



Isolamento e avaliação qualitativa de bactérias endofíticas e epifíticas quanto à habilidade de utilizar ácido tânico

Miquéas Jamesse Gouveia¹, Rafael Silva de Araújo¹, Marcelo Rodrigues Figueira de Mello², Amanda Reges de Sena²

¹ Discentes do Curso de Licenciatura em Química. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, *Campus* Barreiros. Email: miqueasgouveia@hotmail.com, rafael_gemios@hotmail.com.

² Docentes do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, *Campus* Barreiros. Email: marcelomello@barreiros.ifpe.edu.br, amandareges@gmail.com.

Resumo: Tanases são enzimas largamente distribuídas na natureza e hidrolisam as ligações éster e depsídicas do ácido tânico, um tanino hidrolisável, em ácido gálico e glicose. Elas são extensamente utilizadas nas indústrias de alimentos e bebidas, farmacêutica e química, sendo o ácido gálico o principal produto obtido através da reação. A mais importante fonte de obtenção da tanase é utilização de micro-organismos, pois podem produzir enzimas de maneira contínua e em altas quantidades. O objetivo do presente trabalho foi avaliar qualitativamente, em meio sólido, a produção de tanase por bactérias endofíticas e epifíticas isoladas da azeitona-do-nordeste (*Syzygium cumini* Lam). Os micro-organismos foram isolados no meio TSA. A caracterização foi realizada em meio Ágar nutriente suplementado com 0,3% de ácido tânico. Neste trabalho foram isoladas 9 bactérias: 5 endofíticas e 4 epifíticas. Das 9 bactérias testadas, 3 apresentaram atividade tanásica e podem ser potenciais produtoras de enzimas que passarão por futura otimização no processo de produção.

Palavras-chave: micro-organismos, *Syzygium cumini*, tanase, triagem

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores versáteis, existindo um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica. Estão presentes em todos os sistemas biológicos e são produzidas por todos os organismos vivos e apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores para a biotransformação. É atualmente, um dos principais alvos da pesquisa em Biotecnologia, não apenas por seu papel crucial nos mecanismos celulares, mas também por seu potencial de aplicação na substituição de processos químicos convencionais (CANTO; MENEZES, 1995; DALLA-VECCHIA et al., 2004).

A enzima Tanino acil hidrolase (TAH) conhecida como tanase (E.C: 3.1.1.20) é uma enzima que catalisa a hidrólise de ligações ésteres do ácido *m*-digálico (conhecida como ligação depsídica) e ligações laterais de taninos hidrolisáveis, como o ácido tânico, produzindo ácido gálico e glicose (BHAT et al., 1998; BANERJEE; MONDAL; PATI, 2001; PINTO et al., 2001). É uma enzima ligada à membrana (intracelular) ou extracelular, induzível, produzida na presença de ácido tânico, podendo ser obtida a partir de fontes vegetal, animal e microbiana (AGUILAR et al., 1999). Vale ressaltar que o meio microbiológico é a fonte mais importante de obtenção da tanase, uma vez que as enzimas produzidas desta forma são mais estáveis que aquelas obtidas por outros meios (BANERJEE; KAR, 2000). Vários pesquisadores estudaram o potencial de bactérias em produzir tanase extracelular. Algumas espécies já foram utilizadas na produção enzimática como *Bacillus pumilis*, *B. polymyxa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus bovis* e *Selenomonas ruminantium* (BELMARES et al., 2004).

Existem diversas aplicações industriais para a TAH, no entanto, poucas são efetivamente empregadas devido ao seu alto custo de produção e pouco conhecimento sobre seu modo de ação catalítica (BANERJEE; MONDAL; PATI, 2001; MACEDO; MATSUDA; BATTESTIN, 2005). Entre as aplicações pode-se citar: preparação de chás instantâneos (LEKHA; LONSANE, 1997), fabricação de bebidas (sucos, cervejas e vinhos) (BATTESTIN; MACEDO, 2007), aditivo para a produção animal (NUERO; REYES, 2002), produção de ácido gálico e elágico

(ROBLEDO et al., 2008), síntese de ésteres e tratamento de efluentes (MAHENDRAN et al., 2006).

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi isolar bactérias endofíticas e epifíticas de amostras de *Syzygium cumini* Lam. e avaliar qualitativamente as mesmas quanto à habilidade de utilizar o ácido tânico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental foi iniciada pela seleção de plantas às coordenadas de 08°49' (S) e 35°11' (W), aparentemente sadias da azeitona-do-nordeste (*Syzygium cumini* Lam. – Figura 1) do IFPE/*Campus* Barreiros, onde as amostras consistiram apenas de folhas e frutos, para posteriormente ser realizado o isolamento dos micro-organismos. A coleta ocorreu em diferentes regiões da planta.



Figura 1 - *Syzygium cumini* Lam. Fonte: o autor.

As partes recolhidas foram devidamente lavadas em água corrente, cortadas em pedaços menores em condições assépticas, desinfetadas em solução de etanol a 70% durante 1 minuto, hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) por 3 minutos, novamente em solução de etanol a 70% por 30 segundos, depois foram enxaguadas em água destilada esterilizada (3 vezes) e secas em papel filtro esterilizado (Neto et al., 2002). A desinfecção superficial do material vegetal visa eliminar os organismos saprófitos que se encontram na superfície diminuindo a população dos contaminantes que podem crescer no meio de cultura utilizado. A água da última lavagem foi utilizada como controle para verificar a natureza das bactérias, se endofíticas ou epifíticas.

Após a limpeza maceraram-se em água destilada esterilizada os fragmentos do material vegetal (limbo e pecíolo) com auxílio de almofariz e pistilo até aparecer um líquido, onde foi adicionado 100 µL para placa de Petri com o meio TSA (*Tryptone Soya Agar*), previamente esterilizado (121 °C/20 minutos) com uma pipeta automática. O líquido obtido foi espalhado sobre o meio com o auxílio de uma alça de Drigalski. No caso dos frutos, após o processo de desinfecção, foram retirados alguns fragmentos e estes foram homogeneizados em água destilada estéril, em vórtex, por 10 minutos antes de serem adicionados ao meio.

Após essa etapa incubou-se em temperatura de 25 ± 3 °C, em sala climatizada, por um tempo estimado de 24 horas (tempo previsto para o aparecimento de bactérias). Após o aparecimento das colônias fez-se a purificação no mesmo meio, através de estrias, para a obtenção de um único tipo de bactéria e assim avaliar seu potencial em produzir a enzima tanase na presença de ácido tânico. As colônias individuais foram semeadas em tubos de ensaio inclinados, contendo o mesmo meio de isolamento, e permanecem em geladeira para posterior identificação.

A caracterização qualitativa quanto à produção de tanase foi realizada de acordo com a metodologia de Osawa e Walsh (1993), modificado. Para o experimento, tanto das bactérias endofíticas quanto das epifíticas, foi utilizado o meio ágar nutriente suplementado com 0,3 % de

ácido tânico, o qual foi adicionado ao meio após ser esterilizado em membrana de 0,2 μm . Após esterilização (121 $^{\circ}\text{C}$ /20 minutos) e solidificação, o meio foi inoculado com 100 μL da solução bacteriana com o auxílio de pipeta automática, espalhado no meio com a alça de Drigalski e incubado em temperatura de 26 $^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. A adição do ácido ao meio de cultura forma um complexo entre tanino e proteína. A clivagem deste pelas bactérias produtoras de tanase forma uma zona (castanho esverdeado) em volta da colônia (Kumar et al., 2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho desenvolvido, até o momento, permitiu o isolamento de diferentes grupos bacterianos endofíticos e epifíticos de folhas associados à azeitona-do-nordeste. Em meio de cultura TSA foi observada uma comunidade bacteriana constituída basicamente de cinco grupos morfológicos em relação às cores das colônias (amarela, vermelha, creme, branca e laranja – Figura 2), além de diferenciação na textura.



Figura 2 – Diversidade morfológica de bactérias associadas à azeitona-do-nordeste (*Syzygium cumini*).

As bactérias endofíticas (5) tiveram as seguintes colorações: laranja, amarela, vermelha e creme. As epifíticas (4) apresentaram coloração branca, creme e laranja. Como visto na figura acima, as bactérias com a mesma coloração pode habitar o hospedeiro tanto de forma endofítica quanto epifítica e, no entanto serem diferentes. A afirmação, se iguais ou não, só será possível pela identificação morfológica, caracterização bioquímica e análise molecular.

Os resultados quanto à capacidade em degradar o ácido tânico encontram-se na Tabela 1. Neste trabalho foram testadas nove bactérias isoladas quanto à habilidade de utilizar o ácido tânico através do método de estriamento em placas contendo Agar nutriente acrescido de ácido tânico.

Tabela 1 – Triagem das bactérias quanto à habilidade de utilizar o ácido tânico.

| Bactérias | Coloração | Natureza bacteriana | Resultado |
|-----------|-----------|---------------------|-----------|
| A | Vermelha | Endofítico | + |
| B | Creme | Epifítico | + |
| C | Creme | Epifítico | + |
| D | Laranja | Endofítico | - |
| E | Amarela | Endofítico | - |
| F | Vermelha | Endofítico | - |
| G | Creme | Endofítico | - |
| H | Branca | Epifítico | - |
| I | Laranja | Epifítico | - |

+: Positivo. -: Negativo.

Dos nove isolados, apenas três tiveram resultado positivo. As bactérias A, B e C (Figura 3) formaram a zona de degradação (castanho esverdeado) indicando que as bactérias são produtoras de tanase.

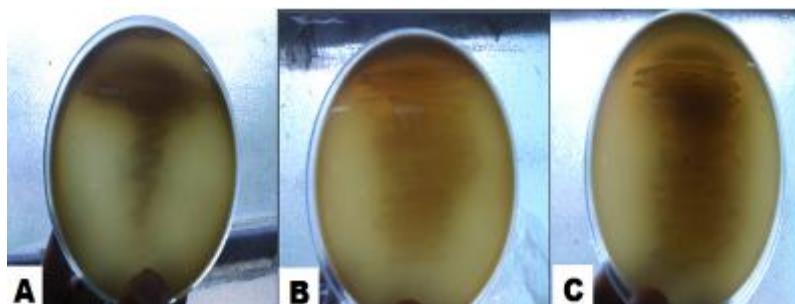


Figura 3. Bactérias com resultado positivo.

As bactérias com resultados positivos foram congeladas em tubos eppendorfs preenchidos com água e glicerol (1:1) e posteriormente será feita a identificação.

Vários pesquisadores estudaram o potencial de bactérias em produzir tanase extracelular. Peter et al., (2009) isolaram 6 micro-organismos morfologicamente diferentes de ambientes ricos em taninos. Os mesmos foram testados quanto à produção de tanase entre 18 e 24 horas. O isolado mais eficiente na degradação do ácido tânico e que pode ser utilizado para a produção de tanase foi identificado com *Citrobacter* sp. por testes bioquímicos. Nadaf e Ghosh (2011) fizeram a triagem com a bactéria *Rhodococcus* NCIM 2891. A triagem também foi feita em ágar nutriente suplementado com ácido tânico. A zona clara foi observada ao redor do micro-organismo após 48 horas de incubação. Em contraste ao presente trabalho, Sivashanmugan e Jayaraman (2011) fizeram uma triagem de bactérias isoladas de efluentes de indústria de couro quanto a produção de tanase e verificaram que das 22 cepas 9 produziram halo de degradação em MMT ágar (meio mínimo adicionado de ágar e ácido tânico). Raghuwanshi et al. (2011) fizeram a triagem com 150 bactérias isoladas do solo e verificaram que somente 5 apresentaram atividade tanásica.

Como visto, os estudos sobre tanase bacteriana são limitados em comparação com tanase fúngicas e que durante toda a pesquisa não foram vistos outros trabalhos realizados com isolamento de bactérias da azeitona-do-nordeste (*Syzygium cumini* Lam.). Ademais, a baixa quantidade de bactérias produtoras de tanase estão de acordo com pesquisas divulgadas na literatura.

4. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que é possível isolar bactérias endolíticas e epifíticas da azeitona-do-nordeste, com a habilidade de utilizar o ácido tânico, aumentando a possibilidade de estudos mais aprofundados com essa espécie vegetal e com os seus micro-organismos. A partir das bactérias com maior atividade de hidrólise do ácido tânico, será possível a otimização da produção enzimática e a enzima obtida poderá ser caracterizada quanto à temperatura e pH ótimo, sendo possível obter enzimas com características atrativas, no que diz respeito às aplicações biotecnológicas.

5. AGRADECIMENTOS

Ao IFPE/*Campus* Barreiros e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelas bolsas concedidas.



REFERÊNCIAS

AGUILAR, C. N.; AUGUR, C.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA, E. A comparison of methods to determine Tannin Acyl Hydrolase Activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.42, n.3, p. 355-361, 1999

BHAT, T. K.; SINGH, B.; SHARMA, O. P. Microbial degradation of tannins: a current perspective. **Biodegradation**, v. 9, p. 343-357, 1998.

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

BANERJEE, D.; MONDAL, K. C.; PATI, B. R. Production and characterization of extracellular and intracellular tannase from newly isolated *Aspergillus aculeatus* DBF 9. **Journal Basic Microbiology**, [S.l.], v. 41, p. 313-318, 2001.

BATTESTIN, V; MATSUDA, K, L.; MACEDO, A, G.; Fonte de aplicação de taninos e tanase em alimento. **Alimentos e Nutrição**, v. 25, p. 63-72, 2004.

BELMARES, R.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; RODRÍGUEZ-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.

CANTO, W. L.; MENEZES, T. J. B. Estudos econômicos – alimentos processados. **Produção, usos e mercados de enzimas**, Campinas: Ital, 1995.

DALLA-VECCHIA, R.; MARIA NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.

KUMAR, R.; KUMAR, A.; NAGPAL, R.; SHARMA, J.; KUMARI, A. A novel and sensitive plate assay for screening of tannase-producing bacteria. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 177-179, 2010.

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.

MACEDO, G. A.; MATSUDA, L. K.; BATTESTIN, V. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 833-838, 2005.

MAHENDRAN, B.; RAMAN, N.; KIM, D. J. Purification and characterization of tannase from *Paecilomyces variotii*: hydrolysis of tannic acid using immobilized tannase. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 70, p. 444-450, 2006.

NADAF, N. H.; GHOSH, J. S. Production, purification and characterization of tannase from *Rhodococcus* NCIM 2891. **Current Research Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 3, p. 246-253, 2011.



NETO, P. A. SÁ PEIXOTO.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biociência**, v. 29, p. 62-76, 2002.

NUERO, O. M.; REYES, F. Enzymes for animal feeding from *Penicillium chrysogenum* mycelial wastes from penicillin manufacture. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 413-416, 2002.

OSAWAL, R.; WALSH, T. P. Visual Reading Method for Detection of Bacterial Tannase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 1251-1252, 1993.

PETER, W.; JOHN, R. P.; KUMAR, P.; THOMAS, S. Tannin acyl hydrolase production by *Citrobacter* sp. Isolated from tannin rich environmental, using *Tamarindus indica* seed powder. **Journal of Applied Sciences & Environmental Management**, v. 13, p. 95-97, 2009.

RAGHUWANSHI, S.; DUTT, K.; GUPTA, P.; MISRA, S.; SAXENA, R. K. *Bacillus sphaericus*: The highest bacterial tannase producer with potential for gallic acid synthesis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, p. 635-640, 2011.

ROBLEDO, A.; AGUILERA-CARBÓ, A.; RODRIGUEZ, R.; MARTINEZ, J. L.; GARZA, Y.; AGUILAR, C. N. Ellagic acid production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of pomegranate residues. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 507-513, 2008.

SIVASHANMUGAM, K.; JAYARAMAN, G. Media optimization for extra cellular tannase production by *Klebsiella pneumoniae* MTCC 7162 using response surface methodology. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, p. 3611-3615, 2011.