

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Purificação e Caracterização Bioquímica de Tanases
Produzidas pelo Fungo Filamentoso *Aspergillus phoenicis*

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

Alana Jacomini Riul

Araraquara

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Purificação e Caracterização Bioquímica de Tanases
Produzidas pelo Fungo Filamentoso *Aspergillus phoenicis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Química, UNESP, Araraquara, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia - Área de Concentração Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

Alana Jacomini Riul

Araraquara

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

R615p Riul, Alana Jacomini
Purificação e caracterização bioquímica de tanases
produzidas pelo fungo filamentoso *Aspergillus phoenicis* /
Alana Jacomini Riul. – Araraquara : [s.n], 2011
127 f. : il.

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

1. Biotecnologia. 2. Enzimas. 3. Tanase. 4. Taninos.
I. Título.

ALANA JACOMINI RIUL

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 20 de abril de 2011.

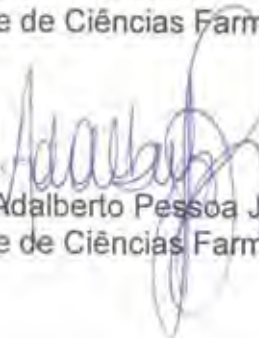
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães (Orientador)
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras / USP / Ribeirão Preto



Prof. Dr. Hamilton Cabral
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP / Ribeirão Preto



Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP / São Paulo

AGRADECIMENTOS

A Deus pela graça de viver e por estar sempre ao meu lado iluminando minhas escolhas e guiando meus passos.

Aos meus pais Marcos Antônio e Maria Aparecida pelo amor, carinho, educação e dedicação em todas as etapas da minha vida, por apoiarem as minhas decisões e acreditarem sempre em mim (amo vocês).

A toda a minha família por todo o apoio, confiança e amizade.

Ao Renan, pelo amor, carinho, respeito e paciência em estar sempre ao meu lado me apoiando e me incentivando nos momentos difíceis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Henrique, pela oportunidade, confiança depositada, pela dedicação e incentivo e por todo conhecimento transmitido. Muito obrigada!

A Prof. Dra. Maria de Lourdes T. M. Polizeli, ao Prof. Dr. João Atílio Jorge e ao Prof. Dr. Héctor Francisco Terenzi pelos ensinamentos, pelas valiosas sugestões, conselhos e amizade.

Aos técnicos Mariana, Maurício e Ricardo (Fessor) pelo auxílio técnico, pela disponibilidade e colaboração ao desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos de laboratório, que durante todo o meu mestrado muito me ensinaram, foram companheiros, amigos e colaboraram de diversas maneiras para a realização deste trabalho: Ana Vici, André Damásio, André Lucca, Cynthia, Fernanda, Jean, Josana, Jú Leão, Jú Nunes, Larissa, Liliane, Loli, Maller, Marielle, Marita, Matheus, Michele, Priscila, Rose, Simone, Taty, Telma, Tiago, Tony, Vivian e Zé Carlos.

Em especial as amigas muito queridas Loli pelo apoio dado desde o começo da minha iniciação científica, pela paciência e esclarecimento de todas as dúvidas, a Marielle (irmã gêmea) pelo companheirismo e pela ajuda em todas as disciplinas, também a Telma (Japonesa), Taty, Marita e Cynthia pela amizade, pelos conselhos, pela paciência nos ensinamentos e por compartilhar comigo vários momentos dentro e fora do laboratório, me apoiando sempre que preciso. Estarão sempre em meu coração.

A Lili pela grande ajuda na minha qualificação.

Aos amigos André, Beraba, Jean, Matheus e Zé pelos momentos de descontração e alegria com suas músicas e piadinhas.

Aos meus grandes amigos, amigos para toda a vida, Grazi, Max e Tida por todo carinho e confiança depositados em mim e com quem sempre posso dividir os momentos felizes e também os difíceis.

Meus agradecimentos aos funcionários da Unesp e da USP que contribuíram com esse trabalho, em especial as secretárias da Pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Química da UNESP-Araraquara por estarem sempre a disposição quando foi necessário.

A todos que tenham contribuído de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Os meus mais sinceros agradecimentos.

**“Não há saber mais ou saber menos:
há saberes diferentes.”**

Paulo Freire

**Dedico este trabalho aos meus pais, Marcos
Antônio e Maria Aparecida e ao Renan, pelo amor,
carinho, dedicação e por estarem sempre ao meu
lado me apoiando em todas as decisões.**

Alana Jacomini Riul graduou-se em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Barão de Mauá (2008). Atualmente é membro do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” no curso de mestrado, desenvolveu sua dissertação intitulada “Purificação e Caracterização Bioquímica de Tanases Produzidas pelo Fungo Filamentoso *Aspergillus phoenicis*” no Laboratório de Biologia Celular e Microbiologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP/SP, sob orientação do Professor Dr. Luis Henrique Souza Guimarães. Tem experiência na área de Microbiologia e Bioquímica, com ênfase em Biologia e Fisiologia dos Microrganismos.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE GERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABELAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT.....	XVI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 MECANISMO DE AÇÃO HIDROLÍTICA.....	3
1.2 TANINOS.....	5
1.2.1 Taninos hidrolisáveis.....	5
1.2.2 Taninos condensados.....	8
1.3 FONTES DE TANASES.....	9
1.3.1 Tanases em microrganismos.....	10
1.3.2 Fungos filamentosos e microrganismo em estudo.....	13
1.4 PROCESSOS FERMENTATIVOS NA PRODUÇÃO DE TANASES.....	19
1.5 APLICAÇÕES DAS TANASES.....	20
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 GERAL.....	24
2.2 ESPECÍFICOS.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 SELEÇÃO DA LINHAGEM PRODUTORA DE TANASES EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	26
3.1.1 Microrganismo selecionado.....	26
3.2 MANUTENÇÃO DAS CEPAS EM LABORATÓRIO E OBTENÇÃO DAS CULTURAS.....	26
3.2.1 Composição dos meios de cultivo e soluções de sais.....	27
3.3 PREPARAÇÃO DOS PRODUTOS AGROINDUSTRIAIS E FOLHAS DE VEGETAIS COMO SUBSTRATOS/ FONTES DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE TANASES EM FSS.....	31
3.4 INFLUÊNCIA DE FONTES DE NITROGÊNIO E FOSFATO NA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	31
3.5 OBTENÇÃO DAS ENZIMAS EXTRACELULAR E INTRACELULAR.....	31

3.6 INDUÇÃO DA BIOMASSA COM GLICOSE PARA A PRODUÇÃO DE TANASES.....	32
3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	32
3.8 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	33
3.9 QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS.....	33
3.10 PURIFICAÇÃO DAS TANASES EXTRA E INTRACELULAR EM COLUNA CROMATOGRÁFICA.....	34
3.11 PROCEDIMENTO ELETROFORÉTICO.....	34
3.12 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR.....	35
3.13 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS TANASES.....	36
3.13.1 Temperatura ótima e estabilidade térmica	36
3.13.2 pH ótimo e estabilidade ao pH.....	36
3.13.3 Efeito de diferentes compostos químicos na atividade tanásica.....	36
3.14 HIDRÓLISE DE DIFERENTES SUBSTRATOS E ANÁLISE DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE DO ÁCIDO TÂNICO E DO METIL GALATO.....	37
3.15 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS.....	38
3.16 SÍNTESE DE PROPIL GALATO.....	38
3.17 ANÁLISE DOS EXPERIMENTOS.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1 PRODUÇÃO DE TANASES POR <i>ASPERGILLUS PHOENICIS</i> EM FSbM E EM FSS.....	42
4.1.1 Produção de tanases em FSbm.....	43
4.1.1.1 Produção de tanases por diferentes linhagens de fungos filamentosos.....	43
4.1.1.2 Produção de tanases por <i>Aspergillus phoenicis</i> em função do meio de cultivo.....	45
4.1.1.3 Efeito da temperatura sobre o crescimento do fungo e sobre a produção de tanases em FSbm.....	47
4.1.1.4 Produção de tanases em FSbm em função do tempo de cultivo.....	50
4.1.1.5 Efeito do pH inicial do meio de cultivo na produção de tanases em FSbm.....	51
4.1.1.6 Efeito de fontes de carbono na produção tanásica em FSbm.....	53
4.1.1.7 Efeito de diferentes fontes de nitrogênio e fosfato na produção tanásica em FSbm.....	58
4.1.1.8 Indução da biomassa com glicose para a produção de tanases por <i>Aspergillus phoenicis</i>	63

4.1.2 Produção de tanases em FSS.....	66
4.1.2.1 Influência de diferentes substratos/ fontes de carbono na produção de tanases....	66
4.1.2.2 Efeito de diferentes soluções umectantes adicionadas a FSS na produção de tanases.....	69
4.1.2.3 Produção de tanases em FSS em função do tempo de cultivo.....	71
4.2 PURIFICAÇÃO DAS TANASES INTRA E EXTRACELULARES.....	73
4.2.1 Purificação das tanases intracelular e extracelular.....	74
4.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS TANASES INTRA E EXTRACELULARES.....	80
4.3.1 Determinação da massa molar nativa e conteúdo de carboidratos.....	81
4.3.2 Influência da temperatura e do pH sobre a atividade tanásica.....	83
4.3.3 Efeito de diferentes sais e outros compostos na atividade tanásica.....	89
4.3.4 Influência de glicose e ácido gálico na atividade tanásica.....	96
4.3.5 Estabilidade das tanases frente a diferentes solventes orgânicos.....	98
4.3.6 Atividades hidrolíticas das tanases sobre o ácido tânico e o metil galato.....	99
4.3.7 Parâmetros cinéticos.....	101
4.3.8 Análise dos produtos de hidrólise do ácido tânico e do metil galato.....	104
4.3.9 Análise qualitativa da hidrólise do ácido tânico e síntese de propil galato.....	107
5. CONCLUSÕES.....	110
6. REFERÊNCIAS.....	112

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hidrólise do ácido tânico (Modificado de Aguilar e Gutiérrez-Sánchez, 2001).....	2
Figura 2. Via de hidrólise do ácido tânico pela tanase. Ácido tânico (I), 1,2,3,4,6,-pentagaloil glicose (II), 2,3,4,6,-tetragaloil glicose (III), monogaloil glicose (IV), radical R ₁ (ácido gálico) e radical R ₂ (ácido digálico) (V). (Modificado de Lekha e Lonsane, 1997).....	4
Figura 3. Estrutura de galotaninos (A), ácido gálico-galoil (B) e digálico-digaloil (C) (Modificado de Bhat, 1998).....	6
Figura 4. Estrutura química do ácido tânico (Modificado de Nakamura, 2003).....	7
Figura 5. Estrutura de elagitaninos (A) e do ácido hexahidroxidifênico (B) (Modificado de Bhat, 1998).....	8
Figura 6. Estrutura de tanino condensado (Modificado de Lekha e Lonsane, 1997).....	9
Figura 7. Diagrama filogenético de Ascomicetos (Taylor <i>et al.</i> , 2006).....	13
Figura 8. Representação do <i>Aspergillus phoenicis</i> cultivado em meio sólido Vogel. (A) Fotomicrografia com aumento 400x, (B) e Microscopia eletrônica de varredura, representando os conidiósporos do fungo em estudo (C). (Rizzatti, 2004).....	16
Figura 9. Ciclo de vida de <i>Aspergillus nidulans</i> . Fases sexual (--), assexual (--) e parassexual (--). (Modificado de Casselton e Zolan, 2002).....	18
Figura 10. Crescimento de <i>A. phoenicis</i> a 25°, 30°, 35° e 40°C em placas de Petri contendo meio de aveia, por 120 h.....	49
Figura 11. Efeito da temperatura de incubação na produção de tanases (A) e na produção de proteínas (B) por <i>A. phoenicis</i> em FSbm, nas temperaturas de 25°, 30°, 35° e 40°C.....	49
Figura 12. Produção de tanases intra (●) e extracelulares (■) pelo fungo <i>A. phoenicis</i> em função do tempo de cultivo. Cultivo realizado em meio de Khanna tendo 2% (m/v) de ácido tânico como fonte de carbono, a 30°C, sob agitação orbital (120 rpm).....	51
Figura 13. Produção de tanases extracelular (■) e intracelular (●) por <i>A. phoenicis</i> em função do pH inicial do meio de cultivo. A cultura foi realizada em meio Khanna tendo ácido tânico 2% (m/v) como fonte de carbono, por 3 dias sob agitação orbital (120 rpm) a 30°C.....	52

- Figura 14.** Efeito da concentração de ácido tânico na produção de tanases extracelular e intracelular por *A. phoenicis*. Cultivos realizados em meio Khanna, por 3 dias sob agitação (120 rpm), a 30°C.....56
- Figura 15.** Produção de tanases extracelular (A) e intracelular (B) por *A. phoenicis* em função da concentração de diferentes fontes de nitrogênio. A cultura foi realizada em meio Khanna tendo ácido tânico 2% (m/v) como fonte de carbono, por 3 dias sob agitação (120 rpm) a 30°C.....60
- Figura 16.** Produção de tanases extracelular e intracelular por *A. phoenicis* em função de diferentes concentrações de KH_2PO_4 (A) e de NaH_2PO_4 (B). A cultura foi realizada em meio Khanna tendo ácido tânico 2% (m/v) como fonte de carbono, por 3 dias sob agitação (120 rpm) a 30°C.....62
- Figura 17.** Indução da biomassa com glicose para a produção de tanases extra (A) e intracelular (B) por *A. phoenicis* em FSbm, utilizando como fonte de carbono glicose, chá verde, ácido tânico e ácido gálico. O crescimento se deu em 24h, 48h 72h e 96h.....65
- Figura 18.** Produção de tanase extracelular pelo fungo *A. phoenicis* em função do tempo de cultivo em FSS com a mistura de folhas de caju e chá verde umidificado com solução de sais Khanna (1:1, m/v), sendo o cultivo realizado a 30°C em atmosfera com umidade relativa de 60%.....72
- Figura 19.** Perfis cromatográficos em colunas DEAE-Celulose (A) e Sepharose CL6B (B) para a tanase intracelular produzida por *A. phoenicis* em FSbm. Símbolos: (●) Absorbância 280 nm, (□) Atividade tanásica.....75
- Figura 20.** Perfil eletroforético da tanase intracelular em PAGE 6% revelado por prata (A), para a atividade tanásica (B) e em SDS-PAGE 6% corado por Coomassie Brilliant Blue R-250 (C).....76
- Figura 21.** Perfis cromatográficos em colunas DEAE-Celulose (A) e Sepharose CL6B (B) para a tanase extracelular produzida por *A. phoenicis* em FSbm. Símbolos: (●) Absorbância 280 nm, (□) Atividade tanásica.....78
- Figura 22.** Perfil eletroforético da tanase extracelular em PAGE 6% revelado por prata (A), para a atividade tanásica (B) e em SDS-PAGE 6%, corado por prata (C).....79
- Figura 23.** Temperatura ótima aparente (A, C) e pH ótimo aparente (B, D) para as atividades tanásicas dos extratos brutos extracelular (■) e intracelular (●), produzidos em FSbm (A e B) e em FSS (C e D).....85

Figura 24. Temperatura ótima aparente para atividade das tanases extracelular (■) e intracelular (●) purificadas, obtidas em FSbm.....	85
Figura 25. Estabilidade térmica (A, C e E) e ao pH (B, D e F) para as tanases extracelular (A e B) e intracelular (C e D) produzidas por <i>Aspergillus phoenicis</i> em FSbm e extracelular (E e F) em FSS.....	88
Figura 26. Influência da glicose na atividade tanásica extracelular (■) e intracelular (▨).....	97
Figura 27. Influência do ácido gálico na atividade tanásica extracelular (■) e intracelular (▨)....	97
Figura 28. Estabilidade das tanases extracelular (A) e intracelular (B) frente a diferentes solventes orgânicos em função do tempo de incubação.....	99
Figura 29. Determinação da hidrólise dos substratos metil galato (●), ácido tânico (▲) e metil galato: ácido tânico (1:1; v/v) (■), em diferentes tempos de reação, pelas tanases extracelular (A) e intracelular (B) produzidas por <i>Aspergillus phoenicis</i>	100
Figura 30. Representação gráfica de duplo recíproco para determinação do K_m e da V_{max} para as tanases purificadas extracelular (A, C e E) e intracelular (B, D e F) para os substratos ácido tânico (A e B), metil galato (C e D) e propil galato (E e F).....	103
Figura 31. Perfil cromatográfico em camada delgada (TLC) do ácido gálico formado a partir da hidrólise do ácido tânico (A) e do metil galato (B), pela tanase extracelular, obtido em diferentes tempos de reação.....	105
Figura 32. Perfil cromatográfico em camada delgada (TLC) do ácido gálico formado a partir da hidrólise do ácido tânico (A) e do metil galato (B), pela tanase intracelular, obtido em diferentes tempos de reação.....	106
Figura 33. Conversão de propil galato em ácido gálico pela tanase em função do meio reacional (Pinto <i>et al.</i> , 2005).....	107
Figura 34. Perfil cromatográfico em camada delgada (TLC) da síntese de propil galato a partir da esterificação do ácido tânico (5mM) em 50% de 1-propanol pelas tanases extracelular(A) e intracelular (B), obtido em diferentes tempos de reação.....	109

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Características de algumas tanases fúngicas produzidas por diferentes processos fermentativos (Adaptado de Pinto <i>et al.</i> , 2005)	12
Tabela 2. Produção de tanases por diferentes linhagens de fungos filamentosos em FSbm.....	44
Tabela 3. Produção de tanases intra e extracelulares por <i>Aspergillus phoenicis</i> em diferentes meios de cultivo mantidos ou não sob agitação (120 rpm).....	46
Tabela 4. Fontes de carbono utilizadas para a produção de tanases em FSbm por <i>Aspergillus phoenicis</i>	54
Tabela 5. Efeito da suplementação do meio de cultivo com diferentes concentrações de glicose e ácido tânico na produção de tanases por <i>Aspergillus phoenicis</i> em FSbm.....	57
Tabela 6. Produção de tanase por <i>Aspergillus phoenicis</i> em FSS em função do substrato.....	68
Tabela 7. Misturas de substratos utilizadas para a produção de tanase por <i>A. phoenicis</i> em FSS.....	69
Tabela 8. Efeito de diferentes soluções umectantes adicionadas à FSS sobre a produção de tanases por <i>Aspergillus phoenicis</i> , tendo folhas de caju e chá verde como substrato.....	70
Tabela 9. Efeito da umidificação com solução de sais Khanna em diferentes proporções adicionadas à FSS com mistura de folhas de caju e chá verde sobre a produção de tanase por <i>A. phoenicis</i>	71
Tabela 10. Purificação da tanase intracelular produzida por <i>Aspergillus phoenicis</i> em FSbm.....	76
Tabela 11. Purificação da tanase extracelular produzida por <i>Aspergillus phoenicis</i> em FSbm.....	79
Tabela 12. Determinação de conteúdo de carboidratos e da massa molar das tanases intra e extracelulares purificadas, produzidas por <i>A. phoenicis</i>	82
Tabela 13. Efeito de íons metálicos na atividade tanásica intra e extracelular do fungo <i>Aspergillus phoenicis</i>	94
Tabela 14. Efeito de compostos químicos na atividade tanásica intra e extracelular do fungo <i>Aspergillus phoenicis</i>	95

Tabela 15. Parâmetros cinéticos para as tanases extra e intracelular produzidas por <i>A. phoenicis</i>	104
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	absorbância
°C	graus Celsius
BDA	batata dextrose ágar
cm	centímetros
DEAE	Diethylaminoethyl
EC	Enzyme Commission
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FSbm	Fermentação Submersa
FSS	Fermentação em Substrato Sólido
g	grama
<i>g</i>	aceleração da gravidade
h	hora
kDa	mil Daltons
K_m	constante de Michaelis-Menten
M	Molar
mA	miliampére
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
m/v	massa por volume
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pH	potencial hidrogeniônico
qsp	quantidade suficiente para
rpm	rotações por minuto
SbmF	<i>Submerged Fermentation</i>
SDS	duodecil sulfato de sódio
SSF	<i>Solid Substrate Fermentation</i>
T_{50}	tempo de meia vida
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>
V	volts
V_{max}	velocidade máxima
v/v	volume por volume
U	unidade de atividade
μL	microlitro
μmol	micromolar
λ	comprimento de onda

RESUMO

A tanase (EC 3.1.1.20) é uma enzima capaz de hidrolisar ligações éster e depsídicas de taninos hidrolisáveis obtendo-se como produtos a glicose e o ácido elágico ou ácido gálico, sendo este último, um importante substrato para as indústrias farmacêutica e química. Entre os diferentes organismos capazes de produzir tanases, os microrganismos, de modo especial os fungos filamentosos, vêm se destacando uma vez que são mais versáteis na degradação de diferentes tipos de taninos. Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi estudar a produção de tanases intra e extracelulares por *Aspergillus phoenicis* em Fermentação Submersa (FSbm) e em Fermentação em Substrato Sólido (FSS), melhorando as condições de cultivo para obtenção destas enzimas em altos níveis, purificando e caracterizando-as bioquimicamente. Os maiores níveis enzimáticos em FSS foram obtidos utilizando-se folhas de caju e chá verde como fonte de carbono umedecidas com solução de sais Khanna (1:1, m/v), a 30°C por 6 dias e em FSbm tendo 2% de ácido tânico como fonte de carbono, por 3 dias a 30°C para ambas as formas enzimáticas. Fontes de nitrogênio e fosfato aumentaram a produção de tanases quando adicionadas em baixas concentrações. As tanases extra e intracelular produzidas em FSbm foram purificadas 22 e 17 vezes com recuperação de 9% e 16%, respectivamente, após dois passos cromatográficos, DEAE-Celulose e Sepharose CL6B. A forma extracelular possui massa molar nativa de aproximadamente 218,8 kDa com 65,1% de carboidratos. Já a enzima intracelular apresentou massa molar nativa de 154,9 kDa e 43,2% de carboidratos. A temperatura ótima de atividade para ambas as enzimas purificadas foi de 60°C e o pH ótimo de atividade ficou estabelecido na faixa de 5,0 a 6,0 para ambas as formas tanásicas. As tanases se mostraram bastante estáveis tanto a temperatura quanto ao pH e mantiveram a atividade constante para quase todos os íons testados, exceto para Al^{3+} , Fe^{2+} e Co^{2+} , que foram potentes inibidores da atividade tanásica. Os parâmetros cinéticos foram analisados, sendo que as enzimas mostraram maior afinidade quando utilizado o propil galato como substrato. A transesterificação de ácido gálico em propil galato pela ação das tanases foi avaliada qualitativamente por TLC, utilizando-se para isso o solvente orgânico 1-propanol no meio reacional. Portanto, conclui-se que as tanases produzidas por *Aspergillus phoenicis* possuem bom potencial biotecnológico e são promissoras para o emprego industrial, atuando em uma ampla faixa de pH e temperatura, além de serem produzidas utilizando fontes de nutrientes de baixo custo, e ainda por possuir a capacidade de transesterificação de ácido gálico em propil galato, propriedade esta, bastante rara entre as tanases e cobiçada industrialmente.

ABSTRACT

Tannase (EC 3.1.1.20) is an enzyme able to hydrolyze ester and depside bonds of hydrolysable tannins obtaining as products glucose and ellagic acid or gallic acid. This last one is an important substrate for the pharmaceutical and chemical industries. Among different organisms able to produce tannases, the microorganisms, especially filamentous fungi, have been highlighted since they are more versatile in the degradation of different types of tannins. In this context, the aim of this work was to study the production of intracellular and extracellular tannase from *Aspergillus phoenicis* under Submerged Fermentation (SbmF) and Solid Substrate Fermentation (SSF), improving culture conditions to obtain these enzymes at high levels, purifying and characterizing them biochemically. The highest enzyme levels were obtained in SSF using cashew and green tea leaves wetted with Khanna salt solution (1:1, w/v) as carbon source at 30°C for 6 days and SbmF with 2% tannic acid as carbon source, for 3 days at 30°C, for both enzymatic forms. Nitrogen and phosphate sources increased the production of tannase when added at low concentrations. The extra and intracellular tannase produced in SbmF were purified 22 and 17 times with recovery of 9% and 16%, respectively, after two chromatographic steps, DEAE-Cellulose and Sepharose CL6B. The extracellular form has native molecular mass of 218.8 kDa with 65.1% of carbohydrate content. The intracellular enzyme showed native molecular mass of 154.9 kDa and 43.2% of carbohydrate content. The optimum temperature for both purified enzymes was 60°C, and the optimum pH activity was established at a range from 5.0 to 6.0 for both enzymatic forms. Tannase proved to be quite stable at both temperature and pH and the activities remained constant for all ions tested, except for Al^{3+} , Fe^{2+} e Co^{2+} which were potent inhibitors of the enzymatic activity. The kinetic parameters were analyzed, and the enzymes showed higher affinity when propyl gallate was used as substrate. The gallic acid transesterification in propyl gallate by tannases activities was qualitatively evaluated by TLC, using for that the organic solvent 1-propanol in the reaction. Therefore, we can conclude that the tannases produced by *Aspergillus phoenicis* have good biotechnological potential and are promising for industrial employment, working in a wide range of pH and temperature, besides, they are produced using low cost nutrients sources, and they also have the transesterification ability of gallic acid in propyl gallate, a property quite rare among tannases and industrially coveted.

1. INTRODUÇÃO

A tanase, também conhecida como tanino acil hidrolase (EC 3.1.1.20), é uma enzima capaz de hidrolisar taninos, levando a liberação de glicose e ácido gálico ou ácido elágico (Mahendran *et al.*, 2006) (Figura 1). Esta enzima favorece a invasão dos microrganismos, principalmente fungos, em plantas hospedeiras pela hidrólise de parte dos compostos fenólicos presentes em tecidos vivos ou em decomposição, mais especificamente os taninos hidrolisáveis (Scalbert, 1991). As tanases podem contribuir para a degradação da parede celular dos vegetais, uma vez que são capazes de romper ligações cruzadas existentes entre as diferentes macromoléculas que a compõe (Garcia-Conesa *et al.*, 2001). Diferentes estudos relatados por Lekha e Lonsane (1997) apontam que microrganismos de solo produtores desta enzima desempenham papel ativo na decomposição e reciclagem de materiais vegetais ricos em taninos. Assim, as espécies microbianas que sintetizam esta enzima apresentam vantagem competitiva comparadas a outros microrganismos.

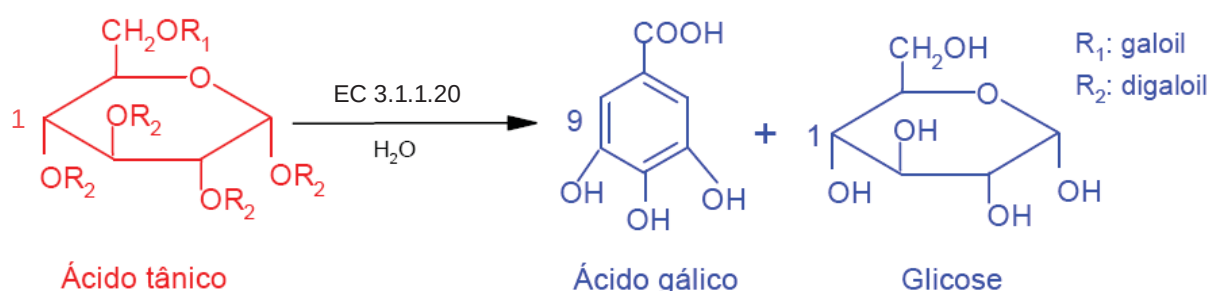


Figura 1. Hidrólise do ácido tânico (Modificado de Aguilar e Gutiérrez-Sánchez, 2001).

Teighem (1867) foi o primeiro a descrever esta enzima ao examinar duas espécies de fungos, *Penicillium glaucum* e *Aspergillus niger*, que crescem na presença de taninos (Teighem, 1867 apud Lekha e Lonsane, 1997, p. 216).

Os taninos são considerados os substratos naturais para as tanases, mas estas enzimas também são capazes de degradar ésteres de ácido gálico (Lekha e Lonsane, 1997). Alguns fungos, principalmente os pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são produtores de tanases (Rajakumar e Nandy, 1983).

Esta enzima encontra-se em maiores quantidades dentro da célula ligada à membrana. No entanto, a tanase também pode ser secretada para o meio de cultura (Bradoo *et al.*, 1997). Até o momento, os fungos *A. niger*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus oryzae* foram descritos como sendo os melhores produtores de tanases, tanto em ácido tânico, quanto com outras fontes de carbono (Gupta *et al.*, 1997).

1.1 Mecanismo de ação hidrolítica

Como foi mencionado, a tanase catalisa a quebra de ligações éster e depsídicas de taninos hidrolisáveis (Lekha e Lonsane, 1997). Embora o ácido tânico (Figura 2-I) seja conhecido por desnaturar proteínas, sabe-se que a tanase pode hidrolisá-lo completamente à ácido gálico e glicose. Os compostos intermediários desta reação de hidrólise são: 1,2,3,4,6,-pentagaloil glicose (Figura 2-II), 2,3,4,6,-tetragaloil glicose (Figura 2-III) e dois tipos de monogaloil glicose (Figura 2-IV) (Iibuchi *et al.*, 1972). Quando o substrato de reação é o metil éster do ácido tânico, os produtos finais são ácido gálico e metanol. O ácido tânico hidrolisado pela tanase pode (ou não) ser metilado. Se não é metilado, a molécula de glicose pode ser ligada através de ligações éster aos radicais R_2 (ácido digálico) nos carbonos 1,2,3 e 4, e aos radicais R_1 (ácido gálico) no carbono 6 (Figura 2-V). Se o ácido tânico é metilado, o radical R_2 pode ser substituído em todas as posições por um radical R_3 (m-digalato metilado) (Aguilar e Gutiérrez-Sánchez, 2001). A tanase pode reagir com qualquer grupo hidroxila fenólico, mas para o verdadeiro complexo enzima-substrato ser formado, o substrato tem que ser um éster composto de ácido gálico (Iibuchi *et al.*, 1972).

Para formação de um verdadeiro complexo enzima-substrato os seguintes critérios devem ser observados:

- Não deve haver nenhuma restrição sobre a estrutura do álcool que compõe o substrato éster, embora o ácido deva ser ácido gálico.
- Qualquer hidroxila fenólica pode reagir com o sítio de ligação da enzima e impedir a enzima de formar um verdadeiro complexo ES.

• Uma ligação éster ou carboxílica por si só não liga com a enzima, porque compostos ésteres ou carboxílicos não são hidrolisados por enzimas se não tiver hidroxilas fenólicas (Iibuchi *et al.*, 1972).

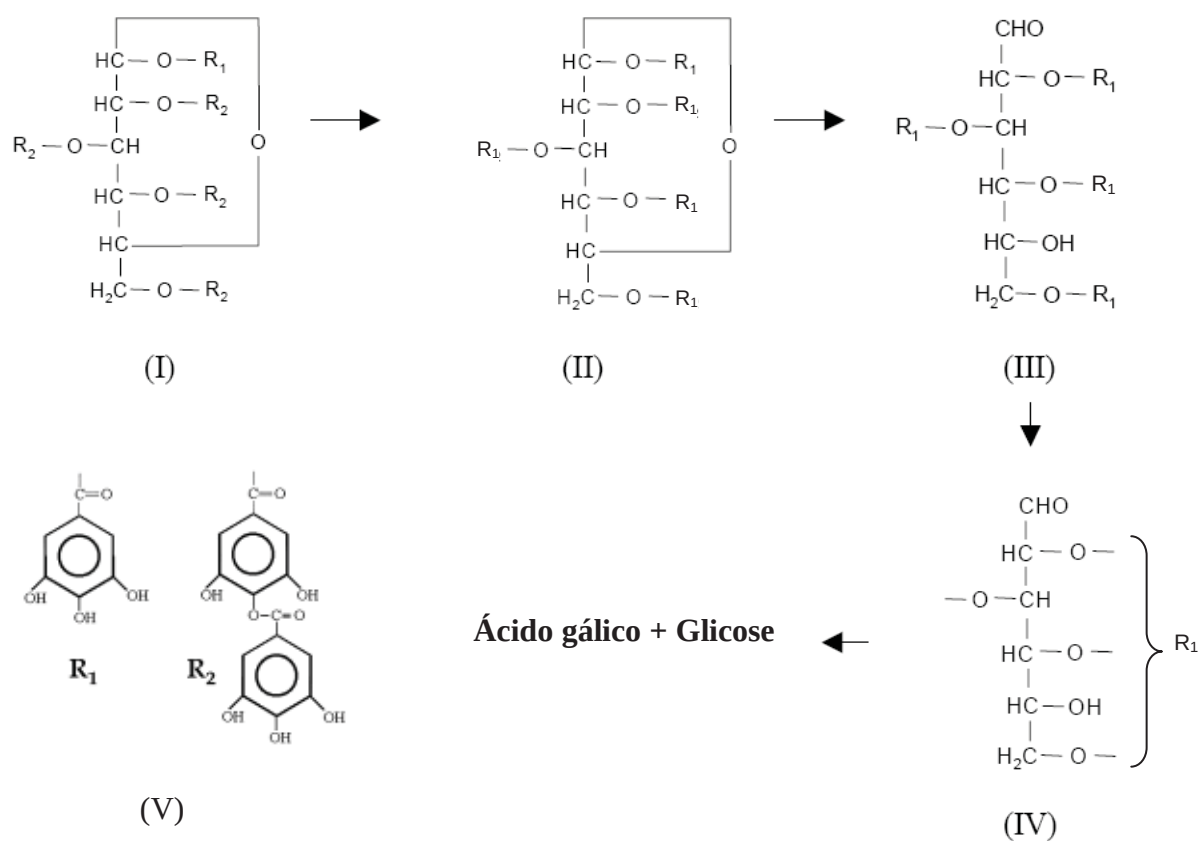


Figura 2. Via de hidrólise do ácido tânico pela tanase. Ácido tânico (I), 1,2,3,4,6,-pentagaloil glicose (II), 2,3,4,6,-tetragaloil glicose (III), monogaloil glicose (IV), radical R_1 (ácido gálico) e radical R_2 (ácido digálico) (V). (Modificado de Lekha e Lonsane, 1997).

1.2 Taninos

Os taninos são metabólitos secundários fenólicos produzidos por diferentes vegetais e possuem massa molar variando de 300 Da a 3 kDa (Aguilar *et al.*, 2007). Eles representam o quarto mais abundante constituinte vegetal, depois da celulose, da hemicelulose e da lignina e atuam como parte do mecanismo de defesa dos vegetais contra microrganismos, herbívoros, pássaros e condições ambientais hostis. Altas quantidades de taninos estão associadas com a resistência de vegetais ao ataque microbiano (Scalbert, 1991). Os taninos podem apresentar alguns efeitos negativos para os animais, como o sabor adstringente desagradável, além de se ligarem às moléculas de nutrientes tornando-as indigestas, interferindo assim na nutrição animal (Goel *et al.*, 2005). No entanto, baixas concentrações de taninos elevam a assimilação de nitrogênio em ruminantes aumentando seu crescimento e produção de leite (Aguilar *et al.*, 2007).

As principais características dessa classe de compostos são: a solubilidade em água (exceto os que possuem elevada massa molar); a habilidade de ligar-se a proteínas e formar complexos (na maioria das vezes insolúveis); e a capacidade de combinação com celulose e pectina para formar complexos insolúveis (Pinto, 2003).

Com base em suas características estruturais, os taninos podem ser divididos em 2 grandes grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Durante a degradação de taninos, ocorrem hidrólise e oxidação, catalisadas por diferentes enzimas produzidas por microrganismos, tais como tanase, fenol-oxidase e decarboxilase (Pinto *et al.*, 2005).

1.2.1 Taninos hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis são sub-divididos em galotaninos e elagitaninos. Galotaninos são facilmente degradados por bactérias, fungos e leveduras, enquanto que elagitaninos são mais difíceis de serem degradados devido a sua estrutura complexa. Mesmo assim, algumas bactérias e fungos encontrados em solos ricos em elagitaninos, folhas e efluentes contendo taninos podem produzir tanase com alta atividade para degradação deste componente (Mingshu *et al.*, 2006).

Nos galotaninos (Figura 3), os grupos fenólicos que esterificam o núcleo glicosídico são constituídos pelo ácido gálico (ou radical galoil), ou pelo ácido digálico, estando as duas unidades galoil unidas por ligação depsídica. As moléculas são usualmente compostas pelo núcleo de glicose e de 6 a 9 grupos galoil, apresentando massas molares em torno de 3 kDa. Há grande abundância de ésteres de glicose mono ou digaloil na natureza que não são considerados taninos. É necessário que pelo menos 3 grupos hidroxil da molécula de glicose estejam esterificados para exibir a capacidade de se ligar e precipitar proteínas para serem considerados taninos. O mais comum dos galotaninos é o ácido tânico (Aguilar e Gutiérrez-Sánchez, 2001) (Figura 4).

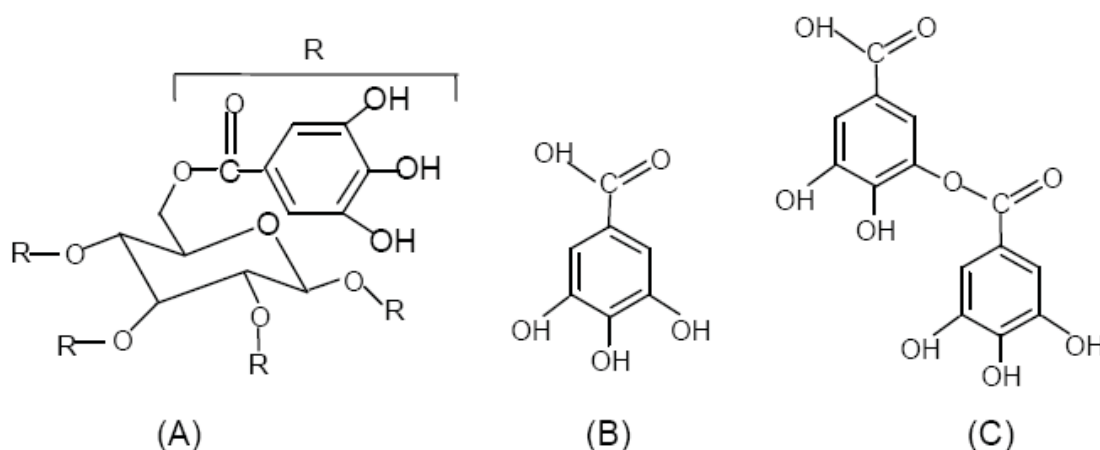


Figura 3. Estrutura de galotaninos (A), ácido gálico-galoil (B) e digálico-digaloil (C) (Modificado de Bhat, 1998).

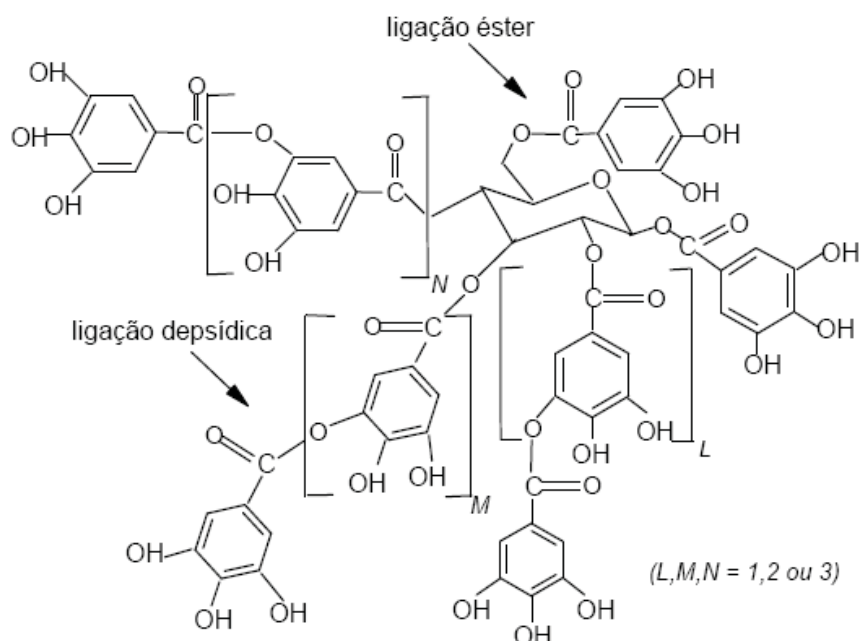


Figura 4. Estrutura química do ácido tânico (Modificado de Nakamura, 2003).

Nos elagitaninos, os grupos fenólicos utilizados são moléculas de ácido hexaidroxidifênico que podem se desidratar espontaneamente para formar sua dilactona estável, o ácido elágico. Os elagitaninos apresentam massa molar entre 2 e 3 kDa (Pinto *et al.*, 2005) (Figura 5).

A decomposição de taninos hidrolisáveis é mediada por duas enzimas. Uma com atividade esterásica sobre a ligação éster entre o grupo anel aromático e o resíduo de glicose, e a outra com atividade depsidásica sobre a ligação éster entre os anéis aromáticos. Haslam e Stragroom (1966) responsabilizaram a tanase pelas duas atividades. Também relataram que a proporção entre essas duas atividades pode variar de acordo com as condições de cultivo. Beverini e Metche (1990), utilizando colunas de afinidade, fracionaram duas isoformas de tanase de *A. oryzae*. Ambas com as duas atividades, sendo que a tanase I apresentou maior característica esterásica e a tanase II atividade depsidásica mais pronunciada.

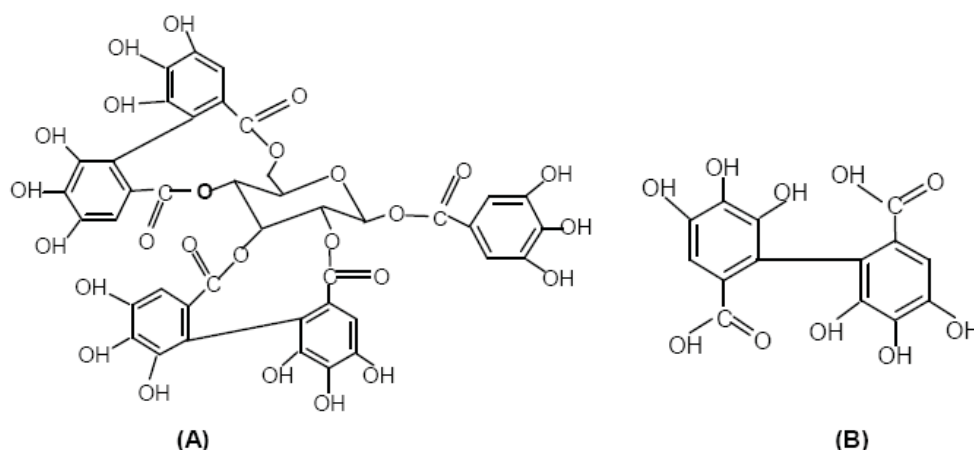


Figura 5. Estrutura de elagitaninos (A) e do ácido hexahidroxi difênico (B) (Modificado de Bhat, 1998).

1.2.2 Taninos condensados

Os taninos condensados, também conhecidos como proantocianidinas são mais vastamente distribuídos entre os vegetais do que os taninos hidrolisáveis. São chamados de taninos condensados devido a sua estrutura química compacta. As proantocianidinas resultam do acoplamento de uma unidade flavonil eletrofílica, gerada a partir de um flavan-4-ol ou de um flavan-3,4-diol, uma unidade flavanil nucleofílica. Desta forma, são oligômeros ou polímeros de unidades flavonóides, os quais são a maior classe de polifenóis, sendo constituídos por dois anéis aromáticos ligados por um anel heterocíclico. Os taninos condensados possuem estruturação complexa, não são suscetíveis à clivagem por hidrólise, mas podem ser solúveis em solventes orgânicos, dependendo de sua estrutura (Faria *et al.*, 2005). Ao contrário dos taninos hidrolisáveis, os condensados não contém resíduos de carboidratos (Deshpande *et al.*, 1986), mas possuem de 2 a 50 ou mais unidades flavonóides, podendo atingir massas molares superiores a 20 kDa. As proantocianidinas apresentam grande variedade estrutural devido ao número de grupos hidroxilas presentes em cada unidade, bem como a estereoquímica dos três centros quirais do anel B, a localização das ligações interflavana e, em menor proporção, as possíveis derivações como O-metilalação ou C- e O-glicosilações (Bruyne *et al.*, 1999).

Em razão de suas estruturas químicas, sem a presença de ligações éster e depsídica, estes taninos não são suscetíveis a hidrólise pela tanase (Pinto *et al.*, 2005) (Figura 6).

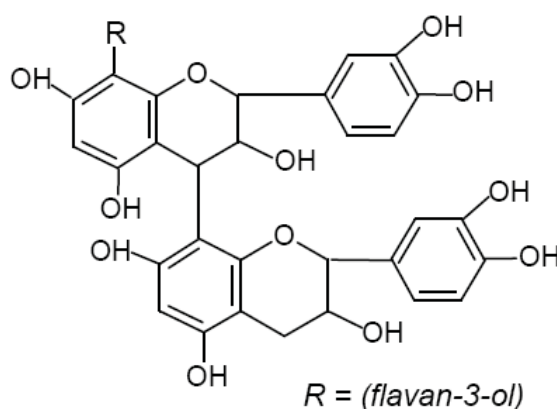


Figura 6. Estrutura de tanino condensado (Modificado de Lekha e Lonsane, 1997).

1.3 Fontes de tanases

As tanases podem ser encontradas tanto em procariotos como em eucariotos, como plantas, animais e microrganismos, sendo que entre estes últimos, os fungos filamentosos merecem destaque. Plantas com conteúdo de tanino solúvel como, por exemplo, *Terminalia chebula*, *Caesalpinia coriaria*, *Anogeissus latifolia* ou ainda apresentando taninos insolúveis como, *Cassia auriculata*, *Acacia arabica* e *Cassia fistula* possuem esta enzima (Lekha e Lonsane, 1997).

A importância fisiológica da tanase em plantas foi discutida por Madhavakrishna *et al.* (1960) que sugeriram que junto com a grande quantidade de açúcar, as plantas sintetizam ácido gálico, ácido chebulínico e ácido hexahidroxifênico durante o crescimento. E como os frutos amadurecem, se imaginou que estes ácidos poderiam tornar-se esterificados com glicose com a ajuda da tanase para formar taninos complexos. Após a abscisão dos frutos a atividade de esterase da tanase, ainda poderia contribuir para a hidrólise de taninos pré-formados. Já no caso dos taninos condensados, estes seriam formados como intermediários ou precursores e mais tarde transformados em moléculas complexas de taninos, com a ajuda da tanase (Madhavakrishna *et al.*, 1960 apud Lekha e Lonsane, 1997, p. 225).

Em animais ruminantes, baixas concentrações de tanase são encontradas na mucosa do rumem, provavelmente para hidrolisar o ácido tânico presente na dieta rica em fenóis e açúcares, que podem ser rapidamente absorvidos (Lekha e Lonsane, 1997).

Já os microrganismos produzem tanases que possibilitam a decomposição e a reciclagem de materiais contendo tanino no ambiente. Além disso, as tanases produzidas por microrganismos são mais interessantes para produção industrial por apresentarem vantagens econômicas. Microrganismos podem ser cultivados em grandes quantidades em períodos de tempo relativamente curtos, por métodos de fermentação, produzindo quantidades abundantes e regulares de conteúdo enzimático. Além das enzimas de microrganismos serem mais estáveis do que as análogas obtidas de animais e vegetais, eles podem ser manipulados geneticamente aumentando ainda mais a atividade das enzimas (Lekha e Lonsane, 1997). O uso de microrganismos termófilos e termotolerantes possibilita ainda a produção de enzimas mais estáveis do que aquelas produzidas por mesófilos não termotolerantes. A atuação dessas enzimas em processos de produção em temperaturas mais elevadas traz muitas vantagens como a redução da viscosidade do meio, facilitando o bombeamento, filtração e centrifugação, permite a hidrólise enzimática em altas concentrações de substrato e diminui a contaminação por mesófilos, que são a maioria em um ambiente industrial. Outra característica das enzimas termoestáveis é sua maior resistência à ação de proteases, uma vez que, quanto mais rígida for a molécula, menos o sítio de proteólise é exposto, além da maior resistência à desnaturação por alguns solventes orgânicos (Gomes *et al.*, 2007).

1.3.1 Tanases em microrganismos

Os microrganismos têm emergido, cada vez mais, como novas fontes de produtos e processos para o benefício da sociedade. Eles são importantes decompositores de matéria orgânica, pois reciclam elementos vitais através do uso de exoenzimas, as quais apresentam grande potencial biotecnológico.

A maioria dos microrganismos é capaz de produzir tanases, entre eles as bactérias como, por exemplo, *Bacillus licheniformis* (Mondal *et al.*, 2000) e *Citrobacter freundii* (Kumar *et al.*, 1999), as leveduras (Aoki *et al.*, 1976) e os fungos filamentosos tais como *A. niger*, *Penicillium* sp. e *Paecilomyces variotii* (Mahendran *et al.*, 2006). No entanto, alguns trabalhos têm mostrado que as tanases microbianas não são igualmente ativas para todos os taninos. Tanases de leveduras são efetivas somente na hidrólise de galotaninos, enquanto que tanases de fungos filamentosos são mais versáteis e podem degradar eficientemente diferentes tipos de taninos hidrolisáveis (Bhat, 1998; Mingshu *et al.*, 2006).

Devido às vantagens da utilização de fungos filamentosos alguns trabalhos têm sido realizados com estes microrganismos para a produção de tanases, principalmente com as seguintes espécies de *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. awamori*, *A. niger*, *A. japonicus*, *A. aureus*, *A. fischeri*, *A. gallonyces*, *A. fumigatus*, *A. versicolor*, *A. caespitosum*, *A. aculeatus*, *A. rugulosus*, *A. terreus* e *A. foetidus*), *Penicillium* (*P. notatum*, *P. islandicum*, *P. chrysogenum*, *P. digitatum*, *P. acrellanum*, *P. caryophilum*, *P. citrinum*, *P. charlessi*, *P. variable*, *P. glaucum*, *P. crustosum*, *P. restrictum* e *P. glabrum*), *Trichoderma* (*T. viride*, *T. hamatum* e *T. harzianum*) e *Fusarium* (*F. solani* e *F. oxysporium*) (Belur e Mugeraya, 2011).

Porém, estudos envolvendo a produção de tanases por fungos filamentosos ainda são escassos merecendo maiores investigações.

A tanase de todos estes organismos têm sido caracterizada, mas ainda há pouco conhecimento sobre a estrutura do gene desta enzima. Entre as poucas sequências genéticas disponíveis para tanase encontram-se a de *A. oryzae* (Hatamoto *et al.*, 1996) e *A. niger* (León-Galván *et al.*, 2010).

A tanase produzida por fungos é uma glicoproteína formada por uma mistura de uma esterase e uma depsidase, com um ponto isoelétrico por volta de 4,0-4,5 e uma massa molar entre 186 e 300 kDa (Aguilar e Gutiérrez-Sánchez, 2001).

Ainda, as tanases fúngicas apresentam pH ótimo em torno de 5,5. Sua estabilidade em diferentes valores de pH pode variar entre faixas 3,0 a 8,0, como observado para

Aspergillus flavus IFO 5839, *Aspergillus niger* LFC 8 e *Penicillium chrysogenum* dependendo da fonte de obtenção da enzima (Tabela 1). A temperatura ótima para atividade desta enzima ocorre, em geral, próxima a 35°C. Contudo, temperaturas mais elevadas (50°C a 60°C) foram observadas para tanases produzidas por *A. flavus* IFO 5839 e *A. niger* 3T5B8 (Tabela 1). Para a temperatura, a estabilidade da tanase ocorre basicamente entre 10°C e 60°C (Tabela 1).

Tabela 1. Características de algumas tanases fúngicas produzidas por diferentes processos fermentativos (Adaptado de Pinto *et al.*, 2005).

Microrganismo/ linhagem	Condições de cultivo	pH		Temperatura (°C)		Referência
		Ótimo	Estabilidade	Ótima	Estabilidade	
<i>Aspergillus flavus</i> IFO 5839	Submersa	5,5	5,0-5,5	50-60	60	Yamada <i>et al.</i> , 1968 Adachi <i>et al.</i> , 1971
<i>Aspergillus niger</i> LFC 8	Submersa	6,0	3,5-8,0	35	-	Barthomeuf <i>et al.</i> , 1994
<i>Aspergillus niger</i> PKL 104	Submersa	5,5	4,0-7,0	60	10-40	Lekha e Lonsane, 1994
<i>Aspergillus niger</i> PKL 104	Semi-sólida	5,5	2,0-8,0	35	10-30	Lekha e Lonsane, 1994
<i>Aspergillus niger</i> 3T5B8	Semi-sólida	5,0	3,0-6,0	60	25-45	Pinto, 2003
<i>Aspergillus niger</i> MTCC 2425	Submersa	4,5-6,0	-	35	-	Sharma <i>et al.</i> , 1999
<i>Aspergillus oryzae</i>	Submersa	5,5	3,0-7,5	30-40	30	Iibuchi <i>et al.</i> , 1968
<i>Penicillium</i> <i>chrysogenum</i>	Superfície	5,0-6,0	4,5-6,0	30-40	30-45	Rajkumar e Nandy, 1983

1.3.2 Fungos filamentosos e microrganismo em estudo

Os fungos constituem um grupo importante de organismos, conhecendo-se mais de 77.000 espécies, a maioria das quais, terrestres (Putzke e Putzke, 2002). Muitos fungos da nossa biodiversidade ainda não foram estudados, embora sejam microrganismos biodegradadores naturais, que encontram as substâncias necessárias para o seu desenvolvimento na natureza, na forma de macromoléculas, as quais precisam ser degradadas em unidades monoméricas, antes de serem incorporadas ao nível celular. Entre esses compostos, estão os polissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos, lignina, lipídeos, taninos e outros.

Entre todos os grupos fúngicos existentes, o filo Ascomycota tem chamado atenção sob vários aspectos inclusive quanto à produção de biomoléculas como as enzimas. Atualmente o filo Ascomycota está dividido em 6 subfilos os quais podem ser observados na figura 7. Entre eles, Taphrinomycotina, Saccharomycotina e Pezizomycotina são provenientes do período Pré-Devoniano, um pouco mais de 400 milhões de anos atrás. Algumas estimativas, porém, sugerem uma origem de Ascomycota de aproximadamente 727 milhões de anos atrás (Taylor *et al.*, 2006).

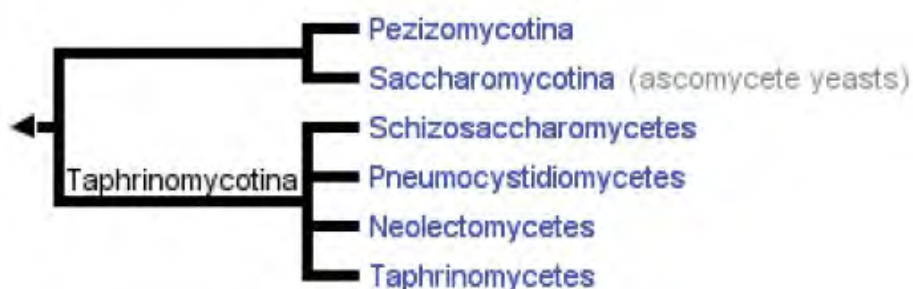


Figura 7. Diagrama filogenético de Ascomicetos (Taylor *et al.*, 2006).

Os ascomicetos são fungos filamentosos que atuam como decompositores de matéria orgânica, pois secretam exoenzimas, as quais hidrolisam as macromoléculas até atingir a forma e a solubilidade necessária para que sejam transportadas pela membrana (Putzke e Putzke, 2002). Entre estas enzimas encontram-se as amilases, pectinases, xilanases, celulasas, tanases e proteases, importantes para diversos processos com promissoras aplicações industriais.

Neste contexto, os fungos filamentosos têm despertado grande interesse de pesquisadores como produtores de enzimas com aplicações industriais, destacando-se o gênero *Aspergillus*.

Existem cerca de 200 espécies de *Aspergillus* comumente isolados do solo, materiais em decomposição e do ar (Silva, 2009). Dentre as espécies mais conhecidas encontram-se *A. niger*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucos* e *A. versicolor*. A produção de tanases foi descrita em diferentes espécies de *Aspergillus*: *A. japonicus* (Bradoo *et al.*, 1997), *A. niger* (Barthomeuf *et al.*, 1994), *A. oryzae* (Hatamoto *et al.*, 1996), *A. awamori* (Chhokar *et al.*, 2009), *A. tamarii* (Costa *et al.*, 2008) e *A. foetidus* (Mukherjee e Banerjee, 2004).

A espécie em estudo é o fungo filamentoso e termotolerante *Aspergillus phoenicis* (Figura 8) que pertence ao reino fungi, filo Ascomycota, ordem Aspergillales, família Trichocomaceae e gênero *Aspergillus*.

O Filo Ascomycota, compreende mais de 50% de todas as espécies fúngicas conhecidas e aproximadamente 80% de espécies patogênicas e oportunistas (Guarro *et al.*, 1999). Esse filo apresenta um tipo característico de conidióforo constituído por ascos.

Os Ascomicetos podem ser agrupados em seis classes, segundo critério de biologia molecular: Hemiascomycetae, Plectomycetae, Pyrenomicetae, Discomycetae, Laboulbeniomycetae e Loculoascomycetae (Guarro *et al.*, 1999).

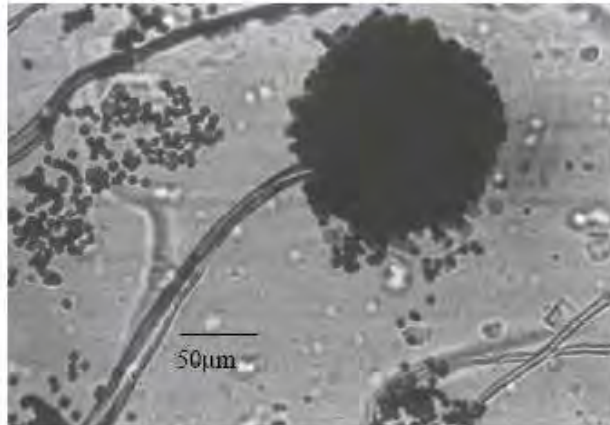
O *Aspergillus phoenicis* pertence à Classe Plectomycetae, Ordem Aspergillales, os quais possuem ascocarpo do tipo Cleistotécio, caracterizado por ser completamente fechado durante todas as fases do desenvolvimento, o qual se forma no interior de um entrelaçado frouxo de hifas vegetativas, sendo que em muitos casos, a superfície não está nitidamente delimitada da parte vegetativa do micélio. Possui um asco característico, cada um contendo um número definido de ascósporos, sendo estes, múltiplos de quatro, formados imediatamente após a meiose e por um processo especial de citocinese endoplasmática. Os ascos são formados em vários níveis dentro do cleistotécio e, em geral, constituem, quando maduros, uma massa pulverulenta (Smith *et al.*, 1985).

O micélio vegetativo dos fungos filamentosos sofre transformações, dando origem ao micélio reprodutivo. Os propágulos formados no micélio reprodutivo podem ter origem assexuada, também denominada de anamórfica ou imperfeita; sexuada, chamada de teleomórfica ou perfeita ou pelo fenômeno da parassexualidade (Gompertz *et al.*, 1999), ilustrados (Figura 9).

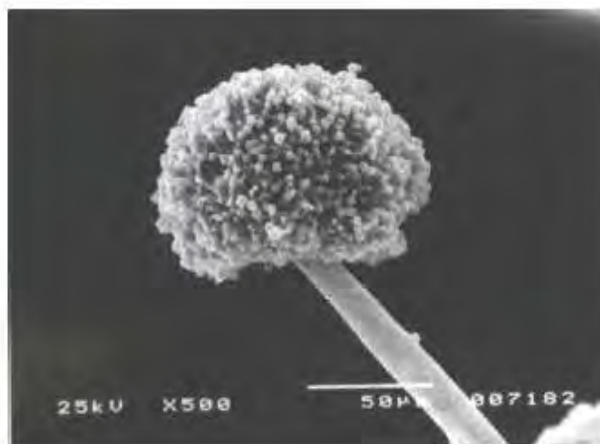
Os propágulos assexuados originam-se de estruturas denominadas de conídios por um processo interno de clivagem de seu citoplasma, e são chamados conidiósporos, sendo estes liberados após ruptura. A hifa especial que sustenta os conídios é denominada de conidióforo (Figura 9) (Gompertz *et al.*, 1999).

Na reprodução sexuada dos Ascomycetes superiores, a fase diplóide desenvolve-se de uma única maneira em células dicarióticas ou micélio, compreendendo três fases: plasmogamia, cariogamia e meiose. Após a plasmogamia, estágio em que ocorre a fusão sexual das células e mistura do citoplasma, os núcleos que representam os dois gametas se pareiam. Então, persistem e multiplicam-se, por um período mais curto ou mais longo, em pares ou sincários. À medida que as hifas ou células do micélio que os contém crescem, estes núcleos pareados dividem-se simultaneamente, produzindo novos pares. Finalmente, os núcleos que se fundem nos ascos jovens, formam um núcleo zigótico que imediatamente sofre meiose, formando-se esporos haplóides (Figura 9) (Gompertz *et al.*, 1999).

A



B



C



Figura 8. Representação do *Aspergillus phoenicis* cultivado em meio sólido Vogel. (A) Fotomicrografia com aumento 400x, (B) e Microscopia eletrônica de varredura, representando os conidiósporos do fungo em estudo (C). (Rizzatti, 2004).

O processo parassexual (Figura 9) consiste em fusão de hifas e formação de heterocário que contém núcleos haplóides. Em seguida, esses núcleos fundem-se e originam núcleos diplóides, heterozigóticos, cujos cromossomos homólogos sofrem recombinação durante a mitose (Gompertz *et al.*, 1999). No núcleo diplóide os cromossomos podem associar-se e haver recombinação, seguindo-se a formação de novos núcleos haplóides. A restauração da condição haplóide não envolve meiose. Em vez disso, resulta da gradual perda cromossômica em um processo chamado haploidização. Esse fenômeno genético em que a plasmogamia, cariogamia e haploidização ocorrem em sequência é conhecido como parassexualidade (Raven *et al.*, 2001).

Poucos estudos foram realizados com o *Aspergillus phoenicis* em relação a sua produção enzimática, em especial à produção tanásica. Entretanto, foi relatada a produção de celulase (Sheldon *et al.*, 1985), β -glucosidase (Allan e Sternberg, 1980; Persson *et al.*, 1989; Reczey *et al.*, 1990; Flachner *et al.*, 1999), xilanase (Smith *et al.*, 1991), β -xilosidase (Zeng e Zhang, 1993), glucoamilase (Kuek, 1991), β -fucosidase (Zeng *et al.*, 1992), 1,2- α -manosidase (Suwasono e Rastall, 1996; Fujita *et al.*, 1997) e β -fructofuranosidase (Rustiguel *et al.*, 2010).

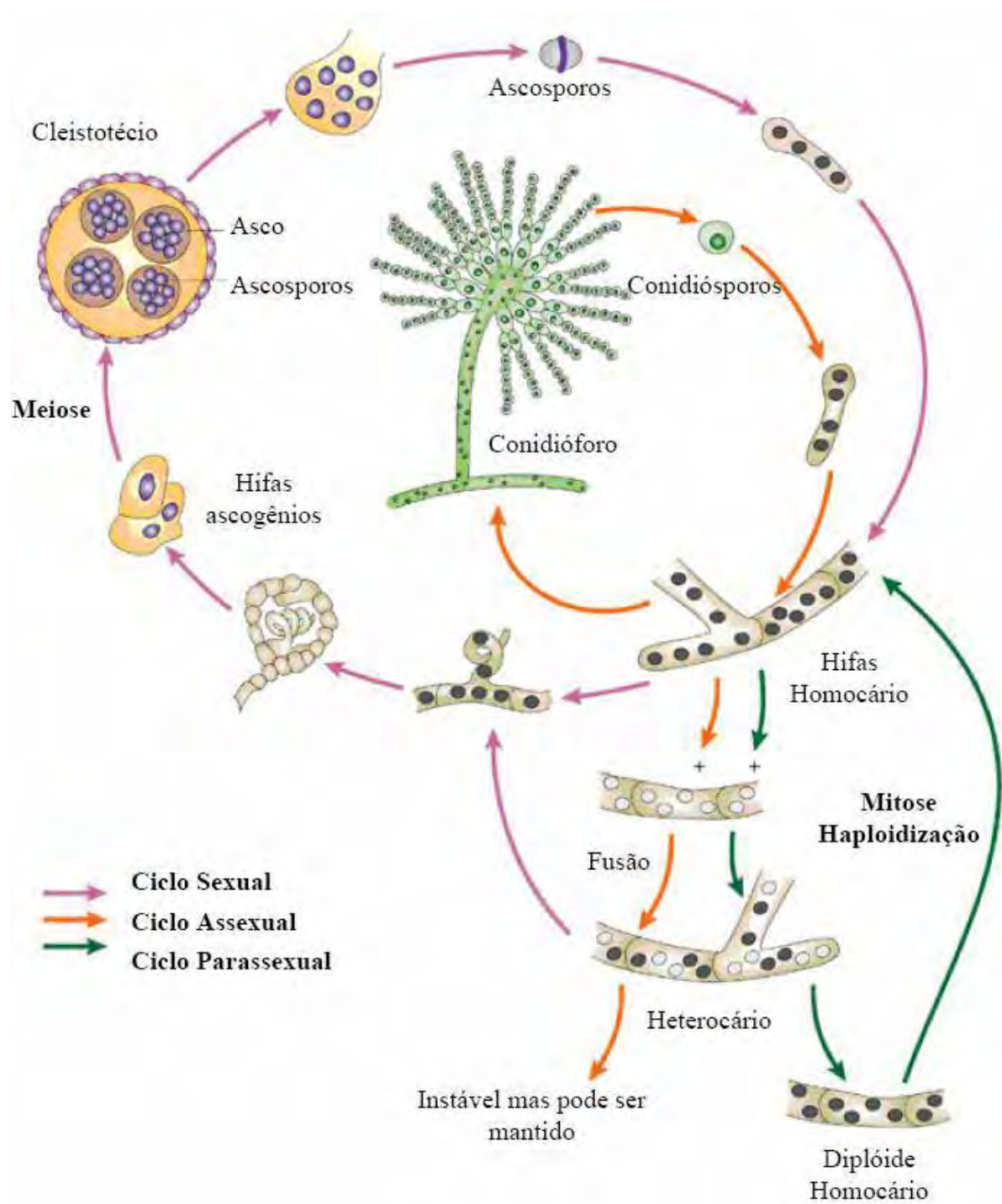


Figura 9. Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*. Fases sexual (---), assexual (---) e parassexual (---). (Modificado de Casselton e Zolan, 2002).

1.4 Processos fermentativos na produção de tanases

A produção de tanases pode ser realizada em fermentação submersa (FSbm) ou em fermentação em substrato sólido (FSS) (Mingshu *et al.*, 2006).

Em FSbm, o microrganismo fica em suspensão em um meio de cultura líquido no qual estão dissolvidos ou suspensos todos os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento, sendo que a água compõe de 90 a 99% da massa total do material a ser fermentado (Mitchell *et al.*, 2000).

Nesse tipo de fermentação é fácil o acompanhamento da formação do produto e consumo do substrato, além do controle do pH, temperatura, crescimento celular, e oxigenação. A esterilização é rápida e eficiente, o que fez com que este método fosse preferido por muitos anos. Entretanto, grande volume de resíduo é gerado, e a separação do produto do meio de cultivo é difícil (Mitchell *et al.*, 2000).

Para o processo de fermentação em substrato sólido, o microrganismo deve se desenvolver em substratos insolúveis sem disponibilidade de fase líquida livre. Na FSS, o controle de parâmetros, como pH, temperatura, umidade e crescimento celular, é difícil. No entanto, este método de cultivo oferece algumas vantagens econômicas com relação ao cultivo submerso: a produção do meio para crescimento do microrganismo é sempre bastante simples, podendo ser utilizados resíduos agroindustriais, como farelo de trigo, bagaço de cana, farelo de soja e sabugo de milho, entre outros, como substrato/fonte de carbono. Apesar do rendimento da enzima ser menor, pela baixa disponibilidade de água livre, a atividade da enzima produzida geralmente é maior com este método de fermentação, pois a recuperação é feita com menores volumes de água. Além disso, toda a tanase produzida em substrato sólido encontra-se extracelularmente, facilitando sua obtenção, enquanto que nos cultivos líquidos, apenas parte da enzima é de natureza extracelular (Deschamps *et al.*, 1983; Said e Pietro, 2002).

O principal fator limitante, no entanto, refere-se à dificuldade de vários grupos microbianos em crescer sob baixos teores de umidade, o que acaba por restringir o processo ao uso de fungos filamentosos, que se adaptam bem a essa condição. Os

fungos filamentosos são os microrganismos mais adaptados para FSS devido a sua fisiologia e as propriedades bioquímicas. Suas hifas têm a capacidade de penetrar nos substratos sólidos. Isto lhe proporciona vantagens sobre os microrganismos unicelulares na colonização do substrato e no aproveitamento dos nutrientes disponíveis, destacando sua capacidade de crescer sob baixo nível de umidade e em alta pressão osmótica devido à grande concentração de nutrientes e a sua capacidade de aderência e percepção das misturas de polissacarídeos diferentes (Pérez-Guerra *et al.*, 2003).

Desse modo, a FSS tem se mostrado adequada para a produção de enzimas por fungos filamentosos (Pandey *et al.*, 1999), ao se considerar a possibilidade de reprodução das condições de crescimento natural desses organismos (Pandey, 2000).

A produção de tanases por microrganismos ainda pode ser influenciada pela adição de outros compostos nos meios de cultivos, como é o caso de fontes de carbono ricas em taninos, nitrogênio, íons metálicos e substratos indutores de atividade tanásica (Aguilar e Gutiérrez-Sánchez, 2001).

1.5 Aplicações das tanases

No momento, uma das principais aplicações comerciais das tanases está no processamento de chás instantâneos, eliminando precipitados insolúveis indesejados. Estes precipitados resultam da polimerização de polifenóis (taninos presentes nas folhas de chá) e da interação da cafeína e das proteínas com tais componentes, fenômeno que ocorre quando a bebida é mantida a baixas temperaturas. A utilização de tanase evita o emprego de substâncias químicas para a remoção destes compostos, garantindo um produto final de excelente qualidade, solúvel em água e caracterizado pelo alto conteúdo de componentes aromáticos e coloração apropriada (Sanderson *et al.*, 1974). Sendo que, amostras de chá tratadas com tanase podem apresentar redução de até 82% no teor de sólidos não-dissolvidos (Lekha e Lonsane, 1997).

A tanase, também, pode ser utilizada na fabricação de bebidas para reduzir a formação de turbidez decorrente da presença de compostos fenólicos. A descoloração e

desenvolvimento de turbidez da cerveja durante a estocagem pode ser evitada com a hidrólise dos polifenóis do malte pela tanase (Lekha e Lonsane, 1997).

Na indústria vinícola, a aplicação de tanase nos resíduos do tratamento de uva favorece a remoção de compostos fenólicos, estabilizando e incrementando a qualidade dos vinhos. A tanase hidrolisa o ácido clorogênico à ácido caféico e ácido quínico, o que influencia favoravelmente o sabor. Além disso, cerca de 50% da coloração do vinho se deve à presença de taninos e a oxidação destes componentes em contato com o ar (gerando quinonas) pode causar uma turbidez indesejável e conseqüentemente perda de qualidade do produto final. Essa turbidez pode ser evitada com o emprego da tanase, que impede a reação de oxidação (Chae e Yu, 1983; Lekha e Lonsane, 1997).

A tanase também é utilizada como agente clarificador em alguns sucos de frutas e em bebidas geladas a base de café, onde seu uso se concentra na remoção de compostos fenólicos presentes no material vegetal (Lekha e Lonsane, 1997).

Os taninos apresentam efeitos antinutricionais, uma vez que complexam-se com proteínas endógenas e da dieta, além de interferir na absorção de íons e alterar a excreção de certos cátions. Eles estão presentes em várias plantas utilizadas como ração animal como, por exemplo, o sorgo. A adição de tanase em rações contendo taninos pode trazer efeitos benéficos na remoção desses compostos indesejáveis, aumentando a digestibilidade e favorecendo a assimilação dos nutrientes contidos na formulação, facilitando a utilização de constituintes que o animal não poderia digerir fácil ou completamente (Lekha e Lonsane, 1997). As tanases microbianas, especialmente fúngicas, tem sido usadas para remover taninos de vários gêneros alimentícios e forragens para animais (Nuero e Reyes, 2002; Belmares *et al.*, 2004; Rana e Bhat, 2005), uma vez que estes ainda podem ter efeitos tóxicos em diferentes organismos (Mingshu *et al.*, 2006).

Contudo, a aplicação mais importante das tanases é na produção de ácido gálico, o qual tem vários empregos na indústria química e farmacêutica. O ácido gálico é um composto intermediário na síntese de propil galato, pirogalol e trimetropina. O propil galato

é uma substância amplamente utilizada como aditivo na indústria de alimentos e como antioxidante em óleos e produtos ricos em lipídeos. O pirogalol é utilizado como conservante na indústria alimentícia (Lekha e Lonsane, 1997) e a trimetropina é um agente antibacteriano empregado na indústria farmacêutica (Hadi *et al.*, 1994).

Outra aplicação para as tanases se refere ao tratamento de efluentes de curtumes, os quais apresentam altas concentrações de polifenóis e taninos que são fundamentais no processo de curtimento do couro e são considerados poluentes perigosos. Por esta razão, a utilização de tanases representa um modelo de tratamento de baixo custo e bastante efetivo na remoção dos taninos presentes (Aguilar *et al.*, 2007). Ainda a tanase pode ser utilizada na indústria de couro para homogeneizar o tanino durante a preparação do couro (Lekha e Lonsane, 1997).

Podemos observar também a aplicação dessa enzima em vários outros campos, como na cosmetologia para eliminar a turbidez dos extratos de plantas (Lekha e Lonsane, 1997).

A utilização das tanases em processos industriais pode ser realizada de duas formas: uma com contato direto do extrato enzimático ou da enzima imobilizada em suportes, com o material polifenólico a ser hidrolisado ou, de outra maneira, cultivando o microrganismo produtor de tanase diretamente no material rico em taninos que será degradado em compostos cada vez mais simples (Aguilar e Gutiérrez-Sánchez, 2001).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a produção de tanases intra e extracelulares por *Aspergillus phoenicis* em FSbm e em FSS determinando as melhores condições de cultivo para obtenção destas enzimas em altos níveis, purificando e caracterizando-as bioquimicamente.

2.2 Específicos

- Selecionar linhagens de fungos filamentosos com alta produtividade tanásica.
- Padronizar as melhores condições para produção de tanases por *Aspergillus phoenicis* em Fermentação Submersa (FSbm) e em Fementação em Substrato Sólido (FSS).
- Purificar as tanases extra e intracelulares de *Aspergillus phoenicis* obtidas por FSbm.
- Caracterizar bioquimicamente as tanases produzidas por *Aspergillus phoenicis*.
- Verificar a influência de diferentes compostos na atividade tanásica.
- Analisar qualitativamente e quantitativamente a hidrólise de ácido tânico e metil galato pelas tanases de *Aspergillus phoenicis*.
- Analisar a atividade de transesterificação das tanases de *Aspergillus phoenicis* por TLC.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção da linhagem produtora de tanases em Fermentação Submersa

Entre as diferentes linhagens de fungos filamentosos existentes na micoteca do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 12 já identificadas (*Aspergillus caespitosus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus versicolor*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Scytalidium thermophilum*) foram analisadas quanto à produção de tanases. Estas cepas foram cultivadas em meio Khanna adicionado de ácido tânico como fonte de carbono, por 72 horas, a 30°C sob agitação orbital de 100 rpm.

3.1.1 Microrganismo selecionado

Entre as linhagens fúngicas analisadas quanto a produção tanásica, a que demonstrou melhores rendimentos foi a de *Aspergillus phoenicis* (FJ810504), um fungo filamentoso mesófilo isolado do solo da cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil e identificado pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, Campinas, SP.

3.2 Manutenção das cepas em laboratório e obtenção das culturas

A manutenção das cepas em laboratório foi realizada em meio solidificado de batata (BDA) em tubos de ensaio inclinados, com repiques periódicos em intervalos de aproximadamente trinta dias, mantendo-se as novas cepas em estufa a 30°C por 6 dias para crescimento e posteriormente armazenadas em geladeira a 4°C.

Para Fermentação Submersa foram utilizados 6 diferentes meios de cultivos: meio Khanna (Khanna *et al.*, 1995), meio Czapeck (Wiseman, 1975), meio SR (Rizzati *et al.*, 2001), meio Vogel (Vogel, 1964), Adams (Adams, 1990) e meio M5 (Peralta *et al.*, 1990). As culturas foram obtidas mediante inóculo de 1mL de uma suspensão de conídios em água destilada estéril em uma concentração final de 10^5 esporos/mL, em frascos

Erlenmeyer de 125mL, contendo 25mL de meio. As culturas foram mantidas a 30°C, sob agitação orbital de 120 rpm, por 3 dias.

Culturas em substrato sólido foram também utilizadas, empregando-se para tanto resíduos e produtos agroindustriais tais como bagaço de cana, farelo de trigo, farinha de aveia e palha de arroz, ou folhas de vegetais, como caju, goiaba, chá verde e manga, entre outros, como substratos/ fontes de carbono umidificados com água de torneira ou destilada ou ainda com diferentes soluções de sais (Vogel, SR, Khanna, Sais de nitrato e Traços de elementos, como descritos no item 3.2.1) em diferentes proporções (m/v). As FSS foram incubadas a 30°C em estufa com 60% de umidade relativa monitorada com termohigrometro, por diferentes períodos.

3.2.1 Composição dos meios de cultivo e soluções de sais

Meio Khanna (Khanna *et al.*, 1995)

- Solução de sais Khanna [20x].....5mL
- Extrato de levedura.....0,1g
- Fonte de carbono.....1g
- Água destilada.....qsp 100mL

Solução de sais Khanna [20x]

- NH_4NO_32g
- KH_2PO_41,3g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,362g
- KCl.....0,098g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$0,007g
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$0,0138g
- $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$0,0066g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$0,0062g
- Água destilada.....qsp 100mL

Meio SR (Rizzati *et al.*, 2001)

- Solução de sais SR [20x].....5mL
- Peptona.....0,02g
- Extrato de levedura.....0,45g
- Fonte de carbono.....1g
- Água destilada.....qsp 100mL

Solução de sais SR [20x]

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,24g
- KH_2PO_40,3g
- $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$1g
- Água destilada.....qsp 100mL

Meio Czapeck (Wiseman, 1975)

- NaNO_30,3g
- KH_2PO_40,1g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,05g
- KCl0,05g
- $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,001g
- Extrato de levedura.....0,1g
- Fonte de carbono.....1g
- Água destilada.....qsp 100mL

Meio M5 (Peralta *et al.*, 1990)

- Extrato de levedura.....0,6g
- Peptona.....0,1g
- CaCO_30,1g
- NaCl1g

- $\text{CH}_3\text{COONH}_4$0,6g
- Fonte de carbono.....1g
- Água destilada.....qsp 100mL

Meio Vogel (Vogel, 1964)

- Solução de sais Vogel [50x].....2mL
- Solução de biotina.....0,5mL
- Fonte de carbono.....2g
- Água destilada.....qsp 100mL

Solução de sais Vogel [50x]

- $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$12,5g
- KH_2PO_425g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$1g
- NH_4NO_310g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$0,5g
- Solução de traços de elementos.....0,5mL
- Água destilada.....qsp 100mL

Solução de biotina

- Biotina.....0,005g
- Etanol 50% (v/v).....100mL

Solução de traços de elementos

- $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$5g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$5g
- $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$1g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$0,25g
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$0,05g
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$0,11g

- H_3BO_31,1g
- Água destilada.....qsp 100mL

Meio Adams (Adams, 1990)

- Extrato de levedura.....0,2g
- KH_2PO_40,1g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,05g
- Fonte de carbono.....1g
- Água destilada.....qsp 100mL

Solução de traços de elementos (Selig *et al.*, 2008)

- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$2,2g
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,5g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$0,16g
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$0,5g
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$0,05g
- $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$0,16g
- Na_2EDTA5g
- Água destilada.....qsp 100mL

Solução de sais de nitrato (Selig *et al.*, 2008)

- NaNO_312g
- KCl1,04g
- KH_2PO_43,04g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$1,04g
- Água destilada.....qsp 100mL

3.3 Preparação dos produtos agroindustriais e folhas de vegetais como substratos/ fontes de carbono na produção de tanases em FSS

Os resíduos e produtos agroindustriais como milho, sabugo de milho, farinha de mandioca, farelo de trigo, farelo de soja, bagaço de cana, palha de arroz, farinha de aveia, farinha de centeio e casca de amendoim foram adquiridos no comércio local, sendo utilizados diretamente como meio de cultivo, ou no caso do milho, sabugo de milho e casca de amendoim, triturados com auxílio de multiprocessador doméstico (Walita).

Já as folhas dos vegetais foram colhidas no município de Jardinópolis (21°0'55.37" de latitude sul e 47°46'4.25" de longitude oeste), secas em estufa a 40°C por 3 a 5 dias, até atingirem massa seca constante e posteriormente trituradas em gral de porcelana. Tais produtos foram utilizados como substratos/ fontes de carbono em Fermentação em Substrato Sólido (FSS) preenchendo 1/5 do volume total em frascos Erlenmeyer de 125mL.

3.4 Influência de fontes de nitrogênio e de fosfato na produção enzimática

A influência da fonte de nitrogênio em diferentes concentrações (0 – 5%) na produção de tanases em FSbm foi avaliada, sendo utilizados extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio. Para avaliar a influência de diferentes fontes de fosfato na produção de tanases foram utilizados KH_2PO_4 e NaH_2PO_4 , nas concentrações de 0 – 5%. O controle foi o meio original na ausência de fontes de nitrogênio e fosfato.

3.5 Obtenção das enzimas extracelular e intracelular

Após o período de incubação, as FSbm foram filtradas a vácuo em funil Büchner, com papel de filtro Watman nº1, obtendo-se um filtrado livre de células, o qual foi denominado extrato bruto extracelular e utilizado para determinação da atividade enzimática, e o micélio, o qual foi macerado com areia previamente tratada com ácido, em gral de porcelana mantido em banho de gelo e, posteriormente, ressuspenso em solução tampão acetato de sódio 100mM pH 5,0, e centrifugado a 23 000 g, durante 10 minutos, a 4°C (centrífuga Sorvall super T 21). O sobrenadante, denominado extrato bruto intracelular,

foi utilizado para a determinação da atividade tanásica. Ambos os extratos contendo as enzimas extracelulares e intracelulares foram dialisados contra água destilada, com duas trocas de 1 hora cada em recipiente contendo 4L de água destilada e, posteriormente, *overnight* a 4°C.

No caso das FSS, as mesmas foram adicionadas de 25mL de água destilada gelada e submetidas a intensa agitação com o auxílio de uma barra magnética por um período de 20 minutos a 4°C. Após esse período, as culturas foram filtradas à vácuo em gaze e posteriormente em papel de filtro Watman nº1 utilizando-se funil Büchner. O filtrado livre de células obtido foi dialisado, como descrito anteriormente, e empregado na determinação da atividade enzimática extracelular. Os resíduos do meio, juntamente com o micélio, foram descartados, após autoclavados a 120°C por 40 minutos.

3.6 Indução da biomassa com glicose para a produção de tanases

O fungo *Aspergillus phoenicis* foi crescido em glicose por 48h, após esse período, as culturas foram filtradas à vácuo em funil Büchner e os micélios foram transferidos para outros meios de cultura Khanna estéreis, contendo 4 diferentes fontes de carbono, sendo estas glicose (utilizada como controle), chá verde, ácido tânico e ácido gálico. Os meios foram incubados por diferentes períodos (24h, 48h, 72h e 96h) a 30°C e 120 rpm.

3.7 Determinação da atividade enzimática

A atividade tanásica foi determinada pelo método da rodanina metanólica, utilizando-se o metil galato como substrato (0,2% em tampão acetato de sódio 100mM, pH 5,0) de acordo com o protocolo descrito por Sharma e colaboradores (2000). O método foi previamente padronizado por uma curva padrão de ácido gálico (0,0 a 0,2 mg/mL).

A reação foi composta por 250µL da solução contendo o substrato e 250µL da amostra enzimática, sendo a reação conduzida em diferentes temperaturas (30°C a 90°C) e por diferentes períodos como definido para cada experimento. A reação enzimática foi parada pela adição de 300µL de rodanina metanólica 0,667% (m/v). Após 5 minutos, 200µL

de hidróxido de potássio 0,5N (m/v) foram adicionados, formando um cromatógeno de coloração violeta. O volume obtido foi diluído adicionando 4mL de água destilada em cada reação. Após 10 minutos procedeu-se a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda $\lambda=520\text{nm}$.

Uma unidade de atividade tanásica (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de ácido gálico por minuto nas condições de ensaio. A atividade total (U total) = U x volume do extrato. A atividade específica foi expressa em U/mg proteína. Para a FSS a atividade tanásica foi expressa em U/g de substrato.

3.8 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada como descrito por Lowry *et al.* (1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. As amostras de soluções enzimáticas (200 μL) foram acrescidas de 1mL de uma solução preparada no momento do uso, composta de carbonato de sódio 2% (m/v) em NaOH 0,1N (m/v), sulfato de cobre 1% (m/v) e tartarato de sódio e potássio 1% (m/v), na proporção de 100:1:1 (v/v/v). Após 15 minutos, acrescentou-se 100 μL de Folin Ciocalteau em água destilada (1:1 v/v). Após 30 minutos foi mensurada a absorbância em comprimento de onda $\lambda=620\text{nm}$. A unidade foi definida como sendo a quantidade em mg de proteína/mL de amostra. A proteína total (mg totais) foi definida como mg de proteína x volume do extrato.

3.9 Quantificação de carboidratos

O conteúdo de carboidratos das tanases purificadas foi estimado pelo método fenol-sulfúrico segundo Dubois *et al.* (1956) utilizando-se manose como padrão (0 a 0,1 mg/mL). As amostras enzimáticas (2mL) foram adicionados a 5mL de ácido sulfúrico concentrado e 50 μL de fenol 80%. Esta mistura foi agitada e mantida em banho de gelo por 10 minutos e posteriormente incubada a 30°C por 15 minutos. Após este procedimento, a mistura foi novamente agitada e a absorbância foi mensurada em comprimento de onda $\lambda=490\text{nm}$. Para o branco, a amostra enzimática foi substituída pela mesma quantidade de água

destilada. A unidade foi definida como sendo a quantidade em mg de carboidrato presente por mL da amostra.

3.10 Purificação das tanases extra e intracelular em coluna cromatográfica

Os extratos brutos extra e intracelular obtidos da FSbm foram dialisados contra água destilada como descrito anteriormente e posteriormente tratados com Caulim (40 mg/mL) para remoção dos pigmentos, em banho de gelo, sendo agitado por barra magnética por um período de 2 horas e em seguida centrifugado a 23000 *g*. O sobrenadante foi aplicado em coluna cromatográfica de troca iônica DEAE-Celulose (1 x 12 cm) equilibrada previamente em tampão acetato de sódio 10mM, pH 5,0 e com vazão ajustada para 1 mL/min. A enzima foi eluída mediante a aplicação de um gradiente linear de NaCl (0 a 1,5M). As frações (3 mL/tubo) que apresentaram atividade foram reunidas em um único *pool*, dialisadas *overnight* contra água destilada a 4°C. Após este procedimento, este *pool* foi liofilizado, ressuspenso em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,5 adicionado de 100mM de KCl e aplicado em coluna de exclusão molecular Sepharose CL6B (1 x 80 cm), previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,5 com 100mM de KCl e com vazão ajustada para 0,4 mL/min. As frações (1,25 mL/tubo) que apresentaram atividade tanásica foram reunidas e dialisadas *overnight* contra água destilada a 4°C. Posteriormente as amostras intra e extracelulares purificadas foram liofilizadas, e aplicadas em eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE 6%) e desnaturantes (SDS-PAGE 6%) como descrito no item 3.11.

3.11 Procedimento eletroforético

O processo de purificação foi acompanhado por eletroforese em gel de poliacrilamida montado entre placas de vidro, em condições não desnaturantes (PAGE 6%) (Davis, 1964) e em condições desnaturantes (SDS-PAGE 6%) (Laemmli, 1970), utilizando-se uma fonte ajustada para 120 V e 40 mA. Após corrida eletroforética o gel foi removido das placas de vidro e corado em Coomassie Brilliant Blue R-250 ou submetido ao

procedimento de revelação por prata segundo metodologia descrita por Blum e colaboradores (1987) ou ainda, utilizado para determinação da atividade enzimática em gel segundo Aoki e colaboradores (1979).

A determinação da atividade tanásica em gel foi realizada lavando-se o gel sob agitação com 100mL de Triton X-100 2,5% (v/v) durante 1 h, seguida de 2 lavagens com 100mL de tampão acetato de sódio 10mM pH 5,0 por 45 minutos. Depois de lavado, o gel foi submetido a incubação a 40°C com ácido tânico 0,5% (m/v) em tampão acetato de sódio 100mM pH 5,5. A solução de ácido tânico foi descartada depois de 24 horas, e substituída por 100mL de solução de hidrocloreto de quinino 0,5% (m/v) em tampão acetato de sódio 50mM pH 5,5 a temperatura ambiente para revelação. A atividade tanásica apareceu como uma banda clara no gel.

3.12 Determinação da massa molar

A massa molar nativa das tanases extracelular e intracelular foi determinada utilizando-se amostras protéicas dialisadas *overnight* contra água destilada, liofilizadas e ressuspensas em 2mL de tampão Tris-HCl 50mM pH 7,5 adicionado de 100mM de KCl, sendo posteriormente aplicadas em coluna de exclusão molecular Sepharose CL6B (1 x 80 cm), nas mesmas condições citadas anteriormente. Como marcadores de massa molar foram utilizados β -amilase (200 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). O volume livre da coluna (V_0) foi de 86,3mL, determinado com Blue Dextran 2000.

Já a massa molar da tanase desnaturada foi determinada utilizando-se SDS-PAGE 6% (como descrito no item 3.11) e como marcadores de massa molar foram utilizados α -macroglobulina (169 kDa), β -galactosidase (112,5 kDa), lactoferrina (92 kDa), piruvato quinase (67 kDa), fumarase (60 kDa), desidrogenase láctica (36,5 kDa) e triosefosfato isomerase (31,5 kDa).

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 que variaram entre 30°C e 90°C com intervalos de 5°C. A estabilidade térmica foi determinada incubando-se alíquotas de enzima em banho maria em diferentes temperaturas (40°C a 70°C) por diferentes intervalos de tempo (0, 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos). A cada intervalo, alíquotas da enzima incubada eram retiradas, mantidas em banho de gelo e depois ensaiadas para atividade tanásica.

3.13.2 pH ótimo e estabilidade ao pH

O pH ótimo para a atividade tanásica foi determinado utilizando-se diferentes soluções tampões (100mM) com pH variando entre 2,5 e 10,0. Para pH 2,5 e 3,0 foi utilizado tampão citrato de sódio, para pH 3,5 - 5,5 tampão acetato de sódio, para pH 6,0 e 6,5 tampão MES, para pH 7,0 - 9,0 tampão Tris-HCl e para pH 9,5 e 10,0 tampão glicina. A estabilidade ao pH das tanases foi verificada incubando-se as enzimas, em banho de gelo, em diferentes soluções tampões a 100mM, sendo utilizados tampão citrato de sódio (pH 2,5), tampão acetato de sódio (pH 4,0 e 5,0), tampão MES (pH 6,0), tampão Tris-HCl (pH de 7,0 a 9,0) e tampão glicina (pH 10,0). As amostras enzimáticas foram adicionadas na proporção 1:1 (v/v) e após incubação por diferentes períodos, alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos de tempo e a atividade enzimática residual foi determinada.

3.13.3 Efeito de diferentes compostos químicos na atividade tanásica

O efeito de vários compostos sobre a atividade tanásica foi determinado. Os compostos foram utilizados em concentrações finais de 1mM para diferentes sais, β -mercaptoetanol, uréia, H_2O_2 e EDTA, 0,01% (v/v) para os detergentes SDS, Triton X – 100, Tween-80 e Tween-20 e 1% (v/v) para os solventes orgânicos (metanol, acetonitrila, etanol, acetona, isopropanol, n-butanol e glicerol), adicionados à mistura de reação.

A estabilidade da enzima na presença de alguns solventes orgânicos como etanol, metanol, isopropanol, n-butanol, acetona, glicerol e acetonitrila foi determinada incubando-se a enzima com tais solventes na proporção de 1:1 (v/v) a 4°C, durante os períodos de 10 minutos, 4 e 8 horas. O tubo controle foi aquele no qual o solvente foi substituído por água destilada.

3.14 Hidrólise de diferentes substratos e análise dos produtos de hidrólise do ácido tânico e do metil galato

As atividades esterásica e depsidásica das tanases intra e extracelular foram determinadas utilizando-se metil galato e ácido tânico como substratos, respectivamente. Ambos substratos foram preparados em tampão acetato de sódio 100mM pH 5,0 e as reações foram finalizadas em intervalos de tempo variando de 1 a 210 minutos. A mistura de ambos os substratos (1:1, v/v) foi também submetida a ação das tanases com o intuito de se verificar se os sítios de hidrólise para estes substratos eram comuns.

A análise qualitativa do ácido gálico obtido a partir da hidrólise do ácido tânico e do metil galato foi determinada por cromatografia em camada delgada (TLC), segundo metodologia descrita por Mahendran e colaboradores (2006). Como fase móvel foi utilizada uma solução de benzeno:acetato de etila:ácido fórmico (18:15:1, v/v/v). As misturas de reação contendo tanase e ácido tânico ou tanase e metil galato (1:1, v/v) foram incubadas a 40°C por diferentes períodos retirando-se alíquotas de 10µL que foram aplicadas em TLC. Para o controle negativo foi utilizada a tanase desnaturada (fervida por 10 minutos) e incubada por 10 minutos com o substrato, nas mesmas condições. Foram empregados como padrões, o ácido tânico, o metil galato e o ácido gálico, todos em tampão acetato de sódio 100mM pH 5,0. Após a corrida e secagem das placas, o ácido tânico, o metil galato residual e o ácido gálico formado foram revelados com FeCl₃ 1% (m/v) em água destilada.

3.15 Determinação das constantes cinéticas

A constante de Michaelis-Menten (K_m), a velocidade máxima (V_{max}) e a razão V_{max}/K_m foram determinadas para as tanases intra e extracelulares purificadas, utilizando ácido tânico (0,1–10mM), metil galato (0,1–60mM) e propil galato (0,1–20mM) como substratos. Os valores de K_m e V_{max} foram determinados pela representação gráfica do duplo-recíproco de acordo com Lineweaver-Burk (1934) utilizando o programa Enzyplot (Leone *et al.*, 1995). A atividade tanásica foi determinada pelo método da rodanina metanólica, como descrito no item 3.7.

3.16 Síntese de propil galato

Para analisar qualitativamente a hidrólise do ácido tânico em ácido gálico e a síntese do propil galato a partir da transesterificação do ácido gálico com 1-propanol foi utilizada a cromatografia em camada delgada (TLC), como descrito no item 3.14. Como padrões foram utilizados ácido tânico 1mM, ácido gálico 10mM e propil galato 10mM em tampão MES 100mM pH 6,0.

Para as reações, foi utilizado como substrato o ácido tânico 5mM, que foi preparado em solução tampão MES 100mM pH 6,0 e posteriormente adicionado de solvente orgânico 1-propanol na proporção 1:1 (v/v). As amostras enzimáticas intra e extracelulares foram incubadas na proporção 1:1 (v/v) com o substrato, em diferentes intervalos de tempo, retirando-se alíquotas de 10 μ L das misturas de reação, as quais foram aplicadas em TLC. Para o controle negativo foi utilizada a tanase desnaturada (fervida por 10 minutos) e incubada por 10 minutos com o substrato, nas mesmas condições. Após a corrida e secagem das placas, o ácido tânico residual, o propil galato e o ácido gálico formados foram revelados com $FeCl_3$ 1% (m/v) em água destilada.

3.17 Análise dos experimentos

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os experimentos foram analisados com base na média e no desvio padrão. Para a análise dos dados obtidos e representação gráfica foram utilizados os programas Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft), Origin 6.1 (OriginLab Corporation) e Enzyplot (Leone *et al.* 1995).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor entendimento dos resultados, estes foram separados em 3 seções a saber:

4.1 Produção de tanases por *Aspergillus phoenicis* em FSbm e em FSS.

4.2 Purificação das tanases intra e extracelulares.

4.3 Caracterização bioquímica das tanases intra e extracelulares.

4.1 Produção de tanases por *Aspergillus phoenicis* em FSbm e em FSS

4.1.1 Produção de tanases em FSbm

4.1.1.1 Produção de tanases por diferentes linhagens de fungos filamentosos

A capacidade de secretar grandes quantidades de enzimas para o meio de cultivo de alguns fungos filamentosos tem estimulado pesquisas para o desenvolvimento de fermentação em larga escala, purificação enzimática e técnicas de biologia molecular (Agger *et al.*, 2002; Said e Pietro, 2002).

Entre as cepas fúngicas identificadas encontradas na micoteca do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, 12 foram testadas quanto a produção de tanases, sendo que todas apresentaram esta característica (Tabela 2). Dentre os fungos testados, os que apresentaram maiores produções enzimáticas extracelulares foram *Aspergillus phoenicis* (0,42 U/mL), *Aspergillus ochraceus* (0,39 U/mL) e *Aspergillus caespitosus* (0,31 U/mL), respectivamente. Já quanto a atividade intracelular, os que mais se destacaram foram *Aspergillus ochraceus* (0,65 U/mL), *Aspergillus phoenicis* (0,59 U/mL) e *Aspergillus oryzae* (0,43 U/mL) (Tabela 2).

O *Aspergillus versicolor* e *Humicola insolens* foram os fungos que apresentaram menor produção da tanase extracelular, ao passo que a menor produção da enzima intracelular foi observada em *Aspergillus terreus* e *Humicola grisea*, sendo estas 3,5 e 5,9 vezes menor quando comparadas a produção obtida por *Aspergillus phoenicis*.

Analisando a atividade tanásica total (somatória da atividade intracelular com a atividade extracelular) 2 linhagens se destacaram, sendo elas a de *A. ochraceus* e a de *A. phoenicis*. Porém, considerando a atividade extracelular, dentre os microrganismos analisados, *Aspergillus phoenicis* foi o melhor produtor, sendo escolhido para a continuidade dos estudos (Tabela 2).

Tabela 2. Produção de tanases por diferentes linhagens de fungos filamentosos em FSbm

Linhagens de fungos filamentosos	Atividade tanásica (U/mL)		
	Extracelular	Intracelular	Total (extra + intra)
<i>Aspergillus caespitosus</i>	0,31 ± 0,05	0,24 ± 0,03	0,55
<i>Aspergillus flavus</i>	0,22 ± 0,08	0,32 ± 0,09	0,54
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0,39 ± 0,07	0,65 ± 0,05	1,04
<i>Aspergillus oryzae</i>	0,27 ± 0,03	0,43 ± 0,08	0,70
<i>Aspergillus terreus</i>	0,26 ± 0,12	0,10 ± 0,04	0,36
<i>Aspergillus phoenicis</i>	0,42 ± 0,05	0,59 ± 0,02	1,01
<i>Aspergillus versicolor</i>	0,12 ± 0,04	0,19 ± 0,07	0,31
<i>Humicola grisea</i>	0,22 ± 0,06	0,10 ± 0,12	0,32
<i>Humicola insolens</i>	0,12 ± 0,09	0,32 ± 0,03	0,44
<i>Neurospora crassa</i>	0,18 ± 0,10	0,16 ± 0,06	0,34
<i>Penicillium purpurogenum</i>	0,20 ± 0,05	0,15 ± 0,11	0,35
<i>Scytalidium thermophilum</i>	0,29 ± 0,07	0,17 ± 0,04	0,46

Cultivos realizados em meio Khanna tendo ácido tânico como fonte de carbono, por 3 dias sob agitação de 120rpm a 30°C.

A capacidade de produzir tanases já foi observada em muitos outros microorganismos, como apresentado por Aguilar *et al.* (2007), destacando-se entre os fungos filamentosos os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Mucor* e *Rhizopus*, e entre as bactérias os gêneros *Bacillus*, *Klebisella*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, e *Pediococcus*. Entre as leveduras, merecem destaque os gêneros *Candida*, *Saccharomyces* e *Pichia*.

Os fungos e bactérias dos gêneros *Aspergillus* e *Bacillus*, respectivamente, são os mais utilizados para a produção de tanases. A produção de tanases por *Aspergillus* sp. já foi observada tanto em FSbm quanto em FSS, na presença ou ausência de ácido tânico. Dependendo da linhagem e das condições cultivo, a enzima é induzida e expressa com diferentes níveis, mostrando diferentes padrões de produção (Aguilar *et al.*, 2007), também observado pelos resultados obtidos.

4.1.1.2 Produção de tanases por *Aspergillus phoenicis* em função do meio de cultivo

Processos industriais necessitam de grandes quantidades da enzima de interesse, que devem também atuar com um máximo de atividade. Vários fatores influenciam na produção e secreção de enzimas pelo fungo, como a composição do meio em que ele se desenvolve e as condições de cultivo. O meio de fermentação deve proporcionar ao microrganismo todos os nutrientes que ele necessite. O meio deve conter basicamente, fontes de carbono e nitrogênio, e alguns minerais.

Com o intuito de determinar a melhor composição do meio de cultura para o crescimento fúngico e para a produção enzimática, foram utilizados os meios Adams (Adams, 1990), Khanna (Khanna; *et al.*, 1995), M5 (Peralta; *et al.*, 1990), Vogel (Vogel, 1964), Czapeck (Wiseman, 1975) e SR (Rizzatti *et al.*, 2001), adicionados de ácido tânico como única fonte de carbono. Esses meios variam na composição de íons e no tipo e concentração da fonte de nitrogênio.

Entre os meios analisados, as maiores produções das enzimas extracelular (0,58 U/mL) e intracelular (0,75 U/mL) foram obtidas em meio Khanna mantido sob agitação (120 rpm, por 72 horas). Desta forma, optou-se pelo uso deste meio para os experimentos subsequentes (Tabela 3).

O meio M5 em condição estacionária foi o que menos favoreceu a produção enzimática, sendo a produção das tanases extracelular e intracelular cerca de 7 e 3 vezes menor, respectivamente, se comparada a maior produção obtida com o meio Khanna em agitação.

Fatores físicos como temperatura, pH, aeração e tempo de cultivo também são capazes de afetar a produção de tanases por microrganismos e não apenas os fatores nutricionais.

Adicionalmente, o fungo em estudo cresceu em ambas as condições físicas de cultivo (agitação e estacionária), porém os maiores níveis da enzima extracelular foram obtidos em condições de agitação, o que condiz com o descrito por Aguilar *et al.* (2007),

que apontam que os fungos do gênero *Aspergillus* possuem a maior produção de tanases em culturas submersas quando possuem alta aeração.

Natarajan e Rajendran (2009) testaram a velocidade de agitação ótima para tanases de *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407 e o valor encontrado para a máxima produção tanásica foi de 125 rpm, sendo que o aumento da taxa de agitação além de 200 rpm resultou em uma drástica queda na atividade específica da enzima.

Também, Barthomeuf *et al.* (1994) relataram que a aeração insuficiente impede o crescimento, enquanto que excessiva aeração favorece a oxidação de taninos e tem um efeito inibitório na biossíntese de tanase por *A. niger*. Já quando considerada a produção da enzima intracelular pelo fungo em estudo, a condição estacionária foi mais favorável para os meios Vogel e Czapeck.

Tabela 3. Produção de tanases intra e extracelulares por *Aspergillus phoenicis* em diferentes meios de cultivo mantidos ou não sob agitação (120 rpm).

Meio de cultura	Condição de cultivo	Atividade Tanásica (U/mL)	
		Extracelular	Intracelular
SR	Estacionário	0,42 ± 0,10	0,37 ± 0,02
	Agitação	0,44 ± 0,05	0,55 ± 0,01
Vogel	Estacionário	0,42 ± 0,10	0,58 ± 0,03
	Agitação	0,46 ± 0,06	0,45 ± 0,07
Czapeck	Estacionário	0,45 ± 0,04	0,34 ± 0,01
	Agitação	0,46 ± 0,01	0,29 ± 0,05
M5	Estacionário	0,08 ± 0,04	0,23 ± 0,10
	Agitação	0,25 ± 0,02	0,41 ± 0,05
Khanna	Estacionário	0,49 ± 0,01	0,67 ± 0,04
	Agitação	0,58 ± 0,07	0,75 ± 0,02
Adams	Estacionário	0,49 ± 0,08	0,31 ± 0,09
	Agitação	0,50 ± 0,04	0,35 ± 0,05

Cultivos realizados em meio de cultura tendo ácido tânico 2% (m/v) como fonte de carbono, por 3 dias, a 30°C.

4.1.1.3 Efeito da temperatura sobre o crescimento do fungo e sobre a produção de tanases em FSbm

Assim como a aeração e a fonte de carbono, a temperatura tem importante influência sobre o crescimento e secreção das enzimas pelos microrganismos. Dessa forma, é importante o conhecimento da temperatura mais apropriada para a síntese e secreção das enzimas pelo fungo (Silva, 2009). A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que afetam o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos. Cada organismo apresenta uma temperatura mínima, abaixo da qual é incapaz de crescer, e uma temperatura máxima, acima da qual ocorre a morte da célula microbiana. A temperatura ótima de crescimento de um organismo sempre se encontra mais próxima da temperatura máxima do que da temperatura mínima (Madigan *et al.*, 2003).

A temperatura de crescimento dos fungos abrange uma larga faixa, havendo espécies psicrófilas, mesófilas e termófilas (Carlile e Watkinson, 1994). *Aspergillus phoenicis* é uma espécie mesófila. Entretanto, para saber a temperatura ideal de crescimento deste microrganismo, foram realizados repiques em placas de Petri com meio BDA, as quais foram incubadas em temperaturas de 25°, 30°, 35° e 40°C, por 120 horas. O fungo apresentou maior crescimento quando incubado a 30°C. Crescimento considerável foi também observado quando incubado a 35°C. Porém, não houve crescimento quando incubado a 25°C e a 40°C (Figura 10). Foi realizado também um estudo sobre o efeito da temperatura no crescimento do fungo e na produção de tanases em fermentação submersa. Para tanto, o fungo foi inoculado em meio Khanna suplementado com ácido tânico 2%, incubado por 120 horas, 120 rpm, nas temperaturas de 25°, 30°, 35° e 40°C.

Os resultados mostram que, em FSbm, *A. phoenicis* apresentou maior produção tanásica quando incubado a 30°C, para ambos os extratos brutos, intra e extracelular (Figura 11A). Quanto à produção protéica (Figura 11B), esta foi semelhante nos cultivos a 30° e 35°C, o que se pode perceber pelos resultados de proteínas totais.

Quando crescido a 40°C, *A. phoenicis* secretou aproximadamente 85% das tanases extracelulares detectadas nos cultivos a 30°C e produziu aproximadamente 80% das

tanases intracelulares. A 25°C não se observou produção de tanases nas condições determinadas para o experimento.

A maior parte das tanases fúngicas descritas são produzidas por organismos mesofílicos cujas temperaturas de crescimento variam de 28°C a 37°C (Lekha e Lonsane, 1997, Pinto *et al.*, 2005). Uma temperatura ótima de 30°C foi descrita para a produção de tanases pelas linhagens mesofílicas de *A. niger* AUMC 4301 (El-Fouly *et al.*, 2010), *A. niger* ATCC 16620 (Sabu *et al.*, 2005), *A. flavus* (Yamada *et al.*, 1968) e *A. oryzae* (Rodrigues *et al.*, 2008).

Temperatura ótimas semelhantes foram relatadas para as tanases de *A. niger* (35°C) (Lokeswari *et al.*, 2007), *A. niger* LCF8 (33°C) (Barthomeuf *et al.*, 1994), *A. japonicus* (35°C) (Ojha *et al.*, 2010), *P. chrysogenum* NCIM 722 (28°C) (Rajakumar e Nandy, 1983) e *A. fumigatus* MA (25°C) (Manjit *et al.*, 2008). Temperaturas ótimas de crescimento mais elevadas foram descritas para a produção de tanases por *Trichoderma viride* (45°C) (Lokeswari *et al.*, 2010) e *Candida* sp. (50°C) (Aoki *et al.*, 1976).

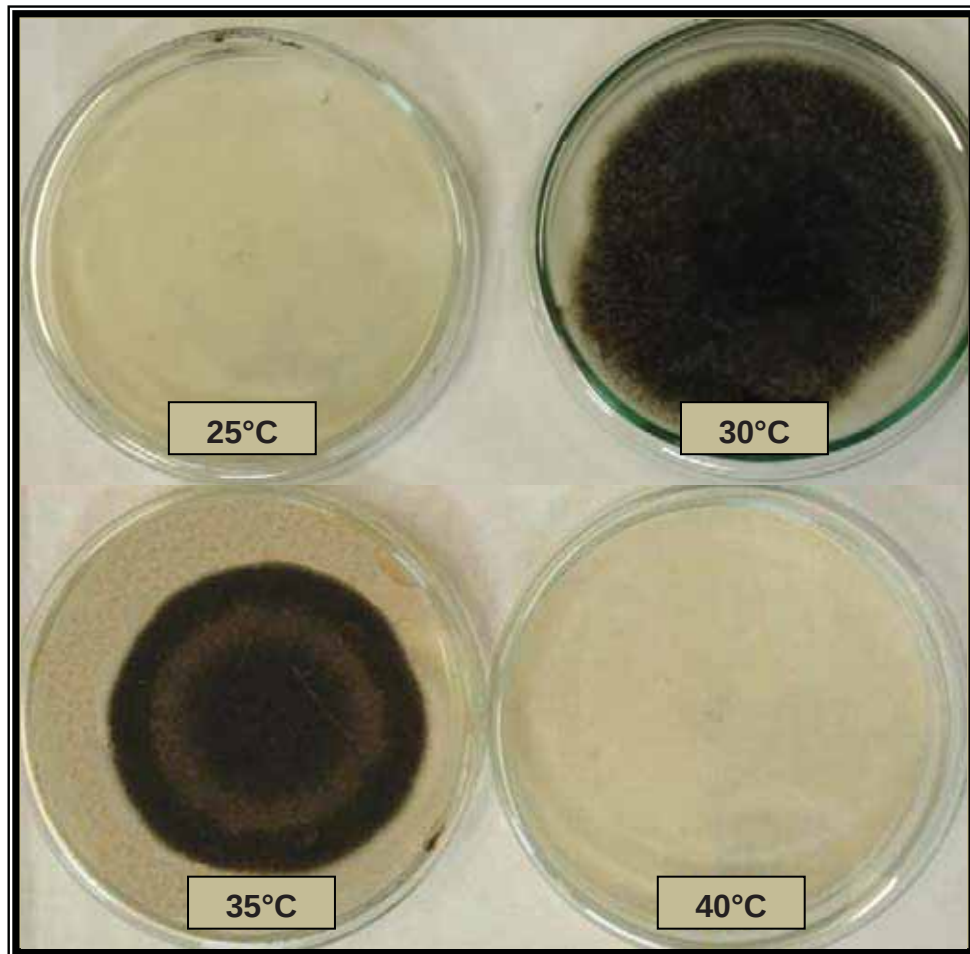


Figura 10. Crescimento de *A. phoenicis* a 25°, 30°, 35° e 40°C em placas de Petri contendo meio de aveia, por 120 h.

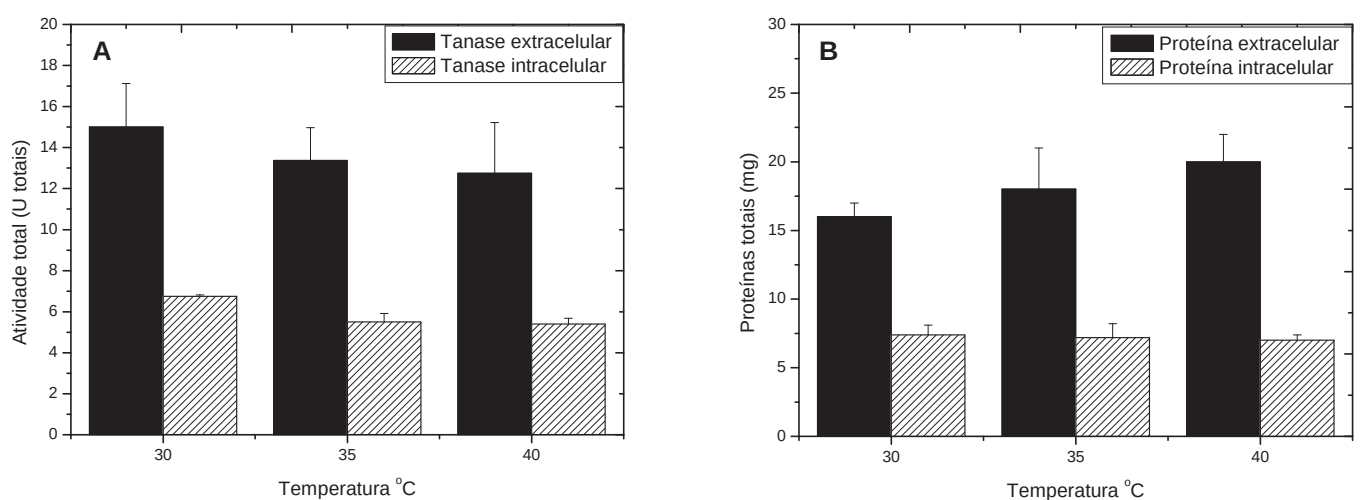


Figura 11. Efeito da temperatura de incubação na produção de tanases (A) e na produção de proteínas (B) por *A. phoenicis* nas temperaturas de 25°, 30°, 35° e 40°C.

4.1.1.4 Produção de tanases em FSbm em função do tempo de cultivo

A produção e a secreção de tanases em função do tempo de incubação do fungo *A. phoenicis* foram investigadas.

Analisando-se a produção tanásica em função do tempo de cultivo (Figura 10) pode-se observar que os maiores níveis enzimáticos foram obtidos em 72 horas para ambas as formas, extracelular (0,59 U/mL) e intracelular (0,78 U/mL). Com base neste resultado, optou-se por cultivar o fungo sob agitação por 72 horas. Em adição, o crescimento da massa micelial foi também significativo neste período, sendo maior que o observado para o período de 96 horas (dados não mostrados). Fato este justificado, provavelmente pela ocorrência de autólise das células fúngicas. Dessa forma, ao minimizar o tempo de cultivo, pode-se agilizar os experimentos, tendo uma produção enzimática considerável. Os dados mostram que a secreção das tanases ocorrem principalmente em períodos iniciais de cultivo. Como o meio é rico em taninos, provavelmente o fungo gasta energias iniciais para exteriorizar a enzima na intenção de utilizar esta fonte de carbono.

A incubação por um curto período pode não resultar na produção máxima da enzima de interesse. Da mesma forma, cultivos por um longo período podem levar ao esgotamento dos nutrientes, levando a um declínio da produção enzimática além da morte celular (Pelczar *et al.*, 1996).

Tais dados encontrados são coincidentes com os já apresentados por outros autores. No caso da tanase extracelular produzida por *A. flavus* em fermentação submersa, o tempo ótimo para a produção da enzima foi de 3 dias (Yamada *et al.*, 1968). Já para a tanase intracelular de *Aspergillus niger* MTCC 2425, a produção máxima ocorreu em 5 dias para os cultivos em superfície líquida (Rana e Bhat, 2005).

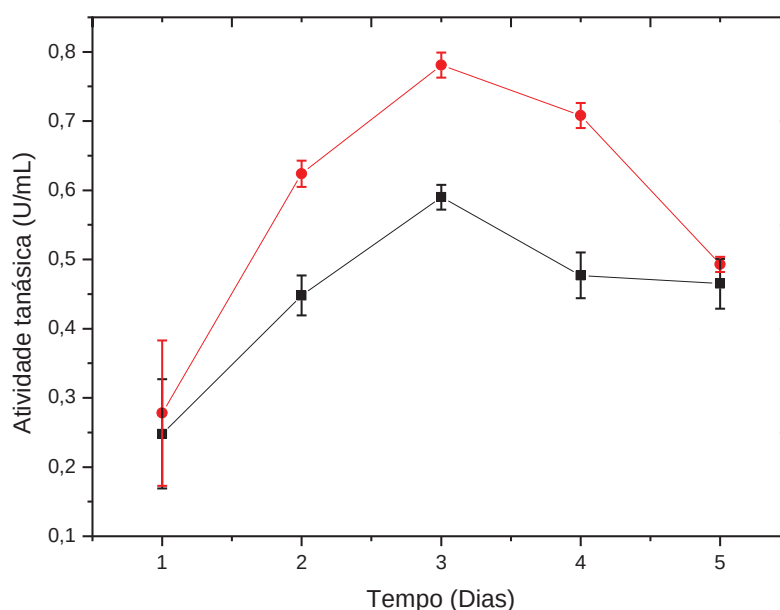


Figura 12. Produção de tanases intra (●) e extracelulares (■) pelo fungo *A. phoenicis* em função do tempo de cultivo. Cultivo realizado em meio Khanna tendo 2% (m/v) de ácido tânico como fonte de carbono, a 30°C, sob agitação orbital (120 rpm).

4.1.1.5 Efeito do pH inicial do meio de cultivo na produção de tanases em FSbm

Na figura 11 pode-se observar que os maiores níveis enzimáticos extracelular e intracelular foram obtidos quando o pH inicial do meio de cultivo foi ajustado para 6,0. Foi observada também uma queda dos valores de pH ao longo dos dias de cultivo, sendo aferido os pH dos filtrados extracelulares (não mostrado). Provavelmente, isso se deve a produção de metabólitos ácidos.

Segundo Raimbault (1998), os valores de pH durante o processo fermentativo podem aumentar ou diminuir em função dos produtos do metabolismo do microrganismo durante a fermentação. A secreção de ácidos orgânicos como ácido acético, ácido lático e ácido cítrico proporciona um decréscimo nos valores de pH e por outro lado, a assimilação de ácidos orgânicos, juntamente com a hidrólise de algumas substâncias como uréia e proteínas, geralmente causam um aumento no pH do meio de cultivo.

Barthomeuf *et al.* (1994) demonstraram que para tanases produzidas por *A. niger*, em pH abaixo de 3,5 a enzima é instável. No entanto, a hidrólise do substrato e a difusão

da enzima no meio são melhoradas quando o microrganismo é cultivado em valores de pH acima de 5,5.

O crescimento das células microbianas também é influenciada pelo pH. Além disso, o pH do meio de cultura pode afetar a estrutura e a função das enzimas, sendo que estas proteínas contém grupos ionizáveis. O pH ótimo de crescimento e de produção podem diferir, bem como o pH ótimo para a atividade da enzima (Said e Pietro, 2002).

No caso da maioria das tanases produzidas em fermentação submersa, o pH inicial ótimo se encontra entre 4,5 e 7,0 e entre 5,0 e 6,5 para a FSS (Van de Lagemaat e Pyle, 2005). Lekha e Lonsane (1997) relataram que tanases são proteínas ácidas com pH ótimo em torno de 5,5. Da mesma forma Sabu *et al.* (2005) também descreveram um pH ótimo inicial de 5,5 para a produção de tanase por *Aspergillus niger* ATCC 16620.

No entanto, nem sempre o pH inicial se mantém até o fim da cultura, sendo que para a manutenção desta estabilidade seria necessária a utilização de um fermentador onde o pH pudesse ser constantemente verificado e corrigido.

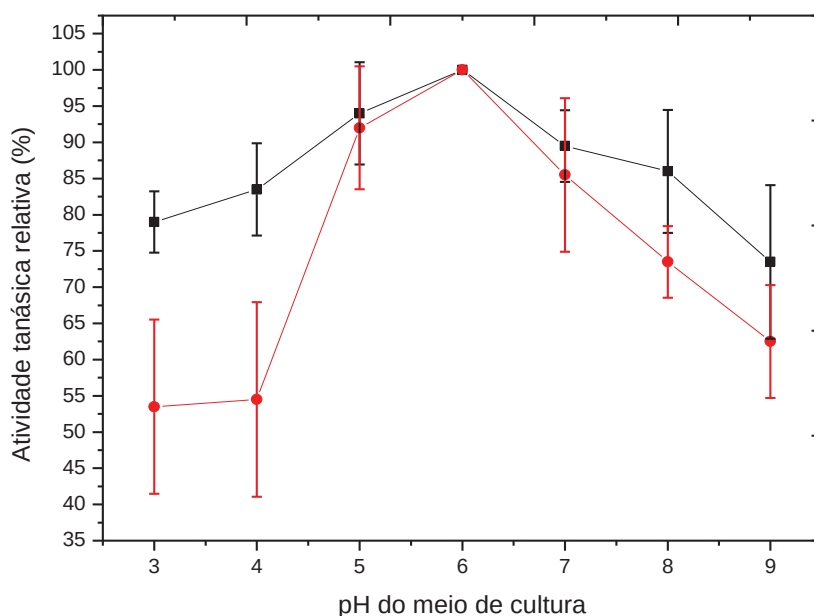


Figura 13. Produção de tanases extracelular (■) e intracelular (●) por *A. phoenicis* em função do pH inicial do meio de cultivo. A cultura foi realizada em meio Khanna tendo ácido tânico 2% (m/v) como fonte de carbono, por 3 dias sob agitação orbital (120 rpm) a 30°C.

4.1.1.6 Efeito de fontes de carbono na produção tanásica em FSbm

Na tabela 4 pode-se observar a influência de diferentes fontes de carbono sobre a produção de tanases pelo fungo *A. phoenicis* em FSbm em meio Khanna.

O ácido tânico foi a melhor fonte de carbono para a produção de tanases extra e intracelular, sendo os valores de atividades tanásicas de 0,64 U/mL e 0,79 U/mL, respectivamente. Para todas as demais fontes testadas, a produção foi diminuída. O ácido tânico foi, a partir desses dados, utilizado como fonte de carbono para os demais experimentos, sendo que esta fonte já havia sido descrita por Aoki *et al.* (1976) como um indutor para esta enzima, além de fonte de carbono para o microrganismo.

Bradoo *et al.* (1996) relataram que a síntese de tanases em FSbm por *A. japonicus* duplicou com presença de ácido tânico nos meios de cultura. Fato semelhante foi observado para a enzima de *A. phoenicis*, porém com um aumento de aproximadamente 13 vezes na produção da tanase extracelular e de 8 vezes na obtenção da enzima intracelular, se comparado ao meio na ausência de fonte de carbono.

O chá verde e o chá mate também foram boas fontes indutoras da produção de tanases, provavelmente, por serem folhas que apresentam elevada concentração de taninos. Sendo assim, essas fontes de carbono/substrato são uma ótima alternativa para a obtenção de tanases, pois, torna desnecessário a presença de ácido tânico no meio de cultura. É importante notar que níveis enzimáticos basais foram obtidos utilizando-se glicose como fonte de carbono, o que condiz com o descrito por Bradoo *et al.* (1996) que evidenciaram a síntese da tanase mesmo quando a única fonte de carbono foi a glicose.

Porém, sem a presença de um indutor, seja ele o ácido tânico ou outro tipo de tanino hidrolisável, como aqueles presentes nas folhas de chás, a produção de tanases é reduzida, praticamente nula, como pode ser observado para a palha de arroz e bagaço de cana que foram as piores fontes para a produção da tanase extracelular por *A. phoenicis*. Já para a enzima intracelular a produção foi menor quando utilizados farinha de centeio, palha de arroz e amido como fontes de carbono.

Isto se deve ao fato de que a tanase é uma enzima induzível, sendo expressa em grandes quantidades apenas na presença de taninos hidrolisáveis.

Tabela 4. Fontes de carbono utilizadas para a produção de tanases em FSbm por *Aspergillus phoenicis*.

Fontes de carbono	Atividade tanásica (U/mL)	
	Extracelular	Intracelular
Ausente	0,05 ± 0,03	0,09 ± 0,08
Ácido gálico 2%	0,43 ± 0,09	0,11 ± 0,05
Ácido tânico 2%	0,64 ± 0,06	0,79 ± 0,03
Metil galato 2%	0,26 ± 0,04	0,19 ± 0,011
Glicose 2%	0,07 ± 0,07	0,28 ± 0,06
Lactose 1%	0,08 ± 0,07	0,10 ± 0,04
Sacarose 1%	0,07 ± 0,02	0,10 ± 0,01
Amido 1%	0,09 ± 0,03	0,09 ± 0,08
Milho moído 1%	0,08 ± 0,05	0,10 ± 0,03
Farinha de aveia 1%	0,14 ± 0,10	0,12 ± 0,10
Sabugo de milho 1%	0,08 ± 0,04	0,10 ± 0,02
Farelo de trigo 1%	0,09 ± 0,03	0,13 ± 0,07
Farinha de centeio 1%	0,10 ± 0,09	0,09 ± 0,06
Palha de arroz 1%	0,06 ± 0,05	0,09 ± 0,03
Bagaço de cana 1%	0,06 ± 0,07	0,11 ± 0,01
Soja moída 1%	0,07 ± 0,04	0,12 ± 0,05
Chá mate 1%	0,24 ± 0,04	0,25 ± 0,08
Chá verde 1%	0,42 ± 0,08	0,76 ± 0,02

Cultivos realizados em meio Khanna por 3 dias, sob agitação (120 rpm) a 30°C.

Considerando-se a maior produção enzimática obtida com ácido tânico, a influência de diferentes concentrações deste composto foi analisada. Na concentração de 2% (m/v) foram obtidos os maiores níveis enzimáticos extra (0,62 U/mL) e intracelular (0,76 U/mL),

sendo estes maiores cerca de 9 e 7 vezes, respectivamente, quando comparadas ao meio controle, ou seja, sem a presença de ácido tânico (Figura 14).

Porém, em concentrações de ácido tânico maiores que 2%, a produção de ambas as formas diminuiu gradativamente (Figura 14). Tal dado, também, foi observado para tanase de *Aspergillus pullulans* DBS66, a qual teve sua produção diminuída em elevadas concentrações de ácido tânico. Esta observação foi explicada com base no fato de que o ácido tânico em maior concentração faz uma reação irreversível com proteínas de superfície do organismo, assim, o crescimento e a produção da enzima podem ser reduzidos (Banerjee e Pati, 2007). Da mesma forma, Seth e Chand (2000) constataram para *Aspergillus awamori* que um grande aumento na concentração de ácido tânico induziu a uma diminuição na produção da tanase por deposição de ácido gálico na superfície da célula.

Entretanto o mecanismo de indução por ácido tânico ainda não é conhecido. O grande tamanho e reatividade do ácido tânico impedem a absorção da molécula através da membrana celular. Além disso, a reação do ácido tânico com a parede celular tem sido relatada por prejudicar a permeabilidade. Estes fatos sugerem que o ácido tânico não pode ser o agente indutor. O mecanismo de indução é provavelmente similar ao da celulase, onde o microrganismo produz um nível básico ou uma quantidade constitutiva de tanase que hidrolisa o ácido tânico em glicose e ácido gálico, o qual pode entrar na célula microbiana e funcionar como um indutor (Lekha e Lonsane, 1997).

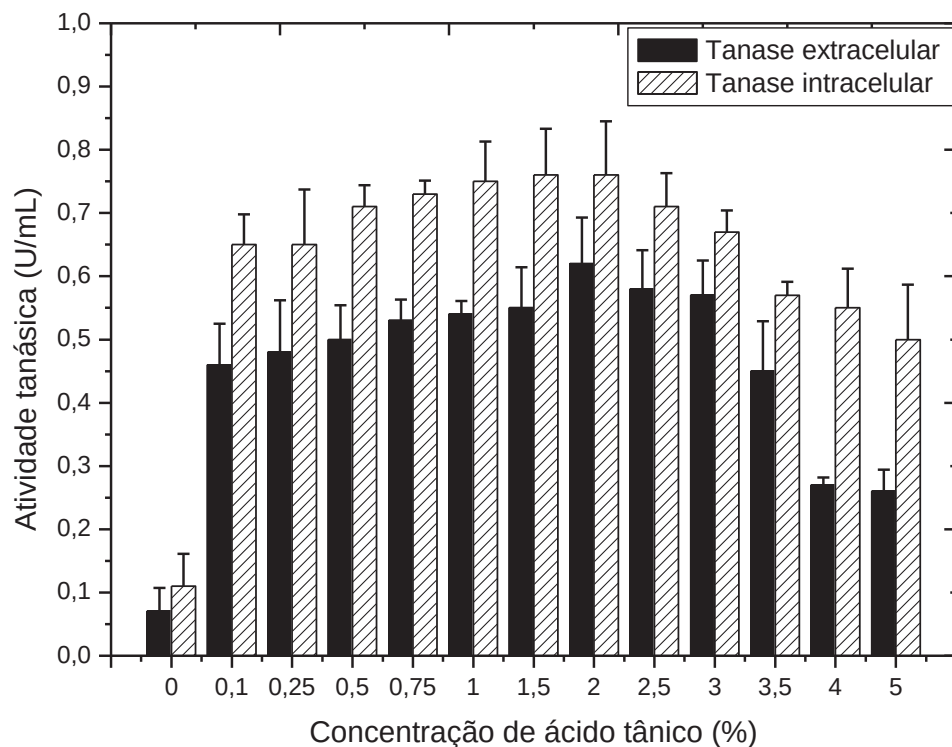


Figura 14. Efeito da concentração de ácido tânico na produção de tanases extracelular e intracelular por *A. phoenicis*. Cultivos realizados em meio Khanna, por 3 dias sob agitação (120 rpm), a 30°C.

Em adição, meios contendo ácido tânico como principal fonte de carbono foram também suplementados com diferentes concentrações de ácido gálico e glicose, produtos de hidrólise do próprio ácido tânico. No caso da glicose, até uma concentração de 0,75% (m/v), a produção de ambas as tanases teve um aumento gradativo. No entanto, em concentrações maiores, a produção foi diminuindo, sendo que na presença de 5% (m/v) a produção da forma extracelular foi equivalente a obtida na ausência de glicose e a da intracelular cerca de 15% menor. Já com adição de 1% de ácido gálico, a tanase extracelular teve sua produção aumentada cerca de 51% e a produção da forma intracelular foi diminuindo gradativamente chegando a uma redução de 57% se comparado ao controle (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito da suplementação do meio de cultivo com diferentes concentrações de glicose e ácido tânico na produção de tanases por *Aspergillus phoenicis* em FSbm.

Concentração (%)	Atividade tánasica relativa (%)			
	Acido gálico		Glicose	
	Extracelular	Intracelular	Extracelular	Intracelular
0	100	100	100	100
0,1	121 ± 26,16	87 ± 18,38	101 ± 7,80	115 ± 14,10
0,25	128 ± 24,75	83 ± 28,28	106 ± 4,20	117 ± 17,00
0,5	130 ± 20,51	80 ± 24,75	110 ± 12,00	121 ± 7,10
0,75	131 ± 8,49	79 ± 18,38	145 ± 24,00	145 ± 15,60
1,0	151 ± 19,09	70 ± 12,73	141 ± 24,00	109 ± 13,40
2,0	133 ± 11,31	67 ± 14,14	113 ± 12,00	105 ± 7,80
5,0	18 ± 15,56	43 ± 2,83	103 ± 0,70	85 ± 11,30

Cultivo realizado em meio de Khanna tendo ácido tânico 2% (m/v) como fonte de carbono, por 3 dias sob agitação (120 rpm), a 30°C.

No passado, acreditava-se que apenas o ácido tânico fosse capaz de induzir a produção de tanases em microrganismos. No entanto, em 1997, Bradoo demonstrou que a tanase poderia ser expressa inclusive na ausência deste, ou também na presença de outros substratos como monossacarídeos, dissacarídeos, polissacarídeos, peptona ou caseína.

Bajpai e Patil (1997) demonstraram que outros compostos como metil galato, ácido gálico e pirogalo também podem induzir a tanase, além do ácido tânico. Estes autores sugerem que a tanase não deve ser controlada por retroalimentação negativa, porque o ácido gálico, que é um produto final, também pode induzir a produção da enzima. Já Bradoo *et al.* (1997) observaram que a adição de ácido gálico em meios líquidos contendo ácido tânico promovia total inibição na síntese de tanase em *A. japonicus*. Também não foi observada a produção da enzima por *A. niger* em fermentação submersa, quando o ácido gálico foi utilizado como única fonte de carbono (Aguilar *et al.*, 2001). Ambos os artigos sugerem que o ácido gálico está envolvido em algum mecanismo de regulação da atividade enzimática pelo produto final, pois atua como repressor de síntese. Esse fato se contrapõe

ao observado por Knudson (1913) para a fermentação submersa, na qual o ácido gálico desempenha papel de indutor (Knudson, 1913 apud Pinto *et al.*, 2005, p. 446). Portanto, o mecanismo de indução ainda não está totalmente elucidado e existem controvérsias a respeito da função de alguns componentes dos taninos hidrolisáveis na síntese das tanases (Belmares *et al.*, 2004). Em relação à adição de glicose no meio de cultura, diferentes autores, incluindo Lekha e Lonsane (1997), têm afirmado que a tanase produzida por espécies de *Aspergillus* seria livre de repressão catabólica. Em discordância aos demais, Pinto (2003) observou a repressão na síntese da enzima por *A. niger* 3T5B8 em meios submerso e sólido, com a adição de glicose.

No caso da enzima produzida por *A. phoenicis* em FSbm, uma produção significativa foi observada na presença de ácido tânico e chá verde. Porém, outras fontes de carbonos podem ser adicionados ao meio favorecendo sua produção. No caso dos meios de cultura suplementados com ácido gálico pode-se inferir, para a forma extracelular, que em determinadas concentrações ocorra uma retroalimentação positiva, uma vez que o produto é capaz de estimular a produção tanásica. Porém, em concentrações mais elevadas (5%), foi observada uma inibição pelo produto final da síntese de ambas as formas enzimáticas. De acordo com os resultados obtidos da suplementação por glicose pode-se inferir que a tanase de *A. phoenicis* é uma enzima livre de repressão catabólica em baixas concentrações deste sacarídeo.

4.1.1.7 Efeito de diferentes fontes de nitrogênio e fosfato na produção tanásica em FSbm

O nitrogênio, constituinte de proteínas e ácidos nucleicos, é obtido por várias espécies de fungos a partir de uma grande variedade de compostos nitrogenados, por isso o meio de cultura também deve conter uma fonte de nitrogênio, que pode ser tanto orgânica quanto inorgânica. Nitrogênio inorgânico pode ser suplementado como sais de amônio (sulfato, carbonato, cloreto, nitrato, fosfato monoidratado) ou sais de nitrato (sódio,

potássio ou amônio). Para as fontes orgânicas, podem ser utilizados peptona, glutamato monossódico, ácido glutâmico e caseína hidrolizada, entre outros (Belmares *et al.*, 2004).

Na figura 15 podemos observar a influência das diferentes fontes de nitrogênio adicionadas ao meio de cultura, em diferentes concentrações (0% a 5% - m/v) na produção de tanases. A fonte de nitrogênio orgânica peptona na concentração de 0,75% (m/v) foi mais favorável para a obtenção de tanases extracelulares aumentando a produção em 169% comparada ao controle, enquanto que o sulfato de amônio (0,1%; m/v) foi a melhor fonte para a produção de tanases intracelulares, sendo esta 45% maior se comparada ao controle. Já a presença de fontes de nitrogênio em concentrações mais elevadas levou a uma diminuição gradativa da produção de tanases em todos os casos (Figura 15). Estes resultados estão de acordo com o apresentado por Aguilar *et al.* (2007), onde fontes de nitrogênio como sulfato ferroso de amônio, sulfato de amônio, nitrato de amônio e cloreto de amônio, aumentam a atividade tanásica em baixas concentrações, como 0,1% (m/v).

As fontes de nitrogênio comumente usadas em meio definido para produção de tanase são nitrato de sódio, cloreto de amônio, fosfato de amônio di-hidrogênio, oxalato de amônio, sulfato de amônio, glutamato monossódico e ácido glutâmico (Yamada *et al.*, 1968; Lekha e Lonsane, 1997).

Selwal *et al.* (2010) testaram várias fontes de nitrogênio inorgânicas para a produção de tanase por *Pseudomonas aeruginosa*, como nitrato de sódio, cloreto de amônio, nitrato de amônio e sulfato de amônio, sendo que o maior rendimento foi observado com nitrato de amônio.

Kumar *et al.* (2007) sugeriram que a produção da tanase é altamente afetada pela natureza da fonte de nitrogênio utilizada, por exemplo, fontes de nitrogênio orgânicas podem reagir com o ácido tânico, formando um precipitado complexo, que pode impedir o consumo fúngico de fontes de carbono e nitrogênio e, por isso, afetar grandemente o crescimento de fungos, já fontes inorgânicas podem ser tóxicas e inibir o crescimento de fungos.

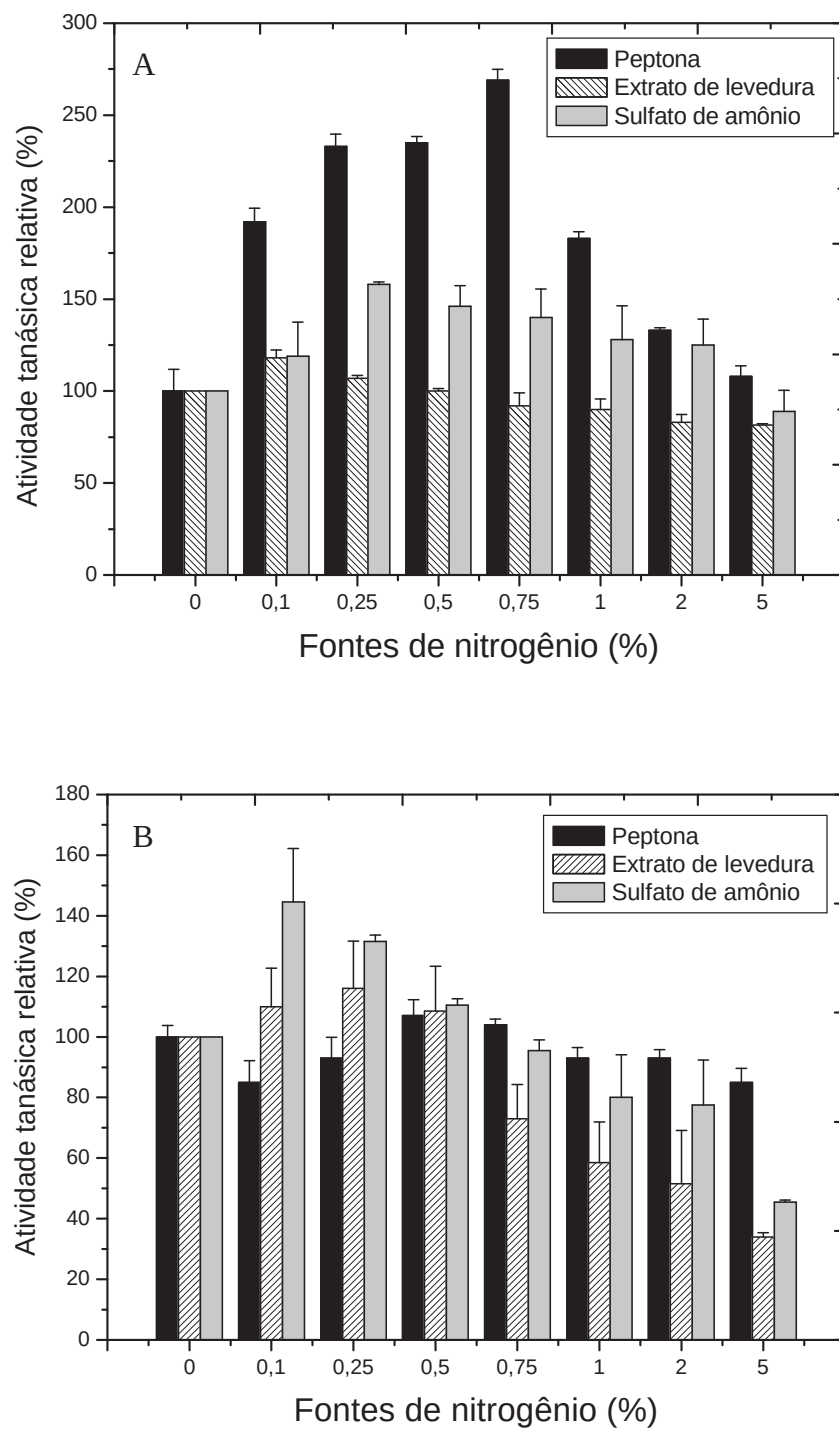


Figura 15. Produção de tanases extracelular (A) e intracelular (B) por *A. phoenicis* em função da concentração de diferentes fontes de nitrogênio. A cultura foi realizada em meio Khanna tendo ácido tânico 2% (m/v) como fonte de carbono, por 3 dias sob agitação (120 rpm) a 30°C.

Na figura 16 estão ilustrados os resultados obtidos para a influência da adição de diferentes fontes de fosfato adicionados ao meio de cultura sobre a produção tanásica. Pode-se observar, para a forma extracelular, que após 0,1%, a adição de concentrações crescentes de fosfato de potássio diminuiu gradativamente a secreção da enzima, tornando-a inferior ao meio sem adição de fosfato e chegando a inibi-la em 74% na concentração de 5% (m/v) em comparação ao controle. A adição de fosfato de potássio em baixas concentrações favoreceu a forma intracelular, sendo que o maior nível de atividade enzimática, cerca de 24% maior que o controle, foi obtido quando utilizada a concentração de 0,1% (m/v). Já com a adição de fosfato de sódio a produção de ambas as formas enzimáticas foi maior mediante utilização de baixas concentrações, obtendo-se os maiores níveis enzimáticos em 0,5% (m/v) e 0,1% (m/v), respectivamente, para as tanases extracelular e intracelular. Contudo, em altas concentrações (2% e 5%) a secreção enzimática foi reduzida.

Do ponto de vista industrial, a utilização da forma extracelular é mais vantajosa e, considerando este aspecto, foram escolhidas as condições que melhor favoreceram a obtenção desta forma enzimática. Sendo assim, a peptona 0,75% foi selecionada como fonte adicinal de nitrogênio para os demais experimentos. No entanto, nenhuma das fonte de fosfato foi adicionada, pois, proporcionaram, apenas, o aumento de algumas unidades de atividade.

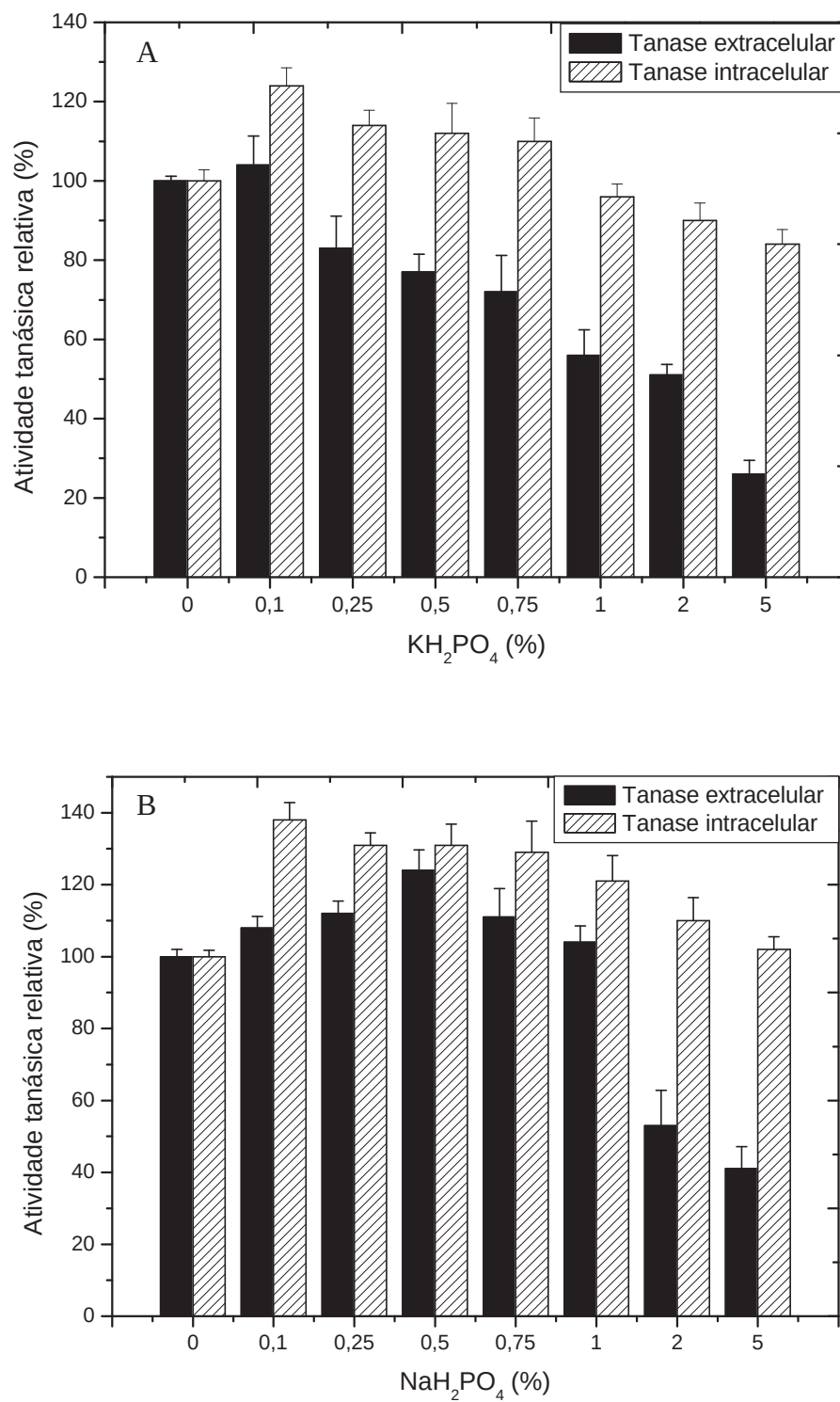


Figura 16. Produção de tanases extracelular e intracelular por *A. phoenicis* em função de diferentes concentrações de KH_2PO_4 (A) e de NaH_2PO_4 (B). A cultura foi realizada em meio Khanna tendo ácido tânico 2% (m/v) como fonte de carbono, por 3 dias sob agitação (120 rpm) a 30°C.

4.1.1.8 Indução da biomassa com glicose para a produção de tanases por *A. phoenicis*

Na figura 17 é possível observar que nos meios contendo ácido tânico e ácido gálico ocorreu uma maior produção e secreção da enzima logo no primeiro dia de cultivo, sendo que nos próximos dias a enzima continuou sendo produzida, porém o fungo deixou de secretá-la. Com isso, a forma extracelular teve sua maior produção em 24h com ácido tânico (0,95 U/mL), seguida por ácido gálico (0,78 U/mL), sendo ambas aproximadamente 2 vezes maiores que a produção obtida em 96h, e aproximadamente 4 e 3 vezes maiores que o controle com glicose relativo ao período de 24h, respectivamente.

Já a forma intracelular teve sua produção aumentada com 96h de cultivo, para todas as fontes de carbono utilizadas, sendo que o ácido tânico e ácido gálico também foram melhores para a produção desta enzima, apresentando valores 6 e 11 vezes maiores que o controle com glicose relativo ao mesmo período (Figura 17).

Com esses resultados é possível comprovar que a tanase de *A. phoenicis* é uma enzima induzível, sendo produzidas em quantidades elevadas, apenas na presença de taninos hidrolisáveis, porém níveis basais desta enzima são expressos na presença de glicose como fonte de carbono.

Além disso, a glicose propiciou um aumento da biomassa no início do crescimento e provavelmente, também a produção de níveis basais da tanase, o que levou a uma rápida indução da produção da enzima na presença de outras fontes de carbono.

Desta forma, foi possível a obtenção da tanase extracelular em grandes quantidades e em um menor tempo de cultivo, sendo que nas primeiras 24h a quantidade de tanase secretada pelo fungo foi 1,5 e 1,8 vezes maior do que a quantidade obtida sem a indução com glicose (após 72h de cultivo), respectivamente quando utilizados o ácido tânico e o ácido gálico como fontes de carbono/substratos. Porém, quando utilizado o chá verde a indução da biomassa não foi vantajosa.

Até o momento, nenhum experimento deste tipo, com indução da massa micelial por glicose, foi descrito para produção de tanases. Porém, Costa *et al.* (2008) relataram

para *A. tamarii* que entre as fontes de carbono testadas, um bom crescimento foi obtido com a glicose, amido, xilana e sacarose, mas as maiores produções de tanase foram observadas apenas quando o organismo foi cultivado em ácido gálico, metil galato e ácido tânico, o que condiz com o verificado para *A. phoenicis* com relação ao crescimento da biomassa e à produção enzimática, respectivamente.

Selwal *et al.* (2010) também relaram para tanase de *Pseudomonas aeruginosa* que fontes de carbono adicionais, tais como glicose, frutose e sacarose foram empregados nas concentrações de 0,06-7,0% (m/v) para promover o crescimento inicial de biomassa, pois o ácido tânico é mais difícil de metabolizar do que açúcares simples.

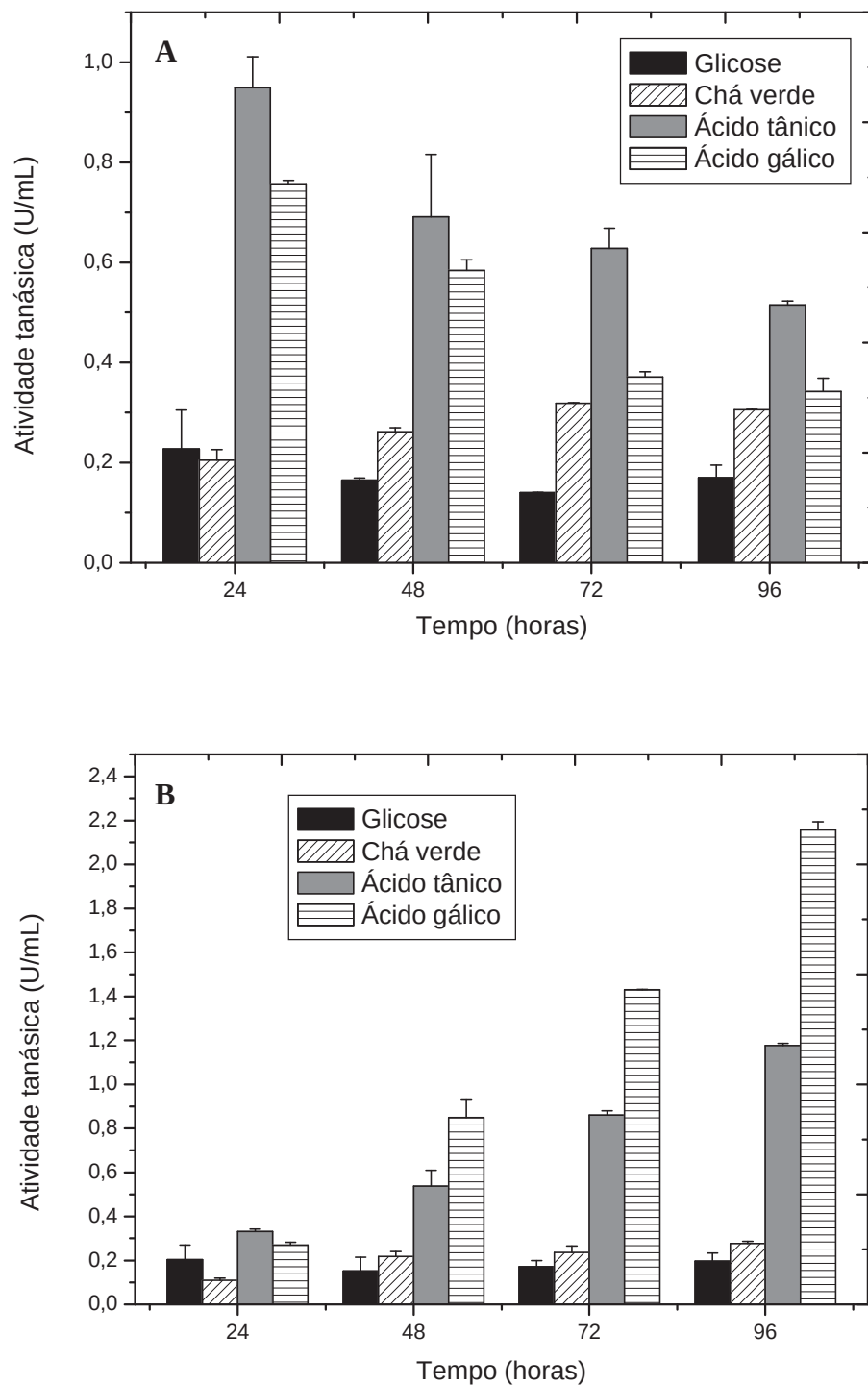


Figura 17. Indução da biomassa com glicose para a produção de tanases extra (A) e intracelular (B) por *A. phoenicis* em FSbm, utilizando como fonte de carbono glicose, chá verde, ácido tânico e ácido gálico. O crescimento se deu em 24h, 48h 72h e 96h.

4.1.2 Produção de tanases em FSS

A FSS tem grande potencial para a obtenção de enzimas e o interesse neste tipo de fermentação é consequência da busca por produtos com menor custo de produção, em especial para aqueles processos onde o extrato bruto possa ser usado. A exploração adequada de produtos da FSS pode significar a redução dos custos de produção da tanase. O uso de resíduos agroindustriais pode ajudar não somente a reduzir a poluição ambiental, mas também agregar valor às indústrias processadoras (Pandey *et al.*, 2000).

4.1.2.1 Influência de diferentes substratos/ fontes de carbono na produção de tanases

A FSS foi testada na tentativa de se encontrar uma melhor condição de cultivo que favorecesse a produção de tanases em grandes quantidades pelo microrganismo, além de considerar o baixo custo e a possibilidade de degradação de resíduos ricos em taninos desprezados no meio ambiente. Para isso, vários substratos sólidos/ fontes de carbono foram utilizados para produção de tanases pelo fungo *A. phoenicis*, sendo inicialmente umedecidos com solução de sais Khanna (1:1, m/v).

Na tabela 6 é mostrada a produção de tanases por *A. phoenicis* em FSS em função do substrato/fonte de carbono utilizado. Dentre os substratos testados o que proporcionou melhores condições para a produção de tanases foi a folha de caju (2,24 U/g) seguida pelas folhas de goiaba (2,04 U/g), de chá verde (1,97 U/g), e de manga (1,41 U/g).

Os resíduos agroindustriais (casca de amendoim, sabugo de milho, bagaço de cana e palha de arroz), assim como os produtos agroindustriais (milho moído, farinha de mandioca, farelo de trigo, farelo de soja, farinha de aveia e farinha de centeio) se mostraram piores indutores da produção de tanases (0,07 U/g a 0,62 U/g) do que as folhas em geral, provavelmente, por não possuírem grande quantidade taninos hidrolisáveis.

Vários trabalhos já mostraram as vantagens da produção enzimática em fermentação em substrato sólido, incluindo-se as tanases (Lekha e Lonsane, 1994; Aguilar *et al.*, 2001). Agro-resíduos e produtos florestais são geralmente considerados os melhores

substratos para este tipo de cultivo (Mukherjee e Banerjee, 2004). Farelos, cascas, bagaços, e outros são materiais considerados viáveis para a biotransformação por fermentação sólida. Estas matérias primas são recursos naturais renováveis e geralmente produzidos em grandes quantidades, muitas vezes tornando-se um problema ecológico e sanitário (Pinto, 2003). A sua estrutura macromolecular podendo ser composta de celulose, amido, pectina, lignina, hemicelulose, proteínas, taninos, entre outros, os caracteriza como materiais extremamente heterogêneos, que servem tanto como fonte de carbono e energia como suporte para o crescimento microbiano (Pandey *et al.*, 2000).

Alguns substratos já descritos para FSS para a produção de tanase incluem pó de semente de tamarindo, torta do cerne de palmeira, farelo de trigo e casca de café (Sabu *et al.*, 2005 e Sabu *et al.*, 2006), folhas de jambolão (Kumar *et al.* 2007), bagaço de caju (Rodrigues *et al.*, 2008), bagaço de cana (Lekha e Lonsane, 1994), casca de café e farelo de arroz (Battestin e Macedo, 2007) e folhas de *Phyllanthus emblica* (amla), *Acacia nilotica* (keekar), *Eugenia cuspidate* (Jamoá) e *Syzygium cumini* (Jamun) (Selwal *et al.*, 2010).

É importante salientar que 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 (Santos, 2000). Além disso, o teor de tanino em vários substratos varia conforme as condições agro-climáticas. As diferenças no conteúdo de taninos pode ser devido às variações das condições ambientais em diferentes partes do país (Hota *et al.*, 2007).

Tabela 6. Produção de tanase por *Aspergillus phoenicis* em FSS em função do substrato.

Substrato	Atividade tanásica (U/g de substrato)
Casca de amendoim	0,30 ± 0,20
Milho moído	0,10 ± 0,02
Sabugo de milho	0,11 ± 0,03
Farinha de mandioca	0,09 ± 0,02
Farelo de trigo	0,24 ± 0,08
Farelo de soja	0,02 ± 0,00
Bagaço de cana	0,62 ± 0,27
Palha de arroz	0,12 ± 0,02
Farinha de aveia	0,11 ± 0,02
Farinha de centeio	0,07 ± 0,03
Folha de caju (<i>Anacardium occidentale</i>)	2,24 ± 0,51
Folha de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>)	0,45 ± 0,07
Folha de jabolão (<i>Syzygium jambolanum</i>)	1,15 ± 0,28
Folha de banana (<i>Musa paradisiaca</i>)	0,23 ± 0,07
Folha de milho (<i>Zea mays</i>)	0,33 ± 0,21
Folha de couve (<i>Brassica oleracea</i>)	0,34 ± 0,22
Folha de chá verde (<i>Camellia sinensis</i>)	1,97 ± 0,77
Folha de romã (<i>Punica granatum</i>)	1,18 ± 0,36
Folha de manga (<i>Mangifera indica</i>)	1,41 ± 0,39
Folha de goiaba (<i>Psidium guajava</i>)	2,04 ± 0,37
Folha de caqui (<i>Diospyros kaki</i>)	0,14 ± 0,04
Folha de uva (<i>Vitis vinifera</i>)	0,22 ± 0,02
Folha de abacate (<i>Persea americana</i>)	0,13 ± 0,03
Folha de guaco (<i>Mikania glomerata</i>)	0,12 ± 0,04
Folha de seriguela (<i>Spondias purpurea</i>)	0,11 ± 0,03
Folha de cacau (<i>Theobroma cacao</i>)	0,25 ± 0,07
Folha de jaca (<i>Artocarpus interglifoliam</i>)	0,27 ± 0,04
Folha de abil (<i>Lucuma caimito</i>)	0,24 ± 0,09
Folha de pitanga (<i>Eugenia uniflora</i>)	0,42 ± 0,02
Folha de café (<i>Coffea arábica</i>)	0,47 ± 0,18
Folha de mate (<i>Ilex paraguariensis</i>)	0,26 ± 0,01
Folha de eucalipto (<i>Eucaliptus</i> spp)	0,38 ± 0,13

Substrato umidificado com solução de sais Khanna (1:1, m/v), sendo o cultivo realizado por 4 dias a 30°C em atmosfera com 60% de umidade.

Em adição, os melhores substratos/ fontes de carbono foram misturados na proporção 1:1 (m/m) e umidificados com solução de sais Khanna (1:1, m/v). Quando utilizada a mistura de folhas de caju com folhas de chá verde foram obtidos os maiores níveis enzimáticos (3,65 U/g), sendo melhor do que as demais misturas e que os substratos individualmente analisados. Desta forma padronizou-se o uso desta mistura de substratos para os demais experimentos (Tabela 7).

Tabela 7. Misturas de substratos utilizadas para a produção de tanase por *A. phoenicis* em FSS.

Substratos (1:1)	Atividade tanásica (U/g de substrato)
Caju / Manga	2,24 ± 0,38
Caju / Chá verde	3,65 ± 0,02
Caju / Goiaba	2,60 ± 0,08
Goiaba / Manga	3,35 ± 0,29
Goiaba / Chá verde	3,23 ± 0,01
Chá verde / Manga	2,83 ± 0,33

Substrato umidificado com solução de sais Khanna (1:1, m/v), sendo o cultivo realizado por 4 dias a 30°C em atmosfera úmida (60%).

4.1.2.2 Efeito de diferentes soluções umectantes adicionadas a FSS na produção de tanases

A solução umectante do meio de cultura na FSS é de importância fundamental para o crescimento do fungo e produção de enzimas.

Alguns sais metálicos, quando adicionados no meio de cultura líquido ou presentes nos substratos sólidos, são capazes de alterar a produção da tanase (Kar *et al.*, 2003). Objetivando aumentar a produção de tanases em FSS com mistura de folhas de caju e chá verde, foram utilizados como meio umectante diferentes soluções de sais, além de água de torneira e água destilada, todos na proporção de 1:1 (m/v).

A maior produção de tanase foi obtida com a solução de sais Khanna (3,28 U/g) apresentando uma diferença significativa de 1,6 até 5,3 vezes maior em relação as outras soluções testadas, e por isso, para os demais experimentos, a solução de sais Khanna continuou sendo utilizada como meio umectante (Tabela 8).

A solução de sais de Khanna é composta por NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , KCl , ZnSO_4 , MnSO_4 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ e CuSO_4 . A produção da tanase foi maior na presença desta solução provavelmente por conter elementos básicos indispensáveis para o metabolismo do fungo, como os macronutrientes: nitrogênio, fósforo e magnésio e os micronutrientes: zinco, ferro, cobre e manganês, contribuindo assim para o crescimento do microrganismo e consequentemente favorecendo a produção enzimática (Said e Pietro, 2002). Tal fato condiz com o descrito por Lippitsch (1961) em relação aos micronutrientes, o qual observou que íons de ferro, zinco e cobre são essenciais para a produção da tanase por *A. niger* (Lippitsch, 1961 apud Pinto *et al.*, 2005, p. 443).

Também, Van de Lagemaat e Pyle (2006) relataram que a maioria dos sais e traços de elementos encontrados em meios de cultura definidos para a produção da tanase foram Na_2HPO_4 , KCl , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , FeSO_4 , AlCl_3 (Van de Lagemaat e Pyle, 2006 apud Belur e Mugeraya, 2011, p. 33).

Tabela 8. Efeito de diferentes soluções umectantes adicionadas à FSS sobre a produção de tanases por *Aspergillus phoenicis*, tendo folhas de caju e chá verde como substrato.

Solução de sais (1:1, m/v)	Atividade tanásica (U/g de substrato)
Vogel	$0,62 \pm 0,09$
SR	$2,00 \pm 0,16$
Khanna	$3,28 \pm 0,05$
Água de torneira	$1,29 \pm 0,03$
Água destilada	$0,76 \pm 0,12$
Traços de elementos	$1,02 \pm 0,04$
Sais de nitrato	$1,65 \pm 0,07$

O cultivo foi realizado por 4 dias a 30°C com umidade relativa ao redor de 60%.

Depois que a solução de sais Khanna foi escolhida como umidificante para a FSS utilizando como substrato/fonte de carbono a mistura de folhas de caju e chá verde, foi verificado a proporção que favorecia a melhor produção de tanases por *A. phoenicis*. Foram testadas as proporções de 1:0,5, 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4 (m/v). Considerando as proporções 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4 (m/v), a produção obtida foi muito semelhante, não havendo diferenças significativas entre as mesmas, e por isso, a proporção 1:1 (m/v) foi a escolhida (Tabela 9).

A umidificação do substrato/fonte de carbono é fundamental para a produção enzimática pelo fungo. Em casos onde o meio está sem umidificante, além da produção ser reduzida, a exteriorização da enzima pelo fungo pode ser dificultada, tornando praticamente impossível sua obtenção. No entanto, se existe quantidade excedente do umidificante, isso pode dificultar a aderência do fungo ao substrato, e este por falta de acesso a sua fonte de nutrientes não poderá produzir a enzima para degradá-lo (Said e Pietro, 2002).

Tabela 9. Efeito da umidificação com solução de sais Khanna em diferentes proporções adicionadas à FSS com mistura de folhas de caju e chá verde sobre a produção de tanase por *A. phoenicis*.

Solução de sais Khanna (m/v)	Atividade tanásica (U/g de substrato)
1:0,5	1,012 ± 0,05
1:1	3,476 ± 0,13
1:2	3,564 ± 0,04
1:3	3,352 ± 0,17
1:4	3,392 ± 0,09

O cultivo foi realizado por 4 dias, a 30°C e com umidade relativa ao redor de 60%.

4.1.2.3 Produção de tanases em FSS em função do tempo de cultivo

Para verificar qual o melhor tempo de cultivo para a produção de quantidades máximas de tanases, meios contendo a mistura (1:1; m/m) de folhas de caju e chá verde como substrato/fonte de carbono foram utilizados. Neste caso, a produção ótima da enzima

(4,43 U/g) foi obtida no sexto dia de cultivo como mostrado na figura 18. Em tempos superiores, a produção foi diminuída, o que pode ser explicado pelo aumento de fontes de carbono prontamente assimiláveis, como a glicose obtida da hidrólise dos taninos, bem como o aumento de proteases que degradariam a tanase.

Treviño-Cueto *et al.* (2007) descreveram que o tempo de produção máxima de tanase por *Aspergillus niger* Aa-20 em FSS utilizando folhas de *Larrea tridentata* foi de apenas 43,5 horas enquanto que para a tanase intracelular produzida por *Aspergillus niger* MTCC 2425, foi de 4 dias (Rana e Bhat, 2005). Ambas enzimas descritas requerem menor tempo para a produção de tanase se comparada a utilização de folhas de caju e chá verde feita neste estudo. Tal fato pode estar relacionado a menor disponibilidade de taninos hidrolisáveis, ou ainda, por conterem outros compostos que precisariam ser degradados por inúmeras outras enzimas antes que a tanase pudesse agir sobre os taninos.

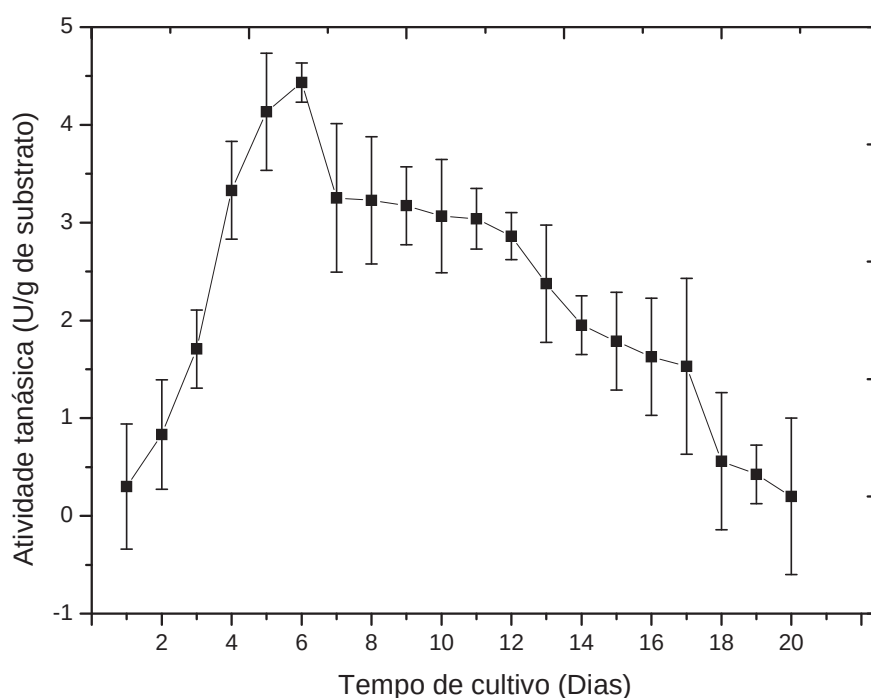


Figura 18. Produção de tanase extracelular pelo fungo *A. phoenicis* em função do tempo de cultivo em FSS com a mistura de folhas de caju e chá verde umidificado com solução de sais Khanna (1:1, m/v), sendo o cultivo realizado a 30°C em atmosfera com umidade relativa de 60%.

4.2 Purificação das tanases intra e extracelulares

4.2.1 Purificação das tanases intracelular e extracelular

Na figura 19A podemos observar o perfil cromatográfico em DEAE-Celulose para o extrato bruto intracelular previamente tratado com caulim como descrito em material e métodos. A tanase intracelular foi eluída como única forma com 0,29 M de NaCl através de um gradiente linear (0 - 1,5 M) em tampão acetato de sódio 100mM pH 5,0. As frações que apresentaram atividade foram reunidas em um único *pool*, o qual foi dialisado contra água destilada, liofilizado e posteriormente ressuspensão em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,5 adicionado de KCl 100mM. A amostra foi então aplicada em coluna de filtração Sepharose CL6B, sendo eluída como única forma com o mesmo tampão (Figura 19B). Através deste procedimento, a enzima intracelular foi purificada 17 vezes com recuperação de 16% (Tabela 10). O perfil eletroforético em condições não desnaturantes (PAGE 6%) para a tanase intracelular purificada pode ser observado, com o aparecimento de uma única banda protéica e de atividade, as quais tiveram a mesma mobilidade relativa (Figura 20). Em condições desnaturantes (SDS-PAGE 6%) pode-se observar 2 bandas protéicas coradas por Coomassie Brilliant Blue R-250 (Figura 20C).

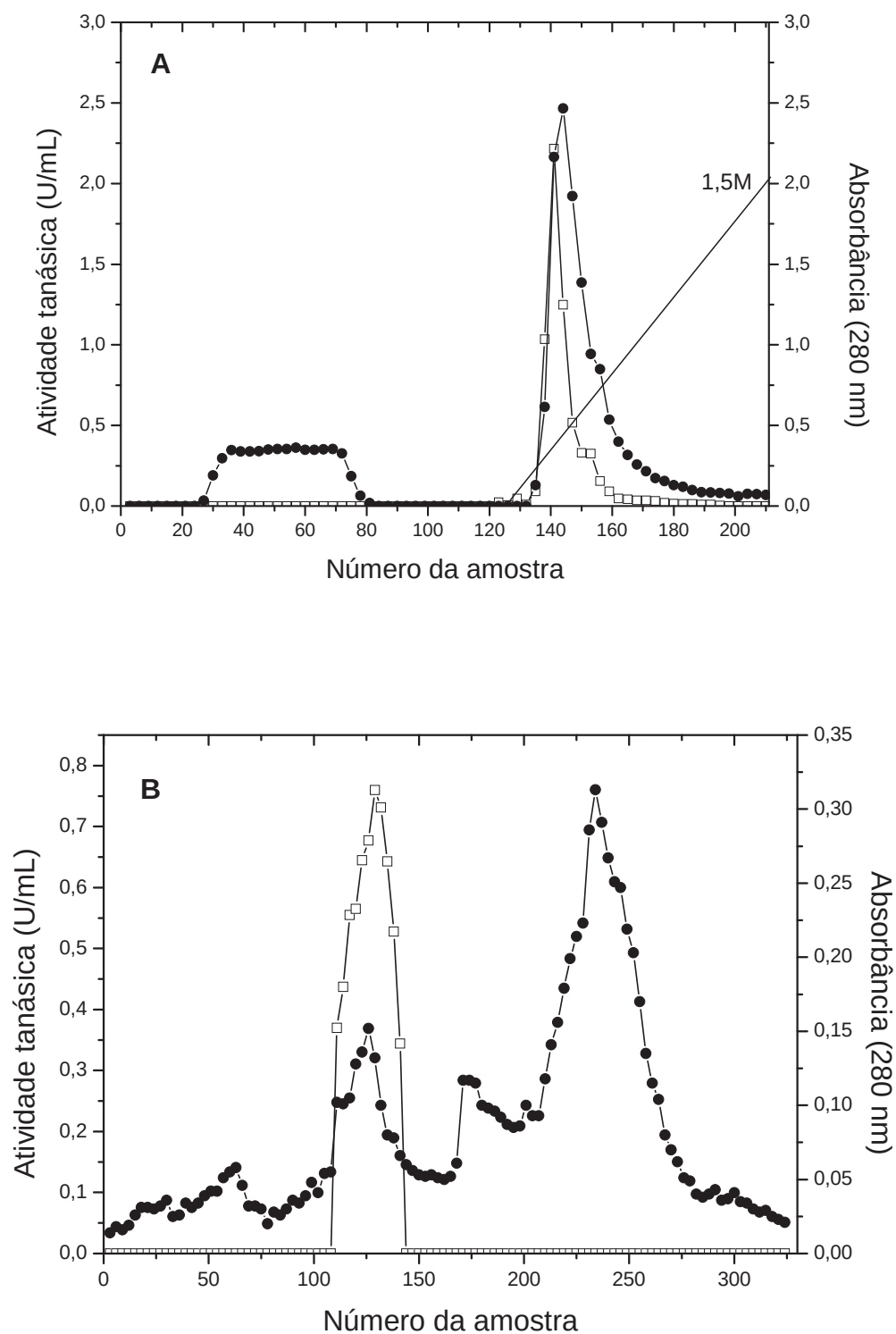


Figura 19. Perfis cromatográficos em colunas DEAE-Celulose (A) e Sepharose CL6B (B) para a tanase intracelular produzida por *A. phoenicis* em FSbm. Símbolos: (●) Absorbância 280 nm, (□) Atividade tanásica.

Tabela 10. Purificação da tanase intracelular produzida por *Aspergillus phoenicis* em FSbm.

Passo	Volume (mL)	Proteína (mg totais)	Atividade (U totais)	Atividade específica (U/mg)	Purificação (vezes)	Recuperação (%)
Extrato bruto	90	31,5	38,7	1,2	1,0	100,0
Caulim	80	21,1	55,2	2,6	2,2	142,6
DEAE - Celulose	13	2,4	18,9	7,9	6,6	48,8
Sepharose CL6B	20	0,3	6,4	21,3	17,8	16,5

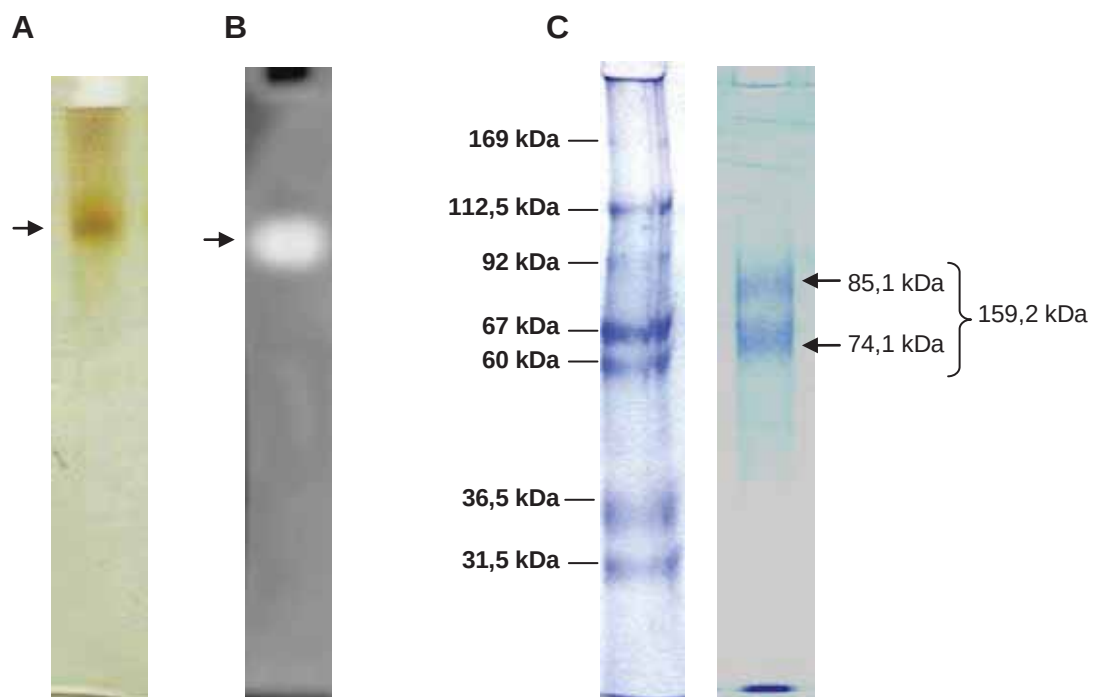


Figura 20. Perfil eletroforético da tanase intracelular em PAGE 6% revelado por prata (A), para a atividade tanásica (B) e em SDS-PAGE 6% corado por Coomassie Brilliant Blue R-250 (C).

O extrato extracelular obtido em FSbm foi submetido ao mesmo procedimento utilizado para a enzima intracelular como descrito anteriormente, sendo a enzima eluída, em DEAE-Celulose como única forma com 0,85 M de NaCl aplicado através de um gradiente linear (0-1,5 M) em tampão acetato de sódio 100mM pH 5,0 (Figura 21A). As frações que apresentaram atividade foram reunidas em um único *pool*, o qual foi dialisado contra água destilada, liofilizado, ressuspenso em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,5 adicionado de KCl 100mM e posteriormente aplicado em coluna de filtração Sepharose CL6B (Figura 21B). A tanase extracelular foi purificada 22 vezes com recuperação de 9% (Tabela 11). O processo de purificação foi acompanhado por eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE 6%) sendo observada uma única banda protéica revelada por prata (Figura 22A) e uma única banda de atividade (Figura 22B) as quais tiveram a mesma mobilidade relativa. Em condições desnaturantes (SDS-PAGE 6%) pode-se observar 2 bandas protéicas reveladas por prata (Figura 22C). A purificação da tanase extracelular foi mais eficiente, porém, apresentou menor rendimento quando comparada a intracelular.

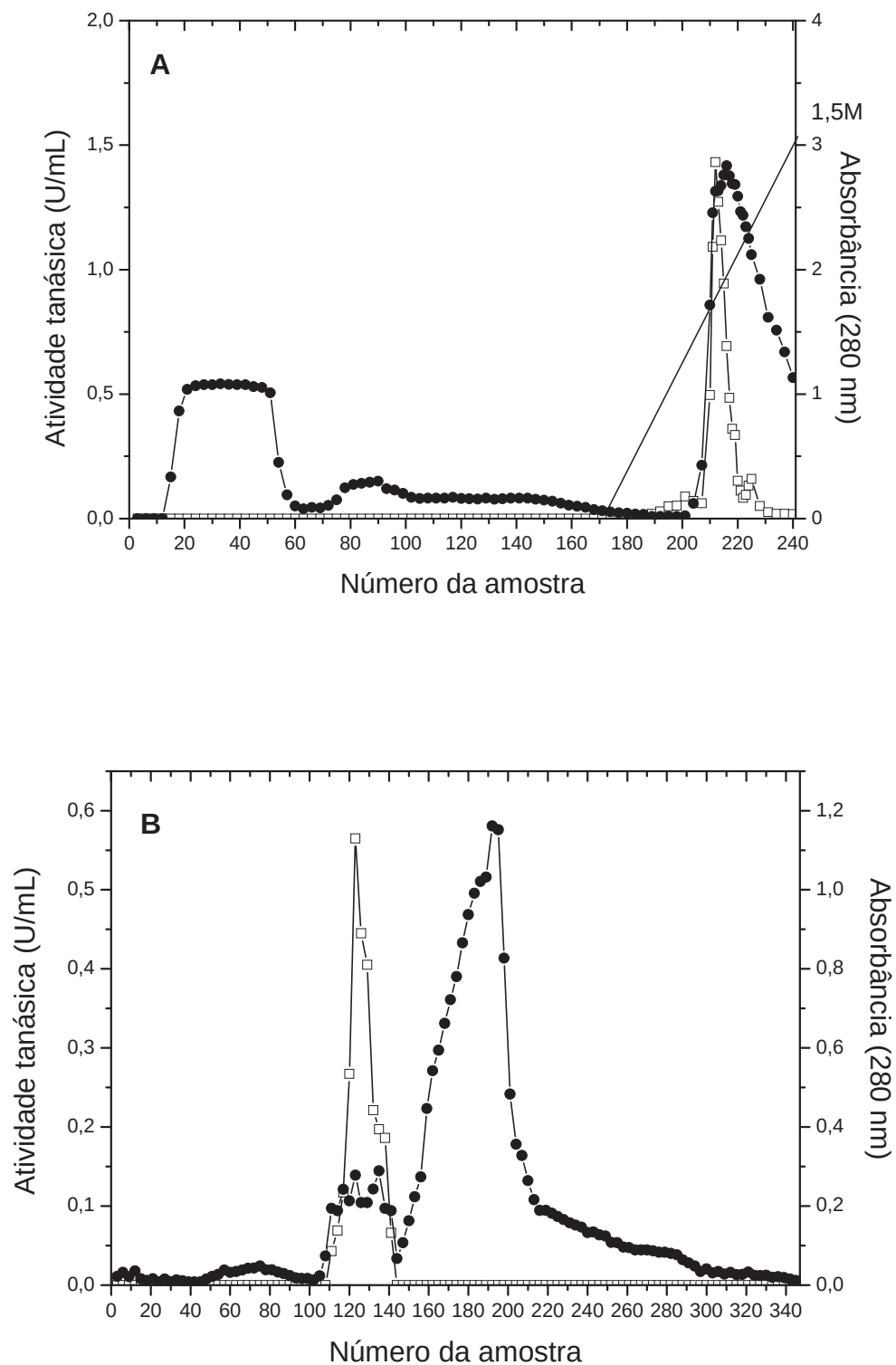


Figura 21. Perfis cromatográficos em colunas DEAE-Celulose (A) e Sepharose CL6B (B) para a tanase extracelular produzida por *A. phoenicis* em FSbm. Símbolos: (●) Absorbância 280 nm, (□) Atividade tanásica.

Tabela 11. Purificação da tanase extracelular produzida por *Aspergillus phoenicis* em FSbm.

Passo	Volume (mL)	Proteína Total (mg totais)	Atividade total (U totais)	Atividade específica (U/mg)	Purificação (vezes)	Recuperação (%)
Extrato bruto	180	197,8	72,2	0,4	1,0	100,0
Caulim	176	136,0	60,4	0,4	1,0	83,7
DEAE-Celulose	32	8,6	25,9	3,0	7,5	35,9
Sephacryl S200	25	0,8	7,0	8,8	22,0	9,7

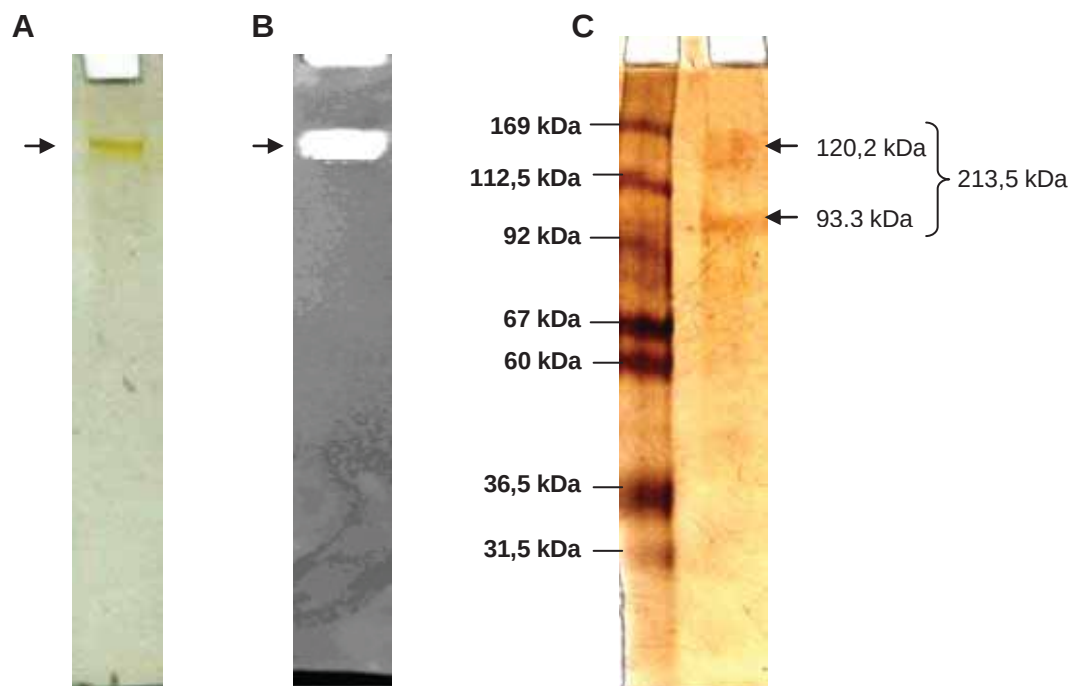


Figura 22. Perfil eletroforético da tanase extracelular em PAGE 6% revelado por prata (A), para a atividade tanásica (B) e em SDS-PAGE 6%, corado por prata (C).

4.3 Caracterização bioquímica das tanases intra e extracelulares

4.3.1 Determinação da massa molar nativa e conteúdo de carboidratos

A massa molar nativa da tanase extracelular produzida em FSbm por *A. phoenicis* foi de 218,8 kDa determinada por coluna de filtração Sepharose CL6B com conteúdo de carboidratos de aproximadamente 65,1%. Já a forma intracelular produzida em FSbm apresenta massa molar nativa, determinada na mesma coluna, de 154,9 kDa com 43,2% de carboidratos. A natureza multimérica das tanases produzidas por *A. phoenicis* foi confirmada por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE 6%) que resultou em dois polipeptídios de tamanhos diferentes, sendo um com 120,2 kDa e outro com 93,3 kDa para a tanase extracelular e um com 85,1 kDa e outro com 74,1 kDa, para a tanase intracelular, cuja soma é 213,5 kDa e 159,2 kDa, respectivamente, valores estes muito próximos ao das massas molares das proteínas nativas obtidas, tratando-se, provavelmente, de proteínas heterodiméricas (Tabela 12).

As tanases produzidas por fungos filamentosos e leveduras são, na maioria, estruturas protéicas com elevada massa molar, podendo ser superiores a 300 kDa (Pinto *et al.*, 2005), sendo que algumas tanases podem ser multiméricas (Aguilar e Gutiérrez-Sánchez, 2001; Ramirez-Coronel *et al.*, 2003). Alguns autores sugerem que enzima nativa seja constituída de duas subunidades idênticas de mesma massa molar (Aoki *et al.*, 1976; Rajkumar e Nandy, 1983). Costa *et al.* (2007) descreveram tanases produzidas pelo fungo *Aspergillus tamarii* com massa molar nativa de 180 kDa, sendo composta por 2 subunidades de 90 kDa, contendo 40,5% de carboidratos. Contudo, Bhardwaj *et al.* (2003), observaram duas cadeias polipeptídicas de massas molares distintas para a enzima produzida por *A. niger* MTCC2425 (102 kDa e 83 kDa). Também, a tanase de *A. oryzae*, expressa em *Pichia pastoris*, é formada por um par de subunidades distintas (31 kDa e 34 kDa) e massa molar total de 100 kDa (Zhong *et al.*, 2004). De acordo com Hatamoto *et al.* (1996), a tanase de *A. oryzae* é formada por dois tipos de subunidades uma de 30 kDa e outra de 33 kDa. No entanto, a tanase nativa é um heterooctâmero com massa molar de 300 kDa, constituída por 4 pares dessas subunidades. Já a massa molar estimada para

tanase de *Cryphonectria parasitica* foi de 240 kDa, sendo a molécula um tetrâmero composto por quatro subunidades, com uma massa molar de 58 kDa (Farias *et al.*, 1994).

A glicosilação em tanases é bastante comum, sendo que todas as tanases fúngicas são caracterizadas como glicoproteínas, com o conteúdo de carboidratos variando de 25,4 a 66,2% do peso total da enzima (Pinto *et al.*, 2005). O conteúdo de carboidratos da enzima produzida por *Aspergillus niger* foi de 43% (Barthomeuf *et al.*, 1994), enquanto que para a enzima de *Penicillium crysogenum* foi de 68,1% (Rajkumar e Nandy, 1983). O significado para um conteúdo tão alto de carboidratos ainda não foi elucidado, no entanto, é conhecido que os taninos se associam fortemente a proteínas e isso conduz a precipitação deste complexo. As tanases fúngicas, além de conseguirem escapar do efeito inibitório desses taninos hidrolisáveis, ainda clivam tais taninos em produtos inertes, glicose e ácido gálico, e isto sugere que a glicosilação proteja a cadeia polipeptídica, tornando-a menos acessível aos efeitos de precipitação dos taninos e ainda direcione o substrato ao centro ativo da enzima para possibilitar a quebra desse em seus respectivos componentes, glicose e ácido gálico (Lekha e Lonsane, 1997).

Tabela 12. Determinação do conteúdo de carboidratos e da massa molar das tanases intra e extracelulares purificadas, produzidas por *A. phoenicis*.

Tanase	Conteúdo de carboidratos (%)	M.M. (filtração)	M.M. (SDS-PAGE)
Extracelular	65,1 ± 3,31	218,8	213,5 (120,2 + 93,3)
Intracelular	43,2 ± 3,57	154,9	159,2 (85,1 + 74,1)

4.3.2 Influência da temperatura e do pH sobre a atividade tanásica

A temperatura e o pH ótimos aparentes de atividade foram testados para todos os extratos brutos e também para as enzimas intra e extra purificadas.

No caso dos extratos brutos, para todas as formas enzimáticas foram obtidas duas temperaturas ótimas aparentes de atividade, sendo de 40°C e 60°C para a enzima extracelular da FSbm, de 40°C e 65°C para a enzima intracelular (Figura 23A) e de 45°C e 65°C para a tanase extracelular da FSS (Figura 23C).

O fato de todas as formas apresentarem duas temperaturas ótimas sugere uma possível existência de duas isoformas enzimáticas, uma atuando melhor em baixa temperatura (por volta de 40°C) e uma outra em temperatura mais elevada (por volta de 60°C). Porém, para confirmar essa hipótese foram realizados experimentos com as enzimas intra e extracelulares purificadas resultando em uma única temperatura ótima de atividade, que foi 60°C para ambas as formas, o que sugere que apenas uma das isoformas tenha sido purificada enquanto que a outra foi perdida durante os processos de purificação (Figura 24).

Enzimas capazes de atuar em elevadas temperaturas são preferidas para aplicações industriais como, por exemplo, as tanases de *A. phoenicis*. Porém, aumento de temperatura para além do valor ideal causou uma diminuição na velocidade catalítica das tanases.

Quando a temperatura aumenta resulta em uma maior energia cinética das moléculas e, portanto, maior número de choques entre a tanase e o seu substrato, o ácido tânico resultando em uma maior atividade. Porém, além do nível ótimo de temperatura, a energia das moléculas aumenta ainda mais e quando a energia química potencial aumenta muito, algumas das ligações fracas que determinam a forma tridimensional das proteínas ativas quebram levando a desnaturação térmica da enzima causando sua inativação. Temperaturas acima do valor ótimo também afetam o estado de ionização da proteína e a solubilidade das espécies em solução, o que resulta em uma menor atividade da enzima (Lehninger *et al.*, 2006, Mukherjee e Banerjee, 2006).

O pH ótimo de atividade ficou estabelecido na faixa de 5,0 a 6,0 para ambas as enzimas extra e intracelular (Figura 23), sendo que não houve alteração do pH ótimo para as enzimas purificadas (dados não mostrados).

As enzimas foram ativas em pH ácidos e a atividade diminuiu quando o pH aproximou-se da faixa alcalina. Qualquer alteração no pH afeta a estrutura da proteína e um declínio na atividade da enzima além do pH ótimo pode ser devido a inativação enzimática ou a sua instabilidade. Poderia ser inferido a partir dos resultados que a tanase de *A. phoenicis* precisa de um ambiente ácido para ser ativa, pois, tanases fúngicas, em geral, são proteínas ácidas (Mahapatra *et al.*, 2005). O efeito do pH sobre a atividade da enzima é determinado pela natureza dos aminoácidos no sítio ativo, que sofrem protonação e desprotonação e as mudanças conformacionais induzidas pela ionização dos aminoácidos. As enzimas são muito sensíveis às mudanças no pH e funcionam melhor em um pH ótimo definido (Sabu *et al.*, 2005).

Tais dados estão em acordo com o observado para outras tanases já descritas com ótimos de temperatura variando entre 50°C e 60°C como as enzimas de *A. niger* PKL104 (Lekha e Lonsane, 1994), *A. flavus* (Yamada *et al.*, 1968), *A. niger* van Tieghem (Sharma *et al.*, 1999) e *Paecilomyces variotii* (Mahendran *et al.*, 2006), e pH entre 5,0 e 6,0 (Aoki *et al.*, 1976; Rajkumar e Nandy, 1983; Lekha e Lonsane, 1994; Pinto, 2003; Batra e Saxena, 2005; Mahapatra *et al.*, 2005; Mahendran *et al.*, 2006 e Costa *et al.*, 2008). Entretanto, outras tanases foram descritas apresentando temperaturas ótimas inferiores tais como 35°C para a enzima de *A. niger* (Barthomeuf *et al.*, 1994) e 30°C para a tanase de *Aspergillus tamaritii* (Costa *et al.*, 2008). E temperaturas ótimas menores que 40°C também foram notificadas para *Aspergillus caespitosus*, *Penicillium charlesii*, *Penicillium crustosum* e *Penicillium restrictum* (Batra and Saxena, 2005), *A. oryzae* (Libuchi *et al.*, 1968 apud Pinto *et al.*, 2005, p. 449) e *P. chrysogenum* (Rajakumar Nandy e 1983).

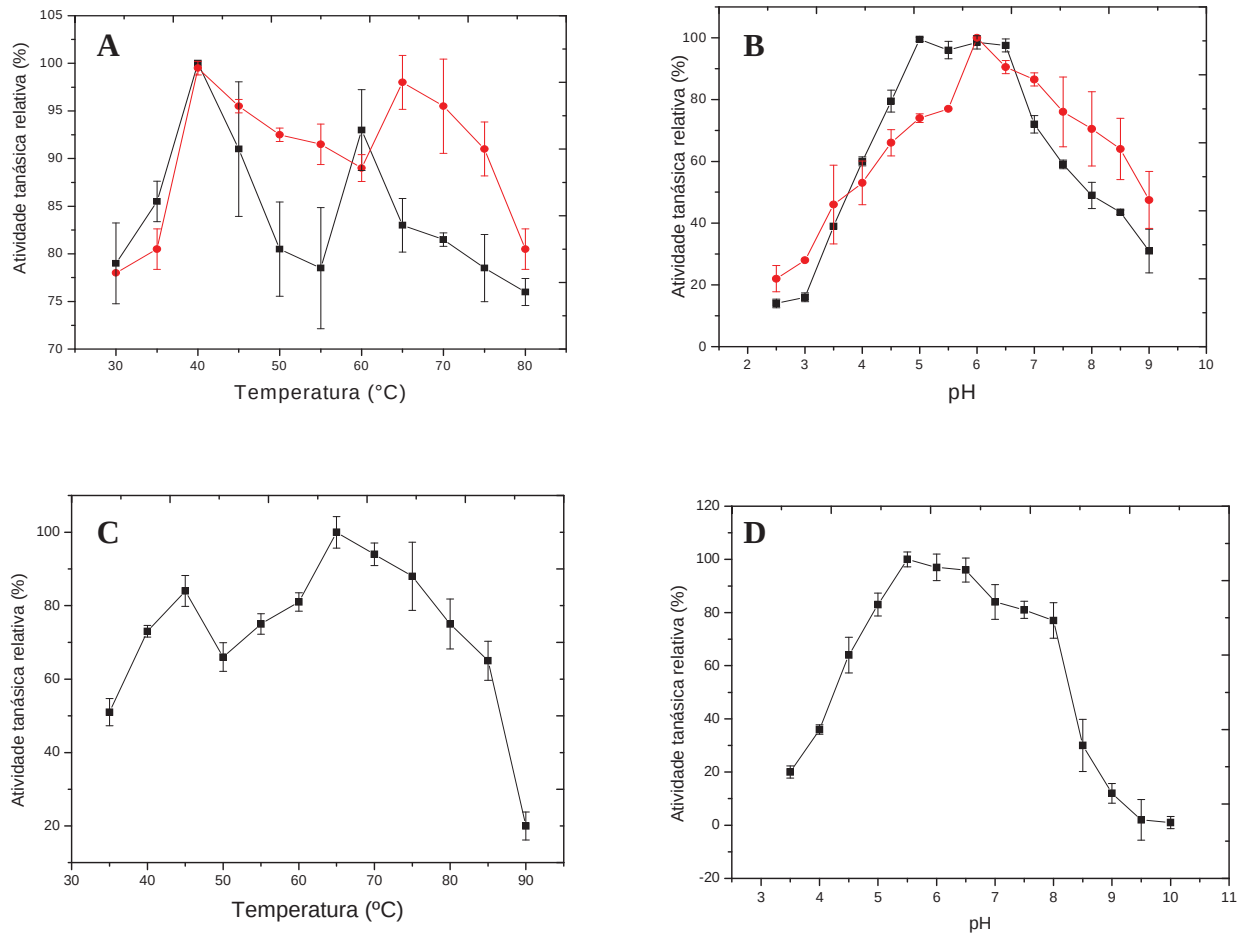


Figura 23. Temperatura ótima aparente (A, C) e pH ótimo aparente (B, D) para as atividades tanásicas dos extratos brutos extracelular (■) e intracelular (●), produzidos em FSbm (A e B) e em FSS (C e D).

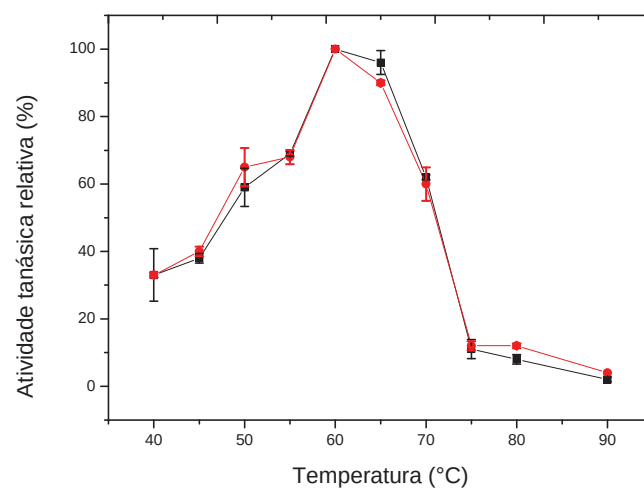


Figura 24. Temperatura ótima aparente para atividade das tanases extracelular (■) e intracelular (●) purificadas, obtidas em FSbm.

As tanases extra e intracelular purificadas, assim como, a tanase extracelular da FSS foram testadas quanto à estabilidade a temperatura e ao pH.

A forma extracelular obtida em meio líquido manteve-se estável por até 1 hora nas temperaturas de 40°C e 50°C, com T_{50} de aproximadamente 20 e 5 minutos nas temperaturas de 60°C e 70°C, respectivamente (Figura 25A). Já a forma intracelular foi estável por até 1 hora em 40°C e 50°C, com T_{50} de aproximadamente 55 e 9 min a 60°C e 70°C, respectivamente (Figura 25C). A tanase extracelular produzida em FSS foi ainda mais estável que as demais, mantendo sua atividade constante por até 1 hora de 40°C a 60°C, com T_{50} de aproximadamente 23 min a 70°C (Figura 25E).

Adicionalmente as tanases produzidas por *A. phoenicis* foram mais estáveis em pHs ácidos. A medida que os valores de pH foram aumentando, as atividades diminuíram, chegando a 30%, 27% e 16% no pH 10,0, após 60 min, para as formas extra e intracelular da FSbm e extracelular da FSS, respectivamente (Figura 25).

Os resultados obtidos estão em acordo com os dados já descritos no que diz respeito as faixas de temperatura e pH em que as tanases são estáveis. Com relação a termoestabilidade das tanases, esta ocorre basicamente entre 10°C e 45°C (Rajkumar e Nandy, 1983; Barthomeuf *et al.*, 1994; Lekha e Lonsane, 1994; Sharma *et al.*, 1999; Pinto *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2008). Já a tanase purificada de *P. variotii* foi estável em uma faixa de temperatura de 20 a 55°C (Battestin e Macedo, 2007) e as tanases de *A. niger* (Yamada *et al.*, 1968) e *A. fumigatus* (Batra e Saxena, 2005) foram estáveis a 60°C. No entanto, as tanases produzidas por *A. phoenicis* apresentaram desempenho superior.

Esta propriedade pode estar associada a glicosilação das tanases, atuando como uma proteção a proteína (Lekha e Lonsane, 1997).

A estabilidade ao pH para a tanase de outros fungos ocorre em faixas bem mais estreitas (5,0 a 5,5; 4,5 a 6,0 e 4,5 a 5,0) para *A. flavus* IFO 5839 (Yamada *et al.*, 1968), *P. chrysogenum* (Rajkumar e Nandy, 1983) e *Bacillus cereus* KBR9 (Mondal *et al.*, 2001), respectivamente, diferindo do observado para as tanases de *A. phoenicis*, as quais permaneceram estáveis em uma ampla faixa de pH. As características aqui descritas para

as tanases produzidas por *A. phoenicis* são extremamente atrativas para o emprego industrial destas enzimas. Aguilar e Gutiérrez-Sánchez (2001) também descreveram que as tanases produzidas por FSS são mais estáveis a variações na temperatura e no pH, o que faz com que este método de cultivo seja mais interessante economicamente para a produção de tanases.

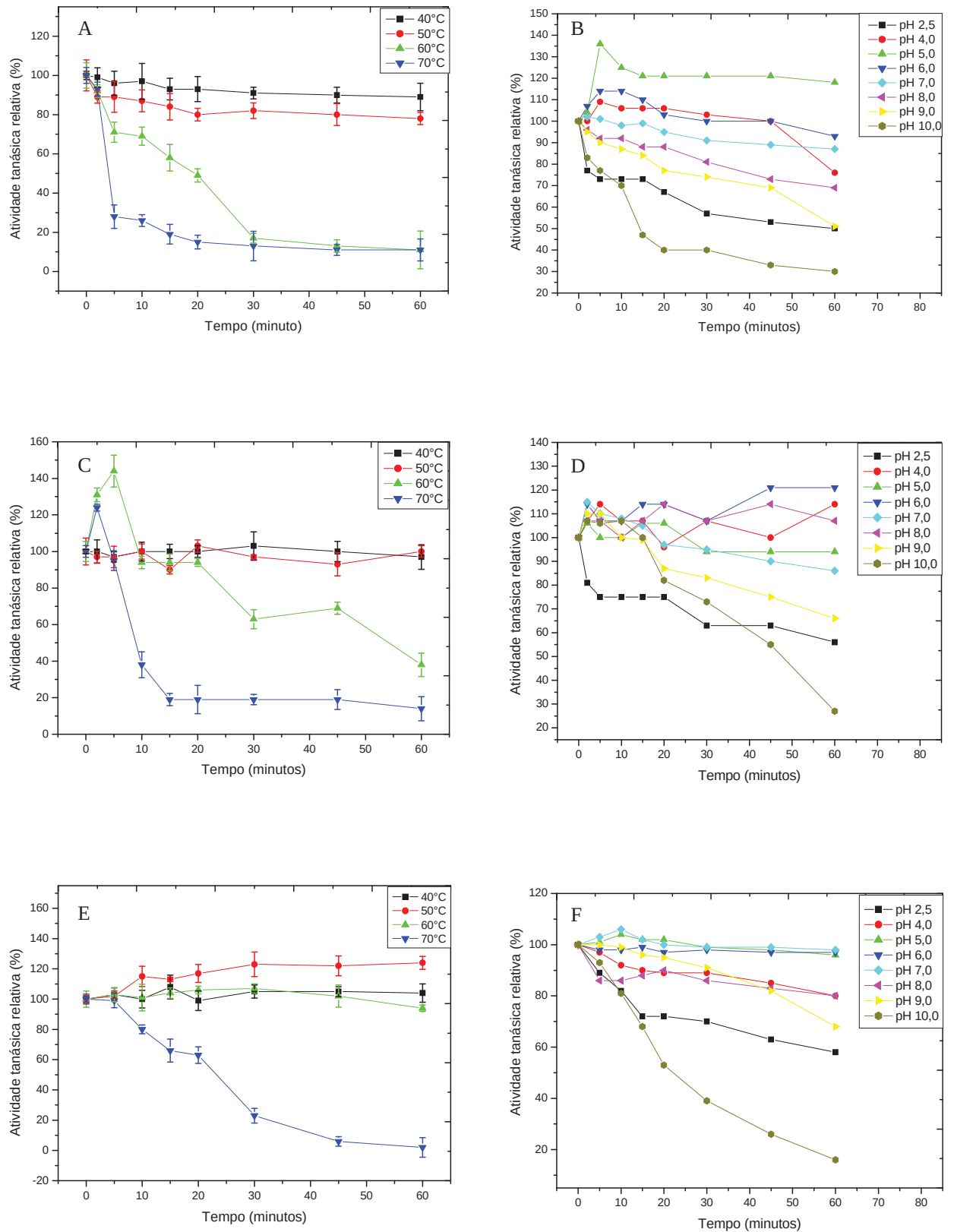


Figura 25. Estabilidade térmica (A, C e E) e ao pH (B, D e F) para as tanases extra (A e B) e intracelular (C e D) produzidas por *A. phoenicis* em FSbm e extracelular (E e F) em FSS.

4.3.3 Efeito de diferentes sais e outros compostos na atividade tanásica

Estudar a ativação e inibição da tanase é importante, pois, irá gerar informações sobre a estrutura geral da enzima e seu sítio ativo, que podem ser utilizadas para encontrar aplicações especiais para esta enzima (Mata-Gómez *et al.*, 2009).

Mais de 75% das enzimas requerem íons metálicos para expressar sua máxima capacidade catalítica. Esta ativação de reações enzimáticas por íons metálicos é, portanto, importante industrialmente, a fim de alcançar a eficiência catalítica total. Em baixas concentrações, alguns metais atuam como cofatores enzimáticos aumentando a atividade, mas em altas concentrações, o efeito é inibitório (Mukherjee e Banerjee, 2006; Mata-Gómez *et al.*, 2009).

Inicialmente, considerando-se a influência dos diferentes íons, nenhuma das formas enzimáticas apresentou uma grande ativação na presença dos íons testados. Porém, as tanases de *A. phoenicis* mantiveram sua atividade na presença de Ag^+ e Hg^{2+} , dado este que merece destaque, pois os íons Ag^+ e Hg^{2+} funcionam, em geral, como potentes inibidores da atividade enzimática (Tabela 13). Os íons prata e mercúrio reagem com os grupos tióis das proteínas (Pessoa Júnior e Kilikian, 2005).

Já quanto à inibição, a tanase intracelular manteve sua atividade constante para quase todos os íons testados, exceto para Al^{3+} , Fe^{2+} , Ba^{2+} e Co^{2+} , que foram potentes inibidores da atividade tanásica, chegando a uma redução de 84% na presença de Co^{2+} . Para a forma extracelular foi observada uma maior inibição da atividade na ordem de 48-69% na presença de Al^{3+} , Fe^{2+} e Co^{2+} (Tabela 13).

A inibição de tanases fúngicas por íons metálicos é bastante comum e pode estar relacionada à sua ligação em sítio não-específico ou a agregação da enzima (Costa, 2007). Sais de metais pesados têm sido relatados inibidores da atividade enzimática, por serem capazes de precipitar moléculas de proteínas. Eles também podem causar uma redução da atividade catalisadora, provavelmente devido à desnaturação parcial da enzima na presença do excesso de radicais livres no extrato enzimático (Valee e Ulmer, 1972, Tunga *et al.*, 1999).

O efeito de íons metálicos na tanase purificada de outros fungos também foi relatado. A atividade tanásica de *P. chrysogenum* foi inibida por Cu^{2+} (53%), Zn^{2+} e Fe^{3+} (45%), Mn^{2+} (22%) e Mg^{2+} (17%) (Rajakumar e Nandy, 1983). Já tanase de *A. niger* ATCC 16620 foi inibida por Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Fe^{2+} , e apenas K^{+} foi capaz de ativar a enzima (Sabu *et al.*, 2005). Barthomeuf *et al.* (1994) descreveram que sais como ZnCl_2 , FeCl_3 e CuSO_4 são inibidores da atividade tanásica enquanto que 1,0mM dos sais MgCl_2 , HgCl_2 , NaBr e $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ativaram a enzima de *A. niger*. Tais dados condizem com o observado para tanases de *A. phoenicis* quanto a inibição e no caso dos íons Hg^{2+} , Na^{2+} e Mg^{2+} , estes não foram capazes de ativar as enzimas de *A. phoenicis*, porém elas mantiveram sua atividade constante na presença destes aditivos. Também, a tanase de *A. niger* GH1 foi drasticamente inibida por Fe^{3+} , enquanto que Cu^{2+} e Zn^{2+} causaram apenas um leve efeito inibitório. Ao mesmo tempo, Co^{2+} foi capaz de aumentar a atividade da enzima (Mata-Gómez *et al.*, 2009). Mukherjee e Banerjee (2006) relataram que o único estimulador da tanase de *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus foetidus* foi o Mg^{2+} , sendo a enzima inibida principalmente por Hg^{2+} seguido por Fe^{3+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} e Cu^{2+} . E para a tanase obtida por *A. niger* MTCC 2425 foi observada uma maior inibição por Ca^{2+} (Bhardwaj *et al.*, 2003).

Kasieczka-Burnecka *et al.* (2007) também estudaram o efeito de íons metálicos em tanase de *Verticillium* sp. e descobriram que a adição de íons metálicos como Zn^{2+} , Cu^{2+} , K^{+} , Cd^{2+} , Ag^{+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , e Sn^{2+} inibiu a atividade da enzima.

Outros compostos químicos importantes que podem influenciar a atividade tanásica são os surfactantes, quelantes, desnaturantes, inibidores e solventes orgânicos.

Quando verificada a influência de tais compostos adicionados à reação enzimática, nenhuma das atividades enzimáticas sofreu grandes variações, apenas pequenas inibições em relação ao controle, exceto na presença de β -mercaptoetanol, o qual inativou a enzima. Essas características fazem das tanases de *A. phoenicis* atrativas para possíveis aplicações industriais.

Estudos de inibição principalmente fornecem uma idéia sobre a natureza da enzima ativa e os seus cofatores requisitados (Battestin e Macedo, 2007). A atividade tanásica foi completamente inibida por β -mercaptoetanol 1mM (Tabela 14), o que condiz com o observado na literatura para tanases de *A. niger* (Aguilar e Gutiérrez Sánchez, 2001), *P. variotii* (Battestin e Macedo, 2007), *Rhizopus oryzae* e *A. foetidus* (Mukherjee e Banerjee, 2006) que foram inativadas por β -mercaptoetanol. A inibição da atividade enzimática por β -mercaptoetanol sugere a existência de pontes dissulfeto entre as subunidades da enzima, as quais são reduzidas, levando a separação das mesmas e, conseqüentemente, à inativação.

Avaliando o efeito do desnaturante, pode-se observar que em ambos os casos a tanase não sofreu desnaturação pela uréia (Tabela 14), tais dados condizem com o descrito por Mahapatra *et al.* (2005) para tanase de *A. awamori*, onde somente em concentrações mais elevadas (6-8M) a uréia foi capaz de desnaturar a enzima por causar uma mudança conformacional na sua estrutura terciária, o que não ocorreu em concentrações menores (1-5M). Também, Mukherjee e Banerjee (2006) verificaram que apenas em altas concentrações a uréia causou um efeito inibitório sobre a atividade da enzima.

Os solventes orgânicos penetram o glóbulo de proteína causando desnaturação por interferência nas zonas hidrofóbicas internas, importantes na manutenção da conformação da molécula. Também, a adição de solventes reduz a constante dielétrica do meio que leva a imobilização das moléculas de água pela hidratação do grupo polar (hidroxila) do solvente orgânico, com o deslocamento das moléculas de água das zonas hidrofílicas e redução da camada de hidratação e da solubilidade. Ainda, resulta em maior disponibilidade de cargas superficiais da proteína para interação eletrostática com outras proteínas, o que pode levar a agregação e precipitação (Pessoa Júnior e Kilikian, 2005).

Informações sobre o efeito de solventes orgânicos na atividade enzimática é muito limitada. No presente estudo, o efeito de diferentes solventes (1%) foi testado, sendo que nenhum foi capaz de causar grandes alterações na atividade tanásica, apenas pequenas

inibições em relação ao controle (Tabela 14). Contudo, Chhokar *et al.* (2009) mostraram que a tanase produzida por *A. awamori* MT9299 teve sua atividade completamente inibida na presença de álcool isoamílico, clorofórmio, álcool isopropílico e etanol.

Para a tanase intracelular deve-se considerar, também, a grande inibição causada por EDTA, na presença do qual a atividade foi 47% menor que o controle (Tabela 14). Estes dados estão de acordo com o apresentado por Kar *et al.* (2003) e Battestin e Macedo (2007) que mostraram que 1mM de EDTA inibiu a atividade enzimática de *Rhizopus oryzae* e *P. variotii*, respectivamente. As tanases de *A. niger* (Barthomeuf *et al.*, 1994) e de *A. oryzae* (Iibuchi *et al.*, 1968 apud Mukherjee e Banerjee, 2006, p. 211) também foram inativadas por este quelante. Porém, nenhuma inibição por EDTA foi observada no caso da tanase de *A. flavus* (Yamada *et al.*, 1968).

O EDTA ácido etilenodiamino tetra-acético é um composto orgânico que age como agente quelante, formando complexos muito estáveis com diversos íons metálicos. Entre eles estão magnésio, cálcio, manganês, ferro(II), ferro(III), zinco, cobalto, cobre(II), chumbo e níquel (Holleman, 2007). A queda detectada na presença de EDTA pode ser devido à sua influência sobre a área interfacial entre o substrato e a enzima, pois pode se complexar com íons presentes no sítio ativo e prejudicar interação desta enzima com o substrato (Lopes *et al.*, 2002; Jinwal *et al.*, 2003).

Surfactantes desempenham um papel importante na atividade catalítica de enzimas e o grau de estimulação por surfactantes varia para as diversas enzimas (Kim *et al.*, 1995). Os surfactantes aniônicos como SDS e não iônicos como Triton X-100, Tween 80 e Tween 20 podem induzir mudanças na própria enzima, resultando em uma mudança na sua atividade catalítica (Peek *et al.*, 1992). Tween 80 é predominantemente um composto de ácido oléico (70%) e Tween 20 de ácido láurico. Devido à predominância de ácido oléico e ácido láurico em Tween 80 e Tween 20, respectivamente, eles podem causar uma diminuição na atividade enzimática. Esta inibição pode ser o resultado do efeito combinado de fatores como a redução das interações hidrofóbicas que desempenham um papel

fundamental na manutenção da estrutura terciária e as interações diretas com a molécula de proteína (Kar *et al.*, 2003).

Surpreendentemente, as tanases de *A. phoenicis* mostraram boa estabilidade em todos os detergentes testados (Tabela 14), assim como as de *A. niger* GH1 (Mata-Gómez *et al.*, 2009).

Já as tanases de *P. variotii* tiveram sua atividade diminuída na presença de Tween 80, Tween 20 e Triton X-100 em baixas concentrações (Battestin e Macedo, 2007). Da mesma forma, Kar *et al.* (2003) mostraram que SDS, Tween 60 e Triton X-100 inibiram a atividade enzimática de *Aspergillus aculeatus*. Tween 80, Triton X-100 e SDS, nas concentrações de 0,1-1%, também, causaram inibição da atividade enzimática de *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus foetidus* (Mukherjee e Banerjee, 2006). Belmares *et al.* (2004), descreveram que a maioria das tanases fúngicas são total, ou parcialmente inibidas por estes surfactantes.

Adicionalmente, as tanases de *A. phoenicis* foram testadas quanto à estabilidade a alguns solventes (metanol, etanol e isopropanol) e detergentes (Triton X-100 e Tween 80), sendo que para isso as enzimas foram incubadas com estes compostos em diferentes tempos de 0h a 5h, nas concentrações de 1% para solventes e 0,01% para detergentes. As tanases mantiveram-se estáveis para todos os compostos testados, sendo que após 5h as atividades residuais para a enzima extra foram 81%, 83%, 94%, 98% e 78%, respectivamente para metanol, etanol, isopropanol, Triton X-100 e Tween 80. Ao passo que a tanase intracelular apresentou até mesmo um aumento na atividade, quando comparada ao controle sem a presença destes aditivos. Sendo estas atividades equivalentes a 95%, 105%, 111%, 109% e 95%, respectivamente para metanol, etanol, isopropanol, Triton X-100 e Tween 80, após 5h de incubação (dados não mostrados).

Tabela 13. Efeito de íons metálicos na atividade tanásica intra e extracelular do fungo *Aspergillus phoenicis*.

Compostos (1mM)	Atividade relativa (%)	
	Extracelular	Intracelular
Controle	100	100
AlCl ₃	31 ± 5,31	59 ± 9,71
AgNO ₃	86 ± 7,60	95 ± 7,49
BaCl ₂	73 ± 4,57	59 ± 3,56
CoCl ₂	52 ± 3,45	16 ± 5,73
CaCl ₂	78 ± 8,09	79 ± 2,44
CuCl ₂	86 ± 6,33	75 ± 2,59
Fe ₂ (SO ₄) ₃	52 ± 2,05	50 ± 1,85
FeCl ₃	84 ± 4,12	87 ± 7,73
HgCl ₂	97 ± 12,73	84 ± 2,12
KH ₂ PO ₄	102 ± 1,85	97 ± 8,61
KCl	102 ± 5,98	90 ± 7,54
MgCl ₂	70 ± 6,75	87 ± 3,22
MnCl ₂	102 ± 9,47	91 ± 4,95
NaCl	100 ± 9,80	94 ± 5,42
NH ₄ Cl	98 ± 4,89	88 ± 3,08
Zn(NO ₃) ₂	84 ± 3,74	78 ± 4,45
ZnCl ₂	97 ± 2,91	96 ± 1,87

Tabela 14. Efeito de compostos químicos na atividade tanásica intra e extracelular do fungo *Aspergillus phoenicis*.

Compostos	Atividade relativa (%)	
	Extracelular	Intracelular
Controle	100	100
EDTA (1mM)	70 ± 2,59	53 ± 3,65
Metanol (1%)	95 ± 0,97	85 ± 4,13
Acetonitrila (1%)	85 ± 1,86	85 ± 6,83
Etanol (1%)	85 ± 2,34	80 ± 4,97
Acetona (1%)	95 ± 5,57	85 ± 2,13
Isopropanol (1%)	85 ± 0,83	85 ± 5,07
Butanol (1%)	75 ± 3,11	85 ± 3,91
Glicerol (1%)	70 ± 4,02	95 ± 1,14
SDS (0,01%)	90 ± 2,73	85 ± 4,17
Tween-20 (0,01%)	90 ± 1,29	90 ± 5,36
Triton X-100 (0,01%)	95 ± 1,54	105 ± 3,02
Tween-80 (0,01%)	95 ± 2,95	90 ± 3,74
H ₂ O ₂ (1mM)	95 ± 4,46	85 ± 1,95
β-mercaptoetanol (1mM)	0 ± 0,00	0 ± 0,00
Uréia (1mM)	95 ± 3,49	85 ± 1,67

4.3.4 Influência de glicose e ácido gálico na atividade tanásica

Inibidores competitivos são substâncias, geralmente estruturalmente relacionados com o substrato, que são capazes de combinar com a enzima no mesmo local que o substrato, competindo com ele. Inibidor e substrato, portanto, competem pelo mesmo local formando complexos enzima-substrato (ES) e enzima-inibidor (EI), respectivamente. Estes complexos desfavoráveis (EI) afetam grandemente a atividade tanásica (El-Fouly *et al.*, 2010).

Para verificar a possível existência de inibição pelos produtos de hidrólise glicose e ácido gálico, diferentes concentrações destes compostos foram adicionadas à mistura de reação enzimática.

Ambas as formas não apresentaram inibição por glicose, sendo que a atividade tanásica foi mantida constante em todas as concentrações testadas (Figura 26). O fato das tanases de *A. phoenicis* não serem inibidas por glicose em elevadas concentrações faz destas enzimas interessantes para uma possível aplicação industrial.

Já o ácido gálico pode ser considerado um inibidor para as tanases de *A. phoenicis*, sendo que a tanase intracelular apresentou uma atividade residual de 18% na presença de 10mM deste composto, enquanto que a enzima extracelular foi totalmente inibida a partir de 2mM de ácido gálico (Figura 27).

Poucos estudos de inibição por glicose foram relatados para tanases, porém, o ácido gálico, assim como outros compostos tem sido descritos como inibidores da atividade tanásica.

libuchi *et al.* (1972) relataram que o sítio de ligação da tanase pode ser capaz de reagir com qualquer grupo hidroxila fenólico, sendo que a tanase de *A. oryzae* foi inibida competitivamente por substratos análogos como n-propil galato e isoamil galato, que tem grupos hidroxilas fenólicos. Pirogalol e ácido gálico, também, foram descritos como inibidores competitivos para tanase produzida por *A. niger* (Parmentier e Verbruggen, 1973).

Kar *et al.* (1999) e Kar e Banerjee (2000) verificaram que o ácido gálico atua como inibidor competitivo para a tanase, sendo que este composto também causou inibição na tanase de *A. niger* AUMC 4301 (El-Fouly *et al.*, 2010).

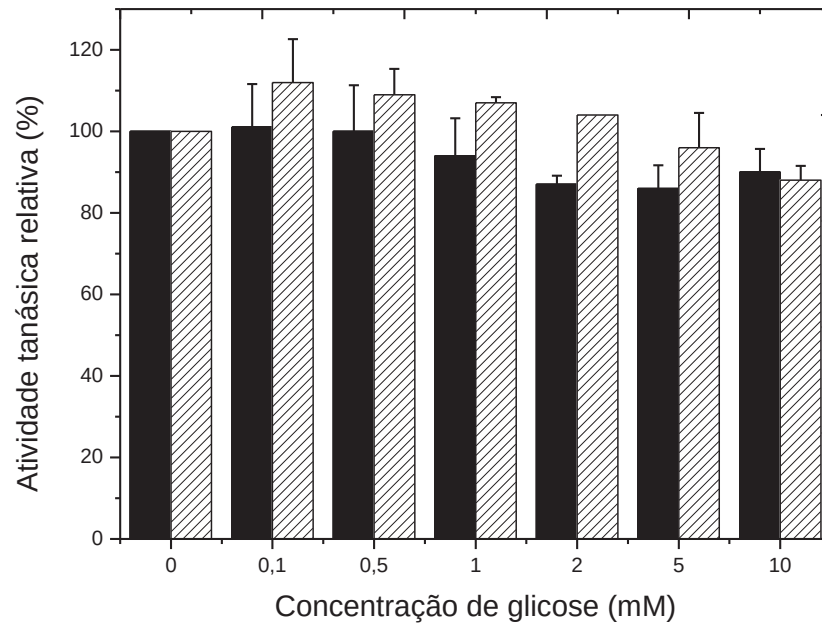


Figura 26. Influência da glicose na atividade tanásica extracelular (■) e intracelular (▨).

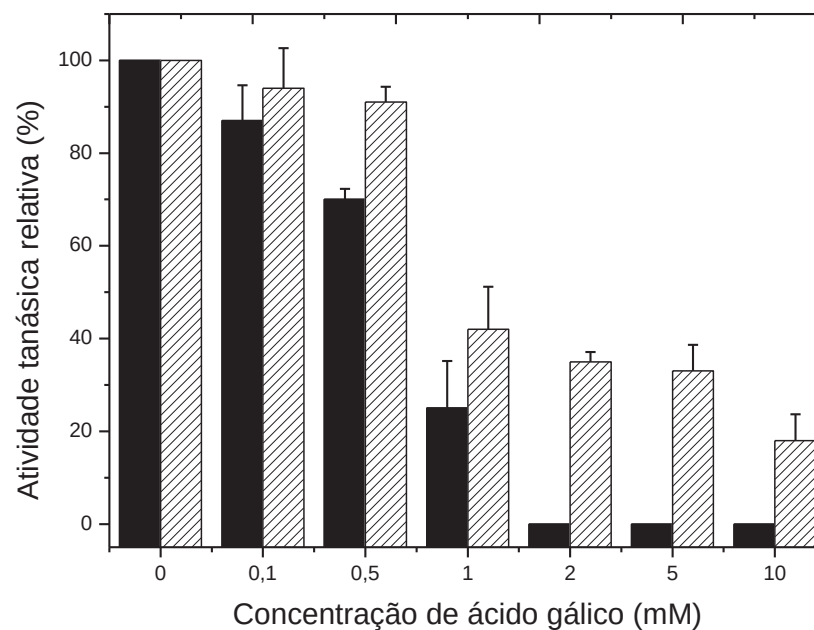


Figura 27. Influência do ácido gálico na atividade tanásica extracelular (■) e intracelular (▨).

4.3.5 Estabilidade das tanases frente a diferentes solventes orgânicos

A estabilidade das tanases na presença de solventes orgânicos é de grande interesse, uma vez que são nessas condições que se realizam as reações de esterificação (Pinto *et al.*, 2005). Fatores como polaridade, hidrofobicidade e tamanho da cadeia carbônica do solvente devem ser levados em consideração, pois se tratam de características envolvidas nesse processo (López *et al.*, 2004). Sendo assim, a estabilidade das enzimas extra e intracelulares frente a alguns solventes como, metanol, etanol, acetona, isopropanol, butanol e glicerol, foi analisada.

Para a tanase extracelular, a atividade foi aumentada cerca de 39% na presença de butanol no período de 4 horas e somente a acetona desnaturou ou precipitou a enzima (Figura 28A). Já para a enzima intracelular, o butanol promoveu um aumento sucessivo na atividade e a acetona também levou a uma desnaturação ou precipitação da enzima. Para os demais solventes testados as atividades foram reduzidas, especialmente com o metanol e etanol (Figura 28B). Estes resultados estão de acordo com o observado por Chhokar *et al.* (2009) para as tanases de *A. awamori* MT9299, onde o butanol e o benzeno aumentaram a atividade da enzima. No entanto, a adição de alguns solventes como o ácido acético, álcool isoamílico, clorofórmio, álcool isopropílico e etanol inibiram completamente a atividade enzimática (Chhokar *et al.*, 2009)

Vários solventes orgânicos tais como isopropanol, álcool isoamílico, benzeno, metanol, etanol, tolueno e glicerol também inibiram a atividade da tanase de *Aspergillus heteromorphus* MTCC 8818 (Chhokar *et al.*, 2010).

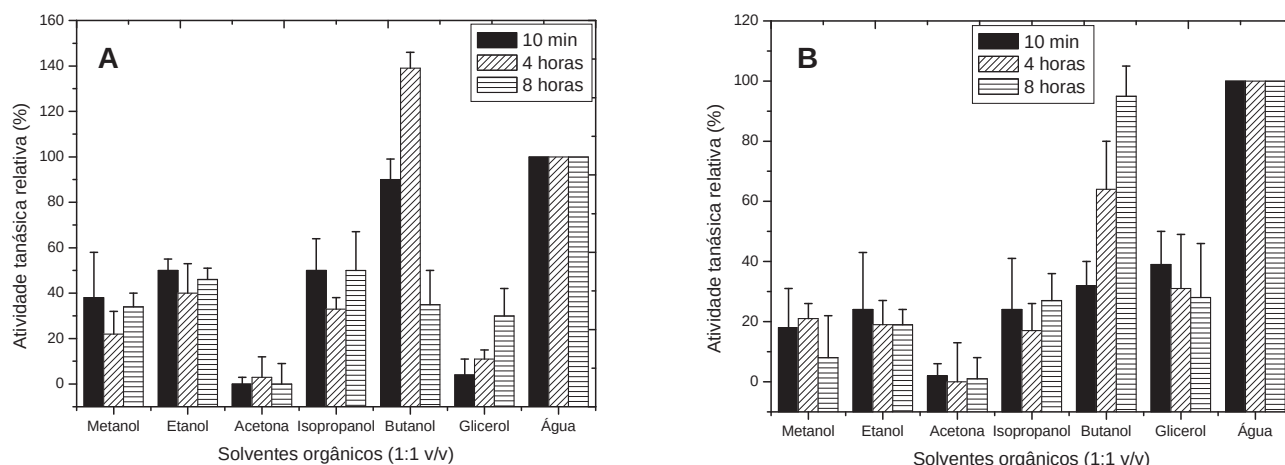


Figura 28. Estabilidade das tanases extracelular (A) e intracelular (B) frente a diferentes solventes orgânicos em função do tempo de incubação.

4.3.6 Atividades hidrolíticas das tanases sobre o ácido tânico e o metil galato

Como pode ser observado na figura 29, ambos os substratos foram hidrolizados pelas enzimas intra e extracelulares produzidas por *A. phoenicis*. Ambas as formas hidrolizaram preferencialmente o metil galato. Quando analisada a hidrólise da mistura de ambos os substratos, valores intermediários ao das hidrólises dos substratos separados foram obtidos. Tal fato sugere a existência de um mesmo sítio catalítico para a hidrólise tanto do ácido tânico como do metil galato. Caso tais catálises ocorressem em sítios diferentes, os valores de atividade tanásica obtidos para a mistura deveriam ser maiores, correspondendo aproximadamente aos valores hipotéticos obtidos pela soma das hidrólises em separado.

O ácido tânico é um substrato de origem natural enquanto o metil galato deve ser processado sinteticamente. Yamada *et al.* (1968) descreveram que o ácido tânico é o melhor substrato para a atividade tanásica se comparado ao metil galato e outros substratos, sendo estes menos reativos. Tal fato não condiz ao observado para as tanases de *A. phoenicis*, que hidrolizaram preferencialmente o metil galato. Isso pode ser explicado pelo fato de que as tanases apresentam maior atividade esterásica do que depsidásica,

hidrolizando melhor o metil galato, pois este possui apenas ligação éster, enquanto que o ácido tânico possui ligações éster e depsídica.

Bhardwaj *et al.* (2003) também investigaram as atividades esterásica e depsidásica das tanases I e II de *Aspergillus niger* MTCC 2425, sendo que a tanase I apresentou 52% de atividade esterásica e 48% de atividade depsidásica e a tanase II teve 46% de atividade esterásica e 54% de atividade depsidásica.

Tanases de outros microrganismos foram testadas quanto a eficiência na hidrólise do metil galato e do ácido tânico, entre eles *Selenomonas ruminantium* (Skene e Brooker, 1995), *A. tamarii* (Costa *et al.*, 2007), *Cryphonectria parasitica* (Farias *et al.*, 1994), *P. chrysogenum* (Rajakumar e Nandy, 1983), *A. flavus* (Yamada *et al.*, 1968) e *A. niger* GH1 (Mata-Gómez *et al.*, 2009), *A. oryzae* (Chang *et al.*, 2006) e *Penicillium variable* (Sharma *et al.*, 2008).

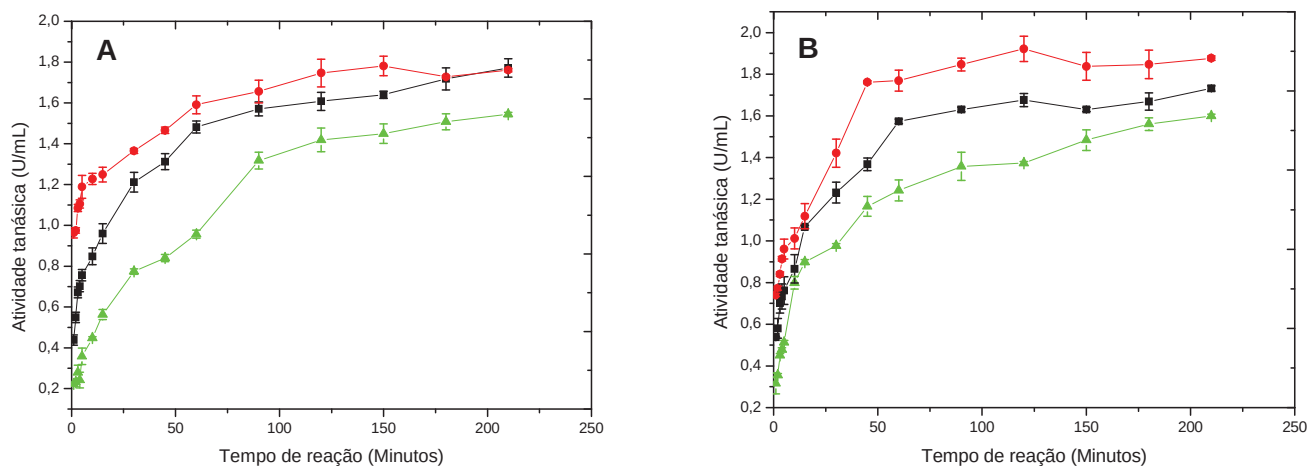


Figura 29. Determinação da hidrólise dos substratos metil galato (●), ácido tânico (▲) e metil galato: ácido tânico (1:1; v/v) (■), em diferentes tempos de reação, pelas tanases extracelular (A) e intracelular (B) produzidas por *Aspergillus phoenicis*.

4.3.7 Parâmetros cinéticos

As propriedades cinéticas das tanases intra e extracelulares purificadas foram investigadas utilizando os substratos metil galato, ácido tânico e propil galato, e determinadas pela representação gráfica do duplo recíproco (Figura 30). Como mostrado na tabela 15, para as enzimas extra e intracelular, os maiores valores de K_m foram obtidos na presença de metil galato (14,30mM) e de ácido tânico (1,39mM), como substrato, respectivamente, mostrando uma menor afinidade por estes substratos se comparados aos valores obtidos para o propil galato, que foram menores.

Porém, quando analisada a V_{max} e a razão V_{max}/K_m de ambas as formas enzimáticas, a enzima extra apresentou melhores valores para o metil galato e a enzima intracelular para o ácido tânico. Para a tanase intracelular a razão V_{max}/K_m para o ácido tânico é quase quatro vezes maior do que para o propil galato e 2,6 vezes do que para metil galato. Já no caso da enzima extra a razão V_{max}/K_m para o metil galato é 1,3 vezes maior do que para o ácido tânico e 2,2 vezes do que para o propil galato (Tabela 15).

Os valores de V_{max} observados para as tanases extra e intracelular neste trabalho utilizando o ácido tânico foram muito maiores que o encontrado para tanase de *P. variotii* (Battestin e Macedo, 2007).

Os valores de K_m da tanase extracelular para o metil galato (14,3mM) e ácido tânico (1,67mM) foram muito semelhantes aos obtidos para tanase de *A. oryzae*, (Chang *et al.*, 2006), sendo estes 14,97mM e 1,37mM para o metil galato e ácido tânico, respectivamente. Porém, para o propil galato o valor de K_m foi 12,13 vezes maior para a tanase de *A. oryzae*. No entanto, a tanase de *P. variable* apresentou valores de K_m mais elevados, sendo 32mM para o ácido tânico, 14mM para o metil galato e 12mM para o propil galato (Sharma *et al.*, 2008).

Bhardwaj *et al.* (2003) também relataram valores de K_m para estes três substratos para tanase de *A. niger* MTCC 2425 que foram de $2,8 \times 10^{-4}$ M (ácido tânico), $9,5 \times 10^{-4}$ M (metil galato) e $20,5 \times 10^{-4}$ M (propil galato).

Portanto, as tanases de *A. phoenicis* apresentaram afinidades maiores do que as de *P. variable* para todos os substratos e também afinidades maiores do que a enzima de *A. niger* MTCC 2425 para o propil galato.

Outros valores de K_m já foram descritos para tanases de outros microrganismos utilizando como substrato o metil galato, entre eles *S. ruminantium* (Skene e Brooker, 1995), *A. tamarii* (Costa *et al.*, 2007) e *C. parasitica* (Farias *et al.*, 1994). Quando o substrato utilizado foi o ácido tânico, diferentes valores de K_m foram encontrados para tanases de *C. parasitica* (Farias *et al.*, 1994), *P. chrysogenum* (Rajakumar e Nandy, 1983), *A. flavus* (Yamada *et al.*, 1968) e *A. niger* GH1 (Mata-Gómez *et al.*, 2009), sendo estes valores de 0,94mM, $0,48 \times 10^{-4}$ M, $0,5 \times 10^{-4}$ M e $2,3 \times 10^{-5}$ M, respectivamente.

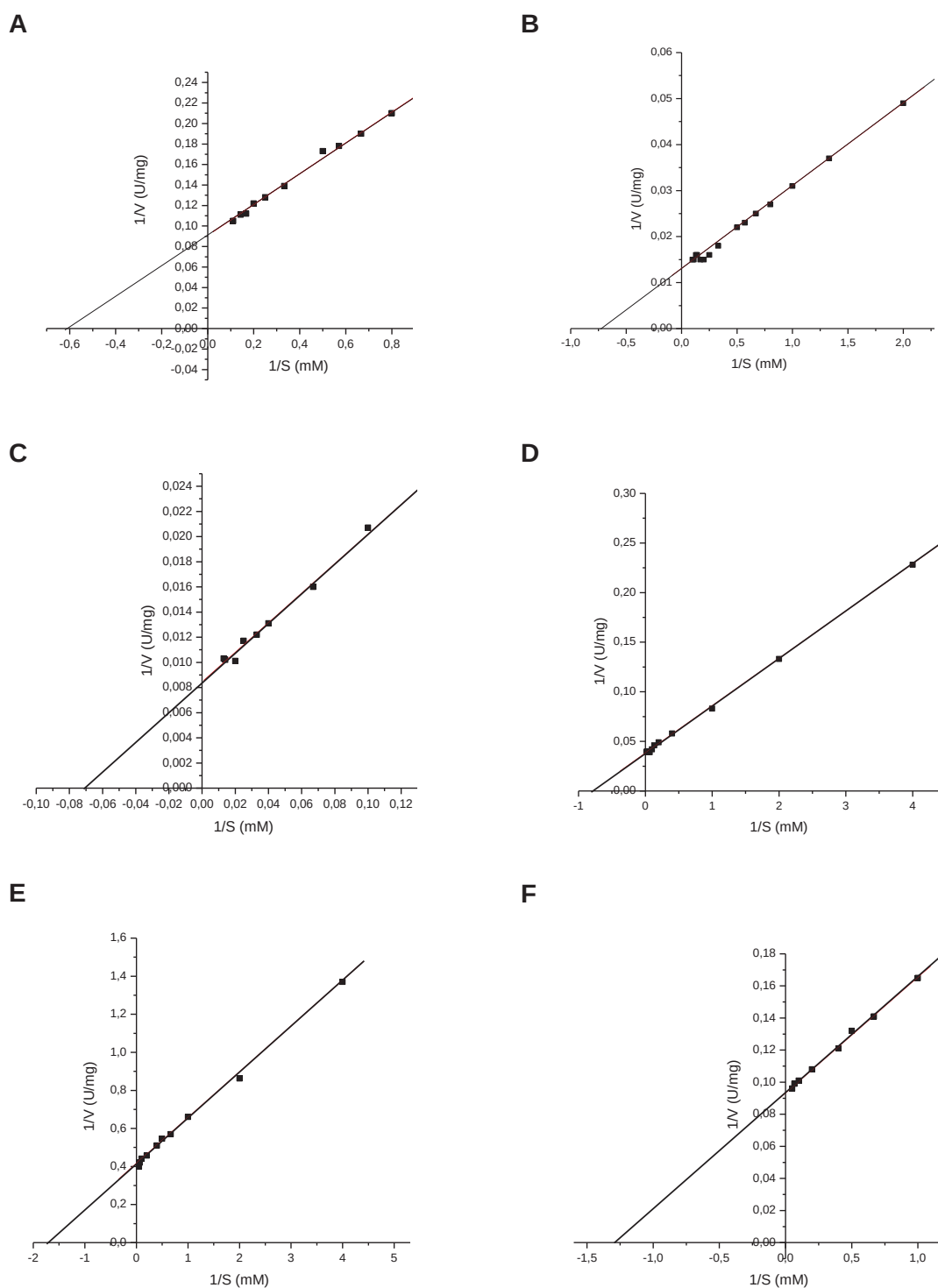


Figura 30. Representação gráfica de duplo recíproco para determinação do K_m e da V_{max} para as tanases purificadas extracelular (A, C e E) e intracelular (B, D e F) para os substratos ácido tânico (A e B), metil galato (C e D) e propil galato (E e F).

Tabela 15. Parâmetros cinéticos para as tanases extra e intracelular produzidas por *A. phoenicis*.

Tanase	Substrato	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)	V_{max}/K_m (Umg ⁻¹ mM ⁻¹)
Extracelular				
	Ácido tânico	1,67±1,17	10,99±9,91	6,58
	Metil galato	14,30±4,03	125,00±0,00	8,74
	Propil galato	0,60±0,16	2,38±0,69	3,97
Intracelular				
	Ácido tânico	1,39±0,10	76,92±17,18	55,34
	Metil galato	1,25±0,27	26,32±4,18	21,06
	Propil galato	0,78±0,08	10,75±7,45	13,78

4.3.8 Análise dos produtos de hidrólise do ácido tânico e do metil galato

A análise qualitativa dos produtos de hidrólise do ácido tânico e do metil galato, por cromatografia de camada delgada (TLC), obtidos durante a reação enzimática pela ação da tanase extracelular (Figura 31) e intracelular (Figura 32) mostra que o produto formado, ou seja, o ácido gálico, aumenta em função do tempo da reação.

O mesmo método foi utilizado para a identificação do ácido gálico formado após 3 horas de incubação do ácido tânico com a tanase produzida por *A. tamarii*, obtendo-se os mesmos resultados (Costa *et al.*, 2008). Uma das principais razões para se estudar os fungos produtores de tanases é o seu uso em potencial no processo de produção de ácido gálico (Hadi *et al.*, 1994), uma vez que tal composto é muito apreciado na indústria farmacêutica servindo como precursor de fármacos e nas indústrias alimentícia e química, sendo utilizado para síntese de propil galato (antioxidante), pirogalol (conservante) e resinas semicondutoras (Lekha e Lonsane, 1997). Como é conhecido, além de ácido gálico, a glicose também é um produto e hidrólise desta reação. Contudo, esta não é detectada pela metodologia utilizada e os respectivos “spots” não podem ser visualizados.

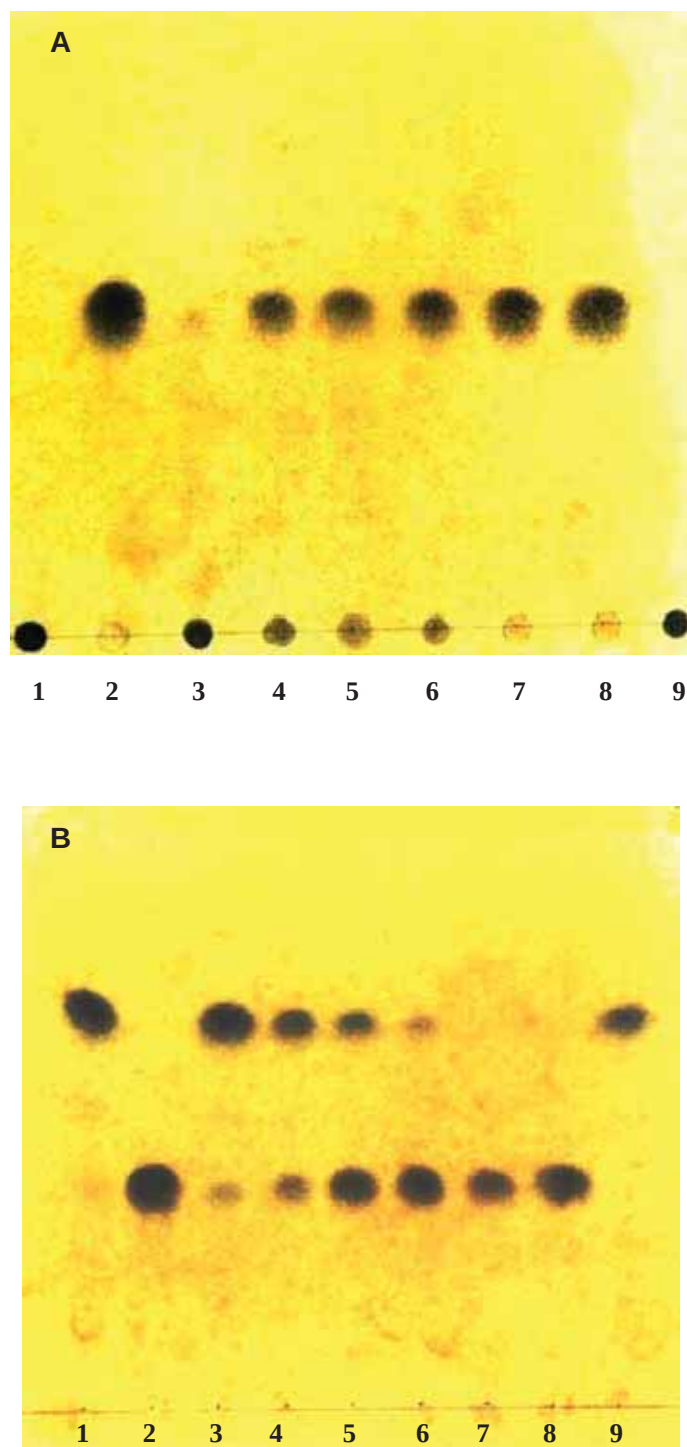


Figura 31. Perfil cromatográfico em camada delgada (TLC) do ácido gálico formado a partir da hidrólise do ácido tânico (A) e do metil galato (B), pela tanase extracelular, obtido em diferentes tempos de reação. Raias: (1) ácido tânico (A) e metil galato (B); (2) ácido gálico; (3) reação de 1 minutos; (4) reação de 10 minutos; (5) reação de 30 minutos; (6) reação de 1 hora; (7) reação de 2 horas; (8) reação de 4 horas; (9) controle negativo.

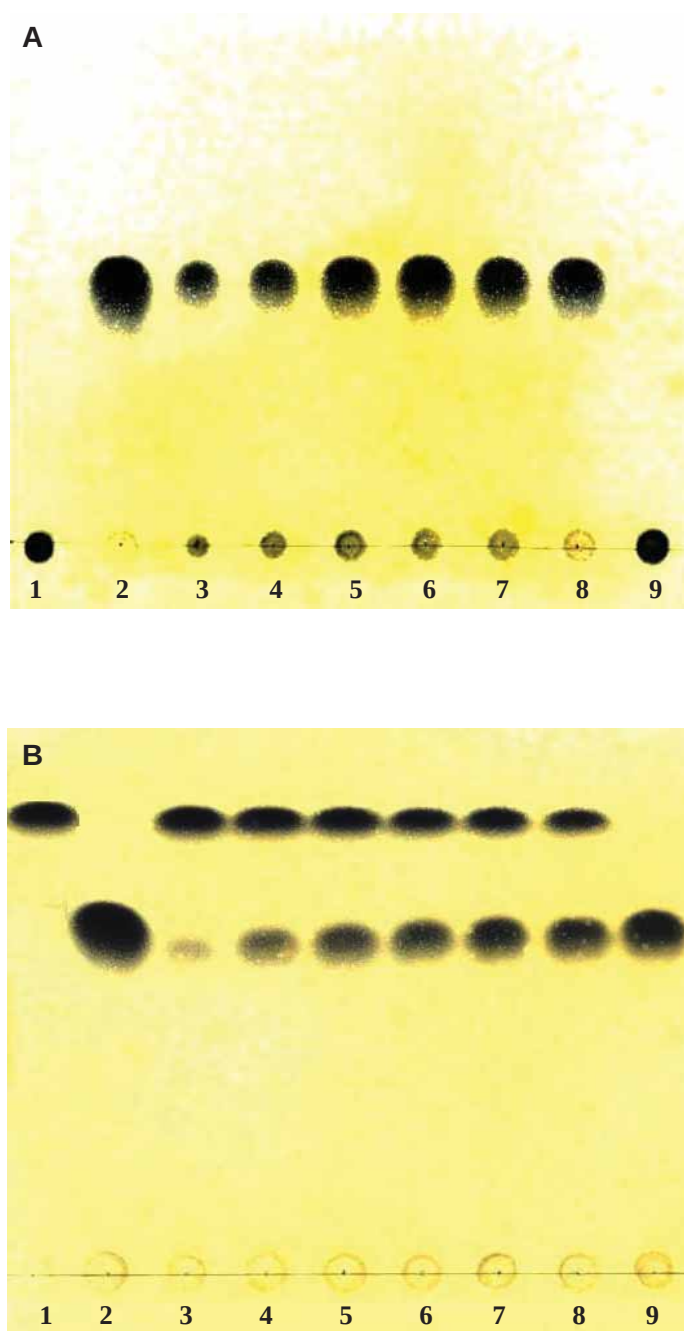


Figura 32. Perfil cromatográfico em camada delgada (TLC) do ácido gálico formado a partir da hidrólise do ácido tânico (A) e do metil galato (B), pela tanase intracelular, obtido em diferentes tempos de reação. Raias: Em (A) (1) ácido tânico; (2) ácido gálico; (3) reação de 1 minuto; (4) reação de 10 minutos; (5) reação de 30 minutos; (6) reação de 1 hora; (7) reação de 2 horas (8) reação de 4 horas; (9) controle negativo. Em (B) (1) metil galato; (2) ácido gálico; (3) reação de 1 minuto; (4) reação de 2 minutos; (5) reação de 4 minutos; (6) reação de 6 minutos; (7) reação de 8 minutos (8) reação de 10 minutos; (9) reação de 30 minutos.

4.3.9 Análise qualitativa da hidrólise do ácido tânico e 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 (Tewari *et al.*, 1996) para o equilíbrio entre o ácido gálico e o propil galato (**Figura 33**).

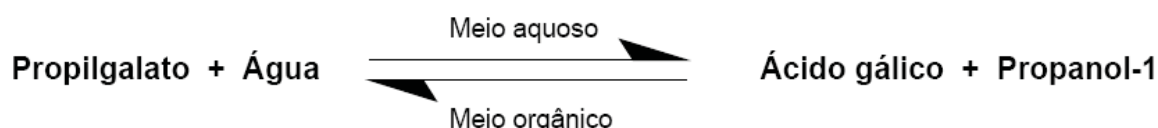


Figura 33. Conversão de propil galato em ácido gálico pela tanase em função do meio reacional (Pinto *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, o uso de meios não-convencionais em biocatálise industrial tem crescido consideravelmente por suas potenciais aplicações em química fina, agroquímica, perfumarias e indústria farmacêutica (Yu e Li, 2006).

De uma perspectiva biotecnológica há muitas vantagens em empregar enzimas em meio orgânico em oposição ao meio aquoso (Carrea e Riva, 2000). Algumas delas incluem uma maior solubilidade do substrato, a capacidade de usar enzimas sinteticamente em vez de degradativamente e a capacidade de modificar a seletividade nativa simplesmente adaptando o meio de reação ao invés da enzima em si (Yu *et al.*, 2004).

Neste contexto, as tanases purificadas de *A. phoenicis* foram testadas quanto a sua capacidade de síntese de propil galato pela transesterificação do ácido gálico, utilizando como meio orgânico de reação o 1-propanol em baixas condições aquosas.

O produto foi monitorado por TLC e foi possível observar que as tanases de *A. phoenicis* foram capazes de sintetizar o propil galato em meio orgânico a partir do ácido tânico, ou seja, as tanases hidrolisaram o ácido tânico (banda inferior) produzindo a glicose (não mostrada) e o ácido gálico (banda mediana), o qual foi esterificado pela tanase na presença de 1-propanol produzindo o propil galato (banda superior), sendo que este produto aumentou com o tempo de reação (Figuras 34A e 34B).

Tanino acil hidrolase são esterases capazes de hidrolisar as ligações éster e depsídica de substratos como ácido tânico, metil galato e ácido m-digálico em meio aquoso e sintetizar ésteres de ácido gálico com uma variedade de alcoóis e dióis em meio orgânico (Weetall, 1985; Lekha e Lonsanne, 1997). O propil galato é um éster de ácido gálico muito importante e amplamente usado como um aditivo de alimentos, uma vez que age como um antioxidante, também é utilizado em cosméticos, produtos de cabelo, adesivos e indústria de lubrificantes e como um pró-fármaco da trimetoprima (agente antibacteriano) (Yu e Li, 2006).

A possibilidade da preparação do propil galato pela esterificação do ácido gálico pela tanase tem sido explorada (Yu e Li, 2006). Embora esses estudos sintéticos tenham sido realizados em meio orgânico, pouco se conhece sobre o efeito de solventes orgânicos na tanase.

Outras tanases têm significativo potencial sintético e foram estudadas quanto à propriedade de transesterificação. Toth e Hensler (1952) divulgaram a capacidade da tanase para produzir ésteres de ácido gálico. Gaathon *et al.* (1989) sintetizou propil galato em um sistema reverso micelar. Sharma e Gupta (2003) imobilizaram a tanase de *A. niger* van Teighem em Celite para a transesterificação do ácido gálico com 1-propanol. Weetall (1985) explorou a tanase imobilizada em suporte de sílica porosa para sintetizar ester em meio contendo hexano e 1-propanol e Yu *et al.* (2004) estudaram a síntese de ésteres de ácido gálico pela tanase microencapsulada.

Apesar de o resultado ter sido interessante para uma possível aplicação, melhores condições para a reação e o estudo com a tanase imobilizada com melhores potenciais poderiam maximizar a síntese deste antioxidante tão almejado industrialmente.

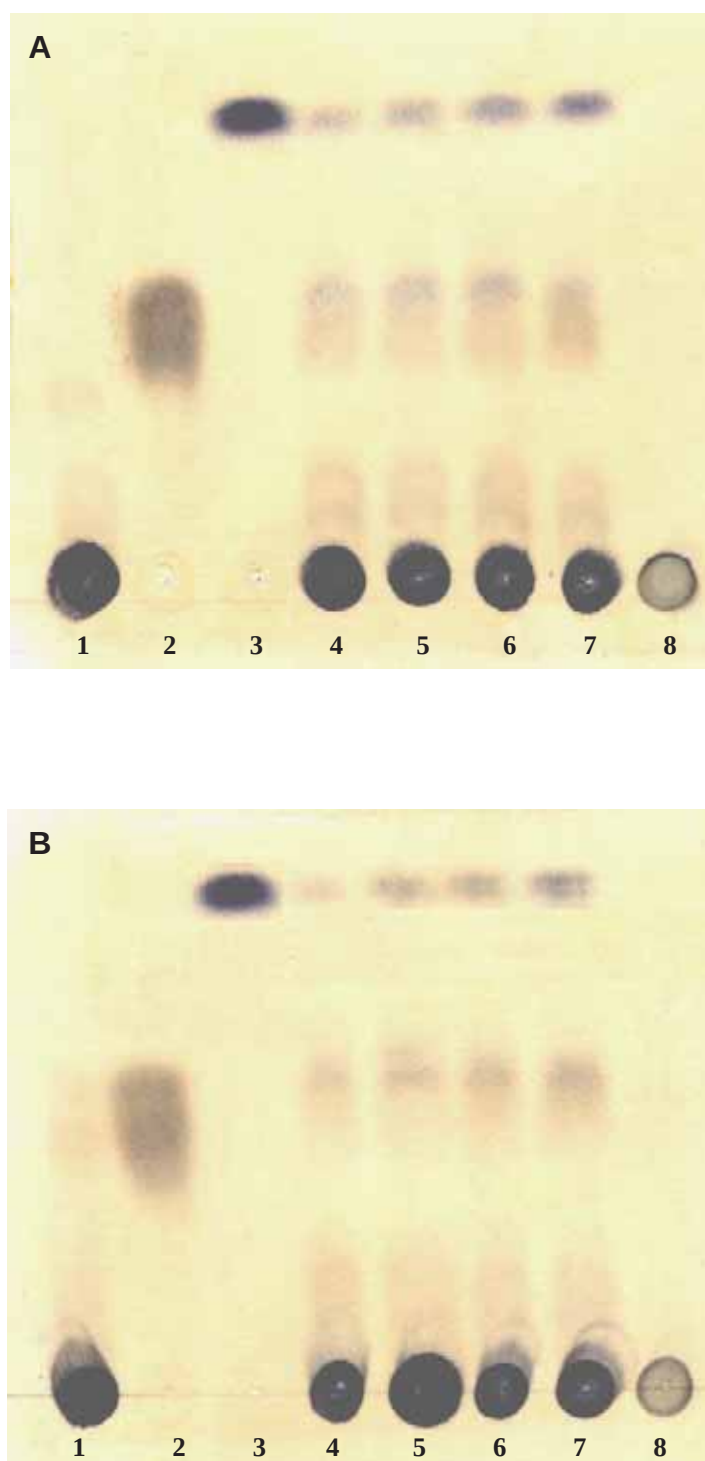


Figura 34. Perfil cromatográfico em camada delgada (TLC) da síntese de propil galato a partir da esterificação do ácido tânico (5mM) em 50% de 1-propanol pelas tanases extracelular (A) e intracelular (B), obtido em diferentes tempos de reação. Raias: (1) ácido tânico; (2) ácido gálico; (3) propil galato; (4) reação de 6 horas; (5) reação de 12 horas; (6) reação de 18 horas; (7) reação de 24 horas; (8) controle negativo.

5. CONCLUSÕES

O fungo filamentoso *A. phoenicis* foi um bom produtor de tanases intra e extracelulares quando cultivado tanto em FSbm quanto em FSS, destacando-se entre as diferentes linhagens analisadas. As tanases produzidas por *A. phoenicis* apresentam potencial biotecnológico com muitas características desejáveis para o emprego industrial como, por exemplo, na produção de ácido gálico. Dentre estas características destacam-se as estabilidades térmica e ao pH elevadas e a manutenção da atividade na presença de alguns solventes, quelantes, surfactantes, íons e desnaturantes diferindo substancialmente das tanases conhecidas até o momento. Estas formas tanásicas ainda tiveram maiores afinidades pelo substrato sintético metil galato em detrimento ao natural, ácido tânico. As enzimas extra e intracelular foram caracterizadas quanto a sua massa molar, sendo heterodímeros de 218,8 kDa e 154,9 kDa, respectivamente. As tanases de *A. phoenicis* são glicoproteínas com 65,1% e 43,2% de conteúdo de carboidratos, respectivamente, para as formas extra e intracelular. Adicionalmente, apresentam uma característica incomum entre as tanases fúngicas, que é a produção de propilgalato a partir da transesterificação de ácido gálico. A produção desses dois compostos a partir de taninos é bastante desejável para a indústria, o que justificaria a aplicabilidade das tanases produzidas por *A. phoenicis*. Além disso, a tanase pode ser produzida também em meio sólido utilizando folhas vegetais como substrato, não requerendo a adição de outros compostos com maior valor agregado como fonte de taninos, sendo esta uma propriedade bastante cobiçada comercialmente. Tais características, fazem dessas tanases promissoras ferramentas biotecnológicas para o emprego industrial.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, P. R. Mycelial amylase activities of thermophilic species of *Rhizomucor*, *Humicola* and *Papulaspora*. **Mycopatologia**, v. 112, p. 35-37, 1990.
- AGGER, T.; PETERSEN, J. B.; O'CONNOR, S. M.; MURPHY, R. L.; KELLY, Y. M.; NIELSEN, J. Physiological characterization of recombinant *Aspergillus nidulans* strain with different creA genotypes expressing *A. oryzae* α -amylase. **Journal of Biotechnology**, v. 92, p. 279-285, 2002.
- AGUILAR, C. N.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, 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.
- 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 and Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 296-302, 2001.
- AGUILAR, C. N.; RODRIGUEZ, R.; GUTIERREZ-SANCHEZ, G.; AUGUR, C.; FAVELA-TORRES, E.; PRADO-BARRAGAN, L. A.; RAMÍREZ-CORNEL, A.; CONTRERAS-ESQUÍVEL, J. C. Microbial tannases: advances and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 47-49, 2007.
- ALLAN, A.; STERBERG, D. β -glucosidase production by *A. phoenicis* in stirred-tank fermentors. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 10, p. 189-197, 1980.
- AOKI, K.; SHINKE, R.; NISHIRA, H. Purification and some properties of yeast tannase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, p. 79-85, 1976.
- AOKI, K.; TANAKA, T.; SHINKE, R. L.; NISHIRA, H. Detection of tannase in polyacrylamide gels. **Journal of Chromatography**, v. 170, p. 446-448, 1979.
- BAJPAI, B.; PATIL, S. Induction of tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity in some members of fungi imperfect. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, p. 612-614, 1997.
- BANERJEE, D.; PATI, B. R. Optimization of tannase production by *Aureobasidium pullulans* DBS 66. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 6, p. 1049-1053, 2007.

- BARTHOMEUF, C.; REGERAT, F.; POURRAT, H. Production, purification and characterization of tannase from *Aspergillus niger* LCF 8. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, p. 320-323, 1994.
- BATRA, A.; SAXENA, R. K. Potential tannase producers from genera *Aspergillus* and *Penicilium*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1553-1557, 2005.
- BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1832-1837, 2007.
- BELMARES, R.; CONTRERAS-ESQUÍVEL, J. C.; RODRIGUES-HERRERA, R.; CORONEL, A. R.; AGUILAR, C. N. Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 37, p. 857-864, 2004.
- 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.
- BEVERINI, M.; METCHE, M. Identification, purification and physicochemical properties of tannase of *Aspergillus niger*. **Sciences des Aliments**, v. 10, p. 807-816, 1990.
- BHARDWAJ, R.; SINGH, B.; BHAT, T. K. Purification and characterization of tannin acyl hydrolase from *Aspergillus niger* MTCC 2425. **Journal Basic Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 449-461, 2003.
- BHAT, T. K.; SINGH, B.; SHARMA, O. P. Microbial degradation of tannins: a current perspective. **Biodegradation**, v. 9, p. 343-357, 1998.
- BLUM, H.; BIER, H.; GROSS, H. L. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.
- BRADDOO, S.; GUPTA, R.; SAXENA, R. K. Screening of extracellular tannase producing fungi: development of a rapid and simple plate assay. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 42, p. 325-329, 1996.
- 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.

- BRUYNE, T. D.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. **Biochemical and Systematic Ecology**, v. 27, p. 445-459, 1999.
- CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. **The fungi**. London: Academic Press, 1994. 482 p.
- CARREA, G.; RIVA, S. Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 39, p. 2226-2254, 2000.
- CASSELTON, L.; ZOLAN, M. The art and design of genetic screens: filamentous fungi. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 9, p. 683-697, 2002.
- CHAE, S.; YU, T. Experimental manufacture of acorn wine by fungal tannase. **Hanguk Sipkum Kwahakoechi**, v. 15, p. 326-332, 1983.
- CHANG, F. S.; CHEN, P. C.; CHEN, R. L. C.; LU, F. M.; CHENG, T. J. Real-time assay of immobilized tannase with a stopped-flow conductometric device. **Bioelectrochemistry**, v. 69, p. 113-116, 2006.
- 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. 2009.
- CHHOKAR, V.; SEEMA; BENIWAL, V.; SALAR, R. K.; NEHRA, K. S.; KUMAR, A. E.; RANA, J. S. Purification and characterization of extracellular tannin acyl hydrolase from *Aspergillus heteromorphus* MTCC 8818. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, n. 5, p. 793-799, 2010.
- COSTA, A. M. **Produção, purificação e caracterização de tanases de *Aspergillus tamaritii***. 2007. 36 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular)-Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.
- 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.
- DAVIS, B. J. Disk eletroforeses. II. Method and application to human serum proteins. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 121, p. 407-427, 1964.

- DESCHAMPS, A. M.; OTUK, G.; LEBEAULT, J. M. Production of tannase and degradation of chestnut tannins by bacteria. **Journal of Fermentation Technology**, v. 61, n. 1, p. 55-59, 1983.
- DESHPANDE, S. S.; CHERYAN, M.; SALUNKHE, D. K. Tannin analysis of food products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 24, n. 4, p. 401-449, 1986.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytic Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- EL-FOULY, M. Z.; EL-AWAMRY, Z.; SHAHIN, A. A. M.; EL-BIALY, H. A.; NAEEM, E.; EL-SAEED, G. E. Biosynthesis and characterization of *Aspergillus niger* AUMC 4301 tannase. **Journal of American Science**, v. 6, n. 12, p.709-721, 2010.
- FARIA, A.; OLIVEIRA, J.; NEVES, P.; GAMEIRO, P.; SANTOS-BUELGA, C.; FREITAS, V. de; MATEUS, N. Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6896-6902, 2005.
- FARIAS, G. M.; GORBEA, C.; ELKINS, J. R.; GRIFFIN, G. J. Purification, characterization, and substrate relationships of the tannase from *Cryphonectria parasitica*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 44, n. 1, p. 51-63, 1994.
- FLACHNER, B.; BRUMBAUER, A.; RECZEY, K. Stabilization of β -glucosidase in *Aspergillus phoenicis* QM329 pellets. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 362-367, 1999.
- FUJITA, A.; YOSHIDA, T.; ICHISHIMA, E. Five crucial carboxil residues of 1,2-alfamannosidase from *Aspergillus satoi* (*A. phoenicis*), a food microorganism, are identified by site-directed mutagenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 238, n. 3, p. 779-783, 1997.
- GAATHON, A.; GROSS, Z.; ROZHANSKI, M. Propyl gallate: enzymatic synthesis in a reverse micelle system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 604-609, 1989.
- GARCA-CONESA, M. T.; OSTERGAARD, P.; KAUPPINEN, S.; WILLIAMSON, G. Hydrolysis of diethyl diferulates by a tannase from *Aspergillus oryzae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, n. 4, p. 319-324, 2001.

GOEL, G.; PUNIYA, A. K.; AGUILAR, C. N.; SING, K. Interaction of gut microflora with tannins in feeds. **Naturwissenschaften**, v. 92, p. 497-503, 2005.

GOMES, E.; GUES, M. A.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

GOMPERTZ, O. F.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; CORRÊA, B. Biologia dos fungos. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 365-397.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999.

GUPTA, R.; BRADDOO, S.; SAXENA, R. K. Rapid purification of extracellular tannase using polyethylene glycol-tannic acid complex. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, p. 253-255, 1997.

HADI, T. A.; BANERJEE, R.; BHATTARCHARYYA, B. C. Optimization of tannase biosynthesis by newly isolated *Rhizopus oryzae*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 11, p. 239-243, 1994.

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

HATAMOTO, O.; WATARAI, 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.

HOLLEMAN, A. F.; WIBERG, E.; WIBERG, N. **Inorganic chemistry**. San Diego: Academic Press, 2001. 1884 p.

HOTA, S. K.; DUTTA, J. R.; BANERJEE, R. Immobilization of tannase from *Rhizopus oryzae* and its efficiency to produce gallic acid from tannin rich agro-residues. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 200-204, 2007.

IIBUCHI, S.; MINODA, Y.; YAMADA, K. Hydrolyzing pathway, substrate specificity and inhibition of tannin acyl hydrolase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 36, p. 1553-1568, 1972.

- JINWAL, U. K.; ROY, U.; CHOWDHURY, A. R.; BHADURI, A. P.; ROY, P. K. Purification and characterization of an alkaline Lipase from a newly isolated *Pseudomonas mendocina* PK-12CS and chemoselective hydrolysis of fatty acid ester. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 6, p. 1041-1046, 2003.
- KAR, B.; BANERJEE, R. Biosynthesis of tannin acyl hydrolase from tannin-rich forest residue under different fermentation conditions. **The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 29-38, 2000.
- KAR, B.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. C. Microbial production of gallic acid by modified solid state fermentation. **The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 173-177, 1999.
- KAR, B.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. C. Effect of additives on the behavioral properties of tannin acyl hydrolase. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1285-1293, 2003.
- KASIECZKA-BURNECKA, M.; KUC, K.; KALINOWSKA, H.; KNAP, M.; TURKIEWICZ, M. Purification and characterization of two cold-adopted extracellular tannin acyl hydrolases from an Antarctic strain *Verticillium* sp. P9. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 77-89, 2007.
- 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.
- KIM, T. U.; GU, B. G.; JEONG, J. Y.; BYUN, S. M.; SHIN, Y. C. Purification and characterization of a maltotetraose-forming alkaline (alpha)-amylase from an alkalophilic *Bacillus* strain, GM8901. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 8, p. 3105-3112, 1995.
- KUEK, C. Production of glucoamylase using *Aspergillus phoenicis* immobilized in calcium alginate beads. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 466-470, 1991.
- KUMAR, R. A.; GUNASEKARAN, P.; LAKSHMANAN, M. Biodegradation of tannic acid by *Citrobacter freundii* isolated from a tannery effluent. **Journal of Basic Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 161-168, 1999.
- KUMAR, R. A.; SHARMA, J.; SINGH, R. Production of tannase from *Aspergillus ruber* under solid-state fermentation using Jamun (*Syzygium cumini*) leaves. **Microbiological Research**, v. 162, n. 4, p. 384-390, 2007.

- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Comparative titres, localization and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus Niger* PKL104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. **Process Biochemistry**, v. 29, n. 6, p. 497-503, 1994.
- 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.
- LEÓN-GALVÁN, F.; TORRES-PACHECO, I.; JIMENEZ-ESPINOZA, F.; ROMERO-GOMEZ, S.; GUEVARA-OLVERA, L.; BARBA DE LA ROSA, A. P.; GONZALEZ-CHAVIRA, M. M.; GUEVARA-GONZALEZ, R. G. Molecular and biochemical characterization of extracellular tannin acyl hydrolase activity from a Mexican isolate of *Aspergillus niger*. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 69, n. 12, p. 942-947, 2010.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.
- LEONE, F. A.; BARANAUSKAS, J. A.; CIANCAGLINI, P. Enzyplot: a microcomputer assistant program for teaching enzyme kinetics. **Biochemistry Educational**, v. 37, p. 35-37, 1995.
- LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, p. 658-666, 1934.
- LOKESWARI, N.; JAYA-RAJU, K.; NARASIMHA-RAO, M. Production of gallic acid from tannin using three different fungal strains by submerged fermentation. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 1, p. 21-28, 2007.
- LOKESWARI, N.; JAYARAJU, K.; POLA, S.; BOBBARALA, V. Tannin acyl hydrolase from *Trichoderma viride*. **International Journal of Chemical and Analytical Science**, v. 1, n. 5, p. 106-109, 2010.
- LOPES, S. M. F.; LEITAO, A. L.; REGALLA, M.; FIGUEIREDO MARQUES, J. J.; TEIXEIRA CARRONDO, M. J.; BARRETO CRESPO, M. T. Characterization of a highly thermostable extracellular lipase from *Lactobacillus plantarum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 76, n. 1-2, p. 107-115, 2002.

- LÓPEZ, N.; PERNAS, M. A.; PASTRANA, L. M.; SÁNCHEZ, A.; VALERO, F.; RÚA, M. Reactivity of pure *Candida rugosa* lipase isoenzymes (Lip1, Lip2, and Lip3) in aqueous and organic media. Influence of the isoenzymatic profile on the lipase performance in organic media. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 65-73, 2004.
- LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 10th ed. New Jersey: Prentice Hall, 2003. 1385 p.
- MAHAPATRA, K.; NANDA, R. K.; BAG, S. S.; BANERJEE, R.; PANDEY, A.; SAKACS, 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.
- MANJIT, S. K.; ANITA, Y.; AGGARWAL, N. K.; KUMAR, K.; KUMAR, A. Tannase production by *Aspergillus fumigatus* MA under solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 3023-3030, 2008.
- MATA-GÓMEZ, M.; RODRÍGUEZ, L. V.; RAMOS, E. L.; RENOVATO, J.; CRUZ-HERNÁNDEZ, M. A.; RODRÍGUEZ, R.; CONTRERAS, J.; AGUILAR, C. N. J. A novel tannase from the xerophilic fungus *Aspergillus niger* GH1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 9, p. 987-996, 2009.
- MINGSHU, L.; KAI, Y.; QIANG, H.; DONGYING, J. Biodegradation of gallotannins and ellagitannins. **Journal Basic Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 68-84, 2006.
- MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. New developments in solid state fermentation. II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1211-1225, 2000.
- MONDAL, K. C.; BANERJEE, R.; PATI, R. B. Tannase production by *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology Letters**, v. 8, p. 767-769, 2000.

- MONDAL, K. C.; BANERJEE, D.; BANERJEE R.; PATI, B. R. Production and characterization of tannase from *Bacillus cereus* kbr9. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 47, p. 263-267, 2001.
- MUKHERJEE, G.; BANERJEE, R. Biosynthesis of tannase and gallic acid from tannin rich substrates by *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus foetidus*. **Journal Basic Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 42-48, 2004.
- 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, n. 3, p. 207-212, 2006.
- 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, p. 331-339, 2003.
- NATARAJAN, K.; RAJENDRAN, A. Effect of fermentation parameters on extra cellular tannase production by *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407. **E-Journal of Chemistry**, v. 6, p. 979-984, 2009.
- NUERO, O. M.; REYES, F. Enzymes for animal feeding from *Penicillium chrysogenum* mycelial wastes from penicillin manufacture. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 413-416, 2002.
- OJHA, A.; VERMA, N.; SHARMA, H.; CHAUHAN, D.; RAWAT, A.; AGARWAL, B. Optimization of fermentation conditions for production of tannase enzyme by *Apergillus japonicus*. **Developmental Microbiology and Molecular Biology**, v. 1, n. 1, p. 13-20, 2010.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.
- PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 29, p. 119-131, 1999.
- PARMENTIER, F.; VERBRUGGEN, D. On the inhibition of tannase. **Archives Internationales de Physiologie, de Biochimie et de Biophysique**, v. 81, n. 2, p. 339-341, 1973.

- PEEK, K.; DANIEL, R. M.; MONK, C.; PARKER, L.; COOLBEAR, T. Purification and characterization of a thermostable proteinase isolated from *Thermus* sp Strain Rt 41A. **European Journal of Biochemistry**, v. 207, p. 1035-1044, 1992.
- PELCZAR, M. J. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia, conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Markron Books, 1996. v. 1, 524 p.
- 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.
- PÉREZ-GUERRA, N.; TORRADO-AGRASAR, A.; LÓPEZ-MACIAS, C.; PASTRANA, L. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 2, n. 3, p. 343-350, 2003.
- PERSSON, I.; TJERNELD, F.; HAHN-HAGERDAL, B. Production of β -glucosidase with *Aspergillus phoenicis* QM329 in aqueous two-phase systems. **Biotechnology Techniques**, v. 3, n. 4, p. 265-270, 1989.
- PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005. 444 p.
- PINTO, G. A. S. **Produção de tanase por *Aspergillus niger***. 2003. 208 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.
- PINTO, G. A. S.; 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.
- PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul: Ed. UFSCS, 2002. v. 2.
- RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 175-188, 1998.
- RAJAKUMAR, G. S.; NANDY, S. C. Isolation, purification, and some properties of *Penicillium chrysogenum* tannase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 525-527, 1983.

- RAMIREZ-CORNEL, M. A.; VINIEGRA-GONZALEZ, G.; DARVILL, A.; AUGUR, C. A novel tannase from *Aspergillus niger* with α -glucosidase activity. **Microbiology**, v. 149, p. 525-527, 2003.
- RANA, N.; BHAT, T. Effect of fermentation system on the production and properties of tannase of *Aspergillus niger* van Tieghem MTCC 2425. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 203-212, 2005.
- RAVEN, P. H.; EVERET, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.
- RECZEY, K.; STALBRAAND, H.; PERSSON, I.; HAHN-HAGERDAL, B.; TJERNELD, F. Continuous cellobiose hydrolysis using self-immobilized β -glucosidase from *Aspergillus phoenicis* QM329 in a fluized-bed reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24, p. 637-649, 1990.
- 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.
- RIZZATTI, A. C. S.; SANDRIM, V. C.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Influence of temperature on the properties of the xylanolytic enzymes of the thermotolerant fungus *Aspergillus phoenicis*. **The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 88-93, 2004.
- RODRIGUES, T. R. S.; PINTO, G. A. S.; GONÇALVES, L. R. B. Effects of inoculum concentration, temperature and carbon sources on tannase production during solid state fermentation of cashew apple bagasse. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 13, p. 571-576, 2008.
- RUSTIGUEL, C. B.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. A novel silver-activated extracellular β -fructofuranosidase from *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 67, p. 10-15, 2010.
- SABU, A.; AUGUR, C.; SWATI, C.; PANDEY, A. Tannase production by *Lactobacillus* sp. ASR-S1 under solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 575-580, 2006.

SABU, A.; PANDEY, A.; JAAFAR DAUD, M.; SZAKACS, G. Tamarind seed powder and palm kernel cake: two novel agro residues for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* ATCC 16620. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1223-1228, 2005.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Rio de Janeiro: Eventos, 2002. 121 p.

SANTOS, M. A. T. **Caracterização química das folhas de brócoli e couve-flor (*Brassica oleracea* L.) para utilização na alimentação humana**. 2000. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.

SELIG, M. J.; KNOSHAUG, E. P.; DECKER, S. R.; BAKER, J. O.; HIMMEL, M. E.; ADNEY, W. S. Heterologous expression of *Aspergillus niger* beta-D-xylosidase (XlnD) characterization on lignocellulosic substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 146, p. 57-68, 2008.

SELWAL, M. K.; YADAV, A.; SELWAL, K. K.; AGGARWAL, N. K.; GUPTA, R.; GAUTAM, S. K. Optimization of culture conditions for tannase production by *Pseudomonas aeruginosa* III B 8914 under submerged fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 599-605, 2010.

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

SHARMA, G.; GUPTA, M. N. Synthesis of antioxidant propyl gallate using tannase from *Aspergillus niger* van Tieghem in nonaqueous media. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 395-397, 2003.

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

SHARMA, S.; BHAT, T. K.; DAWRA, R. K. Isolation, purification and properties of tannase from *Aspergillus niger* van Tieghem. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, n. 6, p. 673-677, 1999.

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.

SHELDON, J. B.; DUFFDAVID, G.; COOPER, D. G.; FULLER, O. M. Evaluation of the hydrolytic potential of a crude cellulase from mixed cultivation of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, n. 5, p. 305-308, 1985.

SILVA, T. M. **Produção e determinação das propriedades funcionais das amilases de *Aspergillus niveus***. 2009. 171 f. Tese (Doutorado em Biologia Comparada) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

SKENE, I. K.; BROOKER, J. D. Characterization of tannin acylhydrolase activity in the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. **Anaerobe**, v. 1, n. 6, p. 321-327, 1995.

SMITH, D. C.; BHAT, K. M.; WOOD, T. M. Xylan-hydrolysing enzymes from thermophilic and mesophilic fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, p. 475-484, 1991.

SMITH, M. T.; BATENBURG-VAN DER VEGTE, W. H. Ultrastructure in septa in *Blastobotrys* and *Sporothrix*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 51, p. 121-128, 1985.

SUWASONO, S.; RASTALL, R. A. A highly region selective synthesis of mannobiose and mannotriose by reverse hydrolysis using specific 1,2- α -mannosidase from *Aspergillus phoenicis*. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 7, p. 851-856, 1996.

TAYLOR, J. W.; JOEY, S.; BERBEE, M. **Ascomycota. Sac Fungi**: in the tree of life web project. Disponível em: <<http://tolweb.org/Ascomycota/20521/2006.10.09>>. Acesso em: 29 jan. 2011.

TEWARI, Y. B.; SCHANTZ, M. M.; REKHARSKY, M. V.; GOLDBERG, R. N. Thermodynamics of hydrolysis of 3,4,5-trihydroxybenzoic acid propyl ester (n-propylgallate) to 3,4,5-trihydroxybenzoic acid (gallic acid) and propan-1-ol in aqueous media and in toluene. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 28, p. 171-185, 1996.

THOMAS J. LIPTON INC. (United State). G. Sanderson; N. Englewood; P. Coggon; N. Orngeburg. **Green tea conversion using tannase and natural tea leaves**, US 3812266, 7 Aug. 1973, 21 May 1974.

- TOTH, G.; HENSLER, D. The enzymatic synthesis of gallic acid derivatives. **Acta Chimica II**, v. 10, p. 209-212, 1952.
- TREVIÑO-CUETO, B.; LUIS, M.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; RODRÍGUEZ, R.; AGUILERA, A.; AGUILAR, C. N. Gallic acid and tannase accumulation during fungal solid state culture of tannin-rich desert plant (*Larrea tridentata* Cov.). **Bioresource Technology**, v. 98, p. 721-724, 2007.
- TUNGA, R.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. C. Optimization of n-variable biological experiments by evolutionary operation-factorial design technique. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, p. 125-131, 1999.
- VALEE, B. L.; ULMER, D. D. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. **Annual Review of Biochemistry**, v. 41, p. 91-128, 1972.
- VAN DE LAGEMAAT, J.; PYLE, D. L. Modeling the uptake and growth kinetics of *Penicillium glabrum* in a tannic acid containing solid-state fermentation for tannase production. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1773-1782, 2005.
- VOGEL, H. F. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. **American Naturalist**, v. 98, p. 435-446, 1964.
- WEETALL, H. H. Enzymatic gallic acid esterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, n. 2, p. 124-127, 1985.
- WISEMAN, A. **Handbook of enzyme biotechnology**. New York: John Wiley and Sons, 1975. 276 p.
- YAMADA, H.; ADACHI, O.; WATANABE, M.; SATO, N. Studies on fungal tannase. Part I. Formation, purification, and catalytic properties of tannase of *Aspergillus flavus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 32, n. 9, p. 1070-1078, 1968.
- YU, X.; LI, Y.; WU, D. Enzymatic synthesis of gallic acid esters using microencapsulated tannase: effect of organic solvents and enzyme specificity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 2, p. 69-73. 2004.
- YU, X. W.; LI, Y. D. Kinetics and thermodynamics of synthesis of propyl gallate by mycelium-bound tannase from *Aspergillus niger* in organic solvent. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, p. 44-50, 2006.

ZENG, Y.; ZHANG, S. Purification and properties of β -xylosidase from *Aspergillus phoenicis*. **Acta Microbiology Sinica**, v. 33, n. 6, p. 427-433, 1993.

ZENG, Y. C.; LI, Y. T.; GU, Y. J.; ZHANG, S. Z. Purification and characterization of a strictly β -furanosidase from *Aspergillus phoenicis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 298, p. 226-230, 1992.

ZHONG, X.; PENG, L.; ZHENG, S.; SUN, Z.; REN, Y.; DONG, M.; XU, A. Secretion, purification, and characterization of a recombinant *Aspergillus oryzae* tannase in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 36, p. 165-169, 2004.