



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**TATIANA PEREIRA SHIU LIN LIU**

**Produção, purificação, caracterização e aplicação de tanase de *Aspergillus melleus* URM 5827 produzida por fermentação em estado sólido utilizando sementes de achachairú (*Garcinia humilis* (Vahl) C. D. Adam).**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Produção, purificação, caracterização e aplicação de tanase de *Aspergillus melleus* URM 5827 produzida por fermentação em estado sólido utilizando sementes de achachairú (*Garcinia humilis* (Vahl) C. D. Adam).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

**Discente:** Tatiana Pereira Shiu Lin Liu

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Figueiredo Porto

**Co-orientadores:** Dr<sup>a</sup>. Polyanna Nunes Herculano

Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa

L783p

Liu, Tatiana Pereira Shiu Lin

Produção, purificação, caracterização e aplicação de tanase de *Aspergillus melleus* URM 5827 produzida por fermentação em estado sólido utilizando sementes de achachairú (*Garcinia humilis* (Vahl) C. D. Adam) / Tatiana Pereira Shiu Lin Liu. – Recife, 2016.

81 f. : il.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Fisiologia e Morfologia Animal, Recife, 2016.

Inclui referências e anexo(s).

1. *Aspergillus melleus* 2. Fermentação em estado sólido  
3. Achachairú 4. Chá verde 5. Tanase I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo, orientadora II. Título

CDD 636.089

**Tatiana Pereira Shiu Lin Liu**

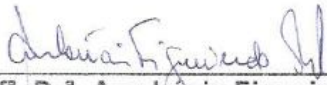
**Produção, purificação, caracterização e aplicação de tanase de *Aspergillus melleus* URM 5827 produzida por fermentação em estado sólido utilizando sementes de achachairú (*Garcinia humilis* (Vahl) C. D. Adam).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.


Recife, 25 de fevereiro de 2016.


Resultado: APROVADA

BANCA EXAMINADORA

  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Ana Lúcia Figueiredo Porto  
Orientadora/Presidente

  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Galba Maria Campos Takaki  
Membro Titular externo

  
Prof Dr. Bruno Severo Gomes  
Membro Titular externo

  
Dr<sup>ª</sup>. Amanda Emmanuelle Sales  
Membro Titular interno

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Raquel Pedrosa Bezerra  
Membro Suplente

Dr<sup>ª</sup> Marcia Nieves Carneiro da Cunha  
Membro Suplente

A todos que amo

Dedico

“Luke: Mas eu não acredito!

Mestre Yoda: É por isso que você fracassa.”

(Star Wars: Episódio V - **O Império Contra-Ataca**)

## AGRADECIMENTOS

Iria resumir os agradecimentos em uma única frase "A todos que participaram desta jornada. Obrigada!", mas fui barrada.

Então, Vamos lá!

Gostaria de agradecer a Deus, que mostrou que depois da tempestade sempre vem a calmaria, e espero permanecer nela por muito tempo.

Aos meus pais que me deram toda a base para formar a pessoa que sou hoje.

Aos meus irmãos, pois marcamos na pele o quanto nos amamos.

Ao meu sobrinho lindo, por todo "titia" dito que enchia meu coração de amor e tranquilidade na hora do desespero.

Ao meu namorado que me aguenta nesses 9 anos, sei que não é uma coisa fácil, e mesmo longe me ajudou de todas as formas possíveis.

Aos meus cachorros por serem além de melhores amigos, os melhores antidepressivos do mundo.

A professora Ana Porto, pela confiança no meu trabalho apesar de ter passado um tempo afastada do laboratório, me acolheu de braços abertos. Meus mais sinceros agradecimentos.

Aos meus co-orientadores que se tornaram amigos: Polyanna Nunes, pelos conselhos quanto aos experimentos e paciência por ter me ensinado de novo como se fazia uma fermentação em estado sólido. A Romero Brandão que tive o prazer de conhecer, trabalhar e "aperriar" o tempo todo, pela enorme paciência de me explicar as coisas milhões de vezes, os conselhos e conversas. Uma coisa para te dizer: TU É O CARA!

Aos meus amigos que mesmo seguindo caminhos diferentes me deram todo apoio.

A família LABTECBIO que torna o laboratório além de um lugar de experimentos e pesquisas de descontração, conversas e boas risadas.

Gostaria de agradecer a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa concedida.

E sim, vou sentir saudades!

## RESUMO

Tanino acil hidrolase (TAH) conhecida como tanase (E.C:3.1.1.20) é uma enzima que hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis. O ácido tânico é um típico tanino hidrolisável, que pode ser hidrolisado por tanase em glicose e ácido gálico. A tanase pode ser obtida a partir de fontes vegetais, animais e microbianas, sendo o meio microbiológico a fonte mais importante de obtenção desta enzima. O chá verde apresenta várias substâncias, dentre elas, as catequinas que são uma importante fonte de antioxidante, que ajudam na manutenção do organismo. A atividade e a purificação de tanase produzida por *Aspergillus melleus* URM 5827 foi avaliada por fermentação em estado sólido utilizando como substrato sementes de achachairú (*Garcinia humilis* (Vahl) C. D. Adam). Foram utilizadas 42 culturas de fungos do gênero *Aspergillus* para seleção qualitativa das culturas com potencial para produção da tanase. Com a cultura selecionada foi realizada uma fermentação em estado sólido utilizando sementes de achachairú como substrato. Um planejamento fatorial ( $2^3$ ) foi utilizado para analisar a influência das variáveis de produção: quantidade de substrato, umidade inicial e quantidade de ácido tânico sobre a atividade da tanase. A purificação foi avaliada por cromatografia de troca iônica em DEAE- Sephadex. A máxima atividade foi produzida por *Aspergillus melleus* URM 5827 com 452,55 unidades por grama de substrato na base seca (U/gss) utilizando 5,0 g de substrato, com umidade inicial de 60% e 2,0% de ácido tânico em 48 horas de fermentação. A enzima purificada apresentou peso molecular de 69,52 kDa em Superdex G-75, enquanto que em eletroforese SDS-PAGE apresentou 66,5 kDa. Quanto a caracterização, apresentou pH e temperatura ótima de 5,5 e 40°C respectivamente, obtendo termoestabilidade a 30°C. A atividade enzimática na presença de íons, surfactantes e inibidores de protease, foi inibida na presença dos íons  $ZnCl_2$ ,  $ZnSO_4$  e dos surfactantes triton X-100, SDS, reduzida com os íons  $CaCl_2$ , KCl, NaCl,  $MgSO_4$ ,  $CuSO_4$ , dos surfactantes Tween 20, Tween 80 e dos inibidores de protease EDTA e  $\beta$ -mercaptoetanol. A tanase aumentou a atividade antioxidante do chá verde significativamente. Os resultados obtidos no presente estudo, mostram o potencial promissor da tanase produzida por *Aspergillus melleus* URM 5827 e na sua utilização no aumento do potencial antioxidante do chá verde.

**Palavras-chave:** Tanase, *Garcinia humilis*, *Aspergillus melleus*, Fermentação em Estado Sólido, Purificação, Chá verde



## ABSTRACT

Tannin acylhydrolase (TAH) known as tannase (E.C:3.1.1.20) is an enzyme which hydrolyzes esters and lateral bonds of hydrolyzable tannins. The tannic acid is a typical hydrolyzable tannin, which can be hydrolyzed by tannase along with glucose and gallic acid. Tannase can be obtained from vegetables, animal and microbial sources. From those, the last is the most important source to obtain the enzyme. Green tea has several substances, among which catechins are a major source of antioxidant, which help in maintaining the organism. The activity and purification of tannase produced by *Aspergillus melleus* URM 5827 was evaluated by semi solid fermentation using seeds of mangosteen (*Garcinia humilis* (Vahl) C. D. Adam) as substrate. Forty two cultures fungal cultures of *Aspergillus* were used for qualitative selection purposes in order to verify potential for tannase production. After selecting cultures, it was performed a semi solid fermentation using seeds of mangosteen as substrate. A factorial planning ( $2^3$ ) was used to verify the influence of production variables such as: quantity of substrate; initial moisture and amount of tannic acid over tannase activity. The purification was evaluated by ionic change chromatography at DEAE-Sephadex. Maximum activity was produced by *Aspergillus melleus* URM 5827 with 452.55 units per gram of dry-based substrate (U/gss) using 5.0 grams of substrate, with initial moisture of 60% and 2% of tannic acid through 48 hours fermentation. The purified enzyme has a molecular weight of 69.52 kDa on Superdex G-75, while on SDS-PAGE electrophoresis showed 66.5 kDa. As for the characterization, the optimum pH and temperature was 5.5 and 40°C, respectively, achieving thermostability at 30°C. Coughing increases the antioxidant activity of green tea significantly. The results obtained in this study show the promising potential of tannase produced by *Aspergillus melleus* URM 5827 and its use in improving the antioxidant potential of green tea.

**Key words:** Tannase, *Garcinia humilis*, *Aspergillus melleus*, Solid state fermentation, Purification, Green tea

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão Bibliográfica

- Figura 1.** Estrutura geral dos taninos condensados (R = H ou OH): a) monômero de flavan-3-ol, catequina (R = H). 18
- Figura 2.** Estrutura geral do ácido gálico (a) e do ácido elágico (b). 18
- Figura 3.** Estrutura geral do galotaninos: a) estrutura do ácido gálico; b) estrutura do ácido di-gálico. 19
- Figura 4.** Estrutura química do elagitanino (casuarictina):(a) estrutura do ácido hexahidroxidifênico; (b) estrutura do ácido elágico 19
- Figura 5.** Esquema da hidrólise do ácido tânico 20
- Figura 6.** Frutos da *Garcinia humilis* (Vahl) C. D. Adam (a e b); Sementes (c); Polpa (d) 25
- Figura 7.** *Camellia sinensis* (L) O. Kuntze 29

### Capítulo 1.

- Figura 1.** Gráfico de Pareto dos principais efeitos da tanase produzida por *Aspergillus melleus* URM 5827, tendo como variável-resposta a atividade de tanase total (U/ml) com 48h de FES, utilizando planejamento fatorial 2<sup>3</sup>. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (1) Concentração de substrato (g), (2) Umidade inicial (%), (3) Ácido tânico (%). 64
- Figura 2.** Purificação da enzima tanase de *Aspergillus melleus* URM 5827 em sistema FPLC e SDS-PAGE. (A) Cromatografia em resina de exclusão molecular Superdex-G75 através de protocolo de eluição com tampão fosfato 0,1M, pH 5,5, fluxo de 0,5mL/min, monitorado em 215nm. Peso molecular estimado através da construção de uma curva de calibração utilizando os padrões: Albumina (66kDa), Ovoalbumina (45kDa), Inibidor de Tripsina (23kDa) e Lisozima (14kDa). (B) (1) amostra obtida a partir de FPLC em concentrações de (1) 30µg, (2) 15µg e (3) 10µg. Os marcadores moleculares (SigmaMarker™ alta gama, peso mol 36,000-200,000 Da): (A) miosina cardíaca porcina (200.000), (B) β-galactosidase de E.

coli (116000), (C) A fosforilase B, músculo de coelho ( 97000), (D) de albumina, de soro bovino (66000), (E) desidrogenase glutâmico, fígado de bovino (55000), (F) de ovalbumina de ovo de galinha (45,000), (G), da desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato, músculo de coelho ( 36000). 65

**Figura 3.** Efeito do pH ótimo (A), da temperatura ótima e termoestabilidade (B) na atividade da tanase purificada de *Aspergillus melleus* URM 5827. Todos os resultados foram realizados em triplicata. 66

**Figura 4.** Efeito de íons, surfactantes e inibidores de protease na atividade da tanase purificada de *Aspergillus melleus* URM 5827. 67

**Figura 5.** Cromatograma de tanase como uma abordagem potencial para a atividade antioxidante do chá verde. Experimento realizando utilizando a eliminação de radicais livres pelo método DPPH. Todos os resultados foram obtidos em triplicatas. Tempo de hidrólise de ácido tânico presente no chá verde foi avaliada e monitorada pelo potencial antioxidante. 68

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Níveis das variáveis utilizadas no planejamento fatorial  $2^3$  para produção de tanase de *Aspergillus melleus* URM 5827 por Fermentação em Estado Sólido (FES). 61
- Tabela 2.** Seleção de *Aspergillus* com potencial para produção de tanase utilizando meio mínimo Ágar Czapek Dox contendo 0,5% de ácido tânico. 62
- Tabela 3.** Matriz experimental do planejamento fatorial  $2^3$  para a produção de tanase por *Apergillus melleus* URM 5827 através de Fermentação em Estado Sólido (FES). utilizando sementes de achachairú (*Garcinia humilis* (Vahl) C. D. Adam). 63

## **LISTA DE ABREVIATÓES**

TAH: Tanino acil hidrolase

kDa: Kilodaltons

FES: Fermentação em estado sólido

FSm: Fermentação submersa

TC: Taninos condensados

TH: Taninos hidrolisáveis

GT: Galotaninos

ET: Elagitaninos

EGCG: Epigalocatequina galato

EGC: Epigalocatequina

ECG: Epicatequina galato

EC: Epicatequina

GC: Galocatequina

C: Catequina

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EB: Extrato Bruto

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS .....	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. REVISÃO DE BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
2.1. TANINOS .....	17
2.2. TANASE.....	20
2.3. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES).....	22
2.4. <i>Garcinia humilis</i> (Vahl) C. D. Adam.....	24
2.5. O GÊNERO <i>Aspergillus</i> .....	26
2.6. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.....	27
2.7. <i>Camellia sinensis</i> (L) O. Kuntze .....	28
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	31
3.1. Objetivo Geral .....	31
3.2. Objetivos Específicos.....	31
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	32
<b>Capítulo 1</b> .....	43
Resumo .....	43
<b>1. Introdução</b> .....	44
<b>2. Materiais e métodos</b> .....	46
2.1. Micro-organismos.....	46
2.2. Seleção dos Fungos Produtores de Tanase .....	46
2.3. Sementes do Achachairú ( <i>Garcinia humilis</i> (Vahl) C. D. Adam) .....	46
2.4. Produção de Tanase por Fermentação em Estado Solido (FES) .....	47
2.5. Delineamento Experimental e Análise Estatística .....	47
2.6. Extração da Enzima .....	47

2.7. Dosagem de Proteína .....	48
2.8. Atividade de tanase.....	48
2.9. Cromatografias.....	48
2.9.1.Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex.....	48
2.9.2. Análise de filtração em gel da protease purificada colagenolítica.....	49
2.10. Eletroforese em SDS- PAGE .....	49
2.11. Efeitos do pH e temperatura na atividade da enzima purificada. ....	49
2.12. Efeitos de diferentes íons, surfactantes e inibidores de protease na atividade da enzima purificada. ....	50
2.13. Efeito da enzima purificada no potencial antioxidante do chá verde.....	50
<b>3. Resultados e discussão.....</b>	<b>50</b>
<b>4. Conclusão .....</b>	<b>55</b>
<b>Agradecimentos .....</b>	<b>55</b>
<b>Referências .....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>69</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Taninos são compostos polifenólicos, possuem diferentes pesos moleculares, e ocorrem naturalmente no reino vegetal. Os taninos estão presentes em diversas partes da planta. Com base na estrutura os taninos podem ser classificados como condensados e hidrolisáveis (ZAKIPOUR-MOLKABADI et al., 2013).

Tanino acil hidrolase (TAH) conhecida como tanase (E.C:3.1.1.20) é uma enzima que catalisa a hidrólise de ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis, liberando assim glicose e ácido gálico como produtos (ZHANG et al., 2016). A tanase pode ser amplamente utilizada nas indústrias alimentícias no preparo de chás instantâneos, vinhos, refrigerantes que tenham café como ingrediente, clarificação de cerveja e sucos de fruta e detanificação de alimentos, indústrias de cosmético e farmacêutica (SENA et al., 2014).

Além de ser produzida por plantas, a tanase pode ser produzida por animais e micro-organismos, como fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Dependendo da fonte produtora a tanase pode apresentar massas moleculares variando entre cerca de 50 a 320 kDa (REN et al., 2013).

A fermentação em estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FSm), tem sido amplamente estudadas para produção de tanase. Entretanto, existem vários dados que mostram as vantagens da FES sobre a FSm, dentre eles estão a natureza extracelular da enzima, maior rendimento na produção, entre outros (BENIWAL et al., 2015).

A FES é um bioprocessamento no qual os micro-organismos crescem em substratos sólidos na ausência ou quase ausência de água livre. Neste processo, a obtenção da enzima pode ter o custo reduzido pelo uso de resíduos vegetais ricos em taninos, como substratos alternativos, sendo vantajoso para as indústrias onde esses materiais são produzidos em abundância (SOUZA et al., 2015).

As plantas que pertencem à família Clusiaceae (ou Guttiferae) são distribuídas principalmente nas regiões tropicais, o gênero *Garcinia* (ex-*Rheedia*) é considerado como o mais numeroso, possuindo cerca de 450 espécies (KUMAR et al., 2013). O gênero *Garcinia* contém uma grande variedade de compostos os quais possuem uma vasta gama de propriedades biológicas e farmacêuticas, por exemplo, antibacterianos, antioxidantes, antifúngicos, etc (MOLIN et al., 2012). O achachairu (*Garcinia humilis* (Vahl) C. D. Adam) pode ser conhecido pelos nomes de



achachairú, chachairu, tatairu, bacupari boliviano, shashairú, ibaguazú, cachicheruqui e tapacuarai (SOPRANO et al.,2010).

Há um interesse de alguns países na importação desta fruta, e por esta razão, vem aumentando a produção e o aproveitamento pelas indústrias alimentícias e de bebidas (“IBCE – Instituto Brasileiro de Comércio Exterior”, 2010).

O emprego de micro-organismos para utilização de resíduos agroindústrias para a produção de biomoléculas pode diminuir o custo de produção desses compostos e ajuda a combater a poluição ambiental proveniente do descarte inadequado desses ricos substratos (PANESAR et al.,2015).

Segundo Zhang e colaboradores (2016) O chá verde é uma das bebidas mais amplamente consumida em alguns países como China e Índia. O chá verde é proveniente das folhas da *Camellia sinensis* (L) O. Kuntze, que dependendo do tratamento empregado, pode dar origem a quatro variedades de chás:branco, verde, preto e oolong (BATISTA et al., 2009). Sharpe et al., (2016) relatam vários estudos que apontam os benefícios do consumo do chá verde.

Sendo uma excelente fonte de vários sais minerais, vitaminas, compostos polifenólicos e antioxidantes, tais como as catequinas (MILANI; MORGANO; CADORE, 2016).

Em virtude dos benefícios medicinais que o consumo prolongado do chá verde pode proporcionar ao mercado consumidor, a demanda por este produto encontra-se em crescimento ao longo dos últimos anos. Desta forma, frente a este cenário, o presente estudo dispõe-se a promover um melhoramento da atividade antioxidante de forma a agregar valor biotecnológico ao chá verde a partir do uso de tanase produzida por *Aspergillus melleus* URM 5827.

## 2. REVISÃO DE BIBLIOGRÁFICA

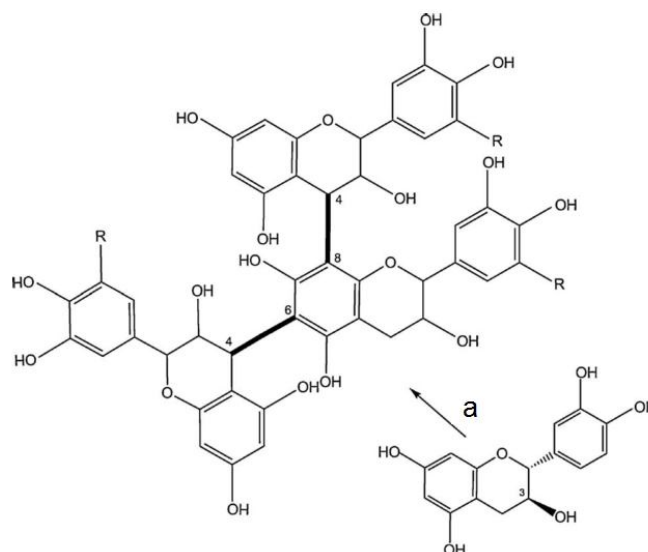
### 2.1.TANINOS

A denominação "tanino" foi utilizada pela primeira vez por Seguin em 1796, para descrever o material presente na casca de carvalho. A infusão preparada com as cascas era utilizada para curtimento do couro (LAGHI et al., 2010). Taninos são polifenóis que ocorrem amplamente no reino vegetal, representam o quarto componente mais abundante das plantas depois da celulose, hemicelulose e lignina (SIVASHANMUGAM; JAYARAMAN, 2011). São metabólitos secundários, que estão distribuídos nas diversas partes da planta (raiz, caule, folhas, frutos e sementes). Sua principal função para os vegetais, consiste em protegê-los contra ataques de animais herbívoros, insetos e fitopatógenos. Nos animais esse mecanismo de defesa atua, de modo que, tal substância atribui uma palatabilidade amarga e desagradável. Os taninos agem também como mecanismo de defesa contra fungos, bactérias e vírus (JANA et al., 2014).

Os taninos são um grupo heterogêneo de compostos polifenólicos, com peso molecular entre 500 e 20.000 Daltons. Essas biomoléculas possuem a capacidade de ligar e de precipitar proteínas, polissacarídeos e alcaloides (FALCÃO; ARAÚJO, 2011). Essa capacidade de ligar-se a proteínas gera a adstringência de muitos frutos e produtos vegetais, devido à precipitação das glicoproteínas salivares. (MA et al., 2014a). Estruturalmente, os taninos podem ser divididos em dois grupos: condensados e hidrolisáveis. (CRESTINI; LANGE, 2015).

Segundo Klongsiriwet e colaboradores (2015), taninos condensados (TC) são oligômeros ou polímeros de flavan-3-ol (catequina) (Figura 1). Podem ser divididos em dois subgrupos principais de TC são procianidinas, que apresentam dois grupos OH, e prodelfinidina, que têm três grupos OH no Radical.

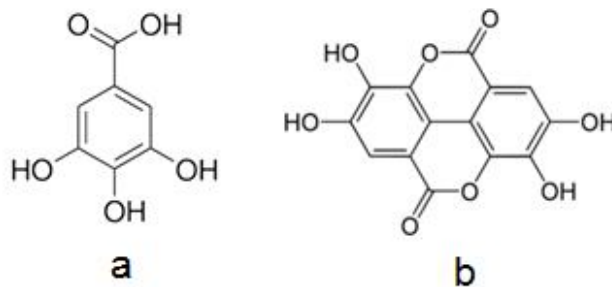
**Figura 1.** Estrutura geral dos taninos condensados (R = H ou OH): a) monômero de flavan-3-ol, catequina (R = H).



**Fonte:** FALCÃO; ARAÚJO, (2011).

Taninos hidrolisáveis (TH) são compostos formados por ésteres de ácido gálico ou ácido elágico (Figura 2) ligado a uma unidade central de carboidrato (OLIVAS-AGUIRRE et al., 2015). Segundo Sáyago-Ayerdi et al. (2013), os TH podem ser divididos em galotaninos e elagitaninos.

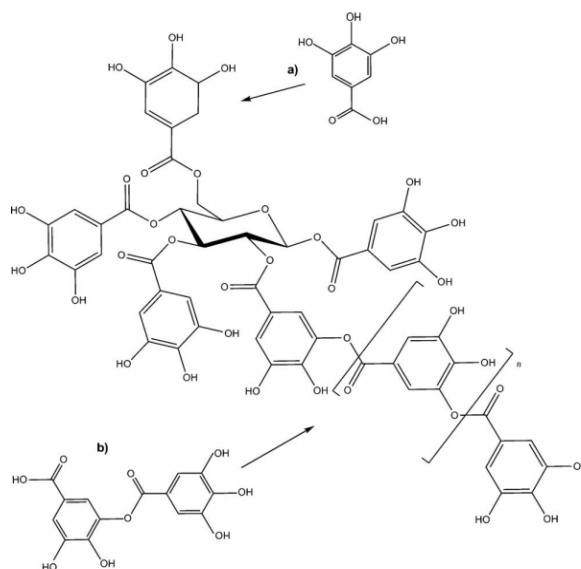
**Figura 2.** Estrutura geral do ácido gálico (a) e do ácido elágico (b).



**Fonte:** Modificado de OLIVAS-AGUIRRE et al., (2015).

Os galotaninos (GT) são considerados as formas mais simples de taninos hidrolisados. Os GT são ésteres de ácido gálico e ácido di-gálico ligados entre si por ligações éster entre a carboxila (-COOH) de um e o -OH do outro, e por sua vez ligado a hexoses (Figura 3) (OLIVAS-AGUIRRE et al., 2015).

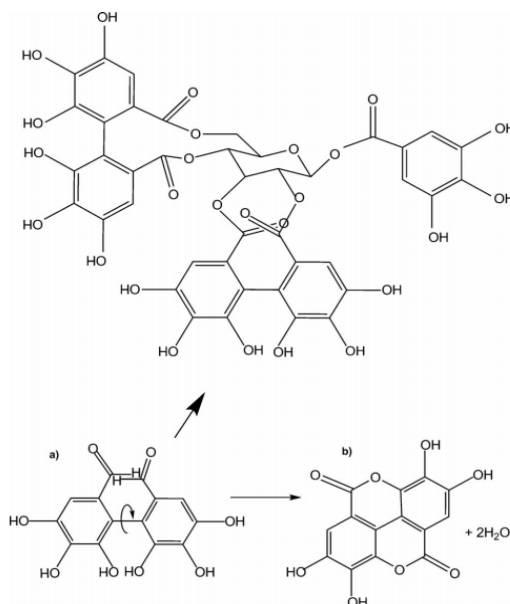
**Figura 3.** Estrutura geral do galotaninos: a) estrutura do ácido gálico; b) estrutura do ácido di-gálico.



**Fonte:** Modificado de FALCÃO; ARAÚJO, (2011).

Os elagitaninos (ET) são formados a partir do ácido hexahidroxidifênico que quando hidrolisado desidrata-se para formar o ácido elágico (Figura 4) (OLIVAS-AGUIRRE et al., 2015).

**Figura 4.** Estrutura química do elagitanino (casuarictina):(a) estrutura do ácido hexahidroxidifênico; (b) estrutura do ácido elágico



**Fonte:** FALCÃO; ARAÚJO, (2011).

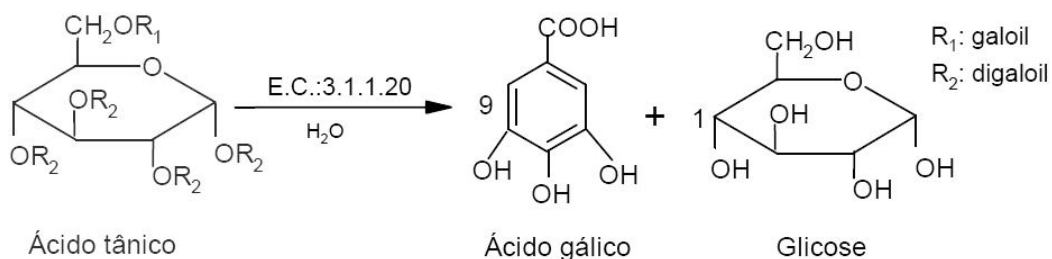
Segundo Sekowski et al. (2014), os taninos apresentam uma variedade de efeitos biológicos, tais como, anti-tumorais, antimutagênicos, antimicrobianos, antivirais, antiplaquetários, hipoglicêmicos, anti-inflamatórios, entre outros, tal fato justifica a realização de novas pesquisas para o conhecimento sobre seu mecanismo de ação e efeitos.

## 2.2.TANASE

Os micro-organismos, juntamente com suas enzimas exercem um importante papel no melhoramento de vários processos industriais. Dentre as principais utilizações das enzimas bioproduzidas, podemos afirmar que elas são eficientes catalisadores de reações, proporcionando vantagens sobre catalisadores químicos. O custo aproximado da utilização das enzimas no mercado industrial é de US \$ 1,6 bilhões, entretanto, ainda existem obstáculos para utilização integral destas enzimas e o principal deles é o alto custo de produção (JANA et al., 2013; CHOI; HAN; KIM, 2015).

Tanino acil hidrolase (EC 3.1.1.20), frequentemente denominado de tanase, é uma enzima produzida principalmente por micro-organismos intra ou extracelularmente. Trata-se de uma enzima induzível, que é produzida na presença de uma fonte de tanino, tal como o ácido tânico. A tanase catalisa a hidrólise de ligações éster de taninos hidrolisáveis (Figura 5) tendo glicose e ácido gálico como produtos finais da reação (XIAO et al., 2015).

**Figura 5.** Esquema da hidrólise do ácido tânico



**Fonte:** Modificado de AGUILAR et al., (2001).

Esta enzima foi acidentalmente descoberta por Tieghem em 1867 durante um experimento que tinha como objetivo a produção de ácido gálico, a solução aquosa de taninos utilizadas acabaram sendo contaminadas acidentalmente por duas

espécies fúngicas, posteriormente identificadas como *Penicillium glaucum* e *Aspergillus niger* (CRESTINI; LANGE, 2015).

A tanase pode ser obtida através de fontes vegetais, animais e microbianas. A enzima encontra-se presente em vegetais ricos em taninos, principalmente nos frutos, folhas, galhos e cascas de árvores. A tanase de origem animal é extraída do intestino bovino e das mucosas de ruminantes. No entanto, para fins de processos biotecnológicos, a enzima de origem microbiana é a mais utilizada e é produzida a partir de fungos e bactérias (YAO et al., 2014a).

Segundo MURUGAN; SARAVANABABU; ARUNACHALAM, 2007 o meio microbiológico é a fonte mais importante de obtenção de tanase, uma vez que as enzimas são mais estáveis, do que as obtidas de outros meios.

Segundo Ma et al. (2014b), a tanase é industrialmente importante devido à sua ampla aplicação principalmente nos setores alimentícios e farmacêuticos. Dentre suas aplicações destacam-se o seu uso na elaboração de chás instantâneos, na produção de vinhos, refrigerantes a base de café, clarificação de cervejas e sucos. Outra aplicação secundária da enzima está na utilização para preparação de alimentos para animais, pois aumentam a disponibilidade de nutrientes pela hidrólise dos taninos que são fatores antinutricionais (MADEIRA; MACEDO; MACEDO, 2011).

No setor farmacêutico o ácido gálico é utilizado como um importante intermediário para fabricação do antimicrobiano trimetoprim (BENIWAL et al., 2015). Na indústria química, é utilizado para síntese do propil galato sendo empregado em cosméticos, adesivos e lubrificantes, o ácido gálico também é utilizado na fabricação de semicondutores, corantes e em compostos para revelação fotográfica (CHÁVEZ-GONZÁLEZ et al., 2012).

Para fins de conservação ambiental, a tanase também tem sido utilizada como uma alternativa de baixo custo para a biodegradação de águas residuais contendo taninos, geradas pelo curtume do couro (REN et al., 2013)

Vários estudos relatam a utilização da fermentação submersa (FSm) para produção de tanase, entretanto, a utilização da fermentação em estado sólido (FES) vem ganhando destaque, pois o método proporciona uma maior quantidade e

qualidade na produção da enzima (ABOUBAKR; EL-SAHN; EL-BANNA, 2013; BAIK et al., 2014; VISWANATH et al., 2015).

A primeira descrição da produção de tanase em FES ocorreu em, 1917, onde foi utilizado o *Aspergillus oryzae*, tendo como substrato farelo de trigo. Foi estudado que a produção de tanase era maior à medida que se elevava a concentração de tanino no meio, sendo que, a partir de 20% de tanino o crescimento fúngico foi inibido (BATTESTIN; DRA; ALVES, 2007).

### **2.3. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)**

O termo fermentação semisólida ou fermentação em estado sólido (FES) foi proposto por Moo-Young et al. (1983), onde é definido como um bioprocesso realizado na ausência ou quase ausência de água livre no substrato, no entanto deve conter umidade e aeração suficiente para permitir o crescimento e o metabolismo microbiano, simulando as condições de crescimento naturais (BUENROSTRO-FIGUEROA et al., 2013; KARIMI et al., 2014; SINDHU, 2015).

Os substratos utilizados para a realização da FES podem ser divididos em dois grupos: materiais inertes, que agem como apoio sólido para os microorganismos, e materiais naturais, que além de ser um suporte atuam como fonte de carbono para o crescimento microbiano (MACHADO; TEIXEIRA; RODRÍGUEZ-COUTO, 2013).

Os resíduos agroindustriais são gerados durante o processamento industrial de produtos agrícolas. Os produtos derivados das atividades agrícolas incluem: palhas, caules, talos, folhas, cascas, bagaços, sementes, borras entre outros. Devido a grande disponibilidade e sua rica composição há um grande interesse em reutilizá-los (PANESAR; KAUR; PANESAR, 2015).

Há um enorme interesse pelas indústrias na obtenção de novas enzimas, mais específicas e estáveis que podem ser produzidos através de processos de FES. As enzimas têm um papel importante nas indústrias biotecnológica, farmacêutica e química. Elas também podem ser utilizadas em aplicações para produtos alimentares ou no tratamento das águas residuais (MAULINI-DURAN et al., 2015).

A fermentação submersa (FSm) é mais utilizada pelas indústrias fabricantes de enzimas, no entanto, nos últimos anos tem ocorrido uma crescente utilização da FES pelas vantagens que esta proporciona em comparação com a FSm (CHANG; CHANG, 2014).

Segundo Machado e colaboradores (2013) e Sindhu, (2015) as principais vantagens da FES em relação a fermentação submersa FSm são: Substratos de fermentação de composição simples; Disponibilidade restrita de água auxilia na seleção contra contaminantes; Maior rendimento em comparação com a FSm; Maior concentração da molécula de interesse; Não utiliza agitação; Possibilita a reutilização dos substratos; Recuperação facilitada do produto.

Em contrapartida, algumas das desvantagens da utilização em FES em escala industrial, se dá em grande parte devido a problemas de transferência de calor, homogeneidade do fermentado no substrato, controle da umidade do substrato, controle da aeração, dificuldade na determinação do crescimento microbiano, entre tanto várias pesquisas vem sendo direcionadas para o desenvolvimento de métodos que possam superar essas dificuldades (MARTINS et al., 2011).

A seleção dos micro-organismos é de extrema importância para a FES, uma variedade de micro-organismos incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias podem ser utilizados, no entanto, devido ao baixo teor de umidade comumente os fungos filamentosos são mais utilizados, uma vez que suas hifas tem a capacidade de crescer na superfície das partículas e também são capazes de penetrar nos espaços entre as partículas do substrato (MARTINS et al., 2011; AWAD et al., 2014).

Outro aspecto importante para a FES está na seleção do substrato sólido, já que o rendimento de produção pode ser melhorado com uma escolha ou mistura adequada (SHARMA et al., 2013). Assim, nas regiões com uma alta produção de material orgânico de baixo valor, como países baseados em economia agrícola, FES fornece meios de agregar valor aos subprodutos e é uma alternativa para resolver o problema da poluição decorrente do descarte inapropriado desses resíduos (GAYEN; GHOSH, 2013; DEMIR; TARI, 2014; BÜCK et al., 2015).



#### **2.4. *Garcinia humilis* (Vahl) C. D. Adam**

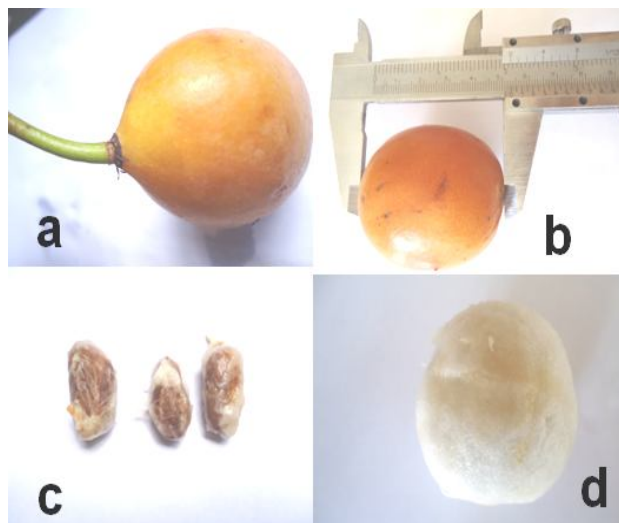
As plantas que pertencem à família Clusiaceae (ou Guttiferae) são distribuídas principalmente nas regiões tropicais. Esta família compreende cerca de 40 gêneros e aproximadamente 1.300 espécies (NIERO et al., 2012). Dentre esses, o gênero *Garcinia* (ex-*Rheedia*) é considerado como o mais numeroso, possuindo cerca de 450 espécies amplamente distribuídas na Ásia, África, América, Madagascar, Austrália, Polinésia, Bolívia e Brasil (KUMAR; SHARMA; CHATTOPADHYAY, 2013).

*Garcinia humilis* (Vahl) C. D. Adam pode ser conhecida pelos nomes de achachairu, chachairu, tatairu, bacupari boliviano, shashairú, ibaguazú, cachicheruqui e tapacuarai, pitomba do índio (SOPRANO et al., 2010).

O achachairu é proveniente de uma árvore perenifólia a qual exsuda látex amarelado e atinge entre 10 e 15 m de altura. Essa árvore possui folhas simples, coriáceas, glabras e lustrosas na sua face superior, com cerca de 10 a 18 cm de comprimento (LORENZI et al., 2006). Suas flores podem ser solitárias ou agrupadas em fascículos axilares, estróginas e andróginas, formadas principalmente durante os meses de julho e setembro (BARBOSA et al., 2008; JANICK; PAULL, 2008).

Seus frutos são amarelo-alaranjados, ovoides ou elipsoides, possuindo de 5,0 a 6,0 cm de comprimento por 4,4 a 5,0 cm de diâmetro (Figura 6a e 6b), casca grossa, lisa e resistente com 0,8 a 1,5 mm de espessura, possuem de 2 a 3 sementes (Figura 6c), ovais, marrons, poliembriônicas, possuindo de 3,0 a 3,5 cm de comprimento por 1,5 a 2,0 cm de diâmetro, cobertas por polpa compacta (Figura 6d), de sabor levemente ácido (LIM, 2012). A casca e a polpa são responsáveis pelos maiores percentuais do peso total do fruto (JANICK; PAULL, 2008).

**Figura 6.** Frutos da *Garcinia humilis* (Vahl) C. D. Adam (a e b); Sementes (c); Polpa (d)



**Fonte:** O autor, (2014).

Segundo Barbosa et al., (2008), o achachairu é utilizado na medicina popular boliviana e brasileira para tratar distúrbios gástricos, reumatismo, inflamação e dor.

Terrazas et al. (2013), realizaram estudos de caracterização fitoquímica com extratos das sementes de *achachairu* e revelaram a presença de benzofenonas, xantonas e bioflavonóides, como gutiferona N, garcinol, isogarcinol, gutiferona M, camboginol, xantocimol e gutiferona A. Dentre esses compostos, benzofenona e gutiferona A são tidos como os elementos principais, pois esses compostos possuem uma grande importância para a indústria farmacêutica, devido ao amplo espectro de atividades biológicas (MARQUES et al., 2012). Segundo (MOLIN et al., 2012) as atividades dos compostos incluem a inibição citopática da infecção *in vitro* do HIV, eliminação de radicais livres, propriedades tripanocidas, atividades anti-inflamatórias, antimicrobianas, citotóxicas e antiplasmódicas.

O fruto em questão trata-se de um produto agropecuário em potencial para cultivo comercial, pois apresentam longa durabilidade bem como boa tolerância ao manuseio e transporte, garantindo assim vantagens competitivas (SOPRANO, 2010). Embora o achachairu venha sendo comercializado no Brasil, os dados disponíveis na literatura sobre esse fruto são limitados. Há alguns relatos de plantios

em São Paulo, Santa Catarina e Pernambuco ( BARBOSA et al., 2008; SOPRANO, 2010).

As importações mundiais do produto ainda não são tão específicas, contudo, os principais países interessados na importação são: China, Rússia e Alemanha. Diante disto, já existem iniciativas não só para aumentar a produção e qualidade, mas também o aproveitamento na indústria de sucos, sorvetes, conservas e outros produtos, por esta razão, nos últimos anos tem sido crescente o interesse no estabelecimento de plantios comerciais da fruta, objetivando a industrialização e sua exportação. Os possíveis benefícios nutricionais e antioxidantes do achachairú fazem os produtores e pesquisadores conjecturar que em poucos anos, o fruto possa se tornar produto agropecuário alvo de exportação (NUNES, 2004; “IBCE – Instituto Brasileiro de Comércio Exterior”, 2010).

## **2.5. O GÊNERO *Aspergillus***

Os fungos filamentosos têm sido empregados ao longo de décadas na biotecnologia industrial, onde foi possível explorar sua capacidade de degradar várias fontes de nutrientes, bem como as de tolerar condições adversas. Além disso, eles estão sendo reconhecidos como produtores promissores de vários compostos bioativos (BRANDL; ANDERSEN, 2015).

O gênero *Aspergillus* são fungos considerados mitospóricos (apresentam esporos de origem assexuada) e estão inseridos no Reino Fungi. Cerca de aproximadamente 250 espécies compõem esse grupo taxonômico. Por fim, as espécies deste gênero, apresentam um elevado impacto econômico e social, pois ocorrem em todo o mundo e nos mais variados habitats (SAMSON et al., 2014).

A primeira descrição do gênero foi feita em 1729, por Pietro Antonio Micheli sacerdote florentino e microbiologista. O gênero foi assim nomeado em função da estrutura do conidióforo se assemelhar ao aspersório, instrumento empregado na igreja católica para aspergir água benta (BENNETT, 2010).

A classificação do gênero *Aspergillus* é tradicionalmente baseada em caracteres morfológicos. Raper e Fennell (1965) dividiu o gênero em 18 grupos, entretanto, a classificação em grupos não tinha status para suportar uma

nomenclatura. Em 1985, Gams et al. introduziram nomes nos subgêneros e seções em *Aspergillus*. Posteriormente Peterson (2008) aceitou cinco subgêneros e 16 seções do gênero *Aspergillus* (SAMSON et al., 2014). Houbraeken et al. (2014) e Hubka et al. (2014) recentemente propuseram quatro subgêneros (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* e *Nidulantes*) e 20 seções.

Segundo Miller JD, McMullin DR (2014), *Aspergillus* é um dos gêneros mais utilizados biotecnologicamente. Os organismos desse táxon podem secretar um amplo espectro de enzimas e proteínas extracelulares. Tais produtos podem ser utilizados pra diversos processos industriais (BIANCO; PERROTTA, 2015).

Dentre as enzimas produzidas por espécies deste gênero, destacam-se celulasas, proteases, queratinases, quitanases e tanases. *Aspergillus* é reconhecido como o melhor gênero produtor de tanases (SELWAL; SELWAL, 2012).

## 2.6. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Segundo Aquino e Nunces (2003), as primeiras observações referente a cromatografia de troca iônica foram feitas por Way e Thompson em 1850, que observaram a capacidade dos solos em remover íons de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) de soluções e substituí-los por Cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Tal processo foi utilizado para o tratamento de água. Folin e Bell em 1917, tentaram usar essa técnica na área da bioquímica em uma tentativa de determinar o teor de amônio na urina. Por volta de 1935, as primeiras resinas de troca orgânica começaram a ser produzidas, o qual foi um importante avanço para a técnica.

A fim de que uma determinada biomolécula chegue ao mercado, se faz necessário efetuar a separação, identificação e quantificação da substância em estudo. Dentre os métodos cromatográficos empregados, destacam-se: cromatografia em papel; em camada delgada; por absorção; por troca iônica; por exclusão; por bioafinidade; gasosa e líquida de alta eficiência (FEKETE et al., 2015).

Dentre os tipos de cromatografia citados, a de troca iônica é uma técnica amplamente utilizada em proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos de forma a caracterizar e purificar as biomoléculas. Tal método tem como princípio a separação

dos compostos de uma mistura de acordo com diferenças nas suas propriedades específicas (ROCHA et al., 2014).

A cromatografia consiste de duas fases: a fase móvel (que pode ser um líquido ou gás) e a fase secundária (fixa a coluna). Esta segunda fase pode ser uma resina ligada ao interior da coluna ou sobre a superfície de partículas sólidas empacotadas dentro da coluna (HARRIS, 2012).

Segundo Collins (2006), a resina utilizada é feita de material poroso, tanto natural ou sintético, inerte, insolúvel em água e em solventes orgânicos. A resina ainda possui ligações covalentes a grupos trocadores iônicos e podem ser classificadas em inorgânicas ou orgânicas e ainda em naturais ou sintéticas. Caso esteja carregada negativamente, a resina é denominada catiônica, sendo chamada aniônica quando apresentar-se carregada positivamente.

Contudo, para a escolha da resina é necessário a consideração de alguns fatores como: estabilidade física, resistência química para as condições rigorosas de limpeza e seu baixo nível de interação não específica. O pH e a força iônica do tampão também são importantes para assegurar a eficácia do processo (ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY & CHROMATOFOCUSING - PRINCIPLES AND METHODS, 2004)

## **2.7. *Camellia sinensis* (L) O. Kuntze**

*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze (Figura 7) é uma árvore pertencente a família Theaceae, nativa de alguns países do oriente, podendo chegar até 15 metros de altura na natureza, no entanto quando cultivada comercialmente, as plantas são podadas em intervalos periódicos, para manter sua altura entre 60 a 90 cm facilitando assim, a colheita das folhas e brotos (MUKHOPADHYAY; MONDAL; CHAND, 2015).

**Figura 7.** *Camellia sinensis* (L) O. Kuntze



**Fonte:** LETTSOM JOHN COAKLEY, (1799)

Segundo Chang (2015), a produção do chá está geograficamente limitada a algumas áreas, pois a planta é cultivada em climas tropicais e subtropicais, tendo como requisitos para o plantio, temperaturas que variem de 10-30 °C (ou mais quentes), precipitação mínima anual de 1,250 milímetros, solos ácidos.

De acordo, com a colheita e o processo de fermentação e oxidação sofrido pelas folhas da *Camellia Sinensis* (L) O. Kuntze, podem ser obtidos quatro tipos de chás diferentes, sendo eles chás: branco, verde, preto, e oolong (HAJIAGHAALIPOUR et al., 2015)

O chá branco é feito dos brotos e folhas jovens, sofrem um processamento rápido de vaporização e secagem (HAJIAGHAALIPOUR et al., 2015).

O chá verde é produzido das folhas frescas da planta, pelo emprego de vaporização e secagem, o que mantém preservado seu teor de polifenóis e o torna mais rico em catequinas que os demais. O chá preto é derivado de folhas envelhecidas pela oxidação aeróbica das catequinas. Já o chá oolong ou é obtido após as folhas ficarem em repouso por duas a quatro horas, sendo depois aquecidas para que o processo oxidativo seja interrompido (SENGER; SCHWANKE; GOTTLIEB, 2010).

Vale ressaltar que o chá é uma das bebidas não alcoólicas mais consumidas no mundo, sendo uma bebida tradicional em alguns países (MILANI; MORGANO; CADORE, 2016).

Estima-se que a produção mundial de chá (preto, verde e instantâneo) aumentou significativamente em 2013 para 5,07 milhões de toneladas. A China continua sendo o maior produtor de chá, com uma produção de 1,9 milhões de toneladas. Esse valor perfaz mais de 38% do total mundial. A Índia, por outro lado, detém a posição de segundo maior produtor, com acréscimo atingindo 1,2 milhões de toneladas em 2013. Isso se deve, pelo aumento no consumo de chá, em particular na China, Índia e em outros países de economia emergente. A produção mundial de chá verde cresce 8,2% e estima-se que na China a produção alcance 2,97 milhões de toneladas em 2023 (CHANG, 2015).

Segundo Nishiyama et al., (2010) no Brasil o chá mais comercializado é o chá verde, principalmente os adicionados em saquinhos de papel filtro (sachê). Tendo como diferencial a maior quantidade de compostos polifenólicos, esta característica pode ser atribuída ao clima e ao solo do país.

O chá verde contém em sua composição química diversas classes de compostos fenólicos, além de cafeína, carboidratos, aminoácidos e algumas vitaminas. Além de minerais como: cálcio, magnésio, zinco, potássio e ferro (SENGER; SCHWANKE; GOTTLIEB, 2010; ZHANG et al., 2016). Pelos seus benefícios à saúde o chá verde é amplamente estudado por ter atividades antioxidante, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antimicrobiana e antimutagênica (DUARTE; MENARIM, 2006).

Segundo Baik et al., (2014) as catequinas representam aproximadamente 75 a 80% dos ingredientes do chá verde, sendo elas: epigallocatequina galato (EGCG), epigallocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG), epicatequina (EC), galocatequina (GC) e catequina (C).

Noh e colaboradores (2014) relatam que as catequinas do chá verde são utilizadas em uma vasta gama de produtos industriais, além de fornecer benefícios à saúde.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

- Selecionar, produzir e purificar tanase de *Aspergillus* utilizando fermentação em estado sólido (FES) das sementes de achachairú.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Selecionar culturas de *Aspergillus* em meio sólido com maior potencial para produção de tanase;
- Produzir tanase por fermentação em estado sólido utilizando sementes de achachairú;
- Estudar a influência das variáveis: concentração de resíduo, umidade e concentração de ácido tânico sobre a produção de tanase por fermentação em estado sólido, utilizando um planejamento fatorial ( $2^3$ ).
- Purificar a tanase por cromatografia de troca iônica e de exclusão molecular.
- Caracterizar a tanase purificada quanto ao pH, temperatura ótima e estabilidade térmica, efeito de íons, surfactantes e inibidores de protease.
- Avaliar o potencial antioxidante do Chá Verde frente a ação da enzima purificada.



## REFERÊNCIAS

ABOUBAKR, H. A.; EL-SAHN, M. A.; EL-BANNA, A. A. Some factors affecting tannase production by *Aspergillus niger* Van Tieghem. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 567, p. 559–567, 2013.

AGUILAR, C. N.; NCHEZ, G. G. RREZ-S. Review: Sources, Properties, Applications and Potential uses of Tannin Acyl Hydrolase. **Food Science and Technology International**, v. 7, n. 5, p. 373–382, 2001.

AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. S. Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins. **Rio de Janeiro: Interciência**, p. 64-8, 2003.

AWAD, G. E. A et al. Optimization of phytase production by *Penicillium purpurogenum* GE1 under solid state fermentation by using Box-Behnken design. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 1, p. 81–88, 2014.

BAIK, J. H. et al. Differential activities of fungi-derived tannases on biotransformation and substrate inhibition in green tea extract. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 118, n. 5, p. 546–553, 2014.

BARBOSA, W. et al. Germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de achachairu. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 263–266, 2008.

BATISTA, G. D. A. P. et al. Estudo prospectivo, duplo cego e cruzado da *Camellia sinensis* (chá verde) nas dislipidemias. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 93, n. 2, p. 128–134, 2009.

BATTESTIN, VANIA. **Produção, purificação, caracterização e aplicação da tanase de Paecilomyces variotii**. 2007. 86 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

BENIWAL, V. et al. Use of chickpea (*Cicer arietinum* L.) milling agrowaste for the production of tannase using co-cultures of *Aspergillus awamori* MTCC 9299 and *Aspergillus heteromorphus* MTCC 8818. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1277–1286, 2015.

BENNETT, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. In: MACHIDA, M.; GOMI, K. (Ed). ***Aspergillus: molecular biology and genomics***. Poole: Caister Academic Press, 2010. chap. 1, p. 1-17.

BHOITE, R. N.; MURTHY, P. S. Biodegradation of coffee pulp tannin by *Penicillium verrucosum* for production of tannase, statistical optimization and its application. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 727–735, 2014.

BIANCO, L.; PERROTTA, G. Methodologies and Perspectives of Proteomics Applied to Filamentous Fungi: From Sample Preparation to Secretome Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p. 5803–5829, 2015.

BRANDL, J.; ANDERSEN, M. R. Current state of genome-scale modeling in filamentous fungi. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 6, p. 1131-1139, 2015.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Sci Technol**, v. 28, p. 25–30, 1995.

BÜCK, A. et al. Model-based Control of Enzyme Yield in Solid-state Fermentation. **Procedia Engineering**, v. 102, p. 362–371, 2015.

BUENROSTRO-FIGUEROA, J. et al. Potential use of different agroindustrial by-products as supports for fungal ellagitannase production under solid-state fermentation. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, n. 4, p. 376–382, 2013.

CHANG, B.-V.; CHANG, Y.-M. Biodegradation of toxic chemicals by *Pleurotus eryngii* in submerged fermentation and solid-state fermentation. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, p. 1–7, 2014.

CHANG, K. World tea production and trade Current and future development. **Food and Agriculture Organisation**, 2015.

CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M. et al. Biotechnological Advances and Challenges of Tannase: An Overview. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 2, p. 445–459, 2012.

CHOI, J.-M.; HAN, S.-S.; KIM, H.-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1443-

1454, 2015.

CRESTINI, C.; LANGE, H. A novel and efficient immobilised tannase coated by the layer-by-layer technique in the hydrolysis of gallotannins and ellagitannins. **Microchemical Journal**, v. 123, p. 139–147, 2015.

DEMIR, H.; TARI, C. Valorization of wheat bran for the production of polygalacturonase in SSF of *Aspergillus sojae*. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 302–309, 2014.

DUARTE, M. R.; MENARIM, D. O. Morfodiagnose da anatomia foliar e caulinar de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 545–551, 2006.

FALCÃO, L.; ARAÚJO, M. E. M. Tannins characterisation in new and historic vegetable tanned leathers fibres by spot tests. **Journal of Cultural Heritage**, v. 12, n. 2, p. 149–156, 2011.

FEKETE, S. et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 113, p. 43–55, 2015.

GAYEN, S.; GHOSH, U. Purification and Characterization of Tannin Acyl Hydrolase Produced by Mixed Solid State Fermentation of Wheat Bran and Marigold Flower by *Penicillium notatum* NCIM 923. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

GAYEN, S.; GHOSH, U.. Purification and characterization of tannin acyl hydrolase produced by mixed solid state fermentation of wheat bran and marigold flower by *Penicillium notatum* NCIM 923. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

HAIAGHAALIPOUR, F. et al. White tea (*Camellia sinensis*) inhibits proliferation of the colon cancer cell line, HT-29, activates caspases and protects DNA of normal cells against oxidative damage. **Food Chemistry**, v. 169, p. 401–410, 2015.

HOUBRAKEN, J.; VRIES, R. P. DE; SAMSON, R. A. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Advances in Applied Microbiology**, v. 86: p. 199–249, 2014.

HONG, Y.-H. et al. Physiological effects of formulation containing tannase-converted green tea extract on skin care: physical stability, collagenase, elastase, and tyrosinase activities. **Integrative Medicine Research**, v. 3, n. 1, p. 25–33, 2014.

HUBKA, V. et al. Revision of *Aspergillus* section *Flavipedes*: seven new species and proposal of section *Jani* sect. nov. **Mycologia**, v. 107, n. 1, p. 169-208, 2015.

IBCE - Instituto Brasileiro de Comércio Exterior. Perfil de mercado: Copoazú y Achachairú. 2010. Disponível em: <www.ibce.org.bo>. Acesso em: 25 julho de 2015.

ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY & CHROMATOFOCUSING - PRINCIPLES AND METHODS. Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing - Principles and Methods. **GE Healthcare**, p. 1–188, 2004.

JANA, A. et al. Structural characterization of thermostable, solvent tolerant, cytosafe tannase from *Bacillus subtilis* PAB2. **Biochemical Engineering Journal**, v. 77, p. 161–170, 2013.

JANA, A. et al. Biosynthesis, structural architecture and biotechnological potential of bacterial tannase: A molecular advancement. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 327–340, 2014.

JANICK, Jules; PAULL, Robert E. (Ed.). **The encyclopedia of fruit and nuts**. CABI, 2008.

JIN, W. et al. Improving *Aspergillus niger* Tannase Yield by N + Ion Beam Implantation. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v. 56, n. February, p. 135–142, 2013.

JIN, X. et al. Separation and purification of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) from green tea using combined macroporous resin and polyamide column chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 1002, p. 113–122, 2015.

KARIMI, A. et al. Porosity changes during packed bed solid-state fermentation. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, n. 6, p. 4022–4027, 2014.

KLONGSIRIWET, C. et al. Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 5, n. 3, p. 127–134,

2015.

KUMAR, S.; SHARMA, S.; CHATTOPADHYAY, S. K. The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia* and related genera: Ethnobotanical and therapeutic importance. **Fitoterapia**, v. 89, n. 1, p. 86–125, 2013.

LAGHI, L. et al. Fingerprint of enological tannins by multiple techniques approach. **Food Chemistry**, v. 121, n. 3, p. 783–788, 2010.

LIM, T. K. Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants. **Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants**, v. 2, p. 867–878, 2012.

LIMA, J. S. DE et al. Production , Characterization of Tannase from *Penicillium montanense* URM 6286 under SSF Using Agroindustrial Wastes , and Application in the Clarification of Grape Juice ( *Vitis vinifera* L .). **The Scientific World Journal**. v., 2014.

LORENZI, H. et al. **Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas**. p. 160, 2006.

LETTSON J. C. **The Natural History of the Tea-Tree : With Observations on the Medical Qualities of Tea, and Effects of Tea-Drinking**. Cambridge Library Collection, 1799, 82 p.

MA, W. et al. A review on astringency and bitterness perception of tannins in wine. **Trends in Food Science & Technology**, v. 40, n. 1, p. 6–19, 2014a.

MA, W. et al. Production and Partial Purification of Tannase from *Aspergillus ficuum* Gim 3.6. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 45, n. 8, p. 754–768, 2014b.

MACHADO, I.; TEIXEIRA, J. A.; RODRÍGUEZ-COUTO, S. Semi-solid-state fermentation: A promising alternative for neomycin production by the actinomycete *Streptomyces fradiae*. **Journal of Biotechnology**, v. 165, n. 3-4, p. 195–200, 2013.

MADEIRA, J. V.; MACEDO, J. A.; MACEDO, G. A. Detoxification of castor bean residues and the simultaneous production of tannase and phytase by solid-state fermentation using *Paecilomyces variotii*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 15, p. 7343–7348, 2011.

MANDAL, Sudipta; GHOSH, Koushik. Optimization of tannase production and improvement of nutritional quality of two potential low-priced plant feedstuffs under solid state fermentation by *Pichia kudriavzevii* isolated from fish gut. **Food biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 86-103, 2013.

MAO, Y. et al. The mass transfer of sugar in sweet sorghum stalks for solid-state fermentation process. **Fuel**, v. 144, p. 90–95, 2015.

MARQUES, E. D. S. et al. Genotoxicity assessment of *Garcinia achachairu* Rusby (Clusiaceae) extract in mammalian cells in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 2, p. 362–366, 2012.

MARTINS, S. et al. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 365–373, 2011.

MATA-GÓMEZ, M. et al. Gallic Acid Production with Mouldy Polyurethane Particles Obtained from Solid State Culture of *Aspergillus niger* GH1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2015.

MAULINI-DURAN, C. et al. Gaseous emissions during the solid state fermentation of different wastes for enzyme production at pilot scale. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 211–218, 2015.

MILANI, R. F.; MORGANO, M. A.; CADORE, S. Trace elements in *Camellia sinensis* marketed in southeastern Brazil: Extraction from tea leaves to beverages and dietary exposure. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 491–498, 2016.

MIZUNO, T.; SHIONO, Y.; KOSEKI, T. Biochemical characterization of *Aspergillus oryzae* native tannase and the recombinant enzyme expressed in *Pichia pastoris*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 118, n. 4, p. 392–395, 2014.

MOLIN, M. M. D. et al. Phytochemical analysis and antinociceptive properties of the seeds of *Garcinia achachairu*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, n. 4, p. 623–631, 2012.

MUKHOPADHYAY, M.; MONDAL, T. K.; CHAND, P. K. Biotechnological advances in

tea (*Camellia sinensis* [L.] O. Kuntze): a review. **Plant Cell Reports**, n. February 2016, 2015.

MURUGAN, K.; SARAVANABABU, S.; ARUNACHALAM, M. Screening of tannin acyl hydrolase (E.C.3.1.1.20) producing tannery effluent fungal isolates using simple agar plate and SmF process. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 4, p. 946–949, 2007.

NI, H. et al. Biotransformation of tea catechins using *Aspergillus niger* tannase prepared by solid state fermentation on tea byproduct. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 1206–1213, 2015.

NIE, G. et al. Development of a tannase biocatalyst based on bio-imprinting for the production of propyl gallate by transesterification in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 32–37, 2012.

NIERO, R. et al. Gastroprotective effects of extracts and guttiferone A isolated from *Garcinia achachairu* Rusby (Clusiaceae) against experimentally induced gastric lesions in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 385, n. 11, p. 1103–1109, 2012.

NOH, D. O.; CHOI, H. S.; SUH, H. J. Catechine biotransformation by tannase with sequential addition of substrate. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 2, p. 271–276, 2014.

NUNES, J. S. **Propagación del achachairú (*Rheedia achachairu* Rusby) por estacas. 2004.** 17f. Monografía (Graduação) – Carrera de Ciencia y Producción Agropecuária, Zamorano, 2004.

OLIVAS-AGUIRRE, F. J. et al. Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. **Nutrición Hospitalaria**. v. 31, n. 1, p. 55–66, 2015.

ORDOÑEZ, R. M. et al. Production of tannase from wood-degrading fungus using as substrate plant residues: Purification and characterization. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 10, p. 2325–2333, 2011.

PANESAR, R.; KAUR, S.; PANESAR, P. S. Production of microbial pigments utilizing

agro-industrial waste: a review. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 70–76, 2015.

Peterson SW. Phylogenetic analyses of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. **Mycologia**, v. 100, p. 205–226, 2008.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I.. The genus *Aspergillus*. **The genus *Aspergillus***, 1965.

REDONDO, L. M. et al. Anaerobe Hydrolyzable and condensed tannins resistance in *Clostridium perfringens*. **Anaerobe**. v. 34, p. 139-145, 2015.

REN, B. et al. Crystal structure of tannase from *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, n. 15, p. 2737–2751, 2013.

RENOVATO, J. et al. Differential properties of *Aspergillus niger* tannase produced under solid-state and submerged fermentations. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 1, p. 382–395, 2011.

RIUL, A. J. et al. Characterization of a glucose- and solvent-tolerant extracellular tannase from *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85-86, p. 126–133, 2013.

ROCHA, L. A. et al. Screening of gellan gum as an ionic and hydrophobic chromatographic matrix for biomolecules purification. **Separation and Purification Technology**, v. 132, p. 452–460, 2014.

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**, v. 96, n. 11, p. 1223–1228, 2005.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 141–173, 2014.

SÁYAGO-AYERDI, S. G. et al. Mexican “ Ataulfo ” mango ( *Mangifera indica* L ) as a source of hydrolyzable tannins . Analysis by MALDI-TOF / TOF MS. **Food Research International**. v. 51, p. 188–194, 2013.



SEKOWSKI, S. et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Biophysical studies of interaction between hydrolysable tannins isolated from *Oenothera gigas* and *Geranium sanguineum* with human serum albumin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 623–628, 2014.

SELWAL, M. K. et al. Tannase production by *Penicillium atramentosum* KM under SSF and its applications in wine clarification and tea cream solubilization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 374–387, 2011.

SELWAL, M. K.; SELWAL, K. K. High-level tannase production by *Penicillium atramentosum* KM using agro residues under submerged fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 139–148, 2012.

SENA, A. R. DE et al. Production, Characterization and Application of a Thermostable Tannase from *Pestalotiopsis guepinii* URM 7114. **Food Technol. Biotechnol.** v. 52, n. 4, p. 459–467, 2014.

SENGER, A. E. V.; SCHWANKE, C. H. A; GOTTLIEB, M. G. V. Green tea (*Camellia sinensis*) and its functional properties on transmissible chronic diseases. **Scientia Medica**, v. 20, n. 51, p. 292–300, 2010.

SHARMA, K. P.; JOHN, P. J. Purification and characterization of tannase and tannase gene from *Enterobacter* sp. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 240–244, 2011.

SHARMA, N. K. et al. Production of Tannase Under Solid-State Fermentation and Its Application in Detannification of *Guava Juice*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 281–290, 2013.

SHARMA, S.; BHAT, T. K.; DAWRA, R. K. Isolation, purification and properties of tannase from *Aspergillus niger* van Tieghem. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, n. 6, p. 673–677, 1999.

SHARMA, S.; BHAT, T. K.; DAWRA, R. K. A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. **Analytical biochemistry**, v. 279, n. 1, p. 85–89, 2000.

SHARPE, E. et al. Effects of brewing conditions on the antioxidant capacity of

twenty-four commercial green tea varieties. **Food Chemistry**, v. 192, p. 380–387, 2016.

SINDHU, R. Solid-state Fermentation for the Production of Poly(hydroxyalkanoates). **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 29, n. 2, p. 173–181, 2015.

SIVASHANMUGAM, K.; JAYARAMAN, G. Production and partial purification of extracellular tannase by *Klebsiella pneumoniae* MTCC 7162 isolated from tannery effluent. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 8, p. 1364–1374, 2011.

SMITH, P. K. et al. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985.

SOUZA, P. N. D. C. et al. Optimization of culture conditions for tannase production by *Aspergillus* sp. gm4 in solid state fermentation. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 37, n. 1, p. 23, 2015.

SOPRANO, E.; SILVA, T. A.; KOLLER, O. L.; BENDER, R. J. Bacupari boliviano (*Garcinia humilis* Vhal): uma opção de cultivo para o litoral catarinense. In: **XXI Congresso Brasileiro de Fruticultura**, Natal-RN, 2010.

SPIER, M. R. et al. Phytase production using citric pulp and other residues of the agroIndustry in SSF by fungal isolates. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 2, p. 178–182, 2008.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 777–780, 1982.

TERRAZAS, P. M. et al. Benzophenone guttiferone A from *Garcinia achachairu* Rusby (Clusiaceae) Presents Genotoxic Effects in Different Cells of Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e76485, 2013.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146–161, 2013.

VERLOOP, A J. W. et al. Altering the phenolics profile of green tea using exogenous oxidases. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1197–1206, 2015.

VISWANATH, V. et al. Biosynthesis of tannase from cashew testa using *Aspergillus niger* MTCC5889 by solid state fermentation. **Journal of Food Science and Technology**, 2015.

WANG, F. et al. Tea stalks - A novel agro-residue for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* JMU-TS528. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 897–904, 2013.

XIAO, A. et al. Statistical optimization for tannase production by *Aspergillus tubingensis* in solid-state fermentation using tea stalks. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 143–147, 2015.

YAO, J. et al. Production, characterization and applications of tannase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 137–147, 2014a.

YAO, J. et al. Immobilization and characterization of tannase from a metagenomic library and its use for removal of tannins from green tea infusion. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 80–86, 2014b.

ZAKIPOUR-MOLKABADI, E.; HAMIDI-ESFAHANI, Z.; SAHARI, M. A. A New Native Source of Tannase Producer , *Penicillium* sp . EZ-ZH190 : Characterization of the Enzyme. **Iranian Journal of Biotechnology**. v. 11, n. 4, p. 244–250, 2013.

ZENEBON, Odair; PASCUET, Neus Sadocco; TIGLEA, Paulo. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. **São Paulo: Instituto Adolfo Lutz**, p. 1020, 2008.

ZHANG, Y.-N. et al. Improving the sweet aftertaste of green tea infusion with tannase. **Food Chemistry**, v. 192, p. 470–476, 2016.

## Capítulo 1

Aplicação da tanase produzida por *Aspergillus melleus* URM 5827 por fermentação em estado sólido utilizando sementes de achachairú (*Garcinia humilis* (Vahl) C. D. Adam) no melhoramento do potencial antioxidante do chá verde (*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze)

Tatiana Pereira Shiu Lin Liu<sup>1</sup>, Raquel Pedrosa Bezerra<sup>1</sup>, Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa<sup>1</sup>, Polyanna Nunes Herculano<sup>1</sup>, Cristina Maria de Souza Motta<sup>2</sup>, Ana Lucia Figueiredo Porto<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos – CEP: 52171-900 – Recife- PE – Brasil.

<sup>2</sup>Department of Mycology, Federal University of Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

### Resumo

A produção da tanase e as características bioquímicas da enzima purificada foram avaliadas. Das 42 amostras de *Aspergillus* avaliadas para seleção do potencial de produção de tanase, o *Aspergillus melleus* URM 5827 apresentou o melhor resultado de 2,97 mm. A produção foi avaliada utilizando um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>. A atividade máxima obtida foi de 452,55 U/gss nas condições de 5,0 g de sementes de achachairú, umidade inicial de 60% e 2,0% de ácido tânico em 48 horas de fermentação. A enzima purificada apresentou peso molecular estimado de 69,52 kDa, temperatura ótima de 40°C, pH ótimo 5,5 e estabilidade térmica aos 30°C. Em relação aos íons, surfactantes e inibidores de protease a tanase foi inibida na presença de ZnCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, triton X-100, SDS, e foi reduzida na presença de CaCl<sub>2</sub>, KCl, NaCl, MgSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, Tween 20, Tween 80, EDTA e β-mercaptoetanol. A tanase aumentou a atividade antioxidante do chá verde significativamente. Os resultados obtidos no presente estudo mostram o potencial promissor da tanase produzida por *Aspergillus melleus* URM 5827 utilizando sementes de achachairú como substrato, e na sua utilização como adjuvantes no melhoramento do potencial antioxidante do chá verde. Ambos componentes foram utilizados pela primeira vez para produção de tanase. Entretanto, ainda se faz necessário novos estudos quanto a otimização dos parâmetros para produção em biorreator, para determinar a viabilidade comercial da enzima em escala industrial.

Palavras-chave: *Aspergillus melleus*, Tanase, *Garcinia humilis*, Fermentação em estado sólido, Caracterização, Purificação, Chá Verde.

\*Autor correspondente: Ana Lúcia Figueiredo Porto. Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos – CEP: 52171-900 – Recife- PE – Brasil. fone: (+5581) 33206345, Fax:(+5581) 33206388. email: analuporto@yahoo.com.br

## 1. Introdução

O achachairuzeiro (*Garcinia humilis* (Vahl) C. D. Adam) é uma espécie frutífera originária da floresta tropical de média altitude da Bolívia. Atualmente, as plantações podem ser encontradas no estado nativo e semi-cultivado. O gênero possui aproximadamente 1300 espécies, sendo geralmente conhecido popularmente como: achachairú, chachairu, tatairu e bacupari boliviano (Lorenzi et al., 2006).

Segundo dados Bolivianos as importações mundiais do produto ainda não são específicas. Contudo, os principais países interessados na importação são: China, Rússia e Alemanha. Diante disto já existem iniciativas dos produtores bolivianos não só para aumentar a produção e qualidade, mas também o aproveitamento na indústria de sucos, sorvetes, conservas e outros produtos. É por esta razão que nos últimos anos houve um aumento de interesse no estabelecimento de plantios comerciais da fruta, objetivando sua industrialização e exportação (“IBCE – Instituto Brasileiro de Comércio Exterior”, 2010).

O processo e a produção agroindustrial sempre resultam em algum tipo de resíduo, o qual pode ser sólido, líquido ou gasoso (Panesar *et al.*, 2015). Tais resíduos podem causar problemas ambientais quanto a sua eliminação e tratamento (Viswanath *et al.*, 2015). A utilização da biotecnologia surge, com a possibilidade em utilizar esses resíduos para gerar substâncias com alto valor agregado (Panesar *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2011).

A fermentação em estado sólido (FES) tornou-se uma tecnologia promissora por utilizar resíduos agroindustriais para produção de biomoléculas (MAO *et al.*, 2015). Este bioprocessos é realizado na ausência (ou quase ausência) de água livre. No entanto, o substrato deve possuir umidade suficiente para proporcionar o crescimento microbiano. A utilização da fermentação em estado sólido apresenta como principal vantagem o baixo consumo de energia, baixa produção de águas residuais, redução nos custos de processamento, maior produtividade, dentre outras (Thomas *et al.*, 2013; Demir & Tari, 2014).

Taninos são metabolitos secundários distribuídos em todas as partes da planta, sendo o quarto componente mais abundante depois da celulose, hemicelulose e lignina (Sharma & John, 2011). Os taninos podem ser divididos em

dois grupos de acordo com suas características estruturais em: taninos condensados e taninos hidrolisáveis (Redondo *et al.*, 2015). Essas substâncias são responsáveis pela inibição do crescimento de inúmeros micro-organismos, entretanto, alguns micro-organismos produzem tanase como mecanismo necessário para superar o efeito inibitório (Chávez-González *et al.*, 2012).

As enzimas são biocatalisadores de imenso potencial, sendo cada vez mais utilizadas em indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosmético, em substituição aos catalisadores químicos, os quais empregam reagentes corrosivos e de alta energia (Nie *et al.*, 2012). Dentre elas, a tanase (tanino acil hidrolase - EC 3.1.1.20) é uma enzima que hidrolisa ligações éster de taninos hidrolisáveis. Os produtos finais da reação são glicose e ácido gálico (Yao *et al.*, 2014b).

A tanase pode ser obtida a partir de fonte animal, vegetal e microbiológica, esta última apresenta maior importância, uma vez que as enzimas produzidas desta maneira são mais estáveis (Yao *et al.*, 2014a). A tanase é uma enzima produzida extracelularmente, induzida em fungos e bactérias na presença de ácido tânico (Ren *et al.*, 2013).

A tanase é empregada nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e agropecuárias. É válido também ressaltar outros empregos como por exemplo: no processamento de couro, na fabricação de chá instantâneo, agentes clarificador em sucos, cervejas, alguns vinhos e refrigerante que tenha café como componente (Selwal *et al.*, 2011). O interesse na produção de tanase a partir de resíduos agrícolas ou agroindústrias tem aumentado ultimamente por apresentar um baixo custo de produção (Xiao *et al.*, 2015).

O chá verde é produzido a partir das folhas da *Camellia sinensis* (L) O. Kuntze, trata-se de uma bebida saudável que é consumida nível global. Um dos motivos pelo qual existe este sucesso comercial reflete suas propriedades medicinais, tais quais: antioxidantes, anti-inflamatórias, antihipertensivas, antidiabéticas e antimutagênicas (Senger *et al.*, 2010).

Frente ao crescente cenário de uso e exportação deste agroproduto, o presente estudo teve como objetivo a produção e purificação da tanase, utilizando fermentação em estado sólido em sementes de achaichairú (*Garcinia humilis* (Vahl)

C. D. Adam) e sua aplicação para o melhoramento na atividade antioxidante de chá verde.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Micro-organismos**

As 42 cepas de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* estão preservadas em óleo na Micoteca URM (University Recife Mycologia) do Departamento de Micologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

Para a manutenção dos fungos foi utilizado o meio de cultura Ágar Extrato de Malte e para esporulação foi utilizado o meio de cultura Ágar Czapek.

### **2.2. Seleção dos Fungos Produtores de Tanase**

Os fungos foram submetidos a uma seleção utilizando a metodologia descrita por Murugan *et al.*, (2007). As culturas com sete dias de crescimento foram repicadas centralmente em placas de Petri, contendo o meio mínimo Ágar Czapek Dox contendo 0,5% de ácido tânico (esterilizado em filtro Millipore de 0,22 µm) como única fonte de carbono. As placas foram incubadas a 30°C durante 7 dias, em câmara de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD TECNAL TE-40/ Recife-Brasil). As culturas com potencial para produção de tanase foram evidenciadas, pela formação de halo de degradação ao redor da colônia. O potencial de degradação do ácido tânico foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Teather & Wood, (1982) e adaptado para a enzima estudada. O índice para potenciais produtores de tanase (It) foi determinado pela relação entre o diâmetro do halo de degradação (mm) e o diâmetro da colônia (mm). Foram selecionados os fungos que obtiveram halo de degradação maior que 1,90 mm.

### **2.3. Sementes do Achachairú (*Garcinia humilis* (Vahl) C. D. Adam)**

Os frutos do achachairuzeiro foram adquiridos no Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco – CEASA/PE, nos meses de dezembro a abril e levados para o Laboratório de Tecnologia de Bioativos - LABTECBIO da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, onde foram devidamente processados. A polpa foi retirada das sementes manualmente, as sementes foram lavadas e

mantidas durante uma hora numa solução de hipoclorito de sódio a 2%, e secas a 65°C até peso constante e, em seguida, armazenadas em recipientes de plástico hermeticamente fechados. As sementes de achachairu foram utilizadas como substrato, para a realização da FES, o tamanho das partículas foram padronizadas entre 3 e 8 mm para proporcionar uma melhor absorção de nutrientes, facilitando o transporte de oxigênio (Spier *et al.*, 2008)

#### **2.4. Produção de Tanase por Fermentação em Estado Sólido (FES)**

O fungo que obteve o melhor resultado na seleção (item 2.2), foi utilizado para a produção de tanase. A fermentação foi realizada em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 ml, contendo 5 g das sementes de achachairú, inicialmente esterilizado a 60°C durante 120 minutos, em seguida, em luz ultravioleta (UV) durante 120 minutos. O inóculo foi preparado, através da suspensão dos esporos presentes em tubos de Ágar Czapek em solução de tween 80% em água destilada até obtenção de  $10^7$  esporos por grama por contagem em câmara de Neubauer. A solução de 2% ácido tânico foi preparada em solução nutriente, contendo 0,5% de extrato de levedura e 1% de dextrose em tampão de fosfato de sódio (10 mM, pH 5,5) (Viswanath *et al.*, 2015). A umidade inicial de 60% foi determinada de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (Zenebon *et al.*, 2008). Os frascos foram incubados a 30°C em BOD (câmara de Demanda Bioquímica de Oxigênio) (TECNAL TE-401/ Recife-Brasil) no tempo de 48 horas.

#### **2.5. Delineamento Experimental e Análise Estatística**

A influência da concentração do substrato, umidade inicial e a concentração do ácido tânico foram avaliadas realizando um planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) (Tabela 1). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *Statistica 8.0*.

#### **2.6. Extração da Enzima**

O tempo de fermentação para o experimento foi de até 96 horas. O conteúdo total dos frascos retirados para extração em intervalos regulares (24 h). Foi pesado 3,0 gramas do substrato fermentado e misturado com 18 ml de tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 5,5), macerado e filtrado em papel de filtro (Whatman nº. 1)



utilizando bomba de vácuo. O extrato foi centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi denominado como extrato bruto (EB) e utilizado para posteriores determinações analíticas (Sabu *et al.*, 2005).

## **2.7. Dosagem de Proteína**

A concentração de proteína total foi estimada seguindo o método descrito por Smith *et al.*, (1985). Foi realizada uma curva na concentrações de 100 para 1000 ug / ml, tendo como padrão albumina de soro bovino, as amostras foram lidas em espectrofotômetro (GE, Ultrospec 7000, Reino Unido).

## **2.8. Atividade de tanase.**

A atividade tanase foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Sharma *et al.*, (2000), modificada por Ordoñez *et al.*, (2011). A atividade foi realizada utilizando 100 µl do extrato enzimático e 100 µl de solução de ácido tânico (0,3 mM) em tampão de fosfato de sódio (10 mM, pH 5,5), incubado durante 30 minutos a 30°C. Em seguida, foram adicionados 300 µl de solução de rhodanina metanólica (0,667% w / v) e 100 µl de KOH (500 mM). Para a diluição das amostras foi adicionado 900 µl de água destilada. Após incubação durante 10 minutos a 30° C as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 520 nm. A atividade de tanase foi definida como a quantidade de enzima requerida para catalisar a produção de 1 µmol de ácido gálico por minuto sobre essas condições. A atividade específica foi expressa em unidades por grama de substrato na base seca (U/gss) (Mata-Gómez *et al.*, 2015).

## **2.9. Cromatografias**

### **2.9.1. Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex.**

O ensaio foi realizado utilizando um volume de 100 mL de EB, que foi precipitado em 70% de acetona, e depois ressuspenso em 5 mL de tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 5,5). Uma alíquota de 1 mL da amostra foi então submetida a cromatografia em resina catiônica de trocador aniônico, segundo Sharma *et al.*, (1999) modificado. A coluna de vidro (15,5 x 2,5 cm) foi empacotada com resina DEAE- Sephadex G-50, previamente ativada com soluções de HCl e NaOH a 0,1 M respectivamente, equilibrada e lavada com 100 mL de tampão fosfato de sódio

(10mM, pH 5,5). A eluição foi realizada a um fluxo de 1,0 ml / min, foram recolhidas frações (1 mL) em tubos de ensaio. As amostras coletadas foram lidas em espectrofotômetro a 280nm. Posteriormente os picos foram submetidos a atividade e tanase.

### **2.9.2. Análise de filtração em gel da protease purificada colagenolítica.**

A análise de filtração em gel da protease purificada colagenolítica foi realizada utilizando PBS num Avant 25 Sistema Äkta (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) em Superdex 75 (HR10 / 300GL), PC 3.2 / 30 da coluna de acordo com as instruções do fabricante. A calibração da coluna foi realizada usando uma mistura de filtração em gel marcadores de peso molecular (1 mg / mL): albumina de soro bovino, anidrase carbônica e albumina de ovo de galinha e um inibidor de tripsina. A curva padrão plotado usando o software UNICORN-6.0 seguiu a equação  $y = -7,674 + 134,7 (R^2 = 0,991)$ .

### **2.10. Eletroforese em SDS- PAGE**

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) na presença de sulfato de dodecilo de sódio (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com Laemmli (1970), utilizando 10% (w / v) de gel. Os marcadores moleculares (Sigma <sup>TM</sup> Marcador de gama alta, peso mol 36,000-200,000 Da): (A) miosina cardíaca porcina (200.000), (B)  $\beta$ -galactosidase de E. coli (116000), (C) A fosforilase B, músculo de coelho (97000), (D) de albumina, de soro bovino (66000), (E) desidrogenase glutâmico, fígado de bovino (55000), (F) de ovalbumina de ovo de galinha (45,000), (G), da desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato, músculo de coelho (36000). As bandas de proteínas foram coradas com Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250 seguido de coloração em prata (método sensível para as proteínas).

### **2.11. Efeitos do pH e temperatura na atividade da enzima purificada.**

O efeito do pH sobre a atividade da enzima foi observado utilizando diferentes tampões a 0,2 M ( Acetato de sódio 3,0-5,0; Citrato fosfato 5,0-7,0; Tris- HCl 7,0- 8,5; Glicina NaOH 10,0). A temperatura ótima foi determinada no intervalo de 20-80°C pela incubação da mistura de reação no pH ótimo. A termoestabilidade foi avaliada

incubando-se a enzima nas diferentes temperaturas de 20-80°C durante 30 min. Em seguida a atividade foi determinada de acordo com o item 2.8.

### **2.12. Efeitos de diferentes íons, surfactantes e inibidores de protease na atividade da enzima purificada.**

Para avaliar os efeitos das diferentes substâncias sobre a atividade da enzima purificada, a enzima foi incubada durante 30min a 30°C com soluções contendo 10 mM de CaCl<sub>2</sub>, KCl, NaCl, ZnCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, e com os surfactantes na concentração de 2%, Tween 20, Tween 80, Dodecil sulfato de sódio (SDS) e Triton X-100. Os efeitos do ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e β-mercaptoetanol também foram avaliados. Em seguida a atividade foi determinada de acordo com o item 2.8.

### **2.13. Efeito da enzima purificada no potencial antioxidante do chá verde.**

O teste foi realizado utilizando 20 µl da enzima purificada e 20 µl do chá verde, este foi homogeneizado utilizando o homogeneizador de soluções (TECNAL AP 22/ Recife-Brasil) na rotação de 30 rpm a temperatura de 30°C. A dosagem da atividade antioxidante foi determinada pelo método de Brand-Williams et al. O teste foi realizado em microplaca de 96 poços, onde foi adicionado em cada poço, 200 µl do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), em seguida foi adicionado 20 µl da enzima purificada com o chá verde. As leituras foram realizadas no leitor de microplaca (iMark™ Microplate Absorbance Reader/ Recife-Brasil) a 595 nm. A atividade antioxidante foi dosada nos intervalos de 30, 40, 50, 60, 70 e 80 minutos

## **3. Resultados e discussão.**

Das 42 culturas fúngicas submetidas ao "screening" em meio mínimo Ágar Czapek Dox acrescido de ácido tânico, todas produziram halo de degradação como pode ser observado na tabela 2. Isto se deve a utilização do tanino presente no meio pelo micro-organismo como fonte de carbono para o seu crescimento (Mizuno; *et al.*, 2014).

Os fungos que obtiveram halo de degradação maior que 1,90 mm foram: *A. janus* URM 4456, *A. aculeatus* URM 4953, *A. carbonarius* URM 5012, *A. versicolor* URM 5701 e *A. melleus* URM 5827, que apresentaram índice enzimático de tanase

de 1,99 mm; 1,95 mm; 2,13 mm; 2,48 mm e 2,97 mm respectivamente. O *A. melleus* URM 5827 obteve halo superior aos demais, sendo escolhido para a realização do estudo.

Bhoite & Murthy, (2014), utilizando meio de ágar contendo ácido tânico para selecionar fungos produtores de tanase, relatam que a relação entre o diâmetro do halo de degradação e o diâmetro da colônia pode ser utilizada como indicador da eficiência do micro-organismo para secretar tanase.

Souza *et al.*, (2015) relata que, os fungos do gênero *Aspergillus* são amplamente estudados para produção de tanase. Yao *et al.*, (2014a) descreve que além dos fungos do gênero *Aspergillus* outros fungos como: *Penicillium*, *Fusarium* e *Trichoderma*, também são empregados para produção de tanase.

Dentre os micro-organismos citados o *A. melleus* URM 5827 obteve o melhor resultado, sendo escolhido para nossos estudos. A atividade máxima da enzima foi de 339,03 U/gss, obtida no tempo de 48 horas, sob as condições de 5,0 g de substrato com umidade inicial de 60%, utilizando 2,0% de ácido tânico (Tabela 3).

Xiao *et al.*, (2015) em seus estudos de produção de tanase utilizando a fermentação em estado sólido do pó de talo de chá por *A. tubigensis* e observaram uma produção de 84,24 U/gss de tanase obtidas em 118 horas. Mata-Gómez *et al.*, (2015) utilizaram *A. niger* GH1 em fermentação sólida tendo como suporte a espuma de poliuretano, a produção da enzima atingiu o valor de 130 U/gss em 24 horas. Para *A. ficuum* (Gim 3.6), usando farelo de trigo como substrato, a produção de tanase foi de 8,65 U/gss em 72 horas (Ma *et al.*, 2014b). Sharma *et al.*, (2013) utilizou *A. niger*, tendo como substrato de fermentação a borra de chá, por um período de 48 horas, a produção de enzima foi de apenas 1,86 U/gss. Ainda para a fermentação de *A. niger* JMU-TS528, tendo com substrato talos de chá com 96 horas de fermentação, a melhor produção foi de 62 U/gds (Wang *et al.*, 2013). Desta forma as sementes de achachairú demonstram ser um bom substrato para a produção de tanase apresentando uma produção superior ao relatado na literatura.

Quanto ao tempo de produção, nosso trabalho está de acordo com o relatado pelo grupo de pesquisa de Sharma *et al.*, (2013), onde a tanase é produzida na fase primária de crescimento até as primeiras 48 horas e com o decorrer do tempo a

atividade diminui. Essas concentrações podem variar, de acordo com o micro-organismo e o substrato utilizado para a fermentação. Além disso, para a produção industrial de enzimas, o micro-organismo ideal é aquele que obtenha a máxima produção num curto período de tempo, pois esse fator minimiza os custos produtivos (Lima *et al.*, 2014).

A principal variável que mais influenciou positivamente a produção da tanase foi a concentração de ácido tânico, ou seja, maiores atividades da enzima podem ser obtidas quando altas concentrações de ácido tânico são utilizadas, pode-se observar que a interação da umidade inicial e a concentração de ácido tânico também influenciaram significativamente a produção (Figura 1.).

Este resultado corrobora com as considerações feitas por Yao *et al.*,(2014a) e Mandal & Ghosh,(2013), relatam que o principal fator para a expressão da atividade de tanase é a presença de um indutor, como o ácido tânico, este em determinadas concentrações induz positivamente a produção da enzima. Em relação a variável umidade está também foi significativa, segundo Wang *et al.*,(2013) o teor de umidade do substrato também é um fator importante que determina o crescimento e a produção da enzima. Enquanto que a variável substrato não foi um fator significativo para produção da enzima.

Após precipitação do EB, uma alíquota foi injetada na Superdex G-75, cromatografia de exclusão molecular. A (Figura 2A.) mostra o cromatograma obtido, que revelou um único pico de atividade e foi denominado tanase purificada a partir de *A. melleus* URM 5827 utilizando sementes de achachairú. O pico apresentou um peso molecular de 69,52 kDa. Posteriormente, este pico foi submetido a eletroforese SDS-PAGE a enzima demonstrou peso de 66,5 kDa (Figura 2B.)

A tanase de *A.niger* MTCC5889 avaliada por SDS-PAGE obteve peso molecular de 89,9 kDa (Viswanath *et al.*, 2015). A enzima recombinante (rAoTanA) e nativa (AoTanA) produzidas por *A. oryzae* e expressas por *Pichia pastoris* obtiveram peso moleculares de 45-80 e 45-75 kDa, respectivamente e após N-desglicosilação os pesos apresentaram valores de 33-30 kDa e 34-30 kDa, respectivamente (MIZUNO *et al.*, 2014). A tanase produzida por *A. phoenicis* apresentou peso molecular de 218 kDa quando estimado por filtrado em gel, e quando analisada a

6% de SDS-PAGE apresentou subunidades de 93,3 kDa e 120,2 kDa (Riul *et al.*, 2013). Os resultados de purificação obtidos corroboram com a literatura disponível, que relatam pesos moleculares para tanase na faixa de 50 e 320 kDa (Crestini & Lange, 2015).

O pH ótimo para a enzima purificada foi pH 5,5 (Figura 3A.), tendo 40 °C como temperatura ótima (Figura 3B.). Quanto à termoestabilidade, foi possível observar que quando colocado sob temperaturas acima de 30°C , ocorreu decréscimo da atividade de tanase (Figura 3B).

Alguns estudos referentes a caracterização de tanase produzidas pelo gênero *Aspergillus* relatam que para *A. niger* MTCC5889, em FES tendo o bagaço do caju como substrato, a temperatura ótima foi de 40 °C e o pH ótimo para produção de tanase foi de 5,5 (Viswanath *et al.*, 2015). Ainda utilizando o *A. niger*, Ni *et al.*, (2015) relatam a máxima atividade de tanase no pH ótimo de 5,5 tendo como temperatura ótima de 50 °C, no que se refere a termoestabilidade a enzima apresentou estabilidade até a temperatura de 60 °C.

Enquanto para a enzima purificada de *A. oryzae*, nativa AoTanA e recombinante rAoTanA o pH ótimo foi de 4,0 e 5,0 respectivamente, quanto a temperatura ótima foi de 30 °C e 35 °C respectivamente, e mantiveram-se estáveis até 40 °C (Mizuno *et al.*, 2014). O *A. niger* JMU-TS528, teve como pH ótimo 6,0 e temperatura de 28 °C, utilizando talo de chá como substrato para FES (Wang *et al.*, 2013).

Dependendo do fungo utilizado o pH ótimo pode variar de 4,5 a 6,5 enquanto a temperatura ótima pode variar numa faixa de 30-70°C (Wang *et al.*, 2013; Zakiour-Molkabadi *et al.*, 2013).

Quanto a ação dos íons, surfactantes e inibidores de protease na atividade de tanase, a enzima foi reduzida na presença de CaCl<sub>2</sub>, KCl, NaCl, MgSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, Tween 20, Tween 80, EDTA e β-mercaptoetanol. e inibida na presença de ZnCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, triton X-100, SDS (Figura. 4).

O efeito dos íons, surfactantes e inibidores de protease sobre a atividade de tanase tem sido estudado por vários autores. Jin *et al.*, (2013), estudaram o

melhoramento da atividade de tanase obtida por *A. niger* TA9701, utilizando íons e tensoativos e relatam que os agentes tensoativos como xileno e SDS foram estimulantes, enquanto EDTA e triton reduziram a atividade enzimática, quanto aos íons estudados  $Mn^{2+}$ ,  $Sn^{2+}$  aumentaram o rendimento, enquanto  $Fe_2$ ,  $Fe_3$ ,  $Zn_2$ ,  $Cu_2$  e  $Co_2$  diminuíram o rendimento.

Por outro lado Riul *et al.*, (2013) verificaram que a atividade de tanase foi mantida quando utilizados os compostos de  $KH_2PO_4$ , KCl,  $MnCl_2$ , NaCl,  $NH_4$ , Cl e  $ZnCl_2$ , reduzida na presença de  $Al_3$ ,  $Co_2$  e inibida por  $\beta$ -mercaptoetanol. Enquanto que Renovato *et al.*, (2011) estudaram o efeito de  $MgSO_4$ ,  $CuSO_4$ ,  $FeSO_4$ , KCl,  $CaCl_2$ ,  $ZnSO_4$ , e  $MnCl_2$ , e observaram que estes compostos inibiram a atividade da tanase, já o EDTA não demonstrou efeito inibitório na atividade enzimática produzida por *A. niger* (coleção UAdeC-DIA).

No entanto muitos autores relatam que o comportamento da tanase fúngica na presença de algumas substâncias químicas como: íons metálicos, sais, solventes e surfactantes ainda são contraditórios podendo em alguns casos induzir ou inibir a atividade enzimática (Riul *et al.*, 2013; Jana *et al.*, 2014),

DPPH é um radical livre que é capaz de receber um elétron ou um radical para se tornar uma molécula de hidrogênio estável. Este método é tipicamente utilizado para avaliar a capacidade de eliminação de radicais livres de um antioxidante. A diminuição significativa da concentração de radical DPPH ( $p < 0,05$ ), com ou sem tratamento da tanase no chá é ilustrada na Figura 5. Podemos observar, o tempo de reação de cinco minutos, o tempo de 40 minutos (chá verde com adição de tanase) o potencial de captura do DPPH foi 60%, enquanto o controle (chá verde sem tanase) foi de 5%, indicando que o tratamento enzimático melhorou a captura dos radicais livres. Os tempos superiores a 40 minutos não demonstraram mudanças significativas.

Este aumento no potencial antioxidante se deve, pela esterificação do EGC com o ácido gálico, no qual é produzido no processo final da hidrólise de taninos hidrolisáveis presentes no chá verde, aumentando assim a concentração de EGCG. Corroborando com o relatado por (Jin *et al.*, 2015).

Verloop *et al.*, (2015) relatam que as catequinas são um dos componentes mais numerosos presente no chá verde, sendo divididas em: epigallocatequina galato (EGCG), epigallocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG), epicatequina (EC), galocatequina (GC) e catequina (C).

Dentre as propriedades medicinais do chá verde, a atividade antioxidante merece destaque. Os compostos antioxidantes auxiliam no combate aos radicais livres, formado pelo metabolismo do organismo, auxiliando no combate ao envelhecimento precoce. No tocante a este aspecto, as catequinas presente no chá verde são alvos de interesses das indústrias farmacêuticas e alimentícias. (Hong *et al.*, 2014).

#### **4. Conclusão**

Os resultados obtidos no presente estudo mostram o potencial promissor da tanase produzida por *Aspergillus melleus* URM 5827 utilizando sementes de achachairú no melhoramento do potencial antioxidante do chá verde . Tanto o micro-organismo, quanto o substrato utilizado para a fermentação, foram utilizados pela primeira vez para produção de tanase. Entretanto, ainda se faz necessário novos estudos quanto a otimização dos parâmetros para produção em biorreator, para determinar a viabilidade comercial da enzima em escala industrial

#### **Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer a FACEPE-CNPq pelo apoio financeiro e ao Laboratório Tecnologia de Bioativos (LABTECBIO / UFRPE) que nos forneceu a estrutura necessária para a pesquisa.

#### **Referências**

- Bhoite, R.N. & Murthy, P.S. (2014). Biodegradation of coffee pulp tannin by *Penicillium verrucosum* for production of tannase, statistical optimization and its application. *Food and Bioproducts Processing*, **94**, 727–735.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol*, **28**, 25–30.
- Chávez-González, M., Rodríguez-Durán, L. V., Balagurusamy, N., Prado-Barragán,



- A., Rodríguez, R., Contreras, J.C. & Aguilar, C.N. (2012). Biotechnological Advances and Challenges of Tannase: An Overview. *Food and Bioprocess Technology*, **5**, 445–459.
- Crestini, C. & Lange, H. (2015). A novel and efficient immobilised tannase coated by the layer-by-layer technique in the hydrolysis of gallotannins and ellagitannins. *Microchemical Journal*, **123**, 139–147.
- Demir, H. & Tari, C. (2014). Valorization of wheat bran for the production of polygalacturonase in SSF of *Aspergillus sojae*. *Industrial Crops and Products*, **54**, 302–309.
- Hong, Y.-H., Jung, E.Y., Noh, D.O. & Suh, H.J. (2014). Physiological effects of formulation containing tannase-converted green tea extract on skin care: physical stability, collagenase, elastase, and tyrosinase activities. *Integrative Medicine Research*, **3**, 25–33.
- IBCE - Instituto Brasileiro de Comércio Exterior. Perfil de mercado: Copoazú y Achachairú. 2010. Disponível em: <[www.ibce.org.bo](http://www.ibce.org.bo)>. Acesso em: 25 julho de 2015.
- Jana, A., Halder, S.K., Banerjee, A., Paul, T., Pati, B.R., Mondal, K.C. & Mohapatra, P.K. Das. (2014). Biosynthesis, structural architecture and biotechnological potential of bacterial tannase: A molecular advancement. *Bioresource Technology*, **157**, 327–340.
- Jin, W., Nie, G., Liu, H., Xiaoran, Y., Gong, G. & Wang, L. (2013). Improving *Aspergillus niger* Tannase Yield by N + Ion Beam Implantation. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **56**, 135–142.
- Jin, X., Liu, M., Chen, Z., Mao, R., Xiao, Q., Gao, H. & Wei, M. (2015). Separation and purification of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) from green tea using combined macroporous resin and polyamide column chromatography. *Journal of Chromatography B*, **1002**, 113–122.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

- Lima, J.S. De, Cruz, R., Fonseca, J.C., Medeiros, E.V. De, Holanda, M. De, Maciel, C., Moreira, K.A., Maria, C. & Motta, D.S. (2014). Production , Characterization of Tannase from *Penicillium montanense* URM 6286 under SSF Using Agroindustrial Wastes , and Application in the Clarification of Grape Juice ( *Vitis vinifera* L .). *The Scientific World Journal* , **2014**, 9.
- Lorenzi, H., Bacher, L., Lacerda, M. & Sartori, S. (2006). Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas., 160.
- Ma, W., Zhao, F., Ye, Q., Hu, Z., Yan, D., Hou, J. & Yang, Y. (2014). Production and Partial Purification of Tannase from *Aspergillus ficuum* Gim 3.6. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, **45**, 754–768.
- Mandal, S. & Ghosh, K. (2013). Optimization of Tannase Production and Improvement of Nutritional Quality of Two Potential Low-Priced Plant Feedstuffs under Solid State Fermentation by *Pichia kudriavzevii* Isolated from, *Food Biotechnology*, **27**, 86–103.
- Mao, Y., Li, J., Li, S., Chang, S. & Zhao, G. (2015). The mass transfer of sugar in sweet sorghum stalks for solid-state fermentation process. *Fuel*, **144**, 90–95.
- Martins, S., Mussatto, S.I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C.N. & Teixeira, J. a. (2011). Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*. **29**, 365–373.
- Mata-Gómez, M., Mussatto, S.I., Rodríguez, R., Teixeira, J. a., Martinez, J.L., Hernandez, A. & Aguilar, C.N. (2015). Gallic Acid Production with Mouldy Polyurethane Particles Obtained from Solid State Culture of *Aspergillus niger* GH1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **176**, 4, 1131-1140.
- Mizuno, T., Shiono, Y. & Koseki, T. (2014). Biochemical characterization of *Aspergillus oryzae* native tannase and the recombinant enzyme expressed in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **118**, 392–395.
- Murugan, K., Saravanababu, S. & Arunachalam, M. (2007). Screening of tannin acyl hydrolase (E.C.3.1.1.20) producing tannery effluent fungal isolates using simple agar plate and SmF process. *Bioresource Technology*, **98**, 946–949.

- Ni, H., Chen, F., Jiang, Z.D., Cai, M.Y., Yang, Y.F., Xiao, A.F. & Cai, H.N. (2015). Biotransformation of tea catechins using *Aspergillus niger* tannase prepared by solid state fermentation on tea byproduct. *LWT - Food Science and Technology*, **60**, 1206–1213.
- Nie, G., Zheng, Z., Jin, W., Gong, G. & Wang, L. (2012). Development of a tannase biocatalyst based on bio-imprinting for the production of propyl gallate by transesterification in organic media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **78**, 32–37.
- Ordoñez, R.M., Colombo, I., Alberto, M.R. & Isla, M.I. (2011). Production of tannase from wood-degrading fungus using as substrate plant residues: Purification and characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **27**, 2325–2333.
- Panesar, R., Kaur, S. & Panesar, P.S. (2015). Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. *Current Opinion in Food Science*, **1**, 70–76.
- Redondo, L.M., Dominguez, J.E., Rabinovitz, B.C., Redondo, E.A. & Fern, M.E. (2015). Anaerobe Hydrolyzable and condensed tannins resistance in *Clostridium perfringens*. *Anaerobe*, **34**, 139 - 145.
- Ren, B., Wu, M., Wang, Q., Peng, X., Wen, H., McKinstry, W.J. & Chen, Q. (2013). Crystal structure of tannase from *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Molecular Biology*, **425**, 2737–2751.
- Renovato, J., Gutiérrez-Sánchez, G., Rodríguez-Durán, L. V., Bergman, C., Rodríguez, R. & Aguilar, C.N. (2011). Differential properties of *Aspergillus niger* tannase produced under solid-state and submerged fermentations. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **165**, 382–395.
- Riul, A.J., Gonçalves, H.B., Jorge, J.A. & Guimarães, L.H.S. (2013). Characterization of a glucose- and solvent-tolerant extracellular tannase from *Aspergillus phoenicis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **85-86**, 126–133.
- Sabu, a., Pandey, a., Jaafar Daud, M. & Szakacs, G. (2005). Tamarind seed

- powder and palm kernel cake: Two novel agro residues for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* ATCC 16620. *Bioresource Technology*, **96**, 1223–1228.
- Selwal, M.K., Yadav, A., Selwal, K.K., Aggarwal, N.K., Gupta, R. & Gautam, S.K. (2011). Tannase production by *Penicillium atramentosum* KM under SSF and its applications in wine clarification and tea cream solubilization. *Brazilian Journal of Microbiology*, **42**, 374–387.
- Senger, A.E.V., Schwanke, C.H. a & Gottlieb, M.G.V. (2010). Green tea (*Camellia sinensis*) and its functionals properties on transmissible chronic diseases. *Scientia Medica*, **20**, 292–300.
- Sharma, K.P. & John, P.J. (2011). Purification and characterization of tannase and tannase gene from *Enterobacter* sp. *Process Biochemistry*, **46**, 240–244.
- Sharma, N.K., Beniwal, V., Kumar, N., Kumar, S., Pathera, A.K. & Ray, A. (2013). Production of Tannase Under Solid-State Fermentation and Its Application in Detannification of *Guava Juice*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, **44**, 281–290.
- Sharma, S., Bhat, T.K. & Dawra, R.K. (1999). Isolation, purification and properties of tannase from *Aspergillus niger* van Tieghem. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **15**, 673–677.
- Sharma, S., Bhat, T.K. & Dawra, R.K. (2000). A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. *Analytical biochemistry*, **279**, 85–89.
- Souza, P.N.D.C., Maia, N.D.C., Guimarães, L.H.S., Resende, M.L.V. De & Cardoso, P.G. (2015). Optimization of culture conditions for tannase production by *Aspergillus* sp. gm4 in solid state fermentation. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, **37**, 23.
- Spier, M.R., Greiner, R., Rodriguez-León, J.A., Woiciechowski, A.L., Pandey, A., Soccol, V.T. & Soccol, C.R. (2008). Phytase production using citric pulp and other residues of the agroIndustry in SSF by fungal isolates. *Food Technology and Biotechnology*, **46**, 178–182.

- Teather, R.M. & Wood, P.J. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, **43**, 777–780.
- Thomas, L., Larroche, C. & Pandey, A. (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, **81**, 146–161.
- Verloop, a J.W., Gruppen, H., Bisschop, R. & Vincken, J.-P. (2015). Altering the phenolics profile of green tea using exogenous oxidases. *Food Chemistry*, **196**, 1197–1206.
- Viswanath, V., Leo, V.V., Prabha, S.S., Prabhakumari, C., Potty, V.P. & Jisha, M.S. (2015). Biosynthesis of tannase from cashew testa using *Aspergillus niger* MTCC5889 by solid state fermentation. *Journal of Food Science and Technology*. **52**, 11, 7433-7440.
- Wang, F., Ni, H., Cai, H.N. & Xiao, A.F. (2013). Tea stalks - A novel agro-residue for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* JMU-TS528. *Annals of Microbiology*, **63**, 897–904.
- Xiao, A., Huang, Y., Ni, H., Cai, H. & Yang, Q. (2015). Statistical optimization for tannase production by *Aspergillus tubingensis* in solid-state fermentation using tea stalks. *Electronic Journal of Biotechnology*, **18**, 143–147.
- Yao, J., Chen, Q., Zhong, G., Cao, W., Yu, A. & Liu, Y. (2014a). Immobilization and characterization of tannase from a metagenomic library and its use for removal of tannins from green tea infusion. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **24**, 80–86.
- Yao, J., Guo, G.S., Ren, G.H. & Liu, Y.H. (2014b). Production, characterization and applications of tannase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **101**, 137–147.
- Zenebon, O., Pascuet, N.S. & Tiglea, P. (2008). Introdução e índice. *Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos*, 1–29.

**Tabela 1.** Níveis das variáveis utilizadas no planejamento fatorial  $2^3$  para produção de tanase de *Aspergillus melleus* URM 5827 por Fermentação em Estado Sólido (FES).

Variáveis	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
Cs (g) <sup>a</sup>	5,0	7,5	10,0
Ui (%) <sup>b</sup>	40	50	60
At (%) <sup>d</sup>	0	1	2

<sup>a</sup> Cs- Concentração de substrato (g), <sup>b</sup> Ui- Umidade inicial (%), <sup>d</sup> At- Ácido tânico (%).

**Tabela 2.** Seleção de *Aspergillus* com potencial para produção de tanase utilizando meio mínimo Ágar Czapek Dox contendo 0,5% de ácido tânico.

	URM	Linhagem	Øh	Øc	It
1	1546	<i>Aspergillus carbonarius</i>	37	24	1,54
2	2803	<i>A. niveus</i>	15,7	10	1,57
3	3266	<i>A. tamaritii</i>	23,5	13,4	1,75
4	3840	<i>A. japonicus</i>	31,2	29	1,07
5	3856	<i>A. niger</i>	38,9	21,2	1,83
6	3916	<i>A. japonicus</i>	35,6	28,5	1,24
7	4009	<i>A. versicolor</i>	14	8,5	1,64
8	4456	<i>A. janus</i>	28,9	14,5	1,99
9	4634	<i>A. tamaritii</i>	25,5	14	1,82
10	4641	<i>A. granulatus</i>	17,8	14,5	1,22
11	4645	<i>A. niger</i>	31,2	20	1,56
12	4658	<i>A. terreus</i>	13	12	1,08
13	4924	<i>A. phoenicis</i>	34,5	24,5	1,40
14	4953	<i>A. aculeatus</i>	38	20	1,95
15	5012	<i>A. carbonarius</i>	51,2	24	2,13
16	5076	<i>A. clavatus</i>	13	8	1,62
17	5093	<i>A. terreus</i>	18,9	16,5	1,14
18	5620	<i>A. japonicus</i>	34,5	33,4	1,03
19	5654	<i>A. niger var. awamori</i>	36,7	28,5	1,28
20	5701	<i>A. versicolor</i>	11,2	4,5	2,48
21	5740	<i>A. flavus</i>	24,5	14,5	1,68
22	5741	<i>A. niger</i>	40	37,8	1,05
23	5751	<i>A. japonicus</i> <i>var. japonicus</i>	19	11,5	1,65
24	5756	<i>A. niger</i>	41	33,4	1,22
25	5774	<i>A. sydowii</i>	26,5	25,5	1,03
26	5778	<i>A. parasiticus</i>	28,9	15,5	1,86
27	5787	<i>A. parasiticus</i>	21,2	13,4	1,58
28	5791	<i>A. flavus</i>	19,2	11	1,74
29	5792	<i>A. sclerotiorum</i>	14,5	11,2	1,29
30	5793	<i>A. flavus</i>	22,3	17,5	1,27
31	5794	<i>A. flavus</i>	23,4	16,7	1,40
32	5827	<i>A. melleus</i>	13,4	4,5	2,97
33	5829	<i>A. varicolor</i>	15,6	15,5	1,00
34	5837	<i>A. niger</i>	38,9	28,5	1,36
35	5838	<i>A. niger</i>	33,5	28,5	1,17
36	5863	<i>A. niger</i>	34,5	30	1,15
37	5864	<i>A. terreus</i>	24,5	13,5	1,81
38	5865	<i>A. parasiticus</i>	26,7	15,6	1,71
39	5870	<i>A. niveus</i>	20,9	14,5	1,44
40	5930	<i>A. niveus</i>	32,3	24,5	1,31
41	5896	<i>A. terreus</i>	21,2	17,8	1,19
42	5860	<i>A. sydowii</i>	20,7	11,2	1,84

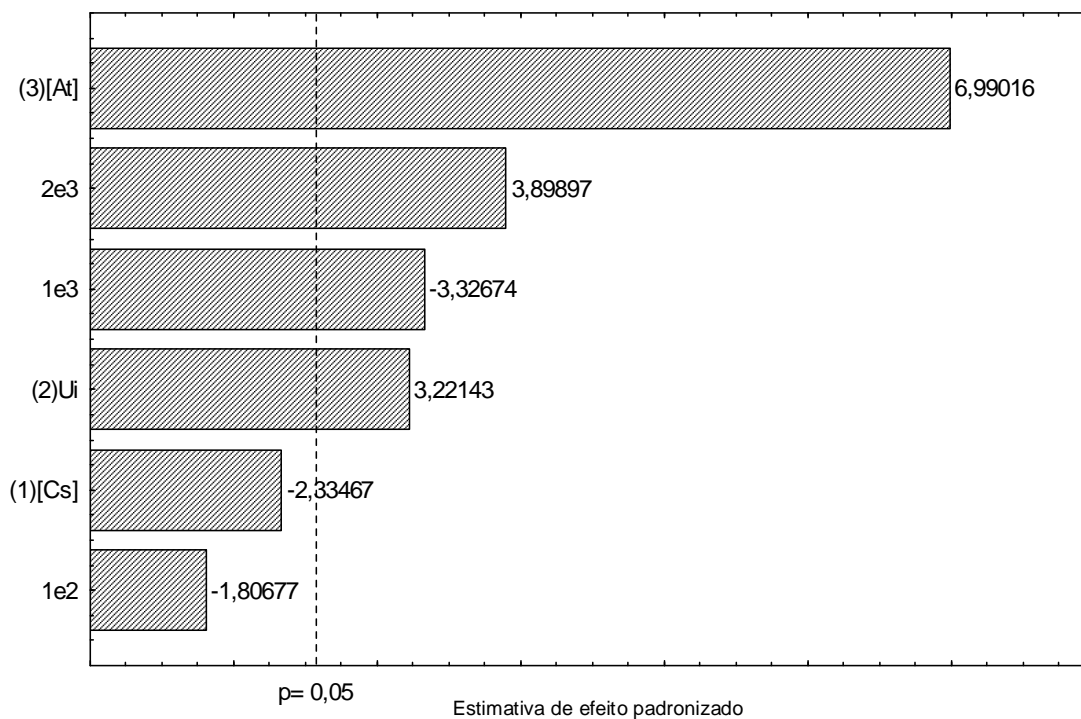
(It): Índice de produção de tanase = relação entre o (Øh) diâmetro do halo (mm) / (Øc) diâmetro da colônia (mm).

**Tabela 3.** Matriz experimental do planejamento fatorial  $2^3$  para a produção de tanase por *Apergillus melleus* URM 5827 através de Fermentação em Estado Sólido (FES). utilizando sementes de achachairú (*Garcinia humilis* (Vahl) C. D. Adam).

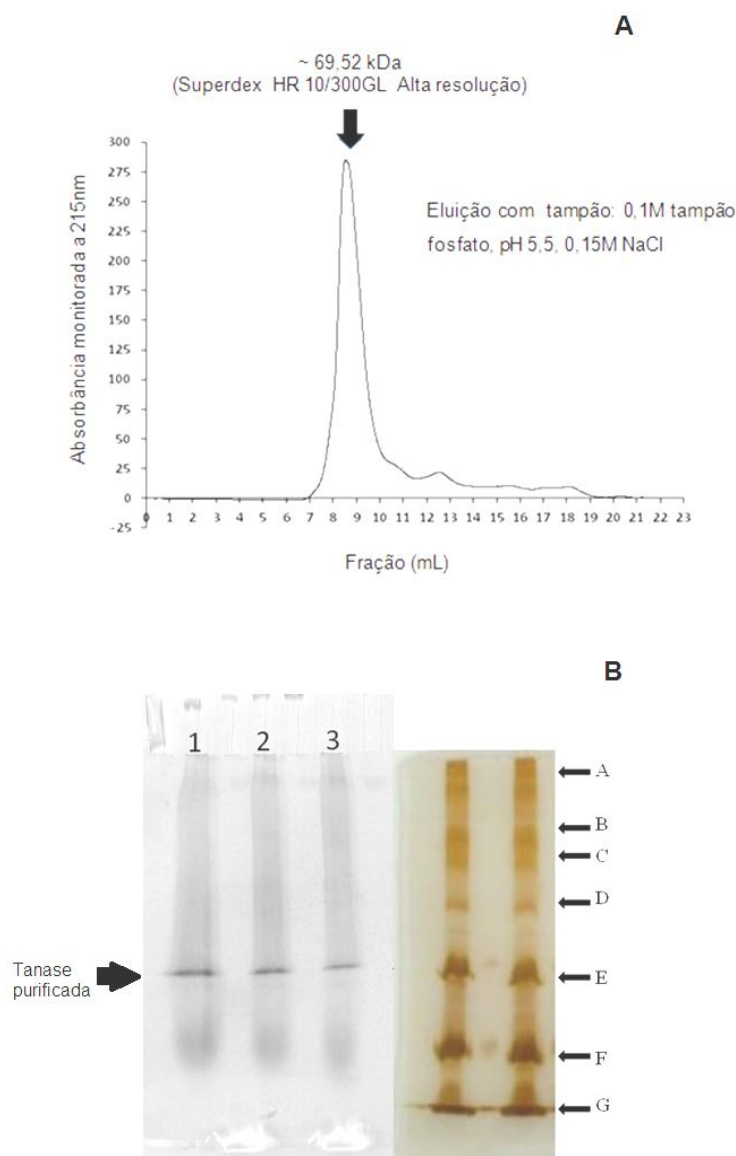
Ensaio	Cs (g) <sup>a</sup>	Ui (%) <sup>b</sup>	At (%) <sup>d</sup>	Tanase			
				24h	48h	72h	96h
				U/gss	U/gss	U/gss	U/gss
1	5	40	0	200,66	176,95	175,20	177,85
2	5	60	0	118,58	131,23	130,87	178,16
3	10	40	0	171,81	259,65	248,35	209,60
4	10	60	0	143,62	187,05	158,85	238,13
5	5	40	2	207,64	289,99	217,15	275,12
6	5	60	2	224,69	452,55	179,49	180,64
7	10	40	2	243,37	218,45	212,27	251,09
8	10	60	2	225,90	220,85	186,30	262,48
9 <sup>c</sup>	7,5	50	1	195,13	251,38	243,31	214,67
10 <sup>c</sup>	7,5	50	1	220,95	279,64	204,98	224,08
11 <sup>c</sup>	7,5	50	1	272,56	221,18	234,05	186,69
12 <sup>c</sup>	7,5	50	1	284,88	258,84	193,44	192,62

Nota: Para tanase o tempo de cultivo é dado em horas. <sup>a</sup>Cs - Concentração de substrato (g), <sup>b</sup>Ui - Umidade inicial (%), <sup>d</sup>At - Ácido tânico (%) e (C) – Ponto central. Todos os ensaios foram realizados a temperatura de 30°C.

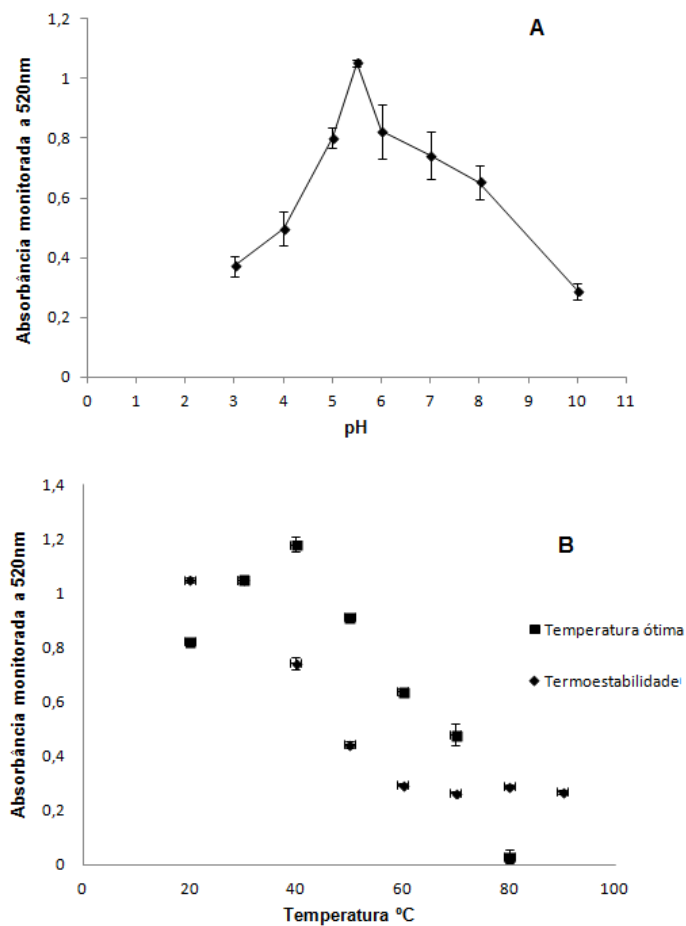




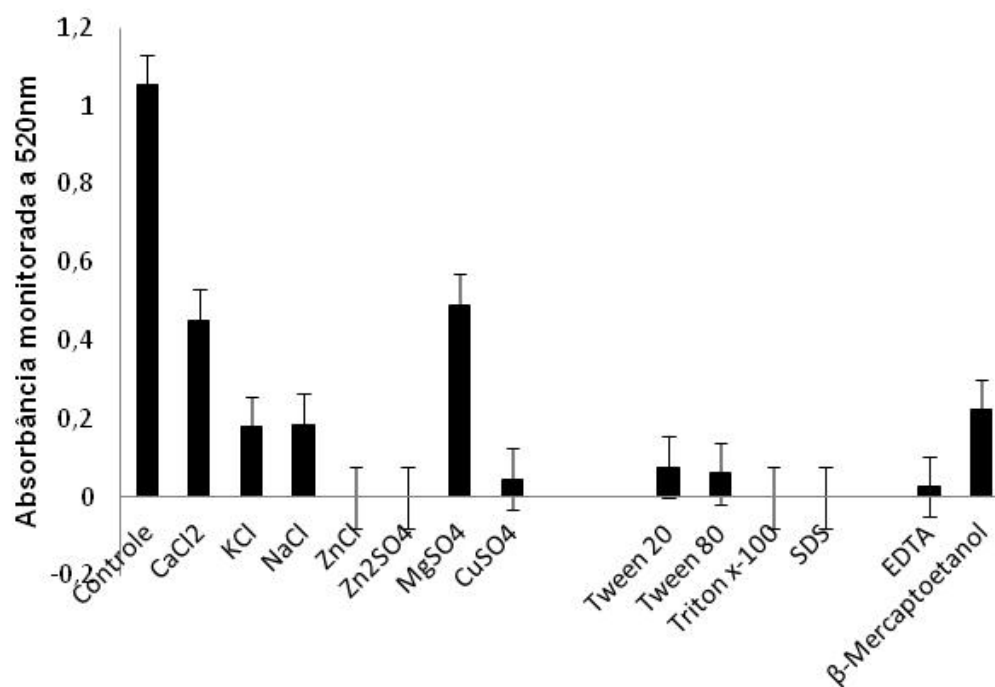
**Figura 1.** Gráfico de Pareto dos principais efeitos da tanase produzida por *Aspergillus melleus* URM 5827, tendo como variável-resposta a atividade de tanase total (U/ml) com 48h de FES, utilizando planejamento fatorial 23. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (1) Concentração de substrato (g), (2) Umidade inicial (%), (3) Ácido tânico (%).



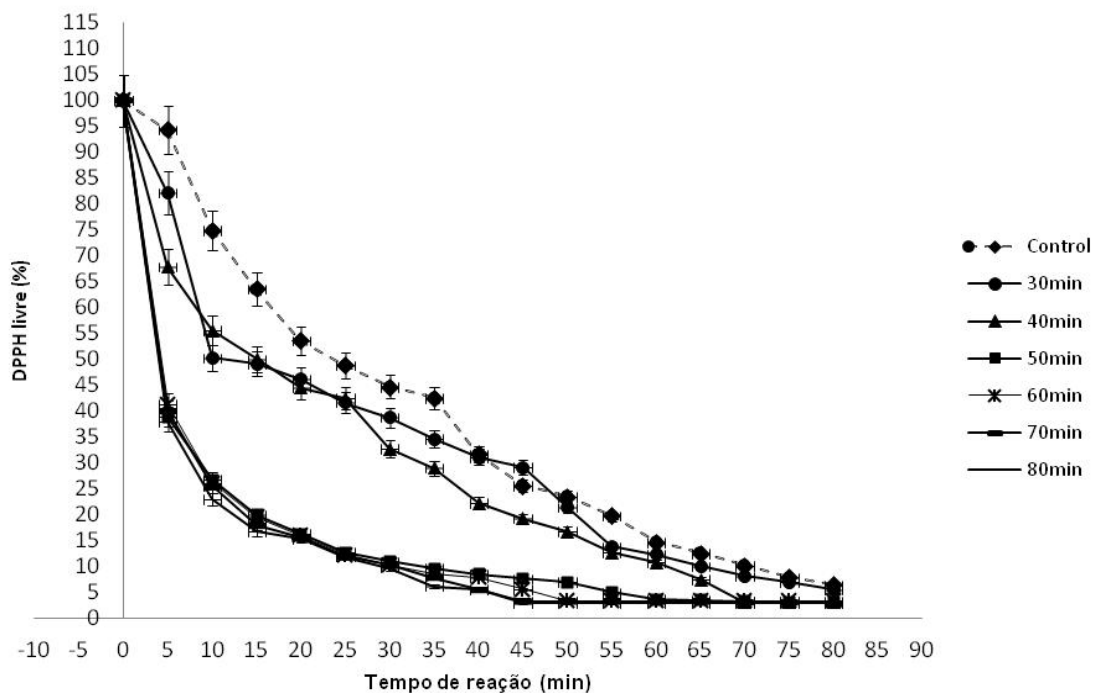
**Figura 2.** Purificação da enzima tanase de *Aspergillus melleus* URM 5827 em sistema FPLC e SDS-PAGE. (A) Cromatografia em resina de exclusão molecular Superdex-G75 através de protocolo de eluição com tampão fosfato 0,1M, pH 5,5, fluxo de 0,5mL/min, monitorado em 215nm. Peso molecular estimado através da construção de uma curva de calibração utilizando os padrões: Albumina (66kDa), Ovoalbumina (45kDa), Inibidor de Tripsina (23kDa) e Lisozima (14kDa). (B) (1) amostra obtida a partir de FPLC em concentrações de (1) 30µg, (2) 15µg e (3) 10µg. Os marcadores moleculares (SigmaMarker™ alta gama, peso mol 36,000-200,000 Da): (A) miosina cardíaca porcina (200.000), (B) β-galactosidase de *E. coli* (116000), (C) A fosforilase B, músculo de coelho ( 97000), (D) de albumina, de soro bovino (66000), (E) desidrogenase glutâmico, fígado de bovino (55000), (F) de ovalbumina de ovo de galinha (45,000), (G), da desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato, músculo de coelho ( 36000).



**Figura 3.** Efeito do pH ótimo (A), da temperatura ótima e termoestabilidade (B) na atividade da tanase purificada de *Aspergillus melleus* URM 5827. Todos os resultados foram realizados em triplicata.



**Figura 4.** Efeito de íons, surfactantes e inibidores de protease na atividade da tanase purificada de *Aspergillus melleus* URM 5827.



**Figura 5.** Cromatograma de tanase como uma abordagem potencial para a atividade antioxidante do chá verde. Experimento realizado utilizando a eliminação de radicais livres pelo método DPPH. Todos os resultados foram obtidos em triplicatas. Tempo de hidrólise de ácido tânico presente no chá verde foi avaliada e monitorada pelo potencial antioxidante.

## ANEXO

### Author Guidelines ( International Journal of Food Science & Technology )

Content of Author Guidelines: 1. General, 2. Ethical Guidelines, 3. Submission of Manuscripts, 4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure, 6. After Acceptance.

Relevant Documents: [Colour Work Agreement Form](#)

Useful Websites: [Submission Site](#), [Author Services](#), [Wiley's Ethical Guidelines](#), [Guidelines for Figures](#)

---

#### 1. GENERAL Scope

The Editor welcomes the submission of original articles relevant to the science and technology of food and beverages. Contributions are accepted on the strict understanding that the material in whole or in part has not been, nor is being, considered for publication elsewhere. Topics of only narrow local interest will not be accepted unless they have wider potential or consequences. If accepted, papers will become the copyright of the journal. Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in the *International Journal of Food Science & Technology*. Authors are encouraged to visit [Wiley-Blackwell's Author Services](#) for further information on the preparation and submission of articles and figures.

#### 2. ETHICAL GUIDELINES

The *International Journal of Food Science & Technology* adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements  
 Authorship: Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript has been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal. ALL named authors must have made an active contribution to the conception and design and/or analysis and interpretation of the data and/or the drafting of the paper and ALL must have critically reviewed its content and have approved the final version submitted for publication. Participation solely in the acquisition of funding or the collection of data does not justify authorship. The *International Journal of Food Science & Technology* adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3. It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission

of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Acknowledgements: Under Acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Please also include specifications of the source of funding for the study and any potential conflict of interests if appropriate. Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

## 2.2 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at <http://www.consort-statement.org/>. A CONSORT checklist should also be included in the submission material ([http://www.consort-statement.org/mod\\_product/uploads/CONSORT\\_2001\\_checklist.doc](http://www.consort-statement.org/mod_product/uploads/CONSORT_2001_checklist.doc)).

*The International Journal of Food Science & Technology* encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), [clinicaltrials-dev.ifpma.org/](http://clinicaltrials-dev.ifpma.org/), [isrctn.org/](http://isrctn.org/). The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

## 2.3 Conflict of Interest and Source of Funding

Conflict of Interest: Authors are required to disclose any possible conflict of interest. These include financial (for example patent, ownership, stock ownership, consultancies, speaker's fee).

Source of Funding: Authors are required to specify the source of funding for their research when submitting a paper. Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included. The information will be disclosed in the published article.

## 2.4 Appeal of Decision

The Editor's decision on a paper is final and cannot be appealed.

## 2.5 Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

## 2.6 Copyright Assignment and OnlineOpen

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services (see 6.3 below); where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

### *For authors signing the copyright transfer agreement*

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp)

*For authors choosing OnlineOpen*

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License	OAA
Creative Commons Attribution Non-Commercial License	OAA
Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License	OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

2.7 Manuscript Referrals to the Open Access Journal *Food Science & Nutrition*  
This journal works together with Wiley's open access journal, *Food Science & Nutrition*, to enable rapid publication of good quality research that is unable to be accepted for publication by our journal. Authors may be offered the option of having the paper, along with any related peer reviews, automatically transferred for consideration by the Editor of *Food Science & Nutrition*. Authors will not need to reformat or rewrite their manuscript at this stage, and publication decisions will be made a short time after the transfer takes place. The Editor of *Food Science & Nutrition* will accept submissions that report well-conducted research which reaches the standard acceptable for publication. *Food Science & Nutrition* is a Wiley Open Access Journal and article publication fees apply. For more information, please go to [www.foodscience-nutrition.com](http://www.foodscience-nutrition.com).

### 3. SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site. **Go to the journal home page and click on 'Online Submission'**. The use of an online submission and peer review site enables rapid distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper are available online and below.

Manuscript submission is a step-by-step process, and little preparation is required beyond having all parts of your manuscript in an electronic format and a computer with an Internet connection and a Web browser. Full help and instructions are provided on-screen. As an author, you will be prompted for author and manuscript details and then to upload your manuscript file(s).

To avoid postal delays, all correspondence is by e-mail. A completed manuscript submission is confirmed by e-mail immediately and your paper enters the editorial process with no postal delay. Your manuscript will have a unique manuscript number and you can check the progress of your manuscript at any time by returning to the online



submission site via the journal home page. When a decision is made, revisions can be submitted online, with an opportunity to view and respond to all comments. Peer review is also handled online. Referees are given full instructions and access to the paper on the online submission site. The review form and comments are completed online and immediately made available to the Editor-in-Chief. Full instructions and support are available on the site and a user ID and password can be obtained on the first visit. If you require assistance then click the **Get Help Now** link which appears at the top right of every ScholarOne Manuscripts page. If you cannot submit online, please contact the Editorial office.

### 3.1. Getting Started

- Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 6 or higher, Netscape 7.0, 7.1, or 7.2, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4) and go to the journal's online Submission Site via the journal home page and click on '**Online Submission**'.
- Log-in or click the 'Create Account' option if you are a first-time user.
- If you are creating a new account.
  - After clicking on 'Create Account', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
  - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
  - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise. Click 'Finish'.
- If you have an account, but have forgotten your log in details, go to Password Help on the journals online submission system <http://mc.manuscriptcentral.com/ijfst> and enter your e-mail address. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
- Log-in and select 'Author Centre.'

### 3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged in, click the 'Submit a Manuscript' link in the menu bar.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
  - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
  - Select the designation of each file in the drop-down menu next to the Browse button.
  - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- Review your submission (in HTML and PDF format) before sending to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

### 3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rtf) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text and the figures should be uploaded as separate files. The text file must contain the entire manuscript including title page, summary, keywords, text,

references, tables, and figure legends, but no embedded figures. Figure tags should be included in the file. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

#### 3.4. Blinded Review [Version 1 (Single-blinded Review):]

All manuscripts submitted to the *International Journal of Food Science & Technology* will be reviewed by at least two experts in the field. The *International Journal of Food Science & Technology* uses single-blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

#### 3.5. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

#### 3.6. E-mail Confirmation of Submission

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation e-mail after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by spam filtering software on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our e-mail server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

#### 3.7. Manuscript Status

You can access ScholarOne Manuscripts any time to check your 'Author Centre' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

#### 3.8. Submission of Revised Manuscripts

Revised manuscripts must be uploaded within 1 month of authors being notified of conditional acceptance pending satisfactory revision. Locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision' to submit your revised manuscript. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript. Please also remember to upload your manuscript document separate from your title page.

Correspondence regarding manuscripts should be sent by e-mail to the Editor-in-Chief. General and IFST correspondence should be sent to:

Institute of Food Science and Technology  
5 Cambridge Court  
210 Shepherds Bush Road  
London, W6 7NJ, UK

When preparing a manuscript, authors should refer to a recent issue of the Journal and

follow the detailed instructions given below. Please keep a copy of the original manuscript for reference. An e-mail acknowledging the online submission of a manuscript will be sent by the Journal. Any material sent to the Editorial Office will not be returned.

#### **4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED**

Original Papers: These are reports of substantial research less than 5000 words equivalent, including tables, figures, references. Typically a table or figure is equivalent to 150 words while photograph is equivalent to 300 words. These are guidelines only.

Original Articles should comprise:

(a) a concise Summary (fewer than 150 words) containing the main results and conclusions;

(b) up to ten keywords that accurately identify the paper's subject, purpose and focus;

(c) an Introduction giving essential background but no subheadings; objectives must be clearly stated;

(d) Materials and methods with sufficient full experimental detail (where possible by reference) to permit repetition; sources of material must be given and statistical methods must be specified by reference, unless non-standard;

(e) Results should be presented concisely, using well-designed tables and/or figures; the same data may not be used in both; appropriate statistical data should be given. All data must be obtained with attention to statistical detail in the planning stage. If a sufficiently large number of replicates are not organized before the experiment is undertaken, biological variation is not eliminated satisfactorily. As replicate design has been recognised to be important to biological experiments for a considerable time, the Editor has decided that any paper that appears not to have adequate mathematical treatment of the data will be returned un-refereed;

(f) Discussion should cover the implications and consequences, not merely recapitulating the results; conclusions should be concise;

(g) brief Acknowledgements;

(h) References as shown below.

Review Articles: (fewer than 6000 words) These are concise, critical but constructive and conclusive topical accounts written for non-specialists. References must be in the form shown below. A small honorarium may be given.

Letters to the Editor: These are brief comments on material published in previous issues; they are published at the discretion of the Editor. They are the only items not subject to multiple peer review.

#### **5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE**

Authors should very carefully consider the preparation of papers to ensure that they communicate efficiently. Papers are much more likely to be accepted if they are carefully designed and laid out, have few or no errors, are concise, and conform to the style and

instructions. They will also be published with much less delay than those that require much scientific and editorial correction.

The Editor reserves the right to make literary corrections and to make suggestions to improve brevity.

It is important that authors take care in submitting a manuscript that is written in plain language and adheres to published guidelines (see the new *Fowler's Modern English Usage* 3rd ed. Oxford: Clarendon Press, 1996; Hall G.M. How to write a paper. London: BMJ Publishing, 1994).

Language: The language of publication is UK English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. An English Language Editing Service is available. Ensure your paper is clearly written in standard, scientific English language appropriate to your discipline. [Visit our site](#) to learn about the options. Please note that using the Wiley English Language Editing Service does not guarantee that your paper will be accepted by this journal.

5.1.	Page	Charge
------	------	--------

From the 1st March 2007 all manuscripts submitted are subject to a charge of 100GBP for each page in excess of seven printed journal pages (approximately 21 pages of double-spaced typescript). The editor may decide to waive this charge in exceptional circumstances.

5.2.	Format
------	--------

Standard Usage, Abbreviations and Units: Spelling and hyphenation should conform to *The Concise Oxford English Dictionary*. Statistics and measurements should always be given in figures, e.g. 10 min, except when the number begins a sentence. When the number does not refer to a unit of measurement it should be spelt in full unless it is 100 or greater.

Abbreviations should be used sparingly and only if a lengthy name or expression is repeated throughout the manuscript, and never in the title. The abbreviated name or expression should be cited in full at first usage, followed by the accepted abbreviation in parentheses.

Metric SI units should generally be used except where they conflict with current practice or are confusing. For example 1.5 l rather than  $1.5 \times 10^{-3} \text{ m}^3$ , or 3 mm rather than  $3 \times 10^{-3} \text{ m}$ . Chemical formulae and solutions must specify the form used, e.g. anhydrous or hydrated, and the concentration must be in clearly defined units. Common species names should be followed by the Latin binomial (underlined) at the first mention. For subsequent use the generic name should be contracted to a single letter if it is unambiguous.

Main Text: Text files should be formatted double-spaced with no hyphenation and automatic wordwrap (no hard returns within paragraphs). Please type the text consistently e.g. take care to distinguish between '1' (one) and 'l' (lower case L) and '0' (zero) and 'O' (capital O), etc.

### 5.3. Structure

All manuscripts submitted to *The International Journal of Food Science & Technology* should include:

**Title Page:** The title page should carry an informative title that reflects the content, a running title (less than 46 characters including spaces), the names of the authors, and the place(s) where the work was carried out. The full postal address plus e-mail address of the indicated corresponding author must be given. Up to ten keywords or very brief phrases must be given to aid data retrieval and indexing.

**Graphical abstract** - Please upload the Graphical Abstract as the first file in the Manuscript. Please ensure that it is clearly sub-titled 'Graphical Abstract.' The Graphical Abstract should be designed to be read on-line in conjunction with the text abstract, it should be approximately square, ideally in colour and should contain a high impact Figure, Graph or Photograph that summarises the key findings of your research.

**Summary (or Abstract), used in Original Papers and Reviews: Optimizing Your Abstract for Search Engines**  
Many students and researchers looking for information online will use search engines such as Google, Yahoo or similar. By optimizing your article for search engines, you will increase the chance of someone finding it. This in turn will make it more likely to be viewed and/or cited in another work. We have compiled these guidelines to enable you to maximize the web-friendliness of the most public part of your article.

Well written summaries attract both the general reader and the specialist and greatly improve the impact of your paper. Summaries should give information specific to your article and comprise short punchy sentences with an introduction of one or two sentences followed by comparative data between treatments where interesting effects were observed. This should be followed by concise conclusions.

**Statistical Methods:** Statistical methods used should be defined and, where appropriate, supported by references. Useful statistical references are as follows:

Statistical				Textbooks
Cochran,	W.G.,	Cox,	G.M.	(1992).
<i>Experimental</i>	<i>Designs</i> ,	2nd	edn.	New York: Wiley.
Cox,	D.R.	(1992).	<i>Planning of Experiments</i> .	New York: Wiley.
Draper, N.R.,	Smith, H.	(1998).	<i>Applied Regression Analysis</i> ,	3rd edn. New York: Wiley.
Sokal, R.R.,	Rohlf, F.J.	(1994)	<i>Biometry</i> ,	3rd edn. San Francisco: W.H. Freeman.
Steel, R.G.D.,	Torrie J.H.,	Dickey, D.	(1996).	<i>Principles and Procedures of Statistics</i> .
McGraw-Hill.				

General			Papers
Chatfield, C.	(1985).	The initial examination of data.	<i>Journal of the Royal Statistical Society</i>
		A, <b>148</b> ,	214-253

Preece, D.A. (1987). Good statistical practice. *The Statistician*, **36**, 397-408.

Repeated Measures  
Kenward, M.G. (1987). A method for comparing profiles of repeated measurements. *Applied Statistics*, **36**, 296-308.

Acknowledgements: please make these as brief as possible.

#### 5.4. References

References follow the Harvard system of referencing. References in the text should cite the authors' names followed by the date of their publication, unless there are three or more authors when only the first author's name is quoted followed by *et al.* e.g. Smith *et al.* (1999) or Jones and Smith (2000). Add a, b, c etc. to distinguish between two or more references with the same author name and year date (e.g. Jones 1999a,b). References at the end of the paper should be listed in alphabetical order with the title of the article or book and the title of the journal given in full, as shown:  
Bucky, A. R., Robinson, D.S. & Hayes, P. R. (1987). Enhanced deactivation of bacterial lipases by a modified UHT treatment. *International Journal of Food Science and Technology*, **22**, 35-40.

Stone, H. & Sidel, J. L. (1985). *Sensory Evaluation Practices*. Pp. 56-59. Orlando, USA: Academic Press.

Dubois, P. (1983). Volatile phenols in wines. In: *Flavour of Distilled Beverages* (edited by J. R. Piggott). Pp. 110-119. Chichester, UK: Ellis Horwood.

Unpublished work must only be cited where necessary, and only in the text. Copies of references in press in other journals must be supplied with submitted typescripts. It is essential that all citations and references are carefully checked before submission, as mistakes or omissions will cause delays.

References to material on the World Wide Web can be given, but only if the information is available without charge to readers on an official site. Authors will be asked to provide electronic copies of the cited material for inclusion on the *International Journal of Food Science and Technology* homepage at the discretion of the Editors. The format of citations is:

Beckleheimer, J. (1994). Online reference included in article [Internet document] URL [http://www.sample\\_url.bibliography/html](http://www.sample_url.bibliography/html). Accessed 01/04/2004.

The editor and publisher recommend that citation of online published papers and other material should be done via a DOI (digital object identifier), which all reputable online published material should have - see [www.doi.org/](http://www.doi.org/) for more information. If an author cites anything which does not have a DOI they run the risk of the cited material not being traceable.

We recommend the use of a tool such as Reference Manager for reference management and formatting.

Reference Manager reference styles can be searched for here: [www.refman.com/support/rmstyles.asp](http://www.refman.com/support/rmstyles.asp)

### 5.5. Tables, Figures and Figure Legends

**Tables:** Tables should be few in number, carefully designed, uncrowded, and include only essential data. Each must have an Arabic number, e.g. Table 3, a self-explanatory caption and be on a separate sheet. Vertical lines must not be used.

**Figures:** Figures should be submitted as separate files. Always include a citation in the text for each figure using Arabic numbers, e.g. Fig. 3. Artwork should be submitted online in electronic form. Detailed information on our digital illustration standards is available on the Wiley-Blackwell website [here](#). Approval for reproduction/modification of any material (including figures and tables) published elsewhere should be obtained by the authors/copyright holders before submission of the manuscript. Contributors are responsible for any copyright fee involved.

#### Preparation of Electronic Figures for Publication

Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (line art) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of at least 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). Please submit the data for figures in black and white or submit a Colour Work Agreement Form (see Colour Charges below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: line art: >600 dpi; halftones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi. Further information can be obtained at Wiley-Blackwell's guidelines for figures: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

Check your electronic artwork before submitting it: [www.authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp](http://www.authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp)

**Permissions:** If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publisher.

**Colour Charges:** It is the policy of the *International Journal of Food Science & Technology* for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Wiley-Blackwell require you to complete and return a colour work agreement form before your paper can be published. This form can be downloaded as a PDF\* from [here](#).

\* To read PDF files, you must have Acrobat Reader installed on your computer. If you do not have this program, this is available as a free download from the following web address: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>

Once completed, please return the form to:

The International Journal of Food Science and Technology  
 Scientific Publishing Services (P) Ltd No. 97,  
 G.N. Chetty Road,  
 Production Editor

T. Nagar,  
 Chennai 600 017.  
 Tamil Nadu, India.  
 e-mail: [ijfs@wiley.com](mailto:ijfs@wiley.com)

Any article received with colour work will not be published until the form has been returned.

**Figure Legends:** Self-explanatory legends of all figures should be included separately under the heading 'Legends to Figures'. In the full-text online edition of the journal, figure legends may be truncated in abbreviated links to the full screen version. Therefore, the first 100 characters of any legend should inform the reader of key aspects of the figure.

## 6. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

6.1. Proof Corrections

The corresponding author will receive an e-mail alert containing a link to a website. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site.

Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following website: [www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html](http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html). Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs.

Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt.

As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors.

Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in their work, including changes made by the copy editor.

6.2. Early View (Publication prior to Print)

The *International Journal of Food Science & Technology* is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

6.3. Author Services

Online production tracking is available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key



stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more. For more substantial information on the services provided for authors, please see [Wiley-Blackwell Author Services](#)

6.4. Author Material Archive Policy

Please note that unless specifically requested, Wiley-Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible.

6.5. Offprints and Extra Copies

Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Author Services only. Please therefore sign up for Author Services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Additional paper offprints may be ordered online. Please click on the following link, fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields: [offprint.cosprinters.com/cos/bw/main.jsp?SITE\\_ID=bw&FID=USER\\_HOME\\_PG](http://offprint.cosprinters.com/cos/bw/main.jsp?SITE_ID=bw&FID=USER_HOME_PG)

If you have queries about offprints please e-mail [offprint@cosprinters.com](mailto:offprint@cosprinters.com)

**Note to NIH Grantees:** Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see [www.wiley.com/go/nihmandate](http://www.wiley.com/go/nihmandate)