



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

VANILLA MERGULHÃO ALVES DA SILVA

**PRODUÇÃO DE TANASE POR ESPÉCIES DE *ASPERGILLUS* E
PENICILLIUM MANTIDAS NA MICOTECA URM E APLICAÇÃO PARA
CLARIFICAR SUCO DE MANGABA (*Hancornia speciosa* Gomes) E TAMARINDO
(*Tamarindus indica* L.)**

RECIFE
2016

VANILLA MERGULHÃO ALVES DA SILVA

**PRODUÇÃO DE TANASE POR ESPÉCIES DE *ASPERGILLUS* E
PENICILLIUM MANTIDAS NA MICOTECA URM E APLICAÇÃO PARA
CLARIFICAR SUCO DE MANGABA (*Hancornia speciosa* Gomes) E TAMARINDO
(*Tamarindus indica* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Orientadora: Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira

Co-orientadora: Dra. Lidiane Roberta Cruz da Silva

RECIFE
2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Vanilla Mergulhão Alves da

Produção de tanase por espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* mantidas na micoteca URM e aplicação para clarificar suco de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) e Tamarindo (*Tamarindus indica* L.). / Vanilla Mergulhão Alves da Silva- Recife: O Autor, 2016.

50 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Keila Aparecida Moreira

Coorientadora: Lidiane Roberta Cruz da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Biologia de Fungos, 2016.

Inclui referências

1. Fungos 2. Tanase 3. Fermentação I. Moreira, Keila Aparecida (orient.) II. Silva, Lidiane Roberta Cruz da (coorient.) III. Título

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-374

VANILLA MERGULHÃO ALVES DA SILVA

**PRODUÇÃO DE TANASE POR ESPÉCIES DE *ASPERGILLUS* E
PENICILLIUM MANTIDAS NA MICOTECA URM E APLICAÇÃO PARA
CLARIFICAR SUCO DE MANGABA (*Hancornia speciosa* Gomes) E TAMARINDO
(*Tamarindus indica* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 24/02/2016

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Dra. Keila Aparecida Moreira – (Orientadora)
Universidade Federal Rural de Pernambuco/UAG

Dra. Erika Valente de Medeiros
Universidade Federal Rural de Pernambuco/UAG

Dra. Marília de Holanda Cavalcanti Maciel
Universidade Federal de Pernambuco

*Aos meus pais, **Denise Mergulhão e Josenildo Alves**. Por toda dedicação, amor e força.*

Agradecimentos

À Deus por sempre me amparar e iluminar o meu caminho;

À UFPE, Departamento de Micologia e a Pós-Graduação em Biologia de Fungos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo fomento da bolsa de estudo, imprescindível para minha dedicação e permanência no curso;

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a Keila Aparecida Moreira pela orientação;

À minha co-orientadora, Dr^a Lidiane Roberta Cruz da Silva pelos ensinamentos, paciência e orientação;

À Prof^a Dr^a Cristina Maria de Souza Motta pela amizade, força, conselhos e colaboração;

À Prof^a Amanda Reges por todo apoio e orientação;

Ao Prof^o Dr^o Bruno Severo Gomes pela alegria e humanização transmitida;

À Prof^a Dr^a Elaine Malosso pelo acolhimento;

Aos meus familiares que sempre me apoiaram, a minha mãe Denise Mergulhão, meu pai Josenildo Alves e minha irmã Vanessa Mergulhão, por todo amor e incentivo. Sem vocês não teria chegado até aqui. Amo muito vocês;

Ao meu noivo, Phelipe Oller pelos grandes conselhos, companheirismo, carinho, força e amor. Você foi essencial nisso tudo. Te amo;

À minha grande amiga, Erika Cavalcanti por sempre acreditar em mim e torcer pelo meu melhor;

Às minhas amigas de laboratório e toda vida, Marina Araújo, Mayra Silva e Marcela Alves pela amizade, risadas diárias e companheirismo;

À Julyanna Cordoville, Juliana Lima e Minelli Albuquerque, por toda prestatividade e dúvidas sanadas;

Aos meus colegas de laboratório, Antony, Cyndy, Diogo, Goreti e Odacy.

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.

É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.

Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver...”

Martin Luther King

RESUMO

Tanase é uma enzima extracelular induzível produzida por fungos filamentosos, leveduras e bactérias através de Fermentação em Estado Sólido (FES) ou Submersa (FS). Taninos são compostos fenólicos presentes nas plantas, sendo assim, as folhas podem ser ótimos indicadores para a produção da tanase. Espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* se destacam na produção da FES devido a capacidade de suportar diferentes condições físico-química. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a produção de tanase por isolados de *Aspergillus* e *Penicillium*, através da FES, utilizando folhas de castanhola (*Terminalia catappa* L.) como substrato, selecionar o melhor produtor de tanase, otimizar a produção, purificar e aplicar na clarificação dos sucos de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) e tamarindo (*Tamarindus indica* L.). As melhores condições foram determinadas utilizando como ferramenta o Planejamento Placket-Burman (PB) e Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Todas as culturas testadas produziram atividade entre 238,93 e 2088,19 U/gbs. *Aspergillus carneus* URM 5577 se destacou como o melhor produtor. Os melhores parâmetros para a produção de tanase foram: 70 horas de cultivo, pH 6,0, ácido tânico na concentração de 7% à 28°C, como variável resposta a atividade de 5449,31 U/gbs. A melhor condição para a pré-purificação foi a massa molecular do PEG 8000 (g/mol), concentração de PEG de 15% (m/m), citrato de 25% (m/m) e pH 8,0. Em sua aplicação, com o extrato bruto, o suco de mangaba reduziu o teor de tanino em 49,66% após 90 minutos, e tamarindo em 51,82% aos 120 minutos de incubação à 37 °C. As folhas da castanhola se mostrou como um excelente potencial para a produção da enzima, diminuindo assim os custos da produção e enaltecendo o valor do substrato.

Palavras-chave: Taninos. Fermentação em Estado Sólido. Folhas.

ABSTRACT

Tannase is an inducible extracellular enzyme produced by filamentous fungi, yeasts and bacteria by Solid-State Fermentation (SSF) or submerged (SmF). Tannins are phenolic compounds present in plants, therefore, the sheets can be good indicators for the production of tannase. Species of *Aspergillus* and *Penicillium* are highlighted in the production of SSF because of the ability to support different physical and chemical conditions. The objectives of this study were to evaluate the production of tannase by isolates of *Aspergillus* and *Penicillium*, by SSF, using sheets of castanets (*Terminalia catappa* L.) as a substrate, selecting the best tannase producer, optimize production, purify and apply the clarification mangaba of juices (*Hancornia speciosa* Gomes) and tamarind (*Tamarindus indica* L.). The best conditions were determined using as a tool the Placket-Burman Planning (PB) and Response Surface Methodology (RSM). All tested crops produced activity between 238.93 and 2088.19 U/gds. *Aspergillus carneus* URM 5577 stood out as the best producer. The best parameters for producing tannase were 70 hours of cultivation, pH 6.0, tannic acid at a concentration of 7% at 28°C as the response variable 5449.31 activity U/gds. The best condition for the pre-purification was the molecular weight of PEG 8000 (g/mol), concentration of PEG 15% (w/w), 25% citrate (w/w) and pH 8.0. In its application, with the crude extract, the mangaba juice reduced the tannin content of 49.66% after 90 minutes and tamarind 51.82% to 120 minutes of incubation at 37°C. The leaves of the castanet was shown as an excellent potential for the production of the enzyme, thereby lowering the cost of production and exalting the value of the substrate.

Keywords: Tannins. Solid-State Fermentation. Leaves.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hidrólise do ácido tânico pela tanase.....	14
Figura 2: Folhas da castanhola	18
Figura 3. Estruturas morfológicas de <i>Aspergillus</i> A: Conidióforo Bisseriado. B: Conidióforo Unisseriado.	22
Figura 4: Tipos de conidióforos e subgêneros presentes em <i>Penicillium</i> spp. Adaptado de Samson et al. (2004).	23
Figura 5. Resultados do efeito e coeficiente para a produção de tanase apresentados pelas variáveis utilizadas no planejamento Plackett-Burman (PB) do <i>Aspergillus carneus</i> URM 5577.	32
Figura 6. Superfície de resposta para a atividade da tanase considerando ácido tânico e tempo.	33
Figura 7. Superfície de resposta para o fator de purificação considerando CPEG e MMPEG.	35
Figura 8. Gráfico de Pareto dos efeitos para o fator de purificação.	35
Figura 9. Efeito de diferentes volumes do extrato bruto na degradação de taninos presentes no suco de mangaba após 90 minutos de incubação.	36
Figura 10. Efeito de 2 mL de extrato bruto na degradação dos taninos presentes no suco da mangaba em diferentes tempos.....	37
Figura 11. Efeito de diferentes volumes do extrato bruto na degradação de taninos presentes no suco de tamarindo após 90 minutos de incubação.....	38
Figura 12. Efeito de 2 mL de extrato bruto na degradação dos taninos presentes no suco de tamarindo em diferentes tempos.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Matriz experimental do planejamento Plackett-Burman (PB) para a produção de tanase por <i>Aspergillus aureolus</i> URM 7034 e <i>Aspergillus carneus</i> URM 5577 através de FES, utilizando folhas de castanhola.....	27
Tabela 2. Níveis dos fatores utilizados no planejamento experimental do tipo 2 ⁴ selecionados para a extração e purificação da tanase utilizando o SDFA PEG/fosfato.	29
Tabela 3. Atividade de tanase (U/gbs) de linhagens de <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> em Fermentação em Estado Sólido (FES), utilizando folhas da castanhola (<i>Terminalia catappa</i> L.) como substrato, após 96 horas de fermentação.....	31
Tabela 4. Atividade da tanase através do Sistema de Duas Fases Aquosas baseados em PEG 3350, 6000 e 8000	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
2.1 Taninos	13
2.2 Tanase	13
2.3 Fermentação em estado sólido (FES)	14
2.4 Aplicações das tanases.....	16
2.5 Potencial de substrato utilizado como indutor para produção de tanase por fermentação em estado sólido (FES).....	17
2.5.1 Folhas da castanhola (<i>Terminalia catappa</i> L.)	17
2.6 Pré-purificação da tanase: sistema de duas fases aquosas (SDFA)	18
2.7 Produção de tanase por linhagens dos gêneros <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i>	19
2.7.1 <i>Aspergillus Micheli</i>	20
2.7.2 <i>Penicillium Link</i>	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Substratos	25
3.2 Microrganismos e preparação do inóculo.....	25
3.3 Produção de tanase por Fermentação em Estado Sólido (FES).....	25
3.4 Determinação da atividade enzimática	26
3.5 Análise Estatística	26
3.5.1 Otimização da produção de tanase	26
3.5.2 Identificação e seleção das variáveis mais importantes na otimização usando o design Planejamento Placket-Burman (PB).....	27
3.5.3 Otimização dos componentes selecionados utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)	27
3.6 Pré – purificação da tanase	28
3.6.1 Preparo do sistema de duas fases aquosas	28
3.6.2 Delineamento experimental	28
3.6.3 Determinação do coeficiente de partição, rendimento e fator de purificação	29
3.6.4 Aplicação do extrato enzimático bruto ao suco de mangaba e tamarindo para clarificação	30
4. RESULTADOS	31
5 DISCUSSÃO	39
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos responsáveis pela fabricação de diversos produtos de grande importância, como alimentos, bebidas, ácidos orgânicos, fármacos e vem se destacando bastante em seu potencial enzimático devido a sua diversidade bioquímica e facilidade de manipulação genética, os fungos filamentosos vêm se sobressaindo com os demais, destacando-se os gêneros de *Aspergillus* e *Penicillium* (FERNANDES, 2014).

Os taninos ocorrem em uma ampla variedade de vegetais, podendo ser encontrados nas raízes, na casca, nas folhas, nos frutos, nas sementes e na seiva. Representam o quarto mais abundante constituinte vegetal (MANJIT et al., 2008), sendo esses, degradados pela ação da tanase.

Tanino acil hidrolase (TAH) (EC 3.1.1.20), ou tanase, é uma enzima indutiva que catalisa a hidrólise de ligações éster e peptídico em taninos hidrolisáveis, como ácido tânico, liberando glicose e ácido gálico (MARTINS, 2014). Os fungos filamentosos são reconhecidos como ótimos produtores desta enzima, sendo que as espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* se destacam nessa produção (CRUZ et al., 2013; LIMA et al., 2014).

Os processos fermentativos podem ser realizados por microrganismos, mas para a produção de enzimas há preferências por fungos filamentosos, pois são capazes de secretar quantidades significativas de proteínas em meios de culturas (FERNANDES, 2014). O processo fermentativo pode ser de dois tipos, a Fermentação Submersa (FS) quando o microrganismo é inoculado em meio líquido e a Fermentação em Estado Sólido (FES), no qual o microrganismo é inoculado normalmente em resíduos ou substratos sólidos, na ausência de água livre (PEREIRA, 2015).

Existem alguns tipos de substratos utilizados na produção de tanases por fungos, que visam a diminuição dos custos da produção. A folha da castanhola (*Terminalia catappa* L.) é rica em tanino, porém nunca foi utilizada como substrato para a produção de tanase. Quando há produção dessas enzimas, esses substratos podem alcançar um alto valor no mercado (TREVINO-CUETO et al., 2007; SELWAL; SELWAL, 2012; CRUZ et al., 2013).

A presença dos taninos confere um amargor ao alimento, diminuindo o seu consumo e consequentemente o valor comercial. No caso dos vinhos e sucos de frutas, como o da mangaba e tamarindo, os taninos podem causar uma turbidez indesejável, apresentando graves problemas de qualidade diminuindo o valor comercial do produto final. O uso da tanase no

clareamento destas bebidas pode ser uma solução para estes problemas (BANERJEE, et al., 2005; LIMA, et al., 2014).

Dependendo da aplicação a ser dada à tanase que será purificada, pode-se buscar como alternativa a extração com solventes orgânicos, como a pré-purificação em Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA). Neste processo, a separação entre a molécula a ser purificada e os contaminantes decorrerá das diferentes solubilidades apresentadas por esses solutos, em cada uma das fases aquosas. O SFDA é formado pela reunião de determinados polímeros, polieletrólitos, ou ainda, por polímeros em combinação com solutos de baixa massa molecular. Os mais utilizados e estudados são os constituídos por PEG/Dextrana; PEG/fosfato de potássio; PEG/citrato de magnésio e PEG/citrato de sódio (LUCCARINI et al., 2005). Tal processo pode ser utilizado na purificação da tanase e aplicada na clarificação de sucos.

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram avaliar a produção de tanase, através de FES, utilizando folhas de castanholas (*Terminalia catappa* L.) como substrato, por isolados de *Aspergillus* e *Penicillium*, bem como selecionar o melhor produtor, otimizar a produção e aplicar a enzima na clarificação dos sucos de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) e do suco do tamarindo (*Tamarindus indica* L.).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Taninos

Os taninos são compostos polifenólicos naturais que estão amplamente distribuídos em várias partes das plantas desde vacúolos celulares, folhas, casca, frutos, semente à seiva (COUTINHO, 2013). São o quarto grupo mais abundante constituinte vegetal, provenientes do metabolismo secundário das plantas. (FLORES-MALTOS et al., 2011). São caracterizados pela sua capacidade de formar complexos com diferentes minerais e macromoléculas, tais como proteínas, celulose, amido e entre outros (BELE et al., 2010)

Esses compostos possuem princípios ativos de plantas medicinais, e, nos últimos anos, tem havido um grande interesse científico para esse grupo de compostos, devido às suas propriedades antioxidantes, antivirais e propriedades anticancerígenas (CARRETERO-ACCAME, 2000; ASSIS et al., 2015).

Os taninos apresentam um sabor amargo, e isso pode diminuir significativamente a digestão dos nutrientes em humanos. (MINGSHU et al., 2006; ASSIS et al., 2015)

Elevadas concentrações de taninos em bebidas tais como o chá gelado, cerveja, vinho, sumos de frutas e café podem resultar na formação de precipitados, devido a sua interação com outras moléculas presentes nessas bebidas. Estes efeitos indesejáveis de taninos podem ser reduzidos ou eliminados através dos tratamentos enzimáticos (BELMARES et al., 2004; ORTIZ, 2015).

Muitos microrganismos desenvolveram mecanismos para superar os efeitos destes compostos. Estes mecanismos incluem a modificação do tanino, como a degradação dos complexos de tanino-substrato, sendo inativados por ligantes de alta afinidade, a modificação da membrana e do íon metálico (BELUR et al., 2010). A tanase está envolvida na biodegradação de taninos e é um biocatalisador ecologicamente importante.

2.2 Tanase

A tanase, também conhecida como Tanino acil hidrolase (EC 3.1.1.20) é uma enzima induzível que catalisa a hidrólise de ligações de éster e depsídeo em taninos hidrolisáveis, como o ácido tânico, liberando os seus produtos em ácido gálico e glicose (Figura 1).

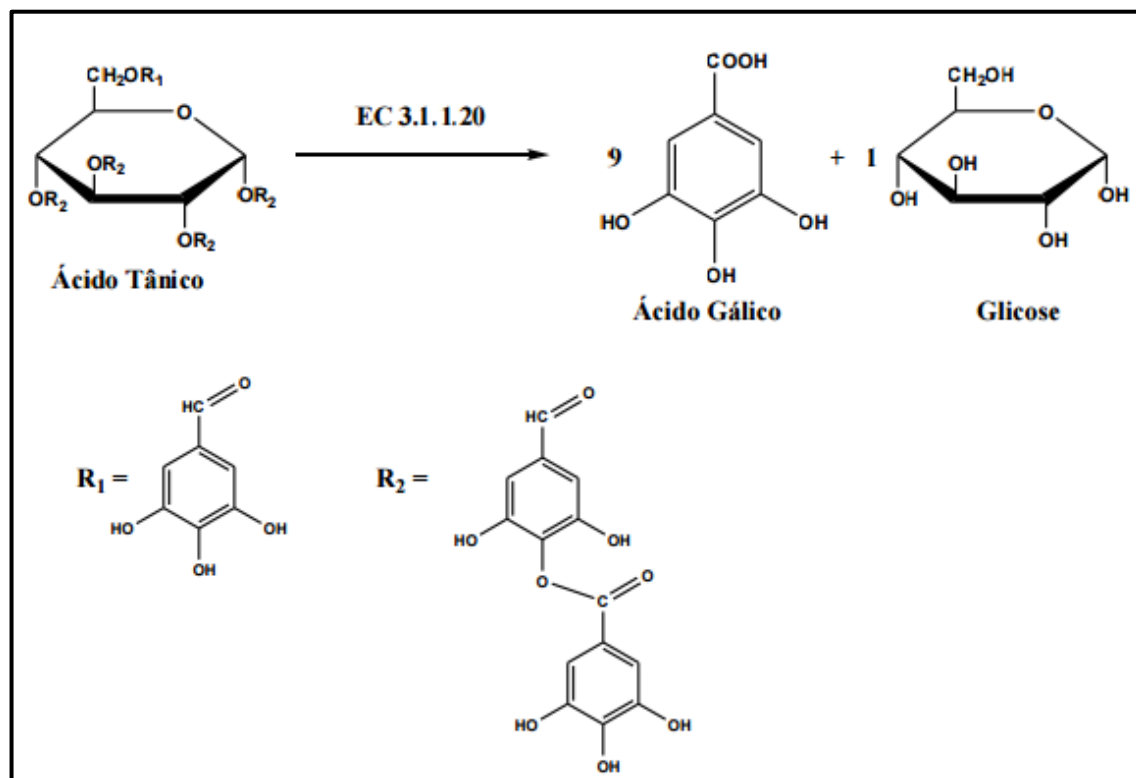


Figura 1. Hidrólise do ácido tânico pela tanase

Fonte: Adaptado de Macedo et al., 2005.

Esta enzima é aplicada comercialmente nas indústrias de bebidas e alimentos, na produção de farmacêuticos químicos, fabricação de cerveja e até na produção da ração animal. Entretanto, seu uso em grande escala ainda é limitado, devido a uma série de fatores, como seu alto custo na produção e pouco conhecimento desta enzima. Assim, existe um interesse crescente em aspectos básicos e aplicados da tanase. Na última década, tem havido uma série de interesses para o melhoramento nos processos da produção, recuperação e purificação da enzima, esses esforços incluem a procura de novas fontes de tanase, o desenvolvimento de novos sistemas de fermentação, a otimização das condições de cultivo a produção da enzima por microrganismo recombinante e o projeto de protocolos eficientes para a recuperação e purificação tanase (CURIEL et al., 2010; RAAMAN et al., 2010).

2.3 Fermentação em estado sólido (FES)

A Fermentação em Estado Sólido é definida como o processo de crescimento de microrganismo em substratos sólidos na ausência de água livre, no qual o substrato sólido deve possuir um suporte ideal para o crescimento metabólico e microbiano (SINGHANIA et al., 2009).

O primeiro relato registrado na produção da tanase através da FES foi em 1917, no qual a espécie de *Aspergillus oryzae* foi fermentada no meio de farelo de trigo e a produção da tanase era maior à medida que se aumentava a concentração de tanino no meio. A partir de 20% de tanino, o crescimento do fungo foi inibido (LEKHA E LONSANE, 1997).

A FES é uma tecnologia muito antiga empregada pelos países do leste e tem atraído a atenção dos países ocidentais nas últimas décadas. Foi relatado que o uso de substratos sólidos para o crescimento de microrganismos remonta aos tempos antigos. A técnica mais antiga da FES foi relatada na fabricação de pães por egípcios em 2600 A.C. Outros relatos antigos da FES podem ser resumidos como a fabricação do queijo produzido por *Penicillium roqueforti*, alimentos orientais e bebidas, como tempeh, sorgo, molho de soja, saké e koji (FEITOSA, 2014). O koji é um produto da fermentação do arroz cozinhado ou outros cereais cozinhados produzidos por *Aspergillus oryzae*, que é ainda utilizado como uma cultura de arranque no molho de soja e produção do saquê (COUTO; SANROMÁN, 2006; COSTA, 2015). Hoje, a produção de koji tradicional é aceito como um modelo para a compreensão do princípio da técnica da FES.

Devido aos aspectos de engenharia e ambientais, a fermentação em estado sólido tem se mostrado muito promissora para o desenvolvimento de produtos e processos biológicos diversos. A FES oferece inúmeras vantagens sobre fermentação submersa (FS). Estes incluem, a alta produtividade volumétrica, baixo custo, concentração relativamente mais elevada dos produtos, menor geração de efluentes, equipamentos de fermentação simples, etc. Os principais fatores que afetam o crescimento e atividade microbiana na FES incluem a seleção de um microrganismo e substrato apropriado, pré-tratamento do substrato, tamanho de partícula (o espaço inter-partículas e a área de superfície) do substrato, a umidade, conteúdo e atividade de água do substrato, umidade relativa, tipo e tamanho do inóculo, a temperatura de fermentação de matéria, a remoção de calor metabólico gerado durante a respiração, período de cultivo, a manutenção da uniformidade em ambiente da FES, e a atmosfera gasosa, ou seja, o consumo de oxigênio e taxa de evolução do dióxido de carbono (SHINDU et al., 2015).

Muitos microrganismos apresentam capacidade de crescimento em substratos sólidos. Tipicamente, os fungos crescem nesses substratos, tais como pedaços de madeira, sementes, raízes e partes das plantas na natureza. O modo de crescimento das hifas permite que o fungo ao penetrar no substrato sólido resulte na colonização do substrato sólido e utilização dos nutrientes disponíveis. Além disso, a boa tolerância à baixa atividade de água e condições de alta pressão osmótica faz dos fungos uma microbiota competitiva para a bioconversão de substratos sólidos (KRISHNA, 2005; BHARGAV et al., 2008; PEREIRA, 2015).

2.4 Aplicações das tanases

A tanase é amplamente utilizada nas indústrias, principalmente na fabricação de chás instantâneo. Pode ser utilizada também na fabricação de cervejas e sumos de frutas diminuindo a turbidez, na fabricação de cafés aromatizados, refrigerantes, e na melhoria do sabor do vinho (SETH; CHAND, 2000; COSTA, 2013). Também tem sido aplicada por clivagem de compostos fenólicos presentes na célula parede de plantas, o que é necessário para a digestibilidade da parede celular vegetal (GARCIA-CONESA et al., 2001; VALERA, 2014).

O ácido gálico que é sintetizado quimicamente é utilizado na indústria farmacêutica para a produção de trimetropim, uma droga bactericana e em sínteses de ésteres como propil galato, usado como antioxidante na indústria de alimentos (OW; STUPANS, 2003; ROCHA, 2015).

Na indústria de bebidas, a tanase pode hidrolisar os compostos fenólicos com outros produtos químicos, diminuindo a sua turbidez. No tratamento da cerveja, as quantidades dessas proteínas estão bem elevadas e causa uma turbidez indesejada, a tanase irá quebrar os polifenóis presentes no malte. O vinho é tratado de forma bem similar para remover estes compostos fenólicos, assim como os sucos de frutas são tratados com tanases para estabilizar e clarificar o produto. Na produção de chá, há uma grande concentração de flavonoides, causando uma turbidez indesejada para os consumidores, a tanase atua como uma atividade catalítica para remover porções do ácido gálico do tanino e polifenóis do extrato do chá (SHARMA et al., 2014).

Singleton e Kratzer (1969) observaram pela primeira vez os efeitos anti-nutricionais dos taninos. Eles estão presentes numa grande variedade dos vegetais, que são utilizados como alimentos para animais (BATE-SMITH; RASPER, 1969). O uso da tanase no pré-tratamento da alimentação contendo tanino pode revelar-se benéfica na remoção destes compostos indesejáveis e também melhoria da digestibilidade. A tanase reduz os efeitos anti-nutricionais dos taninos na alimentação animal.

Os taninos são resistentes ao ataque microbiano e são conhecidos como inibidores de crescimento de alguns microrganismos. O efeito antimicrobiano do tanino diminui a taxa de biodegradação da matéria orgânica do solo (SANTANA, 2014). Compostos polifenólicos sobre tanino forma uma estrutura complexa de substrato com enzimas celulares e intracelulares adicionais a partir de organismos em biodegradação. O tempo para a

decomposição da matéria orgânica do solo pode ser reduzido com o auxílio da tanase (HASLAM; TANNER, 1970).

Segundo Costa (2013), a tanase produzida pelos fungos é uma excelente alternativa para o tratamento de efluentes de curtume, uma vez que apresentam grandes quantidades de taninos, principalmente polifenóis, que são poluentes perigosos e causam graves problemas ambientais. Ela pode ser potencialmente utilizada para a degradação de taninos, pois esses efluentes de curtumes oferecem um custo benefício muito baixo para o tratamento e a remoção destes compostos.

Devido à escassez e alto custo da produção da enzima, o uso da tanase em aplicações de grande escala é limitado. Espera-se, portanto, que os benefícios de sua produção ajudem a melhorar a viabilidade global do processo. Neste contexto, a fermentação em estado sólido, mostra-se como excelente alternativa para produção de tanase por fungos.

2.5 Potencial de substrato utilizado como indutor para produção de tanase por fermentação em estado sólido (FES)

2.5.1 Folhas da castanhola (*Terminalia catappa* L.)

A *Terminalia catappa* L., é uma espécie da família Combretaceae uma planta originária da Índia e da Malásia, e popularmente conhecido no Brasil como "Amendoeira", "amendoeira-da-praia", "Amendoeira-da-Índia", "cuca", "guarda-sol", "Castanheira da Índia", "Castanhola" e "chapéu-de-Sol". Esta planta é amplamente distribuída em países com climas tropicais e subtropicais, especialmente em regiões costeiras, devido à capacidade da planta em se adaptar facilmente à salinidade e os ventos (THOMSON; EVANS, 2006).

As diferentes partes (folhas, frutos e casca) da castanhola mostram distintas atividades biológicas: antimicrobianos, antifúngicos, anti-oxidante, antimetastática, anti-inflamatório, afrodisíaco e antidiabético (CHEN; LI, 2005; PANDYA et al., 2013, YEH et al., 2014). Nunes et al. (2012) descreveu o efeito do extrato etanólico obtido da casca desta espécie, Kumar et al. (2014) relataram previamente o efeito anti-secretor do extrato etanólico das folhas, embora o mecanismo responsável continua desconhecido, assim, o uso desta espécie contra bactérias e doenças gástricas são relevantes. Suas folhas (Figura 2) são ricas em uma ampla variedade de metabólitos secundários, tais como taninos, terpenóides, alcalóides e flavonoides podendo representar uma excelente fonte de carbono para a produção de tanase por FES (FOGAÇA et al., 2013).



Figura 2: Folhas da castanhola

Fonte: www.acaradisco.org

2.6 Pré-purificação da tanase: sistema de duas fases aquosas (SDFA)

O sistema de duas fases aquosas (SDFA) é formado quando duas soluções aquosas enriquecidas com diferentes polímeros (PEG, dextrana, entre outros) ou um polímero e um sal (fosfatos, sulfatos, citratos, entre outros) são misturados em diferentes concentrações, formando assim uma extração líquido-líquido com duas fases. Os polímeros solubilizados e os sais fazem com que as soluções tornem-se incompatíveis, e como resultado, as fases aquosas se tornam imiscíveis (AGUIRRE et al., 2010; GARZA-MADRID et al., 2010; YAN-MIN et al., 2010).

Este fenômeno foi reconhecido pela primeira vez em 1896 por Martinus Beijerinck, descobriu que as soluções aquosas de ágar não se misturavam com outras soluções aquosas de amido ou gelatina (BEIJERINCK, 1896). Desde esta descoberta, a investigação do SDFA tornou-se um campo de estudo e os pesquisadores ainda estendeu a aplicação do sistema com fases múltiplas acima de 18 fases distintas (ALBERTSSON, 1986). Embora tenham sido utilizadas, as considerações teóricas de entalpia e entropia para prever e/ou explicar a formação do SFDA com base na teoria de Flory-Huggins para soluções com polímeros (BASKIR et al., 1989a; BASKIR et al., 1989b; SJÖBERG; KARLSTRÖM, 1989), muitas vezes, uma abordagem empírica é necessária para determinar se um SFDA que se formará com base nos seguintes parâmetros: pesos moleculares do polímero, concentração do sal, temperatura e pH da solução. A saída resultante destas experiências é uma curva que apresenta as concentrações de cada polímero e/ou sal, em soluções, no qual levam à formação de um sistema único ou de duas fases. Ela é avaliada como uma técnica bastante simples e de baixo custo (AZEVEDO et al., 2009; LING et al., 2010).

Uma vez caracterizado, o sistema de duas fases pode ser utilizado para várias aplicações. Uma área que tem sido fortemente investigada é a utilização do SFDA em técnicas

de separação e de purificação em processos biológicos em escala industrial (ASENJO; ANDREWS, 2011).

A distribuição de proteínas entre as duas fases do sistema é caracterizada por um parâmetro denominado de coeficiente de partição (K) que é definido pela relação entre as concentrações da biomolécula nas fases superior e inferior do SFDA (ALBERTSSON, 1986).

Duas características interessantes do SFDA para a purificação e extração de biomoléculas são: baixa tensão interfacial e particionamento da biomolécula. Em primeiro lugar, ao contrário dos sistemas óleo/água que possuem elevadas tensões de superfície e que conduzem à desnaturação das proteínas e de outras biomoléculas, o SFDA têm tensões de superfície baixas e são altamente biocompatíveis, preservando deste modo a estrutura e função do material biológico. Em segundo lugar, o particionamento passivo de determinadas biomoléculas podem gerar soluções altamente purificadas e concentradas. Além disso, o coeficiente de partição é dependente, até certo ponto, sobre as propriedades físico-químicas do SFDA. Alterando a hidrofobicidade, as concentrações e pesos moleculares dos polímeros do SFDA, bem como o pH e as concentrações de vários sais na solução, podem modificar o coeficiente de partição (ALBERTSSON, 1986). Isto é bastante útil para a purificação de proteínas, devido à grande variedade de conformações das mesmas, taxas, tamanhos e hidrofobicidades. Por exemplo, Tubío et al. (2007) utilizou diferentes concentrações e pesos moleculares de polietileno glicol (PEG) e de sódio, bem como o NaCl, para aumentar a tripsina e quimotripsina- α para a fase de citrato do SFDA.

A aplicação do SFDA tem se mostrado, em muitos casos, bastante prático e apresenta excelentes níveis de pureza e rendimentos, podendo ser utilizado na separação e purificação de proteínas, mas, o particionamento é dependente das propriedades físico-químicas das proteínas e sobre a composição do sistema utilizado. O mecanismo de particionamento é complexo, mas algumas tendências muito claras podem ser estabelecidas. A hidrofobicidade é o determinante principal na divisão de proteínas no SFDA (ASENJO; ANDREWS, 2011).

2.7 Produção de tanase por linhagens dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*

A partir do avanço nos estudos sobre enzimas, que vem ocorrendo nos últimos anos, a utilização de fungos filamentosos como fonte de inúmeras enzimas tem adquirido destaque nas mais diversas áreas industriais e comerciais, principalmente na produção em escala industrial estes são selecionados, uma vez que, cerca de 90% das enzimas produzidas são extracelulares (UENOJO; PASTORE, 2007).

Para se obter sucesso na produção de metabólitos fúngicos de interesse, é necessário conhecer detalhadamente suas características de crescimento e principalmente seus aspectos fisiológicos, pois cada fungo é único no seu desenvolvimento anatômico, morfológico e fisiológico. Desta forma, pesquisas tem se direcionado para a seleção de novas linhagens de fungos como fonte de enzimas, explorando assim o potencial biotecnológico da biodiversidade mundial (ABBASI et al., 2011; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011).

Aspergillus e *Penicillium* têm se destacado como gêneros mais importantes para a produção comercial de enzimas extracelulares (NOVAKI, 2009; MACIEL et al., 2013) e são considerados grandes produtores de tanases (BELUR; MUGERAYA, 2011). São gêneros comuns de fungos filamentosos, sendo considerados cosmopolitas. As espécies que os compõe são amplamente distribuídas na natureza, frequentemente isolados de ecossistemas de solo (CAVALCANTI et al., 2006; SCHOENLEIN-CRUSIUS et al., 2006; TANGJANG et al., 2009) e crescendo em diversas condições abióticas (RHODES, 2006).

Selwal e Selwal (2012) observaram a produção de tanase através da fermentação em estado sólido por *Penicillium atramentosum* utilizaram folhas de Amla, Jamoa, Jambul, Syzygium e Kikar, no qual obtiveram resultados da atividade taninolítica de 170,75 e 165,56 U/g, nas folhas de jambul e kikar, durante 96 horas a 28 °C, respectivamente.

Cruz et al. (2013) utilizaram folhas da mangueira (*Mangifera indica* L.) e da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) como substrato para a produção de tanase e como isolado, *Penicillium restrictum* URM 6044 foi considerado o melhor produtor de tanases, produzindo 104,16 U/mL de tanase incubado a 30°C durante 96 horas com a folha da mangueira.

Lima et al. 2014 utilizaram folhas e resíduos de acerola e de mangaba como substrato para a FES e obtiveram a melhor atividade taninolítica por *Penicillium montanense* URM 6286 com 41,64 U/mL, após 72h de fermentação com o resíduo de acerola.

2.7.1 *Aspergillus* Micheli

O gênero *Aspergillus* foi descrito pela primeira vez em 1729 pelo padre-micologista e botânico Pier Antonio Micheli, sendo validado por Link em 1809. A inspiração para nomear o gênero, surge a partir da observação ao microscópio de suas estruturas, no qual foi notado semelhança com um aspergidor de água benta (*Aspergillum*). Entretanto a primeira monografia sobre o gênero e as espécies pertencentes a ele foi publicada por Tom e Church em 1926, baseados em caracteres morfológicos aceitaram 69 espécies de *Aspergillus*, no qual

foram divididas em 11 grupos, sendo a partir daí este gênero considerado um dos maiores gêneros de fungos estudados.

Atualmente o gênero possui mais de 260 espécies, no entanto esse número tende a aumentar, devido à taxonomia baseada em uma abordagem polifásica que vem sendo recentemente utilizada. Nesta abordagem são verificadas as características morfológicas, bioquímicas, ecológicas, genéticas e moleculares, e suas interações, com intuito de analisar a variabilidade dentro da espécie e adicionar ou reclassificar as espécies dentro do gênero (PERRONE et al., 2007; PETERSON, 2008; PILDAIN et al., 2008; SAMSON; VARGA, 2009; BENNETT, 2010; KRIJGSHELD et al., 2013).

As espécies de *Aspergillus* apresentam diferentes características fisiológicas e morfológicas. A temperatura de crescimento está entre 15 e 35 °C, porém algumas espécies podem crescer a temperaturas acima de 35 °C. O pH em torno de 6,0 é considerado ótimo para a maioria das espécies e a taxa de crescimento em meios de cultura é de rápida para moderadamente rápida. As colônias apresentam uma ampla variação na coloração, em tons de verde, amarelo, cinza, marrons, preto e branco, assim como o reverso. Também podem apresentar esclerócios e clestotécio, produção de exsudatos e pigmentos solúveis (KLICH, 2002a).

Quanto as estruturas microscópicas, apresentam hifas septadas de aproximadamente 4 mm de diâmetro, que podem se diferenciar em hifas especializadas, denominadas conidióforos, onde se encontram as células conidiogênicas que dão origem aos conídios (esporos assexuais) (Figura 3). Os conidióforos são asseptados e com a base em forma de “T” ou “L”, comumente chamada de “célula pé”, conectada a uma hifa vegetativa. A partir da célula pé os conidióforos se estendem por alguns milímetros de comprimento e em sua extremidade ocorre uma expansão chamadas de vesículas que podem apresentar até 7 diferentes formatos (KLICH, 2002b).

Na vesícula são formadas as células conidiogênicas denominadas de métulas e fiálides. De acordo com a produção do conídio as espécies podem ser divididas em: unisseriadas (possuem o conídio diretamente ligado às fiálides) ou bisseriadas (apresentam métulas, estruturas especializadas que ficam entre a vesícula e as fiálides) (KLICH, 2002b).

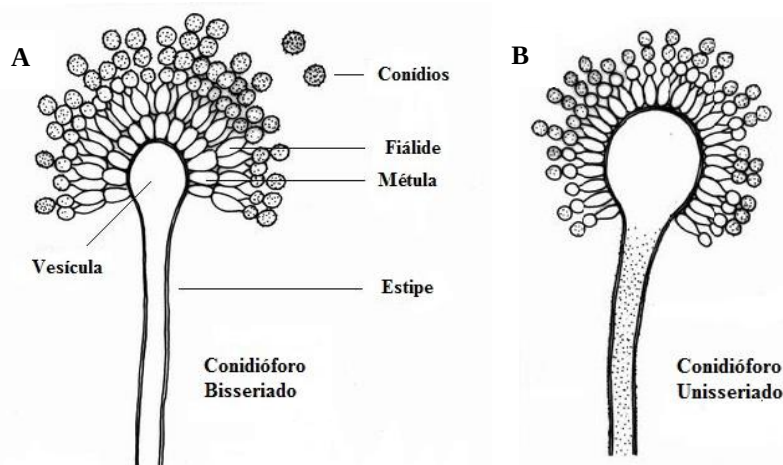


Figura 3. Estruturas morfológicas de *Aspergillus* **A:** Conidióforo Bisseriado. **B:** Conidióforo Unisseriado. Adaptado de Klich e Pitt (1988).

Aspergillus é um dos gêneros de fungos economicamente mais importantes, no qual abriga espécies de grande interesse biotecnológico, onde são utilizadas na produção industrial de alimentos e de produtos farmacêuticos devido ao diverso perfil enzimático. São utilizados industrialmente como fonte de enzimas extracelulares: tanase, amilase, catalase, celulase, glucoamilase, lipase, pectinase, protease, xilanase e fitase, utilizadas em diversos setores industriais, bem como na produção de ácidos orgânico, cítrico e glucônico, dentre outros (PANDEY et al., 2005; BENDER et al., 2008; MANJIT et al., 2008; MRUDUL; MURUGAMMAL, 2011; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011).

2.7.2 *Penicillium* Link

O gênero *Penicillium* foi descrito pela primeira vez por Link em 1809 em seu trabalho “*Observationes in Ordines plantarum naturales*”, no qual foram descritas as espécies *Penicillium glaucum*, *Penicillium candidum* e *Penicillium expansum*. O nome *Penicillum* deriva da palavra em latim *Penicillius*, que significa pincel, devido seus conidióforos terem possuírem forma de pincel. Em 1910, Thom designou *P. expansum* como espécie tipo para este gênero (RAPER; THOM, 1949).

No ano de 1993, durante o congresso ‘*Fifteenth International Botanical Congress*’, Pitt e Samson propuseram uma lista que foi aprovada com 223 nomes de *Penicillium* spp e de 61 teleomorfos dos gêneros *Eupenicillium* e *Talaromyces*, para a família Trichocomaceae. Recentemente foi publicado uma lista de espécies aceitas que inclui 225 *Penicillium* ssp. e 61 nomes de seus teleomorfos *Eupenicillium* e *Talaromyces*. (PITT et al., 2000). Esta lista também inclui nomes vigentes de uso mais frequentes, juntos com seus respectivos sinônimos.

O gênero *Penicillium* possui ampla distribuição na natureza e apresenta colônias com diferentes colorações, principalmente com diferentes tonalidades de verde (verde-amarelas, verde-azuladas, verde-acinzentadas). O reverso das colônias pode ser incolor, ou variar de tons de amarelo, verde, vermelho e marrom. Os isolados de algumas espécies podem produzir pigmentos que modificam a tonalidade do meio de cultura. Podem crescer em uma gama de temperaturas e substratos, sem do necessário o cultivo em meios específicos para taxonomia (PITT et al., 2000; FRISVAD; SAMSON, 2004).

Penicillium spp. caracteriza-se pela produção de conídios dispostos em cadeia que se originam a partir da fiálide (célula conidiogênica), com os conidióforos apresentando estrutura morfológica semelhante a pequenos pincéis. Os conidióforos estão unidos ao micélio vegetativo pela estirpe. Entre as fiálides e o conidióforo podem aparecer diferentes células, que se apresentam agrupadas e se originam de um mesmo ponto. A partir das fiálides, os pontos de ramificação (um, dois, ou três) ao longo do conidióforo. A célula de suporte da fiálide se denomina métula que é sustentada pela rama. As ramificações dos conidióforos são classificadas como: monoverticiladas, biverticiladas, triverticiladas e quadriverticiladas (Figura 4) e contribuíram para a classificação das espécies de *Penicillium* em quatro subgêneros: *Aspergilloides*: monoverticilados (conidióforo mais simples); *Biverticillium* e *Furcatum*: apresentam conidióforos biverticilados; *Penicillium* o subgênero mais complexo, por apresentar todas as estruturas descritas: fiálides, métulas, ramificações intermediárias na estirpe (PITT, 1991).

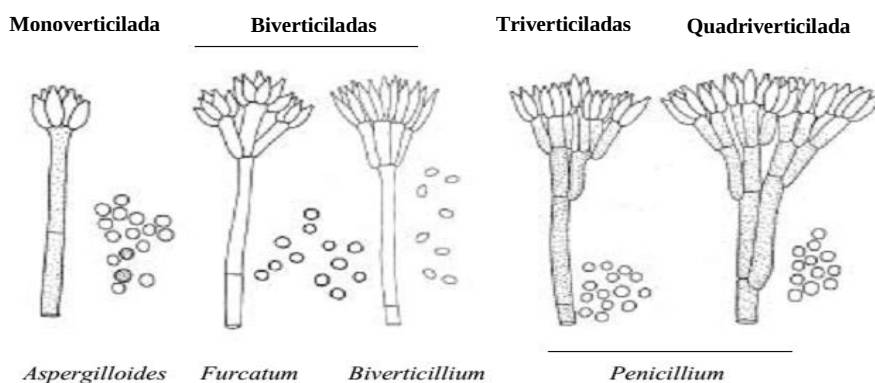


Figura 4: Tipos de conidióforos e subgêneros presentes em *Penicillium* spp. Adaptado de Samson et al. (2004).

Penicillium é gênero cosmopolita, ocorrendo em uma variada gama de habitats, principalmente no solo. Seus conídios estão presentes no ar e são considerados contaminantes de alimentos, tendo grande impacto econômico. Sua principal função na natureza é a decomposição de compostos orgânicos (FRISVAD; SAMSON, 2004).

Na indústria de alimentos, destacam-se *Penicillium camemberti* e *Penicillium roqueforti*, que são utilizados para a produção de queijos especiais, como *Camembert* ou *Roquefort* (GIRAUD et al., 2010). Algumas espécies também são utilizadas em processos fermentativos durante a fabricação de salsichas (LUDEMANN et al., 2010).

Devido a sua grande capacidade de produção de diferentes enzimas extracelulares, como amilase, protease, tanase, xilanase, celulase, etc, *Penicillium* spp. são estudadas para a seleção de melhores linhagens quanto a produção de diferentes enzimas e descobertas de novas enzimas, além de otimização de processos de produção enzimáticos, amplamente empregadas em vários processos na indústria de alimentos, indústria têxtil, produção de bebidas, detergentes e papel (LI et al., 2007; ADSUL et al., 2007; TERRASAN et al., 2010).

Assim, o conhecimento da biodiversidade e da bioprospecção microbiana tornara-se um dos focos principais da era biotecnológica, visto que a utilização desses organismos na busca de soluções nas áreas de saúde, alimentos, meio ambiente e indústria vêm crescendo de forma acelerada (BURKE et al., 2011)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Substratos

Folhas de castanhola (*Terminalia catappa* L.) foram obtidas no campus da Universidade Federal de Pernambuco, situada no município de Recife em Pernambuco (8°02'55.20"S e 34°57'03.90"O) - Brasil. No qual foram previamente lavadas com água corrente, seguido de água destilada, secas em estufa a 55 °C durante 72h e trituradas mecanicamente (LIMA et al., 2014).

3.2 Microrganismos e preparação do inóculo

Foram selecionadas 15 espécies de *Aspergillus* e 15 espécies de *Penicillium*, preservadas em óleo mineral (SHERF, 1943), estocadas na Micoteca URM do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco. O método de seleção utilizado foi: o fungo não ser de interesse médico ou produtor de micotoxina.

Cada isolado foi inoculado em Ágar Extrato de Malte (MEA), contido em tubo de ensaio e incubado a 30 °C. Após o crescimento, as culturas foram mantidas a 4 °C para utilização em curto prazo. Posteriormente, esporos de cada cultura foram transferidos para o tubo de ensaio contendo 10 mL de água destilada esterilizada e 0,1% de Tween 80. A suspensão de esporos foi utilizada como inóculo. Os esporos foram quantificados pela técnica de contagem em placa, na concentração de 5×10^8 esporos/mL (SABU et al., 2005).

3.3 Produção de tanase por Fermentação em Estado Sólido (FES)

Cinco gramas das folhas da cantanhola (*Terminalia catappa* L.) foram acondicionados em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL e esterilizados a 121 °C, durante 30 min em vapor fluente. Os substratos foram umedecidos com 5 mL de uma solução esterilizada de sais contendo 0,5% m/v de NH_4NO_3 , 0,1% m/v de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,1% m/v de NaCl, pH 5,0. O teor de umidade foi ajustado para 50%. Todos os ensaios foram feitos em triplicata e em cada frasco foi inoculado com 1 mL da solução de esporos (5×10^8 esporos/mL). O conteúdo foi misturado e incubado a 30 °C durante 96h (SABU et al., 2005). Após este período, a cada frasco foram adicionados 50 mL de água destilada contendo 0,01% de Tween 80, previamente

esterilizada. Em seguida, os frascos foram agitados em agitador rotatório (Tecnal TE421, São Paulo, Brasil) a 150 rpm durante 10 minutos. Em seguida, o conteúdo foi filtrado utilizando papel de filtro Whatman #1 e o filtrado foi considerado como extrato enzimático bruto, sendo acondicionado em frascos cônicos e preservados a -4 °C para posterior análises (SABU et al., 2005).

3.4 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada através espectrofotometria de acordo com o método de Sharma modificado (SHARMA; GUPTA, 2003). Este método baseia-se na formação de um cromógeno entre ácido gálico (liberado pela atividade de tanase esterase) e a rodanina (2-tio-4-cetotiazolidina). Para determinar o ácido gálico, 100 µl do extrato enzimático bruto foi incubado com ácido tânico (0,3 mM) em tampão de fosfato de sódio (10 mM, pH 5,5) durante 30 min a 30 °C. Em seguida, 300 µl da solução metanólica de rodanina (0,667 % p/v de rodanina em metanol 100 %) e 100 µl de KOH 500 mM foram adicionados à mistura que foi diluída com 900 µl de água destilada e incubados durante 10 min a 30 °C. Após esse período, as amostras foram lidas em espectrofotômetro (Hitachi-U5100) a absorvância de 520 nm. No qual foi realizada uma curva padrão, utilizando ácido gálico em diferentes concentrações. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Uma unidade de atividade de tanase (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um µmol de ácido gálico por minuto sob condições de reação definida. A atividade da enzima foi expressa em U/gbs.

3.5 Análise Estatística

3.5.1 Otimização da produção de tanase

Das 30 espécies, apenas 1 foi escolhido para a otimização das melhores condições para a produção da tanase pelo fungo selecionado, foram utilizados dois estágios: o design Planejamento Placket-Burman (PB) e a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR).

3.5.2 Identificação e seleção das variáveis mais importantes na otimização usando o design Planejamento Placket-Burman (PB)

Para seleção dos componentes do meio para a produção de tanase, foi utilizado design Plackett Burman (PB), no qual foram avaliadas as variáveis Tempo (h), Temperatura (°C); pH e Ácido Tânico (%). Cada componente foi examinado em dois níveis: "-1" para baixo e nível "+1" alto, utilizando o pacote de software estatístico ESTATÍSTICA 8.0, que gerou um conjunto de 12 ensaios experimentais (Tabela 1).

Tabela 1. Matriz experimental do planejamento Plackett-Burman (PB) para a produção de tanase por *Aspergillus aureolus* URM 7034 e *Aspergillus carneus* URM 5577 através de FES, utilizando folhas de castanhola.

ENSAIO	pH inicial	Temperatura de incubação (°C)	Ácido tânico (% p/v)	Tempo de fermentação (h)
1	6 (+)	28 (-)	7 (+)	48 (-)
2	6 (+)	32 (+)	1 (-)	96 (+)
3	4 (-)	32 (+)	7 (+)	48 (-)
4	6 (+)	28 (-)	7 (+)	96 (+)
5	6 (+)	32 (+)	1 (-)	96 (+)
6	6 (+)	32 (+)	7 (+)	48 (-)
7	4 (-)	32 (+)	7 (+)	96 (+)
8	4 (-)	28 (-)	7 (+)	96 (+)
9	4 (-)	28 (-)	1 (-)	96 (+)
10	6 (+)	28 (-)	1 (-)	48 (-)
11	4 (-)	32 (+)	1 (-)	48 (-)
12	4 (-)	28 (-)	1 (-)	48 (-)

3.5.3 Otimização dos componentes selecionados utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

Para conhecimento do nível ótimo da variável selecionada pelo PB (Tempo (h)), foi aplicada a MSR, utilizando o software estatístico ESTATÍSTICA 8.0. No qual foi estudada em cinco diferentes níveis (12, 24, 36, 48 e 70h). Os experimentos foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 5 gramas da folha da castanhola adicionado da solução de sais (pH 6,0), 7% de ácido tânico, preparados de acordo com o design, à 28 °C.

3.6 Pré – purificação da tanase

3.6.1 Preparo do sistema de duas fases aquosas

Para a extração da tanase, o sistema foi preparado com PEG de diferentes massas moleculares (3350, 6000 e 8000 g/mol) e sais de fosfato. As soluções fosfato (40%, m/m) foram preparadas pela mistura de quantidades adequadas de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) a diferentes valores de pH (6,0, 7,0 e 8,0) a 25 ± 1 °C. As quantidades desejadas de PEG e sal foram colocadas em tubos de centrifuga graduados (15 mL). O extrato enzimático bruto contendo as PG, representa 20% do volume total do sistema e foi adicionado aos tubos, a água adicionada a um peso final de 10 g. Após agitação por um minuto em vórtex, os tubos permaneceram em repouso por 60 min para a separação das fases. Os volumes de cada fase foram mensurados e em seguida separados com pipetas automatizadas. As atividades enzimáticas e dosagem do teor de proteína foram determinados, o que permitiu o cálculo do coeficiente de partição, rendimento e fator de purificação da tanase.

3.6.2 Delineamento experimental

Os efeitos da massa molar do PEG (M_{PEG}), concentração do PEG (C_{PEG}), concentração de fosfato (C_{FOS}) e pH sobre as variáveis resposta do sistema (coeficiente de partição (K), rendimento em atividade (Y) e fator de purificação (FP) foram avaliados com base nos resultados obtidos por um planejamento experimental do tipo 2^4 , mais um ponto central que foi realizado duas vezes para permitir uma estimativa do erro experimental (VIEIRA NETO et al., 2002). Os valores selecionados para estas variáveis (Tabela 2) foram escolhidos com base nos diagramas de relatos binodais na literatura (VERNAU; KULA, 1990; ASSIS et al., 2001). Todas as análises estatísticas e gráficos foram feitos no software Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA) (STATSOFT, 2008).

Tabela 2. Níveis dos fatores utilizados no planejamento experimental do tipo 2⁴ selecionados para a extração e purificação da tanase utilizando o SDFA PEG/fosfato.

Variáveis	Níveis		
	Baixo (-1)	Central (0)	Alto (+1)
M_{PEG}^a	3350	6000	8000
C_{PEG}^b	15	20	25
C_{FOS}^c	15	20	25
pH	6.0	7.0	8.0

^aMassa molar do PEG (g/mol). ^bConcentração do PEG (%). ^cConcentração de fosfato (%).

3.6.3 Determinação do coeficiente de partição, rendimento e fator de purificação

O coeficiente de partição da enzima foi definido como a razão entre a atividade enzimática das enzimas na fase superior (At) e na fase inferior (Ab):

$$K = \frac{At}{Ab} \quad (1)$$

O fator de purificação foi calculado como a razão entre a atividade específica na fase superior e a atividade específica do extrato enzimático bruto (antes da partição) (Ai):

$$PF = \frac{At / Ct}{Ai / Ci} \quad (2)$$

onde Ct e Ci são as concentrações de proteína total, expressa em g/mL, na fase superior e no extrato enzimático bruto, respectivamente.

O rendimento da atividade foi definido como a razão entre a atividade total na fase superior e a do extrato enzimático bruto e foi expresso em porcentagem:

$$Y = \left(\frac{AtVt}{AiVi} \right) \times 100 \quad (3)$$

onde Vt e Vi são os volumes da fase superior e do extrato enzimático bruto, respectivamente.

3.6.4 Aplicação do extrato enzimático bruto ao suco de mangaba e tamarindo para clarificação

Para o preparo dos sucos, frutos de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) e do tamarindo (*Tamarindus indica* L.) foram lavados em água corrente, retiradas as sementes e a polpa foi liquidificada (Black&Decker, LF910) e, em seguida filtrada com o auxílio de peneira granulométrica (Peneira em aço Inox - ASTM 1/4 Polegadas, abertura 6,30 mm). O suco foi estocado a -4 °C para posteriores análises (SABU et al., 2005).

Para clarificação, em frascos de Erlenmeyers de 125 mL foram adicionados 10 mL separadamente do suco de mangaba e tamarindo, aos quais foram acrescidos diferentes alíquotas de extrato enzimático bruto: (0,5 mL; 1,0mL; 1,5mL e 2,0 mL), no qual continha 5449,31 U/gbs de tanase. Como controle foi utilizado o suco de mangaba e tamarindo, separadamente, sem adição de extrato enzimático bruto. Em seguida, os frascos foram mantidos em agitador rotativo a 150 rpm com temperatura ajustada para 37 °C, durante 120 minutos, sendo analisados a cada 30 min (0, 30, 60, 90 e 120 min). Os ensaios foram realizados em quintuplicada. Após agitação, os frascos foram incubados em banho Maria, durante 10 min a 50 °C. Após esse período, foi retirado 1 mL de suco tratado com o extrato enzimático bruto para dosagem do teor de taninos de acordo com Hagerman e Butler (1978).

O teor de taninos presente no suco da mangaba e do tamarindo foi determinado através do método de precipitação de proteínas por taninos, de acordo com Hangerman; Butler (1978).

4. RESULTADOS

Quando inoculadas no substrato testado através de FES todas as 30 linhagens testadas produziram tanase (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade de tanase (U/gbs) de linhagens de *Aspergillus* e *Penicillium* em Fermentação em Estado Sólido (FES), utilizando folhas da castanhola (*Terminalia catappa* L.) como substrato, após 96 horas de fermentação.

Linhagens	URM	U/gbs
<i>Aspergillus aureolus</i>	7034	2088,19
<i>A. carneus</i>	5577	1128,59
<i>Penicillium implicatum</i>	6223	1055,75
<i>P. brasilianum</i>	6892	974,16
<i>P. melinii</i>	6463	933,37
<i>A. viride-nutans</i>	7033	929,49
<i>P. corylophilum</i>	6491	925,60
<i>P. brevicompactum</i>	6833	881,90
<i>P. aurantiogriseum</i>	6844	867,33
<i>P. fellutanum</i>	6472	855,67
<i>A. candidus</i>	6607	810,02
<i>A. flavus</i>	7028	802,25
<i>A. flavo-furcatis</i>	6142	774,09
<i>P. griseofulvum</i>	6846	773,12
<i>A. versicolor</i>	7029	749,81
<i>A. carbonarius</i>	6613	738,15
<i>A. tubingensis</i>	6991	683,76
<i>P. adametzii</i>	7015	662,39
<i>P. janczewskii</i>	6672	599,26
<i>P. citrinum</i>	7030	588,58
<i>A. terreus</i>	3420	523,50
<i>A. aculeatus</i>	7013	518,65
<i>A. caespitosus</i>	5938	511,85
<i>A. sclerotiorum</i>	6619	506,02
<i>P. commune</i>	6671	427,35
<i>P. purpurogenum</i>	6634	372,96
<i>A. oryzae</i>	5638	303,03
<i>P. citreonigrum</i>	6458	255,44
<i>P. restrictum</i>	6135	253,50
<i>A. niveus</i>	5461	238,93

Duas espécies se destacaram na produção da enzima, o *Aspergillus aureolus* URM 7034 e *Aspergillus carneus* URM 5577, sendo selecionados para a otimização da produção da tanase.

Para aumentar a produção de tanase, as duas espécies destacadas foram otimizadas utilizando-se o delineamento experimental Plackett-Burman (PB) e com o melhor otimizado, foi aplicado a metodologia de superfície resposta (MSR), visando selecionar variáveis

importantes na produção da tanase, bem como verificar os níveis significativos. Foram analisadas 4 variáveis: Tempo (h), Temperatura (°C); pH e Ácido Tânico (%) em relação a produção de tanase. O efeito da variável encontra-se na figura 5. A variável independente foi o tempo (h) evidenciando a influência dessa variável foi maior nos parâmetros testados na produção de tanase por *Aspergillus carneus* URM 5577.

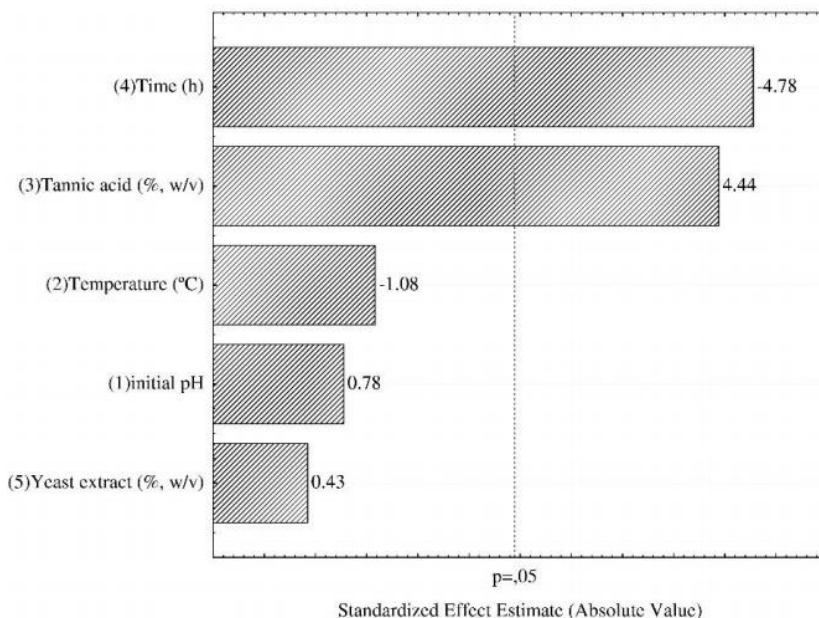


Figura 5. Resultados do efeito e coeficiente para a produção de tanase apresentados pelas variáveis utilizadas no planejamento Plackett-Burman (PB) do *Aspergillus carneus* URM 5577.

O tempo de fermentação foi identificado como a variável mais significativa para a produção de tanase por *Aspergillus carneus* URM 5577 em FES utilizando o modelo Plackett-Burman (Figura 1). Para o *A. aureolus* URM 7034, não houve aumento significativo da atividade, sendo então descartado das atividades posteriores. Essa variável foi selecionada para ser otimizada utilizando parâmetros disponibilizados pelo programa estatístico, através da Metodologia de Superfície Resposta (MSR).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). A equação de regressão quadrática foi a que melhor explicou a otimização das variáveis do meio para a produção de tanase, com um R^2 de 0,98, explicando 98% da variabilidade do modelo e demonstrando a qualidade do mesmo.

As interações entre as variáveis geraram gráficos tridimensionais que mostram o aumento na produção de tanase, sugerindo uma produção ótima (5571,09 U/gbs) em meio de cultura adicionado de 7% de ácido tânico, incubado a 28°C, durante 70h e pH 6. Portanto, houve um aumento de aproximadamente de 4% na produção da enzima, quando comparado ao valor máximo de atividade obtida no planejamento PB (5449,31 U/gbs) e de

aproximadamente 5 vezes superior quando comparada ao *screening* inicial (1128,59U/gbs), provando a validade do modelo de otimização.

De acordo com o planejamento MSR, quando analisados simultaneamente os fatores tempo e teor de ácido tânico, observou-se que produção de tanase por *Aspergillus carneus* URM 5577 aumenta de acordo com o aumento do teor de ácido tânico, até um nível de aproximadamente 7,2% e depois volta a cair e quanto ao tempo de incubação, seu ponto máximo é atingido num tempo máximo de 70h (Figura 6).

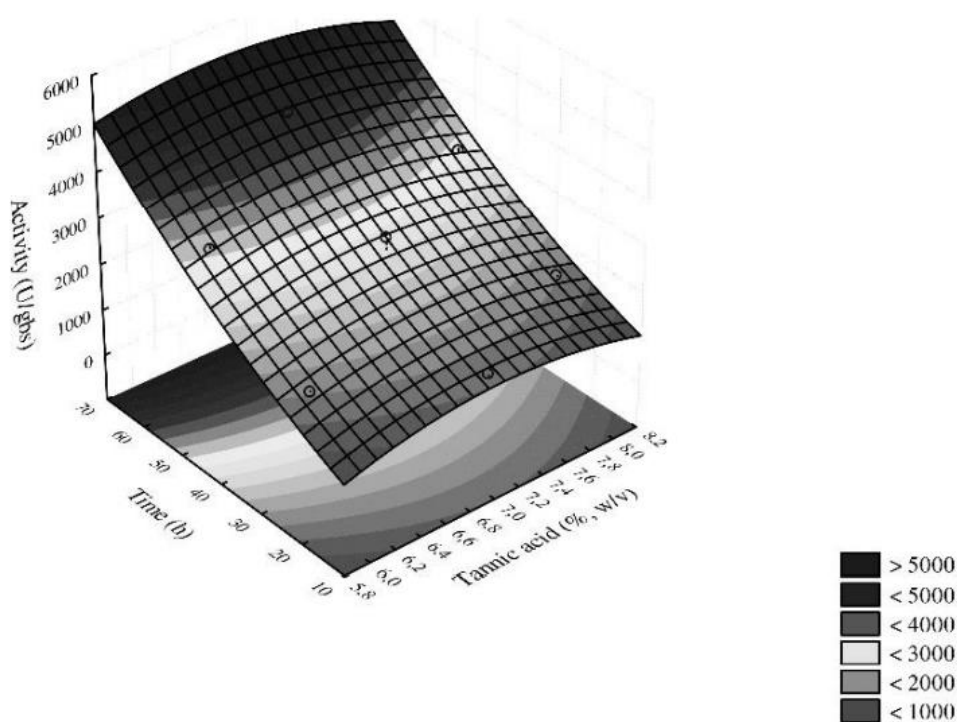


Figura 6. Superfície de resposta para a atividade da tanase considerando ácido tânico e tempo.

Para a purificação da enzima foram testados PEG de diferentes massas moleculares (3350, 6000 e 8000) em pH 6, 7 e 8. Foram escolhidos os pontos aleatórios da região bifásica de acordo com a fase que a tanase se fixou, que no caso foi a PEG. Na tabela 4, estão apresentados os resultados obtidos para o fator de purificação, recuperação taninolítica (RT) e coeficiente de partição (K).

Tabela 4. Atividade da tanase através do Sistema de Duas Fases Aquosas baseados em PEG 3350, 6000 e 8000

Ensaio	PEG (%)	pH	PEG	Citrato de Potássio	Fator de Purificação	Kpartição	RT (%)
1	15	6	3350	15	3,72	23,14	2166,38
2	15	6	8000	15	1,83	8,14	1906,95
3	25	6	3350	15	2,13	17,84	1981,65
4	25	6	8000	15	1,73	10,58	599,64
5	15	8	3350	15	2,21	14,44	1280,49
6	15	8	8000	15	2,75	11,44	1518,05
7	25	8	3350	15	1,36	16,29	2122,61
8	25	8	8000	15	8,07	12,60	2327,76
9	15	6	3350	25	3,82	15,62	1941,95
10	15	6	8000	25	4,95	10,35	1366,20
11	25	6	3350	25	3,58	21,82	2269,33
12	25	6	8000	25	6,42	14,22	1514,90
13	15	8	3350	25	1,56	25,51	1749,58
14	15	8	8000	25	8,15	17,03	1389,52
15	25	8	3350	25	2,44	21,18	1941,43
16	25	8	8000	25	7,39	18,90	2229,30
17	20	7	6000	20	1,93	7,89	1440,41
18	20	7	6000	20	1,77	9,01	1382,69

*RT: Recuperação Taninolítica

De acordo com o planejamento MSR, quando analisados simultaneamente as variáveis independentes, MMPEG e Citrato, apresentaram efeito significativo para o FP. O maior fator de purificação (FP = 8,15), foi observado no ensaio 14, utilizando 15 % PEG 8000 e 25% de citrato de potássio pH 8, com uma recuperação de 1389,52 %. O ensaio 8 apresentou um FP de 8,07 utilizando 25% de PEG 8000 e 15% de citrato de potássio pH 8, com uma recuperação de 2327,76 % (Figura 7).

As maiores recuperações (RT) foram observadas nos ensaios 8, com 25 % PEG 8000 e 15% citrato de potássio e o ensaio 11, com 25% PEG 3350 e 25% citrato de potássio, com RT de 2327,76% e 2269,33%, respectivamente (Tabela 4). Todos os ensaios conduziram a purificação (FP > 1).

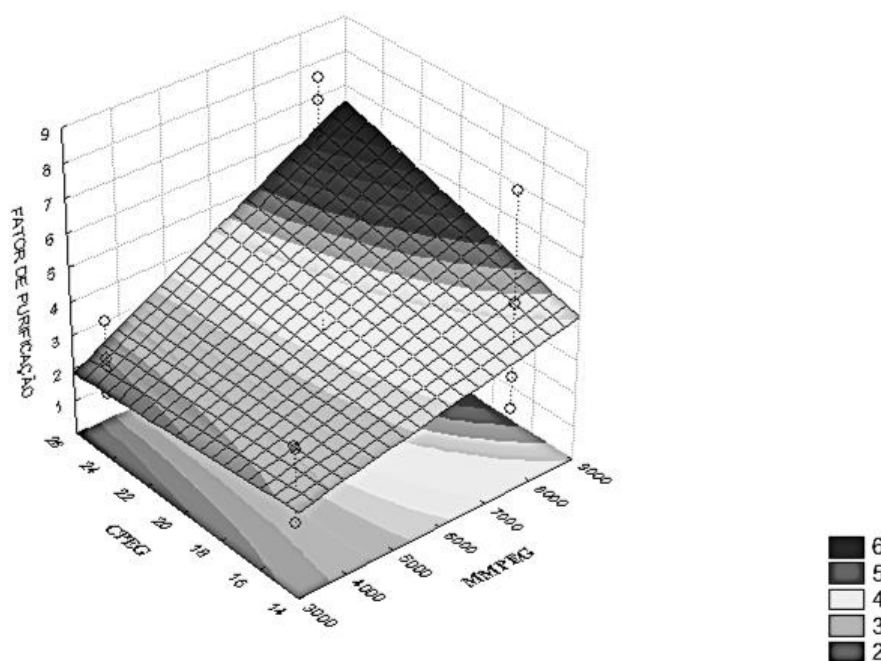


Figura 7. Superfície de resposta para o fator de purificação considerando CPEG e MMPEG.

Os efeitos das concentrações de PEG, Citrato de potássio, pH e concentração do PEG sobre o fator de purificação estão apresentados na Figura 8.

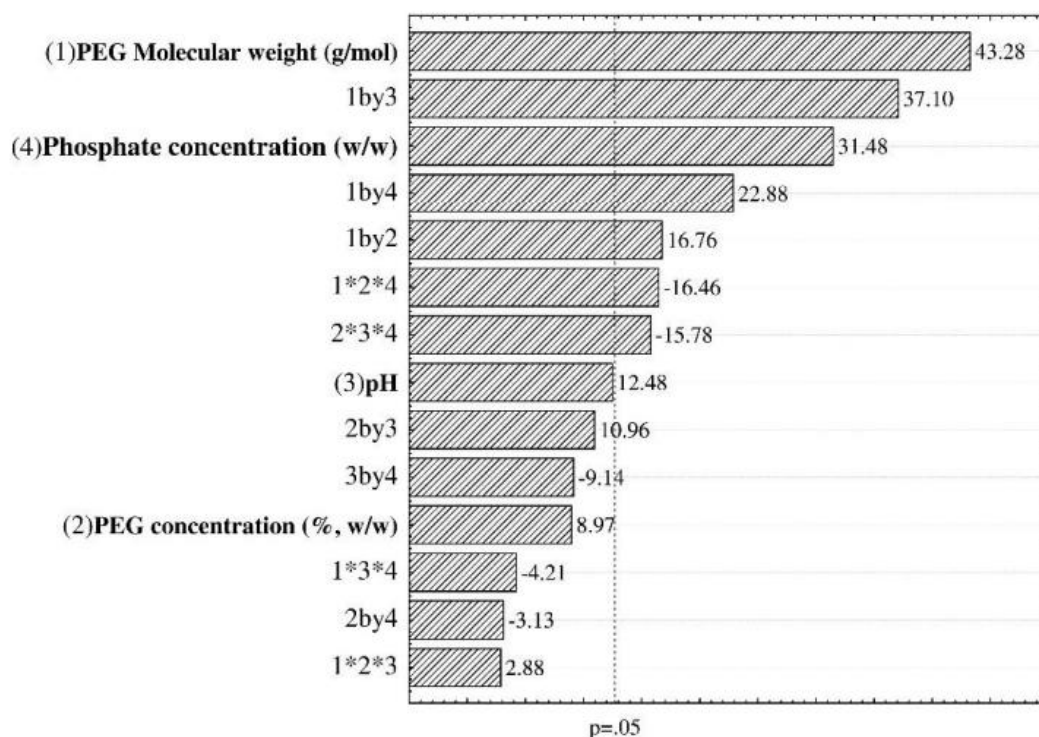


Figura 8. Gráfico de Pareto dos efeitos para o fator de purificação.

Para o fator de purificação a MMPEG e Citrato apresentaram efeitos significativos, sendo a MMPEG foi a variável independente que apresentou um efeito significativo maior. As interações entre as variáveis da massa molar do PEG e pH, entre o citrato de potássio com a

massa molar do PEG e com a concentração do PEG, entre o pH e a concentração do PEG apresentaram efeitos significativos com efeitos positivos, sendo então diretamente proporcionais. Já se tratando do pH ele vai interagir negativamente com o citrato e em relação a concentração de PEG, interagindo juntamente com as demais variáveis, também vai apresentar um efeito negativo, ou seja, são diretamente proporcionais.

Na aplicação, a ação do extrato enzimático bruto de *A. carneus* URM 5577 contendo tanase é evidenciado nas Figuras 5, 6, 7 e 8.

O suco puro da mangaba apresentou uma quantidade de 126,21 U/mL de taninos. A clarificação foi testada em diferentes concentrações de extrato bruto (Figura 9), assim como em diferentes intervalos de tempo (Figura 10). Esses dados foram submetidos à análise de regressão, sendo selecionadas equações polinomiais de segundo grau, com um R^2 de 0,94. Um aumento adicional no volume de extrato enzimático bruto (2 mL) melhorou o ponto de clarificação, pois de acordo com a predição dos dados da equação, o ponto de máximo foi com um volume de extrato bruto de 63,53 U/mL de tanase (Figura 10), apresentando o mínimo de quantidade de tanino, houve diferença estatística quando aplicado as diferentes concentrações do extrato bruto (Figura 9). O teor de taninos no suco foi reduzido a 49,66% (63,53 U/mL) após 90 minutos de incubação com o extrato enzimático bruto em 2mL a 37 °C.

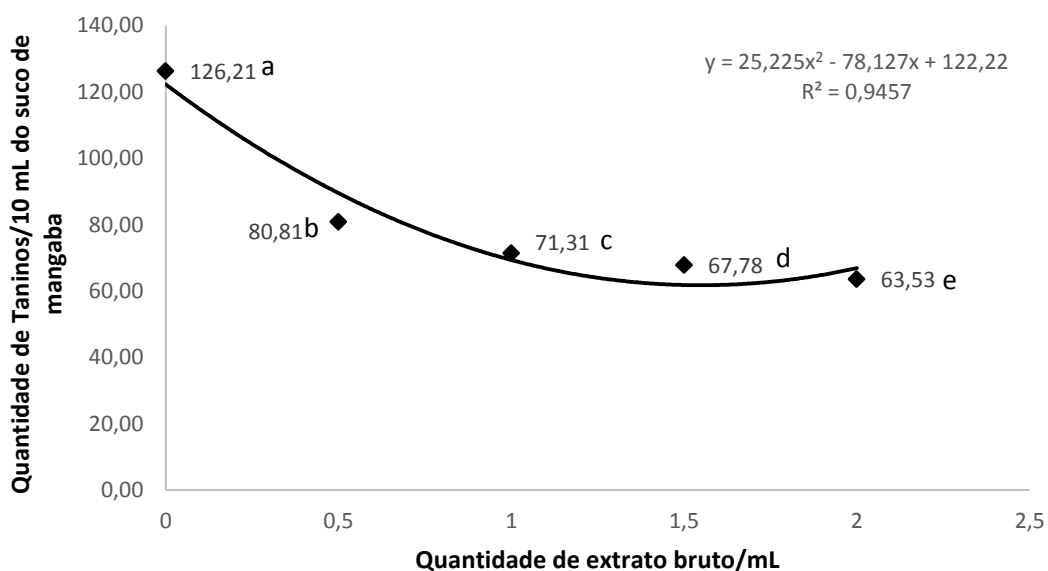


Figura 9. Efeito de diferentes volumes do extrato bruto na degradação de taninos presentes no suco de mangaba após 90 minutos de incubação.

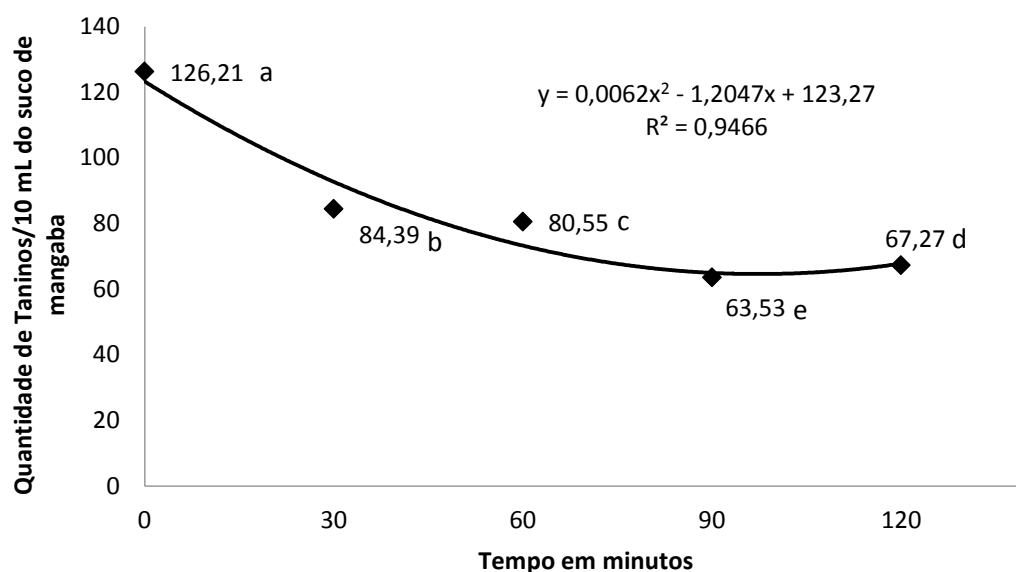


Figura 10. Efeito de 2 mL de extrato bruto na degradação dos taninos presentes no suco da mangaba em diferentes tempos.

O suco puro do tamarindo apresentou uma quantidade de 161,21 U/mL de taninos (Figura 11) e foi submetido as mesmas condições de análises do suco de mangaba, sendo o $R^2=0,99$ relacionado ao tempo e $R^2=0,92$ em relação às concentrações do extrato. Ele também demonstrou um aumento adicional na clarificação de acordo com volume de extrato enzimático bruto (2 mL) e seu ponto máximo apresentou um volume de extrato bruto de 77,67 U/mL de tanase, apresentando o mínimo de quantidade de tanino, houve diferença estatisticamente às diferentes concentrações do extrato bruto (Figura 12). O teor de taninos no suco foi reduzido a 51,82% (77,67 U/mL) após 120 minutos de incubação com o extrato enzimático bruto em 2mL a 37 °C.

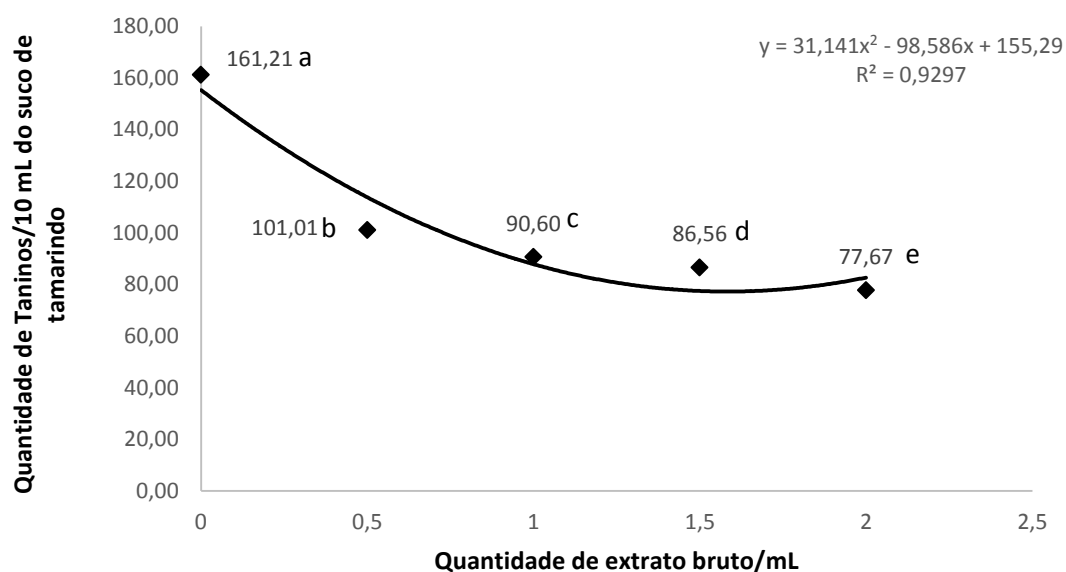


Figura 11. Efeito de diferentes volumes do extrato bruto na degradação de taninos presentes no suco de tamarindo após 90 minutos de incubação.

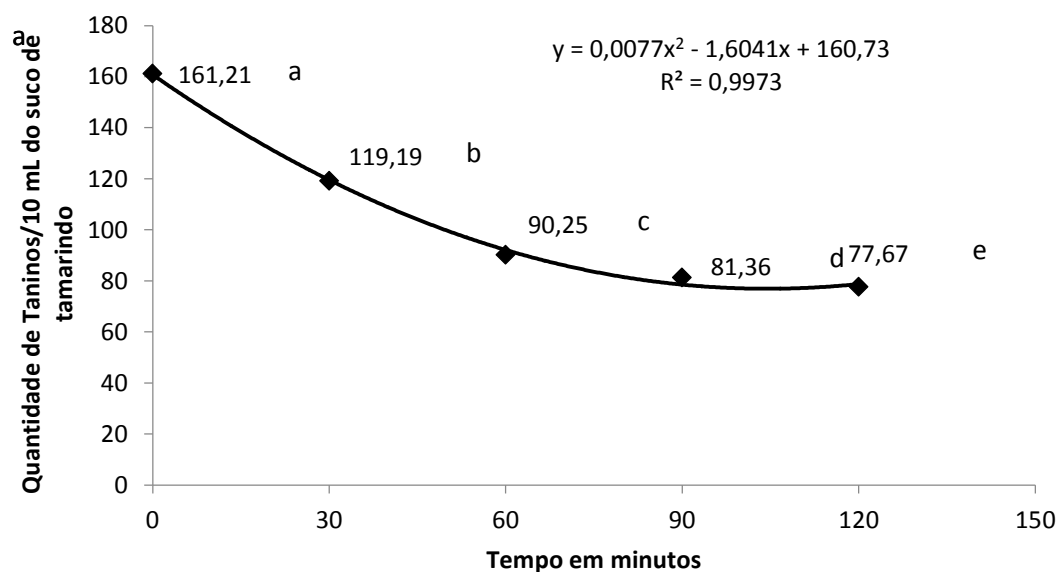


Figura 12. Efeito de 2 mL de extrato bruto na degradação dos taninos presentes no suco de tamarindo em diferentes tempos.

5 DISCUSSÃO

Diversos microrganismos são utilizados para a produção industrial da tanase através de FES. Entretanto, os fungos filamentosos têm se destacado como ótimos produtores desta enzima, como é o caso dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (RAMOS et al., 2011; YAO et al., 2013).

No Brasil, especialmente em regiões costeiras, a castanhola (*Terminalia catappa*) se adapta facilmente à salinidade e os ventos (THOMSON; EVANS, 2006). Suas folhas são ricas em taninos, apresentando assim, uma excelente fonte de carbono para a produção de tanase por FES.

A Fermentação em Estado Sólido, tem se mostrado uma excelente alternativa na produção dessas enzimas por fungos filamentosos utilizando folhas (SELWAL; SELWAL, 2012). Kumar et al. (2007) observaram a produção máxima de 69 U/gbs, após 96 h de incubação a 30 °C por *Aspergillus ruber*, utilizando folhas de “jamum”. Selwal et al. 2011 utilizou diferentes substratos de folhas como amla (*Phyllanthus emblica*), ber (*Ziziphus mauritiana*), jamun (*Syzygium cumini*), Jamoa (*Eugenia cuspidate*) e keekar (*Acacia nilotica*) através da FES, nesse estudo os autores obtiveram uma atividade máxima de 170,75 U/gbs e 165,56 U/gbs no jamun e keekar, respectivamente durante 96h à 28 °C.

Macedo e Madeira (2013) avaliaram a produção de tanase, utilizando o bagaço de laranja como substrato através da fermentação em estado sólido e o *Penicillium variotii* como biocatalisador. Nesse estudo, após a otimização obtiveram uma atividade enzimática de 4800 U/gbs utilizando 3% de ácido tânico, durante 96 horas.

As folhas de castanhola utilizadas nesse estudo apresentaram resultados significativos, quando comparados a literatura, pontencializaram suas atividades aumentando em quase 5 vezes mais após ser otimizada, com uma atividade do *Aspergillus carneus* URM 5577 de 5571,09 U/gbs. Este é o primeiro relato da produção de tanase para esta espécie. Com isso, comprovando a utilização de folhas como substratos por fungos filamentosos são eficazes para a produção da tanase, sendo de grande interesse industrial com seu potencial enzimático.

O pH e o tempo tem grande importância na produção de metabólitos (SELWAL; SELWAL, 2012). Neste presente estudo, a maior atividade apresentada foi em pH 6,0 durante 70h de fermentação. Quanto mais curto o tempo de incubação mais interessante será para a indústria produtora de enzimas, pois isto diminuirá nos custos de sua produção. Logo, o *Aspergillus carneus* URM 5577 é viável por ter realizado essa atividade relativamente num curto espaço de tempo e ter se mostrado um ótimo produtor da tanase.

Após a aplicação do planejamento Plackett-Burman (PB), o tempo e o percentual de ácido tânico foram identificados como as variáveis significativas. De acordo com o PB, o menor tempo de fermentação (48h) possibilitou maior atividade. Porém, após a aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) observou-se que o tempo de 70h é ideal para a produção de tanase por *A. carneus* URM 5577. Além disso, o MSR mostrou que a melhor concentração do ácido tânico é a 7%. Anwar (2007) obteve uma melhor otimização da produção de tanase a 7% de ácido tânico por *Aspergillus niger*.

O fator de purificação apresentou resultados relevantes quando comparados com a literatura. Rodríguez-Durán et al., (2011) utilizou o PEG em diferentes concentrações 400, 600 e 1000 com o fosfato de potássio para a purificação da tanase produzida por *Aspergillus niger*. E obteve uma recuperação de 96 % que se fixou na fase inferior do sistema composto por PEG 1000, e apresentou um aumento de 7 vezes no fator de purificação.

Todos os ensaios ultrapassaram 100% podendo ser devido à ativação da enzima em análise, por exemplo, na remoção dos metabólitos secundários durante a purificação, a atividade enzimática poderá ser inibida, ou também elevar a concentração de sal e/ou proteína, os quais ajudam a manter a conformação da proteína na forma ativa (PAN et al., 2001).

Avaliando-se o coeficiente de partição ($K_{partição}$), foi observado que todos os valores de K foram superiores a 1 (um), demonstrando que a enzima apresenta diferentes tendências de partição entre as fases. Albertsson (1970) e Marcos et al., (1999) relataram que a fase rica em sal (fase de fundo) possui características hidrofílicas, e a fase rica em PEG (fase de topo) características hidrofóbicas. Deste modo, o particionamento da enzima apresentou uma maior afinidade pela fase rica em PEG (fase de topo), favorecida pela sua interação hidrofóbica ao sistema.

Srivastava e Kar (2010) utilizaram a tanase co-produzida por *Aspergillus niger*, para clarificação do suco de emblica (*Phyllanthus emblica*) observaram uma redução de 45,2% no teor de taninos a 37°C por 180 minutos e 150 rpm. Sharma et al., (2014) observaram a co-produção da tanase através da fermentação em estado sólido por *Aspergillus niger* no tratamento do sumo da goiaba (*Psidium guajava*), havendo uma redução máxima de 59,23% no teor de taninos, após 60 minutos utilizando 2% do extrato enzimático bruto.

Em outro estudo, Lima et al., (2014) testou a atividade ao suco de uva por *Penicillium montanense* URM 6486, e apresentou maior eficiência ao reduzir 46% do teor de taninos, após 120 minutos de incubação, a 37°C e 2 mL do extrato bruto. O presente estudo mostrou que a enzima produzida por *Aspergillus carneus* URM 5577 contida em 2 mL do extrato

enzimático bruto quando aplicados nos dois sucos, apresentaram eficiência quando comparados com a literatura, demonstrando assim, a relevância das tanase fúngicas na clarificação de sucos ricos em taninos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através da FES todas as espécies foram capazes de produzir tanase, entretanto, a espécie *Aspergillus carneus* URM 5577 se destacou nessa produção e está sendo descrito pela primeira vez como produtor da tanase através da fermentação em estado sólido, utilizando como substrato folhas de castanhola.

O sistema de duas fases aquosas se mostrou bastante eficiente para a pré-purificação da enzima. Os sucos da mangaba e do tamarindo, aplicado ao extrato bruto, reduziram cerca de 50% o teor de taninos, afirmando a eficiência do potencial enzimático desses fungos. Entretanto, a otimização dos parâmetros de crescimento em um biorreator é indispensável para a viabilidade comercial da tanase e possível aplicação na clarificação de sucos como os de tamarindo e mangaba.

A utilização das folhas de castanhola como substrato para a produção de tanase pode ser uma alternativa para promover a redução dos custos de produção da enzima;

REFERÊNCIAS

- ABBASI, H.; SHAFIGHZADEH, H.; RAHIMI, A. Continuous production of polygalacturonases (PGases) by *Aspergillus awamori* using wheat flour in surface culture fermentation. **Iran. J. Biotechnol**, v. 9, p. 50-55, 2011.
- ADSUL, M. G. et al. Strain improvement of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 for increased cellulase production. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 7, p. 1467-1473, 2007.
- AGUIRRE, C. et al. Partition and substrate concentration effect in the enzymatic synthesis of cephalixin in aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 7, p. 1163-1167, 2010.
- ALBERTSSON, P. A. Partition of cell particles and macromolecules. 1986.
- ALBERTSSON, P.A; SASAKAWA, S.; WALTER, H. Cross partition and isoelectric points of proteins. **Nature**, v. 228, n. 5278, p. 1329-1330, 1970.
- ANWAR, Y.A.S. et al. The production of tannin acyl hydrolase from *aspergillus niger*. **Microbiology Indonesia**, v. 1, n. 2, p. 9, 2007.
- ASENJO, J. A.; ANDREWS, B.A. Aqueous two-phase systems for protein separation: a perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 49, p. 8826-8835, 2011.
- ASSIS, S.A.; LIMA, D.C.; DE FARIA OLIVEIRA, O.M.M. Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development. **Food Chemistry**, v. 74, n. 2, p. 133-137, 2001.
- ASSIS, A.C.G.G.; SOUZA, M.A.; ROCHA, S.S.A. O uso do chá verde na hipertrofia muscular. 2015.
- AZEVEDO, A.M. et al. Partitioning of human antibodies in polyethylene glycol–sodium citrate aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 65, n. 1, p. 14-21, 2009.
- BANERJEE, R.; MUKHERJEE, G.; PATRA, K.C. Microbial transformation of tannin-rich substrate to gallic acid through co-culture method. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 8, p. 949-953, 2005.
- BASKIR, J.N.; HATTON, T.A.; SUTER, U.W. Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, n. 4, p. 541-558, 1989a.
- BASKIR, J.N.; HATTON, T.A.; SUTER, U.W. Thermodynamics of the partitioning of biomaterials in two-phase aqueous polymer systems: comparison of lattice model to experimental data. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 93, n. 5, p. 2111-2122, 1989b.

BATE-SMITH, E. Cn; RAŠPER, V. Tannins of Grain Sorghum: Luteoforol (Leucoluteolinidin), 3', 4, 4', 5, 7-Pentahydroxyflavan. **Journal of Food Science**, v. 34, n. 2, p. 203-209, 1969.

BEIJERINCK, M. W.; UHLWORM, O. Centralblatt für Bakteriologie. **Parasiten und Infektionskrankheiten, Gustav Fischer, Jena**, p. 699, 1896.

BELE, A.A. et al. Potential of tannins: a review. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 9, n. 4, p. 209, 2010.

BELMARES, R. et al. Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry. **LWT-Food Science and Technology**, v. 37, n. 8, p. 857-864, 2004.

BELUR, P.D. et al. Production of novel cell-associated tannase from newly isolated *Serratia ficaria* DTC. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 732-736, 2010.

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

BENDER, J.P. et al. Extraction of inulinase obtained by solid state fermentation of sugarcane bagasse by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 149, n. 3, p. 195-203, 2008.

BENNETT, J.W. **An overview of the genus Aspergillus**. Caiser Academic Press, Portland, 2010.

BHARGAV, P.B. et al. Characterization of poly (vinyl alcohol)/sodium bromide polymer electrolytes for electrochemical cell applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 108, n. 1, p. 510-517, 2008.

BURKE, D.J. et al. Relationship between soil enzyme activities, nutrient cycling and soil fungal communities in a northern hardwood forest. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 795-803, 2011.

CARRETERO-ACCAME, E. Compuestos fenólicos: taninos. **Panorama Actual del Medicamento**, v. 24, n. 235, p. 633-636, 2000.

CHEN, P.S., LI, J.H. Chemopreventive effect of punicalagin, a novel tannin component isolated from *Terminalia catappa*, on H-ras-transformed NIH3T3 cells. **Toxicology Letter** 163, 44-53, 2005.

COSTA, D.F.C. **Desenvolvimento de bebidas fermentadas a partir de subprodutos da indústria da castanha**. 2013. Tese de Doutorado. ISA/UL.

COSTA, P.N. **Otimização da produção de tanase por Aspergillus sp. em fermentação em estado sólido (FES)**. 2015. Dissertação de Mestrado. UFL/MG.

COUTINHO, A. **Extração de tanino em folhas, sementes e frutos verdes de cinamomo (*Melia azedarach* L.) com diferentes tipos de solventes**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry—a review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291-302, 2006.

CRUZ, R. et al. Diversity of filamentous fungi of area from Brazilian Caatinga and high-level tannase production using mango (*Mangifera indica* L.) and surinam cherry (*Eugenia uniflora* L.) leaves under SSF. **Advances in Microbiology**, v. 3, n. 08, p. 52, 2013.

CURIEL, J.A. et al. Hydrolysis of tannic acid catalyzed by immobilized-stabilized derivatives of tannase from *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58(10):6403–6409, 2010.

FEITOSA, E.F.A. et al. Produtos fermentados a base de soja (*glycine max*): fermentação láctica e em estado semissólido. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 3, n. 3, p. 266-274, 2014.

FERNANDES, A. P. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes**. 2014. Dissertação de Mestrado. UFL/MG.

FLORES-MALTOS, A. et al. Catalytical properties of free and immobilized *Aspergillus niger* tannase. **Enzyme research**, v. 2011, 2011.

FOGAÇA, D.N.L. et al. Atividade antioxidante e teor de fenólicos de folhas da *Terminalia catappa* Linn em diferentes estágios de maturação. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 2, p. 257-261, 2013.

FRISVAD, Jens C.; SAMSON, Robert A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in mycology**, v. 49, n. 1, p. C174, 2004.

GARCIA-CONESA, M.T. et al. Hydrolysis of diethyl diferulates by a tannase from *Aspergillus oryzae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, n. 4, p. 319-324, 2001.

GARZA-MADRID, M. et al. Potential of Aqueous Two-Phase Systems constructed on flexible devices: Human serum albumin as proof of concept. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 7, p. 1082-1087, 2010.

GIRAUD, F. et al. Microsatellite loci to recognize species for the cheese starter and contaminating strains associated with cheese manufacturing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2, p. 204-213, 2010.

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

HASLAM, E.; TANNER, R. J. N. Spectrophotometric assay of tannase. **Phytochemistry**, v. 9, n. 11, p. 2305-2309, 1970.

KLICH, M.A. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. **Mycologia**, v. 94, n. 1, p. 21-27, 2002a.

KLICH, M.A. Identification of common *Aspergillus* species. 1rd ed. **Utrecht: Centraalbureau vöör Schimmelcultures**, 116pp, 2002b.

KLICH, Maren A.; PITT, John I. **A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs**. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing, 1988.

KRIJGSHELD, P. et al. Development in *Aspergillus*. **Studies in mycology**, v. 74, p. 1-29, 2013.

KRISHNA, C. Solid-State fermentation systems- an overview. **Critical reviews in biotechnol.**v. 25, n. 1-30, 2005.

KUMAR, B. G. et al. Antiulcer activity of ethanolic extract of *Terminalia catappa* leaves against gastric ulcers by pyrolic ligation induced model in rats. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 6, p. 38-40, 2014.

KUMAR, R.; 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.

LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. **Advances in applied microbiology**, v. 44, p. 216-260, 1997.

LIMA, J.S. et al. Production, characterization of tannase from *Penicillium montanense* URM 6286 under SSF using agroindustrial wastes, and application in the clarification of grape juice (*Vitis vinifera* L.). **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

LING, Y.Q. et al. Optimization of affinity partitioning conditions of papain in aqueous two-phase system using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 73, n. 3, p. 343-348, 2010.

LUCCARINI, A. C. et al. Purificação de produtos biotecnológicos. **Purificação de produtos biotecnológicos**, 2005.

LUDEMANN, V. et al. Conidial production by *Penicillium nalgioense* for use as starter cultures in dry fermented sausages by solid state fermentation. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 2, p. 315-318, 2010.

MACEDO, G.A. and MADEIRA, J.V.Jr. Production of phytase and tannase using *Paecilomyces variotii* for solid state fermentation of orange bagasse. **PCT Int. Appl.**, WO 2013020188 A1 20130214, 2013.

MACEDO, G.A. et al. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. **Ciência e Agrotecnologia**, 2005.

MACIEL, M. et al. Production of polygalacturonases by *Aspergillus section Nigri* strains in a fixed bed reactor. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 1660-1671, 2013.

MANJIT, K.S. et al. Tannase production by *Aspergillus fumigatus* MA under solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 3023-3030, 2008.

MARCOS, J.C. et al. Partial purification of penicillin acylase from *Escherichia coli* in poly (ethylene glycol)–sodium citrate aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 734, n. 1, p. 15-22, 1999.

MARTINS, A.G.R. et al. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de tanase por *Aspergillus* sp isolado do solo da Caatinga de Pernambuco, Brasil. **e-xacta**, v. 7, n. 1, 2014.

MIN, B.R. et al. Comparative antimicrobial activity of tannin extracts from perennial plants on mastitis pathogens. **Scientific Research and Essay** 3, 66–73, 2010.

MINGSHU, Li et al. Biodegradation of gallotannins and ellagitannins. **Journal of basic microbiology**, v. 46, n. 1, p. 68-84, 2006.

MRUDUL, S., MURUGAMMAL, R. Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo , v. 42, n. 3, p. 1119-1127, Sept. Mycology, nº 49:1-174, 2011.

NOVAKI, L. **Produção, purificação e caracterização parcial da invertase obtida por fermentação em estado sólido de soja com *Aspergillus casei***. 2009. Tese de Doutorado. Dissertação]. Toledo: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná.2009.

NUNES, A.F. et al. Antiulcerogenic activity of ethanol extract of the bark from *Terminalia catappa* in gastric ulcer model induced by ethanol in *Rattus norvegicus*. **Pharmacologyonline** 9, 98 – 101, 2012.

ORTIZ, D. et al. Avaliação do teor de taninos em farinha de resíduo de pupunha. **Revista de Biotecnologia & Ciência (ISSN 2238-6629)**, v. 4, n. 1, 2015.

OW, Y.Y; STUPANS, I. Gallic acid and gallic acid derivatives: effects on drug metabolizing enzymes. **Current drug metabolism**, v. 4, n. 3, p. 241-248, 2003.

PAN, I.H., YAO, H.J., LI, Y.K. Effective extraction and purification of β -xylosidase from *Trichoderma koningii* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. **Enzyme and microbial technology**, v. 28, n. 2, p. 196-201, 2001.

PANDEY, A. et al. Enzyme Technology. **New Delhi: Asiatech Publishers, Inc**, 760p, 2005.

PANDYA, N.B. et al. Antitumor and antioxidant status of *Terminalia catappa* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Indian journal of pharmacology**, v. 45, n. 5, p. 464, 2013.

PEREIRA, J. L. **Produção de enzimas amilolíticas por *Aspergillus oryzae* através de fermentação no estado sólido**. 56 f., il. Monografia (Bacharelado em Farmácia) Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

PERRONE, G. et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in mycology**, v. 59, p. 53-66, 2007.

PETERSON, S.W. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. **Mycologia**, v. 100, n. 2, p. 205-226, 2008.

PILDAIN, M.B. et al. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, n. 3, p. 725-735, 2008.

PITT, J. I. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Commonwealth scientific and Industrial Research Organization. **North Ryde, Australia: Division of Food Processing**, 1991.

PITT, J.I. SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification**, p. 9, 2000.

RAAMAN, N. et al. Optimisation of extracellular tannase production from *Paecilomyces variotii*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 26(6):1033–1039, 2010.

RAMOS, E.L. et al. Catalytic and thermodynamic properties of a tannase produced by *Aspergillus niger* GH1 grown on polyurethane foam. **Appl. Biochem. Biotechnol**, 165: 1141–1151, 2011.

RAPER, K.B.; THOM, E.A. A manual of the *Penicillia*. **A manual of the *Penicillia***., 1949.

RHODES, J. *Aspergillus fumigatus*: Growth and virulence. **Medical Mycology**, v. 44, p. 77-81, 2006.

ROCHA, L. B. et al. Gallic acid as the major antioxidant in pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit peel. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 17, n. 4, p. 592-598, 2015.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U.F.R. et al. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 8, p. 912-919, 2011.

SABU, A.A. et al. 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**, 96:1223–1228, 2005.

SAMSON, R.A., FRISVAD, J.C. *Penicillium* Subgenus *Penicillium*: new Taxonomics Schemes, Mycotoxins and Other Extrolites. **Studies in Mycology** 49: 1-260, 2004.

SAMSON, R.A., VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*?. **Medical Mycology**, v. 47, p. 13-20, 2009.

SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H. et al. Microscopic fungi in the atlantic rainforest in Cubatão, S.P. Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** 37: 267- 275, 2006.

SELWAL, M. K. et al. Tannase Production by *Penicillium Atramentosum* KM under SSF and its Applications in Wine Clarification and Tea Cream Solubilization. **Brazilian Journal of Microbiology**, 42(1), 374–387, 2011.

SELWAL, M.K., SELWAL, K.K. High-level tannase production by *Penicillium atramentosum* KM using agro residues under submerged fermentation. **Annals Microbiology** 1-10, 2012.

SETH, M., CHAND, S. Biosynthesis of tannase and hydrolysis of tannins to gallic acid by *Aspergillus awamori* — optimisation of process parameters. **Process Biochem.** 36:39–44, 2012.

SHARMA, N.K. et al. Production of tannase under solid-state fermentation and its application in detannification of guava juice. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, 44: 281–290, 2014.

SHARMA, S.; GUPTA, M.N. Synthesis of antioxidant propyl gallate using tannase from *Aspergillus niger* van Tieghem in nonaqueous media. **Bioorganic Medicinal Chemical Letters**, 13: 395-397, 2003.

SHERF, A.F. A method for maintaining *Phytopomonas sepedonica* in culture for lon periods winthout transfer. **Phytopatology**, 33: 330-332, 1943.

SHINDU, R. PANDEY, A. BINOD, P. Solid-state Fermentation for the Production of..., **Chem. Biochem. Eng. Q.**, 29 (2) 173–181, 2015.

SINGHANIA, R.R. et al. Recents advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SINGLETON, V.L., KRATZER, F.H. Toxicity and related physiological activity of phenolic substances of plant origin. **Agr. Food Chem.** 17, 497—51 1, 1969.

SJÖBERG, A.; KARLSTROEM, G. Temperature dependence of the phase equilibria for the system poly (ethylene glycol)/dextran/water. A theoretical and experimental study. **Macromolecules**, v. 22, n. 3, p. 1325-1330, 1989.

SRIVASTAVA, A.; KAR, R. Application of immobilized tannase from *Aspergillus niger* for the removal of tannin from myrobalan juice. **Indian journal of microbiology**, v. 50, p. 46-51, 2010.

STATSOFT Inc. **Statistica (Data Analysis Software Systems)** Version 8.0, 2008.

TANGJANG, S. et al. Microbial population dynamics of soil under traditional agroforestry systems in Northeast India. **Research Journal of Soil Biology** 1: 1-7, 2009.

TERRASAN, C.R.F. et al. Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. **Bioresource Technology** 101: 4139–4143, 2010.

THOMSON, L.A.J., EVANS, B. *Terminalia catappa* (tropical almond). **Species Profiles for Pacific Island Agroforestry**, v. 2, p. 1-20, 2006.

TREVIÑO-CUETO, B. et al. Gallic acid and tannase accumulation during fungal solid state culture of a tannin-rich desert plant (*Larrea tridentate* Cov.). **Bioresource Technology**, 98:721-724, 2007.

TUBÍO, G., NERLI, B., PICÓ, G. Partitioning features of bovine trypsin and alpha-chymotrypsin in polyethyleneglycol-sodium citrate aqueous two-phase systems. **Journal Chromatogr. B**. 852, 244- 249, 2007.

UENOJO, M; PASTORE, G.M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

VALERA, L.S. **Produção e caracterização das Tanases do fungo filamentoso *Aspergillus carbonarius***, 2014. 67 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Química, 2014.

VERNAU J., KULA, M.R. Biotechnol. **Appl. Biochem.** 12 397-404, 1990.

VIEIRA NETO, R.D. et al. Cultura da mangabeira. Aracaju: Embrapa-CPATC,. 16p. **Circular Técnica** n.2, 2002.

YAN-MIN, L. et al. Bovine serum albumin partitioning in polyethylene glycol (PEG)/potassium citrate aqueous two-phase systems. **Food and Bioproducts Processing** 88: 40-46, 2010.

YAO, J. Production, characterization and applications of tannase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2833: 1-11, 2013.

YEH, C.B. et al. *Terminalia catappa* attenuates urokinase-type plasminogen activator expression through Erk pathways in Hepatocellular carcinoma. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 141, 2014.