

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Produção e Caracterização das Tanases
do Fungo Filamentoso *Aspergillus carbonarius***

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

Larissa Serrani Valera

Araraquara

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Produção e Caracterização das Tanases
do Fungo Filamentoso *Aspergillus carbonarius***

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

Larissa Serrani Valera

Araraquara

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

V162p Valera, Larissa Serrani
Produção e caracterização das Tanases do fungo
filamentoso *Aspergillus carbonarius* / Larissa Serrani
Valera. – Araraquara : [s.n], 2014
88 f. : il.

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

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

LARISSA SERRANI VALERA

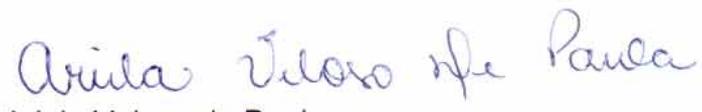
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Araraquara, 27 de novembro de 2014.

BANCA EXAMINADORA



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



Profª Drª Ariela Veloso de Paula
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Profª Drª Eleonora Cano Carmona
Instituto de Biociências - UNESP, Rio Claro

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade que me foi dada, pela força de enfrentar e pular os obstáculos colocados durante a caminhada.

Ao meu pai, Braz Valera Junior, por todo apoio, carinho, dedicação e paciência nesta jornada, a minha mãe Adalgisa Serrani Valera, que mesmo longe sei que acompanhou toda esta fase me dando muita luz e força. Ao meu irmão Victor, pela paciência, amor, compreensão e caronas para USP rsrs.

Aos meus velhinhos, Gregória, Ana, Braz e Mario, por todo carinho, dedicação e por sempre acreditarem em mim, amo vocês.

Ao meu Tio Wagner, pelo apoio, pelo crédito depositado, pelo incentivo e até pelas ligações de preocupação.

A minha segunda família Tia Marta, Tio Sergio, Paty, Ane e Fa pelo apoio, por sempre acreditarem em mim e pela presença no momento mais difícil da minha vida.

A Lucia por sempre cuidar de mim e da minha família.

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

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

A minha amiga, Marluce por me ouvir, me apoiar e me aconselhar quando necessário, e pelos momentos de distração, muita risada e por todos estes anos de amizade, muito obrigada.

A minha amiga Natália, por todo o apoio dado em todos os momentos, o incentivo, o companheirismo, a amizade de anos e anos e também pela ajuda em toda a parte gráfica feita neste trabalho, sem você não sairia da forma que eu mais queria muito obrigada, super profissional.

As amigas que ganhei no laboratório Vanessa, Cynthia, Alana e Thais obrigada pela amizade, conselhos, pela paciência nos ensinamentos e por compartilhar comigo vários momentos, me apoiando sempre que preciso. Em especial Gabi, muito obrigada pelas longas conversas, pelo super apoio, pelas estadias em São Carlos rsrs, em tão pouco tempo me identifiquei demais com você. Meninas vocês estarão sempre no meu coração, lembrarei com muito carinho cada momento que passamos juntas. MUITO OBRIGADA POR TUDO.

A minha amiga Isabele, que muito me ajudou durante o mestrado, obrigada por tudo, não sei o que seria de mim sem você nesta fase.

As minhas mais novas amigas e companheiras de trabalho, Patricia, Erika e Paula, que acompanharam a reta final do meu mestrado, me dando muito apoio nesta fase que termina e em outra que se inicia, muito obrigada meninas.

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

Ao Técnico Mauricio pelo auxílio técnico, pela disponibilidade e colaboração ao desenvolvimento desse trabalho.

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 CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

Os meus mais sinceros agradecimentos.

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

Paulo Freire

Dedico este trabalho ao meu pai Braz, ao meu irmão Victor e ao Davi, por todo apoio, paciência companherismo e dedicação e em especial minha mãe Adalgisa por acompanhar e iluminar meus passos.

Larissa Serrani Valera graduou-se em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Barão de Mauá (2011). 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 “Produção e Caracterização das Tanases do Fungo Filamentoso *Aspergillus carbonarius*” 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	IV
ÍNDICE DE TABELAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 TANINOS	2
1.1.1 TANINOS HIDROLIZÁVEIS	2
1.1.2 TANINOS CONDENSADOS	4
1.2 TANASE	5
1.3 MECANISMO DE AÇÃO HIDROLÍTICA	6
1.4 FONTES DE TANASE	7
1.5 TANASES EM MICRO-ORGANISMOS	8
1.6 PROCESSOS FERMENTATIVOS NA PRODUÇÃO DE TANASES	10
1.7 APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DAS TANASES	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 GERAL	14
2.2 ESPECÍFICOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 MICRO-ORGANISMO DE ESTUDO	17
3.2 MANUTENÇÃO DA LINHAGEM EM LABORATÓRIO E OBTENÇÃO DAS CULTURAS	17
3.2.1 PREPARO DOS PRODUTOS AGROINDUSTRIAIS E FOLHAS VEGETAIS	18
3.3 OBTENÇÃO DAS ENZIMAS EXTRACELULAR E INTRACELULAR	18
3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	19
3.5 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS	19
3.6 PURIFICAÇÃO DA TANASE EXTRACELULAR EM COLUNA CROMATOGRÁFICA	20
3.7 PROCEDIMENTO ELETROFORÉTICO	21
3.8 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR	21
3.9 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS TANASES	21

3.9.1	TEMPERATURA ÓTIMA E ESTABILIDADE TÉRMICA	21
3.9.2	pH ÓTIMO E ESTABILIDADE AO pH	22
3.9.3	EFEITO DE DIFERENTES COMPOSTOS NA ATIVIDADE TANÁSICA	22
3.10	HIDRÓLISE DE DIFERENTES SUBSTRATOS E ANÁLISE DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE DO ÁCIDO TÂNICO E DO METIL GALATO	22
3.11	DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS	22
3.12	ANÁLISE DOS EXPERIMENTOS	23
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1	PRODUÇÃO DE TANASES POR <i>ASPERGILLUS CARBONARIUS</i> EM FSBM E EM FSS	26
4.1.1	PRODUÇÃO DE TANASES POR <i>ASPERGILLUS CARBONARIUS</i> EM FSBM	27
4.1.2	PRODUÇÃO DE TANASE POR <i>ASPERGILLUS CARBONARIUS</i> EM FSS	32
4.2	PURIFICAÇÃO DA TANASE EXTRACELULAR	36
4.3	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA TANASE EXTRACELULAR PURIFICADA	41
4.3.1	DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR NATIVA E CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS	42
4.3.2	INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO pH SOBRE A ATIVIDADE TANÁSICA	43
4.3.3	EFEITO DE DIFERENTES SAIS E OUTROS COMPOSTOS NA ATIVIDADE TANÁSICA	45
4.3.4	HIDRÓLISE DO ÁCIDO TÂNICO E DO METIL GALATO	48
4.3.5	PARÂMETROS CINÉTICOS	49
4.3.6	ANÁLISE DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE DO ÁCIDO TÂNICO E DO METIL GALATO	51
5.	CONCLUSÕES	53
6.	REFERÊNCIAS	55
7.	ANEXOS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Divisão dos taninos hidrolisáveis	3
Figura 2. Taninos condensados	4
Figura 3. Hidrolise do ácido tânico pela ação da tanase R ₁ (radical galoil) e R ₂ (radical digaloil).	5
Figura 4. Estrutura do ácido tânico	7
Figura 5. Esquema representativo dos experimentos apresentados neste trabalho	16
Figura 6. Eletromicrografia de varredura de conídios de <i>A. carbonarius</i>	17
Figura 7. Produção de tanase intra e extracelular em diferentes meios de cultivo por <i>A. carbonarius</i> em U/mL (A) e atividade específica (U/mg de proteína) (B)	28
Figura 8. Efeito da concentração de ácido tânico na produção de tanase extracelular e intracelular por <i>A. carbonarius</i> . Cultivos realizados em meio Banerjee, por 3 dias sob agitação a 30°C	31
Figura 9. Produção de tanases intra e extracelular pelo fungo <i>A. carbonarius</i> em FSbm função do tempo de cultivo	32
Figura 10. Efeito de diferentes soluções umectantes adicionadas a FSS sobre a produção de tanases por <i>A. carbonarius</i> , tendo chá verde como substrato	34
Figura 11. Produção de tanase extracelular pelo fungo <i>A. carbonarius</i> em função do tempo de cultivo em FSS com folhas de chá verde umidificado com água de torneira (1:1 m/v), sendo o cultivo realizado a 30°C em atmosfera com umidade relativa de 60%	35
Figura 12. Perfis cromatográficos em coluna DEAE-Celulose e Sepharose CL6B para tanase extracelular produzida por <i>A. carbonarius</i> em FSS.	39
Figura 13. Perfil eletroforético da tanase extracelular em PAGE 6% revelado com Comassie Blue Silver e em SDS-PAGE 6% corado por Comassie Blue Silver	40
Figura 14. Determinação da temperatura ótima aparente, pH ótimo aparente, estabilidade térmica e ao pH para a atividade da tanase extracelular purificada de <i>Aspergillus carbonarius</i>	44
Figura 15. Influência de diferentes concentrações de Ag ₂ SO ₄ sobre a atividade tanásica	47
Figura 16. Determinação da hidrólise dos substratos ácido tânico, metil galato e ácido tânico : metil galato , em diferentes tempos de reação, pela tanase extracelular produzida por <i>A. carbonarius</i>	48

Figura 17. Representação gráfica de duplo recíproco para determinação do K_m e V_{max} para a tanase purificada extracelular para os substratos ácido tânico e metil galato_____50

Figura 18. Perfil cromatográfico em camada delgada (TLC) do ácido gálico formado a partir da hidrólise do ácido tânico e do metil galato , pela tanase extracelular, obtido em diferentes tempos de reação_____52

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Características de algumas tanases fúngicas produzidas por diferentes processos fermentativos_____	9
Tabela 2. Produção de tanases intra e extracelulares por <i>A. carbonarius</i> em diferentes condições e temperaturas_____	29
Tabela 3. Atividade tanásica intra e extracelular em função da fonte de carbono utilizada em FSbm_____	30
Tabela 4. Produção de tanase por <i>Aspergillus carbonarius</i> em FSS em função do substrato/fonte de carbono_____	33
Tabela 5. Efeito da umidificação com água de torneira em diferentes proporções adicionadas a FSS com folha de chá verde como fonte de carbono sobre a produção de tanases por <i>A. carbonarius</i> _____	35
Tabela 6. Tratamento do extrato bruto enzimático com diferentes compostos químicos em diferentes concentrações_____	37
Tabela 7. Purificação da tanase extracelular produzida por <i>A. carbonarius</i> em FSS _____	40
Tabela 8. Efeito de íons metálicos na atividade tanásica extracelular do fungo <i>A. carbonarius</i> _____	46
Tabela 9. Efeito de compostos químicos na atividade tanásica extracelular do fungo <i>A. carbonarius</i> _____	47
Tabela 10. Parâmetros cinéticos para tanase extracelular produzida por <i>A. carbonarius</i> _____ _____	51

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	absorbância
BDA	batata dextrose ágar
DEAE	Diethylaminoethyl
EC	Enzyme Commission
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FSbm	Fermentação Submersa
FSS	Fermentação em Substrato Sólido
g	grama
g	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
SDS	duodecil sulfato de sódio
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
λ	comprimento de onda

RESUMO

Atualmente, a biotecnologia é acompanhada dos estudos sobre o funcionamento, estrutura e utilização, principalmente na indústria, das enzimas obtidas a partir de micro-organismos, o que têm despertado grandes interesses em pesquisadores da área. De modo especial, os fungos filamentosos vêm se destacando como grandes produtores de enzimas, principalmente o gênero *Aspergillus*, pertencente aos ascomicetos. Dentre as enzimas de interesse biotecnológico encontramos a tanino acil hidrolase (EC 3.1.1.20), também conhecida como tanase, a qual pode ser produzida por fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Desta forma, foi objetivo deste trabalho o estudo da produção de tanases pelo fungo filamentoso *Aspergillus carbonarius* padronizando-se as melhores condições físico-químicas para o crescimento do micro-organismo, visando a obtenção de tanases em níveis elevados assim purificando e caracterizando-as bioquimicamente.

Os maiores níveis enzimáticos em FSS foram obtidos utilizando folhas de chá verde trituradas como fonte de carbono umedecidas com água de torneira (1:1 m/v) a 30°C por 3 dias. A tanase foi purificada 11,3 vezes com recuperação de 98%, após dois passos cromatográficos, DEAE-Celulose e Sepharose CL-6B. A enzima possui massa molar de 134,89 kDa com 50% de carboidratos. A temperatura ótima de atividade foi de 60°C e o pH ótimo foi 5,0. A tanase se mostrou bastante estável entre as temperaturas de 40°C a 65°C e em pH ácido. A atividade enzimática foi aumentada em 32% na presença de Ag^+ , e foi inibida por Mg^+ , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} e Cu^{2+} . Os parâmetros cinéticos foram analisados, sendo que a enzima apresentou maior afinidade pelo substrato metil galato (K_m de 1,42mM) se comparado ácido tânico (K_m de 2,2mM).

Portanto conclui-se que a tanase produzida por *Aspergillus carbonarius* possui um bom potencial biotecnológico e é promissora para o emprego industrial.

ABSTRACT

Nowadays, biotechnology is accompanied by functional, structural and application studies, mainly in industry, of microbial enzymes, which have aroused great interest in researchers around the world. Specially filamentous fungi have been highlighted as the major enzymes producers, mostly *Aspergillus genera*, an ascomycete. Among the enzymes of biotechnological interest we can find the tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20), also known as tannase that can be produced by filamentous fungi, yeasts and bacterias. According to the this objective of this work was to study the production of tannase by *Aspergillus carbonarius* standardizing the best physico-chemical conditions for the microorganism growth, in order to obtain high levels of tannase, purifying and characterizing them biochemically.

The higher enzymes levels in SSF were obtained when it was used green tea leaves as carbon source moistured with tap water (1: 1 w / v) at 30° C for 3 days. Tannase was purified 11,3 fold with 98% of recover after two chromatographic steps: DEAE-celulose and Sepharose CL-6B. The enzyme has a molecular weight of 134,89 kDa with 50% of carbohydrates. The optimal temperature of activity was 60°C and the optimal pH was 5.0. Tannase showed quite stability to temperatures between 40°C and 65°C and under acid pH. The enzyme activity was strongly inhibited by Mg⁺, Fe²⁺, Zn²⁺, Al³⁺ e Cu²⁺. The kinetic parameters were analyzed and the enzyme showed higher affinity to the substrate methyl gallate (Km 1.42mM) in it compared to tannic acid (Km 2.2mM).

Therefore it is concluded that the tannase produced by *Aspergillus carbonarius* has great biotechnological potential and it is promising for industrial use.

1.INTRODUÇÃO

1.1 Taninos

Tanino é um termo amplamente usado para caracterizar a segunda maior classe de compostos fenólicos, que assim como os demais possui a função primordial e essencial de proteger os tecidos do vegetal contra o ataque de insetos, fungos ou de bactérias. Os taninos possuem alta massa molecular de 500 a 3000 Da, são considerados antioxidantes e combinam-se com celulose e pectina, além de precipitarem alcalóides, gelatina e proteínas (Santos; 2007, Mello., 2007).

Os taninos podem ser encontrados em diversas partes da planta como raiz, casca, caule, folhas e frutos, principalmente os "verdes", ou seja, não maduros, conferindo adstringência para proteger o vegetal e seus frutos contra os herbívoros. Esta sensação ocorre devido à precipitação de glucoproteínas salivares, provocando assim a perda do poder lubrificante (Monteiro; Albuquerque; Araújo, 2005). Além do sabor adstringente desagradável estas moléculas podem apresentar outros efeitos negativos para os animais como, por exemplo a ligação em 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).

Esses compostos são encontrados em abundância no reino vegetal e foram separados em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados, devido a algumas diferenças em suas estruturas químicas. Durante a degradação de taninos, ocorrem hidrólise e oxidação, catalisadas por diferentes enzimas produzidas pelos micro-organismos, tais como tanase, fenol-oxidase e decarboxilase (Pinto *et al.*, 2005).

1.1.1 Taninos hidrolisáveis

Recebem esta denominação os taninos que podem ser hidrolisados por enzimas como a tanase, por ácidos ou bases dando origem a álcoois, açúcares e ácidos carboxílicos fenólicos (Basttestin, 2004).

Eles são subdivididos em galotaninos e elagitaninos (figura 3). 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

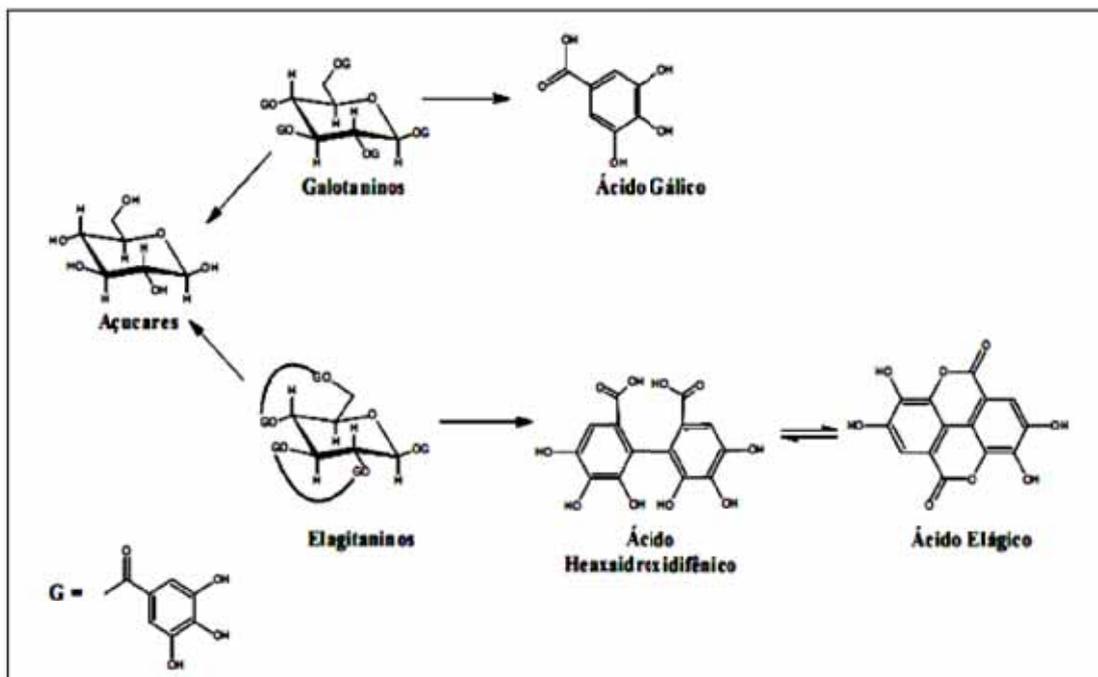
taninos podem produzir tanase com alta atividade para degradação deste componente (Mingshu *et al.*, 2006).

Os galotaninos surgem a partir da esterificação da glicose por grupos fenólicos formados por ácido gálico, ou digálico, estando as duas unidades galoil unidas por ligações depsídicas. 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 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).

Os elagitaninos são formados por moléculas de ácido hexaidroxidifênico que podem se desidratar espontaneamente para formar sua dilactona estável, o ácido elágico. Os elagitaninos tem massa molar entre 2 e 3 kDa (Pinto *et al.*,2005).

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) responsabilizam a tanase pelas duas atividades. Também relataram que a proporção entre essas duas atividades pode variar de acordo com as condições de cultivo.

Figura 1. Divisão dos taninos hidrolisáveis



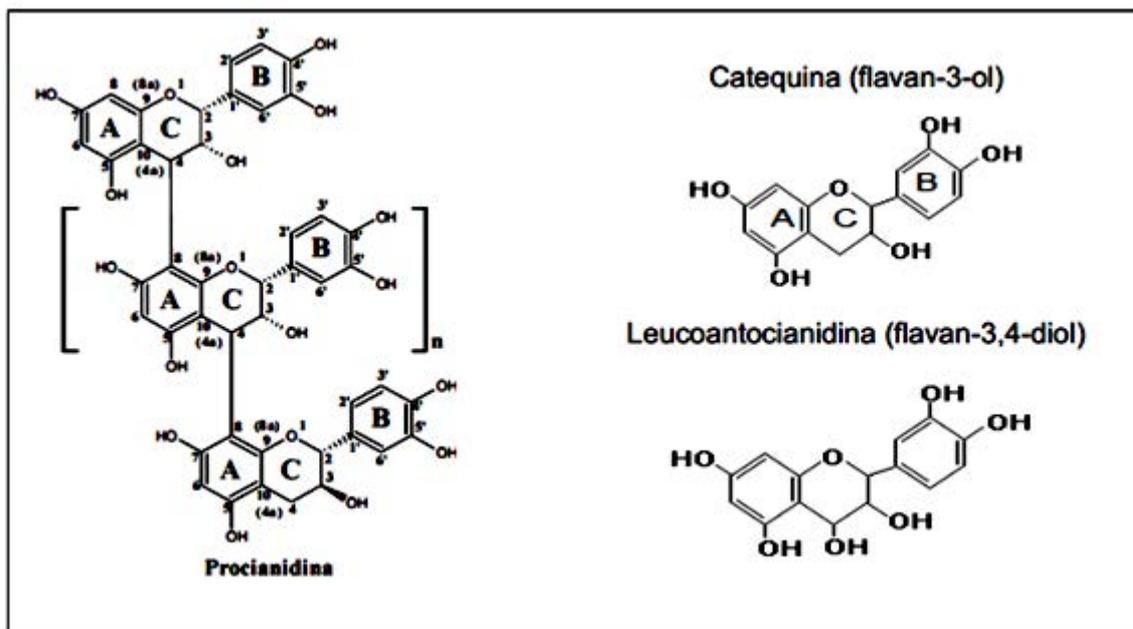
Fonte: (Melo, 2008).

1.1.2 Taninos condensados

Conhecidos como proantocianidinas são polímeros e oligômeros constituídos pela condensação de unidades de flavonoides como a leucoantocianidinas (flavan-3,4-diol) e catequinas (flavan-3-ol) por meio de ligações carbono-carbono (figura 4) (Santos, 2000). Os taninos condensados possuem estruturação complexa, poucos são suscetíveis a clivagem por hidrólise, mas podem ser solúveis em solventes orgânicos dependendo da sua estrutura (Faria *et al.*, 2005). Ao contrário dos taninos hidrolisáveis, os condensados não contém resíduos de carboidratos (Deshpande *et al.*, 1986). 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-metilação ou C- e O-glicosilação (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 2. Taninos condensados



Fonte: (MELO, 2008; SANTOS; 2007 MELLO, 2007).

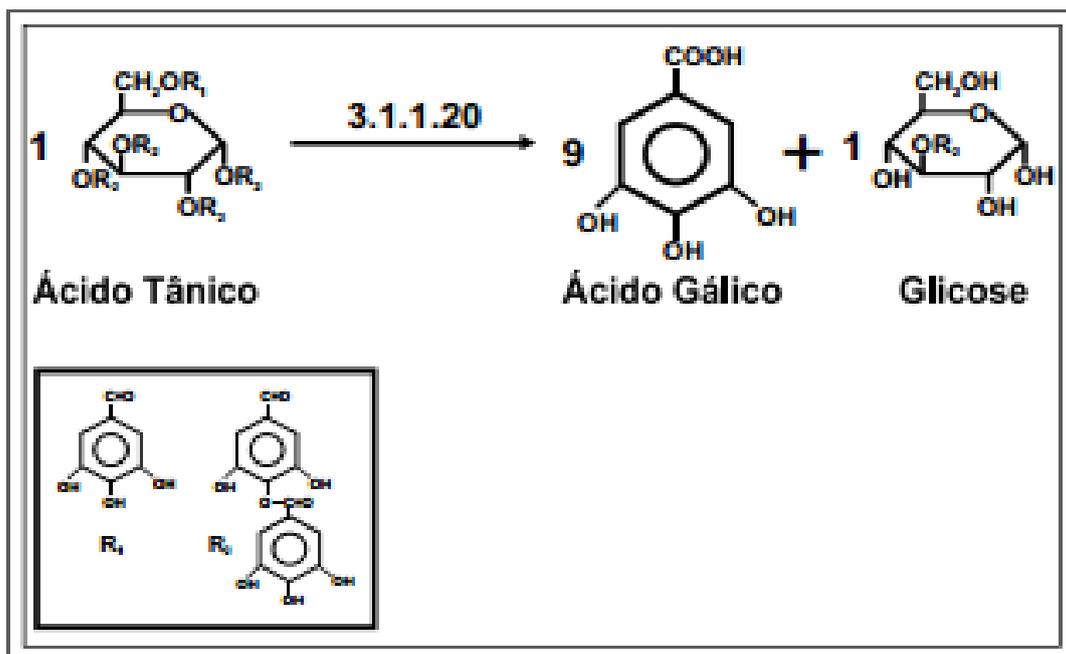
1.2 Tanase

Tanino acil hidrolase, também conhecida como tanase (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). Algumas ainda são capazes de realizar reação de transesterificação para a produção de propilgalato.

Esta enzima favorece a invasão dos micro-organismos, principalmente fungos, em vegetais pela hidrólise de parte dos compostos fenólicos presentes em tecidos vivos ou em decomposição, mais especificamente os taninos hidrolisáveis (Scalbert, 1991). As tanases podem ainda 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, assim como relatado por Lekha e Losane (1997), apontam que micro-organismos 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 micro-organismos.

Figura 3. Hidrólise do ácido tânico pela ação da tanase R₁ (radical galoil) e R₂ (radical digaloil).



Fonte: (Battestin *et al.*, 2004)

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

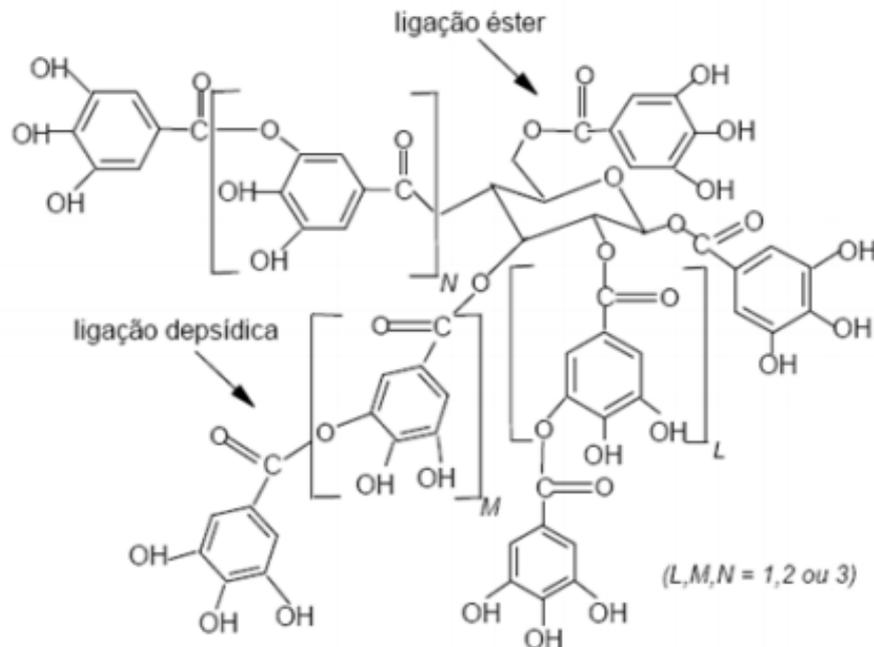
Os taninos são considerados os substratos naturais para as tanases, mas estas enzimas também são capazes de degradar ésteres de ácido gálico (Lekha e Losane, 1997). Diferentes espécies de fungos, principalmente as pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, têm sido relatadas como produtoras de tanases (Rajakumar e Nandy, 1983, Pinto *et al.*, 2001 Costa *et al.*, 2008). Segundo Yamada (1968) esta enzima encontra-se em maiores quantidades intracelularmente. No entanto, a enzima também pode ser secretada para o meio de cultura.

1.3 Mecanismo de ação hidrolítica

A tanase catalisa a quebra de ligações ésteres e depsídicas de taninos hidrolisáveis. Embora o ácido tânico considerado um galotanino seja conhecido por desnaturar proteínas, sabe-se que a tanase pode hidrolisá-lo completamente á ácido gálico e glicose (Lekha e Lonsane., 1997).

Os compostos intermediários desta reação são: 1, 2, 3, 4, 6,- pentagaloil glicose 2, 3, 4, 6,- tetragaloil glicose e dois tipos de monogaloil glicose (Iibuchi *et al.*, 1972). Quando o substrato da 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 R₂ (ácido digálico) nos carbonos 1, 2, 3 e 4, e aos radicais R₁ (ácido gálico) no carbono 6. Se o ácido tânico é metilado, o radical R₂ pode ser substituído em todas as posições por um radical R₃ (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).

Figura 4. Estrutura química do ácido tânico



Fonte: (Modificado de Nakamura, 2003)

No caso particular de elagitaninos, a informação é escassa e confusa, principalmente devido à complexidade química e diversidade de tipos de elagitaninos (Aguilera-Carbó, 2011).

1.4 Fontes de tanase

A tanase pode ser encontrada em plantas, animais e em micro-organismos. Com relação aos vegetais a tanase pode ser obtida de diferentes partes de *Terminalia chebula*, *Caesalpinia coriaria*, *Anogeissus latifolia*, *Cassia fistula* e *Acacia arabica*, principalmente em seus frutos, folhas, galhos e nas cascas (Banerjee e Kar, 2000). Quando consideradas fontes animais, a enzima pode ser obtida a partir do intestino bovino e das mucosas dos ruminantes. Por outro lado, os micro-organismos podem ser mencionados como as fontes mais importantes de obtenção desta enzima, uma vez que as tanases produzidas por eles são mais estáveis do que aquelas obtidas de outras fontes. Além disso, micro-organismos são mais vantajosos, pois podem produzir tanase em quantidades abundantes e de maneira contínua, com consequente aumento de rendimento (Aguilar *et al.*, 1999), podendo ainda serem

manipulados geneticamente melhorando as propriedades enzimáticas (Lekha & Lonsane, 1997).

1.5 Tanases em micro-organismos

Os micro-organismos 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 hidrolisam as macromoléculas até atingir a forma e a solubilidade necessária para que sejam transportadas pela membrana. Entre esses compostos hidrolisáveis, estão os polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lignina, lipídeos e taninos, entre outros (Putzke e Putzke, 2002).

A maioria dos micro-organismos 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 *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. e *Paecilomyces variotii* (Mahedran *et al.*, 2005). 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).

Ainda que algumas enzimas possam ser obtidas de fontes vegetais e animais, os micro-organismos merecem destaque para a produção industrial de tais biomoléculas por apresentarem vantagens econômicas. Micro-organismos podem ser cultivados em ampla escala por períodos de tempo relativamente curtos, utilizando-se diferentes métodos de fermentação, produzindo, assim, quantidades abundantes e regulares de conteúdo enzimático (Lekha e Lonsane, 1997).

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

As tanases produzidas por fungos têm sido caracterizadas como glicoproteína formada por uma mistura de uma esterase e uma depsidase, com um ponto isoelétrico de 4,0-4,5 e uma massa molar entre 186 e 300 kDa (Aguilar e Gutiérrez-Sánchez, 2001). Como pode ser observado na tabela 1 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 niger* LFC 8 e *Penicillium chrysogenum* dependendo da fonte

de obtenção da enzima. 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. niger* 3T5B8 e *Aspergillus phoenicis*. Para a temperatura, a estabilidade da tanase ocorre basicamente entre 10°C e 60°C.

Tabela 1. Características de algumas tanases fúngicas produzidas por diferentes processos fermentativos.

Microrganismo/ linhagem	Condições de cultivo	pH		Temperatura (°C)		Referências
		Ótimo	Estabilidade	Ótimo	Estabilidade	
<i>Aspergillus phoenicis</i>	Submersa	5,0 - 6,0	2,5 - 7,0	60	40 - 60	Riul <i>et al.</i> , 2012
<i>Aspergillus aculeatus</i>	Semi-sólida	5,5	5,0 - 6,0	50	50 - 60	EL- Tanash <i>et al.</i> , 2011
<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	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 tamarii</i>	Submersa	5,0	3,0 - 8,0	35	30 - 45	Costa <i>et al.</i> , 2008
<i>Penicillium</i> <i>chrysogenum</i>	Superfície	5,0 - 6,0	4,5 - 6,0	30 - 40	30 - 45	Rajkumar e Nandy, 1983
<i>Emericela nivea</i>	Submersa	5,0	4,0 - 6,0	45	22 - 50	Gonçalves <i>et al.</i> , 2010

*(-) não avaliado pelo autor.

1.6 Processos fermentativos na produção de tanases

A produção de tanase pode ser realizada em fermentação submersa (Fsbm) ou em fermentação em substrato sólido (FSS), sendo que neste último a produção e a atividade enzimática, geralmente, apresentam-se maiores (Mingshu *et al.*, 2006).

A fermentação submersa é o processo de produção de enzimas mais utilizado industrialmente. Neste processo a célula desenvolve-se no meio de cultivo contendo o substrato, geralmente sob agitação. As fermentações podem ser realizadas em biorreatores aerados e agitados, e os parâmetros operacionais, tais como pH, temperatura, agitação, consumo de O₂ e formação de CO₂ são controlados rigidamente (Bon *et al.*, 2008).

Este processo fornece algumas vantagens, tais como a facilidade do controle de variáveis físico-químicas, a maior eficiência na absorção de nutrientes e excreção de metabólitos pelas células, a alta produção de micélios em ambiente compacto e controlado, e em um tempo de incubação bastante reduzido, devendo-se considerar ainda, chances menores de contaminação se condições assépticas para o inóculo forem corretamente utilizadas (Xiao *et al.*, 2004). Porém, oferece algumas desvantagens, tais como os elevados custos para a manutenção da agitação e da aeração, e também a formação de espuma (Bon *et al.*, 2008).

A fermentação em substrato sólido foi definida como um processo em que o crescimento microbiano e a formação de produto ocorrem na superfície de substratos sólidos na ausência de água livre (Bon *et al.*, 2008; Singhanian *et al.*, 2009). A água, indispensável ao crescimento dos micro-organismos, é adsorvida num suporte sólido ou complexada no interior de uma matriz sólida (Soccol, 1994). Os substratos utilizados são geralmente produtos agrícolas, tais como arroz, trigo, cevada, milho e soja, além de resíduos agroindustriais como o bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo, farelo de arroz, farelo de milho, sabugo de milho, casca de arroz, resíduos de maçã, banana e chás (Pandey *et al.*, 2000; Bon *et al.*, 2008; Guimarães, 2012).

A FSS pode apresentar vantagens que não são possíveis em FSbm, principalmente pela simplicidade na composição dos meios de cultura, alta produtividade e concentração elevada do produto de interesse e diminuição de possíveis contaminantes, aumentando o interesse por esse tipo de fermentação (Ashokkumar *et al.*, 2001). Outra vantagem é o baixo custo de produção, já que os resíduos agroindustriais são os substratos preferidos dos micro-organismos fermentadores (Sageentha *et al.*, 2004).

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 os cultivos líquidos, apenas parte da enzima é de natureza extracelular (Deschamps *et al.*, 1983; Said e Pietro, 2002).

A produção de tanases por micro-organismos ainda pode ser influenciada pela adição de outros compostos nos meios de cultivos, como é o caso de fontes de carbono ricas em taninos (Aguilar e Gutiérrez-Sánchez, 2001).

1.7 Aplicações industriais das tanases

Embora existam muitas aplicações industriais da tanase em potencial, poucas são efetivamente empregadas devido essencialmente ao custo de produção da enzima, que ainda é elevado. A enzima tem vasta aplicação na indústria de alimentos e bebidas, em cosméticos, fármacos e indústria química. É principalmente utilizada para produção de ácido gálico, chás instantâneos, na estabilização da cor do vinho, no processo de tratamento de couro e efluentes desta indústria, na detanificação de alimentos e na produção de antioxidantes (Banerjee *et al.*, 2001).

No processamento de chá instantâneo, elimina complexos insolúveis indesejados, conhecidos como “creme de chá”, resultantes da polimerização de polifenóis (taninos) e da interação de cafeína e 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 eliminação do “creme de chá”, 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). Na fabricação de vinhos, a aplicação de tanase no tratamento da uva favorece a remoção de compostos fenólicos, estabilizando e incrementando a qualidade dos vinhos (Lekha e Lonsane, 1997). A tanase pode ser utilizada para produção de antioxidantes como epigallocatequina, epicatequina e ácido gálico. Segundo Banerjee *et al.* (2001), o ácido gálico tem várias aplicações na indústria química e farmacêutica. É utilizado para síntese de propil galato, pirogalol, trimetropim e resinas semicondutoras. 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 de alimentos (Lekha e Lonsane, 1997) e o trimetropim é um agente antibacteriano utilizado na indústria farmacêutica (Aguilar e Gutiérrez-Sánchez, 2001).

A tanase também pode ser utilizada para melhoramento das rações animais. As aplicações de enzimas em rações vêm crescendo muito nos últimos anos, considerando-se os efeitos antinutricionais de diferentes componentes da ração como, por exemplo, os taninos. A utilização desta enzima pode ser efetuada de duas formas: por contato direto dos extratos enzimáticos com o material a ser tratado, hidrolisando os polifenóis e evitando uma polimerização indesejada; ou pelo cultivo de linhagens de fungos produtores de tanase em substratos ricos em taninos, os quais são degradados a compostos simples, caracterizados pela propriedade de não se polimerizar ou não formar complexos com as proteínas e/ou cafeína presente nos materiais brutos (Aguilar e Gutiérrez-Sanchez, 2001).

2.OBJETIVOS

2.1 Geral

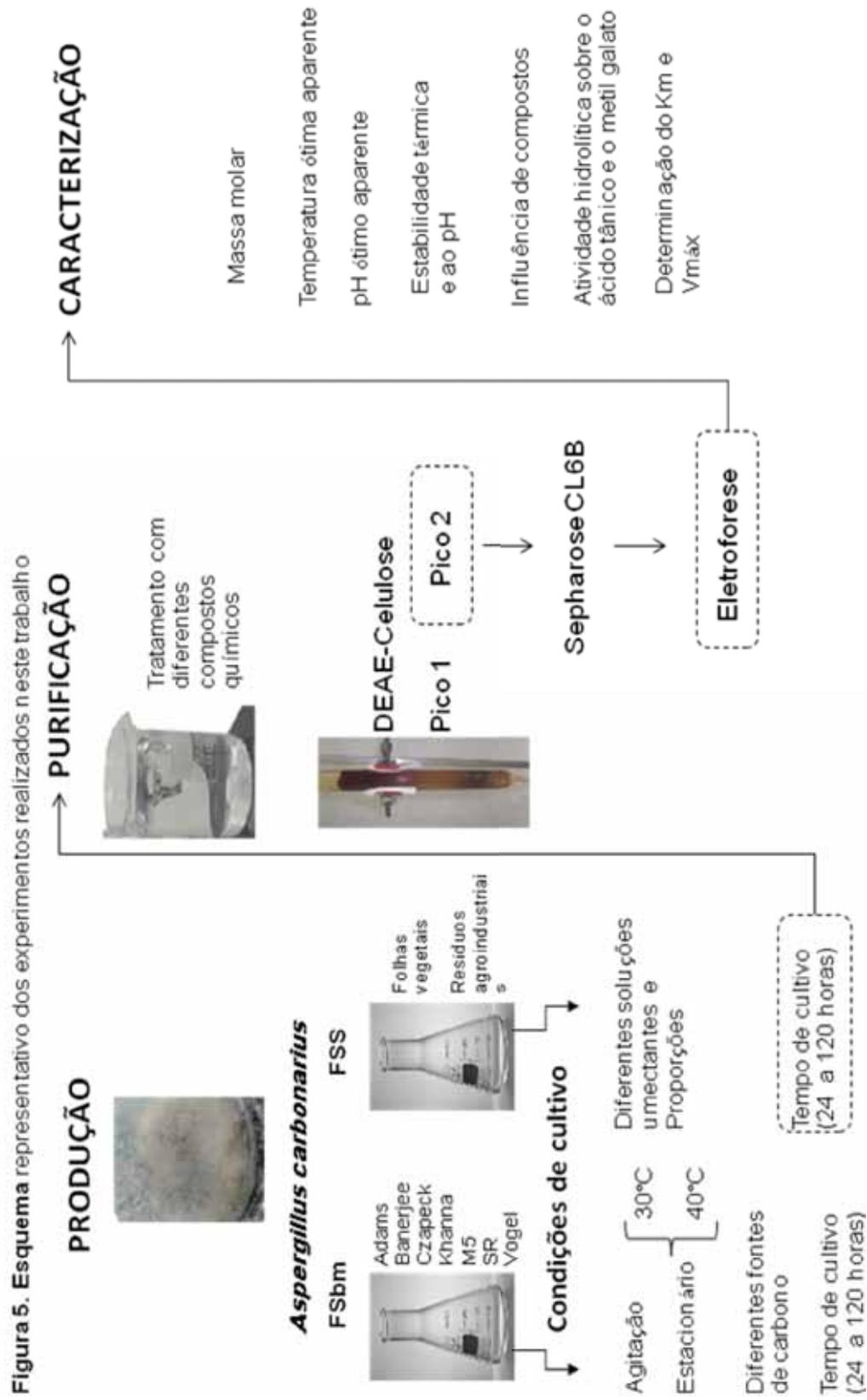
O trabalho desenvolvido teve por objetivo estudar as condições ótimas para a produção de tanase por *Aspergillus carbonarius* sob diferentes formas de cultivos, determinando-se as melhores condições para a obtenção desta enzima em altos níveis, purificando e caracterizando-a bioquimicamente.

2.2 Específicos

- Padronizar as melhores condições de cultivo para a produção de tanases por *Aspergillus carbonarius* em Fermentação Submersa (FSbm) e em Fermentação em Substrato Sólido (FSS);
- Purificar a tanase extracelular de *Aspergillus carbonarius*;
- Caracterizar bioquimicamente a tanase produzida por *Aspergillus carbonarius* quanto a:
 - Influência de diferentes compostos na atividade tanásica;
 - Analisar a hidrólise de ácido tânico e metil galato pelas tanases de *Aspergillus carbonarius*.
- Determinar os parâmetros cinéticos para a atividade tanásica.

3.MATERIAL E MÉTODOS

A figura 5 mostra um resumo simplificado de todos os experimentos realizados neste trabalho, de produção à caracterização

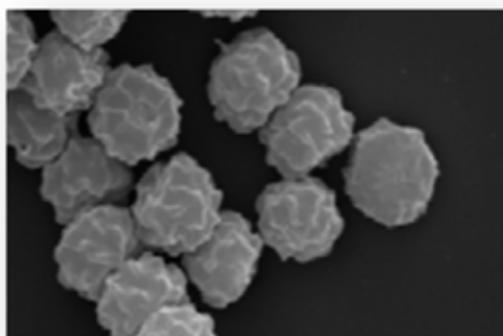


Os experimentos apresentados neste trabalho foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

3.1 Micro-organismo de estudo

O fungo filamentoso *Aspergillus carbonarius* foi isolado a partir de amostras de solo e identificado de acordo com caracteres morfológicos pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Pernambuco. Este fungo pertence ao gênero *Aspergillus* seção *nigri* e possui conídios verrucosos, com tamanho que varia de 7 a 9 μm de diâmetro, o que o diferencia das demais espécies desta mesma seção (Figura 6). Podem ser encontrados em folhas de plantas, em sementes, frutos e no solo (Silva, 2010).

Figura 6. Eletromicrografia de varredura de conídios de *A. carbonarius*



Fonte: (Silva, 2010).

3.2 Manutenção da linhagem em laboratório e obtenção das culturas

A manutenção da linhagem em laboratório foi realizada em meio solidificado de batata dextrose-agar (BDA) em tubos de ensaio inclinados. Foram realizados repiques periódicos em intervalos de aproximadamente trinta dias, mantendo-se as novas culturas em estufa a 30°C por 5 dias para crescimento, sendo posteriormente armazenadas em geladeira a 4°C até o momento do uso.

Para fermentação submersa foram utilizados 7 diferentes meios de cultivo: Adams (Adams, 1990), Banerjee (Banerjee *et al.*, 2001), Czapeck (Wiseman, 1975), Khanna (Khanna *et al.*, 1995), M5 (Peralta *et al.*, 1990), Vogel (Vogel, 1964) e SR (Rizzatti *et al.*,

2001). As culturas foram obtidas mediante inóculo de 1mL de uma suspensão de conídios em água destilada estéril em uma concentração final de 10^5 conídeos/mL, em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio. As culturas foram mantidas a 30°C ou 40°C, sob agitação orbital (120 rpm) ou em condição estacionária, por 3 dias.

Culturas em substrato sólido foram também utilizadas, empregando-se resíduos e produtos agroindustriais tais como bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo, sorgo, linhaça, milho moído, ou folhas vegetais secas e trituradas como descrito abaixo (folha de caju, folha de chá verde, folha de eucalipto, entre outras), como substratos/fontes de carbono umidificados com água de torneira, água destilada ou ainda diferentes soluções de sais (Vogel, SR e Khanna) em diferentes proporções (1:0,5 a 1:4 m/v). As FSS foram incubadas a 30°C em estufa com 60% de umidade relativa, monitorada com termohigrometro digital, por diferentes períodos.

3.2.1 Preparo dos produtos agroindustriais e folhas vegetais

Os resíduos e produtos agroindustriais como milho, farelo de trigo, bagaço de cana de açúcar, linhaça, folha de chá verde e sorgo foram adquiridos no comércio local, sendo utilizados diretamente como meio de cultivo ou, no caso do milho, triturado 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 de frascos Erlenmeyer de 125mL.

3.3 Obtenção das enzimas extracelular e intracelular

Após o período de incubação, as FSbm foram filtradas a vácuo em funil Buchner, com papel de filtro Watman nº 1, obtendo-se um filtrado livre de células, o qual foi denominado extrato bruto extracelular e utilizado para a determinação da atividade enzimática. O micélio obtido foi macerado com areia previamente tratada com ácido sulfúrico, posteriormente ressuspensão 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 extracelular e intracelular foram dialisados contra água destilada *overnight* a 4°C.

No caso das FSS, as mesmas foram adicionadas de 25 mL de água destilada gelada e submetidas a intensa agitação com auxílio de uma barra magnética por um período de 20 minutos a 4°C. Após esse período, as culturas foram filtradas á vácuo em gaze e posteriormente em papel filtro Watman n°1 utilizando-se funil Buchner. 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.

3.4 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada pelo método da rodanina metanólica, utilizando-se o ácido tânico como substrato (0,2% em tampão acetato de sódio 100mM, pH 5,0) conforme a metodologia descrita por Sharma e colaboradores (2000) e adaptada. O método foi previamente padronizado por uma curva analítica de ácido gálico (0,0 a 0,06 mg/mL).

A reação foi composta por 250 µL da solução contendo substrato e 250 µL da amostra enzimática, sendo a reação conduzida em diferentes temperaturas (30°C a 80°C) e por diferentes períodos como definido para cada experimento. A reação foi interrompida 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. Ao volume obtido em cada reação foram adicionados 4mL de água destilada. Em seguida procedeu-se a leitura em espectrofotômetro com $\lambda = 520\text{nm}$.

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) foi calculada como U x volume do extrato, e a atividade específica foi expressa em U/mg proteína. Para FSS a atividade tanásica foi expressa em U/g de substrato.

3.5 Quantificação de proteínas e carboidratos

A dosagem de proteínas foi realizada como descrito por Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A reação foi realizada em triplicata obtendo um volume final de 800µL onde foram adicionados 50µL de amostra enzimática + 750µL água destilada no primeiro tubo, no segundo tubo foram adicionados 100µL de amostra enzimática

+ 700 μ L de água destilada; e no terceiro tubo 150 μ L de amostra enzimática + 650 μ L de água destilada. O tubo controle foi obtido utilizando-se apenas água destilada.

Após reação foram adicionados 200 μ L de reagente Bradford (Biorad) e em seguida procedeu-se a leitura em espectrofotômetro com $\lambda = 595\text{nm}$. A quantidade foi expressa como mg de proteína por mL de amostra. A proteína total (mg totais) foi calculada como mg de proteína x volume do extrato.

O conteúdo de carboidratos das tanases purificadas foi estimado pelo método fenolsulfúrico segundo Dubois *et al.* (1956) utilizando-se manose como padrão (0 a 0,1 mg/mL). As amostras enzimáticas (2mL) foram adicionadas de 5mL de ácido sulfúrico P.A e 50 μ L 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 determinada em $\lambda = 490\text{nm}$.

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.

3.6 Purificação da tanase extracelular em coluna cromatográfica

O extrato bruto extracelular obtido na FSS foi dialisado contra água destilada a 4°C por 24h e posteriormente tratado com diferentes compostos (óxido de alumínio, caulim, carvão ativado e bentonita) para remoção dos pigmentos, mantido a 4°C e agitado por barra magnética por um período de 1 hora e, em seguida, centrifugado a 23000g. O sobrenadante foi aplicado em coluna cromatográfica de troca iônica DEAE-Celulose (1 x 12cm) 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) no mesmo tampão. As frações (3 mL/tubo) que apresentaram atividade tanásica foram reunidas e dialisadas *overnight* contra água destilada a 4°C. Cada *pool* obtido foi liofilizado, ressuspensos em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,5 adicionado de 100mM de KCl e aplicadas 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 vazão ajustada para 0,4 mL/min. As frações (1,5 mL/tubo) que apresentaram atividade tanásica foram reunidas e dialisadas *overnight* contra água destilada a 4°C. Posteriormente a amostra extracelular purificada foi liofilizada, e aplicada em eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE 6%) e desnaturantes (SDS-PAGE 6%) como descrito no item 3.7.

3.7 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 as bandas proteicas coradas com Coomassie Blue Silver G-250 (Candiano, 2004).

3.8 Determinação da massa molar

A massa molar nativa das tanases extracelulares 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 CL-6B (1 x 80cm), 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 3.7) 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).

3.9 Caracterização bioquímica das tanases

3.9.1 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 80°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 80°C) por diferentes intervalos de tempo (0, 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 120 minutos). A cada intervalo, alíquotas da enzima incubada eram retiradas, mantidas em banho de gelo e depois ensaiadas para atividade tanásica como descrito no item 3.4. O tempo de meia vida foi determinado considerando a redução de 50% na atividade.

3.9.2 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 como descrito no item 3.4.

3.9.3 Efeito de diferentes compostos 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, H_2O_2 e EDTA, 0,01% (v/v) para os detergentes SDS e Tween-20 e 1% (v/v) para os solventes orgânicos (metanol, etanol, acetona, isopropanol, n-butanol e glicerol), adicionados à mistura de reação.

3.10 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 a tanase extracelular purificada, 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 OringinPro 8. A atividade tanásica foi determinada pelo método da rodanina metanólica, como descrito no item 3.4.

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

As atividades esterásica e depsidásica da tanase extracelular foram determinadas utilizando-se metil galato e ácido tânico como substratos. Ambos substratos foram preparados em tampão acetato de sódio 100mM pH 5,0 e as reações foram finalizadas em intervalos de

tempo variando de 5 a 200 minutos. A mistura de ambos os substratos (1:1, v/v) foi também submetida a ação da tanase 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 60°C por diferentes períodos retirando-se alíquotas de 10µL, 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. 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.

3.12 Análise dos experimentos

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os experimentos foram analisados com base na média e no erro padrão. Para a análise dos dados obtidos e representações gráficas foram utilizados os programas Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft) e OriginPro 8 (OriginLab Corporation), respectivamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

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

4.2 Purificação da tanase extracelular.

4.3 Caracterização bioquímica da tanase extracelular.

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

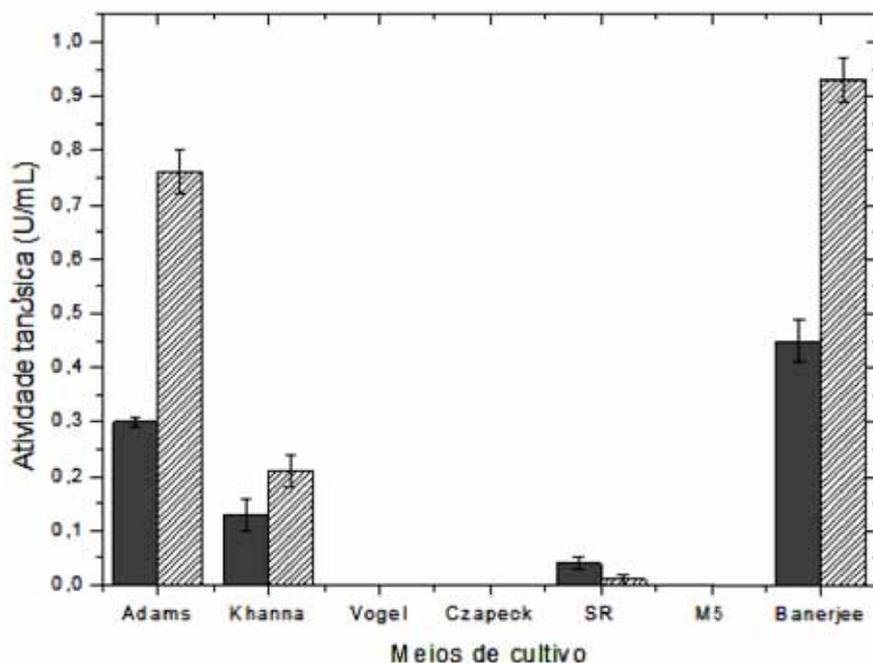
4.1.1 Produção de tanases por *A. carbonarius* em FSbm

Com o intuito de determinar a melhor composição do meio de cultura para FSbm visando a produção enzimática por *A. carbonarius*, foram utilizados os meios Adams, Banerjee, Czapeck, Khanna, M5, Vogel e SR adicionados de ácido tânico (2% m/v) como única fonte de carbono. Entre os meios analisados, as maiores produções extracelular (0,42 U/mL) e intracelular (0,93 U/mL) foram obtidas em meio Banerjee mantido sob agitação (120 rpm), por 3 dias como pode ser observado a figura 7. Para os meios Czapeck, Vogel e M5 não foi observado crescimento significativo e portanto, não houve produção enzimática. O meio Banerjee possibilitou uma produção enzimática 31 vezes maior, tanto para forma extracelular como intracelular, se comparado ao meio SR. Os dois nos quais foram obtidos os melhores resultados (Banerjee e Adams) têm em comum $MgSO_4$ e KH_2PO_4 em sua composição. Talvez esta combinação tenha possibilitado uma maior produção enzimática nestes meios, considerando que os demais meios não apresentam esses dois compostos combinados.

Considerando a produção enzimática pelo fungo *Aspergillus ochraceus* o meio Khanna foi o que mais favoreceu a produção da tanase extracelular (1,1U/mg de proteína) e intracelular (0,58 U/mg de proteína) como descrito por Gonçalves *et al.* (2012). O nível mais elevado de produção de tanase extracelular (1,43 U/mL) e intracelular (0,9 U/mL) por *A. phoenicis* foi obtido também em meio Khanna segundo Riul *et al.* (2013).

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 de cultivo, a enzima é induzida e expressa em diferentes níveis, mostrando diferentes padrões de produção (Aguilar *et al.*, 2007). O meio de fermentação deve proporcionar ao micro-organismo todos os nutrientes que ele necessite, contendo basicamente, fontes de carbono e nitrogênio, e alguns minerais.

Figura 7. Produção de tanase intra (▨) e extracelular (■) por *A. carbonarius* em diferentes meios de cultivo.



Na tabela 2 pode ser verificado que o fungo em estudo cresceu em ambas as condições físicas de cultivo (agitação e estacionária), apresentando maior nível da enzima extracelular (0,3 U/mL) e intracelular (0,6 U/mL) em condição de agitação, assim como descrito por Aguilar *et al.* (2007) e Riul *et al.* (2011).

Barthomeuf *et al.* (1994) relatou que excessiva aeração favorece a oxidação de taninos e tem um efeito inibitório na biossíntese de tanase por *A. niger*. Assim como a aeração, a temperatura influencia o crescimento e secreção das enzimas pelos microorganismos. Sendo assim, o fungo *A. carbonarius* foi submetido ao crescimento em diferentes temperaturas (30°C e 40°C) mostrando melhor produção tanásica, intra e extracelular, quando incubado a 30°C (Tabela 2). Temperatura ótima de cultivo de 30°C também foi descrita para produção de tanases por *A. niger* AUMC 4301 (El-Fouly *et al.*, 2010), *A. flavus* (Yamada *et al.*, 1968) e *A. oryzae* (Rodrigues *et al.*, 2008). Temperaturas ótimas de crescimento mais elevadas foram descritas para a produção tanásica por *Trichoderma viride* (45°C) (Lokeswari *et al.*, 2010).

Tabela 2. Produção de tanases intra e extracelulares por *A. carbonarius* em diferentes condições e temperaturas.

Condições de cultivo	Temperatura (°C)	Atividade tanásica (U/mL)	
		Extracelular	Intracelular
Agitação	30	0,3 ± 0,01	0,6 ± 0,01
Estacionário		0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,03
Agitação	40	0,07 ± 0,01	0,29 ± 0,02
Estacionário		0,14 ± 0,02	0,03 ± 0,01

Uma vez definidas as condições iniciais de cultivo (meio Banerjee sob agitação a 30°C por 3 dias) para a produção de tanases por *A. carbonarius*, foram testadas diferentes fontes de carbono adicionadas ao meio de cultivo Banerjee, como mostrado na tabela 3.

O ácido tânico foi a melhor fonte de carbono para a produção de ambas as formas enzimáticas sendo obtido 0,5 U/mL para enzima extracelular e 0,7 U/mL para a intracelular. Para todas as demais fontes testadas, a produção foi diminuída. Assim, a partir desses dados o ácido tânico foi utilizado como fonte de carbono para os demais experimentos, sendo que esta fonte já havia sido descrita por Aoki *et al.* (1976) como indutor para esta enzima, além de fonte de carbono para o micro-organismo.

Quando comparado com a adição de sorgo que tem grande quantidade de tanino, como fonte de carbono, a produção de tanase com ácido tânico foi 12 vezes maior.

Bradoo *et al.* (1996) relataram que a síntese de tanases por *A. japonicus* duplicou com a presença de ácido tânico. Já Riul *et al.* (2011) observaram que se comparado com a ausência de fonte de carbono o fungo *A. phoenicis* produziu 13 vezes mais tanases extracelulares.

Sem a presença de um indutor, seja ele o ácido tânico ou outro tipo de tanino hidrolisável, como aqueles presentes nas folhas de chá observa-se que a produção enzimática é praticamente nula, assim como os resultados obtidos com ácido gálico, metil galato e folha de pitanga. A folha de chá verde também teve um bom efeito sobre a produção de tanases, provavelmente por apresentar elevada concentração de taninos hidrolisáveis

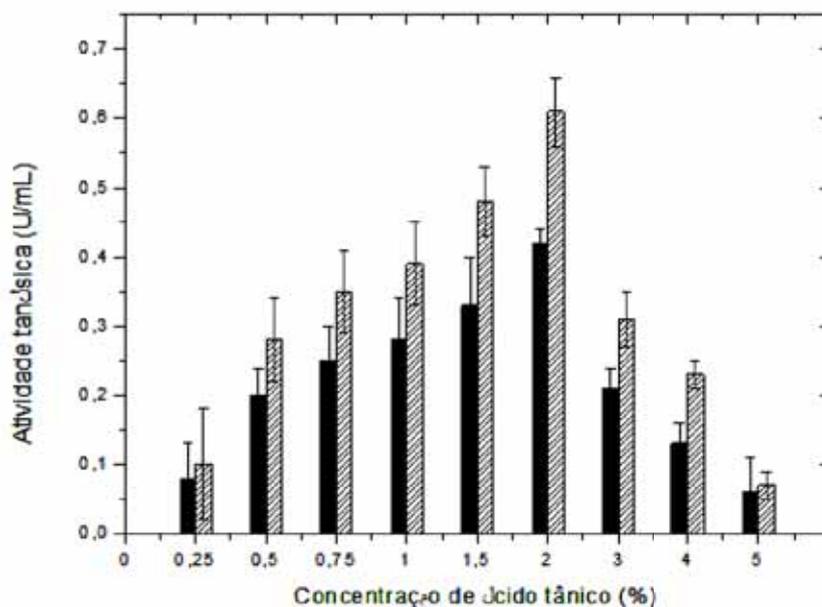
Tabela 3. Atividade tanásica intra e extracelular em função da fonte de carbono utilizada em FSbm.

Fontes de carbono	Atividade tanásica (U/mL)	
	Extracelular	Intracelular
Ác. tânico 2%	0,5 ± 0,05	0,7 ± 0,05
Ác. gálico 2%	0	0
Farinha de aveia 1%	0,05 ± 0,07	0,03 ± 0,03
Folha de chá verde 1%	0,1 ± 0,03	0,3 ± 0,02
Folha de manga 1%	0,02 ± 0,01	0,1 ± 0,07
Folha de pitanga 1%	0	0
Metil galato 2%	0	0
Pirogalol 1%	0,1 ± 0,02	0,02 ± 0,01
Sabugo de milho 1%	0,06 ± 0,05	0,07 ± 0,09
Sorgo 2%	0,04 ± 0,01	0,1 ± 0,03
Ausente	0	0

Os cultivos foram realizados em meio Banerjee 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% foram obtidos os maiores níveis enzimáticos extra (0,42 U/mL) e intracelular (0,61 U/mL) (figura 8). Para o meio controle, ou seja, sem a presença de ácido tânico não foi observada produção enzimática atividade. Nas concentrações maiores que 2% observou-se produção, porém estas diminuíram gradativamente para ambas as formas enzimáticas a medida que a concentração do ácido tânico foi aumentada. Tal dado também foi observado para tanase de *Aspergillus pullulans* DBS66, a qual teve sua produção diminuída em elevadas concentrações de ácido tânico (Banerjee e Pati, 2007). Esta observação pode ser explicada com base no fato de que o ácido tânico, em maior concentração, faz uma reação irreversível com proteínas de superfície do organismo e assim, o crescimento e a produção da enzima podem ser reduzidos (Banerjee e Pati, 2007). Da mesma forma Riul *et al.* (2011) constataram, para *Aspergillus phoenices*, que um grande aumento na concentração de ácido tânico reduzia a atividade enzimática.

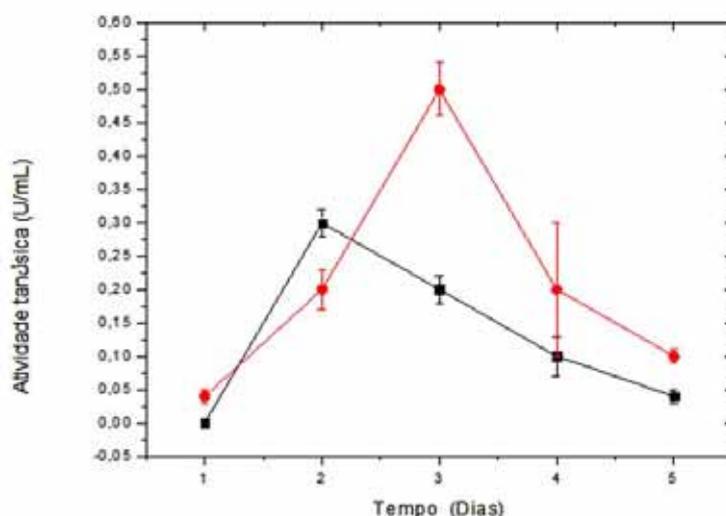
Figura 8. Efeito da concentração de ácido tânico na produção de tanase extracelular (▨) e intracelular (■) por *A. carbonarius*. Cultivos realizados em meio Banerjee, por 3 dias sob agitação a 30°C.



A secreção de tanases em função do tempo de cultivo do fungo *A. carbonarius* foi investigada. Analisando-se a produção tanásica em função do tempo de cultivo (Figura 9) pode-se observar que os maiores níveis enzimáticos foram obtidos em 2 dias para enzima extracelular (0,3 U/mL) e 3 dias para intracelular (0,5 U/mL). Com base neste resultado optou-se por cultivar o fungo sob agitação por 2 dias.

Os dados mostram que a secreção das tanases ocorrem principalmente em períodos iniciais de cultivo assim como os descritos por Yamada *et al.* (1968) que obtiveram a produção ótima da enzima em 3 dias pelo fungo *A. flavus* e por Gonçalves *et al.* (2012) com 72 horas de cultivo para o fungo *Aspergillus ochraceus*. Já para enzima intracelular de *A. niger* MTCC 2425, a produção máxima ocorreu em 5 dias de o cultivo (Rana e Bhat, 2005).

Figura 9. Produção de tanases intra (●) e extracelular (■) pelo fungo *A.carbonarius* em FSbm função do tempo de cultivo.



4.1.2 Produção de tanase por *A. carbonarius* em FSS

O interesse neste tipo de fermentação é consequência da busca por produtos com menor custo de produção. 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).

Considerando os aspectos citados, foram testados diferentes produtos e resíduos agroindustriais como substratos/fontes de carbono para a produção tanásica por *A. carbonarius* em FSS como apresentado o na tabela 4. Dentre os substratos testados a folha de chá verde (3,6 U/g de substrato) foi o que proporcionou melhores condições para a produção de tanase sendo utilizada para os estudos subsequentes, seguida pela folha de mandioca (2,74 U/g de substrato) e de folha de caju (1,59 U/g de substrato). Apesar do crescimento microbiano sobre bagaço de cana e sobre milho moído não se observou produção enzimática, talvez por seu baixo nível ou ausência de taninos.

Alguns substratos já descritos para FSS para a produção de tanases incluem farelo de trigo (Pinto *et al.*, 2003), casca de café (Sabu *et al.*, 2006), folhas de jambolão (Kumar *et al.*, 2007), bagaço de caju (Rodrigues *et al.*, 2008) e folhas de *Phyllanthus emblica* (amla) (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).

Tabela 4. Produção de tanase por *Aspergillus carbonarius* em FSS em função do substrato/fonte de carbono.

Substrato	Atividade tanásica (U/g de substrato)
Bagaço de cana de açúcar	0
Farelo de trigo	0,56 ± 0,02
Folha de caju (<i>Anacardium occidentale</i>)	1,59 ± 0,01
Folha de café (<i>Coffea arabica</i>)	1,00 ± 0,01
Folha de chá verde (<i>Camellia sinensis</i>)	3,60 ± 0,02
Folha de eucalipto (<i>Eucalyptus</i> sp.)	0,50 ± 0,01
Folha de manga (<i>Mangifera indica</i>)	0,10 ± 0,03
Folha de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>)	2,74 ± 0,04
Linhaça	0,70 ± 0,01
Milho moído	0
Sorgo	0,10 ± 0,01

Cultivos realizados por 3 dias a 30°C em atmosfera com 60% de umidade, substratos umedecidos com água de torneira (1:1 m/v).

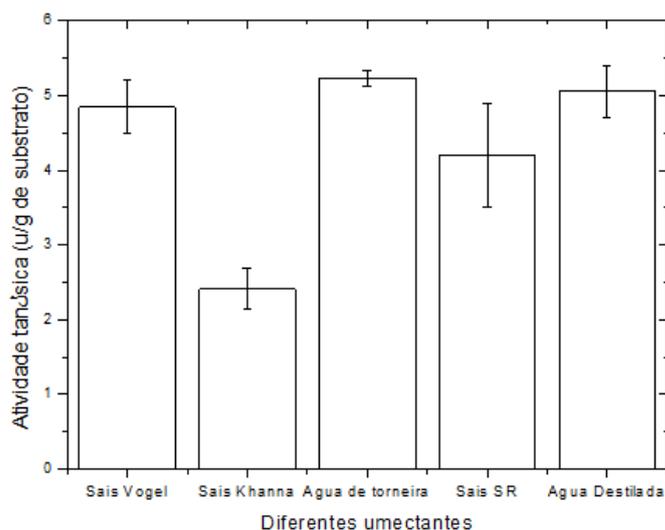
Objetivando aumentar a produção enzimática em FSS com folha de chá verde, foram utilizados como meio umectante diferentes soluções de sais (sais de Vogel, sais de Khanna e sais SR), além de água de torneira e água destilada, todos na proporção 1:1 (m/v).

A maior produção enzimática foi obtida com água de torneira (5,38 U/g de substrato) como mostra a figura 10, sendo 2,5 vezes maior em relação a utilização da solução de sais Khanna, diferindo do descrito por Riul *et al.* (2011) que observaram maior produção de tanase pelo fungo *A. phoenicis* quando adicionada solução de sais de Khanna ao substrato.

A água de torneira é uma solução que contém sais e íons em baixas concentrações, como ppm (partes por milhão) e pode ter compostos que também contribuam para o desenvolvimento do micro-organismo, e conseqüentemente, para a produção da enzima. A

água de torneira utilizada neste trabalho é composta de alumínio 0,009 mg/L, ferro 0,008 mg/L, fluoreto 0,2 mg/L, 0,019 nitrogênio mg/L e cloro 1,15 mg/L. Para a reprodução de tais concentrações seria necessária a análise química desta água e ainda a utilização de equipamentos de pesagem muito precisos, o que torna o processamento praticamente inviável. Assim, pode-se dizer que, mesmo que a água de torneira apresente diferenças regionais, ainda assim, devem possuir semelhanças consideráveis em suas composições. Devido a alta disponibilidade e baixo custo a água de torneira continuou sendo utilizada como meio umectante para os demais experimentos.

Figura 10. Efeito de diferentes soluções umectantes adicionadas a FSS sobre a produção de tanases por *A. carbonarius*, tendo chá verde como substrato, cultivo realizado por 3 dias a 30°C com umidade relativa ao redor de 60%.



Depois que a água de torneira foi escolhida como umidificante para a FSS utilizando como substrato/fonte de carbono folha de chá verde, foi verificada a proporção que favorecia a melhor produção enzimática (tabela 5). A maior produção tanásica foi obtida na proporção 1:1 (m/v) (6,2 U/g de substrato), mantendo-se esta para os demais testes. Segundo Riul *et al.*, (2011) a produção enzimática por *A. phoenicis* não sofreu grandes mudanças sob diferentes proporções de água de torneira usada como meio umectante, sendo mantida também a proporção 1:1 (m/v).

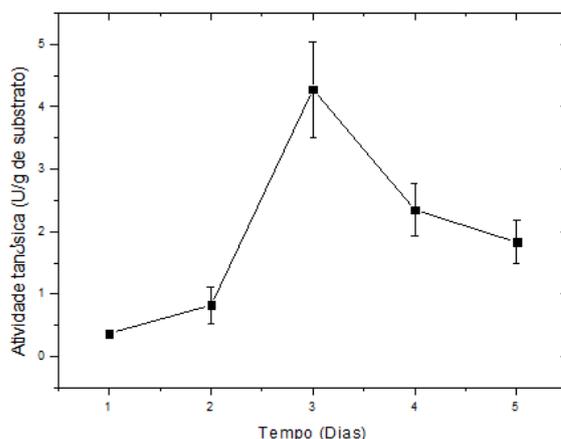
Tabela 5. Efeito da umidificação com água de torneira em diferentes proporções adicionadas a FSS com folha de chá verde como fonte de carbono sobre a produção de tanases por *A. carbonarius*

Água de torneira (m/v)	Atividade tanásica (U/g de substrato)
Ausente	1,01 ± 0,05
1:0,5	3,45 ± 0,04
1:1	6,21 ± 0,08
1:2	5,36 ± 0,1
1:3	5,19 ± 0,06
1:4	3,88 ± 0,09

A influência do tempo de cultivo sobre a produção de tanase, por *A. carbonarius* foi analisada, sendo a maior produção enzimática obtida no terceiro dia de cultivo como pode ser observado na figura 11, tempo superior ao observado para FSbm. Em tempos superiores a produção enzimática 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.

Lekha e Losane (1994) também obtiveram melhor produção tanásica em 3 dias para o fungo *A. niger* PKL 104. Já Treviño e Cueto (2007) descreveram que o tempo da produção máxima de tanase por *Aspergillus niger* Aa-20 em FSS utilizando folhas de *Larrea tridentata* foi apenas 43,5 horas.

Figura 11. Produção de tanase pelo fungo *A. carbonarius* em função do tempo de cultivo em FSS com folhas de chá verde umidificadas com água de torneira (1:1 m/v). Cultivo realizado a 30°C em atmosfera com umidade relativa de 60%.



4.2 Purificação da tanase extracelular

Visando a remoção de pigmentos do extrato bruto da FSS, este foi submetido ao tratamento com diferentes compostos em diferentes concentrações (0,05g/mL, 0,1g/mL, 0,2g/mL), sendo eles, óxido de alumínio, Caulim, carvão ativado e bentonita (tabela 6). Destes apenas o óxido de alumínio, na concentração de 0,1g/mL, conservou a atividade tanásica (6,37 U/g de substrato), observando-se um bom clareamento do extrato. Com a utilização de carvão ativado também houve a manutenção de uma boa atividade enzimática e clareamento do extrato enzimático. Para os demais compostos foi observada a perda total de atividade tanásica. Experimentos similares foram realizados por Riul *et al.*, (2011), que obtiveram uma boa recuperação do extrato tratado com caulim (40mg/mL).

Tabela 6. Tratamento do extrato bruto enzimático com diferentes compostos em diferentes concentrações

Tratamento	Atividade (U/g de substrato)			
	Concentrações	0,05g/mL	0,1g/mL	0,2g/mL
Óxido de alumínio		5,91 ± 0,03	6,37 ± 0,05	4,50 ± 0,03
Caulim		0	0	0
Carvão ativado		3,82 ± 0,05	4,65 ± 0,03	2,39 ± 0,02
Bentonita		0	0	0
Extrato bruto		6,72 ± 0,02		

O extrato clarificado foi então usado para purificação. Na figura 12A podemos observar o perfil cromatográfico em DEAE-Celulose para o extrato bruto extracelular previamente tratado com óxido de alumínio. Foram observados dois picos com atividade tanásica, sendo que o primeiro não interagiu com a resina. O segundo pico, o qual interagiu com a resina foi eluído como única forma com 0,85 M de NaCl através da aplicação de um gradiente linear (0 - 1,5 M) em tampão acetato de sódio 10mM pH 5,0. As frações de ambos os picos que apresentaram atividade foram reunidas em *pools*, os quais foram dialisados contra água destilada. Porém, apenas o segundo pico, que apresentou melhor separação das demais proteínas contidas no extrato bruto, foi liofilizado, ressuspenso em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,5 adicionado de KCl 100mM e aplicado em coluna de filtração Sepharose

CL6B, sendo eluído como única forma (Figura 12B). Através deste procedimento, a enzima extracelular foi purificada 11,3 vezes com recuperação de 98% (Tabela 7). O perfil eletroforético em condições não desnaturantes (PAGE 6%) para a tanase extracelular purificada (Figura 13). Em condições desnaturantes (SDS-PAGE 6%) pode-se observar 2 bandas proteicas (65KDa e 100kDa) coradas por Coomassie Blue Silver (Figura 13B)

Figura 12. Perfis cromatográficos em DEAE-Celulose (A) e Sepharose CL6B (B) para tanase extracelular produzida por *A. carbonarius* em FSS. Símbolos: () Absorbância 280nm, (●) Atividade tanásica.

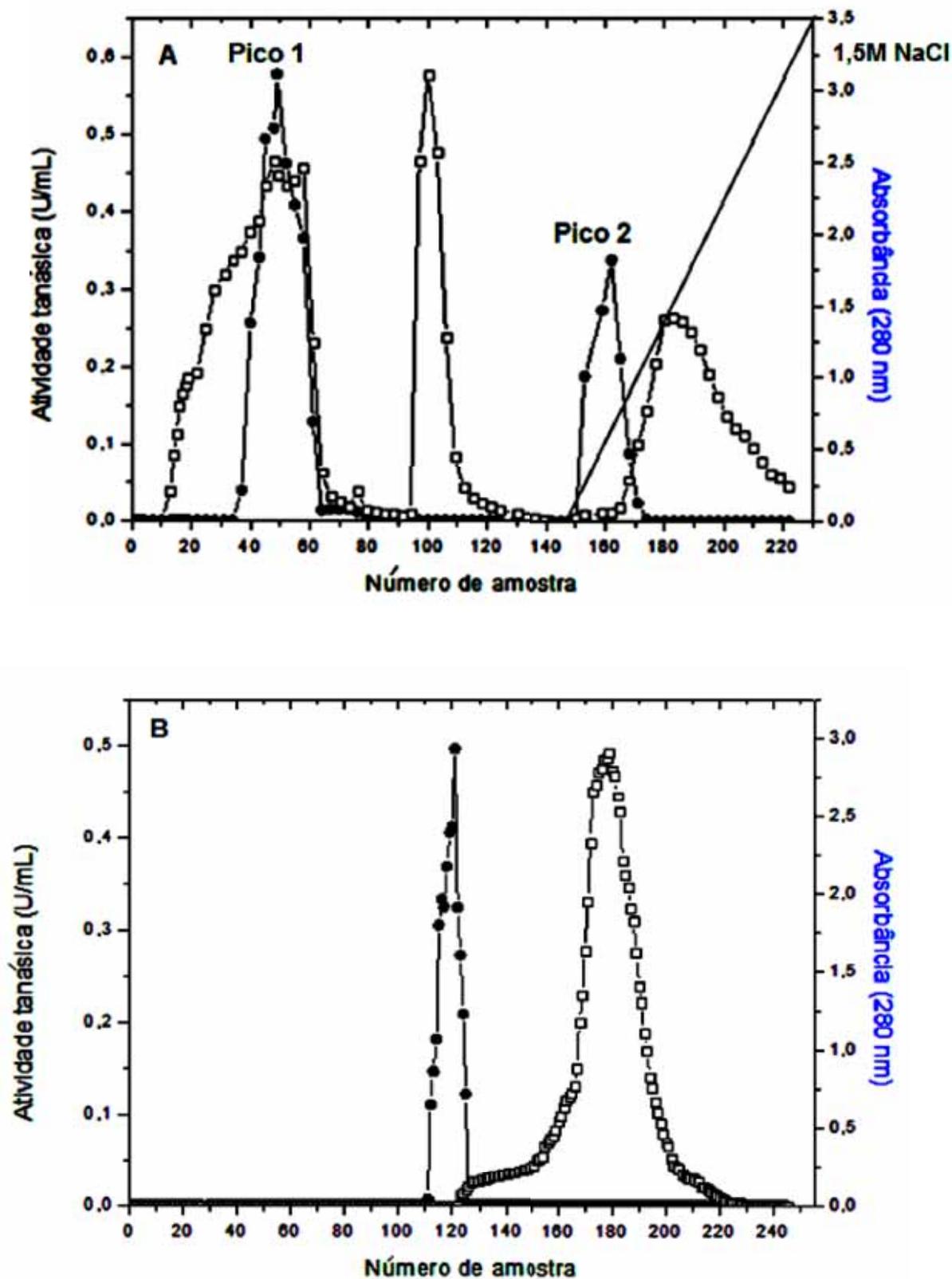


Tabela 7. Purificação da tanase extracelular produzida por *Aspergillus carbonarius* em FSS.

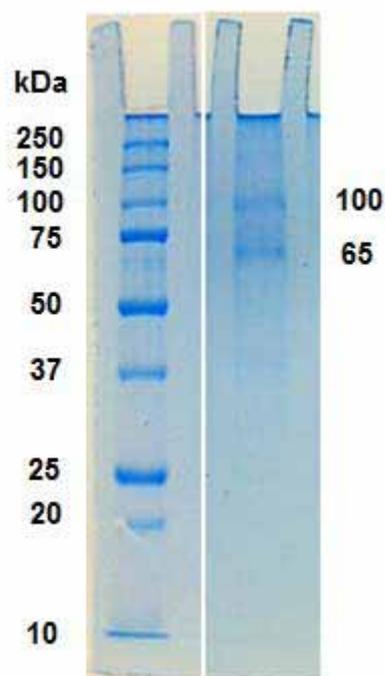
Passo	Volume (mL)	Proteína Total (mg totais)	Atividade Total (U totais)	Atividade específica (U/mg)	Purificação (vezes)	Recuperação (%)
Extrato Bruto	150	64,5	75,0	1,2	1,0	100,0
Óxido de alumínio	148	48,8	88,8	1,9	1,6	118,0
DEAE-Celulose	45 (Pico 1)	2,6	25,6	11,4	9,8	114,0
	18 (Pico 2)	1,2	5,4	4,3	3,7	60,0
Sepharose CL6B	22	0,8	10,8	13,6	11,3	98,0

Figura 13. Perfil eletroforético da tanase extracelular em PAGE 6% revelado com Comassie Blue Silver (A) e em SDS-PAGE 6% corado por Comassie Blue Silver (B).

A



B



4.3 Caracterização bioquímica da tanase extracelular purificada

4.3.1 Determinação da massa molar nativa e conteúdo de carboidratos

A massa molar nativa da tanase extracelular produzida em FSS por *A. carbonarius* foi de 134,89 kDa determinada por coluna de filtração Sepharose CL6B com conteúdo de carboidratos de 47,83%. A natureza multimérica das tanases extracelulares produzidas por *A. carbonarius* foi confirmada por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE 6%) que resultou em dois polipeptídios de tamanhos diferentes, sendo um com 100 kDa e outro com 65 kDa, cuja soma é 165 kDa, valor este próximo ao da massa molar nativa, caracterizando uma estrutura heterodimérica.

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 tamaris* com massa molar nativa de 180 kDa, sendo composta por 2 subunidades de 90 kDa, contendo 40,5% de carboidratos. Contudo, Riul *et al.* (2013) observaram duas cadeias polipeptídicas de massas molares distintas para a enzima produzida por *A. phoenices* (120 kDa e 93 kDa). Também, a tanase de *A. oryzae*, expressa em *Pichia pastoris*, é formada por um par de subunidades distintas (31 kDa e 34 kDa), com massa molar nativa de 100 kDa (Zhong *et al.*, 2004).

A glicosilação em tanases é bastante comum, sendo que todas as tanases fúngicas têm sido caracterizadas como glicoproteínas, com o conteúdo de carboidratos variando de 25 a 66% da massa 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 *Emmericella nivea* foi de 50% (Gonçalves *et al.*, 2011). 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, ainda clivam-os em produtos inertes, glicose e ácido gálico. Isto sugere que a glicosilação proteja a cadeia polipeptídica, tornando-a menos acessível aos efeitos de precipitação dos taninos e ainda direcione o substrato corretamente ao centro ativo da enzima (Lekha e Lonsane, 1997).

4.3.2 Influência da temperatura e do pH sobre a atividade tanásica

A temperatura ótima aparente de atividade foi de 60°C para enzima extracelular produzida em FSS (Figura 14A). Enzimas capazes de atuar em elevadas temperaturas são preferidas para aplicações industriais como, por exemplo, as tanases de *A. carbonarius*. Porém, o aumento de temperatura para além do valor ideal causou uma diminuição na velocidade catalítica da tanase. Com o aumento da temperatura observa-se uma maior energia cinética das moléculas e, portanto, maior número de choques entre a tanase e o seu substrato, 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 são quebradas levando a desnaturação térmica da enzima e 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).

Tais dados estão de acordo com os observados para outras tanases já descritas com temperaturas ótimas 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* (Sharma *et al.*, 1999), *Paecilomyces variotii* (Mahendran *et al.*, 2006) e *A. phoenicis* (Riul *et al.*, 2013).

O pH ótimo aparente de atividade ficou estipulado em 5,0 (Figura 14 B). As enzimas foram ativas em pH ácidos e a atividade diminuiu quando o pH se aproximou da faixa alcalina. Os resultados obtidos para a influência do pH também estão de acordo com outros trabalhos já descritos, sendo as maiores atividades observadas entre os valores de pH 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).

A tanase extracelular purificada de *A. carbonarius* foi avaliada quanto a estabilidade térmica e ao pH. Com relação a temperatura, ela se manteve estável por até 120 minutos a 40°C, 50°C e 60°C. Em 65°C manteve cerca de 60% da sua atividade por 120 minutos. Nas temperaturas de 70°C e 75°C o tempo de meia vida (T_{50}) foi de aproximadamente 60 minutos e 45 minutos, respectivamente (Figura 14 C).

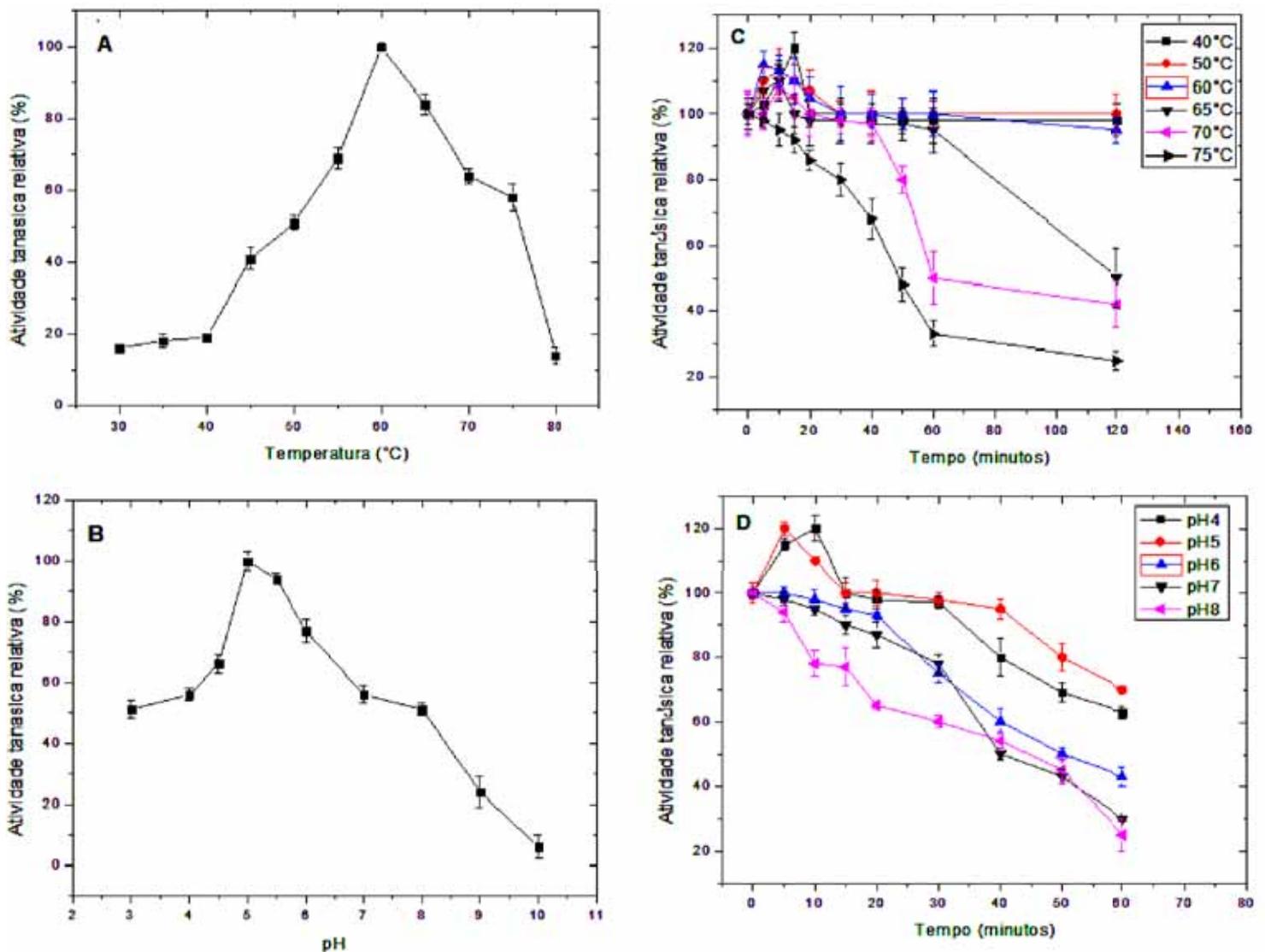
Resultados parecidos foram obtidos por Riul *et al.* (2011), sendo que a enzima purificada de *A. phoenicis* se manteve estável nas temperaturas de 40°C, 50°C e 60°C. De acordo com Lekha e Lonsane (1994) e Pinto *et al.*, (2003), as tanases costumam ser estáveis em temperaturas entre 10°C e 45°C. Já a tanase purificada de *A. niger* foi estável a 60°C

(Yamada *et al.*,2008). Portanto, a tanase de *A. carbonarius* apresenta melhor estabilidade do que a maioria das tanases já descritas.

Adicionalmente as tanases produzidas por *A. carbonarius* foram mais estáveis em pH ácidos. A medida que valores de pH foram aumentando, as atividades diminuíram chegando a menos de 30% em pH 8 com 60 minutos (figura 14D).

A estabilidade ao pH para tanase de outros fungos ocorre em faixas estreitas como, por exemplo, 5,0 a 5,5 para a enzima de *A. flavus* IFO 5839 (Yamada *et al.*, 1968) e 4,5 a 6,0 para a de *P. chrysogenum* (Rajkumar e Nandy, 1983). Já aquelas produzidas por *A. phoenicis* apresentaram estabilidade em uma ampla faixa de pH (Riul *et al.*, 2013).

Figura 14. Determinação da temperatura ótima aparente (A), pH ótimo aparente (B), estabilidade térmica (C) e ao pH (D) para a tanase extracelular de *Aspergillus carbonarius* purificada.



4.3.3 Efeito de diferentes sais e outros compostos na atividade tanásica

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 tende a ser inibitório (Mukherjee e Banerjee, 2006; Mata-Gómez *et al.*, 2009).

A tanase de *A. carbonarius* foi ativada 12% na presença de Ag^+ (1mM) como mostra a tabela 8. Quando essa concentração foi aumentada para 10mM, a atividade enzimática foi aumentada 32% (Figura 15), dado este que merece destaque, considerando que este é um potente inibidor de atividade de diferentes enzimas. Neste caso, o íon prata reage com os grupos tióis das proteínas, promovendo mudanças conformacionais na estrutura da enzima ou alteração da carga elétrica global da molécula, afetando, assim, a atividade catalítica (Pessoa Júnior e Kilijian, 2005). A atividade enzimática foi mantida na presença da maioria dos íons testados, exceto Mg^+ , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} e Cu^{2+} , que foram potentes inibidores da atividade tanásica, promovendo redução de até 90% como observado na presença de Al^{3+} (tabela 9). 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).

As atividades tanásicas das enzimas produzidas por *Penicillium chrysogenum* e *A. niger* ATCC 16620 foram inibidas por Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} e Mg^{2+} (Rajakumar e Nandy, 1983, Sabu *et al.*, 2005). Apenas K^+ foi capaz de ativar a atividade da enzima de *A. niger* ATCC 16620 (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 sais como MgCl_2 , HgCl_2 , NaBr e $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ podem atuar como ativadores. Tais dados condizem com o observado para tanase de *Aspergillus carbonarius*.

Outros compostos químicos importantes que podem influenciar a atividade tanásica são os surfactantes, quelantes, desnaturantes, inibidores e solventes orgânicos. Quando verificada a influência de detergentes e solventes orgânicos na reação enzimática, a atividade tanásica extracelular não sofreu grandes variações. No entanto, na presença do β mercaptoetanol sofreu total inibição, devido a ação dele na proteína onde ele reduz e cliva as pontes dissulfeto, tirando a proteína de sua conformação nativa com conseqüente perda de sua atividade. Os dados diferem daqueles apresentados por Kar *et al.* (2003) onde 0,01% SDS inibiu a atividade da tanase produzida por *Aspergillus oculeatus*, assim como daqueles

apresentados por Gonçalves *et al.* (2010), com perda total de atividade enzimática intracelular na presença de EDTA . Já a tanase produzida por *A. phoenices* mostrou uma grande estabilidade em vários tipos de solventes orgânicos e detergentes (Riul *et al.*, 2013).

Tabela 8. Efeito de diferentes sais na atividade tanásica extracelular do fungo *Aspergillus carbonarius*.

Compostos (1mM)	Atividade relativa (%)
	Extracelular
Controle	100,0
NaCl	86,0 ± 5,0
MgSO ₄	40,0 ± 3,2
Ag ₂ SO ₄	112,0 ± 2,1
FeCl ₃	15,0 ± 4,3
Zn(NO ₃)	34,0 ± 6,5
AgNO ₃	96,0 ± 4,8
NaBr	104,0 ± 1,8
BaCl ₂	100,0 ± 2,9
KCl	96,0 ± 6,7
KH ₂ PO ₄	86,0 ± 3,7
ZnCl ₂	88,0 ± 5,3
CaCl ₂	73,0 ± 3,8
AlCl ₃	10,0 ± 4,3
CuSO ₄	32,0 ± 2,8
NH ₄ Cl	96,0 ± 1,5
CuCl ₂	41,0 ± 3,8

Figura 15. Influência de diferentes concentrações de Ag_2SO_4 sobre a atividade tanásica.

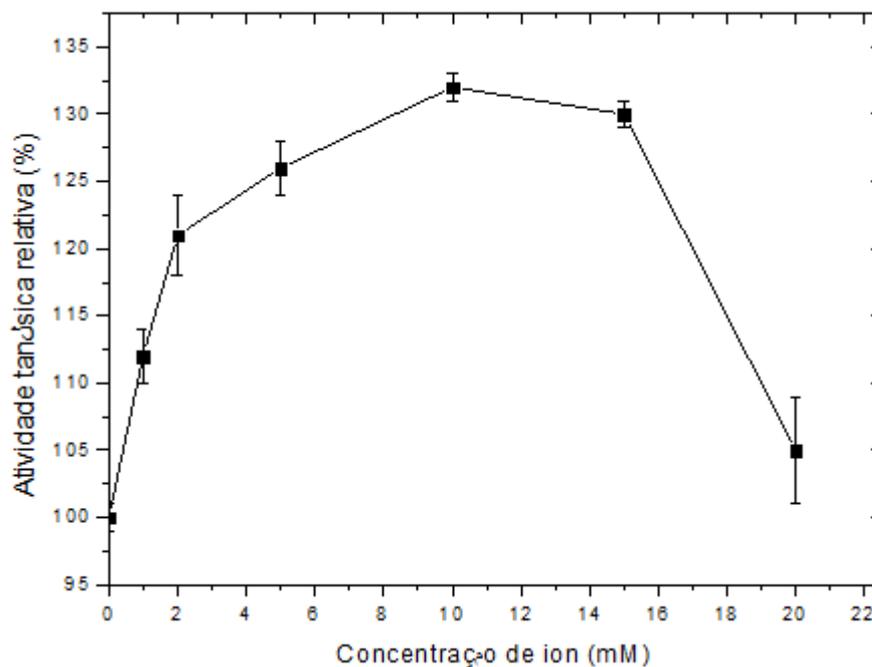


Tabela 9. Efeito de diferentes compostos sobre a atividade tanásica extracelular do fungo *Aspergillus carbonarius*

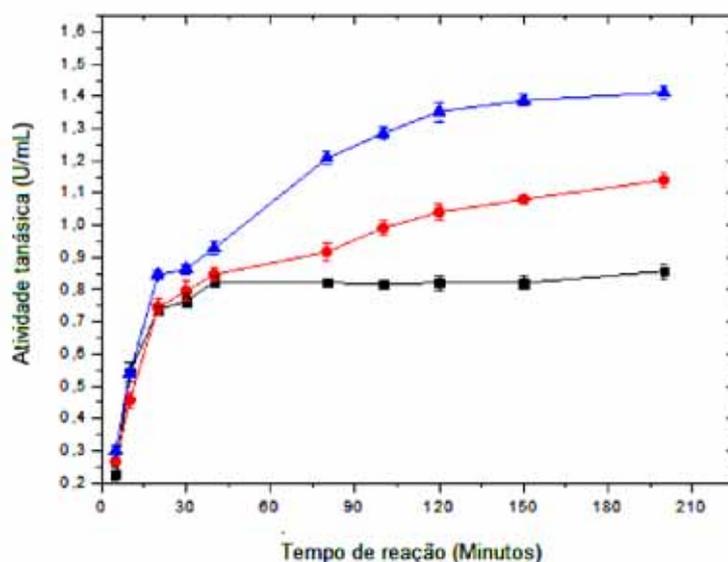
Compostos	Atividade relativa (%)
	Extracelular
Metanol (1%)	95,0 ± 2,3
Etanol (1%)	81,0 ± 1,2
Acetona (1%)	94,0 ± 3,2
Isopropanol (1%)	90,0 ± 1,2
Butanol (1%)	71,0 ± 3,4
Glicerol (1%)	93,0 ± 1,0
EDTA (1mM)	69,0 ± 1,8
SDS (0,01%)	94,0 ± 2,5
TWEEN-20 (0,01%)	81,0 ± 1,3
β -mercaptoetanol (1mM)	0,0 ± 0,0

4.3.4 Hidrólise do ácido tânico e do metil galato

Como pode ser observado na figura 16, ambos os substratos foram hidrolizados pela enzima extracelular produzida por *A. carbonarius*. A tanase hidrolisou preferencialmente o ácido tânico. 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 condiz ao observado para as tanases de *A. carbonarius*.

Tanases de outros micro-organismos foram testadas quanto a eficiência na hidrólise do metil galato e do ácido tânico, entre eles *Selenomonas ruminantium* (Skene e Brooker, 1995), *A. tamaris* (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 16. Determinação da hidrólise dos substratos ácido tânico (), metil galato (■) e ácido tânico : metil galato (1:1) (●), em função do tempo de reação, pela tanase extracelular produzida por *A. carbonarius*.



4.3.5 Parâmetros cinéticos

As propriedades cinéticas (K_m e V_{max}) para a tanase extracelular purificada foram investigadas utilizando os substratos metil galato e ácido tânico.

Como mostrado na tabela 10, para a enzima extracelular, o maior valor de K_m obtido através da representação gráfica do duplo recíproco (Figura 17) foi obtido na presença de ácido tânico (2,2 mM), mostrando uma menor afinidade por este substrato se comparado ao valor obtido para o metil galato (1,42 mM). Quando analisados os valores de V_{max} , o ácido tânico também apresentou valores maiores que o metil galato. O valor da razão V_{max}/K_m obtido para o ácido tânico foi 1,5 vezes maior do que a obtida para o metil galato, mostrando assim que a enzima extracelular é capaz de degradar com maior velocidade e com maior eficiência o ácido tânico (Tabela 10).

Valores de K_m semelhantes ao obtido para a tanase de *Aspergillus carbonarius* já foram descritos para outras tanases microbianas como os obtidos para as enzimas de *Aspergillus flavus* (0,86 mM) (Yamada *et al.*, 1968), *Selenomonas ruminantium* (1,6 mM) (Skene e Brooker, 1995), *Aspergillus tamari* (0,77 mM) (Costa, 2007) e *Cryphonectria parasitica* (7,49 Mm) (Farias *et al.*, 1994).

Figura 17. Representação gráfica de duplo recíproco para determinação do K_m e V_{max} para a tanase extracelular purificada para os substratos ácido tânico (A) e metil galato (B)

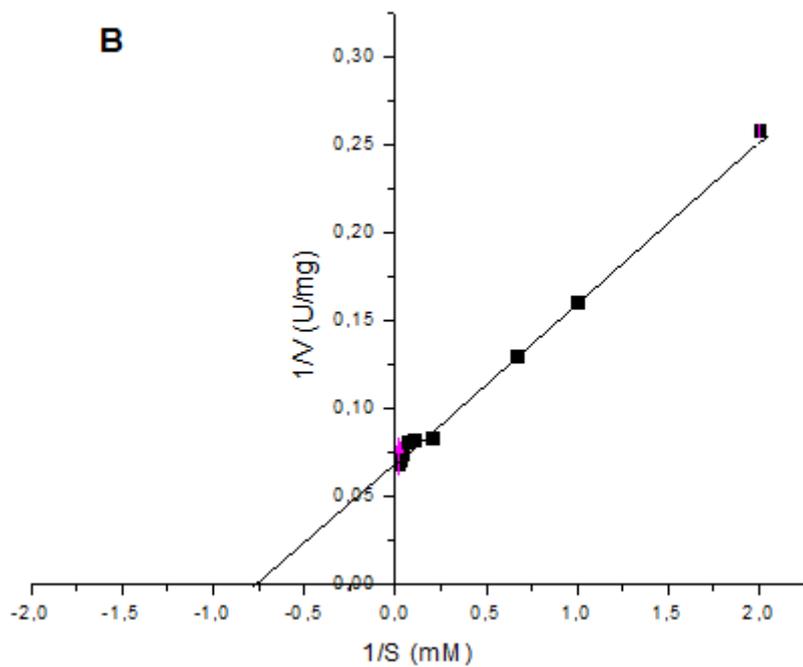
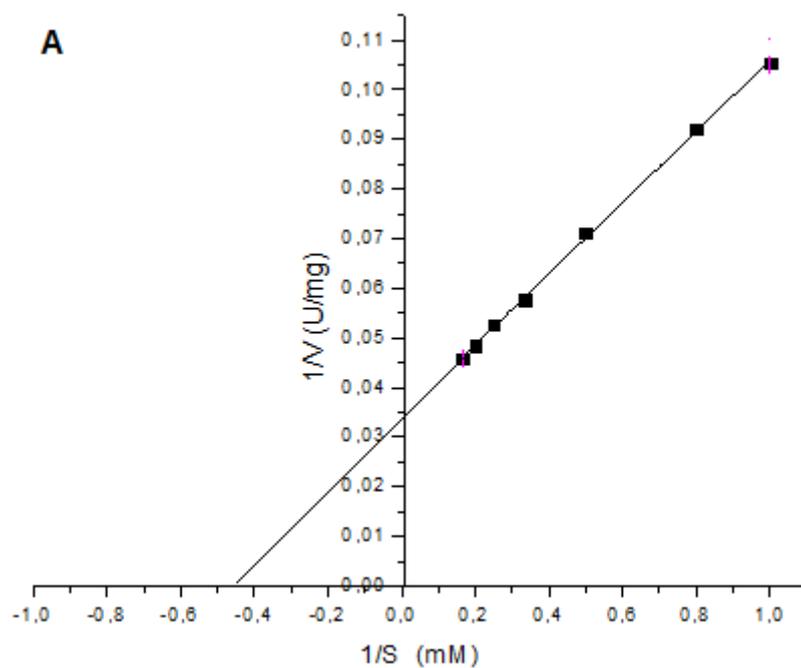


Tabela 10. Parâmetros cinéticos para tanase extracelular produzida por *A. carbonarius*

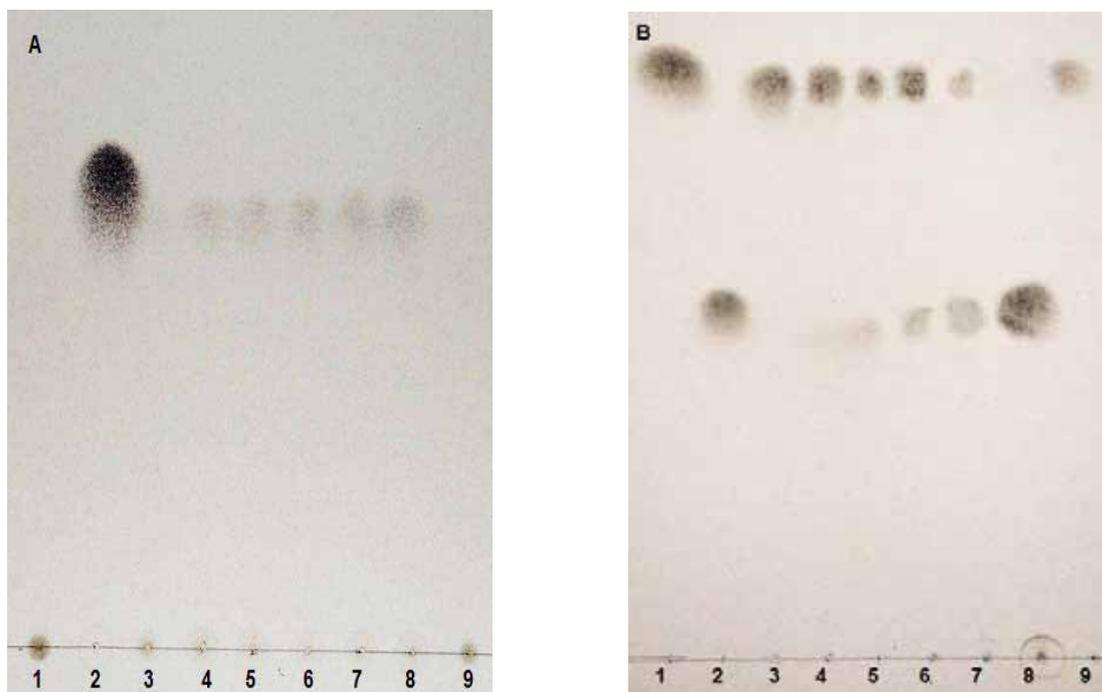
Tanase	Substrato	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)	V_{max}/K_m (Umg ⁻¹ mM ⁻¹)
Extracelular	Ácido tânico	2,2	33,3	15,13
	Metil Galato	1,42	14,70	10,32

4.3.6 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 mostra que o produto formado, ou seja, o ácido gálico, aumenta em função do tempo da reação (Figura 18).

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. tamaritii*, obtendo-se resultados similares (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 18. 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 em 5 minutos; (4) reação em 10 minutos; (5) reação em 20 minutos; (6) reação em 40 minutos; (7) reação em 1 hora; (8) reação em 2 horas; (9) controle negativo.



5.CONCLUSÕES

No presente trabalho, a produção de tanino acil hidrolase (EC 3.1.1.20) também conhecida como tanase, por *A. carbonarius* foi efetiva em fermentação submersa (FSbm) e em substrato sólido (FSS). No entanto, no primeiro caso a atividade enzimática foi observada em grandes quantidades intracelularmente, o que não favorece sua aplicação na indústria, pois sua extração é mais onerosa e exige maior tempo. Além disso tanases produzidas em meio sólido utilizando folhas vegetais como substrato, assim como as folhas de chá verde usadas neste trabalho, não requerem a adição de outros compostos com maior valor agregado como fonte de taninos, sendo esta uma propriedade bastante atraente comercialmente.

As tanases produzidas por *A. carbonarius* 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, desnaturantes e íons, merecendo uma maior atenção a atividade tanásica aumentada pela prata, considerando que este é um potente inibidor de atividade enzimática, diferindo substancialmente da maioria das tanases conhecidas até o momento. Esta tanase apresentou uma melhor afinidade pelo substrato sintético, metil galato, porém uma maior eficiência catalítica pelo substrato natural, ácido tânico. A enzima extracelular foi purificada até a homogeneidade eletroforética e caracterizada, como um heterodímero de 134,89 kDa e com composição de 50% de carboidratos. Tais características fazem desta tanase promissora ferramenta biotecnológica 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.

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

AGUILAR, C. N.; AUGUR, C.; FAVELA-TORRES, E.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid-state fermentation: influence of glucose and tannic acid. **Journal of Industrial Microbiology 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.

AOKI, K.; SHINKE, R.; NISHIRA, H. Purification and some properties of yeast tannase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, p. 79-85, 1976.

ASHOKKUMAR, B.; NAYALVIZHI, N.; GUNASEKARAN, P. Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 331-338, 2001.

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

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 *Penicillium*. **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.

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

BON, E. P. da S.; PEREIRA, N.; GORRSCHALK, L. M. F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J. C.; FERRARA, M.A. Bioprocessos para produção de enzimas. In: BON, E. P.; da S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. (Ed.) **Enzimas em biotecnologia, produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 95-122.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- 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.
- 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.
- CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: a very sensitive colloidal comassie G-250 staining for proteome annalysis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1327-1333, 2004.
- 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.
- COSTA, A. M. **Produção, purificação e caracterização de tanases de *Aspergillus tamarii***. 2007. 36 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.
- COSTA, A. M. Production of tannase by *Aspergillus tamarii* submerged cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 2, p. 399-404, 2008
- COSTA, A. M.; RIBEIRO, W. X.; KATO, E.; MONTEIRO, A. R. G.; PERALTA, R. M. Production of tannase by *Aspergillus tamarii* 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. **Analytical 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.

EL-TANASH, A. B; SHERIEF, A. A; NOUR, A. Catalytic properties of immobilized tannase produced from *Aspergillus aculeatus* compared with the free enzyme. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 28, n. 3, p. 381-391, 2011.

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.

GARCIA-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.

GONÇALVES, H. B.; RIUL, A. J.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, p. 29-35, 2011.

GONÇALVES, H. B.; RIUL, A. J.; QUIAPIM, A. C.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of a thermostable extracellular tannase produced under submerged fermentation by *Aspergillus ochraceus*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 15, p. 1-12, 2012.

GUIMARÃES, L. H. S. Carbohydrates from biomass: sources and transformation by microbial enzymes. In: CHANG, C.-F. (Ed.). **Carbohydrates: comprehensive studies on glycobiology and glycotecnology**. Shangai: InTech, 2012. Chap. 20, p. 441-458.

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.

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.

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.

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.

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.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.

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.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, p. 658-666, 1934.

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.

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.

MATA-GÓMEZ, M.; RODRÍGUEZ, L. V.; RAMOS, E. L.; RENOVATO, J.; CRUZHERNÁNDEZ, 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.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAUJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

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.

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.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. **I. Sugarcane bagasse. Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

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.

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. UNISC, 2002. v. 2.

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 β -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.

RIUL, A. J. **Purificação e caracterização bioquímica de tanases produzidas pelo fungo filamentoso *Aspergillus phoenicis***. 2011 151 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

RIUL, A. J.; GONÇALVES, H. B.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of a glucose- and solvent-tolerant extracellular tannase from *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85/86, p. 126-133, 2013.

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

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.

SABU, A.; PANDEY, A.; DAUD, M. J.; 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.

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.

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

SANDERSON, G. W.; ENGLEWOOD, N. J.; COGGON, P.; ORANGEBURG, N. Y. **Green tea conversion using tannase and natural tea enzyme**. US 3812266A, 07 Ago. 1973, 21 May 1974.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Fructooligosaccharide production using fructosyltransferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR202. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1085-1088, 2005.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Production of fructosyl transferase by *Aspergillus oryzae* CFR 202 in solid-state fermentation using agricultural by-products. **Biotechnological Products and Process Engineering**, v. 65, p. 530-537, 2004.

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.

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.

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.

SILVA, B. M.; BATISTA, L. R.; ALVES, E. Uso da microscopia eletrônica de varredura para diferenciação de espécies de *Aspergillus* seção nigri. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 19., 2010, Lavras. **Anais...** [S. l.]: SBPC, 2010. Disponível em: <<http://www.sbpnet.org.br/livro/lavras/resumos/1673.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2014.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, K.; SOCOOL, C. L.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 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.

SOCCOL, C.; MARIN, B.; RAIMBAULT, M.; LEBEAULT, J. M. Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 330-336, 1994.

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.

XIAO, J. H.; CHEN, D. X.; LIU, J. W.; LIU, Z. L.; WAN, W. H.; FANG, N.; XIAO, Y.; QI, Y.; LIANG, Z. Q. Optimization of submerged culture requirements for the production of mycelial growth and exopolysaccharide by *Cordyceps jiangxiensis* JXPJ 0109. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 1105-1116, 2004.

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.

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.

Anexo

Composição dos meios de cultivo e soluções de sais

Meio Banerjee (Banerjee *et al.*, 2001)

- $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ _____ 3g/L
- MgSO_4 _____ 1g/L
- KH_2PO_4 _____ 0,5g/L
- CaCl_2 _____ 0,3g/L
- Fonte de carbono _____ 10g/L

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_3 _____ 2g
- H_2PO_4 _____ 1,3g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ _____ 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]

- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ _____ 0,24g
- KH_2PO_4 _____ 0,3g
- $NH_4H_2PO_4$ _____ 1g
- Água destilada _____ qsp 100mL

Meio Czapeck (Wiseman, 1975)

- $NaNO_3$ _____ 0,3g
- KH_2PO_4 _____ 0,1g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ _____ 0,05g
- KCl _____ 0,05g
- $Fe_2(SO_4)_3 \cdot 7H_2O$ _____ 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_3 _____ 0,1g
- NaCl _____ 1g
- $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ _____ 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_4 _____ 25g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ _____ 1g
- NH_4NO_3 _____ 10g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ _____ 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

- $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ _____ 5g
- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ _____ 5g
- $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ _____ 1g
- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ _____ 0,25g
- $MnSO_4 \cdot H_2O$ _____ 0,05g
- $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ _____ 0,11g
- H_3BO _____ 1,1g
- Água destilada _____ qsp 100mL

Meio Adams (Adams, 1990)

- Extrato de levedura _____ 0,2g
- KH_2PO_4 _____ 0,1g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ _____ 0,05g
- Fonte de carbono _____ 1g
- Água destilada _____ qsp 100mL