

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**APLICAÇÃO DE CASCAS DE EUCALIPTO NA PRODUÇÃO DE TANASES POR  
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

**ANA CAROLINY FERREIRA PIROLA**

ALEGRE, ES

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**APLICAÇÃO DE CASCAS DE EUCALIPTO NA PRODUÇÃO DE TANASES POR  
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

**ANA CAROLINY FERREIRA PIROLA**

ALEGRE, ES

2020

**Ana Caroliny Ferreira Pirola**

**APLICAÇÃO DE CASCAS DE EUCALIPTO NA PRODUÇÃO DE TANASES POR  
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Engenharia Química.

Área de Concentração: Engenharia Química

Linha de Pesquisa: Materiais, Bioprocessos e Meio Ambiente

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Iara Rebouças Pinheiro

Coorientador: Prof. Dr. Fabricio Gomes Gonçalves

ALEGRE, ES

MARÇO/2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

P671a Pirola, Ana Caroliny Ferreira, 1993-  
Aplicação de cascas de eucalipto na produção de tanases por fermentação em estado sólido / Ana Caroliny Ferreira Pirola. - 2020.  
73 f. : il.

Orientadora: Iara Rebouças Pinheiro.  
Coorientador: Fabricio Gomes Gonçalves.  
Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Biotecnologia. 2. Enzimas. 3. Fermentação. 4. Reaproveitamento. I. Pinheiro, Iara Rebouças. II. Gonçalves, Fabricio Gomes. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 66.0

---



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS- CAMPUS ALEGRE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA - PPEQ

---

Ata da sessão da trigésima quinta defesa de Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PPEQ), do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, da discente **Ana Caroliny Ferreira Pirola**, candidata ao título de Mestre em Engenharia Química, realizada às 14 h do dia vinte e cinco de março do ano dois mil e vinte, por webconferência, em conformidade com a Portaria Normativa 03 da PRPPG/UFES de 17/03/2020. A presidente da Banca, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iara Rebouças Pinheiro, apresentou os demais membros da comissão examinadora, constituídos pelos Doutores Fabrício Gomes Gonçalves (Coorientador - UFES), Damaris Guimarães (Examinadora interna - PPEQ) e Juarez Benigno Paes (Examinador Externo - UFES). Em seguida, cedeu a palavra à candidata que, em trinta minutos, apresentou sua Dissertação intitulada "**Aplicação de cascas de eucalipto na produção de tanases por fermentação em estado sólido**". Terminada a apresentação da aluna, o presidente retomou a palavra e a cedeu aos membros da Comissão Examinadora, um a um, para procederem à arguição. O presidente convidou a Comissão Examinadora a se reunir em sessão secreta para deliberação. Ao final, a Comissão Examinadora retornou e o presidente informou aos presentes que a Tese havia sido **aprovada** e que o aluna deve providenciar dentro do período de 03 (três) meses, a versão final da Tese. O Presidente, então, deu por encerrada a sessão, e eu, Luina Ribeiro Noia, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, lavrei a presente ata, que é assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Alegre, 25 de março de 2020.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iara Rebouças Pinheiro  
Universidade Federal do Espírito Santo – Orientador

---

Prof. Dr. Fabrício Gomes Gonçalves  
Universidade Federal do Espírito Santo – Coorientador

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Damaris Guimarães  
Universidade Federal do Espírito Santo – Examinadora Interna

---

Prof. Dr. Juarez Benigno Paes  
Universidade Federal do Espírito Santo – Examinador Externo



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
IARA REBOUCAS PINHEIRO - SIAPE 1749592  
Departamento de Engenharia Rural - DER/CCA  
Em 25/03/2020 às 17:46

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/13086?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
DAMARIS GUIMARAES - SIAPE 2306518  
Departamento de Engenharia Rural - DER/CCA  
Em 25/03/2020 às 18:33

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/13093?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
FABRICIO GOMES GONCALVES - SIAPE 1541375  
Departamento de Ciências Florestais e da Madeira - DCFM/CCAE  
Em 25/03/2020 às 21:27

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/13098?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
JUAREZ BENIGNO PAES - SIAPE 336984  
Departamento de Ciências Florestais e da Madeira - DCFM/CCA  
Em 31/03/2020 às 17:04

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/13716?tipoArquivo=O>

## AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, pela minha vida, por tudo que sou e que tenho, pela oportunidade de expandir os meus conhecimentos e por sempre abençoar a minha vida me guiando por caminhos de luz.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo apoio financeiro concedido.

À professora Dr.<sup>a</sup> Iara Rebouças Pinheiro pela orientação, disponibilidade, confiança depositada e pela generosidade na transmissão de todo o seu conhecimento.

Ao professor Dr. Fabricio Gomes Gonçalves pela coorientação, dedicação e por todo apoio para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Laboratório de Biodeterioração e Proteção da Madeira (LBPM) e ao Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Doenças e Pragas (NUDEMAFI) por ceder os micro-organismos utilizados nos experimentos deste estudo, e todas as informações pertinentes.

Ao Laboratório de Bromatologia pela infraestrutura cedida para a realização de análises.

À Flaviane Mendonça Ambrozim, Técnica do Laboratório de Engenharia Química, pela amizade e disponibilidade a qualquer momento, por me ajudar em todas as etapas do desenvolvimento deste estudo, contribuindo com o seu conhecimento e dividindo comigo todos os sentimentos envolvidos na elaboração da pesquisa.

Ao Pedro Henrique Fonseca Rabelo, Técnico do Laboratório de Engenharia Química, por toda ajuda e apoio.

Aos professores da Pós-Graduação, Dr. Michel Picanço Oliveira, Dra. Damaris Guimarães e Dr. Sérgio Henriques Saraiva pela dedicação e comprometimento com a qualidade e excelência do ensino.

Aos professores membros da banca examinadora desta pesquisa, Dra. Damaris Guimarães e Juarez Benigno Paes por aceitarem o convite e pelas brilhantes considerações que engrandeceram este estudo e guiaram a elaboração final deste trabalho.

Aos meus pais, Silvana e Delair, pelo incentivo, credibilidade, amor, confiança, pelo apoio incondicional que sempre me proporcionam e por não medirem esforços para me ver feliz e realizada. Vocês são a minha base, meu porto seguro. Amo muito vocês!

Ao meu namorado Bernard, pela paciência, compreensão, amor, apoio, amizade e por estar sempre ao meu lado, em qualquer circunstância. Obrigada por tudo! Te amo muito.

Aos meus amigos Dantara, Jean, Marcos e Grazielle por compartilharem comigo todas as conquistas, alegrias, angústias, ansiedade, e por todo incentivo e suporte.

A todos aqueles que, apesar de não terem sido citados, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“A persistência é o caminho do êxito.”

(Charles Chaplin)

## RESUMO

PIROLA, Ana Caroliny Ferreira. **Aplicação de cascas de eucalipto na produção de tanases por fermentação em estado sólido**. 2020. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES. Orientadora: Iara Rebouças Pinheiro. Coorientador: Fabricio Gomes Gonçalves.

A tanase é uma enzima industrialmente importante e possui diversas aplicações nas indústrias de alimentos, rações animais, bebidas, farmacêuticas e químicas. Pode ser obtida de fontes animais, vegetais e microbianas, sendo o meio microbiológico a principal fonte de obtenção desta enzima. Dentre os micro-organismos, os fungos se destacam na produção de tanases em função da sua versatilidade na hidrólise de diferentes tipos de taninos. Os objetivos deste trabalho foram a seleção entre os fungos *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. e *Fusarium oxysporum* para determinar o melhor produtor de tanase; produção da enzima por fermentação em estado sólido (FES) com uso de casca de eucalipto (CE) e farelo de trigo (FT) como substratos; e análises estatísticas para otimização da produção. O fungo *Penicillium* sp. foi selecionado para os ensaios de produção de tanase nas diferentes condições de cultivo em FES. A otimização das condições da FES foi realizada por meio de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), a partir do estudo da influência do teor de umidade, da proporção de CE e FT e da concentração de ácido tânico na atividade enzimática de tanase. Conforme o modelo de regressão gerado no DCCR, a atividade enzimática máxima de tanase foi de 26,57 U.gms<sup>-1</sup>, na condição de 80% de umidade em base úmida, 50% de CE e 50% de FT, e concentração de 25,00 g.L<sup>-1</sup> de ácido tânico. Portanto, a casca de eucalipto pode ser transformada em um produto com alto valor agregado, visto que foi um substrato promissor para a produção de tanases por FES.

**Palavras-chave:** *Penicillium* sp., enzima, taninos, resíduo lignocelulósico.

## ABSTRACT

PIROLA, Ana Caroliny Ferreira. **Eucalypts bark application in the tannases production by solid state fermentation**. 2020. Dissertation (Master degree in Chemical Engineering) – Federal University of Espírito Santo, Alegre, ES. Adviser: Iara Rebouças Pinheiro. Co-adviser: Fabricio Gomes Gonçalves.

Tannase is an industrially important enzyme and has several applications in the food, animal feed, beverage, pharmaceutical and chemical industries. It can be obtained from animal, vegetable and microbial sources, being the microbiological medium main source of this enzyme obtaining. Among microorganisms, fungi stand out in the tannase production due to their versatility in hydrolysis of tannins different types. Objectives of this work were selection among fungi *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. and *Fusarium oxysporum* to determine the best tannase producer; enzyme production by solid state fermentation (SSF) with use of eucalyptus bark (EB) and wheat bran (WB) as substrates; and statistical analysis for production optimization. *Penicillium* sp. was selected for the tannase production tests under the different cultivation conditions in SSF. SSF conditions optimization was carried out through a Central Composite Rotational Design (CCRD), from study the influence of moisture content, EB and WB proportion and tannic acid concentration on the tannase enzymatic activity. According to regression model generated in CCRD, the maximum tannase enzymatic activity was  $26.57 \text{ U.gms}^{-1}$ , under the condition 80% moisture on a wet basis, 50% EB and 50% WB, and tannic acid concentration of  $25.0 \text{ g.L}^{-1}$ . Therefore, eucalypt bark can be transformed into a product with high added value, since it was a promising substrate for the tannases production by SSF.

**Keywords:** *Penicillium* sp., enzyme, tannins, lignocellulosic residue.

## LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

Ag – prata

ANOVA – análise de variância

$A_w$  – atividade de água

Ba – bário

BC – bagaço de cana

Br - bromo

Ca – cálcio

CC – casca de cacau

CE – casca de eucalipto

Co – cobalto

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – cloreto de cobalto hexa-hidratado

$C_{\text{susp}}$  – concentração de esporos da suspensão

Da – Dalton

$D_a$  – fator de diluição

DCCR – delineamento composto central rotacional

$\text{esp.g}^{-1}$  – esporos por grama

$\text{esp.mL}^{-1}$  – esporos por mililitro

Fe – ferro

FES – fermentação em estado sólido

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – sulfato ferroso hepta-hidratado

FSL – fermentação em superfície líquida

FS – fermentação submersa

FT – farelo de trigo

$\text{g.L}^{-1}$  – grama por litro

Hg – mercúrio

KCl – cloreto de potássio

kDa – kiloDaltons

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  – fosfato de potássio monobásico

$K_2HPO_4$  – fosfato dipotássico

M – massa total do meio fermentativo

Mg – magnésio

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$  - sulfato de magnésio hepta-hidratado

$\mu L$  - microlitro

mM – milimolar

$MnSO_4$  – sulfato de manganês

$m_{ss}$  – massa de solução salina

m:v – massa por volume

N – número médio de esporos nos campos medidos

NaCl – cloreto de sódio

$(NH_4)_2SO_4$  – sulfato de amônio

$NaNO_3$  – Nitrato de sódio

nm – nanômetro

$^{\circ}C$  – graus Celsius

OH – hidroxila

PDA – Potato dextrose ágar

p:v – peso por volume

rpm – rotações por minuto

$S_2O_3$  – tiosulfato

TAH - tanino acil hidrolase

U – umidade

$U \cdot gms^{-1}$  - unidade de atividade enzimática por grama de massa seca

$U \cdot mL^{-1}$  – unidade de atividade enzimática por mililitro

$V_{campo}$  – volume de cada campo

$V_{ss}$  – volume de solução salina

Zn – zinco

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  - sulfato de zinco hepta-hidratado

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição e evolução da área com plantios de eucalipto distribuída por estado. ....	25
Figura 2 - Fórmulas estruturais dos galotaninos e elagitaninos. ....	27
Figura 3 - Fórmulas estruturais: a) flavonoide genérico, b) flavan-3-ol e c) procianidina. ....	28
Figura 4 - Fórmulas estruturais: (a) ácido tânico, (b) ácido chebulínico, (c) ácido m-digálico e (d) ácido metil galato. ....	29
Figura 5 - Esquema da câmara de Neubauer. ....	42
Figura 6 - Esquema das etapas de determinação da atividade enzimática da tanase. ....	48
Figura 7 - Esquema da curva de calibração de ácido gálico. ....	49
Figura 9 - Cultivos das linhagens (a) <i>P. chrysosporium</i> , (b) <i>A. niger</i> , (c) <i>Penicillium</i> sp. e (d) <i>F. oxysporum</i> em placas de Petri e os seus respectivos estoques em frascos Erlenmeyers. ....	51
Figura 10 - Comparação entre as cascas de eucalipto de Nova Almeida (Ambiente A) e de Montezuma (Ambiente B) na produção de tanases. ....	53
Figura 11 - Superfície de resposta para avaliação da atividade enzimática em função da interação entre as variáveis umidade e proporção de casca de eucalipto (CE). ..	61
Figura 12 - Curva de nível para avaliação da atividade enzimática em função da interação entre as variáveis umidade e proporção de casca de eucalipto (CE). .....	61
Figura 13 - Superfície de resposta para avaliação da atividade enzimática em função da interação entre as variáveis umidade e concentração de ácido tânico. ....	62
Figura 14 - Curva de nível para avaliação da atividade enzimática em função da interação entre as variáveis umidade e concentração de ácido tânico. ....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Micro-organismos produtores da tanase empregando diferentes substratos e condições de cultivo e seus respectivos resultados. ....	34
Tabela 2 - Composição da solução salina.....	41
Tabela 3 - Níveis das variáveis estudadas no delineamento composto central rotacional.....	50
Tabela 4 - Concentração de esporos da suspensão para cada fungo testado. ....	51
Tabela 5 - Seleção de fungos produtores de tanases pelo método de ensaio em placa de Petri.....	52
Tabela 6 - Atividade enzimática máxima produzida pelos fungos em estudo. ....	54
Tabela 7 - Produção de tanases por diferentes fungos em até 120 horas de fermentação. ....	55
Tabela 8 - Comparação entre as análises qualitativa e quantitativa dos fungos. ....	56
Tabela 9 - Atividades enzimáticas obtidas nos experimentos com as cascas de eucalipto e de café. ....	57
Tabela 10 - Atividades enzimáticas de tanase obtidas no planejamento experimental para a fermentação em 72 horas de cultivo. ....	58
Tabela 11 - Tabela dos efeitos dos fatores e da interação mantidos no modelo estatístico. ....	59
Tabela 12 - ANOVA resultante do planejamento experimental para otimização da atividade da tanase. ....	60

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
2.1.	Objetivo Geral	23
2.2.	Objetivos Específicos	23
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>25</b>
3.1.	O Eucalipto no Brasil	25
3.2.	Taninos	26
3.3.	Enzima Tanase	28
3.3.1.	<i>Propriedades da tanase</i>	29
3.3.2.	<i>Aplicações industriais da enzima tanase</i>	30
3.3.3.	<i>Produção da tanase</i>	33
3.3.4.	<i>Fermentação em estado sólido</i>	36
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>41</b>
4.1.	Micro-organismos e Preparação do Inóculo	41
4.2.	Seleção Qualitativa dos Fungos Produtores de Tanase	43
4.3.	Substratos	43
4.4.	Análise da Influência do Teor de Extrativos na Atividade Enzimática da Tanase Produzida por FES	44
4.5.	Produção de Tanases por Fermentação em Estado Sólido	45
4.6.	Análise da Influência do Substrato na Produção de Tanases	45
4.7.	Análise de Umidade	46
4.8.	Extração da Enzima	46
4.9.	Determinação da Atividade Enzimática da Tanase	47
4.10.	Análises Estatísticas	49
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>51</b>
5.1.	Micro-organismos Testados	51
5.2.	Seleção Qualitativa dos Fungos Produtores de Tanases	52
5.3.	Determinação da Influência do Teor de Extrativos na Atividade Enzimática da Tanase Produzida por FES	53
5.4.	Produção de Tanases por Fermentação em Estado Sólido	54
5.5.	Avaliação da Influência do Substrato na Produção de Tanases	56
5.6.	Otimização da Produção de Tanases	58
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>65</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>67</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os fungos têm sido utilizados há séculos como fontes de produção de diversos metabólitos e enzimas. São micro-organismos envolvidos em diversas aplicações como, por exemplo, na clarificação de sucos de frutas, na extração de cafés, no processamento de legumes e frutas e na produção de adoçantes. Esses micro-organismos são amplamente utilizados em processos biotecnológicos devido à produção de enzimas relevantes, inclusive aquelas de interesse industrial, como a tanase (BON; FERRARA; CORVO, 2008; SCHUSTER *et al.*, 2002).

Tanino acil hidrolase, também conhecida como tanase, é uma enzima induzível que catalisa a hidrólise de taninos, liberando glicose e ácido gálico. Os taninos são compostos fenólicos classificados em dois grupos: os hidrolisáveis e os condensados. É o quarto constituinte mais abundantemente extraído das biomassas lignocelulósicas, ficando atrás da celulose, da hemicelulose e da lignina. É encontrado em diversas partes das plantas, como em folhas e cascas, e pode ser hidrolisado por ácidos, bases e enzimas, de diferentes fontes microbianas, como a tanase (HERNES; HEDGES, 2004; LAURICHESSE; AVÉROUS, 2014; MAHENDRAN *et al.*, 2006; MINGSHU *et al.*, 2006).

A tanase é uma enzima industrialmente importante e possui diversas aplicações. É empregada na indústria alimentícia para remover algumas substâncias indesejadas, no tratamento do extrato de chás instantâneos para prevenir a turbidez, e na produção industrial de ácido gálico, cujos ésteres são usados como agentes conservantes. Além destas, a tanase também é aplicada em indústrias de bebidas, rações animais, farmacêuticas, químicas e no tratamento de efluentes de curtume (AGUILAR; GUTIÉRREZ- SÁNCHEZ, 2001; BARTHOMEUF; REGERAT; POURRAT, 1994; LEKHA; LONSANE, 1997).

Para a produção da enzima tanase, três processos fermentativos podem ser utilizados, a fermentação em estado sólido (FES), submersa (FS) e em superfície líquida (FSL). Segundo Lekha e Lonsane (1994), a produção e a produtividade de tanase são maiores em FES do que em FS e FSL, e essa enzima, quando produzida por FES, é mais termoestável em comparação com a extra e intracelular produzida pela FS. Além disso, o estudo sugere que a FES é o processo fermentativo que possui maior potencial econômico na produção de tanase (LEKHA; LONSANE, 1997).

A fermentação em estado sólido (FES) é o processo em que ocorre o crescimento do micro-organismo em um substrato sólido, na ausência ou quase ausência de água livre, todavia o substrato deve possuir umidade suficiente para manter o crescimento e o metabolismo microbiano. A FES oferece inúmeras oportunidades no processamento de resíduos como, por exemplo, bagaço de cana-de-açúcar, fibras de coco e polpas de cereais, pois, quando comparada a outros processos fermentativos, tem consumo de energia mais baixo e menor produção de efluentes, além de ser ecologicamente mais correta, visto que minimiza o problema do descarte de resíduos sólidos como as cascas de eucalipto (FARINAS, 2015; PANDEY, 2003; RAHARDJO; TRAMPER; RINZEMA, 2006).

As cascas de eucalipto são subprodutos ou resíduos para a maior parte das indústrias madeireiras que utilizam a madeira de eucalipto para produção de diversos produtos como o carvão, a celulose, painéis reconstituídos, madeira serrada e lenha industrial, o que gera grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos como cascas, galhos e folhas (IBÁ, 2020).

Dentre esses resíduos lignocelulósicos, as cascas representam de 10 a 20% em peso da madeira colhida, e, portanto, milhares de toneladas de casca são geradas anualmente. Esses resíduos geralmente são mantidos no campo para proteção e fertilização do solo ou são queimados e utilizados para a geração de energia e àqueles que não são reutilizados, são encaminhados para aterros sanitários. Se não forem tratados e aproveitados de forma correta e ainda assim forem descartados no meio ambiente, podem acarretar problemas de ordens ambiental e econômica (BRAGATTO, 2010; CARNEIRO *et al.*, 2009; IBÁ, 2020).

Diante desse contexto, a produção de tanases por fermentação em estado sólido com uso de cascas de eucalipto como substrato consagra-se como uma alternativa para a redução do custo das enzimas e um meio de resolução para os problemas de descarte destes resíduos. Assim, os materiais lignocelulósicos que seriam descartados são reaproveitados e transformados em um produto com alto valor agregado.

Os resultados obtidos com o presente estudo contribuem com a literatura da área de bioprocessos, pois a publicação de dados relacionados ao uso de casca de eucalipto como substrato para a produção de tanases por fermentação em estado sólido (FES) é bastante escassa na literatura científica (KUMAR *et al.*, 2009). Em geral, os estudos apresentam produção de tanases por FES com o uso de outras fontes de taninos como, por exemplo, polpa de café e resíduos de manga e de acerola (BHOITE;

MURTHY, 2015; LIMA *et al.*, 2014; SILVA, 2013), entretanto, trabalhos científicos em que a produção de tanases tenha sido promovida a partir de casca de eucalipto por espécies do gênero *Penicillium* em fermentação em estado sólido, assim como foi proposto e investigado no presente estudo, não foram encontrados na literatura.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Produzir tanases por fermentação em estado sólido com uso da casca de eucalipto como substrato.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Selecionar qualitativa e quantitativamente fungos produtores de tanases;
- Avaliar a casca de eucalipto e o farelo de trigo como substratos para a produção de tanases;
- Analisar a influência do teor de umidade, da proporção de casca de eucalipto e farelo de trigo, e da concentração de ácido tânico na produção de tanases;
- Avaliar a otimização da produção da tanases por meio de análises estatísticas.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. O Eucalipto no Brasil

A indústria brasileira de base florestal destaca-se no cenário mundial pela elevada produtividade das suas áreas plantadas. O Brasil apresenta, segundo a Indústria Brasileira de Árvores – IBÁ (2018), a maior produtividade, medida em volume de madeira produzida por unidade de área ao ano e esses resultados procedem tanto das condições de solo e do clima, quanto dos constantes investimentos realizados pelas empresas brasileiras do setor para aprimorar o manejo florestal.

Em 2018, de acordo com a IBÁ (2020), foi plantado no Brasil 7,83 milhões de hectares de área total de árvores, mantendo-se praticamente estável em relação ao ano de 2017. As áreas com plantio de eucalipto ocupam 5,7 milhões de hectares desse total, o que corresponde a 72,8% do total da área plantada.

Os principais estados produtores de eucalipto no Brasil são Minas Gerais (24%), São Paulo (17%), Mato Grosso do Sul (16%) e Bahia (11%). Ao longo dos últimos sete anos, o crescimento médio da área de eucalipto foi de 1,1% ao ano, e esta expansão foi liderada por Mato Grosso do Sul, que sozinho apresentou um índice médio de crescimento de 7,4% ao ano (Figura 1) (IBÁ, 2020).

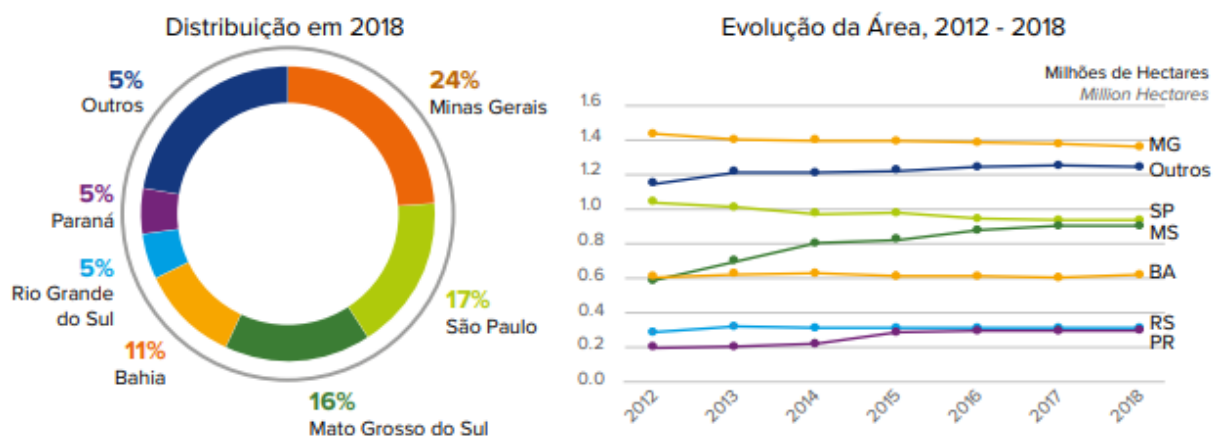


Figura 1 - Distribuição e evolução da área com plantios de eucalipto distribuída por estado.  
Fonte: IBÁ (2020).

O eucalipto é amplamente utilizado para a produção de celulose, painéis reconstituídos, carvão, lenha industrial e madeira tratada. Em 2018, segundo a IBÁ

(2020), o consumo de madeira no Brasil originário de árvores plantadas para uso industrial foi de 220,9 milhões de metros cúbicos e, deste total, 166,0 milhões de metros cúbicos foram de eucalipto.

A casca de eucalipto, que é um dos resíduos gerados por esses processos industriais, geralmente é queimada e utilizada para a produção de energia, é mantida no campo para proteção e fertilização do solo ou é descartada em aterros sanitários. Se as cascas não forem tratadas e aproveitadas de forma correta e ainda assim forem descartadas no meio ambiente podem causar problemas ambientais, visto que milhares de toneladas de casca são geradas anualmente por diversas indústrias que utilizam a madeira de eucalipto como matéria-prima (CARNEIRO *et al.*, 2009, IBÁ, 2020).

Diante disso, entende-se a importância da busca por formas de aproveitamento das cascas de eucalipto que visem à redução da quantidade de resíduos excedente e gere produtos com alto valor agregado. Dentre os componentes químicos da casca estão os polissacarídeos, a lignina, os hidroxiácidos e os extrativos, que têm como destaque os taninos, pois as cascas de algumas espécies podem apresentar uma concentração superior a 40% desse extrativo. A extração de seus componentes pode incorporar valores à atividade florestal e minimizar o problema de descarte desses resíduos pelas indústrias madeireiras (ROWELL, 2012; TRUGILHO *et al.*, 2003).

### 3.2. Taninos

Os taninos são definidos como polifenóis solúveis em água, que possuem peso molecular variável, capazes de precipitar proteínas e suscetíveis à hidrólise enzimática ou química em condições “*in vitro*” (AGUILAR *et al.*, 2007; OLIVAS-AGUIRRE *et al.*, 2015).

Depois da celulose, da hemicelulose e da lignina, os taninos são o quarto constituinte mais abundantemente extraídos das biomassas lignocelulósicas. Esse extrativo tem função defensiva para as plantas contra o ataque de herbívoros e patógenos. Essa função defensiva pode ser responsável, em parte, por sua ocorrência generalizada no reino vegetal, já que podem ser encontrados nas cascas, folhas, frutos e raízes das plantas (BARBEHENN; CONSTABEL, 2011; GOEL *et al.*, 2005; LAURICHESSE; AVÉROUS, 2014).

Quimicamente, os taninos são definidos como metabólitos secundários provenientes de plantas que podem ser ésteres de ácido gálico ou seus derivados, ligados a uma variedade de polióis, núcleos de catequina ou triterpenóides, oligômeros ou polímeros de proantocianidinas. Baseado nas suas estruturas e propriedades, eles são divididos em dois grupos: hidrolisáveis e condensados (CHANG *et al.*, 2019; OLIVAS-AGUIRRE *et al.*, 2015).

Os taninos hidrolisáveis são ésteres do ácido gálico e seus dímeros (ácido elágico e ácido digálico ou hexaidroxidifênico) com monossacarídeos, principalmente a glicose. Geralmente, são subdivididos em galotaninos e elagitaninos, que após a hidrólise produzem ácido gálico e ácido elágico, respectivamente (Figura 2) (MUKHERJEE, 2019).

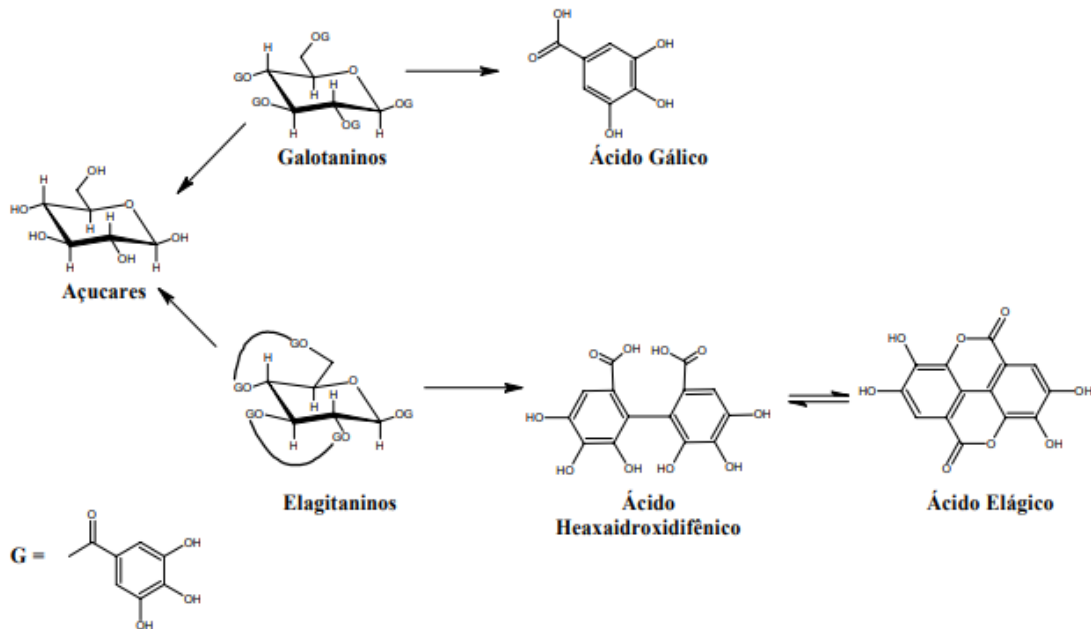


Figura 2 - Fórmulas estruturais dos galotaninos e elagitaninos.

Fonte: QUEIROZ; MORAIS; NASCIMENTO (2002).

Os taninos condensados ou proantocianidinas são compostos por unidades de catequina (flavan-3-ol acoplado), e normalmente são mais abundantes em madeiras e cascas de árvores do que os taninos hidrolisáveis. O principal tipo de tanino condensado é a procianidina (Figura 3), que possui dois grupos OH (KLONGSIRIWET *et al.*, 2015; MUKHERJEE, 2019).

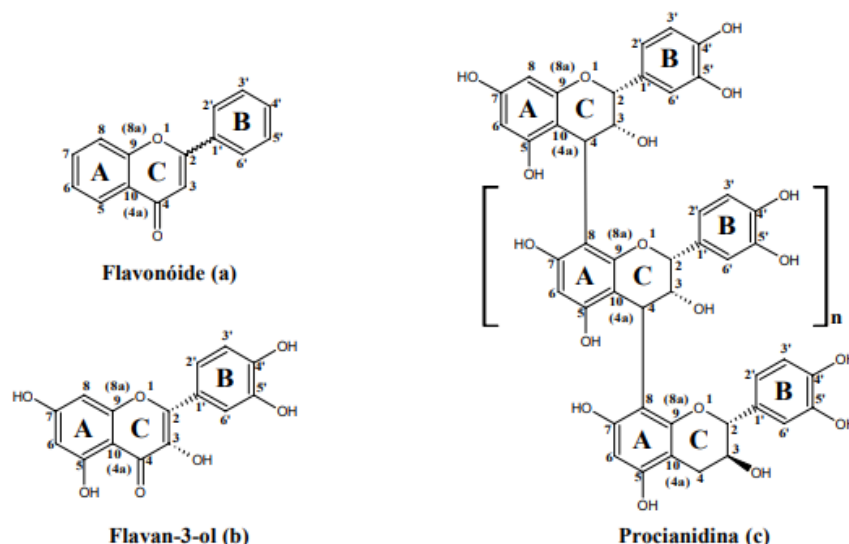


Figura 3 - Fórmulas estruturais: a) flavonoide genérico, b) flavan-3-ol e c) procianidina.  
 Fonte: QUEIROZ; MORAIS; NASCIMENTO (2002).

Em geral, uma das formas mais eficazes de degradar grandes moléculas de tanino, hidrolisável ou condensado, em moléculas pequenas com alto índice de atividades biológicas, é por meio da biodegradação realizada por micro-organismos e enzimas. Em razão da importância da degradação de taninos, diversas pesquisas relacionadas a este assunto vêm sendo desenvolvidas, e uma das enzimas mais estudadas para biodegradação desses polifenóis é a tanase (CHÁVEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2012).

### 3.3. Enzima Tanase

A enzima tanino acil hidrolase (TAH), normalmente conhecida como tanase, catalisa a hidrólise de ligações éster presentes nos taninos complexos, elagitaninos, galotaninos e ésteres de ácido gálico, e produz glicose e ácido gálico. A tanase cliva essas ligações em taninos como o ácido tânico e o chebulínico, e também atua nas ligações éster e depsídica no ácido metil galato e no ácido m-digálico, respectivamente. As fórmulas estruturais desses compostos podem ser vistas na Figura 4 (LEKHA; LONSANE, 1997; ZHANG *et al.*, 2019).

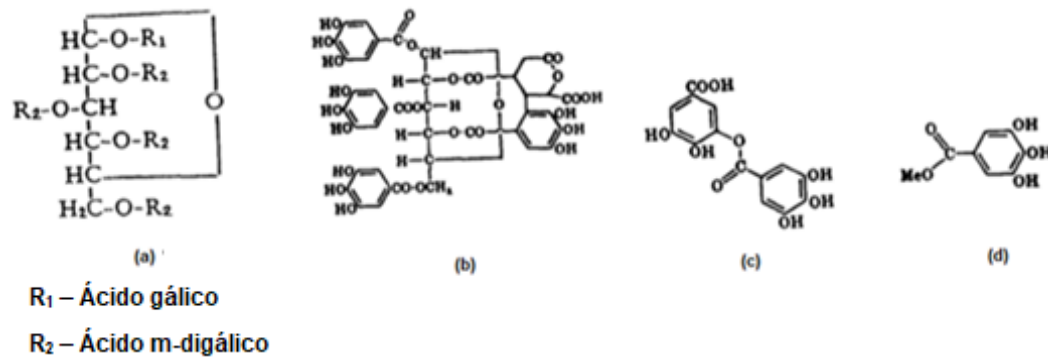


Figura 4 - Fórmulas estruturais: (a) ácido tânico, (b) ácido chebulínico, (c) ácido m-digálico e (d) ácido metil galato.

Fonte: LEKHA; LONSANE (1997), modificado pela autora.

### 3.3.1. Propriedades da tanase

As propriedades da enzima tanase dependem das condições do meio de cultura e do tipo de micro-organismo nas quais é produzida (CHÁVEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2012).

A maioria das tanases possui peso molecular na faixa entre 31 e 320 kDa, estabilidade de temperatura entre 20 e 45°C e temperatura ótima de atividade entre 30 e 40°C. Em relação ao pH, as tanases estudadas foram estáveis em pH entre 3,5 e 8,0 e pH ótimo entre 5,0 e 6,0 (BARTHOMEUF; REGERAT; POURRAT, 1994; BENIWAL, *et al.*, 2013a; BÖER *et al.*, 2009; FARIAS *et al.*, 1994; IWAMOTO *et al.*, 2008; VISWANATH *et al.*, 2015).

Em relação ao efeito de íons metálicos na atividade da tanase, de acordo com o estudo de Kar, Banerjee e Bhattacharyya (2003), um milimolar (mM) de  $\text{Mg}^{+2}$  ou  $\text{Hg}^{+}$  aumentou a atividade enzimática da tanase, enquanto  $\text{Ba}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$  e  $\text{Ag}^{+}$  inibiram a atividade da enzima a 1,0 mM e  $\text{Fe}^{+3}$  e  $\text{Co}^{+2}$  inibiram completamente a atividade da tanase. Entre os ânions analisados, 1,0 mM de  $\text{Br}^{-}$  ou  $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$ , Tween 40 e Tween 80 aumentaram a atividade da tanase, enquanto o Tween 60, Lauril sulfato de sódio e Triton X-100 inibiram a atividade da enzima. A ureia estimulou a atividade da tanase na concentração de 1,5 M.

Entre os quelantes estudados, 1,0 mM de EDTA ou 1,10-fenantrolina inibiram a atividade da tanase. O dimetil sulfóxido e o 2-mercaptoetanol inibiram a atividade da enzima tanase em uma concentração de 1,0 mM, enquanto o extrato de soja inibiu a atividade da enzima em concentrações variando de 0,05 a 1,0% (p:v). Entre as fontes de nitrogênio analisadas, o sulfato ferroso de amônio, o nitrato de amônio, o sulfato

de amônio e o cloreto de amônio aumentaram a atividade de tanase a 0,1% (p:v) de concentração (KAR; BANERJEE; BHATTACHARYYA, 2003).

### 3.3.2. Aplicações industriais da enzima tanase

A tanase é largamente aplicada em diversas indústrias, como as de alimentos, rações animais, bebidas, farmacêuticas e químicas. Essa enzima é usada, principalmente, nos processos de tratamento de sucos de frutas, chás instantâneos e efluentes de curtume, e na produção de ácido gálico, rações animais, vinhos e cerveja (LEKHA; LONSANE, 1997).

a) *Fabricação de sucos*: Os sucos produzidos com alguns tipos de frutas que possuem alto teor de tanino podem, depois de armazenados, apresentarem escurecimento, formação de sedimentos, amargor e adstringência. Como os processos convencionais de tratamento de sucos de frutas não são capazes de remover de forma eficaz o sabor amargo de alguns desses sucos, o enzimático, na qual a tanase é aplicada, tem sido um método utilizado para melhorar a qualidade dos produtos com eficácia (AGUILAR *et al.*, 2007).

A pesquisa de Sharma *et al.* (2014) relatou uma redução nos taninos contidos no suco de goiaba em até 44,38% e 59,23% após 30 e 60 minutos de incubação, respectivamente. Aharwar e Parihar (2019) apresentaram a redução de taninos contidos nos sucos de laranja, romã e groselha da Índia. Houve diminuição de 93,27% dos taninos presentes no suco de laranja após 15 minutos de incubação, 89,36% no de romã após 30 minutos e 75,49% no de groselha da Índia após 45 minutos.

b) *Chás instantâneos*: O chá é uma das bebidas mais populares mundialmente pelo seu sabor, aroma e efeitos medicinais. Um requisito essencial do chá instantâneo é a solubilidade em água fria, pois esse é utilizado, principalmente, como chá gelado. O aparecimento do chamado “creme de chá”, um precipitado insolúvel em água que se forma naturalmente em chás de infusão deixados em repouso por algumas horas a temperaturas de 4°C ou inferiores, é o principal problema encontrado neste processo produtivo (KHOKHAR; MAGNUSDOTTIR, 2002; LEKHA; LONSANE, 1997).

No processo de produção convencional, o extrato solúvel em água quente é submetido a baixas temperaturas com agitação, é centrifugado e, em seguida, o creme é removido quimicamente, o que representa uma perda considerável dos

principais componentes responsáveis pelo sabor. A adição da enzima tanase no processo converte, pelo menos, uma porção do creme de chá para uma forma solúvel em água fria, produzindo um chá instantâneo com cor adequada, boa solubilidade e de melhor qualidade (LEKHA; LONSANE, 1997; NATARAJAN, 2009).

O estudo de Li *et al.* (2017) reportou a produção de extratos de chá *Tieguanyin oolong* e avaliaram a redução da formação do creme de chá por meio do uso de folhas tratadas com tanase. Após o tratamento enzimático das folhas, houve uma redução de 60% da formação de “creme de chá”, quando armazenadas a 4°C durante 30 dias, e 74% a 25°C por 5 dias. Lima *et al.* (2018) compararam a tanase livre e imobilizada na redução de taninos contidos no chá de boldo e os resultados mostraram que o conteúdo de taninos foi reduzido em 31% e 22% com uso de células imobilizadas e livres, respectivamente.

c) *Tratamento de efluentes de curtume*: a tanase possui um potencial amplo de aplicação no tratamento de efluentes resultantes do processamento de couro. Os efluentes dos curtumes apresentam grandes quantidades de polifenóis, principalmente os taninos, que, em quantidades elevadas, podem ser prejudiciais ao meio ambiente. O uso da enzima tanase no tratamento desses efluentes é considerado um processo eficaz e barato para a redução desses compostos (AGUILAR; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, 2001).

A pesquisa de Viswanath *et al.* (2015) apresenta uma análise da capacidade da tanase em adsorver metais tóxicos presentes no efluente de curtume. Os resultados mostraram que chumbo (Pb), cádmio (Cd) e níquel (Ni) estavam presentes em concentrações muito baixas, mas o cobre (Cu) estava presente na concentração de 1,05 mg.L<sup>-1</sup> e, quando tratado com a enzima tanase, obteve uma redução para 0,34 mg.L<sup>-1</sup>. Cavalcanti, Jorge e Guimarães (2018) relataram que a tanase reduziu, após 2 horas de tratamento, 25% e 89% do conteúdo de tanino contido nas amostras do efluente do curtume processadas mecanicamente e manualmente, respectivamente.

d) *Produção de ácido gálico*: O ácido gálico, quimicamente conhecido como ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzóico, é um composto fenólico empregado na fabricação de corantes e em indústrias de couro e farmacêuticas. É utilizado como matéria-prima para produção de diversos produtos como pirogalol e galatos, produtos utilizados nas indústrias alimentícia e farmacêutica (SANTOS, 2007).

Sua principal aplicação é nas indústrias farmacêuticas para a produção do Trimetoprim, um agente antibacteriano, que na maioria das vezes é administrado

juntamente com a sulfonamida, pois juntos eles possuem um amplo espectro de ação. O ácido gálico também é usado na síntese enzimática de ésteres do ácido gálico como o propil galato que é utilizado, principalmente, como um antioxidante em indústria de alimentos (BEENA *et al.*, 2011).

*e) Ração animal:* Os cereais são normalmente utilizados como complemento alimentar animal. Entretanto, algumas cultivares destes cereais podem apresentar teor de tanino elevado, e este composto, na maioria das vezes, é considerado indesejável na alimentação de animais, pois diminuem a digestibilidade da ração (em particular da proteína bruta). O uso da tanase no tratamento preliminar desses complementos alimentares reduz o teor de tanino existente no cereal, melhorando a digestibilidade da ração animal (AGUILAR; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, 2001; LEKHA; LONSANE, 1997; REDONDO *et al.*, 2014).

O estudo de Raghuwanshi, Misra e Saxena (2014) avaliou a redução do teor de tanino da palha de trigo quando submetida a um tratamento enzimático com tanase, para aumentar a digestibilidade da ração animal. Após a aplicação da enzima, ocorreu a degradação de até 91,1% de tanino presente na palha de trigo. Abdulla *et al.* (2016) desenvolveram uma dieta de feijão suplementada com enzima tanase para alimentar frangos de corte e avaliaram a eficiência dessa suplementação no desempenho do crescimento, utilização de energia e nutrientes, e desenvolvimento do trato intestinal desses animais. Os resultados mostraram que a suplementação da dieta com tanase melhorou a eficiência alimentar e a utilização de energia e nutrientes dos animais.

*f) Produção de vinho:* A presença de taninos é responsável por 50% da coloração dos vinhos e a ocorrência de oxidação desses compostos por meio de contato com o ar pode causar a formação de turbidez indesejável e, conseqüentemente, prejudicar a qualidade do produto final. A remoção desses compostos fenólicos pode ser realizada por meio da aplicação da enzima tanase no processo produtivo, que irá evitar a geração de turbidez e promover a elaboração de uma bebida com menor adstringência, cor apropriada e sabor de melhor qualidade. (AGUILAR; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, 2001; BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004).

A pesquisa de Vaquero, Marcobal e Muñoz (2004) apresentou uma análise das espécies bacterianas do ácido láctico isoladas do vinho quanto à capacidade de degradação de taninos em função da ação da enzima tanase. O estudo relatou que alguns lactobacilos foram capazes de degradar os taninos hidrolisáveis presentes no vinho, o que resultou na redução de sua adstringência e turbidez. Selwal *et al.* (2011)

relataram que o uso de tanase no processo de produção de vinho reduziu o teor de tanino em 38,05% para o vinho de jamelão e 43,59% para o de uva.

g) *Produção de cerveja*: As antocianidinas estão presentes no processo de produção de cerveja e podem causar turbidez indesejável no produto final. A tanase é empregada no processo com o objetivo de remover os taninos e, conseqüentemente, evitar que ocorram problemas de turbidez nas cervejas produzidas (AGUILAR; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, 2001).

O estudo de Masschelein e Batum (1981) *apud* Beniwal *et al.* (2013b) relatou que a tanase produzida por uma cepa de *Aspergillus flavus* diminuiu significativamente a formação de turbidez da cerveja após o seu armazenamento. Segundo o estudo, os compostos fenólicos presentes no mosto, que podem causar turbidez da cerveja quando entra em contato com outros produtos químicos, foram hidrolisados pela tanase. Schmedding *et al.* (2004) aplicaram a enzima tanase em uma etapa do processo de produção de cerveja para reduzir os taninos presentes e observaram que o tratamento enzimático aumentou a estabilidade físico-química do sabor da cerveja. Pesquisas com a produção da enzima tanase em escala industrial são necessárias, para que seja possível reduzir os custos de produção e torná-la viável. Por essa razão, torna-se imprescindível um amplo entendimento sobre suas características e aspectos de otimização de sua produção em escala industrial (AGUILAR; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, 2001).

### 3.3.3. *Produção da tanase*

A tanase pode ser obtida de fontes animais, vegetais e microbianas, sendo essa última a principal fonte de produção dessa enzima, pela sua diversidade bioquímica e suas vantagens técnicas e econômicas. Além disso, enzimas obtidas por meio microbiológico possuem maior estabilidade quando comparadas às proteínas análogas obtidas por fontes animais e vegetais (HEADON; WALSH, 1994; LEKHA; LONSANE, 1997; MOLINA *et al.*, 2019).

Essa enzima é produzida na presença de ácido tânico por diversos fungos, bactérias e leveduras. Na Tabela 1 consta exemplos de micro-organismos que, por meio da produção de tanases, foram capazes de desenvolver os mecanismos necessários para superar o efeito inibitório do tanino (CHÁVEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2012).

Tabela 1 – Micro-organismos produtores da tanase empregando diferentes substratos e condições de cultivo e seus respectivos resultados.

<b>Levedura</b>	<b>Substrato</b>	<b>Condições de fermentação</b>	<b>Atividade Enzimática</b>	<b>Referência</b>
<i>Candida sp. K-1</i>	Galotanino	FS, frasco, pH 6,0, 35°C, 6 dias.	92 U/mL	AOKI; SHINKE; NISHIRA (1976)
<i>Arxula adenivorans</i> (3 variações genéticas)	Metil galato	FS, frasco, 180 rpm, pH 5,0, 30°C, 6 dias.	ATAN1 - 228 U/g 2ATAN1 - 187 U/g 2ATAN1v - 230 U/g	BÖER <i>et al.</i> (2011)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Caqui	FS, frasco, 150 rpm, pH 5,5, 30°C, 2 dias.	8,2 U/mL	TASKIN (2013)
<b>Bactéria</b>	<b>Substrato</b>	<b>Condições de fermentação</b>	<b>Atividade Enzimática</b>	<b>Referência</b>
<i>Bacillus licheniformis</i>	Ácido tânico	FS, frasco, 200 rpm, pH 6,8, 30°C, 20h.	0,21 U/mL	MONDAL; BANERJEE; PATI (2000)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Folhas das árvores <i>Phyllanthus emblica</i> (PE) , <i>Acacia nilotica</i> (AN), <i>Eugenia cuspidate</i> (EC) e <i>Syzygium cumini</i> (SC)	FS, frasco, 200 rpm, 37°C, 1 dia.	PE - 11,06 U/mL AN - 10,49 U/mL EC - 7,05 U/mL SC - 6,45 U/mL	SELWAL <i>et al.</i> (2010)
<i>Bacillus subtilis</i>	Semente de tâmara da Índia	FES, frasco, umidade: 50%, 35°C, 3 dias.	3000 U	JANA <i>et al.</i> (2015)
<b>Fungo Filamentoso</b>	<b>Substrato</b>	<b>Condições de fermentação</b>	<b>Atividade Enzimática</b>	<b>Referência</b>
<i>Aspergillus awamori</i>	Propil galato	FS, frasco, 100 rpm, 28°C, 2 dias.	340 U/mL	BEENA <i>et al.</i> (2011)
<i>Aspergillus heteromorphus</i>	Serragem da árvore <i>Dalbergia sissoo</i>	FES, frasco, umidade: 70%, 30°C, 5 dias.	1,84 U/gms	BENIWAL <i>et al.</i> (2013c)
<i>Aspergillus niger</i>	Talo utilizado em chá	FES, frasco, umidade: 50%, 28°C, 7 dias.	62,0 U/gms	WANG <i>et al.</i> (2013)

(continuação)

<i>Penicillium atramentosum</i>	Folhas das árvores <i>Phyllanthus emblica</i> (PE) e <i>Acacia nilotica</i> (AN)	FS, frasco, 150 rpm, pH 5,5 (PE) e pH 7,5 (AN), 30°C, 3 dias.	PE - 15,9 U/mL AN - 18,5 U/mL	SELWAL; SELWAL (2012)
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Semente de tâmara da Índia	FES, frasco, umidade: 66,67%, 30°C, 5 dias.	6,15 U/g	JANA <i>et al.</i> (2012a)
<i>Penicillium montanense</i>	Resíduo de acerola	FES, frasco, umidade: 50%, 30°C, 4 dias.	41,64 U/mL	LIMA <i>et al.</i> (2014)
<i>Fusarium subglutinans</i>	Ácido tânico	FS, frasco, 200 rpm, 35°C, 4 dias.	9,38 U/mL	HAMDY (2008)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Extrato de malte	FS, frasco, 30°C, 4 dias.	16.31 U/mL	KAPOOR; IQBAL (2013)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Semente de <i>Shorea robusta</i> (SSR), frutos de <i>Terminalia chebula</i> (FTC) e folhas de <i>Camellia sinensis</i> (FCS)	FS, frasco, 180 rpm, pH 5,0, 30°C, 4 dias.	SSR - 17.7 U/mL FTC - 15,27 U/mL FCS - 10,32 U/mL	HOTA; DUTTA; BANERJEE (2007)
<i>Paecilomyces variotti</i>	Farelo de trigo com casca de café	FES, frasco, umidade: 60%, 30°C, 5 dias.	1,5263 U/mL	BATTESTIN; MACEDO (2007)

De acordo com Lekha e Lonsane (1997), existem três tipos de fermentação utilizados para a produção de tanases, a fermentação em superfície líquida (FSL), submersa (FS) e em estado sólido (FES), sendo os dois últimos mais extensivamente usados.

A maioria das pesquisas relata o uso da FS para a produção de tanases, porém o uso da FES vem se destacando, pois esse tipo de fermentação possui vantagens como baixo custo de produção em função do uso de subprodutos de baixo custo e resíduos agroindustriais e lignocelulósicos como matéria-prima, e equipamentos e instalações simples. Além disso, as enzimas secretadas no filtrado do meio de cultura geralmente são mais concentradas e de melhor qualidade, gerando menos efluentes e um custo menor de recuperação do que nas culturas da FS (HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004).

O estudo de Raaman *et al.* (2010) apresentou uma comparação entre três métodos diferentes de fermentação para a produção de tanases por *Paecilomyces variotii*. A produção enzimática máxima por FES foi observada em 60 horas de cultivo, enquanto por FS e FSL as maiores atividades foram atingidas em 72 e 96 horas, respectivamente.

A pesquisa de Rana e Bhat (2005) relatou que em FSL e FS, a produção máxima de tanases por *Aspergillus niger* foi observada em 120 horas de fermentação, enquanto em FES sua atividade máxima foi atingida em 96 horas. Lekha e Lonsane (1994) afirmaram que o tempo máximo de fermentação necessário para a produção de tanases por *Aspergillus niger* em FES foi de apenas três dias, enquanto nas demais fermentações foram necessários seis dias.

Em relação aos rendimentos volumétricos, Raaman *et al.* (2010) afirmaram que a produção de tanases por FES foi 1,36 e 1,64 vezes maior quando comparada à FS e FSL, respectivamente. Rana e Bhat (2005) relataram que a produção enzimática por FES foi 1,03 e 3,70 vezes maior que por FS e FSL, respectivamente. Lekha e Lonsane (1994) mencionaram que a produção por FES foi 2,5 e 4,8 vezes maior que por FS e FSL, respectivamente.

#### 3.3.4. Fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido (FES) é definida como o crescimento microbiano em substrato sólido com umidade suficiente para manter o crescimento e o metabolismo dos micro-organismos, mas não há água livre. O nível de umidade em base úmida na

FES pode estar entre 30 e 80%, porém, para a produção da maioria das enzimas, fica tipicamente na região de 60% (RAHARDJO; TRAMPER; RINZEMA, 2006; SURVASE *et al.*, 2009).

Existem dois tipos de sistemas de FES que se distinguem dependendo da natureza da fase sólida utilizada no processo. Em um dos sistemas, o cultivo é realizado em um material natural, como os resíduos lignocelulósicos, que tem função de suporte e fonte de nutrientes para os micro-organismos. No outro tipo, que não é tão comumente utilizado, o cultivo é em um suporte inerte como as espumas de plástico, que funciona como um reservatório para uma solução nutritiva que fica integrada na matriz sólida (HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004; MACHADO; TEIXEIRA; RODRÍGUEZ-COUTO, 2013).

Dentre os grupos de micro-organismos capazes de crescer em substratos sólidos e que podem ser aplicados em processos de FES, o de maior importância é o grupo dos fungos em razão das suas propriedades fisiológicas e bioquímicas. O ambiente fermentativo da FES possui semelhança com o habitat natural dos fungos e, além disso, eles são capazes de tolerar a baixa atividade de água e suportar condições de alta pressão osmótica, tornando-os eficientes na bioconversão de substratos sólidos (PANDEY, 2003; RAIMBAULT, 1998).

De modo geral, quando comparada com a FS, a FES apresenta diversas vantagens, seja do ponto de vista ambiental ou econômico. Em relação ao meio ambiente, uma das vantagens é a possibilidade do uso de resíduos como substrato sólido. Além disso, por ser um processo conduzido na ausência de água livre, há um consumo mínimo de água e, portanto, uma baixa produção de efluente. Do ponto de vista econômico, as principais vantagens são a menor demanda de esterilidade no processo fermentativo, alta produtividade em volume e menor consumo energético, promovendo a redução do custo de produção das enzimas (HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004).

De acordo com Hölker e Lenz (2005), as enzimas produzidas por FES, em comparação com as obtidas por FS, tende a ter menos problemas relacionados à inibição pelo substrato e produz enzimas com maior estabilidade de temperatura e/ou pH.

A principal desvantagem da FES está relacionada à ampliação do processo para escala industrial, em grande parte pela falta de controle dos fenômenos de transferência de calor e massa. No entanto, pesquisas têm sido direcionadas para o

desenvolvimento de biorreatores que superem essas dificuldades (MARTINS *et al.*, 2011; MITCHELL *et al.*, 2000).

Existem diversos fatores que afetam significativamente o crescimento microbiano e influenciam o bom rendimento de processos fermentativos realizados em estado sólido. Os principais são a seleção de micro-organismos e substratos adequados, além de parâmetros de processos como umidade e atividade de água, temperatura, pH, aeração e concentração de inóculo (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000; RAIMBAULT, 1998).

Dentre esses parâmetros, o papel da água na FES possui destaque por conta do seu alto grau de interação com as substâncias que constituem a fase sólida. Neste processo fermentativo, a água está ligada aos parâmetros umidade, que é a porcentagem de água na massa total do meio, e a atividade de água ( $A_w$ ), que é um parâmetro essencial para a transferência de massa da água e solutos por meio das células microbianas e que necessita de controle, pois possui influência determinante na atividade dos micro-organismos (GERVAIS; MOLIN, 2003; PANDEY, 2003; PINTO *et al.*, 2005).

A limitação da água na FES pode ocasionar a redução da taxa de crescimento microbiano e, conseqüentemente, diminuir a produção de enzimas. Portanto, o teor de umidade ideal deve ser mantido, pois se o nível de umidade for muito elevado, os espaços vazios dos sólidos serão preenchidos com água, resultando em difusão gasosa restrita, mas, se por outro lado o nível de umidade for muito baixo, o crescimento microbiano será prejudicado (FARINAS, 2015; RAGHAVARAO; RANGANATHAN; KARANTH, 2003).

Como o teor de umidade depende tanto do substrato sólido quanto do micro-organismo utilizado no processo, a identificação do nível ótimo de umidade é fundamental para propiciar condições de crescimento favoráveis e maximizar a produção de metabólitos (FARINAS, 2015; RAIMBAULT, 1998).

A temperatura é um dos fatores que, no processo de FES, possui maior importância, pois o crescimento microbiano ocorre em condições aeróbicas que resultam na liberação do calor metabólico. Em níveis extremos, isso pode ocasionar desnaturação das enzimas produzidas, bem como outros efeitos prejudiciais ao crescimento de micro-organismos e a produção de metabólitos, uma vez que a remoção do calor gerado durante o crescimento microbiano é complexa em razão da limitada

condutividade térmica do substrato sólido e à falta de superfícies de troca de calor (FARINAS, 2015; RAGHAVARAO; RANGANATHAN; KARANTH, 2003).

Logo, a caracterização de cada micro-organismo em particular, em relação à influência da temperatura na sua cinética de crescimento e na formação do produto, é fundamental para o desenvolvimento de bioprocessos com FES (FARINAS, 2015).

O pH é uma variável de grande influência na atividade enzimática, porque os sítios ativos das enzimas dependem frequentemente da presença de espécies iônicas para manter conformações que permitem uma eficiente ligação ao substrato. A cinética da variação do pH depende do micro-organismo em particular e da natureza do substrato, devido ao efeito tamponante que os materiais lignocelulósicos podem causar no meio de cultura (FARINAS, 2015; RAIMBAULT, 1998).

O controle do pH na produção de enzimas por FES é essencial, pois o pH do meio de cultivo pode mudar em resposta a atividades metabólicas. No entanto, o monitoramento e controle do pH na FES não é simples, e a maioria dos estudos relatados na literatura apenas descreve a influência do pH inicial do meio na produção de enzimas (FARINAS, 2015).

Na FES, a aeração tem como função manter as condições aeróbicas, remover o dióxido de carbono gerado e regular a temperatura e o nível de umidade do substrato sólido, sendo assim um parâmetro que pode afetar de maneira significativa os níveis de biomassa e a produção de enzimas (RAIMBAULT, 1998).

Apesar de não se observar limitação de oxigênio na FES, o controle da aeração deve ser realizado, pois taxas elevadas de fluxo de ar podem causar perda de umidade do substrato, afetando negativamente o crescimento de micro-organismos, e, conseqüentemente, limitando a produção de enzimas (FARINAS, 2015).

A concentração do inóculo é um fator biológico importante, pois determina a produção de biomassa na fermentação em estado sólido. Uma baixa concentração de inóculo pode causar a baixa formação de biomassa, pois pode favorecer o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis no meio, além de aumentar o tempo necessário para o processo fermentativo (MÉLO, 2016; SANDHYA *et al.*, 2005).

No entanto, uma elevada concentração de inóculo pode aumentar o consumo de nutrientes do meio de maneira excessiva para a formação de biomassa, assim como pode aumentar a quantidade de esporos por grama de substrato sólido e a quantidade de água no meio, o que impede a penetração de oxigênio no meio sólido e inibe o crescimento celular e a produção de enzimas. Logo, um equilíbrio relacionado à

concentração de inóculo poderá gerar uma produção máxima de enzima (MÉLO, 2016; VU; PHAM; KIM, 2011).

No processo de FES, a escolha do substrato sólido é fundamental, pois além de fornecer os nutrientes necessários para o crescimento do micro-organismo, ele também funciona como um suporte para as células. Entretanto, quando o micro-organismo é cultivado em um substrato sólido que não fornece as quantidades necessárias de nutrientes, a suplementação é necessária (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000)

A seleção adequada do tipo e concentração de fontes suplementares de carbono e nitrogênio, juntamente com a presença de indutores, é muito importante para que se obtenha o máximo crescimento de micro-organismos e rendimento de enzimas. Os macro e micronutrientes que são necessários ao meio de crescimento microbiano incluem magnésio, potássio, fósforo, cálcio, ferro, enxofre, zinco, cobre, manganês, iodo e cobalto. Além disso, características físicas do substrato, como área de superfície, cristalinidade, tamanho de partícula e porosidade influenciam significativamente no processo fermentativo em estado sólido (FARINAS, 2015).

A seleção do substrato sólido depende de fatores relacionados também com custo e disponibilidade. Uma grande vantagem da FES é a possibilidade de usar resíduos agroindustriais e lignocelulósicos como substratos. Esses resíduos geralmente são subprodutos de outros processos industriais que são gerados em quantidades elevadas e possuem valor comercial baixo. Além disso, seu descarte ou uso subsequente sem tratamento pode causar problemas ambientais (FARINAS, 2015; PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000).

Diversos resíduos agroindustriais podem ser utilizados como substrato sólido para FES, como, por exemplo, bagaço de cana-de-açúcar, mandioca, laranja, farelo de cereais, polpa de café e fibras de coco. As estruturas básicas desses subprodutos (que consistem em celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e fibras) definem as propriedades do substrato sólido e fornecem fontes de carbono e energia para o crescimento microbiano (FARINAS, 2015).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Micro-organismos e Preparação do Inóculo

Os fungos utilizados foram *Phanerochaete chrysosporium*, replicado no Laboratório de Bio deterioração e Proteção da Madeira (LBPM) da UFES, localizado em Jerônimo Monteiro - ES, e *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. e *Fusarium oxysporum*, isolados pelo Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Doenças e Pragas (NUDEMAFI) da UFES, localizado em Alegre - ES.

Todos os fungos foram repicados, em condições assépticas, em placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA) e incubados em estufa bacteriológica (Nova Instruments NI 1522) a 30°C durante 15 dias, quando a coloração característica dos esporos foi observada.

Posteriormente, os fungos foram repicados em meio sólido também em condições assépticas. Foram preparados quatro frascos Erlenmeyers de 500 mL (um para cada placa de Petri), contendo 10 g de sólido em proporção de farelo de trigo e bagaço de cana (FT:BC) 20:80 e 60% de umidade em base úmida. Os frascos foram inoculados com o conteúdo total das placas de Petri e incubados a 30°C por 7 dias, em estufa bacteriológica. A solução salina utilizada para umidificar o meio sólido na qual os fungos foram repicados consta na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição da solução salina.

Reagentes	Concentração
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,0 g.L <sup>-1</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,0 g.L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,0 g.L <sup>-1</sup>
NaCl	1,0 g.L <sup>-1</sup>
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5,0 mg.L <sup>-1</sup>
MnSO <sub>4</sub>	1,6 mg.L <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3,45 mg.L <sup>-1</sup>
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2,0 mg.L <sup>-1</sup>

Fonte: URBÁNSZKI; SZAKACS; TENGÉRDY (2000).

O cálculo do volume total de solução salina a ser acrescentado ao meio para atingir o teor de umidade desejado foi calculado conforme Equação 1.

$$V_{ss} = m_{ss} = \frac{U \cdot M}{100-U} \quad (1)$$

Na qual,  $V_{ss}$  corresponde ao volume da solução salina (mL), que é considerado igual a sua massa  $m_{ss}$  (g), necessário para obter a umidade  $U$  (%), com o uso de uma massa de sólidos  $M$  (g).

A quantificação dos esporos formados nos cultivos sólidos destinados ao estoque foi realizada por meio de contagem em placa com câmara de Neubauer. Nessa técnica, aproximadamente 1,0 g do sólido fermentado foi diluído em água deionizada e adicionou-se duas gotas do surfactante Tween 80. Uma alíquota de 100  $\mu$ L da amostra diluída foi adicionada à câmara de Neubauer (Qualividros; profundidade: 0,100 mm; área: 0,0025 mm<sup>2</sup>) e a contagem de esporos foi realizada nos dois reticulados em microscópio ótico (Bioval) com aumento de 1000 vezes na objetiva.

A contagem de esporos foi realizada em cinco campos (E1 a E5) uniformemente distribuídos em cada reticulado, totalizando 10 campos de contagem (Figura 5). A concentração de esporos na suspensão foi determinada por meio da Equação 2, segundo Pinheiro (2003).

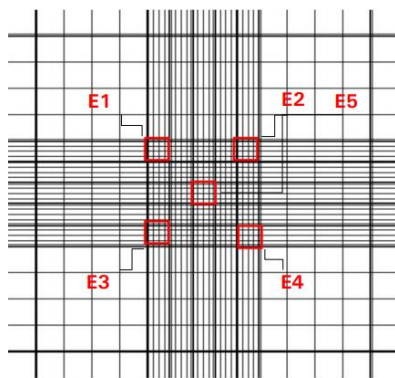


Figura 5 - Esquema da câmara de Neubauer.  
Fonte: EMBRAPA (2012).

$$C_{susp} = \frac{D_a \cdot N}{V_{campo}} \quad (2)$$

Na qual,  $C_{susp}$  é a concentração de esporos da suspensão (esporos.mL<sup>-1</sup>),  $D_a$  é o fator de diluição,  $N$  é o número médio de esporos nos campos medidos e  $V_{campo}$  é o volume de cada campo (área do campo 0,0025 mm<sup>2</sup> multiplicada pela espessura de filme líquido - 0,1 mm).

#### 4.2. Seleção Qualitativa dos Fungos Produtores de Tanase

A seleção dos fungos capazes de degradar o ácido tânico e produzir tanases foi realizada por meio de um meio de cultura de enriquecimento que continha o ácido tânico como única fonte de carbono. O meio de cultura era composto por (g.L<sup>-1</sup>): NaNO<sub>3</sub> – 6,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,0; MgSO<sub>4</sub> – 0,5; KCl – 0,5; FeSO<sub>4</sub> – 0,01; Ágar – 30,0; e Ácido Tânico – 10,0 (MURUGAN; SARAVANABABU; ARUNACHALAM, 2007, modificado).

O meio de cultura, com exceção do ácido tânico, foi esterilizado em autoclave vertical (Phoenix Luferco AV-100) a 121°C, durante 30 minutos. Depois de autoclavado, foi levado à capela de fluxo laminar vertical (Jdeoximar, FLV 1040), previamente limpa com álcool etílico 70% e iluminação ultravioleta ligada por 20 minutos. De acordo com Mata-Gómez *et al.* (2009), o ácido tânico é um reagente sensível a altas temperaturas e, portanto, foi esterilizado separadamente por meio de filtração a vácuo com um papel filtro Whatman nº 1 e, em seguida, misturado ao meio de cultura e distribuído em placas de Petri.

Os fungos foram inoculados no centro das placas de Petri e essas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30°C, durante 5 dias. Após a incubação, a atividade da tanase foi detectada pela presença de halos claros ao redor das colônias, formados pela hidrólise do ácido tânico (PEROVANO FILHO; SILVA; LÓPEZ, 2011).

#### 4.3. Substratos

Um dos substratos utilizados como fonte de taninos para a produção da enzima tanase foram as cascas de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* com sete anos de idade, provenientes de plantios experimentais, localizados nos municípios de Nova Almeida (ES) e Montezuma (MG), fornecidas por uma empresa de celulose. Os ambientes de origem destas cascas de eucalipto (CE) possuem um histórico de precipitação média anual de 1250 mm em Nova Almeida (ambiente A) e 500 mm em Montezuma (ambiente B), de acordo com os dados fornecidos pela empresa. Foram disponibilizados materiais de oito clones diferentes, para ambos os ambientes, na qual foram selecionados de acordo com o teor médio de extrativos.

As cascas de eucalipto foram secas ao ar e periodicamente revolvidas para evitar contaminação. Posteriormente, as cascas foram fragmentadas em serra fita e passadas pelo moinho de martelo (Tigre A4) ao utilizar a peneira de malha 8 mm. As partículas obtidas foram moídas em moinho do tipo Willey (Marconi) e classificadas em peneira de 10 *mesh* para utilização nas fermentações. As CE foram armazenadas por agrupamento de amostras representativas dos dois ambientes no Laboratório de Engenharia Química 3 (LEQ3) da UFES, localizado em Alegre - ES.

O farelo de trigo (FT), substrato utilizado como fontes de nutrientes na produção da enzima e no preparo dos estoques dos fungos em meio sólido, foi adquirido em comércio local e armazenado em geladeira a 4°C.

As cascas de café (CC), utilizadas para análise da influência da fonte de tanino na produção de tanases, foram fornecidas por produtores rurais do distrito de Boa Vista (Cachoeiro de Itapemirim - ES). As CC foram submetidas à secagem em estufa (Quimis, Q314M-32) a 105°C, trituradas em moinho de facas e peneiradas para obtenção da granulometria inferior a 0,425 mm. Em seguida, foram armazenadas em sacolas plásticas para usos posteriores.

O bagaço de cana-de-açúcar (BC), utilizado na preparação dos estoques dos fungos em meio sólido, foi fornecido já triturado pela Usina Paineiras, localizada em Itapemirim-ES, e armazenado em congelador a -6°C até o uso. Antes da sua utilização, o material foi seco em estufa (Quimis, Q314M-32) a 105°C por aproximadamente oito horas e foi triturado em partículas menores em um moinho de facas (Marconi) e peneirado para obtenção da granulometria inferior a 10 *mesh*. Após essas etapas, o BC foi armazenado em sacos plásticos a temperatura ambiente.

#### 4.4. Análise da Influência do Teor de Extrativos na Atividade Enzimática da Tanase Produzida por FES

Chaves (2018) determinou o teor médio de extrativos totais de cascas de eucalipto obtidas em Nova Almeida – ES (ambiente A) e Montazuma – MG (ambiente B), que foram os mesmos materiais utilizados neste estudo. Foram cascas de oito clones diferentes, para ambos os ambientes.

Os resultados apontaram que as cascas do ambiente A se destacaram em teores de extrativos quando comparadas ao ambiente B. O clone 5 apresentou índices

superiores de extrativos em ambos os ambientes, porém não diferiu estatisticamente dos clones 2, 6 e 8 (CHAVES, 2018). No entanto, optou-se pelo clone 2 devido a uma maior disponibilidade de material para os experimentos posteriores.

No presente estudo, as cascas de eucalipto (CE) do clone 2 dos ambientes A e B foram utilizadas como substrato, juntamente com o farelo de trigo (FT), na composição 40:60 (FT:CE), 60% de umidade inicial e 1,0% (m:v) de ácido tânico, para verificação da influência do teor de extrativos na atividade enzimática da enzima tanase por fermentação em estado sólido.

#### 4.5. Produção de Tanases por Fermentação em Estado Sólido

Dez gramas de casca de eucalipto (CE) e farelo de trigo (FT), na proporção 40:60 (FT:CE), foram adicionados em frascos Erlenmeyer de 500 mL e esterilizados, em autoclave vertical a 121°C, durante 20 minutos. Depois de autoclavados, foram levados à capela de fluxo laminar vertical, previamente limpa com álcool etílico 70% e iluminação ultravioleta ligada por 20 minutos, onde as fermentações foram realizadas. O ácido tânico foi esterilizado separadamente por meio de filtração a vácuo com um papel filtro Whatman nº 1 e, em seguida misturado à solução salina esterilizada.

Para verificar a cinética de produção da enzima tanase, os substratos foram umedecidos com 15 mL da solução salina descrita na Tabela 2 (60% de umidade inicial) e ácido tânico 1,0% (m:v). Os frascos foram inoculados com os fungos disponíveis e incubados em estufa bacteriológica a 30°C, durante 120 horas, sendo retirado um frasco a cada 24 horas para realização da extração de tanases e análises do teor de umidade e da atividade enzimática.

#### 4.6. Análise da Influência do Substrato na Produção de Tanases

Para análise da influência do substrato na atividade enzimática da tanase, foi realizada uma comparação entre os experimentos com casca de eucalipto (CE) e farelo de trigo (FT), e casca de café (CC) e FT, realizados nas mesmas condições de cultivo, na qual

utilizou-se a composição 40:60 (FT:CE) e (FT:CC), 60% de umidade inicial e 1,0% (m:v) de ácido tânico.

#### 4.7. Análise de Umidade

A análise do teor de umidade em base úmida foi realizada, em duplicata, com aproximadamente um grama de amostra em cada réplica, em analisador de umidade (SHIMADZU MOC63u). O funcionamento desse analisador baseia-se no método gravimétrico, em que a água existente na amostra é evaporada rapidamente por meio do aquecimento de uma lâmpada de halogênio e a porcentagem de umidade da amostra é lida diretamente ao final da medição.

Deve-se salientar que a umidade das amostras foi medida para observação do comportamento da umidade definida no início da fermentação e para cálculo da atividade enzimática da tanase, que foi expressa em unidade de atividade enzimática por grama de massa seca ( $U \cdot gms^{-1}$ ).

#### 4.8. Extração da Enzima

Para a realização da extração da tanase, cerca de 5,0 gramas do fermentado foi adicionado em Erlenmeyers de 125 mL, com 50 mL de solução tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 5,0) e uma gota de surfactante Tween 80. Os frascos foram submetidos à agitação de 200 rotações por minuto (rpm) em mesa agitadora (SPLabor SP-180/A) por uma hora, em temperatura ambiente.

Em seguida, a mistura foi filtrada em gaze para remoção dos sólidos e o extrato foi centrifugado (Centrífuga Nova Instruments, NT 810) a 4000 rpm, por 30 minutos. O filtrado, denominado extrato enzimático, foi acondicionado em frascos tipo Falcon de 50 mL e preservados a 4°C para as análises posteriores da atividade enzimática (BATTESTIN; MACEDO, 2007; SABU *et al.*, 2005; SALOMÃO, 2017).

#### 4.9. Determinação da Atividade Enzimática da Tanase

A determinação da atividade enzimática da tanase foi realizada a partir da reação com o ácido tânico, conforme o método de Sharma, Bhat e Dawra (2000), modificado. Esse método baseia-se na formação de um cromógeno entre o ácido gálico (liberado pela ação da tanase no ácido tânico) e a rodanina (2-thio-4-ketothiazolidine).

Para determinar o ácido gálico, soluções de substrato (0,2% (m:v) de ácido tânico em tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 5,0), de extrato enzimático e tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 5,0) foram previamente incubadas a 30°C por 5 minutos em banho termostático (QUIMIS Q3334M-28).

Em seguida, tubos de ensaio foram denominados “tubo teste”, “tubo controle” e “tubo branco”. O tubo teste foi utilizado como a base do experimento (onde ocorreu a reação enzimática), o tubo controle para o controle dos açúcares presentes no extrato enzimático e o tubo branco para zerar o espectrofotômetro.

Um esquema dos processos envolvidos na determinação da atividade enzimática da tanase está apresentado na Figura 6. Deve-se salientar que tanto o tubo teste quanto o tubo controle tiveram seus tubos branco para zerar o espectrofotômetro, e nesses tubos, denominados “tubo branco teste” e “tubo branco controle”, o extrato enzimático foi substituído por solução tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 5,0). O valor da absorbância foi calculado de acordo com a Equação 3, segundo Sharma, Bhat e Dawra (2000).

$$\Delta A_{520} = (A_{\text{teste}} - A_{\text{branco}}) - (A_{\text{controle}} - A_{\text{branco}}) \quad (3)$$

Na qual,  $\Delta A_{520}$  é a absorbância da enzima,  $A_{\text{teste}}$  é a absorbância do tubo teste,  $A_{\text{branco}}$  é a absorbância do tubo branco e  $A_{\text{controle}}$  é a absorbância do tubo controle.

Todos os ensaios foram realizados em duplicata. De acordo com Sharma, Bhat e Dawra (2000), uma unidade de atividade de tanase é considerada como a quantidade de enzima necessária para produzir um micromol de ácido gálico por minuto sob as condições descritas. A atividade enzimática foi avaliada por meio de uma curva de calibração de ácido gálico em tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 5,0) e foi expressa em  $\text{U.gms}^{-1}$ .

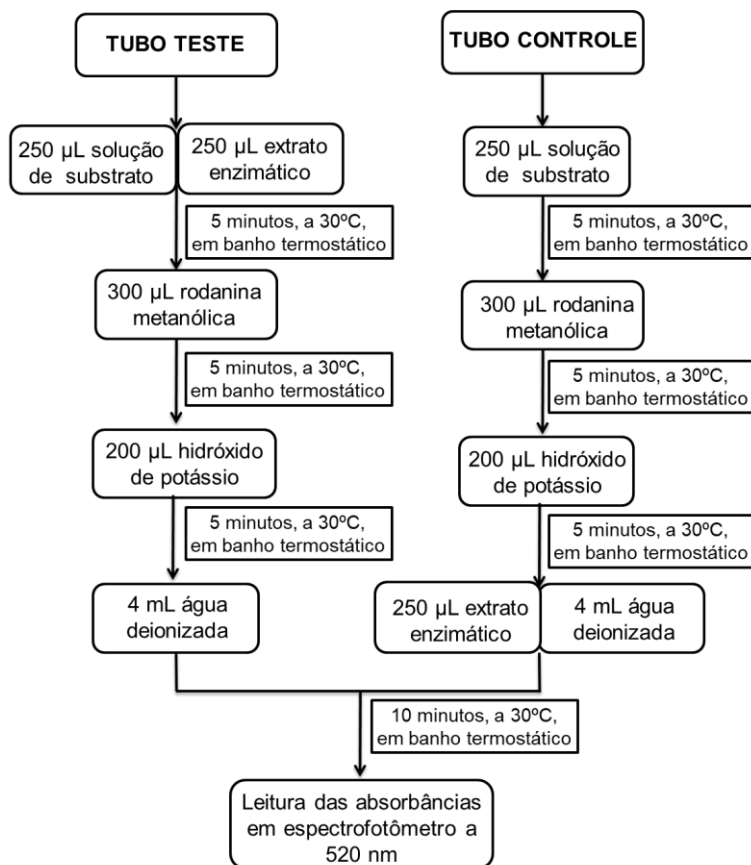


Figura 6 - Esquema das etapas de determinação da atividade enzimática da tanase.

Fonte: própria autora.

A curva de calibração de ácido gálico foi construída conforme o método Melo *et al.* (2005), modificado. Para tanto, uma solução de 10 mg de ácido gálico em tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 5,0) foi preparada em um balão volumétrico de 100 mL e utilizada como solução padrão para a construção da curva de calibração. Alíquotas desta solução de ácido gálico contendo 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 e 0,1 g.L<sup>-1</sup> foram adicionadas a balões volumétricos de 10 mL e o volume de cada balão foi completado com o tampão.

Um esquema dos processos envolvidos na determinação das absorvâncias das soluções de ácido gálico, utilizado para construção da curva de calibração, consta na Figura 7. O valor da absorvância foi calculado de acordo com a Equação 3. Deve-se ressaltar que no tubo branco a solução preparada de ácido gálico foi substituída por solução tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 5,0).

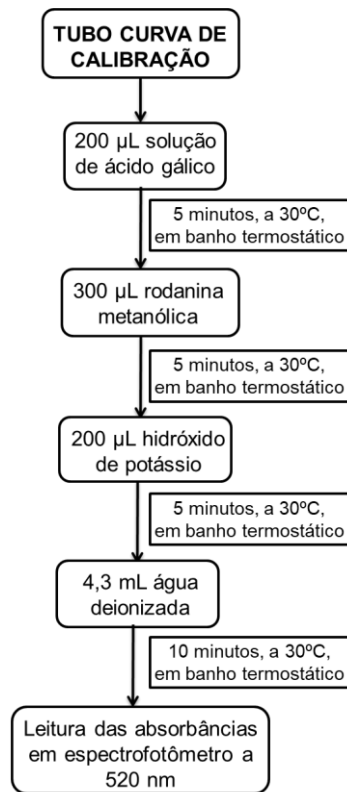


Figura 7 - Esquema da curva de calibração de ácido gálico.

Fonte: própria autora.

#### 4.10. Análises Estatísticas

Após a seleção do melhor fungo e substrato para a produção de tanases, para melhoria das condições da FES, três parâmetros, denominados variáveis independentes, incluindo teor de umidade; proporção de casca de eucalipto e farelo de trigo; e concentração de ácido tânico, foram avaliados por meio de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). O estudo dessas variáveis foi realizado por esse tipo de delineamento, pois, segundo Mateus, Barbin e Conagin (2001), quando comparado ao Delineamento com Fatorial Completo, o DCCR apresenta a vantagem de possuir um menor número de tratamentos, acarretando um menor tempo de produção dos resultados e custo final.

O DCCR foi realizado com oito tratamentos, mais seis pontos axiais e três repetições no ponto central para estimar o erro experimental, dando um total de dezessete experimentos. Cada fator foi estudado em cinco níveis diferentes (-1,682, -1, 0, +1, +1,682) (Tabela 3) e atividade da tanase foi definida como variável dependente (MYERS; MONTGOMERY; ANDERSON-COOK, 2016).

Tabela 3 - Níveis das variáveis estudadas no delineamento composto central rotacional.

Variáveis	Níveis				
	-1,682	-1	0	+1	+1,682
Umidade (%)	50,00	56,08	65,00	73,92	80,00
CE:FT (%)	30:70	38,11:61,89	50:50	61,89:38,11	70:30
Ácido tânico (g.L <sup>-1</sup> )	10,00	16,08	25,00	33,92	40,00

CE: casca de eucalipto; FT: farelo de trigo.

Para avaliar a significância dos principais efeitos e interações, a análise de variância (ANOVA) foi realizada para cada parâmetro. O ajuste do modelo de regressão foi determinado pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e pelo coeficiente ajustado ( $R^2_{adj}$ ) e a significância do modelo apropriado foi definida pelo teste de Fischer (teste F). Os gráficos tridimensionais e seus respectivos gráficos de contorno foram determinados pela interação da variável dependente com as independentes (GHOSH; CHAKRABORTY; RAYCHAUDHURI, 2012).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Micro-organismos Testados

Os fungos *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. e *Fusarium oxysporum* cresceram em meio BDA e em meio sólido, e na Figura 9 consta os fungos nos dois momentos citados.

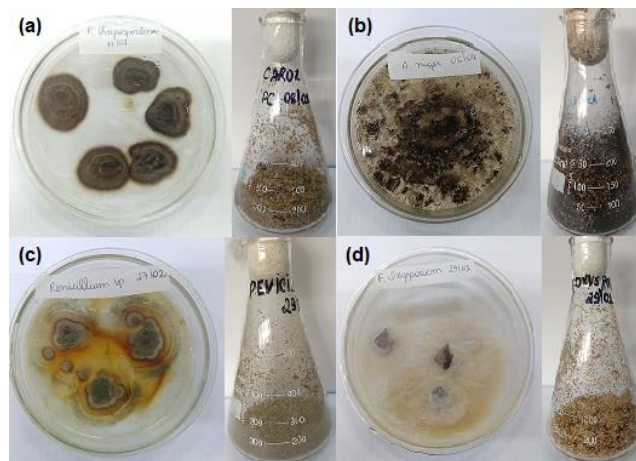


Figura 8 - Cultivos das linhagens (a) *P. chrysosporium*, (b) *A. niger*, (c) *Penicillium* sp. e (d) *F. oxysporum* em placas de Petri e os seus respectivos estoques em frascos Erlenmeyers.

Fonte: própria autora.

Foi realizada a quantificação dos esporos formados nos estoques em meio sólido para determinar a quantidade de esporos iniciais que seria inoculado nos frascos das fermentações subsequentes. A concentração de esporos da suspensão de cada fungo consta na Tabela 4.

Tabela 4 - Concentração de esporos da suspensão para cada fungo testado.

Fungos	Concentração de esporos da suspensão (esporos.g <sup>-1</sup> )
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	2,20 x 10 <sup>11</sup>
<i>Aspergillus niger</i>	1,00 x 10 <sup>9</sup>
<i>Penicillium</i> sp.	6,38 x 10 <sup>12</sup>
<i>Fusarium oxysporum</i>	1,04 x 10 <sup>11</sup>

Assim, os cultivos em frascos, com 10 g de meio sólido, continham 0,1 g de inóculo dos fungos *P. chrysosporium*, *Penicillium* sp., *F. oxysporum* e *A. niger*, obtendo-se, dessa forma, um inóculo com cerca de  $10^8$  esporos por grama de substrato.

## 5.2. Seleção Qualitativa dos Fungos Produtores de Tanases

Os fungos com potencial para produção de tanases foram avaliados por meio do método de ensaio em placas de Petri, na qual a tanase hidrolisa o ácido tânico presente no meio de cultura e um halo claro é formado ao redor da colônia fúngica em função da degradação desse ácido (KUMAR *et al.*, 2010).

Pode-se observar na Tabela 5 que todos os fungos avaliados apresentaram halo de degradação em função da hidrólise do ácido tânico. Não foi possível visualizar formação de halo ao redor das colônias nas primeiras 48 horas de cultivo.

Tabela 5 - Seleção de fungos produtores de tanases pelo método de ensaio em placa de Petri.

Fungo	Halo de hidrólise do ácido tânico (mm)/Dia		
	3	4	5
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	7,1	13,4	21,9
<i>Fusarium oxysporum</i>	11,3	17,2	28,4
<i>Penicillium</i> sp.	27,2	35,0	47,1
<i>Aspergillus niger</i>	38,0	77,9	86,2

Segundo Pinto *et al.* (2001), o método de seleção qualitativa em placa de Petri é um procedimento simples e rápido e, além disso, é considerado eficiente para indicar a capacidade dos micro-organismos em usar o ácido tânico como fonte de carbono em função da síntese e atividade de tanase no meio. De acordo com Murugan, Saravanababu e Arunachalam (2007), a relação entre o diâmetro da colônia e a produção da enzima é significativa e, portanto, esse método pode ser aplicado preliminarmente para detectar potenciais micro-organismos produtores de tanases.

Amplamente aplicado, esse método foi utilizado por Jana *et al.* (2012b) para verificar a capacidade taninolítica de leveduras, bactérias e fungos; por Melo *et al.* (2013) que avaliaram fungos de cavernas brasileiras; por Kumar *et al.* (2015) que verificaram

bactérias isoladas de solos; e por Talukdar, Ringø e Ghosh (2016) que testaram bactérias do sistema digestivo de peixes de água doce.

Entretanto, segundo Melo *et al.* (2013), a triagem em placas de Petri deve ser associada a uma seleção quantitativa para análise completa da eficiência do micro-organismo na produção de tanases. Deste modo, como os fungos avaliados apresentaram capacidade qualitativa de produção de tanases, todos foram submetidos a uma avaliação quantitativa por FES, a partir do uso da combinação de casca de eucalipto e farelo de trigo como substratos.

### 5.3. Determinação da Influência do Teor de Extrativos na Atividade Enzimática da Tanase Produzida por FES

O teor de extrativos é um parâmetro importante, visto que, mediante os resultados obtidos desta variável, torna-se possível identificar o tratamento que possui quantidades superiores de extrativos, dado que os taninos, produtos de interesse deste estudo, é um dos compostos presentes na casca.

Na Figura 10 consta a produção de tanases com cascas de eucalipto dos ambientes A e B, e partir dos resultados foi possível verificar a influência do teor de extrativos na produção de tanases.

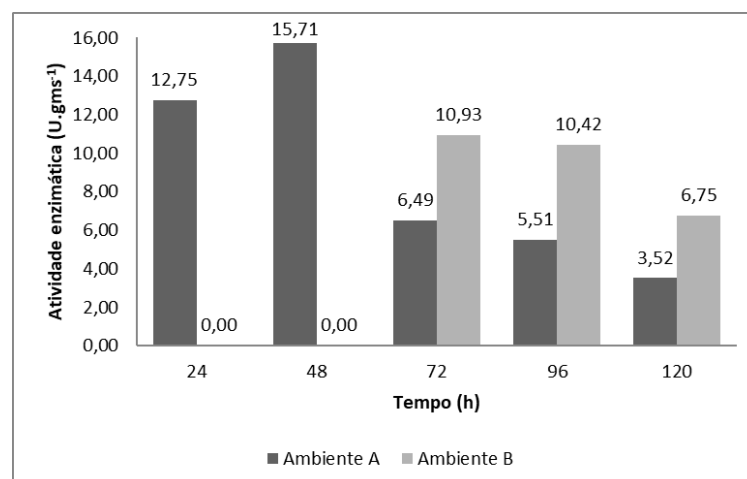


Figura 9 - Comparação entre as cascas de eucalipto de Nova Almeida (Ambiente A) e de Montezuma (Ambiente B) na produção de tanases.

Fonte: própria autora

É possível observar na Figura 10 que a produção de tanases com as cascas de eucalipto do ambiente A se destacou em relação àquela com as cascas do ambiente

B, pois apresentou atividade enzimática máxima de 15,71 U.gms<sup>-1</sup>, enquanto no experimento com as cascas do ambiente B a produção máxima foi de 10,93 U.gms<sup>-1</sup>. É importante ressaltar que o experimento com as cascas do ambiente A produziu tanase desde o primeiro dia de cultivo, enquanto aquele com as do ambiente B começou a produzir a enzima apenas após 72 horas de fermentação.

Diante desses resultados, confirmou-se que o teor de extrativos influencia na atividade enzimática da tanase, pois as CE do ambiente A possuem quantidade superior de extrativos, quando comparadas às do ambiente B, e produziu maior quantidade de enzima.

Segundo Jacobson *et al.* (2005), árvores provenientes de ambientes com maior precipitação produzem maior quantidade de taninos, justificando-se os melhores resultados apresentados pelo ambiente A, que possui um histórico de precipitação superior ao do ambiente B.

Não foram encontradas outras pesquisas com análise da influência do teor de extrativos de casca de eucalipto na produção de tanases, logo, não há dados disponíveis para corroborar com os resultados obtidos. Portanto, o clone 2 proveniente do ambiente A foi o material selecionado como substrato para as fermentações posteriores.

#### 5.4. Produção de Tanases por Fermentação em Estado Sólido

Foram realizados experimentos preliminares para avaliar o potencial dos quatro fungos para produzir tanases por fermentação em estado sólido (FES) e determinar o melhor produtor da enzima. Os resultados obtidos na análise da atividade enzimática indicaram que todos os fungos avaliados foram capazes de sintetizar a enzima tanase, conforme consta na Tabela 6.

Tabela 6 - Atividade enzimática máxima produzida pelos fungos em estudo.

Fungo	Atividade enzimática (U.gms <sup>-1</sup> )	Tempo de fermentação (h)	Produtividade (U.gms <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
<i>P. chrysosporium</i>	13,72	24	0,57
<i>Penicillium</i> sp.	12,75	24	0,53
<i>F. oxysporum</i>	19,35	48	0,40
<i>A. niger</i>	11,67	120	0,10

De acordo com Suseela e Nandy (1985) *apud* Sabu *et al.* (2005), uma característica conferida às tanases é a produção desta enzima durante a fase primária de crescimento do fungo, ocorrendo, posteriormente, a diminuição da atividade devido à redução na produção ou à inibição e desnaturação da enzima. Esta característica pôde ser observada nas fermentações do presente trabalho, conforme pode ser visto na Tabela 6, pois, independente do fungo aplicado, a produção enzimática ocorreu em até 120 horas de cultivo.

Estudos realizados com diferentes fungos, visando a produção de tanases por FES, indicaram produção máxima da enzima em tempos de até 120h de fermentação, conforme pode ser visto na Tabela 7.

Tabela 7 - Produção de tanases por diferentes fungos em até 120 horas de fermentação.

<b>TEMPO DE FERMENTAÇÃO (h)</b>	<b>FUNGO</b>	<b>SUBSTRATO</b>	<b>REFERÊNCIA</b>
24	<i>Aspergillus niger</i>	Pó da semente da tâmara da Índia	SABU <i>et al.</i> (2005)
		Pó da espuma de poliuretano	MATA-GÓMEZ <i>et al.</i> (2015)
48	<i>Penicillium purpurogenum</i>	Semente da tâmara da Índia	JANA <i>et al.</i> (2012a)
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Pó da semente de Achachairu	LIU <i>et al.</i> (2017)
72	<i>Penicillium montanense</i>	Resíduo de acerola	LIMA <i>et al.</i> (2014)
	<i>Aspergillus terreus</i>	Farelo de trigo	MALGIREDDY; NIMMA (2015)
96	<i>Aspergillus heteromorphus</i>	Resíduo de jacarandá do norte da Índia	BENIWAL <i>et al.</i> (2013c)
	<i>Aspergillus niger</i>	Folhas de chá	SHARMA <i>et al.</i> (2014)
120	<i>Paecilomyces variotii</i>	Casca de café e farelo de trigo	BATTESTIN; MACEDO (2007)
	<i>Aspergillus tubingensis</i>	Talos de chá	XIAO <i>et al.</i> (2015)

Como todos os fungos produziram a enzima tanase, a seleção foi realizada por meio da análise da atividade enzimática juntamente com a produtividade. Apesar do *F. oxysporum* ter apresentado maior atividade enzimática de tanase entre os analisados, em termos de produtividade, os fungos *P. chrysosporium* e *Penicillium* sp. se destacaram (Tabela 6). O *Penicillium* sp. foi selecionado para ser aplicado nas fermentações posteriores, pois ocorreram problemas de contaminação no estoque do *P. chrysosporium*.

É importante ressaltar a importância da combinação entre as análises qualitativa e quantitativa para determinar o melhor fungo produtor, conforme descrito por Melo *et al.* (2013), pois, de acordo com os resultados apresentados (Tabela 8), o *A. niger* foi o fungo que formou o maior halo de degradação do ácido tânico na seleção qualitativa, mas não foi o maior produtor da enzima tanase.

Tabela 8 - Comparação entre as análises qualitativa e quantitativa dos fungos.

Fungo	Halo de hidrólise do ácido tânico (mm)	Atividade enzimática (U.gms <sup>-1</sup> )
<i>P. chrysosporium</i>	21,9	13,72
<i>F. oxysporum</i>	28,4	19,35
<i>Penicillium</i> sp.	47,1	12,75
<i>A. niger</i>	86,2	11,67

### 5.5. Avaliação da Influência do Substrato na Produção de Tanases

A seleção do substrato é um dos fatores que influenciam na produção enzimática, pois, dependendo do fungo e do substrato, a enzima, após a indução, pode ser expressa em diferentes níveis de atividade enzimática e mostrar diferentes padrões de produção (AGUILAR *et al.*, 2007).

Avaliou-se a influência do substrato na atividade enzimática da tanase por meio da comparação entre os experimentos com casca de eucalipto (CE) e farelo de trigo (FT), e casca de café (CC) e FT. Consta na Tabela 9 as atividades enzimáticas máximas obtidas nos experimentos com os respectivos substratos.

Tabela 9 - Atividades enzimáticas obtidas nos experimentos com as cascas de eucalipto e de café.

Substrato	Atividade enzimática (U.gms <sup>-1</sup> )	Tempo de cultivo (h)	Produtividade (U.gms <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
Casca de eucalipto	12,75	24	0,53
Casca de café	13,13	96	0,14

Diante dessa comparação, constatou-se que as atividades enzimáticas variaram de acordo com o substrato utilizado e os resultados apontaram a influência do tipo de substrato na produção enzimática.

Observou-se que o cultivo sólido com CC apresentou um rendimento enzimático maior do que o obtido com a CE, porém, em termos de produtividade, a CE se destacou pois produziu maior quantidade de tanase por hora (Tabela 9). Esse dado tornou-se relevante, pois para as indústrias produtoras de enzimas é importante que o micro-organismo alcance a máxima produtividade, já que este é um fator que minimiza os custos de produção.

Pesquisas sobre a produção de tanases por espécies do gênero *Penicillium* a partir de casca de eucalipto em fermentação em estado sólido (FES) não foram encontradas na literatura científica.

Estudos sobre a produção de tanases por outros tipos de fungos com esse substrato são escassas, sendo apenas um relacionado à FES e outro à fermentação submersa (FS). Kumar *et al.* (2009) estudaram a produção de tanases por *Aspergillus ruber* a partir de cascas de eucalipto utilizando FES e apresentaram uma produção menor que 5 U.gms<sup>-1</sup>. Lokeswari (2010) estudou a produção de tanases por *Aspergillus oryzae* utilizando cascas de eucalipto em FS e observaram uma produção de 0,17 U.mL<sup>-1</sup> de tanase.

A produção enzimática obtida a partir de casca de eucalipto por *Penicillium* sp. em FES foi superior às relatadas nos trabalhos citados acima (12,75 U.gms<sup>-1</sup> = 46,52 U.mL<sup>-1</sup>). Logo, a produção enzimática por *Penicillium* sp. a partir de casca de eucalipto mostrou-se satisfatória, e o substrato foi selecionado para a otimização da produção de tanases.

## 5.6. Otimização da Produção de Tanases

Análises estatísticas foram realizadas em um *software* para avaliar a influência dos fatores do planejamento e de suas combinações na atividade enzimática de tanase. Essas análises foram realizadas para o tempo de fermentação fixo em 72 horas, uma vez que a maior parte das atividades máximas de tanase foi obtida nesse tempo de cultivo.

A Tabela 10 apresenta o delineamento composto central rotacional (DCCR) com as respostas da atividade de tanase, com valor em destaque para a máxima atividade obtida experimentalmente de 26,57 U.gms<sup>-1</sup>, nas condições de 80,0% de umidade, proporção de 50% de casca de eucalipto e 50% de farelo de trigo, e concentração de 25,0 g.L<sup>-1</sup> de ácido tânico (tratamento 10).

Tabela 10 - Atividades enzimáticas de tanase obtidas no planejamento experimental para a fermentação em 72 horas de cultivo.

Tratamento	Umidade (%)	Proporção de Casca de Eucalipto (%)	Concentração de Ácido Tânico (g.L <sup>-1</sup> )	Atividade Enzimática (U.gms <sup>-1</sup> )
1	56,08 (-1)	38,11 (-1)	16,08 (-1)	7,00
2	73,92 (+1)	38,11 (-1)	16,08 (-1)	6,25
3	56,08 (-1)	61,89 (+1)	16,08 (-1)	10,34
4	73,92 (+1)	61,89 (+1)	16,08 (-1)	1,31
5	56,08 (-1)	38,11 (-1)	33,92 (+1)	4,57
6	73,92 (+1)	38,11 (-1)	33,92 (+1)	12,88
7	56,08 (-1)	61,89 (+1)	33,92 (+1)	4,25
8	73,92 (+1)	61,89 (+1)	33,92 (+1)	16,47
9	50,00 (-1,682)	50,00 (0)	25,00 (0)	5,46
<b>10</b>	<b>80,00 (+1,682)</b>	<b>50,00 (0)</b>	<b>25,00 (0)</b>	<b>26,57</b>
11	65,00 (0)	30,00 (-1,682)	25,00 (0)	4,39
12	65,00 (0)	70,00 (+1,682)	25,00 (0)	8,05
13	65,00 (0)	50,00 (0)	10,00 (-1,682)	6,78
14	65,00 (0)	50,00 (0)	40,00 (+1,682)	5,83
15	65,00 (0)	50,00 (0)	25,00 (0)	6,79
16	65,00 (0)	50,00 (0)	25,00 (0)	7,06
17	65,00 (0)	50,00 (0)	25,00 (0)	11,97

OBS: Valores entre parênteses são as variáveis codificadas no DCCR.

Inicialmente, foi proposto um modelo composto pelos fatores individuais lineares e quadráticos, bem como as interações entre eles, para ajuste dos dados. Os efeitos foram sendo removidos do modelo um a um, iniciando por aqueles que possuíam

maior p-valor, até que se obteve o valor máximo do coeficiente de determinação ajustado ( $R^2_{adj}$ ). Optou-se por utilizar o  $R^2_{adj}$  para definir o modelo de regressão porque o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) sempre aumenta à medida que são adicionados termos ao modelo, já o  $R^2_{adj}$  geralmente diminui quando variáveis desnecessárias são adicionadas, e isso contribui para a escolha de um modelo de regressão ótimo (MYERS; MONTGOMERY; ANDERSON-COOK, 2016).

Na Tabela 11 constam os coeficientes de regressão, o erro padrão, o teste t para cada coeficiente e o p-valor, que mostra a significância ( $p \leq 0,05$ ) dos coeficientes da regressão.

Tabela 11 - Tabela dos efeitos dos fatores e da interação mantidos no modelo estatístico.

Fatores	Efeitos	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	Test t	p-valor
Média*	8,72103	8,721025	2,579835	3,380459	0,011751
Umidade (L)*	6,77404	3,387020	2,424442	2,794062	0,026752
Umidade (Q) <sup>ns</sup>	4,49594	2,247971	2,670953	1,683273	0,136199
CE (Q) <sup>ns</sup>	-2,44594	-1,222972	2,670953	-0,91576	0,390251
Ác Tânico (L) <sup>ns</sup>	1,71294	0,856468	2,424442	0,706528	0,502692
Ác Tânico (Q) <sup>ns</sup>	-2,38293	-1,191466	2,670953	-0,89217	0,40193
Interação 1L x 3L*	7,58080	3,790399	3,166288	2,394223	0,047871

\*significativo ( $p \leq 0,05$ ); ns: não significativo; L: linear; Q: quadrático.

Os fatores estatisticamente significativos a um nível de confiança de 95% foram a média dos valores de atividade enzimática, o teor de umidade linear e a interação entre a umidade e concentração de ácido tânico. Isso significa que essas variáveis foram os principais fatores de influência em relação à atividade da tanase.

As variáveis teor de umidade quadrática, proporção de casca de eucalipto quadrática e concentração de ácido tânico linear e quadrática não apresentaram significância estatística, porém permaneceram no modelo, dado que assim se obteve o valor de 0,5698 para o  $R^2_{adj}$ , indicando que os termos lineares, quadráticos e de interação ajustados foram capazes de elucidar 56,98% da variação das respostas de atividade de tanase. Além disso, o modelo apresentou um  $R^2$  de 73,11% (Hu *et al.*, 2018).

Segundo Rumsey (2014), o valor do  $R^2_{adj}$  deve ser maior ou igual a 0,70 para ser satisfatório, e, portanto, o  $R^2_{adj}$  do modelo de regressão está abaixo daquele considerado bom. O baixo valor do coeficiente de determinação ajustado do modelo obtido ( $R^2_{adj} = 56,98\%$ ) indica que esse modelo de regressão não é adequado para atingir a atividade enzimática máxima de tanase e, nesse caso, seria indicado o ajuste

do modelo. Apesar disso, avaliou-se a significância estatística do modelo de regressão por meio da análise de variância (ANOVA) (Tabela 12).

Tabela 12 - ANOVA resultante do planejamento experimental para otimização da atividade da tanase.

Fatores	GL	Soma Quadrática	Média Quadrática	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
<b>Regressão</b>	6	371,0642	61,844032	3,30*	3,22
<b>Resíduo</b>	10	187,4761	18,747609		
<b>Falta de Ajuste</b>	8	133,1651	16,645638	1,96 <sup>ns</sup>	19,37
<b>Erro Puro</b>	2	17,0239	8,5119348		
<b>Total</b>	16	558,5403			

\*Significativo ( $p \leq 0,05$ ); ns: Não significativo ( $p > 0,05$ ); GL: graus de liberdade.

Segundo Barros Neto, Scarminio e Bruns (2001), no teste F, ao nível de significância de 5%, o modelo de regressão e a falta de ajuste do modelo são considerados estatisticamente significativos se o valor de  $F_{\text{calculado}}$  for maior que o de  $F_{\text{tabelado}}$ . Logo, o modelo de regressão foi estatisticamente significativo, pois o valor do  $F_{\text{calculado}}$  foi maior que  $F_{\text{tabelado}}$  ( $3,30 > 3,22$ ) e a falta de ajuste do modelo foi não significativa, uma vez que o  $F_{\text{calculado}}$  foi menor que o  $F_{\text{tabelado}}$  ( $1,96 < 19,37$ ) (Tabela 12).

O modelo estatístico explicou de maneira satisfatória os dados experimentais e, a partir disso, foi possível a construção do modelo da superfície de resposta ajustado, representado pela Equação 4.

$$y = 8,72 + 3,39X_1 + 2,25 X_1^2 - 1,22X_2^2 + 0,87X_3 - 1,19X_3^2 + 3,79X_1X_3 \quad (4)$$

Na qual,  $y$  é o valor codificado da variável resposta, que corresponde à atividade enzimática da tanase,  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  são os valores codificados da umidade, da proporção de casca de eucalipto e da concentração de ácido tânico, respectivamente.

Nas Figuras 11 e 12 constam a superfície de resposta e a curva de nível, respectivamente, geradas para análise da interação entre as variáveis umidade e proporção de casca de eucalipto (CE), fixada a variável concentração de ácido tânico.

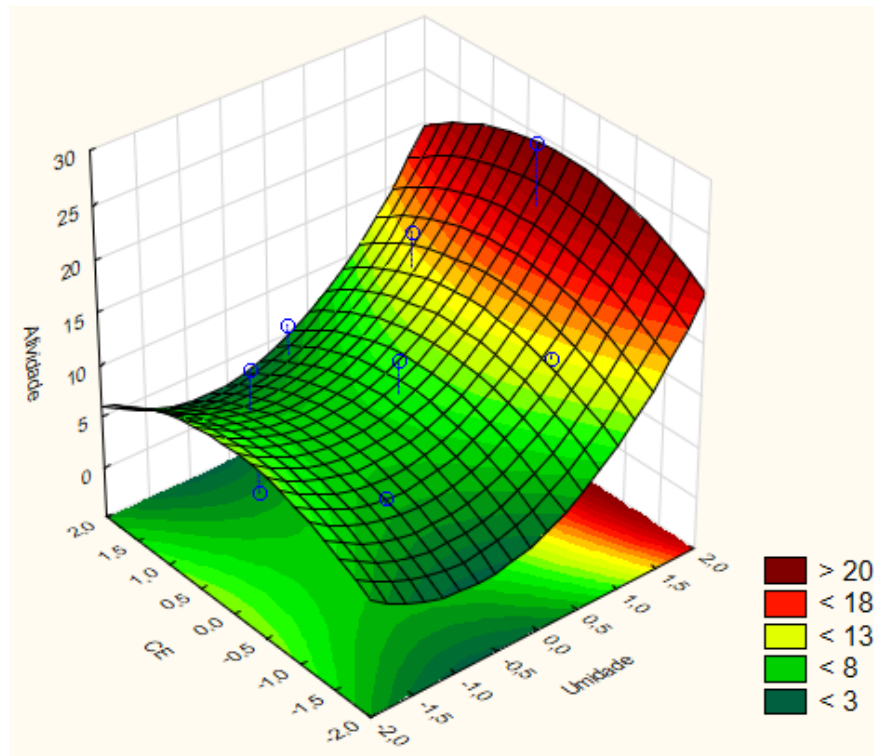


Figura 10 - Superfície de resposta para avaliação da atividade enzimática em função da interação entre as variáveis umidade e proporção de casca de eucalipto (CE).

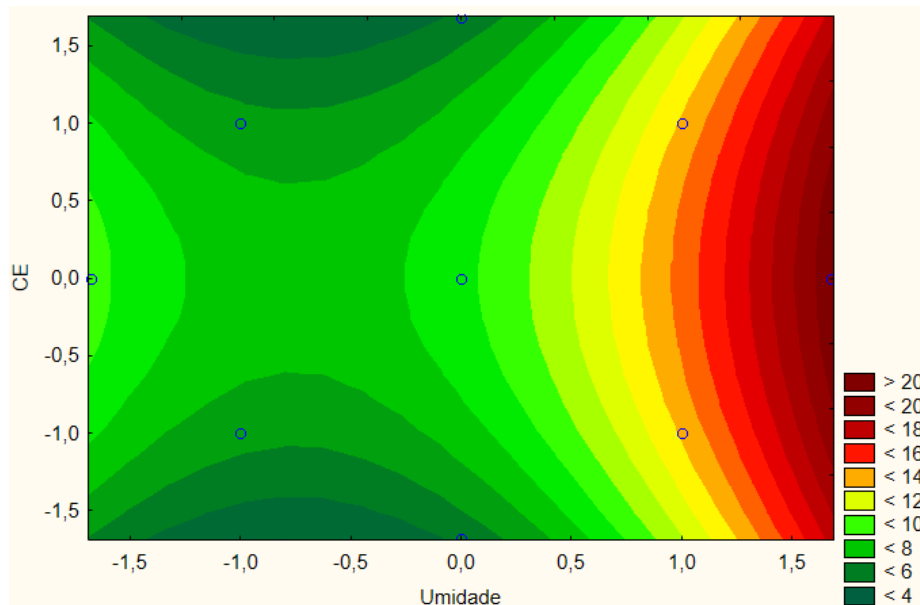


Figura 11 - Curva de nível para avaliação da atividade enzimática em função da interação entre as variáveis umidade e proporção de casca de eucalipto (CE).

Após a análise da superfície de resposta juntamente com a curva de nível, verificou-se que a proporção de casca de eucalipto (CE) e farelo de trigo (FT) influenciou pouco na atividade enzimática da tanase, independente do teor de umidade inicial. No entanto, quando o teor de umidade foi elevado, a atividade da enzima aumentou consideravelmente e atingiu o maior valor ( $26,57 \text{ U.gms}^{-1}$ ) no nível máximo do

planejamento para a umidade e no ponto central para a proporção de CE ( $X_1 = +1,682$  e  $X_2 = 0$ ), ou seja, 80,0% de umidade inicial e proporção 50,0% de CE e 50,0% de FT. Verificou-se nas Figuras 11 e 12 que ensaios com teores de umidade maiores do que 80,0% podem propiciar a obtenção de atividades enzimáticas de tanase superiores àquelas observadas nos experimentos realizados. Isso se confirmou de acordo com o efeito positivo dessa variável (Tabela 11).

Em relação à proporção de CE observou-se que a atividade enzimática se mostrou superior em concentrações intermediárias de CE. No entanto, com base no efeito da Tabela 11 e na tendência das Figuras 11 e 12, não há indícios de que diminuir ou aumentar a proporção de CE no meio sólido causaria um aumento significativo da atividade da tanase, visto que o teor de umidade apresentou uma influência bem superior.

Nas Figuras 13 e 14 é possível observar a superfície de resposta e a curva de nível, respectivamente, geradas para avaliação da interação entre as variáveis umidade e concentração de ácido tânico, fixada a variável proporção de casca de eucalipto.

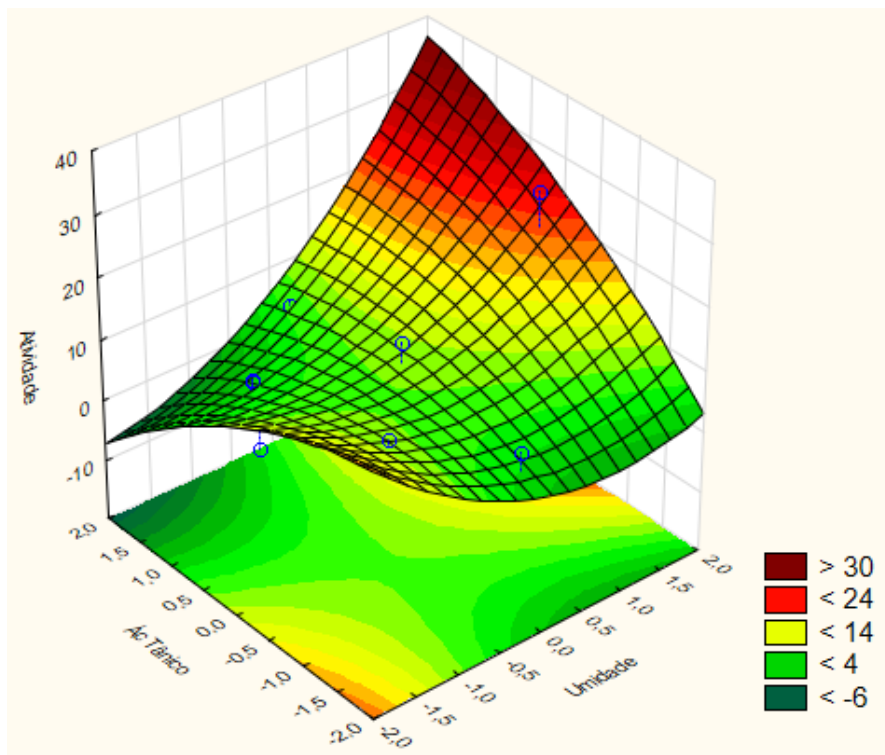


Figura 12 - Superfície de resposta para avaliação da atividade enzimática em função da interação entre as variáveis umidade e concentração de ácido tânico.

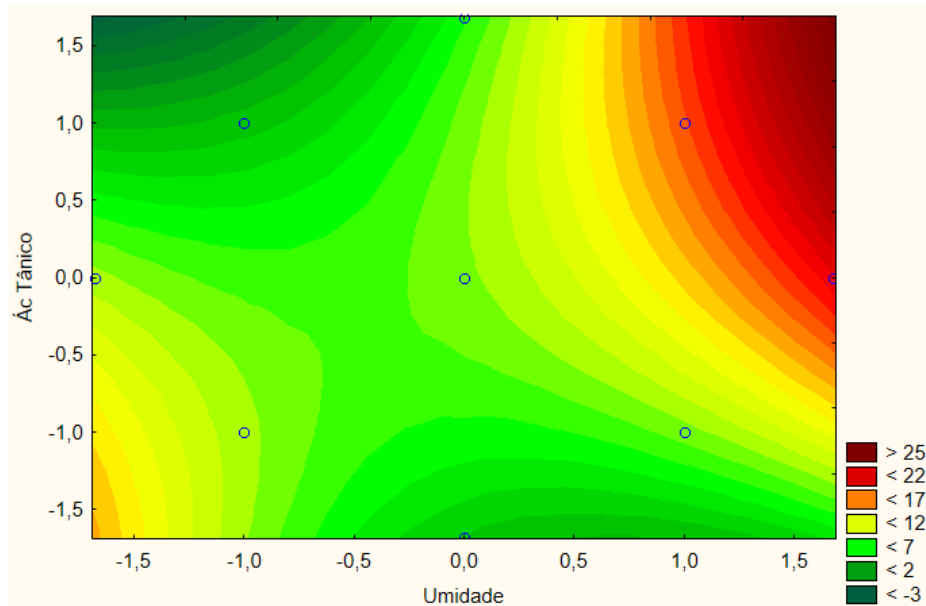


Figura 13 - Curva de nível para avaliação da atividade enzimática em função da interação entre as variáveis umidade e concentração de ácido tânico.

Verificou-se nas Figuras 13 e 14 que quando analisados simultaneamente os fatores teor de umidade e concentração de ácido tânico, a produção de tanases por *Penicillium* sp. aumentou de acordo com o aumento do teor de umidade e da concentração de ácido tânico.

De acordo com os resultados obtidos, a maior atividade enzimática foi obtida no nível máximo do planejamento para a umidade e no ponto central para a concentração de ácido tânico ( $X_1 = +1,682$  e  $X_3 = 0$ ), ou seja, 80,0% de umidade inicial e 25,0 g.L<sup>-1</sup> de ácido tânico. Porém, observando-se as Figuras 13 e 14 e o efeito positivo da interação entre a umidade e a concentração de ácido tânico que consta na Tabela 11, ensaios com teor de umidade maior que 80,0% e concentração de ácido tânico maior que 40,0 g.L<sup>-1</sup> podem propiciar uma produção de tanase superior àquela obtida nos experimentos realizados.

Silva (2013) cultivou *Penicillium rolfsii* URM 6216 em resíduo de manga para produzir tanases por fermentação em estado sólido (FES) e estudou a influência da proporção de substrato, da umidade inicial e da concentração de ácido tânico na produção de tanases por FES. Após delineamento experimental, a produção máxima de tanase de (96,22 U.mL<sup>-1</sup>) foi alcançado com 7,5 g de resíduo de manga, umidade inicial de 50% e 20,0 g.L<sup>-1</sup> de ácido tânico.

Lima *et al.* (2014) cultivaram *Penicillium montanense* URM 6286 em resíduo de acerola e avaliaram a influência do teor de umidade inicial do meio sólido e da concentração de ácido tânico na atividade enzimática. De acordo com o modelo

estatístico obtido, verificou-se que as duas variáveis influenciaram significativamente na produção de tanase e obteve-se a atividade máxima de tanase ( $41,64 \text{ U.mL}^{-1}$ ) em meio sólido umedecido a 70% e suplementado com  $35,0 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido tânico.

Bhoite e Murthy (2015) realizaram um cultivo de *Penicillium verrucosum* em polpa de café e estudaram a influência, dentre outros fatores, da umidade inicial na atividade enzimática da tanase. O teor de umidade apresentou influência na produção da enzima e a atividade máxima ( $115,995 \text{ U.g}^{-1}$ ) foi obtida no ponto central do planejamento estatístico, correspondente a 50% de umidade inicial.

Diante dos dados apresentados comprovou-se que a umidade é um fator de grande influência na produção de tanases por fermentação em estado sólido, pois o teor de umidade ótimo depende tanto do substrato sólido quanto do micro-organismo utilizado no processo. Em relação ao ácido tânico verificou-se que a sua aplicação no processo fermentativo é importante na indução da tanase que, por sua vez, cliva os taninos e propicia fornecimento contínuo de carbono (FARINAS, 2015; SAMPAIO; HADDAD; WIENDL, 2018).

Além da análise relacionada à umidade e à concentração de ácido tânico, vale salientar que a atividade enzimática máxima de tanase obtida neste trabalho ( $26,57 \text{ U.gms}^{-1} = 526,61 \text{ U.g}^{-1} = 53,08 \text{ U.mL}^{-1}$ ) está próxima daquelas citadas acima. Dessa forma, pode-se afirmar que a utilização de casca de eucalipto como substrato na FES para produção de tanases por *Penicillium* sp. apresentou resultados satisfatórios e mostrou-se como um potencial substituto para as fontes de taninos mais comuns na produção de tanases.

## 6 CONCLUSÕES

Os fungos *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium* sp. foram capazes de utilizar o ácido tânico como fonte de carbono em função da síntese e atividade de tanase no meio. Na seleção quantitativa dos fungos produtores de tanases, o *Penicillium* sp. foi selecionado para a otimização da produção de tanases.

Após a aplicação do delineamento composto central rotacional, a melhor condição de fermentação para produção de tanases tanase foi com uma concentração de 25 g.L<sup>-1</sup> de ácido tânico e 80% de umidade inicial em proporções de casca de eucalipto e farelo de trigo de 50:50. Com a otimização, foi possível dobrar a produção da enzima em relação aos testes iniciais do trabalho (de 12,75 U.gms<sup>-1</sup> para 26,58 U.gms<sup>-1</sup>) que tinham como condição fixa de cultivo uma concentração de 10 g.L<sup>-1</sup> de ácido tânico e 60% de umidade inicial em proporções de casca de eucalipto e farelo de trigo de 60:40.

Os fatores estatisticamente significativos na produção de tanases foram a média dos valores de atividade enzimática, o teor de umidade linear e a interação entre a umidade e concentração de ácido tânico. De acordo com o teste F, o modelo de regressão mostrou-se significativo e a falta de ajuste não significativa.

A casca de eucalipto mostrou-se como um substrato promissor para a produção de tanases por fermentação em estado sólido. É importante salientar que o uso de cascas de eucalipto como substrato para produção de tanases é escasso, em especial o uso desse resíduo lignocelulósico com fungos da espécie *Penicillium*, o que comprova a relevância da pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- ABDULLA, J.; ROSE, S. P.; MACKENZIE, A. M.; MIRZA, W.; PIRGOZLIEV, V. Exogenous tannase improves feeding value of a diet containing field beans (*Vicia faba*) when fed to broilers. **British Poultry Science**, v. 57, n. 2, p. 246-250, 2016.
- AGUILAR, C. N.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G. Review: sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. **Food Science and Technology International**, v. 7, n. 5, p. 373-382, 2001.
- AGUILAR, C. N.; RODRÍGUEZ, R.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; AUGUR, C.; FAVELA-TORRES, E.; PRADO-BARRAGAN, L. A.; RAMÍREZ-CORONEL, A.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C. Microbial tannases: advances and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 47-59, 2007.
- AHARWAR, A.; PARIHAR, D. K. *Talaromyces verruculosus* tannase production, characterization and application in fruit juices detannification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 18, 2019.
- AOKI, K.; SHINKE, R.; NISHIRA, H. Purification and some properties of yeast tannase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, n. 1, p. 79-85, 1976.
- BARBEHENN, R. V.; CONSTABEL, C. P. Tannins in plant-herbivore interactions. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1551-1565, 2011.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. ed. Campinas: Unicamp, 2001.
- BARTHOMEUF, C.; REGERAT, F.; POURRAT, H. Production, purification and characterization of a tannase from *Aspergillus niger* LCF 8. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, n. 3, p. 320-323, 1994.
- BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A. Tannase production by *Paecilomyces variotti*. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 9, p. 1832-1837, 2007.
- BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentação e Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2004.
- BEENA, P. S.; BASHEER, S. M.; BHAT, S. G.; BAHKALI, A. H.; CHANDRASEKARAN, M. Propyl gallate synthesis using acidophilic tannase and simultaneous production of tannase and gallic acid by Marine *Aspergillus awamori* BTMFW032. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 5, p. 612-628, 2011.
- BENIWAL, V.; KUMAR, A.; GOEL, G.; CHHOKAR, V. A novel low molecular weight acido-thermophilic tannase from *Enterobacter cloacae* MTCC 9125. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 2, p.132-137, 2013a.
- BENIWAL, V.; KUMAR, A.; SHARMA, J.; CHHOKAR, V. Recent advances in industrial application of tannases: a review. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 228-233, 2013b.

BENIWAL, V.; RAJESH; GOEL, G.; KUMAR, A.; CHHOKAR, V. Production of tannase through solid state fermentation using Indian Rosewood (*Dalbergia Sissoo*) sawdust—a timber industry waste. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 583-590, 2013c.

BÖER, E.; BODE, R.; MOCK, H. P.; PIONTEK, M.; KUNZE, G. Atan1p - an extracellular tannase from the dimorphic yeast *Arxula adenivorans*: molecular cloning of the *ATAN1* gene and characterization of the recombinant enzyme. **Yeast**, v. 26, n. 6, p. 323–337, 2009.

BÖER, E.; BREUER, F. S.; WENIGER, M.; DENTER, S.; PIONTEK, M.; KUNZE, G. Large-scale production of tannase using the yeast *Arxula adenivorans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 1, p. 105-114, 2011.

BHOITE, R. N.; MURTHY, P. S. Biodegradation of coffee pulp tannin by *Penicillium verrucosum* for production of tannase, statistical optimization and its application. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 727-735, 2015.

BON, E. P. S., FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

BRAGATTO, J. **Avaliação do potencial da casca de *Eucalyptus* spp. para a produção de bioetanol**. 2010. 156 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

CARNEIRO, A. C. O.; VITAL, B. R.; FREDERICO, P. G. U.; SANTOS R. C.; SOUSA JÚNIOR W. P. Efeito da hidrólise ácida dos taninos de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden nas propriedades dos adesivos tânicos. **Revista Árvore**, v. 33, n. 4, p. 733-739, 2009.

CAVALCANTI, R. M. F.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of *Aspergillus fumigatus* CAS-21 tannase with potential for propyl gallate synthesis and treatment of tannery effluent from leather industry. **3 Biotech**, v. 8, n. 6, 2018.

CHANG, Z.; ZHANG, Q.; LIANG, W.; ZHOU, K.; JIAN, P.; SHE, G.; ZHANG, L. A comprehensive review of the structure elucidation of tannins from *Terminalia* Linn. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 26p.

CHAVES, I. L. S. **Extração e caracterização de taninos de cascas de eucalipto cultivado em ambientes contrastantes**. 2018. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, 2018.

CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M.; RODRÍGUEZ-DURÁN, L. V.; BALAGURUSAMY, N.; PRADO-BARRAGÁN, A.; RODRÍGUEZ, R.; CONTRERAS, J. C.; AGUILAR, C. N. Biotechnological advances and challenges of tannase: an overview. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 445-459, 2012.

EMBRAPA. **Avaliação da qualidade de produtos à base de *Trichoderma***. 2012. Disponível em: <[http://www.cnpma.embrapa.br/down\\_site/forum/2012/trichoderma/Apostila\\_Trichoderma\\_2012.pdf](http://www.cnpma.embrapa.br/down_site/forum/2012/trichoderma/Apostila_Trichoderma_2012.pdf)>. Acesso em: 24 abr. 2019.

FARIAS, G. M.; GORBEA, C.; ELKINS, J. R.; GRIFFIN, G. J. Purification, characterization, and substrate relationships of the tannase from *Cryphonectria parasitica*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 44, n. 1, p. 51-63, 1994.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179-188, 2015.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid.state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n. 2, p. 85-101, 2003.

GOEL, G.; PUNIYA, A. K.; AGUILAR, C. N.; SINGH, K. Interaction of gut microflora with tannins in feeds. **Naturwissenschaften**, v. 92, n. 11, p. 497-503, 2005.

GHOSH, S.; CHAKRABORTY, R.; RAYCHAUDHURI, U. Optimizing process conditions for palm (*Borassus flabellifer*) wine fermentation using response surface methodology. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 4, p. 1633-1639, 2012.

HAMDY, H. S. Purification and characterisation of a newly isolated stable long-life tannase produced by *F. subglutinans* (Wollenweber and Reinking) Nelson et al. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, v. 3, n. 3, p. 142-151, 2008.

HEADON, D. R.; WALSH, G. The industrial production of enzymes. **Biotechnology Advances**, v. 12, n. 4, p. 635-646, 1994.

HERNES, P. J.; HEDGES, J. I. Tannin signatures of barks, needles, leaves, cones, and wood at the molecular level. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 68, n. 6, p. 1293-1307, 2004.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175-186, 2004.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages?. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301-306, 2005.

HOTA, S. K.; DUTTA, J. R.; BANERJEE, R. Immobilization of tannase from *Rhizopus oryzae* and its efficiency to produce gallic acid from tannin rich agro-residues. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 200-204, 2007.

HU, Y.; DU, C.; PENSUPA, N.; LIN, C. S. K. Optimisation of fungal cellulase production from textile waste using experimental design. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 118, p. 133-142, 2018.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES – IBÁ. **Relatório 2017**. 80p. Disponível em: <[http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA\\_RelatorioAnual2017.pdf](http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf)>. Acesso em: 26 ago. 2018.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES – IBÁ. **Relatório 2019**. 80p. Disponível em: <<https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/iba-relatorioanual2019.pdf>>. Acesso em: 07 jan. 2020.

IWAMOTO, K.; TSURUTA, H., NISHITAINI, Y., OSAWA, R. Identification and cloning of a gene encoding tannase (tannin acylhydrolase) from *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917<sup>T</sup>. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 269-277, 2008.

JACOBSON, T. K. B.; GARCIA, J.; SANTOS, S. C.; DUARTE, J. B.; FARIAS, J. G.; KLIEMANN, H. J. Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35, n. 3, p. 163-169, 2005.

JANA, A.; HALDER, S. K.; GHOSH, K.; PAUL, T.; VÁGVÖLGYI, C.; MONDAL, K. C.; MOHAPATRA, P. K. D. Tannase immobilization by chitin-alginate based adsorption-entrapment technique and its exploitation in fruit juice clarification. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 11, p. 2319-2329, 2015.

JANA, A.; MAITY, C.; HALDER, S. K.; MONDAL, K. C.; PATI, B. R.; MOHAPATRA, P. K. D. Tannase production by *Penicillium purpurogenum* PAF6 in solid state fermentation of tannin-rich plant residues following OVAT and RSM. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 5, p. 1254-1269, 2012a.

JANA, A.; MAITY, C.; HALDER, S. K.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C.; MOHAPATRA, P. K. Rapid screening of tannase producing microbes by using natural tannin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1080-1083, 2012b.

KAPOOR, A.; IQBAL, H. Efficiency of tannase produced by *Trichoderma harzianum* MTCC 10841 in pomegranate juice clarification and natural tannin degradation. **International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research**, v. 4, n. 6, p. 641-650, 2013.

KAR, B.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. C. Effect of additives on the behavioural properties of tannin acyl hydrolase. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 9, p. 1285-1293, 2003.

KHOKHAR, S., MAGNUSDOTTIR, S. G. M. Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 565-570, 2002.

KLONGSIRIWET, C.; QUIJADA, J.; WILLIAMS, A. R.; MUELLER-HARVEY, I.; WILLIAMSON, E. M.; HOSTE, H. Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 5, n. 3, p. 127-134, 2015.

KUMAR, M.; RANA, S.; BENIWAL, V.; SALAR, R. K. Optimization of tannase production by a novel *Klebsiella pneumoniae* KP715242 using central composite design. **Biotechnology Reports**, v. 7, p. 128-134, 2015.

KUMAR, R.; KUMARI, A.; AHLAWAT, S.; VIRENDER, A.; SHARMA, J. Production of tannase under solid-state fermentation using amla and jamun leaves. **Annals of Biology**, v. 25, n. 1, p. 7-12, 2009.

KUMAR, R.; KUMAR, A.; NAGPAL, R.; SHARMA, J.; KUMARI, A. A novel and sensitive plate assay for screening of tannase-producing bacteria. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 177-179, 2010.

LAURICHESSE, S.; AVÉROUS, L. Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 7, p. 1266-1290, 2014.

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**, v. 29, n. 6, p. 497-503, 1994.

LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Production and application of tannin acyl hydrolase: State of the Art. **Advances in Applied Microbiology**, v. 44, p. 215-260, 1997.

LI, J.; XIAO, Q.; HUANG, Y.; NI, H.; WU, C.; XIAO, A. Tannase application in secondary enzymatic processing of inferior Tieguanyin Oolong tea. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 28, p. 87-94, 2017.

LIMA, J. S.; CABRERA, M. P.; CASAZZA, A. A.; SILVA, M. F.; PEREGO, P.; CARVALHO JÚNIOR, L. B.; CONVERTI, A. Immobilization of *Aspergillus ficuum* tannase in calcium alginate beads and its application in the treatment of boldo (*Peumus boldus*) tea. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.118, n. B, p. 1989-1994, 2018.

LIMA, J. S.; CRUZ, R.; FONSECA, J. C.; MEDEIROS, E. V.; MACIEL, M. H. C.; MOREIRA, K. A.; MOTTA, C. M. S. Production, characterization of tannase from *Penicillium montanense* URM 6286 under SSF using agroindustrial wastes, and application in the clarification of grape juice (*Vitis vinifera* L.). **The Scientific World Journal**, v. 2014, 9 páginas, 2014.

LIU, T. P. S. L.; COSTA, R. M. P. B.; FREITAS, D. J. V.; NACIMENTO, C. O.; MOTTA, C. M. S.; BEZERRA, R. P.; HERCULANO, P. N.; PORTO, A. L. F. Tannase from *Aspergillus melleus* improves the antioxidant activity of green tea: purification and biochemical characterisation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 3, p. 652-661, 2017.

LOKESWARI, N. Production of tannase through submerged fermentation of tannin-containing cashew husk by *Aspergillus oryzae*. **Rasayan Journal of Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 32-37, 2010.

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

MAHENDRAN, B.; RAMAN, N.; KIM, D. J. Purification and characterization of tannase from *Paecilomyces variotii*: hydrolysis of tannic acid using immobilized tannase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 444-450, 2006.

MALGIREDDY, N. R.; NIMMA, L. N. R. Optimal conditions for production of tannase from newly isolated *Aspergillus terreus* under solidstate fermentation. **European Journal of Biotechnology and Bioscience**, v. 3, n. 2, p. 56-64, 2015.

MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTAÑEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: production and

extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 365-373, 2011.

MASSCHELEIN, C. A.; BATUM, M. S. Enzymatic degradation and participation of ester linked beer polyphenols in chill haze formation. **Proceedings of the Congress of European Brewers Convention**, v. 18, p. 359-370, 1981.

MATA-GÓMEZ, M.; MUSSATTO, S. I.; RODRÍGUEZ, R.; TEIXEIRA, J. A.; MARTINEZ, J. L.; HERNANDEZ, A.; AGUILAR, C. N. Gallic acid production with mouldy polyurethane particles obtained from solid state culture of *Aspergillus niger* GH1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 4, p. 1131-1140, 2015.

MATA-GÓMEZ, M.; RODRÍGUEZ, L. V.; RAMOS, E. L.; RENOVATO, J.; CRUZ-HERNÁNDEZ, M. A.; RODRÍGUEZ, R.; CONTRERAS, J.; AGUILAR, C. N. A novel tannase from the xerophilic fungus *Aspergillus niger* GH1. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 9, p. 987-996, 2009.

MATEUS, N. B.; BARBIN, D.; CONAGIN, A. Viabilidade de uso do delineamento composto central. **Acta Scientiarum Technology**, v. 23, n. 6, p. 1537-1546, 2001.

MELO, A. F.; PINTO, G. A. S.; GONÇALVES, L. R. B.; FERREIRA, A. L. O. Método para determinação da atividade de tanase em derivados imobilizados. **Comunicado Técnico (Embrapa Agroindústria Tropical)**, v. 110, 4 p., 2005.

MELO, A. G.; SOUZA, P. N. C.; MAIA, N. C.; THOMAS, A. B.; SILVA, L. B. R.; BATISTA, L. R. B.; FERREIRA, R. L.; CARDOSO, P. G. Screening and identification of tannase-producing fungi isolated from Brazilian caves. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 6, p. 483-487, 2013.

MÉLO, B. C. A. **Produção de celulases por fermentação em estado sólido em resíduo de acerola (*Malpighia sp.*) utilizando *Trichoderma reesei***. 2016. 116 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

MINGSHU, L.; KAI, Y.; QIANG, H.; DONGYING, J. Biodegradation of gallotannins and ellagitannins. **Journal of Basic Microbiology**, v. 46, p. 68-84, 2006.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. New developments in solid-state fermentation: II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p.1211-1225, 2000.

MOLINA, G.; GUPTA, V. K.; SINGH, B. N.; GATHERGOOD, N. **Bioprocessing for biomolecules production**. 1. ed. Hoboken: Wiley, 2019.

MONDAL, K. C.; BANERJEE, R.; PATI, B. R. Tannase production by *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 9, p. 767-769, 2000.

MUKHERJEE, P. K. **Quality control and evaluation of herbal drugs: evaluating natural products and traditional medicine**. 1. ed. Cambridge: Elsevier, 2019.

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

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; ANDERSON-COOK, C. M. **Response surface methodology**: process and product optimization using designed experiments. 4. ed. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2016.

NATARAJAN, K. Tannase: a tool for instantaneous tea. **Current Biotica**, v. 3, n. 1, p. 96-103, 2009.

OLIVAS-AGUIRRE, F. J.; WALL-MEDRANO, A.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; LÓPEZ-DÍAZ, J. A.; ÁLVAREZ-PARRILLA, E.; ROSA, L. A.; RAMOS-JIMENEZ, A. Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. **Nutrición Hospitalaria**, v. 31, n. 1, p. 55-66, 2015.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, 2000.

PEROVANO FILHO, N.; SILVA, K. F. S.; LÓPEZ, A. M. Q. Decomposição fúngica de ácido tânico e outros compostos em efluente agroindustrial. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 33, n. 2, p. 145-153, 2011.

PINHEIRO, I. R. **Estudo da influência das condições de cultivo de *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622 na produção do antibiótico retamicina**. 2003. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **Comunicado Técnico (Embrapa Agroindústria Tropical)**, v. 102, 5 p., 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.

QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, v. 26, n. 4, p. 485-492, 2002.

RAAMAN, N.; MAHENDRAN, B.; JAGANATHAN, C.; SUKUMAR, S.; CHANDRASEKARAN, V. Optimisation of extracellular tannase production from *Paecilomyces variotii*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 1033-1039, 2010.

RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p.127-a135, 2003.

RAGHUWANSHI, S.; MISRA, S.; SAXENA, R. K. Treatment of wheat straw using tannase and white-rot fungus to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 5, n. 13, 2014.

RAHARDJO, Y. S. P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 161-179, 2006.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, 1998.

RANA, N. K.; BHAT, T. K. Effect of fermentation system on the production and properties of tannase of *Aspergillus niger* van Tieghem MTCC 2425. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 203-212, 2005.

REDONDO, L. M.; CHACANA, P. A.; DOMINGUEZ, J. E.; MIYAKAWA, M. E. F. Perspectives in the use of tannins as alternative to antimicrobial growth promoter factors in poultry. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-7, 2014.

ROWELL, R. M. Handbook of wood chemistry and wood composites. In: ROWELL, R. M.; PETTERSEN R.; HAN, J. S.; ROWELL, J. S.; TSHABALALA, M. A. **Cell Wall Chemistry**. 2. ed. New York: CRC Press, 2012. p. 37-72.

RUMSEY, D. **Estatística II para leigos**. Rio de Janeiro: Alta Books, 2014.

SABU, A.; PANDEY, A.; DAUD, M. J.; SZAKACS, G. Tamarind seed powder and palm kernel cake: two novel agro residues for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* ATCC 16620. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 11, p. 1223-1228, 2005.

SALOMÃO, G. S. B. **Análise da produção de celulasas por fungos utilizando bagaço de cana como substrato**. 2017. 82 f. Dissertação (Mestrado em Energia) - Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2017.

SAMPAIO, P. R.; HADDAD, S.; WIENDL, V. B. Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para produção da enzima tanase. **Sinergia IFSP**, v. 19, n. 2, p. 152-156, 2018.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2689-2694, 2005.

SANTOS, E. S. **Micro-organismos promissores para a degradação de compostos fenólicos presentes em bagaço-de-cana, lodo e águas residuárias de agroindústria sucro-alcooleira**. 2007. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2007.

SCHMEDDING, D. J. M.; HENNINK, H.; VAN, G. M. J. M. C. ; SMITH, C. J. **Process for the production of beer having improved flavour stability**. EP1252285B1, 01 fev. 2001, 17 mar. 2004.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; VAN DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger*: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 426-435, 2002.

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

SELWAL, M. K.; YADAV, A.; SELWAL, K. K.; AGGARWAL, N. K.; GUPTA, R.; GAUTAM, S. K. Optimization of cultural conditions for tannase production by *Pseudomonas aeruginosa* IIB 8914 under submerged fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 599-605, 2010.

SELWAL, M. K.; YADAV, A.; SELWAL, K. K.; AGGARWAL, N. K.; GUPTA, R.; GAUTAM, S. K. Tannase production by *Penicillium atramentosum* KM under SSF and its applications in wine clarification and tea cream solubilization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 374-387, 2011.

SHARMA, N. K.; BENIWAL, V.; KUMAR, N.; KUMAR, S.; PATHERA, A. K.; RAY, A. Production of tannase under solid-state fermentation and its application in detannification of guava juice. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 281-290, 2014.

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

SILVA, L. R. C. **Espécies de *Penicillium* em solos de Caatinga e Mata Atlântica, produção de tanase e detecção do potencial micotoxigênico**. 2013. 202 f. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: UFSC, 2001.

SURVASE, S. A.; SHALIGRAM, N. S.; PANSURIYA, R. C.; ANNAPURE, U. S.; SINGHAL, R. S. A novel medium for the enhanced production of cyclosporin a by *Tolypocladium inflatum* MTCC 557 using solid state fermentation. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 462-467, 2009.

SUSEELA, R. G.; NANDY, S.C. Decomposition of tannic acid and gallic acid by *Penicillium chrysogenum*. **Leather Science**, v. 32, p. 278–280, 1985.

TALUKDAR, S.; RINGØ, E.; GHOSH, K. Extracellular tannase-producing bacteria detected in the digestive tracts of freshwater fishes (Actinopterygii: Cyprinidae and Cichlidae). **Acta Ichthyologica et Piscatoria**, v. 46, n. 3, p. 201-210, 2016.

TASKIN, M. Co-production of tannase and pectinase by free and immobilized cells of the yeast *Rhodotorula glutinis* MP-10 isolated from tannin-rich persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruits. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 2, p. 165-172, 2013.

TRUGILHO, P. F.; MORI, F. A.; LIMA, J. T.; CARDOSO, D. P. Determinação do teor de taninos na casca de *Eucalyptus* spp. **Cerne**, v. 9, n. 2, p. 246-254, 2003.

URBÁNSZKI, K.; SZAKACS, G.; TENGÉRDY, R. P. Standardization of the filter paper activity assay for solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 1, p. 65-69, 2000.

VAQUERO, I.; MARCOBAL, A.; MUÑOZ, R. Tannase activity by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, n. 2, p. 199-204, 2004.

VISWANATH, V.; LEO, V. V.; PRABHA, S. S.; PRABHAKUMARI, C.; POTTU, V. P.; JISHA, M. S. Biosynthesis of tannase from cashew testa using *Aspergillus niger* MTCC5889 by solid state fermentation. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 11, p. 7433-7440, 2015.

VU, V. H.; PHAM, T. A.; KIM, K. Improvement of fungal cellulase production by mutation and optimization of solid state fermentation. **Mycobiology**, v. 39, n. 1, p. 20-25, 2011.

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

XIAO, A.; HUANG, Y.; NI, H.; CAI, H.; YANG, Q. Statistical optimization for tannase production by *Aspergillus tubingensis* in solid-state fermentation using tea stalks. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 143-147, 2015.

ZHANG, L.; LI, J.; WANG, Y.; LIU, S.; WANG, Z.; YU, X. Integrated approaches to reveal genes crucial for tannin degradation in *Aureobasidium melanogenum* T9. **Biomolecules**, v. 9, n. 9, 14p., 2019.