

FERNANDA MANSANO ARACRI

Produção de tanases por biofilmes de *Aspergillus ochraceus* e potencial de aplicação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Química, UNESP, Araraquara, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

ARARAQUARA

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

A658p Aracri, Fernanda Mansano
Produção de tanases por biofilmes de *Aspergillus ochraceus* e potencial de aplicação / Fernanda Mansano
Aracri. – Araraquara-SP : [s.n.], 2019
98 f. : il.

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

1. *Aspergillus*. 2. Biofilmes. 3. Enzimas. 4. Biotecnologia.
5. Fermentação. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Produção de lanases por biofilmes de *Aspergillus ochraceus* e potencial de aplicação"

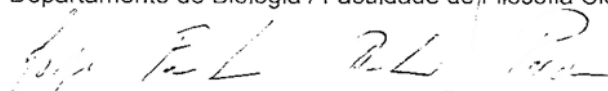
AUTORA: FERNANDA MANSANO ARACRI

ORIENTADOR: LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES
Departamento de Biologia / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto



Prof. Dr. JORGE FERNANDO BRANDÃO PEREIRA
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Prof.^a. Dr.^a. SANDRA REGINA POMBEIRO SPONCHIADO
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 22 de fevereiro de 2019

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Fernanda Mansano Aracri

Nome em citações bibliográficas: ARACRI, F. M.

ENDEREÇO PROFISSIONAL: Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Avenida Bandeirantes, 3900, Monte Alegre. 14040-901 - Ribeirão Preto, SP – Brasil

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2017 - Mestrado em Biotecnologia (Conceito CAPES 6). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil. Título: Produção de tanases utilizando biofilmes de *Aspergillus ochraceus*. Orientador: Luís Henrique Souza Guimarães. Bolsista do (a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2012 – 2016 - Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, Brasil.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2018- Empreendedorismo de base biotecnológica: o caso de estudo da SilicoLife. (Carga horária: 2h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2018- Biologia matemática. (Carga horária: 3h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2015- Noções básicas de Soros e Vacina. (Carga horária: 4h). Instituto Butantã, IBU, Brasil.

2015- Extensão universitária em Gestão de projetos: premissas e aplicações do PMBOK. (Carga horária: 45h).

Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Brasil.

2015- Minicurso de Cerveja Artesanal: da arte ao copo. (Carga horária: 4h).

Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Brasil.

2015- Extensão universitária em Monitoria de Farmacobotânica. (Carga horária: 60h).

Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Brasil.

2014 – Minicurso de Toxicologia Forense. (Carga horária: 9h).

SBTOX

PROJETOS DE PESQUISA

2015 - 2016 Avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos da *Sclerotinia sclerotiorum* (mofo branco) (PIBIC).

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

ALVES, M. D.; ARACRI, F. M.; CREN, E. C.; MENDES, A. A. Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. Chemical Engineering Journal, v. 311, p. 1-12, 2017.

Resumos publicados em anais de congressos

ARACRI, F. M.; CAVALCANTI, R. M. F.; GUIMARÃES, L. H. S. Produção de tanases utilizando biofilmes de *Aspergillus ochraceus* e síntese de propilgalato. In: VIII Congresso Farmacêutico e IV Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2018, Araraquara. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 2018. v. 39.

ALVES, M. D.; ARACRI, F. M.; CREN, E. C.; MENDES, A. A. Influence of protein loading on the catalytic properties of immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosus* on poly-(styrene-divinylbenzene): Determination of thermodynamic and isotherm parameters. In: XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática (XII ENZITEC), 2016, Caxias do Sul -RS. Programa Oficial, 2016.

DELL DUCAS, J.; ARACRI, F. M.; MENDES, A. A. Optimization of the immobilization of a microbial lipase via physical adsorption on mesoporous hydrophobic resin. In: XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática (XII ENZITEC), 2016, Caxias do Sul -RS. Programa Oficial, 2016.

ARACRI, F. M.; BASSI, J. J.; MENDES, A. A. Otimização do processo de imobilização de lipase microbiana via adsorção física em suporte hidrofóbico. In: IV Jornada Científica de Biotecnologia - IV JOBITU, 2016, Alfenas. Anais da IV JOBITU, 2016.

VERDE, B. A.; ARACRI, F. M.; BASSI, J. J.; MENDES, A. A. Influência de temperatura na síntese de éster de cera e determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos. In: IV Jornada Científica de Biotecnologia - IV JOBITU, 2016, Alfenas. Anais da IV JOBITU, 2016.

Apresentações de Trabalho

ARACRI, F. M.; CAVALCANTI, R. M. F.; GUIMARÃES, L. H. S. Produção de tanase utilizando biofilmes de *Aspergillus ochraceus* e síntese de propil galato. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

ARACRI, F. M.; GUIMARÃES, L. H. S. Produção de tanases utilizando biofilmes de *Aspergillus*. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

ARACRI, F. M.; BASSI, J. J.; MENDES, A. A. Otimização do processo de imobilização de lipase microbiana via adsorção física em suporte hidrofóbico. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

XXIV Congresso latino-americano de microbiologia e XL CONGRESSO CHILENO DE MICROBIOLOGIA- ALAM 2018 (Santiago-Chile).

VIII Congresso Científico da UNESP e IV Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. 2018 (Araraquara-SP).

Seminário: Imobilização de Enzimas como ferramenta na produção de Biocatalisadores. 2014 (Alfenas-MG).

59º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA. 2013 (Águas de Lindóia-SP).

5º Congresso Brasileiro de Biotecnologia. 2013 (Florianópolis-SC).

II CICLO DE SEMINÁRIOS EM GENÉTICA. 2013 (Alfenas-MG).

Semana Global do Empreendedorismo. 2013 (Alfenas-MG).

Workshop Genômica, análise de transcriptomas e epigenômica: Princípios e aplicações. 2013 (Alfenas-MG).

II Ciclo de Seminários do PET Fisioterapia. 2012 (Alfenas-MG).

III Jornada Científica de Biotecnologia da UNIFAL-MG. 2012 (Alfenas-MG).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, José Fernando, Edna e Lucas, por todo apoio, amor, carinho e compreensão durante todos os momentos desta e de muitas trajetórias.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pela oportunidade desta vida, para a minha própria evolução, me proporcionando luz, força, fé e amor no meu caminhar.

Ao meu pai, José Fernando Favarão Aracri e a minha mãe Edna Mansano Aracri, por todo apoio, carinho, dedicação e paciência nesta jornada. Amo vocês.

Ao meu irmão Lucas, pela paciência, amor, compreensão e partidas de Clash Royale. Amo você.

Aos meus amores, paçoca e pépi, pela lealdade e momentos felizes. Chegar em casa e ser recebida por vocês é a melhor sensação do mundo!

Aos meus avós Dulce e Roque Aracri (*in memoriam*), Maria e Miguel (*in memoriam*), meus amores e exemplos de garra e honestidade.

Aos meus tios, tias, primos e primas pelos reencontros e palavras de apoio nestes dois anos que estive em Ribeirão Preto. Serei eternamente grata por tudo o que fizeram por mim. Amo vocês.

Ao meu Amor, Pedro Augusto, pelo amor, carinho, companheirismo e paciência em estar sempre ao meu lado me apoiando e me incentivando nos momentos difíceis. Amo você.

Aos meus eternos e fiéis amigos de vida, Bi, Ju, Memé, Naná, Gabi, Lu, Luísa, Larissa, Lívia, Jéssica, André e Gabriel por estarem comigo em todos os momentos nesses muitos anos de amizade. Obrigada por todos os churrascos e barzinhos. Com certeza, essa amizade será eterna. Amo vocês infinitamente.

Aos meus amores da “doismiledose” por estarem sempre presentes e me apoiando mesmo distantes. Saudades. Amo vocês.

Ao prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães, pela oportunidade, confiança depositada, pelos ensinamentos e orientações. Muito obrigada.

A minha amiga Rayza Morganna pelos ensinamentos, atenção, paciência e risadas.

A minha amiga Chadia pela hospedagem em Araraquara, cafés da manhã espetaculares, áudios de quinze minutos e muitas risadas.

A minha amiga Larissa que me recebeu tão bem quando mudei para Ribeirão Preto, companheirismo, risadas e idas à academia.

A minha amiga Isabela, pelo companheirismo nas matérias condensadas, risadas e pela bondade e energia positiva que transmite.

Aos amigos que Ribeirão Preto me proporcionou. Thaís, Pedro, Luís e Camila pelo companheirismo, amizade, risadas, auxílios no laboratório, idas à Rossi e ao Marcão. Sem vocês os dias seriam chatos e não teriam luz!!!

Ao professor e amigo Dr. Adriano Aguiar Mendes, agradeço imensamente pelas conversas e apoio durante a graduação e início do mestrado. Seus ensinamentos me inspiram!

Ao técnico Maurício pelo auxílio e apoio no laboratório.

A Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, pela disponibilidade para a realização desta pesquisa.

Aos funcionários do Instituto de Química de Araraquara, UNESP, por estarem sempre à disposição quando foi necessário, em especial às secretárias da Pós-Graduação em Biotecnologia.

A CAPES e FAPESP, pelo suporte financeiro.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”

Paulo Freire

“É preciso exigir de cada um o que cada um pode dar.”

O pequeno príncipe-Antoine de Saint-Exupéry

Resumo

A utilização de biofilmes como forma inovadora para cultivar fungos filamentosos tem sido cada vez mais empregada na produção de enzimas. Quando o fungo se desenvolve aderido a uma superfície, formando então o biofilme, seu metabolismo é amplificado e conseqüentemente sua secreção enzimática. Deste modo, a fermentação por biofilme (FB) torna-se uma alternativa atrativa para a produção de enzimas, que são um dos principais produtos de interesse biotecnológico. Dentre as enzimas produzidas por fungos filamentosos, as tanases se destacam devido sua ampla gama de aplicações industriais, como na indústria de alimentos, bebidas, ração animal, farmacêutica e química. Estas enzimas atuam na hidrólise de ligações éster de taninos hidrolisáveis, como o ácido tânico, liberando glicose e ácido gálico, o qual é intermediário na síntese de compostos como o propil-galato (utilizado como aditivo na indústria de alimento), pirogalol (conservante) e trimetropina (antibacteriano). Desta forma, esta pesquisa visou a produção de tanases por biofilmes de *Aspergillus ochraceus* desenvolvidos em suporte inerte de polietileno. Em FB o fungo foi cultivado em condições ótimas em meio Khanna tendo 1,5% (m/v) de ácido tânico como fonte de carbono e 0,1% (m/v) de extrato de levedura como fonte adicional de nitrogênio, por 72 horas a 28°C, 50 rpm e pH inicial 5,0. A tanase de *A. ochraceus* apresentou temperatura ótima aparente de 30°C e pH ótimo aparente de 6,0. Mostrou também boa estabilidade na faixa de 30°-40°C, apresentando ainda 50% de sua atividade inicial nos tempos de 100 e 180 minutos, respectivamente. Os valores de pH de 5,0-6,0 foram os mais estáveis. A atividade enzimática foi aumentada na presença de ureia, MnCl₂ e NH₄Cl, e inibida na presença de íons Ag⁺ e Ba²⁺. A aplicação do extrato bruto para tratamento de efluentes de curtume do couro de bode reduziu em 83% o teor de taninos presentes após 2 horas de incubação. Também reduziu em 62% o teor de taninos presentes na farinha de sorgo após 5 dias de tratamento. A enzima contida no extrato foi capaz de produzir propil-galato, sendo a maior produção obtida em 96 horas de reação. Os biofilmes foram ainda reutilizados e um aumento de 20,5% e 30,5% foram observados na atividade enzimática, respectivamente, na primeira e segunda reutilização. Foi realizada a microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes (MEV), na qual a formação de canais foi observada, o que permite a troca eficiente de nutrientes entre o biofilme fúngico e o ambiente. Deste modo, o fungo *A. ochraceus* em FB apresentou bom potencial na produção de tanase com propriedades importantes para aplicação industrial.

Palavras-chave: *Aspergillus ochraceus*; Efluente; Fermentação por biofilme; Propil-galato; Tanino acil hidrolase.

ABSTRACT

The use of biofilms as an innovative way to grow filamentous fungi has been increasingly employed in the production of enzymes. When the fungus develops adhered to a support, then forming the biofilm, its metabolism is amplified and consequently its enzymatic secretion. In this way, biofilm fermentation (BF) becomes an attractive alternative for the production of enzymes, which are one of the main products of biotechnological interest. Among the enzymes produced by filamentous fungi, the tannases stand out due to their wide range of industrial applications, such as the food, beverage, animal feed, pharmaceutical and chemical industries. These enzymes act on the hydrolysis of ester bonds of hydrolysable tannins, such as tannic acid, releasing glucose and gallic acid, which is intermediate in the synthesis of compounds such as propyl gallate (used as an additive in the food industry), pyrogallol (preservative) and trimethoprim (antibacterial). Thus, this research aimed at the production of tannases by *Aspergillus ochraceus* biofilms developed in inert polyethylene support. In BF the fungus was cultivated under optimum conditions in Khanna medium containing 1.5% (w/v) tannic acid as a carbon source, 0.1% (w/v) yeast extract as an additional source of nitrogen, for 72 hours at 28° C, 50 rpm and initial pH of 5.0. The *A. ochraceus* tannase had an optimum apparent temperature of 30°C and an optimum apparent pH of 6.0. It also showed good stability in the 30-40 range presenting as well 50% of its activity on 100 and 180 minutes, respectively. The pH values of 5-6 were the most stable. The enzymatic activity was increased in the presence of urea, MnCl₂ and NH₄Cl, and inhibited in the presence of Ag⁺ and Ba²⁺ ions. The application of the crude extract to treat tannery effluents from goat leather reduced the content of tannins present after 2 hours of incubation by 83%. Also reduced by 62% the content of tannins present in sorghum flour after 5 days of treatment. The enzyme contained in the extract was also capable of producing propyl gallate, and the highest yield was obtained in 96 hours of reaction. Biofilms were also reused and an increase of 20.5% and 30.5% were observed in the enzymatic activity, in the first and second reuse respectively. Scanning electron microscopy of biofilms was performed, in which channel formation was observed, which allows the efficient exchange of nutrients between the fungi biofilm and the environment. Finally, the fungus *A. ochraceus* in BF presented good potential in the production of tannase with important properties for industrial application.

Keywords: *Aspergillus ochraceus*; Wastewater; Biofilm fermentation; propyl gallate; Tannin acyl hydrolase.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C - graus Celsius
BDA - Batata Dextrose Ágar
BSA – Albumina de Soro Bovino
DEAE - Diethylaminoethyl
EC - Enzyme Commission
EDTA -ácido etilenodiaminotetracético
FB- Fermentação por biofilme
FSbm - Fermentação Submersa
FES - Fermentação em Estado Sólido
kDa - mil Daltons
M – Molar (mol/dm³)
mA - miliampére
mg – miligrama
mL - mililitro
mM - milimolar (mmol/dm³)
m/v - massa por volume
PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida
pH - potencial hidrogeniônico
qsp - quantidade suficiente para
rpm - rotações por minuto
SDS - duodecil sulfato de sódio
TAH - tanino acil hidrolase
V - volts
v/v - volume por volume
U - unidade de atividade
µL – microlitro
µmol - micromol
λ - comprimento de onda

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos diferentes grupos de taninos.....	22
Figura 2. Estrutura dos taninos hidrolisáveis.....	23
Figura 3. Estrutura química do ácido tânico	23
Figura 4. Estrutura química de tanino condensado	24
Figura 5. Hidrólise do ácido tânico pela tanase	26
Figura 6. Conversão de propil-galato em ácido gálico pela tanase em função do meio reacional.....	31
Figura 7. Conidióforo de <i>Aspergillus flavus</i>	34
Figura 8. Modelo de desenvolvimento para biofilmes de fungos filamentosos	38
Figura 9. Esquema simplificado dos experimentos realizados neste trabalho.	42
Figura 10. Biofilme fúngico de <i>A. ochraceus</i> desenvolvido sobre suporte inerte de polietileno após 24, 48 e 72 horas de incubação em meio Khanna a 28°C sob agitação (50 rpm), utilizando glicose (2% m/v) como fonte de carbono.	55
Figura 11. Desenvolvimento dos biofilmes fúngicos de <i>A. ochraceus</i> cultivado nos meios SR, Czapeck, M5, Khanna e Mineral por 72 horas à 28°C e 50 rpm, com glicose 2% como fonte de carbono.....	57
Figura 12. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do biofilme de <i>A. ochraceus</i> . Crescimento de hifas sobre o suporte inerte de polietileno por 24h (A), 48h (B) e 72h (C e D). As setas em C e D indicam os canais.	58
Figura 13. Produção de tanase por biofilmes de <i>A. ochraceus</i> em meio Khanna tendo ácido tânico 1% (m/v) e ácido gálico 1% (m/v) como fontes de carbono a 28°C e 50 rpm, em função do tempo de cultivo.....	64

Figura 14. Produção de tanases por biofilme de <i>A. ochraceus</i> em meio Khanna em função da concentração de ácido tânico e ácido gálico como fontes de carbono, a 28°C e 50 rpm por 72 horas.	66
Figura 15. Produção de tanase por biofilmes de <i>A. ochraceus</i> em função de diferentes fontes de nitrogênio e em função de diferentes concentrações de extrato de levedura.....	68
Figura 16. Influência do pH inicial do meio de cultivo na produção de tanase por <i>A. ochraceus</i>	69
Figura 17. Perfil eletroforético em condições desnaturantes (12% SDS-PAGE) para as proteínas obtidas do filtrado extracelular bruto do cultivo de <i>A. ochraceus</i>	71
Figura 18. Determinação do pH e temperatura ótimos aparentes para atividade tanásica extracelular produzida pelo fungo <i>Aspergillus ochraceus</i> em FB.....	73
Figura 19. Estabilidade térmica da tanase produzida em FB por <i>A. ochraceus</i> nas temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C, 50°C e 60°C, e estabilidade ao pH frente aos valores de pH 5,0, 6,0 e 7,0.....	74
Figura 20. Perfil cromatográfico em camada delgada (CCD) para a síntese de propil galato a partir da esterificação do ácido tânico.....	79
Figura 21. Teor de taninos e de compostos fenólicos totais presentes nas amostras de efluentes obtidos do processo de curtição manual e em máquina após tratamento enzimático	81
Figura 22. Teor de taninos e fenóis presentes nas amostras de farinha de sorgo	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fungos filamentosos e leveduras produtores de tanase.....	29
Tabela 2. Produção de tanases extracelulares por biofilmes de <i>Aspergillus ochraceus</i> desenvolvido nos meios Khanna e Mineral, e transferidos para fermentação nos meios Czapeck, M5, SR, Mineral e Khanna.	60
Tabela 3. Influência da fonte de carbono na produção de tanases extracelulares a partir de biofilmes de <i>A. ochraceus</i> induzidos no meio Khanna e transferidos para fermentação em meio Khanna.	63
Tabela 4. Melhores condições para a produção tanásica extracelular por biofilmes de <i>A. ochraceus</i>	70
Tabela 5. Efeito de diferentes sais na atividade tanásica extracelular do fungo <i>A. ochraceus</i>	76
Tabela 6. Efeito de compostos químicos na atividade tanásica extracelular do fungo <i>A. ochraceus</i>	78
Tabela 7. Reutilização dos biofilmes fúngicos de <i>A. ochraceus</i> em mais de uma etapa de fermentação.....	84

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Taninos	21
1.1.1 Galotaninos e Elagitaninos	22
1.1.2 Taninos Condensados	24
1.1.3 Taninos Complexos	25
1.1.4 Aplicação industrial dos taninos	25
1.2 Tanases	26
1.2.1 Fontes de tanase	27
1.2.2 Aplicação das tanases	30
1.3 Fungos Filamentosos	32
1.3.1 O gênero <i>Aspergillus</i>	33
1.3.1.1 <i>Aspergillus ochraceus</i>	34
1.3.2. Produção enzimática por fungos filamentosos	35
1.4. Biofilmes fúngicos	35
1.4.1 Fermentação por biofilme	38
2. OBJETIVO	40
2.1 Objetivo geral	40
2.2 Objetivos específico	40
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Microrganismo e manutenção da linhagem em laboratório	43
3.2 Obtenção dos biofilmes	43
3.3 Composição dos meios de cultivo	44
3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	46
3.5 Produção de tanases por fermentação por biofilme	46
3.6 Obtenção do filtrado extracelular	47
3.7 Determinação da atividade tanásica	47

3.8	Quantificação de proteínas.....	48
3.9	Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de tanases	48
3.10	Efeito do tempo de fermentação na produção de tanases	48
3.11	Efeito de diferentes fontes adicionais de nitrogênio na produção de tanases	49
3.12	Produção de tanase em função do pH de cultivo.....	49
3.13	Caracterização bioquímica das tanases.....	49
3.13.1	Temperatura ótima e estabilidade térmica	49
3.13.2	pH ótimo e estabilidade ao pH	50
3.13.3	Efeito de diferentes compostos na atividade tanásica	50
3.14	Eletroforese em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE 12%)	50
3.15	Aplicações da tanase	51
3.15.1	Síntese de propil galato	51
3.15.2	Aplicação da tanase em efluentes de curtume	52
3.15.2.1	Quantificação dos taninos.....	52
3.15.2.2	Determinação dos compostos fenólicos totais	53
3.15.3	Tratamento do sorgo.....	53
3.16	Reutilização dos biofilmes fúngicos.....	54
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1	Obtenção dos biofilmes.....	55
4.2	Estudo morfológico dos biofilmes de <i>Aspergillus ochraceus</i>	57
4.3	Determinação dos melhores parâmetros para a produção de tanases em FB	59
4.3.1	Influência da composição do meio de cultivo na produção de tanases	59
4.3.2	Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção tanásica .	61
4.3.3	Influência do tempo de cultivo na produção tanásica	63
4.3.4	Influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção tanásica	66

4.3.5	Influência do pH inicial do cultivo na produção de tanase por FB ...	69
4.4	Eletroforese em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE 12%)	70
4.5	Influência da temperatura e do pH na atividade tanásica.....	72
4.6	Efeito de diferentes sais e outros compostos na atividade tanásica ..	74
4.7	Aplicações da tanase produzida por biofilmes de <i>A. ochraceus</i>	78
4.7.1	Síntese de propil-galato.....	78
4.7.2	Aplicação da tanase em efluentes de curtume	80
4.7.3	Sorgo	81
4.8	Reutilização dos biofilmes fúngicos.....	83
5.	Conclusões	85
	REFERÊNCIAS.....	86

1 INTRODUÇÃO

Os processos biotecnológicos têm representado mundialmente uma nova opção para a produção de metabólitos de interesse industrial, apresentando vantagens quando comparados aos processos químicos convencionais (MENDES et al., 2011). As enzimas são um dos principais produtos de interesse biotecnológico e processos alternativos para a sua produção têm sido cada vez mais explorados com a finalidade de se reduzir custos e elevar a produtividade. (FLORÊNCIO, BALDINO e FARINAS, 2017). Um exemplo é a utilização de biofilmes, uma forma inovadora e eficiente de cultivar fungos filamentosos uma vez que os aspectos morfológicos dos biofilmes fúngicos contribuem para a produção de enzimas (VILLENA e GUTIERREZ-CORREA, 2007).

Devido às inúmeras aplicações industriais existentes para a tanase, é justificável a busca de formas alternativas para a obtenção desta enzima, visando a otimização e o barateamento do processo. Desta forma, torna-se atrativa a fermentação por biofilmes (FB) de fungos filamentosos. Grande parte dos fungos relatados com capacidade para sintetizar tanases tem sido isolada a partir do solo como *Aspergillus phoenicis* (RIUL et al., 2013) e *Aspergillus ochraceus* (GONÇALVES et al., 2012). O fungo filamentoso *A. ochraceus* foi escolhido para este estudo uma vez que foi capaz de produzir tanases tanto em fermentação submersa como em fermentação em substrato sólido, como descrito por Gonçalves et al. (2012) e Gonçalves et al. (2013), sendo um candidato interessante para a investigação da produção de tanases utilizando FB.

A fermentação utilizando biofilmes fúngicos tem sido utilizada para a obtenção de diferentes produtos, entre eles as enzimas como, por exemplo, a celulase e a fitase produzidas por biofilmes de *A. niger* e *R. microsporus*, respectivamente (VILLENA E GUITIERREZ-CORREA, 2006; SATO et al., 2016). Contudo, até o momento, não foi descrita a produção de tanases por biofilmes fúngicos, sendo que o gênero *Aspergillus* é o que mais se destaca na produção destas enzimas (SELWAL e SELWAL, 2012).

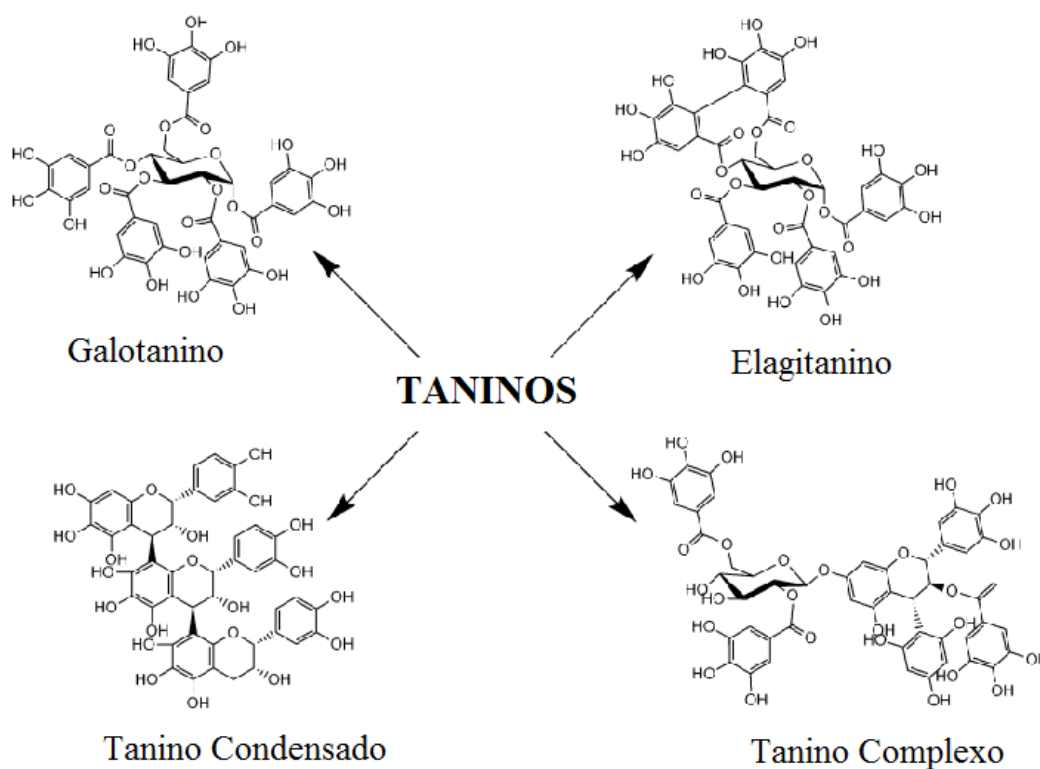
1.1 Taninos

Durante o período de crescimento e maturação em plantas, algumas substâncias podem ser encontradas em sua estrutura e estas apresentam papel essencial em seu desenvolvimento. Estas substâncias são chamadas de metabólitos secundários. Um dos mais importantes metabólitos secundários são os polifenóis (HASSANPOUR et al., 2011) e dentre eles, destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos e os taninos (ANGELO; JORGE, 2007).

Taninos são compostos polifenólicos naturais solúveis em água que são encontrados em cascas, galhos, folhas e frutos de plantas vasculares, com massa molecular variando de 0,3 a 5 kDa. Estes compostos estão presentes também em algumas plantas não vasculares (ARBENZ e AVÉROUS, 215). O teor e o tipo de tanino variam não só de um vegetal para outro como também de uma parte para outra do mesmo vegetal (BATTESTIN, MATSUDA e MACEDO, 2004). São o quarto constituinte vegetal mais abundante após a celulose, hemicelulose e lignina (RANA e BHAT, 2005). Formam o segundo grupo mais abundante de fenóis na natureza e possuem atividades biológicas importantes, como proteção de tecidos vegetais contra herbivoria e mecanismo de defesa contra doenças causadas por fungos, bactérias e vírus. Embora saiba-se que os taninos inibem o crescimento microbiano, há um número de microrganismos capazes de degradar estes compostos e ainda crescer utilizando ácido tânico como única fonte de carbono (BANERJEE e PATI 2007). Estes microrganismos desenvolveram mecanismos necessários para superar o efeito inibitório do tanino, como a produção da tanase.

Os taninos são considerados os substratos naturais para as tanases, porém estas enzimas também são capazes de degradar ésteres de ácido gálico (LEKHA e LOSANE, 1997). Tradicionalmente, os taninos foram classificados em dois grandes grupos: taninos condensados e taninos hidrolizáveis. A classificação atual e mais aceita divide os taninos em quatro grupos: galotaninos, elagitaninos, taninos condensados e taninos complexos (Figura 1) (CHÁVEZ-GONZÁLEZ et al., 2011).

Figura 1. Estrutura química dos diferentes grupos de taninos

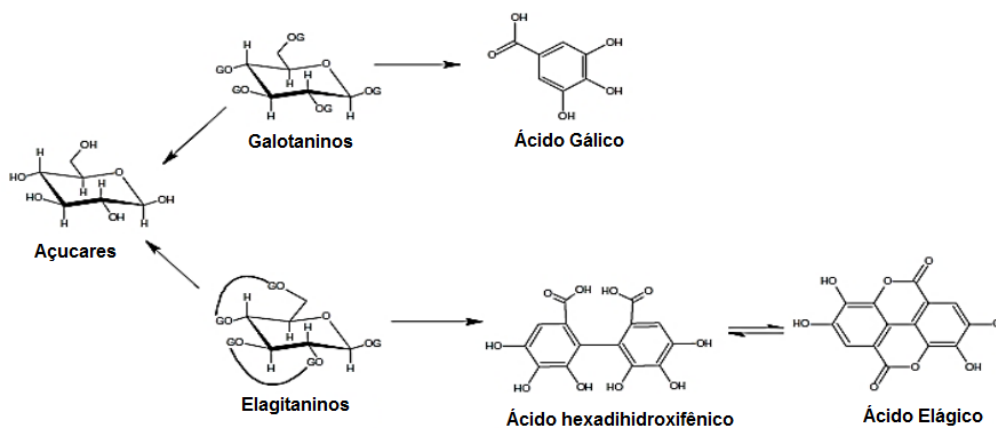


Fonte: Modificado de CHÁVEZ-GONZÁLEZ et al., 2011.

1.1.1 Galotaninos e Elagitaninos

Os galotaninos e os elagitaninos compõem o grupo dos taninos hidrolisáveis. Os taninos hidrolisáveis são compostos quimicamente por um carboidrato central denominado poliálcool (geralmente a D-glucose) com os grupos hidroxila esterificados pelo ácido gálico (galotaninos) ou pelo ácido hexadihidroxifenílico (elagitaninos) (Figura 2). Esses taninos estão sujeitos à hidrólise por ácidos, bases ou por ação enzimática (MIN et al., 2003; PATRA e SAXENA, 2010).

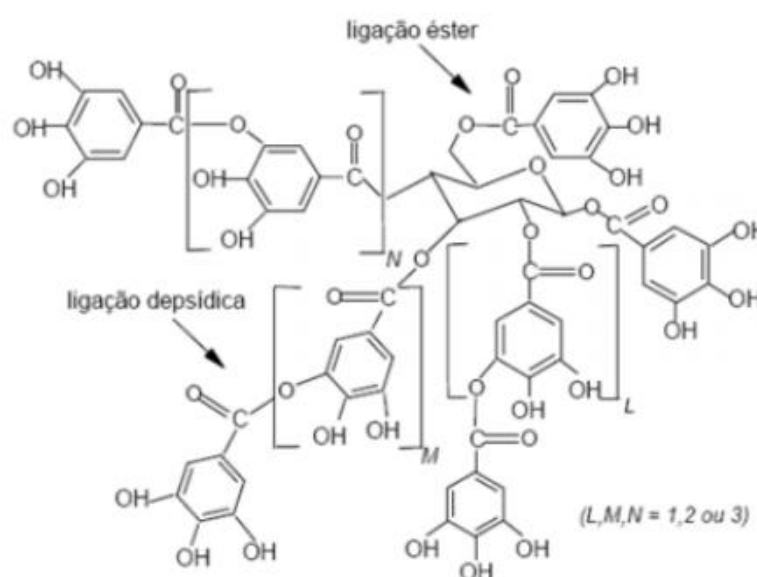
Figura 2. Estrutura dos taninos hidrolisáveis



Fonte: QUEIROZ, MORAIS e NASCIMENTO, 2002.

Os galotânicos são os taninos mais simples que existem e são formados por unidades de galoil ou di-galoil esterificado a um núcleo de glicose ou outro álcool poli-hidroxi. As moléculas são compostas normalmente por um núcleo de glicose contendo de 6 a 9 grupos galoil. O mais comum dos galotânicos é o ácido tânico (Figura 3) (BATTESTIN, MATSUDA e MACEDO, 2004).

Figura 3. Estrutura química do ácido tânico



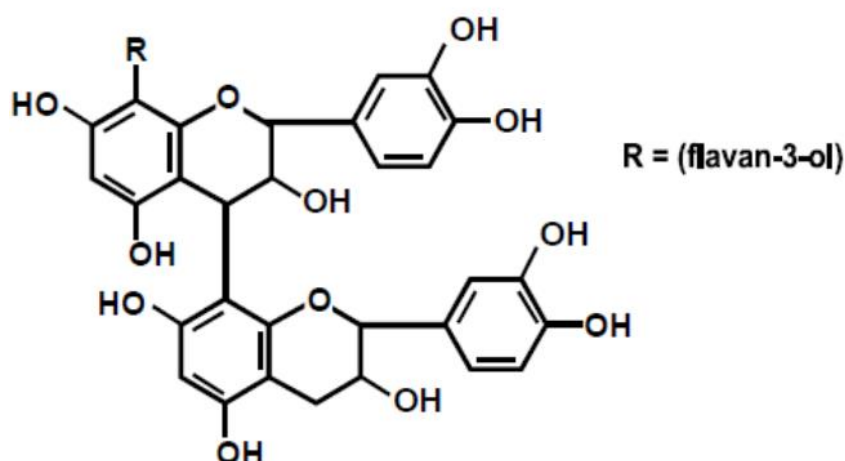
Fonte: Modificado de NAKAMURA, TSUJI e TONOGAI, 2003.

Nos elagitaninos, os grupos fenólicos são moléculas de ácido hexadihidroxifênico que podem se desidratar espontaneamente para formar sua estrutura estável, o ácido elágico (CHÁVEZ-GONZÁLEZ et al., 2011). Os elagitaninos constituem a classe mais conhecida de taninos com mais de 500 produtos naturais identificados (ARBENZ e AVÉROUS, 2015).

1.1.2 Taninos Condensados

Taninos condensados (Figura 4), também intitulados proantocianidinas, são polímeros não-ramificados formados pela condensação de moléculas de flavan-3-ol (catequina) e flavan-3-4-diol (leucoantocianidina), produtos do metabolismo do fenilpropanol, unidas por ligação carbono-carbono. O flavan-3-ol é o metabólito secundário mais abundante produzido pelas plantas. Estes taninos podem conter de duas a cinquenta unidades flavonóides (BATTESTIN, MATSUDA e MACEDO, 2004; SHAY e CONSTABLE, 2018; SCHOFIELD, MBUGUA e PELL, 2001).

Figura 4. Estrutura química de tanino condensado



Fonte: BATTESTIN, MATSUDA e MACEDO, 2004.

Os taninos condensados ocorrem como oligômeros polifenólicos e polímeros em muitas frutas, plantas medicinais e leguminosas forrageiras (ROPIAK et al., 2017). Estes não possuem nenhuma molécula de açúcar e são resistentes à hidrólise. Entretanto, podem ser solúveis em solventes orgânicos aquosos, dependendo de sua estrutura, sendo sujeitos à clivagem quando em meio oxidante dando origem às antocianidinas (BATTESTIN, MATSUDA e MACEDO, 2004).

1.1.3 Taninos Complexos

Taninos complexos são aqueles taninos nos quais a unidade de catequina (flavan-3-ol) é ligada glicosidicamente a uma unidade de galotanino ou elagitanino, apresentando assim características de taninos hidrolisáveis e de taninos condensados. Estes taninos podem sofrer a ação hidrolítica da enzima tanase (CHÁVEZ-GONZÁLEZ et al., 2011).

1.1.4 Aplicação industrial dos taninos

Os taninos apresentam importantes aplicações na indústria como na estabilização da cerveja, processo no qual é utilizado o ácido tânico, que é um tanino hidrolisável, com o objetivo de se reduzir a concentração de proteínas na bebida. Na presença destes compostos as proteínas sofrem precipitação como complexos tanino-proteínas, que são retirados da cerveja através das operações unitárias de sedimentação ou centrifugação seguida de filtração (BATTESTIN, MATSUDA e MACEDO, 2004).

Os taninos são de especial importância na indústria de vinhos, uma vez que são os principais responsáveis pela cor, estrutura e paladar dos vinhos tintos (GÓMEZ-PLAZA e CANO-LÓPEZ, 2011).

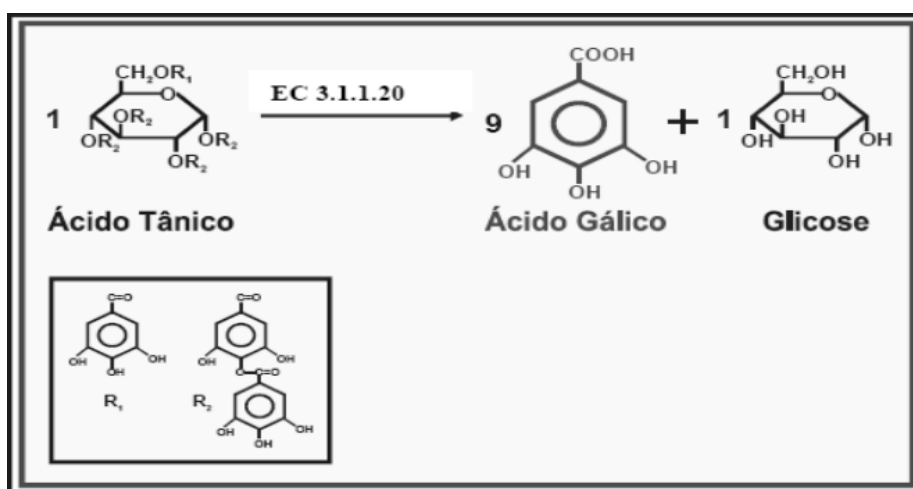
Outra aplicação dos taninos está no curtimento de pele animal para sua transformação em couro e nesse setor o tanino vegetal é o mais utilizado. Os taninos podem ser empregados também na produção de resinas. As resinas

produzidas com tanino vegetal podem apresentar características de ligação interna, viscosidade e tempo de formação de gel semelhantes às resinas comerciais conhecidas (BATTESTIN, MATSUDA e MACEDO, 2004).

1.2 Tanases

Tanino acil hidrolase (TAH; EC 3.1.1.20), usualmente chamada de tanase, é uma enzima induzível podendo ser produzida na presença de ácido tânico. É responsável pela hidrólise de ésteres e ligações laterais (depsídicas) em vários substratos, como o ácido tânico, que é um tanino hidrolisável, liberando ácido gálico e glicose (Figura 5) ou ácido elágico (no caso dos elagitaninos) (SETH e CHAND, 2000; CHÁVEZ-GONZÁLEZ et al., 2011; WU et al., 2016; YAO et al., 2014).

Figura 5. Hidrólise do ácido tânico pela tanase



Fonte: MACEDO et al., 2005.

A tanase é uma enzima que pode estar ligada à membrana (intracelular) ou ser secretada para o meio externo (extracelular) (GOUVEIA et al., 2012). A indução da produção enzimática pode ocorrer pela presença do ácido tânico como fonte principal de carbono ou do seu produto final de hidrólise, que é o ácido gálico (COSTA et al., 2012). Deste modo, a utilização do ácido tânico ou

outro indutor, como ésteres de ácido gálico, como fonte carbono se torna essencial para que o microrganismo produza a tanase. Outras fontes de carbono podem estar presentes no meio, entretanto é a concentração de ácido tânico o fator predominante na produção da enzima (BATTESTIN e MACEDO, 2007).

A THA hidrolisa ainda outros substratos, como os éteres de ácido gálico: metil-galato, o propil-galato, o ácido digálico, o galato de epicatequina e galato de epigalocatequina, liberando ácido gálico (RODRÍGUES- DURÁN et al., 2011). Catalisa também a hidrólise de taninos complexos, mas é incapaz de hidrolisar taninos condensados uma vez que não afeta as ligações carbono-carbono presentes nestes compostos (RODRÍGUES- DURÁN et al., 2011).

Teighem (1867) foi o primeiro autor a descrever esta enzima ao analisar duas espécies de fungos, *Penicillium glaucum* e *Aspergillus niger*, que cresceram na presença de taninos. A tanase é produzida não somente por fungos filamentosos, mas também por bactérias e leveduras (AGUILAR et al., 1999).

1.2.1 Fontes de tanase

As tanases podem ser extraídas de fontes vegetais, animais e microbianas (RAMOS et al., 2011). No caso dos vegetais, podem ser obtidas principalmente a partir de frutos, folhas e cascas. A tanase de fontes vegetais é menos estável em comparação às tanases de fontes microbianas (BELUR e MUGERAYA, 2011). Em fontes animais a tanase pode ser extraída do intestino de bovinos ou das mucosas ruminais. Existem relatos também de que alguns insetos produzem a enzima durante seu estado larval (AGUILAR e GUTIERREZ-SANCHEZ, 2001).

Contudo, são as fontes microbianas as preferidas para a produção industrial desta enzima, destacando-se principalmente os fungos (Tabela 1). As enzimas produzidas por fontes microbianas são mais estáveis do que as similares obtidas de outras fontes (LEKHA e LONSANE, 1997). Os microrganismos podem produzir tanases continuamente e em grandes quantidades, resultando assim em um maior rendimento a partir da determinação

de métodos de fermentação otimizados (MELO et al., 2014). A importância dos fungos filamentosos como fontes de enzimas pode ser explicada devido a sua ampla diversidade bioquímica, possibilidade de manipulação genética e elevada produção e secreção do produto no meio extracelular, facilitando sua recuperação do meio de fermentação (WU et al., 2016; GUIMARÃES e SOUZA, 2017).

Tabela 1. Fungos filamentosos e leveduras produtores de tanase.

Microrganismo	Forma de produção	Tempo de cultivo	Referências
<i>Aspergillus</i> sp. GM4	FSbm	72 horas	Melo et al. (2014)
<i>Aspergillus</i> ssp. UCP1284	FES	48 horas	Liu et al. (2016)
<i>Aspergillus aculeatus</i>	FES	72 horas	Bagga, Pramanik e Pandey (2015)
<i>Aspergillus carbonarius</i>	FES	72 horas	Valera et al. (2015)
<i>Aspergillus foetidus</i>	FES modificada	72 horas	Mukherjee e Banerjee (2006)
<i>Aspergillus fumigatus</i> Cas- 21	FSbm	24 horas	Cavalcanti et al. (2017)
<i>Aspergillus japonicus</i> 246A	FSbm	24 horas	Bradoo et al. (1997)
<i>Aspergillus niger</i>	FSbm/FES	72 horas	Lal et al. (2012)
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16620	FSbm	—	Sabu et al. (2015)
<i>Aspergillus niger</i> FBT1	FSbm	72 horas	George e Ong (2013)
<i>Aspergillus niger</i> Van Tieghem	FSbm	96 horas	Aboubakr et al. (2013)
<i>Aspergillus ochraceus</i>	FSbm	72 horas	Gonçalves et al. (2012)
<i>Aspergillus oryzae</i>	FSbm	120 horas	Varadharajan et al. (2015)
<i>Aspergillus phoenicis</i>	FSbm	72 horas	Riul et al. (2013)
<i>Aspergillus tamarii</i>	FSbm	144 horas	Costa et al. (2008)
<i>Rhizopus oryzae</i>	FES modificada	72 horas	Mukherjee e Banerjee (2006)
<i>Verticillium</i> sp.	FSbm	21 dias	Kasieczka-Burnecka et al. (2007)

Fonte: Autora.

1.2.2 Aplicação das tanases

Uma das principais aplicações comerciais das tanases está no processamento de chás instantâneos. Uma exigência importante desta bebida é a solubilidade em água fria uma vez que o chá instantâneo é preparado principalmente com água gelada. Um precipitado insolúvel se forma naturalmente quando o preparado é deixado repousando por algumas horas a 4°C ou menos, o que é, portanto, um grande problema na fabricação instantânea de chá. Em baixas temperaturas ocorre a polimerização de polifenóis (taninos presentes nas folhas de chá) e também a interação da cafeína e das proteínas com tais componentes, levando à precipitação. A utilização de tanase evita o uso de substâncias químicas para a remoção destes compostos, assegurando um produto final de excelente qualidade, solúvel em água e caracterizado pelo alto conteúdo de componentes aromáticos e coloração apropriada (BENIWAL et al., 2013).

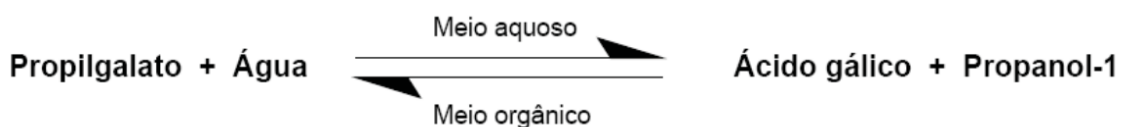
Ainda com relação à indústria de bebidas, é utilizada na fabricação de vinhos. A aplicação de tanases nos produtos do tratamento da uva favorece a remoção de compostos fenólicos, estabilizando e incrementando a qualidade dos vinhos. Grande parte da coloração do vinho é proveniente da presença de taninos. Quando a bebida entra em contato com o ar ocorre a oxidação destes componentes o que pode causar uma turbidez indesejável e conseqüentemente perda de qualidade do produto final. Tal turbidez pode ser evitada com a utilização desta enzima, impedindo assim que ocorra a reação de oxidação (AGUILAR e GUTIERREZ-SANCHEZ, 2001; BATTESTIN, MATSUDA e MACEDO, 2004).

No que se refere às rações animais, a adição de tanase em rações contendo taninos beneficia a digestão dos animais ao remover esses compostos indesejados, favorecendo a assimilação dos nutrientes (MURUGAN e AL-SOHAIBANI, 2010). Um exemplo disto é o sorgo, o quinto cereal mais produzido em todo o mundo, empregado na formulação de rações. Os taninos presentes no grão podem formar complexos estáveis com proteínas e minerais, diminuindo assim a digestibilidade e valor nutricional da ração (SCHON, BATTESTIN e MACEDO, 2012).

Na indústria de alimentos, a aplicação das tanases está relacionada com a remoção de certas substâncias indesejadas e na produção industrial de ácido gálico, cujos ésteres são usados como agentes de conservação (BARTHOMEUF et al., 1994). Pode ser aplicada também no tratamento de efluentes proporcionando uma opção mais eficaz e de baixo custo na remoção dos taninos presentes no processo de curtimento do couro. Este processo utiliza, além de diferentes substâncias químicas, taninos para o tratamento da pele, gerando um efluente altamente poluído com elevadas concentrações de substâncias orgânicas e inorgânicas (AGUILAR e GUTIERREZ-SANCHEZ, 2001; BATTESTIN, MATSUDA e MACEDO, 2004; CASSANO et al., 2001).

Entretanto, é na produção de ácido gálico que temos sua aplicação industrial mais importante, uma vez que esta molécula é intermediária na síntese de compostos como o propil-galato (utilizado como aditivo na indústria de alimento), pirogalol (conservante) e a trimetropina (agente antibacteriano) (LEKHA e LONSANE, 1997). Com relação à síntese de propil-galato, de forma similar a outras esterases, a tanase em meio aquoso catalisa predominantemente reações hidrolíticas. Entretanto, em meios orgânicos com teores reduzidos ou nulos de água, as reações de esterificação passam a ser predominantes (Figura 6) (PINTO et al., 2005).

Figura 6. Conversão de propil-galato em ácido gálico pela tanase em função do meio reacional.



(Fonte: PINTO et al., 2005).

O propil-galato é um antioxidante alimentar de grande interesse uma vez que previne a oxidação lipídica (ADEGOKE et al., 1998). O ácido gálico é o substrato para a síntese química ou enzimática do propil-galato (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2011). Como antioxidante primário, o propil-galato promove a

remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação de oxidação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo assim a reação em cadeia gerada por esta, prevenindo então a degradação de lipídeos (RAMALHO e JORGE, 2006).

1.3 Fungos Filamentosos

O primeiro item a ser definido para o desenvolvimento do processo de produção de enzimas é a seleção da linhagem do microrganismo (BATTESTIN, MATSUDA e MACEDO, 2004).

Os fungos são organismos eucarióticos, que podem ser unicelulares, como as leveduras ou multicelulares, como os fungos filamentosos (TORTORA, FUNKE, e CASE, 2012). São metabolicamente versáteis e amplamente distribuídos na natureza. Eles existem em associação com outras espécies como, por exemplo, os líquens e como patógenos de animais e plantas ou apresentam-se como organismos de vida livre. Muitos são considerados como degradadores primários da natureza porque secretam uma grande variedade de enzimas hidrolíticas que degradam os materiais orgânicos residuais. Muitas espécies produzem metabólitos secundários. Neste contexto, diversas espécies fúngicas são exploradas comercialmente como fontes de enzimas e metabólitos para aplicações industriais (ARCHER, CONNERTON e MACKENZIE, 2008).

Os fungos filamentosos formam massas visíveis chamadas de micélios, compostas de longos filamentos (hifas) que se ramificam e se entrelaçam. O micélio é responsável por todas as funções vegetativas do organismo. Os fungos podem se reproduzir sexuada e assexuadamente. Tanto a reprodução sexuada quanto a assexuada ocorrem pela formação de esporos e os fungos podem ser identificados por estes devido a variações em suas cores e texturas (CUNHA, 2011; TORTORA, FUNKE, e CASE, 2012).

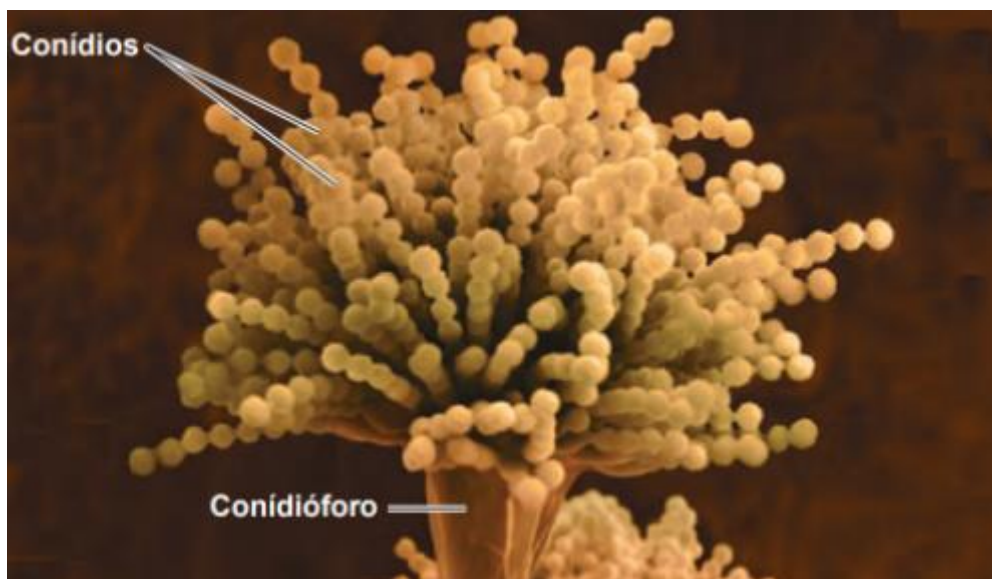
Fungos filamentosos são capazes de crescer em meios de cultura de baixo custo, relativamente simples e produzem elevadas quantidades de enzimas (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2011). São inúmeros os estudos sobre enzimas produzidas por fungos filamentosos, devido à capacidade que

estes possuem de produzir moléculas mais estáveis e em maior quantidade, sendo os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* os mais aplicados para este propósito (CHÁVEZ-GONZÁLEZ et al., 2011).

1.3.1 O gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* foi descrito pela primeira vez em 1729, por Micheli. Compreende fungos filamentosos, anamorfos (reprodução assexuada) e de dispersão cosmopolita, podendo ser encontrados muitas vezes em material vegetal em decomposição. Sua predominância no ambiente natural, facilidade de cultivo em meios laboratoriais e a importância econômica de várias das suas espécies, instigaram o interesse de muitos micologistas e microbiologistas industriais no estudo do gênero. Durante a diferenciação micelial destes fungos, são desenvolvidas as chamadas células podais, em forma de "T" ou "L", ligadas a uma hifa vegetativa que produz um único conidióforo perpendicular ao longo eixo da célula. Uma hifa ereta se desenvolve a partir da célula podal do conidióforo, que forma em seu ápice uma vesícula arredondada ou elíptica. A extremidade da vesícula dá origem a uma camada de células chamadas de métulas ou fiálides, que produzem longas cadeias de esporos mitóticos chamados conídios ou conidiósporos (Figura 7). O tamanho e o arranjo das cabeças dos conidióforos, bem como a cor dos esporos que carregam, são importantes características de identificação. Por exemplo, espécies do grupo *A. niger* possuem esporos pretos, para as espécies do grupo *A. ochraceus* a coloração dos esporos varia de amarelo a marrom, enquanto para *A. fumigatus*, *A. nidulans* e *A. flavus* são verdes (TORTORA, FUNKE, e CASE, 2012; BENNETT, 2010; SCHUSTER et al, 2002; MAESTRELLO, 2018).

Figura 7. Conidióforo de *Aspergillus flavus*.



(Fonte: TORTORA, FUNKE, e CASE, 2012).

1.3.1.1 *Aspergillus ochraceus*

O fungo filamentoso *Aspergillus ochraceus* pertence à Seção *Circumdati*. Se desenvolve em temperaturas moderadas e apresenta temperatura ótima de crescimento na faixa de 25 a 30°C. Morfologicamente é caracterizado pela presença de conídios e vesículas globosas. Seu conidióforo é liso e não septado. É comumente encontrado no solo e em vários alimentos, principalmente os que são armazenados, como os cereais, especiarias e frutas secas. O fungo *A. ochraceus* é capaz de produzir a ocratoxina A (OTA), uma micotoxina nefrotóxica e carcinogênica para alguns animais (KLICH, 2002; PALACIOS-CABRERA et al., 2005).

O uso de *A. ochraceus* para produção de enzimas de interesse biotecnológico tem sido relatado como, por exemplo, por Gonçalves et al. (2012), para a produção de tanases por fermentação submersa, por Betini et al. (2009) para a produção de xilanases por fermentação em estado sólido e por Guimarães et al. (2007), para a produção de β -D-fructofuranosidase extracelular também por fermentação em estado sólido, entre outras.

1.3.2. Produção enzimática por fungos filamentosos

Os métodos comumente utilizados para a produção de enzimas por microrganismos são a fermentação submersa (FSbm) e a fermentação em estado sólido (FES). A produção das enzimas industriais de origem microbiana por FSbm foi amplamente empregada como a tecnologia de produção modelo durante muitos anos (PANDEY et al., 2001). Contudo, nas últimas décadas, a FES tem sido cada vez mais considerada na produção de enzimas, principalmente a partir de sistemas fúngicos. A FES estimula o crescimento de microrganismos em ambiente sólido/úmido, sendo possível a utilização de subprodutos agroindustriais como substrato. É um processo que têm menor necessidade de energia, produz menos águas residuais, são ecologicamente corretos e resolvem o problema da eliminação de resíduos sólidos. Entretanto o aumento de escala é difícil, desfavorecendo a implementação na indústria (PANDEY, 2003).

Algumas das vantagens da produção de enzimas por fungos são: natureza extracelular da enzima, aumento da produção, maiores títulos de atividade e maior estabilidade às alterações de pH e temperatura. Enzimas extracelulares são preferidas uma vez que dispensam métodos de ruptura da célula, os quais são dispendiosos (BATTESTIN, MATSUDA e MACEDO, 2004; MAHADIK et al., 2002; CHÁVEZ-GONZÁLEZ et al., 2011).

Uma alternativa ainda pouco explorada na produção de enzimas é a fermentação utilizando biofilmes fúngicos (VILLENA e GUTIERREZCORREA, 2007).

1.4. Biofilmes fúngicos

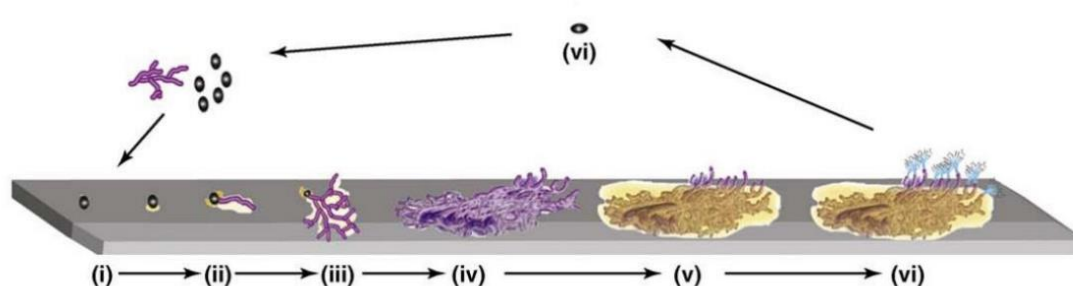
Embora o conceito de biofilme tenha sido desenvolvido para bactérias, fungos filamentosos são aptos a crescer em superfícies, o que é demonstrado

pelo seu modo de nutrição por absorção, secreção de enzimas para digerir moléculas complexas e seu modo de crescimento apical, por hifas (HARDING et al., 2009).

Biofilme é o nome dado ao crescimento microbiano em associação com uma superfície formando um agregado de células (REYNOLDS e FINK, 2001). Trata-se de uma comunidade microbiana séssil, caracterizada por células que estão irreversivelmente ligadas a um substrato, a uma interface ou umas às outras, e estão embebidas em uma matriz polimérica extracelular, por elas produzidas, o que possibilita a comunicação célula-célula. Essa comunidade microbiana sob a forma de biofilme apresenta um fenótipo diferente com relação à taxa de crescimento e transcrição gênica, quando comparada com a célula livre (DOLAN e COSTERTON, 2002). Um dos principais agentes responsável pela adesão fúngica são as hidrofobinas, proteínas anfipáticas que agem como uma cola proteica (HECTOR e SCHOLTMEIJER, 2005). Essas proteínas estabilizam a adesão de esporos e micélio a superfícies hidrofóbicas naturais e artificiais (MANKEL, KRAUSE e KOTHE, 2002). O desenvolvimento de fungos filamentosos no ambiente natural ocorre em associação direta com o substrato, o que parece ser relevante para alguns processos importantes como a adesão do esporo, germinação e crescimento apical de hifas, constituindo o micélio. Durante a formação de um biofilme em um suporte inerte polimérico, os mesmos processos ocorrem, e os fenótipos observados resultam de diferentes expressões gênicas, em comparação com os biofilmes naturalmente formados (AZIANI et al., 2012). As células aderidas apresentam alta taxa metabólica (RAMAGE et al., 2009), além de intensa produção enzimática (SAUER et al., 2002). Segundo Sato et al. (2016), os biofilmes desenvolvidos em matrizes poliméricas permitem uma organização estrutural elevada da morfologia dos organismos, fator importante no processo de produção enzimática. O processo de formação do biofilme tem sido reportado para *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus phoenicis* (GUIMARÃES e SOUZA, 2017). De acordo com o modelo proposto por Harding et al. (2009), para formação de biofilmes fúngicos fases distintas podem ser observadas, como demonstrado na Figura 8, sendo elas:

- i) Adsorção de esporos à superfície: Esta fase envolve essencialmente o contato físico do organismo com uma superfície.
- ii) Adesão inicial à superfície: ocorre a secreção de substâncias adesivas devido à germinação dos esporos.
- iii) Formação de microcolônias I: Os estágios iniciais de crescimento e colonização de superfície, em fungos, envolvem o crescimento apical de hifas e também ocorrem ramificações. As hifas exploram o substrato e ramificam-se através de superfícies como uma monocamada. Esta etapa envolve a produção de uma matriz polimérica extracelular que permite a forte adesão da colônia em crescimento ao substrato.
- iv) Formação de microcolônias II ou maturação inicial: Envolve a formação de redes de hifas compactadas ou adesão de micélios e hifas-hifas. Isto inclui camadas, a formação de feixes de hifas "colados" em conjunto com a matriz polimérica, e a formação de canais através de repulsão hidrofóbica entre hifas ou feixes de hifas.
- v) Maturação ou desenvolvimento reprodutivo: É caracterizada pela formação de corpos frutíferos, células esporogênicas, esclerótios e outras estruturas de sobrevivência. O crescimento aéreo é frequentemente uma característica fundamental da frutificação e dispersão de fungos.
- vi) Dispersão ou fase planctônica: envolve a dispersão ou liberação de esporos, ou a dispersão de fragmentos de biofilme. As células dispersas podem agir como novos propágulos para reiniciar o ciclo.

Figura 8. Modelo de desenvolvimento para biofilmes de fungos filamentosos. Inclui os seguintes estágios: i) adsorção de esporos à superfície, ii) adesão inicial à superfície, iii) formação de microcolônias I, iv) formação de microcolônias II ou maturação inicial v) maturação ou desenvolvimento reprodutivo e vi) dispersão ou fase planctônica



(Fonte: Modificado de HARDING et al., 2009).

1.4.1 Fermentação por biofilme

A fermentação por biofilmes fúngicos (FB) utilizando fungos filamentosos é um sistema de produção homogêneo dentro de um ambiente líquido baseado na infraestrutura do processo de fermentação submersa (FSbm) com a eficiência de produção da fermentação em estado sólido (FES). Os níveis de produção enzimática da FB são muito mais elevados do que os obtidos em FSbm (GUTIÉRREZ-CORREA et al, 2012).

Na literatura, encontramos a produção de diferentes compostos por FB, como a produção de frutooligossacarídeos por *A. phoenicis*, em suporte inerte de polietileno (AZIANI et al., 2012), a produção de celulase por biofilmes de *A. niger* em pano de poliéster (GUTIÉRREZ-CORREA e VILLENA, 2006) e a produção de fitase por *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* em suportes inertes de polietileno e viscosa (SATO, JORGE e GUIMARÃES, 2016). Várias enzimas foram produzidas por FB de *A. niger*, como a produção de glicose

oxidase, que foi 80% maior em culturas de adesão em pedras-pomes ou espuma de poliuretano do que em FSbm. A produção de β -frutofuranosidase por FB de *Aspergillus japonicus* em cubos de fibras vegetais foi aumentada e mantida por até 7 ciclos repetidos de 24 h (GUTIÉRREZ-CORREA et al., 2012)

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral foi a produção de tanases por fermentação por biofilmes (FB) do fungo filamentososo *Aspergillus ochraceus*.

2.2 Objetivos específico

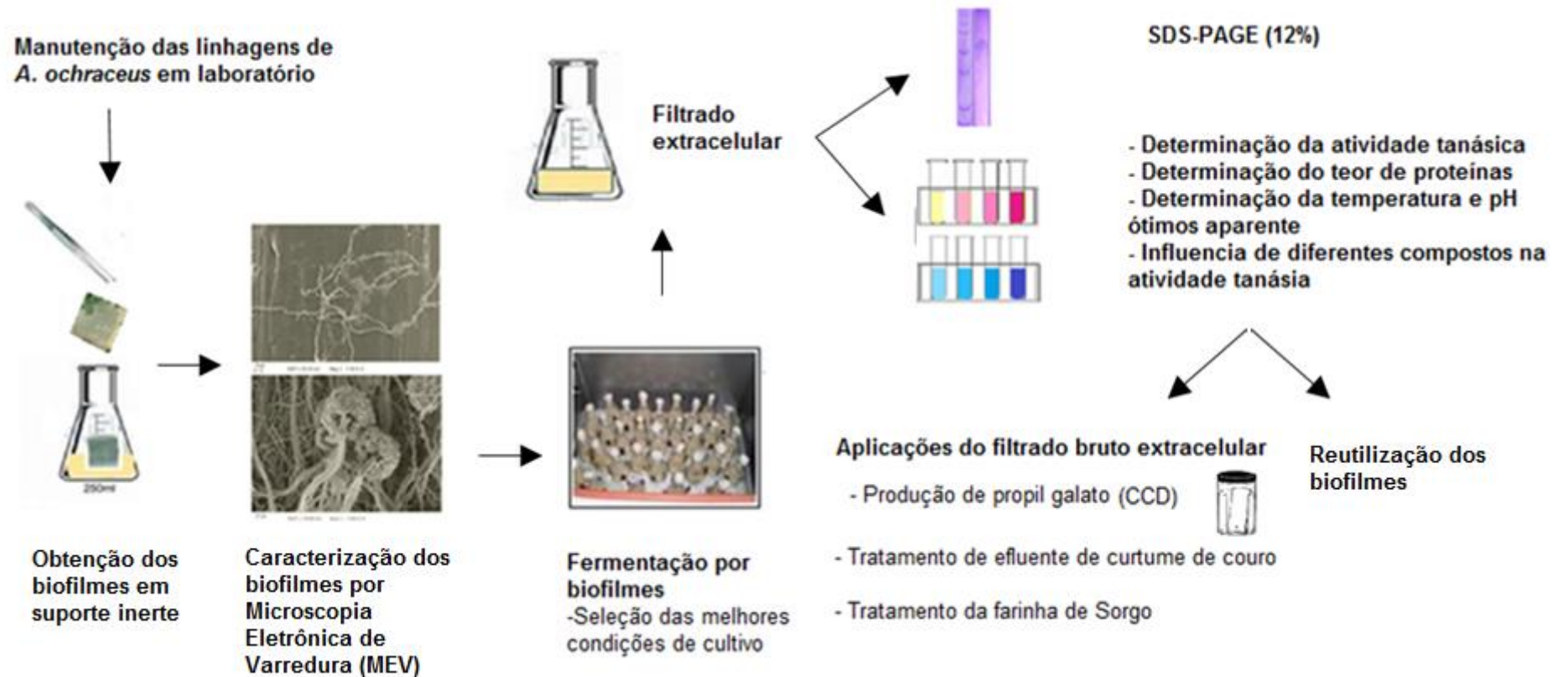
- Determinar as condições ótimas de formação do biofilme em suporte inerte de polietileno;
- Analisar a morfologia dos biofilmes de *Aspergillus ochraceus* através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Padronizar as melhores condições de cultivo para produção de tanase por biofilmes;
- Caracterizar a enzima quanto a melhor temperatura e pH de atuação, e influência de diferentes compostos na atividade enzimática;
- Aplicar o filtrado bruto extracelular contendo tanase na síntese de propilgalato, no tratamento do efluente do curtume e no tratamento da farinha de sorgo;
- Reutilizar os biofilmes para a produção enzimática.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP).

A Figura 9 ilustra de maneira simplificada os experimentos realizados no presente trabalho.

Figura 9. Esquema simplificado dos experimentos realizados neste trabalho.



3.1 Microrganismo e manutenção da linhagem em laboratório

O fungo filamentoso *Aspergillus ochraceus* foi isolado do solo brasileiro, identificado pela fundação André Tosello (Campinas, São Paulo, Brasil) e depositado na micoteca do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular, Departamento de Biologia da FFCLRP – USP. A manutenção da linhagem em laboratório foi realizada em meio de cultivo BDA (Batata Dextrose Agar) em tubos de ensaio inclinados, previamente autoclavados por 20 minutos (121°C; 1,5 atm), e mantidos em incubadora tipo BOD a 25°C por um período de 7 dias, sendo posteriormente utilizados ou armazenados a 4°C por até 30 dias. Repiques periódicos foram feitos a cada 30 dias.

3.2 Obtenção dos biofilmes

Foram utilizadas telas de polietileno como suporte inerte para fixação e desenvolvimento do microrganismo. Estas foram cortadas em pedaços com dimensões 2,3 cm x 2,3 cm. Em seguida, as telas foram lavadas com água destilada e secas em estufa a 40°C. A suspensão de esporos foi preparada em água destilada previamente autoclavada (20 minutos; 121°C; 1,5 atm), sendo utilizadas culturas anteriormente repicadas e armazenadas. Esta suspensão aquosa foi obtida por meio da raspagem da superfície do meio contendo o fungo filamentoso, com o auxílio de uma alça de platina. Após a raspagem, a suspensão contendo os esporos foi filtrada em gaze estéril e em seguida padronizada em contador de células automático (BIORAD TC20), sendo a concentração final da suspensão ajustada para 10^6 esporos/mL.

Após serem secas, as telas foram inseridas em frascos erlenmeyer contendo a suspensão aquosa de esporos e mantidas a 28°C, sob agitação de 50 rpm por 2 horas para promover a adesão dos esporos ao suporte. Após este período as telas foram removidas com o auxílio de uma pinça estéril e submetidas a duas lavagens consecutivas de 30 minutos cada, a 28°C e 50 rpm,

com água destilada estéril, para remoção dos esporos não aderidos. Em seguida, as telas com os esporos aderidos foram colocadas em frascos erlenmeyer contendo diferentes meios (Khanna, Mineral, SR, Czapeck e M5), como descrito abaixo, contendo glicose (2% m/v) como fonte de carbono para a indução do crescimento do biofilme fúngico. Os cultivos foram mantidos a 28°C, sob agitação de 50 rpm, por 24, 48 e 72 horas.

3.3 Composição dos meios de cultivo

Meio Khanna (KHANNA et al., 1995)

➤ Solução de sais de Khanna [20x].....	5,0 mL
NH ₄ NO ₃	2,0g
KH ₂ PO ₄	1,3g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,362g
KCl.....	0,098g
ZnSO ₄ .H ₂ O.....	0,007g
MnSO ₄ .H ₂ O.....	0,0138g
Fe ₂ (SO ₄).6H ₂ O.....	0,0066g
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,0062g
Água destilada q.s.p.....	100mL
➤ Extrato de levedura.....	0,1g
➤ Fonte de carbono.....	1,0g
➤ Água destilada q.s.p.....	100mL

Meio Mineral (COSTA et al., 2008)

Extrato de levedura.....	0,1g
Fonte de carbono.....	1,0g
KH ₂ PO ₄	0,1g

MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,2g
CaCl ₂	0,1g
NH ₄ Cl.....	1,0g
Água destilada q.s.p.....	100mL

Meio SR (RIZZATI et al., 2001)

➤ Solução de sais SR [20x].....	5,0mL
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,24g
KH ₂ PO ₄	0,3g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0g
➤ Peptona.....	0,02g
➤ Fonte de carbono.....	1,0g
➤ Extrato de levedura.....	0,45g
➤ Água destilada q.s.p.....	100mL

Meio Czapeck (WISEMAN, 1975)

NaNO ₃	0,3g
KH ₂ PO ₄	0,1g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,05g
KCl.....	0,05g
Fe ₂ (SO ₄) ₃ .7H ₂ O.....	0,001g
Extrato de levedura.....	0,1g
Fonte de carbono.....	1,0g
Água destilada q.s.p.....	100mL

Meio M5 (Peralta et al., 1990)

Extrato de levedura.....	0,6g
Peptona.....	0,1g
CaCO ₃	0,1g
NaCl.....	1,0g
CH ₃ COONH ₄	0,6g
Fonte de carbono	1,0g
Água destilada q.s.p.....	100mL

3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a análise morfológica dos biofilmes de *A. ochraceus*, estes foram submetidos à Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Química da FFCLRP-USP. Para tanto os biofilmes foram desidratados usando solução aquosa de etanol em concentrações crescentes (10-90%, v/v) e etanol absoluto. Posteriormente, os biofilmes assim tratados foram recobertos com ouro coloidal através do sistema de metalização de amostras da marca Bal-Tec, modelo SCD 050 Sputter Coater e submetidos em seguida à análise em MEV utilizando-se um equipamento Zeiss EVO 50 (Cambridge, UK) (AZIANI et al., 2012).

3.5 Produção de tanases por fermentação por biofilme

Após a obtenção dos biofilmes fúngicos, estes foram transferidos, com o auxílio de uma pinça estéril, para frascos erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio de cultivo de interesse (Khanna, Mineral, SR, Czapeck e M5) para a etapa de fermentação por biofilme para obtenção de tanase, empregando

inicialmente como fonte de carbono ácido tânico 1% (m/v), durante 72 horas, a 28°C, pH 5,0 e agitação de 50 rpm.

3.6 Obtenção do filtrado extracelular

Após o período de incubação, os cultivos foram filtrados a vácuo em funil Büchner, com papel de filtro Whatman nº1, obtendo-se um caldo de cultura livre de células, denominado de filtrado extracelular. Em seguida este foi dialisado contra água destilada por 24 horas a 4°C e utilizado para determinação da atividade tanásica. A massa micelial aderida ao suporte foi reservada para posteriores estudos de reutilização do biofilme.

3.7 Determinação da atividade tanásica

A atividade tanásica foi determinada pelo método da rodanina metanólica utilizando-se o metil galato (0,2% m/v) como substrato, preparado em solução tampão acetato de sódio 100 mmol.L⁻¹, pH 5,0 de acordo com o protocolo descrito por Sharma, Bhat e Dawra (2000). O método foi previamente padronizado por uma curva analítica de ácido gálico (0 a 0,1 mg/mL). A mistura reacional foi constituída de 250 µL de substrato e 250 µL de filtrado extracelular e incubada a 30°C por 5 minutos. Para parar a reação, foram adicionados 300 µL de rodanina metanólica (0,667% m/v). Após 5 minutos, 200 µL de hidróxido de potássio 0,5 mmol.L⁻¹ foram adicionados, formando um cromatógeno de coloração violeta entre o ácido gálico formado e a rodanina. Ao volume final foram acrescentados 4 mL de água destilada. Após 10 minutos as amostras foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de onda $\lambda=520\text{nm}$. O controle foi feito da mesma maneira, entretanto o filtrado extracelular foi adicionado após o tempo de 5 minutos. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de ácido gálico por minuto nas condições de ensaio.

3.8 Quantificação de proteínas

Para a determinação da concentração proteica do filtrado extracelular foi utilizado o método descrito por Bradford (1976), tendo albumina de soro bovino (BSA) (0 – 0,025 mg/mL) como padrão. A leitura foi feita em espectrofotômetro com comprimento de onda $\lambda=595\text{nm}$. A concentração proteica foi expressa em mg de proteína por mL de amostra. A atividade específica foi definida como sendo o número de unidades de atividade enzimática (U) da tanase por miligrama de proteína da amostra.

3.9 Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de tanases

A influência de diferentes fontes de carbono na produção de tanases foi observada em meio Khanna utilizando carboidratos (m/v) (sacarose 1%, glicose 2%, lactose 1% e maltose 1%), folhas vegetais (m/v) (chá verde 1% e hortelã 1%), ácido tânico 1% (m/v) e ácido gálico 1% (m/v).

Em seguida, a influência de diferentes concentrações (m/v) (0,5%, 1%, 1,5%, 3% e 5%) das melhores fontes de carbono sobre a produção enzimática foram avaliadas, em fermentação por biofilme.

3.10 Efeito do tempo de fermentação na produção de tanases

A produção enzimática em função do tempo de cultivo (24-120 horas) em fermentação por biofilme utilizando o meio Khanna foi analisada utilizando 1% (m/v) de ácido tânico como fonte de carbono a 28°C e 50 rpm.

3.11 Efeito de diferentes fontes adicionais de nitrogênio na produção de tanases

As fontes de nitrogênio extrato de carne, peptona, extrato de levedura e caseína (0,1% m/v) foram adicionadas ao meio Khanna contendo 1,5% (m/v) de ácido tânico como fonte de carbono, mantido a 28°C por 72 horas sob agitação de 50 rpm, avaliando-se suas influências sobre a produção tanásica. Após a seleção da melhor fonte de nitrogênio, o efeito da adição de diferentes concentrações (m/v) (0,1%, 0,3%, 0,5% e 0,7%) desta fonte sobre a produção enzimática foi avaliado.

3.12 Produção de tanase em função do pH de cultivo

O pH inicial do meio Khanna, contendo 1,5% (m/v) de ácido tânico como fonte de carbono, foi ajustado para 4,0; 5,0; 6,0, e 7,0, empregando-se NaOH (1 mol.L⁻¹) e HCl (1 mol.L⁻¹), com o objetivo de avaliar seu efeito na produção de tanase. Os cultivos foram mantidos a 28°C por 72 horas sob agitação de 50 rpm.

3.13 Caracterização bioquímica das tanases

3.13.1 Temperatura ótima e estabilidade térmica

A temperatura ótima para a atividade tanásica foi determinada incubando-se as enzimas em diferentes temperaturas (20°C a 85°C), com intervalos de 5°C. A estabilidade térmica foi realizada a partir da incubação da enzima em banho-maria em diferentes temperaturas (25°C, 30°C, 40°C, 50°C e 60°C) por diferentes intervalos de tempo (0, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180 e 360 minutos). A cada intervalo, alíquotas da enzima incubada eram retiradas, mantidas em banho de gelo e depois ensaiadas para atividade tanásica, como descrito no item 3.6.

3.13.2 pH ótimo e estabilidade ao pH

O pH ótimo para a atividade tanásica foi determinado utilizando-se diferentes soluções tampões com pH variando entre 3,0 e 9,0. Foram usados: tampão ácido cítrico 100 mmol.L⁻¹ (pH 3,0 a 4,0); tampão acetato de sódio 100 mmol.L⁻¹ (pH 5,0 a 6,0); tampão Tris-HCl 100 mmol.L⁻¹ (pH 7,0 a 8,0) e tampão glicina 100 mmol.L⁻¹ (pH 9,0). A estabilidade da tanase ao pH foi verificada incubando-se a enzima em diferentes soluções tampões a 50 mmol.L⁻¹ (pH 5, 6 e 7), em banho de gelo. As amostras enzimáticas foram adicionadas na proporção 1:1 (v/v) e após incubação por diferentes períodos (0, 30, 60, 120, 180, 360 e 540 minutos) alíquotas foram retiradas e a atividade enzimática foi determinada.

3.13.3 Efeito de diferentes compostos na atividade tanásica

O efeito de vários compostos químicos sobre a atividade tanásica foi avaliado adicionando-se diferentes sais (AgNO₃, BaCl₂, CaCl₂, CoCl₂, CuCl₂, CuSO₄, Fe₂(SO₄)₃, FeCl₃, HgCl₂, KH₂PO₄, MgCl₂, MnSO₄, MnCl₂, MnSO₄, MgSO₄, NaCl, NH₄Cl e ZnSO₄), β-mercaptoetanol, ureia e EDTA na concentração final de 1mM, detergentes (0,01%; v/v) (SDS, Triton X – 100 e Tween-20) e solventes orgânicos (1%; v/v) (metanol, etanol, acetonitrila, acetona, isopropanol e n-butanol), na reação enzimática.

3.14 Eletroforese em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE 12%)

Para proceder a análise eletroforética, o filtrado bruto extracelular obtido da FB foi dialisado contra água destilada a 4°C pelo período de 24 horas e submetido ao tratamento com caulin, adicionado na proporção de 1 grama para cada 100 mL de filtrado, agitado em vortex e centrifugado a 9681x g durante 5

minutos. Em seguida, o sobrenadante obtido foi liofilizado. O pó obtido após liofilização foi dissolvido em 20 μL de tampão Tris-HCl 100 mmol.L^{-1} , pH 6,8 adicionado de dodecil sulfato de sódio (SDS) 4%, azul de bromofenol 0,2%, glicerol 20% (v/v) e ditioneitol q.s.p. 200 mmol.L^{-1} , fervido a 100°C por 5 minutos. Foram aplicados 100 μg de proteína por canaleta em gel de separação de poliacrilamida 12% (v/v) em condição desnaturante (SDS-PAGE 12%). As condições da corrida eletroforética foram de 90 V, 40 mA e 8 W. Após corrida, o gel foi corado com Comassie Brilliant Blue R-250 durante 30 minutos e descorado em seguida com o auxílio de uma solução contendo 45% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético glacial. Como marcador de massa molecular foi utilizado o Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (BIO-RAD) com massa molecular variando de 10 a 250 kDa.

3.15 Aplicações da tanase

3.15.1 Síntese de propil-galato

Para analisar qualitativamente a hidrólise do ácido tânico, que gera como um dos produtos ácido gálico, e a síntese do propil galato a partir da transesterificação do ácido gálico na presença de 1-propanol, foi utilizada a cromatografia em camada delgada (CCD), segundo metodologia descrita por Mahendran e colaboradores (2006). Como fase móvel foi utilizada a solução de benzeno: acetato de etila: ácido fórmico (18:15:1, v/v/v).

Para as reações, foi utilizado como substrato o ácido tânico 5 mmol.L^{-1} , que foi preparado em solução tampão MES 100 mmol.L^{-1} pH 6,0 e posteriormente adicionado de 1-propanol na proporção 1:1 (v/v). As amostras enzimáticas foram incubadas na proporção 1:1 (v/v) com o substrato, em diferentes intervalos de tempo (24, 48, 72 e 96 horas) em banho-maria a 30°C. Para o controle negativo foi utilizada a amostra enzimática desnaturada (fervida por 10 minutos) adicionada ao substrato, nas mesmas condições. Os padrões utilizados foram preparados com tampão MES 100 mmol.L^{-1} , pH 6,0 sendo eles o ácido tânico 1 mmol.L^{-1} , o ácido gálico 10 mmol.L^{-1} e o propil-galato 10 mmol.L^{-1} . Os padrões, as misturas reacionais e o controle negativo tiveram 10 μL

aplicados na CCD. Após a corrida e secagem das placas de sílica, o ácido tânico residual, o propil galato e o ácido gálico formados foram revelados com solução aquosa de FeCl_3 1% (m/v) em estufa a 100°C .

3.15.2 Aplicação da tanase em efluentes de curtume

As amostras dos efluentes utilizadas nesta pesquisa foram gentilmente cedidas pela Cooperativa dos Curtidores e Artesãos em Couro de Ribeira de Cabaceiras (ARTEZA), no distrito de Ribeira, situado em Cabaceiras, estado da Paraíba. Os efluentes são provenientes do processo de curtimento da pele caprina realizado em máquina ou manualmente. No processo de curtição em máquina a pele é tratada com óleo de soja, óleo de algodão e tanino em pó extraído de angico (*Anadenanthera colubrina* Vell.). No processo manual o tratamento é realizado com cascas de angico em tanques durante 15 dias.

No tratamento, o filtrado contendo a tanase extracelular produzida por *A. ochraceus* foi adicionado aos efluentes na proporção 1:1 (v/v). O tratamento foi conduzido por 2 horas a 30°C . Os efluentes tratados e não tratados foram caracterizados com relação ao teor de taninos e compostos fenólicos totais, como descrito abaixo.

3.15.2.1 Quantificação dos taninos

O teor de taninos foi determinado pelo método de precipitação de proteínas, previamente padronizado por curva analítica de ácido tânico (0-0,2 mg/mL) (HAGERMAN; BUTLER, 1978). A reação foi composta por 500 μL da amostra adicionados de 1 mL de solução de BSA, preparada em tampão acetato de sódio $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 5,0, e mantidas por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, centrifugada a 5 000 g durante 15 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o sedimento dissolvido em 750 μL de SDS 1% (m/v). Foram adicionados 1,5 mL de solução de SDS-trietanolamina e 500 μL de FeCl_3 . Após

repouso por 20 minutos à temperatura ambiente, a absorbância foi lida a $\lambda=510$ nm em espectrofotômetro.

3.15.2.2 Determinação dos compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados seguindo a metodologia descrita por Rao et al. (2018). O método foi previamente padronizado por curva analítica de ácido gálico (0-0,2 mg/mL). A reação foi composta por 125 μ L da amostra, 125 μ L do reagente Folin-Ciocalteu e 500 μ L de água destilada. Após 6 minutos de incubação no escuro, a temperatura ambiente, foram adicionados 1,5 mL de carbonato de sódio (7% m/v) e 1 mL de água destilada. Após 90 minutos de incubação no escuro a temperatura ambiente, a absorbância foi lida a $\lambda=725$ nm em espectrofotômetro.

3.15.3 Tratamento do sorgo

Os grãos de sorgo foram adquiridos no estado da Paraíba (PB-Brasil) e triturados em liquidificador para obtenção da farinha de sorgo. A farinha de sorgo foi tratada com o filtrado bruto extracelular contendo tanase de *A. ochraceus*. Em frascos erlenmeyers de 25 mL foram introduzidos 1 g de farinha de sorgo e 0,5 mL de filtrado bruto. O tratamento foi conduzido por 5 dias a 30°C, seguindo metodologia de Schons, Battestin e Macedo (2012) e os compostos fenólicos quantificados. Como controle foi utilizada a farinha de sorgo sem adição do filtrado bruto, adicionado de 0,5 mL de água destilada.

Os compostos fenólicos foram extraídos em 70% (v/v) de metanol na proporção 200 mg de farinha de sorgo para 10 mL de solvente. O experimento foi conduzido a 200 rpm, 25 °C por 2 horas. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 1320 xg por 15 minutos, a 5°C. O teor de taninos e compostos fenólicos totais foi determinado no controle e nas amostras tratadas com tanase e foram feitos seguindo as metodologias descritas nos itens 3.15.2.1 e 3.15.2.2, respectivamente.

3.16 Reutilização dos biofilmes fúngicos

Após o biofilme fúngico, em suporte inerte, ter sido utilizado em uma etapa de fermentação, este foi retirado do caldo com o auxílio de uma pinça estéril. Feito isto o biofilme foi reutilizado de duas maneiras diferentes. O primeiro modo foi reintroduzir o biofilme imediatamente em outro erlenmeyer contendo o meio Khanna usualmente utilizado na fermentação, para então mais um ciclo de fermentação. Este procedimento foi repetido mais uma vez totalizando uma bateria de três fermentações consecutivas.

Em seguida, a outra maneira empregada para se reutilizar o biofilme foi primeiramente colocar este em uma placa de petri contendo papel filtro Whatman nº1, previamente autoclavados, sendo levado para uma etapa de secagem em estufa a 37°C, pelo período de 24 horas. Após a secagem o biofilme foi reintroduzido em frascos erlenmeyer contendo o meio Khanna para mais uma etapa de fermentação. Este procedimento foi repetido por três vezes fermentações consecutivas.

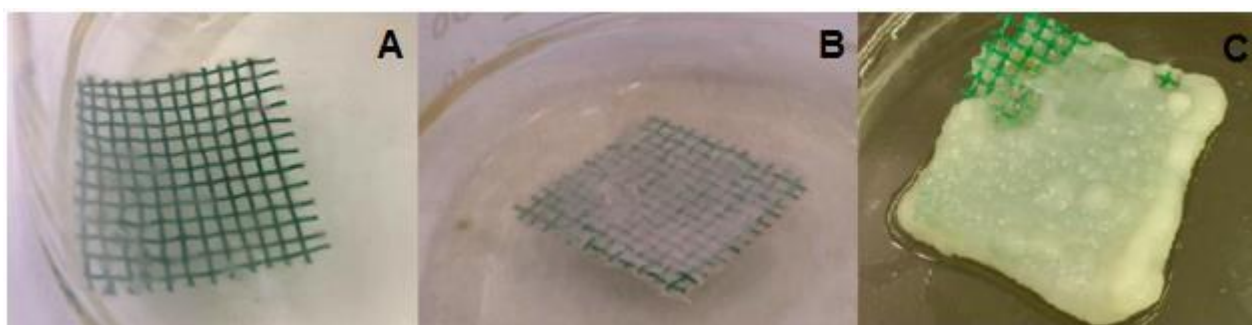
Para a análise estatística da reutilização dos biofilmes foi utilizado o programa BioEstat 5.0, considerando-se três repetições. Foi feita análise de variância e teste de Tukey para a comparação das médias, com intervalo de confiança de 95%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção dos biofilmes

A obtenção dos biofilmes foi inicialmente verificada em meio Khanna tendo glicose 2% (m/v) como fonte de carbono, por diferentes períodos de incubação a 28°C sob agitação de 50 rpm. Sob estas condições foi verificado que o maior desenvolvimento do biofilme ocorreu em 72 horas (Figura 10). Com 24 horas a formação do micélio foi imperceptível e com 48 horas era visível a olho nu porém ainda reduzida. Deste modo, o período de incubação de 72 horas foi selecionado para a análise da influência de diferentes meios de cultivo na formação do biofilme de *A. ochraceus*, uma vez que neste momento foi possível observar que o biofilme fungico recobriu todo o suporte

Figura 10. Biofilme fúngico de *A. ochraceus* desenvolvido sobre suporte inerte de polietileno após 24(A), 48(B) e 72(C) horas de incubação em meio Khanna a 28°C sob agitação (50 rpm), utilizando glicose (2% m/v) como fonte de carbono.

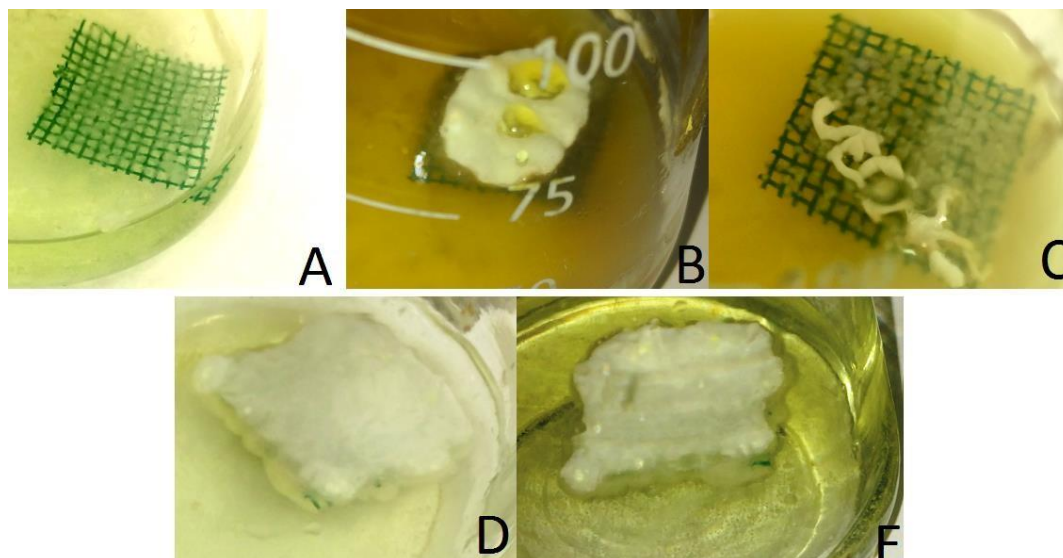


Fonte: Autora.

Na figura 11, ao analisarmos os biofilmes obtidos em diferentes meios, podemos observar o desenvolvimento reduzido do microrganismo sobre o suporte inerte quando utilizados os meios SR e M5. Já no meio Czapeck,

observamos um maior crescimento do fungo no suporte, porém apenas na superfície deste, diferente do observado para os meios Khanna e Mineral, nos quais o fungo se desenvolveu completamente ao redor do suporte. As diferenças observadas para o desenvolvimento dos biofilmes em diferentes meios de cultivo devem-se a composição destes meios, sendo que alguns constituintes podem ter ação positiva, favorecendo o crescimento, enquanto outros podem exercer influência negativa, reduzindo ou inibindo este crescimento. Muitas enzimas requerem íons metálicos como ativadores para expressarem sua atividade catalítica absoluta, favorecendo assim o crescimento e a reprodução do microrganismo (MUKHERJEE e BANERJEE, 2006; JANA et al., 2014). Os íons metálicos são micronutrientes que atuam como co-fatores de enzimas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2016). Os nutrientes comuns aos meios Khanna e Mineral foram o fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e o sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Tais compostos podem ter favorecido o crescimento do biofilme de *A. ochraceus*.

Figura 11. Desenvolvimento dos biofilmes fúngicos de *A. ochraceus* cultivado nos meios SR (A), Czapeck (B), M5 (C), Khanna (D) e Mineral (E) por 72 horas à 28°C e 50 rpm, com glicose 2% como fonte de carbono.



Fonte: Autora.

Desta forma, os meios Khanna e Mineral foram selecionados para continuidade do presente estudo, afim de determinar os melhores parâmetros para a produção de tanases em FB.

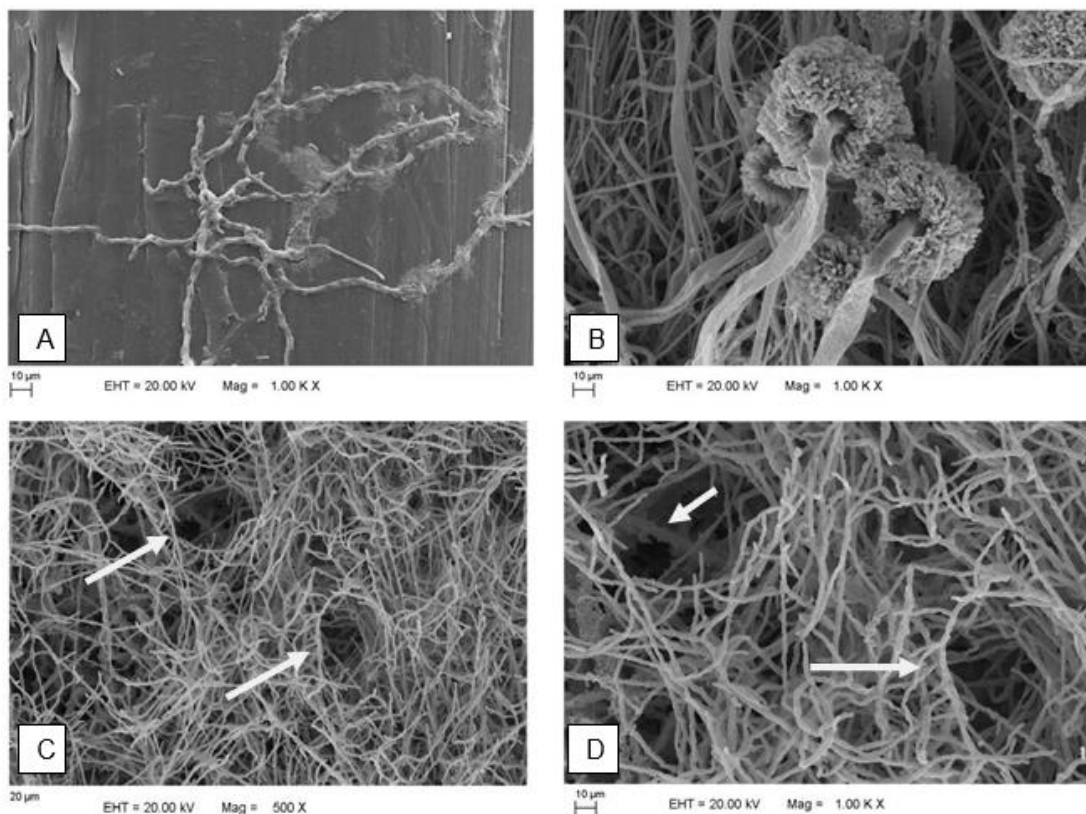
4.2 Estudo morfológico dos biofilmes de *Aspergillus ochraceus*

O biofilme fúngico de *A. ochraceus* foi cultivado e preparado como descrito nos itens 3.2 e 3.15, respectivamente.

Decorridas 24 horas do processo de adesão do esporo ao suporte (Figura 12A) notamos o crescimento inicial de hifas sobre o suporte inerte de polietileno. Em seguida, após 48 horas (Figura 12B), é evidente a presença de conidióforos do fungo. Finalmente, após 72 horas (Figura 12C e D), podemos observar que a morfologia do biofilme de *A. ochraceus* é caracterizada por um crescimento de

várias hifas sobrepostas (micélio), que criam uma matriz densa, com a formação de vários canais que permitem a troca eficiente de nutrientes entre o biofilme fúngico e o ambiente. Um padrão morfológico semelhante foi observado em biofilmes de *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* (SATO et al., 2016) e em *A. phoenicis*, no qual micélios cobriram completamente o suporte. O primeiro passo na adesão dos esporos ao substrato depende da produção de substâncias adesivas para formar uma espécie de almofada sob os esporos (AZIANI et al., 2012). A formação de canais também foi observada em biofilme fúngico de *Aspergillus niger* ATCC 10864 desenvolvido em pano de poliéster, sendo observado também, neste caso, a maior produção celulásica quando comparado ao micélio livre do fungo (VILLENA e GUTIÉRREZ-CORREA, 2006).

Figura 12. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do biofilme de *A. ochraceus*, cultivados em meio Khanna com glicose (2% m/v). Crescimento de hifas sobre o suporte inerte de polietileno por 24h (A), 48h (B) e 72h (C e D). As setas em C e D indicam os canais.



Fonte: Autora.

4.3 Determinação dos melhores parâmetros para a produção de tanases em FB

4.3.1 Influência da composição do meio de cultivo na produção de tanases

Na tabela 2 podem ser observadas as produções enzimáticas em diferentes meios de cultivo utilizando biofilmes fúngicos obtidos nos meios Khanna e Mineral tendo ácido tânico 1% (m/v) como fonte de carbono, pH inicial 5,0 por 72 horas, a 28°C e 50 rpm.

Tabela 2. Produção de tanases extracelulares por biofilmes de *Aspergillus ochraceus* desenvolvido nos meios Khanna e Mineral, e transferidos para fermentação nos meios Czapeck, M5, SR, Mineral e Khanna.

Meios de indução	Meios de fermentação	Atividade Tanásica	
		U/mL	U/mg de proteína
Khanna	M5	0,09 ± 0	0,65 ± 0,5
	Czapeck	0,05 ± 0,03	3,05 ± 2,41
	SR	0,09 ± 0	1,00 ± 0,02
	Mineral	0,02 ± 0	0,67 ± 0,06
	Khanna	0,25 ± 0,03	7,35 ± 0,88
Mineral	M5	0,05 ± 0	0,64 ± 0
	Czapeck	0,13 ± 0,01	4,35 ± 0,97
	SR	0,12 ± 0,02	3,10 ± 0,24
	Mineral	0,03 ± 0	1,49 ± 0,74
	Khanna	0,16 ± 0	5,31 ± 0,05

Os biofilmes foram desenvolvidos em meio Khanna e em meio Mineral tendo glicose 2% (m/v) como fonte de carbono. Os cultivos para produção enzimática foram feitos com os meios Czapeck, M5, SR, Mineral e Khanna tendo ácido tânico 1% (m/v) como fonte de carbono por 72 horas a 28°C e agitação de 50 rpm.

Os melhores resultados obtidos na produção tanásica em FB foram observados quando empregado o meio Khanna, para ambos os biofilmes, sendo a maior atividade enzimática extracelular (0,25 U/mL e 7,35 U/mg de proteína) registrada com o uso do biofilme induzido em meio Khanna, seguido dos valores observados para o biofilme induzido em meio Mineral (0,16 U/mL e 5,31 U/mg de proteína), como apresentado na tabela 2. Uma boa produção tanásica foi observada também no cultivo em meio Czapeck a partir da indução do biofilme em meio Mineral (4,35 U/mg de proteína).

Considerando a produção de tanases pelo fungo *A. ochraceus*, em fermentação submersa, o meio Khanna foi também o que mais favoreceu a produção enzimática extracelular (1,1 U/mg de proteína) como descrito por Gonçalves et al. (2012), sendo o valor obtido no presente trabalho cerca de 7 vezes maior. Da mesma forma, Villena e Gutiérrez-Correa (2012) relataram a maior eficiência na produção de celulase e xilanase de *Aspergillus niger* por FB do que por FSbm. O meio Khanna foi utilizado também para a produção de tanase extracelular em FSbm por *Aspergillus* sp. (MELO et al., 2014) e *Aspergillus japonicus* 246A (Bradoo et al., 1997). Outros meios foram também utilizados na produção tanásica, como os meios Czapeck para *A. niger* (LAL et al., 2012) e o meio Mineral para *A. fumigatus* Cas- 21 (CAVALCANTI et al., 2017).

Desta forma, o biofilme induzido e cultivado em meio Khanna foi selecionado para dar continuidade ao estudo.

4.3.2 Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção tanásica

Observa-se na tabela 3 que as melhores fontes de carbono para a produção de tanase extracelular por biofilmes de *A. ochraceus* foram o ácido gálico (0,4 U/mL) e o ácido tânico (0,31 U/mL). Os melhores resultados para a produção de tanases extracelulares por *A. phoenicis* também foram encontrados com essas fontes de carbono, como apresentado por Riul et al. (2013). O valor obtido por estes autores na presença de ácido gálico (0,43 U/mL) foi semelhante ao aqui encontrado, porém foi superior quando utilizado o ácido tânico (0,64 U/mL). Na presença dos sacarídeos glicose, sacarose e lactose, assim como na ausência de fonte de carbono, não houve produção tanásica por *A. ochraceus*, indicando uma produção induzida da enzima. Dependendo da linhagem e das condições de cultivo, as enzimas podem ser caracterizadas como constitutivas ou induzidas, mostrando diferentes padrões de produção. Enzimas induzidas são aquelas que são sintetizadas apenas na presença de um substrato específico e enzimas constitutivas as que não dependem da presença de um

substrato específico (LEKHA e LONSANE,1997). Compostos fenólicos como ácido gálico, pirogalol, metil galato e ácido tânico podem induzir a síntese de tanase (BELMARES et al., 2014; BAJPAI e PATIL, 1997). No geral, a tanase aparenta ser uma enzima induzida, sendo produzida em quantidades elevadas apenas quando o ácido tânico está presente (AGUILAR e GUTIÉRREZ-SANCHÉZ, 2001). Aguilar e Guitierrez-Sánchez (2001) relataram que, como o ácido tânico é uma molécula relativamente grande, tal composto não pode atravessar a membrana celular dos microrganismos, propondo, assim, que um dos compostos intermediários que se formam durante a biodegradação do ácido tânico é o verdadeiro indutor. Entretanto, em Costa et al. (2012) o ácido gálico é relatado como um indutor mais eficaz do que o ácido tânico.

Quando utilizadas as folhas vegetais de chá verde e hortelã, a produção enzimática por biofilmes de *A. ochraceus* foi bastante reduzida, diferente do observado para o fungo *Aspergillus niger* CAS-21 (CAVALCANTI et al., 2017). Um dos fatores que podem ter contribuído para este resultado é o fato de que os taninos podem ser encontrados em várias proporções em todas as plantas vasculares, porém variando sua concentração dependendo da parte do vegetal (ARBENZ e AVÉROUS, 2015), época da colheita e condições ambientais. A degradação desses taninos pela tanase varia de acordo com a espécie do fungo e pode também não ter ocorrido devido ao tempo de cultivo insuficiente. De acordo com os resultados obtidos, ambas as fontes de carbono, ácido tânico e ácido gálico, foram selecionadas para dar continuidade ao estudo.

Tabela 3. Influência da fonte de carbono na produção de tanases extracelulares a partir de biofilmes de *A. ochraceus* induzidos no meio Khanna e transferidos para fermentação em meio Khanna.

Fontes de carbono (m/v)	Atividade tanásica (U/mL)	Atividade específica (U/mg prot.)
Sacarose (1%)	0	0
Glicose (2%)	0	0
Lactose (1%)	0	0
Maltose (1%)	0	0
Chá verde (1%)	0,04 ± 0,02	0,27 ± 0,12
Ácido tânico (1%)	0,31 ± 0,03	17,62 ± 1,22
Ácido gálico (1%)	0,40 ± 0,04	19,32 ± 5,25
Hortelã (1%)	0,04 ± 0,05	0,29 ± 0,05
Ausente	0	0

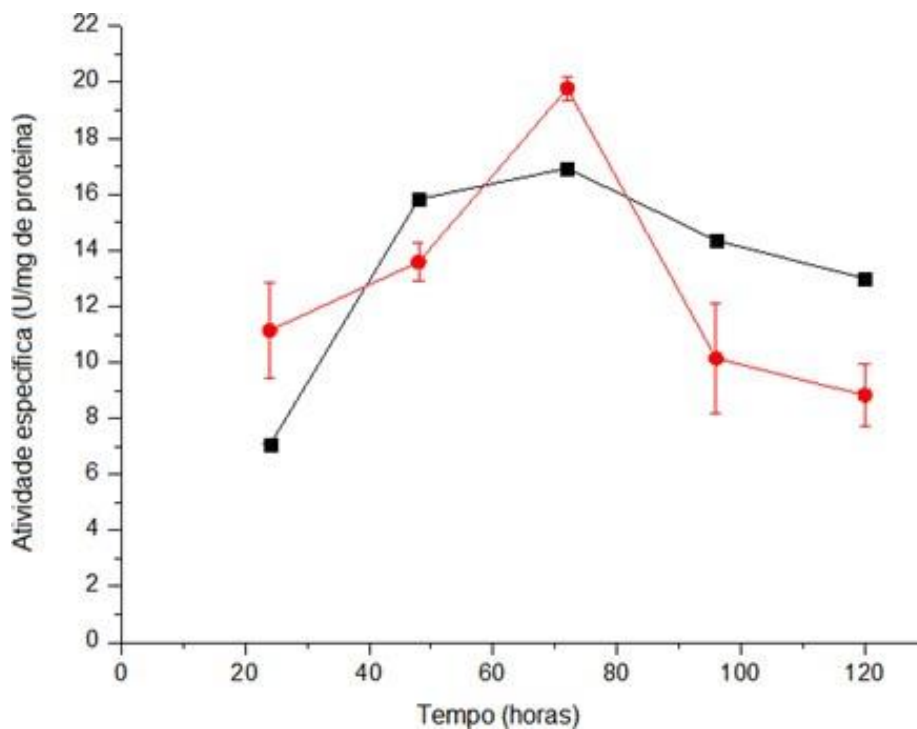
Os cultivos para produção enzimática foram conduzidos em meio Khanna por 72 horas a 28°C sob agitação de 50 rpm.

4.3.3 Influência do tempo de cultivo na produção tanásica

De acordo com o apresentado na Figura 13, observamos que o fungo produz e secreta tanase já nas primeiras 24 horas de cultivo, sendo a maior produção enzimática obtida em 72 horas para ambas as fontes de carbono utilizadas. Porém, a produção da tanase foi cerca de 1,25 vezes maior na presença de ácido gálico do que na de ácido tânico. De acordo com George e Ong (2013), Gonçalves et al. (2012) e Lal et al. (2012) a síntese máxima de tanase foi observada também com 72 horas de cultivo do fungo *A. niger* FBT1, *A. ochraceus* e *A. niger*, respectivamente. Desta forma os ensaios foram conduzidos utilizando o tempo de 72 horas. Liu et al. (2016) relataram o tempo

de 48 horas de cultivo para máxima produção tanásica por *Aspergillus* ssp. UCP1284 utilizando ácido tânico como fonte de carbono.

Figura 13. Produção de tanase por biofilmes de *A. ochraceus* em meio Khanna tendo ácido tânico 1% (m/v) (■) e ácido gálico 1% (m/v) (●) como fontes de carbono a 28°C e 50 rpm, em função do tempo de cultivo (24 a 120 horas).



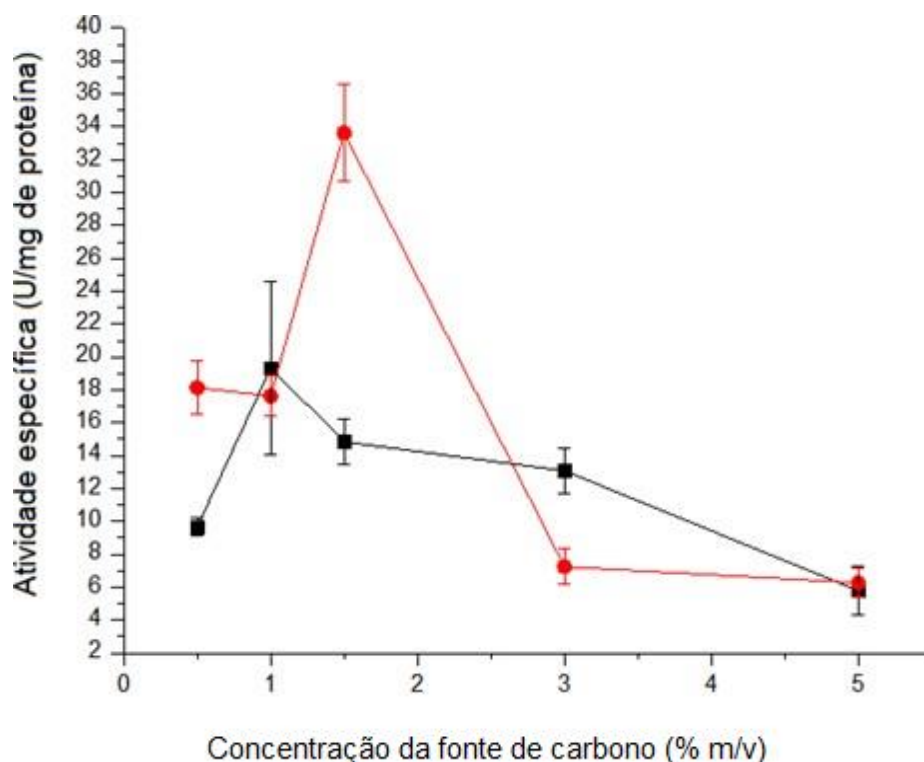
Fonte: Autora.

A partir de 72 horas de cultivo houve um declínio na produção enzimática, provavelmente decorrente do acúmulo dos produtos finais, ácido gálico e glicose, os quais podem estar intimamente relacionados com o controle da expressão de genes. Segundo retrata Aguilar et al. (2001), a glicose pode estar envolvida na repressão catabólica. Por outro lado, Bajpai e Patil (1997) relataram que o ácido gálico não está envolvido no mecanismo regulador por retroalimentação negativa, uma vez que este produto final também pode induzir a produção tanásica diferindo de Bradoo et al. (1997) que sugeriram que o ácido gálico atua sim como um repressor, ou então que a enzima protease é a responsável pela degradação enzimática, reduzindo conseqüentemente a atividade. Para tanto, o

período de 72 horas foi selecionado como o melhor tempo para continuar os estudos de produção tanásica por *A. ochraceus* em FB.

Considerando este período de fermentação, a influência de diferentes concentrações de ácido tânico e ácido gálico sobre a produção enzimática foi avaliada. Verificou-se, como mostrado na Figura 14, que o maior valor de atividade específica foi referente à concentração de 1,5% (m/v) de ácido tânico (33,61 U/mg de proteína), sendo cerca de 30 vezes maior do que a observada por Gonçalves et al. (2012) para a tanase de *A. ochraceus* (1,1 U/mg de proteína) produzida em FSbm. Na concentração de 1% (m/v), como vinha sendo utilizada até então, a atividade enzimática na presença de ácido gálico foi ligeiramente superior à obtida na presença de ácido tânico. Quando empregadas concentrações superiores a 1,5% (m/v) de ácido tânico, a atividade enzimática foi reduzida, ocorrendo o mesmo para o uso do ácido gálico, porém em concentrações acima de 1%. Desta forma, a partir deste resultado, optou-se por utilizar 1,5% (m/v) de ácido tânico como fonte de carbono. Lekha e Lonsane (1997) sugerem que o processo de indução da tanase é ativado de forma semelhante ao processo de indução de celulases, no qual certos níveis basais desta enzima são necessários para iniciar a hidrólise do substrato e proporcionar condições para se obter a verdadeira atividade indutora. É importante também considerar que o ácido tânico em altas concentrações pode se ligar de forma irreversível com proteínas de superfície das células microbianas e, assim, tanto o crescimento do microrganismo quanto a produção enzimática serão reduzidos. Resultados semelhantes foram relatados também para o ácido gálico (LAL et al., 2012).

Figura 14. Produção de tanases por biofilme de *A. ochraceus* em meio Khanna em função da concentração de ácido tânico (●) e ácido gálico (■) como fontes de carbono, a 28°C e 50 rpm por 72 horas.



Fonte: Autora.

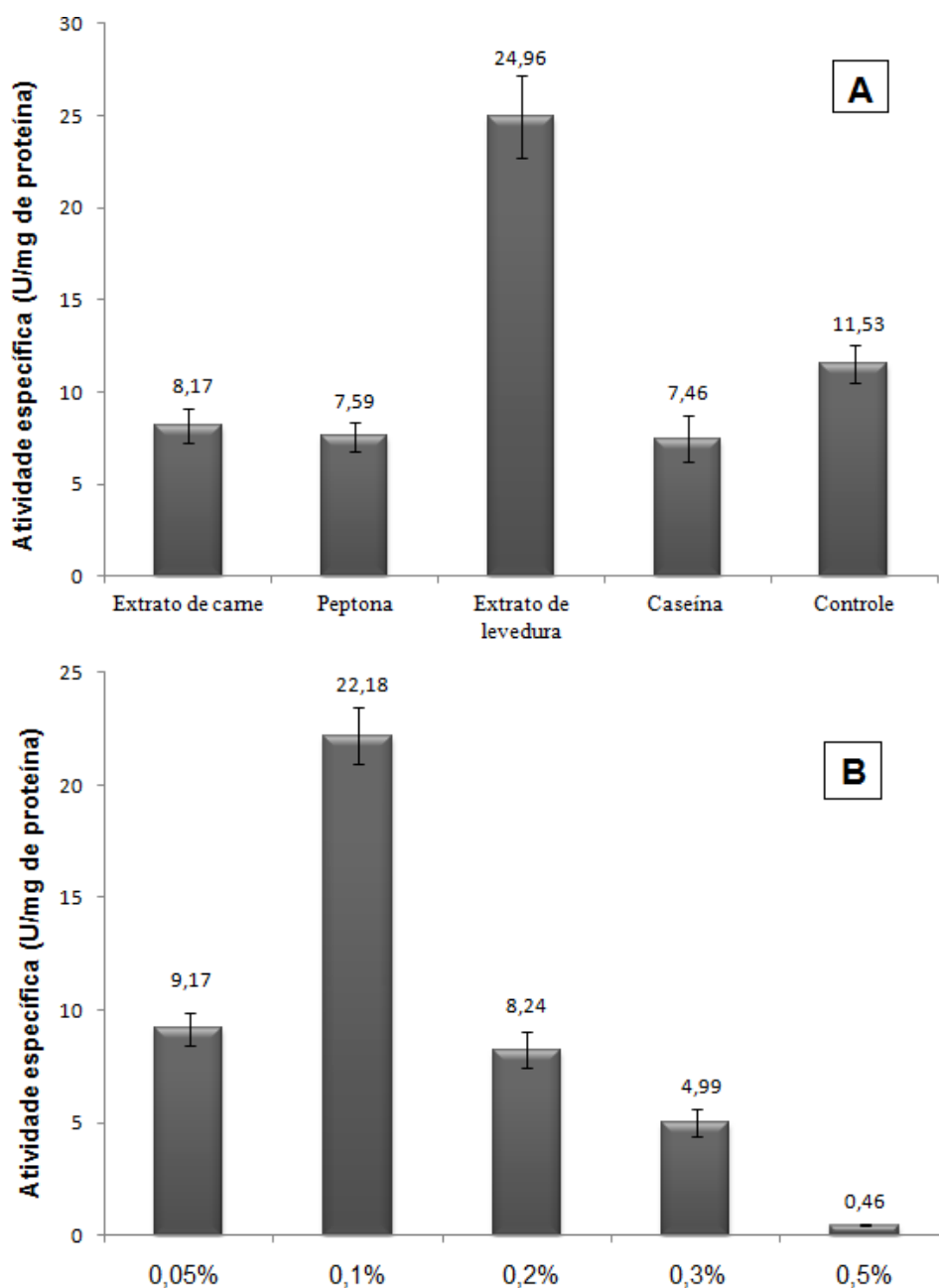
4.3.4 Influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção tanásica

A influência das fontes de nitrogênio extrato de carne, peptona, extrato de levedura e caseína, sobre a produção de tanase por biofilmes de *A. ochraceus* foi avaliada e como mostra a Figura 15A, a máxima produção enzimática específica obtida a partir do cultivo em meio Khanna, foi observada na presença de extrato de levedura (24,96 U/mg de proteína), seguido do cultivo ausente de fonte adicional de nitrogênio (11,53 U/mg de proteína). Na presença de caseína observou-se a menor produção (7,46 U/mg de proteína), sendo cerca de 3,3 vezes menor do que na presença do extrato de levedura. A caseína é relatada

como indutora de proteases (RODARTE et al., 2011), e um aumento dessas no meio pode ter levado à degradação das tanases produzidas pelo fungo, assim como extrato de carne.

Após definir o extrato de levedura como a melhor fonte adicional de nitrogênio, ensaios variando sua concentração foram conduzidos. A maior produção, como pode ser observado na Figura 15B, foi mantida quando usado 0,1% (m/v) de extrato de levedura (22,18 U/mg de proteína). O extrato de levedura apresenta em sua composição proteínas (48,52%), carboidratos (32,92%), minerais (8,32%), RNA (7,52%) e lipídeos totais (3,4%) (CABALLERO-CÓRDOBA, PACHECO e SGARBIERI, 1997). Desta forma, em maiores concentrações desta fonte de nitrogênio ($\geq 0,2\%$), o fungo teria a sua disposição todos os nutrientes necessários para seu crescimento não sendo necessário consumir o ácido tânico para suprir suas necessidades metabólicas, não produzindo assim a tanase. Outros autores relataram que o uso de fontes adicionais de nitrogênio melhorou a produção enzimática, como a adição de peptona, uma fonte orgânica de nitrogênio, para *A. fumigatus* CAS21 (CAVALCANTI et al., 2017) e *A. phoenicis* (RIUL et al., 2013), assim como observado também com extrato de levedura. Entretanto, muitos estudos apresentam fontes inorgânicas de nitrogênio como melhores para a máxima produção enzimática, como relatado em George e Ong (2013) para *A. niger* na presença de nitrato de amônia (NH_4NO_3) e em Aboubakr et al. (2013) para *A. niger* Van Tieghem na presença de nitrato de sódio (NaNO_3). O meio Khanna utilizado no presente estudo apresenta nitrato de amônio em sua composição, o que pode ter contribuído positivamente na produção enzimática.

Figura 15. Produção de tanase por biofilmes de *A. ochraceus* em função de diferentes fontes de nitrogênio (A) e em função de diferentes concentrações de extrato de levedura (B). Cultivos realizados em meio Khanna, com 1,5% (m/v) de ácido tânico como fonte de carbono, por 72 horas a 50 rpm e 28°C.

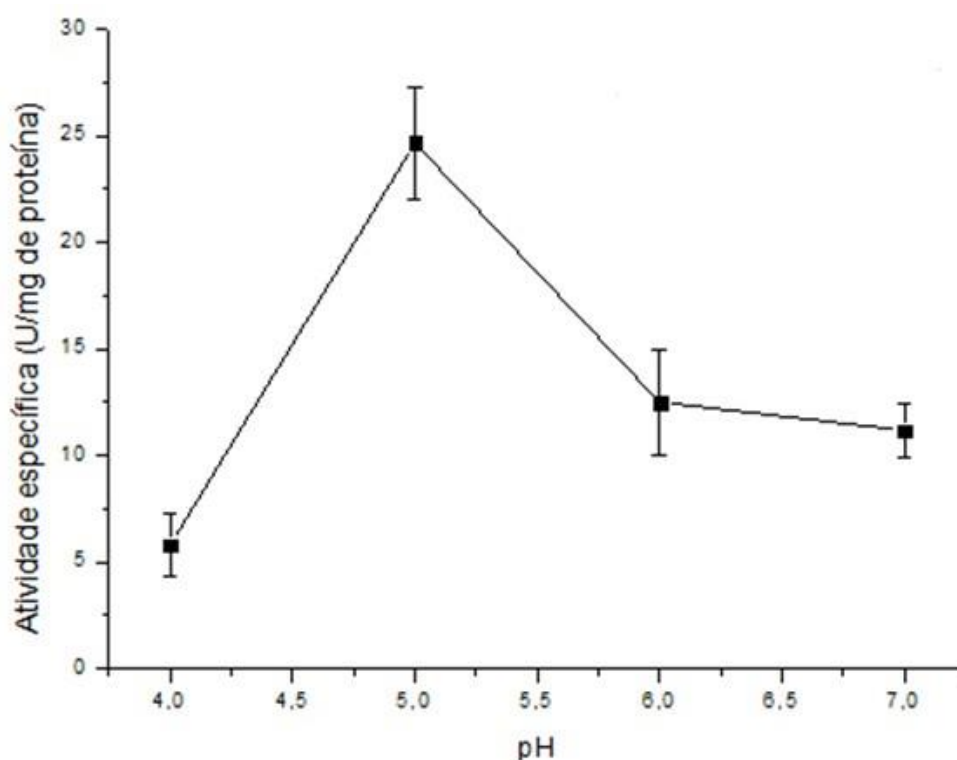


Fonte: Autora.

4.3.5 Influência do pH inicial do cultivo na produção de tanase por FB

Na figura 16 é apresentada a influência de diferentes valores de pH inicial do meio de cultivo sobre a produção tanásica por biofilmes de *A. ochraceus*.

Figura 16. Influência do pH inicial do meio de cultivo na produção de tanase por *A. ochraceus*. Os ensaios foram realizados em meio Khanna contendo 1,5% (m/v) de ácido tânico como fonte de carbono e 0,1% (m/v) de extrato de levedura como fonte adicional de nitrogênio, por 72 horas a 50 rpm e 28°C.



Fonte: Autora.

No pH 5,0 o microrganismo apresentou o maior valor de atividade específica (24,64 U/mg de proteína) sendo o menor valor obtido em pH 4,0 (5,78 U/mg de proteína). Na produção enzimática por *Aspergillus oryzae* (VARADHARAJAN et al., 2015) e *Aspergillus niger* (LAL e GARDNER, 2012), valores de pH igual a 5,0 foram relatados como ideais para máxima produção tanásica. No trabalho efetuado por Cavalcanti et al. (2017), foi relatado o uso de pH inicial do meio de cultivo igual a 5,0 para a produção tanásica em FSbm por *Aspergillus fumigatus* CAS-21. Segundo Belmares et al. (2004), em valores de

pH iniciais de 3,5 a 6,5, a produção tanásica por espécies de *Aspergillus* é favorecida, estando o valor encontrado no presente estudo condizente com a literatura.

A determinação das melhores condições do processo fermentativo em FB possibilitou um aumento na produção da enzima de interesse. Como demonstrado na Tabela 4, o fungo filamentososo *A. ochraceus* apresentou sua maior produção tanásica extracelular em:

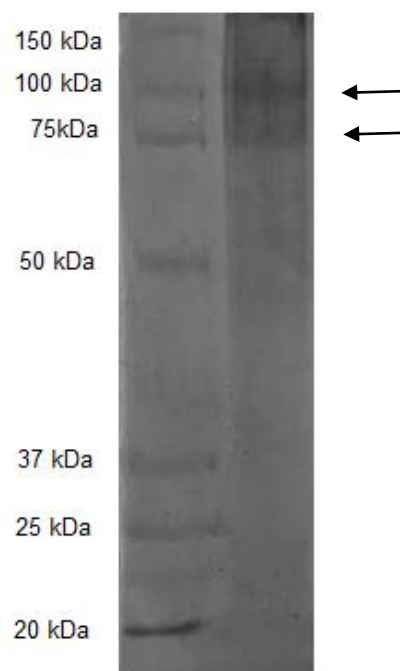
Tabela 4. Melhores condições para a produção tanásica extracelular por biofilmes de *A. ochraceus*.

Meio de cultivo	Khanna
Tempo de cultivo	72 horas
Fonte adicional de carbono	1,5% (m/v) de ácido tânico
Fonte adicional de nitrogênio	0,1% (m/v) de extrato de levedura
pH inicial de cultivo	5,0
Temperatura de cultivo	28°C
Agitação	50 rpm

4.4 Eletroforese em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE)

Com o objetivo de analisar o perfil proteico do filtrado extracelular obtido, amostras contendo tanase foram aplicadas em eletroforese em condições desnaturantes (12% SDS- PAGE) (Figura 17).

Figura 17. Perfil eletroforético em condições desnaturantes (12% SDS-PAGE) para as proteínas obtidas do filtrado extracelular bruto do cultivo de *A. ochraceus* em FB em meio Khanna com 1,5% (m/v) de ácido tânico como fonte de carbono, 0,1% (m/v) de extrato de levedura, pH inicial 5,0, e mantido por 72 horas a 28°C e 50 rpm.



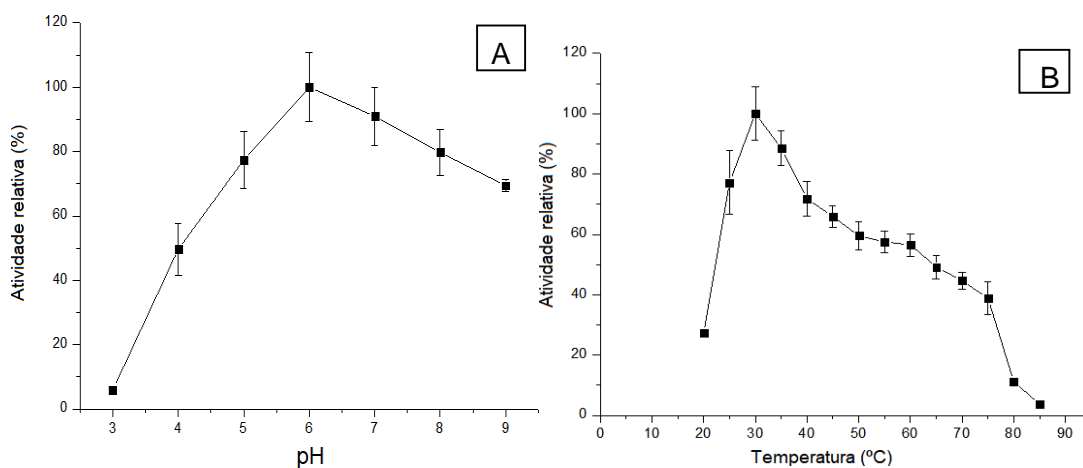
Fonte: Autora.

Utilizando o filtrado bruto extracelular é possível verificar a presença de duas bandas proteicas com aproximadamente 75 kDa e 100 kDa. Na literatura encontramos valores semelhantes relatados para outras tanases fúngicas, como a produzida por *A. fumigatus* CAS-21 com massa molecular de 60,34 kDa (CAVALCANTI et al., 2018), a produzida por *A. ochraceus* com 85 kDa (GONÇALVES et al., 2012) e a de *A. oryzae* com 64 kDa (HATAMOTO et al., 1996). Dadas as condições de cultivo de *A. ochraceus* e os valores de massas moleculares relatadas para tanases fúngicas, podemos supor que a presença desta banda proteica, indica a existência da enzima tanase.

4.5 Influência da temperatura e do pH na atividade tanásica

A enzima presente no filtrado extracelular apresentou pH ótimo aparente de atividade igual a 6,0 e temperatura ótima aparente de atividade igual a 30°C, como pode ser observado na Figura 18. De acordo com Costa e colaboradores (2008), as tanases fúngicas são geralmente caracterizadas como enzimas ácidas com pH ótimo aparente em torno de 5,5. As tanases obtidas a partir de fontes microbianas apresentam atividades ótimas em temperaturas no intervalo de 20°C a 60°C mas, em geral, a temperatura ótima ocorre em torno de 35°C (CAVALCANTI et al., 2017). Temperatura e pH ótimos de atividade de 30°C e pH 5,0, respectivamente, foram descritos para a tanase produzida por *Aspergillus tamaris* (COSTA et al., 2008). Segundo Bagga, Pramanik e Pandey (2015), temperatura e pH ótimos de atividade de 60°C e pH 5,0 foram observados para a tanase produzida pelo fungo *Aspergillus aculeatus*. Entretanto, a tanase de *A. ochraceus* produzida em FSbm (GONÇALVES et al., 2012) apresentou temperatura ótima de atividade igual a 40°C, diferindo do encontrado para a enzima produzida em FB. O pH ótimo aparente também diferiu sendo de 5,0 em FSbm e 6,0 em FB. Usando o mesmo fungo, variações nas propriedades físico-químicas da enzima são esperadas, uma vez que ocorrem diferenças quanto ao crescimento e morfologia fúngica quando o fungo se encontra livre ou firmemente aderido a uma superfície, como é o caso do biofilme. Isto deve-se principalmente ao fato de que durante a formação de um biofilme em um suporte polimérico inerte, os genes são expressos diferencialmente, resultando em fenótipos diferentes (HARDING et al., 2009; AZIANI et al., 2012). O efeito do pH na atividade da enzima é determinado pela natureza dos aminoácidos no sítio ativo, que sofre protonação e desprotonação, e pelas mudanças conformacionais induzidas pela ionização de outros aminoácidos. As enzimas são muito sensíveis a mudanças no pH e funcionam melhor em uma faixa muito limitada, com um pH ótimo definido (SABU et al., 2005).

Figura 18. Determinação do pH (A) e temperatura (B) ótimos aparentes para atividade tanásica extracelular produzida pelo fungo *Aspergillus ochraceus* em FB. Em (A) 100% = 22,82 U/mg de proteína. Em (B) 100% = 33,61 U/mg de proteína.



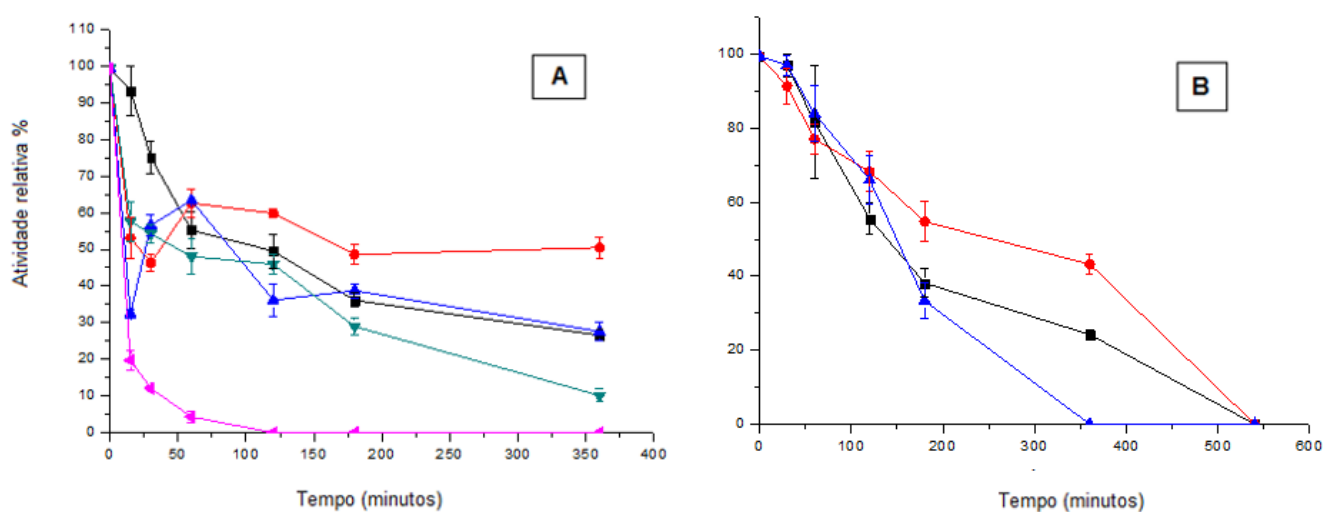
Fonte: Autora.

A estabilidade térmica e ao pH foram verificadas para enzima presente no filtrado bruto extracelular (Figura 19). Quando a tanase foi incubada a 30°C por 60 minutos, 62% de sua atividade inicial foi mantida, e no tempo de 180 minutos a atividade foi reduzida pela metade (Figura 19A). Nas temperaturas de 25°C, 40°C e 50°C a enzima manteve 36%, 29% e 39% de sua atividade inicial por 180 minutos, respectivamente. Na temperatura de 60°C notamos a menor estabilidade térmica da enzima. Normalmente a tanase é estável em temperaturas entre 10 e 45°C (PINTO et al., 2005). A tanase produzida por *A. fumigatus* CAS21 apresentou 50% de atividade após 180 minutos de incubação a 30°C (CAVALCANTI, JORGE e GUIMARÃES, 2018). Já a tanase produzida por *A. tamaritii* foi estável em temperaturas baixas (5°C a 25°C) durante várias horas enquanto em temperaturas elevadas, como 40°C, foi estável durante apenas 1 hora (COSTA et al., 2012).

Com relação à estabilidade ao pH (Figura 19B), a enzima apresentou em pH 6,0, após 60 minutos de incubação, 77% da atividade inicial e decorridos 360 minutos houve perda de aproximadamente 50% de sua atividade. Nos pH 5,0 e 7,0, após 120 minutos de incubação, foram mantidos 55% e 65% da atividade

enzimática inicial, respectivamente. Entretanto, após 360 minutos no pH 7,0 a enzima não apresentou mais atividade. As tanases produzidas por *A. oryzae* e *A. tamarii* apresentaram resultados semelhantes aos aqui encontrados para a estabilidade ao pH (ALDEL-NABY et al., 2016; COSTA et al., 2012). A estabilidade de uma enzima é um aspecto importante de ser compreendido quando se considera sua aplicação em processos biotecnológicos, uma vez que pode fornecer informações sobre a estrutura da enzima e também ajudar a otimizar os lucros dos processos enzimáticos (ABDEL-NABY et al., 2016).

Figura 19. Estabilidade térmica (A) da tanase produzida em FB por *A. ochraceus* nas temperaturas de 25°C (■), 30°C (●), 40°C (▲), 50°C (▲) e 60°C (▲), e estabilidade ao pH (B) frente aos valores de pH 5,0 (■), 6,0 (●) e 7,0 (▲) por diferentes períodos. 100% de atividade relativa corresponde a 26,28 U/mg de proteína.



Fonte: Autora.

4.6 Efeito de diferentes sais e outros compostos na atividade tanásica

Conforme pode ser observado na Tabela 5, a tanase extracelular produzida por biofilmes de *A. ochraceus* foi ativada por $MnCl_2$ (+ 23,97%) e

NH₄Cl (+ 27,84%). As maiores inibições da atividade enzimática foram observadas na presença de Ag⁺ (- 33%) e Ba²⁺ (- 34%). Inibição na ordem de 15-20% foi observada na presença de CuCl₂, MnSO₄, MgSO₄ e NaCl. Os demais sais não apresentarem influência significativa na atividade enzimática.

Normalmente as tanases são inibidas pelo íon Fe²⁺, como no caso das tanases produzidas por *A. fumigatus* CAS-21 (CAVALCANTI, JORGE e GUIMARÃES, 2018), *A. carbonarius* (VALERA et al., 2015), *A. niger* ATCC 16620 (SABU et al., 2005) e *A. oryzae* (ABDEL-NABEY; EL-TANASH; SHERIEF, 2016), diferindo do observado no presente estudo, sendo um dos principais diferenciais da enzima, uma vez que esta pode ser utilizada em processos em que o íon Fe²⁺ esteja presente. Além disso, a inibição por Ag⁺ e Ba²⁺ condiz com a literatura (YAO et al., 2014).

Muitas enzimas requerem íons metálicos como ativadores para expressar sua atividade catalítica absoluta. Essa ativação é muito importante no nível industrial, uma vez que, deste modo, a reação enzimática atinge sua máxima eficiência, gerando o produto de interesse em maior quantidade. As tanases normalmente requerem a presença de íons metálicos específicos, especialmente cátions divalentes, para expressar sua máxima atividade catalítica. Geralmente co-fatores não são necessários para a atividade tanásica. A ativação da enzima por íons metálicos pode alterar a constante de equilíbrio da reação enzimática, seja alterando a carga superficial da molécula, modificando assim a conformação da enzima ou atuando em seu sítio ativo, facilitando a formação do complexo enzima-substrato (ES) (MUKHERJEE e BANERJEE, 2006; YAO et al., 2014)

Tabela 5. Efeito de diferentes sais na atividade tanásica extracelular do fungo *A. ochraceus*.

Sais (1mM)	Atividade relativa (%)
Controle	100
AgNO ₃	67,74 ± 5,83
BaCl ₂	66,45 ± 3,36
CaCl ₂	95,26 ± 9,09
CuCl ₂	85,26 ± 9,40
MnSO ₄	80,75 ± 6,70
MnCl ₂	123,97 ± 9,36
MgSO ₄	81,50 ± 3,24
CuSO ₄	105,81 ± 4,43
Fe ₂ SO ₄	109,89 ± 6,36
FeCl ₂	101,61 ± 3,91
KH ₂ PO ₄	109,13 ± 3,09
MgCl ₂	111,51 ± 7,18
NaCl	82,9 ± 7,13
NH ₄ Cl	127,84 ± 4,51
ZnSO ₄	101,82 ± 2,07

100% = 15,35 ± 0,84 U/mg de proteína.

Outros compostos também afetaram a atividade enzimática como os solventes orgânicos, quelante e surfactantes (Tabela 6). Na presença dos surfactantes Triton X-100, Tween 20 e SDS, a atividade enzimática foi mantida. Já os solventes orgânicos, com exceção do butanol (redução de 38,43%), não apresentaram grande influência na atividade tanásica. Entretanto, percebemos que com o aumento do número de carbonos do hidrocarboneto e consequente aumento da hidrofobicidade há influência negativa na atividade enzimática. Do ponto de vista biotecnológico existem inúmeras vantagens de se realizar reações enzimáticas em solventes orgânicos como, por exemplo, a alta solubilidade da maioria dos compostos orgânicos em meios não aquosos, maior estabilidade da enzima e relativa facilidade de recuperação do produto. O uso de solventes

orgânicos pode, ainda, aumentar a solubilidade de substratos não polares, aumentar a estabilidade térmica de enzimas, diminuir reações colaterais dependentes de água ou eliminar a contaminação microbiana (CHHOKAR et al., 2010).

O agente desnaturante β -mercaptoetanol promoveu uma leve redução na atividade tanásica (-13,51%). Este composto reduziu a atividade da tanase produzida por uma co-cultura de *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus foetidus*. A tanase de *A. niger* foi também inativada por este composto (BARTHOMEUF et al. 1994). O β -mercaptoetanol atua clivando as pontes dissulfeto presentes na estrutura proteica, inibindo assim a atividade enzimática devido alterações no sítio ativo (MUKHERJEE; BANERJEE, 2006). O EDTA também reduziu a atividade tanásica (-18,25 %), assim como reportado para a tanase produzida por *Verticillium* sp., a qual teve sua atividade drasticamente reduzida (KASIECZKA-BURNECKA et al., 2007).

Assim como relatado para *A. fumigatus* CAS-21 (CAVALCANTI, JORGE e GUIMARÃES, 2018), a ureia em baixas concentrações promoveu aumento da atividade tanásica (+18,42%). Em concentrações elevadas a ureia age quebrando todas as ligações de hidrogênio presentes na proteína provocando alteração conformacional na estrutura terciária da enzima e, conseqüentemente, desnaturação (MAHAPATRA et al., 2005). A capacidade da tanase, produzida por *A. ochraceus* em FB, de permanecer estável na presença de solventes, surfactantes e desnaturantes são características favoráveis para aplicações industriais da enzima (CAVALCANTI, JORGE e GUIMARÃES, 2018).

Tabela 6. Efeito de compostos químicos na atividade tanásica extracelular do fungo *A. ochraceus*.

Compostos	Atividade relativa (%)
Controle	100
Etanol (1%)	102,44 ± 4,01
Metanol (1%)	103,68 ± 3,45
Acetonitrila (1%)	101,05 ± 6,21
Isopropanol (1%)	92,80 ± 6,53
Butanol (1%)	61,57 ± 3,20
Acetona (1%)	90,35 ± 5,62
Triton X-100 (0,01%)	105,61 ± 3,95
Tween - 20 (0,01%)	94,38 ± 4,08
SDS (1mM)	104,35 ± 8,03
β-mercaptoetanol (1mM)	86,49 ± 4,77
Ureia (1mM)	118,42 ± 7,75
EDTA (1mM)	81,75 ± 4,08

100% = 15,35 ± 0,84 U/mg de proteína.

4.7 Aplicações da tanase produzida por biofilmes de *A. ochraceus*

4.7.1 Síntese de propil-galato

De forma similar a outras esterases, a tanase em meio aquoso catalisa predominantemente reações hidrolíticas. Entretanto, em meios orgânicos com teores reduzidos ou nulos de água as reações de esterificação passam a ser predominantes (PINTO et al., 2005).

A habilidade da tanase produzida por *Aspergillus ochraceus* em FB de catalisar a reação de transesterificação na presença de 1-propanol foi analisada usando CCD (Figura 20). Em todos os tempos notamos a produção de ácido

gálico, substrato utilizado para a síntese química ou enzimática do propil-galato. Desta forma, o ácido gálico obtido foi parcialmente utilizado para a síntese do propil-galato, a qual aumentou em função do tempo de reação, da mesma forma como observado por Riul et al. (2013) utilizando a enzima produzida por *Aspergillus phoenicis*. A máxima produção foi observada no tempo de 96 horas, o que confirma o potencial da enzima para aplicações industriais. O propil-galato é um antioxidante alimentar de grande interesse uma vez que previne a oxidação lipídica (ADEGOKE et al., 1998).

Figura 20. Perfil cromatográfico em camada delgada (CCD) para a síntese de propil galato a partir da esterificação do ácido tânico (5mmol.L^{-1}) em presença de 1-propanol na proporção 1:1 (v/v) pela tanase extracelular produzida por biofilmes de *A. ochraceus*. Raias: (1) ácido tânico; (2) ácido gálico; (3) propil galato; (4) reação de 24 horas; (5) reação de 48 horas; (6) reação de 72 horas; (7) reação de 96 horas; (8) controle negativo.



Fonte: Autora.

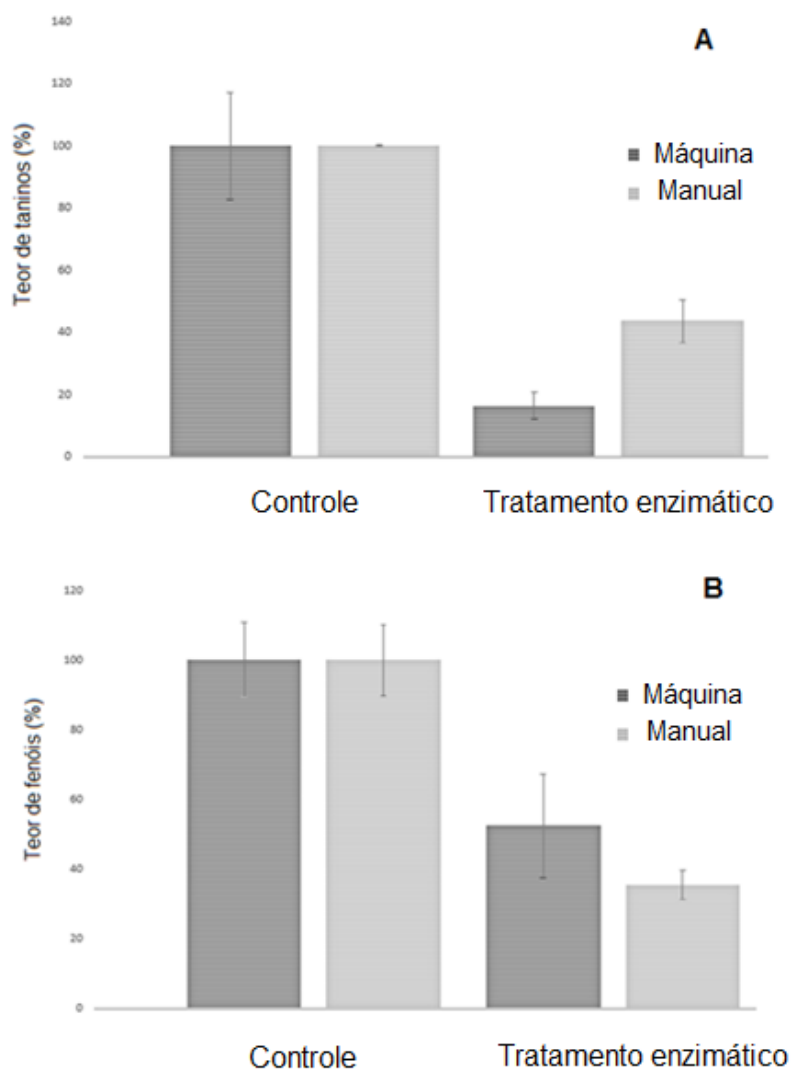
4.7.2 Aplicação da tanase em efluentes de curtume

A indústria de curtimento de couro é responsável por consumir grandes volumes de água e produzir grandes volumes de efluentes com alta concentração de compostos, como taninos vegetais e materiais orgânicos, contribuindo para a poluição ambiental. No tratamento desses efluentes com alta concentração de taninos, a aplicação de tanase representa um modelo de tratamento de baixo custo e efetivo na remoção desses compostos (CAVALCANTI, JORGE e GUIMARÃES, 2018).

Como pode ser observado na Figura 21 A, o teor de taninos presentes nos efluentes obtidos do processo em máquina e manual foi reduzido em 83,64% e 56,41%, respectivamente, após tratamento utilizando o filtrado bruto contendo tanase por 2 horas. Os dados apresentados mostram que a enzima foi mais eficaz para remoção dos taninos presentes na amostra de efluente obtida do processo de curtimento que utiliza máquina. Cavalcanti, Jorge e Guimarães (2018), relataram que a tanase produzida por *A. fumigatus* CAS-21 também foi eficaz na remoção dos taninos presentes nas amostras de efluentes de couro. Entretanto, esta enzima foi mais eficaz nas amostras de tratamento manual do que na de máquina, apresentando redução de 89% e 25% do conteúdo de taninos, respectivamente.

O valor de compostos fenólicos totais presentes nas amostras também foi verificado e a redução destes compostos com o tratamento enzimático (Figura 21B), foi de 47,6 % para o efluente de máquina e de 64,44% para o efluente manual.

Figura 21. Teor de taninos (A) e de compostos fenólicos totais (B) presentes nas amostras de efluentes obtidos do processo de curtição manual e em máquina após tratamento enzimático com a tanase produzida por biofilmes de *A. ochraceus*.



Fonte: Autora.

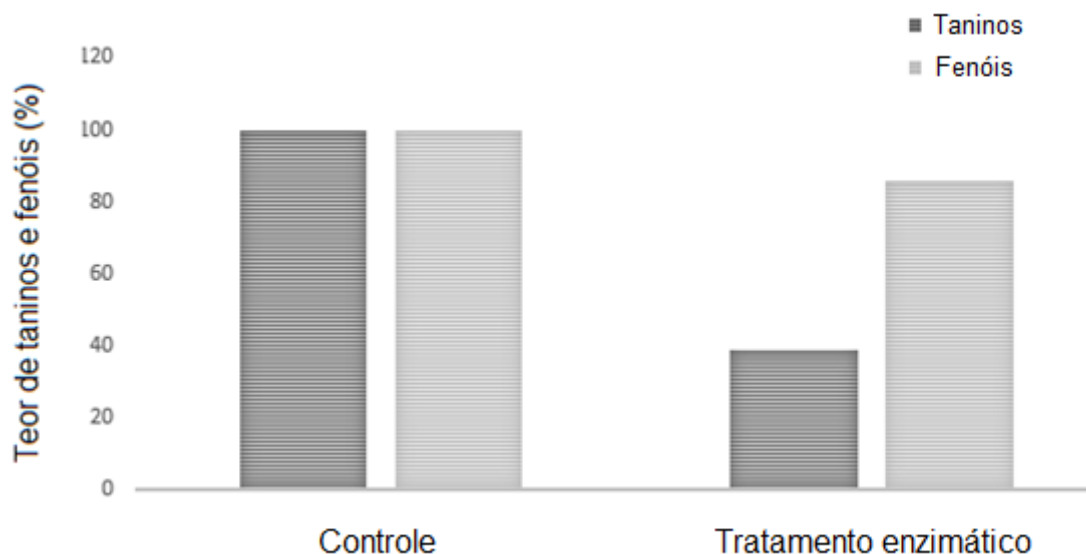
4.7.3 Sorgo

O sorgo é um alimento que apresenta elevada concentração de carboidratos solúveis, que são essenciais para a fermentação adequada do

ácido láctico presente na matéria orgânica, um fator responsável pela qualidade nutricional (TOLENTINO et al., 2016). Entretanto, algumas variedades deste cereal contêm fatores antinutricionais, como taninos, que podem formar complexos estáveis com proteínas e minerais, diminuindo a digestibilidade do animal e o valor nutricional do grão (SCHONS, BATTESTIN e MACEDO, 2012). Neste cenário, a aplicação de tanases para remoção destes compostos se torna um atrativo no preparo de rações animais.

A Figura 22 ilustra a redução dos taninos e compostos fenólicos totais, presentes na farinha de sorgo, após tratamento enzimático com o filtrado extracelular bruto contendo a tanase produzida por biofilmes de *A. ochraceus*. Houve redução de 61,31% no teor de taninos e 17,49% no teor de compostos fenólicos. Schons, Battestin e Macedo (2012) encontram valores de redução de 92% no teor de taninos e 66% no teor de compostos fenólicos da farinha de sorgo tratada com tanase produzida por *Paecilomyces variotii*, também pelo período de 5 dias.

Figura 22. Teor de taninos e fenóis presentes nas amostras de farinha de sorgo após 5 dias de tratamento enzimático.



Fonte: Autora.

4.8 Reutilização dos biofilmes fúngicos

A reutilização do biofilme é interessante uma vez que se evita o uso de mais suportes inertes e também meio de cultivo indutor para obtenção de novos biofilmes. Quando considerada a reutilização direta, foi observada queda na atividade enzimática (Tabela 7). Contudo, de acordo com a análise estatística, não houve diferença significativa entre as atividades observadas para a primeira e a segunda reutilizações. Mesmo diferindo estatisticamente da atividade obtida na primeira fermentação, a reutilização dos biofilmes permitiu a recuperação de atividades muito próximas. Estes resultados indicam a possibilidade de se utilizar o biofilme fúngico em processos de fermentação semi-contínuos, não sendo necessárias paradas constantes dos processos para limpeza e descontaminação.

Já no segundo modo de reutilização, no qual o biofilme passa por uma etapa de secagem antes de ser reutilizado, notamos aumentos da atividade enzimática na ordem de 20,5% e 30,5% para a primeira e segunda reutilizações, respectivamente, sendo estes aumentos estatisticamente significantes.

Quando pensamos em desidratação muitas vezes associamos esta aos graves danos que pode provocar aos organismos, no nível da membrana, e também às suas proteínas. Contudo, muitos organismos são capazes de sobreviver à completa desidratação e retomar rapidamente suas atividades metabólicas quando entram novamente em contato com a água, sendo esta uma estratégia de sobrevivência (FRANÇA, PANEY e ELEUTHERIO, 2007). Desse modo, a segunda forma de reutilização seria interessante como forma de armazenamento do biofilme, em momentos que se faz necessário ter uma pausa no processo fermentativo, sem perder a eficiência da produção.

Tabela 7. Reutilização dos biofilmes fúngicos de *A. ochraceus* em mais de uma etapa de fermentação.

Reutilização direta	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade relativa (%)
Primeira fermentação	0,32 ^A ± 0,01	100
Reutilização 1	0,30 ^B ± 0,01	93,00
Reutilização 2	0,29 ^B ± 0,00	89,90
Reutilização após secagem		
Primeira fermentação	0,28 ^A ± 0,00	100
Reutilização 1	0,34 ^B ± 0,01	120,50
Reutilização 2	0,36 ^C ± 0,01	130,50

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

5. Conclusões

O fungo filamentosso *A. ochraceus* cresceu sob a forma de biofilme quando aderido a uma superfície inerte de polietileno e apresentou bom potencial para a produção de tanases em fermentação por biofilme. Em condições ótimas em FB a tanase presente no filtrado extracelular bruto apresentou boa aplicabilidade, podendo ser utilizada em processos variados, o que é uma característica interessante no nível industrial, destacando sua boa estabilidade térmica e ao pH. Além disso, a temperatura ótima de atividade obtida pode ser facilmente mantida em processos industriais. Diferindo das tanases já descritas, a enzima foi resistente ao íon Fe^{2+} . O uso da enzima promoveu a síntese de propil-galato, permitiu a redução do teor taninos de efluentes de curtume industrial e da farinha de sorgo, empregada em rações animais. A reutilização de biofilmes em processos fermentativos para a produção enzimática é viável, gerando economia de tempo e provável redução de custos do processo. Considerando os resultados obtidos, a presente pesquisa confirmou o potencial da FB na produção de tanases por fungos filamentosos e evidenciou o potencial uso em processos industriais. E POSSIBILIDADES FUTURAS? NOVOS CAMINHOS???

REFERÊNCIAS

ABOUBAKR, H. A.; EL-SAHN, M. A.; EL-BANNA, A. A. Some factors affecting tannase production by *Aspergillus niger* Van Tieghem. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 559-567, 2013.

ABDEL-NABEY, M. A.; EL-TANASH, A. B.; SHERIEF, A. D. A. Structural characterization, catalytic, kinetic and thermodynamic properties of *Aspergillus oryzae* tannase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 803-811, 2016.

ADEGOKE, G. O.; VIJAY KUMAR, M.; GOPALA KRISHNA, A. G.; VARADARAJ, M. C.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B. R. Antioxidants and lipid oxidation in foods – A critical appraisal. **Journal of Food Science and Technology**, v.35, n.4, p. 283–298, 1998.

AGUILAR, C.; AUGUR, C.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA, E. A comparison of methods to determine tannin acyl hydrolase activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.42, n.3, p. 355-361, 1999.

AGUILAR, C. N.; AUGUR, C.; FAVELA-TORRES, E.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid-state fermentation: influence of glucose and tannic acid. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 296-302, 2001.

AGUILAR, C. N.; GUTIERREZ-SANCHEZ, G. Review: Sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. **Food Science and Technology International**, v. 7, n. 5, p. 373-382, 2001.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

- ARBENZ, A.; AVÉROUS, L. Chemical modification of tannins to elaborate aromatic biobased macromolecular architectures. **Green Chemistry**, v.17, p.2626-2646, 2015.
- ARCHER, D. B.; CONNERTON, I. F.; MACKENZIE, D. A. Filamentous fungi for production of food additives and processing aids. **Food Biotechnology**, v. 111, p.99-147, 2008.
- AZIANI, G.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; GUIMARAES, L. H. S. Production of fructooligosaccharides by *Aspergillus phoenicis* biofilm on polyethylene as inert support. **Food Technology and Biotechnology**, v. 50, p. 40-45, 2012.
- BAJPAI, B.; PATIL, S. Induction of tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity in some members of fungi imperfecti. **Enzyme and Microbiol Technology**, v.20, p.612-614, 1997.
- BAGGA, J.; PRAMANIK, S.K.; PANDEY, V. Production and purification of tannase from *Aspergillus aculeatus* using plant derived raw tannin. **International Journal of Scientific Engineering and Technology**, v.4, n.2, p. 50-55, 2015.
- BANERJEE, D.; MAHAPATRA, S. Fungal tannase: a journey from strain isolation to enzyme applications. **Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology**, v. 6, n. 2, p. 49-60, 2012.
- BANERJEE, D.; PATI, B. R. Optimization of tannase production by *Aureobasidium pullulans* DBS66. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.17, n.6, p. 1049–1053, 2007.
- BARTHOMEU F. C.; REGERAT F.; POURRAT H. Production, purification and characterization of a tannase from *Aspergillus niger* LCF 8. **Journal of Fermentation Technology**, v.7, n.7, p.320-323, 1994.
- BATTESTIN, V.; MATSUDA, K. L.; MACEDO, A. G. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.15, n.1, p. 63-72, 2004.
- BATTESTINI, V.; MACEDO, G. A. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. **Bioresource Technologic**, v.98, p.1832-1837, 2007.

BELUR, P. D.; MUGERAYA, G. Microbial production of tannase: state of the art. *Research Journal of Microbiology*, v. 6, n. 1, p. 25-40, 2011.

BELMARES, R.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; RODRIGUEZ-HERRERA, R.; CORONEL, A. R.; AGUILAR, C. N. Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry. **Lebensmittel-Wissenschaft und Biotechnologie**, v. 37, p. 857-864, 2004.

BENNETT, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. In: MACHIDA, M. & GOMI, K. (editors). **Aspergillus Molecular Biology and Genomics**. Linton: Caister Academic Press, p. 1-16, 2010.

BENIWAL, V.; KUMAR, A.; SHARMA, J.; CHHOKAR, V. Recent advances in industrial application of tannases: a review. Recent **Patents on Biotechnology**, v. 7, p. 228-233, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*; v.72, n.2, p. 248-54, 1976.

BRADDOO, S.; GUPTA, R.; SAXENA, R. K. Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tannase from *Aspergillus japonicus*. **Process Biochemistry**, v. 32, p. 135-139, 1997.

BETINI, J. H. A.; MICHELIN, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, n. 32, p. 819-824, 2009.

CABALLERO-CÓRDOBA, G. M.; PACHECO, M. T. B.; SGARBIERI, V. C. Composição química da biomassa de levedura integral (*Saccharomyces* sp.) e determinação do valor nutritivo da proteína em células íntegras ou rompidas mecanicamente. **Food Science and Technology**, v.17, n.2, p. 102-106, 1997.

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**, v. 181, p. 111-126, 2001.

CAVALCANTI, R. M. F.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of *Aspergillus fumigatus* CAS-21 tannase with potential for propyl gallate synthesis and treatment of tannery effluent from leather industry. **3 Biotech**, v.8, p.1-11, 2018.

CAVALCANTI, R.M.F.; ORNELA P.H.O.; JORGE J.A.; GUIMARÃES L.H.S. Screening, selection and optimization of the culture conditions for tannase production by endophytic fungi Isolated from caatinga. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v.5, n.1, p.001-009, 2017.

CAVALCANTI, R.M.F. **Bioprospecção de tanases produzidas por fungos endofíticos isolados de espécies vegetais da Caatinga**. 2017. Dissertação (Mestrado em biotecnologia), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP, Araraquara, 2017.

CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M.; RODRÍGUEZ-DURAN, L. V.; BALAGURUSAMY, N.; BARRAGÁN-PRADO, A.; RODRÍGUEZ, R.; CONTRERAS, C. C.; AGUILAR, C. N. et al. Biotechnological advances and challenges of tanase: An overview. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 445-459, 2011.

CHHOKAR, V.; SANGWAN, M.; BENIWAL, V.; NEHRA, K.; NEHRA, K.S. Effect of additives on the activity of tannase from *Aspergillus awamori* MTCC9299. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 8, p. 2256-2264, 2010.

COSTA, A. M.; KADOWAKI, M. K.; MINOZZO, M. C.; SOUZA, C. G. M.; BOER, C. G.; BRACHT, A.; PERALTA, M. Production, purification and characterization of tannase from *Aspergillus tamaritii*. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 391-398, 2012.

COSTA, A. M.; RIBEIRO, W. X.; KATO, E.; MONTEIRO, A. R. G.; PERALTA, R. M. Production of tannase by *Aspergillus tamaritii* in submerged cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 2, p. 399-404, 2008.

CUNHA, F. M. **Desenvolvimento de processo não-convencional para produção de celulase por *Aspergillus niger* em biorreator pneumático na presença de bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 111 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

DOLAN, R. M.; COSTERTON, W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.2, p.167-193,2002.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; BOLIVAR, J.M.; ROCHA-MARTIN, J.; CUIEL, J.A.; MUÑOZ, R.; RIVAS, B.; CARRASCOS, A.V.; GUIBAN, J.M. Synthesis of propyl gallate by transesterification of tannic acid in aqueous media by derivatives of tannase from *Lactobacillus plantarum*. **Food Chemistry**, v.128, p.214–217, 2011.

FLORENCIO, C.; BADINO, A.C.; FARINAS, C.S. Desafios relacionados à produção e aplicação das enzimas celulolíticas na hidrólise da biomassa lignocelulósica. **Química Nova** [online], v.40, n.9, p.1082-1093, 2017.

FRANÇA, M. B.; PANEY, A. D.; ELEUTHERIO, E. C. A. Oxidative stress and its effects during dehydration. **Science Direct**, v. 146, n. 4, p. 621-631, 2007.

FRISVAD, J. C.; LARSEN, T. O. Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.99, n.14, p.7859-7877, 2015.

GEORGE, D. S.; ONG, C. B. Improvement of tannase production under submerged fermentation by *Aspergillus niger* FBT1 isolated from a mangrove forest. **Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology**, v. 94, n. 4, p. 451- 456, 2013.

GÓMEZ-PLAZA, E.; CANO-LÓPEZ, M. A review on micro-oxygenation of red wines: Claims, benefits and the underlying chemistry. **Food Chemistry**, v.125, p. 1131-1140, 2011.

GONÇALVES, H.B.; RIUL, A.J.; QUIAPIN, A.C.; JORGE, J.A.; GUIMARÃES, L.H.S. Characterization of a thermostable extracellular tannase produced under submerged fermentation by *Aspergillus ochraceus*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 5, 2012.

GONÇALVES, H. B.; RIUL, A. J.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Plant leaves as alternative substrates for tannase production by *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus phoenicis* and *Emmericela nidulans* under solid-state fermentation. **Advances in Biological Research**, v. 7, p. 296-300, 2013.

GOUVEIA, M. L.; ARAÚJO, R.S.; MELLO, M. R. F.; SENA, A. R. Isolamento e avaliação qualitativa de bactérias endofíticas e epifíticas quanto à habilidade de utilizar ácido tânico. **VII CONNEPI Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação**, Palmas-tocantins, 2012.

GUIMARÃES, L. H. S.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T.; JORGE, J. A. Production and characterization of a thermostable extracellular β -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 52-57, 2007.

GUIMARÃES, L. H. S.; SOUZA, P. N. C. *Aspergillus* biotechnology: an overview on the production of hydrolases and secondary metabolites. **Current Biotechnology**, v.6, n.4, p.283-294, 2017.

GUTIÉRREZ-CORREA, M.; LUDEÑA, Y.; RAMAGE, G.; VILLENA, G. K. Recent advances on filamentous fungal biofilms for industrial uses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.167, n.5, p.1235-1253, 2012.

HARDING, M. W.; MARQUES, L. L.; HOWARD, R.J.; OLSON, M.E. Can filamentous fungi form biofilms? **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 475–480, 2009.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 4, v. 26, p. 809-812, 1978.

HASSANPOUR, S.; MAHERI-SIS, N.; ESHRATKHAH, B.; MEHMANDAR, F. B. Plants and secondary metabolites (Tannins): a review. **International Journal of Forest, Soil and Erosion**, v. 1, p. 47-53, 2011.

HATAMOTO, O.; WATARI, T.; KIKUCHI, M.; MIZUSAWA, K.; SEKINE, H. Cloning and sequencing of the gene encoding tannase and a structural study of the tannase subunit from *Aspergillus oryzae*. **Gene**, v.175, p.215-221, 1996.

HECTOR, H. J; SCHOLTMEIJER, K. Hydrophobins: proteins with potencial. **Current opinion in biotechnology**, v.16, p. 434-439, 2005.

- JANA, A.; HALDER, S. K.; BANERJEE, A.; PAUL, T.; MONDAL, K. C.; MOHAPATRA, P. K. Biosynthesis, structural architecture and biotechnological potential of bacterial tannase: a molecular advancement. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 327-340, 2014.
- KASIECZKA-BURNECKA, M.; KUC, K.; KALINOWSKA, H.; KNAP, M.; TURKIEWICZ, M. Purification and characterization of two cold-adapted extracellular tannin acyl hydrolases from an Antarctic strain *Verticillium* sp. P9. **Journal of Applied Biology e Biotechnology**, n.77, v.1, p. 77-89, 2007.
- KANIAS, T.; ACKER, J. P. Biopreservation of red blood cells – the struggle with hemoglobin oxidation. **The FEBS Journal**, n. 277, p. 343-356, 2010.
- KHANNA, P.; SUNDARIL, S. S.; KUMAR, N. J. Production, isolation and partial purification of xylanases from *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 242-243, 1995.
- KLICH, M. A. Identification of Common *Aspergillus* species. **Amsterdam: Centraalbureau voor Schimmelauteurs**, p.116,2002.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LAL, D.; SHRIVASTAVA, D.; VERMA, H. N.; GARDNER, J. J. Production of Tannin Acyl Hydrolase (E.C. 3.1.1.20) from *Aspergillus niger* isolated from bark of *Acacia nilotica*. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v.2, n.4, p.566-572, 2012.
- LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. **Advances in Applied Microbiology**, v. 44, p. 215-260, 1997.
- LIU, T. P. S. L.; PORTO, T. S.; MOREIRA, K. A.; TAKAKI, G. M. C.; BRANDÃO COSTA, R.; HERCULANO, P. N.; PORTO, A. L. F. Tannase production by *Aspergillus* spp. UCP1284 using cashew bagasse under solid state Fermentation. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 6, p. 565-571, 2016.

MAESTRELLO, C. C. **Produção de celulases e xilanases pelo fungo *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223 cultivado em Fermentação em Estado Sólido utilizando resíduos agroindustriais.** 2018. Dissertação (Mestrado em biotecnologia), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, Araraquara, 2018.

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

MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 715-721, 2002.

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

MAHENDRAN, B.; RAMAN, N.; KIM, D. Purification and characterization of tannase from *Paecilomyces variotii*: hydrolysis of tannic acid using immobilized tannase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 445-451, 2006.

MANKEL, A.; KRAUSE, K.; KOTHE, E. Identification of a hydrophobin gene that is developmentally regulated in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma terreum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1408-1413, 2002.

MELO, A. G.; PEDROSO, R. C. F.; GUIMARÃES, L. H. S.; ALVES, J. G. L. F.; DIAS, E. S.; RESENDE, M. L. V.; CARDOSO, P. G. The optimization of *Aspergillus* sp. GM4 tannase production under submerged fermentation. **Advances in Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 143- 150, 2014.

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**, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.

MIN, B.R.; BARRY, T.N.; ATTWOOD, G.T.; MCNABB, W.C. The effect os condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh

temperature forages: a review. **Animal Feed Science and Technology**, n.106, v.1, p.3-19,2003.

MUKHERJEE, G.; BANERJEE, R. Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by a co-culture of *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus foetidus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.22, p.207-212, 2006.

MURUGAN, K.; AL-SOHAIBANI, S. A. Biocompatible removal of tannin and associated color from tannery effluent using the biomass and tannin acyl hydrolase (E.C.3.1.1.20) enzymes of mango industry solid waste isolate *Aspergillus candidus* MTTC 9628. **Research Journal of Microbiology**, v. 5, n.4, p. 262-271, 2010.

NAKAMURA, Y.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples: application to tannic acid metabolism in the rat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.1, p.331-339, 2003.

PALACIUS-CABRERA, H.; TANIWAKI, M. H.; HASHIMOTO, J. M.; MENEZES, H. C. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, n.1, p.24-28, 2005.

PANDEY, A.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ, J. A. L.; SOCCOL, V. T. Production, purification and properties of microbial phytases. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 203-214, 2001.

PANDEY, A. Solid-statefermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n.2-3, p.81-84, 2003.

PARDO, E.; MARÍN, S.; SOLSONA, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, J. Modeling of germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* as affected by water activity and temperature on a barley-based medium. **Food Microbiol**, v.21, p.267-274, 2004.

PATRA, A.; SAXENA, J. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1198-1222, 2010.

- PERALTA, R. M.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A. β -D-glycosidase activities of *Humicola grisea*: biochemical and kinetic characterization of a multifunctional enzyme. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1033, p. 243-249, 1990.
- PINTO, G. A. S.; GOURI, S.; LEITE, S. G. F.; BRITO, E. S. Tanase: conceitos, produção e aplicação. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 435-462, 2005.
- QUEIROZ, R. A. A.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, v.26, n.4. p. 485-492, 2002.
- RAMAGE, G.; MOWAT, E.; JONES, B.; WILLIAMS, C.; LOPEZ-RIBOT, J. Our current understanding of fungal biofilms. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 340- 355, 2009.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v.29, n.4, p.755-760, 2006.
- RAMOS, E.L.; MATA-GOMEZ, M.A.; RODRIGUEZ-DURAN, L.V.; BELMARES, R.E.; RODRIGUEZ-HERRERA, R.; AGUILAR, C.N. Catalytic and thermodynamic properties of a tannase produced by *Aspergillus niger* GH1 grown on polyurethane foam. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.165, n.5-6, p.1141–1151, 2011.
- RAO, S.; SANTHAKUMAR, A. B.; CHINKWO, K. A.; WU, G.; JOHNSON, S. K.; BLANCHARD, C. L. Characterization of phenolic compounds and antioxidant activity in sorghum grains. **Journal of Cereal Science**, v. 9, 2018.
- RANA, N.K; BHAT, T.K. Effect of fermentation system on the production and properties of *Aspergillus niger* van tieghem MTC 2425. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.51, n.4, p.203-212, 2005.
- REYNOLDS, T. B.; FINK G. R. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. **Science**, v. 291, n. 5505, p. 878-881, 2001.
- RIUL, A.J.; GONÇALVES, H.B.; JORGE, J.A.; GUIMARÃES, L.H.S. Characterization of a glucose- and solvent-tolerant extracellular tannase from

Aspergillus phoenicis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 85-86, p. 126-133, 2013.

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

RODARTE, M. P.; DIAS, D. R.; VILELA, D. M.; SCHWAN, R. F. Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.33, n.3, p.457-464,2011.

RODRÍGUEZ-DURÁN, L. V.; VALDIVIA-URDIALES, B.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; RODRÍGUEZ-HERREA, R.; AGUILAR, C. N. **Novel strategies for upstream and downstream processing of Tannin Acyl Hydrolase**. *Enzyme Research*, v. 2011, 2011.

ROPIAK, H. M.; LACHMANN, P.; RAMSAY, A.; GREEN, R. J.; MULLER-HARVEY, I. Identification of structural features of condensed tannins that affect protein aggregation. **Plos one**, n.12, v.1, p.1-23, 2017.

SABU, A.; KIRAN, G. S.; PANDEY, A. Purification and characterization of tannin acyl hydrolase from *Aspergillus niger* ATCC 16620. **Food Technology and Biotechnology**, v. 43, n.2, p. 133-138, 2005.

SATO, V.S.; JORGE, J.A.; GUIMARAES, L.H.S. Characterization of a thermotolerant phytase produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* biofilm on an inert support using sugarcane bagasse as carbon source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, p. 610–624, 2016.

SAUER, K.; CAMPER, A. K.; EHLICH, G. D.; COSTERTON, J. W.; DAVIES, D. G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 4, p. 1140-1154, 2002.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1-2, p. 21-40, 2001.

SCHONS, P. F.; BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A. Fermentation and enzyme treatments for sorghum. **Brazilian Journal of Microbiology**, n.1, v.43, p.89-97, 2012.

SELWAL, M. K.; SELWAL, K. K. High-level tannase production by *Penicillium atramentosum* KM using agro residues under submerged fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 139-148, 2012.

SETH, M.; CHAND, S. Biosynthesis of tannase and hydrolysis of tannins to gallic acid by *Aspergillus awamori* — optimisation of process parameters. **Process Biochemistry**, n. 36, p. 39-44, 2000.

SHARMA, S.; BHAT, T.K.; DAWRA, R.K.A. Spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. **Analytical Biochemistry** v. 279, p. 85-89, 2000.

SHAY, P. E.; CONSTABLE, C. P. Evidence for the role and fate of water-insoluble condensed tannins in the short-term reduction of carbon loss during litter decay. **Biogeochemistry**, v.137, n.1-2, p. 127-144, 2018.

THOMAS, J.; LIPTON INC.(United State); SANDERSON, G.; ENGLEWOOD, N.; COGGON, P.;ORNGEBURG, N. Green tea conversion using tannase and natural tea leaves. **United States patent** US 3812266, 1974.

TOLENTINO, D. C.; RODRIGUE, J. A. S.; PIRES, D. A. D.; VERIATO, F. T.; LIMA, L. O. B.; MOURA, M. M. A. The quality of silage of different sorghum genotypes. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 38, n. 2, p. 143-149; 2016.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 937 p.

VALERA, L.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of a multitolerant tannin acyl hydrolase II from *Aspergillus carbonarius* produced under solidstate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 464-470, 2015.

VARADHARAJAN, V.; VADIVEL, S. S.; RAMASWAMY, A.; SUNDHAEAMURTHY, V.; CHANDRASEKAR, P. Modeling and verification of process parameters for the production of tannase by *Aspergillus oryzae* under

submerged fermentation using agro-wastes. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 64, n. 1, p. 100-109, 2015.

VILLENA, G. K.; GUTIERREZ-CORREA, M. Production of cellulase by *Aspergillus niger* biofilms developed on polyester cloth. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 262-268, 2006.

VILLENA, G.K.; GUTIERREZ-CORRE, A.M. Morphological patterns of *Aspergillus niger* biofilms and pellets related to lignocellulolytic enzyme productivities. **Letters in Applied Microbiology**, v.45, p.231–7, 2007.

VILLENA, G. K.; GUTIÉRREZ-CORREA, M. Kinetic analysis of *Aspergillus niger* cellulase and xylanase production in biofilm and submerged fermentation. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.2, n.5, p.805-814, 2012.

WISEMAN, A. Handbook of enzyme biotechnology. **New York: John Wiley & Sons**, p. 148, 1975.

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

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