



PATRÍCIA NIRLANE DA COSTA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TANASE
POR *Aspergillus* sp. EM FERMENTAÇÃO EM
ESTADO SÓLIDO (FES)**

LAVRAS – MG

2012

PATRÍCIA NIRLANE DA COSTA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TANASE POR *Aspergillus* sp. EM
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Patrícia Gomes Cardoso

LAVRAS – MG

2012

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Costa, Patrícia Nirlane da.

Otimização da produção de tanase por *Aspergillus* sp. em
fermentação em estado sólido (FES) / Patrícia Nirlane da Costa. –
Lavras : UFLA, 2012.

73 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Patrícia Gomes Cardoso.

Bibliografia.

1. Enzima. 2. Metodologia de superfície de resposta. 3. Taninos.
4. Microbiologia industrial. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 660.28449

PATRÍCIA NIRLANE DA COSTA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TANASE POR *Aspergillus* sp. EM
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2012.

Dr. Luís Henrique Souza Guimarães	USP/RIBEIRÃO PRETO
Dr. Luís Roberto Batista	UFLA
Dr. Disney Ribeiro Dias	UFLA

Dra. Patrícia Gomes Cardoso
Orientadora

LAVRAS – MG

2012

OFEREÇO

Aos meus pais, Nirlei de Carvalho Lima Costa e Ernani Martins da Costa, pela confiança, carinho e orações.

Ao meu noivo Thales Henrique Souza pela compreensão, apoio e força nas horas mais difíceis desta caminhada.

A minha querida irmã Poliana e todos os meus familiares, pelo incentivo.

DEDICO

A Deus, por ser o Pastor que me conduz, não deixando nada faltar. Obrigada Senhor por mais essa conquista!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção, força e por todas as suas bênçãos.

Aos meus pais por acreditarem no meu potencial, pela paciência, orientação, orações e amor que sempre me deram.

Ao meu noivo e grande amor, Thales Henrique Souza, pelo companherismo, amizade, pelo apoio nas horas difíceis, pelas vezes que me acompanhou no laboratório e por todo amor e carinho que sempre me dedicou.

A minha irmã Poliana de Lima Costa pelas palavras amigas quando precisei.

Aos familiares e amigos que torcem pelo meu sucesso.

À professora Patrícia Gomes Cardoso pela orientação, credibilidade, amizade, liberdade e confiança durante o Mestrado.

Aos professores Eustáquio de Souza Dias, Luis Henrique Souza Guimarães, Luís Roberto Batista, Disney Ribeiro Dias, Mário Lúcio e José Guilherme pelo apoio, orientação, crescimento profissional e por toda ajuda durante o mestrado.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Departamento de Biologia (DBI) e ao Departamento de Agricultura, Setor de Cafeicultura, pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao órgão de pesquisa CAPES, pelo incentivo e concessão de bolsa.

Aos funcionários dos departamentos de Biologia e Agricultura pela prestação de serviços e gentilezas.

Aos amigos do laboratório, em especial à Natália da Costa Maia, pelo grande auxílio e dedicação durante a condução dos experimentos e pela valiosa amizade, que contribuíram para a realização deste trabalho.

"Não é o que você faz, mas quanto amor você
dedica no que faz que realmente importa."

(Madre Tereza de Calcutá)

RESUMO

A produção de tanase por *Aspergillus* sp. em fermentação em estado sólido (FES) foi investigada utilizando folhas de diferentes espécies vegetais, como folhas de manga (*Mangifera indica* L.), de jambolão (*Syzygium cumini*), de café (*Coffea arabica* L.) e diferentes resíduos agroindustriais, como cascas de café, de arroz e farelo de trigo. Entre os substratos testados, folha de jambolão apresentou alto conteúdo de taninos e proporcionou melhor produção de tanase por *Aspergillus* sp. A metodologia de superfície de resposta foi aplicada para otimizar em escala laboratorial a produção de tanase usando folhas de Jambolão em FES por *Aspergillus* sp. O Delineamento de Plackett e Burman foi conduzido para avaliar o efeito de algumas variáveis na produção de tanase, incluindo temperatura de cultivo (°C), nível de umidade (água de torneira: substrato), ácido tânico % (m/m), glicose % (m/m), ácido gálico % (m/m), nitrato de potássio % (m/m), extrato de levedura % (m/m), sulfato de amônio % (m/m), quantidade de substrato (g), concentração de inóculo (esporos/g de substrato), tempo de incubação (dias) e pH. Entre as variáveis testadas, o tempo de incubação, a concentração de nitrato de potássio e a de ácido tânico apresentaram efeito significativo na produção da enzima. O melhor tempo de incubação foi avaliado e as demais variáveis foram otimizadas usando o Delineamento Composto Central Rotacional (2²) e metodologia de superfície de resposta. As melhores condições para produção de tanase foram: tempo de incubação de dois dias; concentração de ácido tânico de 1,53% (m/m) e concentração de nitrato de potássio de 2,71% (m/m). Após o processo de otimização, a atividade de tanase aumentou 4,65 vezes.

Palavras-chave: *Aspergillus*. Fermentação em estado sólido. Tanase. Metodologia de superfície de resposta.

ABSTRACT

The production of tannase by *Aspergillus* sp. under solid-state fermentation (SSF) was investigated using leafy of different plants species, such as Mango (*Mangifera indica* L.), Jamun (*Syzygium cumini*), Coffee (*Coffea arabica* L.) and different agro-industrial residues, such as coffee and rice husks, and wheat bran. Among different substrates used, Jamun leaves showed high content of tannins and yielded high tannase production by *Aspergillus* sp. Surface response methodology was applied to the optimization in laboratory scale production of tannase using Jamun leaves in SSF for *Aspergillus* sp. The Plackett-Burman design was conducted to evaluate the effects of some variables, including growth temperature (°C), moisture level (tap water: substrate), tannic acid % (w/w), glucose % (w/w), gallic acid % (w/w), potassium nitrate % (w/w), yeast extract % (w/w), ammonium sulfate % (w/w), substrate quantity (g), inoculum concentration (spores/ g of substrate), incubation time (days) and pH on the production of tannase. Among these variables tested, incubation time, potassium nitrate concentration and tannic acid had significant effects on enzyme production. The best incubation time was evaluated and others variables were optimized using the Central Composite Rotatable Design (2²) and surface response methodology. The best conditions for tannase production were: incubation time of two days; tannic acid concentration of 1.53% (w/w) and potassium nitrate concentration of 2.71% (w/w). After the optimization process, the tannase activity increased 4.65-fold.

Keywords: *Aspergillus*. Solid-state fermentation. Tannase. Surface response methodology.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1	Estrutura molecular dos galotaninos (A) e dos elagiotaninos (B)	16
Figura 2	Estrutura química de um tanino condensado.....	17
Figura 3	Atividade esterase e depsídica da tanase.....	20
Figura 4	Jambolão (<i>Syzygium cumini</i>).....	34

CAPÍTULO 2

Figure 1	Effect of moistening agents on tannase activity on SSF using jamun leaves.....	57
Figure 2	Pareto Chart of standardized effects of variables in PB design on tannase production by <i>Aspergillus</i> sp. ($R^2 = 0,83$)	58
Figure 3	Effect of incubation time (hours) over tannase production in SSF using jamun leaves.....	63
Figure 4	Comparison between the observed values and the predicted values for tannase production.....	66
Figure 5	Response surface (A) and contour diagrams (B) for tannase activity considering tannic acid and potassium nitrate.....	67

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Table 1	Range of different variables studied in the Plackett–Burman design	50
Table 2	Levels of variables studied in CCD.....	52
Table 3	Levels of variables no significant in P-B design and used in CCD.....	52
Table 4	Tannin content and tannase activity in different substrates used for SSF	55
Table 5	Centesimal Composition of the substrates	55
Table 6	Placket–Burman design variables (in coded levels) with tannase production as response	59
Table 7	CCD matrix of two variables with experimental and predicted values of tannase production.....	64
Table 8	Analysis of variance for the response of the dependent variables on tannase production	65

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução geral	13
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Taninos	15
2.2	Enzima tanase	19
2.2.1	Fontes de Origem	21
2.2.2	Aplicações da tanase	23
2.2.2.1	Tratamentos de sucos	23
2.2.2.2	Tratamentos de chás instantâneos	24
2.2.2.3	Produção de ácido gálico e propilgalato	25
2.2.2.4	Preparo de ração animal	25
2.2.2.5	Fabricação de vinhos	26
2.2.2.6	Tratamento de efluentes de curtume	26
2.2.3	Produção de tanase através da fermentação microbiana	27
2.2.3.1	Fermentação em Superfície Líquida (FSL)	28
2.2.3.2	Fermentação Submersa (FSm)	29
2.2.3.3	Fermentação em estado sólido (FES)	30
2.2.4	Otimização das condições para produção de tanase	35
	REFERÊNCIAS	38
	CAPÍTULO 2 Optimization of Cultural Conditions for Tannase Production by <i>Aspergillus</i> Sp. Under Solid-State Fermentation ...	44
1	INTRODUCTION	45
2	MATERIAL AND METHODS	47
2.1	Microorganism and inoculum preparation	47
2.2	Selection of substrates for tannase production under SSF	47
2.3	Estimation of tannin	48
2.4	Centesimal composition of the substrates	48
2.5	Effect of tap water as moisturizing agents of Jamun leaves on SSF	48
2.6	Plackett–Burman design	49
2.7	Effect of incubation time	49
2.8	Central composite design (CCD), RSM experimental design and statistical analysis	50
2.9	Extraction of tannase enzyme	52
2.10	Tannase assay	53

2.11	Protein determination.....	53
3	RESULTS AND DISCUSSION	54
3.1	Selection of substrate for tannase production in SSF	54
3.2	Effect of tap water as moisturizing agent of Jamun leaves on SSF	56
3.3	Plackett–Burman (PB) design.....	57
3.4	Effect of incubation time on tannase production	61
3.5	Central composite design (CCD), RSM experimental design and statistical analysis.....	63
3.6	Validation of the model	68
4	CONCLUSION	69
	REFERENCES	70

CAPÍTULO 1 Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

Tanino acil hidrolase (EC 3.1.1.20) ou tanase é uma enzima que catalisa a quebra das ligações ésteres e depsídicas de taninos hidrolisáveis e ésteres de ácido gálico, sendo produzida por vários micro-organismos, principalmente por fungos filamentosos. Essa enzima possui uma série de aplicações industriais incluindo a produção de ácido gálico, utilizado na indústria farmacêutica para produção de drogas antibacterianas, produção de chás instantâneos, clarificação de sucos, cervejas e processamento de vinhos na indústria de alimentos. Essa enzima pode ser usada também no pré-tratamento de rações animais e no tratamento de efluentes de curtume da indústria de couros (MUKHERJEE; BANERJEE, 2006).

A síntese de tanase é realizada por várias espécies de micro-organismos em diferentes sistemas fermentativos, nos quais as condições físicas e químicas são controladas visando maior produção da enzima. A fermentação em estado sólido (FES), processo no qual o micro-organismo cresce em um substrato sólido, na ausência ou quase ausência de água livre, apresenta algumas vantagens para produção de tanase em relação à fermentação submersa, que até o momento, constitui a forma mais utilizada para produção dessa enzima. Algumas vantagens são o alto rendimento da enzima, o baixo custo devido à utilização de resíduos agroindustriais que constituem matérias-primas baratas e disponíveis, e a natureza extracelular da enzima produzida facilitando a sua extração (RODRIGUES et al., 2007).

Estudos têm sido realizados visando à otimização das condições de produção de tanase em FES. Os efeitos de algumas variáveis na produção enzimática foram avaliados em alguns trabalhos, porém, cada fator foi estudado

isoladamente, não considerando as possíveis interações entre essas condições (KUMAR; SHARMA; SINGH, 2007; MANJIIT et al., 2008). Os delineamentos experimentais associados à metodologia de superfície de resposta constituem ferramentas efetivas nos processos de otimização das condições de cultivo e produção de uma enzima, uma vez que consideram os efeitos das interações entre as variáveis e direcionam uma faixa ótima para produção enzimática (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Apesar de trabalhos terem sido realizados visando à produção e caracterização das tanases de alguns micro-organismos, informações a respeito da sua regulação, capacidade catalítica, especificidade e aspectos de otimização da sua produção ainda precisam ser esclarecidos a fim de reduzir custos e viabilizar o uso da tanase em escala industrial.

Assim, esse trabalho tem como objetivo avaliar diferentes substratos para produção de tanase e otimizar as condições de cultivo para produção da enzima utilizando os delineamentos experimentais associados à metodologia de superfície de resposta.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Taninos

Os taninos são definidos como compostos fenólicos, solúveis em água, com peso molecular de 500 a 30000 Da, provenientes do metabolismo secundário das plantas e que diferem da maioria dos outros compostos fenólicos pela sua capacidade de precipitar proteínas e outras macromoléculas em solução (KRAUS et al., 2003). Essa capacidade se deve a grande quantidade de grupos hidroxila-fenólicos em suas estruturas que permitem a formação de ligações cruzadas com muitas macromoléculas (BATTESTIN et al., 2004).

Dependendo de sua estrutura e propriedades, os taninos podem ser divididos em dois grandes grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (PAES et al., 2006). Os taninos hidrolisáveis podem ser subdivididos em galotaninos e elagitaninos. Os galotaninos são caracterizados pela presença de muitas moléculas de ácidos orgânicos, tais como ácido gálico, digálico, que são esterificados a uma molécula de glicose (Figura 1A). Em hidrólise, os galotaninos formam glicose e ácidos fenólicos (principalmente ácido gálico). O exemplo mais comum de um galotanino é o ácido tânico. Por outro lado, os elagitaninos possuem blocos formados por unidades de ácidos elágicos ligados a glicosídeos, e quando hidrolisados, liberam glicose e ácido elágico junto com ácido gálico e frequentemente outros ácidos (Figura 1B) (AGUILAR et al., 2007).

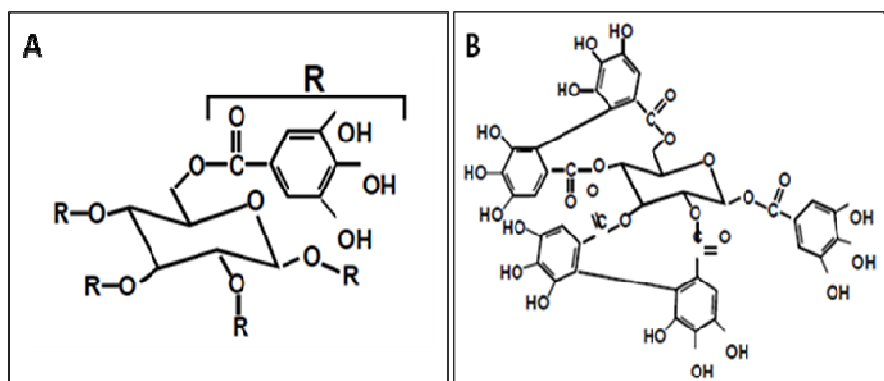


Figura 1 Estrutura molecular dos galotaninos (A) e dos elagiotaninos (B)
 Fonte: Battestin et al. (2004)

Os taninos condensados ou proantocianidinas são compostos complexos constituídos por blocos de flavonoides, como demonstrado na Figura 2 (AGUILAR et al., 2007). São resistentes à hidrólise, mas podem ser solúveis em solventes orgânicos, dependendo de sua estrutura (BATTESTIN et al., 2004). A maior parte dos seus constituintes é responsável pelo sabor adstringente de algumas frutas (BELMARES et al., 2004).

Uma diferença entre taninos condensados e taninos hidrolisáveis é que os taninos condensados não contêm nenhuma molécula de açúcar (ALBERTSE, 2002). Além disso, são mais resistentes ao ataque microbiano que os hidrolisáveis e são tóxicos para vários micro-organismos (Bhat et al., 1988). Os taninos condensados não são hidrolisados por tanases. Essas enzimas hidrolisam apenas taninos hidrolisáveis (AGUILAR; GUTIÉRREZ-SANCHEZ, 2001).

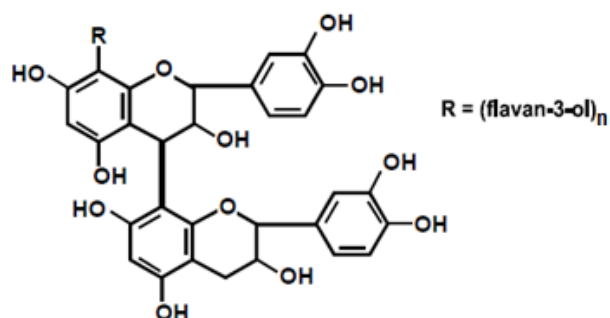


Figura 2 Estrutura química de um tanino condensado

Fonte: Lekha e Losane (1997)

Os taninos são amplamente distribuídos no reino vegetal e são encontrados principalmente em espécies de gimnospermas e angiospermas. São encontrados nas folhas, frutos, cascas, troncos, raízes, sementes e seiva. Fazem parte do metabolismo secundário das plantas e após a lignina, sendo o segundo grupo mais abundante de compostos fenólicos nos vegetais (BHAT et al., 1998). O teor e o tipo de tanino variam, não só de uma espécie para outra, como também de uma parte para outra do mesmo vegetal. Além disso, o conteúdo de taninos pode variar de acordo com as condições climáticas e geográficas do ambiente (NOZELLA, 2001).

Lekha e Lonsane (1997) relataram que o acúmulo de taninos pelas plantas protege partes vulneráveis do ataque microbiano, inativando vírus e enzimas invasivas secretadas pelos micro-organismos. Essas enzimas são totalmente ou parcialmente inativadas pela formação de complexos com os taninos. Porém, muitos desses microrganismos são resistentes aos taninos e podem crescer e se desenvolver em sua presença. A degradação microbiana de taninos é mais relatada para taninos hidrolisáveis, principalmente galotaninos.

Devido sua estrutura e propriedades, os taninos possuem algumas aplicações industriais. Entre elas podemos citar a estabilização da cerveja, na qual se utiliza o ácido tânico para reduzir a concentração proteica através da precipitação e formação de complexos tanino-proteicos que são retirados da bebida por centrifugação/filtração. Os taninos também podem ser utilizados no curtimento de pele animal para sua transformação em couro e na produção de tintas, adesivos e em virtude de suas propriedades antissépticas, vem sendo testados contra organismos xilófagos (que se alimentam de madeira) (BATTESTIN et al., 2004; PAES et al., 2006).

Entretanto, os taninos também apresentam efeitos negativos na nutrição animal, devido ao gosto adstringente e capacidade de se ligar a macromoléculas, tornando-as indigeríveis. Assim, altos conteúdos de taninos levam a um menor consumo involuntário, menor eficiência na digestibilidade e produtividade animal (RANA; BHAT, 2005). Estudos mostraram que menores concentrações de taninos na alimentação levaram a um aumento na assimilação de nitrogênio em ruminantes, resultando em maiores taxas de crescimento e produção de leite (AGUILAR et al., 2007). Os valores nutricionais de alimentos com taninos e forragens podem ser aumentados mediante aos processos de detanificação, que podem ser físicos, químicos e biológicos. Nos tratamentos biológicos, diferentes micro-organismos têm sido utilizados para produção de enzimas, visando diminuir o conteúdo de taninos e aumentar o valor nutritivo dos materiais tratados (RANA; BHAT, 2005).

Além dos efeitos negativos na nutrição animal, esses compostos fenólicos também têm apresentado problemas no processamento de alimentos, como sucos, chás e cervejas, e no descarte de resíduos de couro curtido com taninos. Assim, sua biodegradação tem sido investigada pela utilização de bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Entre os micro-organismos, os fungos filamentosos, especialmente as espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* são

as mais relatadas na degradação de taninos, devido à alta produção da enzima tanase (BHAT et al., 1998).

2.2 Enzima tanase

Tanino acil hidrolase (E.C. 3.1.1.20), comumente chamada de tanase, catalisa a hidrólise de ligações ésteres e depsídicas em taninos hidrolisáveis como o ácido tânico, e ligações ésteres do ácido gálico (AGUILAR et al., 2007). Teighem (1867 citado por LEKHA; LONSANE, 1997) foi o primeiro a relatar a formação de ácido gálico pelos fungos identificados como *Penicillium glaucum* e *Aspergillus niger*, que foram capazes de crescer utilizando ácido tânico como única fonte de carbono, liberando ácido gálico e glicose. Posteriormente, Fernback (1901 citado por LEKHA; LONSANE, 1997) mostrou que a hidrólise de taninos é realizada por uma enzima particular que foi denominada tanase. Desde então, trabalhos têm sido realizados visando o estudo dessa enzima, bem como as condições ótimas para sua produção.

A tanase é uma enzima induzível, ou seja, é produzida em maior quantidade na presença de ácido tânico ou do seu produto final, que é o ácido gálico. Porém, o mecanismo de indução da tanase ainda não foi elucidado. Acredita-se que o ácido tânico não seja o indutor desta enzima, uma vez que o seu tamanho e reatividade com a membrana e parede celular, impedem a absorção dessa molécula pela célula. Assim, sugere-se que níveis básicos de tanase, produzida constitutivamente, hidrolisem o ácido tânico em ácido gálico e glicose, e então, o ácido gálico possa ser absorvido pela célula, funcionando como o indutor da enzima (LEKHA; LONSANE, 1997).

Estudos têm sido realizados visando à produção e isolamento de tanases (HASLAM; STANGROOM, 1966; BEVERINI; METCHE, 1990). Esses trabalhos relatam que a tanase apresenta duas isoformas, uma que possui maior

atividade esterásica sobre a ligação éster entre o anel aromático e o resíduo de glicose e outra que possui maior atividade depsídica sobre a ligação éster entre os anéis aromáticos (Figura 3). As duas isoformas de tanases de *Aspergillus niger* foram fracionadas usando coluna de cromatografia, e as duas enzimas diferiam ligeiramente com respeito ao seu pH ótimo e estabilidade (Haslam & Stangroom, 1966).

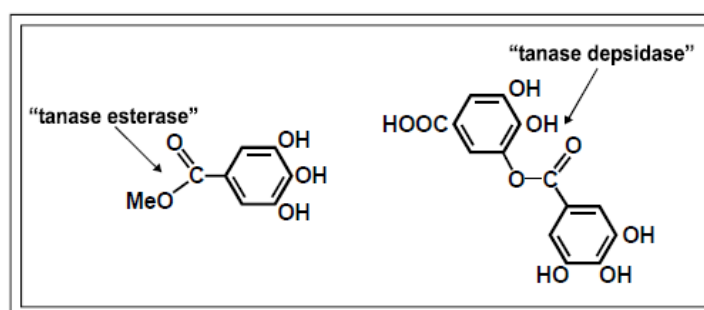


Figura 3 Atividade esterase e depsídica da tanase

Fonte: Battestin et al. (2004)

Um dos tópicos mais estudados sobre tanase se refere às propriedades físico-químicas dessa enzima. As tanases produzidas por fungos são glicoproteínas com peso molecular até 300 kDa, formadas por uma esterase e uma depsidase, estáveis em uma faixa de pH de 3,5 a 8,0, pH ótimo de 5,5 a 6,0, estabilidade a temperaturas de 30 a 60°C e temperatura ótima em torno de 30 a 40°C (AGUILAR; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, 2001). Entretanto, todas essas características dependem das condições de cultivo e da linhagem utilizada, e assim, muitos trabalhos são realizados com o objetivo de isolar e caracterizar a enzima produzida por diferentes linhagens de micro-organismos (ALBERTSE, 2002; BATTESTIN; MACEDO, 2007b; MAHAPATRA et al., 2005; SHARMA et al., 2008).

A tanase de *A. awamori* foi purificada e caracterizada sendo uma glicoproteína, com estrutura β -folha predominante, indicando natureza globular com atividade ótima a 35°C e pH 5.0 (MAHAPATRA et al., 2005). A enzima produzida por *A. oryzae* apresentou uma massa molecular de aproximadamente 64 KDa sendo transcrita como uma cadeia polipeptídica única com uma sequência sinal de 18 aminoácidos. Essa cadeia polipeptídica é clivada em duas subunidades (30 e 33 KDa) que permanecem unidas por uma ligação dissulfeto (HATAMOTO et al., 1996, 1997).

Além do efeito da temperatura e pH, para expressar sua atividade catalítica completa, a tanase requer a presença de alguns íons, porém a presença de outros podem inibir sua atividade. Assim, é importante conhecer quais são os íons e suas concentrações para se obter a máxima eficiência da enzima. A enzima produzida no cultivo de *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus foetidus* foi menos eficiente na atividade sobre os taninos na presença dos íons Ba^+ , Ca^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} e Na^+ e somente o íon Mg^{2+} estimulou a sua atividade (MUKHERJEE; BANERJEE, 2006).

2.2.1 Fontes de Origem

A tanase pode ser obtida a partir das fontes vegetal, animal e microbiana. Essa enzima está presente em muitas plantas ricas em taninos como Haritaki (*Terminalia chebula*), divi divi (*Caesalpinia coriaria*), goma ghati (*Anogeissus latifolia*), cássia-imperial (*Cassia fistula*) e acácia arábica (*Acacia arabica*), principalmente em suas frutas, folhas, galhos e nas cascas. Porém, os níveis de tanase obtida por essa fonte são muito baixos (LEKHA; LONSANE, 1997). Assim, os micro-organismos compreendem a fonte mais importante para obtenção dessa enzima, isso porque podem ser cultivados em larga escala e por um curto período de tempo, levando a produção de tanase em altas quantidades,

continuamente. Além disso, as enzimas produzidas pelos micro-organismos são mais estáveis do que aquelas obtidas por outros organismos. O melhoramento genético também pode ser uma alternativa interessante já que os micro-organismos podem ser manipulados facilmente e os resultados obtidos mais rapidamente do que em animais ou plantas (MACEDO; MATSUDA; BATTESTIN, 2005).

Entre os microrganismos, espécies de bactérias, fungos e leveduras produzem essa enzima, e trabalhos têm sido realizados visando à seleção de linhagens que apresentam potencial para produção industrial (BATRA; SAXENA, 2005; BRADDOO et al., 1996; PINTO et al., 2001). Bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Citrobacter* e *Selenomonas* e leveduras dos gêneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Mycotorula*, *Pichia*, *Debaryomyces* já foram relatados como produtoras de tanase (AGUILAR et al., 2007). Entretanto, os fungos filamentosos são os mais citados como produtores dessa enzima, principalmente espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* como exemplo, *Aspergillus niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. rugulosus* (BRADDOO et al., 1996), *A. fumigatus*, *A. versicolor*, *A. flavus*, *A. caespitosun* (BATRA; SAXENA, 2005), *Penicillium digitatum*, *P. corylophilum*, (BRADDOO et al., 1996), *P. charlessi*, *P. variable*, *P. crustosum* e *P. restrictum* (BATRA; SAXENA, 2005). Algumas espécies pertencentes a outros gêneros também tem sido citadas como produtoras de tanase: *Trichoderma viride*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum* (BRADDOO et al., 1996), *Mucor sp.* (BELMARES et al., 2004), *Paecilomyces variotti* (BATTESTIN; MACEDO, 2007 a e b) e *Rhizopus oryzae* (HADI et al., 1994).

A primeira etapa para produção de enzimas microbianas é a seleção da linhagem (MACEDO; MATSUDA; BATTESTIN, 2005). Os micro-organismos selecionados para produzir enzimas para processamento de alimentos devem ser

listados como GRAS (*Generally recognized as safe*), ou seja, totalmente seguro para os homens e para os animais. Micro-organismos GRAS não devem ser patogênicos, tóxicos e não devem produzir antibióticos (LEKHA; LONSANE, 1997). Assim, a seleção de linhagens de interesse biotecnológico deve garantir ao consumidor um produto seguro e saudável.

2.2.2 Aplicações da tanase

Muitos trabalhos têm sido conduzidos objetivando a aplicação da tanase em escala industrial. Algumas aplicações ou métodos de produção da enzima já foram patenteados. Aguilar et al. (2007) listaram em sua revisão 25 patentes publicadas de 1974 a 2006, mostrando que as pesquisas relacionadas ao isolamento e melhoramento de linhagens, desenvolvimento de processos e aplicações da tanase, têm resultado em um grande número de publicações científicas e de patentes.

Porém, apesar de todas as aplicações da tanase, o uso prático dessa enzima é atualmente limitado devido ao alto custo, falta de conhecimento sobre suas propriedades, condições ótimas de produção e aplicação em larga escala (AGUILAR et al., 2007). Assim, mais estudos ainda são necessários a fim de se obter a produção de tanase em larga escala. A seguir são listadas as principais aplicações da tanase.

2.2.2.1 Tratamentos de sucos

Os sucos produzidos com algumas frutas podem, depois de armazenados, apresentarem escurecimento, formação de sedimentos, bem como gosto amargo e adstringência. Essas características indesejáveis devem-se à presença de altos conteúdos de taninos nessas frutas. Os processos

convencionais de tratamento de sucos de frutas são incapazes de remover de forma eficaz o sabor amargo de alguns sucos. Assim, o tratamento enzimático tem sido preferido (AGUILAR et al., 2007).

Srivastava e Kar (2009) utilizaram tanase imobilizada em esferas de alginato de sódio para remover taninos de sucos de emblica (*Phyllanthus emblica*) e observaram que a remoção máxima de taninos do suco (73,6%) foi obtida a 40°C e 150 rpm por 180 min com 36,6 U/mL de enzima imobilizada, enquanto que a enzima solúvel removeu 45,2% dos taninos a 37°C e 150 rpm no mesmo período de tempo. Um estudo comparando o tratamento de polpa do caju com tanase e com gelatina foi realizado visando reduzir a turbidez e o teor de taninos totais, hidrolisáveis e proantocianidinas. Os resultados mostraram que o tratamento com gelatina foi eficiente para remoção de proantocianidinas, enquanto que o tratamento enzimático foi eficiente na redução de taninos hidrolisáveis. Porém, o estudo comparativo de pré-viabilidade econômica mostrou que o custo de produção do suco de caju clarificado com gelatina é menor devido ao preço ainda elevado da enzima tanase (COURI et al., 2002).

2.2.2.2 Tratamentos de chás instantâneos

O chá é uma bebida bastante consumida no mundo, devido ao seu aroma, sabor e também pelos seus efeitos medicinais. A solubilidade em água fria constitui requisito fundamental para o chá instantâneo, pois são frequentemente utilizados como chás gelados. O principal problema na fabricação de chás instantâneos é o aparecimento do chamado “creme de chá”, que constitui um precipitado insolúvel em água formado pelo complexo de polifenóis (taninos) e pela interação de cafeína e proteínas com tais componentes. Esse creme ocorre naturalmente em bebidas a base de chá a 4°C ou temperaturas inferiores e pode permanecer por horas. No processo

convencional de preparação de chá instantâneo, esse creme é quimicamente eliminado, o que leva à considerável perda dos componentes do sabor. Assim, a adição de tanase em diferentes etapas do processo de manufatura, diminui a turbidez e leva ao aumento da extratibilidade de compostos fenólicos e voláteis (PINTO et al., 2005). Amostras tratadas com tanase podem apresentar redução de até 82% no teor de sólidos não dissolvidos (LEKHA; LONSANE, 1997).

2.2.2.3 Produção de ácido gálico e propilgalato

Uma das mais importantes aplicações da tanase é na produção de ácido gálico e propilgalato a partir de produtos ricos em taninos. O ácido gálico é um importante componente intermediário na síntese de drogas antibacterianas, como o Trimetoprim, usadas na indústria farmacêutica. Na indústria de alimentos, o ácido gálico é um substrato para síntese de compostos químicos que são usados como conservantes. O uso da tanase para produção de ácido gálico também encontra grande aplicação na obtenção de propilgalato, que é usado com um agente antioxidante em ácidos graxos e óleos (AGUILAR; GUTIERREZ-SACHEZ, 2001).

2.2.2.4 Preparo de ração animal

Os taninos presentes em plantas utilizadas na ração animal podem, em geral, causar efeitos adversos em sua nutrição, reduzindo o consumo, a digestibilidade proteica, inibição de enzimas digestivas ou a toxicidade direta de sistemas (BHAT et al., 1998).

O sorgo, por exemplo, geralmente usado como um complemento na alimentação animal apresenta muitas cultivares com altos conteúdos de taninos. Portanto, o tratamento com tanase pode diminuir o conteúdo de taninos e estas

cultivares podem ser utilizadas como complemento na dieta animal. Nesse caso, a tanase pode ser usada através do contato direto do extrato enzimático com o material a ser tratado, ou através do crescimento de linhagens de fungos produtores de tanase nos materiais ricos em taninos, levando a sua degradação e evitando a formação de complexos com proteínas presentes nas matérias-primas (AGUILAR; GUTIERREZ-SACHEZ, 2001).

2.2.2.5 Fabricação de vinhos

Cerca de 50% da coloração de vinhos se deve à presença de taninos, porém, a oxidação desses componentes, que ocorre em contato com o ar formando quinonas, pode causar a turbidez indesejável e conseqüentemente a perda da qualidade do produto final. Assim, a aplicação de tanase nos resíduos do tratamento de uva favorece a remoção de compostos fenólicos, evitando o aparecimento da turbidez e estabilizando a qualidade dos vinhos (BATTESTIN et al., 2004).

2.2.2.6 Tratamento de efluentes de curtume

A tanase também pode ser utilizada no tratamento de resíduos industriais com alta concentração de taninos. O curtimento do couro que utiliza os taninos contidos em extratos vegetais é geralmente utilizado para produção de solas e de alguns tipos especiais de couro, bem como em combinação com os outros tipos de curtimento. Devido ao seu alto custo, os taninos são utilizados ao máximo possível, sendo reciclados para o lote seguinte, e em seguida descartados nos efluentes (ambientes aquáticos naturais que se tornaram residuários) (PACHECO, 2005). Assim, os efluentes resultantes do

processamento de couro contém altas quantidades de polifenóis, principalmente taninos, que constituem perigosos poluentes (BATTESTIN et al., 2004).

Sendo o Brasil detentor de um dos maiores rebanhos de bovinos do mundo e também por ocupar posição de destaque na produção mundial de couros, a utilização da tanase pode constituir um tratamento efetivo e de baixo custo para decompor os taninos presentes nesses tipos de efluentes, reduzindo os riscos desses poluentes nos ambientes aquáticos (PACHECO, 2005; PINTO et al., 2005).

2.2.3 Produção de tanase através da fermentação microbiana

Como mencionado anteriormente, os micro-organismos constituem a principal fonte de enzimas industriais. Esses podem ser cultivados em grandes quantidades e por um pequeno período de tempo utilizando sistemas de fermentação (KAR; BANERJEE, 2000). Dependendo da linhagem e das condições de cultivo a enzima é expressa com diferentes níveis de atividade, mostrando diferentes padrões de produção (AGUILAR et al., 2007).

Há dois tipos principais de fermentação que geralmente são usados para produção comercial de enzimas. Estes são a fermentação submersa e a fermentação em estado sólido. Estudos utilizando diferentes linhagens de micro-organismos em processo fermentativos têm sido conduzidos para produção de tanase (BANERJEE; MONDAL; PATI, 2007; BATTESTIN; MACEDO, 2007b; MANJIT et al., 2008; RODRIGUES et al., 2007; SABU et al., 2005). Além disso, a produção da enzima tem sido comparada nos diferentes tipos de fermentação e os resultados mostram alta produção de tanase em fermentação submersa e em fermentação em estado sólido, mas destacam a última como uma alternativa viável para produção da enzima, pois entre outras vantagens, é um

processo barato e com alto rendimento enzimático (KAR; BANERJEE, 2000; LEKHA; LONSANE, 1994; RANA; BHAT, 2005).

A adição de fontes de carbono como glicose, frutose, sacarose, maltose e arabinose, fontes de nitrogênio e outros requerimentos nutricionais tem sido avaliados nos processos de fermentação visando um aumento na produção da enzima (AGUILAR; GUTIERREZ-SACHEZ, 2001; BATTESTIN e MACEDO, 2007a; RODRIGUES et al., 2008; SABU et al., 2005). Manjit et al. relataram que a adição de 0,2% de glicose, como fonte de carbono e 0,2% de sulfato de amônio, como fonte de nitrogênio, levou a um aumento na produção da enzima. Kumar, Sharma e Singh (2007) relataram que a adição de 0,2% de sacarose e 0,2% de sulfato de amônio, levou a um decréscimo na produção de tanase e justificaram que esse efeito negativo provavelmente ocorreu porque o substrato utilizado na fermentação (folhas de jambolão) já é rico o suficiente para suprir os requerimentos do fungo e produção de tanase. Assim, o efeito da adição de fontes de carbono e nitrogênio na produção de tanase depende da espécie de fungo e das outras variáveis envolvidas na fermentação (AGUILAR; GUTIERREZ-SACHEZ, 2001; RODRIGUES; PINTO; GONÇALVES, 2008).

2.2.3.1 Fermentação em Superfície Líquida (FSL)

Na fermentação em superfície líquida, o micro-organismo auxiliado por um recipiente adequado, se desenvolve na superfície de um meio líquido contendo todos os nutrientes necessários ao seu crescimento (LEKHA; LONSANE, 1997). Trabalhos relatam que a atuação da tanase nesse tipo de fermentação é intracelular e o tempo de fermentação é maior quando comparado com os outros processos fermentativos (LEKHA; LONSANE, 1994; RANA; BHAT, 2005).

Em seus experimentos, Rana e Bhat (2005) obtiveram baixa biomassa e produção de tanase de *Asperigillus niger* van Tieghem MTCC 2425, em FSL. Esses autores concluíram que esses resultados se devem provavelmente a natureza estática desse tipo de fermentação, sem muita aeração. Isso levaria a um lento crescimento micelial e assim a indução da enzima precisaria de um longo tempo de fermentação.

Algumas desvantagens apontadas no uso da fermentação em superfície líquida para produção de metabólitos microbianos seriam altos custos de manutenção, risco de contaminação e as dificuldades envolvidas na aplicação de métodos modernos de parâmetros de controle do processo (LEKHA; LONSANE, 1997).

2.2.3.2 Fermentação Submersa (FSm)

Na fermentação submersa o crescimento do micro-organismo ocorre como uma suspensão em meio líquido, no qual vários nutrientes são dissolvidos. A produção de tanase tem sido estudada nesse tipo de fermentação e protocolos baseados neste sistema já foram patenteados (LEKHA; LONSANE, 1997). A FSm é geralmente usada para produção de enzimas microbianas, principalmente porque o controle dos parâmetros do processo e o controle da esterilização são mais fáceis nesse sistema. Porém, essa técnica é mais dispendiosa, consumindo maior energia, o que eleva o custo da produção dessa enzima (BANERJEE; MONDAL; PATI, 2007).

A localização da tanase na FSm depende do tempo de cultivo. Lekha e Lonsane (1994) relataram que no início do processo, a enzima produzida por *Aspergillus niger* PKL 104, permanece principalmente no meio intracelular e posteriormente é secretada para o meio de cultura. Contudo, acima de 80% da

tanase permanece ligada ao micélio quando o máximo de sua produção é atingido (AGUILAR et al., 2007).

2.2.3.3 Fermentação em estado sólido (FES)

A fermentação em estado sólido é definida com um processo no qual o micro-organismo cresce em materiais sólidos na presença de pouca ou nenhuma água livre. Na FES, a umidade necessária para o crescimento microbiano geralmente se encontra em um estado absorvido ou complexado com a matriz sólida (KRISHNA, 2005). Dois tipos de substratos podem ser empregados nesse processo: um servindo apenas como suporte para seu crescimento e outro que será utilizado pelo microrganismo como fonte de carbono e energia (SABU et al., 2005). No entanto, no último caso, alguns nutrientes presentes nos substratos podem se encontrar em baixas concentrações, sendo necessária a suplementação do meio.

Algumas vantagens podem ser citadas para a FES em relação aos outros tipos de fermentação, como a utilização de resíduos agroindustriais, que constituem matérias-primas de baixo custo, simples e facilmente acessíveis, menor gasto de energia, menor quantidade de água utilizada e conseqüentemente menor saída de água para o esgoto, menor espaço de fermentação, menor possibilidade de contaminação (devido à menor atividade de água), geralmente os meios de fermentação são mais simples (KRISHNA, 2005) e a atividade enzimática é usualmente maior (LEKHA; LONSANE, 1997). Outra vantagem da FES é a natureza extracelular da enzima produzida, que pode ser facilmente extraída pela mistura de água ou tampão com a massa fermentada, que depois de filtrada, constitui o extrato enzimático. Em outros tipos de fermentação a enzima é principalmente intracelular e o procedimento de recuperação da mesma é mais onerosa, isso porque requer etapas como lise das células para liberar a enzima e

posterior separação dos restos celulares, além da realização de todos os procedimentos em menores temperaturas para evitar a desnaturação enzimática. Porém, mesmo sob as melhores condições, uma perda mínima de 15-20% da enzima ocorre devido a sua desnaturação (AGUILAR et al., 2007). Além disso, as enzimas intracelulares são geralmente menos estáveis e mais sensíveis aos fatores ambientais do que as enzimas extracelulares (LEKHA; LONSANE, 1994). As enzimas produzidas em FES exibem atividade em maiores intervalos de pH e são mais termoestáveis que a mesma enzima produzida em FSm (RANA; BHAT, 2005).

Lekha e Lonsane (1994) comparando a produção de tanase por *Aspergillus niger* PKL 104 nos três tipos de fermentação observaram que na FES a quantidade de tanase extracelular foi 2,5 e 4,8 vezes maior do que em FSm e FSL, respectivamente. Além disso, o tempo de fermentação em FES foi menor e a enzima extracelular foi mais estável a uma ampla faixa de pH (2 – 8) e à temperatura de 60°C.

Apesar das vantagens da FES, esse processo também apresenta algumas desvantagens, como dificuldade na agitação do substrato, resultando em um ambiente heterogêneo, dificuldade no controle da fermentação, principalmente do acúmulo de calor, controle da umidade do substrato, controle da aeração, dificuldade na determinação do crescimento microbiano e de outros parâmetros fermentativos (KRISHNA, 2005).

Entre os micro-organismos, os fungos filamentosos são ideais e os melhores adaptados para a FES. O crescimento filamentoso e a boa tolerância a condições de baixa atividade de água e alta pressão osmótica conferem aos fungos vantagens sobre os micro-organismos unicelulares na colonização de substratos sólidos e utilização adequada dos nutrientes disponíveis (MANJIT et al., 2008). Kita (1917) foi o primeiro autor a relatar a produção de tanase por *Aspergillus oryzae* em FES (LEKHA; LONSANE, 1997). Desde então várias

espécies de fungos têm sido estudadas para produção de tanase por esse tipo de fermentação como *Aspergillus niger* (AGUILAR; GUTIERREZ-SACHEZ, 2001; LEKHA; LONSANE, 1994; SABU et al., 2005; TREVIÑO-CUETO et al., 2007), *Aspergillus foetidus*, *Rhizopus oryzae* (MUKHERJEE; BANERJEE, 2006), *Aspergillus aculeatus* (BANERJEE; MONDAL; PATI, 2007), *Aspergillus ruber* (KUMAR; SHARMA; SINGH, 2007), *Aspergillus fumigatus* MA (MANJIT et al., 2008), *Aspergillus oryzae* (RODRIGUES et al., 2007; RODRIGUES; PINTO; GONÇALVES, 2008).

Atualmente, há um crescente interesse na fermentação sólida para a produção de compostos de importância comercial devido à demanda por insumos de menor custo. Assim, a utilização de resíduos provenientes de indústrias processadoras de frutas e grãos pode consistir uma alternativa para promover a redução dos custos de produção de tanase e reduzir a poluição que esses resíduos podem causar no ambiente (MACEDO; MATSUDA; BATTESTIN, 2005).

Para realização da FES muitos substratos já foram utilizados para produção de tanase como o farelo de trigo (BANERJEE; MONDAL; PATI, 2007), bagaço de cana (LEKHA; LONSANE, 1994), pó de sementes de tamarindo e torta do cerne de palmito (SABU et al., 2005), folhas de emblica (*Phyllanthus emblica*), folhas de jujuba das ilhas (*Zyzyphus mauritiana*), folhas de jambo (*Syzygium* sp.) e folhas de espinho-preto (*Acacia nilótica*) (KUMAR; SHARMA; SINGH, 2007), casca de café (MACEDO; MATSUDA; BATTESTIN, 2005), espuma de poliuretano (RANA; BHAT, 2005), bagaço de caju (RODRIGUES et al., 2007), casca de arroz (PARANTHAMAN et al., 2009), folhas de jambolão (*Syzygium cumini*) (MANJIT et al., 2008) entre outros.

A folha do jambolão (*Syzygium cumini*), já se mostrou um bom substrato para produção de tanase por *Aspergillus ruber* e *A. fumigatus* em FES

(KUMAR; SHARMA; SINGH, 2007; MANJIT et al., 2008). Essa constitui uma planta da família Myrtaceae, também conhecida, popularmente, como jamelão, cereja, jalão, kambol, jambu, jambul, azeitona-do-nordeste, ameixa-roxa, azeitona, murta, baga-de-freira, guapê, jambuí e azeitona-da-terra, dentre outros nomes (VIZZOTO; PEREIRA, 2008). Tem como sinonímia *Eugenia jambolana* (Lam.), *Myrtus cumini* L., *Syzygium jambolanum* (Lam.) DC e *Eugenia cumini* Druce (LOGUERCIO et al., 2007). O jambolão é originário da Indonésia, Índia, China e das Antilhas, no entanto, é cultivado em vários países. Essa planta é encontrada em grande parte do Brasil, principalmente nos estados de MG, RJ, RS e SP (MAZZANTI et al., 2003; VIZZOTO; PEREIRA, 2008). O jambolão é uma árvore de grande porte, podendo alcançar vários metros de altura e seus frutos, que são do tipo baga, se assemelham bastante às azeitonas (Figura 4) (MARTINS et al., 2002). Sua coloração, inicialmente branca, torna-se vermelha e posteriormente preta, quando maduras. Sua semente fica envolvida por uma polpa carnosa e comestível, doce, mas adstringente, sendo agradável ao paladar (CAVALCANTI, 2011). No Brasil, o fruto é geralmente consumido *in natura*, porém na Índia esta fruta é geralmente processada na forma de compotas, licores, vinhos, vinagre, geleias, geleiadas, tortas e doces, entre outras (VIZZOTO; PEREIRA, 2008).

O jambolão é largamente utilizado na medicina popular por demonstrar efeitos benéficos à saúde, agindo como antioxidante, diurético, anti-hipertensivo e pelo seu efeito principalmente sobre a glicemia, em casos de Diabetes melitus (MAZZANTI et al., 2003). As folhas são ricas em taninos e saponinas. Tanto a casca como as folhas e as sementes são bastante adstringentes. Assim como as outras partes da planta do jambolão, as folhas possuem substâncias com ação antidiabética, exercendo função hipoglicemiante, mimetizando as ações da insulina, regulando os níveis glicêmicos e influenciando no metabolismo e estoque de glicogênio hepático. Estudos demonstram, ainda, a ação antiviral e

anticarcinogênica (ONG; KHOO, 2000), anti-inflamatória (BRAGA et al., 2007), antibacteriana (OLIVEIRA et al., 2007) e antialérgica de extratos das folhas do jambolão, provavelmente, devido à presença de taninos hidrolizáveis e flavonoides (BRITO et al., 2007).



Figura 4 Jambolão (*Syzygium cumini*)

Fonte: Vizzoto e Pereira (2008)

As informações referentes ao plantio e manejo da planta são vagas, da mesma forma que as informações relativas ao manejo pós-colheita e processamento. A Embrapa Clima Temperado está desenvolvendo algumas ações no sentido de caracterizar as frutas de jambolão provenientes de plantas de crescimento espontâneo na região sul do Rio Grande do Sul, buscando alternativas de uso e geração de renda, principalmente, para pequenas propriedades rurais (VIZZOTTO; ROSA FETTER, 2009). Além disso, trabalhos têm sido realizados, visando à caracterização morfológica bem com a realização de estudos farmacognósticos, para utilização do *Syzygium cumini* no tratamento de doenças entre outras aplicações (ALBERTON et al., 2001; LOGUERCIO et al., 2005; SIQUEIRA-NUNES; MARTINS, 2010).

2.2.4 Otimização das condições para produção de tanase

A utilização de processos fermentativos para produção de tanase é influenciada por vários parâmetros, tais como concentração de ácido tânico, umidade, tipo de substrato ou meio de cultura utilizado, temperatura, pH, tempo de incubação, concentração do inóculo, adição de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, entre outros. Assim, trabalhos têm sido realizados visando encontrar as melhores condições para produção da enzima por uma determinada linhagem microbiana (BATTESTIN; MACEDO, 2007; KAR; BANERJEE, 2000; KUMAR; SHARMA; SINGH, 2007; MANJIT et al., 2008).

A otimização das condições para produção de enzimas pode ser feita através de procedimentos que variam cada parâmetro isoladamente (*one at a time*) mantendo as outras variáveis fixas (KUMAR; SHARMA; SINGH, 2007; MANJIT et al., 2008) ou através de delineamentos experimentais associados à análise de superfície de respostas como exemplo, delineamento fatorial fracionado (BATTESTIN; MACEDO, 2007) e delineamento composto central (ROCHA, 2010). A otimização de um processo utilizando o método *one at a time* pode ser pouco eficiente, pois não detecta o efeito das interações entre as variáveis. Assim, o melhor resultado obtido fica sempre aquém do valor otimizado. Já um procedimento onde são investigadas todas as combinações possíveis entre os fatores, tem a vantagem de explorar todo o espaço experimental, porém necessita de um grande número de experimentos, o que poderia ser muito demorado e de custo muito alto. Portanto, o planejamento experimental torna-se adequado para estudar o efeito entre as variáveis, uma vez que permite explorar todo espaço experimental através da realização de um pequeno número de ensaios (RODRIGUE; IEMMA, 2005).

Quando mais que quatro variáveis estão envolvidas e as condições otimizadas ainda estão longe de serem alcançadas, a estratégia sequencial de

delineamentos fatoriais constitui uma boa ferramenta para se atingir o objetivo desejado. Assim, primeiramente são utilizados delineamentos fatoriais fracionados ou os de Plackett & Burman para uma avaliação prévia das variáveis e para seleção daquelas que tiverem um efeito significativo sobre a resposta, e só então é realizado o delineamento composto central rotacional (DCCR) (RODRIGUE; IEMMA, 2005). A partir do DCCR, é possível elaborar um modelo matemático, que se validado estatisticamente pode ser utilizado para obtenção da superfície de resposta e localização das condições otimizadas (BATTESTIN; MACEDO, 2007).

Rocha (2010) otimizou a produção das enzimas invertase, amilase, celulase, pectinase e protease utilizando o delinemanento composto central (DCC) com três variáveis: relação de massa de resíduo de arroz/massa total (A/T), adição de umidade e concentração de inóculo (CI). O DCC mostrou-se um método eficaz, fornecendo melhores resultados A/T de 0,5, umidade de 30mL/30g de substrato e CI de 0,25 g/100 g de substrato. Battestin e Macedo (2007) otimizaram as condições para produção de tanase utilizando a metodologia de superfície de resposta encontrando a maior produção na temperatura de 29 a 34 °C, concentração de ácido tânico de 8,5 a 14%; proporção de resíduo (casca de café:farelo de trigo) de 50:50, tempo de incubação de 5 dias e suplementação do meio com nitrato de amônio.

Ainda são poucos os trabalhos que utilizam os delineamentos experimentais para otimização da produção de tanase, sendo que a maioria dos experimentos de otimização avaliam o efeito de cada variável isoladamente (KAR; BANERJEE, 2000; MANJIT et al., 2008; RODRIGUES; PINTO; GONÇALVES, 2008; SABU et al., 2005). Porém, como em processos fermentativos, cada variável pode interagir e influenciar no efeito da outras, é essencial que seja utilizado um método de otimização que permita detectar as

possíveis interações, de modo que um ponto ótimo seja escolhido, no qual se obtenha altos rendimentos da enzima (ROCHA, 2010).

Assim, o objetivo deste trabalho foi selecionar um substrato que proporcione uma maior produção de tanase por *Aspergillus* sp. em FES e otimizar as condições de cultivo nesse tipo de fermentação, utilizando delineamentos experimentais associados à metodologia de superfície de resposta.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, C. N. et al. Microbial tannases: advances and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 76, n. 1, p. 47-59, Aug. 2007.
- AGUILAR, C. N.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G. Review sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. **Food Science and Technology International**, London, v. 7, p. 373-382, 2001.
- ALBERTON, J. R. et al. Caracterização farmacognóstica do jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 11, n. 1, p. 37-50, 2001.
- ALBERTSE, E. H. **Cloning, expression and characterization of tannase from *Aspergillus* species**. South Africa: University of the Free State, 2002.
- BANERJEE, D.; MONDAL, K. C.; PATI, B. R. Tannase production by *Aspergillus aculeatus* DBF9 through solid-state fermentation. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, Budapest, v. 54, n. 2, p. 159-166, 2007.
- BATRA, A.; SAXENA, R. K. Potential tannase producers from the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. **Process Biochemistry**, London, v. 40, p. 1553-1557, 2005.
- BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A. Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by *Paecilomyces variotii*. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 10, n. 2, Apr. 2007a.
- BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, p. 1832-1837, 2007b.
- BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.15, n.1, p. 63-72, 2004.
- BELMARES, R. et al. Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, London, v. 37, p. 857-864, 2004.

BEVERINI, M.; METCHE, M. Identification, purification and physicochemical properties of tannase of *Aspergillus oryzae*. **Sciences des Aliments**, Paris, v. 10, p. 807–816, 1990.

BHAT, T. K.; SINGH, B.; SHARMA, O. P. Microbial degradation of tannins - A current perspective. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 9, p. 343–357, 1988.

BRADDOO, S.; GUPTA, R.; SAXENA, R. K. Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tannase from *Aspergillus japonicus*. **Process Biochemistry**, London, v. 32, p. 135–139, 1996.

BRAGA, F. G. et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 111, p. 396-402, 2007.

BRITO, F. A. et al. Pharmacological study of anti-allergic activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 40, p. 105-115, 2007.

CAVALCANTI, N. B. Crescimento inicial de plantas de jabolão (*Syzygium jambolanum* Lam.) em diferentes substratos. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 8, n. 4, p. 164-182, out. /dez. 2011.

COURI, S. et al. Comparação entre os tratamentos com tanase e com gelatina para clarificação do suco de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 20, n. 1, p. 41-54, jan./jun. 2002.

HADI, T. A.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYA, B. C. Optimization of tannase biosynthesis by a newly isolated *R. oryzae*. **Bioprocess Engineering**, New York, v. 11, p. 239–242, 1994.

HASLAM, E.; STANGROOM, J. E. The esterase and deposite activities of the tannase. **Biochemical Journal**, London, v. 99, p. 28–31, 1996.

HATAMOTO, O. et al. Cloning and sequencing of the gene encoding tannase and a structural study of the tannase subunit from *Aspergillus oryzae*. **Gene**, Amsterdam, v. 175, p. 215–221, 1996.

HATAMOTO, O. et al. Erratum to: 'cloning and sequencing of the gene encoding tannase and a structural study of the tannase subunit from *Aspergillus oryzae*'. **Gene**, Amsterdam, v. 186, n. 1, p. 153, 1997.

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

KRAUS, T. E. C.; DAHLGREN, R. A.; ZASOSKI, R. J. Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems – a review. **Plant and soil**, The Hague, v. 256, p. 41-66, 2003.

KRISHNA, C. Solid-State Fermentation Systems: an overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 25, p. 1-30, 2005.

KUMAR, R.; SHARMA, J.; SINGH, R. Production of tannase from *Aspergillus ruber* under solid-state fermentation using jamun (*Syzygium cumini*) leaves. **Microbiological Research**, Jena, v. 162, p. 384-390, 2007.

LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. **Process Biochemistry**, London, v. 29, p. 497–503, 1994.

LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Production and application of Tannic Acyl Hydrolase: state of the art. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 44, p. 215-260, 1997.

LOGUERCIO, A. P. et al. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 371-36, mar./abr. 2005.

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

MAHAPATRA, K. et al. Purification, characterization and some studies on secondary structure of tannase from *Aspergillus awamori nakazawa*. **Process Biochemistry**, London, v. 40, p. 3251–3254, 2005.

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.

MARTINS, L. et al. **Fruteiras nativas do Brasil e exóticas**. Campinas: Graça D'Auria, 2002. 75 p.

MAZZANTI, C. M. et al. Extrato da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 6, p. 1062-1065, nov./dez. 2003.

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

NOZELLA, E. **Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes**. 2001. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagem) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2001.

OLIVEIRA, G. F. et al. Antimicrobial activity of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) leaves extract. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 381-384, 2007.

ONG, K. C.; KHOO, H. E. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. **Life Sciences**, Amsterdam, v. 67, p. 1695-1705, 2000.

PAES, J. B. et al. Avaliação do potencial tanífero de seis espécies florestais de ocorrência no semi-árido brasileiro. **Cerne**, Lavras, v. 12, n. 3, p. 232-238, jul./set. 2006.

PACHECO, J. W. F. **Curtumes**. São Paulo: CETESB, 2005. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em: 21 dez. 2011.

PARANTHAMAN, R. et al. Biosynthesis of tannase and simultaneous determination of phenolic compounds in *Aspergillus niger* fermented paddy straw by HPLC. **Global Journal of Biotechnology Biochemistry**, Thanjavur, v. 4, n. 2, p. 93-97, 2009.

PINTO, G. A. S. et al. Selection of tannase-producing *Aspergillus niger* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, p. 24–26, 2001.

PINTO, G. A. S. et al. Tanase: conceitos, produção e aplicação. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 23, n. 2, p. 435-462, jul./dez. 2005.

RANA, N. K.; BHAT, T. K. Effect of fermentation system on the production and properties of tannase of *Aspergillus niger* van Tieghem MTCC 2425. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokio, v. 51, p. 203-212, 2005.

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. Campinas: Casa do Pão, 2005.

RODRIGUES, T. H. S. et al. Tannase production by solid state fermentation of cashew apple bagasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 5, p. 136-140, 2007.

RODRIGUES, T. H. S.; PINTO, G. A. S.; GONÇALVES, L. R. B. Effects of inoculum concentration, temperature, and carbon sources on tannase production during solid state fermentation of cashew Apple bagasse. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Dordrecht, v. 13, p. 571-576, 2008.

SABU, 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**, Essex, v. 96, p. 1223-1228, 2005.

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

SIQUEIRA-NUNES, A.; MARTINS, M. B. G. Estudo anatômico de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae). **Revista Biocências**, Taubaté, v. 16, n. 2, p. 116-122, 2010

SRIVASTAVA, A.; KAR, R. Application of immobilized tannase from *Aspergillus niger* for the removal of tannin from myrobalan juice. **Indian Journal of Microbiology**, New Delhi, p. 1-6, 2009.

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

VIZZOTTO, M.; FETTER, R. **Jambolão**: o poderoso antioxidante. 2009. Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br/imprensa/artigos/2009/jambolao_Marcia.pdf>. Acesso em: 2 fev. 2012.

VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M. C. **Caracterização das propriedades funcionais do jambolão**. Brasília: Embrapa, 2008. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 79).

CAPÍTULO 2

Optimization of Cultural Conditions for Tannase Production by *Aspergillus* Sp. under Solid-State Fermentation

ABSTRACT

The production of tannase by *Aspergillus* sp. under solid-state fermentation (SSF) was investigated using different vegetables leaves such as Mango (*Mangifera indica* L.), Jamun (*Syzygium cumini*), Coffee (*Coffea arabica* L.) and agricultural residues such as coffee husks, rice husks and wheat bran. Among different substrates used, Jamun leaves yielded high tannase production and showed high tannin content. Surface response methodology was applied to the optimization of the laboratory scale production of tannase using jamun leaves in SSF for *Aspergillus* sp. The Plackett-Burman design was conducted to evaluate the effects of variables, including temperature (°C), moisture level (tap water: substrate), tannic acid (%), glucose (%), gallic acid (%), potassium nitrate (%), yeast extract (%), ammonium sulfate (%), substrate quantity (g), inoculum concentration (spores.g⁻¹ of substrate), incubation time (days) and pH on the production of tannase. Among these variables, incubation time, potassium nitrate and tannic acid had significant effects on enzyme production. The best incubation time was studied and others variables were optimized using the Central Composite Design (2²) and surface response methodology. The best conditions for tannase production were: incubation time of 2 days; tannic acid 1.53% (w/w) and potassium nitrate 2.71% (w/w). After the optimization process, the tannase activity increased 4.65-fold.

Keywords: *Aspergillus* sp. Solid state fermentation. Tannase. Surface response methodology.

1 INTRODUCTION

Tannase or tannin acyl hydrolase (E.C.3.1.1.20) is an inducible enzyme produced by variety of microorganisms. It catalyses the breakdown of hydrolysable tannins and gallic acid esters (LEKHA; LONSANE, 1997). Production of tannase by various bacterial (MONDAL et al., 2001; OSAWA et al., 2000; NISHITANI et al., 2004) and fungal strains (BANERJEE; MONDAL; PATI, 2001; BHARDWAJ; SINGH; BHAT, 2003; MUKHERJEE; BANERJEE, 2006; SAXENA; SAXENA, 2003) have been reported.

Tannase is applied commercially in the food industry where it is used as clarifying agent in some wines, fruit juices and in the production of instantant tea (LEKHA; RAMAKRISHNA; LONSANE, 1993). In the pharmaceutical industry, it is used in the production of gallic acid, a substrate applied in the chemical or enzymatic synthesis of the propylgallate, a potent antioxidant and in the manufacture of Trimethoprim. Tannase is also used to treat tannery effluents and to reduce the non nutritional effects of tannins in animal feed (AGUILAR; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, 2001).

Studies on tannase production have been were done in liquid surface, submerged or solid-state fermentation. Solid state fermentation (SSF) is a bioprocess in which microorganisms are grown on solid substances in the absence ou near absence of free water (RODRIGUES; PINTO; GONÇALVES, 2008). Tannase production by solid-state fermentation (SSF) shows advantageous over submerged or liquid surface fermentation (AGUILAR; GUTIERREZ-SACHEZ, 2001; LEKHA; LONSANE, 1994). In the production system of such enzymes from fungal sources it is cheaper and less technology oriented. In addition, this system produces only negligible amount of liquid effluents and thereby creates less pollution (PANDEY; RADHAKRISHNAN, 1993). To fully exploit the potential of this enzyme for

various applications, it is necessary to explore the possibility of enhancing its production by using more efficient production methods. Hence, the objective of this article was the selection of substrate and optimization of the medium conditions for tannase production by *Aspergillus* sp. under SSF using experimental design associated to the response surface methodology (RSM).

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Microorganism and inoculum preparation

The strain *Aspergillus* sp. GM4 from the collection of the Bioprospecting and Fungal Genetics Laboratory of the University Federal of Lavras was used in this study. The initial inoculum of *Aspergillus* sp. was prepared from 7 day-old cultures grown at 30°C on potato dextrose agar (PDA) medium. The spores were then scraped and transferred to distilled water and counted in a Neubauer chamber until the desired concentration for each experiment.

2.2 Selection of substrates for tannase production under SSF

Leafy vegetables such as mango, jamun and coffee and agroindustrial wastes like coffee husks, rice husks and wheat bran, were examined for tannase production by *Aspergillus* sp. under SSF. The mature leaves of each substrate and agroindustrial wastes were dried at 60°C, finely powdered and used in SSF. Ten grams of each substrate were added to 250 mL Erlenmeyer conical flasks, moistened with 10 mL of mineral salt solution at pH 5.0 containing (g/L) NaNO₃, 3; KCl, 0,5; KH₂PO₄, 1; MgSO₄.7H₂O, 0,5; FeSO₄.7H₂O, 0,01. The contents were autoclaved at 121°C for 20 min, cooled to room temperature and inoculated with 10⁷ spores.g⁻¹ of substrate. The contents were incubated at 30°C for 96 h. Each substrate was investigated in duplicate and average values were reported. The Sisvar 5.3 program was used to compare the data by the Tukey test ($p \leq 0.05$). The substrate that presented higher enzyme production was selected for optimization of tannase production in solid state fermentation.

2.3 Estimation of tannin

The tannin content was estimated by using the Folin-Denis method adapted (1912).

2.4 Centesimal composition of the substrates

The moisture content was determined by drying at 105° C until constant weight (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS - AOAC, 1990). The ethereal extract, which corresponds to every fraction of the substrate soluble in ether primarily comprising fats, was determined using the continuous type Soxhlet extractor, according to AOAC (1990). The remainder of the analyzes were determined in dried and degreased samples: crude protein, amino acid polymers, were determined by total nitrogen, second method of Kjeldhal (AOAC, 1990) and multiplied by a factor 6.25 for conversion into protein. The ash (CIN), which corresponds to inorganic fraction of the substrate, was determined by burning in a muffle at 550° C for 3 hs. The crude fiber (CF) is the residue of acid digestion of the substrate and was determined by the Weende method, based on the weight difference between a funnel pore before and after receiving the sample digested in acid. And the glicidic fraction, the carbohydrate portion of substrate, was determined by difference, Glicidic fraction = 100 - (moisture + protein + ether extract + ash + fiber) (AOAC, 1990).

2.5 Effect of tap water as moisturizing agents of Jamun leaves in SSF

Tap water was evaluated as moisturizing agent of jamun leaves (selected for next experiments) to replace mineral salt solution. Ten grams of jamun leaves were added to 250 mL Erlenmeyer conical flasks, moistened with 10 mL

of tap water (pH =5.0). The contents were autoclaved at 121.5 °C for 20 min, cooled to room temperature and inoculated with 10^7 spores.g⁻¹ of substrates. The contents incubated at 30°C for 96 h.

2.6 Plackett–Burman design

For identifying the important variables for tannase production, 12 factors were evaluated using the PB experimental (PLACKETT; BURMAN, 1946) design with 16 trials. The total number of trials to be carried out according to PB is $k + 4$ where k is the number of variables. Each variable is represented at two levels, high and low which are denoted by “+” and “-”, respectively; and also by one central point denoted by “0”. Table 1 illustrates the 12 factors under investigation as well as the levels of each factor used in the experimental design. The Statistica® 5.0 program was used to analyze the PB design. The variables with confidence levels above 90% were considered as influencing tannase production significantly.

2.7 Effect of incubation time

Five grams of jamun leaves were added to 250 ml Erlenmeyer conical flasks, moistened with 5 mL of tap water (pH=4,0) and the medium was supplemented with potassium nitrate (1.2%) (highest level studied in PB design) and tanic acid (2.5%) (lowest level studied in PB design). The non-significant variables in the PB design were fixed on levels showed in Table 3. The medium was inoculated with 10^5 spores.g⁻¹ of substrate. The contents were incubated at 30°C from 12 to 72h for determination of best incubation time for tannase production.

Table 1 Range of different variables studied in the Plackett–Burman design

Variables	Levels		
	-1	0	+1
Var 1 Temperature (°C)	25	30	35
Var 2 Tap water : Substrate (v/w)	0.5:1	1:1	2:1
Var 3 pH	4.0	5.0	6.0
Var 4 Inoculum	1×10^5	1×10^6	1×10^7
Var 5 Tanic acid % (w/w)	0	2.5	5
Var 6 Glucose % (w/w)	0	2.5	5
Var 7 Potassium nitrate % (w/w)	0	0.6	1.2
Var 8 Substrate quantity (g)	2	6	10
Var 9 Incubation time (days)	2	4	6
Var 10 Gallic acid % (w/w)	0	2.5	5
Var 11 Yeast extract % (w/w)	0	0.6	1.2
Var 12 Ammonium sulfate % (w/w)	0	0.6	1.2

2.8 Central composite design (CCD), RSM experimental design and statistical analysis

Response surface methodology (RSM) was used to optimize the screened components for enhanced tannase production using the central composite design (CCD) (MONTGOMERY, 1997). The complete experimental design was done with 2^2 experiments plus four axial points and three central points to estimate the experimental error. Basically this optimization process involves three major steps: performing the statistically designed experiments, estimating the coefficients in a mathematical model, and predicting the response checking the adequacy of the model. Each factor in the design was studied at five different levels (-1.41, -1, 0, +1, +1.41). A set of 13 experiments was performed. The minimum and maximum levels of variables investigated with respect to their values in actual and coded form are listed in Table 2. Others non-significant variables in the PB design were fixed on levels shown in Table 3.

Upon completion of experiment, the tannase production was taken as the dependent variable or response (Y). The independent variables are coded for statistical calculation according to the following equation:

$$X_i = (x_i - x_0) / \Delta x_i \quad (1)$$

where X_i is the dimensionless coded value (-1.41 or 1.41) of the independent variable x_i , x_i is the real value of that independent variable, x_0 is the real value of that independent variable x_i at the center point, Δx_i is defined by $(X_{i(+1)} - X_{i(-1)})/2$. The role of each variable, their interactions, and statistical analysis to obtain predicted yields is explained by applying following quadratic equation:

$$Y = \beta_0 + \beta_i X_i + \beta_{ii} X_i^2 + \beta_j X_j + \beta_{jj} X_j^2 + \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

where Y is predicted response, β_0 is offset term, β_i is linear effect, β_{ii} is squared effect, β_{ij} is interaction effect, X_i and X_j are the levels of the independent variables. Statistical analysis of the model was performed to evaluate the analysis of variance (ANOVA). Statistical significance of the model equation was determined by Fisher's test value, and the proportion of variance explained by the model was given by the multiple coefficient of determination, R squared (R^2) value. The quadratic models were represented as contour plots (3D) and response surface curves were generated. The Statistica® 5.0 software was used in this investigation.

Table 2 Levels of variables studied in CCD

Variables	Levels				
	-1.41	-1	0	+1	1.41
Tanic acid % (w/w)	0	0.4	1.41	2.4	2.82
Potassium nitrate % (w/w)	1.19	1.6	2.6	3.6	4

Table 3 Levels of non-significant variables in the PB design and used in CCD

Variables	Levels
Temperature (°C)	30
Water:substrate (v/w)	1:1
pH	4.0
Inoculum Concentration (spores.g ⁻¹ of substrate)	10 ⁵
Substrate quantity	5g

2.9 Extraction of tannase enzyme

After incubation time, the fermented substrates were mixed properly by adding of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0) to the flasks (MANJIT et al., 2008). Then, the flasks were kept on the rotary shaker at 200 rpm.min⁻¹ for one hour. The crude enzyme was extracted by passing the extract through muslin cloth and later through Whatman No.1 filter paper. After, it was centrifuged at 10,000 g for 5 min. The filtrate was collected in test tubes and used for determination of tannase activity.

2.10 Tannase assay

Tannase activity was estimated by a modified protein precipitation method (DESCHAMPS; OTUK; LEBEAULT, 1983). The reaction mixture (1 mL) contained 250 μ L 1% tannic acid (in phosphate buffer, pH 6.0), 500 μ L of phosphate buffer (pH 6.0) and 250 μ L of the culture filtrate. The mixture was incubated at 40°C for 30 min in a water bath. The reaction was stopped by adding 1 mL 2% bovine serum albumin (BSA) solution. In the control, BSA was added to the incubation mixture prior to incubation. All tubes were left for 20 min at room temperature to precipitate residual tannins and were centrifuged at 3000 *g* for 20 min. The tannase activity in the supernatant was estimated after appropriate dilution and absorbance directly read at 260 nm (this wavelength corresponds to the optimal absorption of gallic acid) against the control (as blank) in a UV spectrophotometer. One enzyme unit is the amount of enzyme that liberates 1 μ mol gallic acid per mL per min under standard assay conditions.

2.11 Protein determination

Total soluble protein was determined by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin (BSA) as standard.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Selection of substrate for tannase production in SSF

Different agricultural wastes and leafy vegetables were studied for production of tannase by *Aspergillus* sp. in solid state fermentation (SSF). Among the different substrates used, our strain produced high yield of tannase in Jamun leaves (1.44 U.mg^{-1}) followed by Mango leaves (0.99 U.mg^{-1}) after 4 days of incubation (Table 4). There was no significant difference in the production of this enzyme between the jamun leaves and mango leaves ($p < 0.05$). These substrates showed maximum tannin content in relation to others substrates studied (Table 4). Hence, it was observed that tannase activity was related to tannin content on the substrates. These compounds may act as an inducer for tannase production (MACEDO; MATSUDA; BATTESTIN, 2005). In amla and jamun leaves it was also observed that high tannase productivity by *Aspergillus ruber* corresponds to their high tannin content (KUMAR; SHARMA; SINGH, 2007). In addition, the high enzyme activity with these substrates may be due to the presence of nutrients required by the fungus (MANJIT et al., 2008). Analyzing the centesimal composition in Table 5, we observed that the jamun and mango leaves have high levels of carbohydrates, fats and fiber compared with other substrates studied, that can facilitate growth and consequently the enzyme production by *Aspergillus* sp.

Table 4 Tannin content and tannase activity in different substrates used for SSF

Substrate	Tannin content (mg.g ⁻¹)	Tannase activity (U.mg ⁻¹)
Jamun leaves	98.58	1.44 ^a
Mango leaves	92.43	0.99 ^{a b}
Coffe husks	31.17	0.36 ^b
Coffe leaves	30.70	0.34 ^{b c}
Wheat bran	5.92	0.23 ^c
Rice husks	2.75	0.13 ^c

Values are means of duplicates and those with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

In the other substrates evaluated, the isolate showed a low enzyme production when compared with the jamun and mango leaves. However, some studies using these wastes observed high enzyme production when supplemented with tannic acid (BANERJEE; MONDAL; PATI, 2007; MACEDO; MATSUDA; BATTERSTIN, 2005; PARANTHAMAN et al., 2009). Thus, the low tannase activity observed in SSF with these substrates may be due to low tannin content that seems to be not assimilated by the metabolism of microorganisms.

Table 5 Centesimal Composition of the substrates

Substrate	Moisture (%)	Protein (%)	Fat (%)	Fiber (%)	Ash (%)	Glicidic fraction (%)
Coffe leaves	14.17	18.73	3.30	21.00	11.24	31.57
Wheat bran	13.27	16.63	1.90	12.20	4.10	51.90
Coffe husks	10.37	11.46	2.50	23.60	6.68	45.39
Rice husks	5.54	2.98	0.00	51.00	16.08	24.41
Jamun leaves	5.14	8.49	5.90	21.20	6.94	52.33
Mango leaves	4.89	8.49	4.40	30.60	10.27	41.35

SSF offers advantages over submerged fermentation for enzyme production mainly in the use of agro industrial products that are cheap and widely available (ROCHA, 2010). Thus, the search for better conditions and substrates for syntheses of tannase under SSF has been conducted in order to minimize the cost of producing this enzyme (AISSAM et al., 2005; BANERJEE; MONDAL; PATI, 2007; GUSTAVO et al., 2001; RODRIGUES et al., 2007; SABU et al., 2005). With the same objective, the optimization of culture conditions for *Aspergillus* sp. was carried out using jamun leaves as substrate in solid state fermentation.

3.2 Effect of tap water as moisturizing agent of Jamun leaves on SSF

Tap water was a better moisturing agent than the mineral salt solution (Fig. 1). Tannase production by *A. ruber* and *A. fumigatus* also was highest when tap water was used as moistening agent (KUMAR; SHARMA; SINGH, 2007; MANJITI et al., 2008). The ability of the microorganism to produce a high enzyme yield with tap water without addition of mineral salt in SSF could lead to reduction in enzyme production costs. Thus, tap water was used as moisturizing agent of Jamun leaves in optimization experiments.

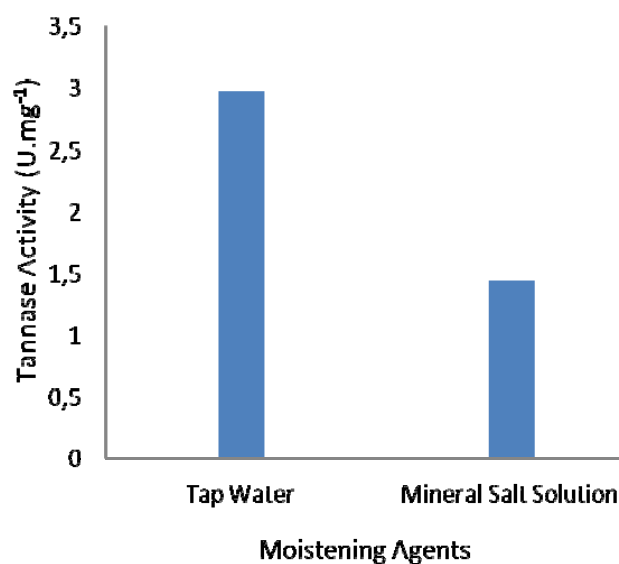


Figure 1 Effect of moistening agents on tannase activity on SSF using jamun leaves

3.3 Plackett–Burman (PB) design

With the objective of increase the tannase production, twelve variables were studied in SSF with *Aspergillus* sp. (Table 1). The first optimization step was to identify the variables having a significant effect on enzyme production. For this, PB design was then used, since this design is recommended for screening of eight or more factors (RODRIGUES; IEMMA, 2005). Table 6 represents the PB experimental design for 16 trials with two levels of each variable, three trials on central points of each variable and the corresponding tannase production in the course of the experiments. Among the variables tested, the statistically significant variables ($p < 0.1$) were tannic acid (%), potassium nitrate (%) and incubation time (days). Tannic acid (%) and incubation time (days) had negative effects on tannase production and potassium nitrate (%) had

a positive effect (Fig. 2). Therefore, significant variables were subsequently evaluated.

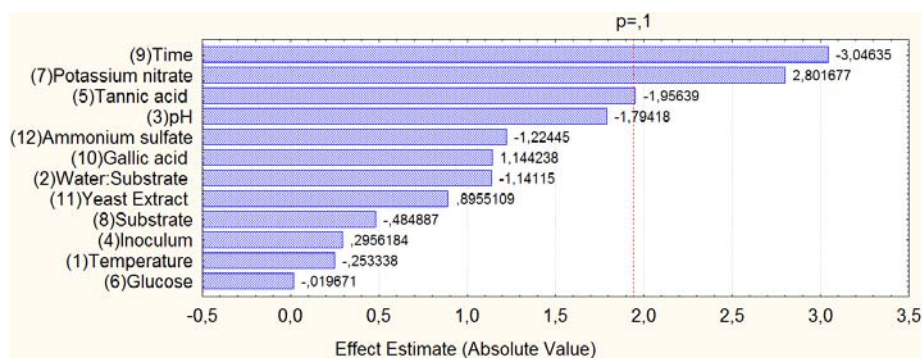


Figure 2 Pareto Chart of standardized effects of variables in PB design on tannase production by *Aspergillus* sp. ($R^2 = 0.83$)

The effects of other variables studied in PB design such as temperature ($^{\circ}\text{C}$), substrate quantity (g), pH, inoculum concentration (spores/g^{-1} of substrate), glucose (%), gallic acid (%), ammonium sulfate (%), water:substrate ratio, yeast extract (%) had not effect over tannase production ($p < 0.1$) (Fig. 2). Although the temperature is one important factor for growth and enzyme production, in this work, this factor not was significant for tannase production in the range studied. This result is not in accordance with other works in the literatue that have reported that the optimum temperature for tannase production ranges from 30°C to 35°C depending on the microorganism and substrate used during SSF (RODRIGUES; PINTO; GONÇALVES, 2008; SABU et al., 2005). The non-influence of temperature range on tannase production observed this work, may be due to tolerance of the microorganism to this temperature range. This may be advantageous, since in SSF, a common phenomenon that can be observed is generation of heat, mainly in large scale process (KAR;

BANERJEE, 2000). Thus, the tolerance of the isolate studied can be interesting for enzyme production on an industrial scale.

Table 6 Plackett–Burman design variables (in coded levels) with tannase production as response

Trial	Var 1	Var 2	Var 3	Var 4	Var 5	Var 6	Var 7	Var 8	Var 9	Var 10	Var 11	Var 12	Activity (U.mg ⁻¹)
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.801
2	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1.041
3	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1.244
4	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	3.077
5	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	6.122
6	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	0.468
7	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	8.944
8	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1.578
9	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	0.676
10	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	3.523
11	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	2.487
12	-1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	7.288
13	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	3.860
14	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1.338
15	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1.081
16	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	4.813
17(C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.593
18(C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.948
19(C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.449

In the PB design, the substrate was moistened using tap water in different ratios (v/w): 0.5:1; 1:1; 2:1. However, ratios studied this work had insignificant effect on tannase production. A mixture ratio of 1:1 and 2:1 (v/w) was found to be the best moisture level for tannase production by *A. fumigatus* and moisture ratios of 3:1, 4:1 and 5:1 to decrease tannase production (MANJIT

et al., 2008). As the fungi needs low water activity, being known to grow on water deficient substrates like bark, leaves, etc. (HOLKER; HOFER; LENZ, 2004) it can be concluded that low moisture in SSF with any ratio tested did not influenced the enzyme production and thus the 1:1 ratio was selected (v/w) for the next experiments.

The effect of pH of the moisturizing agent (tap water) from 4.0 to 6.0 was not was significant. *A. ruber* showed maximum tannase production by this strain at pH 5.5 However, there was not a wide variation on tannase production in pH from 5.0 to 7.0 (KUMAR; SHARMA; SINGH, 2007). Tannases are acidic proteins, stable in a pH range from 3.5 to 8.0 and an optimum pH around 5.5 to 6.0 (AGUILAR; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, 2001). Thus, as the pH range tested in this study was around the optimum pH of tannase, this factor did not cause any significant change in the enzyme activity. Therefore, this was fixed at the lowest level.

Although some studies report that the size of the inoculum influences in the tannase production (RODRIGUES; PINTO; GONÇALVES, 2008; SABU et al., 2005) in our work, the concentration of 10^5 to 10^7 spores/g did not significantly affect the activity of the enzyme and was fixed at the lowest level (10^5 spores/g).

The results of the PB design also showed that supplementation of the medium with two external carbon source (glucose and gallic acid) had no effect on enzyme production by *Aspergillus* sp. This result suggests that the substrate constitutes an adequate carbon source. The Jamun leaves are rich in carbohydrates (Table 5) and probably these are available for fungal metabolism and a carbon source addition was not required. Similar results were reported for *Paecilomyces variotti* using starch as carbon source on tannase production in SSF with coffee husk (BATTESTIN; MACEDO, 2007).

The addition of tannic acid in SSF had a negative and significant effect on tannase production. Although this substrate is known as a tannase inducer, a great increase in its concentration will not necessarily cause an equivalent increase in enzyme synthesis (BATTESTIN; MACEDO, 2007). In the SSF of *A. aculeatus* DBF9 the addition 5% tannic acid was suitable for tannase production and enzyme synthesis was depleted at a higher concentration than this level (BANERJEE; MONDAL; PATI, 2007). Some effects, such as toxicity and saturation level, can determine the ideal concentration (BATTESTIN; MACEDO, 2007). Actually, tannic acid at a high concentration, can produce complexes with membrane protein of the organism, thereby both growth and enzyme production may be inhibited (BANERJEE; MONDAL; PATI, 2007).

Substrate quantity (5, 10, 15g) had no effect on tannase production by *Aspergillus* sp. It offered advantages in terms of the economy of substrate used, being fixed at the lowest level (5g).

Among the nitrogen sources tested, yeast extract and ammonium sulfate had no effect on tannase activity. On the other hand, potassium nitrate had a positive and significant effect on enzyme production. It was similar to tannase production by *A. niger* ATCC 16620, since among eight nitrogen sources tested, the potassium nitrate was the most effective (SABU et al., 2005). This probably occurred due to the distinct assimilation of inorganic ions and the possibility of complex formation between tannins and proteic structures of the yeast extract (PINTO, 2003; RODRIGUES; PINTO; GONÇALVES, 2008). Therefore, these non-significant factors were removed from the experiments.

3.4 Effect of incubation time on tannase production

In PB design, incubation time (hours) had significant and negative effect on tannase production. Therefore, the best incubation time for tannase

production was investigated by dosing the enzyme activity of 12 in 12 hours until 72 hours of culture. The best time for enzyme production was two days (Fig. 3). Therefore, this incubation time was fixed for trials of central composite design. This also was observed for *Aspergillus niger* ATCC 16620 that related maximum specific activity with 48h of incubation in SSF with palm kernel cake (SABU et al., 2005).

Studies with SSF generally report maximum enzyme production with short time of fermentation as 72h (BANERJEE; MONDAL; PATI, 2007; KAR; BANERJEE, 2000), 96h (KUMAR; SHARMA; SINGH, 2007; RANA; BHAT, 2005), 120h (BATTESTIN; MACEDO, 2007). It may occur because the tannase was produced only during the primary phase of growth (SUSEELA; NANDY, 1985). In addition, the decrease in production after long incubation time may be due to accumulation of end product which hampers tannase production or may be due to accumulation of toxic metabolites secreted during fermentation (KUMAR; SHARMA; SINGH, 2007), or it may be due to metabolic regulation which is related to the release of gallic acid (KAR; BANERJEE, 2000). In the present study, an incubation period of 2 days offered advantages in terms of the overall economy of tannase production.

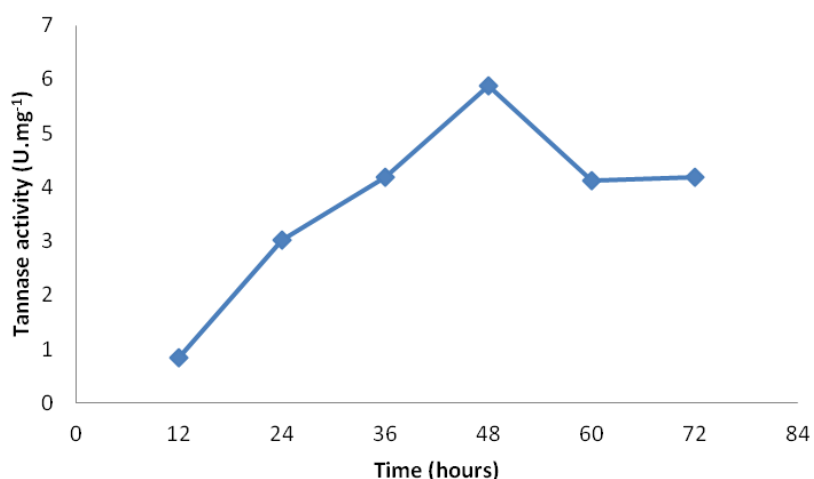


Figure 3 Effect of incubation time (hours) over tannase production in SSF using jamun leaves

3.5 Central composite design (CCD), RSM experimental design and statistical analysis

The final medium optimization and interaction amongst the selected factors was studied. The variables tannic acid (%) and potassium nitrate (%) were optimized using CCD. The levels of the factors chosen were based on the previous PB analysis. Each variable was studied at five coded levels (-1.41, -1, 0, 1, 1.41). Table 7 lists the coded and non-coded values of the variables at different levels. The design matrix of CCD is a 2^2 design combined with three central points and four axial points. The matrix for this design along with the experimental and predicted results is shown in Table 7.

Table 7 CCD matrix of two variables with experimental and predicted values of tannase production

Trials	Tannic Acid (%)	KNO₃ (%)	Tannase Activity (U.mg⁻¹)	Predicted Activity (U.mg⁻¹)
1	(-1) 0.4	(-1) 1.6	4.747	3.789
2	(+1) 2.4	(-1) 1.6	1.967	1.253
3	(-1) 0.4	(+1) 3.6	1.827	1.188
4	(+1) 2.4	(+1) 3.6	5.064	4.670
5	(-1,41) 0	(0) 2.6	1.777	2.631
6	(1,41) 2.82	(0) 2.6	2.792	3.298
7	(0) 1.41	(-1,41) 1.19	1.332	2.238
8	(0) 1.41	(1,41) 4	2.359	2.813
9 (C)	(0) 1.41	(0) 2.6	5.033	6.155
10 (C)	(0) 1.41	(0) 2.6	7.745	6.155
11 (C)	(0) 1.41	(0) 2.6	5.701	6.155

The experimental data in Table 7 were correlated as a second order polynomial model Eq. (3) by nonlinear regression. An empirical relationship between the response and the screened variables was expressed by the following fitted second-order polynomial equation:

$$Y = 6.1545 + 0.2366 X_1 - 1.60438 X_1^2 + 0.20377 X_2 - 1.826 X_2^2 + 1.5044 X_1 X_2 \quad (3)$$

where Y is the predicted response of tannase production (U.mg⁻¹), and X₁ and X₂ are the coded values of tannic acid and KNO₃, respectively.

Statistical significance of the model equation was determined by Fisher's test value, and the proportion of variance explained by the model was given by the multiple coefficient of determination (R²). Table 7 summarizes the predicted responses of CCD based on Eq. (3). This polynomial equation was

tested for adequacy by ANOVA (Table 8). The results of ANOVA showed that the F value of 4.44 was significant. The R^2 value indicated that 82.0 % of the total variation was explained by the model.

Table 8 Analysis of variance for the response of the dependent variables on tannase production

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean Squares	F test^a
Regression	5	35.5366	7.10732	4.441772
Residual	5	8.000547	1.600109	
Total	10	43.53715		

$$R^2 = 0.82$$

$${}^aF_{0.9; 5; 5} = 3.45$$

The plot of predicted values versus experimental values in Fig. 4 also shows that all the predicted values of the model are located in close proximity to the experimental values. This supports the hypothesis that the model equation, Eq. (3), is sufficient to describe the response of the experimental observations pertaining to tannase production. Thus, one response surface curve was plotted to determine the optimum concentration of each factor for maximum tannase specific activity (Fig. 5). The location of the optimum was determined to be $X_1 = 0.12$ and $X_2 = 0.11$ (coded values), obtained by Design Experts 7.0 program. The real values of the test variables were as follows: tannic acid, 1.55 % (w/w); KNO_3 , 2.71 % (w/w). The predicted maximum tannase production corresponding to these values was $6.1854 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$.

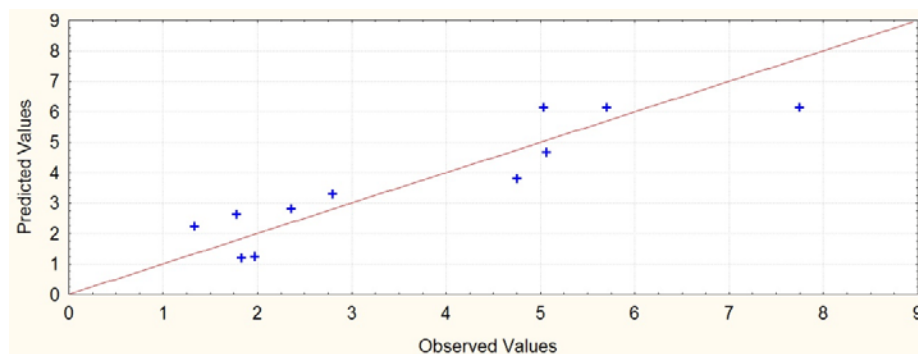


Figure 4 Comparison between the observed values and the predicted values for tannase production

The figure 5 indicated that the best addition of tannic acid is 1.53 %. The addition of tannic acid to the culture medium in SSF has been reported in others works (BATESTIN; MACEDO, 2007; LEKHA; LONSANE, 1994; RANA; BHAT, 2005; RODRIGUES; PINTO; GONÇALVES, 2008; SABU et al., 2005). Although tannic acid showed effect negative on tannase production in PB design, this compound was not removed from the medium because it induces tannase production under SSF. In SSF with pomegranate husk, the tannase production by *Aspergillus niger* increased 3.5-fold adding 1% tannic acid (SRIVASTAVA ; KAR, 2009). In our work, the supplementation with 1.53 % tannic acid yielded the highest tannase production in SSF with jamun leaves, increasing the enzyme activity 4.65-fold. This suggests that although the jamun leaves have high tannin content, it is not easily available and so the substrate supplementation with tannic acid may also increase the tannase production.

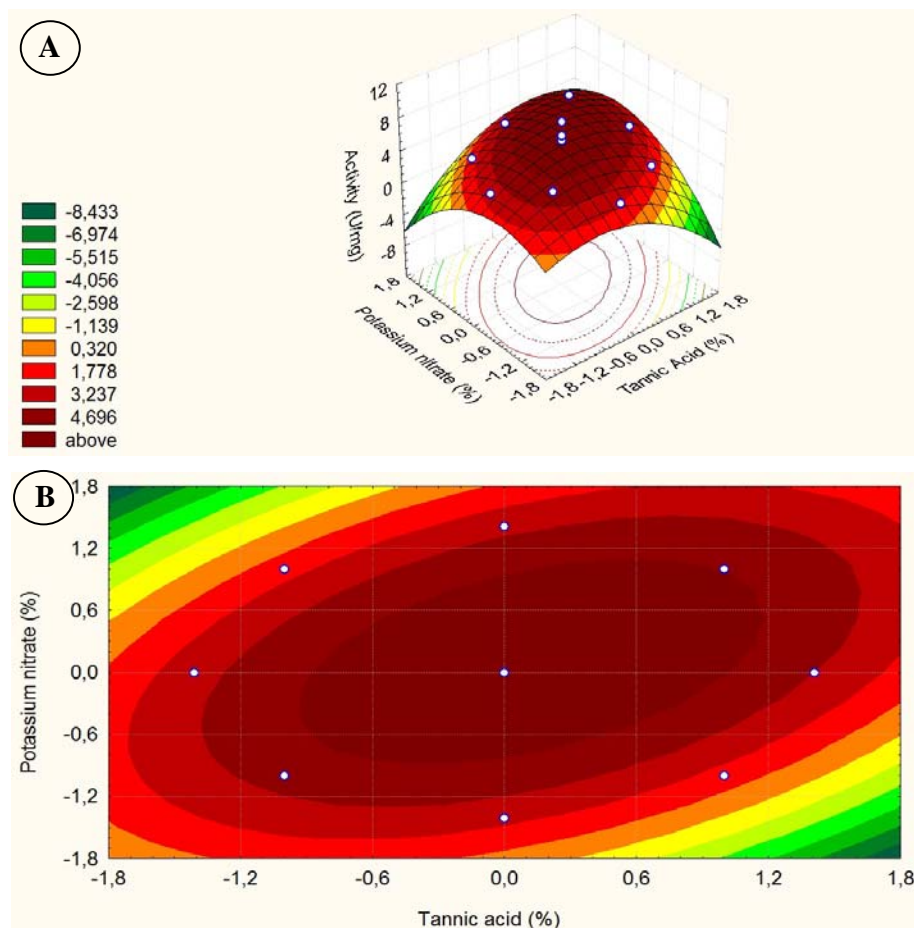


Figure 5 Response surface (A) and contour diagrams (B) for tannase activity considering tannic acid and potassium nitrate

The addition of 2.71% potassium nitrate resulted in an increase in tannase production. Probably the presence of additional nitrogen sources along with nitrogenous compounds present in the substrate increased growth and consequent enzyme production. In microorganisms, nitrogen is metabolized to produce primarily amino acids, nucleic acid, protein and cell wall components. Tannase production depends on the availability of both carbon and nitrogen

sources in the medium. Both have regulatory effects on enzyme synthesis (BATTISTIN; MACEDO, 2007).

3.6 Validation of the model

Validation of the model was carried out in 250 mL flasks containing 5g of Jamun leaves under conditions predicted by the model. The results of a random set of three experiments clearly showed that experimental values were found to be very close to the predicted values, and hence, the model was successfully validated. The predicted response for tannase production was 6.1854 U.mg^{-1} , while the experimental response was $6.6894 \pm 0.29 \text{ U.mg}^{-1}$, which was 4.65-fold higher than the non-otimized medium (1.44 U.mg^{-1} , see Table 1), thus proving the validity. The good agreement between the predicted and the experimental results verified the validity of the model, and the improvement of tannase production also indicated that RSM was a powerful tool for determining the exact optimal values of the individual factors and the maximum response value.

4 CONCLUSION

We are reporting that fungal culture *Aspergillus* sp. was able to produce high yields of tannase under SSF conditions with Jamun leaves. After the optimization process, the tannase production for *Aspergillus* sp. using this substrate increased 4.65-fold that showed that the statistical experimental design offers a practicable approach to the implementation of medium optimization. Our optimized medium for tannase production is mainly composed of a cheap and accessible substrate, an inexpensive inorganic salt and low supplementation of tannic acid, which can reduce large scale tannase production costs.

Acknowledgments: FAPEMIG, CAPES.

REFERENCES

- AGUILAR, C. N.; GUTIERREZ-SANCHEZ, G. Review: sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. **Food Science and Technology International**, London, v. 7, p. 373, 2001.
- AISSAM, H. et al. Production of tannase by *Aspergillus niger* HA37 growing on tannic acid and Olive Mill Waste Waters. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 21, p. 609-641, 2005.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of the association of the agricultural chemists**. 5th ed. Washington, 1990. 2 v.
- BANERJEE, D.; MONDAL, K. C.; PATI, B. R. Production and characterization of extracellular and intracellular tannase from newly isolated *Aspergillus aculeatus* DBF9. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 41, p. 313, 2001.
- BANERJEE, D.; MONDAL, K. C.; PATI, B. R. Tannase production by *Aspergillus aculeatus* DBF9 through solid state fermentation. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, Budapest, v. 54, n. 2, p. 159-166, 2007.
- BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A. Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by *Paecilomyces variotii*. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 10, n. 2, Apr.
- BHARDWAJ, R.; SINGH, B.; BHAT, T. K. Purification and characterization of tannin acyl hydrolase from *Aspergillus niger* MTCC2425. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 43, p. 449, 2003.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 7, n. 72, p. 248-254, 1976.
- DESCHAMPS, A. M.; OTUK, G.; LEBEAULT, J. M. Productions of tannase and degradation of chesnut tannis by bacteria. **Journal Fermentation Technology**, Osaka, v. 61, p. 55-59, 1983.
- FOLIN, O.; DENIS, J. The Journal **Biological Chemistry**, Bethesda, v. 12, p. 239-243, 1912.

GUSTAVO, A. S. P. et al. Selection of tannase-producing *Aspergillus niger* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, p. 24–26, 2001.

HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 64, p. 175–186, 2004.

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

KUMAR, R.; SHARMA, J.; SINGH, R. Production of tannase from *Aspergillus ruber* under solid-state fermentation using jamun (*Syzygium cumini*) leaves. **Microbiological Research**, Jena, v. 162, p. 384, 2007.

LEKHA, P.; RAMAKRISHNA, M.; LONSANE, B. Strategies for isolation of potent culture capable of producing tannin acyl hydrolase in higher titres. **Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel**, Nürnberg, v. 15, p. 5–10, 1993.

LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. **Process Biochemistry**, London, v. 29, p. 497–503, 1994.

LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Production and application of Tannic Acyl Hydrolase: state of the art. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 44, p. 215-260, 1997.

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

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.

MONDAL, K. C. et al. Production and characterization of tannase from *Bacillus cereus* KBR9. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokio, v. 47, p. 263, 2001.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 4th ed. New York: J. Wiley, 1997.

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

NISHITANI, Y. et al. Genotypic analysis of lactobacilli with a range of tannase activities isolated from human feces and fermented foods. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, p. 109, 2004.

OSAWA, R. et al. Isolation of tannin degrading *Lactobacillus* from humans and fermented foods. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3093, 2000.

PANDEY, A.; RADHAKRISHNAN, S. The production of glucoamylase by *Aspergillus niger* NCI M 1245. **Process Biochemistry**, London, v. 28, p. 305, 1993.

PARANTHAMAN, R. et al. Biosynthesis of tannase and simultaneous determination of phenolic compounds in *Aspergillus niger* fermented paddy straw by HPLC. **Global Journal of Biotechnology Biochemistry**, Thanjavur, v. 4, n. 2, p. 93-97, 2009.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, London, v. 33, n. 4, p. 305–325, 1946.

PINTO, G. A. S. **Produção de tanase por *Aspergillus niger***. 2003. 213 f. Tese (Doutorado em em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

RANA, N. K.; BHAT, T. K. Effect of fermentation system on the production and properties of tannase of *Aspergillus niger* van Tieghem MTCC 2425. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokio, v. 51, p. 203-212, 2005.

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. 2010. -- p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**: uma estratégia seqüencial de planejamentos. Campinas: Casa do Pão, 2005.

RODRIGUES, T. H. S. et al. Tannase production by solid state fermentation of cashew apple bagasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 5, p. 136-140, 2007.

RODRIGUES, T. H. S.; PINTO, G. A. S.; GONÇALVES, L. R. B. Effects of inoculum concentration, temperature, and carbon sources on tannase production during solid state fermentation of cashew Apple bagasse. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Dordrecht, v. 13, p. 571-576, 2008.

SABU, 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**, Essex, v. 96, p. 1223-1228, 2005.

SAXENA, S., SAXENA, R. K.: Statistical optimization of tannase production from *Penicillium variable* using fruits of Terminalia Schebula called Chebulina myrobalan. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Duluth, v. 39, p. 99, 2003.

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

SUSEELA, R. G.; NANDY, S. C. Decomposition of tannic acid and gallic acid by *Penicillium chrysogenum*. **Leather Science**, Madras, v. 32, p. 278-280, 1985.