

**Reaproveitamento de resíduos alimentares na produção de tanase por
Cunninghamella echinulata UCP 1305 através de fermentação submersa****Reuse of food waste in the production of tannase by Cunninghamella echinulata UCP
1305 through submerged fermentation**

DOI:10.34117/bjdv6n12-427

Recebimento dos originais: 20/11/2020

Aceitação para publicação: 18/12/2020

José Bezerra de Paiva

Graduado em Ciências Farmacêuticas

Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais pela Universidade Católica de Pernambuco

Universidade Católica de Pernambuco

Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, Recife - PE, 50050-900

email: jbezerrafcia@gmail.com

Uiara Maria de Barros Lira Lins

Graduada em Ciências Farmacêuticas

Mestranda em Desenvolvimento de Processos Ambientais pela Universidade Católica de Pernambuco

Universidade Católica de Pernambuco

Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, Recife - PE, 50050-900

email: uiara_maria@hotmail.com

Diego Guedes de Lima Lemos

Graduado em Engenharia Química

Mestrando em Desenvolvimento de Processos Ambientais pela Universidade Católica de Pernambuco

Universidade Católica de Pernambuco

Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, Recife - PE, 50050-900

e-mail: qdiegolima@hotmail.com

Maria Karollyne dos Santos Paiva

Estudante de Ciências Farmacêuticas pela UNIVISA – Centro Universitário de Vitória de Santo Antão

Loteamento São Vicente Ferrer, 71 , Cajá- PE , CEP: 55610-900

e-mail: karollynemaria1@gmail.com

Armando José Gomes Filho

Graduado em Ciências Biológicas

Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais pela Universidade Católica de Pernambuco

Universidade Católica de Pernambuco

Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, Recife - PE, 50050-900

email: armandogomes935@gmail.com

Laura Ventura Morais e Souza

Estudante de Engenharia Química pela Universidade Católica de Pernambuco

Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, Recife - PE, 50050-900

e-mail: lventurams@gmail.com

Israel Goncalves dos Santos

Graduado em Engenharia Química

Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais pela Universidade Católica de Pernambuco

Universidade Católica de Pernambuco

Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, Recife - PE, 50050-900
email: israelgsds@gamil.com

Carlos Alberto Alves da Silva

Graduado em Engenharia Química

Doutor em Biotecnologia

Professor Adjunto IV, Universidade Católica de Pernambuco

Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, 50050-590 Recife – PE

e-mail: carlos.alves@unicap.br

RESUMO

As enzimas microbianas têm aumentado sua produção nas últimas décadas, devido a sua enorme versatilidade em diversos processos industriais. Tanino acil hidrolase (EC 3.1.1.20) ou tanase, é uma enzima que apresenta uma grande versatilidade e está envolvida diretamente na hidrólise de ésteres e ligações laterais de taninos. Esta enzima é produzida principalmente por diversos gêneros de fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Foram realizados estudos envolvendo amostras de *Cunninghamella echinulata* (UCP 1305 e 1308), isoladas de amostras de solo da Caatinga da cidade de Serra Talhada no Estado de Pernambuco, onde inicialmente foram testadas diferentes temperaturas (28 e 37 °C) e pH (4.5, 5.5, 6.5, 7.0 e 8.0) em meio sólido durante 120 horas, com acompanhamento diário. Após a seleção da melhor amostra produtora, foram realizados estudos de produção enzimática através de fermentação submersa, utilizando quatro meios de composição química diferenciada, durante 120 horas, 37 oC e 150 rpm. Nesses ensaios foram avaliados a curva de crescimento microbiano, variação do pH e a determinação enzimática das amostras a cada 24 hs. Após a seleção do melhor meio de produção, foram realizados ensaios envolvendo planejamento fatorial de 23 com meios contendo resíduos agroindustriais (resíduo de uva, cascas de laranjas e café) nas mesmas condições do meio controle, realizado previamente. Os resultados obtidos revelaram que a amostra *Cunninghamella echinulata* UCP 1305 demonstrou a produção de tanase em meio sólido através do aparecimento do halo característico da enzima testada (4,5 cm), com valores de pH de 7,0 e temperatura de 37 oC. Nos ensaios de fermentação submersa, os melhores resultados da atividade enzimática foram obtidos no meio denominado 3, pH de 6.58 e atividade de 0,413 U/mL, sendo denominado de meio controle. Os ensaios utilizando meios alternativos contendo resíduos agroindustriais, demonstraram que o meio contendo resíduo da uva à 3%, apresentou máximo de atividade da tanase (0,357 U/mL) quando comparado aos demais meios testados nas mesmas condições. Verifica-se que a utilização de meios utilizando resíduos agroindustriais ricos em taninos surgem como uma alternativa promissora nos processos fermentativos, pois reduzem a poluição ambiental e geram produtos biotecnológicos de alto valor agregado para as indústrias.

Palavras-chave: enzimas microbianas, substratos agroindustriais, fungos mucorales

ABSTRACT

Microbial enzymes have increased their production in the last decades, due to their enormous versatility in several industrial processes. Tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) or tannase is an enzyme that exhibits great versatility and is directly involved in the hydrolysis of esters and side-links of tannins. This enzyme are produced mainly by several genera of filamentous fungi, yeasts and bacteria. Studies involving samples of *Cunninghamella echinulata* (UCP 1305 and 1308), isolated from Caatinga soil samples from the city of Serra Talhada in the State of Pernambuco, Brazil, where different temperatures (28 and 37 °C) and pH (4.5, 5.5) were initially tested , 6.5, 7.0 and 8.0) in solid medium for 120 hours, with daily monitoring. After the selection of the best production sample, enzymatic production studies was carried out using submerged fermentation using four different chemical composition media for 120 hours, 37 oC and 150 rpm. In these tests, the microbial growth curve, pH variation and the enzymatic determination of the samples was evaluated every 24 hours. After the selection of the best production medium, tests were carried out involving factorial planning of 23 with media containing agro-industrial residues (grape

residues, peels of oranges and coffee) under the same conditions of the previous control medium. The results showed that the sample *C. echinulata* UCP 1305 demonstrated the production of tannase in solid medium through the appearance of the halo characteristic of the enzyme tested (4,5 cm), with values of pH of 7.0 and temperature of 37 °C. In the submerged fermentation experiments, the best results of the enzymatic activity were obtained in the media named 3, pH of 6.58 and activity of 0.413 U / mL, being denominated control medium. The assays using alternative media containing agroindustrial residues, showed that the medium containing grape residue at 3% presented maximum tannase activity (0.371 U / mL) when compared to the other media tested under the same conditions. It is verified that the use of means using agroindustrial residues rich in tannins appears as a promising alternative in the fermentative processes, because they reduce the environmental pollution and generate biotechnological products of high added value for the industries.

Keywords: microbial enzyme, agroindustrial substrates, mucoral fungi.

1 INTRODUÇÃO

O reaproveitamento de resíduos agroindustriais para formulação de meios para produção de diversos bioprodutos economicamente viáveis, têm sido relatado na literatura, devido a sua grande quantidade de micro e macronutrientes presentes em sua composição química, que podem facilmente serem assimilados por diversos gêneros de micro-organismos e biotransformados em produtos de alto valor agregado, além de redução de custos na produção desses meios e da poluição ambiental (HE, ZHANG, 2014; DO NASCIMENTO FILHO, FRANCO, 2015; KUMAR et al.; 2016; TADDIA, BOGGIONE, TUBIO, 2019; RICARDINO, SOUZA, DA SILVA NETO, 2020).

A biotecnologia tem evoluído expressivamente nos últimos anos, devido aos avanços da biodiversidade microbiana, através do isolamento de novos micro-organismos com elevado potencial biotecnológico, de ambientes pouco conhecidos como a Caatinga. Com isso, existe um incremento no desenvolvimento econômico de pesquisas visando novos bioprodutos de alto valor agregado, produzidos por novos micro-organismos que ainda não foram nem identificados a nível de gênero e espécie desses ambientes, valorizando assim um crescente interesse das indústrias que desenvolvem novos processos, para geração de produtos com maior qualidade, menor consumo energético e que causem menos impactos no meio ambiente (NAGLE et al., 2003; SINGH, RATHORE, SRIVASTAVA, 2020).

O mercado enzimático é considerado extremamente lucrativo e crescente, pois a sua utilização vem conquistando um espaço maior devido a sua vasta aplicação industrial, pois o potencial enzimático apresenta uma versatilidade comprovada devido a série de vantagens apresentadas, superando assim os processos químicos convencionais e contribuindo para a produção de novos compostos e gerar benefícios para o meio ambiente, por meio da biodegradabilidade e pelo menor consumo de energia (RANGHAR, AGRAWAL, AGRAWAL, 2018; NIYONZIMA, VEENA, MORE, 2020). Porém um dos maiores obstáculos enfrentados na competição com a síntese química são: o alto custo de produção e a

qualidade dos resíduos utilizados (EBAID et al, 2019; AHMAD et al., 2019).

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

A biotecnologia tem evoluído expressivamente nos últimos anos, devido aos avanços da biodiversidade microbiana, através do isolamento de novos micro-organismos com elevado potencial biotecnológico, de ambientes pouco conhecidos como a Caatinga (CAVALCANTI, et al., 2017; COELHO et al., 2018; RIBEIRO et al., 2020). Com isso, existe um incremento no desenvolvimento econômico de pesquisas visando novos bioprodutos de alto valor agregado, produzidos por novos micro-organismos que ainda não foram nem identificados a nível de gênero e espécie desses ambientes, valorizando assim um crescente interesse das indústrias que desenvolvem novos processos, para geração de produtos com maior qualidade, menor consumo energético e que causem menos impactos no meio ambiente (JULLESSON et al. 2015; CAVALCANTI et al, 2017; JAGTAP, RAO, 2018).

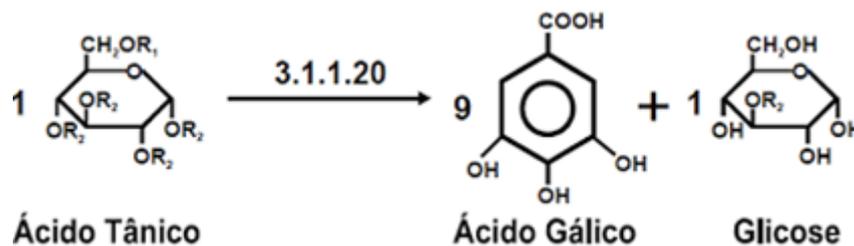
O mercado enzimático é considerado extremamente lucrativo e crescente, pois a sua utilização vem conquistando um espaço maior devido a sua vasta aplicação industrial, pois o potencial enzimático apresenta uma versatilidade comprovada devido a série de vantagens apresentadas, superando assim os processos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

As enzimas são compostos químicos que apresentam uma alta eficiência catalítica, alto grau de especificidade e uma grande capacidade em acelerar reações especiais, na maioria das vezes, sem a formação de subprodutos residuais indesejáveis, reduzindo assim a probabilidade de grandes focos de poluição ambiental (GUSMÃO, SILVA, MEDEIROS, 2017; NIYONZIMA, VEENA, MORE, 2020), e são mais específicas em sua ação do que as substâncias químicas sintéticas e esses aspectos contribuem para o emprego acelerado destes biocatalisadores em todos os campos industriais atualmente (SILVA, MALTA, 2017; PATEL, SINGHANIA, PANDEY, 2017; SHRESTHA et al., 2018).

Tanino acil hidrolase ou tanase (EC 3.1.1.20), são enzimas que pertencem à classe das hidrolases

(AGUILAR et al., 2007; BELUR, MUGERAYA, 2011; MEHTA et al., 2013; GREGORIO, 2017; SHAO et al., 2020; CORRÊA et al., 2020) e se caracterizam pela ação hidrolítica em complexos polifenólicos, tendo a capacidade (Figura 1) de hidrolisar ligações éster e ligações depsídicas de taninos hidrolisáveis como ácido tânico, galato de metilo, ácido digálico, epicatequina galato, epigalocatequina galato, liberando após as reações, produtos como (glicose e ácido gálico em substratos como ácido tânico, epicatequinagalato, epigalocatequinagalato, ácido clorogênico entre outros compostos químicos, apresenta ponto isoelétrico de 4.0-4.5 e massa molecular entre 180kDa e 300kD (BATTESTIN, 2007; BENIWAL et al., 2013; RAGHUWANSHI et al., 2014; DE LIMA, 2014; AHARWAR, PARIHAR, 2018; WAKIL, AJAYI, FASIKU, 2020).

Figura 1. Estrutura química da enzima tanase



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

A utilização de diversos gêneros de micro-organismos, principalmente os fungos filamentosos, em processos fermentativos submersos para produção industrial de uma grande maioria de bioprodutos microbianos, principalmente as enzimas microbianas (PLEISSNER, VENUS, 2016; CHAMBERGO, VALENCIA, 2016; SHARMA et al., 2017; LADICS, SEWALT, 2018; ARORA, MISHRA, MISHRA, 2020).

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

2 OBJETIVOS

Produzir e detectar a atividade enzimática da tanase utilizando uma amostra de *Cunninghamella*

echinulata através da formulação de meios alternativos contendo substratos agroindustriais ricos em taninos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRO-ORGANISMOS

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

3.2 SELEÇÃO COM AMOSTRAS PRODUTORAS DE TANASE EM MEIO SÓLIDO

Para a seleção e detecção da atividade tanase, foi utilizada a metodologia descrita por PINTO et al. (2001). As amostras cresceram em meio Sabouraud suplementado com ácido tânico (1%). O meio de detecção utilizado foi Peptona 10g/L, Glicose 20g/L, Agar 20g/L e Ácido tânico 0,2%, a qual o ácido tânico colocado em vapor fluente e adicionado separadamente. O meio foi distribuído em placas de Petri, e após solidificação, foram feitos furos no centro das placas de 0,8 cm de diâmetro. Foi inoculada 100 μ L uma suspensão esporica de 10^7 esporos/mL. Os ensaios foram realizados em diferentes condições de temperatura (28°C e 37°C), e pH (4.5; 5.5; 6.5; 7.0 e 8.0), durante 120 horas, com acompanhamento diário. A verificação da atividade enzimática foi detectada através da formação de um halo característico da enzima testada.

3.3 SELEÇÃO DE MEIOS PARA A PRODUÇÃO DE TANASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Após a seleção da melhor amostra produtora de tanase em meio sólido e das condições de temperatura e pH, foram realizados ensaios de produção através de fermentação submersa, utilizando quatro diferentes meios com soluções de sais em (g/L), segundo método utilizado por LIMA, et al (2017) nas seguintes composições :

M1 KH₂PO₄ (1,0); NH₄NO₃ (2,0); MgSO₄.7H₂O (0,2); CaCl₂.2H₂O (0,02); MnCl₂.4H₂O (0,004); Na₂MoO₄.2H₂O (0,002); FeSO₄.7H₂O (0,0025), ácido tânico (10).

M2 NaNO₃, (6,0); KH₂PO₄ (1,52); KCl (0,52); MgSO₄. 7H₂O (0,52); FeSO₄. 7H₂O (0,01); ZnSO₄. 7H₂O (0,01); Acido tânico (10).

M3 NaNO₃ (6,0); KH₂PO₄ (1,52); KCl(0,52); MgSO₄. 7H₂O (0,52); FeSO₄. 7H₂O (0,01); ZnSO₄. 7H₂O (0,01); Cu(NO₃)₂. 3H₂O (0,01); Acido tânico (10).

M4 NaH₂PO₄.2H₂O (1,0); KH₂PO₄ (2,0); CaCl₂ (0,025); MnSO₄. 7H₂O (0,015); FeSO₄. 7H₂O (0,005); ZnSO₄. 7H₂O (0,03); (NH₄)₂SO₄ (1,0); Frutose (1,0); Ácido tânico (10).

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

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

3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Foi utilizada a metodologia descrita por Mondal et al.(2001), modificada por Banerjee et al 2006. Foi realizados ensaios empregando 150 μ L de solução de ácido tânico (0,7% (p/v) em tampão acetato com pH 5,5 - 0,2 M), adicionado a 0,025 mL de extrato enzimático bruto e incubados à 40°C por 10 minutos em banho maria. A reação foi paralisada com a adição de 1,5 mL de solução de albumina de soro bovino (preparada em tampão acetato pH 5,0 – 0,2 M, contendo 0,17 M de NaCl), logo em seguida, as amostras foram centrifugadas a 7000 x g por 15 min a temperatura de 4°C. O precipitado foi ressuspensão com a adição de 1,5 mL de solução de SDS-Trietanolamina (SDS 1% (p/v) adicionando 5% (v/v) de Trietanolamina em água destilada), acrescido de 0,5 mL de FeCl₃ (0,01 M de FeCl₃ em 0,01 M de ácido clorídrico). As soluções foram deixadas em repouso por 15 min. As leituras da absorbância foi realizadas a 530 nm em espectrofotômetro modelo Biochrom S21.

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

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

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

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

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios para a detecção da atividade enzimática tanase em placas Petri sob diferentes condições de temperaturas (28 e 37°C) e pH (4.5, 5.5, 6.5, 7,0 e 8.0) foram visualizadas através da medição do crescimento das colônias junto ao halo característico formado pela reação de oxidação do ácido tânico (Figura 2). A tabela 1 mostra os resultados obtidos da detecção enzimática das amostras dos fungos *Cunninghamella echinulata* (UCP 1305 e 1308).

Figura 2. Detecção da atividade enzimática tanase A: Controle; B *Cunninghamella eculata* UCP 1308; C *Cunninghamella eculata* UCP 1305.

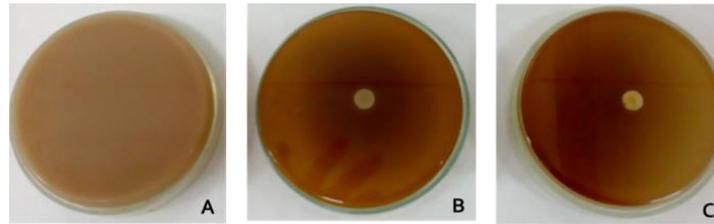


Tabela 1 – Determinação da atividade tanase por amostras de *Cunninghamella echinulata* UCP 1305 e UCP 1308 em diferentes condições de pH e temperatura em 120 h.

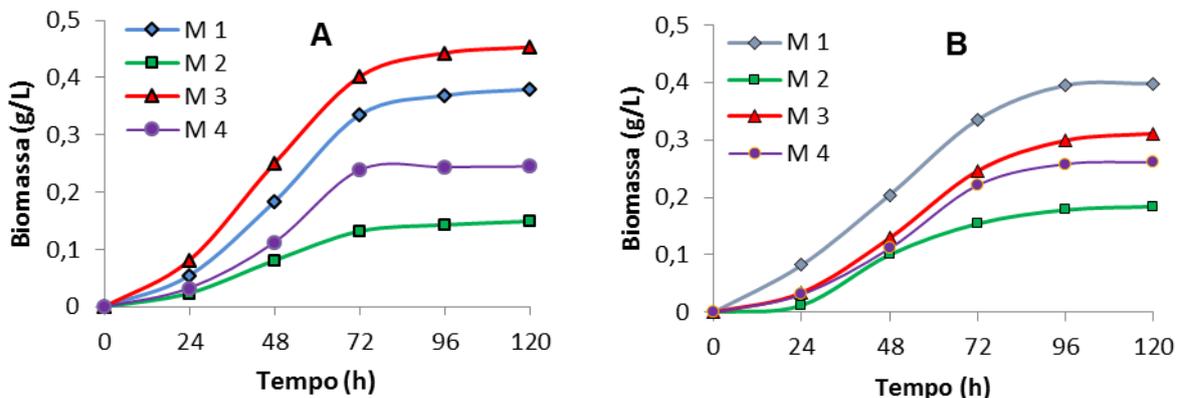
pH	UCP 1305 120h		UCP 1308 120h	
	28°C	37°C	28°C	37°C
4,5	1,0	1,0	0,5	1,0
5,5	1,0	1,0	1,0	1,0
6,5	2,0	3,0	1,5	3,0
7,0	2,5	4,5	3,0	4,0
8,0	2,0	2,0	2,0	3,5

Houve formação do halo característico da tanase durante o período de 72 e 96 horas, porém valores pouco significativos. Assim verifica-se que os melhores valores de atividade 4,5 e 4,0, foram obtidas respectivamente apresentando e, nas condições de pH 7.0 a 37 °C no tempo de 120 horas são apresentadas nas amostras de *Cunninghamella echinulata* UCP 1305 e 1308.

Segundo Costa (2012), a enzima tanase possui estabilidade quando produzida numa faixa da temperatura que pode variar de 30 a 60°C, porém sua melhor produção ocorre na faixa de 30 a 40°C.

Os resultados dos ensaios para seleção do meio de cultivo em fermentação submersa inicialmente foram analisados os valores de biomassa através da curva de crescimento nos diferentes meios de cultivo para as amostras de *Cunninghamella echinulata* UCP 1305 e UCP 1308, estão descritas na figura 2 (A e B).

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



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

Os valores obtidos no ensaio de biomassa corroboram com os trabalhos realizados Moura et al, 2015, que estudaram biomassa de *aspergillus* para o mesmo meio denominado M3 e obteve o valor de 0,310 g/L em 96 hs.

Segundo Orlandelli (2012) a presença de elementos minerais desempenham importante papel como constituintes de enzimas e coenzimas e são geralmente necessários nos meios de produção de enzimas por micro-organismos, aumentando assim sua biomassa microbiana.

Na análise do pH, a variação do valor inicial (7,0) que ao longo dos dias no meio de cultivo tiveram uma diminuição dos valores de pH conforme tabela 2.

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

Meios	pH inicial	UCP 1305 pH final	UCP 1308 pH final
M 1	7,0	5,35	5,17
M 2	7,0	5,10	5,09
M 3	7,0	5,76	5,59
M 4	7,0	5,47	5,37

Os valores de pH obtidos durante o cultivo das cepas fungicas realizadas nos diferentes meios de cultura também demonstraram que o pH permaneceu em uma faixa ligeiramente ácida, provavelmente, devido a produção de metabólitos ácidos, como também indicado por resultados obtidos por Nascimento et al (2014).

Os resultados da produção da enzima tanase por *Cunninghamella echinulata* (UCP 1305 e 1308), em diferentes meios de cultura é apresentado nas figuras 3 A e B. Na Figura 3 A e B constata-se que o melhor resultado da produção da enzima ocorreu no meio denominado M3 em 72 h de cultivo para a *Cunninghamella echinulata* UCP 1305 com 0,413 U/mL, superando o resultado da amostra de *Cunninghamella echinulata* UCP 1308 com o valor de 0,228 U/mL no meio denominado M1, em 96 hs de cultivo.

Figura 3. Produção da enzima tanase por *Cunninghamella echinulata* (A) UCP 1305 e (B) UCP 1308 em diferentes meios de cultura durante o período de 120 horas de cultivo.

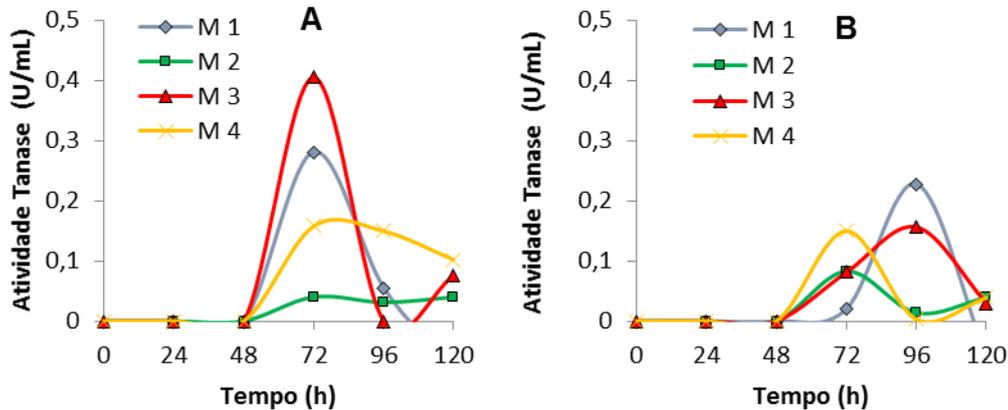


Tabela 3 – Atividade tanase por amostras de *Cunninghamella echinulata* UCP 1305 (A) e UCP 1308 (B) em diferentes meios de cultura.

A	72 h	96 h	120 h
M 1	0,281	0,062	0,000
M 2	0,040	0,034	0,042
M 3	0,413	0,000	0,085
M 4	0,163	0,150	0,103

B	72	96	120
M 1	0,020	0,228	0,000
M 2	0,083	0,014	0,039
M 3	0,081	0,156	0,029
M 4	0,150	0,003	0,039

A atividade enzimática para a tanase através *Cunninghamella echinulata* corrobora com a afirmação feita por RAGHUWANSI et al.,2011 quando relata que a tanase é uma enzima extracelular produzida na presença de um indutor, o ácido tânico, por fermentação líquida, submersa ou sólida, por fungos filamentosos, bactérias e ou leveduras.

De acordo com a literatura nos estudos realizados por MOURA et al (2015) com *Aspergillus niger* em fermentação submersa na mesma temperatura (37°C) obteve índice enzimáticos (0,180 U/mL).

4 CONCLUSÕES

As duas amostras testadas de *Cunninghamella echinulata* UCP 1305 e UCP 1308 apresentaram atividade para a enzima tanase. A melhor condição dos ensaios de detecção da atividade enzimática demonstrou que a temperatura e pH influenciaram nos resultados da atividade tanase. O método de detecção qualitativo em placa de agar demonstrou-se, simples e rápido como procedimento para visualização da atividade de tanase.

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

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, C. N.; RODRIGUEZ, R., GUTIÉRREZ S.; AUGUR, C.; FAVELA-TORRES, E.; BARRAGAN, L:A:P.; RAMIREZ- CORONEL, A.; CONTRERAS –ESQUIVEL, J. Microbial tannases: advances and perspectives. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 47-59, 2007.
- ANDRADE, R. F. S.; SILVA, T.A.L.; RIBEAUX, D.R.; RODRIGUEZ, D.M.; SOUZAA.F.; LIMA, M.A.B.; LIMA, R.A.; ALVES DA SILVA, C.A.; CAMPOS TAKAKI, G. M.Promising biosurfactant produced by *Cunninghamella echinulata* UCP 1299 using renewable resources and its application in cotton fabric cleaning process. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2018, 2018.
- AHARWAR, A.; PARIHAR, D. K. Tannases: production, properties, applications. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 15, p. 322-334, 2018.
- ASINA, F.; BRZONOVA,I.; VOELLER, K.; KOZLIAK, E.; KUBÁTOVA, A.; YAO,B.; JI, Y.Biodegradation of lignin by fungi, bacteria and laccases. **Bioresource technology**, v. 220, p. 414-424, 2016.
- ARORA, N. K.; MISHRA, J.; MISHRA, V. Microbial enzymes: roles and applications in industries. 2020.
- BARATTO, C. M.; SALAMONI, S.P.; COSTA, R.; OLIVEIRA, C.B.; LOCATELLI, G.O. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência, Joaçaba**, v. 11, n. 2, p. 15-28, 2011.
- BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. **Bioresource technology**, v. 98, n. 9, p. 1832-1837, 2007.
- BELUR, P. D.; MUGERAYA, G. Microbial production of tannase: state of the art. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 25-40, 2011.
- BENIWAL, V.; KUMAR, A.; SHARMA, J.; VINOD, C. Recent advances in industrial application of tannases: a review. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 228-233, 2013.
- CAVALCANTI, R. M. F.; ORNELA, P.H.O.; JORGE, J.A.; GUIMARÃES, L.H.S. Screening, Selection and optimization of the culture conditions for tannase production by endophytic fungi isolated from Caatinga. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 5, n. 01, p. 001-009, 2017.
- CHAMBERGO, F. S.; VALENCIA, E. Y. Fungal biodiversity to biotechnology. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2567-2577, 2016.
- COELHO, G. D.; SOUSA, J. P.; LIMA, C.A.; DA SILVA LINS, S.A. Potencial de fungos da Caatinga para produção de enzimas amilolíticas. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 7, n. 2, p. 286-297, 2018.
- COLLADO, S.; OULEGO, P.; SUÁREZ-IGLESIAS, O.; DÍAZ, M. Biodegradation of dissolved humic substances by fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 8, p. 3497-3511, 2018.
- CORRÊA, C.L.O; PENHA, E. M.; FREITAS-SILVA, O.; LUNA, A.S.; GOTTSCHALK, L.M.F. Enzymatic Technology Application on Coffee Co-products: A Review. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1-20, 2020.

DA COSTA LIMA, M.; MENDES DA SILVA, T. C.D.; SOUZA, A.F.; LUNA, M.A.C.; ANDRADE, R.F.S., ALVES DA SILVA, C.A.; OKADA, K. Produção simultânea de biomassa e lipídeos utilizando meios contendo resíduos agroindustriais por *Mucor subtilissimus* UCP/WFCC 1262, *Cunninghamella echinulata* UCP/WFCC 1299 e *Rhizopus microsporus* UCP/WFCC 1304 isolados do solo da Caatinga de Pernambuco. **Engevista**, v. 19, n. 5, p. 1417-1430.

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

GREGORIO, C. L. Considerações acerca das responsabilidades e obrigações entre Estados perante a transnacionalidade de desastres ambientais. **Brazilian Journal of International Relations**, v. 6, n. 2, p. 385-412, 2017.

GUDIÑA, E. J.; Biotech Green Approaches to Unravel the Potential of Residues into Valuable Products. In: **Sustainable Green Chemical Processes and their Allied Applications**. Springer, Cham, p. 97-150, 2020.

KARATAY, S. E.; DÖNMEZ, G. Evaluation of biotechnological potentials of some industrial fungi in economical lipid accumulation and biofuel production as a field of use. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, n. 4, p. 332-341, 2014.

KUMAR, A.; SENGUPTA, B.; DASGUPTA, D.; TAMAL MANDAL, T.; DATTA, S. Recovery of value added products from rice husk ash to explore an economic way for recycle and reuse of agricultural waste. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 15, n. 1, p. 47-65, 2016.

LADICS, G. S.; SEWALT, V. Industrial microbial enzyme safety: What does the weight-of-evidence indicate?. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 98, p. 151-154, 2018.

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

MARTÍN-SANZ, J. P.; VALVERDE—ASENJO, I.; SANTIAGO--MARTIN, A.; QUINTANA_NIETO, J., R.; GONZÁLEZ—HUECAS, C.; LÓPEZ---LAFUENTE A.L.; DIÉGUEZ- ANTON,A. Enzyme activity indicates soil functionality affectation with low levels of trace elements. **Environmental Pollution**, v. 243, p. 1861-1866, 2018.

MEHTA, M.; MUDDAPUR, U. M.; PRIYA, V. G. Fungal production of tannase: a review. **International Journal of Scientific Engineering and Technology**, v. 2, n. 8, p. 752-755, 2013.

MONDAL, K. C.; BANERJEE, D.; PATI, J. B.R. Colorimetric assay method for determination of the tannin acyl hydrolase (EC 3.1. 1.20) activity. **Analytical Biochemistry**, v. 295, n. 2, p. 168-171, 2001.

NAGLE, T.; BERG, C.; NASSR, R.; PANG, K. BERG, The further evolution of biotech. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 1, p. 75-79, 2003.

NIYONZIMA, F. N.; VEENA, S. M.; MORE, S. S. Industrial Production and Optimization of Microbial Enzymes. In: **Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries**. Springer, Singapore, p. 115-135, 2020.

PESSÔA, M. G. K.; VESPERMANN, K.A.C.; PAULINO, B.N.; BARCELOS, M. S.N.; BARCELOS, C. M.; PASTORE, G.M.; MOLINA, G. Newly isolated microorganisms with potential application in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 2, p. 319-339, 2019.

PLEISSNER, D.; VENUS, J. Utilization of protein-rich residues in biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2133-2140, 2016.

- RIBEIRO, K. T.; BERLINCK, R.G.S.; CARIELLO, M. O.; MARANDINO, M.; METZGER, J.P.; OLIVEIRA, D.; SCARANO, F.R.; VIEIRA, I. C. G. Impactos do Programa Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade–Sisbiota Brasil. **Parcerias Estratégicas**, v. 24, n. 48, p. 119-132, 2020.
- RICARDINO, I. E. F., SOUZA, M. N. C., DA SILVA NETO, I. F. Vantagens e Possibilidades do reaproveitamento de resíduos agroindustriais. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, v.1, n.8, p.55-79, 2020.
- SINGH, A.; D.; RATHORE, D.; SRIVASTAVA, S. Perspectives of Environmental Microbiology and Biotechnology. In: **Environmental Microbiology and Biotechnology**. Springer, Singapore, p. 1-16, 2020.
- SHAO, Y.; ZHANG, Y.H.; ZHANG, F.; YANG, Q.M., WENG, H.F., XIAO, Q.; XIAO, A.F. Thermostable Tannase from *Aspergillus niger* and Its Application in the Enzymatic Extraction of Green Tea. **Molecules**, v. 25, n. 4, p. 952, 2020.
- SHARMA, K. M.; KUMAR, R.; PANWAR, S.; KUMAR, A. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 115-126, 2017.
- SOUZA, T. C.; OSTENDORF, T.A.; CUNHA AMARAL, F.A.P.; SALES, P.S.C.; CAMPOS TAKAKI, G.M.; ALVES DA SILVA, C.A. Protease production by *Cunninghamella echinulata* (SIS 40) through submerged fermentation by using factorial design. **Microbes in the Spotlight: Recent Progress in the Understanding of Beneficial and Harmful Microorganisms**, p. 366, 2016.
- TADDIA, A.; BOGGIONE, M. J.; TUBIO, G. Screening of different agroindustrial by-products for industrial enzymes production by fermentation processes. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 4, p. 1027-1035, 2019.
- WAKIL, S. M.; AJAYI, O. D.; FASIKU, S. A. Production of Tannase by Fungi Isolated from Different Soils. **Journal of Basic & Applied Sciences**, v. 16, p. 1-8, 2020.
- YAN, L.; ZHAO, H.; ZHAO, X.; XU, X.; DI, Y.; JIANG, C.; SHI, J.; SHAO, D.; HUANG, Q.; YANG, H.; JIN, M. Production of bioproducts by endophytic fungi: chemical ecology, biotechnological applications, bottlenecks, and solutions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 15, p. 6279-6298, 2018.