

## 74386 - PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE TANASE PELO FUNGO ENDOFÍTICO *Aspergillus niger* ANG18 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

*Rayza Morganna Farias Cavalcanti*<sup>1</sup>, *Luís Henrique Souza Guimarães*<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Doutoranda em Biotecnologia, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, 14800-900, Araraquara - SP, Brasil. rayzaaires@hotmail.com

<sup>2</sup>Doutor em Biologia Comparada, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP. Avenida Bandeirantes 3900, 14040-901 Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

**RESUMO:** As tanases (tanino acil hidrolase, EC 3.1.1.20) são enzimas de grande interesse biotecnológico, com potencial de aplicação em diferentes setores industriais como o de alimentos, de obtenção de químicos, de bebidas e o farmacêutico. Estas enzimas atuam na hidrólise de taninos hidrolisáveis, liberando glicose e ácido gálico a partir de galotaninos. Neste contexto, os fungos filamentosos, especialmente os endofíticos, têm se destacado como fontes enzimáticas. Portanto, este estudo teve como objetivo a produção de tanase pelo fungo endofítico *Aspergillus niger* ANG18, isolado da casca do angico (*Anadenanthera colubrina* Vell), em Fermentação em Estado Sólido (FES), empregando resíduos agroindustriais e produtos agroflorestais como substratos, selecionando-se as melhores condições para máxima produção enzimática, bem como a determinação de algumas propriedades físico-químicas da enzima. O fungo endofítico *A. niger* ANG18 apresentou maior produção enzimática (29,82 U/g de substrato) quando cultivado em FES usando folhas de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) como substrato, umedecida com de solução de sais de Khanna (1:1; m/v) por 96 h a 37°C e 60% de umidade relativa. A tanase contida no filtrado bruto apresentou temperatura e pH ótimos aparentes de atividade entre 40 e 45°C, e pH 5,0, respectivamente, sendo levemente ativada (16,93%) na presença de BaCl<sub>2</sub>. Deste modo, o fungo *A. niger* ANG18 pode ser considerado como um produtor alternativo de tanases em FES, sendo este o primeiro relato de produção de tanase por um fungo endofítico em FES.

**Palavras-chave:** Microbiologia; Fermentação; Enzimas.

## PRODUCTION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF TANNASE BY ENDOFITIC FUNGUS *Aspergillus niger* ANG18 IN SOLID-STATE FERMENTATION

**ABSTRACT:** Tannases (tannin acyl hydrolase, EC 3.1.1.20) are enzymes of great biotechnological interest, with potential for application in different industrial sectors such as food, chemical, beverage and pharmaceutical industries. These enzymes act in the hydrolysis of hydrolysable tannins, releasing glucose and gallic acid from gallotannins. In this context, filamentous fungi, especially endophytic fungi, have been highlighted as enzymatic sources. Therefore, the objective of this study was the production of tannase by the endophytic fungus *Aspergillus niger* ANG18, isolated from bark of angico (*Anadenanthera colubrina* Vell), under Solid-State Fermentation (SSF), using agroindustrial residues and agroforestry products as substrates, selecting the best conditions for maximum enzymatic production, as well as the determination of some physical-chemical properties of the enzyme. The endophytic fungus *A. niger* ANG18 presented higher enzymatic production (29.82 U/g of substrate) when cultivated under SSF using eucalyptus (*Eucalyptus* spp.) leaves as substrate/carbon source moistened with 1:1 (m/v) Khanna salts for 96 h at 37°C and 60% relative humidity. The tannase contained in the crude filtrate presented temperature and apparent optimum pH of activity between 40 and 45°C, and pH 5.0, respectively, being slightly activated (16.93%) in the presence of BaCl<sub>2</sub>. In this way, *A. niger* ANG18 can be considered as an alternative producer of tannases in SSF, being this the first report of production of tannase by an endophytic fungus in SSF.

**Keywords:** Microbiology; Fermentation; Enzymes.

### 1. INTRODUÇÃO

As tanases, também denominadas de tanino acil hidrolase (TAH; EC 3.1.1.20), são enzimas de grande importância no desenvolvimento de bioprocessos industriais. Estas enzimas atuam na hidrólise de ésteres e ligações depsídicas de taninos hidrolisáveis, como o ácido tânico, liberando glicose e ácido gálico ou ácido elágico (no caso dos elagitaninos) (1, 2). Taninos são metabólitos secundários fenólicos produzidos por diferentes vegetais como parte do mecanismo de defesa contra ataque de insetos, fungos ou bactérias (3). São caracterizados por formar complexos insolúveis com proteínas, pectinas e celulosas, pela adstringência de frutos e vegetais, formação de

precipitado em sucos e bebidas e dificultar a assimilação de alguns nutrientes na alimentação animal (4, 5).

As tanases são potencialmente empregadas na indústria de alimentos no processamento de chás instantâneos, eliminando precipitados insolúveis indesejados, na fabricação de bebidas para reduzir a formação de turbidez decorrente da presença de compostos fenólicos e como agente clarificador de sucos de frutas e em bebidas geladas a base de café (6). Na ração animal podem ser adicionadas para remoção dos taninos presentes, aumentando a digestibilidade e favorecendo a assimilação dos nutrientes (7). No tratamento de efluentes representam um modelo de tratamento de baixo custo e efetivo na remoção dos taninos presentes no processo de curtimento do couro (8, 9). Contudo, sua aplicação mais importante das tanases é na produção de ácido gálico, o qual tem emprego na indústria química e farmacêutica por ser intermediário na síntese de propil galato (utilizado como aditivo nas indústrias de alimentos), pirogalol (conservante) e trimetropina (agente antibacteriano) (6).

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos são potenciais produtores de tanases, de modo que estes últimos têm se destacado pela sua versatilidade na degradação de diferentes tipos de taninos (1, 10). Espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* encontram-se entre os produtores mais eficientes quando cultivados em Fermentação Submersa (FSbm) e em Fermentação em Estado Sólido (FES) (10). Nas últimas décadas foi observada alta eficiência na produção enzimática por FES, em que a tanase expressa apresenta atividade mais estável a temperatura e ao pH quando comparada com a enzima obtida por FSbm (2, 11, 12). A FES proporciona vantagens como o baixo custo da matéria-prima, possibilidade de utilizar subprodutos agroindustriais como casca de uva, caju, café ou farelo de trigo, arroz e aveia, entre outros (13-17), equipamentos simples e elevado nível de produção (18).

De forma geral, tanases fúngicas apresentam pH ótimo de atividade em torno de 5,5 e estabilidade enzimática na faixa de pH variando de 3,5 a 8,0 (1, 6). Em geral, a temperatura ótima de atividade encontra-se próxima a 35°C, com estabilidade térmica entre 30°C e 60°C, como relatado para as enzimas de *A. ochraceus* (19) e *A. tamarii* (20). A atividade tanásica costuma ser inativada por EDTA, 2-mercaptoetanol, tioglicolato de sódio, sulfato de magnésio e de cálcio e *o*-fenantrolina (1, 8).

Considerando a grande diversidade fúngica ainda não analisada quanto ao potencial de produção de enzimas de interesse biotecnológico e visando melhorar os processos de produção, recuperação e purificação da tanase, inúmeras pesquisas estão sendo desenvolvidas em busca de novas fontes enzimáticas e novos sistemas de

fermentação (8). Dentre os fungos filamentosos, os fungos endofíticos vêm se destacando como fontes de produtos naturais. Esses microrganismos vivem uma parte ou a totalidade do seu ciclo de vida no interior das plantas, habitando suas partes aéreas sem causar, aparentemente, dano ao hospedeiro (21, 22). Desempenham papel importante para adaptação das plantas nos mais variados ambientes por meio da produção de metabólitos funcionais, como enzimas, alcalóides, hormônios e antibióticos, os quais podem ser explorados biotecnologicamente (23-25). Entretanto, estudos utilizando fungos endofíticos relatando suas aplicações práticas em biotecnologia ainda são escassos. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi analisar o potencial do fungo endofítico *A. niger* ANG18 para a produção de tanases em FES, assim como caracterizar parcialmente a enzima produzida.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Microrganismo**

O fungo endofítico *A. niger* ANG18, isolado a partir de cascas do angico (*Anadenanthera colubrina* Vell.), coletado no bioma Caatinga no Estado da Paraíba - Brasil, foi empregado neste estudo para produção de tanase em FES. O microrganismo foi mantido em meio BDA (batata-dextrose-ágar) a 4°C e estocado no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (FFCLRP-USP). Repiques periódicos foram realizados a cada 30 dias.

### **Produção de tanase em Fermentação em Estado Sólido**

#### **Seleção do substrato sólido**

A Fermentação em Estado Sólido foi realizada mediante inóculo de 1 mL da suspensão de esporos ( $5 \times 10^6$  esporos/mL) de *A. niger* em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 5 g de substrato sólido (resíduos agroindustriais e folhas de vegetais, descritos na Tabela 1) umidificados com solução do Meio Mineral (0,1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,2%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1%  $\text{CaCl}_2$ ; 0,3%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (26) na proporção 1:1 (m/v), previamente autoclavados a 120°C a 1,5 atm por 20 minutos. As FES foram conduzidas a 37°C em estufa com 60% de umidade relativa, verificada por termohigrômetro digital.

Chá verde, hortelã, chá preto e manjeriço foram adquiridos no comércio local, sendo utilizados diretamente no meio de cultivo. As folhas dos demais vegetais foram colhidas no município de Jardinópolis-SP (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.

### **Influência do tempo de cultivo**

As FES foram conduzidas por diferentes períodos por até 168 horas para determinar o efeito do tempo de cultivo na produção de tanase empregando o substrato selecionado na etapa anterior. A cada 24 horas os filtrados foram ensaiados para atividade enzimática e quantificação de proteínas. Os cultivos foram realizados a 37°C em estufa com 60% de umidade relativa.

### **Efeito das soluções umectantes e nível de umidificação**

Soluções de sais de Khanna (27), sais SR (28), meio mineral (26), água de torneira e água destilada foram empregadas como soluções para umedecer o substrato sólido na proporção 1:1 (m/v). Em seguida, analisou-se a influência de diferentes proporções da solução umectante que favoreceu a produção de tanase, variando de 1:0; 1:1; 1:2 e 1:3 (m/v).

### **Obtenção do filtrado bruto**

O filtrado bruto foi obtido adicionando-se 25 mL de água destilada gelada ao cultivo após o término da fermentação. A mistura foi submetida à agitação de 140 rpm com auxílio de uma barra magnética em agitador rotativo por 20 min a 4°C para obtenção do filtrado bruto. Em seguida, os cultivos foram filtrados a vácuo em funil Büchner utilizando gaze e posteriormente papel de filtro Whatman nº1. Os filtrados livres de células foram dialisados contra 4L de água destilada por 24 horas a 4°C e utilizados para determinação das atividades enzimática e quantificação de proteínas.

### **Determinação da atividade enzimática**

A atividade tanásica foi determinada pelo método da rodanina metanólica utilizando metil galato (0,2% m/v) como substrato em tampão acetato de sódio (100 mmol/L, pH 5,0) (29). A reação foi composta por 250 µL do substrato e 250 µL da amostra enzimática, sendo conduzida a 30°C durante 5 min. A reação enzimática foi parada pela adição de 300 µL de rodanina metanólica 0,667% (m/v). Após 5 min, 200

μL de hidróxido de potássio 0,5 mol/L foram adicionados, formando um cromatógeno de coloração violeta. O volume obtido foi adicionado de 4 mL de água destilada. Após 10 min procedeu-se a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 520 nm. Uma unidade de atividade tanásica (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de ácido gálico por minuto nas condições de ensaio. A atividade foi expressa em U/g de substrato sólido.

### **Quantificação de proteínas**

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (30), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão, e expressa como mg de proteína por g de substrato sólido. A atividade específica foi expressa em U/mg de proteína.

### **Caracterização parcial da enzima presente no extrato bruto**

#### **Efeito da temperatura e pH na atividade enzimática**

A temperatura ótima aparente para a atividade tanásica foi determinada em diferentes temperaturas entre 30°C e 70°C, com intervalos de 5°C. O pH ótimo aparente foi determinado utilizando-se tampão McIlvaine, com pH variando entre 3,0 e 8,0.

#### **Efeito de diferentes sais na atividade enzimática**

O efeito de diferentes sais sobre a atividade tanásica foi determinado adicionando-se na mistura de reação AgNO<sub>3</sub>, BaCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>, NaCl, NH<sub>4</sub>Cl, ZnSO<sub>4</sub>, na concentração de 1 mM.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No cultivo em Fermentação em Estado Sólido o fungo endofítico *A. niger* ANG18 apresentou maior produção de tanase quando foram empregadas como substratos folhas de eucalipto (24,73 U/g de substrato), chá preto (15,24 U/g de substrato), folhas de jambo (12,12 U/mg de substrato) e folhas de manga (11,13 U/g de substrato). Nos substratos bagaço de cana-de-açúcar, casca de amendoim, casca e bagaço de laranja e sabugo de milho o microrganismo não sintetizou a enzima de interesse.

Vários trabalhos relatam as vantagens da FES para produção de tanase e o uso de diferentes substratos, como farelo de trigo, bagaço de caju, folhas de manga,

jambolão e resíduos agrícolas, como casca de café e casca de arroz, entre outros (13, 31, 32). Resíduos agroindustriais e produtos florestais ricos em taninos são considerados geralmente os melhores substratos para síntese dessa enzima (33). No presente estudo as folhas de diferentes espécies vegetais foram as melhores indutoras da produção tanásica por *A. niger* ANG18, o que pode ser justificado, possivelmente, pela maior disponibilidade de taninos nas folhas do que em outras partes dos vegetais, como no grão de trigo, casca de mandioca e laranja.

Diferentes espécies de *Aspergillus* foram descritas na literatura como produtores de tanase em FES, como *A. niger* (34-36), *A. carbonarius* (37), *A. awamori* (38), *A. tubingensis* (39), *A. oryzae* (15), *A. ruber* (40) e *A. fumigatus* (31). Entretanto, a maioria dos fungos foi isolada do solo e efluentes, sendo este estudo, então, o primeiro relato em FES por fungo endofítico. Os substratos folhas de jambo, manga e chá preto já foram empregados para produção de tanase por *A. ruber* (40), *P. restrictum*, *A. flavofurcatus*, *A. stromatoides* (41) e *A. carbonarius* (37). Folhas de eucalipto já foram relatadas como fonte de carbono em FSbm para o cultivo de *A. oryzae* (42), *A. fumigatus* CAS21 e *A. niger* ANG18 (43). Contudo, atualmente, não há relatos empregando folhas de eucalipto como substrato em FES para produção de tanase.

A presença de taninos hidrolisáveis já foi relatada para diferentes espécies de eucalipto, como nas folhas de *Eucalyptus microcorys*, representando aproximadamente 90% dos metabólitos secundários desta planta (44). Deste modo, folhas de eucalipto foram selecionadas como substrato para a FES visando à obtenção de níveis elevados de tanase por *A. niger* ANG18.

**Tabela 1.** Produção de tanase em FES por *A. niger* ANG18 utilizando diferentes produtos, resíduos agroindustriais e folhas de diferentes espécies vegetais como substrato.

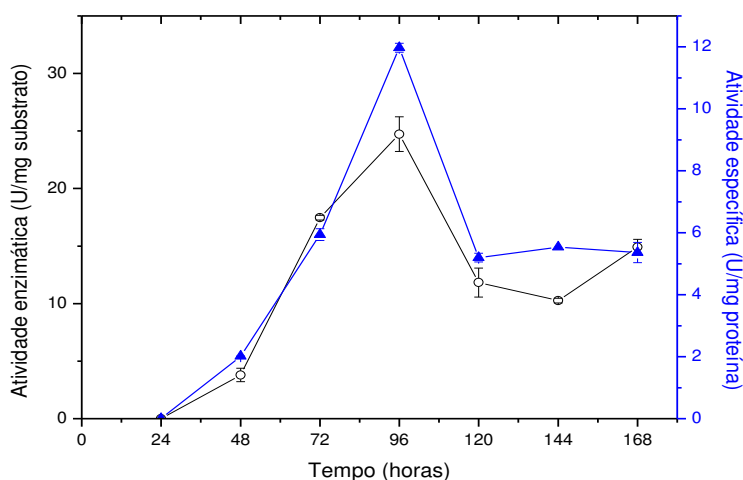
Substratos	Atividade enzimática (U/g de substrato)	Atividade específica (U/mg de substrato)
Casca de mandioca	6,92 ± 2	4,57 ± 0,1
Chá Preto	15,24 ± 0,8	1,83 ± 0
Chá Verde	5,44 ± 0,7	0,7 ± 0
Folha de abacate ( <i>Persea americana</i> )	4,5 ± 2,5	5,29 ± 0,5
Folha de abiu ( <i>Pouteria caimito</i> )	4,48 ± 2,4	2,47 ± 0

Folha de caju ( <i>Anacardium occidentale</i> )	8,23 ± 2,2	4,76 ± 0,05
Folha de eucalipto ( <i>Eucalyptus</i> spp.)	24,73 ± 1,5	13,74 ± 0,2
Folha de goiabeira ( <i>Psidium guajava</i> )	8,2 ± 4,8	4,99 ± 0,2
Folha de jambo ( <i>Syzygium jambos</i> )	12,12 ± 1,5	9,77 ± 0,2
Folha de jambolão ( <i>Syzygium jambolanum</i> )	9,27 ± 0,9	3,92 ± 0,1
Folha de manga ( <i>Mangifera indica</i> )	11,13 ± 0,3	3,50 ± 0,1
Folha de romã ( <i>Punica granatum</i> )	6,45 ± 0,8	5,71 ± 0,1
Manjeriçã ( <i>Ocimum basilicum</i> )	9,53 ± 1,7	0,88 ± 0
Pinhão manso ( <i>Jatropha curcas</i> )	4,74 ± 1,6	4,87 ± 0
Trigo em grão	5,69 ± 1,4	2,27 ± 0

Os cultivos foram realizados em FES por 96 horas, a 37<sup>o</sup> e 60% umidade relativa.

Analisando a influência do tempo de cultivo na produção enzimática em FES empregando folhas de eucalipto como substrato, pode ser observado na Figura 1 que a produção tanásica aumentou gradualmente no decorrer do tempo até 96 horas de cultivo (25,79 U/g substrato), período semelhante ao encontrado para a produção de tanases por *A. ruber* utilizando folhas de jambolão como substrato (40) e por *A. niger* cultivado em resíduos de chá (36). Acima de 96 horas, foi observada redução da atividade tanásica, o que pode ser explicado, possivelmente, pelo aumento de fontes de carbono prontamente assimiláveis, como a glicose, obtida pela hidrólise dos taninos presentes nas folhas, ou pela ação de proteases que degradaram a enzima de interesse. De acordo com o substrato utilizado na FES e o microrganismo, diferentes períodos de cultivo foram relatados para a máxima produção enzimática como, por exemplo, 48 horas para *Aspergillus* spp. UCP1284 cultivado em bagaço de caju (17) e 72 horas para *A. terreus* na presença de farelo de trigo (13).





**Figura 1.** Produção de tanase em função do tempo de cultivo pelo fungo endófito *A. niger* ANG18 em FES empregando folhas de eucalipto como substrato. Símbolos: (○) Atividade tanásica (U/g de substrato); (▲) atividade específica (U/mg de proteína).

Visando melhorar a produção em FES, a influência de diferentes soluções umectantes foi avaliada. Na Tabela 2 observa-se que a máxima produção tanásica ocorreu na presença de sais de Khanna (29,82 U/g de substrato), seguida por Meio Mineral (24,94 U/g de substrato). Na presença de sais SR a produção foi reduzida cerca 2 vezes (13,84 U/g de substrato) quando comparado ao uso de sais de Khanna. As soluções umectantes são importantes para o crescimento do microrganismo e para produção de enzimas. A presença de íons metálicos nessas soluções auxilia na expressão completa da atividade catalítica da enzima, no crescimento e reprodução dos microrganismos (45). Tais compostos são micronutrientes e atuam como co-fatores de enzimas (46). Sais de Khanna, meio Mineral e sais SR possuem como constituintes comuns o fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e o sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Contudo, a presença de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  na composição de sais SR, e ausente nas demais soluções umectantes, pode ter influenciado negativamente a síntese enzimática. A presença de  $\text{ZnSO}_4$  e  $\text{CuSO}_4$  na solução de sais de Khanna pode ter favorecido a máxima produção tanásica por *A. niger* ANG18, corroborando o fato de que este fungo, quando cultivado em meio Khanna contendo ácido tânico como fonte de carbono, promoveu a maior produção de tanase em FSbm (43). Por outro lado, outras espécies de fungos filamentosos, tais como *A. fumigatus* MA (31), *A. carbonarius* (37) e *A. ruber* (40) apresentaram máxima produção de tanases quando utilizada água de torneira como agente umectante.

**Tabela 2.** Efeito de diferentes soluções umectantes adicionadas à FES sobre a produção de tanase por *A. niger* ANG18 empregando como substrato folhas de eucalipto.

<b>Soluções umectantes</b> <b>1:1 (m/v)</b>	<b>Atividade enzimática</b> <b>(U/g subst.)</b>	<b>Atividade específica</b> <b>(U/mg prot.)</b>
Água destilada	18,56 ± 3,3	10,36 ± 0,2
Água de torneira	16,07 ± 4,2	12,11 ± 0,2
Sais de Khanna	29,82 ± 1,3	13,47 ± 0,4
Meio mineral	24,94 ± 1,2	10,85 ± 0,1
Sais SR	13,84 ± 4,1	10,41 ± 0,4

Os cultivos foram realizados por 96 horas a 37°C com umidade relativa em torno de 60%.

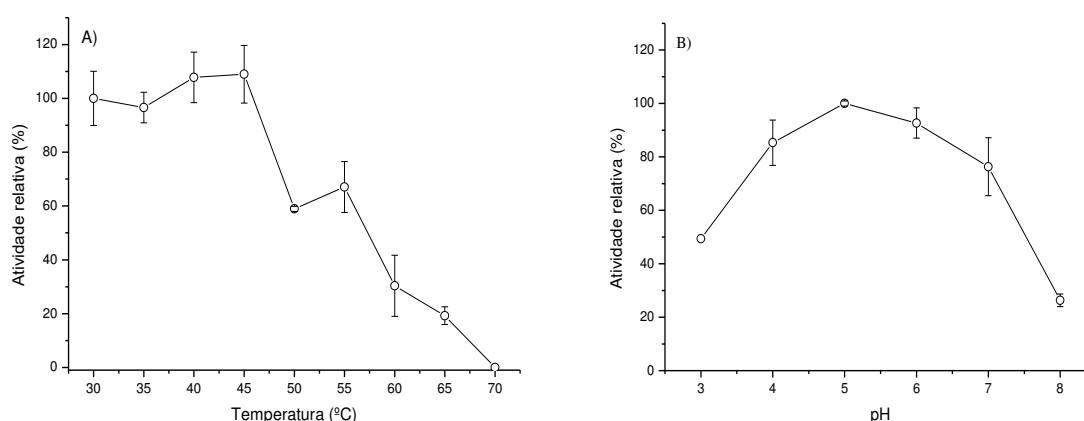
A umidade do meio cultivo influencia no desenvolvimento dos microrganismos, nos processos biológicos e enzimáticos. Para realizar suas atividades metabólicas, como a síntese de diferentes enzimas, os microrganismos necessitam de um limite mínimo de atividade de água (47). Deste modo, analisando a influência da proporção de sais de Khanna empregada para umidificar o substrato folhas de eucalipto, verificou-se a maior produção enzimática (19,33 U/g de substrato) quando utilizado o nível 1:1 (m/v) com atividade específica de 6,58 U/mg de proteína. A presença de sais de Khanna no nível 1:3 (m/v) não favoreceu a produção de tanase por *A. niger* ANG18, possivelmente, porque a alta disponibilidade de umectante dificulta a aderência do fungo ao substrato e, conseqüentemente, não ocorre produção de tanase para degradá-lo (48). Alto teor de umidade prejudica a porosidade do meio, diminuindo as trocas dos gases e aumentando a temperatura interno do meio. Em baixa umidade o crescimento do microrganismo é prejudicado por diminuir a acessibilidade aos nutrientes, o que influencia na obtenção do produto de interesse (49).

### **Temperatura e pH ótimo aparentes de atividade**

A temperatura ótima aparente de atividade da tanase contida no extrato bruto produzido por *A. niger* ANG18 em FES foi de 40-45°C (Figura 2A). Acima de 45°C foi observada redução da atividade enzimática até a completa inativação a 70°C. O aumento da temperatura promove o aumento do número de colisões entre a enzima e

o substrato resultando em maior atividade. Contudo, além do nível ótimo de temperatura algumas das ligações fracas que determinam a estrutura tridimensional das proteínas são rompidas, provocando à desnaturação e causando sua inativação (50). As enzimas de *Emericella nidulans* e *A. ochraceus* apresentaram temperatura ótima de atividade de 45°C e 30-45°C, respectivamente (51, 19). Contudo, altas temperaturas para a máxima atividade enzimática foram descritas para as tanases de *Paecilomyces variotii* (52) e *A. carbonarius* (37).

Em sua maioria, as tanases são enzimas ácidas, com pH ótimo de atividade em torno de 5,5 (1). O pH ótimo aparente de atividade foi igual a 5 (Figura 2B), semelhante ao observado para as tanases de *A. ochraceus* (19), *A. foetidus* (50) e *Aspergillus niger* AUMC 4301 (53).



**Figura 2.** Temperatura ótima aparente (A) e pH ótimo aparente (B) de atividade para a tanase contida no extrato bruto produzido por *A. niger* ANG18 em FES utilizando folhas de eucalipto como substrato.

### Efeito da adição de diferentes compostos na atividade tanásica

Algumas enzimas necessitam de íons metálicos para obter sua completa atividade catalítica (5, 33). A presença de íons pode alterar a estrutura terciária das enzimas tornando-a mais ativa ou inativa (54). No caso da tanase encontrada no extrato bruto produzido por *A. niger* ANG18, observa-se que a presença dos íons estudados não exerceu grande influência nas atividades enzimáticas (Tabela 3). A atividade enzimática foi levemente favorecida na presença  $\text{BaCl}_2$  (+ 16%) e reduzida na presença de  $\text{NaCl}$  (- 44%) e  $\text{CoCl}_2$  (- 38%). De modo geral, as tanases costumam ser inibidas por  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , sendo inativadas por  $\text{MgSO}_4$  e  $\text{CaSO}_4$  (3, 10). Diferindo do observado para a enzima de *A. niger* ANG18, o  $\text{BaCl}_2$  inibiu as atividades das tanases

produzidas por *A. niger* ITCC 6514.07 (55), por *Trichoderma harzianum* MTCC 10841 (56) e por *A. ochraceus* (19).

**Tabela 3.** Efeito de diferentes compostos na atividade tanásica do fungo endofítico *A. niger* ANG18.

Sais (1mM)	Atividade relativa (%)
Controle	100
AgNO <sub>3</sub>	77,56 ± 8,3
BaCl <sub>2</sub>	116,93 ± 11,3
CaCl <sub>2</sub>	99,21 ± 9,7
CoCl <sub>2</sub>	62,73 ± 3,3
CuCl <sub>2</sub>	71,39 ± 4,4
CuSO <sub>4</sub>	83,86 ± 10,6
MgCl <sub>2</sub>	68,77 ± 9,3
MgSO <sub>4</sub>	70,08 ± 8,2
MnCl <sub>2</sub>	90,29 ± 6,7
MnSO <sub>4</sub>	70,08 ± 7,8
NaCl	55,25 ± 2
NH <sub>4</sub> Cl	93,44 ± 3
ZnSO <sub>4</sub>	93,04 ± 8,4

#### 4. CONCLUSÕES

O fungo endofítico *A. niger* ANG18 apresentou potencial para produção de tanase quando cultivado em Fermentação em Estado Sólido. A tanase apresentou características físico-químicas interessantes para aplicação industrial, como temperatura ótima a 45°C e manutenção da atividade na presença de diferentes íons.

## REFERÊNCIAS

- 1 Yao J, Guo GS, Ren GH, Liu YH. Production, characterization and applications of tannase. *J Mol Catal B Enzym.* 2014; 101:137-47.
- 2 Banerjee D, Mahapatra S. Fungal tannase: a journey from strain isolation to enzyme applications. *Dyn Biochem Process Biotechnol Mol Biol* 2012; 6(2): 49-60.
- 3 Pizzi A. Tannins: major sources, properties and applications. In: Belgacem MN, Gandini A, editores. *Monomers, polymers and composites from renewable resources.* Amsterdam: Elsevier, 2008. p. 179-200.
- 4 Goel G, Puniya AK, Aguilar CN, Sing K. Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Naturwissenschaften.* 2005; 92: 497-03.
- 5 Aguilar CN, Rodríguez R, Gutiérrez-Sánchez G, Augur C, Favela-Torres E, Prado-Barragan LA. et al. Microbial tannases: advances and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007; 76(1): 47-59.
- 6 Lekha PK, Lonsane BK. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Adv Appl Microbiol.* 1997; 44: 215-60.
- 7 Murugan K, Al-Sohaibani SA. Biocompatible removal of tannin and associated color from tannery effluent using the biomass and Tannin Acyl Hydrolase (E.C.3.1.1.20) enzymes of mango industry solid waste isolate *Aspergillus candidus* MTTCC 9628. *Res. J. Microbiol.* 2010; 5(4): 262-71.
- 8 Aguilar CN, Gutierrez-Sanche G. Review: sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. *Food Sci. Technol. Int.* 2001; 7(5): 373-82.
- 9 Battestin V, Matsuda KL, Macedo AG. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. *Alim. Nutr.* 2004; 15(1): 63-2.
- 10 Lata S, Rani P. A source of Tannase producers and its optimization and applications: a review. *Adv. Appl. Sci. Res.* 2015; 6 (11):110-16.
- 11 Aguilar A, Borrell A, Pastor T. Biological factors affecting variability of persistent pollutant levels in cetaceans. *JCRM.* 1999; 1:83-116.
- 12 Cruz-Hernández M, Augur C, Rodríguez R, Contreras-Esquivel JC, Aguilar CN. Evaluation of culture conditions for tannase production by *Aspergillus niger* GH1. *Food Technol. Biotechnol.* 2006; 44(4): 541-44.
- 13 Malgireddy, N. R.; Narsimha, L.; Nimma, R. Optimal conditions for production of Tannase from newly isolated *Aspergillus terreus* under solidstate fermentation. v. 3, n. 2, p. 56–64, 2015.
- 14 Macedo GA, Matsuda LK, Battestin V. Screening of tanase producing fungi present in rich tannin vegetable residues. *RCCA.* 2005; 29(4): 833-8.

- 15 Rodrigues THS, Dantas MAA, Pinto GAS, Gonçalves LRB. Tannase production by solid state fermentation of cashew apple bagasse. *Appl Biochem Biotechnol.* 2007; 137/140(1/12): 675-88.
- 16 Bhoite RN, Murthy PS. Biodegradation of coffee pulp tannin by *Penicillium verrucosum* for production of tannase, statistical optimization and its application. *Food and Bioprocesses Processing.* 2015; 94: 727-35.
- 17 Liu, T. P. S. L.; Porto, T. S.; Moreira, K. A.; Takaki, G. M. C.; Brandão-Costa, R.; Herculano, P. N. et al. Tannase production by *Aspergillus* spp. UCP1284 using cashew bagasse under solid state fermentation. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2016; 10 (6): 565-71.
- 18 Hamdy HS, Fawzy EM. Economic production of tannase by *Aspergillus niger* van Tiegh adopting different fermentation protocols and possible applications. *Rom Biotech Lett* 2012; 17(4): 7441-57.
- 19 Gonçalves HB, Riul AJ, Quiapin A C, Jorge JA, Guimarães LHS. Characterization of a thermostable extracellular tannase produced under submerged fermentation by *Aspergillus ochraceus*. *Electron. J. Biotechnol.* 2012; 15 (5): 1-12.
- 20 Costa AM, Kadowaki M K, Minozzo M C, Souza CGM, Boer CG, Bracht A. et al. Production, purification and characterization of tannase from *Aspergillus tamarii*. *Afr. J. Biotechnol* 2012; 11 (2): 391-8.
- 21 Azevedo JL. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? *Rev. bras. bot.* 1999. 22(2): 225-9.
- 22 Hardoim PR, Overbeek LSV, Berg G, Pirttilä AM, Compant S, Campisano A.; et al. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2015, 79(3): 293-20.
- 23 Schulz B, Boyle C, Draeger S, Rommert AK, Krohn K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research.* 2002; 106: 996-04.
- 24 Zhang HW, Song YC, Tan RX. Biology and chemistry of endophytes. *Nat. Prod. Rep.* 2006; 23(5):753-71.
- 25 Araújo WL, Lima AOS, Azevedo JL, Marcon J. Manual de isolamento de microrganismos endofíticos. Piracicaba: CALQ, 2002.
- 26 Costa AM, Ribeiro WX, Kato E, Monteiro ARG, Peralta RM. Production of tannase by *Aspergillus tamarii* in submerged cultures. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2008; 51(2): 399-04.
- 27 Khanna P, Sundaril SS, Kumar NJ. Production, isolation and partial purification of xylanases from *Aspergillus* sp. *World J Microbiol Biotechnol.* 1995; 11: 242-3.

- 28 Rizzatti ACS, Jorge JA, Terenzi HF, Rechia CGV, Polizeli MLTM. Purification and properties of thermostable extracellular  $\alpha$ -D-xylosidase produced by thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. J Ind Microbiol Biotechnol. 2001; 26(3): 156-60.
- 29 Sharma S, Bhat TK, Dawra R. K. A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. Anal. Biochem. 2000; 279: 85-9.
- 30 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976; 72(1/2): 248-4.
- 31 Manjit, Yadav A, Aggarwal NK, Kumar K, Kumar A. Tannase production by *Aspergillus fumigatus* MA under solid-state fermentation. World J Microbiol Biotechnol. 2008; 24: 3023-30.
- 32 Souza PNC, Maia NC, Guimarães LHS, Resende MLV, Cardoso PG. Optimization of culture conditions for tannase production by *Aspergillus* sp. gm4 in solid state fermentation. Acta Sci Biol Sci. 2015; 37(1): 23-30.
- 33 Mukherjee G, Banerjee R. Biosynthesis of tannase and gallic acid from tannin rich substrates by *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus foetidus*. J Basic Microbiol. 2004; 44 (1): 42-8.
- 34 Aissam H, Errachidi F, Penninckx MJ, Merzouki M, Benlemlih M. Production of tannase by *Aspergillus niger* HA37 growing on tannic acid and Olive Mill Waste Waters. World J Microbiol Biotechnol. 2005; 21(4): 609–14.
- 35 Rodríguez-Durán LV, Contreras-Esquível JC, Rodríguez R, Prado-Barragán LA, Aguilar CN. Optimization of tannase production by *Aspergillus niger* in solid-state packed-bed bioreactor. Am J Microbiol Biotechnol. 2011; 21 (9): 960-7.
- 36 Sharma NK, Beniwal V, Kumar S, Pathera AK, Ray A. Production of tannase under solid-state fermentation and its application in detannification of guava juice. Prep Biochem Biotechnol. 2014; 44 (3): 282-90.
- 37 Valera L, Jorge JA, Guimarães LHS Characterization of a multi-tolerant tannin acyl hydrolase II from *Aspergillus carbonarius* produced under solid-state fermentation. EJBT. 2015; 18 (6): 464–70.
- 38 Rajak, R. C.; Singh, A.; Banerjee, R. Biotransformation of hydrolysable tannin to ellagic acid by tannase from *Aspergillus awamori*. Biocatal. Biotransformation. 2017; 35 (1): 27-34.
- 39 Xiao A, Huang Y, Ni H, Cai H, Yang Q. Statistical optimization for tannase production by *Aspergillus tubingensis* in solid-state fermentation using tea stalks. Electron. J. Biotechnol. 2015; 18 (3): 143-7.
- 40 Kumar R, Sharma J, Singh R. Production of tannase from *Aspergillus ruber* under solid-state fermentation using jamun (*Syzygium cumini*) leaves. Microbiol. Res. 2007; 162 (4): 384-90.

- 41 Cruz R, Lima JS, Fonseca JC, Fernandes MJS, Lima DMML, Duda GP. 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. *Adv Microbiol.* 2013; 3: 52-60.
- 42 Lokeswari N. Production of tannase through submerged fermentation of tannin-containing cashew husk by *Aspergillus oryzae*. 2010; 3 (3): 32-7.
- 43 Cavalcanti RMF, Ornela PHO, Jorge JÁ, Guimarães LHS. Screening , Selection and optimization of the culture conditions for tannase production by endophytic fungi isolated from Caatinga. *J. Appl. Bol. Biotechnol.* 2017; 5 (1): 1–9.
- 44 Moore BD, Wallis IR, Wood JT, Foley WJ. Foliar nutrition, site quality, and temperature influence foliar chemistry of Tallowwood (*Eucalyptus microcorys*). *Ecol Monogr.* 2004; 74: 553-68.
- 45 Jana A, Halder SK, Banerjee A, Paul T, Pati BR, Mondal KC. et al. Biosynthesis, structural architecture and biotechnological potential of bacterial tannase: A molecular advancement. *Bioresour Technol.* 2014; 157: 327-40.
- 46 Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia.* 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.
- 47 Pelizer LH, Danesi EDG, Rangel CO, Sassano CE, Carvalho JCM, Sato S. et al. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. *J Food Eng.* 2003; 56 (4): 371-5.
- 48 Said S, Pietro RCLR. *Enzimas de interesse industrial e biotecnológico.* Rio de Janeiro: Eventos, 2002.
- 49 Vu VH, Pham TA, Kim K. Improvement of a fungal strain by repeated and sequential mutagenesis and optimization of solid-state fermentation for the hyperproduction of rawstarch-digesting enzyme. *Am J Microbiol Biotechnol.* 2010; 20: 718-26.
- 50 Mukherjee G, Banerjee R. Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by a coculture of *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus foetidus*. *World J Microbiol Biotechnol* 2006; 22: 207-12.
- 51 Golçanves HB, Riul AJ, Terenzi HF, Jorge JA, Guimarães L HS. Extracellular tannase from *Emericella nidulans* showing hypertolerance to temperature and organic solvents. *J Mol Catal B Enzym* 2011; 71: 29-35.
- 52 Battestin V, Macedo GA. Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by *Paecilomyces variotii*. *Electron. J. Biotechnol* 2007; 10 (2): 191-9.
- 53 El-Fouly MZ, El-Awamry Z, Shahin AAM, El-Bialy HA, Naeem E, El-Saeed G. Biosynthesis and characterization of *Aspergillus niger* AUMC 4301 tannase. *Am. J. Sci* 2010; 6 (12): 709-21.
- 54 Nelson DL, Cox MM. *Princípios de bioquímica de Lehninger.* 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.



55 Srivastava A, Kar R. Characterization and application of tannase produced by *Aspergillus niger* ITCC 6514.07 on pomegranate rind. Braz. J. Microbiol. 2009; 40 (4): 782-9.

56 Iqbal H, Kapoor A. Tannin degradation efficiency of tannase produced by *Trichoderma harzianum* MTCC 10841 and its biochemical properties. Int. J. LifeSc. Bt & Pharm. 2012; 1 (4): 106-17.