

## **Seleção e avaliação da produção de tanase por fungos filamentosos em fermentação submersa utilizando resíduos agrícolas**

## **Selection and evaluation of tannase production by filamentous fungi in submerged fermentation using agricultural residues**

DOI:10.34117/bjdv7n7-364

Recebimento dos originais: 14/06/2021

Aceitação para publicação: 14/07/2021

### **Nailma de Jesus Martins**

Doutoranda em Química

Instituição: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Endereço: Campus JK – Rodovia MGT 367. Alto da Jacuba. Diamantina – MG, Brasil.

E-mail: nailmajanauba@gmail.com

### **Pedro Henrique Gomes de Araújo**

Bacharel Ciência e Tecnologia

Instituição: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Endereço: BR 122, Janaúba – MG, 39440-000, Brasil.

E-mail: pedrohenriquegomes2012@gmail.com

### **Talita Vitoria Ferreira de Souza**

Bacharel Ciência e Tecnologia

Instituição: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Endereço: BR 122, Janaúba – MG, 39440-000, Brasil.

E-mail: talitavic2015@gmail.com

### **Karla Thaísa Perreira Colares**

Mestra em Ensino e Saúde

Instituição: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Endereço: BR 122, Janaúba – MG, 39440-000, Brasil.

E-mail: kaka.colares@yahoo.com.br

### **Bárbhara Mota Marinho**

Doutoranda em Ciências da Saúde

Instituição: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Endereço: BR 122, Janaúba – MG, 39440-000, Brasil.

E-mail: barbharammarinho@hotmail.com

### **Patrícia Gomes Cardoso**

Pós-doutorado em Bioquímica e Imunologia

Instituição: Universidade Federal de Lavras

Endereço: Aquenta Sol, Lavras - MG, 37200-900, Brasil.

E-mail: patricia@ufla.br

### **Patrícia Nirlane da Costa Souza**

Doutora em Microbiologia Agrícola

Instituição: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Endereço: BR 122, Janaúba – MG, 39440-000, Brasil.  
E-mail: patricia.souza@ufvjm.edu.br

## RESUMO

Taninos são polifenóis solúveis em água, provenientes do metabolismo secundário das plantas. São classificados em condensados e hidrolisáveis, sendo que esses últimos podem ser convertidos em ácido gálico e glicose pela ação da enzima tanase que atua nas ligações ésteres e laterais de suas moléculas. A enzima tanase é produzida na presença do indutor ácido tânico, ainda pouco explorada devido ao alto custo de sua produção. Assim, é interessante a seleção de microrganismos que produzam grande quantidade desta enzima, bem como o emprego de substratos de baixo custo para sua produção. Portanto, o objetivo do presente estudo foi isolar e selecionar fungos filamentosos presentes na planta da bananeira (*Musa sp.*) quanto a sua capacidade de produzir tanase e avaliar a produção desta enzima em diferentes condições de cultivo. Foram isolados 40 fungos, entre os quais 8 se destacaram para produção de tanase em meio sólido contendo ácido tânico como única fonte de carbono. Estes foram avaliados em fermentação submersa, na qual o isolado *Aspergillus sp.* PS2.02 se destacou com uma atividade de  $13,20 \pm 1,61$  U/mL. Após testes de otimização utilizando resíduos agroindustriais, sais, ácido tânico, temperatura e tempo de produção, a atividade máxima encontrada foi de  $20,43 \pm 0,43$  U/mL, em meio contendo casca de banana e 3% de ácido tânico no período de 5 dias de fermentação à 30 °C. Os resultados se mostram promissores, uma vez que o isolado *Aspergillus sp.* PS2.02 apresentou uma alta produção de tanase em meio contendo apenas o indutor da enzima, água e casca de banana, um resíduo agrícola amplamente disponível que pode ser utilizado para diminuir os custos da produção desta enzima.

**Palavras chave:** Enzimas, ácido tânico, otimização, fermentação

## ABSTRACT

Tannins are water-soluble polyphenols, derived from the secondary metabolism of plants. They are classified into condensates and hydrolysables, the latter of which can be converted into gallic acid and glucose by the action of the enzyme tanase that acts on the esters and lateral bonds of its molecules. The enzyme tanase is produced in the presence of the tannic acid inducer, which is still little explored due to the high cost of its production. Thus, it is interesting to select microorganisms that produce a large amount of this enzyme, as well as the use of low cost substrates for their production. Therefore, the objective of the present study was to isolate and select filamentous fungi present in the banana plant (*Musa sp.*) As to their capacity to produce tannins and to evaluate the production of this enzyme under different cultivation conditions. Forty fungi were isolated, among which 8 stood out for producing tannase in a solid medium containing tannic acid as the sole carbon source. These were evaluated in submerged fermentation, in which the *Aspergillus sp.* PS2.02 stood out with an activity of  $13.20 \pm 1.61$  U/mL. After optimization tests using agro-industrial residues, salts, tannic acid, temperature and production time, the maximum activity found was  $20.43 \pm 0.43$  U/mL, in a medium containing banana peel and 3% tannic acid in the period 5 days of fermentation at 30 °C. The results are promising, since the *Aspergillus sp.* PS2.02 showed a high production of tannase in medium containing only the enzyme inducer, water and banana peel, a widely available agricultural residue that can be used to reduce the costs of producing this enzyme.

**Keywords:** Enzymes, tannic acid, optimization, fermentation

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores de banana no mundo, sendo o Norte do estado de Minas Gerais uma das regiões brasileiras com maior produção desta fruta. Na cidade de Janaúba, a bananicultura representa um grande núcleo de produção, com alta relevância socioeconômica para a região (MARZANO, 2015). O isolamento de microrganismos das mais diversas culturas, incluindo banana, trouxe importantes contribuições para o setor industrial, uma vez que estas plantas podem constituir fontes de novas linhagens de microrganismos que podem ser utilizados em vários processos biotecnológicos (CANHOS *et al.*, 2016).

As plantas apresentam em seu metabolismo secundário compostos polifenólicos, com altos pesos moleculares, geralmente de 500 a 3000 Da, denominados taninos. Esses compostos apresentam efeitos negativos na nutrição animal, devido ao gosto adstringente e por possuir grupos hidroxilafenólicos, o que permite a formação de ligações cruzadas com proteínas tornando-as indigeríveis **Fonte bibliográfica inválida especificada..** Deste modo, elevados conteúdos de taninos em rações levam a um menor consumo involuntário e baixa eficiência na digestibilidade e produtividade animal. Além disso, os taninos apresentam impasses no processamento de alimentos, como sucos, chás e cervejas e no descarte de resíduos de couro curtido com taninos. Dessa maneira, sua degradação tem sido estudada pela utilização de enzimas como a tanase (AGUILAR, *et al.*, 2007).

Tanino acil hidrolase, conhecida como tanase (E.C. 3.1.1.20), é uma enzima induzível, que hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis, liberando glicose e ácido gálico. Esta enzima é produzida por fungos filamentosos, bactérias e leveduras em fermentação sólida ou submersa (LIU, *et al.*, 2016). A tanase é uma hidrolase de grande interesse na indústria de alimentos visando reduzir o conteúdo de taninos em bebidas com altos teores desses compostos fenólicos, na indústria farmacêutica, para produção de ácido gálico, precursor de drogas antibacterianas, assim como no tratamento de rações e de resíduos provenientes da indústria de couro curtido com taninos **Fonte bibliográfica inválida especificada..** Apesar de todas as aplicações, o uso prático dessa enzima é atualmente limitado, devido ao alto custo de sua produção em larga escala **Fonte bibliográfica inválida especificada..** O uso de tecnologias de biotransformação e biocatálise vem sendo utilizados nos últimos anos e a seleção de microrganismos que produzam grandes quantidades desta enzima, bem como o emprego de substratos de baixo custo para sua produção objetivam viabilizar sua aplicação nos mais diversos seguimentos industriais.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi isolar fungos filamentosos epifíticos da bananeira (*Musa* sp.), selecionar aqueles produtores da enzima tanase, avaliar a produção dessa enzima utilizando diferentes resíduos agroindustriais e avaliar diferentes parâmetros da fermentação para produção desta enzima.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 ISOLAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DA BANANEIRA (*MUSA* SP.)

A coleta de diferentes partes da cultura de banana prata foi realizada na fazenda da EPAMIG, no município de Nova Porteirinha- MG. Foram coletadas as seguintes partes da bananeira: folha, pseudocaule, coração, banana verde, pecíolo e engaço. As amostras foram coletadas assepticamente, acondicionadas e transportadas para o laboratório de Biologia do IECT/UFVJM, campus Janaúba-MG, onde foram cortadas em pequenos pedaços com o auxílio de pinça e bisturi estéreis e inoculadas em meio de cultura Aveia-Agar (2,8de Agar, 4g de aveia, 100 µL de antibiótico Cefatoxina (0,25g/mL), em 100ml de água destilada) (EMERSON, 1941). As placas inoculadas foram mantidas em temperatura ambiente, e avaliadas, diariamente, por um período de 7 dias, para observar o crescimento dos fungos. Os fungos isolados a partir das diferentes partes da bananeira, foram inoculados em potes estéreis contendo meio aveia-ágar e após o crescimento, foram armazenados à 4°C, constituindo assim, o estoque para os próximos experimentos.

### 2.2 TRIAGEM DE FUNGOS PRODUTORES DE TANASE EM MEIO SÓLIDO

Os fungos isolados foram avaliados quanto a capacidade de produzir tanase em placas de Petri contendo meio com ácido tânico como única fonte de carbono. O meio agar ácido tânico (TAA- Test Mildeu) foi constituído de (g/L): 10g de ácido tânico; 3g de NaNO<sub>3</sub>; 1g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5g de MgSO<sub>4</sub>; 0,5g de KCl; 0,01g de FeSO<sub>4</sub>; 15g de Agar (PINTO, LEITE, TERZI, & COURI, 2001). O ácido tânico foi dissolvido em água e esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm e em seguida adicionado aos outros componentes do meio autoclavados. As placas foram incubadas em temperatura ambiente e o diâmetro das colônias e dos halos enzimáticos (zona clara ao redor da colônia) foram medidos após 160 h, para o cálculo do índice enzimático - IE (diâmetro do halo / diâmetro da colônia).

### 2.3 CULTIVO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Os fungos que apresentaram índice enzimático maior que 1,5 foram avaliados quanto a capacidade de produzir tanase em fermentação submersa. Eles foram crescidos em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) por 5 dias e um disco micelial de 6 mm de diâmetro, de cada isolado, foi inoculado em Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio líquido contendo (m/v): 20g de ácido tânico; 3g de  $\text{NaNO}_3$ ; 1g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5g de  $\text{MgSO}_4$ ; 0,5g de KCl; 0,01g de  $\text{FeSO}_4$ . Cada fungo foi inoculado em triplicata e incubado a 30°C durante 5 dias. Após este período, os meios foram filtrados, para separar a massa micelial e cada filtrado constituiu então, o extrato bruto enzimático. O volume final do extrato foi medido em uma proveta e armazenado dentro de tubos falcon refrigerados a 4°C.

#### 2.4 ENSAIO ENZIMÁTICO

Para determinar a atividade de tanase nos extratos, foi utilizada a metodologia adaptada da rodanina metanólica descrita por (SHARMA, BHAT, & DAWRA, 2010) utilizando metil galato (100 mM) em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. A reação foi composta de 250µL da solução contendo o substrato e 250 µL do extrato enzimático, sendo a reação conduzida a 40°C durante 10 minutos. A reação enzimática foi parada pela adição de 300 µL de rodanina metanólica a 0,667% (m/v). Após 5 minutos, 200 µL de hidróxido de potássio a 0,5 M foi adicionado, o que resultou em um cromatógeno de coloração violeta. O volume da reação foi então diluído, adicionando 4 mL de água destilada. Após 10 minutos, a leitura foi procedida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 520 nm. Uma curva padrão foi gerada, utilizando ácido gálico em diferentes concentrações (0 a 0,40µmol/mL). A unidade de atividade tanásica (U/mL) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de ácido gálico por minuto por mL nas condições de ensaio. Foi realizado um branco da reação afim de eliminar a impureza do substrato e outro branco referente ao ácido gálico presente no extrato enzimático.

#### 2.5 PREPARO DOS RESÍDUOS AGRÍCOLAS PARA A FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Resíduos agrícolas como casca de laranja, casca de banana, bagaço de goiaba e de caju foram secos em estufa à 60°C, triturados e tamisados em peneira com poros de 2 mm.

#### 2.6 FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Em Erlenmeyer de 125ml foi adicionado 5g de substrato e 25ml do meio de sais contendo: 3g de  $\text{NaNO}_3$ ; 1g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5g de  $\text{MgSO}_4$ ; 0,5g de  $\text{KCl}$ ; 0,01g de  $\text{FeSO}_4$ . Após ter sido autoclavado durante 20min a  $121^\circ\text{C}$ , o meio recebeu 25 mL de ácido tânico 2%, previamente esterilizado por meio de filtração em membrana de  $0,22\ \mu\text{m}$ , e 1mL de uma solução de esporos, com aproximadamente  $1,23 \times 10^6$  esporos/mL do fungo selecionado no experimento anterior. O crescimento ocorreu em estufa bacteriológica, de forma estacionária, a  $30^\circ\text{C}$ , por cinco dias.

## 2.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Após a escolha do substrato, diferentes meios de cultura descritos na literatura, foram avaliados para produção de tanase em fermentação submersa, entre eles: **Meio Czapek Modificado** (WISEMAN, 1975), contendo (g/100mL): 0,001g de  $\text{FeSO}_4$ ; 0,1g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,05g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,05g de  $\text{KCl}$ ; **Meio SR Modificado** (RIZZATTI, et al., 2001), contendo (g/100mL): 0,02g de Peptona, 0,45g de Extrato de levedura e 5,0mL de Solução de sais contendo em g/100 mL: 0,24g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,3g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; **Meio CP Modificado** (PEIXOTO, et al., 2003), contendo (g/100mL): 0,8g de Extrato de levedura; 0,05g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,03g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; **Meio Khanna modificado** (KHANNA, SUNDARI, & KUMAR, 1995), contendo (g/100mL): 0,1 g de Extrato de levedura; 5,0 mL de Solução de Sais de Khanna modificado [20x] (contendo g/100mL): 2,0 g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 1,3g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,362 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\ \text{H}_2\text{O}$ ; 0,098 g de  $\text{KCl}$ ; 0,066 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\ \text{H}_2\text{O}$ ; 0,00062 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\ \text{H}_2\text{O}$ . Cada meio foi acrescido de 5 g do substrato escolhido e ácido tânico, previamente esterilizado por meio de filtração em membrana de  $0,22\ \mu\text{m}$ , na concentração de 2% (m/v) em 50mL de água destilada.

Além disso, a produção de tanase foi avaliada em fermentação contendo apenas 50 mL de água, 5g do resíduo agrícola e 2% (m/v) de ácido tânico, sem a adição de nenhum sal.

## 2.8 EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO TÂNICO

Para avaliar o efeito da suplementação do substrato com ácido tânico na produção da enzima, diferentes concentrações deste composto foram dissolvidas no meio selecionado no experimento anterior. As concentrações analisadas foram 0%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 6%. O crescimento ocorreu em estufa bacteriológica, de forma estacionária, a  $30^\circ\text{C}$ .

## 2.9 EFEITO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DA ENZIMA

Para avaliar a melhor temperatura para produção da enzima, a fermentação submersa foi conduzida em diferentes temperaturas 30, 35, 40 e 45 °C. O crescimento ocorreu em estufa bacteriológica, de forma estacionária, por cinco dias.

## 2.10 CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO

Com o objetivo de definir a cinética de fermentação no substrato escolhido para produção de cada enzima, a atividade enzimática foi determinada a cada 24 h, durante 10 dias, definindo assim o melhor tempo de fermentação para produção de tanase.

## 2.11 ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados em triplicata e analisadas estatisticamente utilizando o software Sisvar 5.6 (Build 86) (FERREIRA D. F., 2014) através da análise de variância (ANOVA) pelo teste de Scott Knott com 5% de probabilidade, a fim de selecionar as melhores condições para produção da enzima em FSm pelo fungo selecionado.

# 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS

A partir das amostras de uma planta de bananeira (*Musa* sp.) obteve-se o isolamento de 40 fungos filamentosos, sendo 12 do pecíolo, 8 da folha, 4 do pseudocaule, 4 do coração, 7 da casca da banana e 5 do engaço. Após observação das hifas aéreas em microscopia ótica, foram identificados entre os isolados os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*. Alguns isolados não puderam serem identificados uma vez que não foi possível observar a formação de hifas aéreas e esporos assexuais. As espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus* são amplamente distribuídos no ambiente e são reconhecidos pela sua aplicabilidade na indústria, especialmente, na produção de alimentos, enzimas e fármacos (BATTESTIN, MATSUDA, & MACEDO, Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos, 2004). Assim, fungos isolados neste estudo podem constituir importantes produtores de enzimas de aplicação industrial. Além disso, de acordo com os estudos de Feriotti (2010), Oliveira (2012) e Mendes (2009) diversas partes da bananeira como pseudocaule, folha e outros apresentam em sua composição expressivas quantidades de taninos hidrolisáveis responsáveis pela coloração escura no pseudocaule e pelo gosto adstringente do fruto verde. Assim, os fungos isolados podem

ser produtores da enzima tanase uma vez que utilizam nutrientes provenientes da planta hospedeira para se desenvolverem.

### 3.2 SELEÇÃO QUALITATIVA DE FUNGOS PRODUTORES DE TANASE EM MEIO SÓLIDO

Quarenta fungos isolados foram avaliados quanto à sua capacidade de produzir tanase em meio ágar ácido tânico. Entre estes, 27 fungos apresentaram uma zona clara ao redor da colônia, o que indica, a habilidade destes microrganismos em degradar o ácido tânico presente no meio (Batra e Saxena 2005) e, portanto, de produzirem a enzima tanase. Os índices enzimáticos variaram de  $1,08 \pm 0,03$  à  $1,93 \pm 0,06$ .

Entre os isolados que apresentaram formação do halo, 10 pertencem ao gênero *Aspergillus* e 17 não foram identificados a gênero. Entre estes, os fungos com maiores IE foram o Ca1.03, isolado da casca de banana verde, que apresentou um IE de 1,93 e o fungo Pe1.11, isolado do pecíolo, que apresentou IE de 1,91. Entre os fungos com IE maiores que 1,5 quatro pertencem ao gênero *Aspergillus* (F5.1.4; F2.1; PS2-02 F6.1.3) e oito não foram identificados (CA1.03; PE1.11; F6.1.1; PE1.10; PE1.9B; F3.1; C4.1; F2.2). O gênero *Aspergillus* identificado neste trabalho, já é relatado como produtor de enzimas de interesse industrial, incluindo tanase, como por exemplo, *Aspergillus fumigatus*, *A. versicolor*, *A. flavus*, *A. caespitosum* (BATRA & SAXENA, 2005).

O método da seleção em placas, apesar de ser uma metodologia qualitativa, tem sido relatada como sendo rápida, simples e conveniente para a triagem de microrganismos produtores de tanase, principalmente quando se dispõe de um grande número de isolados, uma vez que reduz tempo e gastos com este processo inicial de seleção **Fonte bibliográfica inválida especificada..** Foram selecionados 8 isolados que apresentaram, um IE maior que 1,5 para serem avaliados quantitativamente quanto a sua habilidade em produzir tanase em meio líquido, contendo ácido tânico como única fonte de carbono.

### 3.3 SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE TANASE EM FSM

De acordo com a Tabela 1, o isolado *Aspergillus* sp. (Ps2.02) apresentou a maior atividade enzimática  $13,20 \text{ U/mL} \pm 1,61$  e um dos maiores índices enzimáticos no meio sólido de 1,80, seguido pelo isolado F2.1 que apresentou atividade enzimática de  $11,88 \text{ U/mL} \pm 1,30$  e IE de 1,67.

Entre os isolados do gênero *Aspergillus* que apresentaram produção de tanase em fermentação submersa, os fungos PS2.02, F2.1 e C5.1.4 foram isolados de partes da

bananeira com grandes quantidades de taninos, o que pode ter contribuído para a adaptação dos microrganismos no meio e a expressiva atividade de tanase. O fungo *Aspergillus* sp. (PS2.02), foi isolado do Pseudocaule que de acordo com Feriotti, (2010) apresentam 1,32 mg/L de ácido tânico. Já o isolado *Aspergillus* sp. (F2.1), foi isolado de folhas de bananeira, que de acordo com Oliveira (2012), apresentam taninos hidrolisáveis. Além disso, o isolado *Aspergillus* sp. (C5.1.4) foi isolado do coração de bananeira, que de acordo com Mendes (2009), apresentam 1,14% de taninos hidrolisáveis.

Além disso, pode-se destacar, que o isolado *Aspergillus* sp. (Ps2.02) apresentou atividade maior do que outros fungos isolados de outras plantas como do cacau no sul da Bahia reportados por Fernandes (2009), com atividade de tanase de 9,97 U/mL. Assim, o isolado *Aspergillus* sp. (Ps2.02) pode ser considerado um potencial produtor dessa enzima. Este foi selecionado para os demais experimentos deste trabalho, visando a otimização da produção de tanase em fermentação submersa.

Tabela 1- Índice enzimático (IE) e atividade de tanase (U/mL) dos isolados em fermentação submersa.

Código	Gênero	IE	Atividade (U/mL)
Ps2.02	<i>Aspergillus</i> sp.	1,81 ± 0,15 <sup>a1</sup>	<b>13,20<sup>a1</sup> ± 1,61</b>
F2.1	<i>Aspergillus</i> sp.	1,67 ± 0,04 <sup>a1</sup>	11,88 <sup>a2</sup> ± 1,3
C5.1.4	<i>Aspergillus</i> sp.	1,50 ± 0,05 <sup>a2</sup>	7,02 <sup>a2</sup> ± 1,55
F.6.1.3	<i>Aspergillus</i> sp.	1,60 ± 0,71 <sup>a2</sup>	5,27 <sup>a3</sup> ± 0,55
F3.2	Não identificado	1,27 ± 0,02 <sup>a2</sup>	2,67 <sup>a3</sup> ± 0,18
Ca1.06	Não Identificado	1,40 ± 0,02 <sup>a2</sup>	2,15 <sup>a3</sup> ± 0,69
Ca1.03	Não Identificado	1,93 ± 0,06 <sup>a1</sup>	1,27 <sup>a3</sup> ± 0,34
Pe1.9B	Não Identificado	1,8 ± 0,06 <sup>a1</sup>	0,58 <sup>a3</sup> ± 0,30

\*\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (5% de probabilidade). Médias ± desvio padrão amostral de 3 repetições

### 3.4 FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.

Após selecionar o isolado *Aspergillus* sp. (Ps2.02), realizou-se a fermentação em meio contendo resíduos agroindustriais, acrescidos de ácido tânico na concentração de 2%. Como pode ser observado na Tabela 2, a maior produção de tanase ocorreu em meio com casca de banana, onde o isolado apresentou atividade de 10,30 ± 1,06 U/mL. Em locais onde há uma grande produção desta fruta, o uso de cascas como substratos na produção de enzimas de interesse biotecnológico pode indicar uma boa alternativa para diminuir os custos da produção destes compostos. Assim, este resíduo foi escolhido para os próximos experimentos, visando otimizar a produção de enzima em fermentação submersa.

Tabela 2. Atividade de tanase (U/mL) do isolado *Aspergillus* sp. (PS2.02) em fermentação submersa com diferentes resíduos agroindustriais.

Fonte de Resíduo	Atividade U/mL
Casca de Banana	10,30 <sup>a2</sup> ± 1,06
Casca de Laranja	5,98 <sup>a1</sup> ± 0,27
Bagaço de Goiaba	6,44 <sup>a1</sup> ± 0,37
Bagaço de Caju	6,53 <sup>a1</sup> ± 0,26

\*\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (5% de probabilidade). Médias ± desvio padrão amostral de 3 repetições

### 3.5 EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE TANASE

Vários fatores influenciam na produção e secreção de enzimas pelo fungo, como a composição do meio em que ele se desenvolve e as condições de cultivo. O meio de fermentação deve proporcionar ao microrganismo todos os nutrientes que ele necessite, devendo conter basicamente fontes de carbono e nitrogênio, e alguns minerais, que podem contribuir para o aumento da produção enzimática pelo microrganismo **Fonte bibliográfica inválida especificada..** Assim, foi realizada a fermentação submersa com a casca de banana, acrescida de ácido tânico em diferentes meios de cultura, descritos na literatura, a fim de avaliar a produção de tanase. Além disso, foi realizada a fermentação utilizando a casca de banana e ácido tânico, afim de se verificar se o próprio resíduo poderia fornecer os nutrientes necessários para produção dessa enzima. Os resultados apresentados na Tabela 3, mostram maior atividade de tanase em meio contendo apenas ácido tânico e casca de banana (14,8 U/mL ± 1,88).

Assim, os experimentos seguintes foram conduzidos com ácido tânico e casca de banana. O uso de casca de banana como substrato para o fungo na produção de tanase é interessante, pois pode diminuir os custos de sua produção, uma vez que, favoreceu um aumento na produção da enzima e substituiu a adição de diferentes sais no processo fermentativo.

Tabela 3- Atividade de tanase do isolado *Aspergillus* sp. (PS2.02) em diferentes meios de cultura acrescidos de ácido tânico (2%) e casca de banana, em fermentação submersa.

Meio + Casca de Banana + 2% de ácido tânico	Atividade (U/mL)
Água Destilada	<b>14,8<sup>a2</sup> ± 1,88</b>
Khanna modificado	10,32 <sup>a1</sup> ± 1,26
Meio CP Modificado	7,91 <sup>a1</sup> ± 1,27
Meio Czapek Modificado	11,70 <sup>a2</sup> ± 1,68
Meio SR Modificado	7,66 <sup>a1</sup> ± 0,15
Test Mildeu	11,86 <sup>a2</sup> ± 1,44

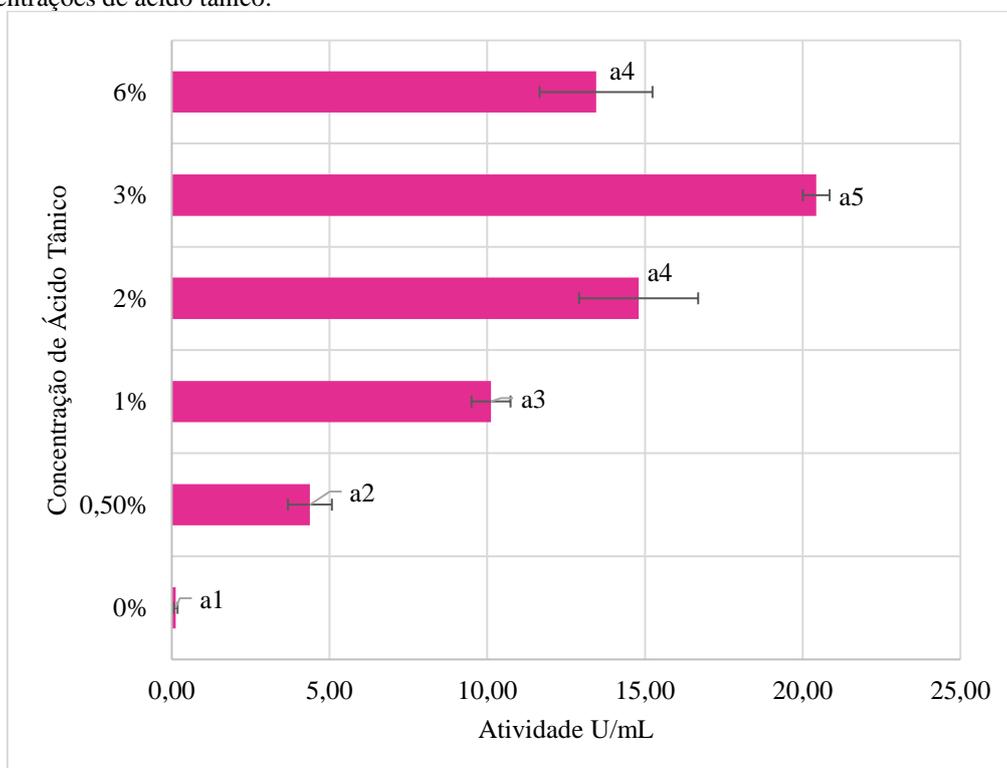
\*\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (5% de probabilidade). Médias ± desvio padrão amostral de 3 repetições

### 3.6 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO TÂNICO NA PRODUÇÃO DE TANASE.

A produção da tanase pelo *Aspergillus* sp. (PS2.02) depende da presença de ácido tânico como indutor no meio de cultivo, uma vez que na ausência deste componente não houve atividade de tanase, além da basal. Isto se deve ao fato de que a tanase é uma enzima induzível, sendo expressa em grandes quantidades apenas na presença de taninos hidrolisáveis. **Fonte bibliográfica inválida especificada..**

A Figura 1 mostra que o aumento da produção de tanase é proporcional a concentração do seu indutor (ácido tânico), sendo que a maior produção ocorreu quando foi adicionado 3% de ácido tânico, com atividade de  $20,43 \pm 0,42$  U/mL. Contudo, quando se adicionou o dobro de ácido tânico (6%) a atividade da enzima diminuiu. Estes resultados foram semelhantes ao de RIUL et al. (2011), que obteve menor atividade enzimática em concentrações superiores a 5%. De acordo com este autor, altas concentrações de ácido tânico podem contribuir para uma reação irreversível deste composto com proteínas da superfície celular do organismo, e assim, o crescimento e a produção enzimática podem ficar comprometidos.

Figura 1- Produção de tanase em fermentação submersa contendo água, casca de banana e diferentes concentrações de ácido tânico.



\*\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (5% de probabilidade). Médias ± desvio padrão amostral de 3 repetições

### 3.7 EFEITO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE TANASE

Utilizando os parâmetros selecionados nos experimentos anteriores: casca de banana e 3% de ácido tânico, a fermentação submersa foi realizada sob as temperaturas de 30, 35, 40 e 45 °C, uma vez que esta pode influenciar o crescimento e secreção das enzimas pelo fungo. A Tabela 4 mostra que após cinco dias de fermentação, o fungo *Aspergillus* sp. (PS2.02) produziu a enzima até a temperatura de 35 °C. Acima desta temperatura não foi observado nem mesmo o crescimento do fungo. A maior parte das tanases fúngicas descritas são produzidas por organismos mesofílicos cujas temperaturas de crescimento variam de 28°C a 37°C (LEKHA & LONSANE, 1994). Resultados semelhantes foram encontrados em COSTA et al. (2008), SOUZA et al (2015), (LIMA, (2014), RANA, et al., (2005) que tiveram a produção da enzima por fungos filamentosos inoculados na faixa de 30 a 35°C.

Tabela 4- Atividade de tanase do fungo *Aspergillus* PS2.02 em diferentes temperaturas

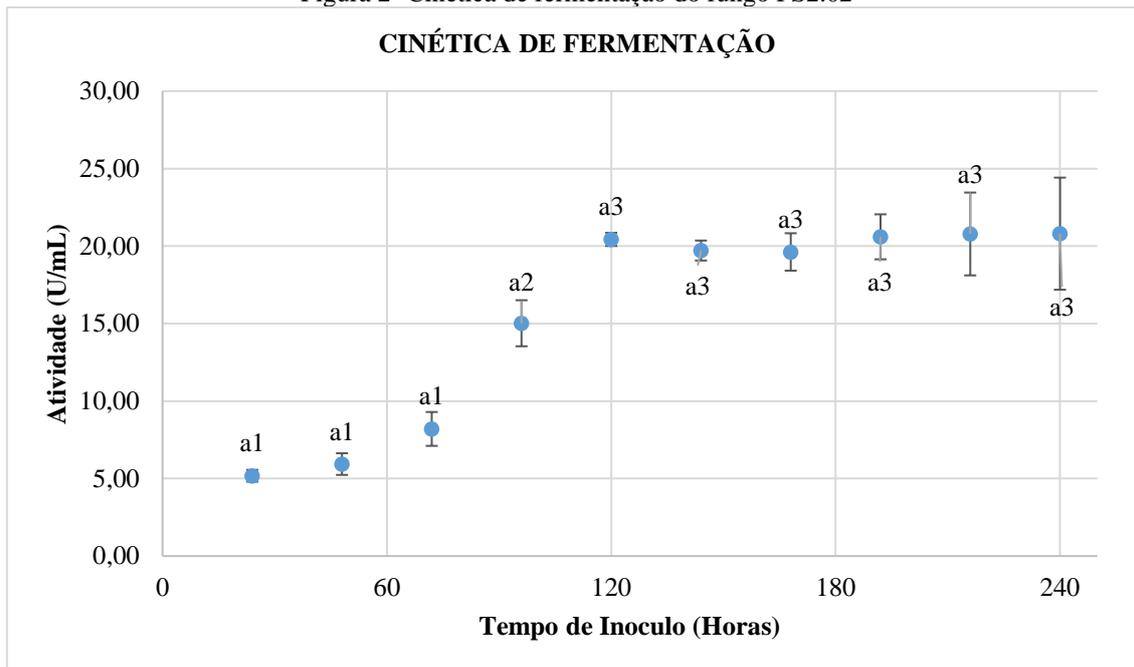
Temperatura	U/mL
30	20,43 <sup>a2</sup> ± 0,43
35	13,24 <sup>a1</sup> ± 0,44
40	-
45	-

- Não houve crescimento micelial.\*\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (5% de probabilidade). Médias ± desvio padrão amostral de 3 repetições

### 3.8 CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO

A produção de tanase em função do tempo de cultivo foi determinada e os resultados mostraram que maiores atividades de tanase foram obtidos a partir de 120 horas de cultivo (Figura 2). Após este período até 240 horas de cultivo não houve diferença significativa na atividade de tanase de acordo com o teste Scott-Knott (5% de probabilidade). Os resultados sugerem que a secreção das tanases devem ocorrer no início do cultivo. Resultado semelhante foi encontrado para tanase de *A. flavus* em fermentação submersa, que apresentou o tempo ótimo para a produção da enzima de 72 horas (YAMADA, ADACHI, WATANABE, & SATO, 1968). Para tanase de *Aspergillus niger* MTCC 2425, a produção máxima ocorreu em 120 dias de cultivo (RANA & BHAT, 2005).

Figura 2- Cinética de fermentação do fungo PS2.02



\*\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (5% de probabilidade). Médias  $\pm$  desvio padrão amostral de 3 repetições

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados mostram que o fungo *Aspergillus* sp. PS2.02, isolado do pseudocaule da bananeira, possui potencial como produtor da enzima tanase. Esse fungo apresentou significativa atividade enzimática quando cultivado em meio contendo apenas seu indutor (ácido tânico) e casca de banana, em fermentação submersa à 30 °C, por 5 dias. Estes resultados podem contribuir para reduzir os custos da produção desta enzima, uma vez que o meio é constituído apenas pelo indutor da enzima e por um resíduo agrícola, sendo dispensado a suplementação de sais. Além da viabilidade econômica, a utilização da casca de banana no processo fermentativo, contribui para dar uma nova aplicação a este resíduo, reduzindo o impacto ambiental causado pelo seu descarte inadequado na natureza.

## REFERÊNCIAS

- AGUILAR, C. N. et al., 2007. Microbial tannases: advances and perspectives.. *Appl. Microbiol. Biot*, aug. , Volume v. 76, pp. p. 47-59.
- BATRA, A. & SAXENA, R. K., 2005. Potential tannase producers from the genera *Aspergillus* and *Penicillium*.. *Process. Biochem*, Volume V.40, pp. 1553-1557.
- BATTESTIN, . V., MATSUDA, . L. K. & MACEDO, G. A., 2004. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. *Alim. Nutr.*, Volume v.15, pp. p.63-72.
- BOADI, D. K. & NEUFELD, R. J., 2000. Encapsulation of tannase for the hydrolysis of tea tannins. *Elsevier Science InC*, Volume V. 28, p. 590–595.
- CANHOS, V. P. & Manfio, G. P., 2016. Recursos Microbiológicos para Biotecnologia. s.l.:s.n.
- COSTA, A. M. et al., 2008. Production of Tannase by *Aspergillus tamarii* in Submerged Cultures. *BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY*, Volume V. 51, n. 2, pp. 399-404.
- EMERSON, R., 1941. An experimental study of the life cycles and taxonomy of *Allomyces*.. *Lloydia*, Volume 4, pp. 77-144.
- FERIOTTI, D. d. G., 2010. Proposta de aproveitamento do pseudocaule da bananeira (musa Cavendish).. São Caetano do sul SP: s.n.
- FERNANDES, A. P., 2009. Avaliação do Potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes. Lavras: Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos – UFLA.
- FERREIRA, D. F., 2014. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciênc. agrotec.* [online], Volume vol.38, n.2, pp. 109-112.
- KHANNA, P., SUNDARI, S. S. & KUMAR, N. J., 1995. Production, isolation and partial purification of xylanases from an *Aspergillus* sp.. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* , Volume 11, pp. 242-243.
- KRAUS, . T. E. C., DAHLGREN, . R. A. & ZASOSKI , R. J., 2003. Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems – a review. *Plant soil.*, Volume v.256, pp. 41-66.
- LEKHA, P. K. & LONSANE, B. K., 1994. Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations.. *Proc. Biochem.*, Volume V. 29, pp. 497-503.
- LIMA, C. S., 2014. BIOPROSPECÇÃO DE TANASES: OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO DE *Pestalotiopsis mangiferae*. ILHÉUS: Universidade Estadual de Santa Cruz.

LIU, T. P. S. et al., 2016. Tannase production by *Aspergillus* spp. UCP1284 using cashew bagasse under solid state fermentation.. *Afr. J. Microbiol. Res.* , april, Volume v.10, pp. 565-571.

MARZANO, F., 2015. Banana que era descartada passa a ser usada na fabricação de produtos diversos. s.l.:s.n.

MENDES, G., 2009. Composição em nutrientes das diferentes partes da bananeira. São Carlos: Anais da I Jornada Científica – Embrapa.

NASCIMENTO, K. B. M. et al., 2014. UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE TANASE POR *ASPERGILLUS* SP ISOLADOS DO SOLO DA CAATINGA DE PERNAMBUCO, BRASIL. *E-xacta*, Volume 7 n.1, pp. 95-103.

OLIVEIRA, L. N., 2012. Composição química, degradabilidade e potencial de emissão de metano de resíduos da bananicultura para ruminantes.. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília.

PEIXOTO, S. C., JORGE, J. A., TERENCE, H. F. & POLIZELI, M. L. T. M., 2003. *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases.. *Int. Microbiol.*, Volume v. 06, pp. 269- 273.

PINTO, G. A. S., COURI, S., LEITE, S. G. F. & BRITO, E. S., 2005. TANASE: CONCEITOS, PRODUÇÃO E APLICAÇÃO. *B.CEPPA*, Volume V. 23, n.22, pp. p. 435-462.

PINTO, G. A. S., LEITE, S. G. F., TERZI, S. C. & COURI, S., 2001. Selection of tannase-producing *Aspergillus niger* strains.. *Braz. J. Microbiol.*, Volume v. 32, p. 24 – 26.

RANA, N. K. & BHAT, T. K., 2005. Effect of fermentation system on the production and properties of tannase of *Aspergillus niger* Van Tieghem MTCC 2425. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, Volume 51, p. 203–212.

RIUL, A. J., 2011. Purificação e caracterização bioquímica de tanases produzidas pelo fungo filamentoso *Aspergillus phoenicis*. Araraquara: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”.

RIZZATTI, A. C. S. et al., 2001. Purification and properties of a thermostable extracellular  $\beta$ -D-xylosidase produced by thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, Volume V. 26, pp. 156-160.

SHARMA, S., BHAT, T. K. E. & DAWRA, R. K., 2010. A Spectrophotometric Method for Assay of Tannase Using Rhodanine.. *Anal. Biochem.*, Volume V. 279, pp. p 85-89.

SOUZA, P. N. C. et al., 2015. Optimization of culture conditions for tannase production by *Aspergillus* sp. gm4 in solid state fermentation. *Acta Scientiarum. Biological Science*, Volume 37, n.1, pp. 23-30.

WISEMAN, A., 1975. Handbook of enzyme biotechnology. Ellis Horwood Ltd John Wiley & Sons, p. p.148.

YAMADA, H., ADACHI, O., WATANABE, M. & SATO, N., 1968. Studies on Fungal Tannase Part I. Formation, Purification and Catalytic Properties of Tannase of *Aspergillus flavus*. Agr. Biol. Chem, Volume 32 n. 9, pp. 1070-1078.