



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(21) PI 1103791-1 A2**



\* B R P I 1 1 0 3 7 9 1 A 2 \*

(22) Data de Depósito: 05/08/2011

**(43) Data da Publicação: 30/07/2013**  
**(RPI 2221)**

**(51) Int.Cl.:**

**C12N 1/14**

**C12P 1/02**

**C12R 1/79**

**A23K 1/14**

**(54) Título:** MEIOS DE CULTURA DE RESÍDUO DE BAGAÇO DE LARANJA PARA PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DAS ENZIMAS FITASE E TANASE PELO MICROORGANISMO PAECILOMYCES VARIOTII ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO SÓLIDA, ENZIMAS OBTIDAS E SEUS USOS

**(73) Titular(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

**(72) Inventor(es):** GABRIELA ALVES MACEDO, JOSÉ VALDO MADEIRA JÚNIOR

**(57) Resumo:** MEIOS DE CULTURA DE RESÍDUO DE BAGAÇO DE LARANJA PARA PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DAS ENZIMAS FITASE E TANASE PELO MICROORGANISMO PAECILOMYCES VARIOTII ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO SÓLIDA, ENZIMAS OBTIDAS E SEUS USOS. A presente invenção compreende a produção de meios de cultura capazes de viabilizar a produção simultânea de duas enzimas fitase e tanase através da fermentação sólida, em bagaço de laranja empregando o fungo Paecilomyces variotii. O uso de enzimas na alimentação animal é conhecido e está sendo bem explorado. A maior dificuldade de expandir o uso de enzimas ainda é o custo de produção. O uso dos resíduos para alimentação animal representa uma alternativa viável para este setor, assim como para a produção de biocatalizadores através da fermentação sólida. Dessa forma, o presente invento permite que o bagaço de laranja apresente maior capacidade antioxidante em relação ao meio não fermentado, representando um ingrediente interessante para uso em ração animal. Esta invenção determinou valores ótimos na constituição do meio de cultura que utiliza bagaço de laranja para produção das enzimas fitase e tanase através da fermentação sólida pelo microorganismo Paecilomyces variotii de forma a obter-se a maior quantidade de enzima produzida e suas maiores atividades. Adicionalmente, também foi determinada a maior capacidade antioxidante do bagaço de laranja em relação ao meio não fermentado, representando um ingrediente interessante para uso em ração animal.

**“MEIOS DE CULTURA DE RESÍDUO DE BAGAÇO DE LARANJA PARA PRODUÇÃO  
SIMULTÂNEA DAS ENZIMAS FITASE E TANASE PELO MICROORGANISMO  
*PAECILOMYCES VARIOTII* ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO SÓLIDA, ENZIMAS OBTIDAS E  
SEUS USOS.”**

5

**CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção compreende a produção de meios de cultura capazes de viabilizar a produção simultânea de duas enzimas fitase e tanase através da fermentação sólida em bagaço de laranja empregando o fungo *Paecilomyces variotii*.

10 O uso de enzimas na alimentação animal é conhecido e está sendo bem explorado. A maior dificuldade de expandir o uso de enzimas ainda é o custo de produção. Uma alternativa para isto seria a utilização destes resíduos como substrato da fermentação para produção de enzimas.

15 A produção mundial de laranja tem aumentado significativamente desde a década de oitenta, especialmente no setor de processamento de suco, sendo que cerca de 40% desta produção é convertida em subproduto, principalmente a casca.

20 O uso dos resíduos para alimentação animal representa uma alternativa viável para este setor, assim como para a produção de biocatalizadores através da fermentação sólida. Dessa forma, o presente invento permite que o bagaço de laranja apresente maior capacidade antioxidante em relação ao meio não fermentado, representando um ingrediente interessante para uso em ração animal.

**FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

**A FERMENTAÇÃO SÓLIDA**

25 A economia brasileira é baseada na produção agrícola, em que se pode destacar a laranja. Além da comercialização deste produto *in natura*, o setor agroindustrial também está envolvido com o processamento e com a produção de suco de laranja. Assim, este produto gera resíduos de interesse para nutrição animal, como o bagaço da laranja na forma peletizada, muito utilizado para nutrição de ruminantes.

Através da fermentação em estado sólido pode-se melhorar a qualidade nutricional deste resíduo com a quebra de compostos antinutricionais como o fitato e tanino; Além disso, a fermentação em estado sólido pode ser utilizada para produção de enzimas (incluindo fitase e tanase) a partir de resíduos agroindustriais. Ao mesmo tempo, estas enzimas são capazes de hidrolisar compostos antinutricionais presentes nestes resíduos, podendo assim, serem aplicadas como aditivos em rações. Há também interesse na produção da fitase e tanase em resíduos agrícolas e agroindustriais via fermentação em estado sólido com o objetivo de diminuição dos custos do processo.

A fermentação em estado sólido (FES) proporciona o cultivo de microrganismos em substratos sólidos na ausência de uma fase aquosa livre (Pandey, A. **Solid-state fermentation. *Biochemistry Engineering Journal* 13, p. 81- 84, 2003**). No entanto, o substrato deve apresentar umidade adequada para manter o crescimento e o metabolismo do microrganismo, sem exceder a capacidade de retenção máxima de água pela matriz (Foong, C. W.; Janaun, J.; Krishnaiah, K.; Prabhakar, A. **Effect of superficial air velocity on solid state fermentation of palm kernel cake in a lab scale fermenter using locally isolated strain. *Industrial Crops and Products* 30, p. 114-118, 2009**).

A matriz sólida utilizada no processo pode ser tanto a fonte de nutriente quanto simplesmente um suporte impregnado com nutrientes adequados ao desenvolvimento do microrganismo (Pandey, 2003), (Nagao, N.; Matsuyama, T.; Yamamoto, H.; Toda, T. **A novel hybrid system of solid state and submerged fermentation with recycle for organic solid waste treatment. *Process Biochemistry* 39, p. 37-43, 2003**). Existem diferenças significativas entre os processos de fermentação em estado sólido e fermentação submersa (FS). A principal diferença entre FES e FS é a quantidade de água livre no meio de cultivo. Na FS, a quantidade de sólidos não ultrapassam 50 g/L, enquanto na FES o conteúdo de sólidos varia de 20 a 70% do peso total do meio (Mitchell, D. A.; Losane, B. K. **Definition, characteristic and potential. In: Doelle, H.; Mitchell, D. A., Rols, C. E. *Solid substrate cultivation*. Elsevier Applied Science, p. 1- 16, 1992**).

A FES confere vantagens sobre a FS como a utilização de meios de cultura simples e não hidrossolúveis, compostos de materiais de origem vegetal, como farelos e cascas de arroz, trigo, milho e outros cereais, necessitando de poucos nutrientes adicionais ao meio.

- Adicionalmente, o custo do meio de fermentação pode representar até 30% do total de uma produção enzimática. Assim, há interesse na utilização de resíduos agroindustriais como substrato, representando, em países como o Brasil, matéria prima abundante e de baixo custo (Graminha, E. B. N.; Gonçalves, A. Z. L.; Pirota, R. D. P. B.; Balsalobre, M. A. A.; Da Silva, R. E.
- 5 **Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology* 144, p. 1-22, 2008), (Pandey, 2003).** Devido ao baixo teor de umidade e a ausência de água livre no meio, a probabilidade de contaminação por bactérias é reduzida. A pequena quantidade de água empregada na FES também implica em vantagens, tais como menor reacional e maior concentração do produto (Nagao, 2003), (Mitchell, 1992)
- 10 **(Mohapatra, P. K.; Maity, C.; Rao, R. S.; Pati, B. R.; Mondal, K. C. Tannase production by *Bacillus licheniformis* KBR6: Optimization of submerged culture conditions by Taguchi DOE methodology. *Food Research International* 42, p. 430-435, 2009.; Singhanian, R. R.; Patel, A. K.; Soccol, C. R.; Pandey, A. Recent advances in solidstate fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 44, p. 13-18, 2009).**
- 15 Dentre as características da FES, a baixa atividade de água do meio de cultivo sólido influencia nos aspectos fisiológicos dos microrganismos, tais como no seu crescimento vegetativo, esporulação, germinação de esporos, produção de enzimas e atividade enzimática (Graminha, 2008). A FES pode, em alguns casos, ser economicamente mais interessante na produção de enzimas. George e colaboradores (George, S.; Raju, V.; Subramanian, T. V.;
- 20 **Jayaraman, K. Comparative study of protease production in solid substrate fermentation versus submerged fermentation. *Bioprocess Engineering* 16, p. 381-382, 1997)** compararam a produção de protease entre a fermentação em estado sólido e submersa. Os autores relataram que para um mesmo rendimento do produto, foram utilizados 100 mL de nutrientes em FS e 1 g para FES.
- 25 **PRODUÇÃO DE RAÇÃO ANIMAL UTILIZANDO RESÍDUOS AGRÍCOLAS**

A economia brasileira é uma das mais importantes economias do mundo e baseia-se, principalmente, na agricultura. Entretanto, a grande produção desses materiais agrícolas gera grandes quantidades de resíduos. Nos últimos anos houve um aumento na tentativa de tornar mais eficiente a utilização desses resíduos cuja disposição no meio ambiente causam sérios

problemas de poluição (Socol, C. R.; Vandenberghe, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal* 13, p. 205-218, 2003).

Resíduos agroindustriais são amplamente produzidos pela atividade humana, agrícola e industrial. Dentre os resíduos produzidos em quantidades significativas pela atividade industrial brasileira, podemos citar: casca, palha e farelo de arroz; palha e farelo de trigo; 5 bagaço de cana; folha de mandioca; bagaço de laranja e torta de mamona (Schieber, A.; Stintzing, F. C.; Carle, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments. *Trends in Food Science & Technology* 12, p. 401-413, 2001); (Graminha, 2008).

10 A maioria destes produtos apresenta potencial nutricional e assim, apresentam inúmeras possibilidades para aplicação, como a produção de biomassa microbiana para alimentação animal, ou seja, o uso destes resíduos como substratos para cultivo de microrganismos capazes de biodegradá-los para obtenção de nutrientes para seu desenvolvimento (Goel, G.; Puniya, A. K.; Aguilar, C. N.; Singh, K. Interaction of gut microflora 15 with tannins in feeds. *Naturwissenschaften* 92, p. 497-503, 2005.; Cao, L.; Wang, W.; Yang, C.; Yang, Y.; Diana, J.; Yakupitiyage, A.; Luo, Z.; Li, D. Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme and Microbial Technology* 40, p. 497-507, 2007. ; Kuhad, R. C.; Singh, A.; Tripathi, K. K.; Saxena, R. K.; Eriksson, K. E. L. Microorganisms as an alternative source of protein. *Nutrition Reviews* 55, p. 65-75, 1997).

20 Genericamente, as rações são materiais de fontes orgânicas com a finalidade de nutrir adequadamente o animal. As principais características de uma ração são a disponibilidade energética, quantidade de fibras (importantes para a digestibilidade) e proteínas suplementares, principalmente aminoácidos essenciais (González-Martín, I.; Alvarez-García, N.; Hernández-Andaluz, J. L. Instantaneous determination of crude proteins, fat and fibre in 25 animal feeds using near infrared reflectance spectroscopy technology and remote reflectance fibre-optic probe. *Animal Feed Science and Technology* 128, p. 165-171, 2006); (Makkar, H. P. S. Review: Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research* 49, p. 241-256, 2003).

Rações produzidas com sub-produtos agrícolas ou resíduos de indústrias alimentícias são utilizados freqüentemente, isso porque há grande disponibilidade de resíduos devido à alta produção de alimentos (Bampidis, V. A.; Robinson, P. H. **Citrus by-products as ruminant feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology* 128, p. 175-217, 2006**). A utilização

5 deste tipo de ração pode trazer alguns benefícios para os animais e consequentemente, para os produtos deles obtidos. Um exemplo disso é a maior produtividade e qualidade da carne e do leite (Vasta, V.; Nudda, A.; Cannas, A.; Lanza, M.; Priolo, A. **Alternative feed resources and their effects on the quality of meat and milk from small ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 147, p. 223-246, 2008**). Porém, estas rações devem ser cuidadosamente

10 formuladas para garantir que os compostos antinutricionais, especialmente fitatos e taninos, não interfiram de forma negativa na saúde do animal. Estes compostos podem causar mudanças na estrutura e composição dos ácidos graxos do leite e também da carne (Hérvas, G.; Frutos, P.; Giráldez, F. J.; Mantecón, A. R.; Del Pino, M. C. A.; **Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Animal Feed Science and***

15 ***Technology* 109, p. 65-78, 2003**).

Na aquicultura, algumas rações formuladas com farelo de soja são interessantes como fontes alternativas às fontes protéicas de peixes, eliminando assim proteínas de origem animal na formulação da ração (Carter, C. G.; Hauler, R. C. **Fish meal replacement by plant meals in extruded feeds for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture* 185, p. 299-311, 2000**). Um

20 estudo mostrou que o salmão (*Hippoglossus hippoglossus* L) necessita de uma concentração mínima de 35% de proteínas em sua alimentação para seu crescimento, sendo necessária a utilização de resíduos agroindustriais que apresentam essa concentração, sem a necessidade de suplementação de outros produtos (Arnason, J.; Imsland, A. K.; Gústavsson, A.; Gunnarsson, S.; Arnarson, I.; Reynisson, H.; Jónsson, A. F.; Smáradóttir, H.; Thorarensen, H.

25 **Optimum feed formulation for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.: Minimum protein content in diet for maximum growth. *Aquaculture* 291, p. 188-191, 2009**). Existem rações suplementados com resíduos de camarão fermentados, que apresentaram uma maior disponibilização de aminoácidos essenciais em relação à ração contendo resíduo não fermentado (Narayan, B.; Velappan, S. P.; Zituji, S. P.; Manjabhatta, S. N. **Yield and chemical**

30 **composition of fractions from fermented shrimp biowaste. *Waste Management & Research* 28, p. 64-70, 2009**).

## PRODUÇÃO DE LARANJA

A laranja pertence ao grupo dos cítricos, que são classificadas nas espécies *citrus sinensis* (laranja-doce) e *Citrus aurantium* (laranja-azeda), elas são consumidas por humanos, principalmente nas formas fresca ou como sucos processados ou ainda concentrados. Após a  
 5 extração do suco da laranja, restam resíduos dos quais se destacam os óleos essenciais, o limoneno e a casca, a qual apresenta o albedo e o flavedo (Santana, M. F. S. **Caracterização físico-química de fibra alimentar de laranja e maracujá. Tese de Doutorado – UNICAMP-FEA, 2005).**

Hoje, no Brasil, a citricultura está voltada para a exportação, representando cerca de  
 10 53% do cenário mundial de suco de laranja, responsável por 80% do comércio internacional e 49% da produção brasileira neste setor (Pereira, C. L. F. **Avaliação da sustentabilidade ampliada de produtos agroindustriais. Tese de Doutorado – UNICAMP-FEA, 2008).**

Indústrias de processamento alimentício, especialmente as de frutas, geram importantes quantidades de resíduos, ao qual devem ser propriamente gerenciados, por  
 15 reciclagem, incineração ou aterramento (Pereira, 2008). Em 2010, estima-se produzir 66,4 milhões de toneladas de laranjas pelo mundo, um aumento de 14% em relação ao período de 1997 a 1999. Desta produção 30,1 milhões de toneladas serão processadas para o setor de sucos, óleos essenciais e casca (Food And Agriculture Organization Of The United Nations. **Medium-term prospects for agricultural commodities – Projections to the year 2010, Rome, Italy, 2003. Available from: <<http://www.fao.org/docrep/006/y5143e/y5143e12.htm>>).**  
 20 Estes resíduos são usados para formulação de rações ou podem ser administrados diretamente ao animal (Bampidis, V. A.; Robinson, P. H. **Citrus by-products as ruminant feeds: a review. Animal Feed Science and Technology 128, p. 175-217, 2006).**

Estes resíduos apresentam crescente interesse, isso porque há uma importância  
 25 econômica e ecológica na sua remoção (Pereira, 2008). A casca de laranja apresenta componentes interessantes para a nutrição de animais, tais como: fibras alimentares, vitaminas, minerais e substâncias fenólicas (Aguilar, C. N.; Aguilera-Carbo, A.; Robledo, A.; Ventura, J.; Belmares, R.; Martinez, D.; Rodríguez-Herrera, R. Contreras, J. **Production of antioxidant nutraceuticals by solid-state cultures of pomegranate (*Punica granatum*) peel and creosote bush (*Larrea Tridentata*) leaves. Food Technology and Biotechnology 46, p.**  
 30

218-222, 2008). As fibras alimentares são consideradas a parte comestível de plantas ou carboidratos análogos que são resistentes à digestão e absorção no intestino. Elas podem ser divididas em duas frações: solúvel e não-solúvel em água. Apresentam efeitos fisiológicos benéficos ao sistema gastrointestinal, alterações do metabolismo de nutrientes e outros derivados da fermentação realizada no intestino (Chau, C. F.; Huang, Y. L. **Comparison of the chemical composition and physicochemical properties of different fibers prepared from the peel of *Citrus sinensis* L. Cv. Liucheng. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, p. 2615–2618, 2003).** Em frutas, incluindo citrus, o total de fibras totais presentes são da ordem de 35 a 59 gramas a cada 100 gramas de matéria seca, sendo 21 a 44 gramas por 100 gramas para fibras insolúveis e 10 a 14 grama por 100 gramas de matéria seca para fibras solúveis (Grigelmo-Miguel, N.; Martin-Belloso, O. **Comparison of dietary fibre from byproducts of processing fruits and greens and from cereals. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 32, p. 503-508, 1999).**

Os minerais também estão presentes em citrus, principalmente o cálcio que representa cerca de 21,7 gramas a cada quilograma de matéria seca; o fósforo com 1,2 gramas; potássio com 6,8 gramas; ferro com 180 gramas e zinco com 16 gramas a cada quilograma de matéria seca (Bampidis, V. A.; Robinson, P. H. **Citrus by-products as ruminant feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology* 128, p. 175-217, 2006).** O cálcio em conjunto com o fósforo está diretamente envolvido com o desenvolvimento e manutenção do sistema esquelético e participa em muitos processos fisiológicos (NRC (**National Research Council**), **Nutrient Requirements of Fish. National Academic Press, Washington, DC, 1993).** Em vertebrados, o cálcio se liga ao fósforo no composto hidroxiapatita para formar o principal componente dos ossos. Para os peixes este mineral é afetado pela constituição química da água. A absorção deve ser pela água em que o peixe se ambienta e também pela alimentação (Lall, S. P. **The minerals. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*, 3rd ed. Academic Press, San Diego, CA, p. 259–308, 2002).** Estudos mostraram que a inclusão de cálcio na ração para peixes da espécie *Litopenaeus vannamei* aumentaram seu peso corpóreo (Cheng, K. M.; Hu, C. Q.; Liu, Y. N.; Zheng, S. X.; Qi, X. J. **Effects of dietary calcium, phosphorus and calcium/phosphorus ratio on the growth and tissue mineralization of *Litopenaeus vannamei* reared in low-salinity water. *Aquaculture* 251, p. 472-483, 2006).** Também que a suplementação de cálcio com 0,75% na ração apresentou efeito positivo na mineralização dos

ossos na espécie *Salmo salar* (Vielma, J.; Lall, S. P. Phosphorus utilization by Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared in freshwater is not influenced by higher dietary calcium intake. *Aquaculture* 160, p. 117-128, 1998).

#### TANINOS E TANASE

- 5 Os taninos são um grupo de compostos fenólicos com alta massa molecular, solúveis em água, capazes de precipitar proteínas e de se ligarem à metais (quelantes). Estes compostos se complexam com a celulose, pectina e amido tornando-os insolúveis. São classificados em dois grupos, os taninos hidrolisáveis, como os elagitaninos e galotaninos, e condensados, também nomeados por proantocianidinas (Gross, G. G. From lignins to tannins: 10 forty years of enzyme studies on the biosynthesis of phenolic compounds. *Phytochemistry* 69, p. 3018-3031, 2008.; Waghorn, 2008).

- Os taninos hidrolisáveis (Figura 1) são unidos por ligações ésteres entre grupos de ácido gálico e resíduo de glicose através de ligações esterásicas e ligações depsidásicas (Mueller-Harvey, I. Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology* 91, 15 p. 3-20, 2001). A unidade básica (monômero) destes taninos são os polióis, que são ácidos gálicos esterificados geralmente com glicose em seus grupos hidroxilas (galotaninos ou elagitaninos) (Battestin, V.; Matsuda, L. K.; Macedo, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. *Alimentos e Nutrição* 15, p. 63-72 2004); (Gross, 2008).

- Os taninos condensados (Figura 2) são mais vastamente distribuídos que os 20 hidrolisáveis no reino vegetal, eles são condensados devido à sua estruturação compacta (Mutabaruka, R.; Hairiah, K.; Cadisch, G. Microbial degradation of hydrolysable and condensed tannin polyphenol-protein complexes in soils from different land-use histories. *Soil Biology & Biochemistry* 39, p. 1479-1492, 2007). Eles estão presentes em grande quantidade nos alimentos, podem conter de 2 a 50 unidades flavonóides. Os condensados são 25 resistentes a hidrólise, devido à ausência de ligações ésteres e depsídicas (Battestin, 2004); (Gross, G. G. From lignins to tannins: forty years of enzyme studies on the biosynthesis of phenolic compounds. *Phytochemistry* 69, p. 3018-3031, 2008).

Taninos são frequentemente distribuídos em diferentes partes das plantas como sementes, flores, casca e folhas. Ocorrem naturalmente no metabolismo secundário de

- vegetais e têm sido considerado o quarto mais abundante constituinte, depois de celulose, hemicelulose e lignina (Manjit; Yadav, A.; Aggarwal, N. K.; Kumar, K.; Kumar, A. **Tannase production by *Aspergillus fumigatus* MA under solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, p. 3023-3030, 2008).** Estes compostos inibem o
- 5 crescimento de muitos microrganismos por se complexarem com proteínas. Estas características são altamente antinutricionais e impedem a utilização de plantas ricas em taninos para ração animal (Sabu, A.; Pandey, A.; Daud, M. J.; Szakacs, G. **Tamarind seed powder and palm kernel cake: two novel agroresidues for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* ATCC 16620. *Bioresource Technology* 96, p.**
- 10 **1223-1228, 2005).** O efeito negativo de taninos na nutrição animal é devido à sua capacidade de se ligar a macromoléculas, diminuindo a absorção destes componentes. Contudo, baixos níveis da concentração de taninos (40 g/kg de matéria seca) na ração têm demonstrado um aumento na assimilação de nitrogênio em ruminantes, rendendo maior taxa de crescimento e produção de leite (Belmares, R.; Contreras-Esquivel, J.; Rodríguez-Herrera, R.; Coronel, A. R.;
- 15 Aguilar, C. N. **Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 37, p. 857-864, p. 2004); (Min, B. R.; Barry, T. N.; Attwood, G. T.; McNabb, W. C. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology* 106, p. 3-19, 2003).**
- 20 A tanase (EC 3.1.1.20) ou tanino-acil-hidrolase (TAH) catalisa a hidrólise de ligações ésteres de ácido gálico (Figura 3) nas moléculas de taninos hidrolisáveis (Kumar, R.; Sharma, J.; Singh, R. **Production of tannase from *Aspergillus rubber* under solid-state fermentation using jamun (*Syzygium cumini*) leaves. *Microbiological Research* 162, p. 384-390, 2007); (Treviño-Cueto, B.; Luis, M.; Contreras-Esquivel, J. C.; Rodríguez, R.; Aguilera, A.; Aguilar, C.**
- 25 **N. Gallic acid and tannase accumulation during fungal solid state culture of a tannin-rich desert plant (*Larrea tridentata* Cov.). *Bioresource Technology* 98, p. 721-724, 2007).** Esta enzima é produzida por alguns fungos filamentosos, principalmente das espécies: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Trichoderma*, mas também pode ser produzida por bactérias do gênero *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Klebsiela*, *Streptococcus* e *Selenomonas*. A tanase também é
- 30 produzida por vegetais para acelerar o processo de amadurecimento de frutas (Aissam, H.; Errachidi, F.; Penninckx, M. J.; Merzouki, M.; Benlemlih, M. **Production of tannase by**

- Aspergillus niger* HA37 growing on tannic acid and olive Mill waste waters. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21, p. 609-614, 2005); (Batra, A.; Saxena, R. K. Potential tannase producers from the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. *Process Biochemistry* 40, p. 1553-1557, 2005); (Hamdy, H. S.; Purification and characterization of a newly isolated stable long-life tannase produced by *Fusarium subglutinans* - Wollenweber and Reinking. *Journal of Pharmaceutical Innovation* 3, p. 142-151, 2008); (Aguilar, C. N.; Gutiérrez-Sánchez, G. Review: sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. *Food Science and Technology International* 7, p. 373-382, 2001b); (Deschamps, A. M.; Otuk, G.; Lebeault, J. M. Production of tannase and degradation of chestnut tannin by bacteria. *Journal of Fermentation Technology* 61, p. 55-59, 1983); (Rodrigues, T. H. S.; Dantas, M. A. A.; Pinto, G. A. S.; Gonçalves, L. R. B. Tannase production by solid-state fermentation of cashew apple bagasse. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 136-140, p. 675-688, 2007); (Rodríguez, H.; Rivas, B.; Gómez-Cordovés, C.; Muñoz, R. Characterization of tannase activity in cell-free extracts of *Lactobacillus plantarum* CECT 748T. *International Journal of Food Microbiology* 121, p. 92-98, 2008); (Van de Lagemaat, J.; Pyle, D. L. Modelling the uptake and growth kinetics of *Penicillium glabrum* in a tannic acid-containing solid-state fermentation for tannase production. *Process Biochemistry* 40, p. 1773-1782, 2005); (Purohit, J. S.; Dutta, J. R.; Nanda, R. K.; Banerjee, R. Strain improvement for tannase production from co-culture of *Aspergillus foetidus* and *Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technology* 97, p. 795-801, 2006); (Belmares, 2004).

A tanase apresenta inúmeras aplicações como:

- Ração Animal: o emprego de enzimas em rações torna possível aumentar a assimilação dos nutrientes nele contido, como a quebra de fatores antinutricionais. Ao mesmo tempo reduz os custos para melhoramento da ração, já que esta enzima pode ser produzida via fermentação (Battestein, 2004; Graminha 2009). Existem estudos em que se utilizaram a ação da tanase, produzida por *Paecilomyces variotii*, em grãos de sorgo tipo vassoura sobre os fatores antinutricionais, neste caso os taninos. Nestes estudos foram verificadas nas amostras tratadas com a tanase uma redução dos taninos, aumento de fósforo, melhora na digestibilidade e diminuição da excreção de fósforo, em comparação ao sorgo cru (Schons, P. F. Detanificação e desfitinização de grãos de

sorgo (*Sorghum bicolor*) por tanase e fitase e estudo biológico. *Dissertação de Mestrado – UNICAMP-FEA, 2009*).

- 5

• Preparação de Chás Instantâneos: uma das bebidas mais consumidas no mundo, pelo seu aroma, sabor e principalmente efeitos medicinais. Na preparação destes chás, que são muitas vezes na forma gelada, produz um precipitado insolúvel. Este precipitado é o complexo de polifenóis, que é o principal problema detectado. A tanase, adicionada ao processo do produto, catalisa a quebra das ligações ésteres, que acaba clivando os compostos insolúveis, diminuindo sua turbidez e aumentando sua qualidade, já que a enzima libera compostos fenólicos e voláteis (Lekha, P. K.; Lonsane, B. K. *Production and application of tannin acyl hydrolase: State of the art. Advances in Applied Biochemistry and Microbiology* 44, p. 215-260, 1997); (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* 50, p. 565-570, 2002).
- 10

• Fabricação de Cervejas: as cervejas apresentam compostos polifenólicos provenientes do malte. Assim a tanase cliva estes compostos e diminui sua turbidez, tornando um produto aceitável ao mercado (Battestin, 2004).
- 15

• Produção de Ácido Gálico: usado principalmente nas indústrias farmacêuticas, como na síntese de trimetoprima, agente antibacteriano e sulfonamida (Aguilar, C. N.; Augur C.; Favela-Torres, E.; Viniegra-González, G. *Production of tannase by Aspergillus niger Aa-20 in submerged and solid-state fermentation: influence of glucose and tannic acid. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 26, p. 296-302, 2001a).
- 20

• Produção de Antioxidantes: a tanase cliva compostos polifenólicos resultando em compostos como epigallocatequina, epicatequina e ácido gálico, que são estruturas moleculares com capacidade antioxidante (Battestin, V.; Macedo, G. A.; De Freitas, V. A. P. *Hydrolysis of epigallocatechin gallate using a tannase from Paecilomyces variotii. Food Chemistry* 108, p. 228-233, 2008).
- 25

O TAH pode ser obtido de várias fontes, como de animais (intestino de ruminantes), plantas (folhas, casca de frutas, galhos) e principalmente de microrganismos, já que sua produção é mais estável e abundante, comparado com as outras fontes. Além disso, os microrganismos podem ser manipulados geneticamente para melhoramento da enzima e sua

5 produção (Battestin, V.; Macedo, G. A. Tannase Production by *Paecilomyces variotii*. *Bioresource Technology* 98, p. 1832-1837, 2007b); (Aguilar, 2007).

Um dos tópicos mais estudados sobre TAH refere-se às propriedades químicas desta enzima, mas o mecanismo de ação e regulação ainda não é totalmente compreendido. A enzima TAH fúngica é uma glicoproteína com pH de estabilidade na faixa de 3,5 e 8,0; pH

10 ótimo de 5,5 e 6,0; temperatura de estabilidade na faixa de 30 e 60°C; temperatura ótima entre 30 e 40°C; ponto isoelétrico de 4,0 e 4,5 e massa molecular entre 186 e 300 kDa. Essas propriedades variam de acordo com o tipo de microrganismo e condições de cultivo da linhagem usada. O TAH é inibido por Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>, sendo inativada por EDTA, 2-mercaptoetanol, tioglicolato de sódio, sulfato de magnésio e de cálcio e ofenanolina

15 (Aguilar, 2001a); (Aguilar, 2007); (Battestin, 2007a); (Belmares, 2004); (Mahapatra, K.; Nanda, R. K.; Bag, S. S.; Banerjee, R.; Pandey, A.; Szakacs, G. Purification, characterization and some studies on secondary structure of tannase from *Aspergillus awamori nakazawa*. *Process Biochemistry* 40, p. 3251-3254, 2005); (Sharma, S.; Agarwal, L.; Saxena, R. K. Statistical optimization for tannase production from *Aspergillus niger* under submerged

20 fermentation. *Indian Journal of Microbiology* 47, p. 132-138, 2007.); (Sharma, S.; Agarwal, L.; Saxena, R. K. Purification, immobilization and characterization of tannase from *Penicillium variable*. *Bioresource Technology* 99, p. 2544-2551, 2008).

#### FITATOS E FITASE

O ácido fítico, *Mio*-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexaquisfosfato (**Figura 4**), é um álcool cíclico

25 derivado da glicose com 6 grupamentos fosfatos ligados em cada carbono da molécula glicosídica. Dentre os compostos agrupados em fosforilados, o ácido fítico é o mais abundante em vegetais, principalmente em sementes já que apresenta função de estocagem do grupo fósforo para obtenção de energia (Raboy, V. Molecules of interest: *myo*-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochemistry* 64, p. 1033-1043, 2003). A presença de fitato em excesso

30 polue o meio ambiente como também atrapalha na dieta de animais monogástricos. O fitato

age como um antinutriente ligando-se às proteínas, aminoácidos e lipídios e quelando minerais como cálcio, ferro, zinco e magnésio formando, assim, sais insolúveis (Howson, S. J.; Davis, R. P. **Production of phytase-hydrolysing enzyme by some fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 5, p. 377-343, 1983).** Além disso, interage com enzimas digestivas reduzindo suas atividades, influenciando na digestão e prejudicando o aproveitamento de vitaminas.

Apesar de o fitato servir como fonte principal de energia e fósforo para germinação de sementes, o fósforo ligado é pouco disponível para animais monogástricos, de maneira que, o fósforo inorgânico, um mineral não-renovável e caro, é acrescentado nas dietas de suínos, peixes e aves para atender suas necessidades nutricionais de fósforo (Vats, P.; Banerjee, U. C. **Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. *Enzyme and Microbial Technology* 35, p. 3-14, 2004).** O fósforo do fitato que não é utilizado é excretado tornando-se um poluente ambiental em áreas de agropecuária intensiva (Lei, X. G.; Porres, J. M. **Phytase enzymology, applications and biotechnology. *Biotechnology Letters* 25, p. 1787-1794, 2003).**

A enzima ácido fosfohidrolase catalisa a hidrólise de fosfato e ácido fítico (Figura 5) a fosfato inorgânico e derivados de fosfato mio-inositol. Fitases são classificadas como histidina ácido fosfatases (Histidine Acid Phosphatases – HAPs), uma subclasse de fosfatases (Vats, 2004). Existe uma outra classificação baseada na posição do primeiro fosfato a ser hidrolisado, nomeado de 3-fitase (E.C.3.1.3.8) e 6-fitase (E.C.3.1.3.26), do qual a 3-fitase (mio-inositol-hexakisfosfato-3-fosfohidrolase) é originado principalmente via microbiana e a 6-fitase é derivada de plantas.

Para obtenção de fitase microbiana, os fungos são os mais pesquisados, dentre eles podemos citar os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Mucor*. Dentre as leveduras destaca-se o gênero *Saccharomyces* (Dvoráková, J. **Phytase: Sources, preparation and exploitation. *Folia Microbiológica* 43, Issue 4, p.323-338, 1998);** (Ries, E. F.; Macedo, G. A. **Progressive screening of thermostable yeasts for phytase production. *Food Science and Biotechnology* 18, p. 655-660, 2009).** Pelo processo fermentativo, a fitase pode ser produzida com a utilização de substratos de baixo custo como torta de sementes oleaginosas (Roopesh, K.; Ramachandran, S.; Nampoothiri, K. M.; Szakacs, G.; Pandey, A. **Comparison of phytase production on wheat**

bran and oilcakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*. *Bioresource Technology* 97, p. 506-511, 2006).

5 A suplementação de fitase em ração animal aumenta a biodisponibilidade de fósforo em animais monogástricos, que consequentemente reduz a poluição de fósforo no meio ambiente. A enzima também impede: quelação do ácido fítico com íons metais, ligação de proteínas, lipídeos e carboidratos, aumentando assim sua nutrição na ração (Vats, 2004).

10 Pesquisas na área de produção da enzima fitase têm importância ressaltada não apenas pela investigação de uma fonte pouco explorada de fitase como também pela busca de fitases com características desejáveis para indústria de alimentação animal, principalmente relacionadas à termoestabilidade, à estabilidade em baixo pH e ao custo do processo fermentativo.

15 Foi realizada uma pesquisa em que se utilizaram como meio de cultivo, resíduos de mandioca, que são os subprodutos do processamento do amido de mandioca, suplementado com fonte de nitrogênio para fermentação em estado sólido com *Aspergillus niger* para produção de fitase. Foi obtido um rendimento máximo de 6,73 UA/g de matéria seca. A enzima apresentou atividade residual de 4,71 UA/g à 75°C durante 30 minutos, que suportaria em processamentos na indústria de ração (Hong, K.; Ma, Y.; Li, M. Solid-state fermentation of phytase from cassava dregs. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 91-93, p. 777-785, 2001).

20 Utilizou-se torta proveniente da extração do óleo de coco para produção de fitase extracelular via fermentação em estado sólido com *Rhizopus oligosporus*. A produção enzimática máxima de 14,29 UA/g de substrato seco após 96 horas de incubação sem suplementação de nutrientes (Sabu, A.; Sarita, S.; Pandey, A.; Bogar, B.; Szakacs, G.; Soccol, C. R. Solid-state fermentation for production of phytase by *Rhizopus oligosporus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 102-103, p. 251-260, 2002).

25

#### ENZIMAS EM RAÇÃO ANIMAL

As enzimas são usadas atualmente em inúmeros produtos e processos industriais, ao mesmo tempo novas áreas de aplicação estão sendo adicionadas, devido à sua eficácia e economia nas suas ações, principalmente na redução do uso de energia, para ativação da

reação e quantidade de água (Kirk, O.; Borchert, T. V.; Fuglsang, C. C. **Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology* 13, p. 345-351, 2002).**

O uso de enzimas como aditivos em alimentos também é bem conhecida, como por exemplo, a ação da bromelina em carne, uma protease que aumenta a maciez do produto, tornando-o mais interessante ao consumo. As enzimas também podem aumentar a disponibilidade de nutrientes, principalmente em rações para animais, como a xilanase e beta-glucanase que são utilizadas em cereais que ajudam na digestibilidade dos nutrientes em animais monogástricos, que ao contrário dos ruminantes, são incapazes de hidrolisar totalmente os alimentos de origem vegetal, principalmente celulose e hemicelulose (Polizeli, M. L. T. M.; Rizzatti, A. C. S.; Monti, R.; Terenzi, H. F.; Jorge, J. A.; Amorim, D. S. **Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiological Biotechnologic* 67, p. 577-591, 2005).**

O uso de resíduos agroindustriais favorece economicamente a formulação de rações, entretanto esses resíduos devem ser suplementados com enzimas que hidrolisam compostos para aumentar seu valor nutricional, como os fatores antinutricionais já mencionados para os taninos e fitatos. Assim, para extrair o máximo valor nutritivo, são adicionadas enzimas exógenas nos alimentos ou resíduos para melhor absorção aos animais monogástricos (Pariza, M. W.; Cook, M. **Determining the safety of enzymes used in animal feed. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 56, p. 332-342, 2010).**

Nos últimos anos, o foco tem sido a utilização de fósforo orgânico para alimentação, estocado no ácido fítico, que está presente em várias espécies e estruturas dos vegetais. Entretanto esse fósforo não está disponibilizado aos monogástricos, já que eles não apresentam enzimas que hidrolisam o fitato e liberam o fósforo. Assim, a suplementação da enzima fitase na ração auxilia na nutrição dos animais (Lei, X. G.; Stahl, C. H. **Nutritional benefits of phytase and dietary determinants of its efficacy. *Journal of Applied Animal Research* 17, p. 97-112, 2000); (Kies, A. K.; Van Hemert, K. H. F.; Saber, W. C. Effect of phytase on protein and amino acid digestibility and energy utilization. *World's Poultry Science Journal* 57, p. 109- 126, 2001).**

Existe também a suplementação de complexos enzimáticos em rações para animais, como a adição de carbohidrases, representadas por xilanase, beta-glucanase e celulase feita

- em ração à base de trigo, que mostraram uma melhora no crescimento e aparente aumento na digestibilidade de nutrientes em porcos (Emiola, I. A.; Opapeju, F. O.; Slominski, B. A.; Nyachoti, C. M. **Growth performance and nutrient digestibility in pigs fed wheat distillers dried grains with solubles based diets supplemented with a multicarbohydrase enzyme.** *Journal of Animal Science* 87, p. 2315–2322, 2009).

Colombatto e colaboradores (Colombatto, D.; Beauchemin, K. A. **A protease additive increases fermentation of alfalfa diets by mixed ruminal microorganisms in vitro.** *Journal of Animal Science* 87, p.1097-1105, 2009) publicaram um estudo sobre a ação da protease em ração, à base de componentes vegetais, para ruminantes. Concluíram que esta enzima age removendo proteínas estruturais da parede celular vegetal e consequentemente disponibiliza uma maior quantidade de nutrientes para digestibilidade na microbiota dos ruminantes.

Nuero e Reyes (Enzymes for animal feeding from *Penicillium chrysogenum* mycelial wastes from penicillin manufacture. *Letters in Applied Microbiology* 34, p. 413- 416, 2002) estudaram a produção multienzimática para utilização como aditivo em ração animal através do *Penicillium chrysogenum*. O microrganismo produziu enzimas como: tanase, lipase, invertase e beta-1,3-glucanase, com atividades enzimáticas comparáveis com a comercial e assim, possibilitando sua aplicação na alimentação animal.

### **BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO**

A presente invenção compreende a produção de meios de cultura capazes de viabilizar a produção simultânea de duas enzimas fitase e tanase através da fermentação sólida, em bagaço de laranja empregando o fungo *Paecilomyces variotii*.

O uso de enzimas na alimentação animal é conhecido e está sendo bem explorado. A maior dificuldade de expandir o uso de enzimas ainda é o custo de produção. Uma alternativa para isto seria a utilização destes resíduos como substrato da fermentação para produção de enzimas.

A produção mundial de laranja tem aumentado significativamente desde a década de oitenta, especialmente no setor de processamento de suco, sendo que cerca de 40% desta produção é convertida em subproduto, principalmente a casca.

O uso dos resíduos para alimentação animal representa uma alternativa viável para este setor, assim como para a produção de biocatalizadores através da fermentação sólida. Dessa forma, o presente invento permite que o bagaço de laranja apresente maior capacidade antioxidante em relação ao meio não fermentado, representando um ingrediente interessante para uso em ração animal.

Determinou-se a otimização da produção de tanase por *Paecilomyces variotii* utilizando metodologia de superfície de resposta e foram obtidas atividades de 4800 em bagaço de laranja. Essa produção foi conduzida utilizando 3% de ácido tânico, 61% de solução salina, 96 de tempo de incubação para os resíduos de laranja.

Na produção de fitase, a atividade da enzima obtida foi de 320 U/g em bagaço de laranja. As condições de cultivo foram 5,8% de ácido tânico, 66% de solução salina e 72 horas de incubação. Após o processo fermentativo, o bagaço de laranja apresentou maior capacidade antioxidante em relação ao meio não fermentado, representando um ingrediente interessante para uso em ração animal.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

**Figura 1:** Taninos hidrolisáveis unidos por ligações ésteres entre grupos de ácido gálico e resíduo de glicose através de ligações esterásicas e ligações depsidásicas. A unidade básica destes taninos são os polióis, que são ácidos gálicos esterificados geralmente com glicose em seus grupos hidroxilas (galotaninos ou elagitaninos).

**Figura 2:** Taninos condensados com estruturação compacta.

**Figura 3:** Tanase (EC 3.1.1.20) ou tanino-acil-hidrolase (TAH), que catalisa a hidrólise de ligações ésteres de ácido gálico nas moléculas de taninos hidrolisáveis.

**Figura 4:** Ácido fítico, *Mio*-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexaquisfosfato, um álcool cíclico derivado da glicose com 6 grupamentos fosfatos ligados em cada carbono da molécula glicosídica.

**Figura 5:** Enzima ácido fosfohidrolase, que catalisa a hidrólise de fosfato e ácido fítico a fosfato inorgânico e derivados de fosfato mio-inositol.

**Figura 6:** Capacidade Antioxidante das amostras durante 60 minutos de reação.

### **BREVE DESCRIÇÃO DOS ANEXOS**

**Anexo 1** - Superfície de Resposta e Curva de Contorno para Atividade da Fitase (U/mL).

**Anexo 2** - Superfície de Resposta e Curva de Contorno para Atividade da Tanase (U/mL).

**Anexo 3** - Porcentagem de Fibras Alimentares Dietéticas nas amostras: (a) BL 5,8% F72h; (b) BL  
5 3% F96h.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

#### **CARACTERIZAÇÃO DO RESÍDUO DE LARANJA**

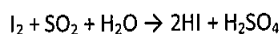
O resíduo do bagaço de laranja deve ser triturado e submetido a um processo de  
separação granulométrica em tamis de 10 *mesh*, com 1,68 mm para avaliação de seu pH,  
10 quantidade de água e teor de umidade, como pode ser observado na Figura 1.

#### **A) Determinação do pH**

Para determinação do pH, adicionam-se 5 mL de água deionizada a 0,5 g de amostra e  
agita-se a mistura vigorosamente. Após 10 minutos, o pH do sobrenadante é medido em  
potenciômetro e, o resultado obtido deve ser 4,1, com variação de 0,01 para mais ou para  
15 menos.

#### **B) Porcentagem de Água**

Para determinar-se a quantidade de água presente no resíduo de laranja, sugere-se  
utilizar metodologia para amostras com baixa quantidade de água livre, como cereais, casca de  
frutas, resíduos vegetais e grãos, como a desenvolvida por Laitinen (**Laitnen, H. A. Boyer, K. W.**  
20 **Automobile exhaust particulates properties of environmental significance. *Environmental Science and Technology* 279, p. 457-1086, 1975).** Esta metodologia baseia-se na oxidação de  
SO<sub>2</sub> pelo I<sub>2</sub>, que constituem o reagente de Karl Fischer, na presença de água, conforme  
ilustrado na equação química a seguir:



Esta metodologia deve ser realizada por titulação volumétrica, pois fornece diretamente a porcentagem de água da amostra, sendo necessário fornecer a massa de amostra adicionada no frasco de titulação.

- 5 A quantidade de água na amostra deve ser de aproximadamente 8,01%, com variação de 0,19% para mais ou para menos.

### C) Umidade

Para determinação da umidade da amostra, deve-se incubar 0,5 g da amostra por 24 horas em estufa a 105°C e, deve-se fazer a pesagem em períodos regulares até que essas amostras atinjam peso constante.

- 10 Para que o resíduo de laranja seja utilizado para produção ótima de fitase e tanase, ele deve apresentar teor de umidade de 14,27%, com variação de 0,18% para mais ou para menos.

## PROCESSO FERMENTATIVO

### A) Microrganismo e preparo do pré-inóculo

- 15 O microrganismo *Paecilomyces variotii* deve ser mantido em meio Potato Dextrose Agar (PDA – OXOID - CM0139) com suplemento de 0,2% de ácido tânico (Tanal B – Prozyn - BioSolutions) e, antes de ser utilizado no meio de cultura, deve permanecer incubado em estufa a 30°C durante 72 horas.

Após a incubação, deve ser realizada uma suspensão celular com um homogeneizador, obtendo-se no final uma concentração de  $9 \times 10^6$  células/mL.

### 20 B) Meio de Fermentação

- 25 Devem ser misturados, na proporção de g/mL, 1 parte do resíduo (bagaço de laranja) para 1 parte da solução salina (g/L) composta por: 1,0 de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2,0 de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 0,2 de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,02 de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,004 de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0,002 de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e 0,0025 de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; e 10% de ácido tânico. Em seguida, o recipiente no qual foi feita a mistura deve ser esterilizado em autoclave a temperatura de 121°C durante 15 minutos.

Após ser resfriado à temperatura ambiente, adiciona-se a suspensão de esporos do *Paecilomyces variotii*, ao meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA – OXOID - CM0139) com suplemento de 0,2% de ácido tânico. Após a inoculação, os recipientes devem ser incubados em estufa a 30°C durante 120 horas.

## 5 C) Otimização de Produção Enzimática

Para a otimização da produção das enzimas tanase e fitase no bagaço de laranja, é necessária que seja mantida a proporção correta entre a concentração de ácido tânico e solução salina no meio de produção enzimática.

### Fitase:

10 Para produção da enzima fitase, determinou-se que, em relação à quantidade de ácido tânico (AT), a faixa em que se obteria a maior atividade enzimática seria de 5,0 a 5,8% do peso total do meio. Os valores poderiam ser maiores para concentração de ácido tânico, para obter uma maior atividade fitásica, entretanto, visou-se à menor concentração de ácido tânico para minimizar os custos da produção enzimática.

15 Adicionalmente, não há o acréscimo à reação do ácido fítico, indutor para a produção de fitase, indicando a independência deste para produção dessa enzima em bagaço de laranja, tornando a produção mais barata.

20 Com relação à concentração do volume da solução salina em relação ao peso total do meio, a faixa de 64 a 66% estimula a produção da enzima. Concentrações menores do volume da solução salina diminuiriam a atividade fitásica, provavelmente devido à menor umidade disponível para o microrganismo produzir a enzima. Concentrações maiores da solução no meio iriam descaracterizar a fermentação sólida, já que haveria grande quantidade de água livre disponível para o microrganismo. De acordo com a melhor faixa do volume da solução salina adicionada no meio para produção de fitase, determinou-se que foi de 66%.

25 Adicionalmente, também foi determinado que o período ótimo de incubação do microrganismo *Paecilomyces variotii* para produção de fitase, é de 72 horas, sofrendo uma pequena queda até as 96 horas, quando o valor de produção torna-se constante e apresenta queda após 120 horas, como podemos verificar na Figura 2.

- A umidade relativa do meio presente antes da fermentação foi de 73% e após incubação na Câmara houve uma pequena redução de 2%, resultando em 71%. Entretanto a Câmara quando utilizada a 90% de umidade relativa do ar, conseguiu manter a umidade presente no meio de cultivo, não havendo perda de água do meio para o ar, resultando em um
- 5 equilíbrio da água presente no meio com o ar.

Dessa formas utilizando o processo de otimização, as melhores condições para a produção da fitase, em 10 g de meio, são: 6,6 mL de SS (%); 0,58 g de AT (%); 2,82 g de bagaço de laranja. Obtendo-se dessa forma uma atividade de 80 U/mL ou 320 U/g.

#### **Tanase:**

- 10 Para otimização de produção da enzima tanase também foram determinados a concentração de ácido tânico e porcentagem do volume da solução salina adicionada em relação ao meio.

Determinou-se que, em relação ao Ácido Tânico, a faixa em que se obtém a maior atividade enzimática é entre 1,8 a 4,5% do peso total do meio, com concentração ótima de 3%.

- 15 Valores acima de 4,5% desta concentração provocariam queda na atividade da tanase devido provavelmente a inibição do ácido tânico para com a enzima.

Para a concentração do volume da solução salina em relação ao peso total do meio, determinou-se que a faixa de 59 a 63% estimula a produção da enzima, com concentração ótima de 61%. Concentrações menores ou maiores do volume da solução salina diminuíram a

20 atividade tanásica.

A otimização da cinética de fermentação, para que se obtenha a maior quantidade de enzimas no menor tempo possível mostrou que para a produção de tanase, o tempo ótimo é de 96 horas, que foi o tempo que encontrou-se atividade tanásica mais alta, como podemos observar na Figura 3.

- 25 A umidade relativa do meio presente antes da fermentação era de 60% e após incubação na Câmara houve um aumento de 10%, resultando em 70%. Assim a Câmara Climática adiciona mais água no meio de cultura, resultando em equilíbrio osmótico na faixa de 70% do meio com 90% de umidade relativa do ar a 30°C de temperatura. O meio de cultura

otimizado no planejamento para produção da enzima tanase em bagaço de laranja apresentam maior atividade enzimática em condições de 90% de umidade relativa do ar.

Utilizando o processo de otimização para obtenção de tanase acima descrito, as melhores condições para a produção da enzima, em 10 g de meio, são: 6,1 mL de solução salina, 0,3 g de ácido tânico e 2,82 g de bagaço de laranja. Obtendo-se dessa forma uma  
5 atividade de 1200 U/mL ou 4800 U/g de substrato na fermentação pela linhagem *P. variotii*.

### **EXEMPLOS DE CONCRETIZAÇÃO**

#### **Exemplo 1: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

Para a otimização da produção das enzimas tanase e fitase no bagaço de laranja, é  
10 necessária a determinação correta entre a concentração de ácido tânico e solução salina no meio de produção enzimática.

Para isso, foram realizados dois delineamentos compostos centrais rotacionais (DCCR), com as variáveis independentes: volume da solução salina (%) e concentração de ácido tânico (%). O primeiro delineamento foi realizado com a variável dependente atividade enzimática da  
15 fitase após 72 horas de fermentação, o segundo delineamento foi com a variável dependente atividade enzimática da tanase após 96 horas de fermentação.

Cada DCCR, apresentou 4 pontos fatoriais (p.f.), 4 pontos axiais (p.a.) e 3 pontos centrais (p.c.) totalizando 11 ensaios (22 p.f. + 4 p.a. + 3 p.c. = 11). As variáveis independentes foram: concentração de ácido tânico, que foi expresso em porcentagem em relação ao peso  
20 total do meio (p/p); e o volume da solução salina, que foi expresso em porcentagem em relação ao peso total do meio (v/p). As variáveis dependentes (respostas) foram atividade enzimática da tanase e fitase.

Nesse delineamento foi avaliado o volume de água adicionado ao meio de fermentação, ou seja, a faixa de volume de água adicionada, determinada de acordo com a  
25 capacidade máxima de absorção do substrato, sem apresentar água livre no meio, conforme Figura 4. Os valores reais utilizados nos ensaios do planejamento estão apresentados na Figura 5 e a matriz dos ensaios na **Tabela 1**.

**Tabela 1:** Indicação do valor ótimo e possível variação de pH, quantidade de água e umidade relativa do bagaço de laranja desidratado.

| <b>Bagaço de Laranja</b> |              |
|--------------------------|--------------|
| <b>Teste</b>             | <b>Média</b> |
| <b>pH</b>                | 4,1 ± 0,01   |
| <b>Água (%)</b>          | 8,1 ± 0,19   |
| <b>Umidade (%)</b>       | 14,27 ± 0,18 |

#### **A) Fitase**

- 5 Apresenta-se na Tabela 2 a matriz do primeiro delineamento com as variáveis independentes em estudo, com valores reais e codificados, e a variável dependente fitase após 72 horas de incubação.

- 10 Analisando-se os valores de atividade obtidos na Tabela 2, verifica-se um incremento nos valores de atividade enzimática, variando-se de 16,52 U/mL para o ensaio 7 (59% do volume da Solução Salina em relação ao peso total e 0,18% de ácido tânico) até uma atividade máxima de 65,19 U/mL, para o ensaio 4 (64% do volume da Solução Salina e 5% de ácido tânico).

**Tabela 2** - Avaliação da cinética de fermentação para atividade fitásica em Bagaço de Laranja.

| <b>Fitase (U/mL)</b>              |               |
|-----------------------------------|---------------|
| <b>Tempo de Incubação (horas)</b> | <b>Média*</b> |
| <b>24</b>                         | 0,1 ± 0,06 a  |
| <b>48</b>                         | 3,59 ± 0,16 b |
| <b>72</b>                         | 5,73 ± 0,37 c |
| <b>96</b>                         | 4,57 ± 0,99 c |
| <b>120</b>                        | 1,27 ± 0,37 d |

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ) ao nível de 5% de probabilidade.

A Tabela 3 apresenta os valores dos coeficientes de regressão, t e p-valor para avaliar quais são as variáveis e suas interações, estatisticamente significativas, acima de 90% de confiança ( $p < 0,10$ ).

De acordo com a Tabela 3, somente a variável quadrática AT (%) (concentração de ácido tânico) não foi significativa, apresentando p igual a 0,401. Assim, somente as variáveis: volume SS (%) (L), volume SS (%) (Q), AT (%) (L) e interação volume SS (%) com AT (%) foram avaliados para Regressão na Fonte de Variação, sendo a variável AT (%) (L) adicionada aos Resíduos na Análise de Variância (ANOVA). A tabela também apresenta os valores de t, p-valor e coeficientes de regressão utilizados para a construção do modelo polinomial quadrático da atividade da fitase a partir das variáveis estudadas. Os valores de p são utilizados para checar a significância de cada coeficiente e também indicam a importância de cada variável ou interação entre variáveis na resposta modelo. Quanto maior a magnitude do valor de t e menor o valor de p-valor, maior será a significância do coeficiente, como pode ser observado na variável AT (%) (L) em que o t é igual a 7,03 e o p-valor igual a 0,001, apresentando um coeficiente de 10,85, sendo bem relevante para resposta em questão.

**Tabela 3** - Avaliação da cinética de fermentação para atividade tanásica em Bagaço de Laranja.

| Tanase (U/mL)              |            |
|----------------------------|------------|
| Tempo de Incubação (horas) | Média*     |
| 24                         | 153 ± 14 a |
| 48                         | 243 ± 29 b |
| 72                         | 315 ± 12 c |
| 96                         | 567 ± 85 d |
| 120                        | 562 ± 52 d |

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ) ao nível de 5% de probabilidade.

A análise de variância (ANOVA) está representada na Tabela 4.

5 **Tabela 4 - Capacidade de Absorção de Água do Bagaço de Laranja.**

| Capacidade de Absorção de Água |                          |             |
|--------------------------------|--------------------------|-------------|
| Massa da Amostra*              | Volume de Água Absorvida | Umidade (%) |
| 10 g                           | 20 mL                    | 66,7        |

\*Peso do Bagaço de Laranja postado para avaliar a capacidade de absorção de água em seu meio.

10 As medidas de correlação utilizadas para se estimar o modelo foram o coeficiente de correlação (R) e o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>). Quanto maior a proximidade de R da unidade 1, melhor a correlação entre valores de atividade preditos pelo modelo e os valores observados. Foi obtido um valor de R de 0,97 indicando uma correlação satisfatória. O valor do coeficiente de determinação obtido foi de 0,95 indicando que apenas 5% do total da variação das respostas obtidas não são explicados pelo modelo. O valor F da Falta de Ajuste obtido a

15 partir da ANOVA foi de 131,09 (14,19 vezes maior do que o valor de F<sub>tabelado</sub>=9,24), resultando em uma falta de ajuste do modelo maior que o indicado pelo valor tabelado. Entretanto o valor de F da Regressão obtido foi de 27,22 (8,56 vezes maior do que o valor de

Ftabelado=3,18) e indicou que o modelo para a atividade de fitase pode ser considerado estatisticamente significativo a 90% de nível de confiança.

Estes resultados são suficientes para obter um modelo codificado que descreve as respostas em função das variáveis analisadas. A partir da validação dos parâmetros de estudo, foi obtido o modelo polinomial quadrático que representa o comportamento da atividade enzimática (1):

$$\text{Fitase (U/mL)} = 29,17 + 3,11 * (\text{volume SS}) + 7,78 * (\text{volume SS})^2 + 10,85 * (\text{AT}) + 12,49 * (\text{volume SS}) * (\text{AT}) \quad (1)$$

O modelo polinomial quadrático foi utilizado para construir as superfícies de resposta e curvas de contorno. O Anexo 1 mostra os efeitos da concentração de ácido tânico e porcentagem do volume da solução salina em relação ao peso total do meio, na produção de fitase pelo *Paecilomyces variotii*.

O Anexo 1 indica que para variável AT (%) a faixa em que se obteria a maior atividade enzimática seria de 5,0 a 5,8% do peso total do meio. Os valores poderiam ser maiores para concentração de ácido tânico, para obter uma maior atividade fitásica, entretanto, o presente trabalho estudou uma menor concentração de ácido tânico para minimizar os custos da produção enzimática. Concentrações menores de ácido tânico no meio diminuiriam a produção da fitase, indicando uma importância deste indutor ao microrganismo *Paecilomyces variotii* para produção enzimática. Na literatura o indutor que se utiliza para produção desta enzima é o ácido fítico, que neste trabalho não foi necessário acrescentar, resultando assim em uma independência do ácido fítico para produção de fitase em bagaço de laranja, tornando a produção mais barata. Não foi encontrada nenhuma referência na literatura indicando a produção da enzima fitase com a suplementação de ácido tânico no meio de cultivo, sendo necessário, para este caso, um estudo sobre o processo metabólico do ácido tânico com microrganismo que o utiliza.

Com relação à concentração do volume da solução salina em relação ao peso total do meio, a faixa de 64 a 66% estimularia a produção da enzima. Concentrações menores do volume da solução salina diminuiriam a atividade fitásica, provavelmente devido à menor umidade disponível para o microrganismo produzir a enzima. Concentrações maiores da

solução no meio iriam descaracterizar o tipo de fermentação que foi estudada (sólida), já que haveria grande quantidade de água livre disponível para o microrganismo.

De acordo com a melhor faixa do volume da solução salina adicionada no meio para produção de fitase, que foi de 66%, foi quantificada a umidade antes e após 72 horas de incubação na câmara climática a 90%, sem a inoculação do microrganismo. O objetivo dessa análise foi relacionar o volume da solução salina adicionada, a umidade presente no meio de cultivo e também para avaliar o desempenho da umidade durante a incubação na câmara climática. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5** - Variáveis e Níveis avaliados no DCCR.

| Variáveis*    | Níveis |    |    |    |       |
|---------------|--------|----|----|----|-------|
|               | -1,41  | -1 | 0  | +1 | +1,41 |
| volume SS (%) | 52     | 54 | 59 | 64 | 66    |
| AT (%)        | 0,18   | 1  | 3  | 5  | 5,8   |

\*volume SS (%) = volume da Solução Salina; AT (%) = concentração de ácido tânico.

#### B) Tanase

O segundo delineamento composto central rotacional foi também utilizado para avaliar a resposta ou variável dependente da atividade enzimática da tanase. Os ensaios foram incubados com o microrganismo durante 96 horas, que foi o tempo que apresentou atividade tanásica mais alta. As variáveis independentes avaliadas foram: a concentração do ácido tânico e a porcentagem do volume da solução salina adicionada em relação ao meio.

Apresenta-se na Tabela 6 a matriz das variáveis independentes em estudo, com valores reais e codificados, e a variável dependente tanase durante 96 horas de incubação.

Analisando-se os valores das atividades obtidas na Tabela 6, verifica-se um incremento nos seus valores, variando-se de 349 U/mL para o ensaio 5 (52% do volume da Solução Salina em relação ao peso total e 3% de ácido tânico) até uma atividade máxima de 1430 U/mL, para o ensaio 11 (59% do volume da Solução Salina e 3% de ácido tânico).

**Tabela 6** - Matriz do delineamento contendo valores codificados das variáveis.

| <b>Ensaio</b> | <b>volume SS (%)</b> | <b>AT (%)</b> | <b>volume SS (%)</b> | <b>AT (%)</b> |
|---------------|----------------------|---------------|----------------------|---------------|
| <b>1</b>      | -1                   | -1            | 54                   | 1             |
| <b>2</b>      | +1                   | -1            | 64                   | 1             |
| <b>3</b>      | -1                   | +1            | 54                   | 5             |
| <b>4</b>      | +1                   | +1            | 64                   | 5             |
| <b>5</b>      | -1,41                | 0             | 52                   | 3             |
| <b>6</b>      | +1,41                | 0             | 66                   | 3             |
| <b>7</b>      | 0                    | -1,41         | 59                   | 0,18          |
| <b>8</b>      | 0                    | +1,41         | 59                   | 5,8           |
| <b>9 (C)</b>  | 0                    | 0             | 59                   | 3             |
| <b>10 (C)</b> | 0                    | 0             | 59                   | 3             |
| <b>11 (C)</b> | 0                    | 0             | 59                   | 3             |

\* volume SS (%) = volume da Solução Salina; AT (%) = concentração de ácido tânico.

5 A Tabela 7 apresenta os valores dos coeficientes de regressão, t e p-valor para avaliar quais são as variáveis e suas interações, estatisticamente significativas, acima de 90% de confiabilidade ( $p < 0,10$ ).

**Tabela 7** - Matriz DCCR 22 e a resposta da atividade enzimática da fitase em 72 horas de incubação.

| Ensaio | Valores Codificados |                | Valores Reais |        | Resposta      |
|--------|---------------------|----------------|---------------|--------|---------------|
|        | x <sub>1</sub>      | x <sub>2</sub> | volume SS (%) | AT (%) | Fitase (U/mL) |
| 1      | -1                  | -1             | 54            | 1      | 31.91         |
| 2      | +1                  | -1             | 64            | 1      | 19.31         |
| 3      | -1                  | +1             | 54            | 5      | 27.82         |
| 4      | +1                  | +1             | 64            | 5      | 65.19         |
| 5      | -1.41               | 0              | 52            | 3      | 45.57         |
| 6      | +1.41               | 0              | 66            | 3      | 45.67         |
| 7      | 0                   | -1.41          | 59            | 0.18   | 16.52         |
| 8      | 0                   | +1.41          | 59            | 5.8    | 48.35         |
| 9 (C)  | 0                   | 0              | 59            | 3      | 28.11         |
| 10 (C) | 0                   | 0              | 59            | 3      | 27.34         |
| 11 (C) | 0                   | 0              | 59            | 3      | 27.29         |

x<sub>1</sub> = volume SS (%) = % do volume da Solução Salina em relação ao peso total (v/p) ; x<sub>2</sub> = AT (%) = % do peso do ácido tânico em relação ao peso total (p/p).

- 5 Com os resultados da Tabela 7, as variáveis linear AT (%) (concentração de ácido tânico) e interação volume SS (%) e AT (%) não foram significativos, apresentando p igual a 0,461 e 0,246, respectivamente. Assim, somente as variáveis volume SS (%) (L), volume SS (%) (Q) e AT (%) (L) foram avaliados para Regressão na Fonte de Variação no ANOVA. A análise de variância (ANOVA) está representada na Tabela 8.

- 10 **Tabela 8** - Resultados do Coeficiente de Regressão, Erro Padrão, t, p e Limite de Confiança na otimização dos componentes do meio de cultivo (volume da Solução Salina e ácido tânico) na atividade de fitase.

|                               | Coefficiente<br>de<br>Regressão | Erro<br>Padrão | t(5)  | p-<br>valor | Limite de<br>Confiança<br>-90, % | Limite de<br>Confiança<br>+90, % |
|-------------------------------|---------------------------------|----------------|-------|-------------|----------------------------------|----------------------------------|
| <b>Média*</b>                 | 27,58                           | 2,52           | 10,95 | 0,000       | 22,50                            | 32,66                            |
| <b>(1) volume SS (%) (L)*</b> | 3,11                            | 1,54           | 2,02  | 0,100       | 0,01                             | 6,22                             |
| <b>volume SS (%) (Q)*</b>     | 8,28                            | 1,84           | 4,51  | 0,006       | 4,58                             | 11,98                            |
| <b>(2) AT (%) (L)*</b>        | 10,85                           | 1,54           | 7,03  | 0,001       | 7,74                             | 13,96                            |
| <b>AT (%) (Q)</b>             | 1,69                            | 1,84           | 0,92  | 0,401       | -2,01                            | 5,38                             |
| <b>1L x 2L*</b>               | 12,49                           | 2,18           | 5,73  | 0,002       | 8,10                             | 16,89                            |

\* parâmetros estatisticamente significativos a 90% de nível de confiança. L = parâmetro linear;  
Q = parâmetro quadrático.

Para o coeficiente de correlação (R) o valor obtido foi de 0,91; para o coeficiente de  
5 determinação (R<sup>2</sup>) foi de 0,83, indicando uma boa correlação entre os valores obtidos pelo  
experimento e os preditos pelo modelo. O valor F da Falta de Ajuste obtido a partir da ANOVA  
foi de 3,73 (2,49 vezes menor do que o valor de F<sub>tabelado</sub>=9,29), resultando em uma falta de  
ajuste do modelo menor que o indicado pelo valor tabelado. O valor de F da Regressão obtido  
foi de 11,64 (3,79 vezes maior do que o valor de F<sub>tabelado</sub>=3,07), indicando que o modelo  
10 para a atividade de tanase pode ser considerado estatisticamente significativo a 90% de nível  
de confiança.

Estes resultados são suficientes para obter um modelo codificado que descreve as  
respostas em função das variáveis analisadas. A partir da validação dos parâmetros de estudo,  
foi obtido o modelo polinomial quadrático que representa o comportamento da atividade  
15 enzimática (2):

$$\text{Tanase (U/mL)} = 1332,67 - 211,28 * (\text{volume SS}) - 332,52 * (\text{volume SS})^2 - 151,52 * (\text{AT}) \quad (2)$$

O modelo polinomial quadrático foi utilizado para construir as superfícies de resposta  
e curvas de contorno. O Anexo 2 mostra os efeitos dos componentes concentração de ácido  
tânico e porcentagem do volume da solução salina em relação ao peso total do meio, na  
20 produção de tanase pelo *Paecilomyces variotii*.

O Anexo 2 indica que para variável AT (%) a faixa em que se obteria a maior atividade enzimática seria entre 1,8 a 4,5% do peso total do meio, com concentração ótima de 3%. Valores acima de 4,5% desta concentração provocariam queda na atividade da tanase devido provavelmente a inibição do ácido tânico para com a enzima. Este resultado apresentou grande interesse já que houve redução na utilização do ácido tânico, um indutor, para produção de tanase em relação ao trabalho apresentado por Battestin e colaboradores (2007b), em que se obteve uma concentração ótima de 10% (p/p) em relação ao peso total do meio, onde foi utilizado farelo de trigo e resíduo de café como substrato, utilizando o mesmo microrganismo após 120 horas a 30°C de incubação.

- 10 Para a concentração do volume da solução salina em relação ao peso total do meio, a faixa de 59 a 63% estimularia a produção da enzima, com concentração ótima de 61%. Concentrações menores ou maiores do volume da solução salina diminuiriam a atividade tanásica. Para produção de tanase, a melhor faixa do volume da solução salina adicionada no meio foi de 61%. Foi realizada uma quantificação da umidade relativa do meio antes e após 96
- 15 horas de incubação na câmara climática a 90% sem a inoculação do microrganismo. O objetivo foi relacionar o volume da solução salina adicionada com a umidade presente no meio de cultivo e também para avaliar o desempenho da umidade durante a incubação na câmara climática. Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

20 **Tabela 9** - Análise de Variância no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (volume SS (%) e AT (%)) na atividade de fitase.

| Fonte de Variação | Soma Quadrática | Graus de Liberdade | Média Quadrática | F <sub>enl</sub> | p       |
|-------------------|-----------------|--------------------|------------------|------------------|---------|
| Regressão         | 2018            | 4                  | 504,52           | 27,22            | 0,00055 |
| Resíduos          | 111             | 6                  | 18,54            |                  |         |
| Falta de Ajuste   | 110,796         | 4                  | 27,70            | 131,09           |         |
| Erro Puro         | 0,423           | 2                  | 0,21             |                  |         |
| Total             | 2129,276        | 10                 |                  |                  |         |

$$R^2=0,95 \quad F_{tab}(0,1;4;6)=3,18 \quad F_{tab}(0,1;4;2)=9,24$$

#### **Exemplo 2: INFLUÊNCIA DA UMIDADE DO AMBIENTE PARA PRODUÇÃO DE TANASE**

O volume de água foi determinado de acordo com a capacidade máxima de absorção do substrato, sem apresentar água livre no meio. Determinou-se também a influência da umidade relativa do ar da Câmara Climática no meio de produção enzimático otimizado.

Foram realizados ensaios para avaliar a influência da umidade relativa do ar, em que o meio de produção foi incubado para produção da enzima tanase. O teste foi realizado com o meio de produção otimizado para produção de tanase com as seguintes concentrações de umidade: 90, 80 e 70%.

A Tabela 10 demonstra os valores obtidos na média da atividade enzimática tanásica em suas respectivas taxas de umidade e desvio padrão a 90% de significância. De acordo com os resultados, a incubação a 90% de umidade relativa do ar apresentou atividade enzimática maior, comparada a 80 e 70%. A atividade tanásica apresentou pequena diferença entre 90 e 80% de umidade, e não houve diferença estatística entre 80 e 70%, isso se deve supostamente pela pequena diferença de umidade incubada do meio entre as faixas estudadas, mas que podem ser significativas com faixas mais amplas de estudo do local de incubação.

**Tabela 10** - Umidade relativa do meio de cultivo antes e após incubação na câmara climática para produção de fitase em bagaço de laranja, considerando-se a porcentagem (%) de umidade relativa no meio de cultivo.

| Amostra* | Tempo de Incubação** | Umidade Inicial | Umidade Final |
|----------|----------------------|-----------------|---------------|
| BL 72h   | 72 horas             | 73%             | 71%           |

\* BL 72h = meio de cultivo de bagaço de laranja com 5,8% do peso do ácido tânico em relação ao peso total do meio (p/p) e 66% do volume da solução salina em relação ao peso total do meio (v/p).

\*\* Incubação em Câmara Climática a 90% de Umidade Relativa do Ar a temperatura de 30°C.

O meio de cultura otimizado no planejamento para produção da enzima tanase em bagaço de laranja apresentam maior atividade enzimática em condições de 90% de umidade relativa do ar.

**Exemplo 3: DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS, TANINOS HIDROLISÁVEIS E CONDENSADOS NO BAGAÇO DE LARANJA**

**A) Extração de Fenóis Totais**

Foram utilizados os solventes Acetato de Etila, Acetona e Metanol, para o processo de extração de fenóis, na proporção de 50% do solvente e 50% de água. Também foi testado o solvente Hexano em sua forma anidra (100%).

Pesaram-se 200 mg da amostra em 10 mL do solvente, em seguida incubou-se a mistura em temperatura ambiente com agitação de 150 rpm durante 120 minutos. Após sua homogeneização, a mistura foi centrifugada a 1320 x g a 5°C durante 15 minutos e, em seguida, foi realizada a determinação de Fenóis Totais, segundo metodologia de Naczek e Shahidi (Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* 1054, p. 95-111, 2004) e Schons (Detanificação e desfitinização de grãos de sorgo (*Sorghum bicolor*) por tanase e fitase e estudo biológico. *Dissertação de Mestrado* – UNICAMP-FEA, 2009).

A concentração de fenóis totais pode ser observada na Tabela 11.

**Tabela 11** - Matriz DCCR 22 e a resposta da atividade enzimática da tanase em 96 horas de incubação.

| Ensaio | Valores Codificados |                | Valores Reais |        | Resposta    |
|--------|---------------------|----------------|---------------|--------|-------------|
|        | x <sub>1</sub>      | x <sub>2</sub> | volume SS (%) | AT (%) | Tanase U/mL |
| 1      | -1                  | -1             | 54            | 1      | 410         |
| 2      | +1                  | -1             | 64            | 1      | 913         |
| 3      | -1                  | +1             | 54            | 5      | 848         |
| 4      | +1                  | +1             | 64            | 5      | 918         |
| 5      | -1,41               | 0              | 52            | 3      | 349         |
| 6      | +1,41               | 0              | 66            | 3      | 1139        |
| 7      | 0                   | -1,41          | 59            | 0,18   | 1131        |
| 8      | 0                   | +1,41          | 59            | 5,8    | 1081        |
| 9 (C)  | 0                   | 0              | 59            | 3      | 1233        |
| 10 (C) | 0                   | 0              | 59            | 3      | 1335        |
| 11 (C) | 0                   | 0              | 59            | 3      | 1430        |

x<sub>1</sub> = volume SS (%) = % do volume da Solução Salina em relação ao peso total (v/p) ; x<sub>2</sub> = AT (%) = % do peso do ácido tânico em relação ao peso total (p/p).

#### B) Determinação de Fenóis Totais

- 5 Foi utilizada a técnica de Follin-Ciocalteu (Singleton, V. L. Rossi, J. A. J. *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture* 20, p. 144-158, 1965) para determinação de fenóis presentes na amostra. Este método baseia-se na redução do ácido fosfomolibdico e fosfotungstico pelas hidroxilas dos fenóis produzindo uma coloração azul, quantificada por espectrofotometria a
- 10 760 nm.

Em um recipiente foram adicionados 1 mL do reagente Follin-Ciocalteu, 10 mL de água destilada, 1 mL da amostra e deixou-se a mistura em repouso durante 3 minutos. Após esse período, adicionaram-se 8 mL de carbonato de sódio (7,5%) e a reação ocorreu por 2 horas em local escuro.

- 15 Após 2 horas, foi realizada a leitura da amostra em espectrofotômetro à absorvância de 760 nm. O branco foi composto por todos os constituintes da reação, substituindo a

amostra por água destilada. O curso da reação foi acompanhado por uma curva de calibração com ácido gálico, conforme metodologia descrita.

Na Tabela 12 estão representadas as concentrações de Fenóis Totais em cada amostra extraída por quatro diferentes solventes: Acetato de Etila (1:1 com água destilada), Acetona (1:1 com água destilada), Metanol (1:1 com água destilada) e Hexano (anidro), em bagaço de laranja não fermentado.

**Tabela 12** - Resultados do Coeficiente de Regressão, Erro Padrão, t, p e Limite de Confiança na otimização dos componentes do meio de cultivo (volume da Solução Salina e ácido tânico) na atividade de tanase.

|                        | Coeficiente<br>de<br>Regressão | Erro<br>Padrão | t(5) | p-valor | Limite de<br>Confiança<br>-90, % | Limite de<br>Confiança<br>+90, % |
|------------------------|--------------------------------|----------------|------|---------|----------------------------------|----------------------------------|
| Média*                 | 1333                           | 95             | 14   | 0.00003 | 1141                             | 1525                             |
| (1) volume SS (%) (L)* | 211                            | 58             | 3,6  | 0,01518 | 94                               | 329                              |
| volume SS (%) (Q)*     | -333                           | 69             | -4,8 | 0,00492 | -472                             | -193                             |
| (2) AT (%) (L)         | 47                             | 58             | 0,8  | 0,46116 | -71                              | 164                              |
| AT (%) (Q)*            | -152                           | 69             | -2,2 | 0,08085 | -291                             | -12                              |
| 1L x 2L                | -108                           | 83             | -1,3 | 0,24643 | -275                             | 58                               |

\* parâmetros estatisticamente significativos a 90% de nível de confiança. L = parâmetro linear; Q = parâmetro quadrático.

Os resultados mostraram que o solvente Acetona diluído a 1:1 com água destilada apresentou maior concentração de fenóis, com uma média de 46 mg/g de amostra, o que nos permite confirmar que solventes apolares não apresentam melhores efeitos para extração dos mesmos, indicando que os compostos presentes nas amostras apresentam características polares.

### C) Determinação de Taninos Hidrolisáveis

Para a determinação de Taninos Hidrolisáveis, foi empregada a metodologia de Brune e colaboradores (Brune, M. Hallberg, L. Skånberg, A. Determination of iron-binding phenolic groups in foods. *Journal of Food Science* 56, p. 128-131, 1991) sendo que a extração das

amostras foi realizada como indicado para os fenóis totais. Porém, utilizou-se uma solução denominada FAS, constituída por: 89% de solução tampão acetato 0,1 M – pH 4,4; 10% de solução de goma arábica à 1%; 1% de solução de sulfato de ferro (III) e amônio à 5%.

5 Em um tubo de ensaio adicionou-se 2 mL da amostra e 8 mL da solução FAZ e, após 15 minutos de reação, foi lida a absorbância em 578 nm. O branco foi realizado substituindo a amostra por água destilada. O curso da reação foi acompanhado por uma curva de calibração com ácido tânico, conforme metodologia descrita.

#### D) Determinação de Taninos Condensados

10 Para a determinação de taninos condensados foi empregada a metodologia de Price e colaboradores (Price, M. L. Van Scoyoc, S. Butler, L. G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26, p. 1214-1218, 1978), sendo específica para flavonóides e dihidroxichalconas que possuem ligação simples na posição 2 e 3 e uma hidroxila livre no anel beta. A vanilina é protonada em uma solução ácida, resultando em um carbocátion eletrofílico fraco, o qual reage com o anel

15 aromático nas posições 6 ou 8, este composto é imediatamente desidratado formando um composto vermelho. A extração da amostra foi realizada como nos fenóis e taninos hidrolisáveis.

Utilizou uma solução de vanilina contendo: 1 parte para a solução de vanilina (1% de vanilina dissolvido em metanol) e 1 parte para solução de HCl (8% de HCl em etanol). O

20 método foi realizado com a adição de 1 mL da amostra em estudo e 5 mL da solução de vanilina durante 5 minutos, sendo que a cada 1 minuto foi colocado 1 mL da solução de vanilina. O branco foi constituído por 1 mL de água destilada e 5 mL da solução de vanilina, em seguida a reação foi conduzida durante 20 minutos e por fim foi feita a leitura em espectrofotômetro a 500 nm. O curso da reação foi acompanhado por uma curva de calibração

25 com catequina, conforme metodologia descrita.

Para melhor extração de Fenóis Totais e também para Taninos Hidrolisáveis, Condensados e Antioxidantes, foi utilizado o extrato com solução de Acetona para analisar os seus teores antes e após a fermentação do bagaço de laranja.

Os teores de Fenóis Totais e Taninos Hidrolisáveis no extrato com solução de Acetona das amostras, bagaço de laranja desidratado, meio de cultivo não fermentado para produção de tanase (3% de ácido tânico) e meio de cultivo otimizado e fermentado para produção de tanase (após 96 horas de fermentação) estão apresentados na Tabela 12.

- 5 De acordo com os resultados, a concentração fenólica não foi alterada com a suplementação de ácido tânico, de acordo com a amostra BL 3%, em relação ao bagaço de laranja desidratado. Para a amostra fermentada após 96 horas de incubação para produção de tanase também não houve alteração na concentração de fenóis totais. Com estes resultados podemos supor que o fungo *P. variotii* em bagaço de laranja não hidrolisou ou mesmo  
10 sintetizou novos compostos fenólicos, mantendo a sua concentração após o processo fermentativo.

- Os resultados obtidos para os taninos hidrolisáveis apresentaram aumento na sua concentração em bagaço de laranja desidratado (BL) para o meio de cultivo não fermentado (BL 3%), isso porque o meio não fermentado foi suplementado com 3% de ácido tânico, que se  
15 caracteriza como tanino hidrolisável.

- Após a fermentação por *P. variotii* em 96 horas, a amostra manteve a sua concentração de taninos, não apresentando diferenças estatisticamente significativas. Provavelmente o microrganismo não hidrolisou estes taninos durante o processo fermentativo. Possivelmente foram utilizados outros compostos para o crescimento do fungo,  
20 como as fibras que constituem grande parte do bagaço de laranja.

Em relação à determinação de taninos condensados, sua presença não foi detectada em nenhuma amostra.

#### **Exemplo 4: CAPACIDADE ANTIOXIDANTE**

- Metodologia utilizada foi a de Re e colaboradores (Re, R. Pellegrini, N. Proteggente, A.  
25 Pannala, A. Yang, M. Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology* 26, p. 1231-1237, 1999) que mensurou a habilidade de um composto sequestrar o cátion ABTS+ {2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonato) [Sigma-A1888-2G]} em comparação ao composto Trolox. Originalmente a técnica foi baseada na ativação da metamioglobina com peróxido de hidrogênio, na presença ou ausência

de antioxidantes, para produzir um radical cátion. O método pode ser feito em aparelhos relativamente mais simples como espectrofotômetro, que difere do ORAC em que se utiliza fluorímetro, sendo um aparelho mais específico e de difícil acesso (Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L.; Byrne, D. H. **Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts.** *Journal of Food Composition and Analysis* 19, p. 669-675, 2006). A metodologia envolve a produção direta do cromóforo ABTS<sup>+</sup>, com tonalidade azul esverdeada através da reação entre ABTS e persulfato de potássio. O Trolox é um análogo da vitamina E, solúvel em água, e o cátion ABTS<sup>+</sup> é um cromóforo azul esverdeado com características de absorção a 734 nm, que quando é reduzido a ABTS, perde sua coloração. Os resultados foram expressos em mmol equivalentes de Trolox por grama de amostra.

O radical ABTS<sup>+</sup> foi formado a partir da reação do ABTS (7 mM) com persulfato de potássio (2,45 mM) ambos em água. As duas soluções foram misturadas e deixadas em repouso no escuro à temperatura ambiente por 12 a 16 h. Esta solução foi diluída com etanol até absorvância de 0,7, medida a 734 nm. As amostras foram diluídas em metanol até absorvância entre 0,7 e 0,5 de leitura a 734 nm, em seguida a reação foi conduzida no espectrofotômetro durante 60 minutos. A curva padrão foi feita com 1 mL do ABTS<sup>+</sup> diluído em 10 µL de Trolox até concentração de 15 µM. Os resultados foram expressos em capacidade antioxidante equivalente a Trolox.

Para este teste utilizou as seguintes amostras: meio de cultivo não fermentado para produção de tanase (3% de ácido tânico) e meio de cultivo fermentado para produção de tanase (após 96 horas de fermentação). As médias e desvio padrão da capacidade antioxidante durante 60 minutos de reação estão apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13** - Análise de Variância no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (volume SS (%) e AT (%)) na atividade de tanase.

| Fonte de Variação | Soma Quadrática | Graus de Liberdade | Média Quadrática | F <sub>cal</sub> | p     |
|-------------------|-----------------|--------------------|------------------|------------------|-------|
| Regressão         | 999345          | 3                  | 333115           | 11,64            | 0,004 |
| Resíduos          | 200285          | 7                  | 28612            |                  |       |
| Falta de Ajuste   | 180873          | 5                  | 36174,55         | 3,73             |       |
| Erro Puro         | 19413           | 2                  | 9706,33          |                  |       |
| Total             | 1199631         | 10                 |                  |                  |       |

$R^2=0,83$   $F_{tab}(0,1;3;7)=3,07$   $F_{tab}(0,1;5;2)=9,29$ .

A capacidade redutora do radical ABTS+ nas amostras demonstrou que durante os 60 minutos de reação não houve diferenças estatística em sua capacidade antioxidante. A amostra BL 3% apresentou valor da concentração equivalente de Trolox de 20 mmol/g de amostra.

A BL 3% F96h apresentou uma capacidade antioxidante de 191 mmol/g de amostra na reação. Esta amostra foi tratada pelo processo fermentativo por *Paecilomyces variotii*, mostrando que o microrganismo aumentou a concentração de compostos com capacidade de proteção à oxidação, impedindo a presença de radicais livres no meio.

Em geral a presença de compostos fenólicos é que determina a capacidade antioxidante, existindo uma relação direta entre eles. Conforme estudado por Battestin e colaboradores (2008) a ação da tanase, proveniente do *P. variotii*, em extrato de chá verde formou produtos como ácido gálico e epigallocatequina, provenientes da hidrólise epigallocatequina galato e, consequentemente, aumentaram a capacidade antioxidativa.

Entretanto, como já dito anteriormente as amostras pré e pós-fermentadas não apresentaram diferenças significativas na concentração de taninos hidrolisáveis e compostos fenólicos.

A Tabela 14 apresenta a capacidade antioxidante das amostras em estudo durante 60 minutos de reação.

**Tabela 14** - Umidade relativa do meio de cultivo antes e após incubação na câmara climática para o meio ótimo para produção de tanase em bagaço de laranja.

| Umidade Relativa do Meio de Cultivo (%) |                      |                 |               |
|-----------------------------------------|----------------------|-----------------|---------------|
| Amostra*                                | Tempo de Incubação** | Umidade Inicial | Umidade Final |
| BL 96h                                  | 96 horas             | 60%             | 70%           |

\* BL 96h = meio de cultivo de bagaço de laranja com 3% do peso do ácido tânico em relação ao peso total do meio (p/p) e 61% do volume da solução salina em relação ao peso total do meio (v/p).

5 \*\* Incubação em Câmara Climática a 90% de Umidade Relativa do Ar a temperatura de 30°C.

#### **Exemplo 5: FIBRAS ALIMENTARES DIETÉTICAS TOTAIS, SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS**

A metodologia usada para determinação das fibras alimentares dietéticas totais, solúveis e insolúveis foi da AOAC (*AOAC. Official methods of analysis (method 985.29 – Total Dietary Fiber in Foods) (16th ed). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists,*  
10 **1995**), que conseguiu mensurar essas fibras no bagaço da laranja.

Segundo esse método, as amostras (em duplicata) foram tratadas com alfa-amilase termorresistente (50 µg/mL – 120 UA/g – Sigma A-3306), submetidas à hidrólise com protease (50 mg/mL – 0,6 UA/g – Sigma P-3910) e amiloglicosidase (200 UA/mL – Sigma A-9913), com finalidade de remover proteína e amido. Seguida da hidrólise enzimática, a fibra alimentar  
15 insolúvel foi separada por filtração e a fibra solúvel foi precipitada adicionando-se etanol a 98%, numa proporção de 1:4 em volume. A solução alcoólica foi então filtrada em lã de vidro. Os resíduos precipitados foram lavados com etanol a 78%, em seguida com etanol 95% e ao final com acetona. Estes resíduos foram secos e pesados. As fibras solúveis e insolúveis foram corrigidas, devido à presença de proteína e cinzas.

20 O cálculo da quantidade de fibra alimentar total e insolúvel foi pela diferença da quantidade de resíduo da digestão enzimática e das cinzas. Para fibra alimentar solúvel foi a diferença entre fibra total e insolúvel.

A Tabela 15 apresenta as médias e seus desvios padrões da porcentagem de fibras alimentares dietéticas totais, insolúvel e solúvel, respectivamente.

25 **Tabela 15 - Atividade Enzimática da Tanase em diferentes valores de Umidade Relativa do Ar.**

| Tanase (U/mL)              |             |
|----------------------------|-------------|
| Umidade Relativa do Ar (%) | Média *     |
| 90                         | 1104 ± 33 a |
| 80                         | 911 ± 100 b |
| 70                         | 805 ± 68 b  |

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p>0,1$ ) ao nível de 10% de probabilidade.

De acordo com os resultados, o bagaço de laranja desidratado apresentou maior  
 5 concentração de fibras totais, solúveis e insolúveis. Nas amostras fermentadas por *Paecilomyces variotii*, tanto para produção de fitase (BL 5,8% F72h) quanto para tanase (BL 3% F96h), sofreram redução na concentração de fibras. Provavelmente o microrganismo utilizou essas fibras como substrato para sua nutrição e desenvolvimento no meio. O meio fermentado para produzir fitase apresentou maior decréscimo de fibras, havendo uma perda de 84% das  
 10 fibras totais, em comparação ao meio fermentado para produzir tanase que perdeu 60% das fibras totais.

Em relação às fibras insolúveis, o meio fermentado para produção de tanase obteve uma perda de 60% de fibras, mas a amostra fermentada para produção de fitase perdeu aproximadamente 72% das fibras insolúveis presentes na amostra.

15 O meio de bagaço de laranja fermentado para produção de fitase apresentou uma redução de 78% das fibras solúveis presentes em comparação ao bagaço desidratado. O meio para produção de tanase reduziu em 61% a concentração de fibras do tipo solúvel. Confirmando assim que o fungo *P. variotii* utilizou mais as fibras no meio otimizado para produção de fitase.

20 O Anexo 3 ilustra a concentração de fibras presentes em cada amostra: (a) BL 5,8% F72h; (b) BL 3% F96h.

O processo de fermentação diminuiu a concentração de fibras dietéticas na amostra, passando de 68% do peso inicial total da amostra para menos de 30%. A fibra dietética mais utilizada pelo microrganismo foi a do tipo solúvel, já que no final do processo fermentativo ele

apresentava com apenas 22% em relação a suas quantidades iniciais, mostrando que o microrganismo foi capaz de hidrolisar estes compostos e utilizá-los para seu crescimento e produção das enzimas de interesse no estudo.

- 5 Em relação à presença de fibras, que são importantes para ração animal, o processo fermentativo não trouxe benefícios, já que diminuiu a concentração dessas substâncias, que são importantes para a digestibilidade do alimento no trato gastrointestinal do animal. No entanto, a fermentação deste resíduo foi interessante para produção de enzimas, no caso a fitase e tanase, resultando em um processo com maior viabilidade financeira.

#### **Exemplo 6: DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO**

- 10 Para determinação de cálcio, seguiu-se a metodologia de Jalbani e colaboradores (Jalbani, N.; Kazi, T. G.; Jamali, M. K.; Arain, B. M.; Afridi, H. I.; Baloch, A. *Evaluation of aluminum contents in different bakery foods by electrothermal atomic absorption spectrometer. Journal of Food Composition and Analysis* 20, p. 226-231, 2007), com modificações.

- 15 Foram pesados 0,6 gramas de amostra em um tubo de digestão e 4 mL de ácido nítrico concentrado, um outro tubo foi usado sem amostra para o branco, os tubos foram levados ao bloco digestor onde foram aquecidos a 100°C durante 2 horas. Em seguida os tubos foram retirados para resfriamento em temperatura ambiente. Cuidadosamente adicionou-se 2 mL de peróxido de hidrogênio em cada tubo e colocou de volta ao bloco digestor a temperatura de  
20 110°C durante 30 minutos e em seguida à 130°C durante 1 hora.

- Durante o processo de mineralização os tubos foram periodicamente visualizados para evitar que os reagentes secassem. Os tubos foram retirados e resfriados a temperatura ambiente. Com o auxílio de uma piseta, adicionou-se aproximadamente 5 mL de água deionizada aos tubos de digestão e em seguida agitados. Transferiu-se, cuidadosamente, o  
25 conteúdo dos tubos para balões volumétricos de 25 mL e completou com água deionizada. Posteriormente, as amostras foram transferidas para frascos plásticos e efetuaram-se as determinações de cálcio em espectrofotômetro de absorção atômica, equipado com lâmpada de deutério como corretor de fundo e o gás utilizado foi uma mistura de ar e acetileno na razão de 2,7/10 (ar/acetileno) litros a cada minuto de vazão. O comprimento de onda

selecionado para determinação de cálcio foi 422,67 nm e a corrente máxima para operação da lâmpada foi 10 mA. A curva de calibração foi realizada, com cálcio livre na faixa entre 5 a 0,5 mg de cálcio por mL.

Os resultados para bagaço de laranja desidratado, meio de cultivo com bagaço de laranja para produção de fitase e fermentado após 72 horas e o meio de cultivo com bagaço de laranja otimizado para produção de tanase e fermentado após 96 horas estão apresentados na Tabela 16.

**Tabela 16** - Concentração de Fenóis Totais em bagaço de laranja não fermentado em diferentes tipos de solventes.

| <b>Fenóis Totais (mg/g de amostra)</b> |                  |
|----------------------------------------|------------------|
| <b>Solvente*</b>                       | <b>Média</b>     |
| <b>Acetato de Etila</b>                | $35,59 \pm 2,57$ |
| <b>Acetona</b>                         | $46,27 \pm 1,91$ |
| <b>Metanol</b>                         | $30,77 \pm 1,65$ |
| <b>Hexano</b>                          | $2,01 \pm 0,15$  |

\*Acetato = 1:1 de Acetato de Etila e Água destilada; Acetona = 1:1 de Acetona e Água destilada; Metanol = 1:1 de Metanol e Água destilada; Hexano = somente Hexano.

De acordo com os resultados, o bagaço de laranja desidratado foi a amostra que apresentou maior concentração de cálcio, com 143,5 mg/kg. A amostra fermentada após 72 horas (BL 5,8% F72h) apresentou 32 mg/kg e a amostra BL 3% F96h com 65,8 mg/kg de amostra.

Após a fermentação do bagaço de laranja, houve um decréscimo na concentração de cálcio presente na amostra analisada. Ocorrendo uma possível liberação do cálcio que estava ligado aos compostos presentes no bagaço, como as fibras, resultando na menor concentração de cálcio nas amostras fermentadas. As amostras fermentadas foram submetidas ao processo de extração enzimática, em que a fração líquida (sobrenadante) foi utilizada para

determinação enzimática e a fração sólida (material retido na filtração) para determinação de compostos fenólicos, taninos, antioxidante, fibras e cálcio. O mineral que foi liberado provavelmente passou para fase líquida na etapa de extração, diminuindo assim sua concentração no extrato sólido.

- 5 **Tabela 17** - Concentração de Fenóis Totais e Taninos Hidrolisáveis em cada amostra antes e após fermentação.

| Fenóis Totais e Taninos Hidrolisáveis (mg/g de amostra) |                |                |
|---------------------------------------------------------|----------------|----------------|
| Amostras*                                               | FT **          | TH **          |
| BL                                                      | 42,28 ± 9,48 a | 0,254 ± 0,06 b |
| BL 3%                                                   | 42,89 ± 2,12 a | 5,755 ± 1,03 c |
| BL 3% F96h                                              | 52,66 ± 7,54 a | 3,345 ± 0,84 c |

- 10 \*BL = Bagaço de Laranja desidratado; BL 3% = meio de cultivo não fermentado para produção de tanase (3% de ácido tânico); BL 3% F96h = meio de cultivo otimizado e fermentado para produção de tanase (após 96 horas de fermentação).

\*\*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ) ao nível de 5% de probabilidade.

**Tabela 18** - Capacidade antioxidante do meio otimizado não fermentado e após fermentação para produção de tanase. Capacidade Antioxidante (mmolequivalenteTrolox/g amostra).

|       | BL 3%*     | BL 3% F96h* |
|-------|------------|-------------|
| Tempo | Média**    | Média**     |
| 0     | 17 ± 1,3 a | 191 ± 16 b  |
| 5     | 18 ± 1,7 a | 193 ± 16 b  |
| 10    | 18 ± 1,8 a | 196 ± 16 b  |
| 15    | 19 ± 1,8 a | 197 ± 17 b  |
| 20    | 19 ± 1,9 a | 197 ± 17 b  |
| 25    | 19 ± 2,0 a | 199 ± 17 b  |
| 30    | 19 ± 2,0 a | 200 ± 17 b  |
| 40    | 19 ± 2,0 a | 202 ± 17 b  |
| 50    | 20 ± 2,0 a | 204 ± 17 b  |
| 60    | 20 ± 2,0 a | 203 ± 17 b  |

\* BL 3% = meio de cultivo não fermentado para produção de tanase (3% de ácido tânico); BL 3% F96h = meio de cultivo otimizado e fermentado para produção de tanase (após 96 horas de fermentação).

- 5 \*\*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ) ao nível de 5% de probabilidade.

**Tabela 19** - Porcentagem de Fibras Alimentares Dietéticas.

|              | Fibras Alimentares Dietéticas |               |              |
|--------------|-------------------------------|---------------|--------------|
| Amostra*     | Total (%)                     | Insolúvel (%) | Solúvel (%)  |
| BL           | 68,73 ± 0,4                   | 44 ± 0,2      | 24,73 ± 0,59 |
| BL 5,8% F72h | 17,90 ± 0,16                  | 12,33 ± 1,31  | 5,57 ± 1,47  |
| BL 3% F96h   | 27,40 ± 1,13                  | 17,66 ± 1,01  | 9,75 ± 0,15  |

- 10 \*BL = bagaço de laranja desidratado; BL 5,8% F72h = meio de cultivo otimizado e fermentado para produção de fitase (após 72 horas de fermentação); BL 3% F96h = meio de cultivo otimizado e fermentado para produção de tanase (após 96 horas de fermentação).

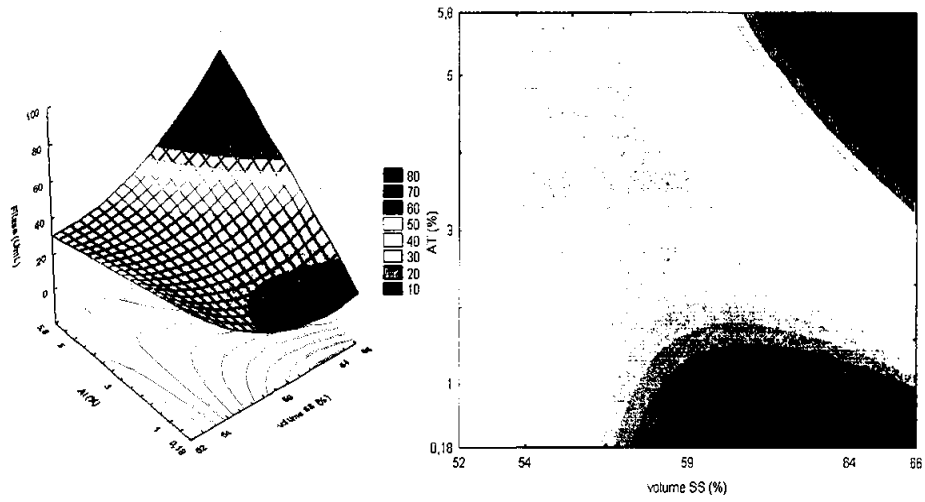
**Tabela 20** - Concentração de cálcio presente nas amostras em estudo.

| <b>Concentração de cálcio (mg/kg de amostra)</b> |              |
|--------------------------------------------------|--------------|
| <b>Amostra*</b>                                  | <b>Média</b> |
| <b>BL</b>                                        | 143,5 ± 4,8  |
| <b>BL 5,8% F72h</b>                              | 32 ± 0,8     |
| <b>BL 3% F96h</b>                                | 65,75 ± 5,6  |

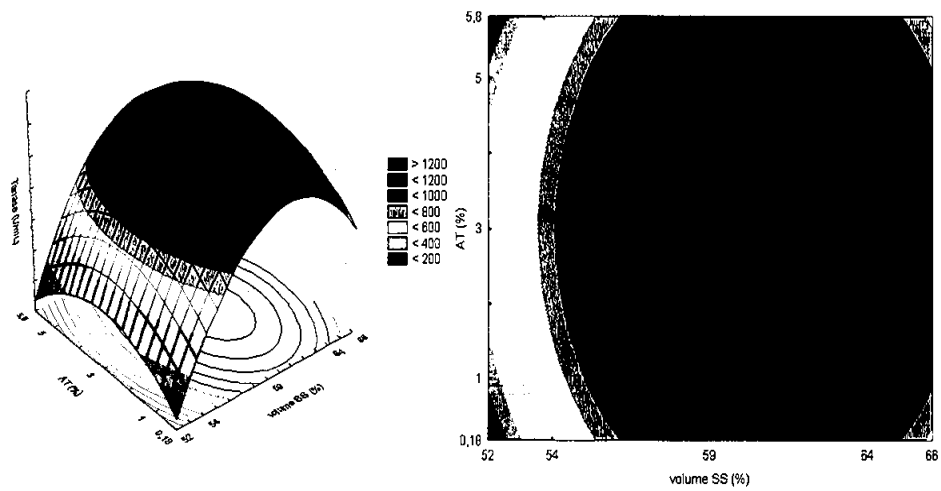
\*BL = bagaço de laranja desidratado; BL 5,8% F72h = meio de cultivo otimizado e fermentado para produção de fitase (após 72 horas de fermentação); BL 3% F96h = meio de cultivo otimizado e fermentado para produção de tanase (após 96 horas de fermentação).

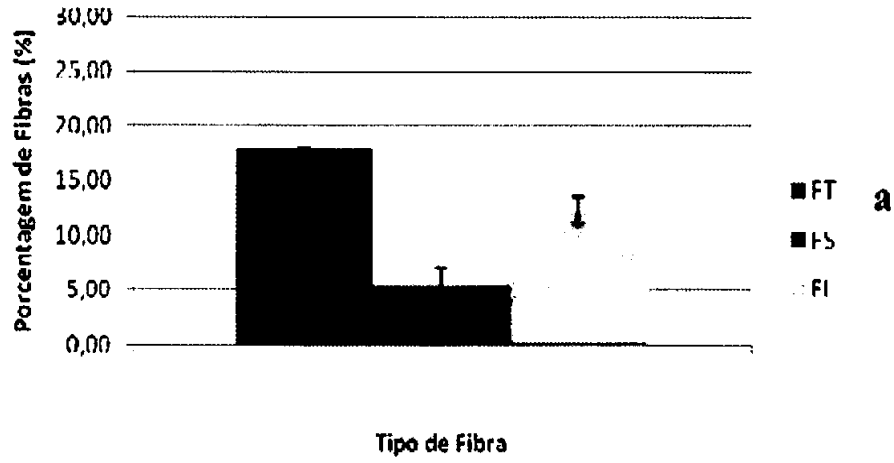
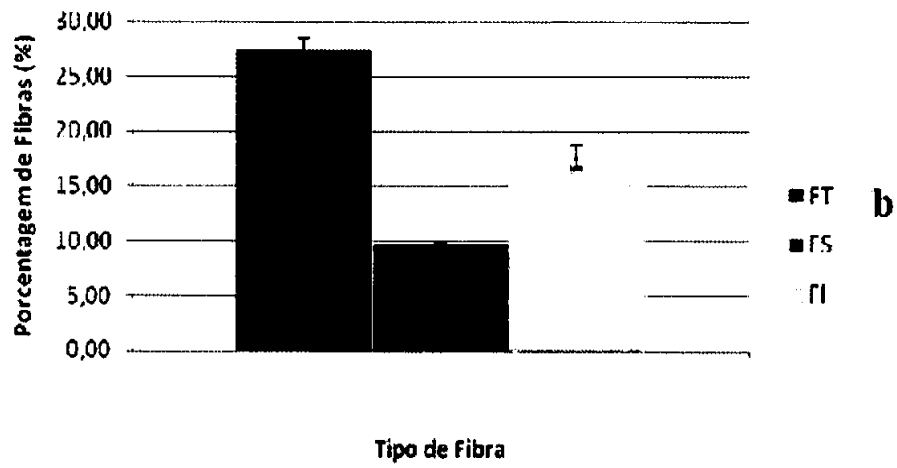
1/2

## ANEXO 1



## ANEXO 2



ANEXO 3**BL 5,8% F72h****BL 3% F96h**

**REIVINDICAÇÕES**

1. Meio de cultura para produção de enzima fitase pelo microorganismo *Paecilomyces variotii*, **caracterizado por** ser de resíduo de bagaço de laranja.
2. Meio de cultura para produção de enzima fitase pelo microorganismo  
5 *Paecilomyces variotii* **caracterizado por** ser constituído de resíduo de bagaço de laranja, solução salina e de ácido tânico;
3. Meio de cultura para produção de enzima fitase pelo microorganismo *Paecilomyces variotii*, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pela** solução salina ser composta em grama por litro de 1 parte de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2 partes de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 0,2  
10 partes de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,02 partes de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,004 partes de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0,002 partes de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e 0,0025 partes de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .
4. Meio de cultura para produção de enzima fitase pelo microorganismo *Paecilomyces variotii*, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado por** conter de 5,0 a 5,8% de ácido tânico, em relação ao peso total do meio.
- 15 5. Meio de cultura para produção de enzima fitase pelo microorganismo *Paecilomyces variotii*, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado por** conter preferencialmente 5,8% de ácido tânico.
6. Meio de cultura para produção de enzima fitase pelo microorganismo *Paecilomyces variotii*, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado por** não conter  
20 ácido fítico.
7. Meio de cultura para produção de enzima fitase pelo microorganismo *Paecilomyces variotii*, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado por** conter de 64 a 66% de solução salina, em relação ao peso total do meio.
8. Meio de cultura para produção de enzima fitase pelo microorganismo  
25 *Paecilomyces variotii*, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado por** conter preferencialmente 66% de solução salina, em relação ao peso total do meio.

9. Meio de cultura para produção de enzima fitase pelo microorganismo *Paecilomyces variotii*, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado por** conter preferencialmente 28,2% de bagaço de laranja.
10. Enzima fitase **caracterizada por** ser produzida pelo microorganismo *Paecilomyces variotii* através de fermentação sólida.
11. Enzima fitase **caracterizada por** ser produzida pelo microorganismo *Paecilomyces variotii* através de fermentação sólida em bagaço de laranja.
12. Enzima fitase **caracterizada por** ser produzida pelo microorganismo *Paecilomyces variotii* através de fermentação sólida em meio de cultura como descrito nas reivindicações de 1 a 9.
13. Enzima fitase produzida pelo microorganismo *Paecilomyces variotii* através de fermentação sólida em bagaço de laranja **caracterizada por** ser obtida preferencialmente após 72 horas de incubação.
14. Enzima fitase produzida pelo microorganismo *Paecilomyces variotii* através de fermentação sólida em bagaço de laranja **caracterizada por** ser obtida preferencialmente em ambiente com 90% de umidade.
15. Enzima fitase produzida pelo microorganismo *Paecilomyces variotii* através de fermentação sólida em meio de cultura como descrito nas reivindicações de 1 a 9 **caracterizada por** ser obtida preferencialmente após 72 horas de incubação.
16. Meio de cultura para produção de tanase pelo microorganismo *Paecilomyces variotii*, **caracterizado por** ser de resíduo de bagaço de laranja.
17. Meio de cultura para produção de enzima tanase pelo microorganismo *Paecilomyces variotii* **caracterizado por** ser constituído de resíduo de bagaço de laranja, solução salina e de ácido tânico;
18. Meio de cultura para produção de enzima tanase pelo microorganismo *Paecilomyces variotii*, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado pela** solução salina ser composta em grama por litro de 1 parte de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2 partes de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 0,2

partes de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,02 partes de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,004 partes de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0,002 partes de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e 0,0025 partes de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

19. Meio de cultura para produção de enzima tanase pelo microorganismo *Paecilomyces variotii*, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado por** conter de 1,8 a 4,5% de ácido tânico, em relação ao peso total do meio.
20. Meio de cultura para produção de enzima tanase pelo microorganismo *Paecilomyces variotii*, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizado por** conter preferencialmente 3% de ácido tânico.
21. Meio de cultura para produção de enzima tanase pelo microorganismo *Paecilomyces variotii*, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado por** conter de 59 a 63% de solução salina, em relação ao peso total do meio.
22. Meio de cultura para produção de enzima tanase pelo microorganismo *Paecilomyces variotii*, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado por** conter preferencialmente 61% de solução salina, em relação ao peso total do meio.
23. Meio de cultura para produção de enzima tanase pelo microorganismo *Paecilomyces variotii*, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado por** conter preferencialmente 28,2% de bagaço de laranja.
24. Enzima tanase **caracterizada por** ser produzida pelo microorganismo *Paecilomyces variotii* através de fermentação sólida.
25. Enzima tanase **caracterizada por** ser produzida pelo microorganismo *Paecilomyces variotii* através de fermentação sólida em bagaço de laranja.
26. Enzima tanase **caracterizada por** ser produzida pelo microorganismo *Paecilomyces variotii* através de fermentação sólida em meio de cultura como descrito nas reivindicações de 16 a 23.
27. Enzima tanase produzida pelo microorganismo *Paecilomyces variotii* através de fermentação sólida em bagaço de laranja **caracterizada por** ser obtida preferencialmente após 96 horas de incubação.

28. Enzima tanase produzida pelo microorganismo *Paecilomyces variotii* através de fermentação sólida em meio de cultura como descrito nas reivindicações de 16 a 23 **caracterizada por** ser obtida preferencialmente após 96 horas de incubação.
29. Enzima tanase produzida pelo microorganismo *Paecilomyces variotii* através de fermentação sólida em meio de cultura como descrito nas reivindicações de 16 a 23 **caracterizada por** ser obtida preferencialmente em ambiente com 90% de umidade.
30. Meio de cultura para produção simultânea das enzimas fitase e tanase pelo microorganismo *Paecilomyces variotii* **caracterizado por** ser de resíduo de bagaço de laranja.
31. Meio de cultura para produção simultânea das enzimas fitase e tanase pelo microorganismo *Paecilomyces variotii* **caracterizado por** ser constituído de resíduo de bagaço de laranja, solução salina e de ácido tânico;
32. Meio de cultura para produção simultânea das enzimas fitase e tanase pelo microorganismo *Paecilomyces variotii*, de acordo com a reivindicação 31, **caracterizado pela** solução salina ser composta em grama por litro de 1 parte de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2 partes de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 0,2 partes de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,02 partes de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,004 partes de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0,002 partes de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e 0,0025 partes de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .
33. Meio de cultura para produção de enzima fitase pelo microorganismo *Paecilomyces variotii*, de acordo com a reivindicação 31, **caracterizado por** conter de 1,8% a 5,8% de ácido tânico, em relação ao peso total do meio.
34. Meio de cultura para produção simultânea das enzimas fitase e tanase pelo microorganismo *Paecilomyces variotii*, de acordo com a reivindicação 31, **caracterizado por** não conter ácido fítico.
35. Meio de cultura para produção de enzima fitase pelo microorganismo *Paecilomyces variotii*, de acordo com a reivindicação 31, **caracterizado por** conter de 59% a 66% de solução salina, em relação ao peso total do meio.

36. Meio de cultura para produção de enzima fitase pelo microorganismo *Paecilomyces variotii*, de acordo com a reivindicação 31, **caracterizado por** conter preferencialmente 28,2% de bagaço de laranja.
37. Enzima fitase **caracterizada por** ser produzida pelo microorganismo *Paecilomyces variotii* através de fermentação sólida em meio de cultura como descrito nas reivindicações de 30 a 36.
38. Enzima fitase produzida pelo microorganismo *Paecilomyces variotii* através de fermentação sólida em meio de cultura como descrito nas reivindicações de 30 a 36 **caracterizada por** ser obtida preferencialmente após 72 horas de incubação.
39. Enzima tanase **caracterizada por** ser produzida pelo microorganismo *Paecilomyces variotii* através de fermentação sólida em meio de cultura como descrito nas reivindicações de 30 a 36.
40. Enzima tanase produzida pelo microorganismo *Paecilomyces variotii* através de fermentação sólida em meio de cultura como descrito nas reivindicações de 30 a 36 **caracterizada por** ser obtida preferencialmente após 96 horas de incubação.
41. Enzima tanase produzida pelo microorganismo *Paecilomyces variotii* através de fermentação sólida em meio de cultura como descrito nas reivindicações de 30 a 36 **caracterizada por** ser obtida preferencialmente em ambiente com 90% de umidade.
42. Uso da enzima fitase obtida de acordo com as reivindicações de 1 a 15, **caracterizado por** ser para suplementação alimentar.
43. Uso da enzima fitase obtida de acordo com as reivindicações de 1 a 15, **caracterizado por** ser para suplementação em ração animal.
44. Uso da enzima tanase obtida de acordo com as reivindicações de 16 a 29, **caracterizado por** ser para suplementação alimentar.
45. Uso da enzima tanase obtida de acordo com as reivindicações de 16 a 29, **caracterizado por** ser para suplementação em ração animal.

46. Uso da enzima fitase obtida de acordo com as reivindicações de 30 a 36, **caracterizado por** ser para suplementação alimentar.
47. Uso da enzima fitase obtida de acordo com as reivindicações de 30 a 36, **caracterizado por** ser para suplementação em ração animal.
- 5 48. Uso da enzima tanase obtida de acordo com as reivindicações de 30 a 36, **caracterizado por** ser para suplementação alimentar.
49. Uso da enzima tanase obtida de acordo com as reivindicações de 30 a 36, **caracterizado por** ser para suplementação em ração animal.

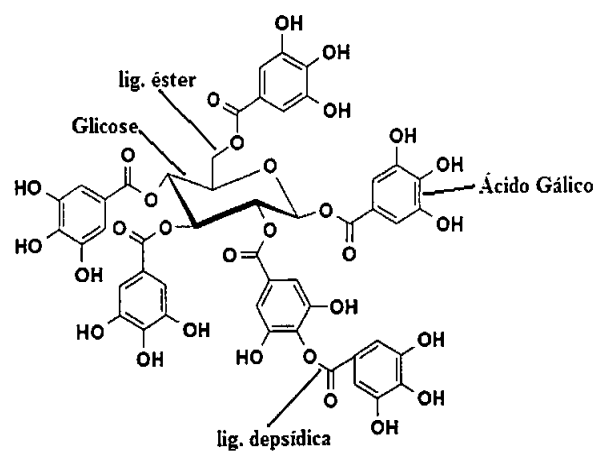


Figura 1

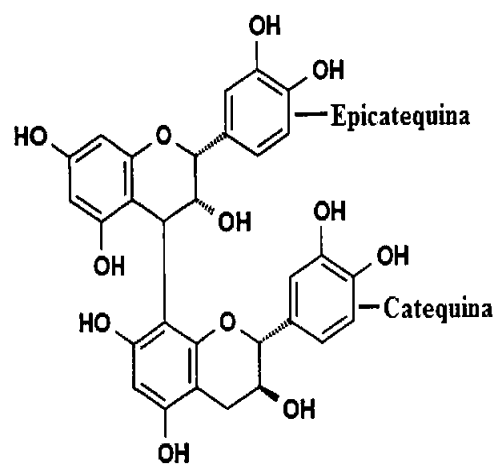


Figura 2

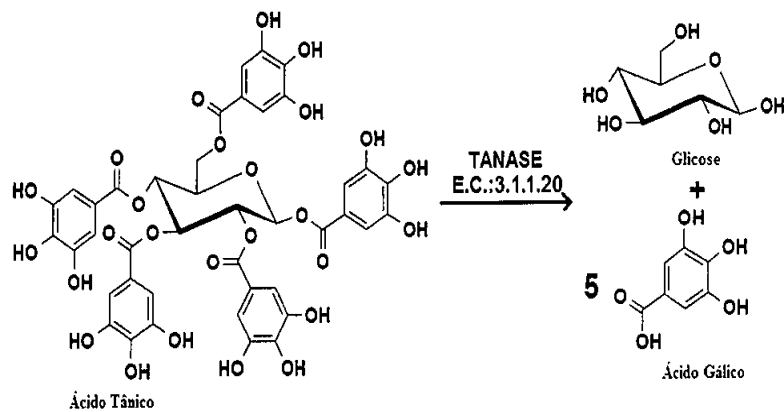


Figura 3

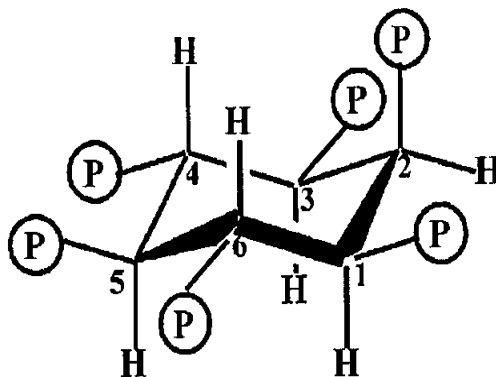


Figura 4

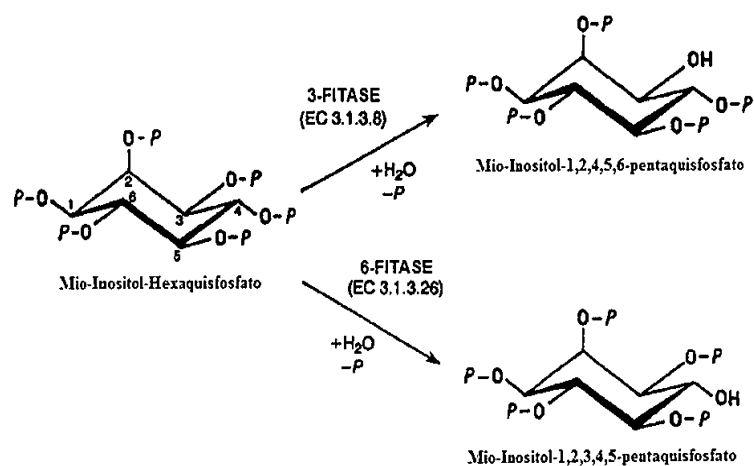


Figura 5

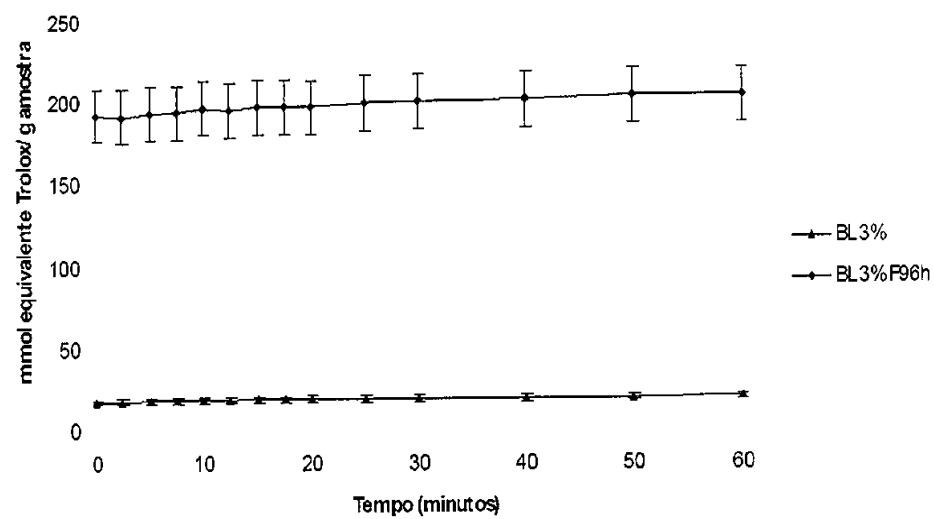


Figura 6

**RESUMO**

**“MEIOS DE CULTURA DE RESÍDUO DE BAGAÇO DE LARANJA PARA PRODUÇÃO  
SIMULTÂNEA DAS ENZIMAS FITASE E TANASE PELO MICROORGANISMO  
*PAECILOMYCES VARIOTII* ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO SÓLIDA, ENZIMAS OBTIDAS E  
SEUS USOS.”**

A presente invenção compreende a produção de meios de cultura capazes de viabilizar a produção simultânea de duas enzimas fitase e tanase através da fermentação sólida, em bagaço de laranja empregando o fungo *Paecilomyces variotii*.

O uso de enzimas na alimentação animal é conhecido e está sendo bem explorado. A maior dificuldade de expandir o uso de enzimas ainda é o custo de produção. O uso dos resíduos para alimentação animal representa uma alternativa viável para este setor, assim como para a produção de biocatalizadores através da fermentação sólida. Dessa forma, o presente invento permite que o bagaço de laranja apresente maior capacidade antioxidante em relação ao meio não fermentado, representando um ingrediente interessante para uso em ração animal.

Esta invenção determinou valores ótimos na constituição do meio de cultura que utiliza bagaço de laranja para produção das enzimas fitase e tanase através da fermentação sólida pelo microorganismo *Paecilomyces variotii* de forma a obter-se a maior quantidade de enzima produzida e suas maiores atividades.

Adicionalmente, também foi determinada a maior capacidade antioxidante do bagaço de laranja em relação ao meio não fermentado, representando um ingrediente interessante para uso em ração animal.