



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

CLÁUDIA MARIA ROCHA MOURA

**PRODUÇÃO DE TANASE POR FERMENTAÇÃO
SUBMERSA ATRAVÉS DE AMOSTRAS DE *Penicillium* spp
ISOLADAS DO SEMI-ÁRIDO DO ESTADO DE
PERNAMBUCO**

RECIFE
2015

CLÁUDIA MARIA ROCHA MOURA

**PRODUÇÃO DE TANASE POR FERMENTAÇÃO
SUBMERSA ATRAVÉS DE AMOSTRAS DE *Penicillium* spp
ISOLADAS DO SEMI-ÁRIDO DO ESTADO DE
PERNAMBUCO UTILIZANDO MEIOS 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

2015

Moura, Cláudia Maria Rocha da

Produção de Tanase por Amostras de *Penicillium ssp* Isoladas do Semi-Árido do Estado de Pernambuco, Utilizando Meios Contendo Resíduos Agroindustriais.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

1. Produção de Tanase 2. *Penicillium ssp* 3. Meios com resíduos agroindustriais. I. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Centro de Ciências e Tecnologia.

**PRODUÇÃO DE TANASE POR FERMENTAÇÃO
SUBMERSA ATRAVÉS DE AMOSTRAS DE *Penicillium* ssp
ISOLADAS DO SEMI-ÁRIDO DO ESTADO DE
PERNAMBUCO UTILIZANDO MEIOS CONTENDO
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

CLÁUDIA MARIA ROCHA MOURA

Examinadores:

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

Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa Lima (Membro Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFPE

Profª Dra. Kaoru Okada (Membro Interno)
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as dádivas a mim concebidas, pelo dom da vida, e por trazer refrigério a minha alma nos momentos mais difíceis.

A minha família, minha mãe Luzinete Rocha, ao meu pai, João Francisco, (*in memoriam*), aos meus irmãos e irmãs que sempre estiveram contribuindo para mais uma etapa fosse finalizada na minha vida.

Em especial ao meu esposo Saulo Moura, pelo seu imenso amor, carinho, dedicação e paciência para comigo, bem como, pelo seu cuidado com nosso maior presente de Deus, Davi Asafe, a ele, meu eterno agradecimento e amor.

Aos meus sogros, Walmir e Graça Moura, que com muita dedicação, zelo e carinho têm cuidado de nosso pequeno príncipe, estando sempre presente na vida de seu neto e nas nossas.

Aos meus tios: João Antônio e Maria do Carmo pelo carinho, força, conselhos, paciência e dedicação.

Aos meus amigos de longa caminhada dos quais conquistei amizade desde a graduação, Paloma Salles, Diêgena Maciel, Wellington Bezerra e Jupiranan Ferreira.

A Brindize Ferreira, por ter sido um instrumento de Deus em minha vida, pela sua insistência, apoio e incentivo, sem a qual não estaria aqui.

A Martinha Santos pelo apoio, risadas e companheirismo.

Aos amigos do laboratório, especialmente a Marcos Luna, Greyce Kelly e Márcia que me acompanharam e me apoiaram nesta árdua caminhada.

A todos os professores das disciplinas cursadas, por contribuírem para minha formação, sobretudo, a prof^a. Dra. Galba Campos Takaki pela sua atenção, colaboração e exemplo de vida.

Em especial ao meu professor e orientador Dr. Carlos Alberto Alves da Silva, pela sua dedicação, apoio incentivo e compreensão, mesmo nos momentos mais difíceis, ajudando e orientando-me a crescer em conhecimento, a ele, meu imenso respeito, carinho, e sincero agradecimento.

Por fim, a todos vocês que se alegraram comigo por mais esta conquista.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
SUMÁRIO	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT.....	vii
CAPÍTULO I.....	8
1.1 INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo Geral.....	11
2.2 Objetivos Específicos	11
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	12
3.1 BIOTECNOLOGIA.....	12
3.2 ENZIMAS.....	13
3.2.1 TANASE	14
3.3 TANINOS.....	15
3.4 FERMENTAÇÃO SUBMERSA	17
3.5 MICRO- ORGANISMOS PRODUTORES DE TANASE.....	18
3.5.1 GÊNERO <i>PENICILLIUM</i>	19
3.5.2 <i>Penicillium chrysogenum</i>	21
3.6 CAATINGA	22
3.7 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....	24
3.7.1 LARANJA PÊRA.....	24
3.7.2 UVA	27
3.7.3 CAFÉ	28
3.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
CAPÍTULO II.....	48
ISSN: 1984-3151	49
SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS DE <i>PENICILLIUM</i> SSP ISOLADAS DA CAATINGA DO ESTADO DE PERNAMBUCO PARA PRODUÇÃO DE TANASE ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO DIFERENTES MEIOS DE PRODUÇÃO ..	49
<i>RESUMO</i>	49

ABSTRACT	50
1 INTRODUÇÃO	50
2. MATERIAL E MÉTODOS	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
5. REFERENCIAS	59
CAPÍTULO III.....	62
INFLUÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NA FORMULAÇÃO DE MEIOS ALTERNATIVOS DE PRODUÇÃO DE TANASE POR <i>PENICILLIUM</i> sp ATRAVÉS DE UM PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO	63
Resumo.....	63
Abstract.....	63
1. Introdução.....	64
2. Material e Métodos.....	66
3. Resultados e discussões.....	68
4. Conclusões	71
5. Referencias.....	71
CAPÍTULO IV	75
CONCLUSÕES GERAIS.....	76

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 - Reação de hidrólise do ácido tânico.....	15
Figura 2 - Estrutura molecular dos galotaninos (A) e dos elagitaninos (B).....	16
Figura 3 - Fluxograma simplificado da produção de enzimas microbianas utilizando o processo de fermentação submersa.....	17
Figura 4 - Morfologia representativa do gênero <i>Penicillium</i> sp.	20
Figura 5 - <i>Penicillium chrysogenum</i> , presença de fialides, metulas e conidióforo.....	21
Figura 6 - Caatinga de Pernambuco	23
Figura 7 - Resíduo de casca de laranja	26
Figura 8 - Uva Isabel rica em taninos	28
Figura 9 - Resíduo de casca de café	29

CAPÍTULO II

Figura 1 – Formação do halo característico da tanase na amostra SIS 25, 37°C, 96 h.....	55
Figura 2 - Amostra SIS 25, identificada como <i>Penicillium chrysogenum</i> , presença de fialides, metulas e conidióforo.	56
Figura 3 – Curva de crescimento da amostra SIS 24 em diferentes meios de produção	56
Figura 4 – Curva de crescimento da amostra SIS 25 em diferentes meios de produção	57

CAPÍTULO III

Figura 1 - Resíduos de: A (Laranja), B (Uva), C (Café).....	66
Figura 2 - Diagrama de pareto mostrando os efeitos principais e alterações das variáveis independentes no processo de produção de tanase por <i>Penicillium chrysogenum</i> a 144 horas de fermentação a 37°C. (1) casca de café, (2) casca de uva, (3) resíduo de laranja. .	69
Figura 3 - Crescimento do <i>Penicillium chrysogenum</i> para o ensaio 3 em 144 horas de fermentação a 37°C e pH 6,0.....	70
Figura 4 - Atividade enzimática tanase utilizando os resíduos de café, uva e laranja em 144 horas de fermentação.....	70

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Principais classes enzimáticas. Fonte: PEREIRA, 2011	14
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Ensaio de detecção da tanase em meio sólido utilizando diferentes amostras de <i>Penicillium spp.</i>	55
Tabela 2 – Determinação da biomassa das amostras SIS 24 e 25 em diferentes meios de produção.....	57
Tabela 3 – Determinação dos valores de pH nos meios testados da amostra SIS 24.....	57
Tabela 4 – Determinação dos valores de pH nos meios testados da amostra SIS 25.....	57
Tabela 5 - Determinação da atividade enzimática de tanase em diferentes meios da amostra SIS 24.....	58
Tabela 6 - Determinação da atividade enzimática de tanase em diferentes meios da amostra SIS 25.....	58

CAPÍTULO III

Tabela 1. Valores dos Fatores utilizados no Planejamento Fatorial 2 ³	67
Tabela 2 - Produção de biomassa, pH e atividade tanalítica nos ensaios para as concentrações de casca de café, casca de uva e resíduo de laranja em 144 horas de cultivo a 37°C a 150rpm.....	68
Tabela 3 - Produção de biomassa, pH e atividade tanalítica dos em diferentes resíduos em 144 horas de cultivo a 37°C a 150 rpm.....	70

RESUMO

As enzimas microbianas são um dos produtos bioativos que têm aumentado sua produção nas últimas décadas, devido a sua grande utilização em diversos setores industriais e ambientais existentes. São inúmeras as aplicações das enzimas microbianas em diversos setores da biotecnologia. Devido a sua grande utilização, vários estudos têm sido realizados no sentido de isolar e identificar novos micro-organismos produtores, principalmente aqueles isolados de ambientes pouco estudados e com uma imensa biodiversidade microbiana como a Caatinga nordestina. Foram realizados estudos com fungos filamentosos do gênero *Penicillium* isolados de solo da Caatinga de Pernambuco para produção de tanase. Inicialmente foi realizada uma seleção de produção da enzima utilizando 4 isolados em meio sólido. Os resultados revelaram que os isolados denominadas de SIS 24 e 25, apresentaram a formação dos maiores halos característicos de produção da enzimas à 37°C, com valores de 4,0 e 4,5 cms, respectivamente. Em seguida, foram realizados ensaios moleculares e morfológicos para identificação das amostras selecionadas (SIS 24) identificada como *Talaromyces* e a (SIS 25) como *Penicillium chrysogenum*. Em seguida, foram realizados ensaios de produção da tanase com os isolados SIS 24 e SIS 25 através de fermentação submersa, utilizando 4 meios de produção com diferentes composições, à 37°C, 150 rpm, 168 horas. Os resultados revelaram que a amostra SIS 25 apresentou a maior produção enzimática com 96 h de produção de 0,1555 U/mL obtida no meio 1. Ensaio de produção utilizando um planejamento fatorial de 2³ completo para formulação de meios alternativos contendo resíduos agroindustriais (casca de café, casca de uva e resíduo de laranja) nas mesmas condições utilizadas no ensaio anterior. Os resultados obtidos evidenciaram que o ensaio denominado 3, que apresentou um valor de pH 4,8, contendo resíduos de café 5g, de uva 12g e de laranja 5g, apresentou uma atividade tanalítica de 0,210 U/mL. A utilização de resíduos agroindustriais surge como uma alternativa viável na elaboração de meios de produção de produtos biotecnológicos bioativos.

Palavras- chaves: Tanase, *Penicillium chrysogenum*, Caatinga e Resíduos Agroindustriais

ABSTRACT

Microbial enzymes are one of the bioactive products have increased their production in recent decades, due to its widespread use in many existing industrial and environmental sectors. There are numerous applications of microbial enzymes in various sectors of biotechnology. Due to its widespread use, several studies have been undertaken to isolate and identify new producers microorganisms, especially those isolated from poorly studied environments and with an immense microbial biodiversity as the northeastern Caatinga. Studies have been conducted with filamentous *Penicillium* isolated from soil samples of the fungi of Pernambuco Caatinga to produce tannase. Initially enzyme production was performed using selection on solid medium 4 samples. The results showed that the samples called SIS 24 and 25 show the formation of the characteristic halos higher production of enzyme at 37°C, with values of 4.0 and 4.5 cm, respectively. Then molecular and morphological tests for identification of the samples were made which had the largest halos production of tannase and the sample identified as *Talaromyces* (SIS 24) and *Penicillium chrysogenum* (SIS 25). The tannase production assays were performed with samples SIS 24 and 25 by submerged fermentation using 4 production media with different compositions at 37 °C, 150 rpm, 168 hours. The results show that the SIS 25 showed the highest enzyme production at 96 hours of production 0.1555 U / mL obtained in the medium 1. Continuing to production studies were performed new production using a 2³ full factorial design for alternative media formulation containing organic residues (coffee, grape and orange wastes) under the same conditions used in the previous test. The results showed that the assay 3, which showed a pH 4.8, containing coffee 5g, 12g of grape and orange 5g, presented a lipase activity of 0.210 U / mL. The use of agro-industrial waste emerges as a viable alternative for the development of biotechnology products bioactive media of production.

Key-words: Tannase, *Penicillium chrysogenum*, Caatinga, Agro-industrial Residues

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

Atualmente, os centros de pesquisas científicas e o mercado mundial de biotecnologia estão atentos às tecnologias sustentáveis, que geram menor impacto na sociedade e propiciam um maior retorno financeiro. O desenvolvimento tecnológico tem se voltado para a sustentabilidade das atividades produtivas, levando a uma tendência à substituição de processos químicos baseados em insumos não renováveis (PADILHA et al, 2011; SILVA et al, 2012; GONZALES et al, 2013).

As enzimas são moléculas protéicas, biocatalisadores, e possuem a capacidade de diminuir a energia de ativação requerida para formação de um complexo de transição ativado, dando origem a um novo produto (SANTOS et al., 2012). Em diversos processos químicos e biotecnológicos, as enzimas podem substituir substâncias químicas sintéticas e contribuir para processos de produção ou gerar benefícios para o meio ambiente, por meio da biodegradabilidade e pelo menor consumo de energia. Elas são mais específicas em sua ação do que as substâncias químicas sintéticas. Os processos que empregam enzimas microbianas produzem menos subprodutos residuais, para a obtenção de produtos de melhor qualidade, diminuindo assim a probabilidade de grandes focos de poluição ambiental (OYELEKE et a, 2010; OYELEKE et al, 2012).

Tanino acil hidrolase (tanase, EC 3.1.1.20) é uma enzima que hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis como o ácido tânico, liberando glicose e ácido gálico. Os taninos são moléculas solúveis em água com diferentes pesos moleculares e alto teor de polifenóis, que ocorrem em certas partes de plantas (casca, madeira, folhas, frutos, raízes e sementes) (ROBLEDO et al., 2008; PRASAD et al., 2012). As tanases têm sido utilizadas como agentes de clarificação, no processamento industrial de sumos de fruta e refrigerantes de café aromatizado, para a preparação de chás instantâneos, e na produção de ácido gálico (RODRIGUEZ et al., 2008; GONÇALVES et al., 2012). Os principais micro-organismos produtores da enzima tanase são os fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* que produzem uma ampla gama de enzimas de interesse biotecnológico o que facilita a recuperação das mesmas e são bons biodegradadores, atributos que distinguem os fungos filamentosos das outras formas microbianas (AGUILAR et al, 2007; RODRÍGUEZ et al, 2008 ; BARATTO et al, 2011; MOURA et al, 2013).

Os cultivos submersos têm sido tradicionalmente utilizados para a produção industrial de uma grande maioria de enzimas microbianas, devido à facilidade de crescimento dos micro-organismos e do controle de diferentes parâmetros, tais como pH, temperatura, aeração e umidade, além de tornar fácil a recuperação das enzimas extracelulares (PANDEY et al, 2000; SANDHYA et al, 2005; SOUZA et al, 2010; ORLANDELLI et al, 2012).

O gênero *Penicillium* tem sido frequentemente isolado como endofítico, constituem um grupo de micro-organismos que sintetizam elevadas quantidade de metabólitos secundários, atingindo em certos casos, uma produção 73% superior a de outras classes de micro-organismos descritos na literatura. Esse gênero tem sido utilizado como organismo modelo em diversos estudos de pesquisa básica. Além disso, em diversas pesquisas aplicadas têm demonstrado seu enorme potencial biotecnológico (FRISVAD et al, 2004; ROMÃO, 2010).

A caatinga é formada de florestas úmidas, montanhas e cerrados, onde a deciduidade das folhas é comum neste bioma. Obtendo-se assim uma enorme biodiversidade de organismos e micro-organismos. A reciclagem de nutrientes acumulados na superfície do solo desempenha um importante papel para obtenção de micro-organismos como, por exemplo, os fungos conidiais, que são ótimos decompositores deste ambiente (GIONGO et al, 2012; MELLO et al, 2013).

Vários bioprocessos têm sido desenvolvidos utilizando resíduos agroindustriais como substratos para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado, tais como proteínas microbianas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos. O uso de resíduos agrícolas como substratos em bioprocessos, além de ser economicamente viável, pode ajudar a resolver os problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza (DASHTBAN et al, 2009; STROPARO et al, 2012).

O presente trabalho tem como objetivo a utilização de resíduos agroindustriais para produção da enzima tanase, utilizando *Penicillium* spp. através de um planejamento fatorial visando menor custo de produção e minimização de impactos ambientais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produção e caracterização de tanase por *Penicillium* spp, isolados da Caatinga do Estado de Pernambuco, por fermentação submersa utilizando meios de alternativos contendo substratos agroindustriais.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar amostras de *Penicillium* spp. e *Talaromyces* produtoras de tanase dentre os isolados do solo da Caatinga de Pernambuco em meio sólido;
- Identificar taxonomicamente as amostras que apresentaram o melhor perfil de produção de tanase em meio sólido;
- Avaliar e selecionar a produção de tanase através de fermentação submersa em diferentes meios tradicionais com as amostras que apresentaram o maior perfil de produção em meio sólido;
- Investigar a elaboração de meios alternativos contendo diferentes substratos agroindustriais ricos em taninos (casca de uva, casca de café e resíduo da laranja) na produção de tanase, através de um planejamento fatorial 2³ completo.
- Verificar a influência dos substratos selecionados na cinética de produção da enzima, através das determinações da temperatura, pH, velocidade de crescimento na produção de tanase;
- Selecionar o melhor meio alternativo de produção da tanase.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 BIOTECNOLOGIA

As informações obtidas pelas descobertas científicas podem ser utilizadas para a geração de novos estudos e tecnologias, há também a necessidade de desenvolver a capacidade de tratamento dessas informações para seu emprego no processo produtivo. A prospecção científica e tecnológica se apresenta viável na análise do conhecimento acerca de um determinado tema de interesse. Tal atividade torna-se eficaz nesse processo por identificar áreas de pesquisas estratégicas e as tecnologias que possuem a capacidade de gerar maiores benefícios econômicos e sociais (ALBAGLI, 1998; PEREIRA et al, 2014).

De acordo com a Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB) entende-se biotecnologia como qualquer aplicação tecnológica em que sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados, são usados para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica. Num entendimento mais amplo, pode-se afirmar que há milhares de anos a humanidade atua em processos biotecnológicos, com o desenvolvimento das técnicas de fermentação na produção de vinhos, queijos e pães (DIAS, 2000; FRANÇA, ILLHA, 2014).

A biotecnologia é a área de interesse Industrial, pois abrange a proteção para novos organismos, avanços e inovações tecnológicas. Abrange diferentes áreas do conhecimento, interligando-as, seja na área da Biologia Molecular, Microbiologia, Biologia Celular, Embriologia, Química, Bioquímica, Tecnologia da Informação, Robótica, Bioética, Biodireito, entre outras (KUNISAWA, 2004; LEITE; MUNHOZ, 2013).

A biotecnologia pode agregar inúmeras denominações, reveladoras de sua complexidade e possibilidades de aplicação. O acesso à biotecnologia, além de propiciar conforto, lazer, segurança; promover a saúde, conservar alimentos e etc, representa fontes de recursos inestimáveis, exigindo a ação conjunta da sociedade e dos poderes constituídos. Os eventuais embaraços à utilização das modernas tecnologias são inúmeros, mais podem ser levantadas algumas reflexões, a título de ponto de partida para a pesquisa ética dos efeitos sobre a vida da sociedade, da natureza e da vida das pessoas (SANTOS, 2007; COLUCCI, 2013).

3.2 ENZIMAS

Enzimas são catalisadores orgânicos, responsáveis por milhares de reações bioquímicas envolvidas nos processos biológicos dos sistemas vivos. Agindo em seqüências catalisam as centenas de reações sucessivas pelas quais moléculas nutrientes são degradadas. A energia química é conservada e transformada e as macromoléculas biológicas são sintetizadas a partir de moléculas precursoras simples. A introdução de enzimas como catalisadores em processos industriais, mostra-se vantajoso, pois são específicas, naturais e geralmente não apresentam toxicidade, características desejáveis tanto pela indústria quanto para a integridade do meio ambiente (NELSON; COX, 2006, GONÇALVES, 2010; COSTA et al, 2012)

Com ampla utilização na indústria alimentícia, principalmente em processos de maceração de vegetais e frutas para produção de néctares e purês, no processamento de produtos cárneos (tenderização) na produção de queijos, na extração e clarificação de sucos de frutas e vinho, na desengomagem de fibras naturais e na recuperação de óleos vegetais. São utilizadas também na indústria de papel e celulose (COELHO et, 2001; TAVARES et al, 2013).

O setor de produção de enzimas apresenta muitas iniciativas de pesquisa e desenvolvimento, que resultam na produção de diversos novos produtos e no aprimoramento de processos e melhor desempenho de produtos já existentes no mercado. No entanto, o custo elevado de produção e purificação de enzima é um dos principais fatores que determinam a economia de um processo. Reduzir os custos de produção é fundamental para aplicações industriais (PARK et al, 2002; SANTOS et al 2013).

Versáteis estereoespecíficas, e de elevada importância nos processos biotecnológicos normalmente os processos enzimáticos têm ação rápida, ocorrem em condições brandas de temperatura e pH, atuando sobre um substrato específico (RIBEIRO et al., 2013). O mercado industrial de aplicação de enzimas continua a crescer devido ao desenvolvimento de novas tecnologias, ao uso da engenharia genética durante a produção e à emergência de novos campos de aplicação. A demanda mundial de utilização dessas enzimas tem crescido anualmente, sendo mais de 90% do seu comércio efetuado por países como Estados Unidos, alguns da Europa e Japão. (JOHANNES; ZHAO, 2006; IYER, ANANTHANARAYAN, 2008; DEMAINE; ADRIO, 2008; LI et al., 2012; ADRIO; DEMAINE, 2014; LIMA et al, 2014).

Enzimas microbianas são preferíveis para aplicações industriais em virtude dos menores tempos de geração para produção, facilidade de manipulações genéticas, aumento de escala e purificação, especificidade e estabilidade. (SHARMA; CHISTIB; BENERJEE, 2001; REINEHR et al, 2014). A tabela 1 descreve as reações catalisadoras pelas enzimas.

Tabela 1. Principais classes enzimáticas. Fonte: PEREIRA, 2011

Classe da enzima	Tipo de reação catalisada
Oxirredutases	Catalisam reações de oxirredução. Transferência de H ₂ O ou elétrons.
Transferases	Catalisam transferências de grupos entre moléculas.
Hidrolases	Catalisam reações de hidrolises.
Liases	Catalisam a adição de grupos a ligações duplas e vice-versa.
Isomerases	Catalisam reações isomerização.
Ligases	Catalisa a união de duas moléculas, associadas à ruptura da ligação tirofosfato do ATP.

3.2.1 TANASE

Tanino acil hidrolase (tanase, EC 3.1.1.20) é uma enzima que hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis como o ácido tânico, liberando glicose e ácido gálico. É uma enzima extracelular, induzível, produzida na presença de ácido tânico ou do seu produto final, que é o ácido gálico por fungos, bactérias e leveduras. A primeira decisão para o desenvolvimento do processo de produção de enzimas por micro-organismo é a seleção da linhagem de micro-organismos. Enzimas extracelulares são preferidas, pois dispensam métodos de ruptura da célula, que são dispendiosos (ROBLEDO et al, 2008; PRASAD et al, 2012; MUSLIM et al, 2015).

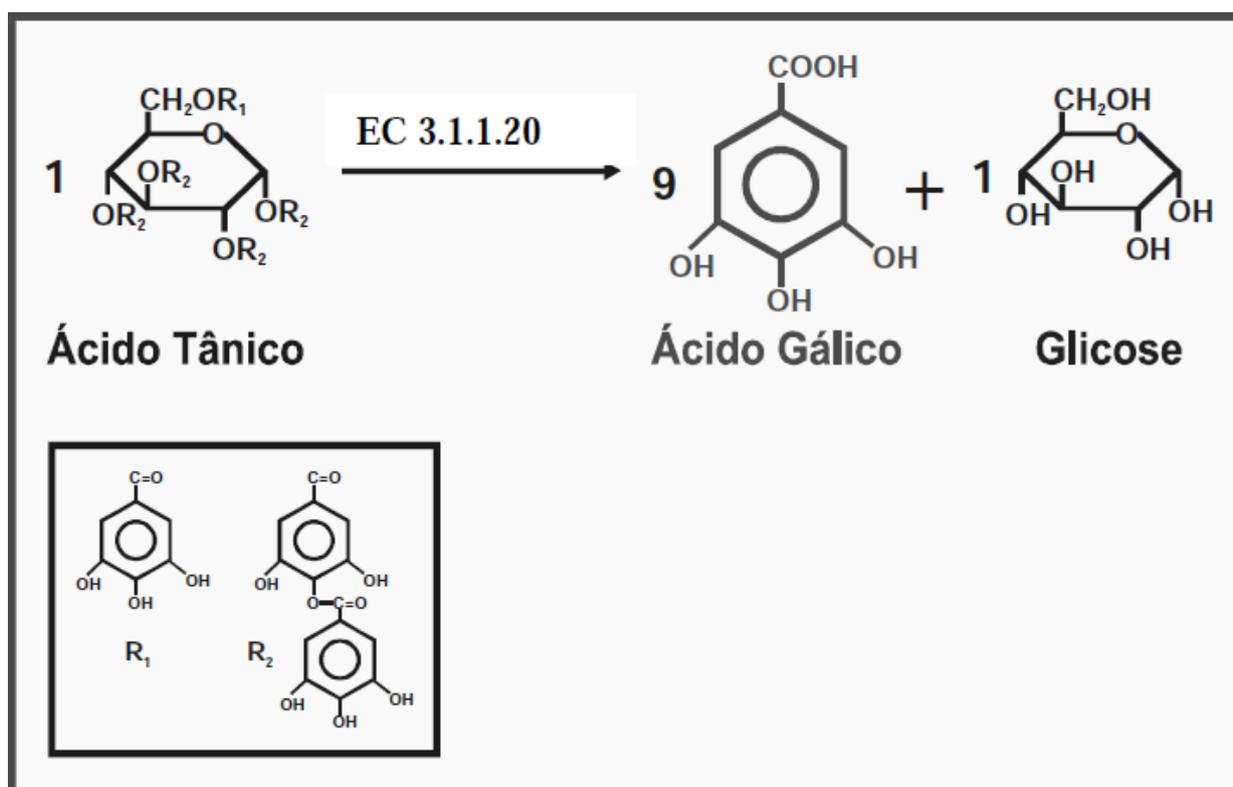
A tanase apresenta um pH estável na faixa de 3.5-8.0, com pH ótimo entre 5.0-6.0, temperatura de estabilidade entre 30°C e 60°C, ótima na faixa de 30-40°C, ponto isoelétrico de 4.0-4.5 e massa molecular entre 180kDa e 300kD. É inibida por Cu²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺ e Mg²⁺ e é inativada pela ação de *o*-fenantrolina, EDTA, 2- mercaptoetanol, tioglicolato de sódio, sulfatos e cloretos de magnésio e cálcio (AGUILAR; GUTIÉRREZ SÁNCHEZ, 2001; BATTESTIN, MATSUDA, MACEDO, 2008; LIMA et al, 2015).

Embora existam muitas aplicações industriais da tanase em potencial, poucas são efetivamente empregadas devido essencialmente ao custo de produção da enzima, que ainda é elevado. A tanase apresenta aplicações em indústrias de alimentos, ração, couro, farmacêutica e química. Na produção de bebidas a tanase pode ser utilizada para reduzir a formação de turbidez dos componentes fenólicos. Tendo grande importância no processo de clarificação de cervejas e sucos de frutas, produção

de refrigerantes a base de café e na melhoria do flavour de vinho de uvas (CHÁVEZ-GONZÁLEZ et al, 2012; YAO et al, 2014).

Outra aplicação da tanase é na produção de ácido gálico, um importante intermediário na síntese da droga antibacteriana, trimetopim, usada na indústria farmacêutica. O ácido gálico também é substrato para a síntese química ou enzimática de propil-galato, um potente antioxidante com importância na indústria alimentícia (LEKHA; LONSANE, 1994 AGUILAR et al, 2007; PRASAD et al, 2012; NASCIMENTO et al, 2014). Na figura 1 descreve a reação de hidrólise do ácido tânico.

Figura 1 - Reação de hidrólise do ácido tânico
Fonte: AGUILLAR, et al., 1999



3.3 TANINOS

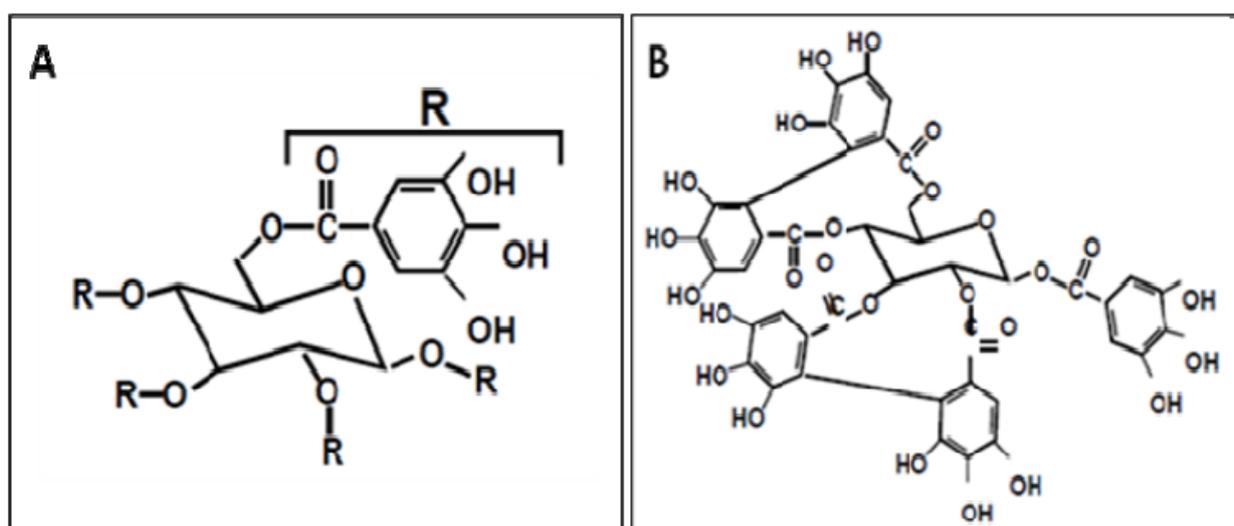
Os taninos são produtos naturais presentes em várias fontes renováveis, destacam-se em diferentes espécies vegetais, pelas aplicações industriais no curtimento de couro, na fabricação de adesivos e às propriedades farmacológicas. São polifenóis, em razão da grande quantidade de anéis fenólicos presentes em sua estrutura, com massa molecular variando entre 500 a 3000 g/mol

aproximadamente. Os taninos são classificados quimicamente em taninos hidrolisáveis e taninos condensados (MORI et al, 2001; LOPES et al., 2003; VIEIRA, LELIS, RODRIGUES, 2014).

Os taninos hidrolisáveis são divididos em galotaninos e elagitaninos. Os galotaninos são caracterizados pela presença de várias moléculas de ácidos orgânicos, tais como gálico e digálico, esterificados a uma molécula de glicose. Os elagitaninos são compostos por unidades de ácidos elágico ligadas a glicosídeos, sendo facilmente hidrolisados por ácidos ou enzimas em suas unidades monoméricas (MELLO, 2012). A figura 2, apresenta a estrutura molecular dos galotaninos e dos elagitaninos.

Figura 2- Estrutura molecular dos galotaninos (A) e dos elagitaninos (B)

Fonte: BATTESTIN et al., 2004



Os taninos são encontrados principalmente em espécies gimnospermas e angiospermas. São encontrados em cascas, troncos, raízes sementes e seiva. Fazem parte do metabolismo secundário das plantas e após a lignina é o grupo mais abundante de compostos fenólicos nos vegetais. A literatura reporta que o acúmulo de taninos pelas plantas protege partes vulneráveis do ataque microbiano, inativando vírus e enzimas invasivas secretadas pelos micro-organismos (BHAT et al, 1998; NOZELLA, 2001; COSTA, 2012).

Os taninos vegetais eram utilizados antigamente no curtimento de peles de animais, atualmente no aproveitamento de sua capacidade de complexação e polimerização com proteínas, na estabilização da cerveja, na qual se utiliza o ácido tânico para reduzir a concentração proteica através da precipitação e formação de complexos tanino-proteicos que são retirados da bebida por centrifugação e filtração (BATTESTIN et al, 2004; PAES et al., 2006; SOUSA, 2013).

3.4 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Na fermentação submersa, o crescimento do micro-organismo ocorre em uma suspensão de meio líquido, no qual vários nutrientes são dissolvidos. Os processos submersos são aqueles em que o micro-organismo, ou mesmo outras células, desenvolvem-se em meio de cultura com excesso de água sob agitação. As fermentações são conduzidas em biorreatores agitados mecanicamente, com volumes que podem chegar a 1000 m³ (FAHEINA JUNIOR, 2012)

A produção de tanase tem sido estudada neste tipo de fermentação por ser muito utilizada na produção de enzimas microbianas, devido à facilidade de crescimento dos micro-organismos e do controle de diferentes parâmetros, tais como pH, temperatura, aeração e umidade, além de tornar fácil a recuperação das enzimas extracelulares e a determinação da biomassa (BANERJEE; MONDAL; PATI, 2007; SOUZA et al, 2010; OLIVEIRA; WATANABE; RODRIGUES, 2011; ORLANDELLI et al, 2012). A figura 3 demonstra o processo simplificado de fermentação submersa em fluxograma.

Figura 3 - Fluxograma simplificado da produção de enzimas microbianas utilizando o processo de fermentação submersa

Fonte: Adaptado de Sant'Anna Junior (2001)



Dentre um grande número de micro-organismos não patogênicos capazes de produzir enzimas, os fungos filamentosos se destacam devido à sua facilidade de cultivo, por secretarem suas enzimas diretamente no meio em que se encontram, não necessitando de ruptura celular para sua liberação (GUIMARÃES et al, 2006; STROPARO et al, 2012).

Os fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* são classificados como GRAS (Generally Recognized as Safe) devido à sua baixa toxicidade (GUIMARÃES et al, 2010). Além desta característica desejável para aplicação na indústria alimentícia, esses fungos são produtores de uma grande variedade de substâncias bioativas e podem ser utilizados em bioprocessos para produção de enzimas hidrolíticas (VARGA et al, 2007; TAVARES et al, 2012).

3.5 MICRO- ORGANISMOS PRODUTORES DE TANASE

Na segunda metade do século XX presenciou expansão de conhecimento sobre utilização de micro-organismos e os seus produtos metabólicos, as enzimas, em diversas áreas da pesquisa. Dentre os micro-organismos com potencial para aplicações biotecnológicas são os fungos que despertam grande interesse, devido à grande diversidade de enzimas que secretam no ambiente, sendo responsáveis pela deterioração de matéria orgânica de forma geral. Esses micro-organismos desempenham um importante papel na natureza por sua capacidade de ciclagem de nutrientes, decompondo resíduos lignocelulósicos (BENNET, 1998; BEG et al, 2001; MENEZES et al, 2014).

A variedade de micro-organismos capaz de produzir enzimas através da fermentação, em condições experimentais definidas, na maioria dos casos somado aos custos associado ao meio de cultivo inviabiliza a transposição do processo para escala industrial. O potencial uso dos micro-organismos como fonte biotecnológica de enzimas para processos alimentícios tem estimulado o interesse na exploração da atividade enzimática extracelular. Entretanto os fungos exercem um importante papel no processo de bioconservação, podendo reduzir a quantidade de resíduos e minimizar a poluição, bem como, formar produtos de interesse industrial de alimentos, papel, fármacos, entre outros (CRUZ, 2012; JESUS et al, 2013).

Dentre as diversas fontes de enzimas, os micro-organismos compõem um dos maiores recursos genéticos disponíveis. Muitas espécies tem sido alvo para investigação da potencialidade industrial, principalmente como fontes enzimas (OYELEKE et al, 2010; OYELEKE et al, 2012) Os micro-organismos compreende a fonte mais importante para a obtenção da enzima tanase, isso porque podem ser cultivados em larga escala e um curto período de tempo, levando a produção de tanase em altas quantidades, continuamente. Bactérias, fungos e leveduras produzem esta enzima, entretanto os fungos filamentosos são os

mais citados como produtores dessa enzima, principalmente espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* (AGUILAR et al, 2007; COSTA, 2012).

3.5.1 GÊNERO *PENICILLIUM*

Link (1809) introduziu o nome genérico *Penicillium*, que significa "escova", o gênero *Penicillium* foi classificado como pertencente ao Filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Eurotomyces e ordem Eurotiales, pertencentes à família Trichocomanaceae, com sua fase teleomófica pertencente aos gêneros *Eupenicillium* ou *Talaromyces*. Apresenta-se como um grupo de fungos filamentosos, encontrados comumente na vegetação em decomposição no solo, ocorrendo numa grande variedade de habitats (no solo, no ar, ambientes interiores e vários produtos alimentares). Ele tem uma distribuição mundial e um grande impacto econômico sobre a vida humana. Sua principal função na natureza é a decomposição de materiais orgânicos, onde as espécies causam podridão devastadoras, como patógenos pré e pós-colheita nas culturas alimentares (SAMSON; FRISVAD, 2011).

Este gênero de fungos divide-se em quatro subgêneros: *Aspergilloides*, *Penicillium*, *Biverticillium* e *Furcatum*, os quais diferem entre si por meio de características como: o número de verticilos (pontos de ramificação) entre a fiálide e o estipe; forma e tamanho das fiálides; tamanho, cor e ornamentação dos conídios; textura do estipe, ramos e métulas (SERRA, 2005; DAMASCENO, 2012).

Fungos deste gênero são bastante conhecidos pela capacidade de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários biologicamente ativos, como por exemplo: alcalóides, terpenóides, peptídeos, e também enzimas extracelulares, bastante utilizadas nas indústrias. Como modelo em estudos básicos, pesquisas aplicadas têm demonstrado que este gênero possui enorme potencial biotecnológico. Algumas espécies podem ser utilizadas no biocontrole, parasitismo, fontes de enzimas, utilização de bioprodutos, novos fármacos em indústrias farmacêuticas bem como a utilização de seus metabólitos secundários em diversos outros segmentos industriais (PITT, 2002; FERRARONI; GRUMACH, 2006; SEMPERE; SANTAMARINA, 2010).

Algumas espécies também têm impactos positivos, com a indústria alimentícia explorando algumas espécies para a produção de queijos especiais, como o Camembert ou

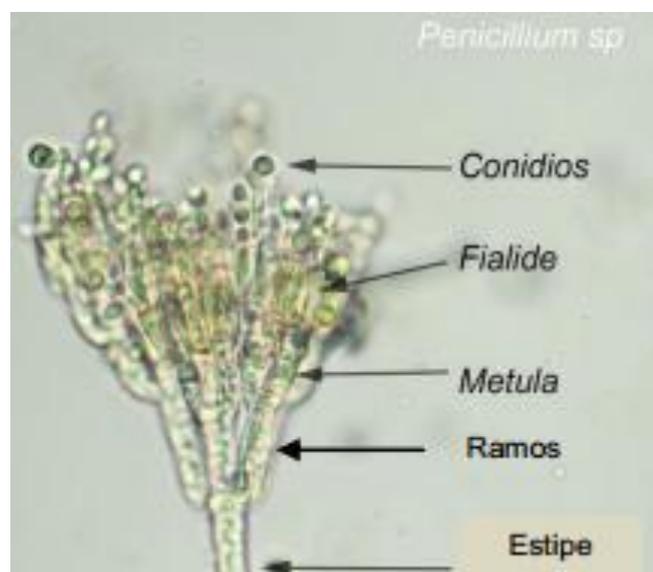
Roquefort (GIRAUD et al., 2010) e salsichas fermentadas (LUDEMANN et al., 2010). A sua capacidade de degradação resultou na espécie a ser rastreados para a produção de novas enzimas bastante utilizadas na indústria (TERRASAN et al, 2010).

Substâncias podem ser aplicadas em diversos setores da ciência, como o controle biológico, fonte de fármacos, antiparasíticos, antibióticos e imunossupressores. Como exemplo mais difundido desses antibióticos, tem-se, a penicilina, substância descoberta acidentalmente em 1928 por Alexander Fleming, a qual foi isolada do *Penicillium notatum*, possui importância para a indústria médica e farmacêutica, por causa de sua importante ação no combate a diversos agentes infecciosos (SARGO, 2010; PALLU, 2010; MONTEIRO, 2012).

Porém, algumas espécies desse gênero também são produtoras de micotoxinas. A importância desses compostos tóxicos varia muito, sendo regida pelos fatores ecológicos e biológicos para cada espécie. Várias espécies produzem toxinas potentes, mas como ambas são raras na natureza, as toxinas produzidas por essas espécies não são consideradas importantes. Com base nas características morfológicas, principalmente: os arranjos dos conidióforos, cor e ornamentação conídios, número de verticilos (pontos de ramificação) entre a fiálide (forma e tamanho) e o estipe (tamanho, textura e ramo). (PITT; HOCKING, 2000; SERRA, 2005; ALECRIM, 2014).

Figura 4 - Morfologia representativa do gênero *Penicillium* sp.

Fonte: MONTEIRO,2012

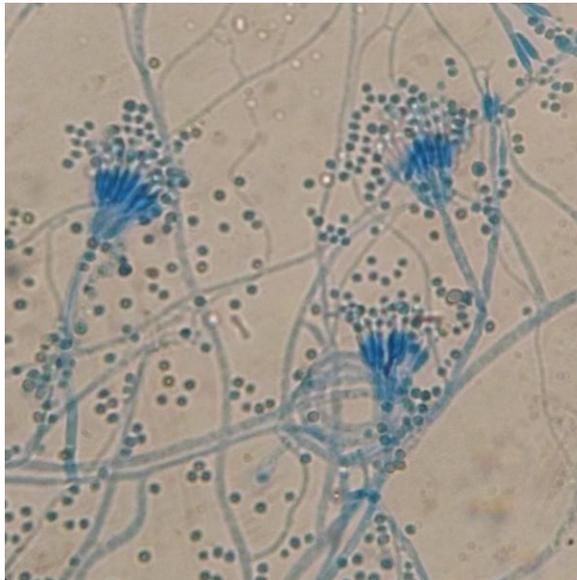


3.5.2 *Penicillium chrysogenum*

A espécie é um fungo filamentososo cosmopolita, habitando uma gama de habitats em solos, decomposição da vegetação, alimentos e ambientes interiores. Sua distribuição parece ser universal, em todas as regiões e climas biologicamente acessíveis (Pitt, 2000). Antes conhecido como *Penicillium notatum* (SAMSON et al, 1977).

O *Penicillium chrysogenum* é uma espécie facilmente reconhecível, apresenta colônia de crescimento rápido a 25°C, e em meio CYA (Czapeck Yeast Extract Agar) apresenta uma colônia colorida por conídios azul esverdeado, produção de exsudato amarelo e pigmento amarelo. Microscopicamente apresenta tipicamente conidióforos terverticilados, na minoria das vezes biverticilados, liso e delicado (PITT, 2000). A figura 5 apresenta a estrutura morfológica do fungo filamentososo *Penicillium chrysogenum*.

Figura 5 - *Penicillium chrysogenum*, presença de fialides, metulas e conidióforo.



Fonte: própria autoria

O micro-organismo é a fonte de vários antibióticos beta-lactâmicos, como a penicilina. Assim como outros metabolitos secundários, como roquefortina C, meleagrina, crisogina, xantocilinas, ácidos secalônicos, sorrentanona, sorbicilina, e toxina (HOOG et al., 2000).

3.6 CAATINGA

A caatinga possui um importante patrimônio biológico, abrigando um número considerável de espécies de animais e plantas endêmicas. A heterogeneidade ambiental da caatinga e a particularidade de seus ambientes permitem inferir que a fauna de invertebrados desse bioma seja riquíssima, com a ocorrência de várias espécies endêmicas. Entretanto, o aspecto que mais se destaca na análise dos dados sobre os invertebrados da caatinga é o conhecimento insuficiente que se tem das espécies deste táxon (SILVA et al, 2003; NASCIMENTO et al, 2014).

A caatinga é formada de florestas úmidas, montanhas e cerrados, onde a deciduidade das folhas é comum neste bioma. Obtendo-se assim uma enorme biodiversidade de organismos e micro-organismos. Os fungos filamentosos possuem um importante papel na ciclagem dos nutrientes acumulados na superfície do solo. Particularmente os fungos conidiais, estão entre os principais decompositores deste ambiente, o semiárido tropical representa aproximadamente 11% do território nacional, sendo a caatinga o bioma considerado mais representativo (GIONGO et al, 2012). A figura 6 apresenta o bioma Caatinga.

O bioma Caatinga, totalmente inserido no semiárido, é um bioma exclusivamente brasileiro. Caracteriza-se pelo clima quente, com menos de 1.000 mm de chuva por ano, distribuídos quase que completamente em períodos de três a seis meses. Devido a grande variação de chuva por ano, a vegetação neste bioma está submetida a uma deficiência hídrica sazonal, que ainda pode ser agravada por períodos de secas. Este bioma apresenta uma grande variedade de tipos de vegetação: Matas Úmidas, Matas Estacionais, Cerrados, Tabuleiros, Campos Rupestres e remanescentes de Mata Atlântica (SILVA, SANTA IZABEL, GUSMÃO, 2014).

Cobrindo 55% dos 1.548.672 km² da área da região Nordeste do Brasil, na porção semiárida, a caatinga envolve áreas dos estados do Ceará, do Rio Grande do Norte, da Paraíba, de Pernambuco, de Alagoas, de Sergipe, do Piauí, da Bahia e de Minas Gerais. Atualmente, ainda quase 40% da área original são recobertas de vegetação nativa (LEAL et al., 2005; SILVA; SAMPAIO, 2008). As ameaças à conservação da caatinga devem-se 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. Esse tipo de exploração em ambiente pouco

conhecido e complexo poderá levar o mesmo a um processo irreversível de degradação (SANTANA; SOUTO, 2006; JUNIOR et al, 2013).

Figura 6 - Caatinga de Pernambuco
Fonte: MELLO, 2012



O solo armazena organismos vivos e proporciona altas taxas metabólicas que ocorrem em seu interior, por existirem raízes e decomposição da matéria orgânica. É nesta região, a da rizosfera, onde existe maior atividade microbiana, em razão da presença de estúdios e secreções radiculares, que representam a maior parte do carbono disponível para os micro-organismos. Sem a influência das raízes e da atividade da biota que funcionam de forma simbiótica, o solo pode ser considerado oligotrófico ou relativamente pobre em fontes de carbono disponíveis (BARROS, 2012). Apesar das condições extremas, estudos comprovam que a caatinga é rica em espécies animais e vegetais, muitas das quais endêmicas, contradizendo a teoria de que esse bioma era improdutivo e pobre em diversidade (LEAL et al, 2005; MELLO et al, 2013).

A grande quantidade de matéria orgânica fornecida por vegetações da caatinga (folhas, cascas, galhos, flores e frutos) podem ser levadas para os ambientes aquáticos através de chuvas, ventos, escoamentos de águas superficiais e assoreamentos. Esse material é denominado alóctone sendo de extrema relevância para a vida dos organismos existente nesse

bioma, onde a biodiversidade dos fungos ali existentes, através da colonização e decomposição, os transformam em importante fonte de energia e de nutrientes. (VANNOTE et al, 1980; GOH; HYDE, 1996; WONG et al, 1998; BARLOCHER 2009; SILVA et al, 2014).

3.7 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Reduzir custos de produção tem sido uma das formas de ampliar o uso de enzimas em diversos segmentos industriais. A otimização da fermentação e do processo de produção, têm sido alvo de extensas pesquisas e, nesse sentido, a utilização de resíduos agroindustriais como substratos alternativos em processos fermentativos vem sendo estudado por diversos pesquisadores (SILVA et al, 2012).

A transformação de resíduos agroindustriais constituídos de cascas, caroços, pode ser um processo viabilizador propulsor, devido a praticidade de uso, redução da perecibilidade, além de ser uma opção que evita danos ao ambiente. Além disso, trabalhos tem demonstrado que os resíduos de frutos são ricos em compostos funcionais como os compostos capazes de degradar os radicais livres presentes nos organismos, podendo atuar como antioxidantes; as cascas e as sementes de certos frutos exibem atividade antioxidante mais elevada do que a polpa e o perfil dos fotoquímicos antioxidantes é diferenciado nestas partes do vegetal (CAETANO et al, 2009; PEREIRA, 2013).

O resíduo necessita de destino adequado, e sua disposição no meio ambiente, através de emissões de matéria e energia depositada na atmosfera, água ou solo deve ocorrer nos padrões da legislação ambiental. Cada país ou região possui um resíduo específico devido à sua atividade agrícola ou industrial. Os resíduos agroindustriais após o processamento de matérias-primas apresentam maior valor agregado, e pela vocação natural que o Brasil possui para sua geração acredita-se que o potencial de ganhos para o país seja de grandes proporções (PELIZER et al., 2007; CASTRO, 2010; STROPARO, 2012; GONZALES et al, 2013).

3.7.1 LARANJA PÊRA (*Citrus sinensis* L. Osbeck)

A laranja está entre as frutas mais produzidas e consumidas no mundo, sendo que sua produção ultrapassa as 80 milhões de toneladas/ano. A citricultura é uma das atividades

agrícolas que mais vem se desenvolvendo na região noroeste do Estado do Paraná, sendo produzidas mais de 200 mil toneladas anuais do produto. Em média, 34% da produção é transformada em suco, mas em grandes países produtores (Brasil e Estados Unidos), esta percentagem chega a 96%, o que gera grande quantidade de resíduos. Este material equivale a 50% do peso da fruta e tem uma umidade aproximada de 82% (ITAVO et al, 2000; IU et al, 2006; STHEL et al, 2014).

Atualmente o uso principal dos resíduos da laranja (figura 7), é como complemento para a ração animal, tendo boa aceitação por bovinos e caprinos. Algumas limitações fazem com que estes resíduos tenham uma utilização restrita, entre elas a grande quantidade de água que contêm o que acarreta problemas de coleta, transporte e armazenamento. Devido ao elevado custo de secagem, há interesse das empresas em desenvolver mercados para o bagaço cítrico úmido. Este interesse é maior, particularmente, para aquelas pequenas esmagadoras de laranja que produzem suco natural engarrafado ou para grandes empresas que não pretendem, em suas fábricas futuras, despendem o alto investimento necessário à secagem do bagaço de laranja (GONÇALVES et al, 2001; BENELLI, 2010; BASTOS et al, 2012; LIMA, 2014).

Vários estudos têm proposto outros usos para os resíduos da laranja, incluindo a obtenção de fertilizantes orgânicos, pectina, óleos essenciais, compostos com atividade antioxidante e várias enzimas, incluindo pectinases e amilases. Apesar de todas essas possibilidades, os resíduos das indústrias de suco de laranja permanecem em sua maior parte inutilizados (FARIAS et al, 2003; ALEXANDRINO et al, 2007; GOBBI et al, 2014).

Em 2007, a produção de laranja foi de 18.500.478 t e no ano de 2008 a safra ultrapassou 18.580.908 t. Dentre os estados brasileiros que mais se destacam na produção de cítricos estão São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Sergipe, Rio Grande do Sul, Paraná e Goiás. 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. 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 (SANTANA, 2005; GERHARDT et al, 2012; COSTA et al, 2014).

Figura 7 - Resíduo de casca de laranja

Fonte: <http://henriquetabosa.blogspot.com.br/2013/05/etanol-desenvolvido-partir-do-bagaco-da.html>

Os açúcares solúveis da casca de laranja são glicose, frutose e sacarose. Os polissacarídeos insolúveis da parede celular da casca de laranja são compostos de pectina, celulose e hemicelulose. A pectina e as hemiceluloses são ricas em ácido galacturônico, arabinose, galactose e pequenas quantidades de xilose, ramnose e glicose. Após a extração do suco, os resíduos sólidos da indústria da laranja, representados pelas cascas, sementes e polpas são geralmente transformados em farelo peletizado para ração animal. Dentre os despejos líquidos, a “água amarela” formada por proteínas, óleos essenciais, pectina, açúcares, ácidos orgânicos e sais, é o que mais preocupa, pelos seus altos índices de matéria orgânica, o que a torna um agente de alto potencial poluidor (DUARTE et al, 2011; TOZATTI et al, 2013; NEGREIROS et al, 2014).

Os subprodutos da indústria citrícola possuem valor comercial expressivo. Destacam-se os óleos essenciais da casca utilizados como insumos na indústria de alimentos, bebidas, cosméticos e perfumes; essências aromáticas obtidas na concentração do suco, farelo de polpa cítrica destinado à produção de ração e polpa de laranja utilizada pelas indústrias de alimentos e bebidas (FRATA, 2006; AULER et al, 2009; PEREIRA et al, 2014).

Na busca de soluções alternativas para o problema do descarte de resíduos, muitas indústrias têm optado pelo uso de microrganismos como agentes redutores de matéria orgânica desses materiais ou para eliminação ou redução de compostos tóxicos. Resíduos de agroindústrias como os das indústrias processadoras de sucos cítricos, têm sido utilizados

como substrato para a produção de pectinases fúngicas, metano e para adsorção de corantes residuais (FIORENTIN et al, 2010; SANTOS et al, 2011; ROSA, 2013).

Esses resíduos também possuem alto valor energético, e podem contribuir para reduzir a dependência de energia comprada para geração de calor, vapor ou eletricidade. Apesar da ampla possibilidade de utilização, existem poucos trabalhos na literatura referindo-se ao uso de resíduos da agroindústria da laranja para fins energéticos, quer na forma como são gerados ou após a sua transformação. Antes de serem utilizados na geração de energia térmica, os resíduos sólidos da laranja podem ser convertidos a carvão vegetal e aos subprodutos da carbonização, o que ampliaria seus usos e, ao mesmo tempo, facilitaria seu transporte, armazenamento e manuseio. (RODRIGUES, 2006; REZZADORI et al, 2009; MEDEIROS, 2014).

3.7.2 UVA (*Vitis labrusca* L.)

As videiras tornaram-se a cultura mais largamente cultivada no mundo com uma produção anual de aproximadamente 69 milhões de toneladas, levando a uva a ser uma das frutas de maior consumo, tanto *in natura* quanto na forma de suco. Seu valor nutricional é composta de baga (grão) de uva é geralmente formada por 6 a 12% de casca, 29% de semente e 85 a 92% de polpa, que constitui a principal parte da uva, formada 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 (SANTANA, 2005; VEDANA, 2008; NATIVIDADE, 2010; GRAEBIN, 2014).

Uvas contêm 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 (figura 8) ricas 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 (PINHEIRO et al, 2009; FERREIRA et al., 2012; ASSUNPÇÃO, 2014).

O resíduo obtido no processo de prensagem da uva é caracterizado com elevado potencial poluidor, cerca de 40% da uva processada é transformada em resíduo. Este resíduo constitui-se 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. O aproveitamento deste resíduo permite tornar mais viável o cultivo de uvas, sendo considerada uma fonte de renda extra, pois diminui o impacto ao ambiente pelo não descarte adequado (DEIANA et al, 2009; CHINAZZO, 2010; MOURA, 2014).

Figura 8 - Uva Isabel rica em taninos



Fonte: <https://www.embrapa.br/dia-de-campo-na-tv/2006>

Com o objetivo de contribuir para o avanço deste setor no Brasil, buscam-se formas de reaproveitar a biomassa residual gerada durante a produção de vinho e sucos de uvas. Alguns estudos têm sido realizados para a determinação da composição e a qualidade destes resíduos, pois estes variam de acordo com a espécie da uva e o tipo de cultivo (CATANEO et al, 2008; SANTOS et al, 2010; BRANDALISE, 2013; ROSSI, SANTOS, 2014).

3.7.3 CAFÉ (*Coffea arabica* L.)

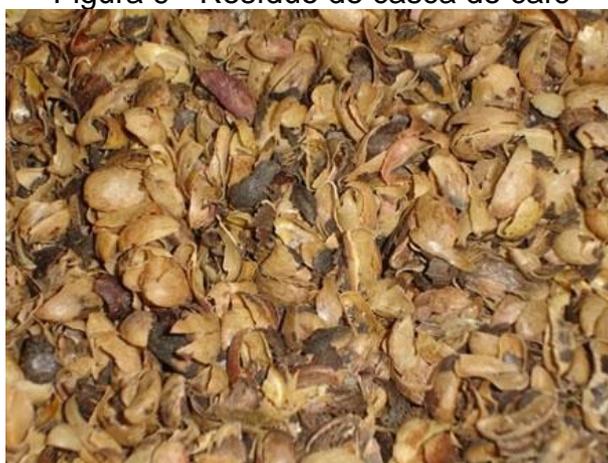
Nativo do continente africano, o café chegou ao Brasil em 1723 por meio de mudas oriundas da Guiana Francesa. No ano seguinte, foi introduzido no Maranhão onde se propagou, para os Estados vizinhos, em pequenas plantações, tendo atingindo a Bahia em 1773. Algumas sementes de café foram transportadas do Maranhão para o Rio de Janeiro onde se fomentou a ampliação da cultura na Serra do mar. O café tem absorvido grande parte

de mão de obra, tornando-se importante fonte de renda para a economia do país (ALONSO-SALCES et al, 2009; CARVALHO et al, 2008; VIEIRA, 2013; VEIGA, 2014).

A microbiota presente durante todas as etapas pré e pós-colheita do café é diversa, composta de bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Esses micro-organismos têm influência direta na qualidade da bebida de café, seja pela degradação de compostos presentes nos grãos ou pela excreção de metabólitos que difundem para o interior dos grãos. O conhecimento da microbiota do café, bem como o entendimento do seu papel no processo de fermentação dos frutos, é de grande importância, para se obter o produto final de qualidade (CHALFOUN, CARVALHO, 2000; VILELA, 2011; CRISÓSTOMO, 2014).

O café é um subproduto fibroso mucilaginoso com considerável quantidade de cafeína e taninos, o que o torna tóxico quando disposto na natureza na forma *in natura*, resultando em problemas de descarte. Tradicionalmente, a casca de café possui aplicações limitadas, sendo utilizada, especialmente, como fertilizantes, ração animal e biocomposto. No entanto, por apresentar altos teores de matéria orgânica e boa quantidade de açúcares fermentescíveis, sugere-se que a casca de café seja uma fonte de carbono alternativa e promissora para o cultivo de micro-organismos em diferentes bioprocessos industriais (SOCCOL, 2002; ROCHA, 2011; GUSMÃO et al, 2014).

Figura 9 - Resíduo de casca de café



Fonte:<http://m.cafepoint.com.br/mypoint/mobile/fotos.aspx?pg=225>

3.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: Tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, n.4, p.117-139, 2014.

AGUILAR CN, GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ G. Review: sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. **Food Sci Technol Int** 7:373–382, 2001.

AGUILAR, C.N, et al; Microbial tannases: Advances and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 76, no. 1, p. 47-59, 2007.

ALBAGLI, S. D. biodiversidade à biotecnologia: a nova fronteira da informação. **Ciência da Informação**, v. 27, n. 1, p. 7-10. 1998.

ALECRIM, M. M.; SOUZA, T. C. de; TEIXEIRA, M. F. S.; SILVA, T. Metabólitos produzidos por fungos do gênero *Penicillium* promovendo antagonismo frente à bactérias patogênicas, 62ª Reunião Anual da SBPC, **FAPEAM**, Universidade Federal do Amazonas. Disponível em <http://www.sbpnet.org.br/livro/62ra/resumos/resumos/3607.htm> (Acesso em: Junho de 2014).

ALEXANDRINO, A M; FARIA, H. G.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus*. **Revista Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 27(2): 364-368, abr.-jun. 2007

ALONSO-SALCES, R. M. et al. Botanical and geographical characterization of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*): chemometric evaluation of phenolic and methylxanthine contents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 10, p. 4224-4235, May 2009.

ASSUNPÇÃO, C. F. **Compostos bioativos em óleos e resíduos de sementes de uvas orgânicas e convencionais**. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal do Rio Grande do sul, 2014.

AULER, P. A. M.; FIORI-TUTIDA, A. C. G.; SCHOLZ, M. B. S. Qualidade industrial e maturação de frutos de laranja 'Valência' sobre seis porta-enxertos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 4, p. 1158-1167, 2009.

AVALLONE, S. et al. Involvement of pectinolytic microorganisms in coffee fermentation. **International Journal of Food Science and Technology**, Davis, v. 37, n. 2, p. 191-198, Feb. 2002.

BANERJEE, D; MONDAL, K.C; PATI, B.R. Tannase production by *Aspergillus aculeatus* DBF9 through solid-state fermentation. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, Budapest, v 54, n 2, p. 159-166. 2007.

BARATTO, C.M. et al. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas. **Evidência**, v. 11, n. 2, p.15-28, 2011.

BARLOCHER, F. Reproduction and dispersal in aquatic hyphomycetes. **Mycoscience** v. 50, p.3-8, 2009.

BARROS, R. P. Diversidade de fungos em um vertissolo com adição de vinhaça na cultura de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). **Revista Uniabeu**, Alagoas, v. 5, n. 10, p.181-195, 2012.

BASTOS, D. C.; PASSOS, O. S.; NASCIMENTO, F.S.S.; NASCIMENTO, S. S.; Caracterização físico-química de Frutos de Laranja no Vale do São Francisco. **XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura**. 2012.

BATTESTIN, V; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2008.

BENELLI, P. Agregação de valor ao bagaço de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) mediante obtenção de extratos bioativos através de diferentes técnicas de extração. (Dissertação) Mestrado em Engenharia de Alimentos- UFSC, Florianópolis, 233 p, 2010.

BHAT, T. K.; SINGH, B.; SHARMA, O. P. Microbial degradation of tannins: a current perspective. *Biodegradation*, Dordrecht, v. 9, n. 5, p. 343-357, 1998.

BRANDALISE, A. Vinícola gaúcha vai transformar resíduos da uva em energia. Disponível em: <<http://wp.clicrbs.com.br/campoelavouranagaucha/2011/12/02/vinicola-gaucha-vai-transformar-residuos-da-uva-em-energia/>> Acesso em: Setembro, 2013.

CAETANO, A. C. S.; MELO, E. A.; LIMA, V. L. G.; MACIEL, M. I. S.; ARAUJO, C.R. Extração de antioxidantes de resíduos agroindustriais de acerola. *Braz. J Food Technol*, v.12, n.2, p.155-160, 2009.

CARVALHO, C. H. S. et al. Cultivares de café arábica de porte baixo. **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília: EMBRAPA Café, p. 157-226, 2008.

CASTRO, A. M. PEREIRA J. N. Produção, Propriedades e Aplicação de Celulases na Hidrólise de Resíduos Agroindustriais. **Quim. Nova**, v.33, n.1, p.181-188, 2010.

CATANEO, C. B; CALIARI, V; GONZAGA, L. V; KUSKOSKI, E. M; FETT, R. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, p. 93-102, 2008.

CHALFOUN, S. M; CARVALHO, V. D. Efeito de micro-organismos na qualidade da bebida do café. **Informe Agropecuário**.v. 18, n.1. p. 21-26, 2000.

CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M. et al. Biotechnological advances and challenges of tannase: An Overview, **Food Bioprocess Technol.**, v.05, p.445-459, 2012.

CHINAZZO, I. R. **Influência da cultivar e do tipo de agricultura na concentração de compostos antioxidantes em óleos de semente de uva**. Trabalho de Conclusão. Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

COELHO, M.A.Z; LEITE, S.G.F; ROSA, M. F.; FURTADO, A. A. L. Aproveitamento de resíduos agroindustriais, produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **Boletim Cepa**. V.19.n.01. p. 33-42, 2001.

COLUCCI, M.G. Biotecnologia e sustentabilidade energética: Constituindo o diálogo pela sobrevivência comum. **Revista Jurídica**. Paraná, v. 1, n.30, p. 430-450, 2013.

CORAZZA, M.; RODRIGUES, D. G.; NOZAKI, J. Preparação e caracterização do vinho de laranja. **Quim. Nova**, v. 24, n. 4, p. 449-452, 2001.

COSTA, L. N. F.; MAGALHÃES, E. A.; MOTA, L. G. S. M.; ALMEIDA, L. M.; GUEDES, M. I. F.; MAGALHÃES, F. E. A. Bioprospecção de atividade lipolítica de fermentos biológicos comerciais (*Saccharomyces cerevisiae*). **Revista de Biologia e Farmácia**. v. 7, n. 1, 2012.

COSTA, N. R; CARVALHOS, M. P; BEM, E. A. D; DALCHIAVON, F. C; CALDAS, R. R. Produtividade de laranja correlacionada com atributos químicos do solo visando a zonas específicas de manejo. **Pesq. Agropec. Trop**. v. 44, n. 4, p. 391-398, 2014.

COSTA, P. N. D. Otimização da produção de tanase por *aspergillus sp.* Em fermentação em estado sólido (FES). Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, p. 99f, 2012.

CRISÓSTOMO, L. M. S. Efeitos de extratos de café na proteção contra oxidantes em *Saccharomyces cerevisiae*. (Dissertação) Curso de Nutrição Humana. Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde. 71 f, 2014.

CRUZ, S. M. **Imobilização de cal b em microrreatores**. Dissertação (Mestrado de Engenharia Química) Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, 69 f, 2012.

DAMASCENO, C. L. **Potencial de *Penicillium citrinum* para o controle de *Aspergillus niger*, agente causal da podridão vermelha do sisal**. 69 f. Monografia (Graduação no curso de Bacharel em Biologia). Universidade Federal do recôncavo da Bahia, 2012.

DASHTBAN, M, et al; Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 6, p. 578-595, 2009.

DEIANA, A. C.; SARDELLA, M. F.; SILVA, H.; AMAYA, A.; TANCREDI, N. Use of grape stalk, a waste of the viticulture industry, to obtain activated carbon. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, n. 1, p. 13-19, 2009.

DEMAIN, A. L.; ADRIO, J. L. Contributions of microorganisms to industrial biology. **Mol. Biotechnol.**, v.38, p.41-45, 2008.

DEMAIN, A.L, ELANDER, R.P, Os antibióticos beta-lactâmicos: passado, presente e futuro. **Antonie Van Leeuwenhoek**. n.75, p. 5-19, 1999.

DIAS, B. F. S. Convenção sobre a Diversidade Biológica - Ministério do Meio Ambiente (MMA) Brasília/DF, 2000.

DUARTE, T. F.; BRON, I. U.; RIBEIRO, R. V.; MACHADO, N.E.C.; MAZZAFERA, P.; SHIMIZU, M. M. Efeito da carga pendente na qualidade de frutos de laranja 'Valência'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, p.823-829, 2011.

ELLIAH, P, et al. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v.39, p. 525–528, 2004.

ESPOSITO, E; AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 2 ed. Caxias do Sul: Educs, 2010.

FAHEINA J. G. S. Produção de celulase por fermentação submersa utilizando microorganismos prospectados em coleções de culturas nacionais. Dissertação (Mestrado de Engenharia Química) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 75 f, 2012.

FARIAS, P. R. S. et al. Agricultura de precisão: mapeamento da produtividade em pomares cítricos usando geoestatística. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2, p. 235-241, 2003.

FARINAS, C. S.; SCARPELINI, L. M.; MIRANDA, E. A.; BERTUCCI NETO, V. Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanase and xylanase produced by solid

state fermentation of *Aspergillus niger*. **Brazilian Journal Chemical Engineering**, v. 28, n. 1, p. 17-26, 2011

FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B; MEIRA, J. A; RAMOS, L. P; MITCHELL, D. A; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, n. 1, p. 8-13, 2007

FERRARONI, N. R; GRUMACH, A. S. O papel da penicilina na medicina moderna. DST – **Jornal brasileiro Doenças Sexualmente Transmissíveis** 18(1): 7-13, SP, 2006.

FERREIRA, L. F. D; PIROZI, M. R. RAMOS, A. M. PEREIRA, J. A. M. Modelagem matemática da secagem em camada delgada de bagaço de uva fermentado. **Pesq. Agropec. Bras** v.47, n.6, p.855-862, 2012.

FIORENTIN, L. D; MENON, B. T; ALVES, J. A; BARROS, S. T. D; PEREIRA, N. C; MÓDENES, A. N. Determinação da cinética e das isotermas de secagem do bagaço da Laranja. **Acta Scientiarum. Technology**. v. 32, n. 2 p. 147-152, 2010

FRANÇA, T. C. C; ILHA, C. E. G. A biotecnologia e a guerra biológica. **Ciencia & Tecnologia**, v. 30, n. 02, p. 59-71. Rio de Janeiro, 2014.

FRATA, M. T. Sucos de laranja: abordagem química, física, sensorial e avaliação de embalagens. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, f.228, 2006.

FRISVAD, J. C. et al. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. **Stud Mycol**, v. 49, p. 201-241, 2004.

GERHARDT, C; WIEST, J. M; GIROLOMETTO, G; SILVA, M. A. S; WESCHENFELDER, S. Aproveitamento da casca de citros na perspectiva de alimentos: prospecção da atividade antibacteriana. **Braz J Food Technol**, v.1, n.1.p.1-17, 2012.

GIONGO, V. et al. Carbono no Sistema Solo-planta no Semiárido Brasileiro (Carbon in Soil Plant System of Brazilian Semiarid). **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 4, n. 6, p. 1233-1253, 2012.

GIRAUD, F, GIRAUD, T., AGUILETA, G., FOURNIER, E., SAMSON, R.A., Microsatellite loci to recognize species for the cheese starter and contaminating strains associated with cheese manufacturing. **International Journal of Food Microbiology** , v.137: 204–213, 2010.

GOBBI, K. F; ABRAHÃO, J. J. S; MOLETTA, J. L; SANTOS, T. M; BETT, V; LUGÃO, S. M. B. Desempenho e características de carcaça de tourinhos alimentados com dietas contendo silagem de bagaço de laranja substituindo a silagem de sorgo. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.** v.15, n.4, p.917-927, 2014.

GOH, T. K; HYDE, K. D. Biodiversity of freshwater fungi. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. V.17 p. 328-345, 1996.

GONÇALVES, A. Z. L. Produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos por fermentação em estado sólido utilizando resíduos sólidos agroindustriais, visando potencial aplicação na produção animal. Tese (Doutorado em Ciências biológicas (microbiologia aplicada) Instituto de Rio Claro – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita filho). São Paulo, f.135, 2010.

GONCALVES, H. B. et al; Characterization of a thermostable extracellular tannase produced under submerged fermentation by *Aspergillus ochraceus*. **Electron. J. Biotechnol.**, Valparaíso, p.4-4, v. 15, n. 5,. 2012.

GONÇALVES, L. C.; FILIZOLA, R. G.; CONCEIÇÃO, M. L.; SILVA, C C. M.; ANDRADE, Yoná O.; Reciclagem das Cascas da Laranja Pêra na Produção de Suplemento Alimentar de Fibras Solúveis (PECTINA). **21º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, 2001.

GONZALES, ASTRIA DIAS FERRÃO et al. Desenvolvimento sustentável para o resgate da cultura do cacau baseado no aproveitamento de resíduos. **Interfaces Científicas -saúde e Ambiente**, Aracaju Se, v. 1, n. 2, p.41-52, 2013.

GRAEBIN, N.G. **Recuperação de compostos bioativos de bagaço de uva por cultivos fúngicos em estado sólido comparado ao método de extração sólido-líquido**. 73 f. Dissertação (Mestrado Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

GUIMARÃES, L. H. S, et al; Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.37, n. 4, p. 474-480, 2006.

GUSMÃO, R. O; FERRAZ, M. L; RÊGO, A. P. B; ASSIS, F. G.V; LEA, V. L. Produção de enzimas por *Aspergillus* spp. sob fermentação em estado sólido em casca de café. **Scientia Plena**. v.10,n.11, p. 1-11, 2014.

ÍTAVO, L. C. V.; SANTOS, G. T.; JOBIM, C. C.; VOLTOLINI, T. V.; BORTOLASSI, J. R.; FERREIRA, C. C. B. Substituição da silagem de milho pela silagem do bagaço de laranja na alimentação de vacas leiteiras: consumo, produção e qualidade do leite. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 29, n. 5, p. 1498-1503, 2000.

ÍTAVO, L. C. V.; SANTOS, G. T.; JOBIM, C. C.; VOLTOLINI, T. V.; BORTOLASSI, J. R.; FERREIRA, C. C. B. Aditivos na conservação do bagaço de laranja in natura na forma de silagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.5, p.1474-1484, 2000.

IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization — Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v.43, p. 1019- 1032, 2008.

JESUS, J. G. R; LESSA, G. S; RODRIGUES, T. B; FERRÃO-GONZALES, A. D; FREIRE, E; HANNA, S. A; MOREAU, V. H. Seleção e identificação de micro-organismos produtores de amilases isolados da microbiota associada a resíduos agrícolas de cacau e dendê. **Diálogos & Ciência**, Salvador Bahia, n. 33, p.08-12, 2013.

JOHANNES, T. W.; ZHAO, H. Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. **Current Opinion of Microbiology**, v.9, p. 261-267, 2006.

LIMA, J. S.; CRUZ, R; FONSECA, J. C; MEDEIROS, E. V; MARCIEL, H. C; MOREIRA, K, A; MOTTA, C.M.S. Production, Characterization of tannase from *Penicillium montanese* URM 6286 under SSF Using Agroindustrial Waster, and Application in the Clarification of Grape juice (*Vitis vinifera* L.) **The Scientific World Journal**. v.1.n.9, p. 1-10, 20014

KUNISAWA, V. Y. M. Os Transgênicos e as Patentes em Biotecnologia. **Revista da ABPI**, n. 70, p.40, São Paulo 2004.

LEAL, I. R. TABARELLI, M. S, J. M. C. **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife, Editora Universitária da UFPE. p. 822f, 2005.

LEITE, D. S; MUNHOZ, L. L. Biotecnologia e melhoramento das variedades de vegetais: cultivares e transgênicos. **Veredas do Direito**, v.10, n.19, p.23-44. 2013.

LIMA, B. F; AMORIM, H. S; NASCIMENTO, A. E; TAKAKI, G.M. C; SILVA, C. A. A. S. Seleção de meios de produção de lipase por amostra de *Aspergillus sp* isoladas da caatinga de Pernambuco. **Revista Exacta**, v. 7, n.1, p 147-157, 2014.

LIMA, H. C. H. **Estudo do efeito de adsorvente alternativo de casca de laranja pera rio (*Citrus sinensis l. osbeck*) na adsorção de corante têxtil vermelho reativo bf-4g.** (Dissertação) Graduação em Bacharel em Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 55 f. 2014.

LINK, H. F., - Observationes in ordines plantarum naturales. Dissertatio prima. - Mag. Ges. naturf. Freunde Berl. 3: 3-42, 1809.

LIU, Y.; SHI, J.; LANGRISH, T. A. G. Water-based extraction of pectin from flavedo and albedo of orange peels. **Chemical Engineering Journal**. .203–209, 2006.

LOPES, G. C; NAKAMURA, C. V; DIAS FILHO, B. P; MELLO, J. C. P. Estudo físico-químico, químico e biológico de extrato das cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 14, p. 24-27, 2003.

LOUSADA, Jr., J. E. et al. Consumo e digestibilidade aparente de sub-produtos do processamento de frutas em ovinos. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 34, n. 2, p. 591-601, 2005.

LUDEMANN, V; GRECO, M; RODRÍGUEZ, M. P., et al.; Conidial production by *Penicillium nalgiovense* for use as starter cultures in dry fermented sausages by solid state fermentation. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, p.315–318, 2010.

MEDEIROS, A. M. **Determinação de sólidos solúveis totais em sucos de laranja comerciais utilizando espectroscopia e calibração multivariada.** (Monografia) Graduação do curso de Química Industrial. Universidade Estadual da Paraíba 39 f. 2014.

MELLO, C. M. A. M; SILVA, I. R.; PONTES, J. S; GOTO, B. T; SILVA, G. A. S; MAIA, L. C. Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em área de Caatinga, PE, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 26, n. 4, p. 938-942, 2013.

MELO, A. G. D. **PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA TANASE DE ASPERGILLUS SP. GM4 EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA.** LAVRAS. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Lavras, 67f, 2013.

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 dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado – (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Dissertação, Lavras, 76 p. 2012.

MORI, F. A.; MORI, C. L. S. O; MENDES, L. M.; SILVA, J. R. M.; MELO, V. M. Influência do sulfito e hidróxido de sódio na quantificação em taninos da casca de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 10, n. 1, p. 86-92, 2003.

MOURA, C. **Avaliação da atividade antioxidante de extratos etanólicos de resíduos provenientes da fabricação de vinho.** Trabalho de Conclusão de Graduação em Bacharel em Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2014.

MOURA, L. F. W. G; OLIVEIRA, M. V; LÔ, M. M; MOTA, J. G. S. M; MAGALHÃES, E. A; LIMA, .M. C. L; MAGALHÃES, F. E. A. Bioprospecção de atividade lipolítica de fungos anemófilos isolados do centro vocacional tecnológico. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande PB, v. 15, n. 02, p.157-165, 2013.

MUSLIM, S. N; MAHAMMED, A. N; MUSAFER, H. K. I. Detection of the Optimal Conditions for Tannase Productivity and Activity by *Erwinia Carotovora*. **Journal of Medical and Bioengineering Vol**, v. 4, n. 3, 2015.

NASCIMENTO, E, AMBROGI, B., SOUTO, L. S., VILAS-BÔAS, M., & UCHÔA, M. Efeito do Envelhecimento de Isca na Captura de Moscas (Diptera: Brachycera) em Área de Caatinga. **EntomoBrasilis**,v. 7, n.1, 2014.

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. **Exacta** v.7, n.1, p.95-103, 2014.

NEGREIROS, J. R. S; NETO, R. C. A; MIQUELONI, D. P; LESSAL. S. Estimativa de repetibilidade para caracteres de qualidade de frutos de laranja doce. **Pesq. agropec. Brás.** v.49, n.1, p.40-48, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica** v.4. p. 64, New York: Freeman and Company, 2006.

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

OLIVEIRA, A. C. D; WATANABE, F. M. F; RODRIGUES, M. L. F. Comparação entre fermentação no estado sólido e fermentação submersa para produção de α -amilases por *Penicillium* sp. e caracterização da enzima. **Biociências, Biotecnologia e Saúde**, Paraná, n. 1, p.01-12, 2011.

ORLANDELLI, R. C; SPECIAN, V; FELBER, C. A; ALENCAR, J. P. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **Sabios: Rev. Saúde e Bio**, v.7, n. 3, p.97-109, 2012.

OYELEKE, S. B; EGWIM, E. C; OYEWOLE, O. A. Production of cellulase and protease from microorganisms isolated from gut of *Archachatina marginata* (Giant African Snail). **Science and Technology**, v. 2, n. 1, p. 15-20, 2012.

OYELEKE, S. B; EGWIM, E. C; AUTA, S. H. Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* strains for extracellular protease enzyme production. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**. v. 2, n. 7, p. 83-87, 2010.

PADILHA, G. S; FERREIRA, J. F; CASTIGLIONI G. L. Avaliação da lipase extracelular de *Pseudomonas cepacia* para purificação em sistema bifásico aquoso. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas SP, v. 1, n. 31, p.16-22, 2011.

PALLU, A. P. S. Potencial biotecnológico de fungos do gênero e interação com cana-de-açúcar. 2010.129 p. Tese (Doutorado em Ciências) – 68p Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2010.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.3636, p.1-4, 2002.

PARK, Y. S; KANG, S. W; LEE, J. S; HONG, S. I. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. **Applied Microbiology And Biotechnology**, Seoul Korea, v. 58, n. 6, p.761-766, 22 jan. 2002.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de Resíduos Agro-Industriais em Processos Biotecnológicos como Perspectiva de Redução do Impacto Ambiental. **Journal of Technology Management & Innovatium**, v.2, 2007.

PEREIRA, E. B. **Enzimas e suas aplicações cinéticas enzimáticas**. Monografia (Graduação no Curso de Engenharia de Alimentos) Departamento de Engenharia Química e Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 40f. 2011

PEREIRA, C. T. M. Obtenção, caracterização físico-química e avaliação da capacidade antioxidante in vitro da farinha de resíduo de acerola (*Malpighia glabra* L.). **Acta Tecnológica**, v. 8, n. 2, p. 50-56, 2014.

PEREIRA, G. S; MACHADO, F. L. C; COSTA, J. M. C. Aplicação de recobrimento prolonga a qualidade pós-colheita de laranja 'Valência Delta' durante armazenamento ambiente. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 3, p. 520-527, 2014.

PEREIRA, S. A; MARQUES, A. A; BARBALHO, C. R. S; MENDONÇA, M. S. Prospecção científica e tecnológica do gênero *Jatropha* (*euphorbiaceae*) com foco em biotecnologia. **Produção e Comunicação da Informação em CT&I**. Amazonas, v. 2, n. 8, p.01-08, 2014.

PINHEIRO, E. S; COSTA, J. M. C; CLEMENTE, E; MACHADO, P. H. S, MAIA, G. A. Estabilidade físico-química e mineral do suco de uva obtido por extração a vapor. **Revista Ciênc. Agron.** v. 40, n. 3, p. 373-380, 2009.

PITT, J. I. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Australia: Food **Science Australia a Joint Venture of CSIRO and AFISC**, 197 p, 2000.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and food spoilage. 2nd ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 540 p. 2002.

PRASAD, D. et al. Advances in production and characteristic features of microbial Tannases: an overview. **Current Trends In Biotechnology And Pharmacy**, v.6, n.2 p.145-165, 2012.

REINEHR, C. O; RIZZARDI, J; SILVA, M. F; OLIVEIRA, D; TREICHEL, H; COLLA, L. M. Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em relações de esterificação e alcoólise. **Química Nova**, v.37, n. 3, p. 454-460, Rio Grande do Sul, 2014.

RIBEIRO, B. D; CASTRO, A. M; SALGADO, A. M; COELHO, M. A. Z. Aplicação de Enzimas: Propostas para Disciplina Experimental. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, p.01-89, 2013.

ROBLEDO, A.; Ellagic acid production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of pomegranate residues. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 6, p. 507-513, 2008.

RODRIGUES, C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica**. 92 p. Dissertação (Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p. 92, 2006.

RODRÍGUEZ, H, et al; Characterization of Tannase activity in cell-free extracts of *Lactobacillus plantarum* CECT 748. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, n 1, p. 92-98, 2008.

ROMÃO, A. S; Análise da comunidade fúngica associada a cana de açúcar e estudo da interação *Trichoderma virens*- planta hospedeira. Tese (Doutorado em genética e melhoramento de plantas) - Escola superior de agricultura” Luiz de Queiroz” São Paulo 270 p, 2010.

ROSA, D. P. **Resíduo de Laranja- estudo da cinética de secagem das sementes e influência da temperatura na qualidade do óleo**. (Dissertação) Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal Paulista Júlio de Mesquita Filho. 127 f, 2013.

ROSSI, E, SANTOS, K. G; Óleo de uva para produção de biodiesel. **Revista Monografias Ambientais**. v. 14, n. 2. p. 3139-3145, 2014.

ROSTAGNO, H. S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição dos alimentos e exigências nutricionais** 3.ed. Viçosa: UFV, p. 252, 2011.

SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. **Studies in Mycology** (Baarn) v.28. n.1 p. 46-54. 2011.

SANDHYA, C, et al; Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2689–2694, 2005.

SANTANA, M. F. S. Caracterização físico-química de fibra alimentar de laranja e maracujá. Tese de Doutorado. Faculdade Estadual de Engenharia de Alimentos, FEA - UNICAMP. Campinas, São Paulo, 2005.

SANTANA, M. T, A. **Caracterização físico-química e sensorial de frutos e vinhos da C.V. Patrícia (*Vitis labrusca L.*)** 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Alimentação) Universidade Federal de Lavras, 94 f, 2005.

SANTOS, A. A. O; SILVA, I.V.C; SANTOS, S. D.G; ALMEIDA, M. L; MARCELLINI, P. S; Elaboração de biscoitos de chocolate com substituição parcial da farinha de trigo por polvilho azedo e farinha de albedo de laranja. **Ciência Rural**. v. 41, n.3, p. 531-536, 2011.

SANTOS, B. Federalismo e desenvolvimento urbano. **UniFOA cadernos UniFOA**, ano II, n.3, Volta Redonda, 2007.

SANTOS, L. KOTOVICZ, V; BARANA, A. C. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de amiloglicosidase por *Aspergillus awamori*. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v. 6, n. 1, p.655-664, 2012.

SANTOS, T. C; ROCHA, T. J. O; OLIVEIRA, A. C; FILHO, G. A; FRANCO, M. *Aspergillus niger* como produtor de enzimas celulolíticas a partir farelo de cacau (*Theobroma cacao*). **Arq. Inst. Biol**, São Paulo, v. 80, n. 1, p.65-71, 2013.

SARGO, C. R; SILVA, J. V; SILVA, B. F; FILHO, E. R. Isolamento e Identificação de Metabólitos Secundários do fungo *Penicillium griseoroseum*. **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, 31a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010.

SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Mixed microbial fermentation s of chocolate and coffee. In: BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. (Ed.). *Yeasts in food*. Hamburg: Behr's Verlag. p. 426-459, 2003.

SEMPERE, F; SANTAMARINA, M.P. Study of the interactions between *Penicillium oxalicum* Currie & Thom and *Alternaria alternate*. **Keissler.Brazilian Journal of Microbiology**. Valencia – Espanha, 2010.

SERRA, R. **Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina** Tese de doutorado em Engenharia Química e Biológica. Universidade do Minho, 2005. Disponível em <<http://hdl.handle.net/1822/2579>> (Acesso em: junho de 2014).

SHARMA, L. AGARWAL AND R. K. SAXENA, “Purification, Immobilization and Characterization of Tannase from *Penicillium variable*,” *Bioresource Technology*, Vol. 99, No. 7, pp. 2544-2551, 2008,

SHARMA, R; CHISTIB, Y; BANERJEE, U. C. Production, Purification, Characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**. n.19.p.627-662, 2001.

SILVA, A. C. C; PRATA, A. P. N; SOUTO, L. S; MELLO, A. A. Aspectos de ecologia de paisagem e ameaças à biodiversidade em uma unidade de conservação na caatinga, em Sergipe. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.37, n.3, p.479-490, 2013.

SILVA, G. K. C; RAMALHO, S. A; GUALBERTO, N. C. Utilização de resíduo agroindustrial como matéria prima para a produção de ácido cítrico por *Kluyveromyces Marxianus* URM 4404. **Scientia Plena**. v. 8, n. 5, p.02-05, 2012.

SILVA, S. S; IZABEL, T. S. S; GUSMÃO, L. F. P. Fungos conidiais associados a substratos vegetais submersos em algumas áreas do bioma Caatinga. **Rodriguésia**. V. 65.n.2. p. 527-538, 2014.

SOCOL C, R. Resíduo de café: um substrato promissor para a produção industrial de bioprodutos com alto valor agregado. *Pesquisa dos cafés do Brasil*. Brasília: Embrapa, p.83-98, 2002.

SOUZA, P. M; MAGALHÃES, P. O., Application of microbial α -amylase in industry – a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v 41, p.850-861, 2010.

STHEL, M. S.; MUNIZ, E. P.; PROVETI, J. R. C.; PORTO, P. S. S. Secagem e extração de pectina do albedo da casca de laranja. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**. v.1, n.1, p. 1-6, 2014.

STROPARO, E. C; BEITEL, S. M; RESENDE, J. T. V; KNOB, A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2267-2278, 2012.

TAVARES, A. N. D; FONSECA, J. S; FONSECA, T. R. B; SOUZA, R. A. T; BARRONCAS, J. F; SILVA, T. A; TEIXEIRA, M. F. S. Extracellular Enzymes of Anamorphic Fungi Isolated from *Morinda citrifolia* L. **Biochemistry And Biotechnology Reports**, Manaus, v. 1, n. 2, p.01-06, 2012.

TAVARES, I.M C. **Produção e aplicação de extratos enzimáticos brutos produzidos em fermentação em sólido estado por aspergillus niger a partir de resíduos agroindustriais na extração de óleo essencial DECRÓTON GREWIOIDES**. Dissertação (Mestrado no Curso de Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga Bahia, 67f, 2013.

TERRASAN, C .R. F., TEMER, B, DUARTE, M. C. T., CARARMONA, E. C., Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. **Bioresource technology**, v. 101, n.11, 4139-4143, 2010.

TOZATTI, P; RIGO, M; MAZILE, J. R; BEZERRA, V; CÓRDOVA, K. R. V; TEIXEIRA, A. M. Utilização de Resíduo de Laranja na Elaboração de Biscoitos Tipo Cracker. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, Vol.15, nº 1, 2013.

VANNOTE, R. L; MINSHALL, W. G; CUMMINS, K. W.; SEDELL, J. R; CUSHING, C. E. The river continuum concept. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**. v. 37, n. 1 p. 30-37, 1980.

VARGA, J, et al; *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriata black *Aspergillus* species with world-wide distribution. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n.8, p.1925 – 1932, 2007.

VEDANA, M.I.S. **Efeito do processamento na atividade antioxidante da uva**. 88p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal do Paraná, 2008.

VEIGA, C.C; Encapsulamento de óleo de café em microcápsulas de gelatina/goma arábica reticuladas por transglutaminase. (Graduação) Curso de Tecnologia de Alimentos. Universidade Tecnológica do Paraná. 44 f. 2014.

VIEIRA, M. C; LELIS, R. C. C; RODRIGUES, N. D. Propriedades químicas de extratos tânicos da casca de *Pinus oocarpa* e avaliação de seu emprego como adesivo. **Cerne**. V. 20, n.01, p. 47-54, 2014.

VIEIRA, N. G; Identificação e Caracterização de genes órfãos (“no hits”) de café (*coffea* spp.) Dissertação. Curso de Biotecnologia Vegetal. Universidade Federal de Lavras, 130 f, 2013.

VILELA, D. M. **Seleção in vitro de culturas iniciadoras para fermentação de Frutos de café (coffea arabica l.) Processados via seca e semi-seca** Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

VILELA, M. D. Seleção in vitro de culturas iniciadoras para fermentação de frutos do café (*coffea arábica L.*) processados via seca e semi-seca.(Tese) Curso Ciências dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras. 80 f. 2011.

WONG, K. M. K; GOH, T. K; HODGKISS, I. J; HYDE, K. D. The role of fungi in freshwater ecosystems. **Biodiversity and conservation** V. 7, N. 11, P. 87-120, 1998.

YAO, J; GUO, G. S; REN, G. H; LIU, Y. H. Production, characterization and applications of tannase. **Journal of Molecular Catalysis b: Enzymatic**, v.10, p. 137-147, 2014.

CAPÍTULO II

Artigo: submetido à Revista E-xacta INSS: 1984-3151)



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

SELECTION AND IDENTIFICATION OF SAMPLES ISOLATED *PENICILLIUM* SSP OF PERNAMBUCO STATE FOR CAATINGA TO TANASE PRODUCTION BY SUBMERGED FERMENTATION USING DIFFERENT MEDIA OF PRODUCTION

**Claudia Maria Rocha Moura¹; Martinha Pereira dos Santos²; Adriana Ferreira de Souza³,
Marcos Antônio Cavalcanti Luna⁴, Galba Maria de Campos Takaki⁵; Carlos Alberto
Alves da Silva⁶**

- 1 Mestranda em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco. claudiarmoura13@gmail.com
- 2 Iniciação Científica PIBIC-CNPq Aluna de Engenharia Ambiental, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco. srtmartinhasantos@gmail.com
- 3 Mestranda do Programa em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco. adrife.souza@gmail.com
- 4 Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco. macluna@bol.com
- 5 Doutora em Microbiologia Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco. takaki@unicap.br
- 6 Doutor em Biotecnologia. Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco. calves@unicap.br

Recebido em: XX/XX/XXXX - Aprovado em: XX/XX/XXXX - Disponibilizado em: XX/XX/XXXX

RESUMO

*Estudos referentes a seleção de novos micro-organismos produtores de enzimas microbianas isolados de ambientes pouco estudados, têm despertado interesse nas últimas décadas, devido ao seu elevado potencial biotecnológico. A Caatinga é uma região brasileira que apresenta uma grande diversidade microbiana pouco explorada e estudada, e o potencial do uso desses micro-organismos como fonte biotecnológica para produção de compostos biotecnológicos de alto valor agregado, principalmente a produção de enzimas por processos biotecnológicos. O setor de produção de enzimas microbianas tem gerado um grande incentivo nas pesquisas e desenvolvimento tecnológico de processos fermentativos com novos micro-organismos produtores de enzimas microbianas, principalmente utilizando fungos filamentosos. O gênero *Penicillium* tem se destacado pela capacidade de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários biologicamente ativos. Foram realizados ensaios de detecção da tanase em meio sólido com 4 amostras de *Penicillium* isoladas da Caatinga de*

Pernambuco em diferentes temperaturas (28, 37, 45 e 50 °C). Os resultados obtidos evidenciaram que a amostra denominada SIS 25 apresentou o maior halo característico da enzima 4,5 mm na temperatura de 37 °C, durante 96 horas. Em seguida, foram feitos ensaios de identificação molecular e morfológica da amostra selecionada e realizados ensaios de produção da tanase por fermentação submersa utilizando 4 diferentes meios de produção, 150 rpm, 37°C, durante 168 horas, onde foram realizados ensaios de detecção do pH, biomassa microbiana e detecção enzimática. Os resultados obtidos evidenciaram que o melhor meio testado foi o meio denominado de 1 com a amostra SIS 25, obtendo uma produção 0,16 U/mL de tanase. O estudo de seleção de meios de produção de enzimas microbianas para a obtenção de novos meios com alto potencial biotecnológico, surge como um recurso necessário na produção de novos bioprodutos na escala industrial.

PALAVRAS-CHAVE: Seleção de Meios, *Penicillium*, enzimas microbianas

ABSTRACT

*Studies on the selection of new producers microorganisms isolated microbial enzymes little studied environments have attracted attention in recent decades, due to its high biotechnological potential. The Caatinga is a Brazilian region with a large microbial diversity little explored and studied, and the potential use of these microorganisms as biotechnological source for production of biotechnological compounds with high added value, mainly the production of enzymes for biotechnological processes. The microbial enzymes production sector has generated a great incentive in research and technological development of fermentation processes with new microorganisms producing microbial enzymes, mainly using filamentous fungi. The *Penicillium* genus has been highlighted by the ability to produce a wide variety of biologically active secondary metabolites. Tannase detection tests were carried out on solid medium with 4 samples of the isolated *Penicillium* Caatinga Pernambuco at different temperatures (28, 37, 45 and 50 °C). The results showed that the sample called SIS 25 had the highest characteristic halo of the enzyme 4,5 mm at a temperature of 37° C for 96 hours. Then, they were made morphological and molecular assays performed and the selected sample of tannase production by submerged fermentation tests using four different production media, 150 rpm, 37°C, for 168 hours, where the pH detection assays were performed biomass microbial and enzymatic detection. The results showed that the best way was tested medium called 1 with SIS 25 sample, obtaining a production 0.16 U / mL of tannase. The selection of study of microbial enzymes producing means for obtaining new media with high biotechnological potential arises as a necessary feature in the production of new bioproducts in industrial scale.*

KEY WORDS: media selection, *Penicillium*, microbial enzymes

1 INTRODUÇÃO

As enzimas microbianas são biomoléculas que apresentam uma série de vantagens quando comparadas as enzimas obtidas por via animal e/ou vegetal. Esse grupo de enzimas está relacionado diretamente à produção por via fermentativa e a sua utilização nos diversos setores industriais (HASAN, SHAH, HAMEED, 2006; SHARMA, RATHORE, SHARMA, 2013; KIELISZEK, MISIEWICZ, 2014; MAJID, 2015).

As enzimas microbianas, apresentam facilidade de manipulação por não depender de intempéries climáticas, uma vez que são produzidas em fermentadores onde as condições de cultivo são controladas. Ocorrendo uma redução do período de produção nos processos fermentativos, possibilidade

de aumento na escala de produção, utilização de métodos de purificação mais viáveis, além de uma elevada especificidade e estabilidade dos compostos após os processos de purificação (FARINAS, BULTER, ARNOLD, 2001; DHIMAN, SHARMA, BATTAN, 2008; KUMAR, SATYANARAYANA, 2009; DE SOUZA, OLIVEIRA, MAGALHÃES, 2010; HE *et al.*, 2013).

O crescente mercado industrial de produção enzimático tem aumentado nas últimas décadas, devido ao aumento no desenvolvimento de novas tecnologias relacionadas com a produção e aos novos campos de aplicação, pois o setor enzimático tem intensificado a quantidade de pesquisas no sentido de isolar novos micro-organismos com elevado potencial

biotecnológico para produção de compostos bioativos de alto valor comercial (LIMA *et al.*, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2014; MUNIZ *et al.*, 2014).

Tanino acil hidrolase (tanase, EC 3.1.1.20) é uma enzima extracelular que hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis com o ácido tânico, liberando glicose e ácido gálico. Quimicamente a tanase é uma glicoproteína esterase formada principalmente por moléculas de ácido gálico, esterase e depsidase, que podem ser separadas em duas esterases, onde uma esterase é um éster alifático, e a outra, uma depsidase que hidrolisa ligações depsídicas como o ácido m-digálico (BHAT, SINGH, SHARMA, 1998; AGUILAR *et al.*, 2007; BELLUR; MUGERAYA, 2011; PRASAD *et al.*, 2012).

A tanase é uma enzima extracelular produzida por diversos micro-organismos, como bactérias, leveduras e principalmente por fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, induzível, produzida na presença de ácido tânico (MONDAL, BANERJEE, PATI, 2000; PINTO *et al.*, 2001; ROBLEDO *et al.*, 2008; KUPPUSAMY, THANGAVELU, CHOKALINGAM, 2012; ZAKIPOUR-MOLKABADI *et al.*, 2013; JANA *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2014; DA COSTA *et al.*, 2014).

Quando produzida por fungos filamentosos utilizando o ácido tânico como indutor, apresenta um pH estável na faixa de 3.5 - 8.0 e um pH ótimo entre 5.0-6.0 (YAO *et al.*, 2014) apresentando uma temperatura de estabilidade entre 30-60°C, uma faixa ótima entre 30-40°C, ponto isoelétrico de 4.0-4.5 e massa molecular entre 180kDa e 300kDa. Estas propriedades dependem fortemente das condições de cultura e também do tipo de micro-organismo produtor (AGUILAR; GUTIÉRREZ SÁNCHEZ, 2001; BATTESTIN, MATSUDA, MACEDO, 2008; PARANTHAMAN *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2014).

A tanase apresenta inúmeras aplicações em diversos setores industriais: alimentos, farmacêuticos, químicos, produção de ração, de couro, de bebidas, de ácidos orgânicos, como o ácido gálico, etc. Na produção de bebidas, a tanase pode ser utilizada para reduzir a formação de turbidez dos componentes fenólicos. Na produção de ácido gálico, um importante intermediário na síntese da droga antibacteriana, trimetropim, usada na indústria farmacêutica. Entretanto seu alto custo de produção impede sua ampla utilização em outros setores industriais (LEKHA; LONSANE, 1994; AGUILAR *et al.*, 2007 MUGERAYA, 2011; NASCIMENTO *et al.*, 2014; YAO *et al.*, 2014).

O gênero *Penicillium* tem sido descrito na literatura como uma classe de fungos filamentosos de extrema importância biotecnológica, podendo ser encontrado na maioria dos ecossistemas existentes, pois participam de forma ativa nos ciclos biogeoquímicos, atuando na decomposição de matéria orgânica existente nesses ambientes e também pelo seu enorme potencial biotecnológico na produção de queijos, enzimas e antibióticos (LI, ZONG, 2010; NIGAM, 2013; VISAGIE *et al.*, 2014).

O trabalho realizado teve como objetivos a seleção de amostras de *Penicillium* spp. isolados do semi-árido do Estado de Pernambuco produtoras de tanase em meio sólido, a identificação molecular e morfológica das melhores amostras selecionadas e a produção da enzima por fermentação submersa em diferentes meios de produção.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismos

Foram utilizadas 4 isolados (SIS 24, 25, 26 e 27) de *Penicillium* spp, de amostras de solo da Caatinga do Estado de Pernambuco, presentes no banco de cultura da Universidade Católica de Pernambuco-Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e

Biocologia (NPCIAMB). As culturas foram mantidas em meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), com a seguinte composição: dextrose (40g/L), peptona (10g/L), Ágar (20g/L), água destilada 1000m/L pH 7,0 e suplementado com ácido tânico (0,2%) durante 96 horas, 28°C.

SELEÇÃO DE AMOSTRAS PRODUTORAS DE TANASE EM MEIO SÓLIDO

Para detecção da presença da enzima tanase em meio sólido, foi utilizada a metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis (1975). Foram preparadas placas contendo o meio de detecção da atividade da tanase (g/L): peptona (10g); glicose (40g); Agar (20g); água destilada (1.000 mL), ácido tânico 0,2%, pH 7.0.

O meio de cultura foi distribuído em placas de Petri e, após a solidificação, foi feito um poço no centro das placas, cujo diâmetro foi de 0,8cm. Foram preparadas suspensões esporícas na condição de 10^7 com as quatro amostras de *Penicillium* denominadas (SIS 24, 25, 26 e 27) e inoculados 100µL da suspensão nos poços. As placas foram incubadas em diferentes temperaturas (28°C, 37°C, 45°C e 50°C) durante 96 horas com acompanhamento diário.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A formação de halo característico ao redor do crescimento da colônia evidencia a produção da tanase, que corresponde à degradação do ácido tânico pelo micro-organismo testado.

IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

Para identificação da amostra selecionada como melhor produtora de tanase, foi utilizado o manual de identificação de *Penicillium* descrito por Pitt (2000).

A amostra foi inoculada nos seguintes meios de cultivo: Agar Czapek autolisado de levedura (CYA,) a

25°C e a 37°C e Extrato de Malte Ágar (MEA) a 25°, com a seguinte formulação CYA (Czapek concentrado 10mL, sacarose 30g, extrato de levedura 5g, K_2HPO_4 , 1g, Agar 20g e água destilada 1000mL), MEA (extrato de malte 20g, peptona 1g, glicose 20g, Agar 20g e água destilada 1000mL). Em seguida os meios foram ajustados ao pH 6 e autoclavados a 121°C por 15 minutos.

As inoculações foram feitas a partir de suspensões de esporos numa solução de ágar semi- sólido contendo 0,2% e 0,05% de Tween 80, utilizando uma micropipeta para inoculação em três pontos equidistantes. As amostras foram incubadas durante 7 dias nas temperaturas previamente descritas acima.

Após 7 dias, os diâmetros das colônias foram medidos, sendo observadas a textura da colônia, grau de esporulação, cor de conídios, textura e cor do micélio, a presença de cores de pigmentos e exsudato formado.

Para as observações microscópicas, foram preparadas lâminas entre 7 a 10 dias de crescimento da colônia, removendo o micélio das zonas onde as colônias adjacentes estão mais próximas, a partir da parte da colônia, a cor dos conídios estava começando a se desenvolver. As lâminas foram montadas com ácido láctico (85%) e gotas de etanol a 70% para lavar o excesso de conídios e para impedir bolhas de ar quando montados em ácido láctico.

Após o preparo de lâminas, foram observadas estruturas microscópicas, como tipo de ramificação, comprimento, largura e textura dos conidióforos, presença ou não de vesícula, comprimento, forma e diâmetro das métulas (se presentes) e as fiálides, diâmetro, forma e textura dos conídios e ascósporos (se presentes), forma e cor do cleistotécio/escleródios.

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS AMOSTRAS

Foram realizados ensaios de identificação molecular das amostras que apresentaram o maior halo de produção de tanase em meio sólido. Para obtenção de biomassa as amostras testadas foram cultivadas no meio de cultura Agar Batata Dextrose, e em seguida incubadas em estufas do tipo BOD a 28°C, com ausência de luminosidade.

Para identificação molecular, foram utilizados fragmentos do micélio com quatro dias de crescimento em meio Czapek líquido, em seguida transferidos para microtubos de extração contendo 800 µL do tampão de lise brometo de cetiltrimetilamônio a 2% (CTAB). Os tubos foram levados ao FastPrep® e agitados a velocidade de 5,5 m/s por 40 segundos para lise mecânica das células. Em seguida, os microtubos foram incubados ao banho-maria à 65°C por 40 min e centrifugados a 13.000 rpm por 10 min.

Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos de 1,5 mL e adicionados igual volume da solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1v/v) ao sobrenadante recuperado, em seguida homogeneizados e centrifugados a 13.000 rpm por 10 min. Ao término do processo de centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para outros microtubos e adicionados volumes iguais de isopropanol gelado e mantidos a -20 °C por 1h. Em seguida os microtubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 10 min. O DNA precipitado foi lavado com uma solução de etanol 70% e acrescentados 50µL de água ultrapura. A concentração final foi determinada usando o espectrofotômetro Nanodrop e o material armazenado foi mantido a -20°C até utilização.

A reação foi realizada em PCR para amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA utilizando um volume total de 50 µL, de tampão da Taq DNA polimerase 1X, 1,5 mM de MgCl₂; 0,4 µM de cada primer ITS1 (5' –

TCCGTAGGTGAACCTGCGG–3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), 0,2 mM de dNTPs, e 0,2 U de Taq DNA polimerase e 25 ng de DNA. A amplificação foi conduzida em termociclador programado para uma desnaturação inicial de 95°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação 95°C por 30s; anelamento a 62°C por 1min; extensão a 72°C por 2 min e extensão final a 72°C por 5 min.

O produto da PCR (fragmento de aproximadamente 950 pb) foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% a 4V.cm⁻¹, em tampão de corrida TAE 1X (pH 8,0), corado com *GelGreen*TM e foto documentado sob luz UV. Foi utilizado o marcador de peso molecular 1 kb (Fermentas®).

O produto de amplificação foi purificado com GeneJetTM – PCR Purification Kit – Fermentas e sequenciado no Laboratório Central da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os eletroferogramas foram editados utilizando-se o software Staden package para obtenção manual da sequência consenso.

Após a edição, a sequência obtida foi utilizada para busca das mais similares depositadas no GenBank, utilizando a ferramenta BLASTn. Os acessos que apresentaram a maior porcentagem de similaridade com a sequência em estudo, considerando a melhor combinação de “score” e “e-value” foram analisados.

SELEÇÃO DE MEIOS DE PRODUÇÃO

Após a seleção e identificação morfológica e molecular das melhores amostras produtoras de tanase (SIS 24 e 25), foram realizados ensaios de produção da enzima através de fermentação submersa, utilizando 4 meios de produção, com as seguintes composições:

Meio 1 (pH 5,7) - solução de sais (g/L): KH₂PO₄ (1,0); NH₄NO₃ (2,0); MgSO₄.7H₂O (0,2); CaCl₂.2H₂O (0,02);

MnCl₂.4H₂O (0,004); Na₂MoO₄.2H₂O (0,002); FeSO₄.7H₂O (0,0025), ácido tânico (10);

Meio 2 (pH 5,0) - solução de sais (g/L): NaNO₃, 6; KH₂PO₄, 1,52; KCl, 0,52; MgSO₄. 7H₂O, 0,52; FeSO₄. 7H₂O, 0,01; ZnSO₄. 7H₂O, 0,01; Acido tânico a 1%g/L;

Meio 3 (pH 4,5) - solução de sais (g/L): NaNO₃ (6); KH₂PO₄ (1,52); KCl (0,52); MgSO₄. 7H₂O (0,52); FeSO₄. 7H₂O (0,01); ZnSO₄. 7H₂O (0,01); Acido tânico (10); Cu(NO₃)₂. 3H₂O (0,01);

Meio 4 (pH 5,5) - solução de sais (g/L): NaH₂PO₄.2H₂O (1); KH₂PO₄ (2); CaCl₂ (0,025); MnSO₄. 7H₂O (0,015); FeSO₄. 7H₂O (0,005); ZnSO₄. 7H₂O (0,03); (NH₄)₂SO₄ (1); Ácido tânico (10); Frutose (1).

A produção da tanase foi realizada em shaker orbital utilizando Erlenmeyers de 250 mL, com volume útil de 125 mL (% p:v), 150 rpm e 37° C, durante 144 horas, com acompanhamento diário. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

PRÉ INÓCULO

A contagem do número de esporos e de células em suspensão foi realizada em câmara de Neubauer e microscópio binocular, utilizando-se volumes de 12,5 mL da suspensão, quantificados no valor de 10⁷ UFC/mL, em meio caldo Sabouraud.

DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA MICROBIANA

A biomassa foi determinada após o termino dos ensaios dos meios de produção. A massa micelial foi filtrada em papel de filtro e o material retido foi transferido para frascos previamente etiquetados e pesados. Em seguida destinados ao liofilizador para posterior quantificação da biomassa. O sobrenadante

denominado extrato enzimático foi utilizado para a determinação do pH e para a atividade enzimática.

DETERMINAÇÃO DO pH

Todas as amostras coletadas foram submetidas ao processo de leituras no potenciômetro para determinação do pH.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para a determinação da atividade enzimática da tanase nas amostras coletadas ao longo do processo de produção, foi utilizada a metodologia descrita por Mondal *et al.* (2001).

Foi preparada uma solução contendo 0,5 % (p/v) de ácido tânico em tampão acetato 0,2 M (pH 5,5) para detecção da enzima através de uma reação enzimática. A reação foi realizada a partir da adição de 0,3 mL da solução de substrato e de 0,5 mL de extrato enzimático bruto previamente obtido. As soluções obtidas foram incubadas a 60°C, durante 10 minutos.

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

A leitura foi realizada após 15 minutos de repouso do término da reação, em espectrofotômetro Biochrom S21, a um comprimento de onda de 530 nm.

A atividade enzimática foi calculada através da diferença da leitura de absorbância medida em 530 nm entre a amostra e o tubo controle. Uma unidade de atividade de tanase foi definida como a quantidade de ácido tânico hidrolisado por mL de enzima empregada por minuto de reação:

$$Abs_{530} = Abs_{controle} - Abs_{teste}$$

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

Foram realizados ensaios de detecção da atividade tanalítica em meio sólido, com quatro amostras isoladas da Caatinga de Pernambuco (SIS 24, 25, 26 e 27) através da metodologia de Hankin, Anagnostakis (1975).

Na Tabela 1 encontram-se os resultados obtidos nos ensaios de detecção da enzima em meio sólido. Verifica-se que nas temperaturas testadas de 45 e 50 °C não foram detectados a presença da formação dos halos característicos da enzima testada.

Tabela 1 – Ensaio de detecção da tanase em meio sólido utilizando diferentes amostras de *Penicillium* spp.

AMOSTRAS	Temperatura (°C)	24h	48h	72h	96h
SIS 24	28°C	-	2,0	2,5	3,0
	37°C	-	2,0	4,0	4,0
	45°C	-	-	-	-
	50°C	-	-	-	-
SIS 25	28°C	-	1,0	2,0	3,0
	37°C	-	1,5	3,0	4,5
	45°C	-	-	-	-
	50°C	-	-	-	-
SIS 26	28°C	-	1,0	1,5	2,0
	37°C	-	1,5	1,5	1,5
	45°C	-	-	-	-
	50°C	-	-	-	-
SIS 27	28°C	-	1,0	1,5	2,0
	37°C	-	-	-	-
	45°C	-	-	-	-
	50°C	-	-	-	-

(-) não detectada a presença da enzima testada

Para as temperaturas testadas de 28 e 37°C, verifica-se que nas primeiras 24 horas de ensaio, não foram detectados a formação de halos característicos nas 4 amostras testadas.

Os melhores resultados obtidos foram obtidos com 96h de ensaio, à 37°C, indicando que as amostras denominadas SIS 24 e 25, apresentaram os maiores halos característicos detectados, apresentando valores de 4,5 e 4,0 cms respectivamente (Figura 1).

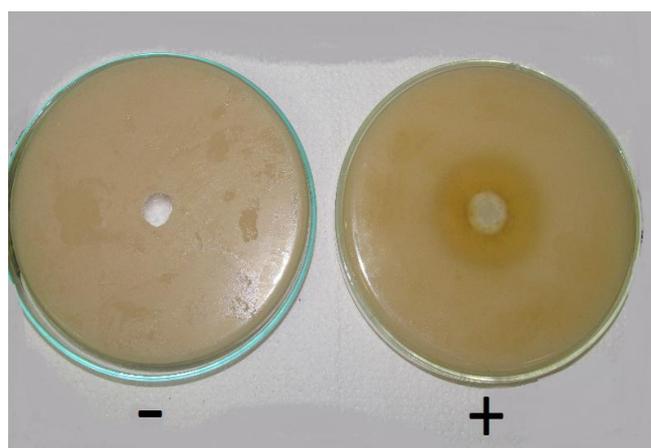


Figura 1 – Formação do halo característico da tanase na amostra SIS 25, 37°C, 96 h.

Os valores obtidos nos ensaios realizados são corroborados com os trabalhos realizados por Arruda et al., 2007, que estudaram linhagens de *Penicillium* na temperatura de 30°C, e obtiveram a presença de halos característicos de 5,0 cm.

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

A utilização de temperaturas acima dos 40°C para produção de tanase em meio sólido também são

corroborados com a literatura de acordo com estão demonstrados a ausência de formação do halo característico e a sua produção.

Colen (2006) descreve que alguns micro-organismos crescem em temperaturas entre 25-37°C e produzem metabólitos de interesse biotecnológico, e Costa (2012) descreve que a enzima tanase possui estabilidade de produção numa faixa de temperatura que varia de 30 a 60°C, porém sua melhor produção ocorre na faixa de 30 a 40°C.

De acordo com a literatura de PITT (2000) a morfologia das amostras de *Penicillium*, indicaram que a amostra denominada de SIS 25 apresentou a presença de fiáldes, métulas e conidióforo terveticilados, corroborando com os resultados obtidos posteriormente pela identificação Molecular.

Para a identificação molecular da sequência de nucleotídeos encontrada nas amostras testadas, foi comparada com as sequências depositadas no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information Website) utilizando o programa Blast para pesquisa da espécie. Com homologia de semelhança de 97%, onde a amostra SIS 24 foi identificada como *Talaromyces verruculosus* e a amostra SIS 25 foi identificada como *Penicillium chrysogenum*. (Figura 2).

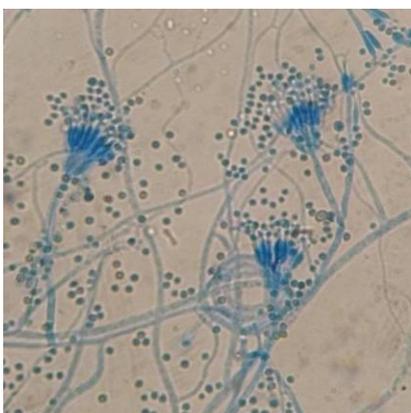


Figura 2 - Amostra SIS 25, identificada como *Penicillium chrysogenum*, presença de fiáldes, metulas e conidióforo.

Após a identificação da amostra que apresentou a maior produção enzimática em meio sólido, foram realizados os ensaios de produção da tanase em meio líquido, utilizando 4 diferentes meios através de fermentação submersa. Foram coletadas amostras a cada 24 horas durante 168 horas para determinação da curva de crescimento, biomassa, pH e atividade enzimática.

Os valores da curva de crescimento das amostras SIS 24 e SIS 25 estão descritas nas figuras 3 e 4, respectivamente.

Verifica-se que o maior crescimento obtido foi detectado no meio denominado de 1

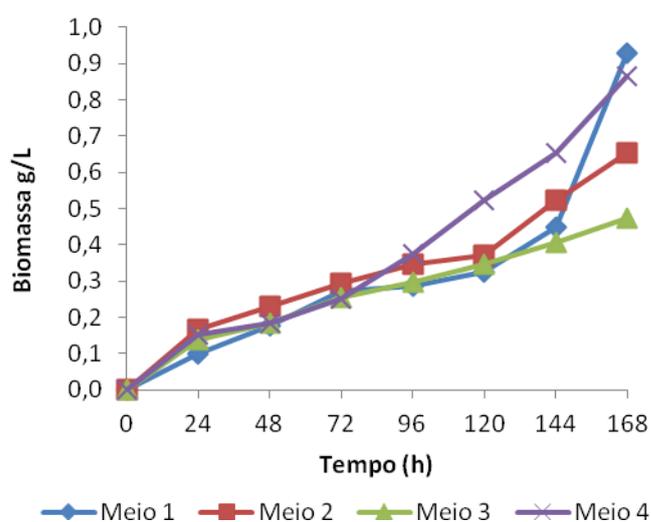


Figura 3 – Curva de crescimento da amostra SIS 24 em diferentes meios de produção. Dados: temp. 28°, 37°, 45° e 50°C; durante 7 dias.

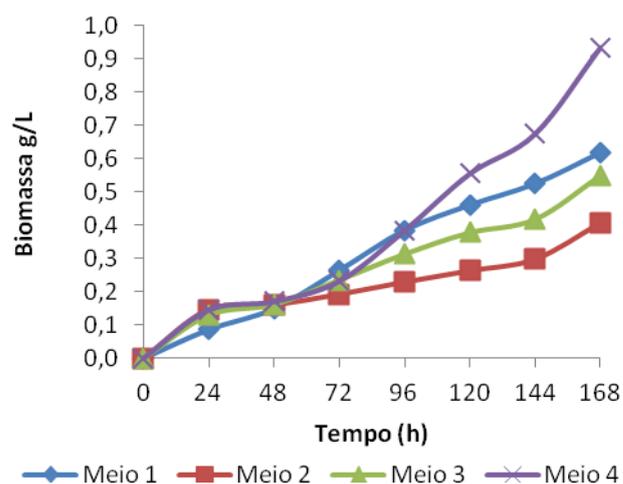


Figura 4 – Curva de crescimento da amostra SIS 25 em diferentes meios de produção. Dados: temp. 28°, 37°, 45° e 50°C; durante 7 dias.

Na tabela 2 estão descritos os valores das biomassas (g/L) obtidas nos 4 diferentes meios de produção da tanase, durante 168 horas. Verifica-se que nos meios 1 e 4, foi produzida a maior quantidade de biomassa dos processos de produção. A amostra denominada de SIS 24 produziu uma maior quantidade de biomassa no meio 1 com 166 horas de crescimento (0,928 g/L) e a amostra SIS 25 produziu no mesmo período uma quantidade de biomassa no meio 4 de 0,935 g/L

Tabela 2 – Determinação da biomassa das amostras SIS 24 e 25 em diferentes meios de produção

Tempo (h)	Meio 1		Meio 2		Meio 3		Meio 4	
	SIS 24	SIS 25						
0	-	-	-	-	-	-	-	-
24	0,01	0,09	0,17	0,15	0,14	0,13	0,15	0,15
48	0,18	0,16	0,23	0,16	0,18	0,16	0,19	0,17
72	0,27	0,27	0,30	0,19	0,25	0,27	0,25	0,23
96	0,29	0,39	0,35	0,23	0,30	0,31	0,37	0,39
120	0,33	0,46	0,37	0,26	0,34	0,38	0,52	0,56
144	0,45	0,53	0,52	0,30	0,40	0,42	0,65	0,68
166	0,93	0,62	0,66	0,41	0,47	0,55	0,86	0,94

Orlandelli (2012) cita que a presença de elementos minerais (fósforo, enxofre, potássio, cálcio, magnésio, sódio, ferro e cloro) e uma pequena quantidade de elementos traços, que desempenham importante papel como constituintes de enzimas e coenzimas (manganês, cobre, zinco, molibdênio, cromo, níquel, cobalto e boro), são geralmente necessários nos meios de produção de enzimas por micro-organismos, aumentando assim sua biomassa microbiana.

Os valores do pH obtidos durante os 4 ensaios de produção de tanase com a amostra SIS 24 estão

descritos na tabela 3, e com a amostra SIS 25 na tabela 4.

Tabela 3 – Determinação dos valores de pH nos meios testados da amostra SIS 24

pH	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
Meio 1	5,7	—	—	4,44	4,38	4,35	4,33	3,94
Meio 2	5,7	—	—	4,58	4,37	4,31	4,22	3,76
Meio 3	5,7	—	—	4,08	3,88	3,75	3,57	3,51
Meio 4	5,7	—	—	4,75	4,46	4,23	4,10	3,98

Verifica-se que os valores de pH iniciais dos 4 meios foram mantidos em 5,7, e após 72 horas houve uma pequena variação, porém ao término do processo de produção, todos os valores se mantiveram na faixa ácida.

Tabela 4 – Determinação dos valores de pH nos meios testados da amostra SIS 25

pH	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
Meio 1	5,7	—	—	3,91	3,69	3,87	3,79	3,19
Meio 2	5,7	—	—	4,01	3,87	4,88	3,90	3,50
Meio 3	5,7	—	—	4,05	3,87	3,77	3,45	3,42
Meio 4	5,7	—	—	4,34	4,34	4,31	4,08	3,98

Verifica-se nos valores apresentados na tabela 4, que após 72 h houve uma pequena variação nos valores de pH obtidos, porém como nos valores apresentados na tabela para a amostra SIS 24, os valores após 168 h de processo, terminaram na faixa ácida.

Nascimento et al (2014) descrevem que os valores de pH obtidos durante o processo de fermentações realizadas em vários meios demonstraram que o pH permaneceu na faixa ácida, corroborando com os resultados obtidos.

A atividade enzimática obtida nos ensaios de produção de tanase com diferentes meios com as

amostras SIS 24 e 25 estão descritos nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Determinação da atividade enzimática de tanase em diferentes meios da amostra SIS 24

Ativ.								
Enzim. (U/mL)	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
Meio 1	—	—	—	0,12	0,12	0,16	0,18	0,12
Meio 2	—	—	—	0,06	0,13	0,18	0,16	0,06
Meio 3	—	—	—	0,05	0,04	0,07	0,07	0,06
Meio 4	—	—	—	0,08	0,15	0,16	0,16	0,14

Verifica-se na tabela 5 que os valores obtidos na determinação da atividade da tanase produzida utilizando a amostra 24 que o meio 1, foram obtidos os maiores valores da atividade com 120 h (0,16 U/mL) e 144 h (0,18 U/mL).

Na tabela 6 estão descritos os valores obtidos na determinação da atividade da tanase produzida em diferentes meios utilizando a amostra 25. Verifica-se que no meio 1, foi obtido o maior valor da atividade com 96 h (0,16 U/mL).

Tabela 6 - Determinação da atividade enzimática de tanase em diferentes meios da amostra SIS 25

tanase. (U/mL)	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
Meio 1	—	—	—	0,08	0,16	0,16	0,11	0,09
Meio 2	—	—	—	0,10	0,11	0,13	0,13	0,14
Meio 3	—	—	—	0,06	0,07	0,08	0,08	0,09
Meio 4	—	—	—	0,06	0,11	0,13	0,14	0,12

De acordo com a literatura de AGUILAR et al, 2007 a máxima atividade da tanase é atingida após 3 dias de cultivo.

Nos estudos realizados por COSTA (2008) observa-se que os maiores níveis enzimáticos (0,185 U/mL) foram obtidos quando o pH inicial do meio de cultivo foi ajustado para 6,0. Entretanto foi observado também uma queda dos valores de pH ao longo dos dias de

cultivo provavelmente, isso se deve a produção de metabólitos ácidos.

Foi constatado ainda que, para tanases produzidas por *Aspergillus níger* em pH abaixo de 3,5 a enzima era considerada instável. No entanto, a hidrólise do substrato e a difusão da enzima no meio são melhoradas quando o micro-organismo é cultivado em valores de pH acima de 5,5. (COSTA, 2008).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo do potencial biotecnológico voltando para produção de enzimas em amostras de micro-organismos isoladas de ambientes pouco estudados como a região da Caatinga, tem apresentado bons resultados no sentido de isolar, identificar e testar o potencial biotecnológico dessas amostras, principalmente devido às características diferenciadas apresentadas pelos micro-organismos produtores isolados.

A tanase é uma enzima microbiana extremamente versátil em suas aplicabilidades nos diversos setores industriais existentes, porém sua produção torna-se cara principalmente devido aos componentes que fazem parte dos meios de produção. Os estudos envolvendo novas amostras produtoras e utilização de novos meios podem proporcionar uma alternativa viável e econômica a ser utilizada nas próximas pesquisas envolvendo a produção de substâncias bioativas produzidas por micro-organismos.

A amostra isolada e identificada como *Penicillium chrysogenum*, (SIS 24) são exemplo da habilidade de novas amostras isoladas em produzir biomoléculas em diferentes meios de produção.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Projeto SISBIOTA - CNPq, pelo suporte financeiro para realização desse trabalho, a plataforma de sequenciamento (LABCEN/CCB) da

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pela identificação molecular das amostras utilizadas nesse trabalho e ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) pela infraestrutura para execução de toda parte experimental.

5. REFERENCIAS

AGUILAR C. N, GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ G Review: sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. **Food Sci Technol Int** 7:373–382, 2001.

AGUILAR, C. N, et al; Microbial tannases: Advances and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 76, no. 1, p. 47-59, 2007.

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

BATTESTIN, V; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2008.

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

BHAT, T. K.; SINGH, B.; SHARMA, O. P. Microbial degradation of tannins: a current perspective. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 9, n. 5, p. 343-357, 1998.

BINOD, P., PALKHIWALA, P., PALKHIWALA, P., GAIKAIWARI, R., NAMPOOTHIRI, K.M., DUGGAL, A., DEY, K., PANDEY, A. Industrial enzymes- present status and future perspectives for India. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v.72, p.271-286, 2013.

BOTTCHER, D., BORNSCHEUER, U.T. Protein engineering of microbial enzymes. **Current Opinion in Microbiology**, v.13, n.3, p.274-282, 2010.

CAETANO, A. C. S; MELO, E. A; LIMA, V. L. G; MACIEL, M. I. S Extração de antioxidantes de resíduos agroindustriais de acerola. **Braz. J Food Technol**, v.12, n.2, p. 155-160, 2009.

CHERRY, J.R., FIDANTSEF, A.L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v.14, p. 438-443, 2003.

COSTA, A. M; KADOWAKI, M. K; MINOZZO, M. C. Production, purification and characterization of tannase

from *Aspergillus tamarii*. **African Journal of Biotechnology**, v.11, n.2, p.391-398, 2014.

SOUZA, P.M., OLIVEIRA E MAGALHÃES, P. Application of microbial alpha-amylase – A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, n.4, p.850-861, 2010.

DHIMAN, S. S., SHARMA, J., BATTAN, B. Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: a review. **BioResources**, v.3, n.4, p.1377-1402, 2008.

FARINAS, E.T., BULTER, T., ARNOLD, F.H. Directed enzyme evolution. **Current Opinion in Biotechnology**, v.12, n.6, p.545-551, 2001.

FERRARONI, N. R.; GRUMACH, A. S. O papel da Penicilina na medicina moderna. DST – **Jornal brasileiro Doenças Sexualmente Transmissíveis** 18(1): 7-13, SP, 2006.

GAVRILESCU, M., CHISTI, Y. Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology Advances**, v.23, p. 471–499, 2005.

GEORGE, D. S.; ONG, C. B. Improvement of tannase production under submerged fermentation by *Aspergillus niger* FBT1 isolated from a mangrove forest. **Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology**, v.94, n.4, p.451-456, 2013.

HAMDY, H. S.; FAWZY, E. M. Economic production of tannase by *Aspergillus niger* van tiegh adopting different fermentation protocols and possible applications. **Romanian Biotechnological Letters**, v.17, n.4, p.7441-7457, 2012.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKI, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v.67, p.597 – 607, 1979.

HASAN, F., SHAH, A. A., HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.235–251, 2006.

HE, Y; XIE, K; XU, P; HUANG, X; GU, W; ZHANG, F. Evolution of microbial community diversity and enzymatic activity during composting. **Research in Microbiology**, v.164, n.2, p. 189-198, 2013.

JANA, A; MAITY, C; HALDER, S. K; MONDAL, K. C; PATI, B. R. Enhanced tannase production by *Bacillus subtilis* PAB2 with concomitant antioxidant production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.2, n.4, p.363-371, 2013.

JANA, A; MAITY, C; HALDER, S. K; PATI, B. R. Rapid screening of tannase producing microbes by using natural tannin. **Brazilian Journal of Microbiology**, p.1080-1083, 2012.

KIELISZEK, M. MISIEWICZ, A. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. **Folia Microbiologica**, v.59, p.241–250, 2014.

- KUMAR, P., SATYANARAYANA, T. Microbial glucoamylases: characteristics and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.29, n.3, p.225—255, 2009.
- KUPPUSAMY, M., THANGAVELU, V., CHOKALINGAM, A. Optimization of submerged fermentative production of tannase by *Aspergillus flavus*. **International Journal of Chem. Tech. Research**, v.4, n.4, p. 1461-1467, 2012.
- LI, N., ZONG, M. H. Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.66, n.1, v.43-54, 2010.
- LIMA, B. F; AMORIM, H. S; NASCIMENTO, A. E; TAKAKI, G. M. C; SILVA, C. A. A. S. Seleção de meios de produção de lipase por amostras de *Aspergillus* sp isoladas da Caatinga de Pernambuco. **Revista e-xacta**, v.7, n.1, p.147-157, 2014.
- LONGO, M.A, SANROMÁN, M.A. Production of Food Aroma Compounds. **Food Technol. Biotechnol.** v.44, n.3, p.335-353, 2006.
- MAJID, F. A. A. Downstream Processing of Recombinant Enzymes for Commercialization. In: **Recombinant Enzymes-From Basic Science to Commercialization**.p. 115-127, 2015.
- MELO, A. G; PEDROSO, R.C.F; GUIMAR,L.H.S 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.
- MONDAL, K. C., BANERJEE, R., PATI, B. R. Tannase production by *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology Letters**, v.22, n.9, p.767-769, 2000.
- MUNIZ, M.C.S. et al. Seleção de amostras de *Aspergillus* isoladas da Caatinga de Pernambuco e Produção de ácido cítrico por fermentação submersa. **Revista e-xacta**, v.7, n.2, p.55-65, 2014.
- NASCIMENTO, E, AMBROGI, B., SOUTO, L. S., VILAS-BÔAS, M., & UCHÔA, M. Efeito do Envelhecimento de Isca na Captura de Moscas (Diptera: Brachycera) em Área de Caatinga. **EntomoBrasilis**, v. 7, n.1, 2014.
- NIGAM, P. S. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. **Biomolecules**, v.3, n.3, p.597-611, 2013.
- PARK, Y.S; KANG, S.W; LEE, J.S; HONG, S.I. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. **Applied Microbiology And Biotechnology**, Seoul Korea, v. 58, n. 6, p.761-766, 22 jan. 2002.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and food spoilage. 2nd ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 540 p. 2002.
- PINTO, G. A. S. COURI, S; LEITE, S. G. F; BRITO, E. S. Tanase: conceitos, produção e aplicação. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.23, n.2, p.439-462, 2005.
- PINTO, G.A.S; LEITE, S.G.F., TERZI, S.C., COURI, S. Selection of tannase producing *Aspergillus niger* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, n.1, p.24-26, 2001.
- PRASAD, D; GUPTA, R. K; MATHANGI, G; KAMINI, N. R. Advances in production and characteristic features of microbial tannases: an overview. **Current Trends In Biotechnology And Pharmacy**, v.6, n.2 p.145-165, 2012
- PRINZ, A., HONIG, J., SCHUTTMANN, I., ZORN, H., ZEINER, T. Separation and purification of laccases from two different fungi using aqueous two-phase extraction. **Process Biochemistry**, v.49, n.2, p. 335-346, 2014.
- ROBLEDO, A. AGUILERA-CARBÓ, A; RODRIGUEZ, R; MARTINEZ, J. L; GARZA, Y; AGUILAR, C. N. Ellagic acid production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of pomegranate residues. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 6, p. 507-513, 2008.
- SANTOS, T.C ROCHA, T. J. O; AC OLIVEIRA; ABREU FILHO, G; FRANCO, M. *Aspergillus niger* como produtor de enzimas celulolíticas a partir farelo de cacau (theobroma cacao). **Arq. Inst. Biol**, São Paulo, v. 80, n. 1, p.65-71, mar. 2013.
- SEMPERE, F.; SANTAMARINA, M.P. Study of the interactions between *Penicillium oxalicum* Currie & Thom and *Alternaria alternata* (fr.) **Keissler.Brazilian Journal of Microbiology**, ISSN 1517-8382, Valencia – Espanha, 2010.
- SHARMA, N., RATHORE, M., SHARMA, M. Microbial pectinase: sources, characterization and applications. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v.12, n.1, p. 45-60, 2013.
- SHARMA, R; CHISTIB, Y; BANERJEE, U.C. Production, Purification, Characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**. n. 19. p. 627-662, 2001.
- TAYLOR, M.J., RICHARDSON, T. Applications of microbial enzymes in food systems and in biotechnology. **Advances of Applied Microbiology**, v.25, p. 7-35, 1979.
- THAKUR, A., PAHWA, R., SINGH, S., GUPTA, R. Production, Purification, and Characterization of Polygalacturonase from *Mucor circinelloides* ITCC 6025. **Enzyme Research**, Article ID 170549, 7 p., 2010.

TORRES, E., BUSTOS-JAIME, I., LE BORGNE, S. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. **Applied Catalysis B: Environmental**, v.46, n.1, p.1-15, 2003.

VISAGIE, C. M. HOUBRAKEN, J., FRISVAD, J. C., HONG, S. B., KLAASSEN, C. H. W., PERRONE, G., SAMSON, R. A; Identification and nomenclature of the genus *Penicillium* **Studies in Mycology**, v.78, p.343-371, 2014.

ZAKIPOUR-MOLKABADI, E. ZAKIPOUR-MOLKABAD, E; HAMIDI-ESFAHANI, Z; ALI SAHARI, M; MOHAMMAD H. A. A new native source of tannase producer, *Penicillium* sp. EZ-ZH190: Characterization of the Enzyme. **Iran J Biotech**, v.11, n.4, p.244-250, 2013.

YAO, J; GUO, G. S; REN, G. H; LIU, Y.H. Production, characterization and applications of tannase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.101, p.137-147, 2014.

CAPÍTULO III

Artigo a ser submetido à Revista Engevista

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

INFLUÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NA FORMULAÇÃO DE MEIOS ALTERNATIVOS DE PRODUÇÃO DE TANASE POR *PENICILLIUM CHRYSOGENUM* ATRAVÉS DE UM PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO

*Cláudia Maria Rocha Moura*¹;

*Brindize Ferreira de Lima*¹;

*Jupiranan Ferreira da Silva*¹;

*Grayce Kelli Barbosa da Silva*²;

*Galba Maria de Campos Takaki*³

Carlos Alberto Alves da Silva;

3

1 – Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais; 2 - Doutorado em Ciências Biológicas **UFPE**. 3 – 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 utilização de resíduos agroindustriais na formulação de meios para produção de compostos biotecnologicamente ativos, tem sido uma alternativa viável, pois a maioria dos resíduos utilizados possuem uma elevada concentração de nutrientes que pode muitas vezes aumentar a produção da enzima estudada. Tanase é uma enzima produzida por diversos micro-organismos que possui uma grande aplicabilidade nas indústrias químicas e alimentícias. Foram realizados estudos para formulação de meios alternativos utilizando resíduos agroindustriais através de um planejamento fatorial completo de 2^3 , utilizando resíduos das cascas de café, uva e laranja, utilizando o *Penicillium chrysogenum* (SIS 25). Os experimentos foram realizados em shaker orbital à 37°C, 150 rpm e 144 horas. Foram realizadas detecções de pH, atividade enzimática, biomassa e curva de crescimento do micro-organismo. Os resultados evidenciaram que a melhor condição de produção foi no ensaio denominado 3, que apresentou um valor de pH 4,8, casca de café 5g, casca de uva 12g e resíduo de laranja 5g, obtendo assim uma atividade tanalítica de 0,210 U/mL. A utilização de resíduos agroindustriais surge como uma alternativa viável na elaboração de meios de produção de produtos biotecnológicos bioativos.

Abstract

The use of agricultural residues in the formulating media for producing biotechnologically active compounds, it has been a viable alternative because most of the residues have used a high concentration of nutrients can often increase the production of the enzyme studied. Tannase is an enzyme produced by various microorganisms which has a wide application in the chemical and food industries. Studies were conducted to formulate alternative means using agro-industrial wastes through a complete factorial design

of 2³, using the coffee husk waste, grape and orange, using *Penicillium chrysogenum* (SIS 25). The experiments were performed in orbital shaker 37°C, 150 rpm, 144 hours. Detections were carried pH, enzymatic, biomass and growth curve of the microorganism. The results showed that the best production condition was called in 3 trial, which showed a pH value of 4.8, coffee husk 5g, 12g grape skin and orange residue 5g, thereby obtaining a tanalytic activity of 0.210 U/mL The use of agro-industrial waste emerges as a viable alternative for the development of biotechnology products bioactive media of production.

1. Introdução

Dentre as diversas tecnologias a biotecnologia tem se destacado em diversos setores apresentando-se como a área de crescimento e desenvolvimento onde se avulta por utilizar micro-organismos vivos ou parte deles. Por ser uma área multidisciplinar, voltada tanto para agricultura, medicina e saúde, quanto para o meio ambiente, destas partem diversas linhas de serviços que se mostram viáveis e crescentes para o desenvolvimento como um todo (SILVEIRA; BORGES, 2004; SBARDELOTTO et al, 2013).

A biotecnologia em sua multidisciplinaridade e possibilidade de novos produtos e processos, mais eficientes e, muitas vezes, menos agressivos ao meio ambiente utiliza a obtenção de diversas substâncias por meio da manipulação de fungos para a obtenção de novas tecnologias como a produção de enzimas como sendo uma ferramenta promissora para a síntese de compostos de alto valor agregado (ASSAD, AUCÉLIO, 2004; FORTUIN, 2006; CHAGAS 2013; MATIAS, VIEIRA, FONTENELE, 2014).

Tanino acil hidrolase (EC 3.1.1.20) ou tanase é uma enzima que catalisa a quebra das ligações ésteres e depsídicas de taninos hidrolisáveis e éster de ácido gálico, é uma enzima extracelular produzida na presença de ácido tânico por fungos filamentosos, bactérias e leveduras, possui uma série de aplicações industriais incluindo a produção de ácido gálico, utilizado na indústria farmacêutica para produção de drogas antibacterianas, produção de chás instantâneos, clarificação de sucos, cervejas e processamento de vinhos na indústria de alimentos e no pré tratamento de rações animais tratamento de efluentes de curtume da indústria de couro (MACEDO, MATSUDA, BATTESTIN et al, 2005; MELO et al, 2014).

As tanases produzidas por fungo são glicoproteínas e apresentam estruturas protéicas com elevada massa molecular sendo produzidas na presença do ácido tânico que normalmente é o indutor, podendo estar presente na composição do meio de produção dessa enzima como única fonte de carbono estável em uma faixa de pH (3,5 a 8,0) sendo o pH ótimo na faixa de 5,5 a 6,0, com estabilidade na temperatura de 30 a 40°C. Entretanto, todas essas características

dependem das condições de cultivo e linhagem utilizada (PINTO et al, 2005; MUKHERJEE; BANERJEE, 2006; COSTA, 2012; NASCIMENTO et al, 2014).

As comunidades microbianas desempenham um papel significativo para a manutenção e equilíbrio ecológico dos ecossistemas. Esses micro-organismos possuem a capacidade de secretar enzimas (GAMS, 2007; MONTEIRO, 2012; ELIZEI et al, 2014).

Dentre os micro-organismos, os fungos filamentosos são especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita a sua recuperação do meio de fermentação e também porque a maioria dos fungos não é nociva à saúde humana. Os gêneros de fungo filamentosos comumente encontrados são representantes de *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Pythium*, *Verticillium*, e *Alternaria*. (PAQUES, MACEDO, 2006; WOLSKI, 2008; LIMA, SILVA, PINOTTI, 2014).

Fungos do gênero *Penicillium* são classificados como GRAS (Generally Regarded As Safe) devido à sua baixa toxicidade. Além destas características desejáveis para a aplicação na indústria, esse fungo é produtor de uma gama de substâncias bioativas e pode ser utilizado em diversos bioprocessos. Extremamente importantes eles são utilizados na produção de

alimentos, contribuem na indústria farmacêutica, tratamentos biológicos de efluentes, atuam na atividade enzimática, ou seja, na produção de enzimas de interesse industrial (KRISHNA et al, 2009; TAVARES et al, 2012; ABREU, ROVIDA, PAMPHILE, 2015).

As matérias-primas dos resíduos agroindustriais são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza, a agro- indústria gera como resíduos sólidos principalmente materiais orgânicos, tais como restos e cascas de vegetais. Esses resíduos quando dispostos no meio ambiente de forma inadequada podem causar impactos ambientais, devido ao alto teor de matéria orgânica que possuem (BRITO et al, 2002; CASTRO, 2010) passível de biodegradação e conseqüentemente liberação de chorume, causando a contaminação do solos e águas superficiais e subterrâneas, além da proliferação de vetores. Entretanto quando manejados corretamente, podem ser fonte de nutrientes para a produção de alimentos e obtenção de matérias primas que apresentam um alto valor agregado (CARVALHO, BROCHIER, 2008; CARVALHO et al, 2012; GONCALVES et al, 2014)

Os planejamentos experimentais buscam encontrar quais as variáveis que mais afetam um determinado processo, assim como a interação entre elas. A observação dos efeitos de variáveis e interações entre elas é de extrema importância para entender os processos que estão sendo

monitorados em um determinado sistema. (PEREIRA-FILHO et al, 2002; SANTOS et al, 2011; PEREIRA et al, 2012).

A utilização de recursos matemáticos, como os planejamentos fatoriais nos processos fermentativos, tem facilitado e diminuído a quantidade de experimentos realizados, pois os resultados obtidos podem selecionar as melhores condições de produção, através da influência das variáveis estudadas (PARK et al, 2002; BURKERT et al, 2004; ZHU et al, 2013; AYENI et al, 2013; MELO et al, 2014).

2. Material e Métodos

Micro-organismo

A amostra de *Penicillium chrysogenum* (SIS 25) isolada da Caatinga de Pernambuco, previamente catalogada no Banco de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), localizado no Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais (NPCIAMB). Mantida em meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), aclimatada com ácido tânico a temperatura de 28°C.

Meio e Controle de produção

Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de 500 mL, com volume útil de 250 mL (%p:v). Alíquotas de 25 mL de uma suspensão esporíca 10^7 foram adicionadas em meio de cultura contendo solução de sais (g/L): 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); pH-5,7.

Meios alternativos de produção

Os meios alternativos foram elaborados utilizando resíduos de uva (*Vitis labrusca* L.), casca do café (*Coffea arábica* L.) e resíduo de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck), (Figura 1 A-B-C). Os ensaios foram realizados em cultivos submersos a 150 rpm, durante 144 horas a 27°C.



Figura 1 Resíduos de: A (Café), B (Uva), C (Laranja)

Cinética de produção de tanase

Os ensaios de produção ocorreram de acordo com o planejamento fatorial de 2^3 no meio controle para obtenção da melhor condição de produção da tanase. Após a seleção da melhor condição, foram elaborados ensaios com os meios alternativos mantendo as condições testadas no meio controle. Os ensaios ocorreram a 37°C, 144 horas, 150 rpm. As amostras coletadas foram submetidas às determinações da atividade tanalítica, pH e biomassa.

Planejamento Fatorial

Foi realizado um planejamento fatorial 2^3 completo para analisar os principais efeitos e interações das variáveis concentrações: resíduo da casca de uva, laranja e casca de café, com 4 pontos centrais e níveis +1 e -1, (Tabela 1) com apoio de um Software Statística 7.0 da Stat Soft.

Tabela 1. Valores dos Fatores utilizados no Planejamento Fatorial 2^3

Variáveis (g/L)	-1	0	+1
Resíduo de café	5	10	15
Resíduo de uva	8	10	12
Resíduo de laranja	5	10	15

Determinação do pH

Foi realizada através de potenciometria em todas as amostras coletadas.

Determinação da atividade tanalítica

Para avaliação da atividade enzimática da tanase, utilizou-se a metodologia descrita por MONDAL *et al.* (2001). Foi preparada uma solução contendo 0,5 % (p/v) de ácido tânico em tampão acetato 0,2 M (pH 5,5) para detecção da enzima através de uma reação enzimática.

A reação foi realizada a partir da adição de 0,3 mL da solução de substrato e de 0,5 mL de extrato enzimático bruto previamente obtido. A solução obtida foi incubada a 60°C, durante 10 minutos. Após o período de incubação, a reação foi paralisada através da adição de 3 mL de uma solução de albumina de soro bovino (BSA), na

concentração de 1 mg/mL e 0,17 M de cloreto de sódio em tampão acetato 0,2 M (pH 5,0). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.300 g, durante 15 minutos, a 4°C. Os precipitados obtidos foram ressuspensos em 3 mL de solução SDS-Trietanolamina [SDS 1% (p/v), adicionando 5% (v/v) de Trietanolamina em água destilada], acrescido 1 mL de solução de FeCl₃ [0,01 M de FeCl₃ em 0,01 M de ácido clorídrico].

A leitura foi realizada após 15 minutos de repouso do término da reação, em espectrofotômetro Biochrom S21, a um comprimento de onda de 530 nm.

A atividade enzimática foi calculada pela diferença da leitura de absorbância medida em 530 nm entre a amostra e o tubo controle. Uma unidade de atividade de tanase foi definida como a quantidade de ácido tânico hidrolisado por mL de enzima empregada por minuto de reação:

$$Abs_{530} = Abs_{controle} - Abs_{teste}.$$

A atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μ mol 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

A síntese de tanase é realizada por várias espécies de micro-organismos em diferentes sistemas fermentativos, nos quais as condições físicas e químicas são controladas visando maior produção da enzima (NASCIMENTO et al., 2014).

A literatura descreve que fungos filamentosos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* tem representado importância na produção de tanase, com vantagens na produção de enzimas eficientes na degradação de ácido tânico e outros taninos hidrolisáveis (CAVALCANTI, 2011).

Segundo MELLO, 2012 as tanases microbianas apresentam pH estável na faixa de 3,5 a 8,0; com pH ótimo entre 5,5 e 6,0; temperatura de estabilidade entre 30 a 60°C, ótimo na faixa de 30 a 40°C. O mesmo destaca que estas propriedades dependem das condições de cultivo e também das linhagens utilizadas.

Na tabela 2 encontra-se a matriz codificada contendo as seguintes variáveis cascas de café, casca de uva e resíduo da laranja e também as determinações tanalíticas realizadas. Observou-se que a máxima atividade tanalítica foi evidenciada no ensaio denominado 3, que apresentou um valor de pH 4,8, casca de café 5g, casca de uva 12g e resíduo de laranja 5g, obtendo assim uma atividade tanalítica de 0,210 U/mL. Verifica-se também que no ensaio 3 foi obtida uma biomassa de 0,0938 g/L e o pH final

atingido foi de 4,8, sendo assim a melhor condição obtida de produção de Tanase.

Tabela 2 - Produção de biomassa, pH e atividade tanalítica nos ensaios para as concentrações de casca de café, casca de uva e resíduo de laranja em 144 horas de cultivo a 37°C a 150rpm.

Ensaio	Café	Uva	Laranja	pH	Biomassa (g/L)	Tanase (U/mL)
1	5,0	8,0	5,0	4,2	0,0266	0,180
2	15,0	8,0	5,0	5,1	0,0128	0,189
3	5,0	12,0	5,0	4,8	0,0938	0,210
4	15,0	5,0	5,0	5,1	0,0138	0,089
5	5,0	8,0	15,0	4,9	0,0133	0,159
6	15,0	8,0	15,0	5,1	0,0112	0,165
7	5,0	12,0	15,0	4,8	0,0145	0,176
8	15,0	12,0	15,0	5,6	0,0244	0,171
9	10,0	10,0	10,0	5,8	0,0254	0,147
10	10,0	10,0	10,0	5,2	0,0128	0,091
11	10,0	10,0	10,0	5,2	0,0112	0,167
12	10,0	10,0	10,0	4,9	0,0111	0,161

Os resultados expressos nos diagrama de pareto (Figura 2) apresenta a significância dos resultados, com 95% de confiança, representado pela linha tracejada vermelha, correspondente ao valor de $p = 0,05$.

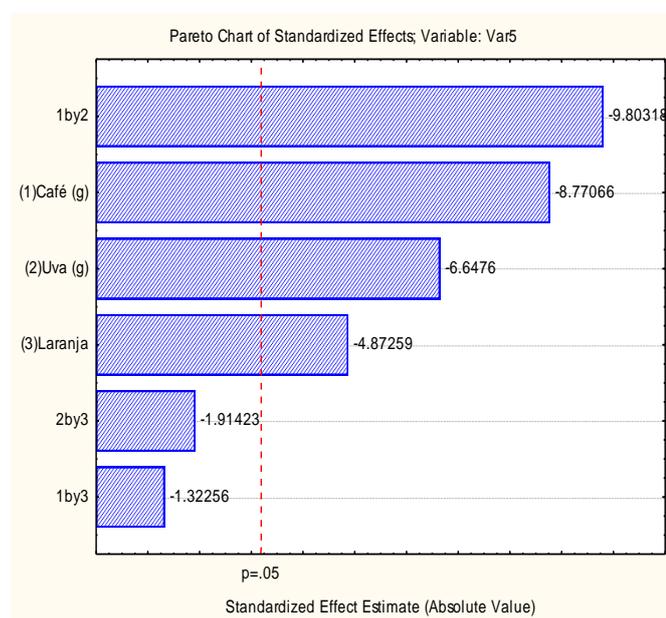


Figura 2 - Diagrama de pareto mostrando os efeitos principais e alterações das variáveis independentes no processo de produção de tanase por *Penicillium chrysogenum* a 144 horas de fermentação a 37°C. (1) casca de café, (2) casca de uva, (3) resíduo de laranja.

As seguintes variáveis independentes: Casca de café, Casca de uva e Resíduo de laranja influenciaram para a produção de tanase. Sendo que a casca do café e a casca da uva foram as variáveis independentes mais relevantes para a produção da enzima, por ambas estarem acima dos valores de p.

A casca e a polpa de café oferecem oportunidades com grande potencial para sua utilização como substrato para bioprocessos. Estudos demonstraram viabilidade para a produção de uma variedade de produtos como enzimas, agregando valores para estes subprodutos. (SOCCOL, 2002).

MACEDO et al., 2004 descreve que resíduo de cascas de café quando adicionado ao meio de fermentação permitem maiores concentrações de taninos. Constatando a influência do resíduo na atividade tanalítica obtendo um valor equivalente a 0,210 U/mL. Em comparação com os demais resíduos testados.

A produção de tanases por *Aspergillus* e *Penicillium* sp. já foi observada tanto em fermentação Submersa quanto em fermentação em substrato Sólido, na presença ou ausência de ácido tânico.

Dependendo da linhagem e das condições de cultivo, a enzima é induzida e expressa com diferentes níveis, mostrando diferentes padrões de produção (AGUILAR et al., 2007).

GONÇALVES (2010) descreve que anteriormente acreditava-se que apenas o ácido tânico fosse capaz de induzir a tanase em microorganismos. Porém em 1997, BRADDOO demonstrou que a tanase poderia ser expressa inclusive na ausência deste, ou também na presença de outros substratos como monossacarídeos, dissacarídeos, polissacarídeos, peptona ou caseína obtendo valores máximos de 0,538 U/mL e 0,151 U/mL para a forma extra e intracelular, respectivamente.

A variação do pH estudado durante o perfil de crescimento ocorreu numa faixa de 6,0 a 5,5, modificando a faixa inicial como demonstrado na figura 3.

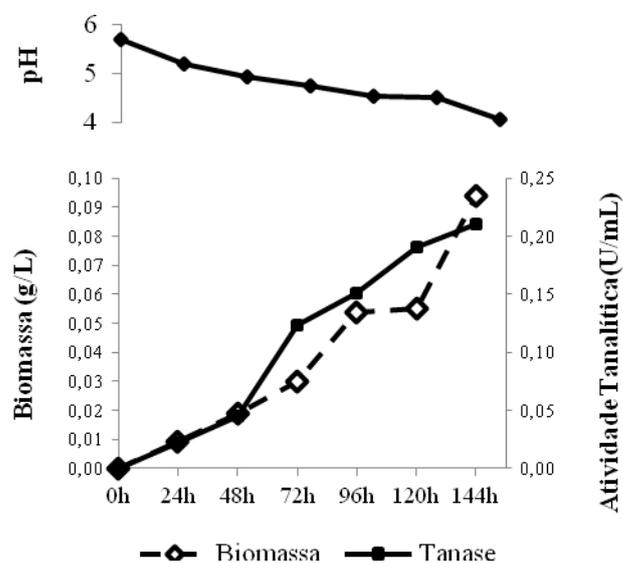


Figura 3 - Crescimento do *Penicillium chrysogenum* para o ensaio 3 em 144 horas de fermentação a 37°C e pH 6,0

De acordo com estudos realizados por COSTA (2008) observou-se que os maiores níveis enzimáticos extracelular (0,345 U/mL) e intracelular (0,185 U/mL) foram obtidos quando o pH inicial do meio de cultivo foi ajustado para 6,0. Entretanto foi observado também uma queda dos valores de pH ao longo dos dias de cultivo provavelmente, isso se deve a produção de metabólitos ácidos. Foi constatado ainda que para tanases produzidas por *Aspergillus niger*, em pH abaixo de 3,5 a enzima é instável. No entanto, a hidrólise do substrato e a difusão da enzima no meio são melhoradas quando o micro-organismo é cultivado em valores de pH acima de 5,5.

O crescimento obtido no ensaio 3, com o micro-organismos *Penicillium chrysogenum* descrito na figura 3 observa-se que houve uma adaptação do micro-organismo na fase onde ocorre a síntese da enzima e de outros constituintes celulares necessários a absorção dos nutrientes presentes no meio. Seu crescimento ocorreu rapidamente atingindo sua produção tanto de biomassa (0,0938g/L) e atividade tanalítica (0,210 U/mL) em 144 horas de cultivo.

Após a seleção da melhor condição de produção de tanase através da utilização do planejamento fatorial, foram elaborados os meios alternativos contendo os resíduos agroindustriais previamente selecionados. Substituindo a interação do ensaio três nas mesmas concentrações mantendo as

mesmas condições de fermentação testadas anteriormente.

A influência da utilização dos substratos agroindustriais na produção de tanase está descrita na tabela 3 e na figura 4.

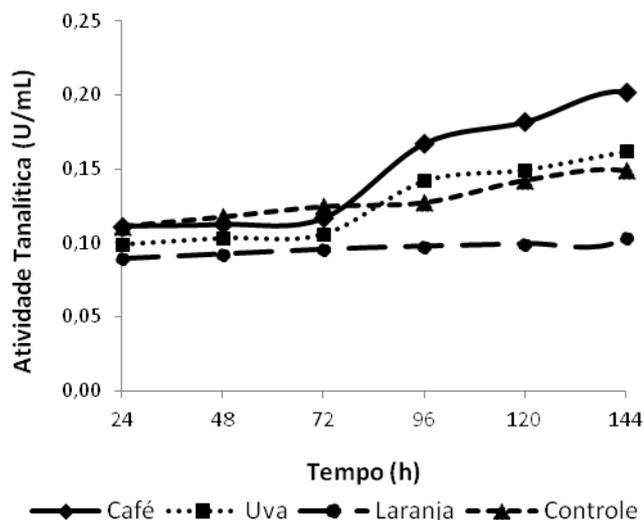
Tabela 3 - Produção de biomassa, pH e atividade tanalítica dos em diferentes resíduos em 144 horas de cultivo a 37°C a 150 rpm.

Resíduos	Biomassa(g/L)	pH	Tanase(U/mL)
Controle	0,198	6.8	0,149
Café	0,297	6.0	0,202
Uva	0,177	5.5	0,162
Laranja	0,140	6,0	0,103

Verifica-se que em todos os resíduos testados houve a produção de tanase, porém o café apresentou uma elevada atividade tanalítica (0,202 U/mL), valor superior ao obtido no meio denominado controle, apresentando também a maior biomassa obtida 0,297 g/L e um valor de pH de 6,0.

A figura 4 mostra a produção enzimática em 144 horas de fermentação, demonstrando que o resíduo da casca do café apresentou uma maior produção de tanase.

Figura 4 - Atividade enzimática tanase utilizando os resíduos de café, uva e laranja em 144 horas de fermentação



SILVA et al, (2012) utilizando amostras de *Aspergillus* sp. em meio de cultura contendo resíduo de cascas de café analisou a produção tanásica e observou maiores níveis enzimáticos obtidos em 72 horas valores de 0,59 (U/mL) em comparação com outros resíduos utilizados.

MACEDO et al., 2005 comprovou em seus estudos que o resíduo de café mostrou-se promissor substituto do resíduo da casca de uva com valores de 0,275(U/mL). O mesmo autor relata que o teor de taninos totais presentes nos resíduos agroindustriais não parece se assimilável ao metabolismo do micro-organismo sendo necessários suplementações de outras fontes de carbono.

4. Conclusões

O meio contendo o resíduo de casca de café apresentou maior produção de tanase, quando comparado aos demais meios testados, nos meios alternativos, como casca de café, casca de uva e

resíduo de laranja, o denominado controle continha a mistura dos três resíduos apresentado nos meios alternativos.

Verificou-se a habilidade da amostra isolada da Caatinga *Penicillium chrysogenum* (SIS 25) em quebrar as moléculas dos taninos presentes no resíduo, transformando-os na enzima estudada.

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

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.
- AGUILLAR, C. N; AUGUR, C; TORRES, F. E; VINIEGRA-GONZALEZ, G. Introduction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. *Process Biochemistry*, v.36, p.565-570,2001.
- ASSAD, A. L. D.; AUCÉLIO, J. G. Biotecnologia no Brasil - Recentes Esforços. In: da Silveira, J. M. F. J. et. al (Org.). **Biotecnologia e Recursos Genéticos: desafios e oportunidades para o Brasil**. Campinas: Instituto de Economia/FINEP, 2004.
- AYENI, A. O; BANERJEE, S; OMOLEYE, J. A., HYMORE, F. K., GIRI, B. S., DESHMUKH, S. C., MUDLIAR, S. N. Optimization of pretreatment conditions using full factorial design and enzymatic convertibility of shea tree sawdust. *Biomass and Bioenergy*, v.48, p.130-138, 2013.

- BRADDOO, S.; GUPTA, R.; SAXENA, R. K. Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tannase from *Aspergillus japonicus*. **Process Biochemistry**, v.32, p. 135-139, 1997.
- BRITO, A. L. F.; MUNIZ, A. C. S.; LOPES, W. S.; LEITE, V. D.; PRASAD, S. Processo de codisposição de resíduos sólidos de curtume. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 4, out/dez, p. 144-150, 2002.
- BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, v.91, n.1, p.77-84, 2004.
- CARVALHO, S.; BROCHIER, M.A. Composição tecidual e centesimal e teor de colesterol da carne de cordeiros terminados em confinamento com dietas contendo níveis crescentes de resíduo úmido de cervejaria. **Ciência Rural**, v.38, p.2023-2028, 2008.
- CASTRO, A. M; Produção, propriedades e aplicação de Celulase na Hidrólise de Resíduos Agroindustriais. **Química Nova**. V.33.n.1. p. 181-188, 2010.
- CAVALCANTI, N. B. Crescimento inicial de plantas de jabolão (*Syzygium jambolanum Lam*) em diferentes substrates. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v.8, n.4, p. 164-182, 2011.
- CHAGAS, R. K. Biotecnologia ao alcance de todos. **InterfacEHS-Revista de Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 8, n. 2, 2013
- COSTA, A. M.; RIBEIRO, W. X; KATO, E; MONTEIRO, A. R. G.; PERALTA, R. M. Production of tannase by *Aspergillus tamaritii* in submerged cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 2, p. 399-404. 2008.
- COSTA, P. N; **Otimização da produção de Tanase por *Aspergillus* sp. Em Fermentação em Estado Sólido**. Dissertação de Mestrados, Universidade Federal de Lavras, 73p. 2012.
- 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, S. M; FACCHI, D. P; BRANDÃO, M. I; BAUER, M; PARIS, J. O. Produção de mudas de alface e couve utilizando composto proveniente de resíduos agroindustriais. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v.1 n.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. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. **Ciência Agrotécnica**, v.29, n.4, p. 833-838, 2005.
- 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.
- PAQUES, F. W; MACEDO, G. A. "Plant lipases from latex": properties and industrial applications. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.
- PARK, Y; KANG, S; LEE, J; HONG, S; KIM, S. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.58, n.6, p.761-766, 2002.
- 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.
- PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Emprego de planejamento fatorial para a otimização das temperaturas de pirólise e atomização de Al, Cd, Mo e Pb por ETAAS. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 246-253, 2002.
- PINTO, G. A. S. COURI, S; LEITE, S. G. F; BRITO, E. S. Tanase: conceitos, produção e aplicação. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.23, n.2, p.439-462, 2005
- 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.
- SILVEIRA, J; BORGES, I. C. K. Um panorama da biotecnologia moderna. **Biotecnologia e recursos genéticos: desafios e oportunidades para o Brasil**. Campinas:Unicamp, 2004.

WOLSKI, E.; “Estudo Comparativo Da Produção De Lipase Por Fermentação Submersa Utilizando *Penicillium sp.* Livre e Imobilizado”. Dissertação de Mestrado, URI-Erechim, 2008.

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.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES GERAIS

Diante dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- Dentre as amostras de *Penicillium* testadas neste estudo, para a seleção de melhores cepas produtoras de tanase em meio sólido, o micro-organismo SIS 25 foi o que se apresentou com os melhores resultados diante das outras amostras testadas;
- Os ensaios moleculares e morfológicos identificaram as amostras SIS 25 como *Penicillium chrysogenum*, foi mais eficiente.
- Nos ensaios referentes a seleção dos meios de produção de Tanase, o meio que apresentou os melhores resultados foi o meio denominado 1, dentre os quatros meios selecionados para produção de tanase;
- Os ensaios utilizando o planejamento fatorial 2^3 para a produção de tanase, utilizando o Meio 1, dentre os 12 ensaios realizados, tendo como variáveis independentes a casca de café, a casca de uva e resíduo de laranja, o ensaio 3 foi o que demonstrou os melhores resultados de produção,
- Apesar da ausência de ácido tânico, como indutor da produção de tanase, a utilização de resíduos agroindústrias, tais como a casca de café, casca de uva e resíduos de laranja, testados neste trabalho, foram suficientes para a obtenção de tanase por meio de fermentação submersa, com destaque para o resíduo de casca de café que obtive 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.