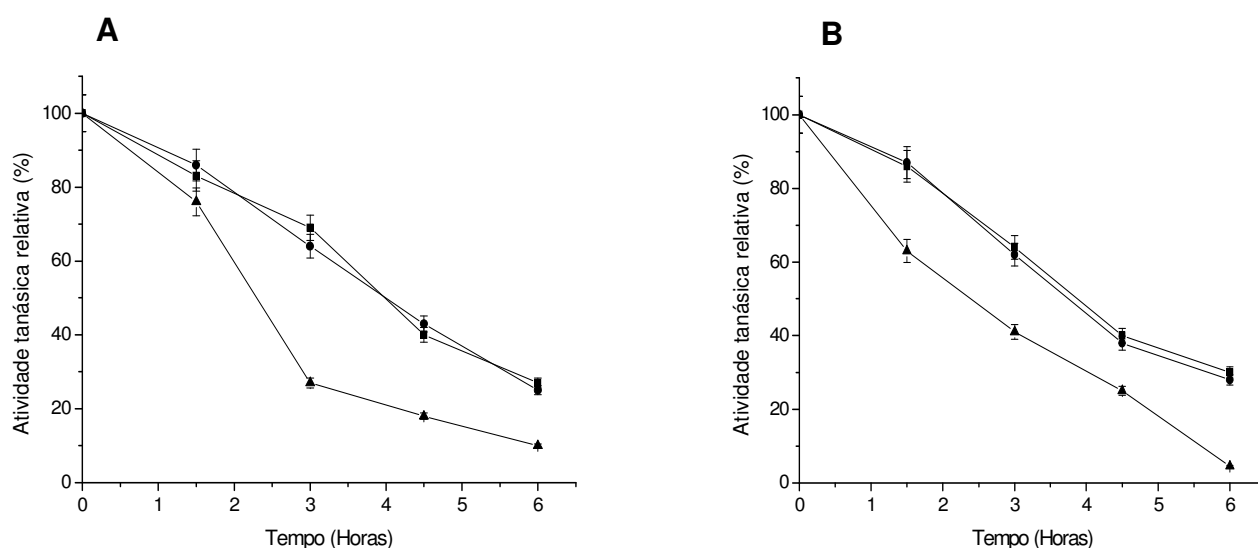


Figura 25 Estabilidade ao 1-propanol 30% (A) e 50% (B) da tanase imobilizada em suportes por ligação covalente em temperatura de 25°C. Símbolos: (■) derivado Glioxil em 50% de etilenoglicol + 50mM de DTT, (●) derivado aminoglioxil em 50% etilenoglicol, (▲) derivado BrCN

4.4.6 Análise quantitativa da hidrólise do ácido tânico e síntese de propilgalato

A reação de formação de ácido gálico a partir de ácido tânico utilizando como catalisador o derivado BrCN foi bastante eficiente com hidrólise de 100% do substrato em aproximadamente 10 horas de reação em temperatura ambiente. Considerando que a hidrólise de 1mM de ácido tânico origina aproximadamente 10mM de ácido gálico, a formação de 20mM de ácido gálico indica a hidrólise total do substrato utilizado (Figura 26A).

Já a reação utilizando a tanase solúvel, apresentou-se mais lenta que a primeira, sendo que em 10 horas apenas 62% do total possível de ácido tânico havia sido hidrolisado. Após 20 horas de reação, a atividade catalítica da tanase começou a diminuir em função do tempo (Figura 26B). A enzima imobilizada apresenta melhores rendimentos na hidrólise do ácido tânico, provavelmente, por não ser influenciada por outras proteínas, como as proteases, além de ficar livre da interferência de várias substâncias que poderiam prejudicar negativamente a atividade catalítica da enzima.

Analisando-se a síntese de propilgalato pela transesterificação de ácido tânico, é possível verificar a formação de 4,4mM do produto, representando 22% do total de síntese possível (Figura 27). Outras duas tanases foram estudadas quanto a capacidade de transesterificação do ácido tânico em propilgalato. Gaathon *et al.* (1989) utilizou um sistema reverso micelar e obteve 51% de rendimento, e Sharma e Gupta (2003) utilizaram tanase de *Aspergillus niger* van Teighem imobilizada em Celite, obtendo 86% de rendimento.

Apesar de o resultado ter sido interessante para uma possível aplicação, melhores condições para a reação e estudo da ligação unipontual ou utilização de derivados com melhores potenciais poderiam maximizar a síntese deste antioxidante tão almejado industrialmente.

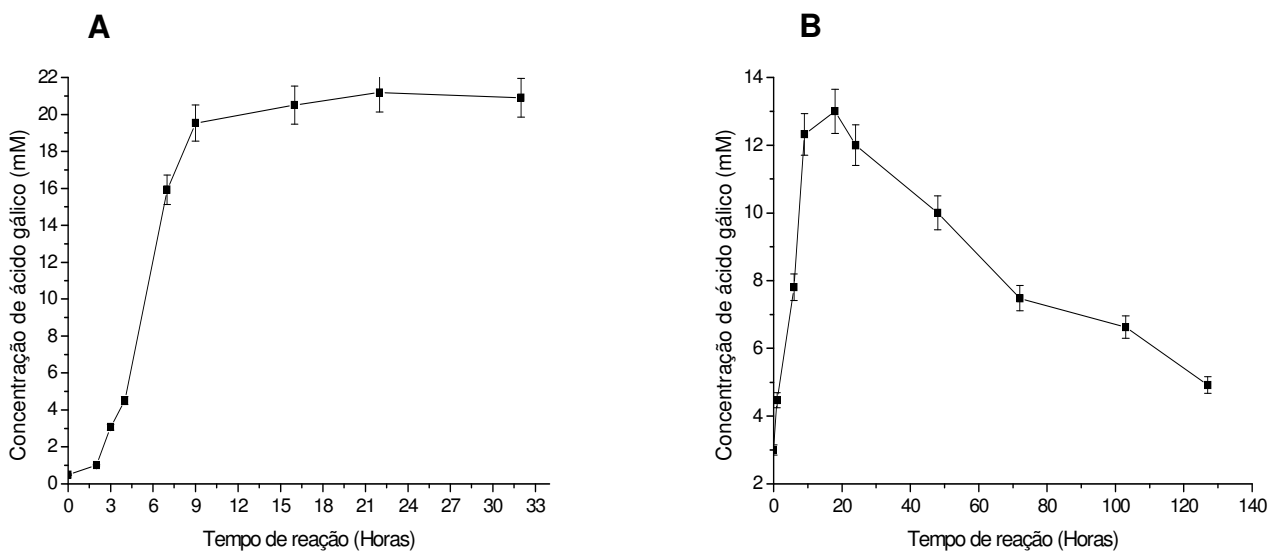


Figura 26. Reação de hidrólise de ácido tânico (2mM) em função do tempo, utilizando a enzima imobilizada em suporte de agarose ativado com brometo de cianogênio (BrCN) (A) e a enzima solúvel (B).

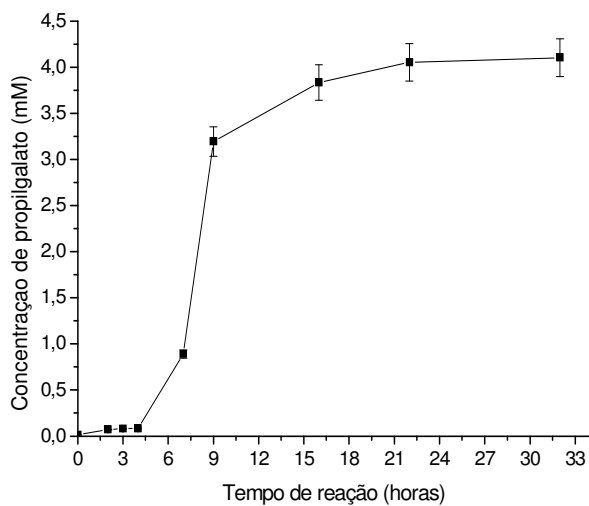


Figura 27. Síntese de propilgalato a partir da esterificação do ácido tânico (2mM) em 50% de 1-propanol utilizando o suporte de agarose ativado com brometo de cianogênio.

5. CONCLUSÕES

O fungo filamentoso *Emericella nivea* foi um bom produtor de tanases intra e extracelulares quando cultivado tanto em FSbm quanto em FSS, destacando-se entre as diferentes linhagens analisadas. As tanases solúveis produzidas por *Emericella nivea*, são bastante estáveis a temperaturas elevadas, pH ácidos e ainda a solventes orgânicos, diferindo substancialmente das tanases conhecidas até o momento. Estas formas tanásicas ainda tiveram maiores afinidade pelo substrato sintético metil galato em detrimento ao natural, ácido tânico. Quando imobilizadas em suportes covalentes e por troca iônica, estas propriedades se potencializam, e a utilização desses derivados traz, como benefícios, a possibilidade de reaproveitamento da enzima após sua utilização. Tais características, fazem dessas tanases promissoras ferramentas biotecnológicas para o emprego industrial. A enzima extracelular foi caracterizada quanto a sua massa molecular, sendo um heteropolímero de 322 kDa com 50% de conteúdo de carboidratos, enquanto a tanase intracelular é de uma glicoproteína de 258kDa com 17% de carboidratos. Além dessas propriedades excelentes, a tanase extracelular produzida em FSbm e imobilizada em agarose ativada com brometo de cianogênio, ainda possui a capacidade de hidrolisar completamente o ácido tânico em ácido gálico. Adicionalmente, apresenta uma característica incomum entre as tanases fúngicas, que é a produção de propilgalato a partir da transesterificação de ácido gálico. A produção desses dois compostos a partir de taninos é bastante desejável para a indústria, o que justificaria a aplicabilidade das tanases produzidas por *Emericella nivea*. Não bastando, a tanase pode ser produzida também em substratos sólidos, diminuindo os custos de produção, sem requerer a adição de outros compostos com maior valor agregado, uma propriedade atrativa comercialmente.

6. REFERÊNCIAS

Referências

- ADACHI, O.; WATANABE, M.; YAMADA, H. Studies on fungal tannase. Part II. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 32, p. 1079-1085, 1968.
- AGUILAR, C. N.; GUTIERREZ-SANCHEZ, G. Review: sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. **Food Science and Technology International**, v. 7, n. 5, p. 373-382, 2001.
- AGUILAR, C. N.; RODRIGUEZ, R.; GUTIERREZ-SANCHEZ, G.; AUGUR, C.; FAVELA-TORRES, E.; PRADO-BARRAGAN, L. A.; RAMÍREZ-CORNEL, A.; CONTRERAS-ESQUÍVEL, J. C. Microbial tannases: advances and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 47-49, 2007.
- AJAY KUMAR, R.; GUNASEKARAN, P.; LAKSHMANN, M. Biodegradation of tannic acid by *Citrobacter freundii* isolated from a tannery effluent. **Journal of Basic Microbiology**, v. 39, p. 161-168, 1999.
- ANTRIM, R. L.; AUTERINEN, A. L. A. A new regenerable immobilized glucose isomerase. **Stärke**, v. 38, p. 132-137, 1986.
- AOKI, K.; SHINKE, R.; NISHIRA, H. Purification and some properties of yeast tannase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, p. 79-85, 1976.
- BAJPAI, B.; PATIL, S. Induction of tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity in some members of fungi imperfect. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, p. 612-614, 1997.
- BARTHOMEUF, C.; REGERAT, F.; POURRAT, H. Production, purification and characterization of tannase from *Aspergillus niger* LCF 8. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, p. 320-323, 1994.
- BATRA, A.; SAXENA, R. K. Potential tannase producers from genera *Aspergillus* and *Penicilium*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1553-1557, 2005.
- BELMARES, R.; CONTRERAS-ESQUÍVEL, J. C.; RODRIGUES-HERRERA, R.; CORONEL, A. R.; AGUILAR, C. N. Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 37, p. 857-864, 2004.
- BEVERINI, M.; METCHE, M. Identification, purification and physicochemical properties of tannase of *Aspergillus niger*. **Sciences des Aliments**, v. 10, p. 807-816, 1990.
- BHARDWAJ, R.; SINGH, B.; BHAT, T. K. Purification and characterization of tannin acyl hydrolase from *Aspergillus niger* MTCC 2425. **Journal Basic Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 449-461, 2003.
- BHAT, T. K.; SINGH, B.; SHARMA, O. P. Microbial degradation of tannins: a current perspective. **Biodegradation**, v. 9, p. 343-357, 1998.

- BLUM, H.; BIER, H.; GROSS, H. L. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.
- BRADDOO, S.; GUPTA, R.; SAXENA, R. K. Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tannase from *Aspergillus japonicus*. **Process Biochemistry**, v. 32, p. 135-139, 1997.
- BRUYNE, T. D.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. **Biochemical and Systematic Ecology**, v. 27, p. 445-459, 1999.
- BUCHOLZ, K. **Characterization of immobilized biocatalysts**: dechema-monographien. Weinheim: Chemie, 1979.
- BUCHOLZ, K.; KASCHE, V.; BORNSCHEUER, U. T. **Biocatalysts and enzyme technology**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.
- CANTARELLI, C. Use of immobilized yeasts in wine fermentation. **Journal of Food Science**, v. 3, p. 3-20, 1989.
- CHAE, S.; YU, T. Experimental manufacture of acorn wine by fungal tannase. **Hanguk Siphum Kwahakoechi**, v. 15, p. 326-332, 1983.
- CHHOKAR, V.; SANGWAN, M.; BENIWAL, V.; NEHRA, K.; NEHRA, K. NEHRA, K. S. Effect of additives on the activity of tannase from *Aspergillus awamori* MTCC9299. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 8, p. 2256-2264. 2010
- COSTA, M. A. **Produção, purificação e caracterização de Tanases de *Aspergillus tamarri***. 2007. 36 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular)-Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.
- COSTA, A. M.; RIBEIRO, W. X.; KATO, E.; MONTEIRO, A. R. G.; PERALTA, R. M. Production of tannase by *Aspergillus tamarrii* in submerged cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 2, p. 399-404. 2008.
- DAVIS, B. J. Disk eletroforeses. II. Method and application to human serum proteins. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 121, p. 407-427, 1964.
- DESCHAMPS, A. M.; OTUK, G.; LEBEAULT, J. M. Production of tannase and degradation of chestnut tannins by bacteria. **Journal of Fermentation Technology**, v. 61, n. 1, p. 55-59, 1983.
- DESHPANDE, S. S.; CHERYAN, M.; SALUNKHE, D. K. Tannin analysis of food products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 24, n. 4, p. 401-449, 1986.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytic Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- FABER, K. **Biotransformation in organic chemistry**. New York: Springer, 1996.

- FARIAS, G. M.; CORBEA, C.; ELKINS, J. R.; GRIFFIN, G. J. Purification, characterization and substrate relationships of the tannase from *Cryphonectria parasitica*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 44, p. 51-63. 1994.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUEZ, V.; MATEO, C.; PENZOL, G.; HERNÁNDEZ-JUSTIZ, O.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, A.; OVSEJEV, K.; BATISTA, F.; GUISÁN, J. M. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 7, p. 181-189, 1999.
- GAATHON, A.; GROSS, Z.; ROZHANSKI, M. Propyl gallate: enzymatic synthesis in a reverse micelle system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 604-609. 1989.
- GOEL, G.; PUNIYA, A. K.; AGUILAR, C. N.; SING, K. Interaction of gut microflora with Tannins in feeds. **Naturwissenschaften**, v. 92, p. 497-503, 2005.
- GUISÁN, J. M.; ALVARO, G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELI, C. M.; GARCIA, J. L.; TAGLIANI, A. Stabilization of heterodimeric enzyme by multipoint covalent immobilization: penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, p. 455-464, 1993.
- GUPTA, R.; BRADDOO, S.; SAXENA, R. K. Rapid purification of extracellular tannase using polyethylene glycol-Tannic acid complex. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, p. 253-255, 1997.
- HADI, T. A.; BANERJEE, R.; BHATTARCHARYYA, B. C. Optimization of tannase biosynthesis by newly isolated *Rhizopus oryzae*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 11, p. 239-243, 1994.
- HATAMOTO, O.; WATARI, T.; KIKUCHI, M.; MIZUSWA, K.; SEKINE, H. Cloning and sequencing of the gene encoding tannase and a structural study of the tannase subunit from *Aspergillus oryzae*. **Gene**, v. 175, p. 215-221, 1996.
- HASLAM, E.; STANGROOM, J. E. The esterase and pepsidase activities of tannase. **Biochemical Journal**, v. 99, p. 28-31, 1966.
- HAWORTH, R. D.; JONES, K.; ROGERS, K. J. Ion-exchange chromatography of *Aspergillus niger* extract. **Proceedings of the Chemical Society**, p. 8-9, 1958.
- KHANNA, P.; SUNDARIL, S. S.; KUMAR, N. J. Production, isolation and partial purification of xylanases from *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 242-243, 1995.
- KAR, B.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. C. Effect of additives on the behavioral properties of tannin acyl hydrolase. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1285-1293, 2003.
- KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. **Enzyme immobilization: biotechnology**. 2 nd ed. Weinheim: VCH, 1987. v. 7, p. 347-404.

KLIBANOV, A M. Enzymes: nature's chemical machines. **Technology Review**, v. 86, p. 40-48, 1983.

KUMAR, R.; SHARMA, J.; SINGH, B. Production of tannase from *Aspergillus rubber* under solid-state fermentation using jamun. **Microbiological Research**, v. 162, n. 4, p. 384-390, 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Comparative titres, localization and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus Niger* PKL104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. **Process Biochemistry**, v. 29, n. 6, p. 497-503, 1994.

LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. **Advances in Applied Microbiology**, v. 44, p. 215-260, 1997.

LEKHA, P.; RAMAKHRISHNA, M.; LONSANE, B. Strategies for isolation of potent culture capable of producing tannin acyl hydrolase in higher titres. **Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel**, v. 15, p. 5-10, 1993.

LEONE, F. A.; BARANAUSKAS, J. A.; CIANCAGLINI, P. Enzyplot: a microcomputer assistant program for teaching enzyme kinetics. **Biochemistry Educational**, v. 37, p. 35-37, 1995.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, p. 658-666, 1934.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAHAPATRA, K.; NANDA, R. K.; BAG, S. S.; BANERJEE, R.; PANDEY, A.; SAKACS, G. Purification, characterization and some studies on secondary structure from *Aspergillus awamori nakazawa*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 3251-3254, 2005.

MAHENDRAN, B.; RAMAN, N.; KIM, D. Purification and characterization of tannase from *Paecilomyces variotii*: hydrolysis of tannic acid using immobilized tannase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 445-451, 2005.

MINGSHU, L.; KAI, Y.; QIANG, H.; DONGYING, J. Biodegradation of gallotannins and ellagitannins. **Journal Basic Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 68-84, 2006.

MONDAL, K. C.; BANERJEE, R.; PATI, R. B. Tannase production by *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology Letters**, v. 8, p. 767-769, 2000.

MUKHERJEE, G.; BANERJEE, R. Biosynthesis of tannase and gallic acid from tannin rich substrates by *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus foetidus*. **Journal Basic Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 42-48, 2004.

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**, v. 51, p. 331-339, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger**: princípios de bioquímica. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2005.

PERALTA, R. M.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A. β -D-glycosidase activities of *Humicola grisea*: biochemical and kinetic characterization of a multifunctional enzyme. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1033, p. 243-249, 1990.

PINTO, G. A. S.; GOURI, S.; LEITE, S. G. F.; BRITO, E. S. Tanase: conceitos, produção e aplicação. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 435-462, 2005.

QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, v. 26, n. 4, p. 485-492, 2002.

RAJAKUMAR, G. S.; NANDY, S. C. Isolation, purification, and some properties of *Penicillium chrysogenum* tannase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 525-527, 1983.

RAMIREZ-CORNEL, M. A. VINIEGRA-GONZALEZ, G.; DARVILL, A.; AUGUR, C. A novel tannase from *Aspergillus niger* with α -glucosidase activity. **Microbiology**, v. 149, p. 525-527, 2003.

RANA, N.; BHAT, T. Effect of fermentation system on the production and properties of tannase of *Aspergillus niger* van Tieghem MTCC 2425. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 203-212, 2005.

RIZZATTI, A. C. S.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; RECHIA, C. G. V.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and properties of thermostable extracellular α -D-xylosidase produced by thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 156-160, 2001.

SABU, A.; PANDEY, A.; JAAFAR DAUD, M.; SZAKACS, G. Tamarind seed powder and palm kernel cake: two novel agro residues for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* ATCC 16620. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1223-1228, 2005.

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

SHARMA, G.; GUPTA, M. N. Synthesis of antioxidant propyl gallate using tannase from *Aspergillus niger* van Tieghem in nonaqueous media. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 395-397, 2003.

- SHARMA, S.; BHAT, T. K.; DAWRA, R. K. Isolation, purification and properties of tannase from *Aspergillus niger* van Tieghem. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, n. 6, p. 673-677, 1999.
- 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.
- SILVA, T. M. **Produção e determinação das propriedades funcionais das amilases de *Aspergillus niveus***. 2009. 171 f. Tese (Doutorado em Biologia Comparada)-Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- SKENE, I. K.; BROOKER, J. D. Characterization of tannin acylhydrolase activity in the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. **Anaerobe**, v. 1, n. 6, p. 321-327. 1995.
- SITTIG, M. Trimethoprim. In: PHARMACEUTICAL Manufacturing Encyclopedia. New Jersey: Noyes Publication, 1988. p. 282-284.
- SRERE, P. A.; UYEDA, K. **Functional groups on enzymes suitable for binding to matrices**. New York: Academic Press, 1976. v. 44.
- TAMPION, J.; TAMPION, M. D. **Immobilized cells: principles and applications**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. p. 257.
- TEIGHEM, V. Sur la fermentation gallique. **Compte Rendus de L'Academie des Science**, v. 65, p. 1091-1094, 1867.
- TISCHER, W.; KASCHE, V. Immobilized enzymes: crystals or carriers? **Trends in Biotechnology**, v. 17, p. 236-335.
- THOMAS J. LIPTON INC. (United State). G. Sanderson; N. Englewood; P. Coggon; N. Orngeburg. **Green tea conversion using tannase and natural tea leaves**. US 3812266, 7 Aug. 1973, 21 May 1974.
- TREVIÑO-CUETO, B.; LUIS, M.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; RODRÍGUEZ, R.; AGUILERA, A; AGUILAR, C. N. Gallic acid and tannase accumulation during fungal solid state culture of tannin-rich deser plant (*Larrea tridentata* Cov.). **Bioresource Technology**, v. 98, p. 721-724, 2007.
- VOGEL, H. F. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. **American Naturalist**, v. 98, p. 435-446, 1964.
- WEETALL, H. H.; DETAR, C. C. Immobilized tannase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 16, p. 1095-1102. 1974
- WISEMAN, A. **Handbook of enzyme biotechnology**. New York: John Wiley & Sons, 1975. p. 148.

YAMADA, H.; ADACHI, O.; WATANABE, M.; SATO, N. Studies on fungal tannase. Part I. Formation, purification, and catalytic properties of tannase of *Aspergillus flavus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 32, n. 9, p. 1070-1078, 1968.

YU, X.; LI, Y.; WU, D. Enzymatic synthesis of gallic acid esters using microencapsulated tannase: effect of organic solvents and enzyme specificity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 2, p. 69-73. 2004.

YU, X. W.; LI, Y.D. Kinetics and thermodynamics of synthesis of propyl gallate by mycelium-bound tannase from *Aspergillus niger* in organic solvent. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40. p. 44-50. 2006.