



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMONUPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

Juliana Silva de Lima

**IMOBILIZAÇÃO DE TANASE E SUA APLICAÇÃO NA DETANIFICAÇÃO DO
CHÁ DE BOLDO**

Recife
2018

JULIANA SILVA DE LIMA

**IMOBILIZAÇÃO DE TANASE E SUA APLICAÇÃO NA
DETANIFICAÇÃO DO CHÁ DE BOLDO**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde. Área de Concentração: Biotecnologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior

Co-Orientadores:

Profª. Dra. Mariana Paola Cabrera

Prof. Dr. Attilio Converti

Recife

2018

Catálogo na fonte
Elaine C. Barroso (CRB4/ 1728)

Lima, Juliana Silva de

Imobilização de tanase e sua aplicação na detanificação do chá de boldo / Juliana Silva de Lima- 2018.

53 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Coorientadores: Mariana Paola Cabrera e Attilio Converti

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife, 2018.

Inclui referências e

1. Taninos 2. Partículas magnéticas 3. Boldo I. Carvalho Júnior, Luiz Bezerra de (orient.) II. Cabrera, Mariana Paola (coorient.) III. Converti, Attilio (coorient.) IV. Título

572.567

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-397

JULIANA SILVA DE LIMA

IMOBILIZAÇÃO DE TANASE E SUA APLICAÇÃO NA DETANIFICAÇÃO DO CHÁ DE BOLDO

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 06/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Jr.
Orientador
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Profª Dra. Lidianne Roberta Cruz da Silva
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Unidade Acadêmica de Garanhuns

Profa. Dra. Maria Helena Menezes Estevam Alves
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Attilio Converti
Departamento de Engenharia Civil, Química e Ambiental, UNIGE (Itália)

Profª Dra. Luiza Rayanna Amorim de Lima
Universidade de Pernambuco (Garanhus)

Dedico...

A Deus e ao meu anjo da guarda,
que sempre está ao meu lado, me
protegendo, guiando e mostrando
tudo que há de melhor nessa vida.

Ofereço...

Aos meus pais, pelo esforço, dedicação
e amor na criação das suas três filhas.
Sem eles nada seria possível em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao bom Deus pelo dom da vida. Pelo acompanhamento, proteção e por me lembrar que após um dia chuvoso sempre vem o sol. Por me mostrar que devemos viver um dia após o outro, ter calma e paciência. Sou grata pelos seus ensinamentos mesmo que em muitas vezes eu não entenda alguns deles, muito obrigada Deus.

À Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta (UFPE), que foi a precursora, juntamente com a professora Lidianne Roberta, na minha vida científica. Na micoteca URM ela me acolheu e orientou o meu primeiro PIBIC e assim me inseriu no mundo da biotecnologia dos fungos e no universo da tanase. Foi o meu primeiro estágio na graduação e até o final do mestrado permaneci. Sou muito agradecida pelo conhecimento que conquistei através da professora Cristina Motta, além da amizade que fizemos todos esses anos.

Ao meu orientador, Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Jr, pela orientação e pelos diversos momentos de conversas e distração que tanto são necessários. Verdadeiramente é uma pessoa iluminada e querida por todos.

À minha querida co-orientadora Mariana Cabrera que tanto me ajudou, orientou, ensinou e se tornou uma amiga sincera e leal. És um anjo iluminado.

Ao professor Attílio Converte pela hospitalidade e todo o apoio e orientação em minha curta duração na Itália durante a execução do doutorado sanduíche.

Aos meus pais, Marcos Augusto de Lima e Sara Maria da Silva Lima, pelo amor dado e por acreditarem em meu potencial desde sempre.

Às minhas irmãs Bárbara Lima e Jéssica Lima, à minha querida sobrinha Maria Clara Guedes por mostrar todos os dias como a vida é bonita.

Aos meus amigos que me proporcionam momentos inesquecíveis e que tem o dom de transformar os dias não tão bons em dias calmos e serenos. Tatiana Belford, Amanda Daher, Julyanna Cordoville, Norma Farias, Sandra Farias, Hugo Farias, Cyndy Mary, Roberta Cruz, Ana Carolina Amorim, Bruna Alencar, Joane Veloso, Mayara Leão, Antony, Minelly Albuquerque, Odacy Camillo, Maria Helena, Débora Raquel, Marília Maciel, entre tantos outros, muito obrigada.

Aos amigos da Micoteca URM, laboratório de Bioquímica do LIKA e todos que fazem parte do Departamento de Engenharia Civil, Química e Ambiental (Universidade de Gênova-Itália).

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e a Coordenação da Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, pelo incentivo acadêmico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo durante o doutorado para realização deste projeto.

Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós.
(XAVIER; FRANCISCO CÂNDIDO, 2005, p. 03).

RESUMO

Dentre as enzimas com grande aplicação na indústria destaca-se a tanase. Esta enzima catalisa a hidrólise de ligações ésteres e depsídicas de vários taninos hidrolisáveis, como o ácido tânico. A aplicação de enzimas imobilizadas pode trazer muitas vantagens em relação ao uso da enzima solúvel, como a possibilidade de seu reuso, aumento de estabilidade e redução dos custos do processo. O uso de partículas magnéticas como suporte acrescenta vantagens como fácil separação do meio de reação e maior área superficial. Outra técnica que apresenta diversas vantagens é a encapsulação em alginato de cálcio destacando o seu reuso e a estabilidade enzimática. O objetivo deste trabalho foi imobilizar a tanase covalentemente em terra de diatomácea magnetizada e pela técnica de encapsulamento com alginato de cálcio e aplicar a enzima imobilizada e livre no processo de hidrólise de taninos presentes no chá de boldo. Após o processo de imobilização covalente, o pH ótimo da tanase imobilizada permaneceu o mesmo apresentado pela enzima livre, enquanto a temperatura ótima subiu em relação a tanase na forma solúvel. A constante de Michaelis mostrou que a tanase imobilizada tem uma maior afinidade de ligação com o substrato do que a tanase livre. Verificou-se também que a enzima imobilizada apresenta um ótimo perfil de estabilidade. Foi observado que é possível realizar a reutilização do suporte até 10 vezes com conservação da atividade de 66%. Na aplicação da enzima no chá de boldo, a tanase imobilizada em mDE-PANI apresentou melhor resultado se comparada à enzima livre. Quando aplicada a técnica de encapsulação, a enzima mostrou um aumento de pH ótimo (5,0 para 6,0) e uma diminuição de 10 graus da temperatura ótima conservando 75% da atividade específica em relação a enzima solúvel. Após a reutilização da enzima em até 6 vezes a atividade foi retida em 50% e após um período de 105 dias de estocagem foi conservada a sua atividade em mais de 55%. Na aplicação da enzima encapsulada houve a redução de 31% dos taninos além de um aumento de catequinas e ácido gálico, melhorando assim o teor nutricional do chá. Com isso, a tanase imobilizada em ambas as técnicas utilizadas se mostrou estável, assim como promissora na aplicação para remoção dos taninos presentes no chá de boldo, ocorrendo ao final do processo uma diminuição dos custos em relação à enzima solúvel e a otimização do processo.

Palavras-chaves: Imobilização. Tanase. Partículas magnéticas.

ABSTRACT

Among the enzymes with great application in the industry stands the tannase. This enzyme catalyses the hydrolysis of esters and depsidic bonds of various hydrolyzable tannins, such as tannic acid. The application of immobilized enzymes can bring many advantages in relation to the use of the soluble enzyme, such as the possibility of its reuse, increase of stability and reduction of the costs of the process. The use of magnetic particles as a carrier adds advantages such as easy separation of the reaction medium and greater surface area. Another technique that presents several advantages is the encapsulation in calcium alginate emphasizing its reuse and the enzymatic stability. The objective of this work was to immobilize the tannase covalently in magnetized diatomaceous earth and the calcium alginate encapsulation technique and to apply the immobilized and free enzyme in the hydrolysis process of tannins present in the boldo tea. After the covalent immobilization process, the optimum pH of the immobilized tannase remained the same as that presented by the free enzyme, while the optimum temperature increased in relation to the tannase in the soluble form. The Michaelis constant showed that immobilized tannase has a higher affinity binding to the substrate than free tannase. It has also been found that the immobilized enzyme has a good stability profile. It was observed that it is possible to perform reuse of the support up to 10 times with conservation of 66% activity. In the application of the enzyme in boldo, the immobilized tannase in mDE-PANI presented a better result when compared to the free enzyme. When applied to the encapsulation technique, the enzyme showed an optimum pH increase (5.0 to 6.0) and a 10 degree decrease in the optimum temperature while retaining 75% of the specific activity relative to the soluble enzyme. After reuse of the enzyme in up to 6 times the activity was retained in 50% and after a period of 105 days of storage its activity was conserved in more than 55%. In the application of the encapsulated enzyme there was a reduction of 31% of the tannins besides an increase of catechins and gallic acid, thus improving the nutritional content of the tea. Thus, the immobilized tannase in both techniques was shown to be stable, as well as promising in the application for the removal of the tannins present in the tea, and at the end of the process a decrease in the costs of the soluble enzyme and the optimization of the process.

Key words: Tannase. Immobilization. Magnetic particles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Desenvolvimento

Figura 1 - Esquema do complexo enzima-substrato.....	17
Figura 2- Hidrólise do ácido tânico pela ação da tanase.....	18
Figura 3- Atividade esterásica e depsidásica da tanase.....	19
Figura 4- Desesterificação de compostos fenólicos (ecg) pela tanase.....	21
Figura 5 - Estrutura de um composto fenólico representado pelo ácido tânico.....	23
Figura 6 - Métodos de imobilização de enzimas.....	26
Figura 7 - Esquema do processo de imobilização de tanase por encapsulação.....	27
Figura 8- Esquema da imobilização covalente de enzimas.....	28
Figura 9- Formação da rede de gel com cadeias homopoliméricas com íons de cálcio.....	31
Figura 10 - Frústula íntegra de diatomácea mapeamento de al e si por Eds.....	33
Figura 11 - Representação esquemática do suporte magnético revestido com pani e sua estrutura “núcleo/casca”.....	34
Figura 12 - Etapas da imobilização da tanase através da ligação covalente utilizando a pani como revestimento do suporte e o glutaraldeído como agente de ligação.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Suportes utilizados como matriz para a imobilização da Tanase.....	30
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

kDa	Quilo daltons
PANI	Polianilina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
K_m	Constante de Michaelis
V_{max}	Velocidade máxima
TD	Terra de Diatomácea
mDE	Terra de Diatomáceas Magnética
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	DESENVOLVIMENTO.....	17
3.1	ENZIMAS.....	17
3.2	TANASE.....	18
3.3	APLICAÇÕES DA TANASE.....	20
3.3.1	Bebidas.....	20
3.3.2	Ração animal.....	21
3.3.3	Efluente de curtume.....	22
3.3.4	Produção de ácido gálico.....	22
3.4	TANINOS.....	22
3.5	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	24
3.5.1	Métodos de Imobilização de Enzimas.....	26
3.6	SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE TANASE.....	29
3.6.1	Alginato de Cálcio.....	30
3.6.2	Terra de Diatomáceas magnética revestida com Polianilina ativadas com glutaraldeído.....	31
4	RESULTADOS.....	36
4.1	HYDROLYSIS OF TANNINS BY ENCAPSULATED TANNASE: BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND PHENOLIC COMPOUND DETERMINATION.....	36
5	CONCLUSÕES.....	38
	REFERÊNCIAS.....	39
	PERSPECTIVAS.....	50
	APÊNDICE A -- HYDROLYSIS OF TANNINS BY TANNASE IMMOBILIZED ONTO MAGNETIC DIATOMACEOUS EARTH NANOPARTICLES COATED WITH POLYANILIN.....	51

1 INTRODUÇÃO

A tanase (EC 3.1.1.20) catalisa a hidrólise de taninos produzindo ácido gálico e glicose (MADEIRA-JUNIOR *et al.*, 2015). Esta enzima pode ser produzida por fungos filamentosos, bactérias, leveduras e, por ser uma enzima de grande interesse comercial, sua aplicação está sendo estudada principalmente na indústria farmacêutica, tratamento de efluentes do couro, alimentos e bebidas como os chás instantâneos (JANA *et al.*, 2014).

Os taninos são considerados os substratos naturais para a tanase. São compostos de alto peso molecular, que contêm suficientes grupamentos hidroxila fenólicos, que permitem a formação de ligações cruzadas estáveis com proteínas (MUELLER-HARVEY, 2001; OLIVAS-AGUIRRE *et al.*, 2015). A maioria dos vegetais é portador de taninos os quais podem ser encontrados nas raízes, no lenho, na casca, nas folhas, nos frutos, nas sementes e na seiva. O teor do tanino varia não só de um vegetal para outro como também de uma parte para outro, do mesmo vegetal (SANTOS, 2000; LENIN *et al.*, 2015). Tais compostos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais, devido à precipitação de glicoproteínas salivares, o que ocasiona a perda do poder lubrificante (LENIN *et al.*, 2015). Muitos alimentos e principalmente bebidas (cerveja, chás instantâneos e vinho) são ricos em taninos. Esses componentes são muito importantes na indústria de alimentos, devido à influência que apresentam sobre suas características físico-químicas ao fato de em estar sensorialmente ligados à adstringência de certos frutos (PANSERA *et al.*, 2003; YAO *et al.*, 2014). A tanase é aplicada nesses alimentos para diminuir a adstringência e assim melhorar a qualidade dos mesmos.

O uso de enzimas livres em grande escala torna-se limitado dependendo dos custos. Além disso, a estabilidade estrutural de algumas enzimas durante qualquer reação bioquímica é altamente desafiadora. A imobilização de enzimas permite preservar a proteína, melhorar fatores como resistência a diferentes pH e temperatura bem como o uso em solventes orgânicos. Esta técnica possibilita o uso das enzimas nas mais diversas áreas industriais se tornando atrativas inclusive na indústria de alimentos e bebidas (KAWAGUTI *et al.*, 2006).

A utilização de enzimas imobilizadas em processos industriais visa reduzir significativamente os custos operacionais por permitir que a enzima se torne mais estável em processos de mudança no pH e na temperatura, mantendo assim a sua

atividade catalítica e que seja recuperada ao final do processo e/ou reutilizada por vários ciclos com alta atividade catalítica, reduzindo a quantidade necessária de produção da própria (SIRISHA *et al.*, 2016).

As propriedades das preparações de enzimas imobilizadas são influenciadas pelas características da enzima e do material de suporte (TISCHER e KASCHE, 1999) ou agente encapsulante (BOTREL *et al.*, 2012). A interação entre esses dois componentes proporciona um imobilizado com propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específicas. Como exemplo de suporte, o alginato de sódio é um polímero extensivamente utilizado como agente encapsulante na imobilização de enzimas através da gelificação iônica por ser um método simples, não tóxico, biodegradável e barato (MOHAPATRA *et al.*, 2007). O uso de suportes magnéticos como matriz para imobilização de enzimas trás uma vantajosa característica que elimina indesejáveis etapas (TÜZMEN *et al.*, 2012). O uso de um revestimento de superfície adequado permite que as partículas do suporte sejam dispersas dentro de fluidos homogêneos e melhorem sua estabilidade. Diferentes estratégias de revestimento são usadas para modificar a superfície química de partículas magnéticas (SHUBAYEV *et al.*, 2009). Dentre os revestimentos utilizados em imobilização, a polianilina (PANI) vem sendo bastante estudada e representa uma classe de polímeros promissores (NERI *et al.* 2008).

Neste contexto, o presente trabalho apresenta os resultados de tanase imobilizada covalentemente em suporte magnético (nanopartículas de terra de diatomáceas magnética revestidas com PANI) e imobilização da enzima pela técnica de encapsulamento com alginato de cálcio.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Imobilizar tanase utilizando duas técnicas diferentes, caracterizar biquimicamente e aplicá-la na hidrólise dos taninos existentes no chá de Boldo.

2.2 Objetivos Específicos

- Imobilizar por ligação covalente a tanase em terra de diatomáceas magnética revestida com polianilina (mTD-PANI);
- Investigar as propriedades físico-químicas e cinéticas da tanase imobilizada em terra de diatomáceas magnética revestida com polianilina (mTD-PANI-TN) e compará-las com aquelas descritas para a enzima solúvel;
- Imobilizar por encapsulação em alginato de cálcio a tanase e avaliar o rendimento do processo e estabilidade das cápsulas;
- Avaliar o potencial do derivado imobilizado (mTD-PANI-TN) e das cápsulas no processo de hidrólise de taninos em chá de boldo.

3 DESENVOLVIMENTO

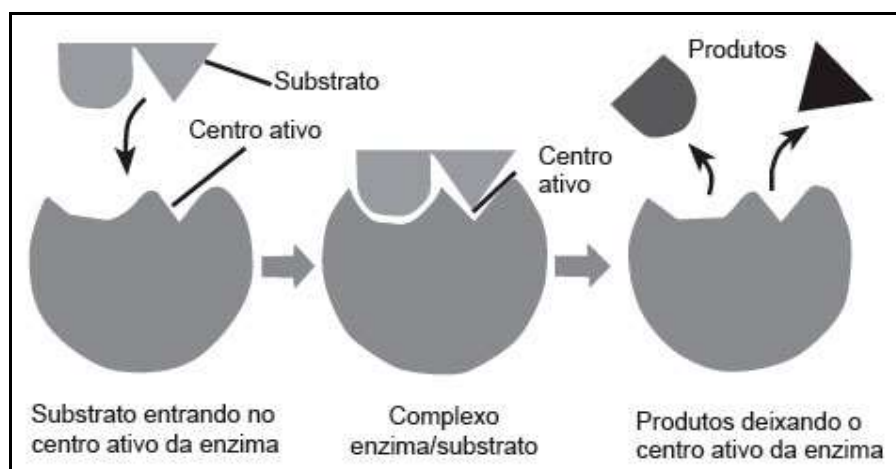
3.1 ENZIMAS

O mercado de enzimas está dividido em enzimas industriais (enzimas técnicas, enzimas para indústria de alimentos e enzimas para ração animal) e enzimas especiais (enzimas terapêuticas, enzimas para diagnóstico, enzimas para química quiral e enzimas para pesquisa). Hoje, as enzimas de uso industrial representam 60% do mercado mundial (PAIVA *et al.*, 2008). O segmento de alimentos e enzimas de bebidas é o maior segmento de enzimas industriais (ADRIO e DEMAÍN, 2014).

As enzimas além de serem altamente especializadas apresentam um alto grau de especificidade em relação ao substrato, aceleram as reações químicas de uma forma extraordinária sem alterar o seu equilíbrio e são capazes de desempenhar a sua função em meio aquoso sob diversas condições de pH e temperatura. Estas características fazem das enzimas catalisadores excepcionais com uma capacidade catalítica muito maior do que os catalisadores inorgânicos e sintéticos (LODISH *et al.*, 2007).

Uma enzima tem uma estrutura tridimensional específica, possuindo uma região denominada de centro ativo, onde o substrato (reagente) se liga. Assim forma-se o complexo enzima-substrato que, sendo estável permite diminuir a energia de ativação, aumentando a velocidade da formação de produtos (Fig. 1). Quando há formação de produtos, estes são libertados e a enzima volta a estar disponível para se ligar a outra molécula de substrato (LODISH *et al.*, 2007).

Figura 1- Esquema do complexo enzima-substrato.

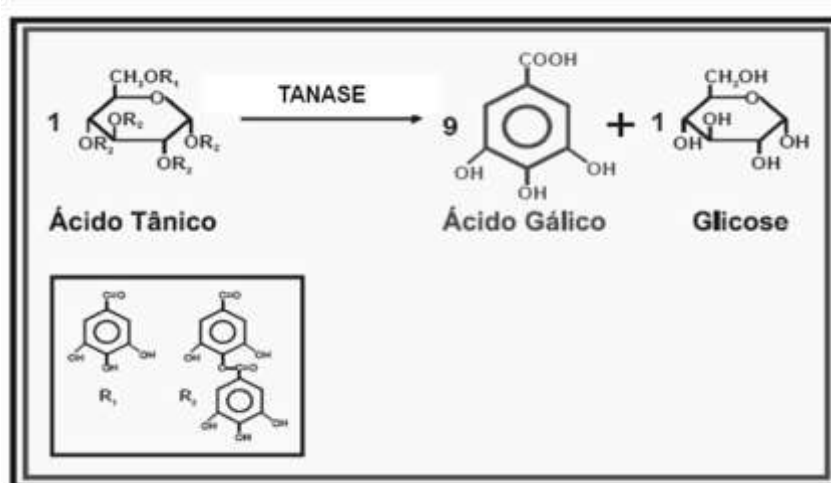


Fonte: <http://experimentoteca.com/biologia/banco-de-questoes/vestibular-ifsp-2010/>

3.2 TANASE

A tanino-acil-hidrolase (EC 3.1.1.20), usualmente chamada de tanase, catalisa a hidrólise de ligações ésteres e depsídicas de vários taninos hidrolisáveis, como o ácido tânico liberando glicose e ácido gálico (Fig. 2) (MADEIRA-JUNIOR *et al.*, 2015; FUENTES-GARIBAY *et al.*, 2015). Esta enzima pode ser encontrada em diferentes fontes, porém seus principais produtores são os microrganismos, entre eles, destacam-se fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (PINTO *et al.*, 2005; CHANG *et al.*, 2006; ZHANG *et al.* 2014; LARA-VICTORIANO *et al.*, 2017).

Figura 2- Hidrólise do ácido tânico pela ação da tanase.



Fonte: MACEDO *et al.*(2005)

Os taninos são considerados os substratos naturais para a tanase, mas esta enzima também é capaz de degradar ésteres de ácido gálico (LEKHA e LONSANE, 1997; CHÁVEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2012). Segundo Ilbuchi *et al.*, (1972), os critérios que devem ser cumpridos na formação de um complexo enzima-substrato da tanase são:

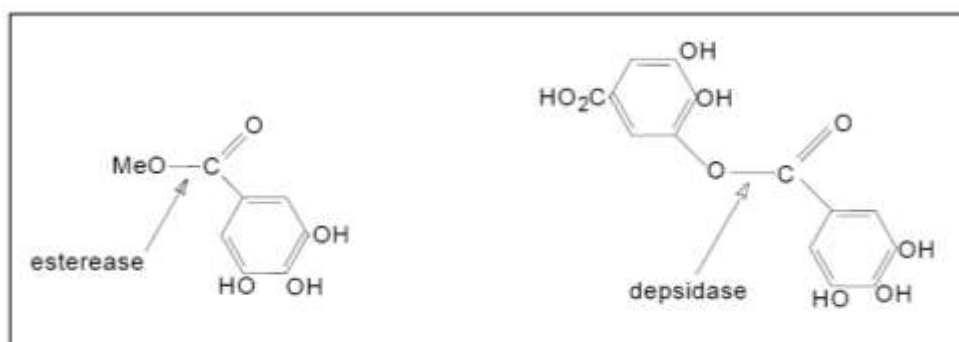
- Não deve haver nenhuma restrição sobre a estrutura do álcool que compõe o substrato éster, embora o ácido deva ser ácido gálico.
- Qualquer hidroxila fenólica pode reagir no sítio de ligação da enzima e impedir a enzima de formar um verdadeiro complexo ES.
- Uma ligação éster ou carboxílica por si só não liga com a enzima, porque compostos ésteres ou carboxílicos não são hidrolisados por enzimas se não tiver hidroxilas fenólicas.

Possuindo uma vasta aplicação no setor industrial, a tanase se destaca na indústria de alimentos, atuando nos extratos de folhas de chá, com a finalidade de reduzir o surgimento de

turbidez em bebidas, devido à presença de taninos. Possui aplicações potenciais, entre as quais a mais importante é a de facilitar e acelerar a biotransformação de catequinas (polifenóis) encontradas no chá, o que pode aumentar a atividade antioxidante desta bebida (LU *et al.*, 2009).

Haslam e Stragroom (1996) identificaram que a tanase é uma glicoproteína que apresenta atividade de esterase e depsidase. Desse modo, a enzima possui atividade esterásica sobre a ligação éster entre o anel aromático e o resíduo de glicose e atividade depsidásica sobre a ligação éster entre os anéis aromáticos (Fig. 3).

Figura 3- Atividade esterásica e depsidásica da tanase.



Fonte: PINTO *et al.*(2005)

O conteúdo de carboidratos desta enzima pode variar de 25,4 a 66,2% do peso total. O papel exato desses carboidratos não é conhecido, suspeita-se que seja uma maneira de proteger o núcleo protéico da ação desnaturante dos taninos hidrolisáveis e de direcionar o substrato ao centro ativo da enzima para possibilitar a quebra desse em seus respectivos componentes, glicose e ácido gálico, neste caso utilizando o ácido tânico como substrato. A tanase apresenta ponto isoelétrico entre 4,0 e 4,5 e peso molecular entre 186 e 300 kDa (AGUILAR e GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, 2001).

A atividade enzimática é função direta das estruturas terciária e quaternária da enzima. Todo tratamento que modifique negativamente a conformação da enzima como aquecimento, alteração do pH do meio e outros modifica também a estrutura do sítio ativo diminuindo suas propriedades catalíticas (CHANG *et al.*, 2006).

A estabilidade da tanase em diferentes valores de pH pode variar entre faixas estreitas (5,0 a 5,5) e amplas (3,5 a 8,0), dependendo da fonte de obtenção da enzima. Em geral apresenta pH ótimo em torno de 5,5. As tanases produzidas por *Aspergillus flavus* IFO 5839, *A. niger* AN11 e *Penicillium chrysogenum* enquadraram-se em faixas bem mais estreitas 5,0 a 5,5; 5,0 a 6,5 e 4,5 a 6,0, respectivamente (GOVINDARAJAN *et al.*, 2016).

A temperatura ótima para atividade da tanase ocorre, em geral, próxima a 30°C e 40°C (CHANG et al., 2006). A estabilidade térmica da tanase ocorre basicamente entre 10°C e 45°C (AGUILAR e GUITIÉRREZ-SÁNCHEZ 2001). Hui et al., (2015) apresentaram a tanase de *Aspergillus niger* ativa e estável em uma ampla faixa de pH (3,0 e 7,0) e temperatura (40°C e 60°C), permitindo a transformação eficiente das catequinas presentes no chá a uma baixa temperatura e sob a condição de pH.

3.3 APLICAÇÕES DA TANASE

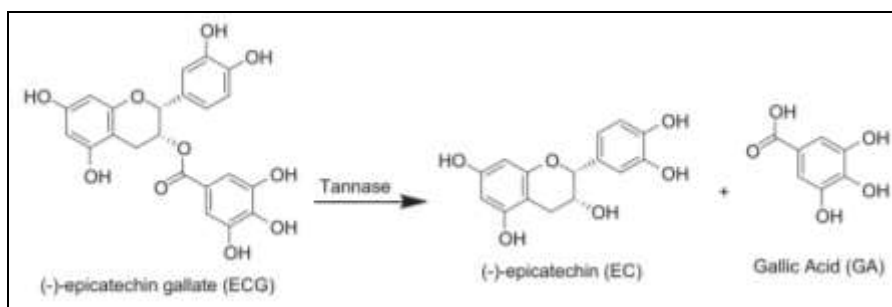
A aplicação industrial da tanase é bastante diversa, atuando nas indústrias de alimentos, na produção de antioxidantes; de bebidas; na indústria de ração animal, removendo compostos indesejáveis e assim promovendo o aumento da digestibilidade e favorecendo a assimilação de certos nutrientes; bem como no tratamento de efluentes de curtumes que apresentam altas quantidades de polifenóis (MELO *et al.*, 2005).

3.3.1 Bebidas

Uma das principais aplicações industriais da tanase é o emprego desta no processamento de chá instantâneo, a fim de eliminar complexos insolúveis indesejados, conhecidos como “creme de chá”, resultados da polimerização de polifenóis (taninos) e da interação de cafeína e proteínas com tais componentes. Fenômeno este que ocorre quando a bebida é mantida a baixas temperaturas (WU *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2017). A utilização da tanase evita o emprego de substâncias químicas para a eliminação do creme, garantindo um produto final de excelente qualidade, solúvel em água e caracterizado pelo alto conteúdo de componentes aromáticos e coloração apropriada (SANDERSON *et al.*, 1974; WU *et al.*, 2016).

A biotransformação mediada pela tanase em extratos de chá causa mudanças previsíveis na composição polifenólica. A Figura 4 mostra o processo de desesterificação de um dos compostos fenólicos (epicatequina galato) presentes no chá pela tanase durante a fabricação desta bebida.

Figura 4- Desesterificação de compostos fenólicos (ECG) pela tanase.



Fonte: Ong e Annuar (2017)

Já na indústria de cervejas, em cuja composição há compostos fenólicos, a tanase pode ser utilizada para reduzir a formação da turbidez. Quando armazenada, a cerveja pode apresentar turbidez, neste caso a enzima atuará quebrando os polifenóis presentes no malte (JANA *et al.*, 2014). A tanase também é utilizada como agente clarificador em alguns sucos de frutas e em bebidas à base de café (SHARMA *et al.*, 2015).

De forma similar, esta enzima é aplicada na estabilização de vinhos, removendo substâncias fenólicas, bem como tratando suco de uva, atuando na ruptura dos compostos fenólicos. A enzima hidrolisa o ácido clorogênico a ácido caféico e ácido quínico, o que influencia favoravelmente o sabor (LEKHA e LONSANE, 1997; JANA *et al.*, 2014).

3.3.2. Ração animal

Os taninos presentes nas rações animais apresentam efeitos antinutricionais, uma vez que se complexam com proteínas endógenas e da dieta, além de interferir na absorção de íons e alterar a excreção de certos cátions. Eles estão presentes em várias plantas utilizadas como ração animal como por exemplo, o sorgo (REDONDO *et al.*, 2014). De acordo com Aguilar e Gutiérrez-Sanchez (2001), a indústria de ração animal pode utilizar a tanase na produção de ração que contenha elevado teor de tanino, sobretudo quando se trata de ração para animais jovens, reduzindo assim a quantidade desses compostos. Neste contexto, tal enzima atuará quebrando taninos, aumentando a digestibilidade e consequentemente a assimilação de nutrientes contidos nos produtos constituintes que o animal, por imaturidade, não conseguiria digerir completamente (REDONDO *et al.*, 2014).

3.3.3 Efluente de curtume

Outra aplicação bastante promissora para esta enzima se refere ao tratamento de efluentes de curtumes. Neste processo, o couro é tratado com diferentes produtos, entre eles os taninos vegetais. O descarte proveniente das diferentes operações deste tipo de indústria contém altas concentrações de polifenóis e são considerados poluentes perigosos (CASSANO *et al.*, 2001). Por esta razão, a utilização da tanase representa um modelo de tratamento de baixo custo e bastante efetivo na remoção dos taninos presentes nestes efluentes (LEKHA e LONSANE, 1997; AGUILAR *et al.*, 2007).

3.3.4 Produção de ácido gálico

Outra relevante aplicação para tanases está na produção de ácido gálico e propilgalato (PG), utilizados como antioxidante em alimentos, cosméticos, produtos de cabelo, adesivos e na indústria de lubrificantes (SHARMA e MUNISHWAR, 2003; SHETE e CHITANAND, 2015; SHARMA *et al.*, 2017).

3.4 TANINOS

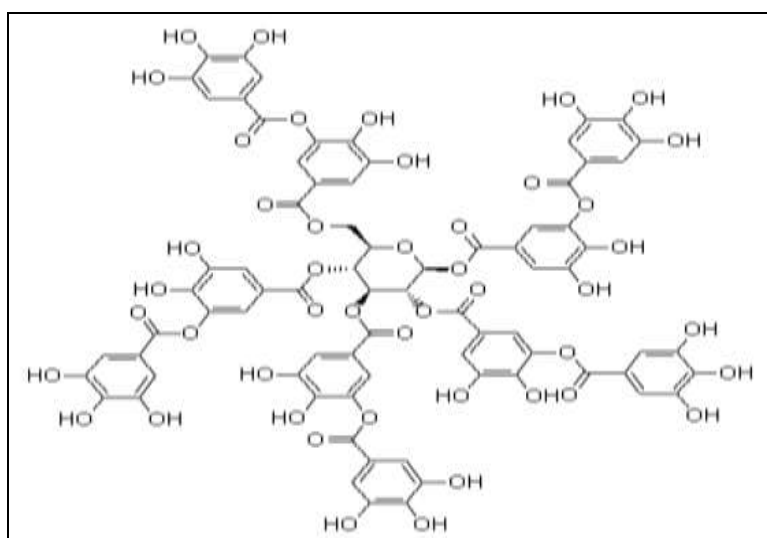
Lekha e Lonsane (LEKHA e LONSANE, 1997) definem taninos como sendo, compostos fenólicos com alto peso molecular (500 a 3000 kDa) que possuem a propriedade de combinar-se com proteínas, celulose e pectina formando um complexo insolúvel. Mais especificamente os taninos são compostos de alto peso molecular, que contêm suficientes grupamentos hidroxila fenólica, para permitir a formação de ligações cruzadas estáveis com proteínas (MUELLER-HARVEY, 2001; OLIVAS-AGUIRRE *et al.*, 2015).

Estes compostos apresentam um amplo valor nas interações entre a planta e seu ecossistema exercendo o papel de inibidores contra fagos de herbívoros ou como agentes antimicrobianos (OLIVAS-AGUIRRE *et al.*, 2015). A maioria dos vegetais é portador de taninos, podendo ser encontrados nas raízes, no lenho, na casca, nas folhas, nos frutos, nas sementes e na seiva. O teor e a espécie de tanino variam, não só de um vegetal para outro como também de uma parte para outra do mesmo vegetal (SANTOS, 2000; LENIN *et al.*, 2015). Tais compostos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais, devido à precipitação de glicoproteínas salivares, o que ocasiona a perda do poder lubrificante (LENIN *et al.*, 2015). A adstringência é a percepção sensorial da presença de

taninos, sendo que tal percepção na boca não ocorre de forma imediata, requerendo um determinado tempo para se desenvolver (BATE-SMITH, 1977; GOLANI *et al.*, 2005).

Os compostos fenólicos compreendem uma ampla gama de substâncias que possuem pelo menos um grupo hidroxila (-OH) em um ou mais anéis fenólicos (Fig. 5). A maioria dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, mas na forma de ésteres ou heterosídeos sendo, portanto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares (CARVALHO *et al.*, 2012). As principais características desses compostos são: a solubilidade em água (exceto os que possuem elevada massa molar); a habilidade de ligar-se a proteínas e formar complexos (na maioria das vezes insolúveis); e a capacidade de combinação com celulose e pectina para formar complexos insolúveis (PINTO, 2003).

Figura 5- Estrutura de um composto fenólico baseado em ácido tânico.



Fonte: LEKHA e LONSANE (1994)

Alimentos e bebidas, principalmente cerveja, chás instantâneos e vinho são ricos em compostos fenólicos. Esses componentes são muito importantes na indústria de alimentos, principalmente pelas influências que apresentam sobre suas características físico-químicas, por formarem precipitados com proteínas e alguns sais, e por estarem sensorialmente ligados à adstringência de certos frutos, além de apresentarem ação antioxidante (PANSEIRA *et al.*, 2003).

A perda da adstringência é a principal mudança que ocorre durante o amadurecimento das frutas comestíveis. Tal fato pode estar associado, ou não, à redução do conteúdo de

taninos. Frutas como caqui (*Diospiros kako*) e o cajú (*Anacardium occidentale*) por vezes são adstringentes mesmo quando maduros (HASLAM e LILLEY, 1988; PINTO, 2003).

Os taninos podem ser aplicados no curtimento do couro, em função da sua capacidade de se combinar com proteínas da pele animal, em especial com a proteína do colágeno que irá inibir o processo de putrefação da pele. Porém, muitas vezes, o descarte industrial (resíduos de curtume) é realizado de forma inadequada, contaminando o meio e atingindo animais e vegetais, uma vez que os resíduos dessas indústrias são tóxicos. Assim, sugere-se a aplicação da tanase para hidrolisar os taninos liberados e gerar produtos menos tóxicos (PEROVANO FILHO *et al.*, 2011).

Por fim, apesar de as enzimas solúveis serem excelentes catalisadores, a aplicação industrial das mesmas pode ser limitada em razão de alguns fatores já citados. Além disso, separar a enzima solúvel do produto final é um processo de elevado custo. A tanase, por exemplo, apresenta muitas aplicações industriais, mas poucas são efetivamente empregadas devido ao valor elevado das variáveis que participam na produção da enzima. Desta forma, a imobilização de enzimas pode minimizar ou até mesmo eliminar o alto custo e os problemas encontrados com as enzimas livres. Podendo superar essas limitações, a imobilização de enzimas apresenta como principal vantagem o reuso da biomolécula e a estabilização da mesma (SHARMA *et al.*, 2017).

3.5 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Segundo Chibata (1978), enzimas imobilizadas são definidas como enzimas que estão fisicamente confinadas ou localizadas numa certa região do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas e que podem ser utilizadas de forma contínua e/ou repetidas vezes. Em termos de processos enzimáticos, a imobilização dos biocatalisadores traz vantagens como: aumento da estabilidade, do nível de controle do processo, do rendimento e da pureza do produto final; além de possibilitar o uso de reatores de diferentes configurações (CHIBATA e TOSA, 1978).

A imobilização de biomoléculas consiste em um método pelo qual elas podem ser fisicamente ou quimicamente aprisionadas em um suporte insolúvel em água, porém as suas funções biológicas são mantidas e assim podem ser utilizadas repetidamente e continuamente, vantagem apresentada quando comparadas às biomoléculas solúveis. Em geral, a imobilização oferece uma série de vantagens, incluindo: possibilidade de uso da enzima por um maior período de tempo; possibilidade de operação em modo contínuo, com maior controle do

processo; facilidade de separação do produto final e de interrupção da reação pela simples remoção da enzima, caso o processo seja em batelada, ou ajuste do tempo de residência em reatores contínuos. Além disso, em alguns casos, ocorre modificação favorável das propriedades catalíticas da enzima, conferindo maior estabilidade frente às condições adversas da reação, como faixas extremas de pH, temperatura e solventes (KLEIN *et al.*, 2013; LIESE e HILTERHAUS, 2013; ASGHER *et al.*, 2014). Dessa forma, a utilização da biomolécula imobilizada torna-se economicamente viável e de grande interesse industrial. Além disso, a imobilização em matrizes inorgânicas combina a alta seletividade das reações às particularidades químicas e físicas do suporte (ASGHER *et al.*, 2014).

Os processos de imobilização têm aplicações analíticas, em biotecnologia e na área médica em geral (BICKERSTAFF, 1997). A técnica da imobilização de um material biológico (enzimas, células e organelas) é interessante, pois substitui a utilização destes materiais na forma solúvel, evitando a necessidade de removê-los do meio da reação para posterior aplicação. Assim, a imobilização permite redução de custos, aumento na rapidez de transformação e exatidão do processo (BICKERSTAFF, 1997).

Alguns autores (D'SOUZA, 2002; ILLANES *et al.*, 2012; TAVANO *et al.*, 2013) têm reportado que algumas propriedades do material devem ser observadas na escolha da matriz de imobilização, tais como: características físicas (área de superfície, não compressibilidade, resistência, grau de porosidade), químicas (inércia, grupos funcionais passíveis de modificação), estabilidade (mecânica e de estocagem), aspectos econômicos (custo – benefício, impacto ambiental, equipamentos e reagentes requeridos) e reações (limitações de transferência de massa, de substância, de cofatores e de produtos).

Quando uma enzima é imobilizada, algumas de suas características podem alterar-se (MATEO *et al.*, 2000), entre elas:

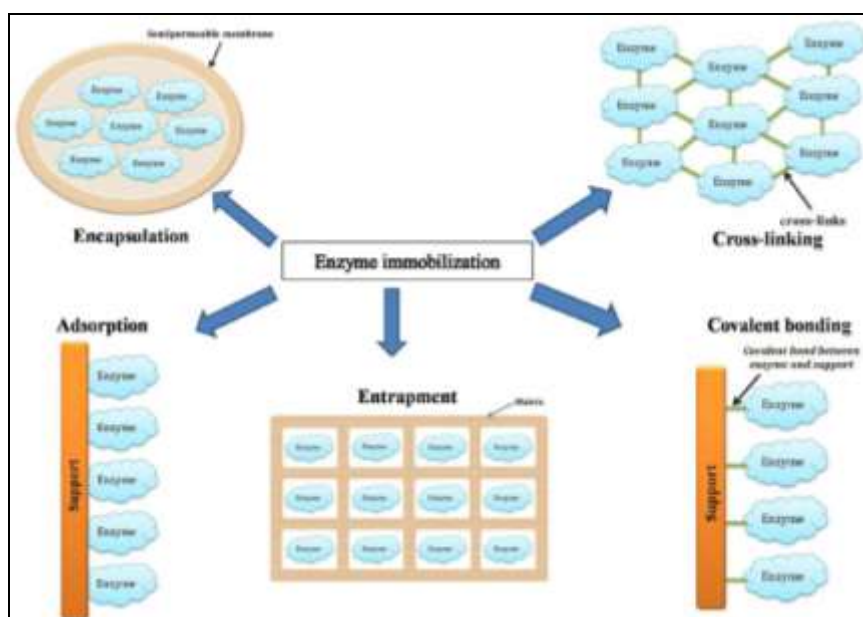
- Estabilidade térmica: a velocidade de desnaturação de uma enzima imobilizada é menor do que de uma livre. A imobilização restringe os movimentos da enzima e, portanto, dificulta modificações conformacionais.
- Constante de Michaelis: geralmente há um aumento no valor de K_m devido à modificação na estrutura tridimensional da enzima o que reflete diretamente na queda da atividade catalítica.
- pH: o pH ótimo para a atividade enzimática sofre uma mudança, podendo aumentar a faixa, onde não há perda de atividade da enzima imobilizada, em até uma unidade de pH.

A seleção do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como atividade global do biocatalisador, características de regeneração e inativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização, estabilidade operacional, propriedades hidrodinâmicas e características finais desejadas para a enzima imobilizada (ILLANES *et al.*, 2012).

3.5.1 Métodos de imobilização de enzimas

A conservação da atividade catalítica da enzima depende da escolha do método e do suporte utilizado na imobilização de enzimas. A Figura 6 mostra as metodologias que podem ser utilizadas para imobilizar enzimas, como por exemplo, a encapsulação, a adsorção em materiais insolúveis como resinas de troca iônica, a copolimerização com monômeros, a ligação a uma matriz insolúvel por ligações covalentes, entre outras (ROMAŠKEVIČ *et al.*, 2006; HANEFELD *et al.*, 2009).

Figura 6 - Métodos de imobilização de enzimas.

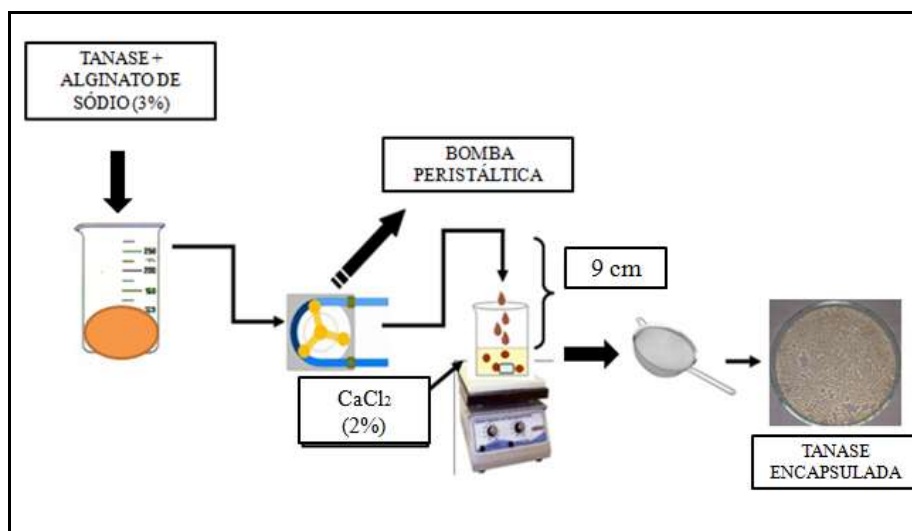


Fonte: SIRISHA *et al.* (2016)

Segundo Fávaro-Trindade *et al.* (2008) a encapsulação é uma técnica que consiste no empacotamento com finas coberturas poliméricas aplicável em materiais sólidos, gotículas de líquidos ou material gasoso. Este procedimento, bastante difundido, envolve a incorporação de ingredientes alimentares, enzimas, células ou outros materiais em pequenas cápsulas (Fig. 7). Proteínas de elevada massa molecular não conseguem entrar ou sair da cápsula, contudo

substratos e produtos de menor massa molecular podem passar pela membrana semipermeável. A encapsulação é uma barreira para evitar reações químicas indesejáveis além de permitir a liberação modificada dos produtos sob velocidade e condições específicas e mascarar odores e sabores desagradáveis (SCHONS *et al.*, 2011).

Figura 7- Esquema do processo de imobilização de tanase por encapsulação.



Fonte: Elaborada pela autora (Adaptação de Schons *et al.*, 2011)

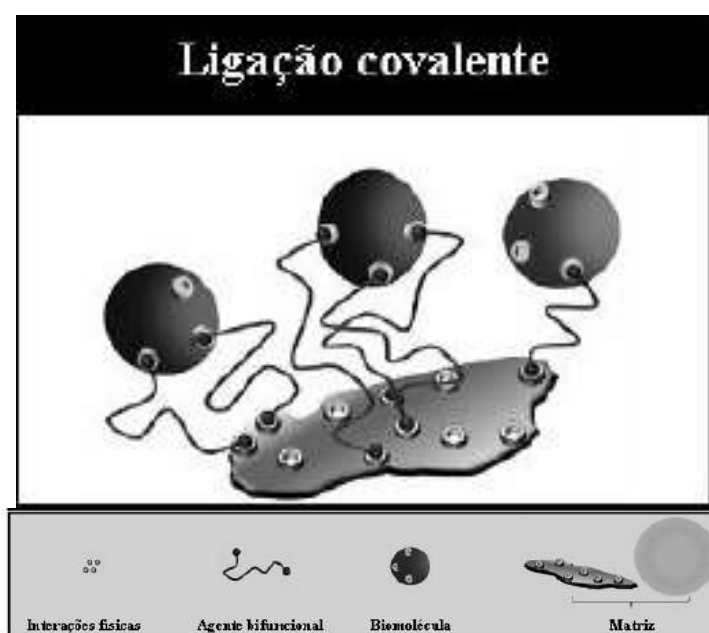
O uso desta metodologia, aplicada desde os anos de 1950, tem aumentado na indústria alimentícia, pois os materiais encapsulados podem ser protegidos do calor, umidade, oxidação, reações químicas ou de outras condições extremas, aumentando a sua estabilidade e mantendo a viabilidade (ROSENBERG *et al.*, 1990; GOUIN, 2004; FÁVARO-TRINDADE *et al.*, 2008).

Mudança de pH, stress mecânico, tempo, temperatura, força osmótica dentre outros, são características que podem ser utilizadas na liberação do ingrediente encapsulado (GOUIN, 2004).

A imobilização de enzimas por ligação covalente depende principalmente da formação da ligação entre a enzima e o material de suporte. A ligação covalente entre a enzima e a matriz ocorre através dos aminoácidos com cadeia lateral provida de grupos funcionais como a histidina, arginina, ácido aspártico, etc. No entanto, a reatividade depende da presença de diferentes grupos funcionais na matriz e na enzima, tais como grupos carboxilo, grupo amino, grupo indol, grupo fenólico, grupo sulfidrílo, grupo tiol, grupo imidazol e grupo hidroxilo (SIRISHA *et al.*, 2016).

Entretanto, poucos suportes contêm esses grupos químicos reativos ou funcionais que permitam o acoplamento direto (suporte-enzima), necessitando, na maioria das vezes, de um processo de funcionalização (por exemplo uma silanização) ou de uma ativação, ou até mesmo dos dois (MELO *et al.*, 2005). Basicamente, dois passos estão envolvidos na ligação covalente entre a enzima e o suporte (Fig 8). No primeiro, o suporte é ativado com o reagente específico e no segundo, a enzima é adicionada para formação da ligação (KENNEDY *et al.*, 1988).

Figura 8- Esquema da imobilização covalente de enzimas.



Fonte: BICKERSTAFF (1997)

Esse tipo de processo apresenta algumas vantagens em relação aos outros existentes na literatura, podemos citar: grande força de ligação, consequente estabilidade do suporte-enzima; alta retenção de sua atividade. Embora a alteração ocorrida na enzima com a ligação ao suporte possa ser favorável, é um método mais complexo (MELO *et al.*, 2005).

As ligações químicas aumentam a rigidez da enzima imobilizada, e podem induzir elevada resistência frente a modificações conformacionais causadas por aquecimento, solventes orgânicos, agentes desnaturantes, entre outros (MENDES *et al.*, 2011). O aumento da estabilidade das enzimas, é ainda umas das principais questões que dificultam a implementação das enzimas como biocatalisadores industriais (LÓPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005).

Esse tipo de ligação pode, ainda, alterar a estrutura conformacional e o sitio ativo da enzima, resultando em uma maior perda da sua atividade catalítica e/ou maior dificuldade

ingresso de seu substrato no sítio ativo. Contudo, ainda pode ser o método mais promissor devido à força de ligação entre a enzima e a matriz ser tão forte que mesmo na presença do substrato ou de soluções de alta força iônica a ligação não é desfeita e a imobilização da molécula continua (MENDES *et al.*, 2011).

3.6 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE TANASE

Segundo Vieira (VIEIRA, 2009) o suporte deve ser quimicamente resistente à etapa de imobilização e às condições em que se processam as reações. Deve ainda possuir grupos químicos que não causem desnaturação na etapa de ligação com a enzima. Muitos estudos de imobilização já foram realizados em tanase utilizando vários suportes, incluindo resinas de permuta iônica (KUMAR *et al.*, 2015; SHARMA *et al.*, 2008), alginato de cálcio (ERZHENG *et al.*, 2010; SRIVASTAVA e KAR, 2010; YAO *et al.*, 2014), quitina (ELTANASH *et al.*, 2011), sepharose (SHARMA *et al.*, 2002), quitosana (ABDEL-NABY *et al.*, 1999) e partículas magnéticas (WU *et al.*, 2016) como está apresentado na tabela 1. Entretanto, suportes com novas características devem ser explorados para obter derivados imobilizados com alta atividade, estabilidade e reutilização sob condições econômicas. Entre os materiais de condições viáveis disponíveis, a terra de diatomáceas magnética e revestida com polianilina recebe interesse devido ao fato de ser um material de fácil acesso e bastante disponível ela também pode ser facilmente separada da solução por um ímã externo e é reciclável (MOTEEVALIZADEH *et al.*, 2015).

Tabela 1- Suportes utilizados como matriz para a imobilização da tanase.

Suporte	Referências
Resinas de Permuta Iônica	KUMAR <i>et al.</i> , 2015; SHARMA <i>et al.</i> , 2008
Quitina	ELTANASH <i>et al.</i> , 2011
Sepharose	SHARMA <i>et al.</i> , 2002; GONÇALVES <i>et al.</i> , 2013; CURIEL <i>et al.</i> , 2010
Quitosano	ABDEL-NABY <i>et al.</i> , 1999
Alginato de Cálcio	ERZHENG <i>et al.</i> , 2010; SRIVASTAVA E KAR, 2010; FLORES-MALTOS <i>et al.</i> , 2011; SCHONS <i>et al.</i> , 2011; ELTANASH <i>et al.</i> , 2011; HE <i>et al.</i> , 2013; YAO <i>et al.</i> , 2014; JANA <i>et al.</i> , 2015; ROBERTO <i>et al.</i> , 2016; CHAITANYAKUMAR e ANBALAGAN, 2016
Alginato revestido com quitosana	BOADI & NEUFELD, 2001
Gelatina	ELTANASH <i>et al.</i> , 2011
Gel de Poliacrilamida	KATWA <i>et al.</i> , 1981
Colágeno	KATWA <i>et al.</i> , 1981
Sílica	MELO <i>et al.</i> , 2005
Amberlite IR	SHARMA <i>et al.</i> , 2008
Partículas magnéticas (carboxyl-functionalized Fe ₃ O ₄ nanoparticles) (CMNPs)	WU <i>et al.</i> , 2016

Fonte: A autora (2018)

No presente trabalho, a terra de diatomáceas magnéticas revestidas com polianilina foi um dos suportes utilizados para a imobilização covalente da tanase, assim como o alginato de sódio foi a matriz para a imobilização pela técnica por encapsulamento.

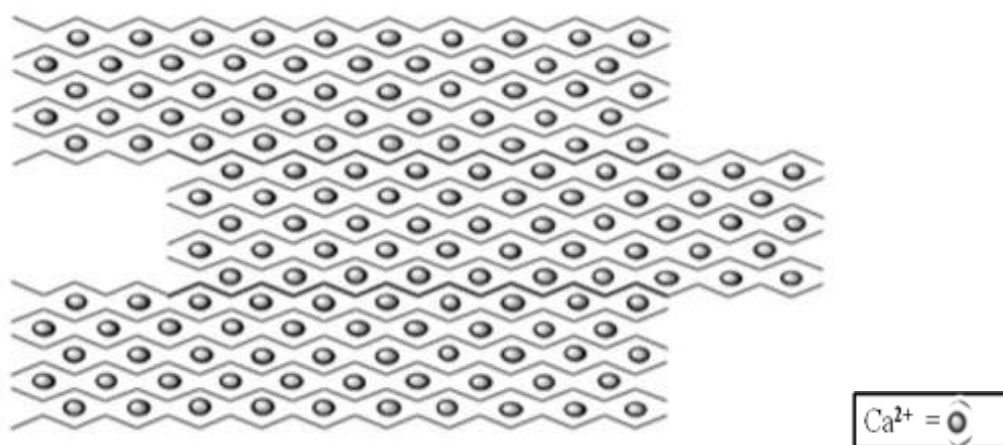
3.6.1 Alginato de cálcio

O alginato (ALG) é um biopolímero aniônico composto de cadeias lineares de ácido α -L-glucurônico e β -D-mannurônico, as quais quando em presença de íons tais como Ca^{2+} formam uma malha de hidrogéis, filmes, esferas, micro- e nanopartículas, com capacidade

para encapsulamento de uma série de substâncias tais como insulina, antifúngicos, enzimas, etc (HAMIDI *et al.*, 2008; FLORES-MALTOS *et al.*, 2011).

A principal aplicação do alginato de sódio é sua habilidade de reagir com cátions polivalentes, especialmente íons cálcio, para produzir géis fortes ou polímeros insolúveis (KING, 1983). A função desses íons é estabelecer ligação entre as cadeias de alginato através de interações iônicas, após terem ocorrido as ligações de hidrogênio entre as mesmas (Fig. 9). Essa estrutura reticulada tridimensional formada tem uma grande capacidade de reter água, formando assim um gel muito estável (ALLEN *et al.*, 1963; SCHONS, 2012).

Figura 9- Formação da rede de gel com cadeias homopoliméricas unidas através dos íons cálcio.



Fonte: SCHONS, 2012.

3.6.2 Terra de diatomáceas magnética revestida com polianilina e ativada com Glutaraldeído

A síntese e a aplicação de partículas magnéticas funcionalizadas têm despertado grande interesse em diferentes áreas (WU *et al.*, 2008; HAO *et al.*, 2010), com principal destaque na área de biotecnologia, uma vez que elas apresentam benefícios sobre a centrifugação, filtração e extração em fase sólida. No caso da extração em fase sólida usando materiais magnéticos, o adsorvente magnético é adicionado à solução ou à suspensão contendo o analito alvo. Esse analito é, então, adsorvido sobre o adsorvente magnético; capturado e recuperado da suspensão usando um separador magnético apropriado, sendo, em seguida, eluído do adsorvente e analisado (CHEN *et al.*, 2014; TÜZMEN *et al.*, 2012). Esses sólidos magnéticos são amplamente usados em sistemas de detecção e analítico, pois oferecem algumas vantagens quando comparados aos sólidos similares que não possuem propriedades magnéticas. Tais sólidos podem ser usados na pré-concentração de analitos, na

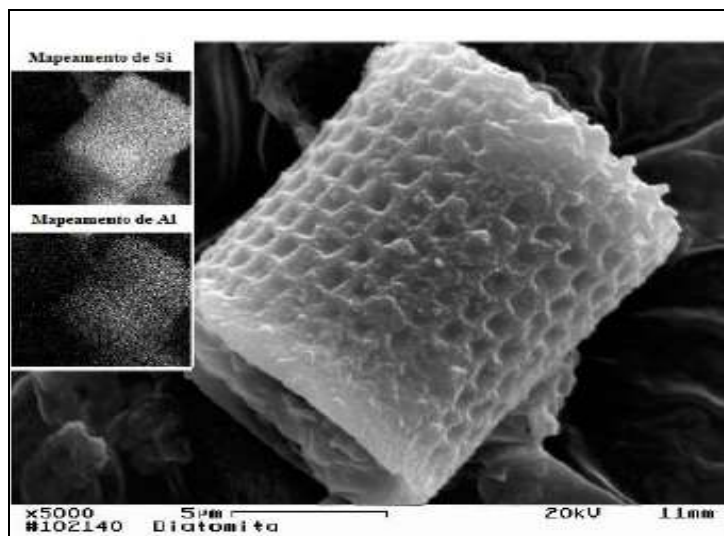
separação magnética, na identificação molecular de biomoléculas, de compostos orgânicos e inorgânicos (AGUILAR-ARTEAGA *et al.*, 2010; NERI *et al.*, 2011; CABRERA *et al.*, 2017).

Na indústria a opção de suporte mais viável para imobilizar enzimas é a utilização de materiais magnéticos, por exemplo, a aplicação de nanopartículas de óxido de ferro (VAN GERPEN *et al.*, 2004; SORIANO *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2003). O uso deste suporte reduz o custo da operação, as nanopartículas magnéticas podem ser separadas das reações do sistema e estabilizadas em um fluido aplicando um campo magnético externo. Partículas magnéticas, como a magnetita (Fe_3O_4) e a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), apresentam excelentes características como suporte para a imobilização de biomoléculas. A elevada área de superfície e a alta transferência de massa são algumas das características que favorecem o processo de imobilização de enzimas visando a rápida separação entre suporte e produtos da reação, em especial a imobilização de aminopeptidase, lipase, lisozima, pectinase, fosfatase, glicose-oxidase, glicosidade, celulase, hidrolase, esterase, polimerase, tanase, entre outras (GUO e SUN, 2004).

Assim como os óxidos de ferro (magnetita), a terra de diatomáceas é um material inorgânico presente na natureza. O diatomito ou terra de diatomáceas (TD) é uma rocha sedimentar originada a partir de frústulas ou carapaças silicosas de diatomáceas (algas marinhas microscópicas). Quando a alga morre, todo o conteúdo orgânico se destrói, e seu esqueleto de sílica se deposita no fundo das águas, para formar ao longo dos séculos grandes depósitos de algas fossilizadas comumente conhecidas como diatomito (CAMPOS e SANTOS, 1984).

O diatomito ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) é um material inerte, não tóxico, de baixa massa específica aparente, com uma estrutura altamente porosa e elevada área de superfície, com carga elétrica negativa, que contém grupos silanóis ($-\text{Si}-\text{OH}$), os quais podem reagir com grupos funcionais polares (BAKR, 2010). Estas características tornam a terra de diatomáceas um suporte ideal para imobilização de biomoléculas (Fig. 10) (BAKR, 2010; CABRERA *et al.*, 2017).

Figura 10- Frústula íntegra de diatomácea. Mapeamento de Al e Si por EDS.



Fonte: SOUZA *et al.*, 2003.

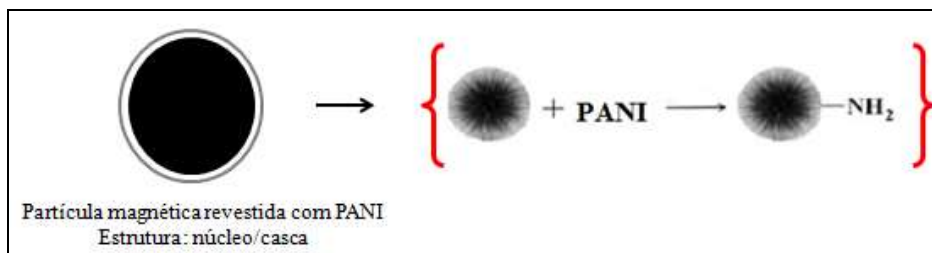
Cabrera *et al.*, (2017) mostraram que a terra diatomácea magnetizada demonstrou ser uma matriz promissora para imobilização de invertase por ligação covalente e assim, podendo ser usada para imobilização e purificação de outras enzimas de interesse industrial para aplicação biotecnológica, como a tanase.

O mecanismo de atuação das partículas magnéticas está relacionado com a área de superfície, uma aglomeração das mesmas inibe este mecanismo. As aglomerações acontecem devido à presença de forças de Van der Waals e da energia de superfície. Estas forças existentes no aglomerado podem ser eliminadas através de processos físicos como o cisalhamento, ou químicos, que envolvem a adição de surfactantes ou funcionalização da superfície (MAITY e AGRAWAL, 2007).

A polianilina (PANI) é um dos polímeros condutores mais estudados no revestimento de suportes para imobilização de enzimas devido a suas propriedades eletrônica e óptica; excelente estabilidade ambiental (JORDAN *et al.*, 2011; JARAMILLO-TABARES *et al.*, 2012); fácil polimerização por síntese química (NERI *et al.*, 2011), eletroquímica (TAKASHIMA *et al.*, 1995), fotoquímica (ARAÚJO *et al.*, 2010); e baixo custo do monômero (UMARE *et al.*, 2010).

O uso da PANI para revestir a superfície das partículas magnéticas, disponibiliza grupamentos amina ($-NH_2$) na superfície do suporte, formando uma estrutura “núcleo/casca” (Fig. 11).

Figura 11- Representação esquemática do suporte magnético revestido com PANI e sua estrutura “Núcleo/Casca”.



Fonte: Elaborado pela autora

A preservação das propriedades estruturais e funcionais das enzimas imobilizadas é muito importante, o que pode ser desempenhado por um agente de reticulação. Para aumentar a estabilidade operacional da tanase em suportes sólidos magnéticos e consequentemente a sua eficiência de imobilização, é necessária a realização da ativação das partículas magnéticas por agentes de reticulação. O glutaraldeído é um desses agentes, devido à sua solubilidade em solventes aquosos e por poder formar ligações covalentes inter- e intra subunidades estáveis, ele é popularmente utilizado como reticulante bifuncional (SIRISHA *et al.*, 2016).

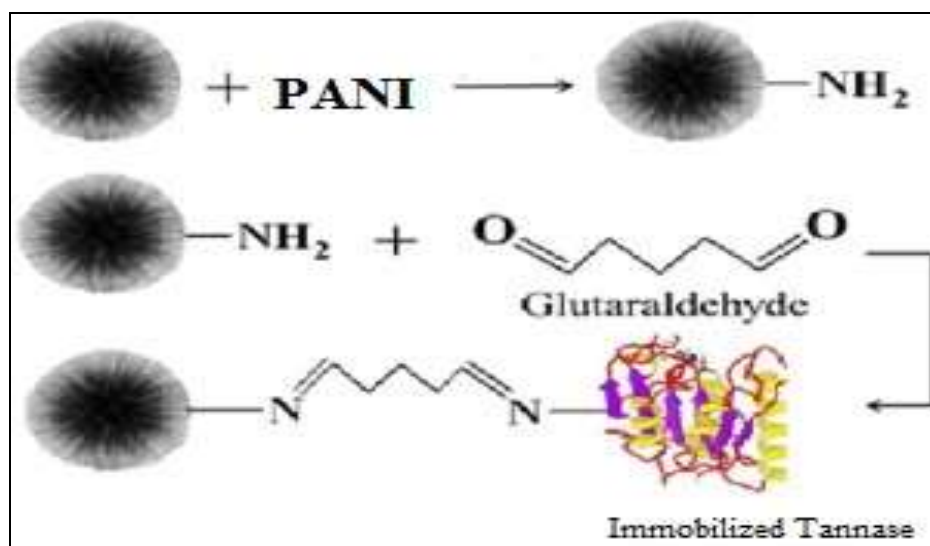
Suportes ativados com epóxi, por exemplo, são muito estáveis em meio aquoso e formam ligações covalentes a temperatura ambiente com grupos funcionais da enzima, tais como, amina ($-NH_2$), tiol ($R-SH$), e fenol (C_6H_5O). Além disso, os grupos epóxi podem ser facilmente incorporados a outros grupos funcionais por copolimerização de monômeros que possuem grupos reativos (DENG *et al.*, 2003). No entanto, a melhor alternativa é a utilização de glutaraldeído (GA) para ativação de suportes, pois melhora a estabilidade da enzima sem promover alterações consideráveis na sua atividade, além de possuir baixo custo e poder ser facilmente encontrado em grandes quantidades (YESILOGLU, 2005).

O glutaraldeído tem encontrado ampla aplicação no processo de imobilização enzimática (covalente ou cruzada) em suportes sólidos para biossensores, tanto em reatores enzimáticos, como em cromatografia por bioafinidade e em pesquisa de imunossensores (YESILOGLU, 2005; SIRISHA *et al.*, 2016).

A efetividade da imobilização com glutaraldeído depende diretamente das condições experimentais em que tal procedimento é aplicado, devido a multiplicidade das estruturas químicas possíveis em cada situação. Diferentes publicações têm mostrado que soluções aquosas de glutaraldeído (25% ou 70%) representam misturas de multicomponentes. O pH desta solução é de aproximadamente 3,1 e pode ser explicado já que alguns dos grupos aldeídos são parcialmente oxidados a seus ácidos carboxílicos correspondentes, daí a redução do pH da solução (BARBOSA *et al.*, 2012).

Neste trabalho, após o revestimento do suporte com a PANI, o glutaraldeído foi utilizado como agente de ligação do suporte com a enzima (Fig. 12).

Figura 12- Etapas da imobilização da tanase através da ligação covalente utilizando a PANI como revestimento do suporte e o glutaraldeído como agente de ligação.

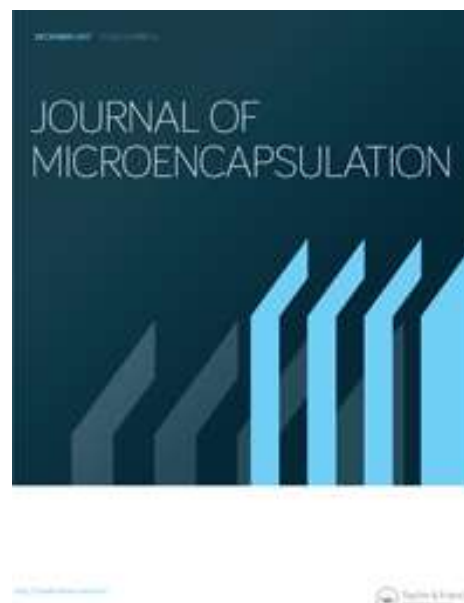


Fonte: A autora (2018)

São escassos os trabalhos que mostram a aplicação da tanase imobilizada na indústria de bebidas (SRIVASTAVA e KAR, 2010; YAO *et al.*, 2014; JANA *et al.*, 2015; ROBERTO *et al.*, 2016). Devido à carência científica, é de fundamental importância a existência de trabalhos voltados para a aplicação da tanase imobilizada direcionada a indústria de bebidas, com destaque, de chás, visando a minimização dos custos e o melhoramento do produto.

4 RESULTADOS

4.1- A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO *JOURNAL OF MICROENCAPSULATION*



Título: Hydrolysis of tannins by encapsulated tannase: biochemical characterization and phenolic compound determination

Autores: Juliana Silva de Lima, Mariana Paola Cabrera, Alessandro Alberto Casazza, Attilio Converti, Luiz Bezerra Carvalho Jr.

Fator de impacto: 1.543 (2016)

Hydrolysis of tannins by encapsulated tannase: biochemical characterization and phenolic compound determination

Juliana Silva de Lima¹; Mariana Paola Cabrera¹; Alessandro Alberto Casazza²; Attilio Converti²; Luiz Bezerra de Carvalho Jr^{1,3}

¹ Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil. e-mail: lbcj.br@gmail.com

² Department of Civil, Chemical and Environmental Engineering, University of Genova, Genova, Italy

³ Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

ABSTRACT

Tannase (tannin acylhydrolase, E.C.3.1.1.20) is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of ester and depside linkages in hydrolysable tannins such as tannic acid to release gallic acid and glucose. They have several applications commercial in food industry, for example to production of gallic acid, reduce the level of tannins in fruit juices, and preparation of instantaneous tea. This study aimed to immobilize the tannase on suitable carrier and its subsequent applicability in tea boldo (*Peumus boldus*). Tannase was immobilized on calcium alginate bead by encapsulation technique with 75% efficiency. The immobilized enzyme was applied for determination of catechins after their application in Boldo tea. Thermal and pH stabilities of immobilized tannase increased as compared with free tannase. The storage stability and reuse of the immobilized enzyme were also improved significantly and retaining 60% activity after storing 90 days at 4°C presenting residual activity after 6 cycles of repeated use. Immobilized tannase was applied in boldo tea to investigate its astringent property. Enzymatic treatment removed 31% tannin from boldo tea after incubation of 120 min at 40°C. The tannase mediated the biotransformation of tea extracts causing predictable changes in polyphenolic composition (an increase of gallic acid, catechin and flavonoid glucoside). Other qualitative indicator was the reduction of color, clarity and pH, whereas, flavonoid (455.50 µg/ml) and antioxidant activity (42.8 %) were increased in clarified boldo tea.

KEYWORDS

Boldo Tea; Calcium alginate; Enzyme; Immobilization.

5 CONCLUSÕES

A tanase imobilizada covalentemente em terra diatomácea magnética revestida com polianilina (mDE-PANI-TANASE) mostrou 41% de atividade residual. O perfil de pH para a enzima imobilizada não mostrou diferença em relação a enzima livre, enquanto o perfil da temperatura indicou sua termostabilidade.

O K_m mostrou que a tanase imobilizada tem uma maior afinidade de ligação com o substrato do que a tanase livre. A mDE-PANI-TANNASE após dez reutilizações manteve 66% de sua atividade inicial e quando armazenada por 90 dias a 4 °C conservou 71% de sua atividade inicial.

A tanase imobilizada em mDE-PANI mostrou melhor desempenho que a enzima livre para hidrolisar os taninos do chá de boldo. Após 120 minutos teor destes compostos foi reduzido em 25% no chá.

A enzima encapsulada em alginato de cálcio mostrou um aumento de pH ótimo (5,0 para 6,0) e uma diminuição de 10 graus da temperatura ótima. Após a imobilização foi conservado 75% da atividade específica residual.

Após a reutilização da enzima encapsulada por 6 ciclos a atividade residual foi retida em 50% e após um período de 105 dias de estocagem a 4 °C foi conservada a sua atividade em mais de 55%.

Quando aplicada no chá de boldo, a enzima encapsulada foi responsável pela redução de 31% dos taninos além de um aumento de catequinas, ácido gálico e flavonóide glicoside melhorando assim o teor nutricional do chá.

Portanto, os resultados obtidos demonstram que a tanase tanto imobilizada em terra diatomácea magnética revestida com polianilina como encapsulada em alginato de cálcio pode ser utilizadas com resultados promissores para reduzir o conteúdo de taninos no chá de boldo, além de aumentar os níveis de catequinas, ácido gálico e flavonóide glicoside, melhorando o valor nutricional da bebida testada.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-NABY, M. A.; SHERIF, A. A.; EL-TANASH, A. B.; MANKARIOS, A. T. Immobilization of *Aspergillus oryzae* tannase and properties of the immobilized enzyme. **Journal of Applied Microbiology**, 87, 108–114. 1999.
- ADRIO, J. L.; DEMAINE, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, 4, 117-139, 2014.
- ASCHERI, D. P. R.; MARQUEZ, M. O. M.; MARCUCCI, E. T. Microencapsulação de Óleo Essencial de Laranja: Seleção de Material de Parede. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 23, 1-6, 2003.
- AGUILAR-ARTEAGA, K.; RODRIGUEZ, J.A.; BARRADO, E. Magnetic solids in analytical chemistry: a review. **Analytica Chimica Acta**, 674, 157–165, 2010.
- AGUILAR, C.N.; GUITIÉRREZ-SÁNCHEZ, G. Review: sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. **Food Science and Technology International**, 5, 373-382, 2001.
- ALLEN, L.; NELSON, A I.; STEINBERG, M. P.; MCGILL, J. N. Edible corn carbohydrate food coatings. I. Development and physical testing of a starch-alginate coating. **Food Technology**, 17, 1437, 1963.
- ARAÚJO, A.C.V.; OLIVEIRA, R. J.; ALVES JUNIOR, S.; RODRIGUES, A. R.; MACHADO, F. L. A.; CABRAL, F. A. O.; AZEVEDO, W. M. Synthesis, characterization and magnetic properties of polyaniline-magnetite nanocomposites. **Synthetic Metals**, 160, 685–690, 2010.
- ASGHER, M.; SHAHID, M.; KAMAL, S.; LQBAL, H. M. N. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 101, 56-66, 2014.
- BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. **Process Biochemistry**, 47, 8, 1220-1227, 2012.
- BAKR, H. E. G. M. M. Diatomite: Its characterization, modifications and applications. **Asian Journal of Materials Science**, 2, 121-136, 2010.
- BATE-SMITH, E.C. Astringent tannins of Acer species. **Phytochemistry**, 16, p. 1421- 1426, 1977.
- BICKERSTAFF, G. F. (Ed.) **Immobilization of enzymes and cells**. New Jersey: Humana, p. 367. 1997.
- BOADI, D.K.; NEUFELD, R.J. Encapsulation of tannase for the hydrolysis of tea tannins. **Enzyme and Microbial Technology**, 28, 590–595. 2001.

BOTREL, D. A.; BORGES, S. V.; FERNANDES, R. V. B.; VIANA, A. D.; COSTA, J. M. G.; MARQUES, G. R. Evaluation of spray drying conditions on properties of microencapsulated oregano essential oil. **International Journal of Food Science and Technology**, 47, 11, 2289–2296, 2012.

BRÍGIDA, A. I. S. **Imobilização de lipases utilizando fibras de casca de coco verde como suporte para aplicações industriais**. 193 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

BÜRKI, K.; JEON, I.; ARPAGAUSS, C.; BETZ, G. New insights into respirable protein powder preparation using a nano spray dryer. **Pharmaceutical Nanotechnology**, 408, 248 – 256, 2011.

CABRERA, M. P.; MACIEL, J. C.; QUISPE-MARCATOMA, J.; PANDEY, B.; NERI, D. F. M.; SORIA, F.; BAGGIO-SAITOVITCH, E.; CARVALHO JR, L. B. Magnetic composites from minerals: study of the iron phases in clay and diatomite using Mössbauer spectroscopy, magnetic measurements and XRD. **Hyperfine Interact**, 224, 197–204. 2014.

CABRERA, M. P.; ASSIS, C. R. D.; NERI, D. F. M.; PEREIRA, C. F.; SORIA, F.; CARVALHO JR., L. B. C. High sucrolytic activity by invertase immobilized onto magnetic diatomaceous earth nanoparticles. **Biotechnology Reports**, 14, 38-46, 2017.

CAMPOS, T.W.; SANTOS, H.S. Estudos de amostras de diatomitos de uso industrial (norte-americana e francesa) por microscopia eletrônica de transmissão e varredura. **Cerâmica**, 30, 347-356. 1984.

CARVALHO, M. L.; SILVA, B. R.; SILVA, M. M.; CARCARÁ, K. A. V.; AMORIM, R. R. Estudo comparativo entre a quantidade de fenólicos totais presentes em folhas e cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. 2012. Disponível em: <http://propi.ifto.edu.br/ocs/index.php/connepi/vii/paper/viewFile/3748/3028>. Acesso em: 20/11/2016.

CASSANO, A.; MOLINARI, R.; ROMANO, M.; DRIOLI, E. Treatment of aqueous effluents of the leather industry by membrane processes: a review. **Journal of Membrane Science**, 181, 111-126, 2001.

CHAITANYAKUMAR, A.; ANBALAGAN, M. Expression, purification and immobilization of tannase from *Staphylococcus lugdunensis* MTCC 3614. **AMB Express**, 6:89, 1- 9, 2016.

CHANG, F.; CHEN, P.; CHEN, R. L. C.; LU, F.; CHENG, T. Real-time assay of immobilized tannase with a stopped-flow conductometric device. **Bioelectrochemistry**, 69, 113– 116, 2006.

CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M.; RODRÍGUEZ-DURÁN, L. V.; BALAGURUSAMY, N.; PRADO-BARRAGÁN, A.; RODRÍGUEZ, R.; CONTRERAS, J. C.; AGUILAR, C. N. Biotechnological advances and challenges of tannase: an overview. **Food and Bioprocess Technology**, 5: 2, 445–459, 2012.

CHIBATA, I. Industrial application of immobilized enzyme systems. **Pure and Applied Chemistry**, 50, 7, 667- 675, 1978.

- CHIBATA, I.; TOSA, T. Immobilization enzymes and immobilized microbial-cells. **Journal of Synthetic Organic Chemistry Japan**, 36, 11, 917-930, 1978.
- CHEN, T.; YANG, W.; GUO, Y.; YUAN, R.; XU, L.; YAN, Y. Enhancing catalytic performance of β -glucosidase via immobilization on metal ions chelated magnetic nanoparticles. **Enzyme and Microbial Technology**, 63, 50–57. 2014.
- CURIEL, J. A.; BENTANCOR, L.; RIVAS, B. L.; MUNOZ, R.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G. Hydrolysis of Tannic Acid Catalyzed by Immobilized-Stabilized Derivatives of Tannase from *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58, 6403–6409, 2010.
- D'SOUZA, S. F.; GODBOLE, S. S. Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine, **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 52, 59-62, 2002.
- DENG, J.; PENG, Y.; HE, C.; LONG, X.; LI, P.; CHAN, A. S. C. Magnetic and conducting Fe_3O_4 -polypyrrole nanoparticles with core-shell structure. **Polymer International**, 52, 1182-1187, 2003.
- DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. **Drying Technology**, 23, 7, 1361- 1394, 2005.
- DESPHANDE, S.S.; CHERYAN, M.; SALUNKHE, D.K. Tannin analysis of foods products. CRC Crit. **Reviews in Food Science and Nutrition**, 24, 401-449, 1986.
- EL-TANASH, A.B.; SHERIEF, A.A.; NOUR, A. Catalytic properties of immobilized tannase produced from *Aspergillus aculeatus* compared with the free enzyme. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 28, 381–391, 2011.
- ERZHENG, S.; TAO, X.; LIPING, G.; QIANYING, D.; ZHENGZHU, Z. Immobilization and characterization of tannase and its haze-removing. **Food Science and Technology International**, 15, 545–552. 2010.
- FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, 11, 2, 103-112, 2008.
- FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, 31, 8, 1008-1825, 2012.
- FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; PALOMO, J. M.; MATEO, C.; BASTIDA, A.; COCA, J.; HARAMBOURE, T.; HERNÁNDEZ-JUSTIZ, O.; TERRENI, M.; GUISÁN, J. M. Biocatalyst engineering exerts a dramatic effect on selectivity of hydrolysis catalyzed by immobilized lipases in aqueous medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 11, 649-656, 2001.
- FLORES-MALTOS, A.; RODRIGUEZ-DURAN, L. V.; RENOVATO, J.; CONTRERAS, J. C.; RODRIGUEZ, R.; AGUILAR, C. N. Catalytical properties of free and immobilized *Aspergillus niger* tannase. **Enzyme Research**, 2011.

FUENTES-GARIBAY, J. A.; AGUILAR, C. N.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; GUERRERO-OLAZARÁN, M.; VIADER-SALVADÓ, J. M. Tannase sequence from a xerophilic *Aspergillus niger* strain and production of the enzyme in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, 57, 439-447, 2015.

GOLANI, G. S.; COCKELL, K. C.; SEPEHR, E. Effects of antinutritional factors on protein digestibility and amino acid availability in foods. **Journal of AOAC International**, 88, 3, 967-987, 2005.

GONÇALVES, H. B.; JORGE, J. A.; PESSELA, B. C.; LORENTE, G. F.; GUISÁN, J. M.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of a tannase from *Emericella nidulans* immobilized on ionic and covalent supports for propyl gallate synthesis. **Biotechnology Letters**, 35, 591–598, 2013.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science and Technology**, 15, 7-8, 330-347, 2004.

GOVINDARAJAN, R. K.; REVATHI, S.; RAMESHKUMAR, N.; KRISHNAN, M.; KAYALVIZHI, N. Microbial tannase: Current perspectives and biotechnological advances. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 6, 168–175, 2016.

GUO, Z.; SUN, Y. Characteristics of immobilized lipase on hydrophobic superparamagnetic microspheres to catalyze esterification. **Biotechnology Progress**, 20, 2, 500-506, 2004.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 60, 1638-1649, 2008.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilization. **Chemical Society Reviews**, 38, 453-468, 2009.

HASLAM, E. **Chemistry of vegetable tannins**. London: Academic Press, 179 p. 1966.

HASLAM, E.; LILLEY, T.H. Natural astringency in foodstuffs – a molecular interpretation. **CRC Crit. Reviews in Food Science and Nutrition**. 27, 1, 1-40, 1988.

HASLAM, E.; STANGROOM, J.E. The esterase and depsidase activities of tannase. **Biochemical Journal**, 99, 28-31, 1966.

HE, S. R.; WU, X. Y.; QIU, S. Y.; HUANG, X.; LI, F. L.; FENG, J. Y. Study on Immobilization of tannase. **Advanced Materials Research**, 781-784, 774-778, 2013.

HELDT, H.W. **Plant biochemistry**. 3rd. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, p. 630, 2005.

HUANG, S. H.; LIAO, M. H.; CHEN, D. H. Direct binding and characterization of lipase onto magnetic nanoparticles. **Biotechnology Progress**, 19, 3, 1095-1100, 2003.

HUI, N.; CHEN, F.; JIANG, Z. D.; CAI, M. Y.; YANG, Y. F.; XIAO, A. F.; CAI, H. N. Biotransformation of tea catechins using *Aspergillus niger* tannase prepared by solid state fermentation on tea byproduct. **Food Science and Technology**, 60, 1206-1213. 2015.

- IIBUCHI, S.; MINODA, Y.; YAMADA, K. Hydrolyzing pathway, substrate specificity and inhibition of tannin acyl hydrolase. **Agricultural and Biological Chemistry**, 36, 1553-1568, 1972.
- ILLANES, A.; CAUERHFF, A.; WILSON, L.; CASTRO, G. R. Recent trends in biocatalysis engineering. **Bioresource Technology**, 115, 48-57, 2012.
- JARAMILLO-TABARES, B.E.; JARAMILO, F.I.; TORRESI, S.I.C. Stabilization of polyaniline by the incorporation of magnetite nanoparticles. **Materials Chemistry and Physics**, 132, 529–533, 2012.
- JANA, A.; HALDER, S. K.; BARNEJEE, A.; PAUL, T.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C.; MOHAPATRA, K. Biosynthesis, structural architecture and biotechnological potential of bacterial tannase: a molecular advancement. **Bioresource Technology**, 157, 327–340. 2014.
- JANA, A.; HALDER, S. K.; GHOSH, K.; PAUL, T.; VÁGVÖLGYI, C.; MONDAL, K. C.; MOHAPATRA, P. K. Tannase Immobilization by Chitin- Alginate Based Adsorption-Entrapment Technique and Its ploitation in Fruit Juice Clarification. **Food and Bioprocess Technology**, 8, 2319. 2015.
- JORDAN J.; KUMAR C.; THEEGALA C. Preparation and characterization of cellulase-bound magnetite nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 68, 139–146, 2011.
- LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. ed. 5 São Paulo: Sarvier, Cap. 9. 1989.
- LI, J.; XIAO, Q.; HUANG, Y.; NI, H.; WU, C.; XIAO, A. Tannase application in secondary enzymatic processing of inferior Tieguanyin oolong tea. **Electronic Journal of Biotechnology**, 28, 87–94, 2017.
- KATWA, L. C.; RAMAKRISHNA, M.; RAGHAVENDRA RAO, M. R. Spectrophotometric assay of immobilized tannase. **Journal of Biosciences**, 3, 2, 135-142. 1981.
- KAWAGUTI, H. Y., MANRICH, E., & SATO, H. H. Production of isomaltulose using *Erwinia* sp. D12 cells: Culture medium optimization and cell immobilization in alginate. **Biochemical Engineering Journal**, 29, 270–277. 2006.
- KENNEDY, J. F.; WHITE, C. A.; MELO, E. H. M. The immobilization of enzymes and cells. **Chimicaoggo**, 21-29, 1988.
- KIM, M. I.; HAM, H. O.; OH, S.; PARK, H. G.; CHANG, H. N.; CHOI, S. Immobilization of *Mucor javanicus* lipase on effectively functionalized silica nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 39, 62-68, 2006.
- KING, A. H. Brown seaweed extracts (Alginates). **Food Hydrocolloids**, 2, 115-188, 1983.
- KLEIN, M. P.; FALLAVENA, L. P.; SCHÖFFER, J. N.; AYUB, M. A. Z.; RODRIGUES, R. C.; NINOW, J. L.; HERTZ, P. F. High stability of immobilized β -d-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. **Carbohydrate Polymers**, 95, 465-470, 2013.

KUMAR, S.; BENIWAL, V.; KUMAR, N.; KUMAR, A.; CHHOKAR, V.; KHATED, T. P. Biochemical characterization of immobilized tannase from *Aspergillus awamori*. *Biocatal. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, 398–403, 2015.

LARA-VICTORIANO, F.; VEANA, F.; HERNÁNDEZ-CASTILLO, F. D.; AGUILAR, C. N.; REYES-VALDÉS, M. H.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R. Variability among strains of *Aspergillus* section *Nigri* with capacity to degrade tannic acid isolated from extreme environments. *Archives of Microbiology*, 199, 77–84, 2017.

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*, 29, 6, 497-503, 1994.

LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Production and application of Tannic Acyl Hydrolase: State of the art. *Advances in Microbiology*, 44, 1997.

LENIN, K. B.; LOKESWARI, N.; SRI, R. R. D. Separation and optimization of phenolic component from *Anacardium occidentales* testa by solvent extraction method. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4, 870-874, 2015.

LI, D.; TEOH, W. Y.; GOODING, J. J.; SELOMULYA, C.; AMAL, R. Functionalization strategies for protease immobilization on magnetic nanoparticles. *Advanced Functional Materials*, 20, 11, 1767-1777, 2010.

LIESE, A.; HILTERHAUS, L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. *Chemical Society Reviews*, 42, 6236-6249, 2013.

LIU, T. P. S.; COSTA, R. M. P. B.; FREITAS, D. J. V.; NACIMENTO, C. O.; SOUZA-MOTTA, C. M.; BEZERRA, R. P.; HERCULANO, P. N.; PORTO, A. L. F. Tannase from *Aspergillus melleus* improves the antioxidant activity of green tea: purification and biochemical characterization. *International Journal of Food Science and Technology*, 52, 652–661, 2017.

LODISH, H.; BERK, A.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M. P.; BRETSCHER, A.; PLOEGH, H.; MATSUDAIRA, P. *Molecular Cell Biology*. New York: W. H. Freeman and Company. 2007.

LÓPEZ-GALLEGU, F.; BETANCOR, L.; MATEO, C.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. *Journal of Biotechnology*, 119(1), 70–5, 2005.

LU, M. J.; CHU, S.; YAN, L.; CHEN, C. Effect of tannase treatment on protein–tannin aggregation and sensory attributes of green tea infusion. *Food Science and Technology*, 42, 338–342. 2009.

MACEDO, G.A.; MATSUDA, L.K.; BATTESTIN, V. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. *Ciência e Agrotecnologia*, 29 (4), 833-838, 2005.

- MACIEL, J.C.; ANDRAD, P. L.; NERI, D. F. M.; CARVALHO JR, L. B.; CARDOSO, C. A.; CALAZANS, G. M. T.; AGUIAR, J. A.; SILVA, M. P. C. Preparation and characterization of magnetic levan particles as matrix for trypsin immobilization. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, 324(7), 1312- 1316, 2012.
- MADEIRA-JUNIOR., J. V.; FERREIRA, L. R.; MACEDO, J. A.; MACEDO, G. A. Efficient tannase production using Brazilian citrus residues and potential application for orange juice valorization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 4, 91–97. 2015.
- MAKKAR, H. P. S. **Quantification of tannins in tree and shrub foliage: a laboratory manual**. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers, p. 102. 2003.
- MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ–LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, 26, 509-515; 2000.
- MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, 40(6), 1451–1463. 2007.
- MAITY, D.; AGRAWAL, D.C. Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, 308, 46-55, 2007.
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, 34, 831-840, 2011.
- MELO, A. F.; PINTO, G. A. S.; GONÇALVES, L. R. B.; FERREIRA, A. L. O. Imobilização de tannase em Suportes Vítreos Utilizando γ -aminopropiltriethoxilano (ATPS). **Comunicado Técnico on line- EMBRAPA**. Dezembro, 2005.
- MOHAPATRA, P.K.D.; MONDAL, K.C.; PATI, B.R.; Production of tannase by the immobilized cells of *Bacillus licheniformis* KBR6 in Ca-alginate beads. **Journal Applied Microbiology**, 102, 1462–1467, 2007.
- MOTEVALIZADEH, S.F.; KHOobi, M.; SADIGHI, A.; KHALILVAND-SEDAGHEH, M.; PAZHOUEHANDEH, M.; RAMAZANI, A.; FARAMARZI, M.A.; SHAFIEE, A. Lipase immobilization onto polyethylenimine coated magnetic nanoparticles assisted by divalent metal chelated ions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 120, 75–83, 2015.
- MUELLER-HARVEY, I. Analysis of hydrolysable tannins. **Animal feed science and technology**, 91, 3-20, 2001.
- MÜLLER, P. S. **Microencapsulação do Óleo Essencial de Laranja**. 2011. 99 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

NERI, D. F. M.; BALCÃO, V. M.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; CARVALHO JR, L. B.; TEIXEIRA, J. A. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane polyvinyl alcohol magnetic (mPOS/PVA) composite for lactose hydrolysis. **Catalysis Communications**, 9, 2334-2339, 2008.

NERI, D. F. M.; BALCÃO, V. M.; DOURADO, F. O. Q.; OLIVEIRA, J. M. B.; CARVALHO JR, L. B.; TEIXEIRA, J. A. Immobilized β -galactosidase onto magnetic particles coated with polyaniline: support characterization and galactooligosaccharides production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 70, 74-80, 2011.

OLIVAS-AGUIRRE, F. J.; WALL-MEDRANO, A.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; LOPEZ-DIAZ, J. A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; DE LA ROSA, L. A.; RAMOS-JIMENEZ, A. Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. **Nutrición Hospitalaria**, 31, 55-66, 2015.

ONG, C.; ANNUAR, M. S. M. Polyphenolic composition and in vitro antioxidant activities of native- and tannase-treated green tea extracts. **International Journal of Food Science and Technology**, 52, 748–756, 2017.

ORDOUDI, S. A.; TSIMIDOU, M. Z. Crocin bleaching assay (CBA) in structure-radical scavenging activity studies of selected phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, 9347–9356. 2006.

PANSERA, M. R.; ROSSATO, M.; ROTA, L. D.; PAULETTI, G. F.; SERAFINI, L. A.; WASUM, R.; PAESE, K.; SANTOS, A. C. A. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no nordeste do Rio Grande do Sul, **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 13, p. 17-22; 2003.

PINTO, G. A. S. **Produção de tanase por *Aspergillus niger***. 2003. 208 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

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 on line Embrapa**, ISSN 1679-6535, 2005.

PONCET-LEGRAND C.; EDELMANN, A.; PUTAUX, J. L.; CARTALADE, D.; SARNI-MANCHADO, P.; VERNHET, A. Poly(L-proline) interactions with flavan-3-ols units: Influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. **Food Hydrocolloids**, 20, 687–697, 2006.

REDONDO, L. M.; CHACANA, P. A.; DOMINGUEZ, J. E., MIYAKAWA, M. E. F. Perspectives in the use of tannins as alternative to antimicrobial growth promoter factors in poultry. **Frontiers in Microbiology**, 5, 1-7. 2014.

ROBERTO, B. S.; MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A.; MARTINS, I. M.; NAKAJIMA, V. M.; ALLWOOD, J. W.; STEWART, D.; MCDOUGALL, G. J. Immobilized tannase treatment alters polyphenolic composition in teas and their potential anti-obesity and hypoglycemic activities in vitro. **Food & Function**, 7, 3920. 2016.

ROMAŠKEVIČ, T.; BUDRIENĖ, S.; PIELICHOWSKI, K.; PIELICHOWSKI, J. Application of polyurethanebased materials for immobilization of enzymes and cells: a review. **Chemija**, 17, 74-89, 2006.

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I. J.; TALMON, Y. Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 38, 1288-1294, 1990.

SANDERSON, G. W.; ENGLEWOOD, N. J.; COGGON, P.; ORANGEBURG, N. Y. **Green tea conversion using tannase and natural tea leaves**. U.S. Patente 3, 1974.

SANTOS, M.A.T. **Caracterização química das folhas de brócoli e couve- flor (*Brassica oleracea* L.) para utilização na alimentação humana**. 2000. Dissertação (Mestrado), UFLA, Lavras, 2000.

SANTOS, J.C.S. **Otimização de biocatalisadores: desenvolvimento de Estratégias para modulação de propriedades de enzimas por Técnicas físicas e químicas**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). 333 f. Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, UFC, 2015.

SCHONS, P. F.; LOPES, F. C. R.; BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A. Immobilization of *Paecilomyces variotii* tannase and properties of the immobilized enzyme. **Journal of Microencapsulation**, 28(3), 211–219, 2011.

SCHONS, P. F. Imobilização da tanase de *Paecilomyces variotii* e ação em reações de hidrólise e síntese. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 2012.

SIRISHA, V. L.; JAIN, A.; JAIN, A. Chapter Nine - Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. **Advances in Food and Nutrition Research**. 79, 179-211, 2016.

SRIVASTAVA, A.; KAR, R. Application of immobilized tannase from *Aspergillus niger* for the removal of tannin from myrobalan juice. **Indian Journal of Microbiology**, 50, 46–51, 2010.

SHARMA, S.; BHAT, T. K.; GUPTA, M. N. Bioaffinity immobilization of tannase from *Aspergillus niger* on concanavalin A-Sepharose CL-4B. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 35, 165–169, 2002.

SHARMA, S.; MUNISHWAR, N. G. Synthesis of antioxidant propylgallate using Tannase from *Aspergillus niger* van Teighein in Nonaqueous media. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 13, 395-397, 2003.

SHARMA, S.; AGARWAL, L.; SAXENA, R. K. Purification, immobilization and characterization of tannase from *Penicillium variable*. **Bioresource Technology**, 99, 2544–2551. 2008.

SHARMA, P.; CHATURVEDI, A.; SHARMA, L. Parametric Optimization for Extracellular Tannase Production in Submerged Fermentation by Isolated *Aspergillus* Species. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 4, 232-239, 2015.

SHARMA, K. P.; JONH, P. J.; GOSWAMI, P.; SONI, M. Enzymatic synthesis of gallic acid from tannic acid with an inducible hydrolase of *Enterobacter* spp. **Biocatalysis and biotransformation**, 35, 177-184, 2017.

SHETE, H. G.; CHITANAND, M. P. Bioconversion of Naturally Occurring Tannins into a Value Added Pharmaceutical Intermediate Gallic Acid a New Approach. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 11, 597-604. 2015.

SHUBAYEV, V. I.; PISANIC II, T. R.; JIN, S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 61, 467–477, 2009.

SOUZA, G. P.; FILGUEIRA, M.; ROSENTHAL, R.; HOLANDA, J. N. F. Characterization of natural diatomaceous composite material. **Cerâmica**, 49, 40-43, 2003.

SORIANO, N. U. Jr.; VENDITTI, R.; ARGYROPOULOS, D. S. Biodiesel synthesis via homogeneous Lewis acid-catalyzed transesterification. **Journal of Fuel Chemistry and Technology**, 88, 560-565, 2009.

TAVANO, O. L.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GOULART, A. J.; MONTI, R. Optimization of the immobilization of sweet potato amylase using glutaraldehyde-agarose support. Characterization of the immobilized enzyme. **Process Biochemistry**, 48, 1054–1058. 2013.

TAKASHIMA, W.; KANEKO, M.; KANETO, K.; MACDIARMID, A. G. The electrochemical actuator using electrochemically-deposited polyaniline film. **Synthetic Metals**, 71, 2265–2266, 1995.

TISCHER, W.; KASCHE, V. Immobilized enzymes: crystals or carriers. **Trends in Biotechnology**, 17, 326–335, 1999.

TÜZMEN, N.; KALBURCU, T.; DENIZLI, A. α -Amylase immobilization onto dye attached magnetic beads: Optimization and characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 78, 16–23. 2012.

UMARE, S. S.; SHAMBHARKAR, B. H.; NINGTHOUJAM, R. S. Synthesis and characterization of polyaniline-Fe₃O₄ nanocomposite: electrical conductivity, magnetic, electrochemical studies. **Synthetic Metals**, 160, 1815–1821, 2010.

VAN GERPEN, J.; SHANKS, B.; PRUSZKO, R.; CLEMENTS, D.; KNOTHE, G. **Biodiesel production technology: august 2002-january 2004**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2004.

VIEIRA, D. C. **Imobilização da Enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação**. 96f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

YAO, J.; CHEN, Q.; ZHONG, G.; CAO, W.; YU, A.; LIU, Y. Immobilization and characterization of tannase from a metagenomic library and its use for removal of tannins from green tea infusion. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24, 80–86, 2014.

YAO, J.; GUO, G.; REN, G.; LIU, Y. Production, characterization and applications of tannase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 101, 137-147, 2014.

YESILOGLU, Y. Utilization of bentonite as a support material for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **Process Biochemistry**, 40, 2155-2159, 2005.

YESILOGLU, Y. Utilization of bentonite as a support material for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **Process Biochemistry**, 40, 2155-2159, 2005.

ZANIN, G. M. **Sacarificação de amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglicosidade imobilizada**. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 1989.

ZHANG, S.; CHEN, S.; HUAN, J.; LIN, J.; NONG, J.; ZHU, H.; CAO, Y. Preparation and properties of high activity tannase with *Aspergillus niger* T3-5-1. **Food Science and Technology**, 30, 137–143, 2014.

ZHANG, Y.; YIN, J.; CHEN, J.; WANG, F.; DU, Q.; JIANG, Y.; XU, Y. Improving the sweet after taste of green tea infusion with tannase. **Food Chemistry**, 192, 470–476. 2016.

ZHOU, Z.; INAYAT, A.; SCHWIEGER, W.; HARTMANN, M. Improved activity and stability of lipase immobilized in cage-like large pore mesoporous organosilicas. **Microporous and Mesoporous Materials**, 154, 133-141, 2012.

WERNER, M.; GARRETT, C.; CHIU, A., KLEMPNER, L. The biological role of enzyme attachment and immobilization. **Clinical Chemistry**, 28, 2351-2358, 1982.

WU, C.; XU, C.; NI, H.; YANG, Q., CAI, H.; XIAO, A. Preparation and characterization of tannase immobilized onto carboxylfunctionalized superparamagnetic ferroferric oxide nanoparticles. **Bioresource Technology**, 205, 67–74. 2016.

PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos foram de elevada importância. As duas técnicas de imobilização testadas foram bem sucedidas e poderão ser utilizadas para a imobilização de tanase e pode-se propor este sistema de tanase imobilizada para remover taninos de outras bebidas aromáticas com o objetivo de melhorar a qualidade dos produtos finais.

APÊNDICE A

ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO *FOOD RESEARCH INTERNATIONAL*



Título: Hydrolysis of tannins by tannase immobilized onto magnetic diatomaceous earth nanoparticles coated with polyaniline.

Autores: Juliana Silva de Lima, Mariana Paola Cabrera, Cristina Maria de Souza Motta, Attilio Converti, Luiz Bezerra Carvalho Jr

Fator de impacto: 3.086 (2016)

Abstract

Responsible for hydrolysis of tannins present in several beverages, tannase is an industrial enzyme of the great potential for applications in the food industry. Tannase was covalently immobilized onto magnetic nanoparticles composed of diatomaceous earth coated with polyaniline (mDE-PANI-TANNASE). This enzyme derivative showed 41% of residual specific activity, higher optimum temperature (40°C) than the free enzyme (30°C) and proved to be more thermostable, whereas both preparations presented the same optimum pH (6.0). The apparent K_m values for the free and immobilized enzyme were statistically different ($p=0.03$) and equal to, respectively, $18 \pm 7 \mu\text{M}$ and $10 \pm 2 \mu\text{M}$. mDE-PANI-TANNASE after ten reuses and 90 days of storage at 4°C kept as much as 66% and 71% of its initial activity, respectively. Even though the tannins content of boldo tea was reduced by only 23-25% after 120 min treatment with either free or immobilized enzyme, mDE-PANI-TANNASE has the advantage of being simply recovered and recycled from the reaction mixture by an outer magnet, thus preventing contamination of the treated tea.

Keywords: Tannase; Immobilization; Magnetic particles; Boldo Tea; Tannins Hydrolysis.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Hydrolysis of tannins by tannase immobilized onto magnetic diatomaceous earth nanoparticles coated with polyaniline



Juliana Silva de Lima^a, Mariana Paola Cabrera^a, Cristina Maria de Souza Motta^b,
Attilio Converti^c, Luiz B. Carvalho^{Jr^{a,c}}

^a Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^b Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^c Department of Civil, Chemical and Environmental Engineering, Pole of Chemical Engineering, University of Genova, Genova, Italy

ARTICLE INFO

Keywords:

Tannase
Immobilization
Magnetic particles
Boldo tea
Tannins hydrolysis

ABSTRACT

Responsible for hydrolysis of tannins present in several beverages, tannase is an industrial enzyme of the great potential for applications in the food industry. Tannase was covalently immobilized onto magnetic nanoparticles composed of diatomaceous earth coated with polyaniline (mDE-PANI-TANNASE). This enzyme derivative showed 41% of residual specific activity, higher optimum temperature (40 °C) than the free enzyme (30 °C) and proved to be more thermostable at 40 °C, whereas both preparations presented the same optimum pH (6.0). The apparent K_m values for the free and immobilized enzyme were statistically different ($p = 0.03$) and equal to, respectively, $18 \pm 7 \mu\text{M}$ and $10 \pm 2 \mu\text{M}$. mDE-PANI-TANNASE after ten reuses and 90 days of storage at 4 °C kept as much as 66% and 71% of its initial activity, respectively. Even though the tannins content of boldo tea was reduced by only 23–25% after 120 min treatment with either free or immobilized enzyme, mDE-PANI-TANNASE has the advantage of being simply recovered and recycled from the reaction mixture by an outer magnet, thus preventing contamination of the treated tea.

1. Introduction

Tannin acyl hydrolase (E.C.3.1.1.20), commonly called tannase, hydrolyzes esters and depside bonds of hydrolysable tannins (tannic acid) releasing glucose, gallic acid, and galloyl esters (Jana et al., 2014; Mehta, Mudanur, & Priva, 2013). Tannase presents extensive appli-

hand, its astringency could be related to the formation of precipitates resulting from the interaction of proteins and tea-condensed tannins. Thus, tannase action avoids the macromolecule aggregation and precipitate formation during storage of tea (Belur & Mugeraya, 2011). Boldo (*Peumus boldus*) is a plant native to central and southern Chile. Although many papers have been published about tannase application