



ISSN: 1984-3151

UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE TANASE POR *ASPERGILLUS SP* ISOLADO DO SOLO DA CAATINGA DE PERNAMBUCO, BRASIL

UTILIZATION AGRO-INDUSTRIAL RESIDUES FOR TANNASE PRODUCTION BY *ASPERGILLUS SP* ISOLATED FROM SOIL PERNAMBUCO CAATINGA, BRAZIL

Katarina Botelho de Melo Nascimento¹, Alex Gabriel Rodrigues Martins², Galba Maria de Campos Takaki³, Carlos Alberto Alves da Silva⁴, Kaoru Okada⁵

- 1 Mestranda em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco katarinabotelho@gmail.com
- 2 Iniciação Científica PIBIC-CNPq. Aluno de Engenharia Ambiental, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco. alexgabrielrm@hotmail.com
- 3 Doutora em Microbiologia Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco. takaki@unicap.br
- 4 Doutor em Biotecnologia. Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco. calves@unicap.br
- 5 Doutora em Medicina. Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco. kao@unicap.br

Recebido em: 27/11/2013 - Aprovado em: 30/04/2014 - Disponibilizado em: 31/05/2014

RESUMO: As enzimas de origem microbiana apresentam características peculiares, que favorecem seu emprego em diversos processos biotecnológicos existentes, sendo relevantes as vantagens de conversões enzimáticas em diferentes processos industriais e ambientais. A sua produção, na maioria das vezes, ainda é economicamente dispendiosa, assim há necessidade de selecionar novos microrganismos com elevado potencial na produção de substâncias de alto valor agregado. A Caatinga é uma região pouco explorada biotecnologicamente, possuindo uma imensa população microbiana. Os rejeitos agroindustriais, principalmente os da indústria de alimentos, muitas vezes são descartados de maneira incorreta no meio ambiente e apresentam um elevado poder nutricional que poderia ser aproveitado na formulação de meios para produção de enzimas. A tanase é uma glicoproteína esterase formada predominantemente por um ácido gálico esterase e uma depsidase, além de possuir inúmeras aplicações biotecnológicas. Foram realizados estudos para seleção de 14 amostras de *Aspergillus* isoladas do solo da Caatinga de Pernambuco, para produção de tanase em meios alternativos contendo resíduos agroindustriais oriundos da indústria de sucos e bebidas (cascas de café, tangerina e uva). As fermentações submersas ocorreram a 30°C, 150 rpm, 120 horas. Os resultados obtidos indicaram que a amostra SIS 04 apresentou o maior halo de produção de tanase (2,0 cm) e uma atividade enzimática de 4,0 µmol/mim. mL de enzima, valor superior ao obtido no meio controle. A utilização de rejeitos agroindustriais para a elaboração de meios econômicos para a obtenção de bioprodutos de alto valor agregado surge como uma alternativa viável na produção de metabólicos com alto potencial biotecnológico.

PALAVRAS-CHAVE: Produção enzimática. Resíduos agroindustriais. *Aspergillus*.

ABSTRACT: The microbial enzymes have characteristics that favor their use in various biotechnological processes. The Caatinga is a region little explored biotechnologically processing an immense microbial population. The agro-industrial wastes, especially the food industry are often improperly discarded in the environment and have a high nutritional power that could be used in formulating means for producing enzymes. The tannase is a glycoprotein esterase formed predominantly by a gallic acid esterase and a depsidase, has numerous biotechnological applications. Studies were conducted to select 14 samples *Aspergillus* isolated from the soil from Caatinga of Pernambuco, to produce tannase in alternative agro-industrial residues containing from industry of juices and beverages (coffee, tangerine and grapefruit peels). The submerged fermentation occurred at 30°C, 150 rpm, 120 hours. The results indicated that the sample had the highest SIS 04 halo production of tannase (2.0 cm) and enzyme activity of 4.0 mmol / min. mL enzyme, higher than that obtained in the control medium. The use of agro-industrial wastes for the production of economic media to obtain value-added bioproducts emerges as a viable alternative in the production of metabolic with high biotechnological potential.

KEYWORDS: Enzyme production. Agro-industrial residues. *Aspergillus*.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de diversos gêneros microbianos para produção de inúmeros compostos bioativos tem aumentado nas últimas décadas devido à grande eficiência que esses organismos apresentam na produção de metabólitos secundários, principalmente as enzimas microbianas (DEMAIN, 1998; DEMAIN, 2000; BULL; WARD; GOODFELLOW, 2000; DEMAIN, 2007; DEMAIN; ADRIO, 2008; HANEFELD; CAO; MAGNER, 2013).

Nas últimas décadas, um grande número de microrganismos não patogênicos, capazes de produzir enzimas, tem sido pesquisado nos diversos ramos industriais. Os fungos filamentosos são microrganismos que se destacam devido à sua grande facilidade de cultivo, por secretarem suas enzimas diretamente no meio de produção, não sendo necessária, assim, a ruptura celular para sua liberação. Adicionalmente, apresentam elevados níveis de produção enzimática, com elevado potencial para inúmeras aplicações industriais (OGAWA, SHIMIZU, 1999; SCHUEGERL, 2000; POLIZELI *et al.*, 2005, STROPARO *et al.*, 2012).

O gênero *Aspergillus* se destaca como um excelente produtor de metabólitos secundários de interesse industrial e ambiental (BERKA, DUNN-COLEMAN, WARD, 1992; WARD *et al.*, 2005; LOTFY; GHANEM; EL-HELOW, 2007; MATA-GOMEZ *et al.*, 2009;

DHILLON *et al.*, 2012; GOSWAMI *et al.*, 2012; CHAVAN; DESHPANDE, 2013; PATRO *et al.*, 2014; SHIVANNA, VENKATESWARAN, 2014).

Tanino acil hidrolase (TAH), conhecida como tanase (EC 3.1.1.20), faz parte de um dos maiores grupos de enzimas industriais descritas nas últimas décadas na literatura (EL-TANASH; SHERIEF; NOUR, 2012), pois hidrolisa ésteres e apresenta ligações laterais de taninos hidrolisáveis, produzindo, assim, glicose e ácido gálico. A tanase é uma enzima extracelular, produzida na presença de ácido tânico por fungos filamentosos, bactérias e leveduras (BATTESTIN, MATSUDA, MACEDO, 2004; BATTESTIN, MACEDO, 2007; BATRA, SAXENA, 2005; PARANTHAMAN *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2014).

Quimicamente a tanase é uma glicoproteína esterase formada principalmente por moléculas de ácido gálico, esterase e depsidase. Pode ser separada em duas esterases, em que uma esterase é considerada específica para ésteres alifáticos, como metil galato, e a outra, uma depsidase que hidrolisa ligações depsídicas, como o ácido m-digálico. (BHAT; SINGH; SHARMA, 1998; AGUILAR *et al.*, 2007, BELUR; MUGERAYA, 2011).

As tanases produzidas por fungos filamentosos e leveduras apresentam, na sua maioria, estruturas proteicas com elevada massa molecular. Essas

enzimas são produzidas na presença de um indutor, que normalmente é o ácido tânico. O ácido pode estar também na composição do meio de produção da enzima, a única fonte de carbono. E mesmo na presença de outro componente nutricional, a concentração do ácido tânico é indispensável para a produção da tanase. Alguns estudos realizados mostram que a presença de íons de ferro, de zinco e de cobre, também, é considerada essencial para a produção da enzima (PINTO *et al.*, 2005, HAMDY; FAWZY, 2012; GEORGE; ONG, 2013).

Por estar envolvida na biodegradação do tanino, a tanase possui inúmeras aplicações em vários setores industriais, como indústrias de alimentos, sucos, cervejaria, cosméticos, farmacêutica e química, entretanto seu alto custo de produção impede sua ampla utilização em outros setores industriais. Por isso, atualmente sua utilização está restrita à produção de ácido gálico, chás instantâneos, estabilização da cor do vinho, refrigerantes à base de café, processos de tratamentos de couro, detanificação de alimentos e em tratamentos de efluentes na indústria de couros (BATTESTIN *et al.*, 2004; MACEDO; MATSUDA; BATTESTIN, 2005, CHÁVEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2012, PRASAD *et al.*, 2012; YAO *et al.*, 2014).

Os resíduos agroindustriais oriundos de diversos produtos das indústrias alimentícias de sucos e outros derivados têm sido bastante utilizados na elaboração de meios de produção considerados alternativos, pois são uma alternativa viável, e a maioria desses resíduos apresenta um elevado valor nutricional, que pode ser assimilado por diversos microrganismos produtores de metabólitos de alto valor agregado, reduzindo, assim, os custos de produção de inúmeros compostos de alto valor agregado (NOVAKI *et al.*, 2010; MURUGAN *et al.*, 2011; STROPARO *et al.*, 2012).

Este trabalho teve por objetivo selecionar amostras de *Aspergillus* ssp isoladas do solo da Caatinga dos municípios de São José do Bel Monte e de Serra Talhada, do estado de Pernambuco, produtoras de tanase, e analisar a produção da enzima por fermentação submersa através da formulação de meios alternativos contendo resíduos agroindustriais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas 14 amostras de *Aspergillus* ssp, isoladas de solo, coletadas nas cidades de José do Bel Monte e de Serra Talhada, região da Caatinga, Pernambuco, catalogadas no Banco de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco – Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB). As culturas foram mantidas em Meio Batata Dextrose Agar (BDA) a 4°C e aclimatadas em meio BDA suplementado com ácido tânico (0,2%), durante 72 horas, a 28°C.

2.2 MEIOS DE DETECÇÃO E PRODUÇÃO DE TANASE

Foram utilizados os seguintes meios de detecção e produção, segundo a metodologia descrita por Lekha e Lonsane (1997): Meio de detecção - meio BDA suplementado com ácido tânico (10 g/L), pH 5,7; meio de produção - solução de sais (g/L): KH₂PO₄, 1,0; NH₄NO₃, 2,0; MgSO₄.7H₂O, 0,2; CaCl₂.2H₂O, 0,02; MnCl₂.4H₂O, 0,004; Na₂MoO₄.2H₂O, 0,002; FeSO₄.7H₂O, 0,0025, ácido tânico, 10 (g/L).

2.3 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Foram utilizados para formulação dos meios alternativos resíduos de cascas de café, tangerina e uva, previamente tratados, lavados com água

destilada e secos em estufa a 40°C, no período de 48 a 72 horas. Em seguida o material foi triturado e peneirado para se obter uma consistência mais homogênea, facilitando, assim, a sua dissolução no meio de produção.

2.4 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS PRODUTORAS DE TANASE EM MEIO SÓLIDO

Para detecção da presença da enzima tanase em meio sólido, foi utilizada a metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis (1975). Foram preparadas placas contendo o meio de detecção, e a seguir inoculados discos de aproximadamente 0,8 cm das amostras de *Aspergillus* ssp no centro placas de Petri contendo o meio de detecção.

As placas foram mantidas em estufa a 28°C, durante 72 horas, sendo acompanhadas diariamente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A formação de halo característico ao redor do crescimento da colônia evidenciava a produção de tanase, que correspondia à degradação do ácido tânico pelo microrganismo testado.

2.5 PRODUÇÃO DA TANASE

Após a seleção da melhor amostra de *Aspergillus* ssp, produtora de tanase isolada do solo da Caatinga, foram iniciados os testes de produção da enzima por fermentação submersa, utilizando o meio de produção, denominado de controle, e os meios alternativos contendo os resíduos agroindustriais.

Para a produção de tanase, foram inoculados 5×10^7 esporos/mL nos meios controle e alternativos, a 30°C, 150 rpm, por 120 horas, em frascos de Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio. Aos meios alternativos foram adicionados 10 g dos resíduos agroindustriais (cascas de café, tangerina e uva).

Foram coletadas amostras a cada 24 horas do processo fermentativo em triplicata.

Ao término do processo, todas as amostras coletadas foram filtradas, centrifugadas a 12.300g, durante 30 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes obtidos corresponderam aos extratos enzimáticos, segundo a metodologia de Lekha e Lonsane (1997).

2.6 DETECÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para avaliação da atividade enzimática da tanase, utilizou-se a metodologia descrita por Mondal *et al.* (2001). Foi preparada uma solução contendo 0,5 % (p/v) de ácido tânico em tampão acetato 0,2 M (pH 5,5) para detecção da enzima através de uma reação enzimática. A reação foi realizada a partir da adição de 0,3 mL da solução de substrato e de 0,5 mL de extrato enzimático bruto previamente obtido. A solução obtida foi incubada a 60°C, durante 10 minutos.

Após o período de incubação, a reação foi paralisada através da adição de 3 mL de uma solução de albumina de soro bovino (BSA), na concentração de 1 mg/mL e 0,17 M de cloreto de sódio em tampão acetato 0,2 M (pH 5,0). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.300 g, durante 15 minutos, a 4°C. Os precipitados obtidos foram ressuspensos em 3 mL de solução SDS-Trietanolamina [SDS 1% (p/v), adicionando 5% (v/v) de Trietanolamina em água destilada], acrescido 1 mL de solução de FeCl₃ [0,01 M de FeCl₃ em 0,01 M de ácido clorídrico].

A leitura foi realizada após 15 minutos de repouso do término da reação, em espectrofotômetro Biochrom S21, a um comprimento de onda de 530 nm. A absorbância final foi calculada pela equação (1):

$$Abs = Abs_{controle} - Abs_{teste} \text{ (equação 1)}$$

A atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de ácido tânico por minuto de reação nas condições avaliadas.

2.7 CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO TÂNICO

Foi realizada uma curva de calibração de ácido tânico para a detecção da atividade enzimática no processo fermentativo, através da preparação de uma solução padrão de ácido tânico: 0,1 g de ácido tânico diluído em 100 mL de água destilada (Solução A). Foram retirados 10 mL da solução A para um balão de 100 mL, completando o volume com água destilada (Solução B). Aliquotas da solução B de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 mL foram transferidas para balões de 100 mL contendo 75 mL de água destilada.

Posteriormente, foram adicionados 5 mL do reagente Folin-Denis e 10 mL da solução de carbonato de sódio, diluídos em 100 mL com água destilada. Após homogeneização as amostras permaneceram em repouso por 30 minutos, em seguida filtradas e determinadas às absorvâncias a 760 nm utilizadas para obtenção da curva padrão do ácido tânico (equação 2). O aparecimento da coloração azul marinho intenso é proporcional à concentração de tanino.

$$Y = 0,027 \cdot X + 0,085 \quad r^2 = 0,998 \quad (\text{equação 2})$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados testes de detecção em meio sólido da enzima tanase em 14 amostras de *Aspergillus* ssp, isoladas de amostras de solo, coletadas em diversos pontos da Caatinga de Pernambuco, na cidade de Serra Talhada e São Jose do Bel Monte (Tabela 1).

Os resultados obtidos nos ensaios de seleção de amostras produtoras de tanase evidenciaram que a amostra SIS 04 apresentou o maior halo característico de degradação do ácido tânico, cujo valor foi de 2,0

cm. Verificou-se também a ausência de atividade enzimática nas amostras SIS 07, 08, 10, 11, 17 e 18, representando um percentual de 43% de amostras testadas não produtoras de tanase.

Jana *et al.* (2012) fizeram uma seleção de diversos microrganismos isolados de ambientes diversos para produção de tanase e obtiveram resultados satisfatórios para a maioria dos organismos testados, pois a maior parte deles apresentaram a formação do halo característico, devido à degradação do ácido tânico pelos microrganismos testados.

Tabela 1 – Detecção de atividade enzimática das amostras de *Aspergillus* ssp isoladas de diferentes tipos de solo da Caatinga do Estado de Pernambuco

Isolado	Local de coleta	Halo (cm)
SIS 4	Serra Talhada	2,0
SIS 5	Serra Talhada	1,4
SIS 7	Serra Talhada	ND
SIS 8	Serra Talhada	ND
SIS 9	Serra Talhada	1,0
SIS 10	São José do BelMonte	ND
SIS 11	Serra Talhada	ND
SIS 16	Serra Talhada	0,5
SIS 17	Serra Talhada	ND
SIS 18	São José do BelMonte	ND
SIS 19	São José do BelMonte	0,8
SIS 20	São José do BelMonte	0,9
SIS 22	Serra Talhada	1,0
SIS 25	Serra Talhada	1,8

(ND) - não detectada a formação do halo característico

Alguns resíduos agroindustriais têm sido testados para produção de tanase através das fermentações sólida e submersa (AGUILAR *et al.*, 2004; RAMACHANDRAN *et al.*, 2007; PARANTHAMAN *et al.*, 2008; KUPPUSAMY; THANGAVELU; CHOKALINGAM, 2012) apresentaram resultados bastante satisfatórios quando incorporados ao meio de produção, através da substituição de reagentes ou mesmo sendo colocados na composição original do meio, aumentando muitas vezes a produção de tanase nos meios considerados alternativos.

Após a seleção da amostra de *Aspergillus* sp (SIS 04), foram realizadas produções da enzima através de fermentações submersas, utilizando os meios denominados de controle e alternativos: A₁ (casca de café), A₂ (casca de tangerina) e A₃ (casca de uva).

Mesmo após serem utilizados para fabricação de polpas de frutas e de café, os resíduos desses produtos, na maioria das vezes descartados, apresentam em sua composição um elevado valor nutricional, podendo servir para formulação de meios de produção de diversos produtos de alto valor agregado.

Os resíduos utilizados foram suplementados ao meio controle na quantidade de 10g/L em substituição ao ácido tânico. A fermentação ocorreu durante 120 h, a 30°C, 150 rpm (Figura 1).

Verifica-se que houve uma fase lag mais acentuada no meio A₂ (casca de tangerina) e bem mais discreta no meio controle, nas primeiras 24 horas de fermentação. Após o período de estabilização em ambos os meios testados, a fase estacionária foi após 48 horas do início do processo fermentativo, se estendendo até o término do processo, com 120 horas.

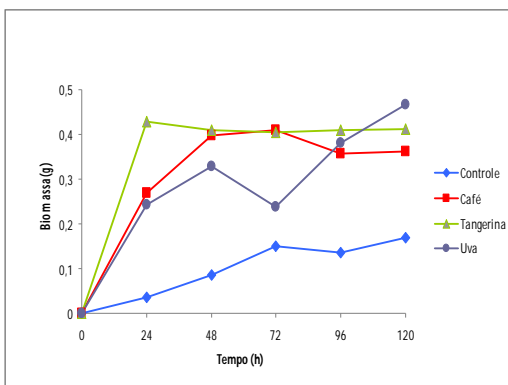


Figura 1 – Curvas de crescimento do *Aspergillus* sp (SIS 04) em diferentes meios de produção

Durante todo o processo de produção da enzima, foram coletadas amostras em triplicata, para detecção

do pH (figura 2), produção da enzima (figura 3), da biomassa (tabela 2).

Tabela 2 – Biomassa obtida através da produção de tanase por *Aspergillus* sp (SIS 04) em diferentes meios de produção

Tempo (h)	Controle (g/L)	Café (g/L)	Tangerina (g/L)	Uva (g/L)
0	0	0	0	0
24	0,036	0,268	0,428	0,242
48	0,087	0,397	0,410	0,329
72	0,150	0,409	0,404	0,238
96	0,135	0,357	0,409	0,380
120	0,169	0,362	0,411	0,466

Verifica-se, na Tabela 2, que a maior biomassa obtida nos diferentes processos de produção ocorreu no meio denominado de A₃, que continha 10g/L de casca de uva (0,466 g/L), e a menor biomassa obtida foi verificada no meio controle, que continha 10 g/L de ácido tânico como indutor (0,169 g/L).

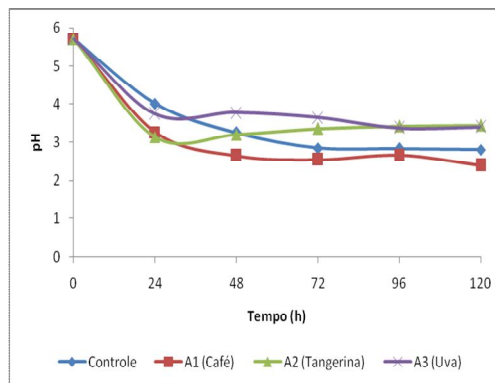


Figura 2 - Variação de pH obtida durante a produção de tanase por *Aspergillus* sp (SIS 04) em diferentes meios de produção

Os valores de pH obtidos nas 4 fermentações realizadas demonstraram que, durante todo processo fermentativo, o pH permaneceu na faixa ácida, tendo o meio controle obtido após 24 h de crescimento celular, valores na faixa de 4,01, e, após 120 horas de produção, obteve valores de 2,8.

As menores oscilações de pH foram verificadas no meio denominado A₃, que obteve valores de 3,74 após 24 horas de fermentação e, com 120 horas, valores na faixa de 3,41.

Na figura 3, estão descritas as atividades enzimáticas obtidas durante 120 horas nos processos de produção da enzima estudada. O meio A₁ apresentou uma atividade enzimática de 4,0 $\mu\text{mol}/\text{mim. mL}$ de enzima, valor superior ao obtido no meio controle, que foi 1,925 $\mu\text{mol}/\text{mim. mL}$, no mesmo período de fermentação. Verifica-se também que todos os resíduos testados através da elaboração de meios alternativos produziram a enzima.

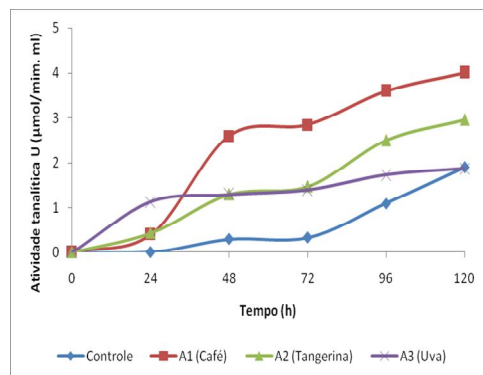


Figura 3 – Detecção da atividade enzimática das amostras nas 4 diferentes fermentações para produção de tanase. Resultados da detecção expressos em U ($\mu\text{mol}/\text{mim. mL}$ de enzima)

A produção de tanase, utilizando resíduo de café por linhagens de *Paecilomyces variotii*, foi estudada por Battestin (2007), em que houve a elevação de 3 e 2,8 vezes na atividade enzimática, com o aumento da concentração de ácido tânico de 0,5% para 1,5%, no meio de cultivo.

Esses resultados indicam que a utilização do meio contendo solução de sais e resíduos de casca de café

apresentou uma maior produção de tanase, quando comparada aos meios contendo soluções de sais, acrescidas de 10g/L de ácido tânico (meio controle), e aos meios contendo soluções de sais e resíduos de tangerina (A2) ou uva (A3).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de rejeitos agroindustriais para a elaboração de meios econômicos para a obtenção de bioprodutos de alto valor agregado surge como uma alternativa viável, para minimizar os custos de produção e também para evitar o descarte de uma grande maioria de resíduos com elevado potencial nutritivo.

O meio contendo resíduo de café apresentou maior produção satisfatória da tanase, quando comparado ao meio denominado controle e aos demais meios contendo diferentes resíduos agroindustriais de laranja e uva.

Verificou-se a habilidade da amostra isolada do solo da Caatinga *Aspergillus* sp (SIS 04) em hidrolisar os taninos presentes nos resíduos testados, transformando-os na enzima estudada.

Esses estudos de produção enzimática revelam o elevado potencial biotecnológico dos fungos isolados do solo da Caatinga do Estado de Pernambuco.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Projeto SISBIOTA-CNPq, pelo suporte financeiro para realização deste trabalho, e ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), pela infraestrutura para execução de toda parte experimental.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, C. N. *et al.* Differences in fungal enzyme productivity in submerged and solid state cultures. **Food Sci. Biotechnol.**, v.13, n.1, p.109-113, 2004.
- BATRA, A.; SAXENA, R. K. Potential tannase producers from the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. **Process Biochem.** 40, p.1553–1557, 2005.
- BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e Aplicações de Taninos e Tanases em Alimentos. **Alim. Nutr.**, v.15, n.1, p.63-72, 2004.
- BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1832–1837, 2007
- BELUR, P. D.; MUGERAYA, G. Microbial production of tannase: state of the art. **Research Journal of Microbiology**, v.6., p. 25-40, 2011.
- BERKA, R.M.; DUNN-COLEMAN, N.; WARD, M. Industrial enzymes from *Aspergillus* species. **Biotechnology**, v.23, p.155-202, 1992.
- BHAT, T. K.; SINGH, B.; SHARMA, O. P. Microbial degradation of tannins – A current perspective. **Biodegradation**, n.9, p.343-357, 1998.
- BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.3, p.573-606, 2000.
- CHAVAN, S. B.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: An appraisal as a product of commercial potential. **Biotechnology Progress**, v.29, n.4, p. 833-846, 2013.
- CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M. *et al.* Biotechnological advances and challenges of tannase: An Overview, **Food Bioprocess Technol.**, v.05, p.445-459, 2012.
- DEMAIN, A. L. Induction of Microbial Secondary Metabolism, **International Microbiology**, v.1, p.259-264, 1998.
- DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, v. 18, p.499-514, 2000.
- DEMAIN, A. L. The business of biotechnology. **Industrial Biotechnology**, v.3, p.269-283, 2007.
- DEMAIN, A. L.; ADRIANO, J. L. Contributions of microorganisms to industrial biology, **Molecular Biotechnology**, v.38, p.41–55, 2008.
- DHILLON, G. S. *et al.* Biotechnological potential of industrial wastes for economical citric acid bioproduction by *Aspergillus niger* through submerged fermentation. **International Journal of Food Science and Technology**, v.47, p.542–548, 2012.
- EL-TANASH, A. B.; SHERIEF, A. A.; NOUR, A. Optimization the hydrolysis process of tannic acid for gallic acid production by tannase of *Aspergillus awamori* using response surface methodology. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 10, p.9-17, 2012.
- GEORGE, D. S.; ONG, C. B. Improvement of tannase production under submerged fermentation by *Aspergillus niger* FBT1 isolated from a mangrove forest. **Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology**, v.94, n.4, p.451-456, 2013.
- GOSWAMI, S. *et al.* A review on production of echinocandins by *Aspergillus sp.* **J. Biochem Tech.** v.4, n.1, p. 568-575, 2012.
- HANEFELD, U.; CAO, L.; MAGNER, E. Enzyme immobilisation: fundamentals and application. **Chemical Society Review**, v.42, p.6211-6212, 2013.
- HAMDY, H. S.; FAWZY, E. M. Economic production of tannase by *Aspergillus niger* van tiegh adopting different fermentation protocols and possible applications. **Romanian Biotechnological Letters**, v.17, n.4, p.7441-7457, 2012.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKI, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v.67, p.597 – 607, 1979.
- JANA, A. *et al.* Rapid screening of tannase producing microbes by using natural tannin. **Brazilian Journal of Microbiology**, p.1080-1083, 2012.
- KUPPUSAMY, M.; THANGAVELU, V.; CHOKALINGAM, A. Optimization of submerged fermentative production of tannase by *Aspergillus flavus*. **International Journal of Chem. Tech. Research**, v.4, n.4, p.1461-1467, 2012.
- LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the

- art. **Advances in Applied Microbiology**, v. 44, p. 215-260, 1997.
- LOTFY, W. A.; GHANEM, K. M.; EL-HELOW, E. R. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: I. Mutagenesis and cost reduction studies. **Bioresource Technology**, v.98, n.18, p. 3464-3469, 2007.
- MACEDO, G. A.; MATSUDA, L. K.; BATTESTIN, V. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. **Ciência Agrotécnica**, v.29, n.4, p. 833-838, 2005.
- MATA-GOMEZ, M. *et al.* A Novel tannase from the xerophilic fungus *Aspergillus niger* GH1. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, n.9, p.987-996, 2009.
- MELO, A. *et al.* The Optimization of *Aspergillus* sp. GM4 Tannase Production under Submerged Fermentation. **Advances in Microbiology**, v.4, p.143-150, 2014.
- MONDAL, K. C. *et al.* Colorimetric assay method for determination of the tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity. **Analytical Biochemistry**, v. 259, p. 168-171, 2001.
- MURUGAN, S. *et al.* Production of xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC 6915 using saw dust as substrate under solid state fermentation. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-7, 2011.
- NOVAKI, A. *et al.* Produção de invertase por fermentação em estado sólido a partir de farelo de soja. **ENGEVISTA**, v. 12, n. 2. p. 131-140, 2010.
- OGAWA, J.; SHIMIZU, S. Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. **Trends in Biotechnology**, v.17, n.1, p.13-20, 1999.
- PARANTHAMAN, R. *et al.* **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v.3, n.2, p.105-110, 2008.
- PATRO, K. R. *et al.* Development of new medium composition for end production of L-asparaginase by *Aspergillus* f. **Journal of Environmental Biology**, v.35, p.295-300, 2014.
- PINTO, G. A. S. *et al.* Tanase: conceitos, produção e aplicação. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.23, n.2, p.439-462, 2005.
- POLIZELI, M. L. T. M. *et al.* Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 67, p. 577-591, 2005.
- PRASAD, D. *et al.* Advances in Production and Characteristic Features of Microbial Tannases: An Overview, **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v.06, n.02, p.119-144, 2012.
- RAMACHANDRAN, S. *et al.* Oil cakes and their biotechnological applications – A review. **Bioresource Technology**, v.98, p.2000-2009, 2007.
- SCHUEGERL, K. Integrated processing of biotechnology products. **Biotechnology Advances**, v.18, p. 581-599, 2000.
- SHIVANNA, G. B.; VENKATESWARAN, G. Phytase Production by *Aspergillus niger* CFR 335 and *Aspergillus ficuum* SGA 01 through Submerged and Solid-State Fermentation. **The Scientific World Journal**, ID 392615, p. 1-6, 2014.
- STROPARO, E. C. *et al.* Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p.2267-2278, 2012.
- YAO, J. *et al.* Production, characterization and applications of tannase. **Journal of Molecular Catalysis b: Enzymatic**, v.10, p. 137-147, 2014.
- WARD, O. P. *et al.* Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. **Advances in Applied Microbiology**, v.58, p.1-75, 2005.