



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

CAMPUS ALTO PARAÓPEBA

CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA TANASE
PRODUZIDA POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS A PARTIR DA
CASCA DE CAFÉ**

ISABELA TERESA SANTOS CORRÊA

Orientador: Professor Doutor Boutros Sarrouh

Ouro Branco
2017

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA TANASE
PRODUZIDA POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS A PARTIR DA CASCA
DE CAFÉ

ISABELA TERESA SANTOS CORRÊA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado em cumprimento às exigências
do Curso de Bacharelado em Engenharia de
Bioprocessos da Universidade Federal de
São João del-Rei.

Orientador: Professor Doutor Boutros Sarrouh

Ouro Branco

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

CAMPUS ALTO PARAÓPEBA

CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA TANASE
PRODUZIDA POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS A PARTIR DA CASCA
DE CAFÉ

ISABELA TERESA SANTOS CORRÊA

A banca examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este trabalho de conclusão de curso:

Boutros Sarrouh – Orientador

Wesley Santiago da Silva – Examinador 1

Thamires de Fátima Andrade Durso – Examinador 2

Ouro Branco, Junho 2017

AGRADECIMENTOS

A Deus, que através da força do teu espírito, me fez superar as dificuldades encontradas no caminho.

À minha família, especialmente meu pai Carlos e meu irmão Mateus, por me incentivarem e proporcionarem todo amor e suporte necessário para que eu pudesse concluir mais essa etapa da minha vida.

Ao Elizio, por ser o melhor companheiro em tudo que preciso, me apoiando e se desdobrando para que a realização desta etapa da minha vida fosse concluída.

Ao meu orientador Boutros Sarrouh, por toda ajuda, excelente orientação e oportunidade ímpar na minha formação, pelos ensinamentos, supervisão e aprendizado.

Aos demais professores, pelos conselhos e informações que me guiaram neste caminho.

Aos técnicos dos laboratórios, pelo carinho, pela paciência com que me ensinaram e pelo exemplo de profissionais que levarei por toda a vida.

Aos meus amigos e todos aqueles que de alguma forma contribuíram e torceram pela concretização desta etapa da minha vida.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISIONAL BIBLIOGRÁFICO	10
2.1- Casca de café	10
2.2- Taninos	11
2.3- Tanase.....	13
2.4- Importância fisiológica e modo de ação da tanase.....	16
2.5- Regulação da biossíntese da tanase.....	18
2.6- Produção de tanase microbiana	18
2.7- Produção da tanase através da fermentação.....	19
2.7.1- <i>Fermentação em estado sólido (FES)</i>	19
2.7.2- <i>Fermentação em superfície líquida (FSL)</i>	21
2.7.3- <i>Fermentação submersa (FSm)</i>	21
2.8- Otimização das condições para produção da enzima tanase	22
3. OBJETIVO GERAL	23
3.1- Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Microrganismos	24
4.2 Análise qualitativa da atividade tanásica	24
4.2.1 <i>Determinação do índice enzimático</i>	24
4.3- Produção de extratos enzimáticos por fermentação submersa.....	24
4.4- Ensaio enzimático.....	25
4.4.1- <i>Quantificação da atividade da enzima tanase</i>	25

4.4.2- Curva padrão de ácido gálico.....	25
4.5- Caracterização enzimática.....	26
4.5.1- Efeito do pH na atividade enzimática	26
4.5.2- Efeito da temperatura na atividade enzimática	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1- Análise qualitativa da atividade tanásica.....	27
5.2- Ensaio enzimático.....	28
5.3- Caracterização da atividade enzimática.....	34
5.3.1- Efeito do pH na atividade enzimática	35
5.3.2- Efeito da temperatura na atividade enzimática.....	36
6. CONCLUSÕES	37
7. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

RESUMO

Os processos enzimáticos têm conquistado cada vez mais aceitação na área industrial, uma vez que eles exibem características econômicas e operacionais que conferem vantagens em relação aos processos químicos convencionais. As enzimas podem provir de fonte animal, vegetal e microbiana, contudo as de origem microbiana apresentam grande potencial para a aplicação industrial, já que podem ser produzidas em larga escala, via processos fermentativos. Então, a produção de tais metabólitos exigem o isolamento e identificação de microrganismos capazes de produzir de forma eficiente o bioproduto de interesse. Dentre as enzimas estudadas pode-se ressaltar a tanase, que catalisa a hidrólise de ligações ésteres e depsídicas em taninos hidrolisáveis como o ácido tânico, gerando glicose e ácido gálico. Substratos naturais como a casca de café, são considerados resíduos abundantes no Brasil, que constituem matéria-prima de grande potencial para bioconversão em outros produtos de alto valor. Neste contexto, a bioprospecção de fungos filamentosos a partir da casca de café apresenta-se como uma perspectiva de suma importância, uma vez que as cepas isoladas poderão produzir enzimas com alto potencial de aplicação em diversos processos biotecnológicos, sejam eles voltados para a indústria alimentícia, tecido, química ou de biocombustíveis. Então, como objetivo do presente trabalho, foi avaliada a atividade da enzima tanase produzida por fungos filamentosos previamente isolados da casca de café, e, por fim, foi feita a caracterização da mesma frente a distintas variações de temperatura e pH. Os fungos isolados da casca de café denominados como FF1-CC, FF2-CC, FF3-CC, FF4-CC, FF5-CC e FF6-CC, são respectivamente *Fusarium sp.*, *Aspergillus spA.*, *Aspergillus spB.*, *Mucor sp.*, *Penicillium sp.*, e *Cladosporium sp.* Em relação a avaliação qualitativa da atividade enzimática da tanase observou-se que, 66,7% dos isolados apresentaram formação de halo de hidrólise, evidenciando a presença da atividade enzimática extracelular pelos fungos FF1-CC, FF2-CC, FF3-CC e FF6-CC, indicando ainda o microrganismo FF6-CC como o melhor produtor de enzimas extracelular, devido ao índice enzimático encontrado ser maior que 2. Já na quantificação da atividade enzimática desses fungos, observou-se que *Fusarium sp.* apresentou atividade tanásica de $1,5 \pm 0,032$ U/mL após 8 dias de cultivo, os gêneros de *Aspergillus sp.* alcançaram valores máximos de $1,2 \pm 0,003$ U/mL após 5 dias de cultivo e $0,78 \pm 0,047$ U/mL já no terceiro dia de cultivo, respectivamente, e por fim, o fungo do gênero *Cladosporium sp.* produziu atividade máxima na faixa de $1,17 \pm 0,0047$ U/mL também no oitavo dia de cultivo. Analisando posteriormente, a atividade da cepa de melhor desempenho frente a distintos valores de pH e temperatura, tem-se que a melhor produção tanásica foi de $1,88 \pm 0,009$ U/mL em pH ideal 5,0 e $1,61 \pm 0,019$ U/mL em temperatura de 40°C. Sendo assim, conclui-se que os fungos em estudo apresentam um potencial promissor para a produção da enzima tanase, utilizada nos diferentes processos biotecnológicos industriais existentes.

Palavras-chave: Casca de café; Fungos filamentosos; Atividade enzimática; Tanase; Caracterização.

ABSTRACT

Enzymatic processes have gained increasing acceptance in the industrial field, since they exhibit the economic and operational conditions that confer advantages over conventional chemical processes. As enzymes they can come from animal, vegetable and microbial source, but as of microbial origin, greatness for an industrial application, since we can be produced in large scale, via fermentative processes. However, the production of such metabolites requires the isolation and identification of microorganisms capable of efficiently producing the bioproduct of interest. Among the studied enzymes, it is possible to emphasize the tannase, which catalyzes the hydrolysis of links and depsidians in hydrolysable tannins such as tannic acid, generating glucose and gallic acid. Natural substrates such as a coffee husk are abundant residues in Brazil, which are a raw material of great potential for bioconversion in other high value products. In this context, a bioprospection of filamentous fungi is from a coffee fair presents itself as an extremely important perspective, since as isolated strains, tissue, chemical or biofuels. Therefore, as an objective of the present work, it was evaluated by an activity of the enzyme tanase produced by filamentous fungi previously isolated from the coffee husk, and by way of a characterization of the same in front of the different variations of temperature and pH. The coffee shell insulation fuses referred to as FF1-CC, FF2-CC, FF3-CC, FF4-CC, FF5-CC and FF6-CC are respectively *Fusarium sp.*, *Aspergillus spA.*, *Aspergillus sp.*, *Mucor sp.*, *Penicillium sp.*, and *Cladosporium sp.* In relation to the qualitative evaluation of the enzymatic activity of the tannase, it was observed that 66.7% of the isolates presented hydrolysis halo formation, evidencing a presence of the extracellular enzymatic activity by the fungi FF1-CC, FF2-CC, FF3-CC and FF6 -CC, also indicating the FF6-CC microorganism as the best producer of extracellular enzymes, due to the enzymatic index found to be greater than 2. Already in the quantification of the enzymatic activity of fungi, it was observed that *Fusarium sp.* It presented tanase activity of $1,5 \pm 0,032$ U / mL after 8 days of cultivation, the genera of *Aspergillus sp.* To reach the maximum values of $1,2 \pm 0,003$ U / mL after 5 days of cultivation and $0,78 \pm 0,047$ U / mL no third day of cultivation, respectively, and finally, the fungus of the genus *Cladosporium sp.* It produced the maximum activity in the range of 1.17 ± 0.0047 U / mL also has no eighth day of culture. Finally, the activity of the best production strain against different pH and temperature values shows that the best production was 1.88 ± 0.009 U / mL at ideal pH 5.0 and 1.61 ± 0.019 U / ML at a temperature of 40 ° C. Thus, it is concluded that the fungi under study, a promising potential for a production of the enzyme tanase, uses our different existing biotechnological processes.

Key-words: Coffee husk; Filamentous fungi; Enzymatic activity; Tanase; Description.

1. INTRODUÇÃO

Pasteur mostrou que as fermentações, conhecidas como práticas artesanais para obtenção de certos produtos como bebidas alcoólicas e vinagre, estavam associadas à presença de microrganismos. O trabalho pioneiro de Eduard Buchner, publicado em 1897 nos *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, ao mostrar que fermentações são ações puramente químicas que podem ocorrer em meio livre de células, conduziu o surgimento da Enzimologia – o estudo das enzimas responsáveis por essas ações fermentativas (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

Na era da biotecnologia, os bioprocessos possibilitam a produção de uma ampla gama de metabólitos de interesse industriais, tais como as enzimas, ácidos orgânicos, antibióticos e outros. Destes bioprodutos, as enzimas funcionam como ativos funcionais e inovadores. Em muitos processos elas podem substituir compostos sintéticos e contribuir para a produção de processos menos agressivos ao meio ambiente devido à sua biodegradabilidade. Dentre sua vasta gama de aplicação, as enzimas digestivas reduzem os alimentos em componentes menores que são mais facilmente absorvidos no intestino; as da indústria alimentícia são responsáveis por panificação, produção de cerveja, vinhos e laticínios; algumas atuam na indústria têxtil, de papel e celulose; na área da saúde com a produção de antibióticos e na indústria de cosméticos (LIMA, AQUARONE, BORZANI E SCHMIDELL, 2001).

As enzimas podem provir de origem animal, vegetal e microbiana. As microbianas são utilizadas em inúmeros processos nas mais diversas áreas biotecnológicas. A utilização da diversidade e capacidade metabólica de microrganismos, resultante de sua diversidade genética, coloca-se como um enorme potencial a ser explorado, ampliado pelo advento da engenharia genética. Contudo, a produção de tais metabólitos exigem o isolamento e identificação de microrganismos capazes de produzir de forma eficiente o bioproduto de interesse (PANDEY et. al., 2000).

Para produção de tais metabólitos são utilizados substratos naturais, como a casca de café, resíduo abundante no Brasil e que constitui matéria-prima de grande potencial para bioconversão em outros produtos de alto valor. Esses materiais permitem o isolamento e a seleção de linhagens com maiores probabilidades de produção dos biocatalisadores de interesse (PANDEY et. al., 2000).

O que possibilita as enzimas desenvolverem tais aplicações é a presença de atividade catalítica. No mecanismo de catálise enzimática há uso de substratos, que são compostos que existem na célula e vão reagir quimicamente. A enzima é o catalisador que fará com que a reação se dê mais facilmente, e por fim o produto é o composto que irá se formar na reação (LIMA, AQUARONE, BORZANI E SCHMIDELL, 2001).

A enzima de interesse, tanase, é uma enzima que hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis, como o ácido tânico, gerando glicose e ácido gálico (GONÇALVES, 2010; MACEDO; MATSUDA; BATTESTIN, 2004). A mesma possui potencial para aplicação nos diversos setores industriais já citados, como a indústria alimentícia, de tratamento de efluentes, nutrição animal e indústria farmacêutica.

Dentro deste contexto, posterior ao isolamento e identificação dos microrganismos produtores da enzima tanase, este trabalho visou a avaliação da atividade enzimática da mesma, produzida pelos fungos filamentosos previamente isolados da casca de café, bem como sua caracterização frente a distintos valores de pH e temperatura.

2. REVISIONAL BIBLIOGRÁFICO

2.1- A casca de café

O café é um produto agrícola cuja qualidade final do grão beneficiado é resultado da interação de vários fatores, tais como condições climáticas, adubação, tratamentos fitossanitários, estágio de maturação dos frutos, cuidados na colheita, secagem, beneficiamento e armazenamento (MALTA, CHAGAS, OLIVEIRA, 2003).

A casca de café, ou palha de café, é um resíduo fibroso, obtido durante o processamento dos grãos de café na via seca (PANDEY et. al., 2000).

Os usos alternativos para este resíduo incluem a queima para geração de energia, suplementação de rações animais, cobertura de solo destinado ao plantio, entre outros (RATHINAVELU e GRAZIOSI, 2005). No entanto, com avanços na tecnologia bioenergética e biotecnológica, este resíduo pode ser fonte abundante e de baixo custo para a produção de bioprodutos de alto valor agregado, bem como geração de energia renovável.

A casca de café é uma matéria-prima lignocelulósica muito rica em diferentes biomoléculas, sendo os carboidratos constituintes de mais de 50% do seu peso seco, seguidos pelas pectinas e proteínas, respectivamente, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1: Composição da casca de café em porcentagem (%) de peso seco.

Componente	% peso seco
Carboidratos	57,8
Proteínas	9,2
Lipídeos	2,0
Cafeína	1,3
Taninos	4,5
Pectinas	12,4

Fonte: SOCCOL, 2000.

Observa-se que dentre os componentes listados, o teor de taninos correspondem a 4,5% do peso seco da casca. Sabe-se que a obtenção de uma determinada concentração de taninos nos alimentos, leva à diminuição da degradação ruminal, possivelmente devido à ligação cruzada de proteínas e outras moléculas. Relacionada então a essa característica, o tanino pode ser utilizado também como proteção da degradação proteica no rúmen, levando a formação de “proteína by-pass” (PANDEY et. al., 2000).

2.2- Taninos

Definimos como taninos os compostos fenólicos, solúveis em água, com peso molecular de 500 a 30.000 Da, provenientes do metabolismo secundário das plantas e que diferem da maioria dos outros compostos fenólicos pela sua capacidade de precipitar proteínas e outras macromoléculas em solução (KRAUS et. al., 2003). Essa capacidade se deve a grande quantidade de grupos hidroxila-fenólicos em suas estruturas que permitem a formação de ligações cruzadas com muitas macromoléculas (BATTESTIN et. al., 2004).

Os taninos representam o quarto mais abundante constituinte vegetal, depois da celulose, hemicelulose e lignina. Atuam como parte do mecanismo de defesa dos vegetais contra microrganismos, herbívoros e condições ambientais hostis. As plantas que contêm altos níveis de taninos, apresentam vantagem evolucionária significativa sobre seus predadores e outras espécies vegetais, que competem pelo mesmo nicho. Altas

quantidades de taninos estão associadas com a resistência de vegetais ao ataque microbiano (SCALBERT, 1991).

Existem dois grandes grupos que se subdividem os taninos, dependendo de suas estruturas e propriedades. Temos os taninos hidrolisáveis e taninos condensados (PAES et al., 2006). Os taninos hidrolisáveis podem ser subdivididos em galotaninos e elagitaninos. Os galotaninos são caracterizados pela presença de muitas moléculas de ácidos orgânicos, tais como ácido gálico e digálico, que são esterificados a uma molécula de glicose (Figura 1A). Em hidrólise, os galotaninos formam glicose e ácidos fenólicos, principalmente ácido gálico. O exemplo mais comum de um galotanino é o ácido tânico (AGUILAR et. al., 2007).

Por outro lado, os elagitaninos possuem blocos formados por unidades de ácidos elágicos ligados a glicosídeos, e quando hidrolisados, liberam glicose e ácido elágico junto com ácido gálico e outros ácidos (Figura 1B) (AGUILAR et. al., 2007).

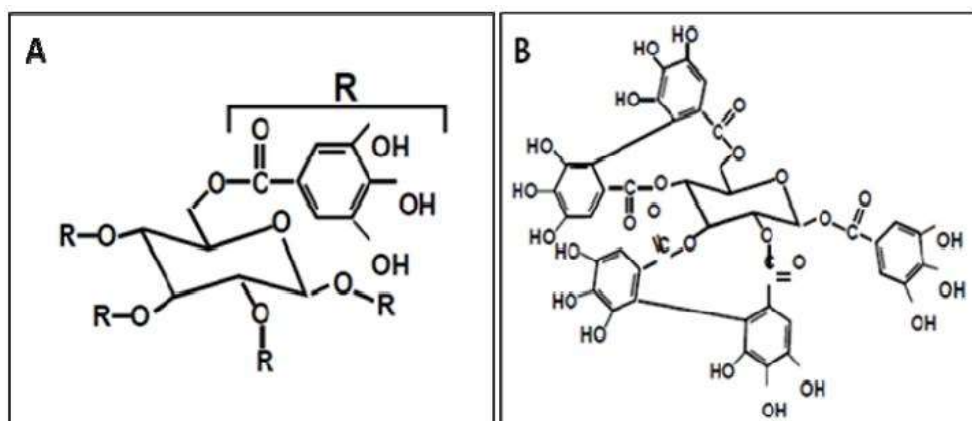


Figura 1: Estrutura molecular dos galotaninos (A) e dos elagitaninos (B). Fonte: BATTESTIN, 2004.

Os taninos condensados (TC) ou proantocianidinas são constituídos por unidades flavonol: flavo-3-ols (catequina) ou flavon 3,4-diols (leucoantocianinas). Eles estão presente em maior quantidade nos alimentos normalmente consumidos (DESPHANDE et. al. 1986). Os TC podem conter de duas a cinquenta unidades flavonoides; possuem estruturação complexa; são resistentes à hidrólise, mas podem ser solúveis em solventes orgânicos aquosos, dependendo de sua estrutura. A Figura 2 ilustra a estrutura química dos taninos condensados.

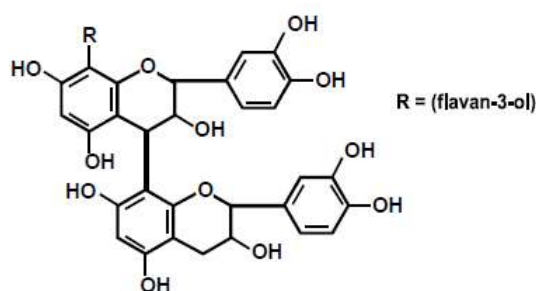


FIGURA 2: Estrutura química de tanino condensado. Fonte: LEKHA; LONSANE, 1997.

Os pigmentos antocianidinas são os responsáveis por um vasto conjunto de nuances rosa, vermelha, violeta e azul em flores, folhas, frutos, sucos e vinhos. Também são responsáveis pela adstringência de frutas, sucos e vinhos, e em muitos casos são compostos bioativos em plantas medicinais (PINTO, 2003).

O teor e a espécie de taninos variam, não só de um vegetal para outro, mas também de uma parte para outra do mesmo vegetal, conforme mostra a Tabela 2 (SANTOS, 2000).

Tabela 2: Teor de taninos totais em algumas espécies vegetais.

Produtos	Teor de Taninos
Abacaxi	
- Folha	0,81%
- Caule	0,61%
Sorgo	0,60 – 2,61%
Mandioca	0,62 – 1,11%
Caju	0,35 – 0,72%
Café (casca)	1,31 – 2,97%

Fonte: BATTESTIN, 2007.

2.3- Tanase

Tanino acil hidrolase (E.C. 3.1.1.20), comumente chamada de tanase, catalisa a hidrólise de ligações ésteres e depsídicas em taninos hidrolisáveis como o ácido tânico, gerando glicose e ácido gálico (Figura 3). AGUILAR et. al., 2007 foi o primeiro a relatar a formação de ácido gálico pelos fungos identificados como *Penicillium glaucum* e *Aspergillus niger*, que foram capazes de crescer utilizando ácido tânico como única fonte de carbono, liberando ácido gálico e glicose. Posteriormente, LEKHA et. al., 1997 mostrou que a hidrólise de taninos é realizada por uma enzima particular que foi denominada tanase. Desde então, trabalhos têm sido realizados visando o estudo dessa enzima, bem como as condições ótimas para sua produção.

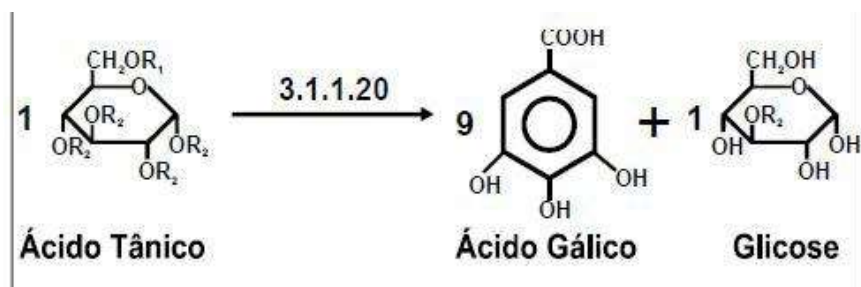


Figura 3: Hidrólise do ácido tânico Fonte: BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004.

A tanase pode ser isolada de vegetais, animais e microrganismos. Contudo, estudos apontam que as tanases provenientes de microrganismos são mais estáveis que as obtidas das demais fontes. Esta enzima pode ser produzida por bactérias do gênero *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* e *Selenomonas*, e também por fungos filamentosos, principalmente das espécies: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Trichoderma* (GONÇALVES, 2010; BATESTIN 2007).

Dentre suas propriedades pode-se mencionar a presença de pH estável na faixa de 3.5-8.0, com pH ótimo entre 5.5-6.0, 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 300kDa. Estas propriedades dependem fortemente das condições de cultivo e também da linhagem utilizada.

Estudos têm sido realizados visando a produção e isolamento de tanases. HASLAM; STANGROOM, 1966; BEVERINI; METCHE, 1990, relatam que a tanase apresenta duas isoformas, uma que possui maior atividade esterásica sobre a ligação éster entre o anel aromático e o resíduo de glicose, e outra que possui maior atividade depsídica sobre a ligação éster entre os anéis aromáticos (Figura 4). Dentre os aspectos que diferem tais isoformas, podemos mencionar o peso molecular, a faixa de estabilidade de pH e temperatura, seguidos pela faixa de pH e temperatura ótimos.

Além desses efeitos da temperatura e pH, para expressar sua atividade catalítica completa, a tanase requer a presença de alguns íons, porém a presença de outros podem inibir sua atividade. Assim, é importante conhecer quais são os íons e suas concentrações para se obter a máxima eficiência da enzima. (MUKHERJEE; BANERJEE, 2006).

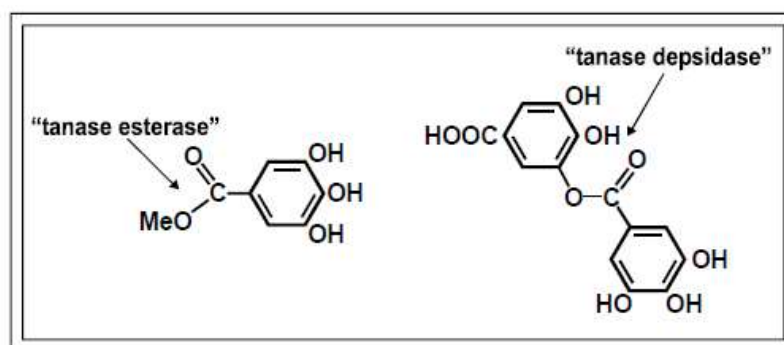


Figura 4: Atividade esterásica e depsídica da tanase. Fonte: BATTESTIN, 2004.

A tanase possui potencial para aplicação em diversos setores industriais, todavia seu uso é limitado devido ao alto custo de produção da enzima (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004).

Na indústria alimentícia ela é aplicada em diversas áreas. Na produção de chás instantâneos, existe um composto denominado “creme do chá”. Este composto é originado devido à complexação de polifenóis poliméricos presentes no chá, como a cafeína, formados quando a bebida atinge temperaturas inferiores a 4°C. O “creme do chá” pode ser removido com adição de compostos químicos, porém esta técnica influencia negativamente na qualidade final da bebida. Em contrapartida, o emprego da tanase, além de eliminar esses complexos solúveis indesejados, promove a diminuição da turbidez, aumento da solubilidade em água e preservação dos conteúdos aromáticos do chá (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004; PINTO et. al., 2005).

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

Na produção de sucos, sabemos que algumas frutas depois de armazenadas podem apresentar escurecimento, formação de sedimentos, gosto amargo e adstringência. Essas características indesejáveis devem-se a presença de altos conteúdos de taninos nessas frutas. Os processos convencionais de tratamento de sucos de frutas são incapazes de remover de forma eficaz o sabor amargo de alguns sucos. Assim, o tratamento enzimático tem sido preferido (AGUILAR et. al., 2007).

Em bebidas geladas de modo geral a base de café, a enzima é empregada como agente clarificante para remover os compostos fenólicos presentes na matéria vegetal, a

fim de evitar a sua complexação e precipitação (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004).

Outra aplicação da tanase se refere ao tratamento de efluentes proveniente do processamento de couro. Estes efluentes possuem alta carga de taninos e polifenóis que são altamente poluentes, então a tanase constitui uma alternativa eficiente para a remoção destes compostos (GONÇALVES, 2010).

Na nutrição animal, os taninos presentes em algumas rações apresentam efeitos antinutricionais, uma vez que o animal pode não digerir-los completamente. O uso da tanase nestes alimentos provoca a remoção dos compostos indesejáveis, aumentando a digestibilidade e favorecendo a assimilação dos nutrientes (PINTO et. al., 2005).

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

Em suma, tanases são enzimas com grande potencial de aplicações biotecnológicas, contudo limitadas devido ao alto custo. Desta forma, torna-se necessário o conhecimento de fontes de tanase, bem como a otimização de produção da mesma.

2.4- Importância fisiológica e modo de ação da tanase

Se os taninos são parte do sistema de defesa vegetal contra os microrganismos, a produção de tanase pode ser considerada como parte do contra-ataque microbiano. Tal ataque inclui estratégias como a secreção de substâncias com elevada afinidade por taninos, a produção de enzimas resistentes aos taninos, a produção de polifenoloxidasas (enzimas capazes de quebrar os anéis fenólicos das proantocianidinas), e a produção de sideróforos (SCALBERT, 1991).

A tanase atua na invasão da planta hospedeira pela hidrólise de parte dos compostos fenólicos presentes em tecidos vivos ou em decomposição, mais especificamente os taninos hidrolisáveis (SCALBERT, 1991). Diferentes estudos relatados por LEKHA e LONSANE, 1997, apontam que microrganismos de solo produtores de tanase desempenham papel ativo na decomposição e reciclagem de

materiais vegetais ricos em taninos. Assim, as espécies microbianas que sintetizam esta enzima apresentam vantagem competitiva às demais de determinado habitat.

Como já visto, a decomposição de taninos hidrolisáveis é mediada por duas isoformas. Uma com atividade esterásica sobre a ligação éster entre o grupo anel aromático e o resíduo de glicose, e a outra depsídica sobre a ligação éster entre os anéis aromáticos. HASLAM e STRAGROOM, 1966, responsabilizaram a tanase pelas duas atividades. Também relataram que a proporção entre essas duas atividades podia variar de acordo com as condições de cultivo. BEVERINI e METCHE, 1990, utilizando colunas de afinidade, fracionaram as duas isoformas de tanase fúngica, ambas com as duas atividades, sendo que a tanase I apresentou maior característica esterásica e a tanase II atividade depsídica mais pronunciada.

A Figura 5 mostra os modelos propostos para a degradação do ácido tânico pela tanase. Na primeira etapa a enzima hidrolisa todas as ligações depsídicas, liberando 1,2,3,4,6-pentagaloilglicose e ácido gálico. Em seguida, os demais resíduos galoil são sequencialmente removidos até a completa liberação da molécula de glicose (LEKHA e LONSANE, 1997).

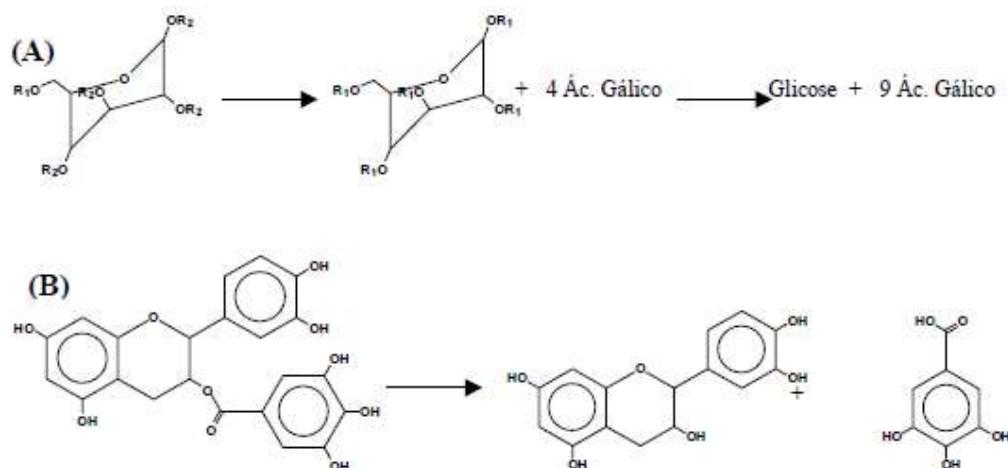


Figura 5: Modelos propostos de ação da tanase - (a): hidrólise completa do ácido tânico, r1 = ácido gálico e r2 = ácido digálico (b): hidrólise do galato de epicatequina. Fonte: LEKHA e LONSANE, 1997.

A tanase também pode atuar sobre substratos como o ácido clorogênico ou galato de catequina e epigalocatequina-3-galato. GARCIA-CONESA et. al., 2001, desenvolveram modelo de hidrólise dessa classe de substâncias no qual há a liberação de uma molécula de ácido gálico e uma de proantocianidina. Tanases também apresentam atividade hidrolítica sobre ésteres de diferulatos, embora sua eficiência seja menor que a da cinamoil esterase.

Desta forma, as tanases podem contribuir para a degradação da parede celular dos vegetais, já que seriam capazes de romper ligações cruzadas existentes entre as diferentes macromoléculas que a compõe (GARCIA-CONESA et. al., 2001).

De forma similar a outras esterases, a tanase em meio aquoso catalisa predominantemente reações hidrolíticas. Entretanto, em meios orgânicos com teores reduzidos ou nulos de água, as reações de esterificação passam a ser predominantes para o equilíbrio entre o ácido gálico e o propilgalato, conforme Figura 6 (TEWARI et. al., 1996).

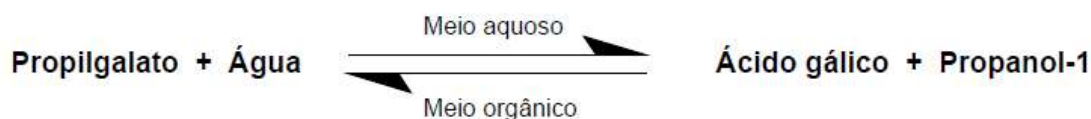


Figura 6: Conversão de propilgalato em ácido gálico pela tanase em função do meio reacional. Fonte: LEKHA e LONSANE, 1997.

2.5- Regulação da biossíntese da tanase

Existem três mecanismos regulatórios genéticos que afetam a síntese e secreção das enzimas. A indução, onde a enzima somente é sintetizada na presença de seu substrato ou análogo; a repressão catabólica, em que a síntese da enzima é inibida quando fontes de carbono de rápida assimilação estão presentes; e a repressão por produto final, em que um metabólito final ou o próprio produto da enzima inibem sua síntese (KNUDSON, 1913).

A síntese da tanase está vinculada a presença de indutor. O ácido tânico e o seu produto de hidrólise, o ácido gálico, podem induzir a síntese da tanase, sendo o ácido tânico o mais efetivo (KNUDSON, 1913). O indutor para síntese de tanase mais frequentemente utilizado é o ácido tânico, porém, trata-se de uma molécula com elevado peso molecular, carregada de grupos polares e com alta reatividade frente aos componentes da parede celular. Desta forma, sua absorção direta pelo microrganismo fica impossibilitada (LEKHA e LONSANE, 1997). SINGH e HAYASHI, 1995, sugeriram que níveis basais de tanase seriam produzidos de forma constitutiva, de modo que o ácido gálico poderia ser metabolizado e atuar como indutor. Já BRADDOO, GUPTA e SAXENA, 1996, relataram que a tanase foi produzida de forma constitutiva em fermentação submersa por *Aspergillus japonicus*, mas que tal microrganismo duplicou a síntese de enzima pela presença de ácido tânico nos meios de cultura.

2.6- Produção de tanase microbiana

Tanino acil hidrolase (TAH) pode ser obtida a partir de fontes vegetais, animais e microbianas. Está presente tanto em plantas ricas em taninos, como myrobalan (*Terminalia chebula*), divi divi (*Caesalpinia coriaria*) e babul (*Acacia arabica*), como também vir de fontes animais, extraída do intestino bovino e das mucosas dos ruminantes. Porém, o meio microbiológico é a fonte mais importante de obtenção da tanase, uma vez que as enzimas produzidas desta forma são mais estáveis do que aquelas obtidas por outros meios. Além disso, microrganismos podem produzir tanase em altas quantidades e de maneira contínua, com consequente aumento de rendimento. Adicionalmente, microrganismos podem ser submetidos a uma manipulação genética, resultando num aumento das concentrações de atividade de tanase. É importante salientar que ainda não foram executados estudos envolvendo a produção de enzima, utilizando estas técnicas (BANERJEE, 2000).

Aceita-se, em geral, que as bactérias são muito sensíveis a presença de ácido tânico, porém bactérias como *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus bovis* e *Selemonas ruminantium* são capazes de crescer neste composto e também de degradá-lo. Entretanto, os microrganismos mais estudados são os fungos filamentosos, e dentre eles os gêneros *Assochyta*, *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Fusarium* (LEKHA; LONSANE, 1997).

Apesar de vários microrganismos produzirem tanase, estas não são igualmente ativas como todos os taninos hidrolisáveis. As tanases de leveduras são efetivas somente na decomposição do ácido tânico, em contrapartida as tanases bacterianas e fúngicas são eficientes na degradação de ácido tânico e outros taninos hidrolisáveis que ocorrem na natureza (PINTO, 2003).

2.7- Produção da tanase através da fermentação

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

A produção da enzima tem sido comparada nos diferentes tipos de fermentações. Dentre elas estão a fermentação em estado sólido, a fermentação submersa e a fermentação em superfície líquida (DAMASO; COURI, 2008).

2.7.1- Fermentação em estado sólido (FES)

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

Algumas vantagens podem ser citadas para a FES em relação aos outros tipos de fermentações, como a utilização de resíduos agroindustriais, que constituem matérias-primas de baixo custo; menor gasto de energia; geralmente os meios de fermentação são mais simples (KRISHNA, 2005) e a atividade enzimática é usualmente maior (LEKHA; LONSANE, 1997). Outra vantagem da FES é a natureza extracelular da enzima produzida, que pode ser facilmente extraída pela mistura de água ou tampão com a massa fermentada, que depois de filtrada, constitui o extrato enzimático. Em outros tipos de fermentações, a enzima pode ser intracelular e o procedimento de recuperação da mesma é mais onerosa, isso porque requer etapas como lise das células para liberar a enzima, e posterior separação dos restos celulares, além da realização de todos os procedimentos em menores temperaturas para evitar a desnaturação enzimática (KRISHNA, 2005). Porém, mesmo sob as melhores condições, uma perda mínima de 15-20% da enzima ocorre devido à sua desnaturação (AGUILAR et. al., 2007). Além disso, as enzimas intracelulares são geralmente menos estáveis e mais sensíveis aos fatores ambientais do que as enzimas extracelulares (LEKHA; LONSANE, 1994). As enzimas produzidas em FES exibem atividade em maiores intervalos de pH e são mais termoestáveis (RANA; BHAT, 2005).

Apesar das vantagens da FES, esse processo também apresenta algumas desvantagens, como dificuldade na agitação do substrato, resultando em um ambiente heterogêneo; dificuldade no controle da fermentação, principalmente do acúmulo de

calor; controle da umidade do substrato; controle da aeração; dificuldade na determinação do crescimento microbiano e de outros parâmetros fermentativos (KRISHNA, 2005).

Entre os microrganismos, os fungos filamentosos são ideais e os mais adaptados para a FES. O crescimento filamentoso e a boa tolerância a condições de baixa atividade de água e alta pressão osmótica, conferem aos fungos vantagens sobre os microrganismos unicelulares na colonização de substratos sólidos e utilização adequada dos nutrientes disponíveis (MANJIT et. al., 2008). IWASHITA, 2002, foi o primeiro autor a relatar a produção de tanase por *Aspergillus oryzae* em FES. Desde então várias espécies de fungos têm sido estudadas para produção de tanase por esse tipo de fermentação.

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

2.7.2- Fermentação em Superfície Líquida (FSL)

Na fermentação em superfície líquida, o microrganismo auxiliado por um recipiente adequado, se desenvolve na superfície de um meio líquido contendo todos os nutrientes necessários ao seu crescimento (LEKHA; LONSANE, 1997). Trabalhos relatam que a atuação da tanase nesse tipo de fermentação pode ser na sua maioria intracelular, e o tempo de fermentação é maior quando comparado com os outros processos fermentativos (LEKHA; LONSANE, 1994; RANA; BHAT, 2005). Em seus experimentos, RANA E BHAT, 2005, obtiveram baixa biomassa e produção de tanase de *Asperigillus niger*, em FSL.

Esses autores concluíram que esses resultados se devem provavelmente a natureza estática desse tipo de fermentação, sem muita aeração. Isso levaria a um lento crescimento micelial e assim a indução da enzima precisaria de um longo tempo de fermentação.

Algumas desvantagens apontadas no uso da fermentação em superfície líquida para produção de metabólitos microbianos seriam também, altos custos de manutenção e o risco de contaminação (LEKHA; LONSANE, 1997).

Poucos trabalhos tratam da produção de tanase por este tipo de processo. GANGA et. al., 1977, testaram diferentes espécies de *Aspergillus* e diferentes meios de cultura, e em todos os experimentos afirmaram que a atividade da tanase foi significativamente

maior nos extratos celulares, indicando que a enzima seria preferencialmente intracelular. LEKHA et. al., 1994, observaram que a enzima é completamente intracelular nas primeiras 48 horas de fermentação, sendo excretada após esse tempo. Este método de fermentação vem se tornando inviável tecnicamente devido à baixa produtividade da enzima (PINTO, 2003).

2.7.3- Fermentação Submersa (FSm)

Na fermentação submersa, o crescimento do microrganismo ocorre como uma suspensão em meio líquido, no qual vários nutrientes são dissolvidos. São aqueles em que o microrganismo produtor se desenvolve no interior do meio de fermentação, geralmente agitado. No caso de fermentações aeróbias, o oxigênio necessário à população em desenvolvimento é suprido, através de um compressor, por borbulhamento de ar (DAMASO; COURI, 2008).

A maioria das fermentações industriais importantes são realizadas por processos submersos. Pode-se citar que uma determinante redução no preço de muitos produtos, anteriormente obtidos por processos em superfície, foi a possibilidade de adaptá-los aos processos submersos. Comparados com os processos em superfície, os processos submersos oferecem uma série de vantagens, dentre elas podemos mencionar a maior facilidade de manipulação, com maiores volumes de meio; a massa de microrganismos responsáveis pela transformação fica totalmente submersa no meio nutriente de maneira uniforme, o que pode ser ajustado para fornecer as condições ideais de crescimento e produção; e a absorção de nutrientes e excreção de metabólitos são executadas com maior eficiência, levando a menores tempos de fermentação e, conseqüentemente, melhor produtividade (DAMASO; COURI, 2008).

A produção de tanase tem sido estudada nesse tipo de fermentação e protocolos baseados neste sistema já foram patenteados (LEKHA; LONSANE, 1997). A FSm é geralmente usada para produção de enzimas microbianas, principalmente porque o controle dos parâmetros do processo e o controle da esterilização são mais fáceis nesse sistema. Porém, essa técnica é mais dispendiosa e consome mais energia, o que eleva o custo da produção dessa enzima (BANERJEE; MONDAL; PATIL, 2007).

A tanase é produzida na presença de um indutor, assim a utilização do ácido tânico como indutor ou única fonte de carbono, é fundamental. Apesar de outras fontes de carbono poderem estar presentes no meio, a concentração de ácido tânico é o fator predominante na produção de tanase. Diferentes fontes de nitrogênio, inorgânicas e

orgânicas, como sulfatos de amônio, nitrato de sódio e peptona, têm sido utilizados para a produção de tanase (PINTO, 2003).

A localização da tanase na FSm depende do tempo de cultivo. LEKHA E LONSANE, 1994, relataram que no início do processo, a enzima produzida por *Aspergillus niger* permanece principalmente no meio intracelular, e posteriormente é secretada para o meio de cultura. Contudo, acima de 80% da tanase permanece ligada ao micélio quando o máximo de sua produção é atingido (AGUILAR et. al., 2007).

2.8 - Otimização das condições para produção de tanase

A utilização de processos fermentativos para produção de tanase é influenciada por diversos parâmetros, tais como concentração de ácido tânico, umidade, tipo de substrato ou meio de cultura utilizado, temperatura, pH, tempo de incubação, concentração do inóculo, adição de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, entre outros. (BATTESTIN; MACEDO, 2007).

A otimização das condições para produção de enzimas pode ser feita através de procedimentos que variam cada parâmetro isoladamente (*one at a time*) mantendo as outras variáveis fixas (KUMAR; SHARMA; SINGH, 2007; MANJIT et. al., 2008) ou através de delineamentos experimentais associados a análise de superfície de respostas (ROCHA, 2010).

A otimização de um processo utilizando o método *one at a time* pode ser pouco eficiente, pois não detecta o efeito das interações entre as variáveis. Assim, o melhor resultado obtido fica sempre aquém do valor otimizado. Já um procedimento onde são investigadas todas as combinações possíveis entre os fatores, tem a vantagem de explorar todo o espaço experimental, porém necessita de um grande número de experimentos, o que poderia ser muito demorado e de custo muito alto. Portanto, o planejamento experimental torna-se adequado para estudar o efeito entre as variáveis, uma vez que permite explorar todo espaço experimental através da realização de um pequeno número de ensaios (RODRIGUE; IEMMA, 2005).

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

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

3- OBJETIVO GERAL

Como principal objetivo, este trabalho visa avaliar a atividade da enzima tanase produzida por fungos filamentosos previamente isolados da casca de café, bem como caracterizar tal enzima frente a distintos valores de pH e temperatura.

3.1- Objetivos específicos

- Preparar as cepas, o inóculo em meio sólido e o meio de fermentação;
- Avaliar qualitativamente a capacidade dos fungos estudados na produção de halo de hidrólise em meio sólido, enriquecido com ácido tânico;
- Produzir extratos enzimáticos brutos de tanase e quantificar a atividade enzimática da tanase pela técnica de precipitação de proteína modificada;
- Caracterizar a enzima frente a distintos valores de pH e temperatura.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Microrganismos

Neste estudo, foram utilizados fungos filamentosos previamente isolados da casca de café. As culturas foram mantidas em placas contendo o meio Ágar Batata Dextrose (BDA). Periodicamente, a cada 30 dias, estas culturas foram inoculadas em novas placas, incubadas por sete dias a 28 °C e posteriormente armazenadas a 4 °C. O meio foi preparado em meio BDA.

4.2 - Análise qualitativa de atividade tanásica

4.2.1 Determinação do índice enzimático

Para a determinação enzimática extracelular por difusão radial em meio sólido, primeiramente foi realizado o inóculo dos microrganismos em placas contendo meio sintético sólido enriquecido com ácido tânico 1% e composto por NaNO₃: 3,0 g/L; (NH₄)₂SO₄: 1 g/L; MgSO₄: 0,5g/L; KCl: 0,5 g/L; FeSO₄.7H₂O: 10 mg/L; ácido tânico: 10 g/L; ágar: 30 g/L. As placas foram incubadas durante 5 dias a 28°C. Posteriormente, foi avaliada uma relação direta entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia, expressos como índice enzimático (IE), conforme a Equação 1.

Segundo LEALEM E GASHE (1994), para considerar um microrganismo bom produtor de enzimas extracelular, o índice enzimático deve ser maior ou igual a 2.

$$IE = \frac{\varnothing h}{\varnothing c} \text{ Equação (1)}$$

Sendo:

$\varnothing c$: Diâmetro da colônia (cm);

$\varnothing h$: Diâmetro do halo (cm).

4.3 - Produção de extratos enzimáticos por fermentação submersa

Para a inoculação em meio líquido, foi retirado uma alíquota de aproximadamente 7 mm de cada cultura em questão. Em seguida, foram inoculadas em *Erlenmeyers* de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido mineral e ácido tânico como única fonte de carbono. O meio mineral foi composto de KH_2PO_4 0,7%, NaH_2PO_4 0,4%, MgSO_4 0,02%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1% e extrato de levedura 0,06% (SINGH et al, 2009, modificado) o qual foi previamente autoclavado.

Os frascos foram colocados em um agitador sob temperatura de 28 °C e rotação de 180 rpm. As amostras da fermentação foram coletadas com o auxílio de uma micropipeta, em intervalos de aproximadamente 24h durante dez dias. As mesmas foram transferidas para um microtubo tipo *ependorf*, e centrifugadas a 10.000 g durante 5 min. O extrato enzimático bruto foi obtido a partir do sobrenadante da amostra e foi encaminhado para análise posterior.

4.4 - Ensaio enzimático

4.4.1 Quantificação da atividade da enzima tanase

A atividade tanásica do extrato enzimático bruto foi quantificada utilizando a técnica de precipitação de proteína modificada (DESCHAMPS; OTUK; LEBEAULT, 1983). A mistura da reação foi formada por 250 μL de 1% de ácido tânico (em tampão fosfato 0,2M, pH 6,0), 500 μL de tampão fosfato 0,2M (pH 6,0) e 250 μL do extrato enzimático da cultura. A mistura foi incubada a 40°C durante 30 min em um banho Maria, e a reação foi parada adicionando uma solução de 1 mL de 2% de albumina de soro bovino (BSA). No controle, BSA foi adicionado à mistura antes da incubação. Todos os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 20 min, para precipitar os taninos residuais, e centrifugados a 3.000 g durante 20 min. Posteriormente, a leitura da absorbância do

sobrenadante foi feita em espectrofotômetro, Bioespectro SP 22®, a 260 nm. As absorbâncias foram comparadas com a curva padrão de ácido gálico, sendo uma unidade de enzima equivalente a quantidade de enzima que liberta 1 mol de ácido gálico por mL por min sob condições padrão de ensaio.

4.4.2 Curva padrão de ácido gálico

A curva padrão foi preparada dissolvendo 0,250 g de ácido gálico em 5 mL de etanol para um volume final de 50 mL de água destilada. Desta solução 0, 1, 2, 3, 5 e 10 mL foram adicionados em frascos volumétricos de 100 mL e diluídos até o volume final com água destilada para obter as concentrações 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,5 e 5 mg/L. As leituras das absorbâncias foram realizadas a 260 nm.

4.5 - Caracterização enzimática

4.5.1 Efeito do pH na atividade enzimática

A atividade da enzima foi estudada frente a diferentes valores de pH que variaram de 4,0 a 7,0. A variação no pH foi realizada utilizando-se o tampão fosfato 0,2 M. O ensaio foi realizado conforme descrito anteriormente, alterando-se apenas o pH do tampão na qual foi feita a reação.

4.5.2 Efeito da temperatura na atividade enzimática

A atividade da enzima foi avaliada em temperaturas que variaram de 30 a 60°C. Os ensaios foram realizados conforme descrito anteriormente, alterando-se o valor do pH da reação para o pH ótimo já encontrado, bem como a temperatura na qual a reação foi incubada.

5- RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram preparados inóculos recentes dos seis fungos filamentosos previamente isolados da casca de café. O gênero de cada cepa se encontra especificado na Tabela 3:



Figura 7: Cepas de fungos isolados da casca de café após sete dias de crescimento meio BDA.
Fonte: NATIVIDADE, 2014.

Tabela 3: Gêneros identificados dos fungos isolados da casca de café.

Isolados	Gênero
FF1-CC	<i>Fusarium</i>
FF2-CC	<i>Aspergillus</i>
FF3-CC	<i>Aspergillus</i>
FF4-CC	<i>Mucor</i>
FF5-CC	<i>Penicillium</i>
FF6-CC	<i>Cladosporium</i>

Fonte: NATIVIDADE, 2014.

5.1 - Análise qualitativa da atividade tanásica

Neste contexto, os seis fungos foram avaliados em condições laboratoriais como potenciais produtores de tanase.

Após o período de incubação dos fungos em meio sólido contendo ácido tânico 1%, verificou-se a formação de halos castanhos em volta das colônias dos isolados FF1-CC, FF2-CC, FF3-CC e FF6-CC, indicando a degradação do ácido tânico e evidenciando a atividade extracelular da enzima tanase. Os halos podem ser observados na Figura 8.

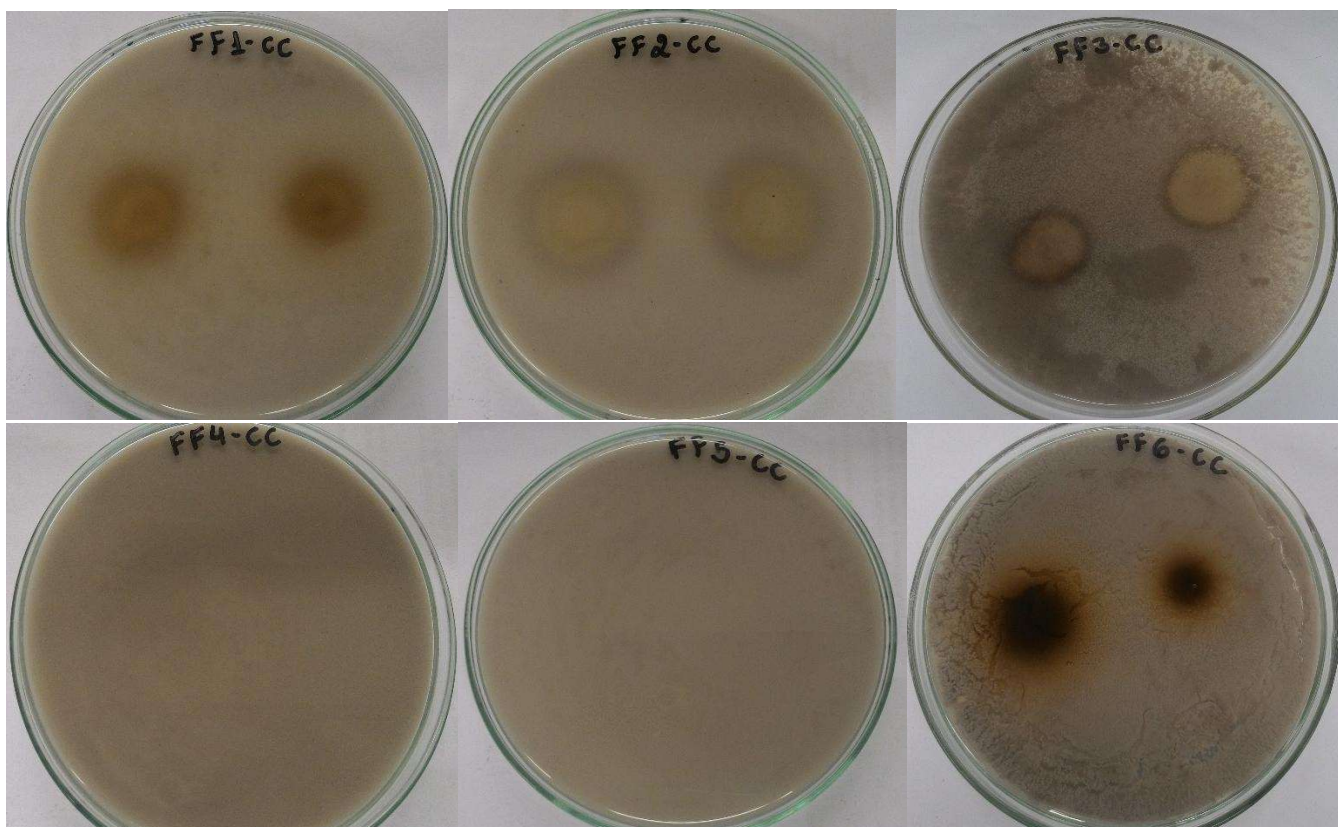


Figura 8: Cepas de fungos isolados da casca de café após crescimento em meio sólido contendo ácido Tânico 1%.
Fonte: O AUTOR, 2016.

Para considerar um microrganismo bom produtor de enzimas extracelular, o índice enzimático deve ser maior ou igual a 2. O cálculo é realizado por meio da Equação 1.

$$IE = \frac{\phi h}{\phi c} \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo:

ϕc : Diâmetro da colônia (cm);

ϕh : Diâmetro do halo (cm).

Então, depois de calculado cada índice, temos na Tabela 4 a correlação dos valores dos halos de hidrólise de cada cepa, seguido do seu respectivo índice enzimático.

Tabela 4: Valores dos halos e das colônias medidos nas placas juntamente com seu índice enzimático total.

Isolados	ϕ halo (cm)	ϕ colônia (cm)	Índice enzimático
FF1-CC	0,5	0,45	1,111
FF2-CC	0,75	0,48	1,562
FF3-CC	0,65	0,46	1,413
FF6-CC	1,05	0,40	2,625

Fonte: O AUTOR, 2016.

Logo, verificou-se apenas o microrganismo FF6-CC, *Cladosporium sp.* como um bom produtor de enzimas extracelular devido ao seu índice enzimático ser maior que 2.

5.2 – Ensaio enzimático

Foi quantificada a atividade enzimática desses fungos que apresentaram atividade extracelular da enzima tanase.

O método da fermentação submersa foi utilizado para tais estudos cinéticos, tendo como parâmetros o crescimento celular e a quantidade de enzima produzida pelos microrganismos.

Paralelamente ao experimento, fez-se a curva padrão de Ácido Gálico. A curva-padrão corresponde a relação gráfica entre os valores de absorbância e os de concentração, nesse caso, concentração de ácido gálico. Com base nessa análise gráfica é possível verificar a linearidade da reação e calcular um fator de conversão de valores de absorbância em concentração.

Os valores de concentração e absorbâncias encontrados estão listados na Tabela 5:

Tabela 5: Valores das concentrações de Ácido Gálico e suas respectivas medições da absorbância.

Concentração(mg/L)	Absorbância (nm)
0,5	0,047
1,0	0,098
1,5	0,127
2,5	0,179
5,0	0,230
8,0	0,320
11,0	0,401
15,0	0,499

Fonte: O AUTOR, 2016.

O gráfico da curva padrão foi plotado e exibido na Figura 9.

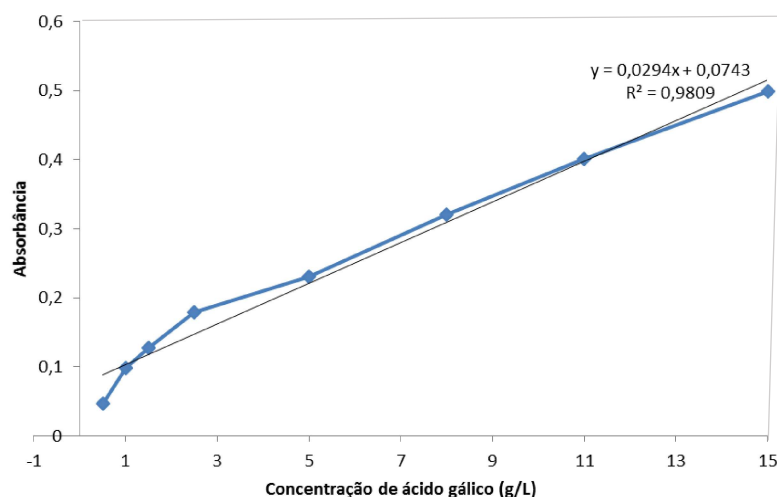


Figura 9: Curva Padrão de Ácido Gálico – Absorbância em função da concentração de Ácido Gálico (g/L). Fonte: O AUTOR, 2016.

Analisou-se separadamente a atividade da enzima tanase de cada cepa apresentada e obteve-se o resumo dos resultados mostrados na Tabela 6.

Tabela 6: Resumo dos resultados gráficos da quantidade de atividade tanásica e melhor dia de cultivo das cepas analisadas.

Cepa	Máxima atividade tanásica	Dia de cultivo
<i>Fusarium sp.</i>	1,5±0,032 U/mL	8°
<i>Aspergillus spA.</i>	1,2 ± 0,003 U/mL	5°
<i>Aspergillus spB.</i>	0,78 ± 0,04 U/mL	3°
<i>Cladosporium sp.</i>	1,17 ± 0,004 U/mL	8°

Fonte: O AUTOR, 2016.

Ao avaliar separadamente cada atividade enzimática, a determinação da mesma pelo fungo de gênero *Fusarium sp.*, pode ser observada no gráfico dado pela Figura 10.

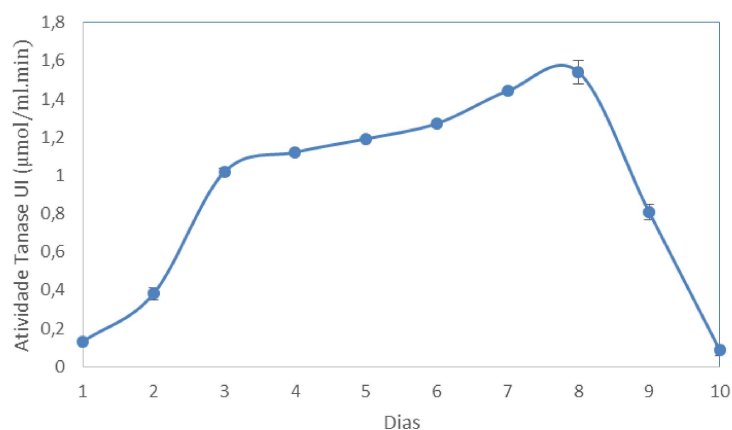


Figura 10: Produção de tanase extracelular por *Fusarium sp.* em função do tempo de cultivo. Fonte: O AUTOR, 2016.

Podemos perceber que a atividade tanásica máxima desse fungo ocorreu após 8 dias de fermentação, obtendo média de $1,5 \pm 0,032$ U/mL. Observa-se inicialmente que a enzima apresentou atividade mínima de $0,13 \pm 0,009$ U/mL logo no primeiro dia de cultivo, assim como era esperado, visto que o fungo estava em fase de adaptação ao meio. Posteriormente, o índice desta enzima exibiu um aumento significativo até o terceiro dia de cultivo, mantendo nos dias posteriores aumentos pequenos e constantes até atingir o topo máximo, oitavo dia de cultivo. Logo depois, observou-se uma queda deste índice de atividade, o que nos evidencia o oitavo dia como o pico máximo de atividade enzimática.

Comparado às demais cepas, observa-se que *Fusarium sp.* apresentou o maior desempenho frente aos parâmetros de atividade dos fungos estudados. Seu desempenho foi 20% maior que a atividade máxima observada na cepa *Aspergillus spA.*, 48% maior que a atividade de *Aspergillus spB.* e 22% maior que a atividade de *Cladosporium sp.*

Analogamente, mediu-se a atividade tanásica do fungo de gênero *Aspergillus spA.* e obteve-se o gráfico da Figura 11.

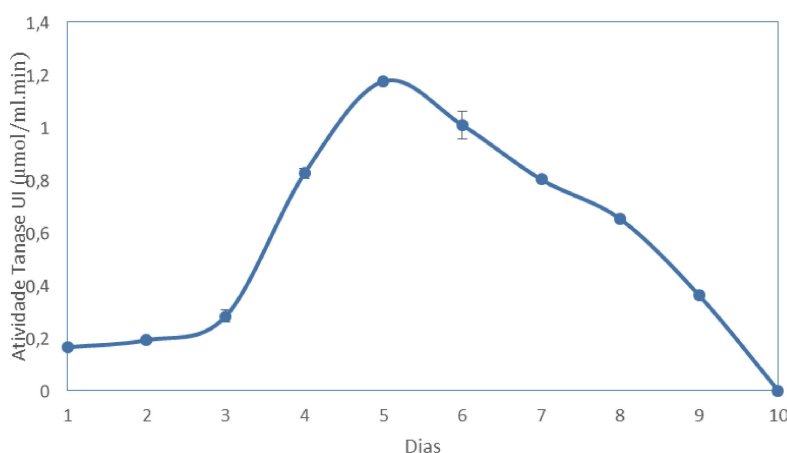


Figura 11: Produção de tanase extracelular por *Aspergillus spA.* em função do tempo de cultivo. Fonte: O AUTOR, 2016.

A máxima atividade de tanase produzida pelo fungo *Aspergillus spA.* foi alcançada após 5 dias do cultivo, apresentando um valor de $1,2 \pm 0,003$ U/mL. Percebe-se inicialmente que a enzima apresentou atividade mínima de $0,16 \pm 0,009$ U/mL logo no primeiro dia de cultivo, já que o fungo estava em fase de adaptação ao meio. Posteriormente, o índice desta enzima exibiu um pequeno e constante aumento até o terceiro dia de cultivo, apresentando significativo aumento nos dias posteriores até atingir o topo máximo, quinto dia de cultivo. Logo depois, observou-se uma queda deste índice de atividade, o que nos evidencia por sua vez, o quinto dia como o pico máximo de atividade enzimática.

Observa-se que o *Aspergillus spA*. apresentou um desempenho frente aos parâmetros de atividade 25% menor que a atividade máxima observada na cepa *Fusarium sp.*, 35% maior que a atividade de *Aspergillus spB*. e apenas 2,5% maior que a atividade de *Cladosporium sp*.

Outro gênero de *Aspergillus sp*. foi isolado e também foi avaliada sua atividade, obtivendo valores mostrados no gráfico da Figura 12.

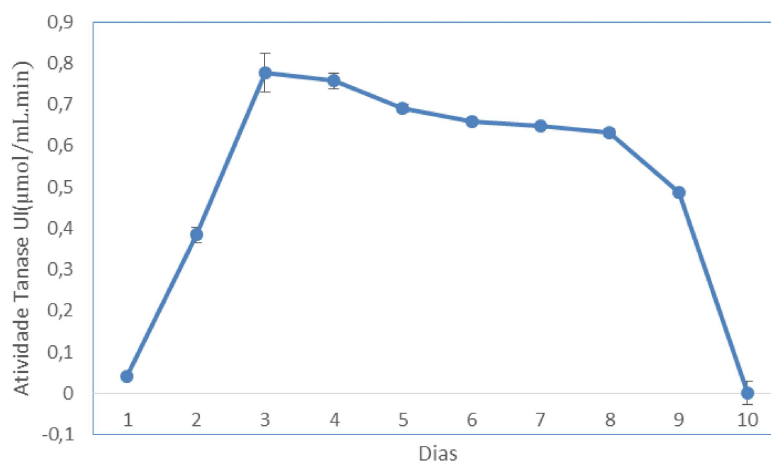


Figura 12: Produção de tanase extracelular por *Aspergillus spB*. em função do tempo de cultivo. Fonte: O AUTOR, 2016.

Este gênero apresentou atividade máxima de tanase após apenas 3 dias do cultivo, apresentando um valor de $0,78 \pm 0,04$ U/mL. Observa-se inicialmente que a enzima apresentou atividade mínima de $0,04 \pm 0,004$ U/mL logo no primeiro dia de cultivo, assim como era esperado, visto que o fungo estava em fase de adaptação ao meio. Posteriormente, o índice desta enzima exibiu um aumento significativo até o terceiro dia de cultivo, onde já atingiu o topo máximo, apenas no terceiro dia de cultivo. Nos dias posteriores, pequenas e constantes quedas foram observadas, o que nos evidencia o terceiro dia como o pico máximo de atividade enzimática.

Neste caso observa-se que esta cepa apresentou o menor desempenho frente aos parâmetros de atividade dos fungos estudados, tal produção foi 92% menor que a atividade máxima observada na cepa *Fusarium sp.*, 53,8% menor que a atividade de *Aspergillus spA*. e 50% menor que a atividade de *Cladosporium sp*.

De acordo com a literatura, COSTA, 2012, chegou a obter valores semelhantes, porém inferiores, para *Aspergillus sp*. tendo também a casca de café como substrato. Neste caso o valor obtido foi de 0,36 U/mL. Já MACEDO; MATSUDA; BATTESTIN, 2005, apresentaram valores da ordem de 0,275 U/mL de *Aspergillus niger* ainda em casca

de café. E por sua vez, RIUL, 2011 encontrou valores de 0,42 U/mL para *Aspergillus phoenicis*, utilizando-se folhas de caju e chá verde como fonte de carbono.

Por fim foi medida a atividade tanásica do fungo de gênero *Cladosporium sp.*, e foram encontrado os valores plotados no gráfico da Figura 13.

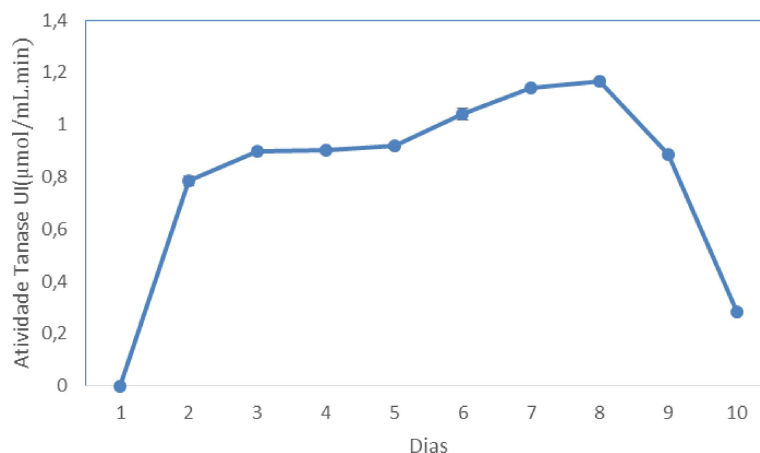


Figura 13: Produção de tanase extracelular por *Cladosporium sp.* em função do tempo de cultivo. Fonte: O AUTOR, 2016.

O *Cladosporium sp.* obteve atividade máxima de $1,17 \pm 0,004$ U/mL no seu oitavo dia de cultivo. Observa-se inicialmente que a enzima não apresentou atividade no primeiro dia de cultivo, visto que o fungo estava em fase de adaptação ao meio. Posteriormente, o índice desta enzima exibiu um aumento significativo até o segundo dia de cultivo, mantendo nos dias posteriores aumentos pequenos e constantes até atingir o topo máximo, oitavo dia de cultivo. Logo depois, observou-se uma queda deste índice de atividade, o que nos evidencia o oitavo dia como o pico máximo de atividade enzimática.

Observa-se que *Cladosporium sp.* apresentou um desempenho frente aos parâmetros de atividade 28% menor que a atividade máxima observada na cepa *Fusarium sp.*, apenas 2,5% menor que a atividade de *Aspergillus spA.* e 33% maior que a atividade de *Aspergillus spB.*

Analisando, por fim, as curvas de um modo geral, percebe-se que a curva da cepa *Cladosporium sp.* apresentou uma semelhança maior com a curva de *Fusarium sp.* Seus dias de maiores desempenho foram detectados no final do experimento, oitavo dia de cultivo. Em contra partida, as cepas *Aspergillus spA* e *Aspergillus spB.* apresentaram maiores desempenho entres os dias 3 e 5 de cultivo.

Utilizando o mesmo resíduo agroindustrial, MACEDO, 2005 testou a produtividade da enzima tanase em meios de cultura contendo 0,5% e 1,5% de ácido tânico. Foi relatado que a produção da enzima mostrou estar diretamente relacionada com

a variação de parâmetros como temperatura, pH e concentração de ácido tânico, que é adicionado ao meio de fermentação. Tais parâmetros e principalmente a fonte de carbono, favorece a produção rápida de tanase, que por sua vez, cliva os taninos fornecendo suprimento contínuo de fonte de carbono. De acordo com BAJPAI, 1997; LEKHA; LONSANE, 1997 e PINTO, 2003, o ácido tânico fornece o papel de fonte de carbono para o microrganismo, bem como de indutor da síntese. Dessa maneira, a presença de ácido tânico é imprescindível para a síntese de tanase. Em trabalho realizado por PINTO, 2003, em experimento preliminar no qual não se adicionou ácido tânico ao meio de fermentação, não foi observada atividade da enzima tanase em nenhum tempo de fermentação. Percebe-se então, que o trabalho em questão, tendo como uso temperatura e pH fixos, assim como concentração de ácido tânico 1%, possivelmente não apresentou condições ideais de produção, podendo exibir maiores atividades se testados futuramente em ótimas condições.

Então, em vista disso, foi realizada a caracterização da tanase frente a dois parâmetros fixos utilizados na reação para quantificação da mesma, o pH e a temperatura.

5.3 - Caracterização da enzimas tanase

5.3.1 Efeito do pH na atividade enzimática

O pH possui papel essencial nas reações de hidrólise catalisadas por enzimas. Sua variação pode ser relacionada a possíveis alterações do estado de ionização, mudanças conformacionais e dissociação da enzima no meio reacional, levando à perda na função da enzima até se tornar inativa (SIMÕES et. al., 2011).

Na caracterização enzimática do fungo de gênero *Fusarium sp.*, a cepa de melhor desempenho em relação a enzima, dois parâmetros foram analisados, o pH e a temperatura. Os dados obtidos sob diferentes valores de pH nos ensaios de caracterização da atividade estão representados na Tabela 7.

Tabela 7: Atividade enzimática da tanase obtida a partir do fungo *Fusarium sp.* em diferentes valores de pH.

pH	Atividade Tanásica (U/mL)
4	1,14±0,013
5	1,88±0,009
6	1,50±0,011
7	0,96±0,019
8	0,89±0,023

Fonte: O AUTOR, 2017.

Por sua vez, a Figura 14 apresenta graficamente a influência do pH na atividade enzimática tanásica.

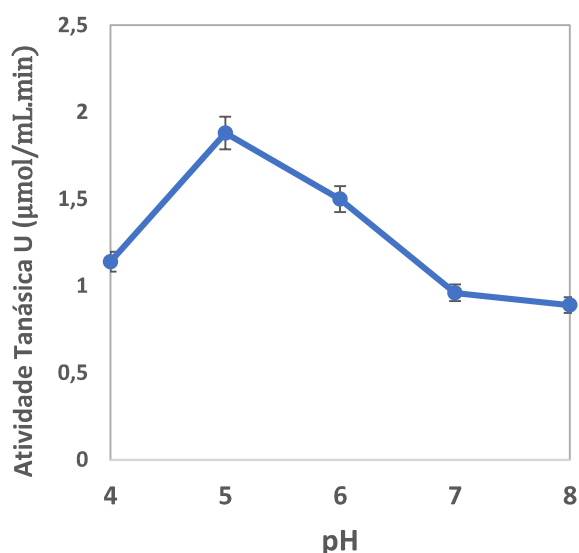


Figura 14: Caracterização da tanase em distintas variações de pH. Fonte: O AUTOR, 2017.

Pode-se observar analisando a Tabela 7 e a Figura 14, que a tanase presente no extrato enzimático apresentou atividade máxima de $1,88 \pm 0,009$ U/mL no pH ideal 5,0. Sendo observado também, um grande decaimento da atividade enzimática em valores de pH superiores ao 6.

De acordo com a literatura, segundo LEKHA; LONSANE,1997, as tanases são proteínas ácidas com pH ótimo em torno de 5,5. Da mesma forma SABU et. al. 2005, também descreveram um pH ótimo de 5,5 para a produção de tanase por *Aspergillus niger*.

5.3.2 Efeito da temperatura na atividade enzimática

A influência da temperatura na cinética da reação enzimática se deve aos aumentos de velocidade de reação. A velocidade da reação em questão aumenta, uma vez que mais moléculas adquirem energia suficiente para atingir o estado de transição. Esse efeito é observado em um intervalo de temperatura compatível com a manutenção da estrutura espacial da enzima (FEITOSA, 2009).

A Tabela 8 apresenta a atividade enzimática da tanase em distintos valores de temperatura, assim como o gráfico da Figura 15.

Tabela 8: Atividade enzimática da tanase obtida a partir do fungo *Fusarium sp.* em diferentes valores de temperatura.

Temperatura	Atividade Tanásica (U/mL)
30	1,44±0,006
40	1,61±0,019
50	1,40±0,021
60	1,36±0,012

Fonte: O AUTOR, 2017.

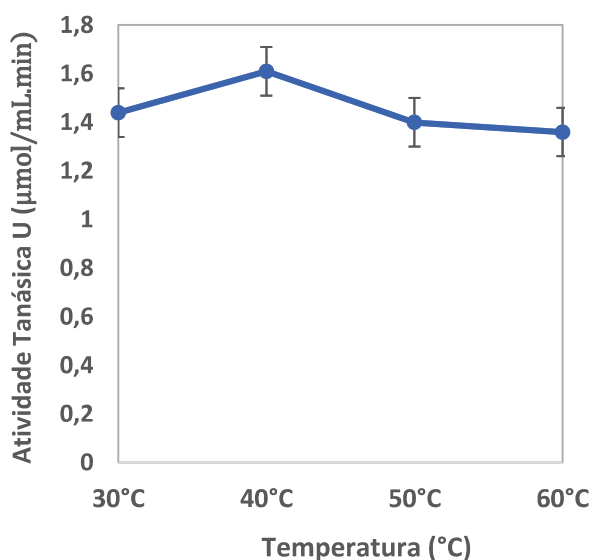


Figura 15: Caracterização da tanase em distintas variações de temperatura. Fonte: O AUTOR, 2017.

Por sua vez, analisando a Tabela 8 e a Figura 15 é possível perceber que a tanase presente no extrato enzimático exibiu atividade máxima de $1,61 \pm 0,019$ U/mL na

temperatura ideal de 40°C.

De acordo com a literatura, PINTO, 2003 observou temperatura ótima entre 32 e 40°C utilizando *Aspergillus niger*. Da mesma forma, em trabalhos de PINTO, 2003 uma temperatura ótima de 40°C foi observada em *Aspergillus caespitosum*, *Penicillium charlesii* e *Penicillium crustosum*.

6. CONCLUSÕES

Dos seis fungos de gêneros *Fusarium sp.*, *Aspergillus spA.*, *Aspergillus spB.*, *Penicillium sp.*, *Mucor sp.* e *Cladosporium sp.* previamente isolados de uma fonte lignocelulósica, a casca de café, quatro deles apresentaram produção de enzima extracelular. *Fusarium sp.*, *Aspergillus spA.*, *Aspergillus spB.* e *Cladosporium sp.* obtiveram degradação do ácido tânico evidenciando a atividade extracelular da enzima tanase, quando incubados em meio sólido contendo ácido tânico 1%. Porém, *Cladosporium sp.*, apresentou melhor produção da enzima extracelular, obtendo índice enzimático maior que 2.

Ao produzir o extrato bruto de tanase e quantificar a atividade enzimática de cada cepa, percebeu-se que tais fungos apresentaram atividade tanásica promissora após 8, 5, 3 e 8 dias de fermentação, respectivamente. Foi evidenciado que a cepa *Fusarium sp.* apresentou melhor desempenho frente aos parâmetros de atividade tanásica, obtendo média de $1,5 \pm 0,032$ U/mL.

Visando alcançar condições ótimas de atividade, foi realizada a caracterização da enzima em estudo. Esta exibiu pH ótimo de 5,0 com atividade de $1,88 \pm 0,009$ U/mL e temperatura ótima de 40°C com atividade de $1,61 \pm 0,019$ U/mL.

7. PERSPECTIVAS PARA FUTUROS TRABALHOS

Futuros trabalhos serão necessários para a recuperação da enzima produzida, ou seja, avaliação da atividade intracelular da mesma; a caracterização desta frente a variações de mais parâmetros fermentativos, como concentração de indutor, fontes de gás carbônico e oxigênio, visando alcançar condições ainda melhores atividades. Bem como realizar a imobilização da tanase, almejando futuras aplicações nos mais diversos bioprocessos existentes.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, C. N. et al. Microbial tannases: advances and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 76, n. 1, p. 47-59, Aug. 2007.
- AGUILAR, C. N.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G. Review sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. **Food Science and Technology International, London**, v. 7, p. 373–382, 2001.
- BAJPAI, B.; PATIL, S. Induction of tannin acyl hidrolase (EC 3.1.1.20) activity in some members of fungi imperfecti. **Enzyme Microb. Technol.** v.20, p.612-614, 1997.
- BANERJEE, D.; KAR, B. Biosynthesis of tannin acyl hydrolase from tannin-rich forest residue under diferente fermentation conditions. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** v.25, 29-38, 2000.
- BARCELOS, A.F.; PAIVA, P.C.A.; PÉREZ, J.R.O.; DOS SANTOS, V.B. Fatores antinutricionais da casca e polpa desidratada de café (*Coffea arabica* L.) armazenadas em diferentes períodos. **Food Science and Technology International, London**, v. 12, p. 420–470, 2003.
- BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A. Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by *Paecilomyces variotii*. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 10, n. 2, Apr. 2007a.
- BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. **Bioresource Technology, Essex**, v. 98, p. 1832–1837, 2007b.
- BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.15, n.1, p. 63-72, 2004.
- BEVERINI, M.; METCHE, M. Identification, purification and physicochemical properties of tannase of *Aspergillus oryzae*. **Sciences des Aliments**, Paris, v. 10, p. 807–816, 1990.
- BHAT, K.T.; SINGH, B.; SHARMA, P. O. Microbial degradation of tannins – a current perspective. **Biodegradation**, V.9, P.343-357, 1998.
- BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia - Produção, Aplicações e Mercado**. 1a. Edição - 2008
- BRADDOO, S.; GUPTA, R.; SAXENA, R.K. Screening of extracellular tannase producing fungi: development of a rapid and simple plate assay. **Journal of general and applied microbiology**, V. 42, P. 325-329, 1996.
- DAMASO, M. C. T.; COURI, S. Fermentação. **Agência EMBRAPA de informação tecnológica. Brasília, 2008**.
- DESCHAMP, A., OTUK, G. and LEBEAULT, J. (1983). Production of tannase and degradation of chestnut tannin by bacteria. **J. Ferment. Technol.** 61,55-59.

DESPHANDE, S.S. CHERYAN, M.SALUNKHE, D.K. Tannin analysis of foods products. **Crc crit. rev. food sci. nutr.**, V.24. P. 401-449, 1986.

FEITOSA, I.C. Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa. **Dissertação (mestrado em engenharias de processos) – Universidade Tiradentes, 2009.fellows, P. Tecnologia del Procesado de Los Alimentos: Principios e Práticas**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994. p.172-177.

GANGA, P.S.; NANDY, S.C.; SANTAPPA, M. Effect of environmental factors on the production of fungal tannase. **Laether Sci.**, v.24. p.8-16, 1977.

GONÇALVES, H. B. Produção de tanases por *Emericella nivea*: purificação e caracterização bioquímica. 116 f. **Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"**, Araraquara, 2010.

GARCIA-CONESA, M.T.; OSTERGAARD, P.; KAUPPINEN, S.; WILLIANSON, G. Hydrolisis of diethyl diferulates by a tannase from *Aspergillus oryzae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, p. 319-324. 2001.

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

IWASHITA, K. Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 94, p. 530-535, 2002.

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

KNUDSON, L. Tannic acid fermentation. **Journal of biological chemistry**, V. 14, N. 3, P. 159-184, 1913.

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

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems: an overview. **Critical reviews in biotechnology**, boca raton, V. 25, P. 1-30, 2005.

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

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

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

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. Volume 2- Engenharia Bioquímica. 2001

MAIA, C. C. R. Estudo sobre fungos filamentosos com atividade lignocelulolítica a partir do grão de café em coco. 47 f. **TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Bioprocessos, Universidade Federal de São João Del -Rei**, Ouro Branco, 2013.

MACEDO, G. A.; MATSUDA, L. K.; BBATTESTIN, V. Seleção de Fungos Produtores de Tanase em Resíduos Vegetais Ricos em Taninos. **Ciênc. agrotec**, Lavras, v. 29, n. 4, p. 833-838, jul./ago., 2005

MANJIT, K. S. ET AL. Tannase production by *aspergillus fumigatus* ma under solid-state fermentation. **World journal of microbiology & biotechnology**, oxford, V. 24, N. 12, P. 3023-3030, 2008.

MORANDI, M.A.B.; POMELLA, A.W.V.; SANTOS, E.R.; FERNANDES, M.; CAOVIOLA, L.E.; FERNANDES, A.O. Selection of Trichoderma spp. isolates to control the bean white-mold fungus Sclerotinia sclerotiorum in winter crops. **IOBC/WPRS Bulletin**, v. 30, p. 79-82, 2007.

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

NATIVIDADE, F. P. Isolamento de Fungos com Atividades Enzimáticas de Interesse Biotecnológico a partir da Casca de Café. **Trabalho de Conclusão de Curso apresentado em cumprimento às exigências do Curso de Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João del-Rei**. Ouro Branco, 2014

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R. e ROUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochem. Eng. J.**, 6:153–162. 2000.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 22, p. 189-259, 2004.

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

PINTO, G.A.S. Produção de Tanase por *Aspergillus niger*. 2003. 213f. **Tese (Doutorado)-UFRJ**, Rio de Janeiro, 2003.

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

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

RATHINAVELU, R.; GRAZIOSI, G. Uso Alternativo potencial de detritos e subprodutos do café. **ICS-UNIDO**, Org. Intern. do Café. Trieste, 2005.

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

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

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

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

SABU, A. et al. Tamarind seed powder and palm Kernel cake: two novel agro residues for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* ATCC 16620. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, p. 1223-1228, 2005.

SANTOS, M. Caracterização química das folhas de brócoli e couve- flor (*Brassica oleracea* L.) para utilização na alimentação humana. **Dissertação de mestrado, UFLA**, Lavras, MG. 2000.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.

SINGH, A.; HAYASHI, K. Microbialcellulase-protein architecture, molecularproperties and biosynthesis. **Advances in applied microbiology**; V. 40, P. 1-44, 1995.

SINGH, A.; SRIVASTAVA, S.; SINGH, H.B. Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases. **Bioresource Technology**, v.98, p.470-473, 2007.

SOCOL, C.R. Resíduo de Café um Substrato Promissor para a Produção Industrial de Bioprodutos com Alto Valor Agregado. **I Simp. de Pesq. dos Cafés do Brasil**. Poços de Caldas, 2000.

SRINIVASAN, K. et al. Efficient production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis*, in a repeated batch culture. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 91, p. 153-158, 2001.

SUTO, M.; TOMITA, F. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 92, p. 305-311, 2001.

TEWARI, Y.B.; SCHANTZ, M.M.; REKHARSKY, M.V.; GOLDBERG R.N. Thermodynamics of hydrolysis of 3,4,5-trihydroxybenzoic acid propyl ester (n-propylgallate) to 3,4,5-trihydroxybenzoic acid (gallic acid) and propan-1-ol in aqueous media and in toluene. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 28, p. 171-185, 1996.

VARGAS, E.; CABEZAS, M.T.; MURILO, B.; BRAHAM, E.J. BRESSANI, R. Efecto de altos niveles de pulpa de café deshidratada sobre el crecimiento y adaptación de novillos jóvenes. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 32(4), p. 972-989.