



Taniny i ich rozkład enzymatyczny

Małgorzata Pleszczyńska, Janusz Szczodrak

Zakład Mikrobiologii Przemysłowej,
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Tannins and their enzymatic degradation

Summary

Tannins as compounds of plant biomass seem to be a very useful raw material for an effective bioconversion. This is due to their abundance and renewability as well as the possibility of producing various chemicals and curative preparations from this source. On the other hand, enzymatic removal of tannins from agricultural feedstocks by tannase is very important for production of digestible feed and food products, clarified beverages and fruit juices or instant tea. This article presents a review of information on tannins and their hydrolysis by microbial tannase. Special attention has been paid to chemical structure of tannins and their negative or positive effects on organisms as well as the production of tannase and its biochemical properties. Most promising prospects for the practical applications of tannase in food, pharmaceutical, cosmetic and leather industries are also discussed.

Key words:

tannins, tannic acid, tannin acyl hydrolase, enzymatic hydrolysis, fungi.

Adres do korespondencji

Małgorzata Pleszczyńska,
Zakład Mikrobiologii
Przemysłowej, Uniwersytet
Marii Curie-Skłodowskiej,
ul. Akademicka 19,
20-033 Lublin; e-mail:
mpleszcz@biotop.umcs.lublin.pl

1. Wstęp

Taniny stanowią odnawialny i szeroko rozpowszechniony składnik biomasy roślinnej i w związku z tym są coraz częściej brane pod uwagę jako ważny surowiec do wykorzystania na drodze biokonwersji. Wynika to także z możliwości produkcji z tanin różnych związków chemicznych, z których część znajduje zastosowanie jako preparaty lecznicze. Jako polifenole taniny spełniają rolę naturalnych antyoksydantów, a także skutecznie obniżają ryzyko nowotworzenia oraz mogą działać przeciwmotygenie. Jednakże enzymatyczne usunięcie tanin z surowców

rolniczych za pomocą tanazy neutralizuje ich toksyczne i antyżywniowe właściwości, polepszając tym samym znacznie strawność i zwiększając wartość odżywczą pasz oraz produktów żywnościowych przygotowanych na bazie tych źródeł. Należy jednak podkreślić, że efektywna eksploatacja tanin jako stosunkowo taniego surowca w biotechnologii wymaga pełnego poznania mechanizmów biologicznej degradacji tych polimerów.

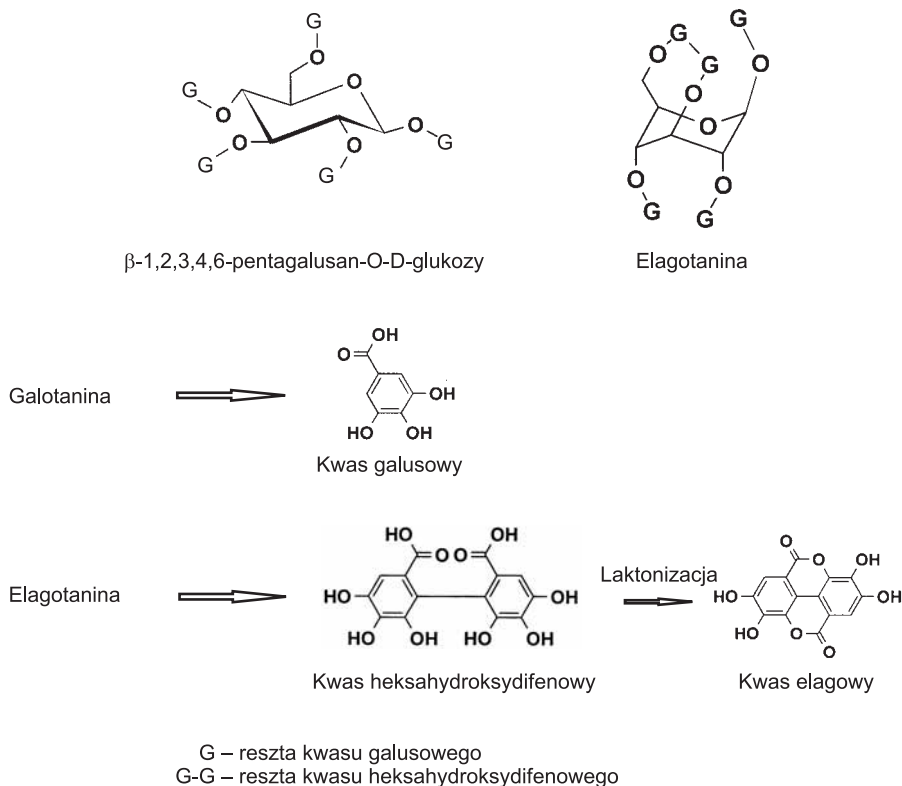
W ostatnich latach wzrost zainteresowania rozkładem tanin i wykorzystaniem w praktyce produktów ich enzymatycznej hydrolizy znajduje odbicie w piśmiennictwie dotyczącym tego tematu. Omawiane są zarówno możliwości zastosowania enzymów rozkładających taniny, jak i właściwości tanaz pochodzenia drobnoustrojowego.

2. Charakterystyka i właściwości tanin

Polifenole tworzą jedną z ważniejszych grup metabolitów wtórnych roślin. Metabolizm fenolowy u roślin jest bardzo złożony, stąd niezwykle bogactwo i zróżnicowanie naturalnych związków fenolowych, od prostych, rozpuszczalnych w wodzie poprzez ich spolimeryzowane pochodne o różnej rozpuszczalności – taniny – aż do nierozpuszczalnych lignin.

Taniny wyraźnie wyróżniają się w tej grupie z powodu ich reaktywności chemicznej i aktywności biologicznej. Można je zdefiniować jako polifenole o masie cząsteczkowej od 500 do 3000 Da, w większości rozpuszczalne w wodzie, zdolne do tworzenia kompleksów z białkami, polisacharydami, a także jonami metali (1).

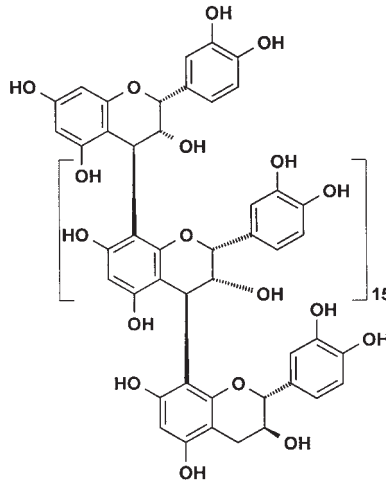
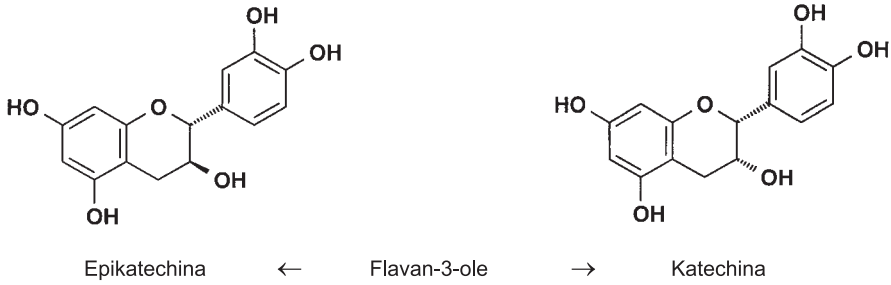
Taniny dzieli się zwykle na dwie podstawowe grupy, taniny hydrolizujące i niehydrolizujące (2,3). W centrum cząsteczki tanin hydrolizujących znajduje się monosacharyd (glukoza lub inne poliole, np. cukier rozgałęziony – hamameloza, kwas szikimowy, chinowy, a nawet pektyny), którego grupy hydroksylowe, częściowo lub całkowicie, zestryfikowane są resztami kwasu galusowego lub jego pochodnymi, np. kwasem m-digalusowym. Taniny te są łatwo hydrolizowane przez słabe kwasy i zasady lub enzymy do monomerycznych produktów. W zależności od rodzaju powstających produktów wyróżnia się galotaniny i elagotaniny. Galotaniny są najprostszymi taninami, zawierającymi w swojej cząsteczce glukozę i estrowo związany z nią kwas galusowy. Przykładem tego rodzaju związków jest kwas taninowy ($C_{76}H_{52}O_{46}$). Częścią rdzeniową jego cząsteczki jest pentagalusan glukozy (rys. 1), do którego kolejne jednostki kwasu galusowego przyłączone są poprzez wiązania depsydowe. W wyniku rozkładu galotanin powstaje glukoza i kwas galusowy. Galotaniny występują w większych ilościach w korze drzew, np. specjalnych odmian dębu oraz w galasówkach, czyli naroślach na liściach sumaka (*Rhus semialata*) – kwas taninowy, galotanina chińska; dębu (*Quercus infectoria*) – galotanina turecka i w liściach sumaka (*R. coriaria*, *R. typhina*). Związki te są składnikiem taniny handlowej – heterogennego preparatu będącego mieszaniną estrów galusanowych.



Rys. 1 Taniny hydrolizujące (3).

Najprostsze elagotanniny są estrami poliolu i kwasu heksahydroksydifenowego, który w roztworze wodnym spontanicznie ulega laktonizacji do kwasu elagowego (rys. 1). Podczas hydrolizy elagotannin uwalniana jest glukoza i kwas elagowy razem z kwasem galusowym, a czasem także inne kwasy przypominające strukturą kwas galusowy. Elagotanniny występują między innymi w owocach chebulowca (*Therminalia* sp.) – kwas chebulinowy, drewnie kasztanowca (*Castanea sativa*), dębu oraz w strąkach *Caesalpinia spinosa*.

Taniny niehydrolizujące (skondensowane, proantocyjanidyny) są pochodnymi flawonoidów, zróżnicowanej grupy metabolitów o charakterystycznym szkieletie węglowym C₆-C₃-C₆. Proantocyjanidyny są oligomerami lub polimerami struktur flawonoidowych, głównie flawan-3-oli, (-)-epikatechiny i (+)-katechiny (rys. 2), flawan-3,4-dioli lub mieszaniny obydwu. W przeciwieństwie do tanin hydrolizujących nie zawierają jednostek cukrowych. Występują w niedojrzałych owocach wielu gatunków, nasionach zbóż, roślin oleistych i strączkowych. Wykorzystywane w handlu skondensowane taniny ekstrahowane są, m.in. z drewna akacji australijskiej (*Acacia mollissima* i *A. mearnsii*) oraz drzewa *Schinopsis lorentzii*, kory sosny i dębu.



Rys. 2. Struktura tanin skondensowanych (3).

Niektórzy autorzy wyróżniają dodatkowo trzecią grupę – taniny katechinowe, których przykładem są polifenole występujące w zielonych liściach herbaty. Mają one charakterystyczny dla tanin skondensowanych szkielet węglowy i nie zawierają reszt cukrowych. Należą do nich monomeryczne flawan-3-ole, np. (+)-katechina, (-)-epikatechina, (+)-galokatechina i (-)-epigalokatechina lub ich estrowe pochodne, np. 3-galusany (-)epikatechiny i (-)epigalokatechiny. Ta ostatnia grupa związków łatwo ulega hydrolizie enzymatycznej pod wpływem tanazy (4).

Podstawową drogą syntezy wszystkich tanin, podobnie jak innych związków aromatycznych u roślin, jest szlak związany z katabolizmem cukrów, wiodący od kwasu szikimowego. Z kwasu szikimowego, protokatechowego lub chinowego powstaje kwas galusowy, który jest substratem w różnego rodzaju kondensacjach, w wyniku których syntetyzowane są taniny. Związki te są szeroko rozpowszechnione w królestwie roślin. Mogą występować w drewnie, korze, korzeniach, liściach, owocach oraz galasówkach. Gromadzą się głównie w wakuolach i wosku powierzchniowym,

tak umiejscowione nie oddziałują na metabolizm rośliny, aż do chwili uszkodzenia jej tkanek. Najważniejsza rola tanin wiąże się z zabezpieczeniem roślin przed patogenami, roślinożercami i niekorzystnymi warunkami środowiska (5). Dobrze udokumentowana jest ich aktywność przeciwdrobnoustrojowa (6-9). Taniny, szczególnie skondensowane, są toksyczne dla wielu grzybów, bakterii i wirusów i mało podatne na rozkład mikrobiologiczny; opóźniają przez to proces rozkładu materii organicznej (10). Mechanizm toksyczności tanin obejmuje ich właściwości ściągające, co pozwala im tworzyć kompleksy z enzymami lub substratami, działanie na błonę komórkową mikroorganizmów i możliwość wiązania jonów metali (6). Taniny nadają cierpki, ściągający smak, m.in. niedojrzałym owocom, herbacie, winu, piwu i ziarnu kakaowemu, występując zaś w łądygach i liściach powodują, że te części roślin są mniej smaczne dla roślinożerców. Charakterystyczna cierpkość jest wynikiem tworzenia kompleksów tanin z białkami, a szczególnie bogatymi w prolinę białkami śliny i błon śluzowych zwierząt (11).

Taniny zaliczane są także do substancji antyżywniowych, co wynika przede wszystkim z ich zdolności do tworzenia kompleksów z różnymi makromolekułami. Duża zawartość garbników, a w szczególności tanin skondensowanych, w paszy dla zwierząt powoduje obniżenie jej spożycia wywołane pogorszeniem smaku (wspomniana już interakcja tanin z białkami śliny) oraz zmniejszenie wartości odżywczej paszy poprzez obniżenie strawności zawartych w niej białek i węglowodanów spowodowane ich skompleksowaniem (5). W warunkach *in vitro* taniny hamują aktywność enzymów trawiennych zwierząt i enzymów mikroorganizmów żwacza (12). W przewodzie pokarmowym produkty rozkładu tanin hydrolizujących są toksyczne i powodują zatrucia u zwierząt. Taniny wykazują również działanie toksyczne i bakteriostatyczne w stosunku do mikroflory żwacza. Zostało to opisane dla kilku gatunków, takich jak *Streptococcus bovis*, *Butyrivibrio fibrisolvens* i *Ruminobacter amylophilus* (13). Taniny wpływają ponadto na biologiczną dostępność witamin (m. in. A i B₁₂) i związków mineralnych. Wykazano, że tworzą nierozpuszczalne kompleksy z żelazem i wskutek tego, na przykład spożywanie nadmiernych ilości herbaty może prowadzić do wystąpienia anemii spowodowanej zmniejszeniem przyswajalności żelaza (14).

Należy wszakże podkreślić, że wszystkie wymienione konsekwencje występują tylko w sytuacji wysokiego poziomu tanin w diecie. Ponadto ssaki, podobnie jak mikroorganizmy, wykształciły wiele mechanizmów obronnych pozwalających im przystosować się do stosunkowo dużych ilości tanin w pożywieniu (15,16). Niewielka ilość tanin może nawet wpływać korzystnie, np. na wzrost i kondycję przeżuwaczy (17), a nawet ludzi (18). Są doniesienia, że taniny mogą spełniać rolę naturalnych przeciwutleniaaczy, a także wykazywać działanie przeciwrakowe i przeciwmutagenne. Szczególnie dobrze zbadano wpływ polifenoli zawartych w zielonej herbacie na powstawanie i rozwój różnych rodzajów raka (14). Naukowcy udowodnili, że picie zielonej herbaty może skutecznie obniżyć ryzyko nowotworzenia dzięki przeciwutleniającym właściwościom epigalokatechin i katechin. Silne antyoksydacyjne od-

działywanie tych substancji powoduje neutralizację wolnych rodników uszkadzających DNA, obniżając w ten sposób ryzyko mutacji (19,20). Na podstawie przeprowadzonych szczegółowych badań przypuszcza się, że picie tego napoju może chronić przed wieloma rodzajami nowotworów, włączając raka jamy ustnej, wątroby, prostaty, żołądka czy piersi (21,22). Umiarkowane spożywanie zielonej herbaty modyfikuje również mikroflorę jamy ustnej i jelit, eliminuje organizmy patogenne, selektywnie indukuje odpowiednie enzymy biorące udział w neutralizacji szkodliwych metabolitów, dzięki czemu może stać się skuteczną i nieinwazyjną formą terapii (14,23).

3. Tanaza drobnoustrojowa i jej udział w rozkładzie tanin

Szeroko zakrojone badania mikrobiologiczne i biochemiczne doprowadziły do wyjaśnienia wielu mechanizmów degradacji tanin występujących w naturalnym środowisku, m.in. w przewodzie pokarmowym zwierząt roślinożernych, w ściekach pochodzących z garbarni i w różnego rodzaju odpadach roślinnych. Wspomniano już, że spośród różnych występujących tam związków taninowych najbardziej podatne na atak mikrobiologiczny są taniny hydrolizujące (24,25). W początkowym etapie ich rozkładu bierze udział acylohydrolaza taniny (EC 3.1.1.20), enzym powszechnie zwany tanazą. Katalizuje on reakcję hydrolizy wiązań estrowych występujących pomiędzy cukrem a kwasem galusowym oraz wiązań depsydowych między dwiema cząsteczkami kwasu galusowego (26). Powstający w wyniku reakcji kwas galusowy ulega następnie przemianom prowadzącym do prostych kwasów alifatycznych. Przebiegają one kilkoma drogami, zależnie od warunków środowiska. Pierwszym etapem tych przemian jest jednak zawsze konwersja kwasu galusowego do pirogalolu, zachodząca przy udziale dekarboksylazy galusanowej (27).

Tanaza jest syntetyzowana przez wiele mikroorganizmów, należących zarówno do grzybów nitkowatych, drożdży, jak i bakterii (27,28). Najważniejszym i najlepiej poznanym źródłem tego enzymu są grzyby strzępkowe. Po raz pierwszy o roli enzymu obecnego u *Aspergillus niger* w degradacji kwasu taninowego doniósł Kundson w 1913 r. (29). Od tej pory aktywność tanazową wykryto u przedstawicieli rodzajów *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Ascochyta* (30-32). Niewiele jest natomiast doniesień mówiących o udziale drożdży w degradacji tanin. Jedynie wyizolowane z gleby szczepy *Candida* i *Pichia* okazały się dobrymi producentami zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej tanazy, jeśli były hodowane na podłożu zawierającym galotaninę (16,33). Bakterie rozkładają różne rodzaje naturalnych związków fenolowych, w tym też taniny, ale dopiero w 1983 r. Deschamps i wsp. po raz pierwszy wykryli, że bakterie *Bacillus pumilis*, *B. polymyxa*, *Corynebacterium* sp. i *Klebsiella planticola*, wyrosłe na podłożu zawierającym korę kasztanowca jako jedyne źródło węgla, wytwarzają duże ilości tanazy (34). Potem okazało się, że również wiele szczepów *Streptococcus* i *Enterobacterium*, wyizolowanych z kału koali, może rozkładać kom-

pleksy kwasu taninowego z białkiem, co uwidacznia się powstawaniem stref przejaśnienia wokół kolonii rosnących na traktowanym taniną podłożu agarowym z wyciągiem mózgowo-rdzeniowym (35). Po raz pierwszy udało się także stwierdzić aktywność tanazową u drobnoustroju bytującego w żwaczu. Była to beztlenowa bakteria *Selenomonas ruminantium* wyizolowana ze żwacza kóz, żywionych paszą bogatą w taninę (36). Ostatnio także w fermentowanej żywności i w odchodach ludzkich wykryto bakterie z rodzaju *Lactobacillus* zdolne do degradacji taniny (37).

Najbardziej wartościowymi producentami tanazy okazały się jednak kropidlaki: *A. flavus*, *A. japonicus*, *A. awamori*, *A. oryzae* i *A. niger*, z których pozyskuje się enzym do celów handlowych. Tanaza jest enzymem induktywnym i w związku z tym kwas taninowy, czysty lub w postaci rozdrobnionego, bogatego w taninę materiału roślinnego, jest najczęściej stosowany jako podstawowe źródło węgla. Induktorem enzymu mogą być też niektóre pochodne tego kwasu, np. galusan metylu (38). W przypadku niektórych producentów wytwarzanie tanazy nie podlega represji katabolicznej. Do podłoża hodowlanego z taniną wprowadza się czasem dodatkowe źródło węgla, np. glukozę lub sacharozę, co w niektórych przypadkach pozwala na szybsze wytworzenie enzymu i zwiększenie jego aktywności (39). Uważa się jednak, że to zawartość taniny w podłożu wpływa w zasadniczy sposób na ilość syntetyzowanego enzymu. W fermentacji wgłębnej stężenie tego substratu waha się od 0,1 do 10%, przy czym z uwagi na toksyczność taniny dla większości drobnoustrojów, wartość optymalna wynosi od 3 do 5% (40). Zmiana sposobu hodowli na fermentację na podłożu stałym sprawia, że zawartość kwasu taninowego w pożywce może być nawet dziesięciokrotnie wyższa. Wytwarzany enzym jest uniwersalny – rozkłada różne rodzaje tanin hydrolizujących (41). Może być albo związany z komórką albo wydzielany do podłoża, co w dużym stopniu zależy od sposobu hodowli grzyba (42).

Tanaza jest produkowana metodą wgłębną, powierzchniową i na podłożu stałym. W przeprowadzonych licznych badaniach dowiedziono jednak, że najefektywniej proces ten zachodzi w przypadku fermentacji na podłożu stałym (42-44). Metoda ta polega na hodowli mikroorganizmów na nierozpuszczalnym substracie (w tym przypadku najczęściej są to otręby zmieszane z roztworem taniny), którego poziom wilgotności waha się między 30 a 80%. Najczęściej jednak wilgotność wynosi 60% (45). W 1917 r. Kita jako pierwszy doniósł o wytwarzaniu tanazy przez *A. oryzae* podczas fermentacji w podłożu stałym (46). Zauważył, że produkcja enzymu rosła ze wzrostem zawartości taniny w pożywce, jednak zbyt duża jej ilość hamowała rozwój grzyba. Z kolei Nishira i Mugibayashi (47) obserwowali wzrost różnych szczepów *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Neurospora* oraz *Trichothecium roseum*, *Mucor pranii*, *Myrothecium verrucaria* i *Chaetomium lobosum* na podłożu z otrębami pszennymi zawierającym 4% taninę. Hodowlę inkubowano w 25-27°C przez 3-10 dni. Autorzy stwierdzili, że spośród badanych grzybów szczepy *Aspergillus* i *Penicillium* produkowały największe ilości tanazy.

Fermentacja w podłożu stałym daje wiele korzyści ekonomicznych, które decydują o jej przewadze nad hodowlą wgłębną (48). W metodzie tej prostsze jest przy-

gotowanie podłoża. Jako substrat stały wykorzystuje się rolno-przemysłowe produkty uboczne, takie jak otręby pszenne, ryżowe lub słomę pszenną (49). Ze względu na niski poziom wilgotności, masa podłoża przypadająca na jednostkę wagi substratu jest także niska. Ekstrakcję enzymu po fermentacji w podłożu stałym prowadzi się z niewielką objętością wody lub odpowiedniego buforu, co sprawia, że otrzymany produkt zawiera stosunkowo dużą ilość tanazy (50,51).

Lekha i Lonsane (42) opisali różnice w aktywności i lokalizacji tanazy wytwarzanej przez *A. niger* w trzech różnych technikach fermentacji. Okazało się, że produkcja enzymu metodą hodowli w podłożu stałym przewyższała 2,5-krotnie jego ilość uzyskaną w fermentacji wgłębnej i aż 4,8-krotnie w przypadku hodowli powierzchniowej na podłożu ciekłym. Czas niezbędny dla uzyskania maksymalnej aktywności tanazy wynosił w tym typie fermentacji 3 dni, zaś w pozostałych fermentacjach 6 dni. Enzym syntetyzowany w fermentacji na podłożu stałym był zewnątrzkomórkowy i bardziej termostabilny niż częściowo wewnątrzkomórkowy enzym uzyskany w fermentacji wgłębnej i powierzchniowej. Podobne rezultaty przyniosły również badania nad produkcją tanazy przez inne szczepy *A. niger* oraz *Rhizopus oryzae* (43,44).

Stosowanie niekosztownych podłoży, duża produktywność enzymu i jego łatwy odzysk stały się przyczyną znacznego obniżenia kosztów tanazy wytwarzanej metodą fermentacji w podłożu stałym (52). Mimo to szacuje się, że tak produkowany enzym stanowi obecnie tylko 5% tanazy obecnej na rynku. Prawdopodobnie spowodowane jest to niezbyt intensywnym rozwojem badań nad tego typu fermentacją po II wojnie światowej, zwłaszcza w porównaniu z dużym postępem prac nad technologią hodowli wgłębnej (53).

Tanazy pochodzące z kilku źródeł mikrobiologicznych oczyszczono i opisano ich właściwości fizykochemiczne (tab.). Warunki działania enzymów grzybowych są podobne, optymalne pH wynosi od 5,0 do 6,0, a temperatura 30-40°C. Wyjątkiem są tanazy z *A. flavus* i *Candida* sp. rozkładające kwas taninowy w wyższej temperaturze. W przeciwieństwie do bakteryjnej, tanaza grzybowa jest białkiem o dużej masie cząsteczkowej, dla natywnego enzymu wynosi ona od 186 do 300 kDa. Beverini i wsp. (54), oczyszczając handlowy preparat tanazy z *A. oryzae*, dzięki zastosowaniu chromatografii powinowactwa rozfrakcjonowali enzym na dwie grupy izoenzymów. Pierwsza grupa, nazwana tanazą I degradowała w podobnym stopniu substraty zawierające wiązania estrowe oraz depsydowe (K_m dla galusanu metylu – 1,7 mM, a dla kwasu m-digalusowego – 2,0 mM). Natomiast tanaza II wykazywała dużo silniejsze powinowactwo do kwasu m-digalusowego (K_m – 0,7 mM) i pochodnych poligalusanowych zawierających wiązania depsydowe niż do galusanu (K_m – 6,2 mM). Poznano także strukturę tanazy z *A. oryzae*. Wykazano, że enzym jest hetero-oktamerem o masie 300 kDa i składa się z czterech par podjednostek. W skład każdej pary wchodzi duża (33 kDa) i mała (30 kDa) podjednostka, połączone wiązaniem dwusiarczkowym (55).

Tabela

Właściwości fizykochemiczne oczyszczonej tanazy

Pochodzenie enzymu	Optimum działania		Masa cząsteczkowa (kDa)	Zawartość reszt cukrowych (%)	Literatura
	pH	temperatura (°C)			
<i>Aspergillus oryzae</i>	5,5	30-40	300	22,7	(55)
<i>Aspergillus niger</i>	5,0-6,0	35	186	43	(56)
<i>Aspergillus flavus</i>	5,5	60	192	25,4	(57)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	5,0-6,0	30-40	300	68	(58)
<i>Candida</i> sp.	6,0	50	250	64,2	(33)
<i>Selenomonas ruminantium</i>	7,0	30-40	59	brak danych	(36)

4. Możliwości wykorzystania tanazy

Tanaza znajduje zastosowanie w przemyśle spożywczym, chemicznym i farmaceutycznym. Podstawowym celem produkcji enzymu w oparciu na drobnoustrojach jest pozyskiwanie przy jego udziale kwasu galusowego z materiału roślinnego zawierającego taniny. Jedną z najstarszych metod używanych do produkcji tego kwasu polegała na tym, że surowiec gromadzony był w przyzmacach, które nawilgacano i zaszczepiano czystą kulturą *A. niger* lub *P. chrysogenum*. Przyzmy te od czasu do czasu mieszano i pozostawiano w temperaturze 30°C. Po okresie fermentacji trwającym około miesiąca z przerośniętego grzybnią materiału roślinnego ekstrahowano kwas galusowy za pomocą gorącej wody (59).

Współczesne metody produkcji kwasu galusowego opierają się na użyciu roztworów taniny, które są zaszczepiane czystymi kulturami mikroorganizmów wytwarzających taninę. Deschamps i Lebeault (60) donieśli o możliwości wytwarzania kwasu galusowego z tanin tary (*Caesalpinia digyna*) przez *Klebsiella pneumoniae* i *Corynebacterium* sp. Wydajność tego procesu została oceniona na 55%. Z kolei Pourrat i wsp. (61) opisali metodę produkcji kwasu galusowego z tanin tary i sumaka z wykorzystaniem *A. niger*. W przypadku tanin tary wydajność reakcji po 45 godzinach fermentacji wynosiła 30%, zaś w odniesieniu do sumaka kształtowała się na poziomie 9,7%. Niska wydajność produktu była spowodowana biodegradacją kwasu galusowego przez te szczepy. Stwierdzono, że użycie do wytwarzania kwasu mutantów niezdolnych do jego rozkładu oraz immobilizowanej tanazy znacznie zwiększa efektywność produkcji kwasu galusowego (60,62).

Kwas galusowy ma kilka ważnych zastosowań w przemyśle. Używany jest głównie jako substrat wyjściowy w produkcji pirogalolu i estrów kwasu galusowego. Pirogalol wykorzystywany jest do barwienia futer, skór i włosów oraz w przemyśle fotograficznym jako jeden ze składników wywoływacza (27). Galusan propylu jest znanym antyutleniaczem stosowanym do utrwalania różnego rodzaju olejów, tłuszczów jadalnych, żywności barowej, gumy do żucia, płatków śniadaniowych, pasztetów i przetworów mięsnych (63). Galusan dodecyłu jest znacznie słabiej rozpusz-

czalny w wodzie, łatwiej zaś rozpuszcza się w olejach. Ma jednak niższą aktywność przeciwutleniającą. Znalazł zastosowanie przy otrzymywaniu olejów, margaryny, past serowych i purée ziemniaczanego. W najnowszych badaniach wykazuje się również, że sam kwas galusowy może być stosowany jako skuteczny antyoksydant, zapobiegający utlenianiu olejów roślinnych w wysokich temperaturach. Jego obecność znacznie ogranicza zmiany w składzie tłuszczów podczas ogrzewania w porównaniu z innymi stosowanymi powszechnie przeciwutleniaczami (64). Kwas galusowy wykorzystywany jest także do wytwarzania barwnika zwanego galocyjaniną, z którego produkowany jest atrament (27).

W przemyśle farmaceutycznym stosuje się kwas galusowy do produkcji trimetoprimu – antybiotyku o szerokim spektrum działania. Kombinacja trimetoprimu i sulfonamidów jest skuteczna przeciwko bakteriom opornym na inne antybiotyki i została zastosowana w leczeniu wielu schorzeń, m.in. skóry (65). W przeprowadzonych ostatnio w Madrycie badaniach dowodzi się, że związki polifenolowe obecne w żywności, np. w winie, czy herbacie mogą chronić przed różnego rodzaju nowotworami poprzez specyficzne hamowanie proliferacji i kierowanie komórek rakowych na drogę apoptozy. Badano działanie różnych substancji, w tym także kwasu galusowego i taninowego, na linię komórek raka prostaty. Stwierdzono, że kwas galusowy znacznie spowalnia tempo podziałów komórek nowotworowych, a także indukuje w nich proces apoptozy (66).

Drugim z bardziej obiecujących zastosowań tanazy jest produkcja herbaty rozpuszczalnej (67). Najważniejszym warunkiem stawianym takiej herbacie jest jej rozpuszczalność w zimnej wodzie, co umożliwi np. przygotowywanie herbaty mrożonej (68). Krzew herbaciany jest rośliną zawierającą duże ilości tanin. W przypadku zielonych liści herbaty związki te mają postać monomerycznych flawanoli i ich pochodnych galusanowych. W herbacie czarnej występują natomiast polimery, teaflawiny i tearubigininy, które łącząc się wiązaniami wodorowymi z kofeiną, tworzą w naparze pozostawionym przez dłuższy czas w temperaturze poniżej 4°C, nierozpuszczalny w wodzie osad, tzw. „krem herbaciany”. W celu otrzymania herbaty instant stosuje się chemiczną metodę rozpuszczania „kremu”, która wymaga traktowania go siarczanem, tlenem cząsteczkowym i zasadą w wysokiej temperaturze (69). Tak przygotowana herbata rozpuszczalna traci jednak częściowo właściwy kolor, smak i zapach oraz źle reaguje na dodanie mleka, gdy podawana jest jako gorący napój. Przyjmuje wówczas czarną, nieprzyjemną barwę. W związku z tym prowadzi się łagodniejszą, enzymatyczną deestryfikację tanin zawartych w liściach herbaty zielonej, w wyniku której zwiększa się w nich ilość epikatechin i kwasu galusowego. Dzięki temu podczas późniejszej konwersji herbaty zielonej do czarnej powstają znaczne ilości kwasu epiteaflawinowego, odpowiadającego za właściwy kolor i dobrą rozpuszczalność herbaty. Jednak użyty enzym musi być następnie zdenaturowany przez ogrzewanie, co znów obniża jakość napoju. Celowe jest zatem stosowanie tanazy w postaci immobilizowanej, co znacznie ułatwia usuwanie enzymu (70).

Yamada i Tanaka (71) wykorzystali tanazę w technologii produkcji wina. Enzym hydrolizował kwas chlorogenowy do kwasu kawowego i chinowego, które wpływają korzystnie na smak wina. Preparaty tanazy pochodzenia grzybowego i bakteryjnego o zróżnicowanych właściwościach enzymatycznych stosuje się też w celu usprawnienia metod badania struktury tanin skondensowanych obecnych w skórcie i nasionach winogron, odpowiedzialnych za kolor i cechy organoleptyczne wina (72).

Tanaza może też służyć jako środek klarujący w produkcji win, piwa, soków owocowych i napojów o smaku kawowym (27). Masschelein i Batum (73) wykazali, że enzym wytwarzany przez *A. flavus* znacząco obniża poziom powstającej w wyniku chłodzenia piwa „mgiełki”, którą stanowią kompleksy polifenoli pochodzących zarówno ze słodu, jak i chmielu z różnymi białkami. Zanik koloru i rozwój „mgiełki” mógłby być zahamowany dzięki hydrolizie enzymatycznej znacznej części tych kompleksów przy użyciu tanazy. Ciekawostką regionalną jest zastosowanie tanazy do produkcji wina z koreańskich żołądzi zawierających 6,5-7,5% kwasu taninowego. Wino z tych żołądzi otrzymuje się na bazie procesu „koji” z użyciem proszku ryżowego i żołądziowego w stosunku 1:1 oraz odpowiedniego szczepu *Aspergillus*. Produkt końcowy zawiera 10% etanolu i 7% cukru (27).

Singleton i Kratzer (74) jako pierwsi zauważyli szkodliwy wpływ pasz zawierających duże ilości tanin na zdrowie karmionych nimi zwierząt. Użycie tanazy do wstępnej obróbki takiej karmy znacznie poprawiłoby jej strawność i zmniejszyło toksyczność zawartych w niej tanin.

Tanaza znalazła również zastosowanie w przemyśle kosmetycznym np. do usuwania zmętnień w płynnych ekstraktach z roślin oraz w przemyśle skórzanym do homogenizowania preparatu taninowego stosowanego przy garbowaniu skór (27).

5. Uwagi końcowe

Z dokonanego przeglądu piśmiennictwa wynika, że tanaza już w chwili obecnej ma szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i chemicznym. Jednak możliwości jej wykorzystania, jak się wydaje, są o wiele większe. Niektóre są dopiero badane, wymagają udoskonalenia i mogą przyczynić się do rozpowszechnienia użycia tanazy w skali przemysłowej. Dotyczy to choćby prób zastosowania enzymu do detanifikacji biomasy o dużej zawartości polifenoli (75). Warunkiem powodzenia tych zamierzeń jest jednakże obniżenie nadal wysokich kosztów produkcji i stosowania tanazy. Konieczne jest zatem poszukiwanie nowych, efektywnych źródeł enzymu oraz kontynuowanie prac nad optymalizacją sposobów hodowli mikroorganizmów, m.in. wytwarzania tanazy w warunkach hodowli na podłożu stałym, bo mimo potwierdzonych zalet tej metody, otrzymuje się tą drogą jedynie niewielką ilość enzymu.

Należy też rozszerzyć badania mające na celu zwiększenie stabilności enzymu i jego wykorzystanie w formie immobilizowanej. Otwarta pozostaje nadal sprawa

struktury genu kodującego tanazę. Dotychczas ukazała się tylko jedna publikacja opisująca klonowanie tanazy z *A. oryzae* TH przy użyciu sond oligonukleotydowych zsyntetyzowanych na podstawie fragmentów sekwencji aminokwasowej enzymu (55). Wykazano, że gen zawiera jedną otwartą ramkę odczytu i brak w nim intronów. Produktem genu jest białko o długości 588 aminokwasów i masie cząsteczkowej 64 kDa. Uzyskano ekspresję tego genu w szczepie *A. oryzae* AO1 o niskiej aktywności tanazowej. Transformanty wykazywały zwiększoną aktywność tanolityczną, rosnącą proporcjonalnie do liczby wprowadzonych do chromosomu kopii genu.

Literatura

1. Bate-Smith E. C., Swain T., (1962), *Comparative Biochemistry*, Eds. Mason H. S., Florkin M., 3, 764, Academic Press, New York.
2. Okuda T., Yoshida T., Hatano T., (1995), *Progress Chem. Org. Natural Prod.*, 66, 1-117.
3. <http://www.users.mnohio.edu/hagermae>
4. Graham H. N., (1992), *Prev. Med.*, 21, 334-350.
5. <http://www.ansci.cornell.edu>
6. Scalbert A., (1991), *Phytochemistry*, 30, 3875-3883.
7. Hara Y., Watanabe M., (1989), *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, 36, 951.
8. Jacob F. H., Pignal M. C., (1972), *Mycopathol. Mycol.*, A, 48, 121.
9. Brownlee H. E., McEuen A. R., Hedger J., Scott J. M., (1990), *Physiol. Molec. Plant Pathol.*, 36, 39.
10. Field J. A., Lettinga G., (1992), *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance*, Eds. Hemingway, R. W., Laks E., 673-692, Plenum Press, New York.
11. Hagerman A. E., Rice M. E., Ritchard N. T., (1998), *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2590-2595.
12. Chung K. T., Wong T. Y., Wei Ch. I., Huang Y. W., Lin Y., (1998), *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 38, 421-464.
13. Jones G. A., McAllister T. A., Muir A. D., Cheng K. J., (1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 1374-1378.
14. Wang H., Provan G. J., Helliwell K., (2000), *Trends Food Sci. Technol.*, 11, 152-160.
15. Mc Arthur C., Hagerman A., Robbins C. T., (1991), *Plant Defenses against Mammalian Herbivory*, Eds. Palo R. T., Robbins C. T., 103, CRC Press, Boca Raton.
16. Deschamps A. M., (1989), *Plant Cell Wall Polymer Biogenesis and Biodegradation*, 559-566, American Chemical Society, Washington DC.
17. Lees G. L., (1992), *Plant polyphenols: Synthesis, Properties, Significance*, Eds. Hemingway R. W., Laks E., 915, Plenum Press, New York.
18. Jakun J., Selman S. H., Swiercz R., Skrzypczak-Jakun E., (1997), *Nature*, 387, 561.
19. Katiyar S. K., Mukhtar H., (1997), *J. Cell Biochem. (suppl.)*, 27, 59-67.
20. Kuroda Y., Hara Y., (1999), *Mutat. Res.*, 436, 69-97.
21. Sadzuka Y., Sugihama T., Hirota S., (1998), *Clin. Cancer Res.*, 4, 153-156.
22. Brown M. D., (1999), *Altern. Med. Rev.*, 4, 360-370.
23. Fujiki H., Sukanuma M., Okabe S., Sueoka N., Komori A., Sueoka E., Kozu T., Tada Y., Suga K., Imai K., Nakachi K., (1998), *Mutat. Res.*, 402, 307-310.
24. Saxena R. K., Sharmila P., Singh V. P., (1995), *Biotransformations: Microbial degradation of health-risk compounds. Progress in Industrial Microbiology*, Ed. Singh V. P., 32, 259-270, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.
25. Field J. A., Lettinga G., (1992), *Metal Ions in Biological Systems. Degradation of environmental pollutants by microorganisms and their metalloenzymes*, Ed. Sigel H., 28, 61-97, Marcel Dekker Inc, New York.
26. Dykerhoff H., Ambruster R., (1933), *Z. Physiol. Chem.*, 219, 38-56.
27. Bhat T. K., Singh B., Sharma O. P., (1998), *Biodegradation*, 9, 343-357.
28. Lekha P. K., Lonsane B. K., (1997), *Adv. Appl. Microbiol.*, 44, 215-260.

29. Kundson L., (1913), *J. Biol. Chem.*, 14, 159-202.
30. Bajpai B., Patil S., (1996), *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 12, 217-220.
31. Bradoo S., Gupta R., Saxena R. K., (1996), *J. Gen. Appl. Microb.*, 42, 325-330.
32. Ganga P. S., Nandy S. C., Santappa M., (1977), *Leather Sci.*, 24, 8-16.
33. Aoki K., Shinke R., Nishira H., (1976), *Agric. Biol. Chem.*, 40, 97-85, 297-302.
34. Deschamps A. M., Otuk G., Lebeault J. M., (1983), *J. Ferment. Technol.*, 61, 55-59.
35. Osawa R., (1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 829-831.
36. Skene I. K., Brooker J. D., (1995), *Anaerobe*, 1, 321-327.
37. Osawa R., Kuroiso K., Goto S., Shimizu A., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 3093-3098.
38. Bajpai B., Patil S., (1997), *Enzyme Microbiol. Technol.*, 20, 612-614.
39. Fumihiko Y., Kiyoshi M., (1975), *Jpn. Patent*, 72, 25, 786.
40. Bradoo S., Gupta R., Saxena R. K., (1997), *Process Biochem.*, 32, 135-139.
41. Lewis J. A., Starkey R. L., (1969), *Soil Sci.*, 107, 235-241.
42. Lekha P. K., Lonsane B. K., (1994), *Process Biochem.*, 29, 497-503.
43. Kar B., Banerjee R., (2000), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 29-38.
44. Aguilar C. N., Augur C., Favela-Torres E., Viniegra-Gonzalez G., (2001), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 296-302.
45. Laukevics J. J., Aspate A. F., Viesturs H. E., Tengerdy R. P., (1984), *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 1465-1474.
46. Kita J., (1917), *J. Chem. Ind. (Tokyo)*, 20, 134-137.
47. Nishira H., Mugibayashi N., (1960), *Hyogo Noka Diagaku Henkyu Hokoku*, 4, 113-116.
48. Mudgett R. E., (1986), *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Eds. Demain A. L., Solomon N. A., 66-83, American Society of Microbiology, Washington.
49. Mitchell D. A., Lonsane B. K., (1992), *Solid substrate cultivation*, Eds. Doelle H. W., Mitchel D. A., Rolz C. E., 1-16, Elsevier Science Publishers, London.
50. Deschamps F., Huet M. C., (1985), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 177-180.
51. Frost G. M., Moss D. A., (1987), *Biotechnology*, Ed. Kenedy J. F., 7a, 65-211, Verlag Chemie, Weinheim.
52. Ramakrishna S. V., Suseela T., Ghildyal N. P., Jaleel S. A., Prema P., Lonsane B. K., Ahmed S. Y., (1982), *Ind. J. Technol.*, 20, 476-480.
53. Frost G. M., (1986), *Development of Food Proteins*, Ed. Hudson B. J. F., 57-134, Elsevier Applied Science Publishers, London.
54. Beverini M., Metche M., (1990), *Sci. Aliments*, 10, 807-816.
55. Hatamoto O., Watarai T., Kikuchi M., Mizusawa K., Sekine H., (1996), *Gene*, 175, 215-221.
56. Barthomeuf C., Regerat F., Pourrat H., (1994), *J. Ferment. Technol.*, 77, 320-323.
57. Yamada H., Adachi O., Watanabe M., Sato N., (1968), *Agric. Biol. Chem.*, 32, 1070-1078.
58. Rajkumar S., Nandy S. C., (1985), *Leather Sci.*, 32, 278-280.
59. Prescott S. C., Dunn C. G., (1959), *Industrial Microbiology*, Eds. Miller B.W., Litsky W., 548, McGraw-Hill, New York.
60. Deschamps A. M., Lebeault J. M., (1984), *Biotechnol. Lett.*, 6, 237-242.
61. Pourrat H., Regerat F., Morvan P., Pourrat A., (1987), *Biotechnol. Lett.*, 9, 731-734.
62. Misro S. K., Kumar M. R., Banerjee R., Bhattachatya B. C., (1997), *Bioprocess Eng.*, 16, 257-260.
63. Weetal H. H., (1985), *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 124-127.
64. <http://www.ift.confex.com>
65. Sittig M., (1988), *Trimetoprim. Pharmaceutical Manufacturing Encyclopedia*, 2nd ed., 282-284, Noyes Publications, New Jersey.
66. Saeki K., You A., Isemura M., Abe I., Seki T., Noguchi H., (2000), *Biol. Pharm. Bull.*, 23, 1391-1394.
67. Sanderson G. W., Englewood N. J., Coggon P., Orangebourg N. Y., (1974), *U. S. Pat.* 3, 812, 266.
68. Coggon P., Graham N. H., Sanderson G. W., (1975), *U. K. Pat.* 1, 380, 135.
69. Sanderson G. W., (1972), *World Coffee and Tea*, 12, 54-57.
70. Boadi D. K., Neufeld R. J., (2001), *Enzyme Microbiol. Technol.*, 28, 590-595.
71. Yamada K., Tanaka T., (1972), *Jpn. Pat.* 2, 224, 100.
72. <http://www.adelaide.edu.au>

73. Masschelein C. A., Batum M. S., (1981), *Proceedings of the Congress of European Brewers Convention*, IRL Press, Maastricht, Belgium. 359-370.
74. Singleton V. L., Kratzer F. H., (1969), *J. Agric. Food Chem.*, 17, 497-512.
75. Lorusso L., Lacki K., Duvnjak Z., (1996), *Biotechnol. Lett.*, 18, 309-314.