



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

José Bezerra de Paiva

**PRODUÇÃO DE TANASE POR *CUNNINGHAMELLA ECHINULATA* UCP
1305 ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO MEIOS
ALTERNATIVOS CONTENDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Recife
2019

José Bezerra de Paiva

**PRODUÇÃO DE TANASE POR *CUNNINGHAMELLA ECHINULATA* UCP
1305 ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO MEIOS
ALTERNATIVOS CONTENDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva

Recife

2019

P149p Paiva, José Bezerra de
 Produção de tanase por *Cunninghamella echinulata* UCP 1305
 através de fermentação submersa utilizando meios alternativos
 contendo resíduos agroindustriais / José Bezerra de Paiva, 2019
 63 f. : il.

 Orientador: Carlos Alberto Alves da Silva
 Mestrado (Dissertação) - Universidade Católica de Pernambuco.
 Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais.
 Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2019.

 1. Enzimas microbianas - Produção. 2. Mucolares. 3. Resíduos
 agroindustriais. I. Título.

CDU 574.6

Ficha catalográfica elaborada por Catarina Maria Drahomiro Duarte -
CRB/4-463

**PRODUÇÃO DE TANASE POR *CUNNINGHAMELLA ECHINULATA* UCP
1305 ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO MEIOS
ALTERNATIVOS CONTENDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

José Bezerra de Paiva

Examinadores:

Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva (Orientador)
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Dra Rosileide Fontenele da Silva Andrade (Membro Interno)
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Profa. Dra. Luciana de Oliveira Franco (Membro Externo)
Universidade Federal de Pernambuco – UFRPE

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me concedeu as graças necessárias que culminam com a conclusão do curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco, na linha pesquisa de Biotecnologia e Meio Ambiente;

Ao orientador do trabalho, o professor Dr. Carlos Alberto Alves da Silva, que dispões do seu precioso tempo e com satisfação me indicou os passos e o caminho a ser percorrido para execução desse trabalho, contribuindo para a minha formação acadêmica, abrindo horizontes aos meus conhecimentos em prol dos ideais profissionais e humanos;

Aos meus pais, Maximiano Bezerra de Paiva e Maria José de Paiva que se tornaram instrumentos de Deus para me conceder a vida, agradeço o orgulho dos mesmos em me ter por filho, o amor, os cuidados, e o apoio que sempre recebi durante minha trajetória nesse mestrado;

A minha esposa Maria Iraneide dos Santos Paiva e aos meus filhos, Maria Karollyne dos Santos Paiva e José Bruno dos Santos Paiva os quais me apoiaram e me entenderam quando muitas vezes tive que optar pelos estudos ao invés de um lazer com eles ou atenção especial,

Aos meus irmãos, Josenilson Bezerra de Paiva, Zacarias José de Paiva e Maria José de Paiva Filha por todo apoio que recebi deles. Aos meus familiares em geral que torceram por mim, mesmo os mais distantes;

A todos os professores, as quais foram para mim motivo de orgulho e referência. Ao Dr. Marcos Luna do laboratório NPCIAMB que me acompanhou nos experimentos.

Aos meus colegas, em especial Armando José Gomes e Israel Gonçalves que foram meus parceiros de caminhada e nos ajudamos mutualmente.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
CAPÍTULO I	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo Geral	11
2.2 Objetivos Específicos	11
3. REVISÃO DA LITERATURA	12
3.1 enzimas.....	12
3.2 Tanase	14
3.3 Fermentação submersa.....	14
3.4 Bioma caatinga	17
3.5 Resíduos agroindustriais	19
3.5.1 Casca da laranja.....	21
3.5.2 Resíduos da uva.....	23
3.5.3 Resíduos do café.....	24
1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
CAPÍTULO II	33
AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TANASE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA POR ESPÉCIES DE <i>Cunninghamella echinulata</i>	34
Resumo.....	35
1 INTRODUÇÃO.....	36
2. MATERIAL E MÉTODOS	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
5. REFERENCIAS	38
CAPÍTULO III.....	44
PRODUÇÃO DE TANASE POR <i>Cunninghamella echinulata</i> EM MEIOS ALTERNATIVOS UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....	45
Resumo.....	46
1 Introdução	47
2. Material e Métodos	48

3. Resultados e discussões	49
4. Conclusões	55
5. Referencias	55
CAPÍTULO IV	60
CONCLUSÕES GERAIS	61
ANEXO	62

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Estrutura química da enzima tanase	14
Figura 2. Bioma caatinga.....	18
Figura 3. Imagens da Laranja (<i>Citrus</i>).....	22
Figura 4. Casca da laranja.....	23
Figura 5. Cacho de uva (<i>Vitis</i> sp).....	23
Figura 6. Resíduos da uva.....	24
Figura 7. Cafeeiro.....	25
Figura 8. Casca do café	266

CAPÍTULO II

Figura 2. Produção de biomassa por <i>Cunninghamella echinulata</i> (A) UCP 1305 e (B) UCP 1308 em diferentes meios de cultura durante o período de 120 horas de cultivo.....	37
Figura 3. Produção da enzima tanase por <i>Cunninghamella echinulata</i> (A) UCP 1305 e (B) UCP 1308 em diferentes meios de cultura durante o período de 120 horas de cultivo.....	47

CAPÍTULO III

Figura 1. Produção de biomassa por <i>C. echinulata</i> (A) UCP 1305 com uso os resíduos uva (A), casca de laranja (B) e café (C) em diferentes concentrações 1, 2, 3% no meio de cultura durante 120 horas de cultivo.....	50
Figura 2. Produção da enzima tanase por <i>C. echinulata</i> UCP 1305 com uso os resíduos uva (A), casca de laranja (B) e café (C) em diferentes concentrações 1, 2, 3% no meio de cultura durante 120 horas de cultivo.....	51
Figura 3. Diagrama de Pareto para análise do substrato nas concentrações e tempo de cultivo das amostras com resíduo da uva (A), casca de laranja (B) e casca de café (C).....	54

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Atividade tanase por amostras de *Cunninghamella echinulata* UCP 1305 e UCP 1308 em diferentes condições de pH e temperatura em 120 h..... 37

Tabela 2. Variação do pH em diferentes meios de cultura por cepas *Cunninghamella echinulata* em 120h de cultivo.....38

CAPÍTULO III

Tabela 1. Variação do pH em diferentes meios de cultura por cepas *Cunninghamella echinulata* em 120h de cultivo..... 51

Tabela 2- Planejamento fatorial-matriz codificada 2^2 de utilização de resíduos..... 53

RESUMO

As enzimas microbianas têm aumentado sua produção nas últimas décadas, devido a sua enorme versatilidade em diversos processos industriais. Tanino acil hidrolase (EC 3.1.1.20) ou tanase, é uma enzima que apresenta uma grande versatilidade e está envolvida diretamente na hidrólise de ésteres e ligações laterais de taninos. Esta enzima é produzida principalmente por diversos gêneros de fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Foram realizados estudos envolvendo amostras de *Cunninghamella echinulata* (UCP 1305 e 1308), isoladas de amostras de solo da Caatinga da cidade de Serra Talhada no Estado de Pernambuco, onde inicialmente foram testadas diferentes temperaturas (28 e 37 °C) e pH (4.5, 5.5, 6.5, 7.0 e 8.0) em meio sólido durante 120 horas, com acompanhamento diário. Após a seleção da melhor amostra produtora, foram realizados estudos de produção enzimática através de fermentação submersa, utilizando quatro meios de composição química diferenciada, durante 120 horas, 37 °C e 150 rpm. Nesses ensaios foram avaliados a curva de crescimento microbiano, variação do pH e a determinação enzimática das amostras a cada 24 hs, Após a seleção do melhor meio de produção, foram realizados ensaios envolvendo planejamento fatorial de 2² com meios contendo resíduos agroindustriais (resíduo de uva, cascas de laranjas e café) nas mesmas condições do meio controle realizado previamente. Os resultados obtidos revelaram que a amostra *Cunninghamella echinulata* UCP 1305 demonstrou a produção de tanase em meio sólido através do aparecimento do halo característico da enzima testada (4,5 cm), com valores de pH de 7,0 e temperatura de 37 °C. Nos ensaios de fermentação submersa, os melhores resultados da atividade enzimática foram obtidos no meio denominado 3, pH de 6.58 e atividade de 0,413 U/mL, sendo denominado de meio controle. Os ensaios utilizando meios alternativos contendo resíduos agroindustriais, demonstraram que o meio contendo resíduo da uva à 3%, apresentou máximo de atividade da tanase (0,357 U/mL) quando comparado aos demais meios testados nas mesmas condições. Verifica-se que a utilização de meios utilizando resíduos agroindustriais ricos em taninos surgem como uma alternativa promissora nos processos fermentativos, pois reduzem a poluição ambiental e geram produtos biotecnológicos de alto valor agregado para as indústrias.

Palavras-Chave: enzima microbiana, substratos agroindustriais, fungos mucorales.

ABSTRACT

Microbial enzymes have increased their production in the last decades, due to their enormous versatility in several industrial processes. Tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) or tannase is an enzyme that exhibits great versatility and is directly involved in the hydrolysis of esters and side-links of tannins. This enzyme is produced mainly by several genera of filamentous fungi, yeasts and bacteria. Studies involving samples of *Cunninghamella echinulata* (UCP 1305 and 1308), isolated from Caatinga soil samples from the city of Serra Talhada in the State of Pernambuco, Brazil, where different temperatures (28 and 37 °C) and pH (4.5, 5.5) were initially tested, 6.5, 7.0 and 8.0) in solid medium for 120 hours, with daily monitoring. After the selection of the best production sample, enzymatic production studies were carried out using submerged fermentation using four different chemical composition media for 120 hours, 37 °C and 150 rpm. In these tests, the microbial growth curve, pH variation and the enzymatic determination of the samples were evaluated every 24 hours. After the selection of the best production medium, tests were carried out involving factorial planning of 2² with media containing agroindustrial residues (grape residue, peels of oranges and coffee) under the same conditions of the previous control medium. The results showed that the sample *Cunninghamella echinulata* UCP 1305 demonstrated the production of tannase in solid medium through the appearance of the halo characteristic of the enzyme tested (4.5 cm), with values of pH of 7.0 and temperature of 37 °C. In the submerged fermentation experiments, the best results of the enzymatic activity were obtained in the medium named 3, pH of 6.58 and activity of 0.413 U / mL, being denominated control medium. The assays using alternative media containing agroindustrial residues, showed that the medium containing grape residue at 3% presented maximum tannase activity (0.371 U / mL) when compared to the other media tested under the same conditions. It is verified that the use of means using agroindustrial residues rich in tannins appears as a promising alternative in the fermentative processes, because they reduce the environmental pollution and generate biotechnological products of high added value for the industries.

Keywords: microbial enzyme, agroindustrial substrates, mucorale fungi.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia tem evoluído expressivamente nos últimos anos, devido aos avanços da biodiversidade microbiana, através do isolamento de novos micro-organismos com elevado potencial biotecnológico, de ambientes pouco conhecidos como a Caatinga. Com isso, existe um incremento no desenvolvimento econômico de pesquisas visando novos bioprodutos de alto valor agregado, produzidos por novos micro-organismos que ainda não foram nem identificados a nível de gênero e espécie desses ambientes, valorizando assim um crescente interesse das indústrias que desenvolvem novos processos, para geração de produtos com maior qualidade, menor consumo energético e que causem menos impactos no meio ambiente (JULLESSON et al. 2015; CAVALCANTI et al, 2017; JAGTAP, RAO, 2018).

O mercado enzimático é considerado extremamente lucrativo e crescente, pois a sua utilização vem conquistando um espaço maior devido a sua vasta aplicação industrial, pois o potencial enzimático apresenta uma versatilidade comprovada devido a série de vantagens apresentadas, superando assim os processos químicos convencionais e contribuindo para a produção de novos compostos e gerar benefícios para o meio ambiente, por meio da biodegradabilidade e pelo menor consumo de energia (MALAFAIA et al.,2016; SINGH, et al., 2016; D'ESTE, ALVARADO-MORALES, ANGELIDAKI, 2018). Porém um dos maiores obstáculos enfrentados na competição com a síntese química são: o alto custo dos processos com biocatalisadores e sua baixa estabilidade térmica (MORAES et al, 2017; D'ESTE, ALVARADO-MORALES, ANGELIDAKI, 2018).

As enzimas são compostos químicos que apresentam uma alta eficiência catalítica, alto grau de especificidade e uma grande capacidade em acelerar reações específicas, na maioria das vezes, sem a formação de subprodutos residuais indesejáveis, reduzindo assim a probabilidade de grandes focos de poluição ambiental (GUSMÃO, SILVA, MEDEIROS, 2017), e são mais específicas em sua ação do que as substâncias químicas sintéticas e esses aspectos contribuem para o emprego acelerado destes biocatalisadores em todos os campos industriais atualmente (SILVA, MALTA, 2017; PATEL, SINGHANIA, PANDEY, 2017; SHRESTHA et al., 2018).

Os taninos são moléculas solúveis em água com diferentes pesos moleculares (500-3000 Da) e alto teor de polifenóis, que ocorrem em certas partes de plantas, tais como casca, madeira, folhas, frutos, raízes e sementes (LATA, RANI, 2016; GARCIA et al. 2016; AMAROWICZ, PEGG, 2018).

Os taninos são classificados em três grupos: condensados, complexos e hidrolisáveis. Esta última classe apresenta em sua estrutura química um núcleo de açúcar ligado por esterificação de ácido gálico (galotaninos) ou ácido elágico (elagitaninos) (PRASAD et al, 2012).

Tanino acil hidrolase ou tanase (EC 3.1.1.20) é uma enzima extracelular que hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis como o ácido tânico, liberando glicose e ácido gálico (CAVALCANTI, GUIMARÃES, 2018). É uma enzima induzível para fins industriais na produção de diversos produtos, sendo a grande maioria produzida por micro-organismos, devido sua excelente facilidade de crescimento, controle de diferentes parâmetros (pH, temperatura, aeração e umidade), além de ser de fácil recuperação por serem enzimas extracelulares (ORLANDELLI et al, 2012; DHIMAN, MUKHERJEE, SINGH, 2018).

A utilização de diversos gêneros de micro-organismos, principalmente os fungos filamentosos, em processos fermentativos submersos para produção industrial de uma grande maioria de bioprodutos microbianos, principalmente as enzimas microbianas (WANG, et al., 2016; PLEISSNER, VENUS, 2016; CHAMBERGO, VALENCIA, 2016; SILVA, MALTA, 2017; SHARMA et al., 2017; SUN et al., 2018; LADICS, SEWALT, 2018).

Essa classe de micro-organismos é considerada biotecnologicamente como excelentes biodegradadores, pois o crescimento micelial fúngico confere uma vantagem sobre as células unicelulares (bactérias e leveduras), especialmente no que concerne à colonização em substratos insolúveis, além de tolerar maiores concentrações de produtos tóxicos que os outros micro-organismos (BARATTO et al, 2011; ASINA et al., 2016; COLLADO et al., 2018). O gênero *Cunninghamella* têm se destacado pela produção de diversos bioprodutos de origem microbiana nos últimos anos (KARATAY, DONMEZ, 2014; SOUZA et al., 2016; DA COSTA LIMA et al., 2017; ANDRADE et al., 2018).

O reaproveitamento de resíduos agroindustriais para formulação de meios para produção de diversos bioprodutos economicamente viáveis, têm sido relatado na literatura, devido a sua grande quantidade de micro e macronutrientes presentes em sua composição química, que podem facilmente serem assimilados por diversos gêneros de micro-organismos e biotransformados em produtos de alto valor agregado, além de redução de custos na produção desses meios e da poluição ambiental (GOUVEIA et al., 2015; MOURA et al., 2016; GÜNEŞER et al., 2016; FONSECA et al., 2018; TADDIA, BOGGIONE, TUBIO, 2018)

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir e detectar a atividade enzimática da tanase utilizando uma amostra de *Cunninghamella echinulata* através da formulação de meios alternativos contendo substratos agroindustriais ricos em taninos.

2.2 Objetivos Específicos

- 1 Selecionar amostras de *Cunninghamella echinulata* em meio sólido, produtoras de tanase através de diferentes valores de temperatura e pH;
- 2 Avaliar e selecionar meios tradicionais de produção de tanase utilizando fermentação submersa em condições pré-estabelecidas;
- 3 Testar diferentes substratos agroindustriais ricos em taninos (resíduo da uva, cascas de laranja e café) na produção de tanase através da formulação de meios alternativos;
- 4 Investigar a influência da presença dos substratos nos diferentes meios através da cinética de crescimento, determinação do pH e na produção enzimática;
- 5 Validar os resíduos por métodos estatísticos, utilizando planejamento fatorial completo 2^2

.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Enzimas

As enzimas são moléculas de caráter proteico, biocatalisadoras com capacidade de acelerar e/ou retardar reações químicas específicas e diminuir a energia de ativação para formação de um novo produto. Sua ação possibilita uma boa digestibilidade de diversos nutrientes, favorecendo assim o aproveitamento do fósforo, cálcio e aminoácidos, resultando numa melhor eficiência produtiva. Essas reações que catalisam as enzimas, podem ser divididas em seis classes distintas: oxidoredutases, transferases, hidrolases, lipases, isomerases e ligases (CAMPOS et al. 2017).

Essas moléculas estão envolvidas em inúmeras reações bioquímicas existentes e em muitos processos biológicos realizados por organismos vivos, catalisando essas reações e favorecendo assim a degradação dos nutrientes envolvidos e consequente conservação e transformação da energia química das macromoléculas biológicas sintetizadas a partir de moléculas precursoras simples (BATISTA et al., 2012; HYSTER, WARD, 2016).

O mercado industrial mundial de produção de enzimas é crescente devido a sua grande utilização em diversos setores industriais e/ou ambientais, principalmente pelos avanços da biotecnologia e da engenharia genética, pois o aparecimento de novos estudos envolvendo a biodiversidade e prospecção de novos micro-organismos vem crescendo de forma acelerada no cenário mundial, e se tornando um dos focos principais da era biotecnológica atual, porque os estudos de isolamento e a utilização dessa biodiversidade, podem apresentar soluções futuras em diversas áreas (alimentícia, saúde, meio ambiente e industrial) (GOHEL et al., 2006; SANTOS et., al. 2013; ARORA, BEHERA, KUMAR, 2015; PEIL et al., 2016; DANILOVICH et al., 2018).

O alto custo envolvido nos diversos processos com utilização de biocatalisadores enzimáticos, reflete de forma negativa na descoberta de novos micro-organismos para produção de diversos produtos de alto valor agregado, pois os custos são considerados elevados, e os investimentos das alternativas utilizadas para redução desses custos, torna-se fundamental para o favorecimento de novas aplicações industriais, e consequentemente (SANTOS et., al. 2013).

Enzimas de origem microbiana são consideradas de grande aplicabilidade industrial quando comparadas as de origem animal e vegetal, em virtude da facilidade de manuseio genético, especificidade, estabilidade, e apresentam um mercado

industrial de aplicação crescente devido ao desenvolvimento de novas tecnologias durante a produção e o aparecimento de novos campos de aplicação (LYND et al., 2002; REINEHR et al., 2014; IMRAN et al., 2015; RAVEENDRAN et al., 2018; DOS SANTOS AGUILAR, SATO, 2018).

A demanda de produção de enzimas industriais em economias consideradas estabilizadas, como os EUA, Europa Ocidental, Japão e Canadá foi relativamente estável durante as últimas décadas, enquanto que as regiões com economia em desenvolvimento como Oriente Médio, Ásia-Pacífico, Europa Oriental e África, emergiram como mercados que mais crescem para indústrias de enzimas (DIETZ, et al., 2018). O Brasil não apresenta um perfil atuante na área de produção enzimática, mas várias pesquisas têm sido relatadas envolvendo a bioprospecção microbiana na produção de diferentes tipos de enzimas (NAIR et al., 2008; ORLANDELLI et al., 2012; DA SILVA et al., 2012; JESUS et al., 2013; TALLAPRAGADA, VENKATESH, 2017; DE SALES et al., 2017; SRIVASTAVA et al., 2018)

A ampla aplicabilidade enzimática em diferentes setores industriais na fabricação de produtos biotecnológicos através do tratamento de resíduos, torna a produção de enzimas é um dos setores primordiais da indústria biotecnológica e sua introdução em processos industriais torna-se um negócio lucrativo e atrativo do ponto vista econômico, além de serem vantajoso, pois são específicas, naturais e geralmente não apresentam toxicidade, características favoráveis para a indústria (COSTA et al., 2012).

Várias enzimas são utilizadas nas industriais, dentre elas: a tanase, lacase, lipase, amilase, e etc. Elas são mais específicas em sua ação do que as substâncias químicas sintéticas e diversas são processos químicos e biotecnológicos envolvendo-as e podem substituir substâncias químicas sintéticas contribuindo para processos de produtivos além de gerar benefícios para o meio ambiente, por meio da biodegradabilidade e pelo menor consumo de energia (SANTOS et al., 2012).

A ampla utilização das enzimas são consequências do vasto perfil de atuação sob o mesmo substrato através de variações no pH, temperatura e concentrações, e nos processos que empregam enzimas microbianas resultam em produção com menos subprodutos residuais, para a obtenção de produtos de melhor qualidade, diminuindo a probabilidade de poluição ambiental (OYELEKE et al., 2012).

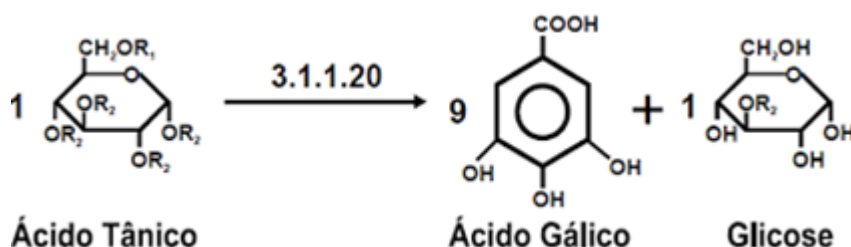
Enzimas de origem microbiana são melhores aproveitadas em sua aplicabilidade industrial em virtude da facilidade de manuseio genético, especificidade e estabilidade,

e o mercado industrial de aplicação cresce devido ao desenvolvimento de novas tecnologias durante a produção e o aparecimento de novos campos de aplicação (REINEHR et al., 2014).

3.2 Tanase

Tanino acil hidrolase ou tanase (EC 3.1.1.20), é uma enzima que pertence à classe das hidrolases, e que se caracteriza pela ação hidrolítica em complexos polifenólicos, tendo a capacidade (Figura 1) de hidrolisar ligações éster e ligações depsídicas de taninos hidrolisáveis como ácido tânico, galato de metilo, ácido digálico, epicatequina galato, epigallocatequina galato, liberando após as reações, produtos como glicose e ácido gálico em substratos como ácido tânico, epicatequinagalato, epigallocatequinagalato, ácido clorogênico entre outros compostos químicos, apresenta ponto isoelétrico de 4.0-4.5 e massa molecular entre 180kDa e 300kD (BATTESTIN, 2007; BENIWAL et al., 2013; RAGHUWANSHI et al., 2014; DE LIMA, 2014; MAKELA et al., 2015; PANESAR et al., 2016; AHARWAR, PARIHAR, 2018).

Figura 1. Estrutura química da enzima tanase



Fonte: <https://www.google.com.br/enzima+tanase>

As tanases são consideradas enzimas extracelulares podendo serem obtidas por diferentes fontes como plantas e micro-organismos (leveduras, fungos filamentosos e bactérias), sendo os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium* e *Rhizopus* (PINTO et al., 2001; LIU, et al. 2016; DHIMAN et al., 2017; ANDRADE et al., 2018) e as bactérias como *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Ewinia* e *Pseudomonas*, (MONDAL et al., 2001; MATSUDA et al., 2016; KIVANÇ et al., 2016; DE LAS RIVAS et al., 2018) leveduras dos gêneros *Kluyveromyces*, *Candida*, *Saccharomyces* (CHERITA et al., 2016; MALAK, BARONIAN, KUNZE, 2016; CHERITA et al., 2017; MAHMOUD et al., 2018), as fontes mais adequadas de produção da enzima descritas na literatura. As tanases produzidas por fungos filamentosos e leveduras

apresentam em sua maioria estruturas protéicas com elevada massa molecular, podendo ser superiores a 300 KDa (PRIGIONE, et al., 2018).

Os taninos são compostos que estão distribuídos em diferentes espécies de vegetais, são encontrados principalmente em espécies gimnospermas e angiospermas ocorrem em certas partes de plantas, tais como casca, madeira, folhas, frutos, raízes e sementes, fazem parte do metabolismo secundário das plantas e apresentam um elevado teor de polifenóis (PRASAD et al., 2012). São definidos quimicamente como polifenóis e devido à presença de anéis fenólicos em sua estrutura, apresentam massa molecular variando entre 500 a 3000 g/mol aproximadamente, sendo classificados quimicamente como taninos hidrolisáveis e taninos condensados (VIEIRA, LELIS, RODRIGUES, 2014). Os hidrolisáveis são divididos em galotaninos que são caracterizados pela presença de moléculas de ácidos orgânicos como: gálico e digálico esterificados a uma molécula de glicose e elagitaninos que são compostos por unidades de ácidos elágico ligadas a glicosídeos (MELLO, 2012).

As tanases produzidas através de processos fermentativos necessitam da presença de um indutor, sendo o ácido tânico esse indutor ou mesmo única fonte de carbono presente na composição do meio de produção, pois mesmo na presença de outras fontes de carbono, a concentração de ácido tânico, é um fator predominante para produção dessa classe enzimática (BELMARES et al., 2004; RUDRA et al., 2015; JANISSEN, HUYNH, 2018). Verifica-se que diferentes fontes de nitrogênio inorgânicas e orgânicas (sulfato de amônio, nitrato de sódio e peptona) têm sido utilizadas para a produção da tanase. Foi descrito que a presença de íons de ferro, zinco e cobre na composição do meios de produção são essenciais para a produção da enzima (BELMARES et al, 2004; BELUR, MUGERAYA, 2011; DHIMAN, MUKHERJEE, SINGH, 2018).

A produção dessa classe de enzimas apresenta características importantes, pode ser produzida numa ampla faixa de pH (3,0-8,0), tendo como pH ótimo 6,5 e temperatura de atividade ótima em 70°C, podendo atingir a estabilidade térmica na faixa entre 30°C e 80°C. As tanases podem serem inibidas pela presença de íons metálicos (Ba^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} e Ag^{2+}), além de tiosulfato, carbonato, bissulfato de sódio, EDTA, 2-mercaptoetanol, ácido 4-aminobenzoico, azida sódica, n-bromo succinato, cisteína, tween 80 e tween 20 (AGUILAR et al., 2007; SRIVASTAVA, KAR, 2009; LAL, GARDNER, 2012; MALGIREDDY, NIMMA, 2015; FARAG et al., 2018).

Quimicamente as tanases apresentam a capacidade em hidrolisar taninos e sintetizar ésteres dependendo do solvente utilizado nos processos, os solventes polares (água e tampões) são os mais indicados para as reações, porém solventes apolares (hexano e benzeno) também podem ser utilizados, pois o processo de catálise pode ser ativado em meio orgânico, visto que existe um aumento das interações moleculares entre os grupos integrantes no processo enzimático, favorecendo assim o meio reacional (AGUILAR et al, 2007; PANESAR et al., 2016; KAUR et al, 2018).

Esta classe enzimática pode ser encontrada numa grande variedade de vegetais (famílias Choripetalaedae dicotiledôneas, dicotiledôneas herbáceas e lenhosas porém as de origem microbiana são consideradas mais estáveis (ROBERTO et al., 2016). As tanases produzidas por fungos filamentosos e leveduras são em sua maioria estruturas protéicas com elevada massa molecular, podendo ser superiores a 300 KDa, sendo caracterizadas como glicoproteínas. O conteúdo de carboidratos pode variar de 25,4 a 66,2% do peso total da enzima (JANA et al., 2014; ZHANG et al., 2016; DHIMAN, MUKHERJEE, KUMAR, 2017).

As tanases apresentam um grande número de aplicações industriais (produção de ácido gálico, chás instantâneos, estabilização da cor do vinho, processo de tratamento de couros, detanificação de alimentos, produção de antioxidantes e para tratamento de efluentes na indústria de couros. Além disso, tem sido utilizada na remoção de taninos dos gêneros alimentares e rações para animais, uma vez que esses alimentos apresentam concentrações elevadas de taninos ligados a hidratos de carbono, proteínas e sais minerais ((BELMARES et al., 2004; AGUILAR et al., 2007; CHANDINI et al., 2011; BENIWAL et al., 2013; YAO et al., 2014; AGUILAR-ZÁRATE et al., 2014; AHARWAR, PARIHAR, 2018; PRIGIONE et al., 2018; KUMAR, SREEKUMAR, SABU, 2019).

A enzima vem sendo comercializada por empresas como Biocon (Índia), Kikkoman (Japão), ASA specilaezzyme GmbH (Alemanha), JFC GmbH (Alemanha) e Amano (Japão) com diferentes unidades catalíticas, dependendo da finalidade do produto (KUMAR et al., 2014; DE VASCONCELLOS TEIXEIRA et al., 2018).

Apesar de suas inúmeras aplicações industriais, a produção de tanase é ainda considerada um processo de elevado custo industrial, por passar por um longo processo biotecnológico (BELUR et al., 2011). Além do seu elevado custo de produção, fatores com matéria prima como fonte de substrato e os micro-organismos que viabilizem uma produção contínua, ainda são problemas que necessitam serem resolvidos. Uma das alternativas para contornar essa situação, seria a utilização de subprodutos agrícolas

para formulação de meios de produção, para servir de substrato para o crescimento de micro-organismos produtores (PODRIGUES et al., 2003; WANG et al., 2013; MADEIRA JR et al., 2015; MOURA et al., 2016; KAPOOR, PANWAR, KAIRA, GUTIERREZ-MACIAS, 2016; DE JESUS, BARRAGAN-HUERTA, 2017; KUMAR, SWAPNA, SABU, 2018; SAMPAIO, et al., 2018, AHARWAR, PARIHAR, 2019; BINOD et al., 2019).

3.3 Fermentação Submersa

Os processos submersos são aqueles em que os micro-organismos se desenvolvem em meio de cultura com agitação constante. Na fermentação submersa, o crescimento do micro-organismo ocorre com uma suspensão em meio líquido, no qual vários nutrientes são dissolvidos (FAHEINA JUNIOR, 2012). Muitas espécies de micro-organismos tem sido alvo para investigação da potencialidade industrial, principalmente como fontes enzimas (OYELEKE et al., 2012). Na fermentação submersa usa-se o microrganismo e os incentiva ao crescimento por intermédio na inserção do mesmo no meio de cultura.

A fermentação com micro-organismos nos processos biotecnológicos industriais e ambientais tem sido uma das alternativas mais viáveis empregadas nos últimos anos, devido a suas inúmeras vantagens apresentadas como: a sua elevada capacidade fisiológica de reprodução, produção de diversas substâncias em diferentes temperaturas, pH e meios de cultivo (SILVA et al, 2012).

Dentre os micro-organismos os fungos filamentosos se destacam devido à sua facilidade de cultivo, é a classe de micro-organismos mais valorizados porque produzem uma extensa gama de enzimas extracelulares, o que facilita a recuperação destas no meio fermentativo, por secretarem suas enzimas diretamente no meio em que se encontram não necessitando de ruptura celular para sua liberação, podem ser cultivados em larga escala e um curto período de tempo, levando a produção de tanase em altas quantidades, porem somado aos custos associado ao meio de cultivo, inviabiliza a transposição do processo para escala industrial (GOMES et al., 2016).

3.4 Bioma caatinga

A Caatinga compreende cerca de 55% dos 1.548.672 km² da área da região Nordeste do Brasil, ocupa áreas dos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Piauí, Bahia e de Minas Gerais. É considerado um dos mais conservados que os demais biomas, mesmo assim sofre ameaças à sua conservação devido à prática de atividades como contínuos desmatamentos para

estabelecer pastagens e utilização de técnicas de irrigação inadequadas. Essas práticas intensificam a desertificação, o assoreamento dos rios e aceleram ainda mais o desgaste do solo que poderá levar o mesmo a um processo irreversível de degradação (JUNIOR et al., 2013).

O bioma Caatinga está inserido no semiárido brasileiro e representa aproximadamente 11% do território nacional é exclusivamente brasileiro é caracterizado pelo clima quente, sendo um dos biomas considerado mais representativo e heterogêneo dos biomas brasileiros (GIONGO et al., 2012). Apresenta uma enorme biodiversidade de organismos e micro-organismos, que são ainda pouco conhecidos e descritos na literatura. (DE MELO et al., 2015; CAVALCANTI et al, 2017).

Com índice pluviométrico relativamente baixo, distribuídos por um período de três a seis meses, apresenta uma vegetação com deficiência hídrica (Figura 2) e que ainda pode ser agravada por períodos de secas (SILVA, SANTA IZABEL, GUSMÃO, 2014).

Figura 2. Bioma caatinga



Fonte: <https://www.google.com.br/caatinga+flora>

A Caatinga é considerado como um ambiente rico em biodiversidade, o solo desse bioma armazena organismos vivos e proporciona altas taxas metabólicas por existirem raízes e decomposição da matéria orgânica, abrigando um número considerável de espécies de animais e plantas endêmicas contradizendo a teoria de que esse bioma era improdutivo e pobre em diversidade (NASCIMENTO et al., 2014).

A matéria orgânica fornecida por essa vegetação assim como as demais, são compostas por folhas, cascas, galhos, flores e frutos que são levadas para os ambientes aquáticos através de chuvas, ventos, escoamentos de águas superficiais e

assoreamentos e esse material é de relevância para a vida dos organismos existente nesse bioma, onde os fungos, através da colonização e decomposição, os transformam em importante fonte de energia e de nutrientes. Abordando a biodiversidade, predominância e importância dos fungos neste bioma consideraram que esse grupo é baseado nos aspectos morfológicos e modo de vida desses organismos nas características do ambiente em destaque (SILVA et al., 2014).

3.5 Resíduos agroindustriais

A economia brasileira é fortemente baseada no agronegócio, o que leva o país a apresentar/produzir elevadas quantidades de resíduos agroindustriais diariamente, os quais representam algumas das fontes mais ricas de energia renovável do planeta. Porém o acúmulo dessa biomassa, ainda mais em grandes quantidades, traz prejuízos ao meio ambiente e também resulta na perda de materiais que ainda são considerados potencialmente valiosos, pela grande quantidade de nutrientes que possui em sua composição química. Essas razões, aliadas ao baixo custo de tais matérias-primas, têm aumentado o interesse na utilização desses resíduos em processos biotecnológicos (ROSA et al., 2011; DO NASCIMENTO FILHO, FRANCO, 2015; AUAD et al., 2016).

Os resíduos agroindustriais são gerados em diversos processamentos de alimentos, fibras, couros, madeiras, produção de açúcar e álcool, etc., sendo sua produção, geralmente, sazonal, condicionada pela maturidade da cultura ou oferta da matéria-prima. A produção de águas residuárias (oriundas de lavagens de produtos, escaldamentos, cozimentos, pasteurização, resfriamento e lavagem do equipamento de processamento e das instalações (CRAVO et al., 2015; GOUVEIA et al., 2015; GUIMARÃES et al., 2018). Na maioria dos casos, os resíduos oriundos das agroindústrias, normalmente não são tratados e apresentam uma disposição ambientalmente inadequada, com potenciais ricos de contaminação em solos e águas (PEDROSA et al., 2013; CURY et al., 2017).

A geração diária de elevadas quantidades de resíduos, os quais representam algumas das fontes mais ricas de energia renovável do planeta, gera a formação de biomassa. O acúmulo dessa biomassa, ainda mais em grandes quantidades, traz prejuízos ao meio ambiente e também resulta na perda de materiais biotecnologicamente de alto valor agregado. Essas razões, aliadas ao baixo custo de tais matérias-primas, têm aumentado o interesse na utilização desses resíduos em processos biotecnológicos utilizando processos fermentativos (DE SIQUEIRA et al., 2010; DO NASCIMENTO FILHO, FRANCO, 2015; DOS SANTOS et al., 2018).

Resíduos e subprodutos agroindustriais são fontes abundantes de compostos orgânicos e são passíveis de recuperação e aproveitamento, por apresentarem elevado potencial de utilização como matéria prima em processos industriais envolvidos com a produção de alimentos, combustíveis, insumos químicos, enzimas e bens de consumo diversos (SOCCOL et al., 2006; DOS SANTOS ROCHA, ALMEIDA, DA CRUZ, 2017).

Nos diferentes processos fermentativos utilizados atualmente, as matérias-primas consideradas complexas (apresentam sua composição química variada, porém nem sempre definida) oriundas do agronegócio, podem ser utilizadas na preparação de meios de produção (bagaço de cana-de-açúcar, polpa de beterraba, resíduo de uva, soro de queijo, água de maceração de milho, casca de arroz, casca de café, cascas de frutas cítricas, farinha de pena). Com isso, diversos processos têm sido desenvolvidos com a utilização desses resíduos para a produção de etanol, cogumelos, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos e metabólitos secundários ativos (PELIZER, PONTIERI, DE OLIVEIRA MORAES, 2007; OLIVEIRA et al., 2013; DE MENDONÇA COSTA et al., 2016; SALGADO et al., 2019).

A geração de resíduos e subprodutos é inerente a implementação de qualquer setor produtivo. O aumento de uma maior conscientização ecológica, foi iniciado no final do Século XX, deixando evidente que o grande desafio da humanidade para as próximas décadas, será o equilíbrio da produção de bens e serviços, o crescimento econômico, a igualdade social e sustentabilidade ambiental. Os resíduos gerados pelas diferentes atividades humanas, atualmente constituem o grande desafio a ser enfrentado pelos municípios, principalmente nos grandes centros urbanos (LAZARO et al., 2015; GUIMARÃES et al, 2018).

Durante os últimos 30 anos, o impacto ambiental das atividades agroindustriais, tornou-se uma preocupação constante de ambientalistas, legisladores, clientes, autoridades públicas e sociedade em geral (PORTUGAL-PEREIRA et al., 2015; SILVEIRA, 2017).

A utilização adequada dos resíduos agroindustriais gerados, pode ajudar não somente a redução da poluição ambiental, mas também agregar valor às indústrias processadoras, promovendo a redução dos custos de produção de metabólitos de alto valor agregado. (WOICIECHOWSKI et al., 2013; SANTOS, GUARNIERI, BRISOLA, 2018).

Apesar da grande diversidade metabólica presente nos diversos micro-organismos existentes, nem sempre estes resíduos são de fácil utilização. Essas

matérias-primas são, em sua grande maioria são muito resistentes e menos susceptíveis a ação de enzimas. Assim, muitas vezes se tornam necessários pré-tratamentos desses resíduos, incluindo técnicas de natureza física (moagem, térmica), química (tratamento alcalino) ou enzimática. Estes tratamentos podem ser necessários para promover uma maior disponibilização dos nutrientes que serão utilizados pelos micro-organismos presentes nos resíduos a serem utilizados (DE ARAÚJO et al., 2019).

Considerando que a maioria desses resíduos são de origem vegetal, os mesmos podem apresentar diferenças na composição de nutrientes, em função de mudanças no solo, na variedade do vegetal, na safra, no clima, no processamento durante a colheita e na estocagem. Assim, vários estudos pilotos são necessários para otimizar as melhores condições de uso desses resíduos antes de aplicá-los nos bioprocessos. Além disso, análises bromatológicas (estudo da composição química, como fibras, minerais, carboidratos, proteínas, umidade) prévias são necessárias, para determinar a composição de nutrientes dos mesmos, permitindo um melhor acompanhamento de possíveis mudanças em diferentes lotes da matéria-prima (TOLMASQUIM, 2012; PERIMENIS et al., 2018).

A obtenção de novos materiais, produtos, co-produtos e substâncias químicas a partir de resíduos agroindustriais tem encontrado espaço e vem sendo desenvolvida. Além da ampliação do mercado, pela disponibilização e valorização de novos produtos, o desenvolvimento de novos usos de produtos agropecuários e de tecnologias que revertam o conceito de resíduo para o de matéria-prima para a produção de novos materiais é imprescindível para otimizar a eficiência do agronegócio além de reduzir o impacto ambiental (BORGES et al., 2017).

3.5.1 Casca da laranja

A laranja é o fruto da laranjeira (*Citrus × sinensis*)(figura 3), uma árvore da família *Rutaceae*. É um fruto híbrido que teria surgido na antiguidade a partir do cruzamento da cimboa com a tangerina. O sabor da laranja varia do doce ao levemente ácido, mas na natureza existem também as laranjas extremamente ácidas, que pertencem a outra espécie, a *Citrus aurantium* (NEGREIROS et al., 2014).

Figura 3 – Imagens da Laranja (*Citrus*)



Fonte: <http://www.chacarasantista.com.br/produtos/laranja/>

A laranja está entre as frutas mais produzidas e consumidas no mundo. O Brasil está entre os três maiores produtores de frutas ocupando a terceira posição, existindo em seu mercado interno indústrias de sucos com grandes potências de produção, além de apresentar frutas em sua biodiversidade com características que são utilizadas pelas indústrias de cosméticos, farmacêuticas, alimentícias (NASCIMENTO FILHO; FRANCO, 2015).

O Brasil produz em torno de 53% da produção mundial de suco de laranja sendo responsável por 80% do comércio internacional desse produto. A laranja representa aproximadamente 49% da produção brasileira de frutas, gerando assim uma grande quantidade de resíduos (GOBBI et al., 2014).

A valorização de resíduos inicia com a caracterização dos mesmos, a casca da laranja contém 16,9% de açúcares solúveis, 9,21% de celulose, 10,5% de hemicelulose e 42,5% de pectina como o componente mais importante (figura 4). Os açúcares solúveis da casca de laranja são glicose, frutose e sacarose. Devido à sua composição rica em carboidratos solúveis e insolúveis, esse subproduto apresenta grande potencial para ser utilizado em produtos de alto valor agregado obtidos através da hidrólise química ou enzimática e posterior conversão biológica (RIVAS et al., 2008; COSTA et al., 2014).

Figura 4. Casca da laranja



Fonte: <https://www.pensamentoverde.com.br>

Esses resíduos também apresentam um alto valor energético, e podem contribuir para reduzir a dependência de energia comprada para geração de calor, vapor ou eletricidade na maiorias das indústrias. Apesar da ampla possibilidade de utilização, existem poucos trabalhos na literatura referindo-se ao uso de resíduos da agroindústria da laranja para fins energéticos (NEGREIROS et al., 2014).

3.5.2 Resíduos da uva

A uva é o fruto da videira (*Vitis sp.*) Figura 5, uma planta da família das Vitaceae. É utilizada frequentemente para produzir sucos, doces (geleia), vinhos e passas, podendo também ser consumida ao natural (BOTELHO, PIRES, TERRA, 2006).

Figura 5. Cacho de uva (*Vitis sp*)



Fonte: www.nagumo.com.br/uva

A uva é formada de 6 a 12% de casca, 29% de semente e 85 a 92% de polpa, que constitui a principal parte da uva, sendo constituída por 65 a 85% de água, 12 a 25% de açúcares redutor, 0,6 a 1,4% de ácidos orgânicos, 0,25 a 0,5% de substâncias minerais, 0,5 a 0,1% de compostos nitrogenados, além de diversas vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis, é constituída de 48% de massa seca, 16,44% de proteína bruta, 51,20% de fibra de detergente neutro, 11,24% de extrato etéreo e 3,72% de matéria mineral. (PENNA, HECKTHEUER, 2004; GRAEBIN, 2014).

No processo de fabricação do vinho, a cada 1000g de uvas colhidas, após o esmagamento, são gerados cerca de 350g de resíduos (cascas, engaços e sementes), que geralmente são jogados nos solos dos parreirais das indústrias vinícolas, servindo apenas como matéria orgânica para fertilização. O bagaço da uva é um abundante subproduto da nossa indústria vitivinícola (BORGHEZAN, 2017).

O bagaço (Figura 6) é o principal subproduto da vinificação, é definido como o resíduo da prensagem das uvas frescas, fermentado ou não. Diversas tecnologias são utilizadas para o aproveitamento energético da biomassa: a combustão, gaseificação, geração de biogás e pirólise utilizam o bagaço de uva e outros resíduos vegetais energéticos em quantidade suficiente para assegurar a viabilidade deste tipo de instalações (ROSSI, MOURA, 2014; SANTOS, 2014).

Esse sub-produto apresenta quantidades significativas de substâncias fotoquímicas que conferem características como cor, aroma e adstringência a vinhos além das propriedades benéficas a saúde humana. Sementes e cascas de uva são boas fontes de taninos ricos em compostos bioativos como ácido gálico, catequina, epicatequina, carotenoides e tocoferóis. A casca é rica em pigmentos, como antocianidinas e antocianinas pertencentes ao grupo dos flavonoides, apresentando-se como matérias-primas adequadas à produção de ingredientes e suplementos alimentares antioxidantes. As pesquisas buscam-se formas de reaproveitar a biomassa residual gerada durante a produção de vinho e sucos de uvas (ROBERTO, COLOMBO, ASSIS, 2011; ASSUNPÇÃO, 2014).

Figura 6. Resíduos da uva



Fonte: <https://www.alamy.com/residue>

3.5.3 Resíduos do café

O café pertence à família das Rubiáceas. Atualmente duas espécies são produzidas comercialmente no Brasil: a *Coffea arábica* (arábica) e a *Coffea Canephora* (conilon ou robusta). É uma bebida produzida a partir dos grãos torrados do fruto do cafeeiro (Figura 7). É servido tradicionalmente quente, mas também pode ser consumido gelado. O café é um estimulante, por possuir cafeína — geralmente 80 a 140 mg para cada 207 ml dependendo do método de preparação (OLIVEIRA, CARVALHO, SILVEIRA, 2001; DURÁN, et al., 2017; DE FREITAS MOURA, BUENO, 2018).

Figura 7. Cafeeiro



Fonte: www.jornaleconomico.sapo

A cafeicultura dá origem a um volume elevado de resíduos, principalmente a casca de café (Figura 8). A crescente preocupação com os problemas ambientais, tem elevado o número de pesquisas sobre a destinação desses resíduos gerados no processamento agroindustrial do café. Após a colheita, apontam a polpa, a mucilagem, o pergaminho e a casca como resíduos originados de formas diferentes de beneficiamento do café. No Brasil, a forma mais comum de preparo de café ocorre por via seca (fruto de café seco ao sol ou em pré-secadores e secadores artificiais), resultando em resíduos formados por casca e pergaminho, com rendimento de aproximadamente 50% do peso colhido (MOREIRA, TRUGO, DE MARIA, 2000; CRISÓSTOMO, 2014; FOSCACHES, SAES, VACARI, 2016; RIBEIRO, RIBEIRO FILHO, RUFINO, 2017; COTI-ZELATI, COPPINI, GHOBIL, 2018).

Figura 8. Casca do café



Fonte: <https://www.google.com.br/cascara+do+cafe>

A casca é considerada um subproduto disposto na natureza com característica tóxica e seu descarte inadequado é um grande problema para o meio ambiente, normalmente é utilizada como fertilizante para ração animal e biocomposto, porém uma alternativa é o uso como fonte de carbono para o cultivo de micro-organismos em diferentes bioprocessos industriais por apresentar altos teores de matéria orgânica e quantidade satisfatória de açúcares fermentescíveis (GUSMÃO et al., 2014; PONTES et al., 2018).

Além de criar potenciais problemas ambientais, os resíduos representam perdas de matérias-primas e energia, exigindo investimentos significativos em tratamentos para controlar a poluição. Muitos dos tratamentos não eliminam realmente os resíduos gerados, apenas os transferem para outro meio (TIMOFIECSYK; PAWLOWSKY, 2000; BASTOS, AMAURO, BENITE, 2017).

O café apresenta uma considerável quantidade de cafeína e taninos. A presença de bactérias, leveduras e fungos filamentosos durante as etapas de pré e pós-colheita mostram a importância da microbiota presente, através do seu papel no processo de fermentação dos frutos, que é de grande importância para qualidade do produto final, pois esses micro-organismos possuem influenciam diretamente na degradação dos compostos presentes nos grãos ou através da excreção de metabólitos que difundem para o interior dos grãos. (DE MARIA, MOREIRA, 2007; CRISÓSTOMO, 2014; FOSCACHES, SAES, VACARI, 2017).

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHARWAR, A.; PARIHAR, D. K. *Talaromyces verruculosus* tannase production, characterization and application in fruit juices detannification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.18, 2019.

ANDRADE, P. M. L. et al. Co-production of tannase and gallic acid by a novel *Penicillium rolsii* (CCMB 714). **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, n. 8, p. 700-706, 2018.

AGUILAR-ZÁRATE, P. et al. Bacterial tannases: production, properties and applications. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 13, n. 1, 2014.

AGUILAR, C. N. et al. Microbial tannases: advances and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 47-59, 2007.

AHARWAR, A.; PARIHAR, D. K. Tannases: Production, properties, applications. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v.15, p. 322-334, 2018.

AUAD, G. A. et al. Uso de resíduos orgânicos e inorgânicos para agricultura. **Revista de Iniciação Científica da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 5, n. 2, 2016.

BASTOS, M. A.; AMAURO, N. Q.; BENITE, A. M. C. A química do café e a lei 10.639/03: uma atividade prática de extração da cafeína a partir de produtos naturais. **Revista da Associação Brasileira de Pesquisadores/as Negros/as (ABPN)**, v. 9, n. 22, p. 312-331, 2017.

BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 9, p. 1832-1837, 2007.

BATTESTIN V, MATSUDA K.L, MACEDO A.G. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alim. Nutr.** n.15, v.1, p. 63-70 ,2004.

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

BELUR, P. D.; MUGERAYA, G. Microbial production of tannase: state of the art. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 25-40, 2011.

BENIWAL, V. et al. Recent advances in industrial application of tannases: a review. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 228-233, 2013.

BINOD, P. et al. Introduction to Green Bioprocesses: Industrial Enzymes for Food Applications. In: **Green Bio-processes**. p. 1-8, 2019.

BORGES, A. C. P. et al. Energias renováveis: Uma contextualização da biomassa como fonte de energia. **Ede-revista eletrônica do prodema**, v. 10, n. 2, 2017.

CHANDINI, S. K. et al. Enzymatic treatment to improve the quality of black tea extracts. **Food chemistry**, v. 127, n. 3, p. 1039-1045, 2011.

CHERITA, G. K. S C. et al. Yeast as a potential candidate for tannase production: a review. **Current Biochemical Engineering**, v. 3, n. 2, p. 82-88, 2017.

COTI-ZELATI, P. E.; COPPINI, D. A. H.; GHOBIL, C. N. Desempenho operacional na exportação do café brasileiro. **Agropampa: Revista de Gestão do Agronegócio**, v. 3, n. 1, 2018.

CRAVO, J. C. M. et al. Paineis aglomerados de resíduos agroindustriais. **Ciência Florestal**, v. 25, n. 3, p. 721-730, 2015.

CURY, K. et al. Resíduos agroindustriais su impacto, manejo y aprovechamiento. **Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA**, p. 122-132, 2017.

DE FREITAS MOURA, E.; BUENO, J. M. Commodity, diferenciado ou especial? Diferentes terminologias para o café a partir das formas de produção, separação e classificação dos grãos. **Desafio Online**, v. 6, n. 3, 2018.

DE LAS RIVAS, B. et al. Bacterial tannases: classification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1-21, 2018.

DE MENDONÇA COSTA, M. S. S. et al. Redução do tempo de compostagem de resíduos agroindustriais. **Engenharia Agrícola**, v. 36, n. 6, 2016.

DHIMAN, S.; MUKHERJEE, G.; SINGH, A. K. Recent trends and advancements in microbial tannase-catalyzed biotransformation of tannins: a review. **International Microbiology**, p. 1-21, 2018.

DE ARAÚJO, M. A. et al. Sustentabilidade empresarial em agroindústrias pernambucanas. **Revista Livre de Sustentabilidade e Empreendedorismo**, v. 4, n. 1, p. 200-218, 2019.

DE LIMA, J. S. et al. Hydrolysis of tannins by tannase immobilized onto magnetic diatomaceous earth nanoparticles coated with polyaniline. **Food research international**, v. 107, p. 470-476, 2018.

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

DE MARIA, C. A.B; MOREIRA, R. F.A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 99, 2007.

DE SIQUEIRA, F. G. et al. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 1, p. 20-26, 2010.

DHIMAN, S. et al. Fungal Tannase: Recent Advances and Industrial Applications. In: **Developments in Fungal Biology and Applied Mycology**. p. 295-313, 2017.

DHIMAN, S.; MUKHERJEE, G.; KUMAR, A. Production & Purification of a low molecular weight extracellular tannase from *Aspergillus* TPF-4. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 8, p. 1251-1260, 2017.

DO NASCIMENTO FILHO, W. B.; FRANCO, C. R. Avaliação do potencial dos resíduos produzidos através do processamento agroindustrial no Brasil. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 1968-1987, 2015.

DOS SANTOS, P. S. et al. Fermentação em Estado Sólido em Resíduos Agroindustriais para a Produção de Enzimas: uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 4, n. 2, p. 181-188, 2018.

DOS SANTOS ROCHA, M. S. R.; ALMEIDA, R. M. R. G.; DA CRUZ, A. J. G. Avaliação do potencial energético de resíduos agroindustriais provenientes de diferentes regiões brasileiras. **Engevista**, v. 19, n. 1, p. 217-235, 2017.

DURÁN, C. A. A et al. Café: Aspectos Gerais e seu Aproveitamento para além da Bebida. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, p. 107-134, 2017.

EL-FOULY, M. Z. et al. Biosynthesis and characterization of *Aspergillus niger* AUMC 4301 tannase. **Journal of American Science**, v. 6, n. 12, p. 709-721, 2010.

FARAG, A. M. et al. Purification, Characterization and Application of Tannase Enzyme Isolated from Marine *Aspergillus nomius* GWA5. 2018. **J Pure Appl Microbiol**, v.12, n. 4, p.1939-1949, 2018.

FOSCACHES, C.; SAES, M. S. M.; VACARI, G. F. J. Formas plurais na aquisição da matéria-prima: uma análise do setor de torrefação e moagem de café no Brasil. **Organizações & Sociedade**, v. 23, n. 78, p. 507-520, 2016.

GOUVEIA, L. G. T. et al. Perspectivas e aplicações de resíduos agroindustriais/agrícolas na obtenção de produtos de maior valor de mercado. **Anais do VII SIMPROD**, 2015.

GUIMARÃES, D. R. et al. Agroecologia, Meio Ambiente e o Gerenciamento de Resíduos Sólidos. **Cadernos de Agroecologia**, v. 13, n. 2, p. 9-9, 2018.

GUTIERREZ-MACIAS, P.; DE JESUS, M. L. H.; BARRAGAN-HUERTA, B. E. The production of biomaterials from agro-industrial waste. **FEB-Fresenius Environmental Bulletin**, p. 4128- 4152, 2017.

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

JANISSEN, B.; HUYNH, T. Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 128, p. 110-117, 2018.

KAUR, R. et al. Bio-Processing of Foods: Current Scenario and Future Prospects. In: **Technologies in Food Processing**, p. 67-100, 2018.

KAPOOR, M.; PANWAR, D.; KAIRA, G. S. Bioprocesses for enzyme production using agro-industrial wastes: Technical challenges and commercialization potential. In: **Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production**. p. 61-93, 2016.

KIVANÇ, M. et al. Determination of tannase activity of the lactic acid bacteria that isolated from fermented products. **GIDA-Journal of Food**, v. 41, n. 6, p. 395-402, 2016.

KUMAR, S. S.; SREEKUMAR, R.; SABU, A. Tannase and Its applications in food Processing. **Green Bio-processes**. p. 357-381, 2019.

KUMAR, S.S.; SWAPNA, T. S.; SABU, A. Coffee Husk: A Potential Agro-Industrial Residue for Bioprocess. In: **Waste to Wealth**. p. 97-109, 2018.

LAL D, GARDNER J J. Production, characterization and purification of tannase from *Aspergillus niger*. **European. J. Exp. Biol.** v.2, n.5, p.1430-143, 2012.

- LAZARO, C. Z. et al. The biological hydrogen production potential of agroindustrial residues. **Waste and Biomass Valorization**, v. 6, n. 3, p. 273-280, 2015.
- LIU, T. P.S.L et al. Tannase production by *Aspergillus* spp. UCP1284 using cashew bagasse under solid state fermentation. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 16, p. 565-571, 2016.
- MADEIRA JR, J. V. et al. Efficient tannase production using Brazilian citrus residues and potential application for orange juice valorization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 91-97, 2015.
- MAHMOUD, A. E. et al. Purification and characterization of a novel tannase produced by *Kluyveromyces marxianus* using olive pomace as solid support, and its promising role in gallic acid production. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 2342-2350, 2018.
- MÄKELÄ, M. R. et al. Aromatic metabolism of filamentous fungi in relation to the presence of aromatic compounds in plant biomass. In: **Advances in Applied Microbiology**. p. 63-137, 2015.
- MALAK, A.; BARONIAN, K.; KUNZE, Gotthard. *Blastobotrys (Arxula) adenivorans*: a promising alternative yeast for biotechnology and basic research. **Yeast**, v. 33, n. 10, p. 535-547, 2016.
- MALGIREDDY, N.R., NIMMA, L.N.R. Optimal conditions for production of Tannase from newly isolated *Aspergillus terreus* under solid state fermentation. **European. J. Biotechnol. Biosci**, n. 3, v.2, p. 56-64, 2015.
- MATSUDA, M. et al. Purification and Characteristics of Tannase Produced by Lactic Acid Bacteria, *Lactobacillus plantarum* H78. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 74, n. 4, p. 258-266, 2016.
- MONDAL, K. C. et al. Production and characterization of tannase from *Bacillus cereus* KBR9. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 263-267, 2001.
- MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C.; DE MARIA, C. A. B. Componentes voláteis do café torrado. Parte II: compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. **Química nova**, v. 23, n. 2, p. 195-203, 2000.
- MOURA, C. M. R. et al. Tannase production by *Penicillium chrysogenum* (SIS 25) through submerged fermentation using alternative media containing agro-industrial residues. **Microbes in the Spotlight: Recent Progress in the Understanding of Beneficial and Harmful Microorganisms**, p. 371-376, 2016.
- OLIVEIRA, A. C. D. et al. Utilização de resíduos da agroindústria para a produção de enzimas lipolíticas por fermentação submersa. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 1, p. 19-26, 2013.
- OLIVEIRA, R. M.; CARVALHO, E. P.; SILVEIRA, I. A. Influência da diversidade microbiana na qualidade da bebida do café: uma revisão. **Interação**, v. 37, p. 16 -22, 2001.
- PANESAR, P.S. et al., Bio-processing of agro-industrial wastes for production of food-grade enzymes: Progress and prospects. **Appl. Food Biotechnol.**, v.3, n.4, p. 208-227, 2016.
- PANESAR, P. S.; KAUR, R.; SINGLA, G.; SANGWAN, R. S. Bio-processing of Agro-industrial Wastes for Production of Food-grade Enzymes: Progress and Prospects. **Applied Food Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 208–227, 2016.

PEDROSA, T. D. et al. Monitoramento dos parâmetros físico-químicos na compostagem de resíduos agroindustriais. **Nativa**, v. 1, n. 1, p. 44-48, 2013.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; DE OLIVEIRA MORAES, I. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, v. 2, n. 1, p. 118-127, 2007.

PENNA, N. G.; HECKTHEUER, L. H. R. Vinho e saúde: uma revisão. **Infarma**, v. 16, n. 1-2, p. 64-7, 2004.

PERIMENIS, A. et al. Comparison of the acidogenic and methanogenic potential of agroindustrial residues. **Waste Management**, v. 72, p. 178-185, 2018.

PINTO, G. A.S et al. Selection of tannase-producing *Aspergillus niger* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 24-26, 2001.

PODRIGUES, T. H.S. et al. Tannase production by solid state fermentation of cashew apple bagasse. In: **Applied Biochemistry and Biotechnology**. p. 675-688, 2007.

PONTES, E. D. S. et al. o Efeito Funcional do Café. **International Journal of Nutrology**, v. 11, n. S 01, p. Trab566, 2018. PORTUGAL-PEREIRA, J. et al. Agricultural and agro-industrial residues-to-energy: Techno-economic and environmental assessment in Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 521-533, 2015.

PRIGIONE, V. et al. Biotransformation of industrial tannins by filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 24, p. 10361-10375, 2018.

RAGHUWANSHI et al. *Bacillus sphaericus*: The highest bacterial tannase producer with potential for gallic acid synthesis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, p.635-640, 2011.

REZZADORI, K.; BENEDETTI, S. Proposições para valorização de resíduos do processamento do suco de laranja. In: **International Workshop Advances in Cleaner Production**. p. 1-11, 2009.

RIBEIRO, S. R. P.; RIBEIRO FILHO, F. D.; RUFINO, M. S. M. O café orgânico e agroflorestal na serra de Baturité-Ceará. Uma análise das dimensões sustentáveis, econômicas e sociambientais. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, v. 6, n. 3, p. 424-442, 2017.

ROBERTO, B. S. et al. Immobilized tannase treatment alters polyphenolic composition in teas and their potential anti-obesity and hypoglycemic activities in vitro. **Food & Function**, v. 7, n. 9, p. 3920-3932, 2016.

ROBERTO, S. R.; COLOMBO, L. A.; ASSIS, A. M. de. Revisão: Cultivo Protegido em viticultura. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, v. 26, n. 1, p. 11-16, 2011.

ROSA, M. F. et al. Valorização de resíduos da agroindústria. **II Simpósio internacional sobre gerenciamento de resíduos agropecuários e agroindustriais-II SIGERA**, v. 15, p.98 – 105, 2011.

RUDRA, S. G. et al. Food industry waste: mine of nutraceuticals. **Int. J. Sci. Environ. Technol**, v. 4, n. 1, p. 205-229, 2015.

SALGADO, A. M. R. et al. Características de algunos preparados microbianos sobre el desarrollo biotecnológico en el sector agropecuario. **Infometric@-Serie Ingeniería, Básicas y Agrícolas**, v. 2, n. 1, p. 39-50, 2019.

SAMPAIO, P. R. et al. Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para produção da enzima tanase. **Sinergia (Área Temática: Multidisciplinar-ISSN: 2177-451X)**, v. 19, n. 2, p. 152-156, 2018.

SANTOS, R. R. D.; GUARNIERI, P.; BRISOLA, M. Logística reversa de resíduos das atividades agrossilvipastoris e agroindustriais: uma revisão sistemática da literatura. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 11, n. 2, p. 573-597, 2018.

SILVA, E. C. A. et al. Potencial Antioxidante de Resíduos Agroindustriais de Uvas. **International Journal of Nutrology**, v. 11, n. S 01, p. Trab639, 2018.

SOCCOL, C. R. et al. New perspectives for citric acid production and application. **Food Technology & Biotechnology**, v. 44, n. 2, 2006.

SRIVASTAVA A. K.A.R, R. Characterization and application of tannase produced by *Aspergillus niger* ITCC 6514.07 on Pomegranate rind. **Braz. J. Microbiol**, v.40, n.4,p.782-789, 2009.

TOLMASQUIM, M. T. Perspectivas e planejamento do setor energético no Brasil. **Estudos Avançados**. São Paulo, v. 26, n. 74, p. 247-260, 2012.

VIAYARAGHAVAN, P. et al. Simultaneous production of commercial enzymes using agro industrial residues by statistical approach. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2018.

VIEIRA, M. C.; LELIS, R. C. C.; RODRIGUES, N. D. Propriedades químicas de extratos tânicos da casca de *Pinus oocarpae* avaliação de seu emprego como adesivo. **Cerne**, v. 20, n. 1, p. 47-54, 2014.

ZHANG, S. et al. Sequence identification, structure prediction and validation of tannase from *Aspergillus niger* N5-5. **Chinese Chemical Letters**, v. 27, n. 7, p. 1087-1090, 2016.

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

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.

WOICIECHOWSKI, A. L. et al. Emprego de resíduos agroindustriais em bioprocessos alimentares. **Chapter in Biotecnologia de alimentos, coleção Ciência, tecnologia, engenharia de alimentos e nutrição**, v. 12, p. 143-172, 2013.

CAPÍTULO II

**SELEÇÃO DE AMOSTRAS DE *CUNNINGHAMELA ECHINULATA*
PRODUTORAS DE TANASE EM MEIO SÓLIDO E PRODUÇÃO
ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

**Manuscrito submetido para publicação à Revista Artigo:
African Journal of Biotechnology**

Seleção de amostras de *Cunninghamella echinulata* produtoras de tanase em meio sólido e produção através de fermentação submersa

José B. Paiva^{1*}; Israel G. S. Silva²; Armando J. G. Filho³; Laura M. Souza⁴; Marcos A. C. Luna⁵; Carlos A. A. Silva⁶

1 Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, 50.500-900 Recife, PE, Brasil. E-mail: jbezerra@catolica.org.br

2 Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, 50.500-900 Recife, PE, Brasil. E-mail: israelgsds@gmail.com

3 Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, 50.500-900 Recife, PE, Brasil. E-mail: armandojosegomes@hotmail.com

4 Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-590, Recife, PE, Brasil. E-mail: lventurams@gmail.com

5 Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-590, Recife, PE, Brasil. E-mail: marcosc.luna@gmail.com

6 Núcleo de Pesquisa em Ciências do Ambiente e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-590, Recife, PE, Brasil. E-mail: carlos.alves@unicap.br

Tanino acil hidrolase ou tanase (EC 3.1.1.20) é uma enzima que apresenta uma grande versatilidade, sendo produzida principalmente por diversos gêneros de fungos filamentosos, possui vasta aplicação em diversos setores das industriais de sucos e bebidas, como também das indústrias químicas e farmacêuticas. Foram realizados estudos com amostras de *Cunninghamella echinulata* isoladas de solo da Caatinga da cidade de Serra Talhada no Estado de Pernambuco, para detecção da tanase em meio sólido com 2 amostras de *C. echinulata* UCP 1305 e 1308, nas temperaturas de 28 e 37°C e diferentes valores de pH 4,5, 5,5, 6,5, 7,0 e 8,0. Em seguida, após a seleção da melhor amostra e condições de produção, foram realizados ensaios de fermentação submersa utilizando 4 diferentes meios, durante 120 horas, 150 rpm, 37°C e pH 7,0 para determinação da curva de crescimento através da biomassa microbiana, variação do pH e determinação enzimática. Os resultados obtidos evidenciaram que a amostra denominada UCP 1305 apresentou a formação do maior halo característico da atividade enzimática de 4,5 cm na temperatura de 37°C e pH 7,0. Nos ensaios de fermentação submersa, o meio denominado de 3 com a amostra UCP 1305, obteve uma produção 0,413 U/mL de tanase. Ensaios envolvendo a biodiversidade microbiana de ambientes pouco explorados biotecnologicamente, se revelam eficazes no sentido de isolar, identificar organismos com elevado potencial na produção de substâncias de elevado valor agregado.

PALAVRAS-CHAVE: Detecção enzimática, seleção de micro-organismos, fungos Mucorales.

INTRODUÇÃO

A biodiversidade microbiana está ligada diretamente à atividade metabólica dos micro-organismos presentes na natureza principalmente no solo, através da participação direta em processos ecológicos (fotossíntese, geração de oxigênio, reciclagem de matéria orgânica, ciclos biogeoquímicos, manutenção da fertilidade e da estrutura de solos) (GRIEBLER, LUEDERS, 2009; ZEGLIN, 2015; BELLO et al., 2018; BACH et al., 2018). O isolamento de micro-organismos de ambientes pouco conhecidos como a

Caatinga Nordestina, se torna indispensável para o desenvolvimento de estudos envolvendo a produção de metabólitos de alto valor agregado utilizando essa microbiota, principalmente as enzimas (LIMA et al., 2014; RAMOS et al., 2015; PACCHIONI et al., 2014; BISWAS, SARKAR, 2018).

As enzimas microbianas têm sido muito utilizadas nas últimas décadas devido participarem de inúmeros processos industriais e/ou ambientais, e por apresentarem uma série

de vantagens frente as produzidas por plantas e animais (OGAWA, SHIMIZU, 1999; ADRIO, DEMAINE, 2014; CHRAST, CHALOUPOKOVA, DAMBORSKY, 2017; RAVEENDRAN et al., 2018.).

Tanino acil hidrolase (tanase, EC 3.1.1.20) é uma enzima que hidrolisa ésteres e ligações de taninos, liberando glicose e ácido gálico. Quimicamente é uma glicoproteína formada por moléculas de ácido gálico, esterase e depsidase, (PRASAD et al., 2012), sendo produzida por diversos gêneros de micro-organismos, principalmente por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Nos processos fermentativos são produzidas pela presença de um indutor na composição do meio de produção, que normalmente é o ácido tânico (BELMARES et al., 2004; AGUILAR et al., 2007; GOVINDARAJAN et al., 2016; AHARWAR, PARIHAR, 2018; KUMAR, SREEKUMAR, SABU, 2019).

O gênero *Cunninghamella* apresenta em torno de 12 espécies descritas na literatura, apresentando as seguintes características morfológicas: forma filamentosa de crescimento rápido, colônias formadas por vesículas piriformes e/ou globais, com diversos esporângios, coloração branca ou cinza. Apresentam a capacidade em metabolizar uma ampla diversidade de xenobióticos existentes e são encontrados em solos e plantas de zonas mediterrâneas e subtropicais (BAIJAL, MEHROTRA, 1980; SHIOSAKI et al., 2001; PISKA et al., 2016; NAYAK, 2018; PRENAFETA-BOLDÚ, DE HOOG, SUMMERBELL, 2018).

O presente trabalho teve como objetivos a seleção de amostras através da fermentação sólida, a seleção de meios de cultivo e a produção de tanase através da fermentação submersa, utilizando amostras de *Cunninghamella echinulata*, isoladas de solo provenientes da Caatinga de Pernambuco.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismos

Foram utilizados amostras de *Cunninghamella echinulata*, (UCP 1305 e UCP 1308, catalogadas no Banco de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco), localizado no Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB). As culturas foram mantidas em Meio Sabouraud, a 4°C.

Seleção com amostras produtoras de tanase em meio sólido

Para a seleção e detecção da atividade tanase, foi utilizada a metodologia descrita por Hankin, Anagnostaki (1979). As amostras cresceram em meio Sabouraud suplementado com ácido tânico (0,2%). O meio de detecção utilizado foi **Peptona (1%)**; Glicose (4%); Agar (2%); Ácido tânico (1%) e água destilada. O meio foi distribuído em placas de Petri, e após solidificação, foram feitos furos no centro das placas de 0,8 cms Foi inoculada 100 µL uma suspensão esporíca de 10^7 esporos/mL. Os ensaios foram realizados em diferentes condições de temperatura (28°C e 37°C), e de pH (4.5; 5.5; 6.5; 7.0 e 8.0), durante 120 horas, com acompanhamento diário. A verificação da atividade enzimática foi detectada através da formação de um halo característico da enzima testada e expressa em centímetros.

Seleção de meios para a produção de tanase por Fermentação Submersa

Após a seleção da melhor amostra produtora de tanase em meio sólido e das condições de temperatura e pH, foram

realizados ensaios de produção através de fermentação submersa, utilizando os seguintes meios com soluções de sais soluções de sais em (g/L) nas seguintes composições em quatro diferentes meios:

M1 KH_2PO_4 (1,0); NH_4NO_3 (2,0); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,02); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,004); $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,002); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,0025), ácido tânico (10) (MACEDO et al., 2005)

M2 NaNO_3 (6,0); KH_2PO_4 (1,52); KCl (0,52); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,52); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01); Ácido tânico (10) (EL-REFAI et al., 2017)

M3 NaNO_3 (6,0); KH_2PO_4 (1,52); KCl (0,52); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,52); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01); $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,01); Ácido tânico (10) (SRIVASTAVA, KAR, 2009).

M4 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,0); KH_2PO_4 (2,0); CaCl_2 (0,025); $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,015); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,005); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,03); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,0); Frutose (1,0); Ácido tânico (10) (MOURA et al., 2015)

Os ensaios foram realizados em frascos de Erlenmeyers de 250 mL inoculados com 10% de uma suspensão de conídios ($10^7/\text{mL}$). e incubados em rotação orbital de 150 rpm a 37° C, por 120 horas.

Foram retiradas alíquotas de 5 mL dos meios de cultivos a cada 24 h, para detecção da curva de crescimento pela biomassa (g/L), da variação do pH e da produção da enzimática.

Determinação da atividade enzimática

Foi utilizada a metodologia descrita por Hankin, Anagnostakis (1975). Os ensaios foram realizados utilizando uma solução contendo 150 µL de uma solução de ácido tânico (0,7% p/v) em tampão acetato com pH 5,5 - 0,2 M), adicionado a 0,025 mL de extrato enzimático bruto e incubados à 40°C por 10 minutos em banho maria. A reação foi paralisada com a adição de 1,5 mL de solução de albumina de soro bovino (tampão acetato pH 5,0 - 0,2 M, contendo 0,17 M de NaCl), logo em seguida, as amostras foram centrifugadas a 7000 x g por 15 min à temperatura de 4°C. O precipitado foi ressuspenso com adição de 1,5 mL de solução de SDS-Trietanolamina (SDS 1% (p/v) adicionada de 5% (v/v) de Trietanolamina em água destilada), e de 0,5 mL de FeCl_3 (0,01 M de FeCl_3 em 0,01 M de ácido clorídrico). As soluções foram deixadas em repouso durante 15 min. As leituras da absorbância foram realizadas a 530 nm em espectrofotômetro modelo Biochrom S21.

Para o branco foi feito um teste contendo todos os reagentes, mas utilizando água destilada no lugar do extrato enzimático.

A atividade enzimática foi calculada através da diferença da leitura de absorbância medida a 530 nm entre amostra e tubo controle, e calculada através da seguinte equação:

$$\text{Abs}_{\text{final}} = \text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{teste}}$$

Onde uma unidade de atividade de tanase foi definida como a quantidade de ácido tânico hidrolisado por mL de enzima empregada por minuto de reação ($U = \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mL}$ de enzima).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na seleção dos micro-organismos para a detecção da atividade enzimática tanase em meio sólido sob diferentes condições de temperaturas (28 e 37°C) e pH (4.5, 5.5, 6.5, 7,0 e 8.0) estão descritos na Tabela 1.

TABELA 2 – Atividade tanase por amostras de *Cunninghamella echinulata* UCP 1305 e UCP 1308 em diferentes condições de pH e

temperatura durante 120 h.

pH	UCP 1305 120h		UCP 1308 120h	
	28°C	37°C	28°C	37°C
4,5	1	1	0,5	1
5,5	1	1	1	1
6,5	2	3	1,5	3
7	2,5	4,5	3	4
8	2	2	2	3,5

Os resultados da produção da enzima tanase por *Cunninghamella echinulata* (UCP 1305 e 1308), em diferentes meios de produção estão apresentados nas figuras 1 A e B.

Constata-se que o melhor resultado da produção da enzima ocorreu no meio denominado M3 após 72 h de cultivo para a *Cunninghamella echinulata* UCP 1305 apresentando uma atividade enzimática de 0,413 U/mL, superando o resultado da amostra de *Cunninghamella echinulata* UCP 1308 que apresentou o valor de 0,228 U/mL no meio denominado M1, após 96 h de cultivo.

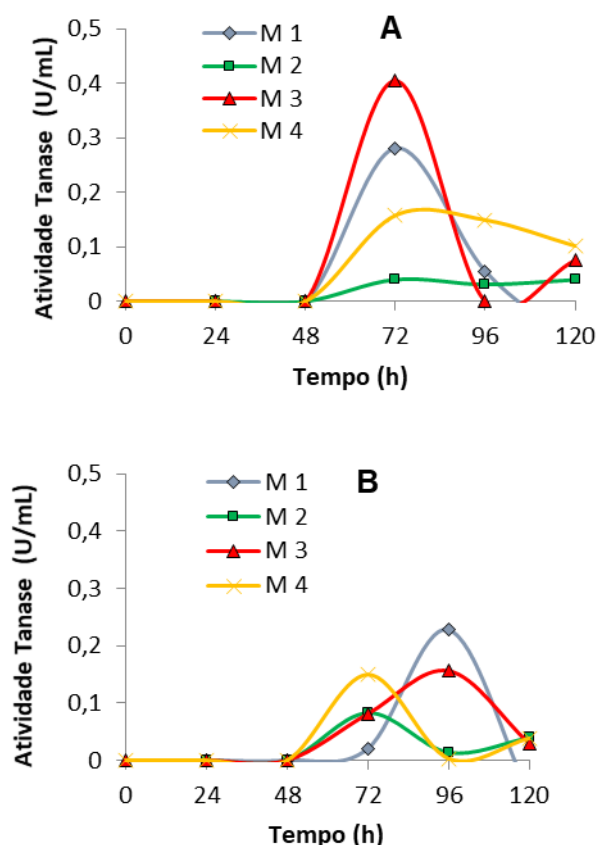


FIGURA 1. Produção da enzima tanase por *Cunninghamella echinulata* (A) UCP 1305 e (B) UCP 1308 em diferentes meios de cultura durante o período de 120 horas de cultivo.

Os resultados obtidos corroboram com os dados descritos por Purohit et al., (2006); Aharwar, Parihar (2018) relatam que a tanase é uma enzima extracelular produzida na presença de um indutor, o ácido tânico, por fermentação líquida, submersa ou sólida, através de fungos filamentosos, bactérias e ou leveduras.

Estudos realizados por Moura et al (2015) com *Aspergillus niger* em fermentação submersa na mesma temperatura (37°C), em 120 horas foram obtidos índices enzimáticos (0,180 U/mL).

Os valores de biomassa obtidos através da curva de crescimento nos diferentes meios de cultivo para as amostra de *Cunninghamella echinulata* UCP 1305 e UCP 1308, estão descritas na figura 2 (A e B).

Verifica-se, que houve uma maior produção de biomassa no meio M3 com 0,453 g/L de cultivo, após 72 horas para UCP 1305 e de 0,398 g/L no meio denominado M1 para a UCP 1308 após 96 horas.

Os valores obtidos nos ensaios de biomassa corroboram com os obtidos por Moura et al, 2015, que estudaram biomassa de *Aspergillus* para o mesmo meio denominado M3 e obtiveram valores de 0,310 g/L em 96 h.

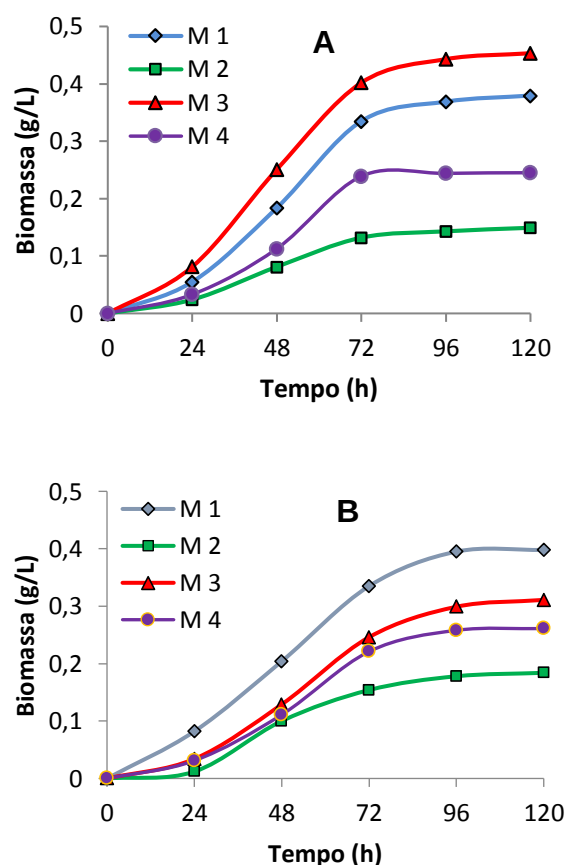


FIGURA 2. Produção de biomassa por *Cunninghamella echinulata* (A) UCP 1305 e (B) UCP 1308 em diferentes meios de produção durante o período de 120 horas.

Segundo Orlandelli (2012), a presença de elementos minerais na composição do meio, desempenham importante papel como constituintes na produção de enzimas e coenzimas por micro-organismos, e sua presença se torna necessária nos meios de produção de biomoléculas, aumentando assim sua biomassa microbiana.

Na análise dos valores de pH durante o processo fermentativo, verifica-se variações dos valores iniciais de pH 7,0 para valores ácidos que se encontram numa faixa de 5,09 -5,76, descritos na tabela 2

TABELA 2. Variação do pH em diferentes meios de cultura por cepas *Cunninghamella echinulata* em 120h de cultivo.

1305	0h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
M1	7,00	-	-	6,51	5,86	5,35
M2	7,00	-	-	6,26	5,69	5,10
M3	7,00	-	-	6,58	6,02	5,76
M4	7,00	-	-	6,35	5,98	5,47

1308	0h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
M1	7,00	-	-	6,49	5,91	5,59
M2	7,00	-	-	6,18	5,55	5,09
M3	7,00	-	-	6,46	5,71	5,17
M4	7,00	-	-	6,28	5,79	5,37

Arruda et al., (2007), obtiveram valores de pH com amostras fúngicas em diferentes meios de produção, numa faixa ligeiramente ácida, provavelmente, devido a produção de metabólitos ácidos durante as diversas etapas do processo fermentativo.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As duas amostras testadas de *Cunninghamella echinulata* (UCP 1305 e 1308), apresentaram atividade para a enzima tanase tanto em meio sólido como através de fermentação submersa. A melhor condição dos ensaios de detecção da atividade enzimática, demonstrou que a temperatura e pH influenciaram diretamente nos resultados de produção da enzima.

Os resultados obtidos nesses ensaios pesquisa servem como base para estudos futuros, pois se trata de um trabalho com uso de amostras de *Cunninghamella echinulata* isolados da Caatinga, ainda não descritos na literatura para a produção da enzima tanase.

AGRADECIMENTOS

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

5. REFERÊNCIAS

Aguilar CN et al (2007). Microbial tannases: advances and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 76, n. 1, p. 47-59, 2007.

Aharwar A, Parihar DK (2018). Tannases: Production, properties, applications. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, v.15, p. 322-334.

Arruda et al (2007). Fungos endofíticos produtores de tanase. *Laboratório de Fármacos e Ensaios Antimicrobianos*, Departamento de Antibióticos, UFPE. CONIC XV, p. 1-2.

Bach EM et al (2018). Greatest soil microbial diversity found in micro-habitats. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 118, p. 217-226.

Bajjal U, Mehrotra BS (1980). The genus *Cunninghamella*—a reassessment. *Sydowia*, v. 33, p. 1-13.

Bello MGD et al (2018). Preserving microbial diversity. *Science*, v. 362, n. 6410, p. 33-34.

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

Biswas R, Sarkar A (2018). 'Omics' Tools in Soil Microbiology: The State of the Art. In: *Advances in soil microbiology: recent trends and future prospects*. p. 35-64.

Chrast L, Chaloupkova R, Damborsky J (2017). Gram-scale production of recombinant microbial enzymes in shake flasks. *FEMS microbiology letters*, v. 365, n. 2, p. fnx265.

El-Refai HA et al (2017). Statistical Optimization for Tannase Production by *Mucor circinelloides* Isolate F6-3-12 under Submerged and Solid State Fermentation. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, Vol. 11 (2) 167-180 April.

Govindarajan RK et al (2016). Microbial tannase: Current perspectives and biotechnological advances. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, v. 6, p. 168-175.

Griebler C, Lueder T (2009). Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshwater Biology*, v. 54, n. 4, p. 649-677.

Hankin L, Anagnostaki SL (1979). The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. *Mycologia*, v.67, p.597 –607.

Kumar S, Sreekumar R, Sabu A (2019). Tannase and Its Applications in Food Processing. In: *Green Bio-processes*. p. 357-381.

Lima JMN et al (2014). Isolation, identification and phenotypic characterisation of *Rhizopus* strains isolated from Caatinga soil in Pernambuco, Brazil. *Industrial, medical and environmental applications of microorganisms*, p. 119.

Macedo GA, Matsuda LK, Battestin V (2005). Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 29, n. 4, p. 833-838, jul./ago.

Morales-Lopez S, Ceballos-Garzon A, ParraA-Giraldo CM (2018). Zygomycete Fungi Infection in Colombia: Literature Review. *Current Fungal Infection Reports*, v. 12, n. 4, p. 149-154.

Moura CMR et al (2015). Seleção e identificação de amostras de *Penicillium* ssp isoladas da Caatinga do estado de Pernambuco para produção de tanase através de fermentação submersa utilizando diferentes meios de produção. *Revista E-xacta*.

Nayak N (2018). Detection of Heavy Metals Indifferent Soil Samples and Their Bioremediation with the Help of Fungus *Cunninghamella* sp. *Research & Reviews: A Journal of Biotechnology*, v. 8, n. 1, p. 16-23.

- Ogawa J, Shimizu S (1999). Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. Trends in biotechnology, v. 17, n. 1, p. 13-20.
- Pacchioni RG et al (2014). Taxonomic and functional profiles of soil samples from Atlantic forest and Caatinga biomes in northeastern Brazil. MicrobiologyOpen, v. 3, n. 3, p. 299-315.
- Piska K et al (2016). *Cunninghamella* biotransformation-similarities to human drug metabolism and its relevance for the drug discovery process. Current drug metabolism, v. 17, n. 2, p. 107-117.
- Prasad D et al (2012). Advances in production and characteristics features of microbial tannases: an overview. Curr. Trends Biotech Pharm. v.6, p.145-165.
- Prenafeta-Boldu FX, De-Hoog GS, Summerbell RC (2018). Fungal communities in **hydrocarbon** degradation. Microbial Communities Utilizing Hydrocarbons and Lipids: Members, Metagenomics and Ecophysiology, p. 1-36.
- Purohit JS et al (2006). Strain improvement for tannase production from co-culture of *Aspergillus foetidus* and *Rhizopus oryzae*. Bioresource Technology, v. 97, n. 6, p. 795-801.
- Ramos KA et al (2015). Caracterização e diversidade cromogênica de actinobactérias de um nicho microbiano preservado no bioma Caatinga. Enciclopédia Biosfera, v. 11, n. 21, p. 2115-2125.
- Raveendran S et al (2018) Applications of microbial enzymes in food industry. Food technology and biotechnology, v. 56, n. 1, p. 16.
- Shiosaki RK et al (2001). Biochemical markers in taxonomy of the genus *Cunninghamella*. Revista iberoamericana de micologia, v. 18, n. 3, p. 123-127.
- Srivastava A, Kar R (2009). Characterization And Application Of Tannase Produced By *Aspergillus Niger* ITCC 6514.07 On Pomegranate Rind Braz. J. Microbiol, vol.40 no.4 São Paulo Oct./Dec.
- Zeglin LH (2015). Stream microbial diversity in response to environmental changes: review and synthesis of existing research. Frontiers in microbiology, v. 6, p. 454.
- Yamada H, Adachi O, Watanabe M, Sato N (1968a). Studies of fungal tannase. Part I. Formation, purification and catalytic properties of tannase of *Aspergillus flavus*. Agric. Biol. Chem. 32: 1070-1078.

AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY

REVISTA AFRICANA DE BIOTECOLOGIA

AJB - Instruções para os Autores Políticas

Objetivos e Escopo

O Jornal Africano de Biotecnologia (AJB) é uma publicação revisada por pares que começou a ser publicada em 2002. AJB publica artigos de todas as áreas da biotecnologia incluindo biotecnologia médica e farmacêutica, diagnósticos moleculares, bioquímica aplicada, microbiologia industrial, biologia molecular, bioinformática, genômica e proteômica, , transcriptômica e edição de genoma, tecnologias alimentares e agrícolas e engenharia metabólica. Também são considerados manuscritos sobre questões econômicas e éticas relacionadas à pesquisa em biotecnologia.

Tipos de artigos

Pesquisa de comprimento total

Comunicações breves

Rever

Os manuscritos devem ser submetidos on-line no Sistema de Gerenciamento de Manuscritos de Revistas Acadêmicas.

Ética de pesquisa

Estudos envolvendo seres humanos devem aderir à Declaração WMA de Helsinque - Princípios Éticos para Pesquisa Médica Envolvendo Seres Humanos.

Estudos envolvendo animais não humanos devem seguir diretrizes éticas apropriadas, tais como a Lei de Bem-Estar Animal, A Lei de Animais (Procedimentos Científicos) (Emenda) 1993, A diretriz do Parlamento Europeu sobre a proteção de animais usados para fins científicos e políticas e diretrizes da ARRP.

Ética de Publicação

A revista exige que os autores sigam os padrões éticos exigidos dos pesquisadores e da escrita científica. Especificamente, a revista exige que todos os autores sigam os padrões éticos prescritos pelo Comitê de Ética na Publicação (COPE).

Autoria

A inclusão de uma pessoa que não atenda aos requisitos de autoria, conforme especificado pela política editorial ou a exclusão de uma pessoa que atenda ao requisito, é uma violação dos requisitos éticos da revista.

Plágio

A revista considera o plágio uma ofensa grave. Os manuscritos submetidos devem ser os trabalhos originais do (s) autor (es). AJB seguirá a diretriz do COPE em casos suspeitos de plágio.

O dicionário Merriam Webster Online define plagiar como: roubar e passar (as idéias ou palavras de outro) como o próprio usar (produção de outro) sem creditar a fonte cometer roubo literário apresentar como nova e original uma ideia ou produto derivado de uma fonte existente.

A revista está empenhada em eliminar manuscritos com possíveis casos de plágio a partir de seu processo de revisão e publicação. A revista usa o aplicativo de detecção de plágio iThenticate para verificar cada manuscrito quanto a possíveis casos de plágio. Verificação de plágio é o primeiro

passo no processo de revisão do manuscrito. Manuscritos que são encontrados para conter nível inaceitável de semelhança com outros trabalhos publicados são imediatamente rejeitados.

Veja Política de Revisão por Pares

Manuscritos duplicados

É antiético que os autores submetam um manuscrito ao Jornal Africano de Biotecnologia e, ao mesmo tempo, submeta o mesmo manuscrito a outro periódico, seja em Revistas Acadêmicas ou em qualquer outro editor. Isso inclui a submissão de manuscritos derivados dos mesmos dados, de tal maneira que não haja diferenças substanciais nos manuscritos. A submissão duplicada também inclui a submissão do mesmo / similar manuscrito em diferentes idiomas a diferentes periódicos.

Fabricação e falsificação de dados

A fabricação, manipulação ou falsificação de dados é uma violação desta ética de publicação. A revista deve empregar as diretrizes do COPE em casos suspeitos de fabricação e falsificação de dados.

Manipulação de citações

Os autores devem usar apenas citações relevantes para seus manuscritos. A adição de referências que não são relevantes para o trabalho é fortemente desencorajada. Da mesma forma, a autocitação irrelevante para aumentar a citação é antiética.

Política de Revisão por Pares

O Jornal Africano de Biotecnologia emprega um rigoroso sistema de revisão por pares. Todos os manuscritos submetidos passam por um processo de revisão por pares duplo-cego antes da publicação. Ver Política de Revisão por Pares

Preparando Seu Manuscrito

Antes da submissão, certifique-se de que o manuscrito se enquadre no escopo da revista. Veja Objetivos e Escopo acima. Todas as submissões devem ser escritas em bom inglês. Submissões mal escritas serão rejeitadas no momento da submissão. Os manuscritos devem ser preparados em espaçamento de linha única de não mais que 25 páginas. Cabeçalhos, subtítulos, seções e subseções não devem ser numerados. Os títulos principais devem ser indicados em negrito e texto em bloco (por exemplo, INTRODUÇÃO). Os subtítulos devem ser indicados no texto normal e no título do caso.

O uso de notas de rodapé não é aceito.

O Sistema Internacional de Unidades (SI) e outras convenções e nomenclaturas aceitas devem ser seguidas.

Título

A frase do título deve ser breve.

Liste os nomes completos dos autores (primeiro nome, nome do meio e último nome). Títulos acadêmicos como Prof., Dr., Assoc. O Prof. etc não deve ser incluído. Indique claramente as afiliações de todos os autores (Departamento, Corpo Docente, instituição e País). Forneça e-mails e números de telefone para cada autor.

Abstrato

O resumo deve ter menos de 300 palavras. As palavras-chave devem ser menores que 10.

Abreviaturas

Abreviações padrão devem ser usadas durante todo o manuscrito. O uso de abreviaturas não padronizadas deve ser reduzido ao mínimo e deve ser bem definido no texto após o primeiro uso. Uma seção de abreviaturas deve ser fornecida no caso de uso extensivo.

A introdução

A declaração do problema, além do histórico do estudo, deve ser clara e concisa.

Materiais e métodos

Materiais e métodos devem ser claramente apresentados para permitir a reprodução dos experimentos.

Resultados e discussão

Os resultados e a discussão podem ser combinados em uma única seção ou apresentados separadamente, quando necessário.

Tabelas e figuras

O uso da mesa deve ser reduzido ao mínimo. As tabelas devem ter um título descritivo curto posicionado no canto superior esquerdo da tabela. As tabelas devem ser apresentadas em texto modificado organizado em planilha do Microsoft Word ou Excel e não como imagens.

A unidade de medida usada em uma tabela deve ser declarada. Tabelas devem ser numeradas consecutivamente. Figuras / gráficos devem ser preparados em GIF, TIFF, JPEG ou PowerPoint. Figuras / gráficos devem ter uma breve legenda descritiva colocada imediatamente na parte inferior esquerda da figura. Tabelas e Figuras devem ser adequadamente citadas no manuscrito.

Divulgação de conflito de interesses

Os autores devem divulgar todos os interesses financeiros / relevantes que possam ter influenciado o estudo.

Agradecimentos

O reconhecimento de pessoas, fundos, etc., deve ser breve.

Referências

As referências devem ser listadas em ordem alfabética no final do artigo. Os links DOIs para artigos referenciados devem ser declarados sempre que disponíveis. Os nomes dos periódicos devem ser apresentados na íntegra e não abreviados.

Exemplos:

Concurso CJ, Bernard OP, Ntiido NU (2018). Ressonância plasmônica de superfície e propriedades antimicrobianas de novas nanopartículas de prata preparadas a partir de algumas plantas nativas em Uyo, Nigéria. *African Journal of Biotechnology* 17 (24): 748-752. <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16119>

Saharan P, Duhan JS, Gahlawat SK (2015). Detecção de *Pseudomonas fluorescens* a partir de caldo, água e tecidos infectados pelo método de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP). *African Journal of Biotechnology* 14 (14): 1181-1185. <https://doi.org/10.5897/AJB2014.14360>

Ubah SA, Ogwu D, Rekwot PI, Rwuaan JS (2017). Anormalidades espermáticas específicas observadas em carneiros (*Ovis aries*) após o tratamento com cipermetrina. *Jornal de Biologia Celular e Animal* 11 (1): 1-6. <https://doi.org/10.5897/JCAB2017.0450>

Nsofor CA (2014). Microarrays de DNA e suas aplicações em microbiologia médica. *Biotecnologia e Biologia Molecular Comentários* 9 (1): 1-11. <https://doi.org/10.5897/BMBR2013.0216>

Certificado de Aceitação

Autores recebem um Certificado de Aceitação para manuscritos que foram revisados e aceitos para publicação por um editor.

Artigos na Imprensa

Depois que um manuscrito for aceito por um editor, o resumo do manuscrito será colocado na página Artigos da Revista na Imprensa, pendente quando o artigo for totalmente publicado. O manuscrito publicado será removido dos Artigos da Imprensa após a publicação.

Pagamento da Taxa de Manuscrito

Uma vez que o manuscrito tenha sido aceito, o autor correspondente será contatado para fazer o pagamento necessário da taxa de manuseio do manuscrito. Por favor, observe que no sistema de gerenciamento de manuscritos, a opção de pagamento só está habilitada para manuscritos aceitos para publicação.

Provas

Antes da publicação, uma prova é enviada ao autor correspondente. Os autores são aconselhados a ler a prova e corrigir pequenos erros tipográficos ou gramaticais. Os autores devem prontamente devolver as provas ao escritório editorial.

Publicação

Uma vez que as provas são recebidas pela redação, os manuscritos são geralmente incluídos na próxima edição da revista. O artigo será posteriormente publicado no site da revista

Notificação de Publicação

Depois que o artigo é disponibilizado no site da revista, um aviso de publicação é enviado ao autor correspondente com links para o problema e o artigo.

Contatos AJB

Escritório Editorial: ajb@academicjournals.org

Helpdesk: helpdesk@academicjournals.org

Unidade de Contas: accounts@academicjournals.org

CAPÍTULO III

**PRODUÇÃO DE TANASE POR *Cunninghamella echinulata* EM MEIOS
ALTERNATIVOS UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Artigo a ser submetido à Revista Engevista

ISSN: 1415-7314 e-ISSN: 2317-6717



PRODUÇÃO DE TANASE POR *CUNNINGHAMELLA ECHINULATA* EM MEIOS ALTERNATIVOS UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

TANASE PRODUCTION BY *CUNNINGHAMELLA ECHINULATA* IN ALTERNATIVE MEANS USING AGROINDUSTRIAL RESIDUES

José Bezerra de Paiva^{1*}

Laura V. Morais e Souza²

Marcos Antônio Cavalcanti Luna³

Carlos Alberto Alves da Silva⁴

1 – Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais; 2 Bolsista de Iniciação Científica (PIBIC); 3 Doutorado em Biotecnologia (RENORBIO- UFRPE) 4 Orientador – Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) – Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) – R. do Príncipe, 526, Boa Vista, Recife, Pernambuco, 50050-900.

Resumo

A Tanase é uma enzima produzida por micro-organismos e bastante utilizada nas indústrias devido a sua importância na aplicabilidade química e alimentícia. Uma alternativa para diminuição dos custos de produção desta enzima tem sido o uso de resíduos agroindustriais na formulação de meios de cultura devido concentração de nutrientes. Neste estudo, foram realizados diversos ensaios para formulação de meios alternativos utilizando resíduos agroindustriais de uva, casca de café e laranja nas concentrações de 1, 2, 3% para a produção de tanase por *Cunninghamella echinulata* (UCP 1305). Os experimentos foram realizados em shaker orbital 150 rpm, 37°C, por 120 horas. Os resultados evidenciaram que a maior atividade enzimática foi obtida com o substrato da uva na concentração de 3%, 0,357 U/mL de tanase. Foi feito planejamento fatorial 2² para avaliar a atividade enzimática de cada resíduos, variando a concentração do substrato e o tempo de cultivo. O resultado foi significativo na interação das variáveis, com destaque para o resíduo da uva que apresentou melhor resultado com 99,75 %. A concentração do substrato mostra a maior significância estatística para o aumento da atividade enzimática. A utilização de resíduos agroindustriais surge como uma alternativa viável na elaboração de meios de produção de produtos biotecnológicos bioativos.

Palavras chaves: Tanase, Resíduos agroindustriais, *Cunninghamella echinulata*

Abstract

Tanase is an enzyme produced by microorganisms and widely used in industries because of its importance in chemical and food application. An alternative to decrease the production costs of this enzyme has been the use of agroindustrial residues in the formulation of culture media due to the concentration of nutrients. In this study, several tests were carried out to formulate alternative media using grape, coffee peel and orange agroindustrial residues at concentrations of 1, 2, 3% for the production of tannase by *Cunninghamella echinulata* (UCP 1305). The experiments were performed in orbital shaker 150 rpm, 37°C, for 120 hours. The results showed that the highest enzymatic activity was obtained with the substrate of the grape at 3% concentration, 0.357 U / mL of tannase. Factorial design was done 2² to evaluate the enzymatic activity of each residues, varying the substrate concentration and time of culture. The result was significant in the interaction of the variables, highlighting the grape residue that presented the best result with 99.75%. The substrate concentration shows the highest statistical significance for the increase of the enzymatic activity. The use of agro-industrial waste appears as a viable alternative in the production of means of production of bioactive biotechnological products.

Key Words: Tannase, Agro wastes, *Cunninghamella echinulata*

1 Introdução

A busca por métodos de produção economicamente viável e menos agressivos ao meio ambiente tornou a biotecnologia uma área importante de pesquisa capaz de promover o desenvolvimento de novos insumos industriais. Os setores como da agricultura, farmacêutica, cosmética e ambiental, vêm sendo beneficiados devido a importância de unir o potencial econômico ao aspecto da sustentabilidade (SBARDELOTTO et al., 2013).

Neste contexto a biodiversidade microbiana encontrada em diferentes ecossistemas tem representado uma fonte atrativa para bioprospecção na síntese de compostos de interesse com alto valor agregado (MATIAS, VIEIRA, FONTENELE, 2014). Dentre os compostos bioativos a produção de enzimas microbianas tem se destacado no mercado mundial como uma alternativa economicamente promissora possuindo uma vasta aplicação na indústria.

O Tanino acil hidrolase (EC 3.1.1.20) ou tanase é uma enzima produzida por microrganismo como fungos, bactérias e leveduras, possuindo a função de catalisar a quebra das ligações ésteres de taninos hidrolisáveis em ácido gálico.

Industrialmente a tanase tem sido empregada na produção de drogas antibacterianas e em produtos como chás instantâneos, clarificação de sucos, cervejas e processamento de vinhos além do tratamento de rações animais e de efluentes na indústria de couro (MELO et al., 2014).

A composição do meio de produção, condições de cultivo e linhagem microbiana utilizada, influenciam drasticamente na obtenção da enzima (NASCIMENTO et al., 2014).

Os fungos do gênero *Cunninghamella* são extremamente importantes na produção de enzimas de

interesse industrial além de uma gama de substâncias bioativas, sendo utilizadas na produção de alimentos, medicamento e cosméticos (ABREU, ROVIDA, PAMPHILE, 2015).

Apesar de inúmeras aplicações industriais da tanase, a sua produção ainda é considerada um processo de alto custo industrial, por passar por um longos processos biotecnológicos além do seu elevado custo de produção, fatores com matéria prima como fonte de substrato e micro-organismos que viabilizem uma produção contínua são percalços que ainda necessitam serem abolidos (ALMEIDA, 2014).

Por outro lado, tem se dado importância a utilização de resíduos da agroindústria como fonte alternativa para formulação de meios de cultura. O alto teor de matéria orgânica tem sido explorado, pois pode contribuir como fonte de nutrientes para a produção de alimentos e obtenção de matérias primas com alto valor agregado (CASTRO, 2010). Além disso, abundância e diversidade, de resíduos tais como cascas de frutas, folhagens e restos vegetais quando dispostos no meio ambiente de forma inadequada podem causar impactos ambientais (GONCALVES et al., 2014) (PANESAR *et al.*, 2016)

Nesse contexto, esta pesquisa avaliou a formulação de um meio de cultura utilizando como fonte alternativa os substratos agroindustriais da uva, café e laranja em diferentes concentrações para produção da enzima tanase.

2. Material e Métodos

Micro-organismo

A amostra de *Cunninghamella echinulata* (UCP 1305) isolada da Caatinga de Pernambuco, previamente mantida e catalogada no Banco de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), foi gentilmente cedidas para este estudo.

Substratos Agroindustriais

Os resíduos agroindustriais utilizados, foram: Resíduo de uva (proveniente do processamento para a fabricação de vinho) casca da laranja (proveniente da utilização do fruta em sucos), e casca de café (proveniente do processamento para a comercialização). Os substratos agroindustriais coletadas foram desidratados em estufa a 45°C, até obtenção de partículas secas e não aglomeradas. Essas amostras foram trituradas em liquidificador e padronizadas com relação ao tamanho das partículas utilizando peneiras de 1,68 mm.

Meio de produção e condições de cultivo

Para os ensaios da produção de tanase utilizou-se um meio de cultura constituído de uma base de sais em (g/L): NaNO₃; KH₂PO₄; KCl; MgSO₄. 7H₂O; FeSO₄. 7H₂O; ZnSO₄. 7H₂O; Cu(NO₃)₂. 3H₂O. Adicionadas a três diferentes substratos agroindustriais: os resíduos de uva, casca de café e laranja, variando as concentrações de 1, 2 e 3%.

Os ensaios com os meios de cultura foram realizados em frascos de Erlenmeyers de 250 mL, com volume útil de 125 mL, inoculados com 10% de uma suspensão de conídios (10^7 /mL) e incubados em rotação orbital de 150 rpm a 37° C, por 120 horas. Alíquotas de 5 mL do meio de cultura foram retiradas cada 24 h, para investigar a curva de crescimento pela biomassa (g/L), o pH e produção da enzimática. Os ensaios foram realizados em triplicata e a influência dos resíduos no meio de cultura para a produção da enzima foi avaliada através da análise do gráfico de PARETO, utilizando o programa Statistic versão 10 da Stat Soft.

Determinação da atividade enzimática

Foi utilizada a metodologia descrita por Mondal et al.(2001), modificada por Banerjee et al 2006. Foram realizados ensaios empregando 150 mL de solução de ácido tânico (0,7% (p/v) em tampão acetato com pH 5,5 - 0,2 M), adicionado a 0,025 mL de extrato enzimático bruto e incubados à 40°C por 10 minutos em banho maria. A reação foi paralisada com a adição de 1,5 mL de solução de albumina de soro bovino (preparada em tampão acetato pH 5,0 – 0,2 M, contendo 0,17 M de NaCl), logo em seguida, as amostras serão centrifugadas a 7000 x g por 15 min a temperatura de 4°C. O precipitado foi ressuspenso com a adição de 1,5 mL de solução de SDS-Trietanolamina (SDS 1% (p/v) adicionando 5% (v/v) de Trietanolamina em água destilada), acrescido de 0,5 mL de FeCl₃ (0,01 M de FeCl₃ em 0,01 M de ácido clorídrico). As soluções foram deixadas em repouso por 15 min. As leituras da absorbância serão realizadas a 530 nm em espectrofotômetro modelo Biochrom S21. O branco foi feito um teste contendo todos os reagentes, mas utilizando água destilada no lugar do extrato enzimático. A atividade enzimática foi calculada através da diferença da leitura de absorbância medida a 530 nm entre amostra e tubo controle, e calculada através da seguinte equação: $Abs_{530} = Abs_{controle} - Abs_{teste}$.

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

A curva padrão foi realizada utilizando quantidades de ácido tânico comercial variando entre 0,02% e 0,16%.

3. Resultados e discussões

Os resultados da curva de crescimento avaliados pela produção de biomassa de *C echinulata* UCP 1305 nas diferentes concentrações e substratos agroindustriais utilizado nos meios de cultivo estão apresentados na figura 1 (A -C).

Verifica-se, que os resíduos utilizados no meio de cultura possibilitaram o crescimento do microrganismo em todas as concentrações testadas. A maior produção de biomassa foi obtido com uso do resíduo de casca de laranja a 3% no meio de cultura com 4,2 g/L seguido do resíduo da uva 3% com 4,096 g/L após 120 horas.

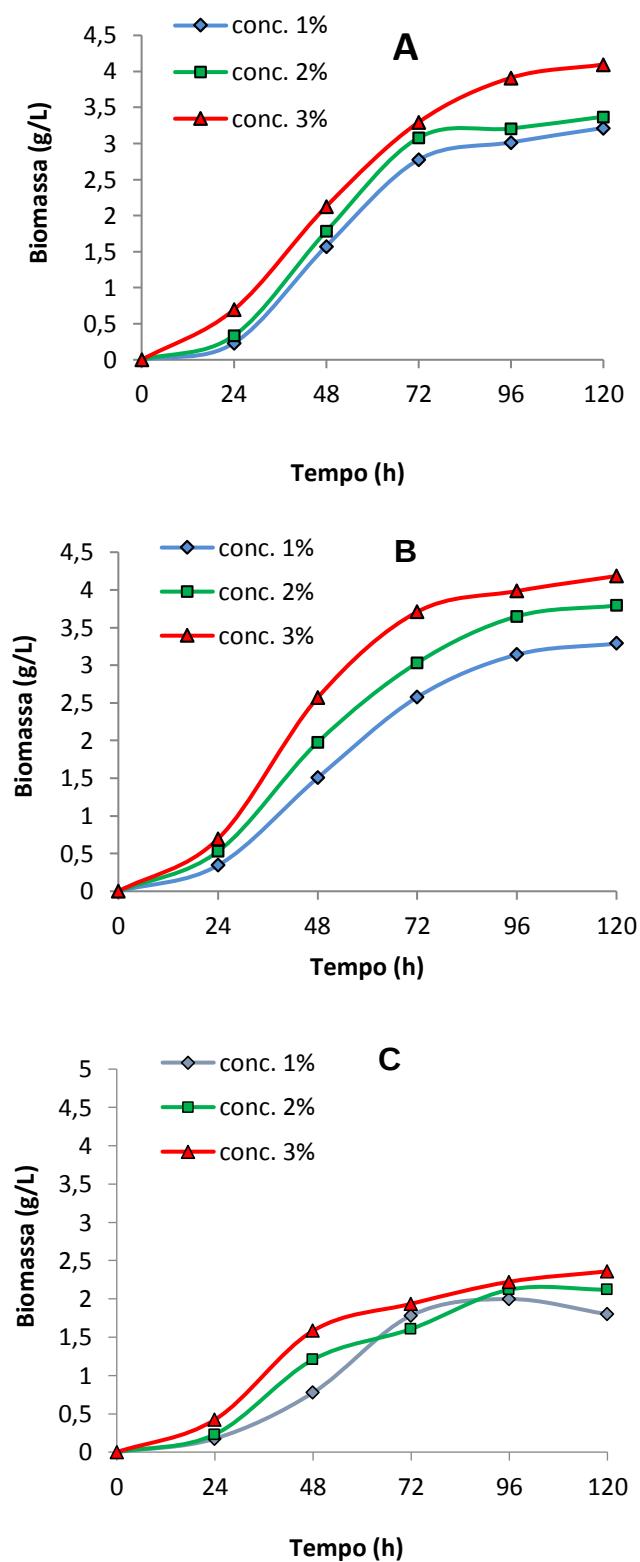


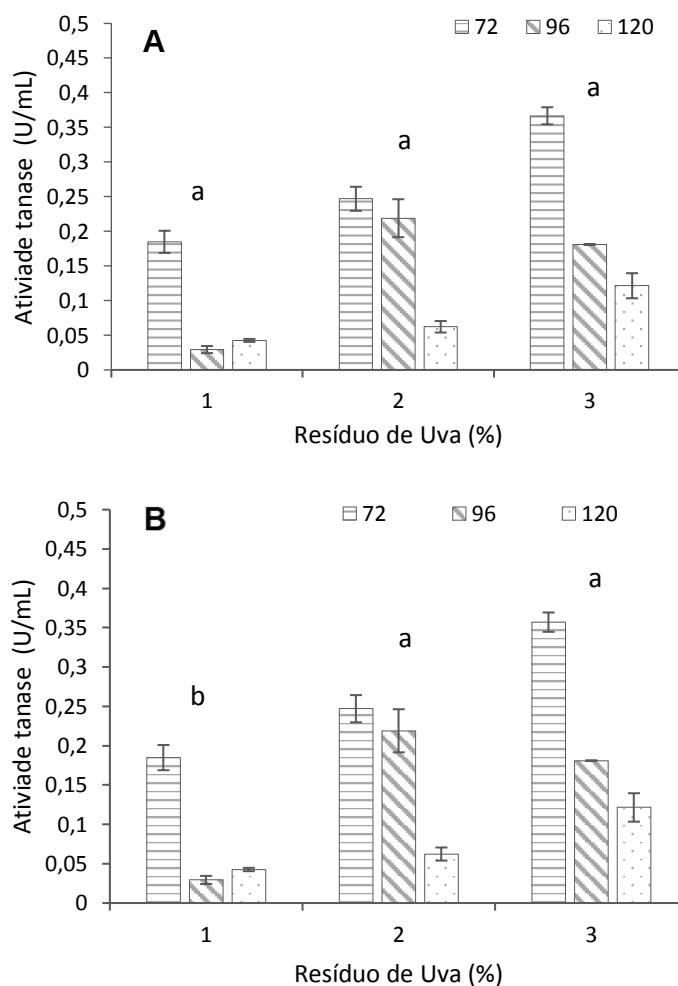
FIGURA 1. Produção de biomassa por *C. echinulata* (A) UCP 1305 com uso os resíduos uva (A), casca de laranja (B) e café (C) em diferentes concentrações 1, 2, 3% no meio de cultura durante 120 horas de cultivo

Os valores de pH ao final do período de cultivo realizadas nos diferentes meios de cultura também demonstraram que o pH teve uma variação para uma faixa ligeiramente ácida sendo pouco diferenciada entre os resíduos (Tabela 1).

TABELA 1. Variação do pH em diferentes meios de cultura por cepas *Cunninghamella echinulata* em 120h de cultivo

Conc. %	pH inicial	Uva pH final	Laranja pH final	Café pH final
1	7,0	5,33	5,19	4,89
2	7,0	5,52	5,41	5,12
3	7,0	5,67	5,50	5,21

Os resultados da produção da enzima tanase por *C. echinulata* (UCP 1305), nos diferentes resíduos estão apresentados nas figuras 2 A - C.



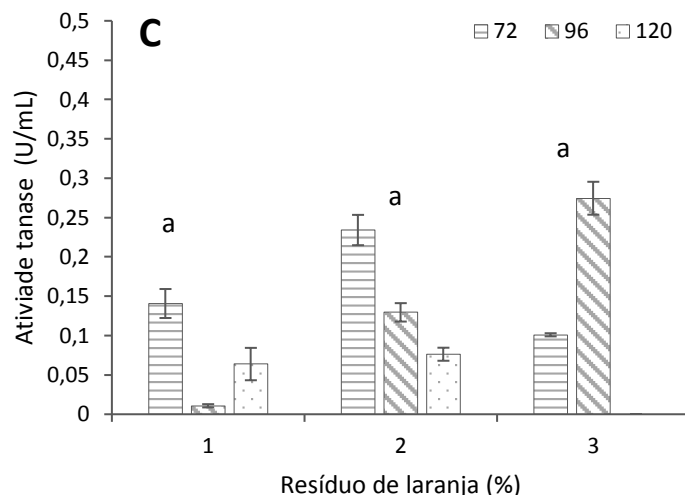


Figura 2. Produção da enzima tanase por *C. echinulata* UCP 1305 com uso os resíduos uva (A), casca de laranja (B) e café (C) em diferentes concentrações 1, 2, 3% no meio de cultura durante 120 horas de cultivo

* letras iguais não são significativas a nível de 5% pelo teste de Tukey

Atividade tanase de 0,357 U/mL e de 0,274 U/mL foram encontrados para os resíduos de uva e laranja respectivamente. Atividade enzimática mostra que o tempo e a concentração do substrato, tiveram efeitos significativos pra atividade enzimática, dados em material suplementar (Tabela1 - 3). O efeito do tempo demonstrou uma maior significância estatística para o aumento da atividade enzimática com o resíduo de uva e laranja, verificando a melhor produção da enzima já nas primeiras 72 horas de cultivo e uma diminuição ao passar do tempo. A concentração do substrato também demonstrou influenciar significativamente com uso do resíduo de uva.

A produção de tanase utilizando resíduos agroindustriais como substratos em cultivos submersos ou por cultivos semi sólidos por bactérias, leveduras e fungos tem sido descritas em diversos trabalhos (PANESAR *et al.*, 2016)

Os resíduos da vinicultura destaca-se por sua rica fonte de compostos fenólicos e açúcares fermentáveis o que o torna um dos resíduos mais promissoras para a produção de substâncias bioativas naturais (SAMPAIO; HADDAD; WIEND, 2018). Por outro lado, poucos estudos têm proposto a utilização do resíduo de sucos e processamento de laranja pra produção de enzima tanase foi proposto por (SAMPAIO; HADDAD; WIEND, 2018).

Em trabalho com uso de resíduos de diversos resíduos para produção de tanase por culturas fúngicas por SAMPAIO *et al.* (2018) obtiveram os melhores resultados para o resíduo de uva 0,210 U/mL.

O uso de resíduos agroindustriais de uva também foram demonstrado por Macedo *et al.* (2005). Neste estudo a produção de tanase por isolados fúngicos os autores obtiveram uma atividade de 0,1021 U/mL após 120h de cultivo (MACEDO; MATSUDA; BATTESTIN, 2005).

Para a análise estatística foram usadas como parâmetros a matriz codificada 2² com o resíduo da uva, com a casca da laranja e a casca do café nas concentrações de 1, 2 e 3% variando com o tempo de cultivo de 72, 96 e 120 hs conforme tabela 2 (A) para o resíduo da uva, tabela 2 (B) para a casca da laranja e tabela 2 (C) para a casca do café.

TABELA 2- Planejamento fatorial-matriz codificada 2² de utilização de resíduos

Uva	A	Níveis		
Fatores		-1	0	+1
Conc. resíduos (%)		1	2	3
Tempo (min)		72	96	120

Laranja	B	Níveis		
Fatores		-1	0	+1
Conc. resíduos (%)		1	2	3
Tempo (min)		72	96	120

Café	C	Níveis		
Fatores		-1	0	+1
Conc. resíduos (%)		1	2	3
Tempo (min)		72	96	120

O diagrama de Pareto apresentado na figura 3 (A) mostra que o resíduo da Uva apresentou o melhor resultado em comparação com a casca da Laranja e a casca do Café. O tempo, a concentração do substrato, e a interação do tempo com a concentração do substrato foram significativos pra o aumento da produção da atividade enzimática por *C. echinulata* UCP 1305. A concentração do substrato mostra a maior significância. Na figura 3 (B) o resultado da casca da laranja com o segundo melhor resultado também mostra significância das variáveis porém menos que a apresentada no resíduo da uva, Já na figura 3 (C) mostra que as variáveis não apresentaram resultado significativo para a atividade enzimática.

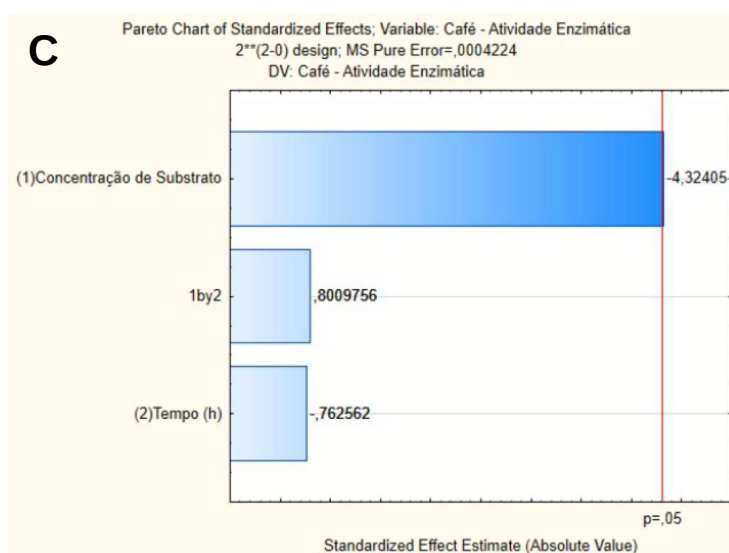
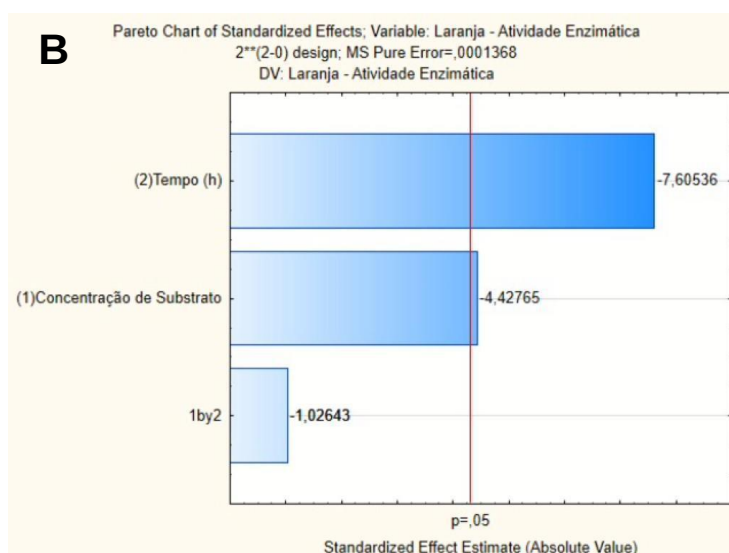
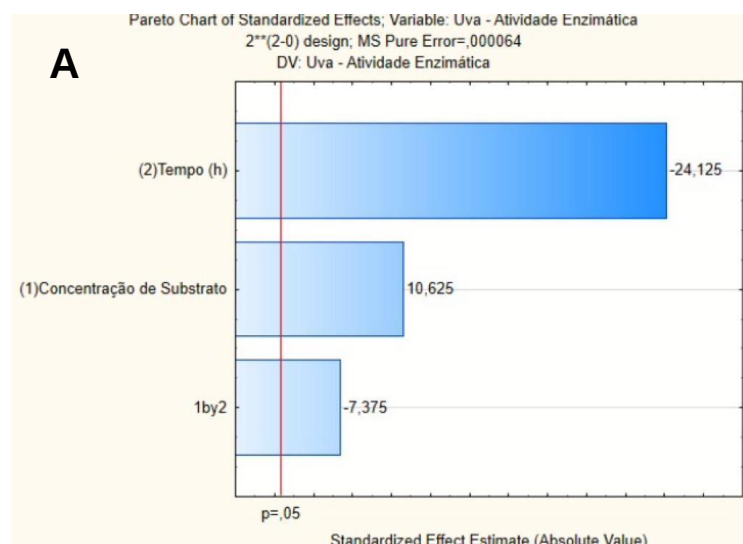


Figura 3. Diagrama de Pareto para análise do substrato nas concentrações e tempo de cultivo das amostras com resíduo da uva (A), casca de laranja (B) e casca de café (C)

A atividade Enzimática e o principal parâmetro para se avaliar as variáveis em estudo, pois o substrato da uva à 3% na temperatura 37°C, pH 7,0 em no tempo de 72 hs obteve uma produção enzimática de 0,357 U/mL, evidenciando o bom resultado da análise no diagrama de Pareto.

4. Conclusões

A utilização dos resíduos agroindustriais tornam possíveis a formulação de meios alternativos para o crescimento do microrganismo e produção de bioprodutos de alto valor agregado, com economia e contribuindo para um maior aproveitamento dos recursos naturais descartado na natureza, mais uma alternativa para melhorar os custo da produção de enzimas. O meio contendo o resíduo da uva apresentou maior produção de tanase, em comparação aos demais.

Verificou-se a habilidade da amostra isolada da *Cunninghamella echinulata* (UCP 1305) na produção da enzima em estudo, corrobora positivamente para confirmar o elevado potencial biotecnológicos dos fungos isolados do solo da caatinga do Estado de Pernambuco.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CNPq, CAPES e FACEPE pelo suporte financeiro para realização desse trabalho, e ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) pela infraestrutura da execução de toda parte experimental

5. Referencias

- ABREU, J. A. S; ROVIDA, A. F .S; PAMPHILE, L. A. Fungos de Interesse: Aplicações Biotecnológicas. **UNINGÁ REVIEW**. V.21.n.1.p.55-59,2015.
- ALMEIDA, L. Dos S. BIOPROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMO COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DA ENZIMA TANASE. [S.l.]: Universidade Federal do Pampa, 2014.
- CASTRO, A. M; Produção, propriedades e aplicação de Celulase na Hidrólise de Resíduos Agroindustriais. **Química Nova**. V.33.n.1. p. 181-188, 2010.
- ELIZEI, V.G; CHALFOUN, S.M.; BOTELHO, D.M.S; REBELLE,P.P.R; Imobilização de fungos filamentosos com potencial de uso agroindustrial. **Biotechnology/Scientificarticle**. v.81.n.2.p. 165-172, 2014.
- FORTUIN, F. T. J. M. **Aligning innovation to business strategy: combining cross-industry and longitudinal perspectives on strategic alignment in leading technology-based companies**. 2006. 189f. Tese (Doutorado). Wageningen University and Research Center, Wageningen University, Wageningen, 2006.
- GAMS,W. Biodiversity of soil-inhabiting fungi. **Biodiversity and Conservation**. London, v.16.p.69-72,2007.
- GONÇALVES, H. B. Produção de tanases por *Emericella nivea*: purificação e caracterização bioquímica. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, p.1-83, 2010.

- GONÇALVES, Morgana Suszek; FACCHI, Débora Pietrobon; BRANDÃO, Marcia Ines; BAUER, Maryana; PARIS JUNIOR, Orlando de. Produção de mudas de alface e couve utilizando composto proveniente de resíduos agroindustriais. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v.1n.9.p.216-224, 2014.
- KRISHNA, V.; GUPTA, M.; GUPTA, N.; GAUDANI, H.; TRIVED, S. ; PATIL, P.; GUPTA, G.; KHAIRNAR, K.; BORASATE, A.; MISHRA, D. Optimization of growth and production of protease by *Penicillium* species using submerged fermentation. **International Journal of Microbiology Research**, v. 1, n. 1, p. 14-18, 2009.
- LIMA, R.C.; SILVA, H.N.L.; PINOTTI, L.M. Produção de Lipase por *Penicillium* sp **Blucher Chemical Engineering Proceedings**. v.1. n.1. p.1-6, 2014.
- MACEDO, G. A.; MATSUDA, L. K.; BATTESTIN, V. Screening of tannase producing fungi present in rich tannin vegetable residues. **Ciência e Agrotecnologia**, 2005. v. 29, n. 4, p. 833–838.
- MATIAS, F; VIERIRA, P.I.L; FONTENELE, H.A. Avaliação do perfil de Investimentos em Biotecnologia no Brasil. **Cadernos de Prospecção - ISSN 1983-1358. (print), 2317-0026 (online)**. V.07.n.3. p. 314-323, 2014.
- MELO, A.G., PEDROSO, R.C.F., GUIMARÃES, L.H.S., ALVES, J.G.L.F., DIAS, E.S., RESENDE, M.L.V., CARDOSO, P.G. The Optimization of *Aspergillus* sp. GM4 Tannase Production under Submerged Fermentation. **Advances in Microbiology**, v.4, p. 143-150, 2014.
- MONDAL, K. C. BANERJEE, D, JANA, M, PATI, B.R. . Colorimetric assay method for determination of the tannin acyl hydrolase (EC 3.1. 1.20) activity. **Analytical Biochemistry**, v. 295, n. 2, p. 168-171, 2001.
- MONTEIRO, M.C.P; **Identificação de Fungos do Gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em Solos preservados do Cerrado**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Lavras, 76p. 2012.
- NASCIMENTO, K.B.M; MATINS, A.G.R; TAKAKI, G.M.C; SILVA, A.A.C; OKADA, K. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de Tanase por *Aspergillus* sp isolado do solo da caatinga de Pernambuco, v.7, n.1, p.95-103, 2014.
- PANESAR, P. S. et al. Bio-processing of Agro-industrial Wastes for Production of Food-grade Enzymes : Progress and Prospects. **APPLIED FOOD BIOTECHNOLOGY**, 2016. v. 3, n. 4, p. 208–227.
- PARANTHAMAN, R. *et al.* **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v.3, n.2, p.105-110, 2008.
- PARANTHAMAN, R.; VIDYALAKSHMI, R.; MURUGESH, S. Optimisation of Fermentation Conditions for Production of Tannase Enzyme by *Aspergillus oryzae* Using Sugarcane Baggasse and Rice Straw Optimisation of Fermentation Conditions for Production of Tannase Enzyme. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, 2008. v. 3, n. 2, p. 105–110.
- PEREIRA, E.D; VALDERRAMA, P; MARÇO, P.H; PAIVA, V.B; SCARMINIO, I.S; SOARES, D.X; BRUNS, R.E. Desenvolvimento de experimentos envolvendo Planejamentos fatoriais **SICITE**. v.1.p.01-06. 2012.
- SAMPAIO, P. R.; HADDAD, S.; WIEND, V. B. BIOTECNOLÓGICO PARA PRODUÇÃO DA ENZIMA TANASE USE OF AGRO-INDUSTRIAL WASTES IN BIOTECHNOLOGICAL PROCESS. **Sinergia**, 2018. v. 19, n. 2, p. 152–156. Disponível em: <<http://ojs.ifsp.edu.br>>.
- SANTOS, F.M.; SIMÕES, J.C.; SILVA, J.R.A.; BARTHUS, R.C.; POPPI, R.J.; AMARAL, A.C.F. Otimização das condições de extração de saponinas em *Ampelozizyphus amazonicus* usando planejamento

experimental e metodologia de superfície de resposta. *Química Nova*, v. 34, n. 9, p. 1629-1633, 2011.

SBARDELOTTO, M., AGNOL, A.D; VENTURIN, B; MULINARI, J; TREICHEL, E; VARGAS, G.D.L.P. Avaliação da produção de lipase microbiana a partir de *Aspergillus* sp., utilizando torta de canola como substrato. **Biochemistry And Biotechnology Reports**, Rio Grande do Sul, v. 2, n. 3, p.293-296, mar. 2013.

SILVA, J P L; VIANA,L. Caracterização molecular de fungos filamentosos da coleção de micro-organismos de interesse da indústria de alimentos.**Embrapa CONGRESSO RASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS**, v 2., Belém, PA,2012..

ZHU, M. J., CHENG, J. R., CHEN, H. T., DENG, M. C., XIE, W. H. Optimization of neutral protease production from *Bacillus subtilis*: Using agroindustrial residues as substrates and response surface methodology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, n.60, v.3, p.336-342, 2013

NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DE ARTIGOS PARA A ENGEVISTA

O TEXTO:

1. Os artigos devem ser inéditos, não sendo aceitas compilações, transcrições, traduções, reproduções ou adaptações de trabalhos já publicados em revista. Não são aceitos trabalhos que tenham cunho promocional de empresa, marcas ou produtos e que possam induzir à promoção comercial;
2. Os trabalhos devem ser apresentados em formato Word 97 ou versão posterior. Devem ser **submetidos exclusivamente através da página do [SEER](#)**.
3. As seguintes instruções devem ser observadas:

Formato de Página: A4

Margens: superior e inferior – 2,5; esquerda - 3 e direita - 3;

Espaçamento: 1,5

Tipo de letra: Títulos e subtítulos: Times New Roman (12) em negrito; corpo do texto: Times New Roman (11)

No máximo 20 (vinte) páginas, contendo, no mínimo, os seguintes itens: título, resumo, palavras-chave, desenvolvimento, conclusão e bibliografia. Artigos com maior número de páginas poderão ser aceitos a critério dos editores:

Título: o mais conciso possível, sugerindo, sem dúvida, o assunto. Centralizado, em Times New Roman 16. **Nos mestrados o título deverá estar todo em maiúsculo** seguido, entre parênteses pela versão do título em inglês (quando o artigo não for nesse idioma);

Resumo (e abstract): em no máximo vinte linhas. O **abstract** deve vir precedido do título em inglês;

Palavras-chave (e keywords): no máximo quatro (4);

Desenvolvimento (em uma coluna e sem qualquer nota de rodapé):

1. Numeração progressiva de títulos e subtítulos, em Times New Roman negrito;
2. Tabelas e figuras: devem ser centralizadas, ter um número e um título, colocados *acima da tabela e abaixo da figura*;
3. Equações: centralizadas e numeradas sequencialmente.
4. Na descrição da metodologia, ou equivalente, não deve ser incluído nenhum tópico sobre classificação da pesquisa (exploratória, quantitativa, etc). Informações desse tipo apenas aumentam o tamanho do artigo sem acrescentar nada de relevante ao conteúdo do texto.
5. Evitar complicar desnecessariamente o texto. Evite modismos linguísticos, gramaticalmente errados. Por exemplo, modal não é substantivo (não existe o modal terrestre ou aéreo) e uma situação que gera um problema não é uma “situação problema” é, no máximo, uma situação problemática.

6. Muito cuidado com o espaçamento de palavras. É comum alguns editores de texto incluírem códigos que anulam os espaçamentos feitos. Recomenda-se, antes da submissão de cada versão, verificar como fica o arquivo quando aberto no Word para Windows, em especial se o texto foi feito num MAC.

Conclusão: clara, objetiva e concisa.

Bibliografia:

- 1- As citações, no corpo do texto, não devem usar caixa alta. Apenas a primeira letra de cada nome deve estar em maiúscula.
- 2- Ainda nas citações, deve-se usar o *et al* para 3 ou mais autores.
- 3- Nas referências não usar *et al* em hipótese alguma. Deve aparecer o nome de todos os autores.
- 4- Nas referências apenas o(s) último(s) sobrenome(s) de cada autor é por extenso. Os primeiros nomes virão apenas com a inicial.
- 5- As referências devem ser à obra original, não se admitindo o uso do "apud".
- 6- Devem ser evitadas citações literais. O seu uso abusivo, mesmo com referência à obra citada, caracteriza plágio. Em caso de extremamente necessário fazer um citação literal, ela deve ser curta, em itálico e com citação à obra original. Não serão publicados artigos com mais de 2 citações literais
- 7- Em cada referência os nomes dos autores devem ser indicados. Mesmo que os autores de duas referências sejam os mesmo, os seus nomes devem ser novamente escritos. Nunca usar "----" para indicar a repetição de autores.

EXEMPLOS DE REFERÊNCIAS:

Artigo em revista:

ENSSLIN, L., GIFFHORN, E., ENSSLIN, S. R., PETRI, S. M. & VIANNA, W. B. 2010. Avaliação do desempenho de Empresas Terceirizadas com o uso da Metodologia Multicritério de Apoio à Decisão - Construtivista. *Pesquisa Operacional*, 30, 125-152.

Artigo em congresso:

PINHEIRO, P. R., DE CASTRO, A. K. A. & PINHEIRO, M. C. D. A Multicriteria Model Applied in the Diagnosis of Alzheimer's Disease: A Bayesian Network. 11th IEEE International Conference on Computational Science and Engineering, 2008 São Paulo, Brasil. 15-22.

Livro:

ARROW, K. J. 1951. *Social Choice and Individual Values*, New York, Wiley.

Capítulo de livro:

BALSADI, O. V. 2008. O mercado de trabalho assalariado na cultura da cana-de-açúcar no período 1992-2006. In: FILHO, F. B. B. (ed.) *Energia e Biomassa*. Brasília.

Teses e dissertações

AZEVEDO, J. 2001. *Aplicação da metodologia multicritério de apoio à decisão na seleção de centros de usinagem para uma central de usinagem*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES GERAIS

Diante dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- Dentre as amostras de *Cunninghamella echinulata* testadas neste estudo, para a seleção de melhores cepas produtoras de tanase em meio líquido, o micro-organismo UCP 1305 foi o que se apresentou com os melhores resultados;
- Nos ensaios referentes a seleção dos meios de produção de Tanase, o meio que apresentou os melhores resultados foi o meio denominado M3, dentre os demais selecionados para produção de tanase: Solução de sais (g/L): NaNO_3 ; KH_2PO_4 ; KCl ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; Resíduo da Uva, casca de Café e laranja como substratos a 1, 2 e 3%;
- O resíduo da uva na concentração de 3% na temperatura de 37°C, pH 7,0 em 72 hs de cultivo apresentou o maior resultado da atividade enzimática em comparação aos substrato da casca de laranja e café.
- Apesar da ausência de ácido tânico, como indutor da produção de tanase, a utilização de resíduos agroindústrias, testados neste trabalho, foram suficientes para a obtenção de tanase por meio de fermentação submersa, com destaque para o resíduo da Uva que obteve o melhor resultado.
- Os resultados obtidos demonstraram a eficácia na utilização de resíduos agroindustriais como substratos alternativos na produção de tanase, através da formulação de meios alternativos, pois o reaproveitamento desses resíduos contribui para minimização dos impactos ambientais, bem como a redução dos custos da produção de tanase de vasta utilização biotecnológica.

ANEXO

Material suplementar

Artigo III

Tabela 1. ANOVA - Atividade tanase - Resíduo de uva

Efeitos	DF	GL	MS	F	p
Interceção	0.699477	1	0.699477	330.0554	0.000000
concentração	0.082889	2	0.041445	19.5561	0.000013
tempo	0.167586	2	0.083793	39.5386	0.000000
erro	0.046624	22	0.002119	-	-

Tabela 2. ANOVA - Atividade tanase - Resíduo de casca de laranja

Efeitos	DF	GL	MS	F	p
Interceção	0.354107	1	0.354107	62.83361	0.000000
concentração	0.026759	2	0.013379	2.37407	0.116525
tempo	0.059614	2	0.029807	5.28901	0.013319
erro	0.123984	22	0.005636		

Tabela 3. ANOVA - Atividade tanase - Resíduo de casca de café

Efeitos	DF	GL	MS	F	p
Interceção	0.180512	1	0.180512	69.82529	0.000000
concentração	0.004189	2	0.002094	0.81011	0.457643
tempo	0.014091	2	0.007046	2.72534	0.087613
erro	0.056874	22	0.002585	-	-