

PURIFICAÇÃO PARCIAL DE TANASE PRODUZIDA POR *Aspergillus niger* URM 7131 SOB FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Partial purification of tannase produced by Aspergillus niger URM 7131 under submerged fermentation

Resumo:

Tanino Acil Hidrolase é um biocatalisador produzido por diversos organismos vivos e entre eles, bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Em alimentos e bebidas são utilizadas na remoção de efeitos indesejáveis, como a adstringência em sucos e propriedades antinutricionais em rações. Neste trabalho objetivou-se produzir, purificar e caracterizar parcialmente a tanase obtida de *Aspergillus niger* URM 7131. A produção foi realizada por meio de fermentação em estado submerso e o extrato enzimático bruto obtido passou por análises de atividade enzimática utilizando rodanina etanólica e proteínas totais por meio da metodologia de Bradford. O extrato bruto passou por uma purificação parcial através de um sistema aquoso bifásico utilizando PEG e sal. Por meio do sistema PEG (6000 g mol⁻¹), concentração de PEG 24%, de citrato 15% e pH 6 foi observado fator de purificação de 3,1 e rendimento de 60%. Verifica-se a necessidade de adicionar novas etapas para purificação da enzima.

Abstract:

Tannin Acyl Hydrolase is a biocatalyst produced by several living organisms and among them, bacteria, filamentous fungi and yeast. In foods and beverages they are used in the removal of undesirable effects, such as juice astringency and anti-nutritional properties in animal feed. The objective of this work was to produce, purify and partially characterize the tannase obtained from *Aspergillus niger* URM 7131. The production was carried out by submerged fermentation and the crude enzymatic extract obtained was analyzed by enzyme activity using ethanolic rhodanine and total proteins by Bradford method. The crude extract underwent partial purification aqueous two-phase system using PEG and salt. Through the system PEG (6000 g mol⁻¹), concentration of PEG 24% and 15% citrate pH 6 was observed purification factor of 3.1 and yield of 60%. It is necessary to add new steps for the purification of the enzyme.



**Flávio Manoel Barros Oliveira¹,
Tonny Cley Campos Leite¹, Talita
Camila Evaristo da Silva
Nascimento², Keila Aparecida
Moreira², Amanda Reges de
Sena¹**

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Campus Barreiros; Universidade Federal Rural de Pernambuco.

E-mail: amandareges@gmail.com

Contato principal

Amanda Reges de Sena¹



Palavras chave: Fungo endofítico, Sistema aquoso bifásico, Tanino acil hidrolase.

Keywords: Endophytic fungus, Aqueous biphasic systems, Tannin acyl hydrolase.



INTRODUÇÃO

Tanino acil hidrolase (TAH), conhecida como tanase (EC 3.1.1.20), é uma enzima produzida em presença do ácido tânico. Ela é uma glicoproteína esterase formada predominantemente por um ácido gálico esterase e uma depsidase. A tanase pode ser separada em duas esterases uma com atividade esterásica, onde hidrolisa especificamente a ligação éster entre o grupo anel aromático e o resíduo de glicose e a outra depsidásica sobre a ligação éster entre os anéis aromáticos (BATTESTIN et al., 2004; LEKHA; LONSANE, 1997; PINTO et al., 2005). A tanase está entre os maiores grupos de enzimas industriais nas últimas décadas (EL-TANASH; SHERIEF; NOUR, 2012) e possui uma vasta aplicação na indústria de alimentos e bebidas (chás, sucos, vinhos e cervejas), na indústria farmacêutica e química. Sua aplicação na produção de alimentos e bebidas contribui para a remoção de alguns efeitos indesejáveis dos taninos, como a adstringência e ações antinutricionais resultante da reação destes com proteínas (MONTEIRO et al., 2005; SANTOS; MELLO, 2007), bem como evitar o surgimento de turbidez e alterações de cor em cervejas (LEKHA; LONSANE, 1997).

O interesse crescente pelos processos de purificação de moléculas biológicas está diretamente relacionado ao desenvolvimento da biotecnologia e à demanda e necessidade das indústrias químicas e farmacêuticas por produtos com alto teor de pureza. A separação e purificação de produtos biológicos como enzimas, polissacarídeos, antibióticos, aminoácidos, entre outros, compõe um momento de suma importância durante o processo downstream nas indústrias. A maioria desses produtos são altamente sensíveis, portanto, deve-se ter bastante cautela nas condições operacionais e ao meio em que se encontram as operações de separação e purificação de bioprodutos. No caso principalmente de enzimas, por serem moléculas complexas, requerem muita atenção para que se evite uma possível desnaturação (SARKAR et al., 2009; LIN et al., 2008; TUNG et al., 2007).

As técnicas mais utilizadas para a purificação de proteínas são a cromatografia, precipitação com solvente ou sais, ultrafiltração, centrifugação e diálise, porém, possuem algumas limitações como alto custo de instalação, manutenção e operação em virtude de sua complexa instrumentação, além de apresentar baixos rendimentos, o que torna sua utilização em escala industrial limitada (CAO et al., 2012; HUANG et al., 2009). Na etapa de fermentação são produzidos vários outros compostos que não possuem interesse para processos industriais. Os métodos tradicionais de purificação de moléculas biológicas tornam o processo mais caro, promovendo uma elevação de certa de 70% de custos operacionais (RAJA et al., 2011).

A extração de proteínas líquido-líquido por meio do sistema de duas fases aquosas é um método alternativo de purificação que vem ganhando destaque por sua aplicação na área da biotecnologia, por apresentar baixos custos e

por apresentar um alto grau de purificação (NERLI et al., 2009). Por exibirem em sua composição uma elevada quantidade de água em suas fases, é mais fácil acomodar as enzimas em face de sua biocompatibilidade (MALPIEDI et al., 2009).

Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi produzir a tanase partir do fungo endofítico *Aspergillus niger* URM 7131 sob fermentação submersa e purificar parcialmente a enzima obtida por meio de Sistema Aquoso Bifásico (SAB).

MATERIAIS E MÉTODOS

O fungo *Aspergillus niger* URM 7131 encontra-se preservado, no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, *Campus* Barreiros, em frascos de penicilina contendo água destilada esterilizada sob refrigeração (CASTELLANI, 1939) e em óleo mineral. O micro-organismo foi previamente identificado pela Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco, do Departamento de Micologia, onde se encontra depositado.

Preparo do inóculo

Repiques foram realizados semanalmente em meio Batata Dextrose Agar (BDA - HIMEDIA®), na temperatura de 28 °C em incubadora do tipo BOD. A duração do crescimento da estirpe foi padronizado em 10 dias. O inóculo preparado em suspensão contendo 1×10^6 esporos/mL⁻¹.

Produção enzimática sob fermentação em estado submerso

A produção enzimática ocorreu em frascos tipo Erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL de meio de fermentação (% pv⁻¹, NaNO₃ a 0,3%; K₂HPO₄ a 0,1%; MgSO₄ a 0,05%; KCl a 0,05%; FeSO₄ a 0,0001%; ácido tânico a 1%, pH 5,0). A fermentação transcorreu em incubadora orbital a 100 rpm, a 30 °C por 72 h. O conteúdo fermentado foi filtrado e centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante, considerado extrato enzimático bruto foi congelado para análises posteriores.

Determinação da atividade enzimática

A atividade da tanase foi estimada pelo método modificado de Sharma et al. (2000), modificado por Pinto (2006), onde se utilizou rodanina etanólica e ácido tânico como substrato. O meio reacional foi constituído por 250 µL do substrato, dissolvido em tampão citrato 0,05 M (pH 5), e 250 µL do extrato enzimático bruto, ficando estes em contato por 5 minutos a 30 °C. A reação enzimática foi paralisada pela adição de 300 µL de rodanina etanólica 0,667% (pv⁻¹). Após 5 minutos a 30 °C, 200 µL de hidróxido de potássio 0,5 N foram adicionados, adquirindo uma coloração violeta. Ao passar 5 minutos, na temperatura supracitada, o volume obtido foi diluído adicionando 4 mL de água destilada em cada reação. Tubos designados de controles (extrato enzimático

adicionado ao final da reação) foram usados simultaneamente. Após 10 minutos a 30 °C procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 520 nm. A unidade de atividade tanásica (UmL⁻¹) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de ácido gálico por minuto nas condições de ensaio. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Conteúdo proteico

A proteína total foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando-se albumina de soro bovino como padrão.

Purificação parcial

Sistema bifásico aquoso (peg/citrato)

Para o processo de purificação parcial da tanase pelo sistema bifásico aquoso utilizando PEG/citrato de sódio (Tabela 1) foi selecionada a massa molar de polietilenoglicol de 6000 g mol⁻¹, concentração do polietilenoglicol, concentração de citrato e pH. Os sistemas (10 g) foram preparados a partir de solução estoque de PEG a 50% (m.m⁻¹). Os sistemas aquosos bifásicos formados de PEG/citrato de sódio foram preparados em tubos cônicos graduados pesando-se quantidades apropriadas de PEG, citrato de sódio, ácido cítrico e água destilada de acordo com os valores de pH desejados. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado mecanicamente em vórtex para completa dissolução do polímero e uma quantidade do extrato enzimático bruto, representando 20% da massa total do sistema foi adicionado. Após a adição do extrato enzimático os tubos foram agitados por 1 min e então armazenados em refrigeração durante uma hora para permitir a redistribuição dos componentes e formação das fases.

Após a formação das fases, os volumes das mesmas foram medidos e separados. As fases PEG e sal foram analisadas quanto a atividade enzimática e conteúdo de proteínas totais. Amostras contendo água, em substituição ao extrato enzimático, foram elaboradas para corrigir interferências nos ensaios tanto do PEG quanto do sal.

Tabela 1. Sistemas bifásicos aquosos PEG/citrato

M _{PEG} (g mol ⁻¹)	C _{PEG} (% , pV ⁻¹)	C _{cit} (% , pV ⁻¹)	pH
6000	20	15	8
6000	20	20	6
6000	24	15	6
6000	24	20	8

2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Após obtenção dos resultados, os mesmos foram analisados através do programa SISVAR – Sistema de Análise de Variância (FERREIRA, 2011), realizando-se a comparação de médias pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Purificação parcial em sistema aquoso bifásico

As análises de atividade enzimática e proteína total foram executadas no extrato purificado parcialmente. Nesse estudo foi testado o PEG a 6000 g mol⁻¹ em dois níveis distintos de pH. Sabe-se que o sistema aquoso bifásico é influenciado por alguns parâmetros como pH, tipo e concentração do sal, massa molar e concentração do polímero do sistema, bem como as características das proteínas.

O sistema que apresentou maior fator de purificação foi o ensaio 3 (6000 g mol⁻¹, PEG a 24%, citrato de sódio a 15% e pH 6) (Tabela 2). Neste sistema foi obtido um fator de purificação igual a 3,1 e rendimento em atividade em torno de 60%. Resultados parecidos, utilizando sistema de duas fases aquosas contendo PEG/Citrato, foram encontrados por MA et al. (2015) ao purificar parcialmente tanase obtida de *Aspergillus ficuum* Gim 3.6. A enzima foi preferencialmente particionada para a fase topo e teve sua pureza incrementada em 2,7 vezes. Já Sena et al. (2017) ao utilizar o sistema PEG/Citrato para purificar parcialmente a tanase obtida de *Aspergillus tamarii* URM 7115 verificaram que a enzima também foi particionada para a fase PEG, entretanto obtiveram um fator de purificação maior, em torno de 19,8.

Tabela 2. Purificação parcial de tanase por sistema aquoso bifásico baseado em PEG 6000/Citrato.

Ensaio	M _{PEG} (g/mol)	C _{PEG} (%)	C _{cit} (%)	pH	Atividade (U/mL)	Ke	Kp	Y	FP	S
1	6000	20	15	8	11,8	12,9	10,1	92,4	1,2 b	1,3
2	6000	20	20	6	9,3	7,9	1,9	65,2	0,8 b	4,3
3	6000	24	15	6	6,3	10,4	0,4	60,03	3,1 a	25,2
4	6000	24	20	8	5,9	16,4	1,6	47,4	1,07 b	10,2

Ke: Constante de partição (atividade enzimática); Kp: Constante de partição (proteína); Y: Rendimento; FP: fator de purificação; S: Seletividade. Médias seguidas por letras distintas na vertical diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Scott-Knott.

O sistema composto por PEG a 20% e citrato de sódio a 20% não foi promissor, pois seu fator de purificação teve valor de 0,8, logo não teve purificação parcial significativa. A Tabela 2 mostra que a tanase foi preferencialmente particionada para a fase PEG, pois em todos os ensaios o coeficiente de partição foram maiores que 1 (Ke>1). Valores altos para Ke e baixos para Kp

indicam que a enzima alvo teve maior tendência a se particionar na fase topo. O efeito hidrofóbico da fase está diretamente relacionado com a identidade química dos componentes do sistema, bem como a sua concentração. Embora, os constituintes de um sistema aquoso bifásico são em princípio hidrofílico, sendo que, relativamente, a sua hidrofobicidade irá variar. Assim, apesar de ambas as

fases do SAB serem bastante hidrofílica, a fase superior (geralmente de PEG) é mais hidrofóbica. Isso favorece a partição de proteínas hidrofóbicas para essa fase particular (ASENJO; ANDREWS, 2012). Desta forma, a enzima expressou um maior particionamento pela fase topo, devido à sua interação hidrofóbica ao sistema. Por apresentar o $K_e > K_p$, a enzima teve uma maior atração pela fase PEG sendo este comportamento desejável, uma vez que aumentou o fator de purificação e a seletividade por esta fase. Verificou-se também que um $K_p > 1$, encontrado no primeiro sistema, não foi seletivo para a tanase e não é adequado para o processo de purificação, mesmo obtendo maior rendimento em atividade. Avaliando ainda os dados obtidos na Tabela 2, no ensaio 3, pode-se notar que as enzimas contaminantes foram separadas da enzima alvo uma vez que apresentou um baixo coeficiente de partição da proteína e alta seletividade.

CONCLUSÃO

O presente trabalho relatou a produção, partição e purificação parcial da tanase obtida de *Aspergillus niger* URM 7131. Os resultados demonstraram as vantagens do sistema aquoso bifásico, seja pelo fator de purificação obtido (3,1) quanto pelo rendimento em atividade (60%). Ademais, o sistema bifásico é uma alternativa rápida e de baixo custo para uma etapa inicial de purificação. Tendo em vista que a tanase é versátil e possui uma gama de aplicações industriais, inclusive alimentícia, verifica-se a necessidade de explorar e/ou adicionar outros métodos de purificação com a finalidade de obter maior fator de purificação.

AGRADECIMENTOS

Ao IFPE, Campus Barreiros, pelas bolsas concedidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: phase separation and applications. **Journal of chromatography. A**, v. 1238, p. 1-10, 2012.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, p. 63-72, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAO, M.; LI, Z.; WANG, J.; GE, W.; YUE, T.; LI, R.; COLVIN, V. L.; YU, W. W. Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis.

Trends in Food Science & Technology, v. 27, p. 47-56, 2012.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v.24, p. 270-276, 1939.

EL-TANASH, A. B.; SHERIEF, A. A.; NOUR, A. Optimization the hydrolysis process of tannic acid for gallic acid production by tannase of *Aspergillus awamori* using response surface methodology. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 10, p. 9-17, 2012.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

HUANG, R.; KOSTANSKI, L.K.; FILIPE, C.D.M.; GHOSH, R. Environment-responsive hydrogel-based ultrafiltration membranes for protein bioseparation. **Journal of Membrane Science**, v. 336, p. 42-49, 2009.

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.

LIN, S.; HUNG, C.; JUANG, R., Effect of operating parameters on the separation of proteins in aqueous solutions by dead-end ultrafiltration. **Desalination**, v. 234, p. 116-125, 2008.

MA, W. L.; ZHAO, F. F.; YE, Q.; HU, Z. X.; YAN, D.; HOU, J.; YANG, Y. Production and partial purification of tannase from *Aspergillus ficcum* Gim 3.6. **Preparative Biochemistry Biotechnology**, v. 45, p. 754-768, 2015.

MALPIEDI, L. P.; ROMANINI, D.; PICÓ, G. A.; NERLI, B. B. Purification of trypsinogen from bovine pancreas by combining aqueous two-phase partitioning and precipitation with charged flexible chain polymers. **Separation and Purification Technology**, v. 45, p. 40-45, 2009.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, p. 892-896, 2005.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. **Comunicado Técnico**, v. 102, p. 1-5, 2005.

PINTO, G. A. S.; COURI, S.; GONÇALVES, E. B. Replacement of methanol by ethanol on gallic acid determination by rhodanine and its impacts on the tannase

assay. **Electronic Journal Environmental, Agricultural Food Chemistry**, v. 5, p. 1560-1568, 2006.

RAJA, S.; MURTY, V. R.; THIVAHARAN, V.; RAJASEKAR, V.; RAMESH, V. Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules - a review. **Science and Technology**, v. 1, p. 7-16, 2011.

RANA, D. S.; THÉODORE, K.; NAIDU, S. N.; PANDA, T. Stability and kinetics of β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 149-155, 2003.

SARKAR, B.; DASGUPTA, S.; DE, S. Electric field enhanced fractionation of protein mixture using ultrafiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 341, p. 11-20, 2009.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCKENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; J. MELLO, C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6ª ed. Porto Alegre: UFSC/UFRG, 2007. pp. 885-901.

SENA, A. R.; OLIVEIRA, F. M. B.; LEITE, T. C. C.; NASCIMENTO, T. C. E. S.; MOREIRA, K. M.; ASSIS, S. A. The application of aqueous biphasic systems as strategy to purify tannase from *Aspergillus tamaris* URM 7115. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**. doi: [10.1080/10826068.2017.1365249](https://doi.org/10.1080/10826068.2017.1365249).

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.

TUNG, K.; HU, C.; LI, C.; CHUANG, C., Investigating protein crossflow ultrafiltration mechanisms using interfacial phenomena. **Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers**, v. 38, p. 303-311, 2007.