



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**Estudo da Produção Simultânea de Fitase e Tanase
por *Paecilomyces variotii* e Detoxificação de Resíduos
Agroindustriais para Reuso em Ração Animal**

JOSÉ VALDO MADEIRA JUNIOR
Biólogo

Profa. Dra. GABRIELA ALVES MACEDO
Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos, da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do
título de Mestre em Ciência de Alimentos

Campinas - SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M264e Madeira Junior, José Valdo
Estudo da produção simultânea de fitase e tanase por
Paecilomyces variotii e detoxificação de resíduos
agroindustriais para reuso em ração animal / José Valdo
Madeira Junior . -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientador: Gabriela Alves Macedo
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Tanase. 2. Fitase. 3. *Paecilomyces variotii*. 4.
Ração Animal. 5. Fermentação em Estado Sólido. I.
Macedo, Gabriela Alves . II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.
Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Study of simultaneous production of phytase and tannase by *Paecilomyces variotii* and detoxification of agro-industrial residues for reuse in animal feed

Palavras-chave em inglês (Keywords): Tannase, Phytase, *Paecilomyces variotii*,
Animal feed, Solid-state fermentation

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Gabriela Alves Macedo

Vânia Battestin Wiendl

Alexandre Nunes Ponezi

Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Dissertação defendida em ___/___/___ por _____
aprovado pela comissão julgadora em ___/___/___.

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo
(Orientadora)

Profa. Dra. Vânia Battestin Wiendl
CEFET/RJ – Unidade Valença
(Membro Titular)

Prof. Dr. Alexandre Nunes Ponezi
CPQBA/UNICAMP
(Membro Titular)

Profa. Dra. Luciana Francisco Fleuri
IBB/UNESP
(Membro Suplente)

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
FEA/Unicamp
(Membro Suplente)

O mestre disse a um dos seus alunos: Yu, queres saber em que consiste o conhecimento? Consiste em ter consciência tanto de conhecer uma coisa quanto de não a conhecer. Este é o conhecimento.

Confúcio

AGRADECIMENTOS

À Professora Gabriela Alves Macedo pela oportunidade, amizade e dedicação. Ainda, pela alegria e motivação que demonstrou durante o meu mestrado.

Aos Professores da banca examinadora pela contribuição ao meu trabalho, em especial a Professora Vania Battestin pela ajuda durante o meu mestrado.

A Professora Doutora Olga Lima Tavares Machado pela oportunidade de realizar parte dos experimentos na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

A Professora Doutora Leila Picolli da Silva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) pelo conhecimento e ensinamento.

A Professora Doutora Hélia Sato pelo carinho e ajuda.

A todas as pessoas com quem tive o prazer de conviver no Departamento de Ciência de Alimentos, incluindo alunos, técnicos do laboratório e funcionários.

A todos do laboratório de Bioquímica: Ana Luiza, Bia, Camilo, Dani Branta, Evandro, Fabiano, Fran, Haroldo, Joelise, Ju Macedo, Marcela, Márcio, Paty Schons, Paulinha, Pri Becker, Pri Hoffman e Val.

A minha família: pai, mãe, Michelle, Kelly, Rafael, Bruno e Gabriel.

A CP Kelco Headquarters (Limeira) pela doação de amostras de bagaço de laranja desidratada.

A indústria produtora de óleos vegetais A. Azevedo Indústria e Comércio de Óleos Ltda (Itupeva) pela doação da torta de mamona.

À CAPES pela concessão da bolsa.

À todos aqueles que, apesar de não serem citados, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Índice de Tabelas.....	xv
Índice de Figuras.....	xix
Resumo Geral.....	xxi
Summary.....	xv
Introdução Geral.....	1
CAPÍTULO 1	4
1 Resumo.....	4
1.1 Abstract.....	5
2 Revisão Bibliográfica.....	6
2.1 Produção de Enzimas por Fermentação em Estado Sólido.....	6
2.2 Produção de Ração Animal com Resíduos Agrícolas.....	7
2.3 Laranja e Mamona.....	8
2.4 Taninos e Tanase.....	12
2.5 Fitatos e Fitase.....	16
2.6 Enzimas em Ração Animal.....	19
3 Referências Bibliográficas.....	21
CAPÍTULO 2	28
1 Resumo.....	28
1.1 Abstract.....	30
2 Introdução.....	31
3 Materiais e Métodos.....	32
3.1 Obtenção dos Resíduos de Laranja.....	32
3.2 Caracterização do Resíduo.....	32
3.2.1 Determinação do pH.....	32
3.2.2 Porcentagem de Água (Karl-Fischer).....	32
3.2.3 Umidade.....	33
3.3 Processo Fermentativo.....	33
3.3.1 Microrganismo.....	33
3.3.2 Preparo do Pré-Inóculo.....	33
3.3.3 Meio de Fermentação.....	34
3.3.4 Extração Enzimática.....	34
3.3.5 Determinação da Atividade Enzimática da Tanase.....	34
3.3.6 Determinação da Atividade Enzimática da Fitase.....	35
3.3.7 Cinética de Fermentação.....	36
3.3.8 Delineamento Experimental.....	36

3.3.9	Determinação da Umidade Relativa do Ar.....	38
3.4	Determinações Analíticas.....	39
3.4.1	Extração de Fenóis Totais.....	39
3.4.2	Determinação de Fenóis Totais.....	39
3.4.3	Determinação de Taninos Hidrolisáveis.....	40
3.4.4	Determinação de Taninos Condensados.....	40
3.4.5	Capacidade Antioxidante.....	41
3.4.6	Fibras Alimentares Totais, Solúveis e Insolúveis.....	42
3.4.7	Determinação de Cálcio.....	42
4	Resultados e Discussão.....	44
4.1	Caracterização do Resíduo.....	44
4.2	Cinética de Fermentação.....	45
4.3	Delineamento Experimental.....	46
4.3.1	DCCR para Produção de Fitase.....	46
4.3.2	DCCR para Produção de Tanase.....	52
4.3.3	Análise da Umidade Relativa do Ar no meio de Produção de Bagaço de Laranja.....	57
4.4	Determinações Analíticas.....	60
4.4.1	Determinação de Fenóis Totais, Taninos Hidrolisáveis e Condensados no Bagaço de Laranja.....	60
4.4.2	Capacidade Antioxidante.....	64
4.4.3	Fibras Alimentares Dietéticas Totais, Solúveis e Insolúveis.....	67
4.4.4	Determinação de Cálcio.....	69
5	Conclusões Parciais.....	71
6	Referências Bibliográficas.....	72
	CAPÍTULO 3	76
1	Resumo.....	76
1.1	Abstract.....	78
2	Introdução.....	79
3	Materiais e Métodos.....	80
3.1	Obtenção da Torta de Mamona.....	80
3.2	Caracterização do Resíduo.....	80
3.2.1	Determinação do pH.....	80
3.2.2	Porcentagem de Água (Karl-Fischer).....	80
3.2.3	Umidade.....	81
3.3	Processo Fermentativo.....	81
3.3.1	Microrganismo.....	81
3.3.2	Preparo do Pré-Inóculo.....	81

3.3.3	Meio de Fermentação.....	82
3.3.4	Extração Enzimática.....	82
3.3.5	Determinação da Atividade Enzimática da Tanase.....	82
3.3.6	Determinação da Atividade Enzimática da Fitase.....	83
3.3.7	Cinética de Fermentação.....	84
3.3.8	Delineamento Experimental.....	84
3.4	Determinações Analíticas.....	87
3.4.1	Extração de Fenóis Totais.....	87
3.4.2	Determinação de Fenóis Totais.....	87
3.4.3	Determinação de Taninos Hidrolisáveis.....	88
3.4.4	Determinação de Taninos Condensados.....	88
3.4.5	Avaliação da Detoxificação da Torta de Mamona por Fermentação em Estado Sólido.....	89
3.4.5.1	Detecção de Ricina por SDS-PAGE.....	89
3.4.5.2	Teste de Atividade Tóxica em Cultura de Células.....	89
4	Resultados e Discussão.....	91
4.1	Caracterização do Resíduo.....	91
4.2	Cinética de Fermentação.....	92
4.3	Delineamento Experimental.....	93
4.3.1	DCCR para Produção de Tanase.....	93
4.3.2	DCCR para Produção de Fitase.....	102
4.4	Determinações Analíticas.....	110
4.4.1	Determinação de Fenóis Totais, Taninos Hidrolisáveis e Condensados na Torta de Mamona.....	110
4.4.2	Avaliação da Detoxificação da Torta de Mamona por Fermentação em Estado Sólido.....	113
4.4.2.1	Detecção de Ricina por SDS-PAGE.....	113
4.4.2.2	Teste de Atividade Tóxica em Cultura de Células.....	115
5	Conclusões Parciais.....	117
6	Referências Bibliográficas.....	118
	Conclusão Final.....	121
	Trabalhos Futuros.....	122

Índice de Tabelas

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Capacidade de Absorção de Água do Bagaço de Laranja.....	37
Tabela 2	Variáveis e Níveis avaliados no DCCR.....	37
Tabela 3	Matriz do delineamento contendo valores codificados das variáveis.....	38
Tabela 4	pH, quantidade de água e umidade relativa do bagaço de laranja desidratado.....	44
Tabela 5	Avaliação da cinética de fermentação para atividade tanásica em Bagaço de Laranja	45
Tabela 6	Avaliação da cinética de fermentação para atividade fitásica em Bagaço de Laranja.	46
Tabela 7	Matriz DCCR 2 ² e a resposta da atividade enzimática da fitase em 72 horas de incubação.....	47
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.....	48
Tabela 9	Análise de Variância no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (volume SS (%) e AT (%)) na atividade de fitase.....	49
Tabela 10	Umidade relativa do meio de cultivo antes e após incubação na câmara climática para o meio ótimo para produção de fitase em bagaço de laranja.....	51
Tabela 11	Matriz DCCR 2 ² e a resposta da atividade enzimática da tanase em 96 horas de incubação.....	53
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.....	54
Tabela 13	Análise de Variância no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (volume SS (%) e AT (%)) na atividade de tanase.....	55
Tabela 14	Umidade relativa do meio de cultivo antes e após incubação na câmara climática para o meio ótimo para produção de fitase em bagaço de laranja.....	57
Tabela 15	Atividade Enzimática da Tanase em diferentes valores de Umidade Relativa do Ar.	58
Tabela 16	Concentração de Fenóis Totais em bagaço de laranja não fermentado em diferentes tipos de solventes.....	60
Tabela 17	Concentração de Fenóis Totais e Taninos Hidrolisáveis em cada amostra antes e após fermentação.....	61
Tabela 18	Capacidade antioxidante do meio otimizado não fermentado e após fermentação para produção de tanase.....	64
Tabela 19	Porcentagem de Fibras Alimentares Dietéticas.....	67
Tabela 20	Concentração de Cálcio presente nas amostras em estudo.....	70

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Capacidade de Absorção de Água da Torta de Mamona.....	85
Tabela 2	Valores utilizados no DCCR para três fatores.....	85
Tabela 3	Matriz do delineamento contendo valores codificados das variáveis.....	86
Tabela 4	pH, quantidade de água e umidade relativa da torta de mamona <i>in natura</i>	91
Tabela 5	Avaliação da cinética de fermentação para a atividade tanásica em Torta de Mamona.....	92
Tabela 6	Avaliação da cinética de fermentação para a atividade fitásica em Torta de Mamona.....	92
Tabela 7	Matriz DCCR 2 ³ e a resposta da atividade enzimática da tanase em 48 horas de fermentação.....	94
Tabela 8	Resultados do Coeficiente de Regressão, Erro Padrão, t, p e Limite de Confiança na otimização dos componentes do meio de cultivo (umidade relativa do ar, volume da Solução Salina e ácido tânico) na atividade de tanase.....	95
Tabela 9	Análise de Variância no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (UR (%), volume SS (%) e AT (%)) na atividade de tanase.....	96
Tabela 10	Umidade relativa do meio de cultivo antes e após incubação na câmara climática para o meio otimizado para produção de tanase em torta de mamona.....	100
Tabela 11	Estudo Comparativo da Dependência de Sais no Meio de Cultivo na Torta de Mamona.....	100
Tabela 12	Matriz DCCR 2 ³ e a resposta da atividade enzimática da fitase em 72 horas de incubação.....	103
Tabela 13	Resultados do Coeficiente de Regressão, Erro Padrão, t, p e Limite de Confiança na otimização dos componentes do meio de cultivo (umidade relativa do ar, volume da solução salina e ácido tânico) na atividade de fitase.....	104
Tabela 14	Análise de Variância no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (UR (%), volume SS (%) e AT (%)) na atividade de fitase.....	105
Tabela 15	Umidade relativa do meio de cultivo antes e após incubação na câmara climática para o meio ótimo para produção de fitase em torta de mamona.....	107
Tabela 16	Estudo Comparativo da Dependência de Sais no Meio de Cultivo na Torta de Mamona.....	108
Tabela 17	Concentração de Fenóis Totais em torta de mamona não fermentada em diferentes tipos de solventes.....	110
Tabela 18	Concentração de Fenóis Totais e Taninos Hidrolisáveis seus desvios em cada amostra antes e após fermentação.....	111

Índice de Figuras

CAPÍTULO 1

Figura 1	Estrutura da Ricina (Rutenber, 1991).....	11
Figura 2	“Loop” do RNA ribossômico e sítio de despurinação da Ricina (Stirpe, 2006).....	12
Figura 3	Estrutura química do Tanino Hidrolisável (Battestin, 2004).....	13
Figura 4	Exemplo da Estrutura Química do Tanino Condensado (Battestin, 2004).....	13
Figura 5	Hidrólise do Ácido Tânico (Battestin, 2004).....	14
Figura 6	Estrutura química do Ácido Fítico (Raboy, 2003).....	17
Figura 7	Hidrólise do Ácido Fítico (Dvoráková, 1998).....	18

CAPÍTULO 2

Figura 1	Superfície de Resposta e Curva de Contorno para Atividade da Fitase (U/mL).....	50
Figura 2	Superfície de Resposta e Curva de Contorno para Atividade da Tanase (U/mL).....	56
Figura 3	Capacidade Antioxidante das amostras durante 60 minutos de reação.....	65
Figura 4	Porcentagem de Fibras Alimentares Dietéticas nas amostras: (a) BL 5,8% F72h; (b) BL 3% F96h.....	68

CAPÍTULO 3

Figura 1	Superfície de Resposta e Curva de Contorno Atividade da Tanase (U/mL): (a) em função do volume da solução salina e umidade relativa do ar, (b) em função da umidade relativa do ar e ácido tânico e (c) em função do ácido tânico e volume da solução salina.....	98
Figura 2	Superfície de Resposta e Curva de Contorno para Atividade da Fitase (U/mL).....	106
Figura 3	SDS-PAGE 12% do extrato protéico de cada amostra testada.....	113
Figura 4	Comportamento celular (quanto à sobrevivência) após tratamento com as amostras em estudo.....	115

Resumo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de produzir simultaneamente fitase e tanase através da fermentação sólida, em bagaço de laranja e torta de mamona, empregando o fungo *Paecilomyces variotii*.

A produção mundial de laranja tem aumentado significativamente desde a década de oitenta, especialmente no setor de processamento de suco. Para o ano de 2010 a produção mundial de laranja está estimada em 66,4 milhões de toneladas, sendo que 40% desta produção serão convertidas em subprodutos, principalmente a casca. Uma das alternativas para o uso deste resíduo tem sido na forma peletizada para alimentação animal.

A mamona é uma oleaginosa muito estudada para a produção de biodiesel. A torta residual da extração do óleo é de grande utilidade para adubação e também rica em proteínas, abrindo possibilidade da sua utilização como ração animal. Esta segunda aplicação enfrenta o problema da presença da ricina, composto tóxico presente na torta, havendo a necessidade de detoxificá-la antes do destino como ração.

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.

Dessa forma, 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.

As características do bagaço de laranja e torta de mamona após a fermentação foram avaliadas a fim de estudar sua viabilidade como ingrediente para ração animal.

No estudo de otimização da produção de tanase por *Paecilomyces variotii* utilizando metodologia de superfície de resposta, foram obtidas atividades de 4800 e 2400 U/g em bagaço de laranja e torta de mamona, respectivamente. Essa produção foi conduzida utilizando 3 e 4,6% de ácido tânico, 61 e 25% de solução salina, 96 e 48 horas de tempo de incubação para os resíduos de laranja e mamona, respectivamente.

Para produção de fitase as atividades foram de 320 e 280 U/g em bagaço de laranja e torta de mamona, respectivamente. As condições de cultivo em bagaço de laranja foram

5,8% de ácido tânico, 66% de solução salina e 72 horas de incubação. O processo fermentativo com torta de mamona foi conduzido com as mesmas condições com exceção da porcentagem de solução salina, que foi de 25%, e a ausência de ácido tânico. 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. A torta de mamona fermentada apresentou menor concentração de ricina no meio de cultivo, entretanto, ainda exibiu atividade tóxica em células Vero.

Palavras-chave: Tanase, Fitase, *Paecilomyces variotii*, Ração Animal, Fermentação em Estado Sólido.

Summary

The aim of this study was to evaluate the feasibility of producing both phytase and tannase by solid fermentation on orange peel and castor bean cake, using the fungus *Paecilomyces variotii*.

World production of oranges has increased significantly since the eighties, especially in the processing of juice. For the year 2010, the world production of oranges is estimated at 66.4 million tons, with 40% of this production will be converted into waste, mainly the peel. An alternative use of this waste has been as pellets for animal food.

The castor bean is an oilseed much studied for the production of bio-diesel. The castor cake of the extraction of oil is very useful for fertilization and also rich in protein, opening the possibility of its use as animal food. This second application faces the problem of the presence of ricin, a toxic compound present in the castor cake. There is a need for a detoxification before using it as food.

The use of enzymes in animal feed is well known and is being explored. The biggest difficulty to expand the use of enzymes is the production cost. An alternative to this would be the use of waste as fermentation substrate for enzyme production with higher added value.

Therefore, the use of these residues for animal food represents a viable alternative to the sector as well as for the production of biocatalysts by solid fermentation.

The characteristics of the orange peel and the castor cake after fermentation were evaluated in order to study its feasibility as an ingredient for animal food.

In the study of optimization of the production of tannase by *Paecilomyces variotii* using response surface methodology, activities were obtained from 4,800 and 2,400 U/g in orange peel and castor cake, respectively. This production was conducted using 3 and 4.6% tannic acid, 61 and 25% salt solution, 96 and 48 hours of incubation time for the waste of orange and castor bean, respectively.

For phytase production by *Paecilomyces variotii*, the activities were of 320 and 280 U/g using orange peel and castor cake, respectively. Growing conditions on orange peel were 5.8% tannic acid, 66% salt solution and 72 hours of incubation. The fermentation with

castor cake was conducted with the same conditions except for the absence of tannic acid and the percentage of salt solution which was 25%. After fermentation, the orange peel had a higher antioxidant capacity compared to a non-fermented environment, an interesting ingredient in animal food. The fermented castor cake showed lower concentration of ricin in the culture medium. However, it still exhibited toxic activity in Vero cells.

Keywords: Tannase, Phytase, *Paecilomyces variotii*, Animal Feed, Solid-State Fermentation.

Introdução Geral

Rações produzidas com subprodutos agrícolas ou resíduos de indústrias alimentícias estão em crescente interesse, já que apresentam uma forma econômica e viável para sua formulação na ração. Os resíduos também podem disponibilizar nutrientes, compostos energéticos e interferem na digestibilidade no trato gastrointestinal de animais. Entretanto, estes resíduos podem apresentar compostos tóxicos ou antinutricionais como o fitato e tanino, presentes na maioria das plantas terrestres, que diminuem a absorção de nutrientes (Graminha, 2008).

O uso de enzimas em ração animal é conhecido e tem sido explorado para aumentar o valor nutricional do alimento (Pariza, 2010). A tanase hidrolisa os taninos, que são compostos fenólicos de alta massa molecular, liberando monômeros como o ácido gálico. O ácido gálico não interfere na digestibilidade, absorção de nutrientes e apresenta capacidade protetora contra ação oxidativa (Battestin, 2008; Schons, 2009). A fitase hidrolisa o fitato, liberando o fosfato presente em sua molécula, tornando-os disponíveis para absorção em animais. Ela também diminui a ação antinutricional no trato intestinal dos mesmos (Vats, 2004). Destas duas, somente a fitase é encontrada no mercado e tem seu uso largamente difundido. A tanase ainda é pouco conhecida, assim como seus efeitos em rações animais. No entanto, o custo de produção de enzimas ainda é um entrave para sua comercialização em larga escala (Graminha, 2008; Battestin, 2004).

O processo de fermentação em estado sólido (FES) oferece aplicações promissoras para a produção de enzimas, ácidos orgânicos e compostos bioativos, utilizando como substratos resíduos de mamona, laranja, café, uva, entre outros (Pandey, 2003). O custo para seu processamento é menor em relação ao submerso, os resíduos agroindustriais se adequam perfeitamente às condições para fermentação e produção de compostos com bom rendimento (Singhania, 2009; Foong, 2009). Assim, a FES constitui uma forma de reduzir o custo de produção e viabilizar o uso das enzimas tanase e fitase, ao mesmo tempo há interesse em estudar a utilização de resíduos agroindustriais fermentados como ingrediente na ração animal.

Na produção agrícola da laranja, estima-se produzir cerca de 66,4 milhões de toneladas em 2010 ao redor do mundo, sendo que a maior parte da fruta produzida está

voltada para produção de suco, gerando 30,1 milhões de toneladas de resíduos. Deste processamento, os resíduos gerados apresentam inúmeros subprodutos como D-limoneno, óleos essenciais e a casca (representado pelo albedo e flavedo), a qual geralmente é peletizada e utilizada para ração animal (FAO, 2003, Bampidis, 2006). A produção do suco de laranja no Brasil é voltada para exportação, sendo responsável por 80% do comércio internacional. Nos últimos anos, o bagaço era peletizado e vendido para os países europeus para nutrição animal (Pereira, 2008).

No mercado mundial, a Índia, China e Brasil foram os principais produtores de mamona, entre 1978 a 2004. Com a necessidade de substituição do óleo diesel proveniente do petróleo, o óleo extraído de vegetais está sendo estudado para o setor de combustíveis no mundo (Savy Filho, 2005). Entre 2002 a 2003 foram produzidos 1,3 milhão de toneladas de sementes de mamona, sendo que no processo de extração do óleo, metade de seu peso é representada pela torta (Gowda, 2008). A principal alternativa para utilização desta torta é na fertilização orgânica em plantas (Jones, 1947). A torta apresenta alto teor de proteínas (cerca de 35%) e poderia ser usada como uma fonte em potencial para alimentação animal. Entretanto, a torta apresenta compostos tóxicos como a ricina que impedem seu uso (Anandan, 2005; Godoy, 2009).

Este trabalho teve como objetivo principal estudar a produção simultânea das enzimas fitase e tanase através da fermentação em estado sólido utilizando o fungo *Paecilomyces variotii*. Os substratos utilizados na fermentação sólida foram bagaço de laranja e torta de mamona, visando a produção destas enzimas em questão para posteriores aplicações. Após o processo fermentativo, o resíduo da laranja foi analisado quanto à capacidade antioxidante e concentração de fibras e cálcio. Na torta de mamona foi analisado o processo de detoxificação.

O trabalho a seguir será apresentado na forma de artigos científicos, distribuídos na seguinte ordem:

O capítulo 1 trata de uma revisão bibliográfica sobre a produção da tanase e fitase. Foram abordados os dados de produção dos resíduos agroindustriais e suas principais finalidades, focando seu uso na fermentação em estado sólido para melhoria do produto e uso na ração animal.

O capítulo 2 trata da produção simultânea de tanase e fitase por fermentação em estado sólido por *P. variotii* utilizando bagaço de laranja como substrato. Foi também estudado a concentração de fenóis, taninos, fibras, cálcio e capacidade antioxidante antes e após a fermentação.

O capítulo 3 descreve a produção simultânea de fitase e tanase por *P. variotii* em torta de mamona como substrato para fermentação em estado sólido. Foram avaliadas a presença de fenóis, taninos e compostos tóxicos (detoxificação) antes e após a fermentação.

CAPÍTULO 1: ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE FITASE E TANASE EM PROCESSO DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA APLICAÇÃO NA NUTRIÇÃO ANIMAL.

1. Resumo

A economia brasileira é baseada na produção agrícola, em que se pode destacar a laranja e mamona. Além da comercialização destes produtos *in natura*, o setor agroindustrial também está envolvido com o processamento e com a produção de suco de laranja e óleo de mamona. Assim, estes produtos geram resíduos de interesse para nutrição animal, como o bagaço da laranja na forma peletizada, muito utilizado para nutrição de ruminantes e a torta de mamona, geralmente utilizada para fertilização orgânica, já que existem compostos tóxicos como a ricina que impedem seu uso como ingrediente. Através da fermentação em estado sólido pode-se melhorar a qualidade nutricional destes resíduos como a quebra de compostos antinutricionais como o fitato e tanino; a biodisponibilidade de nutrientes e a detoxificação dos substratos, como a ricina na torta de mamona. 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.

Palavras-chave: Fermentação, Bagaço de Laranja, Torta de Mamona, Enzimas, Ração Animal

1.1 Abstract

The world economy is based on agricultural production, where the orange and castor oil can be highlighted in Brazil. In addition to marketing these products *in natura*, the agribusiness sector is also involved with the processing and the production of orange juice and castor oil. Therefore, they generate waste products of interest to animal nutrition, such as orange peel as pellets, widely used for ruminant nutrition and castor bean oil cake, often used as organic fertilizer, as there are toxic compounds, such as ricin, which prevent its use as an ingredient. Through solid-state fermentation, the nutritional quality of these wastes may be improved as the increasing the bioavailability of nutrients; breaking anti-nutritional compounds such as phytate and tannin, and the detoxification of substrates, such as ricin in castor bean oil cake. Moreover, the solid-state fermentation can be used for the production of enzymes (including phytase and tannase) from organic residues. At the same time, these enzymes are capable of hydrolyzing anti-nutritional compounds in the waste, which could be used as additives in animal food. There is also interest in the production of phytase and tannase in crop and agribusiness residues via solid-state fermentation with the objective of reducing the costs of the proceedings.

Keywords: Fermentation, Orange Peel, Castor Cake, Enzymes, Animal Feed.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Produção de Enzimas por Fermentação em Estado Sólido

A fermentação em estado sólido (FES) proporciona o cultivo de microrganismos em substratos sólidos na ausência de uma fase aquosa livre (Pandey, 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, 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, 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, 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, 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; Mohapatra, 2009; Singhanian, 2009).

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 (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.

2.2. Produção de Ração Animal Utilizando Resíduos Agrícolas

A economia brasileira é uma das mais importantes economias do mundo, baseadas na agricultura, produzindo café, cana de açúcar, soja, mandioca, frutas, sementes oleaginosas, entre outros, o que significa uma ótima contribuição para o desenvolvimento da economia (Schieber, 2001; Gowda, 2008).

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 (Soccol, 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; bagaço de cana; folha de mandioca; bagaço de laranja e torta de mamona (Schieber, 2001; Graminha, 2008).

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, 2005; Cao, 2007; Kuhad, 1997).

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, 2006; Makkar, 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, 2006).

A utilização deste tipo de ração pode trazer alguns benefícios para os animais e conseqüentemente, para os produtos deles obtidos. Um exemplo disso é a maior produtividade e qualidade da carne e do leite (Vasta, 2008). Porém, estas rações devem ser cuidadosamente 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 (Hervás, 2003).

Na aquíicultura, 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, 2000).

Um 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 (Árnason, 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, 2009).

2.3. Laranja e Mamona

A laranja pertence ao grupo dos cítricos, que são classificadas nas espécies *Citrus sinensis* (laranja-doce) e *Citrus aurantium* (laranja-azedo), elas são consumidas por humanos, principalmente nas formas fresca ou como sucos processados ou ainda concentrados. Após a extração do suco da laranja, restam resíduos dos quais se destacam os óleos essenciais, d-limoneno e a casca, a qual apresenta o albedo e o flavedo (Santana, 2005).

Hoje, no Brasil, a citricultura está voltada para a exportação, representando cerca de 53% do cenário mundial de suco de laranja, responsável por 80% do comércio internacional e 49% da produção brasileira neste setor (Pereira, 2008).

Indústrias de processamento alimentício, especialmente as de frutas, geram importantes quantidades de resíduos, ao qual devem ser propriamente gerenciados, por 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 (FAO, 2003). Estes resíduos são usados para formulação de rações ou podem ser administrados diretamente ao animal (Bampidis, 2006).

Estes resíduos apresentam crescente interesse, isso porque há uma importância 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, 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, 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, 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, 2006). O cálcio em conjunto com o fósforo estão diretamente envolvidos com o desenvolvimento e manutenção do sistema esquelético e participa em muitos processos fisiológicos (NRC, 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, 2002). Estudos

mostraram que a inclusão de cálcio na ração para peixes da espécie *Litopenaeus vannamei* aumentaram seu peso corpóreo (Cheng, 2006). Também que a suplementação de cálcio com 0,75% na ração apresentou efeito positivo na mineralização dos ossos na espécie *Salmo salar* (Vielma, 1998).

A mamona, *Ricinus communis*, é cultivada em regiões tropicais para utilização do seu óleo, que está presente na semente, o qual é extensivamente usado para propósitos industriais e medicinais (Anandan, 2005; Jones, 1947). Os principais países produtores são a Índia, com 60% da produção mundial e China, com 20%. O Brasil em 2002 produziu 37.000 toneladas de óleo, representando somente 7,5% da produção mundial (Savy Filho, 2005). Mas este cenário está mudando com a substituição gradual da obtenção de energia via fontes petrolíferas para o óleo vegetal, incluindo o óleo de mamona. A torta de mamona, resíduo da extração do óleo, representa metade do peso da semente e apresenta uma quantidade de 34 – 36% de proteínas (Gowda, 2008; Anandan, 2005); 20% de fibras, 0,7% de cálcio; 0,8% de fósforo e 4% de extrato etéreo (Souza, 1979). Apesar disso, a torta de mamona não pode ser usada como fonte de proteínas devido à sua toxicidade, sendo usada geralmente como fertilizante orgânico (Jones, 1947). Dentre as toxinas presentes estão a ricinina, a albumina 2S e a ricina.

A ricinina é um alcalóide tóxico denominado 1,2-dihidro-4-metoxi-1-metil-2-oxo-3-piridinocarbonitrila ($C_8H_8N_2O_2$), presente na torta de mamona e de baixa toxicidade (Beltrão, 2007).

O complexo alergênico denominado antigamente de CB-1A (Castor Bean Allergen), atualmente mencionado como Albumina 2S está presente também em nozes e outras sementes como castanha do maranhão, avelã, mostarda e algodão (Breiteneder, 2004). Há muitos anos que a presença desta toxina é conhecida, no entanto, os tratamentos aplicados à torta no que se referem à detoxificação são geralmente ineficientes (Anandan, 2005).

A ricina (n° CAS: 9009-86-3) é uma das mais potentes fitotoxinas conhecidas, sendo classificada como uma proteína inativadora de ribossomos (RIP) do tipo 2, que são heterodímeros compostos de duas cadeias unidos por pontes dissulfeto: cadeia A, enzimaticamente ativa; e a cadeia B, ligante de receptores (Figura 1) (Stirpe, 2006).

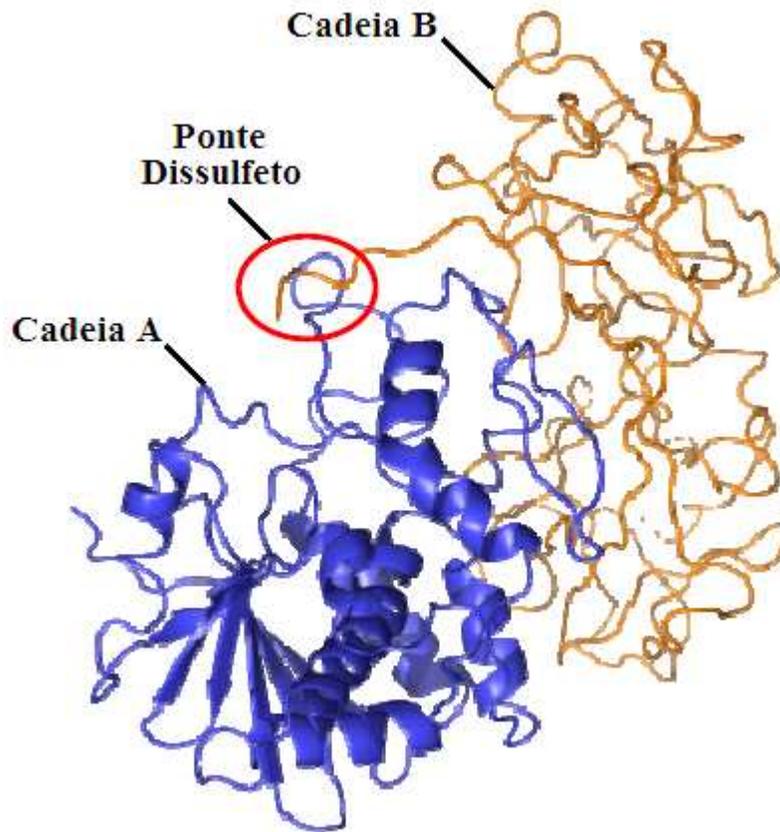


Figura 1. Estrutura da Ricina (Rutenber, 1991).

A cadeia A remove um resíduo adenina numa região “loop” do RNA ribossômico, com essa modificação, estes ribossomos não podem dar suporte à síntese de proteínas (Figura 2). Esta inativação pode ser efetuada na proporção de uma ricina para cada 2.000 ribossomos a cada minuto, uma velocidade em que a célula não consegue acompanhar (Olsnes, 1975).

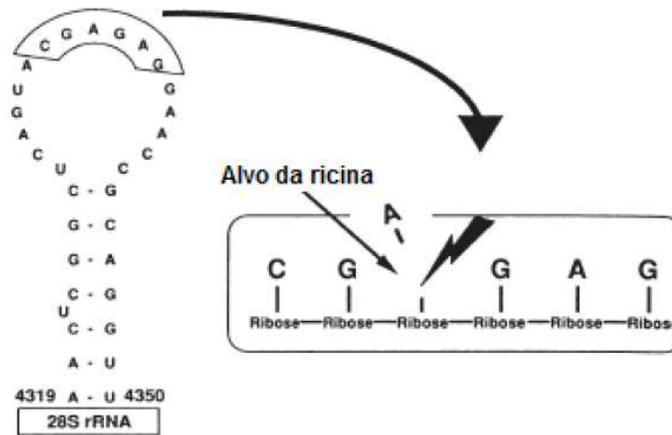


Figura 2. “Loop” do RNA ribossômico e sítio de despuração da Ricina (Stirpe, 2006).

A ricina por ser termossensível, poderia facilmente ser inativada por qualquer processo de cozimento ou autoclavagem (Anandan, 2005), mas este processo não apresenta viabilidade para aplicação em escala industrial devido ao alto custo. Para solucionar esse problema, uma detoxificação via fermentação poderia ser realizada (Anandan, 2005; Godoy, 2009).

2.4. Taninos e Tanase

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, 2008; Waghorn, 2008).

Os taninos hidrolisáveis (Figura 3) são unidos por ligações ésteres entre grupos de ácido gálico e resíduo de glicose através de ligações esterásicas e ligações depsidásicas (Mueller-Harvey, 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, 2004; Gross, 2008).

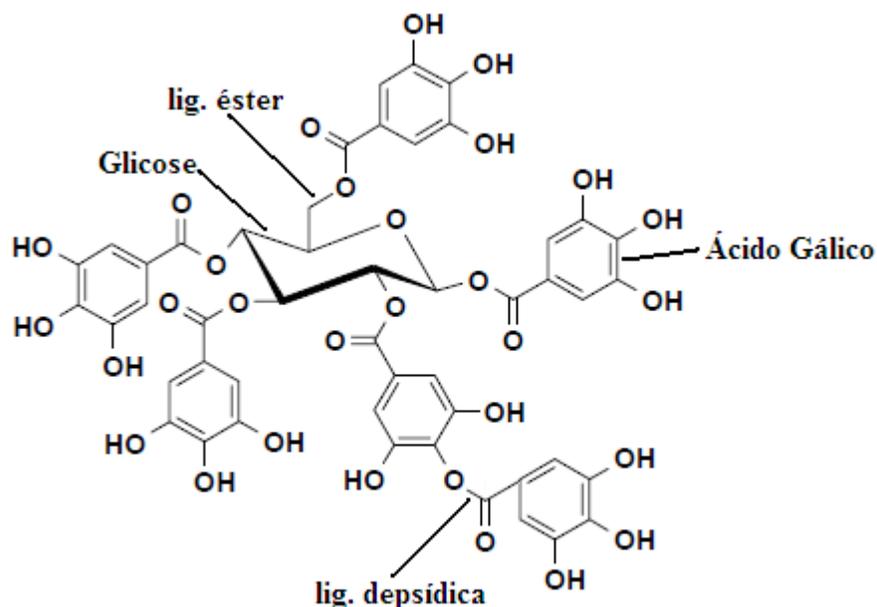


Figura 3. Estrutura química do Tanino Hidrolisável (Battestin, 2004).

Os taninos condensados (Figura 4) são mais vastamente distribuídos que os hidrolisáveis no reino vegetal, eles são condensados devido à sua estruturação compacta (Mutabaruka, 2007). Eles estão presentes em grande quantidade nos alimentos, podem conter de 2 a 50 unidades flavonóides. Os condensados são resistentes a hidrólise, devido à ausência de ligações ésteres e depsídicas (Battestin, 2004; Gross, 2008).

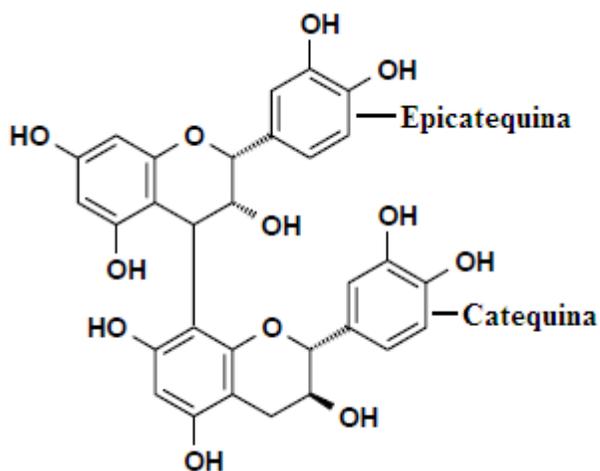


Figura 4. Exemplo da Estrutura Química do Tanino Condensado (Battestin, 2004).

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, 2008). Estes compostos inibem o 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, 2005). O efeito negativo de taninos na nutrição animal é devido à sua capacidade de se ligar à 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, 2004; Min, 2003).

A tanase (EC 3.1.1.20) ou tanino-acil-hidrolase (TAH) catalisa a hidrólise de ligações ésteres de ácido gálico (Figura 5) nas moléculas de taninos hidrolisáveis (Kumar, 2007; Treviño-Cueto, 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 produzida por vegetais para acelerar o processo de amadurecimento de frutas (Aissam, 2005; Batra, 2005; Hamdy, 2008; Aguilar, 2001b; Deschamps, 1983; Rodrigues, 2007; Rodríguez, 2008; Van de Lagemaat, 2005; Purohit, 2006; Belmares, 2004).

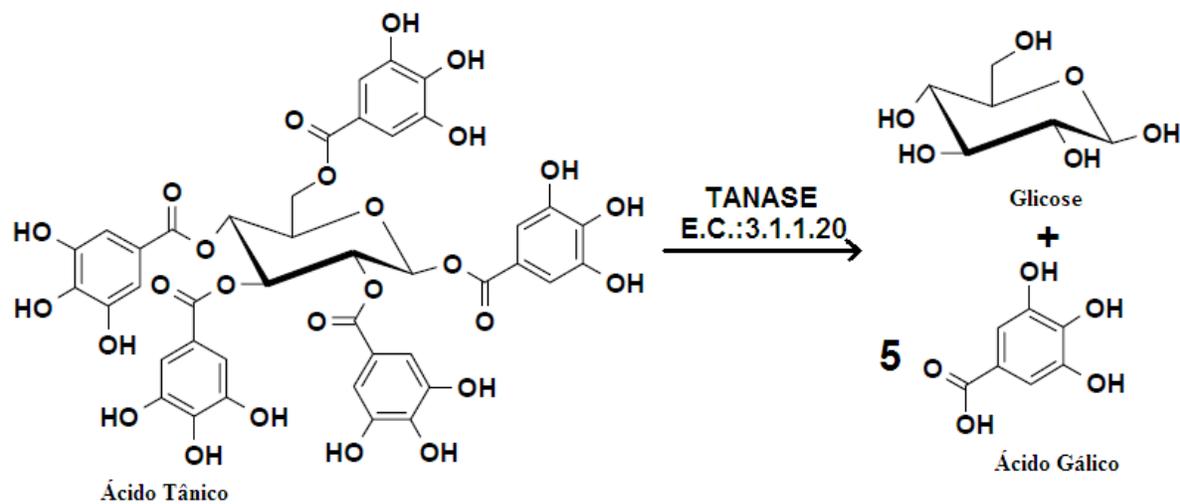


Figura 5. Hidrólise do Ácido Tânico (Battestin, 2004).

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 (Battestin, 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, 2009).

- **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, 1997; Khokhar, 2002).

- **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).

- **Produção de Ácido Gálico:** usado principalmente nas indústrias farmacêuticas, como na síntese de trimetoprima, agente antibacteriano e sulfonamida (Aguilar, 2001a).

- **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, 2008).

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 produção (Battestin, 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 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 isoeletrico 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^{2+} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} e Mg^{+2} , sendo inativada por EDTA, 2-mercaptoetanol, tioglicolato de sódio, sulfato de magnésio e de cálcio e *o*-fenantrolina (Aguilar, 2001a; Aguilar, 2007; Battestin, 2007a; Belmares, 2004; Mahapatra, 2005; Sharma, 2007; Sharma, 2008).

2.5. Fitatos e Fitase

O ácido fítico, *Mio*-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexaquisfosfato (Figura 6), é um álcool cíclico 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, 2003). A presença de fitato em excesso 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, 1983). Além disso, interage com enzimas digestivas reduzindo suas atividades, influenciando na digestão e prejudicando o aproveitamento de vitaminas.

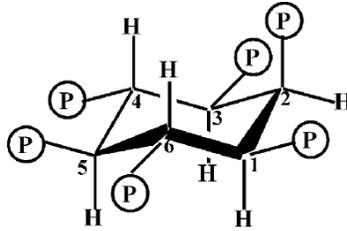


Figura 6. Estrutura química do Ácido Fítico (Raboy, 2003).

Apesar do 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, 2004). O fósforo do fitato que não é utilizado é excretado tornando-se um poluente ambiental em áreas de agropecuária intensiva (Lei, 2003).

A enzima ácido fosfohidrolase catalisa a hidrólise de fosfato e ácido fítico (Figura 7) 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.

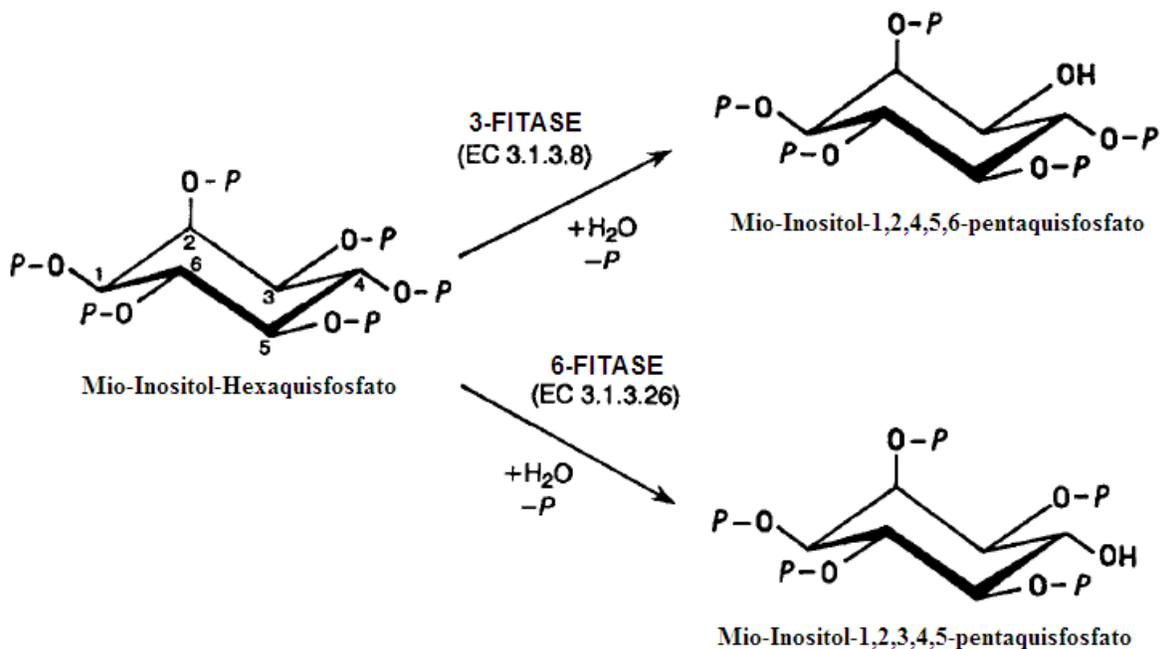


Figura 7. Hidrólise do Ácido Fítico (Dvoráková, 1998).

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, 1998; Ries, 2009). Pelo processo fermentativo, a fitase pode ser produzida com a utilização de substratos de baixo custo como torta de sementes oleaginosas (Roopesh, 2006).

A suplementação de fitase em ração animal aumenta a biodisponibilidade de fósforo em animais monogástricos, que conseqüentemente 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).

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.

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, 2001).

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, 2002).

2.6. 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, 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 disponibilização 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, 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, 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, 2000; Kies, 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, 2010).

Colombatto e colaboradores (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 conseqüentemente disponibiliza uma maior quantidade de nutrientes para digestibilidade na microbiota dos ruminantes.

Nuero e Reyes (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.

3. Referências Bibliográficas

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. 218-222, 2008.

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.

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.

Aguilar, C. N.; Rodríguez, R.; Gutiérrez-Sánchez, G.; Augur, C.; Favela-Torres, E.; Prado-Barragan, L. A.; Ramírez-Coronel, A.; Contreras-Esquivel, J. C. Microbial tannases: advances and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76, p. 47-59, 2007.

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.

Anandan, S.; Kumar, G. K. A.; Ghosh, J.; Ramachandra, K. S. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. *Animal Feed Science and Technology* 120, p. 159-168, 2005.

Arnason, J.; Imsland, A. K.; Gústavsson, A.; Gunnarsson, S.; Arnarson, I.; Reynisson, H.; Jónsson, A. F.; Smáradóttir, H.; Thorarensen, H. Optimum feed formulation for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.): Minimum protein content in diet for maximum growth. *Aquaculture* 291, p. 188-191, 2009.

Bampidis, V. A.; Robinson, P. H. Citrus by-products as ruminant feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology* 128, p. 175-217, 2006.

Battestin, V.; Macedo, G. A. Purification and biochemical characterization of tannase from a newly isolated strain of *Paecilomyces variotii*. *Food Biotechnology* 21, p. 207-216, 2007a.

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

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.

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.

Batra, A.; Saxena, R. K. Potential tannase producers from the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. *Process Biochemistry* 40, p. 1553-1557, 2005.

Belmares, R.; Contreras-Esquivel, J.; Rodríguez-Herrera, R.; Coronel, A. R.; 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.

Beltrão, N. E. M.; Lima, R. L. S. Aplicação do óleo de mamona como fonte de energia: Biodiesel. In: Azevedo, D. M. P.; Beltrão, N. E. M. (Ed.). *O Agronegócio da mamona no Brasil*. 2ª Edição, Embrapa Informação Tecnológica, Brasília-DF, p. 395-416, 2007.

Berntssen, M. H. G.; Julshamn, K.; Lundebye, A. K. Chemical contaminants in aquafeeds and Atlantic salmon (*Salmo salar*) following the use of traditional – versus alternative feed ingredients. *Chemosphere* 78, p. 637-646, 2010.

Breiteneder, H.; Radauer, C. A classification of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113, p. 821-30, 2004.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

Dvoráková, J. Phytase: Sources, preparation and exploitation. *Folia Microbiologica* 43, Issue 4, p.323-338, 1998.

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.

FAO (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>>.

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.

George, S.; Raju, V.; Subramanian, T. V.; Jayaraman, K. Comparative study of protease production in solid substrate fermentation versus submerged fermentation. *Bioprocess Engineering* 16, p. 381-382, 1997.

Godoy, M. G. Produção de lipase microbiana e detoxificação simultânea de rejeitos agroindustriais. *Dissertação de Mestrado*, IQ-UFRJ - RJ, 2009.

Goel, G.; Puniya, A. K.; Aguilar, C. N.; Singh, K. Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Naturwissenschaften* 92, p. 497-503, 2005.

González-Martín, I.; Alvarez-García, N.; Hernández-Andaluz, J. L. Instantaneous determination of crude proteins, fat and fibre in animal feeds using near infrared reflectance spectroscopy technology and remote reflectance fibre-optic probe. *Animal Feed Science and Technology* 128, p. 165-171, 2006.

Gowda, N. K. S.; Pal, D. T.; Srinivas, R. B.; Bharadwaj, U.; Sridhar, M.; Satyanarayana, M. L.; Prasad, C. S.; Ramachandra, K. S.; Sampath, K. Evaluation of castor (*Ricinus communis*) seed cake in the total mixed ration for sheep. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89, p. 216-220, 2008.

Graminha, E. B. N.; Gonçalves, A. Z. L.; Pirola, R. D. P. B.; Balsalobre, M. A. A.; Da Silva, R. E. Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology* 144, p. 1-22, 2008.

Grigelmo-Miguel, N.; Martín-Belloso, O. Comparison of dietary fibre from by-products of processing fruits and greens and from cereals. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 32, p. 503-508, 1999.

Gross, G. G. From lignins to tannins: forty years of enzyme studies on the biosynthesis of phenolic compounds. *Phytochemistry* 69, p. 3018-3031, 2008.

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.

Hérvás, 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 Technology* 109, p. 65-78, 2003.

Hong, K.; Ma, Y.; Li, M. Solid-state fermentation of phytase from cassava dregs. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 91-93, p. 777-785, 2001.

Howson, S. J.; Davis, R. P. Production of phytase-hydrolysing enzyme by some fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 5, p. 377-343, 1983.

Jones, D. B. Proteins of the castor bean-their preparation, properties, and utilization. *The Journal of The American Oil Chemists' Society*, July, p. 247-251, 1947.

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.

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.

Kirk, O.; Borchert, T. V.; Fuglsang, C. C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology* 13, p. 345-351, 2002.

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.

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.

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.

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.

Lei, X. G.; Porres, J. M. Phytase enzymology, applications and biotechnology. *Biotechnology Letters* 25, p. 1787-1794, 2003.

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.

Macias-Corral, M.; Samani, Z.; Hanson, A.; Smith, G.; Funk, P.; Yu, H.; Longworth, J. Anaerobic digestion of municipal solid waste and agricultural waste and the effect of co-digestion with dairy cow manure. *Bioresource Technology* 99, p. 8288-8293, 2008.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

Montgomery, R. Development of biobased products. *Bioresource Technology* 91, p. 1-29, 2004.

Mueller-Harvey, I. Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology* 91, p. 3-20, 2001.

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.

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.

Narayan, B.; Velappan, S. P.; Zituji, S. P.; Manjabhatta, S. N. Yield and chemical composition of fractions from fermented shrimp biowaste. *Waste Management & Research* 28, p. 64-70, 2009.

NRC (National Research Council), Nutrient Requirements of Fish. National Academic Press, Washington, DC, 1993.

Nuero, O. M.; Reyes, F. Enzymes for animal feeding from *Penicillium chrysogenum* mycelial wastes from penicillin manufacture. *Letters in Applied Microbiology* 34, p. 413-416, 2002.

Olsnes, S.; Fernandez-Puentes, C.; Carrasco, L.; Vazquez, D. Ribosome inactivation by the toxin lectins abrin and ricin. Kinetics of the enzymic activity of the toxin A-chain. *European Journal of Biochemistry*, v. 60, p. 281-288, 1975.

Osawa, R.; Walsh, T. P. Visual reading method for detection of bacterial tannase. *Applied and Environmental Microbiology* 59, p. 1251-1252, 1993.

Pandey, A. Solid-state fermentation. *Biochemistry Engineering Journal* 13, p. 81-84, 2003.

Pariza, M. W.; Cook, M. Determining the safety of enzymes used in animal feed. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 56, p. 332-342, 2010.

Pereira, C. L. F. Avaliação da sustentabilidade ampliada de produtos agroindustriais. *Tese de Doutorado – UNICAMP-FEA*, 2008.

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.

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.

Raboy, V. Molecules of interest: *myo*-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochemistry* 64, p. 1033-1043, 2003.

Ries, E. F.; Macedo, G. A. Progressive screening of thermostable yeasts for phytase production. *Food Science and Biotechnology* 18, p. 655-660, 2009.

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.

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.

Rutenber, E.; Robertus, J. D. Structure of ricin B-chain at 2.5 Å resolution. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 10, p. 260-269, 1991.

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. 1223-1228, 2005.

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.

Sandhya, C.; Sumantha, A.; Szakacs, G.; Pandey, P. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry* 40, p. 2689-2694, 2005.

Santana, M. F. S. Caracterização físico-química de fibra alimentar de laranja e maracujá. *Tese de Doutorado – UNICAMP-FEA*, 2005.

Savy Filho, A. *Mamona: Tecnologia Agrícola*. Campinas. SP: EMOPI, 2005.

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.

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.

Sharma, S.; Agarwal, L.; Saxena, R. K. Purification, immobilization and characterization of tannase from *Penicillium variable*. *Bioresource Technology* 99, p. 2544-2551, 2008.

Sharma, S.; Agarwal, L.; Saxena, R. K. Statistical optimization for tannase production from *Aspergillus niger* under submerged fermentation. *Indian Journal of Microbiology* 47, p. 132-138, 2007.

Singhania, R. R.; Patel, A. K.; Soccol, C. R.; Pandey, A. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 44, p. 13-18, 2009.

Skene, I.; Brooker, J. D. Characterisation of the tannin acylhydrolase in the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Anaerobe* 1, p. 321-327, 1995.

Soccol, C. R.; Vandenbergher, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal* 13, p. 205-218, 2003.

Souza, R. M. Efeito do farelo de mamona detoxificado sobre os valores hematológicos de suínos. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 1979.

Stirpe, F.; Batelli, M. G. Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63, p. 1850-1866, 2006.

Treviño-Cueto, B.; Luis, M.; Contreras-Esquivel, J. C.; Rodríguez, R.; Aguilera, A.; Aguilar, C. 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.

Ulloa, J. B.; Van Weerd, J. H.; Huisman, E. A.; Verte, J. A. J. Tropical agricultural residues and their potential uses in fish feeds: the Costa Rican situation. *Waste Management* 24, p. 87-97, 2004.

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.

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.

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.

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.

Waghorn, G. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production – progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology* 147, p. 116-139, 2008.

CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE FITASE E TANASE EM BAGAÇO DE LARANJA PARA REUSO EM RAÇÃO ANIMAL.

1. Resumo

Em 2010, cerca de 30,1 milhões de toneladas de laranjas serão processados para produzir sucos, óleos essenciais e outros subprodutos. Uma grande quantidade de resíduos de processamento de citrus será descartada a cada ano. Assim, nas últimas décadas aumentou o interesse em pesquisas sobre formas alternativas de utilização destes resíduos, tais como a produção de enzimas hidrolíticas e enriquecimento de subprodutos para a alimentação animal, especialmente em fermentação em estado sólido. O objetivo deste trabalho foi utilizar o bagaço de laranja como substrato para fermentação em estado sólido para a produção simultânea de tanase e fitase, assim como avaliar seu produto em relação sua capacidade antioxidante e concentração de fibras, fenóis, taninos e cálcio. Uma cinética de fermentação foi realizada para encontrar o melhor tempo de fermentação para produção de tanase e fitase em casca de laranja utilizando *Paecilomyces variotii*. O experimento foi realizado em câmara climática a 30°C e 90% de umidade relativa do ar. A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) foi aplicado para otimizar a produção das enzimas fitase e tanase. O planejamento composto central rotacional 2² (PCCR) foi utilizado para verificar a influência das variáveis independentes, em porcentagem, ácido tânico (AT) e solução salina (SS) na atividade enzimática de fitase e tanase (U/g). Foram realizados 11 ensaios, incluindo 4 ensaios ao fatorial completo 2², 4 ensaios referentes aos pontos axiais e 3 ensaios referentes aos pontos centrais para estimar o erro puro. O resultado para o estudo da cinética de fermentação mostrou que o meio contendo bagaço de laranja apresentou maior atividade nos tempos de 72 e 96 horas para produção de fitase e tanase, respectivamente. Utilizando a MRS as melhores condições para produção de fitase foram 66% de SS, 5,8% de AT, obtendo-se uma atividade enzimática de 320 U/g de substrato. Para produção da tanase as melhores condições foram: 61% de SS, 3% de AT, obtendo-se uma atividade enzimática de 4800 U/g de substrato. A capacidade antioxidante aumentou e a concentração de fibras diminuiu para o bagaço de laranja fermentado. Não existem estudos relatados em que o *P. variotii* produziu fitase, apresentando uma alternativa para obtenção desta enzima

em fermentação em estado sólido e também para melhoramento de subprodutos para ração animal.

Palavras-chave: Tanase, Fitase, Bagaço de Laranja, Ração Animal, *Paecilomyces variotii*.

1.1. Abstract

In 2010, approximately 30.1 million tons of oranges are processed to produce juices, essential oils and other by-products. A lot of citrus processing waste is discarded every year. Thus, in recent decades, it has increased the interest in researches on alternative ways to use these wastes, such as the production of hydrolytic enzymes and the enhancement of by-products for animal food, especially in solid-state fermentation. The objective was to use orange peel as a substrate for solid-state fermentation for the simultaneous production of tannase and phytase, as well as evaluate its product against its antioxidant activity and fiber, phenols, tannins and calcium concentration. Fermentation kinetics was performed to find the best fermentation time for production of tannase and phytase in orange peel using *Paecilomyces variotii*. The experiment was conducted in a climatic chamber at 30°C and 90% relative air humidity. The Response Surface Methodology (RSM) was applied to optimize production of the phytase and tannase enzymes. The central rotational compound planning 2^2 (CRCP) was used to verify the influence of independent variables, in percentage, tannic acid (TA) and salt solution (SS) in the enzymatic activity of phytase and tannase (U/g). Eleven (11) trials were performed, including four (4) full factorial trials 2^2 , four trials regarding the axial points and three trials concerning central points to estimate pure error. The outcome for the study of fermentation kinetics showed that the medium containing orange peel showed higher activity in the periods of 72 and 96 hours to produce phytase and tannase respectively. Using MRS, the best conditions for phytase production were 66% for SS, 5.8% TA, obtaining an activity of 320 U/g phytase. For the production of the enzyme tannase, the best conditions were: 61% of SS, 3% of AT, resulting in an activity of 4,800 U/g tannase. The antioxidant activity increased and the concentration of fibers decreased for the fermented orange peel. There are no studies reported in which the *P. variotii* produced phytase, presenting an alternative to obtain this enzyme in solid-state fermentation and also for the improvement of byproducts for animal food.

Keywords: Tannase, Phytase, Orange Peel, Animal Feed, *Paecilomyces variotii*.

2. Introdução

A produção mundial de laranja para 2010 estará na ordem de 60 milhões de toneladas, sendo que metade será processada para produção de suco. Para este processamento, metade do peso da fruta é transformada em suco e o restante em subprodutos (FAO, 2003).

As indústrias de sucos têm pesquisado constantemente meios de se aproveitar integralmente a laranja. Atualmente, todos os componentes presentes na fruta são utilizados na obtenção de diversos subprodutos, como óleo essencial obtido da prensagem da casca e utilizado nas indústrias alimentícia, farmacêutica e química (Citrosuco, 2010). Pode-se produzir etanol a partir da fermentação dos açúcares encontrados no licor proveniente da prensagem do bagaço (Oberoi, 2010; Boluda-Aguilar, 2010).

A polpa cítrica proveniente da casca da laranja é muito utilizada para nutrição animal, principalmente na forma peletizada (Citrus Pulp Pellets), já que este produto pode substituir o trigo ou outros grãos na formulação da ração animal por apresentar fibras, que ajudam a estimular a fermentação ruminal (Tripodo, 2004).

Uma alternativa para o resíduo do bagaço da laranja é na produção de enzimas de interesse comercial como celulases, pectinases, glucanases ou mesmo na síntese de complexo multienzimático através da fermentação, como na produção simultânea de tanase e fitase, ambos de interesse para formulação de ração animal (Mamma, 2008; Benítez, 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção simultânea de fitase e tanase pelo *Paecilomyces variotii* através da fermentação em estado sólido utilizando bagaço de laranja como substrato, bem como determinar a concentração de compostos fenólicos, taninos, fibras, cálcio e capacidade antioxidante do produto pré e pós-fermentado.

3. Materiais e Métodos

3.1. Obtenção dos Resíduos de Laranja

O resíduo do bagaço de laranja foi doado pela indústria especializada em produção de pectina CP Kelco Headquarters – Limeira – SP, na forma seca da casca (albedo e flavedo). O resíduo foi triturado e submetido à um processo de separação granulométrica em tamis de 10 *mesh*, com 1,68 mm (Bertel Indústria Metalúrgica LTDA).

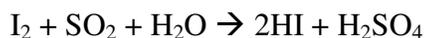
3.2. Caracterização do resíduo

3.2.1. Determinação do pH

Foram adicionados 5 mL de água deionizada a 0,5 g de amostra, a mistura foi vigorosamente agitada. Após 10 minutos, o pH do sobrenadante foi medido em potenciômetro (Marte®-MB-10).

3.2.2. Porcentagem de Água (Karl-Fischer)

Metodologia utilizada para amostras com baixa quantidade de água livre, como cereais, casca de frutas, resíduos vegetais e grãos. Baseia-se na oxidação de SO₂ pelo I₂, que constituem o reagente de Karl Fischer, na presença de água, conforme ilustrado na equação química a seguir (Laitinen, 1975).



Esta metodologia foi realizada por titulação volumétrica através do aparelho de Karl Fischer KF-1000 (Analyser). Este aparelho fornece diretamente a porcentagem de água da amostra, sendo necessário fornecer a massa de amostra adicionada no frasco de titulação.

3.2.3. Umidade

Foi postada 0,5 g de amostra em placas de Petri previamente taradas e pesadas em balança analítica. Após a incubação de 24 horas em estufa a 105°C, as mesmas foram pesadas até atingir peso constante.

3.3. Processo Fermentativo

3.3.1. Microrganismo

O microrganismo *Paecilomyces variotii* foi selecionado dentre 400 linhagens fúngicas pertencentes ao laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp. Este fungo apresentou melhor capacidade de síntese de tanase conforme descrito por Macedo e colaboradores (2005). O microrganismo foi mantido em meio Potato Dextrose Agar (PDA – OXOID - CM0139) em tubos de ensaios com suplemento de 0,2% de ácido tânico (Tanal B – Prozyn - BioSolutions) e incubados em estufa a 30°C (Estufa de Cultura Modelo 002 CB - FANEM-LTDA) durante 72 horas. A cultura vêm sendo conservada a 4°C sob camada de vaselina esterilizada e repicadas a cada três ou quatro meses de armazenamento.

3.3.2. Preparo do Pré-inóculo

O microrganismo foi repicado em meio de cultura PDA com 0,2% de ácido tânico em placas de Petri onde, depois de 72 horas de crescimento a 30°C, 10 áreas circulares de 1,54 cm² (d = 1,4 cm) foram retiradas da placa contendo o microrganismo e transferidas para um Erlenmeyer contendo 50 mL de água destilada estéril. Em seguida foi realizado uma suspensão celular com um homogeneizador do tipo Turrax (Ultra-Turrax® T50), obtendo no final uma concentração de 9×10^6 células/mL, em que a contagem foi realizada em câmara de Neubauer, adaptado por Battestin (2007b).

3.3.3. Meio de Fermentação

Em Erlenmeyers de 250 mL foram adicionados 5 g do resíduo (bagaço de laranja); 5 mL da solução salina (g/L) composto por: 1,0 de KH_2PO_4 ; 2,0 de NH_4NO_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 (Battestin, 2007b). Em seguida os Erlenmeyers foram esterilizados em autoclave a temperatura de 121°C durante 15 minutos. Após resfriar a temperatura ambiente, foi adicionada 1 mL da suspensão de esporos do *Paecilomyces variotii*, como descrito no item 3.3.2. Após a inoculação, os Erlenmeyers foram incubados em estufa a 30°C durante 120 horas.

3.3.4. Extração Enzimática

Após a fermentação procedeu-se a extração da enzima adicionando 4 partes de tampão acetato pH 5,5 – 0,02 M para 1 parte do meio de fermentação em cada Erlenmeyer. Os frascos foram agitados a 200 rpm por 1 hora (Battestin, 2007b). A solução foi filtrada em gaze e o extrato retido na filtração foi denominado extrato sólido bruto. O filtrado foi centrifugado (Beckman Coulter – Allegra™ X-22R Centrifuge) a 7100 x g por 30 minutos a 4°C, sendo então chamado de extrato enzimático bruto (Lekha, 1997). O extrato enzimático foi utilizado para determinação da atividade das enzimas tanase e fitase. O extrato sólido bruto foi utilizado para determinações analíticas de fenóis totais, taninos condensados, taninos hidrolisados, quantificação de fibras alimentares, cálcio e atividade antioxidante, conforme descrito no item 3.4.

3.3.5. Determinação da Atividade Enzimática da Tanase

A medida da atividade da enzima tanase foi realizada empregando-se 0,3 mL de substrato [solução de ácido tânico 0,7% (p/v) em tampão acetato pH 5,5 – 0,2 M]; 0,5 mL de solução enzimática, incubando a 60°C por 10 minutos, paralisando a reação pela adição de 3 mL de solução de albumina de soro bovino (BSA) na concentração de 1 mg/mL (solução preparada em tampão acetato pH 5,0 – 0,2 M, contendo 0,17 M de cloreto de

sódio), sendo em seguida centrifugada a 7100 x g durante 15 minutos a temperatura de 4°C. O precipitado contendo o ácido tânico que a enzima não hidrolisou foi ressuspensão em 3 mL de solução SDS-Trietanolamina [SDS 1% (p/v) adicionando 5% (v/v) de Trietanolamina em água destilada] acrescido 1 mL de solução de FeCl₃ (0,01M de FeCl₃ em 0,01 M de ácido clorídrico), após 15 minutos de repouso procedeu-se a leitura da absorbância a 530 nm em espectrofotômetro (Beckman Coulter DU 640), o resultado foi chamado de Abs_{teste}. O branco foi efetuado com um teste que contém todos os reagentes usados na determinação, com água destilada no lugar do extrato enzimático. O teste controle foi feito com o extrato enzimático desnaturado previamente incubado em banho de água em ebulição durante 15 minutos, que foi chamado de Abs_{controle}. A absorbância final obteve-se da seguinte forma:

$$\text{Abs} = \text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{teste}}$$

Uma unidade de atividade da enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um µmol de ácido tânico por minuto de reação nas condições testadas. O curso da reação foi acompanhado por uma curva de calibração com ácido tânico, conforme metodologia descrita por Mondal e colaboradores (2001).

3.3.6. Determinação da Atividade Enzimática da Fitase

Empregou-se o substrato sintético para fosfatase para medida da atividade de fitase. A 1000 µL de solução 5 mM 4-nitrofenilfosfato dissódico hexahidratado (Sigma) foram adicionados 500 µL de ácido acético pH 5,0 - 0,8 M e 500 µL do extrato enzimático bruto. Após 10 minutos de reação em banho com aquecimento à 37°C, a reação foi paralisada com 2 mL da solução de hidróxido de sódio 0,1 M, a liberação de p-nitrofenol foi lida a 410 nm em espectrofotômetro, o qual foi chamado de Abs_{teste}. O teste controle efetuou-se com solução enzimática incubada em tubo de ensaio em banho sob aquecimento da água em ebulição durante 15 minutos, o qual foi denominado de Abs_{controle}. A absorbância final foi obtida da seguinte forma:

$$\text{Abs} = \text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{teste}}$$

No branco, substituiu a solução enzimática por água destilada. O curso da reação foi acompanhado por uma curva de calibração de p-nitrofenol. Uma unidade de atividade da

enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de *p*-nitrofenol por minuto de reação nas condições testadas (Stockmann, 2003).

3.3.7. Cinética de Fermentação

Com o objetivo de definir a cinética de fermentação, a atividade enzimática da tanase e fitase foram determinadas em diferentes tempos: 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Definindo assim o melhor tempo de fermentação do meio para produção das enzimas, sendo este tempo utilizado na etapa de delineamento experimental.

3.3.8. Delineamento Experimental

Com objetivo principal de otimizar a produção das enzimas tanase e fitase no bagaço de laranja, foram analisados a influência da concentração do ácido tânico e volume da solução salina no meio de produção enzimática. Utilizou-se a técnica do delineamento composto central rotacional (DCCR), apresentando 4 pontos fatoriais (p.f.), 4 pontos axiais (p.a.) e 3 pontos centrais (p.c.) totalizando 11 ensaios (2^2 p.f. + 4 p.a. + 3 p.c. = 11). As 2 variáveis independentes foram: concentração de ácido tânico, que foi expresso em porcentagem em relação ao peso 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.

A concentração de ácido tânico (%) utilizada nesse estudo foi determinada de acordo com Battestin e colaboradores (2007b), onde a produção máxima de tanase foi obtida utilizando 8 a 15% de ácido tânico. Para o presente trabalho, foram testadas concentrações menores de ácido tânico a fim de reduzir os custos do meio de produção.

A quantidade de sal adicionado no meio de fermentação está descrito no item 3.3.3. Nesse estudo foi avaliado o volume de água adicionado ao meio de fermentação. A faixa de volume de água adicionada foi determinada de acordo com a capacidade máxima de absorção do substrato, sem apresentar água livre no meio, conforme Tabela 1. Os valores reais utilizados nos ensaios do planejamento estão apresentados na Tabela 2 e a matriz dos ensaios na Tabela 3.

Tabela 1. 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.

De acordo com a tabela 1, a capacidade máxima de água que o bagaço de laranja absorveu em 10 gramas foram 20 mL de água, ou seja, em um meio com bagaço de laranja e água, 66,7% do peso do meio está representado por água.

Tabela 2. 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.

Tabela 3. Matriz do delineamento contendo valores codificados das variáveis.

Ensaio	Valores Codificados*		Valores Reais*	
	volume SS (%)	AT (%)	volume SS (%)	AT (%)
1	-1	-1	54	1
2	+1	-1	64	1
3	-1	+1	54	5
4	+1	+1	64	5
5	-1,41	0	52	3
6	+1,41	0	66	3
7	0	-1,41	59	0,18
8	0	+1,41	59	5,8
9 (C)	0	0	59	3
10 (C)	0	0	59	3
11 (C)	0	0	59	3

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

Com os resultados do planejamento foi possível no software STATISTICA 7.0 a determinação dos coeficientes de regressão para a resposta de interesse, calculou a ANOVA para analisar a possibilidade de construir a equação da resposta em função dos coeficientes de regressão estatisticamente significativo e também a superfície de resposta, com nível de significância de 10% (p-valor<0,1).

3.3.9. Determinação da Umidade Relativa do Ar

Um ensaio foi realizado para avaliar a influência da umidade relativa do ar da Câmara Climática (Nova Ética-Modelo 420/CLDTS 300) no meio de produção enzimático otimizado. As faixas estudadas foram de 90, 80 e 70% de umidade relativa do ar, os resultados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) e Tukey com 90% de confiabilidade.

3.4. Determinações Analíticas

O objetivo principal desta etapa foi avaliar as concentrações de compostos de valor nutricional no meio pré-fermentado e pós-fermentado, como: fenóis totais, taninos hidrolisáveis, condensados, capacidade antioxidante, presença de fibras e cálcio.

3.4.1. Extração de Fenóis Totais

Foram utilizadas os seguintes solventes para o processo de extração, na proporção de 50% do solvente e 50% de água: Acetato de Etila, Acetona e Metanol. Também foi testado com o solvente Hexano em sua forma anidra (100%). Foram pesados 200 mg da amostra em 10 mL do solvente, em seguida foram incubados a temperatura ambiente com agitação de 150 rpm durante 120 minutos. Após a homogeneização foram centrifugados a 1320 x g a 5°C durante 15 minutos e analisados por determinação de Fenóis Totais (Naczka, 2004; Schons, 2009).

3.4.2. Determinação de Fenóis Totais

Foi utilizada a técnica de Follin-Ciocalteu (Singleton, 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 760 nm.

Em um Erlenmeyer de 50 mL foram adicionados 1 mL do reagente Follin-Ciocalteu, 10 mL de água destilada, 1 mL da amostra e deixou-se em repouso durante 3 minutos. Foram adicionados 8 mL de carbonato de sódio (7,5%) e a reação ocorreu por 2 horas em local escuro. 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.

3.4.3. Determinação de Taninos Hidrolisáveis

Foi empregada a metodologia de Brune e colaboradores (1991) sendo que a extração das amostras foi realizada como indicado para os fenóis totais. Utilizou-se uma solução de sulfato de ferro (III) e amônio, denominada FAS. A solução era 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%.

Em um tubo de ensaio adicionou-se 2 mL da amostra em estudo e 8 mL da solução FAS. 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.

3.4.4. Determinação de Taninos Condensados

Empregou-se a metodologia de Prince e colaboradores (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 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 metanol).

O 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 com catequina, conforme metodologia descrita.

3.4.5. Capacidade Antioxidante

Metodologia utilizada foi a de Re e colaboradores (1998) que mensurou a habilidade de um composto seqüestrar 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. A utilização do ABTS apresenta vantagens como a determinação antioxidativa em compostos hidrossolúveis e lipossolúveis, diferentemente do DPPH que se mensura amostras do tipo lipossolúveis (Re, 1998). 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, 2006). A metodologia envolve a produção direta do cromóforo $ABTS^+$, 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 $ABTS^+$ 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 $ABTS^+$ 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 à 16 h. Esta solução foi diluída com etanol até absorbância de 0,7, medida à 734 nm. As amostras foram diluídas em metanol até absorbância entre 0,7 e 0,5 de leitura à 734 nm, em seguida a reação foi conduzida no espectrofotômetro durante 60 minutos. A curva padrão foi feita com 1 mL do $ABTS^+$ diluído em 10 μ L de Trolox até concentração de 15 μ M. Os resultados foram expressos em capacidade antioxidante equivalente a Trolox.

3.4.6. Fibras Alimentares Totais, Solúveis e Insolúveis

A metodologia usada foi da AOAC (1995), que conseguiu mensurar as fibras solúveis, insolúveis e totais no bagaço da laranja. 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 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.

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.

3.4.7. Determinação de Cálcio

Seguiu-se a metodologia de Jalbani e colaboradores (2007), com modificações. 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 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 sequem. Os tubos foram retirados e resfriados a temperatura ambiente. Com o auxílio de uma pisseta, adicionou-se aproximadamente 5 mL de água deionizada aos tubos de digestão e em seguida agitados. Transferiu-se, cuidadosamente, o conteúdo dos tubos para balões volumétricos de 25 mL e completou com água deionizada. Transferiu as amostras para

frascos plásticos. Foi efetuado as determinações de cálcio em espectrofotômetro de absorção atômica (*Atomic Absorption Spectrometer A Analyst 400 PerkinElmer precisety*), 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.

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização do Resíduo

Os resultados do pH, quantidade de água (porcentagem de água presente na amostra) e umidade relativa do bagaço de laranja desidratado estão representados na Tabela 4.

Tabela 4. pH, quantidade de água e umidade relativa do bagaço de laranja desidratado.

Bagaço de Laranja	
Teste	Média
pH	4,1 ± 0,01
Água (%)	8,1 ± 0,19
Umidade (%)	14,27 ± 0,18

A solução com bagaço de laranja apresentou pH de 4,1, sendo provavelmente por apresentar compostos de caráter ácido como a pectina. A quantidade de água presente na amostra e o teor de umidade apresentam valores de 8,01% e 14,27% do peso total, respectivamente. Isso acontece, provavelmente porque o bagaço de laranja apresenta compostos que conseguem aprisionar soluções aquosas em seu meio, como a pectina.

4.2. Cinética de Fermentação

O melhor tempo de fermentação para produção enzimática da tanase foi de 96 horas, como indicado na Tabela 5.

Tabela 5. 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 partir de 96 horas de fermentação a atividade enzimática manteve-se estatisticamente constante.

Para enzima fitase, o melhor tempo de fermentação para sua produção foi em 72 horas, sendo estatisticamente constante após 96 horas, com redução em 120 horas, conforme indicado na Tabela 6.

Tabela 6. Avaliação da cinética de fermentação para atividade fitásica em Bagaço de Laranja.

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

4.3. Delineamento Experimental

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 fitase após 72 horas de fermentação, o segundo delineamento foi com a variável dependente atividade enzimática da tanase após 96 horas de fermentação.

4.3.1. DCCR para Produção de Fitase

Apresenta-se na Tabela 7 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.

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 ₁	x ₂	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

x₁ = volume SS (%) = % do volume da Solução Salina em relação ao peso total (v/p) ; x₂ = AT (%) = % do peso do ácido tânico em relação ao peso total (p/p).

Analisando-se os valores de atividade obtidos na Tabela 7, 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).

A Tabela 8 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).

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.

	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor	Limite de Confiança -90,%	Limite de Confiança +90,%
Média*	27,58	2,52	10,95	0,000	22,50	32,66
(1) volume SS (%) (L)*	3,11	1,54	2,02	0,100	0,01	6,22
volume SS (%) (Q)*	8,28	1,84	4,51	0,006	4,58	11,98
(2) AT (%) (L)*	10,85	1,54	7,03	0,001	7,74	13,96
AT (%) (Q)	1,69	1,84	0,92	0,401	-2,01	5,38
1L x 2L*	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.

De acordo com a Tabela 8, 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.

A análise de variância (ANOVA) está representada na Tabela 9.

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 _{cal}	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			

R²=0,95 F_{tab(0,1;4;6)}=3,18 F_{tab(0,1;4;2)}=9,24

As medidas de correlação utilizadas para se estimar o modelo foram o coeficiente de correlação (R) e o coeficiente de determinação (R²). 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 partir da ANOVA foi de 131,09 (14,19 vezes maior do que o valor de F_{tabelado}=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 F_{tabelado}=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. A Figura 3 mostra os efeitos dos componentes 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*.

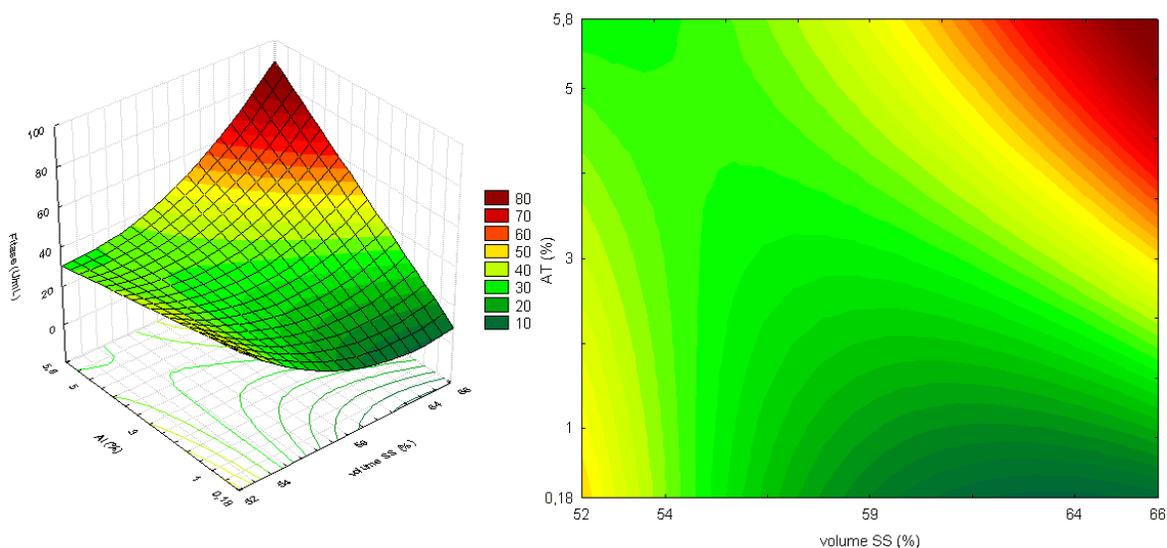


Figura 3. Superfície de Resposta e Curva de Contorno para Atividade da Fitase (U/mL)

A Figura 3 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 10.

Tabela 10. Umidade relativa do meio de cultivo antes e após incubação na câmara climática para produção de fitase em bagaço de laranja.

Umidade Relativa do 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.

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 equilíbrio da água presente no meio com o ar.

Utilizando o processo de otimização, as melhores condições para a produção da fitase, em 10 g de meio, seriam: 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. Não existem estudos relacionando a produção de fitase pelo fungo *Paecilomyces variotii*, representando este estudo uma inovação quanto à produção de fitase por fermentação em estado sólido.

A atividade de fitase foi maior do que a obtida pela linhagem *Aspergillus niger* PD com 6,73 UA/g de matéria seca, em que as células foram fermentadas, em estado sólido, em meio de cultivo contendo resíduo de mandioca com 65% do seu peso total representado por solução salina, à temperatura de 30°C durante 7 dias de fermentação (Hong, 2001). O microrganismo *Rhizopus oligosporus* apresentou atividade fitásica de 14,29 UA/g de substrato seco, este substrato apresentava torta de côco com 54,5% do seu peso total representado por água (umidade do meio de cultura) em fermentação em estado sólido a 30°C durante 96 horas de fermentação (Sabu, 2002). Outro estudo usando torta de côco suplementado com glicose, caseína e sulfato de amônio apresentou atividade de 26 U/g de matéria seca, também em fermentação em estado sólido com o fungo *Mucor racemosus* (Bogar, 2003). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresentou uma atividade de 0,06 UA/mL em 72 horas de incubação utilizando substrato sintético (4-nitrofenilfosfato) e 0,15 UA/mL em 96 horas de incubação utilizando fitato de sódio como substrato (Ries, 2009). Chadha e colaboradores (2004) demonstraram que o microrganismo *Rhizomucor pusillus* produziu a fitase em meio otimizado a 50°C e após 48 horas de incubação a atividade foi de 9,18 UA/g de substrato em fermentação em estado sólido.

4.3.2. DCCR para Produção de 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 estudadas foram: a concentração do ácido tânico e a porcentagem do volume da solução salina adicionada em relação ao meio.

Apresenta-se na Tabela 11 a matriz das variáveis independentes em estudo, com valores reais e codificados, e a variável dependente tanase durante 96 horas de incubação.

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 ₁	x ₂	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

x₁ = volume SS (%) = % do volume da Solução Salina em relação ao peso total (v/p) ; x₂ = AT (%) = % do peso do ácido tânico em relação ao peso total (p/p).

Analisando-se os valores das atividades obtidas na Tabela 11, 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).

A Tabela 12 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 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 de Regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor	Limite de Confiança -90,%	Limite de Confiança +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.

Com os resultados da Tabela 12, 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 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 _{cal}	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			

R²=0,83 F_{tab(0,1;3;7)}=3,07 F_{tab(0,1;5;2)}=9,29

Para o coeficiente de correlação (R) o valor obtido foi de 0,91; para o coeficiente de determinação (R²) 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_{tabelado}=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_{tabelado}=3,07), indicando que o modelo 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 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. A Figura 4 mostra os efeitos dos componentes concentração de ácido tânico e porcentagem do volume da solução salina em relação ao peso total do meio, na produção de tanase pelo *Paecilomyces variotii*.

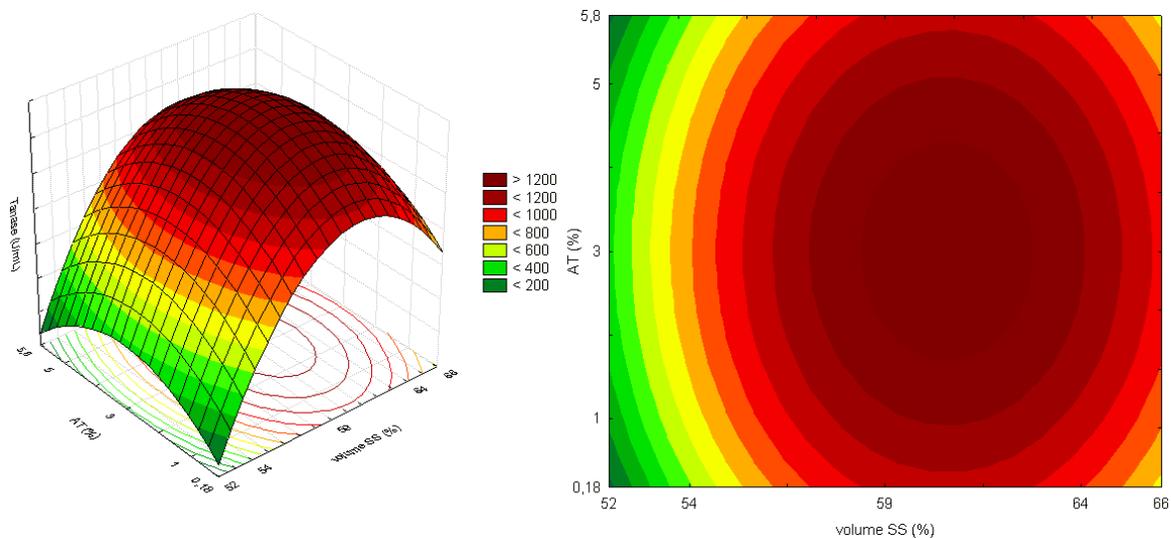


Figura 4. Superfície de Resposta e Curva de Contorno para Atividade da Tanase (U/mL)

A Figura 4 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.

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 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 14.

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).

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

A umidade relativa do meio presente antes da fermentação foi de 60% e após incubação na Câmara houve um aumento de 10%, resultando em 70%. Assim a Câmara Climática adicionou 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.

Utilizando o processo de otimização, as melhores condições para a produção da tanase, em 10 g de meio, seriam: 6,1 mL de SS (%), 0,3 g de AT (%), 2,82 g de bagaço de laranja. Obtendo-se dessa forma uma atividade de 1200 U/mL ou 4800 U/g de substrato na fermentação pela linhagem *P. variotii*.

4.3.3. Análise da Umidade Relativa do Ar no meio de Produção em Bagaço de Laranja

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 15 demonstra os valores obtidos na média da atividade enzimática tanásica em suas respectivas taxas de umidade e desvio padrão a 90% de significância.

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, 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.

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.

Um estudo foi realizado utilizando folhas de Jambolão (*Syzygium cumini*) como substrato para fermentação em estado sólido, a 25°C após 96 horas de fermentação, com o microrganismo identificado como *Aspergillus fumigatus* MA. O rendimento máximo enzimático da tanase foi de 174,32 UA/g de substrato, o meio utilizado apresentava uma relação de 1:1 de substrato e água com suplementação de glicose e nitrato de amônio como fontes de carbono e nitrogênio (Manjit, 2008).

Banerjee e colaboradores (2007) estudaram diferentes resíduos agroindustriais para produção de tanase em fermentação em estado sólido com o microrganismo *Aspergillus aculeatus* DBF9 e incubados a 30°C após 72 horas. Os resíduos foram farelo de trigo, farelo de arroz, bagaço da cana de açúcar, resíduo de palha de arroz, em que foram obtidas atividades enzimáticas de 3,95; 2,93; 1,32 e 1,39 U/g de substrato, respectivamente.

Foi realizado um estudo para obter maior rendimento de produção da tanase. O meio de cultivo era constituído por farelo de trigo como substrato sólido inerte, umidade do meio entre 50 a 60% em relação ao peso total do meio; 1,5% de ácido tânico, 1% de glicose e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. A produção enzimática foi por fermentação em estado sólido a temperatura de 35°C após 60 horas de incubação com o *Paecilomyces variotii*, sendo que a atividade máxima foi de 167 UA/mL (Raaman, 2009).

Battestin e colaboradores (2007b) realizaram um planejamento experimental em fermentação em estado sólido para otimização da produção da tanase em farinha de trigo suplementado com resíduo de café e ácido tânico. O microrganismo utilizado foi o *Paecilomyces variotii*, em que o substrato foi fermentado à 30°C após 120 horas. A produção enzimática otimizada foi de 1200 UA/mL ou 4800 UA/g de substrato.

Sabu e colaboradores (2005) utilizaram resíduo de tamarindo como substrato, suplementado com ácido tânico à 5% em relação ao peso total do meio e 65% de solução salina. A atividade tanásica foi de 6,44 UA/g de substrato, que foi fermentado com a linhagem *Aspergillus niger* ATCC 16620 à 30°C após 120 horas de incubação.

4.4. Determinações Analíticas

4.4.1. Determinação de Fenóis Totais, Taninos Hidrolisáveis e Condensados no Bagaço de Laranja

Foi realizada inicialmente a escolha do solvente para extração de Fenóis Totais nas amostras em estudo. Na Tabela 16 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 16. Concentração de Fenóis Totais em bagaço de laranja não fermentado em diferentes tipos de solventes.

Fenóis Totais (mg/g de amostra)	
Solvente*	Média
Acetato de Etila	35,59 ± 2,57
Acetona	46,27 ± 1,91
Metanol	30,77 ± 1,65
Hexano	2,01 ± 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.

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. Existem vários trabalhos mostrando diferentes tipos de solventes para extração de fenóis, concluindo que não existe um padrão a se seguir para amostras em alimentos, mas podemos confirmar que solventes apolares não apresentam melhores efeitos para extração dos mesmos, indicando que os compostos presentes nas amostras apresentam características polares.

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 17.

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

*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.

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 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 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, 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. Provavelmente não se obteve uma concentração mínima de amostra no processo de extração citado no item 3.4.1.

Khan e colaboradores (2010) quantificaram compostos fenólicos em bagaço de laranja, usando etanol como solvente. Verificaram a presença de 275,8 mg/100 g de matéria. Uma concentração mais baixa em relação ao presente trabalho, da ordem de 10 vezes.

Faller e colaboradores (2010) determinaram a concentração de fenóis em alguns alimentos, dentre eles a laranja. Separaram a polpa do bagaço para quantificar em cada parte da fruta e usaram metanol a 50% como solvente para extração dos compostos. Constataram que o bagaço de laranja apresentou maior concentração de fenóis do que a polpa. Mas a concentração estava abaixo do verificado com o presente trabalho.

Ventura e colaboradores (2009) utilizaram o fungo da espécie *Aspergillus niger* GH1 para produzir tanase em folhas de duas espécies de vegetais, presentes em regiões áridas, como substrato: *Flourensia cernua* e *Larrea tridentata*. O microrganismo biotransformou mais de 75% do tanino presente na amostra em ácido gálico, que é um composto fenólico, apresentando cerca de 80 mg/kg de amostra após quatro dias de fermentação.

Kanaze e colaboradores (2009) reportaram a presença de flavonóides no bagaço de laranja, provenientes da Grécia. O solvente utilizado para extração foi uma solução 1:1 de água e metanol. Pelo método cromatográfico (CLAE) identificou a presença de hesperidina, diosmina e naringina, compostos fenólicos glicosilados, na concentração de 47,78; 2,16 e 0,05 mg/g de matéria seca, sendo os principais flavonóides presentes no bagaço.

Aguilar e colaboradores (2008) quantificaram taninos hidrolisáveis em folhas de *Larrea tridentata* e bagaço de *Punica granatum* durante processo fermentativo em estado sólido utilizando *Aspergillus niger* GH1. Para as folhas de *Larrea tridentata* a presença de

galotânicos foi mais expressiva; no bagaço de *Punica granatum* os elagitaninos que apresentaram maior concentração. Em ambos os substratos o microrganismo conseguiu hidrolisá-los para ácido gálico e ácido elágico após 96 horas de incubação. Mostrando que o microrganismo utilizou estes compostos como fonte de carbono para seu crescimento.

Dei e colaboradores (2010) estudaram a influencia da dieta de nozes de *Vitellaria paradoxa* fermentada com algumas espécies fúngicas como *Ceriporiopsis subvermispora* e *Aspergillus niger*. O material fermentado diminuiu sua concentração de taninos hidrolisáveis de 3,4 para até 0,7 mg/g de amostra, tornando o produto com menor concentração de compostos antinutricionais para uso em ração animal.

Foi determinada a concentração de taninos hidrolisáveis antes e após fermentação por *Paecilomyces variotii* em farinha de sorgo e suplementação de tanase e fitase. A farinha de sorgo apresentava 64 mg de taninos hidrolisáveis em 100 g de amostra, depois da aplicação das enzimas e/ou microrganismo a concentração caiu 90%. Entre as amostras não houve diferença estatística, demonstrando possível hidrólise por tratamento enzimático ou biológico (microrganismo), entretanto não podemos afirmar com certeza pois a diminuição pode ter ocorrido pelo tratamento físico, que foram maceração e aquecimento (Schons, 2009).

Clifford e colaboradores (2000) reportaram a presença de elagitaninos, um dos principais taninos hidrolisáveis, em algumas espécies vegetais de interesse econmico como: castanha de caj, pistache, avelã, manga, caqui, goiaba, romã, damasco, psseg, morango, framboesa, amora e uva, sendo na maioria das vezes encontrada em folhas.

Em sorgo do tipo vassoura foram detectados 67,3 mg de taninos condensados a cada grama de amostra. Esta amostra foi fermentada por *Paecilomyces variotii* e em seguida detectada a presença de taninos na concentração de apenas 0,045 mg/g de amostra, mostrando que o microrganismo hidrolisou-o (Schons, 2009).

4.4.2. Capacidade Antioxidante

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 18.

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).

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

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, conseqüentemente, 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. Para trabalhos futuros, uma análise por cromatografia líquida de alta eficiência nestas amostras seria adequada para determinar os compostos presentes.

A Figura 5 apresenta a capacidade antioxidante das amostras em estudo durante 60 minutos de reação.

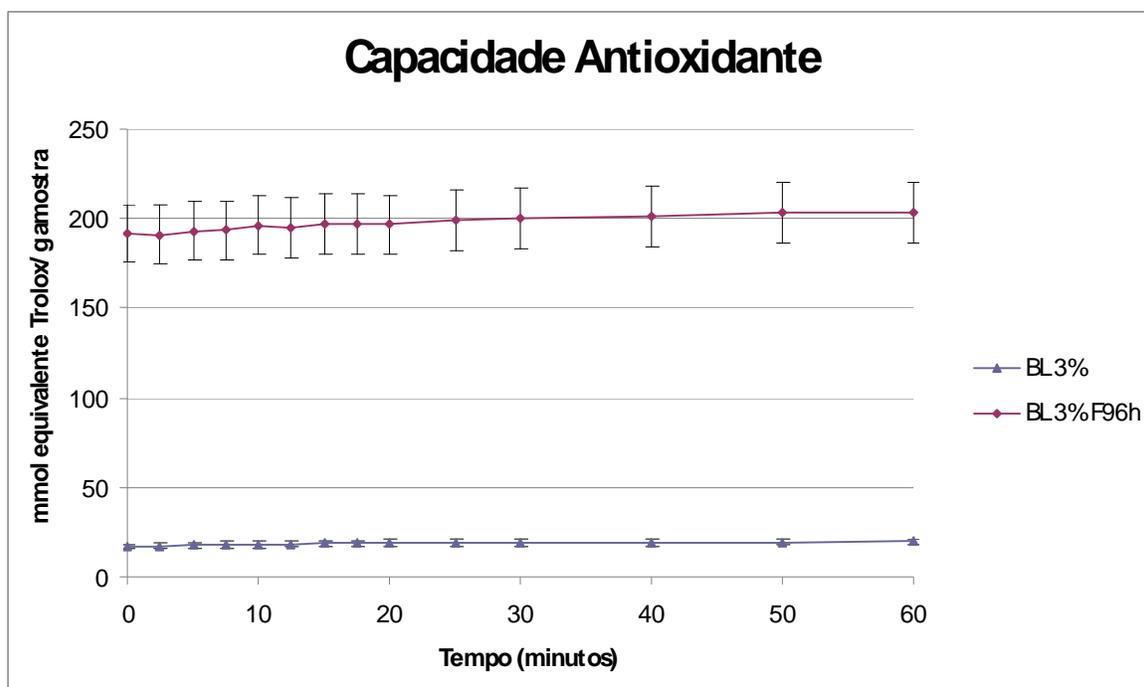


Figura 5. Capacidade Antioxidante das amostras durante 60 minutos de reação.

Estudou-se a influência do processo de desidratação em bagaço e polpa da laranja. De acordo com os resultados houve um aumento da capacidade antioxidante de bagaço de laranja após o processo de desidratação, que foram feitos por secagem e aquecimento, principalmente a temperaturas de 60°C (Garau, 2007).

Anagnostopoulou e colaboradores (2006) relataram em laranja da espécie *Citrus sinensis*, atividade antioxidante, sendo atribuída pela presença de flavanonas glicosiladas, flavonas e flavanóis.

Jayaprakasha e colaboradores (2008) publicaram a capacidade antioxidante de laranjas das variedades Navel e Toranja. Foram realizadas extrações com diferentes tipos de solvente e relataram que metanol apresentou melhor capacidade de extração para a atividade antioxidante nas duas variedades sendo 2,3 mmol/g de amostra para Toranja e 2 mmol/g para Navel. Para a atividade usando o método de DPPH, foi publicada uma inibição acima de 90% da atividade oxidativa, utilizando 1000 µg de amostra por mL de etanol ou acetona para Toranja e somente etanol para variedade Navel. Estes valores estão abaixo dos apresentados neste trabalho, essa diferença pode ser explicada, pois foram usadas amostras de diferentes regiões.

Kanaze e colaboradores (2008) apresentaram a atividade antioxidante de bagaço de laranja cultivada na Grécia para uso na produção comercial de hesperidina. Diferentes frações de extração foram testadas pelo método DPPH, que determinou a concentração de apenas 10 mg da amostra por mL da solução.

Aguilar e colaboradores (2008) publicaram o aumento da concentração de compostos com capacidade antioxidante em materiais fermentados como bagaço de romã e folhas da espécie *Larrea tridentata*. Foi relacionado o aumento da presença de ácido gálico e ácido elágico para o aumento da capacidade antioxidante, também foi relatada a produção de ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico em fermentação em estado sólido.

Battestin e colaboradores (2008) demonstraram a atividade antioxidante de chá verde após aplicação de tanase produzida por *Paecilomyces variotii*. Os resultados relataram que a suplementação de tanase no produto aumentou a atividade antioxidativa já que a enzima hidrolisou taninos e liberou ácido gálico e epigalocatequina.

4.4.3. Fibras Alimentares Dietéticas Totais, Solúveis e Insolúveis

A Tabela 19 apresenta as médias e seus desvios padrões da porcentagem de fibras alimentares dietéticas totais, insolúvel e solúvel, respectivamente.

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

*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).

De acordo com os resultados, o bagaço de laranja desidratado apresentou maior 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 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.

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.

A Figura 6 ilustra a concentração de fibras presentes em cada amostra: (a) BL 5,8% F72h; (b) BL 3% F96h.

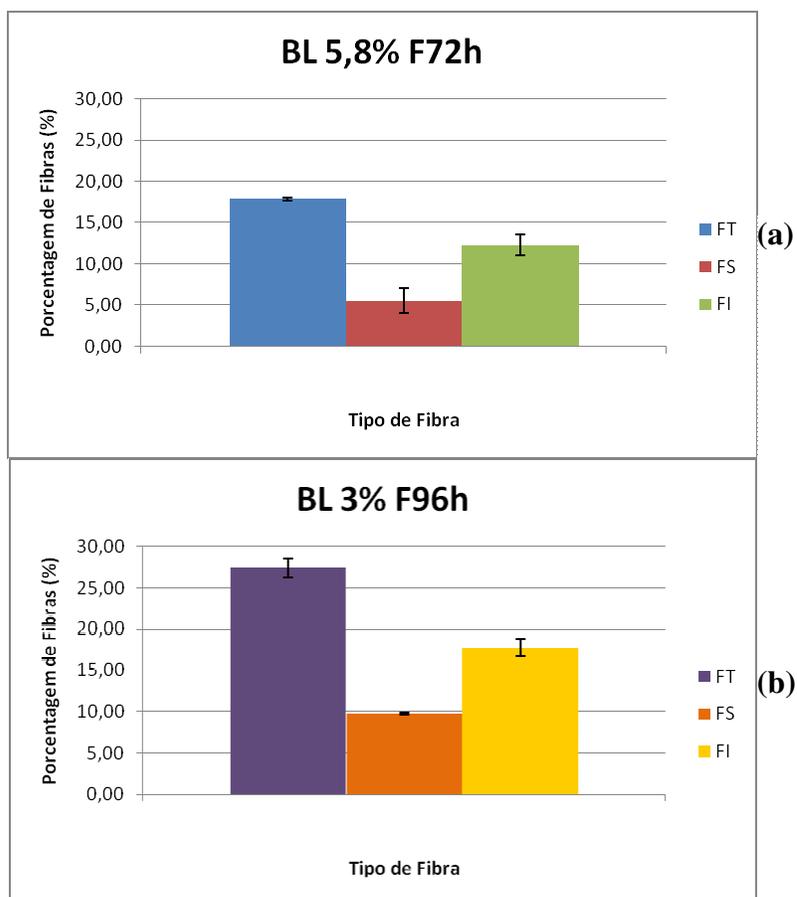


Figura 6. Porcentagem de Fibras Alimentares Dietéticas nas amostras: (a) BL 5,8% F72h; (b) BL 3% F96h.

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.

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.

Larrauri e colaboradores (1997) avaliaram a concentração de fibras presentes no bagaço de laranja e sua associação com a capacidade antioxidante. De acordo com os resultados a concentração de fibras totais foi entre 61 a 69% e das fibras solúveis foram entre 19 a 22%. A capacidade antioxidante do bagaço foi determinada, e concluíram por CLAE que os compostos presentes nas fibras que induziam a proteção antioxidativa eram ácidos cafeico e ferúlico, naringina, hesperidina e miricetina.

Montagne e colaboradores (2003) publicaram a importância da presença de fibras alimentares dietéticas para saúde e manutenção da microflora do intestino grosso, como o aumento da proteção de infecções entéricas, doenças cardiovasculares e sistêmicas e outras doenças crônicas.

Em contrapartida, existem estudos em que a presença de fibras juntamente com fitato inibe a absorção de cálcio em animais, assim com a diminuição de fitato pela ação da enzima fitase e concomitante redução na concentração de fibras na amostra, a taxa de absorção de cálcio no trato gastrointestinal será maior com a fermentação do substrato (Lönnerdal, 1989; Heaney, 1991; Harrington, 2001). Entretanto, um estudo de digestibilidade do bagaço, antes e após fermentação, em animais deve ser realizado para avaliar seus efeitos.

4.4.4. Determinação de Cálcio

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 20.

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

Concentração de cálcio (mg/kg de amostra)	
Amostra*	Média
BL	143,5 ± 4,8
BL 5,8% F72h	32 ± 0,8
BL 3% F96h	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).

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. Um estudo, em trabalhos futuros, deverá ser realizado nesta fração líquida para quantificar o cálcio presente, para que se possa concluir a concentração total do cálcio presente antes da fermentação.

Entretanto, podemos afirmar que processos fermentativos alteram os níveis da bioacessibilidade de minerais, neste caso o cálcio, em amostras orgânicas, principalmente em vegetais (Poutanen, 2009).

Foi realizado em reatores de auto hidrólise não isotérmica um estudo para determinar a composição química do bagaço de laranja antes e após este processo. De

acordo com os resultados, o processo de auto hidrólise aumentou a concentração de cálcio, passando de 5,46 mg/kg para 155 mg/kg de amostra (Rivas, 2008).

Topuz e colaboradores (2005) publicaram a quantificação de minerais em 4 variedades de laranjas, em relação ao suco da fruta. De acordo com os resultados, foram encontrados entre 53 a 94 mg de cálcio por litro de amostra entre as variedades.

Sripriya e colaboradores (1996) estudaram o aumento da biodisponibilidade de minerais pela fermentação natural da espécie vegetal *Eleusine coracana*, conhecido como Capim Pé de Galinha. Os resultados mostraram que houve um aumento da biodisponibilidade de minerais, principalmente zinco e cálcio. A concentração de fitato diminuiu em torno de 60% na amostra.

5. Conclusões Parciais

Obteve-se pela primeira vez uma produção simultânea das enzimas tanase e fitase, utilizando o processo de fermentação em estado sólido. Estas enzimas são de grande interesse para indústria de ração animal e foram obtidas a partir de um único microrganismo, o fungo filamentosso *Paecilomyces variotii*.

Foi possível produzir as enzimas tanase e fitase a partir do bagaço de laranja, utilizando um subproduto do setor agroindustrial. Foi observado que houve um decréscimo na concentração do indutor ácido tânico para produção da enzima tanase, podendo diminuir o custo de produção.

Através do processo fermentativo foi possível aumentar a capacidade antioxidante do bagaço de laranja e com isso estimular o interesse em sua utilização como ração animal. Porém, houve um decréscimo na quantidade de fibras presentes no bagaço após a sua fermentação, prejudicando sua utilização em relação ao processo de digestibilidade durante a passagem do trato gastrointestinal.

6. Referências Bibliográficas

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 tridentate*) leaves. *Food Technology and Biotechnology* 46, p. 218-222, 2008.

Anagnostopoulou, M. A.; Kefalas, P.; Papageorgiou, V. P.; Assimopoulou, A. N.; Boskou, D. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chemistry* 94, p. 19-25, 2006.

AOAC. *Official methods of analysis (method 985.29 – Total Dietary Fiber in Foods)* (16th ed). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 1995.

Banerjee, D.; Mondal, K. C.; Pati, B. R. Tannase Production by *Aspergillus aculeatus* DBF9 through solid-state fermentation. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 54, p. 159-166, 2007.

Battestin, V.; Macedo, G. A. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. *Bioresource Technology* 98, p. 1832-1837, 2007b.

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.

Benítez A.; Sánchez, O. Evaluation of agro-industrial by-products for α -galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in submerged culture. *Chemical Engineering Transactions* 17, p. 1155-1160, 2009.

Bogar, B.; Szakacs, G.; Pandey, A.; Abdulhameed, S.; Linden, J. C.; Tengerdy, R. P. Production of phytase by *Mucor racemosus* in solid-state fermentation. *Biotechnology Progress* 19, p. 312-319, 2003.

Boluda-Aguilar, M.; García-Vidal, L.; González-Castañeda, F. P.; López-Gómez, A. Mandarin peel wastes pretreatment with steam explosion for bioethanol production. *Bioresource Technology* 101, p. 3506-3513, 2010.

Brune, M. Hallberg, L. Skånberg, A. Determination of iron-binding phenolic groups in foods. *Journal of Food Science* 56, p. 128-131, 1991.

Chadha, B. S.; Harmeet, G.; Mandeep, M.; Saini, H. S.; Singh, N. Phytase production by the thermophilic fungus *Rhizomucor pusillus*. *World of Microbiology & Biotechnology* 20, p. 105-109, 2004.

Citrosuco (Grupo Fischer). Laranjas – sucos, óleos essenciais, polpa cítrica e álcool, 2010. Available from: <<http://www.citrosuco.com.br/fischer/fischer/sites/fischer/citrosuco/pr/odutos/produtos/sucos.html>>.

Clifford, M. N.; Scalbert, A. Review: Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, p. 1118-1125, 2000.

Dei, H. K.; Rose, S. P.; Mackenzie, A. M.; Effects of fungal (*Aspergillus niger* or *Ceriporiopsis subvermispota*) fermentation on the nutritive value of shea nut (*Vitellaria paradoxa*) meal for broiler chicks. *British Poultry Science* 49, p. 360-367, 2008.

Faller, A. L. K.; Fialho, E. Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, Impress, 2010.

FAO (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>>.

Garau, M. C.; Simal, S.; Rosselló, C.; Femenia, A. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of Orange (*Citrus aurantium* v. Canoneta) by-products. *Food Chemistry* 104, p. 1014-1024, 2007.

Harrington, M. E.; Flynn, A.; Cashman, K. D. Effects of dietary fibre extracts on calcium absorption in the rat. *Food Chemistry* 73, p. 263-269, 2001.

Heaney, R. P.; Weaver, C. M.; Fitzsimmons, M. C. Soybean phytate content: effect on calcium absorption. *American Journal of Clinical Nutrition* 53, p. 745-747, 1991.

Hong, K.; Ma, Y.; Li, M. Solid-state fermentation of phytase from cassava dregs. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 91-93, p. 777-785, 2001.

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.

Jayaprakasha, G. K.; Girenavar, B.; Patil, B. S. Antioxidant capacity of pummelo and navel oranges: Extraction efficiency of solvents in sequence. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie – Food Science and Technology* 41, p. 376-384, 2008.

Kanaze, F. I.; Termentzi, A.; Gabrieli, C.; Niopas, I.; Georgarakis, M.; Kokkalou, E. The phytochemical analysis and antioxidant activity assessment of orange peel (*Citrus sinensis*) cultivated in greece-crete indicates a new commercial source of hesperidin. *Biomedical Chromatography* 23, p. 239-249, 2009.

Khan, M. K.; Abert-Vian, M.; Fabiano-Tixier, A.; Dangles, O.; Chemat, F. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry* 19, p. 851-858, 2010.

Laitnen, H. A. Boyer, K. W. Automobile exhaust particulates properties of environmental significance. *Environmental Science and Technology* 279, p. 457-1086, 1975.

Larrauri, J. A.; Rupérez, P.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. High dietary fibre powders from orange and lime peels: associated polyphenols and antioxidant capacity. *Food Research International* 29, p. 757-762, 1996.

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.

Lönnerdal, B.; Kunz, C.; Sandberg, A. S.; Sandström, B. Inhibitory effects of various inositol phosphates on zinc and calcium absorption. *Journal of Nutrition* 119, p. 211-214, 1989.

Macedo, G. A.; Matsuda, L. K.; Battestin, V. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais. *Ciência e Agrotecnologia* 29, p. 833-838, 2005.

Mamma, D.; Kourtoglou, E.; Christakopoulos, P. Fungal multienzyme production on industrial by-products of citrus-processing industry. *Bioresource Technology* 99, p. 2373-2383, 2008.

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.

Mondal, K. C. Banerjee, D. Jana, M. Pati, B. R. Colorimetric assay method for determination of the tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity. *Analytical Biochemistry* 295, p. 168-171, 2001.

Montagne, L.; Pluske, J. R.; Hampson, D. J. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Animal Feed Science and Technology* 108, p. 95-117, 2003.

Naczka, M.; Shahidi, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* 1054, p. 95-111, 2004.

Oberoi, H. S.; Vadlani, P. V.; Madl, R.; Saída, L.; Abeykoon, J. P. Ethanol production from orange peels: Two-stage hydrolysis and fermentation studies using optimized parameters through experimental design. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, p. 3422-3429, 2010.

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.

Poutanen, K.; Flander, L.; Katina, K. Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiology* 26, p. 693-699, 2009.

Raaman, N.; Mahendran, B.; Jaganathan, C.; Sukumar, S.; Chandrasekaran, V. Optimisation of extracellular tannase production from *Paecilomyces variotii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26, p. 1033-1039, 2009.

Re, R. Pellegrini, N. Proteggente, A. 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.

Ries, E. F., Macedo, G. A. Progressive screening of thermostable yeasts for phytase production. *Food Science and Biotechnology* 18, p. 655-660, 2009.

Rivas, B.; Torrado, A.; Torre, P.; Converti, A.; Domínguez, J. M. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, p. 2380-2387, 2008.

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. 1223-1228, 2005.

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.

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.

Singleton, V. L. Rossi, J. A. J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdc phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 20, p. 144-158, 1965.

Sripriya, G.; Antony, U.; Chandra, T. S. Changes in carbohydrate, free amino acids, organic acids, phytate and HCl extractability of minerals during germination and fermentation of finger millet (*Eleusine coracana*). *Food Chemistry* 58, p. 345-350, 1997.

Stockmann, C.; Losen, M.; Dahlems, U.; Knocke, C.; Gellissen, G.; Buchs, J. Effect of oxygen supply on passaging, stabilizing and screening of recombinant *Hansenula polymorpha* production strains in test tube cultures. *FEMS Yeast Research* 4, p. 195-205, 2003.

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.

Topuz, A.; Topakci, M.; Canakci, M.; Akinci, I.; Ozdemir, F. Physical and nutritional properties of four orange varieties. *Journal of Food Engineering* 66, p. 519-523, 2005.

Tripodo, M. M.; Lanuzza, F.; Micali, G.; Coppolino, R.; Nucita, F. Citrus waste recovery: a new environmentally friendly procedure to obtain animal feed. *Bioresource Technology* 91, p. 111-115, 2004.

Rodrigues, M. I. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos. 1a.Ed. – Campinas, SP: *Casa do Pão Editora*, 2005.

Ventura, J.; Gutiérrez-Sanchez, G.; Rodríguez-Herrera, R.; Aguilar, C. N. Fungal cultures of tar bush and creosote bush for production of two phenolic antioxidants (pyrocatechol and gallic acid). *Folia Microbiologica* 54, p. 199-203, 2009.

Capítulo 3: PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE FITASE E TANASE E DETOXIFICAÇÃO DE TORTA DE MAMONA PARA REUSO EM RAÇÃO ANIMAL.

1. Resumo

Para produção de biodiesel, o óleo proveniente da mamona se destaca entre as sementes oleaginosas. Além do óleo, a mamona após a extração produz a torta que é de grande interesse para fertilização orgânica. A torta também apresenta alta concentração de proteínas, o que traz possibilidades para sua utilização como ingrediente para nutrição animal. No entanto, essa aplicação enfrenta problemas na presença de toxinas, principalmente da ricina, uma proteína que impede a síntese protéica nas células de animais que as ingerem. Atualmente, diversas técnicas vêm surgindo para detoxificar a torta de mamona e utilizá-la na alimentação animal. Dentre estas técnicas, a fermentação em estado sólido mostrou-se promissora na detoxificação da torta, e simultaneamente pode ser utilizada para produção de enzimas de interesse biotecnológico, aumentando seu valor comercial. No presente trabalho o objetivo foi produzir simultaneamente as enzimas fitase e tanase utilizando o fungo *Paecilomyces variotii* através da fermentação em estado sólido em torta de mamona. Foram realizadas determinações de fenóis totais, taninos hidrolisáveis, condensados e estudos da detoxificação da torta após o processo fermentativo. A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) foi aplicado para otimizar a produção das enzimas fitase e tanase. O planejamento composto central rotacional 2^3 (PCCR) foi utilizado para verificar a influência das variáveis independentes, em porcentagem: umidade relativa do ar (UR), ácido tânico (AT) e solução salina (SS) na atividade enzimática de fitase e tanase (U/g). Foram realizados 17 ensaios, incluindo 8 ensaios ao fatorial completo 2^3 , 6 ensaios referentes aos pontos axiais e 3 ensaios referentes aos pontos centrais para estimar o erro puro. O resultado para o estudo da cinética de fermentação mostrou que o meio contendo torta de mamona apresentou maior atividade nos tempos de 48 e 72 horas para produção de tanase e fitase, respectivamente. Utilizando a MRS as melhores condições para produção de tanase foram: 90% de UR; 25% de SS; 4,6% de AT; obtendo-se uma atividade enzimática de 2800 U/g de substrato. Para produção da

enzima fitase as melhores condições foram: 90% de UR; 25% de SS, obtendo-se uma atividade enzimática de 280 U/g de substrato. O SDS-PAGE não detectou a presença de ricina durante o processo fermentativo, entretanto no teste de citotoxicidade as células perderam viabilidade, apresentando uma possível quantidade residual de ricina ou o microrganismo produziu compostos tóxicos a sobrevivência das células Vero.

Palavras-chave: Torta de Mamona, Tanase, Fitase, Detoxificação, *Paecilomyces variotii*.

1.1. Abstract

For biodiesel production, oil from the castor bean stands out among the oilseeds. Besides the oil, the castor bean produces an oil cake after the extraction, which is of great interest for organic fertilization. The cake also has a high concentration of proteins, which has possibilities for use as an ingredient for animal nutrition. However, it still faces problems in the presence of toxins, especially the ricin, a protein that prevents protein synthesis in cells of animals that ingest it. Currently, several techniques have emerged to detoxify castor bean oil cake and use it as animal food. Among these techniques, solid-state fermentation proved to be promising in the detoxification of the cake, and it can be used for the production of enzymes of biotechnological interest, increasing its commercial value. In this work, we aimed to produce both the phytase and tannase enzymes using the fungus *Paecilomyces variotii* by solid-state fermentation in castor cake. An analysis was made for total phenols, hydrolysable and condensed tannins, and studies of detoxification of the cake after the fermentation process. The Response Surface Methodology (RSM) was applied to optimize production of phytase and tannase enzymes. The central rotational compound planning 2^3 (CRCP) was used to verify the influence of independent variables, in percentage: relative air humidity (UR), tannic acid (TA) and salt solution (SS) in the enzymatic activity of phytase and tannase (U/g). There were 17 trials, including eight (8) trials at the complete factorial 2^3 , six (6) trials related to the axial points and three (3) trials concerning central points to estimate pure error. The result for the study of the fermentation kinetics showed that the medium containing castor bean oil cake showed higher activity in the periods of 48 and 72 hours for the production of tannase and phytase, respectively. Using the MRS, the best conditions for tannase production were 90% of UR, 25% SS, 4.6% TA, yielding an activity of 2,800 U/g tannase. For the production of phytase, the best conditions were: 90% UR, 25% of SS, yielding an activity of 280 U/g tannase. The SDS-PAGE did not detect the presence of ricin during the fermentation process. However, on the test of cytotoxicity, the cells lost viability, indicating a possible residual amount of ricin, or the microorganism has produced compounds which were toxic to the survival of Vero cells.

Keywords: Castor Cake, Tannase, Phytase, Detoxification, *Paecilomyces variotii*.

2. Introdução

O Brasil confere grande potencial na produção de óleos vegetais e seus derivados, destacando o setor de biodiesel, em decorrência do interesse em substituir o combustível de origem mineral (proveniente do petróleo), já que o orgânico é renovável e menos poluente (Anandan, 2005; Jones, 1947).

Dentre os vegetais utilizados para produção do biodiesel, a mamona (*Ricinus communis* L.) vem se destacando no país. O Brasil já representa cerca de 7,5% da produção de óleo vegetal no mundo, ficando atrás apenas da Índia e China (Savy Filho, 2005).

Para obtenção do óleo, a semente da mamona deve ser passada pela extração, que acaba produzindo também um resíduo chamado de torta. A torta de mamona hoje é alvo de grande interesse comercial devido ao seu alto valor nutricional, principalmente pela concentração de proteínas. A torta bruta é muito utilizada como adubo orgânico, mas pode-se utilizar para ração animal desde que passe por uma eliminação dos resíduos tóxicos presentes como o complexo alergênico albumina 2S, ricina e principalmente a ricina (Anandan, 2005; Jones, 1947).

Muitos trabalhos vêm sendo relatados na finalidade de eliminar os compostos tóxicos da torta, como adição de hidróxido de sódio ou pelo processo de autoclavagem (Gowda, 2009; Anandan, 2005).

A fermentação em estado sólido também apresenta sucesso na detoxificação da torta, como na inoculação do fungo *Penicillium simplicissimum* em torta de mamona incubada em condições ótimas para seu crescimento, que acabam conseqüentemente hidrolisando os compostos tóxicos, tornando-os detoxificados (Godoy, 2009).

O presente trabalho visou avaliar a produção simultânea de tanase e fitase na torta de mamona em fermentação em estado sólido com *Paecilomyces variotii*, bem como determinar a concentração de fenóis, taninos e ricina (detoxificação) antes e após o processo fermentativo.

3. Materiais e Métodos

3.1. Obtenção da Torta de Mamona

A torta de mamona foi doada pela indústria produtora de óleos vegetais A. Azevedo Indústria e Comércio de Óleos Ltda – Itupeva – SP. O resíduo foi triturado e submetido à um processo de separação granulométrica em tamis de 10 *mesh*, com 1,68 mm (Bertel Indústria Metalúrgica LTDA).

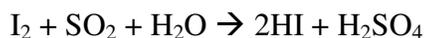
3.2. Caracterização do resíduo

3.2.1. Determinação do pH

Foram adicionados 5 mL de água deionizada a 0,5 g de amostra, a mistura foi vigorosamente agitada. Após 10 minutos, o pH do sobrenadante foi medido em potenciômetro (Marte®-MB-10).

3.2.2. Porcentagem de Água (Karl-Fischer)

Metodologia utilizada para amostras com baixa quantidade de água livre, como cereais, casca de frutas, resíduos vegetais e grãos. Baseia-se na oxidação de SO₂ pelo I₂, que constituem o reagente de Karl Fischer, na presença de água, conforme ilustrado na equação química a seguir (Laitinen, 1975).



Esta metodologia foi realizada por titulação volumétrica através do aparelho de Karl Fischer KF-1000 (Analyser). Este aparelho fornece diretamente a porcentagem de água da amostra, sendo necessário fornecer a massa de amostra adicionada no frasco de titulação.

3.2.3. Umidade

Foi postada 0,5 g de amostra em placas de Petri previamente taradas e pesadas em balança analítica. Após a incubação de 24 horas em estufa a 105°C, as mesmas foram pesadas até atingir peso constante.

3.3. Processo Fermentativo

3.3.1. Microrganismo

O microrganismo *Paecilomyces variotii* foi selecionado dentre 400 linhagens fúngicas pertencentes ao laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp. Este fungo apresentou melhor capacidade de síntese de tanase conforme descrito por Macedo e colaboradores (2005). O microrganismo foi mantido em meio Potato Dextrose Agar (PDA – OXOID - CM0139) em tubos de ensaios com suplemento de 0,2% de ácido tânico (Tanal B – Prozyn - BioSolutions) e incubados em estufa a 30°C (Estufa de Cultura Modelo 002 CB - FANEM-LTDA) durante 72 horas. A cultura vêm sendo conservada a 4°C sob camada de vaselina esterilizada e repicadas a cada três ou quatro meses de armazenamento.

3.3.2. Preparo do Pré-inóculo

O microrganismo foi repicado em meio de cultura PDA com 0,2% de ácido tânico em placas de Petri onde, depois de 72 horas de crescimento a 30°C, 10 áreas circulares de 1,54 cm² (d = 1,4 cm) foram retiradas da placa contendo o microrganismo e transferidas para um Erlenmeyer contendo 50 mL de água destilada estéril. Em seguida foi realizada uma suspensão celular com um homogeneizador do tipo Turrax (Ultra-Turrax® T50), obtendo no final uma concentração de 9×10^6 células/mL, em que a contagem foi realizada em câmara de Neubauer, adaptado por Battestin (2007b).

3.3.3. Meio de Fermentação

Em Erlenmeyers de 250 mL foram adicionados 5 g do resíduo (torta de mamona); 5 mL da solução salina (g/L) composto por: 1,0 de KH_2PO_4 ; 2,0 de NH_4NO_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 (Battestin, 2007b). Em seguida os Erlenmeyers foram esterilizados em autoclave a temperatura de 121°C durante 15 minutos. Após resfriar a temperatura ambiente, foi adicionada 1 mL da suspensão de esporos do *Paecilomyces variotii*, como descrito no item 3.3.2. Após a inoculação, os Erlenmeyers foram incubados em estufa a 30°C durante 120 horas.

3.3.4. Extração Enzimática

Após a fermentação procedeu-se a extração da enzima adicionando 4 partes de tampão acetato pH 5,5 – 0,02 M para 1 parte do meio de fermentação em cada Erlenmeyer. Os frascos foram agitados a 200 rpm por 1 hora (Battestin, 2007b). A solução foi filtrada em gaze e o extrato retido na filtração foi denominado extrato sólido bruto. O filtrado foi centrifugado (Beckman Coulter – Allegra™ X-22R Centrifuge) a 7100 x g por 30 minutos a 4°C, sendo então chamado de extrato enzimático bruto (Lekha, 1997). O extrato enzimático foi utilizado para determinação da atividade das enzimas tanase e fitase. O extrato sólido bruto foi utilizado para determinações analíticas de fenóis totais, taninos condensados, taninos hidrolisados e detoxificação, conforme descrito no item 3.4.

3.3.5. Determinação da Atividade Enzimática da Tanase

A medida da atividade da enzima tanase foi realizada empregando-se 0,3 mL de substrato [solução de ácido tânico 0,7% (p/v) em tampão acetato pH 5,5 – 0,2 M]; 0,5 mL de solução enzimática, incubando a 60°C por 10 minutos, paralisando a reação pela adição de 3 mL de solução de albumina de soro bovino (BSA) na concentração de 1 mg/mL (solução preparada em tampão acetato pH 5,0 – 0,2 M, contendo 0,17 M de cloreto de sódio), sendo em seguida centrifugada a 7100 x g durante 15 minutos a temperatura de 4°C.

O precipitado contendo o ácido tânico que a enzima não hidrolisou foi ressuspenso em 3 mL de solução SDS-Trietanolamina [SDS 1% (p/v) adicionando 5% (v/v) de Trietanolamina em água destilada] acrescido 1 mL de solução de FeCl₃ (0,01 M de FeCl₃ em 0,01 M de ácido clorídrico), após 15 minutos de repouso procedeu a leitura da absorbância a 530 nm em espectrofotômetro (Beckman Coulter DU 640), o resultado foi chamado de Abs_{teste}. O branco foi efetuado com um teste que contém todos os reagentes usados na determinação, com água destilada no lugar do extrato enzimático. O teste controle foi feito com o extrato enzimático desnaturado previamente incubado em banho de água em ebulição durante 15 minutos, que foi chamado de Abs_{controle}. A absorbância final obteve-se da seguinte forma:

$$\text{Abs} = \text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{teste}}$$

Uma unidade de atividade da enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de ácido tânico por minuto de reação nas condições testadas. O curso da reação foi acompanhado por uma curva de calibração com ácido tânico, conforme metodologia descrita por Mondal e colaboradores (2001).

3.3.6. Determinação da Atividade Enzimática da Fitase

Empregou-se o substrato sintético para fosfatase para medida da atividade de fitase. A 1000 μL de solução 5 mM 4-nitrofenilfosfato dissódico hexahidratado (Sigma) foram adicionados 500 μL de ácido acético pH 5,0 - 0,8 M e 500 μL do extrato enzimático bruto. Após 10 minutos de reação em banho com aquecimento à 37°C, a reação foi paralisada com 2 mL da solução de hidróxido de sódio 0,1 M, a liberação de p-nitrofenol foi lida a 410 nm em espectrofotômetro, o qual foi chamado de Abs_{teste}. O teste controle efetuou-se com solução enzimática incubada em tubo de ensaio em banho sob aquecimento da água em ebulição durante 15 minutos, o qual foi denominado de Abs_{controle}. A absorbância final foi obtida da seguinte forma:

$$\text{Abs} = \text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{teste}}$$

No branco, substituiu a solução enzimática por água destilada. O curso da reação foi acompanhado por uma curva de calibração de *p*-nitrofenol. Uma unidade de atividade da

enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de *p*-nitrofenol por minuto de reação nas condições testadas (Stockmann, 2003).

3.3.7. Cinética de Fermentação

Com o objetivo de definir a cinética de fermentação, a atividade enzimática da tanase e fitase foram determinadas em diferentes tempos: 24, 48, 72 e 96 horas. Definindo assim o melhor tempo de fermentação do meio para produção das enzimas, sendo este tempo utilizado na etapa de delineamento experimental.

3.3.8. Delineamento Experimental

Com objetivo principal de otimizar a produção das enzimas tanase e fitase na torta de mamona, foram analisados a influência da concentração do ácido tânico e volume da solução salina no meio de produção enzimática. Utilizou-se a técnica do delineamento composto central rotacional (DCCR), apresentando 8 pontos fatoriais (p.f.), 6 pontos axiais (p.a.) e 3 pontos centrais (p.c.) totalizando 17 ensaios (2^3 p.f. + 6 p.a. + 3 p.c. = 17). As 3 variáveis independentes foram: umidade relativa do ar (%) em Câmara Climática (Nova Ética-Modelo 420/CLDTS 300); concentração de ácido tânico, que foi expresso em porcentagem em relação ao peso 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.

A concentração de ácido tânico (%) utilizada nesse estudo foi determinada de acordo com Battestin e colaboradores (2007b), onde a produção máxima de tanase foi obtida utilizando 8 a 15% de ácido tânico. Para o presente trabalho, foram testadas concentrações menores de ácido tânico a fim de reduzir os custos do meio de produção.

A quantidade de sal adicionado no meio de fermentação está descrito no item 3.3.3. Nesse estudo foi avaliado o volume de água adicionado ao meio de fermentação. A faixa de volume de água adicionada foi determinada de acordo com a capacidade máxima de absorção do substrato, sem apresentar água livre no meio, conforme Tabela 1. Os valores

reais utilizados nos ensaios do planejamento estão apresentados na Tabela 2 e a matriz dos ensaios na Tabela 3.

Tabela 1. Capacidade de Absorção de Água da Torta de Mamona.

Capacidade de Absorção de Água		
Massa da Amostra*	Volume de Água Absorvida	Umidade (%)
10 g	11 mL	55

*Peso da torta de mamona postado para avaliar a capacidade de absorção de água em seu meio.

De acordo com a tabela 1, a capacidade máxima de água que a torta de mamona absorveu em 10 gramas foram 11 mL de água, ou seja, em um meio com torta de mamona e água, 55% do peso do meio está representado por água.

Tabela 2. Valores utilizados no DCCR para três fatores.

Variáveis*	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
UR (%)	60	66	75	84	90
volume SS (%)	25	31	40	49	55
AT (%)	4,6	6	8	10	11,4

* AT (%) = Concentração de Ácido Tânico (p/p); volume SS (%) = volume da Solução Salina (v/p); UR (%) = Porcentagem da Umidade Relativa do Ar.

Tabela 3. Matriz do delineamento contendo valores codificados das variáveis.

Ensaio	Níveis Codificados das Variáveis Independentes*			Níveis Não-Codificados das Variáveis Independentes*		
	x ₁	x ₂	x ₃	UR (%)	volume SS (%)	AT (%)
1	-1	-1	-1	66	31	6
2	+1	-1	-1	84	31	6
3	-1	+1	-1	66	49	6
4	+1	+1	-1	84	49	6
5	-1	-1	+1	66	31	10
6	+1	-1	+1	84	31	10
7	-1	+1	+1	66	49	10
8	+1	+1	+1	84	49	10
9	-1,68	0	0	60	40	8
10	+1,68	0	0	90	40	8
11	0	-1,68	0	75	25	8
12	0	+1,68	0	75	55	8
13	0	0	-1,68	75	40	4,6
14	0	0	+1,68	75	40	11,4
15	0	0	0	75	40	8
16	0	0	0	75	40	8
17	0	0	0	75	40	8
18	0	0	0	75	40	8

* x₁= UR (%) = % umidade relativa do ar; x₂ = volume SS (%) = % do volume da solução salina em relação ao peso total (v/p); x₃ = AT (%) = % do peso do ácido tânico em relação ao peso total (p/p).

Com os resultados do planejamento foi possível no software STATISTCA 7.0 a determinação dos coeficientes de regressão para a resposta de interesse, calculou a ANOVA para analisar a possibilidade de construir a equação da resposta em função dos coeficientes de regressão estatisticamente significativo e também a superfície de resposta, com nível de significância de 10% (p-valor<0,1).

3.4. Determinações Analíticas

O objetivo principal desta etapa foi avaliar as concentrações de compostos de valor nutricional no meio pré-fermentado e pós-fermentado como compostos fenólicos, taninos hidrolisáveis, condensados, avaliação da presença de ricina e determinação do processo de detoxificação.

3.4.1. Extração de Fenóis Totais

Foram utilizadas os seguintes solventes para o processo de extração, na proporção de 50% do solvente e 50% de água: Acetato de Etila, Acetona e Metanol. Também foi testado com o solvente Hexano em sua forma anidra (100%). Foram pesados 200 mg da amostra em 10 mL do solvente, em seguida foram incubados a temperatura ambiente com agitação de 150 rpm durante 120 minutos. Após a homogeneização foram centrifugados a 1320 x g a 5°C durante 15 minutos e analisados por determinação de Fenóis Totais (Naczka, 2004; Schons, 2009).

3.4.2. Determinação de Fenóis Totais

Foi utilizada a técnica de Follin-Ciocalteu (Singleton, 1965) para determinação de fenóis presentes na amostra. Este método baseia-se na redução do ácido fosfomolibdídico e fosfotungstíco pelas hidroxilas dos fenóis produzindo uma coloração azul, quantificada por espectrofotometria a 760 nm.

Em um Erlenmeyer de 50 mL foram adicionados 1 mL do reagente Follin-Ciocalteu, 10 mL de água destilada, 1 mL da amostra e deixou-se em repouso durante 3 minutos. Foram adicionados 8 mL de carbonato de sódio (7,5%) e a reação ocorreu por 2 horas em local escuro. 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, com exceção da amostra. O curso da reação foi acompanhado por uma curva de calibração com ácido gálico, conforme metodologia descrita.

3.4.3. Determinação de Taninos Hidrolisáveis

Foi empregada a metodologia de Brune e colaboradores (1991) sendo que a extração das amostras foi realizada como indicado para os fenóis totais. Utilizou-se uma solução de sulfato de ferro (III) e amônio, denominada FAS. A solução era 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%.

Em um tubo de ensaio adicionou-se 2 mL da amostra em estudo e 8 mL da solução FAS. 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.

3.4.4. Determinação de Taninos Condensados

Empregou-se a metodologia de Prince e colaboradores (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 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 metanol).

O 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 com catequina, conforme metodologia descrita.

3.4.5. Avaliação da Detoxificação da Torta de Mamona por Fermentação em Estado Sólido

3.4.5.1. Detecção de ricina por SDS-PAGE

Esta técnica foi utilizada somente para o resíduo da torta de mamona como descrito por Anandan e colaboradores (2005). Primeiro, efetuou-se a extração com adição de tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2 na proporção 1:4 (1 g de resíduo sólido para 4 mL de tampão) no resíduo que foi mantido em agitação durante 3 horas, em seguida submetido à centrifugação a 14000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para determinação de ricina presente na amostra, foi realizada a quantificação de proteínas (Bradford, 1976) para obter uma concentração padrão para todas as amostras. Adicionou 80 µL do sobrenadante a 40 µL de tampão contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e β-mercaptoetanol, totalizando 120 µL. Deste total, foram aplicados 25 µL para correr o gel de SDS-PAGE 12% (10x10x0,1cm). Após a corrida, as proteínas foram fixadas e coradas por 1 hora com solução de Coomassie-Brilliant-Blue 0,1% em metanol/ácido acético/água (45/10/45, v/v/v). Após esse tempo, o gel foi descorado com uma solução contendo metanol/ácido acético/água (45/10/45, v/v/v).

3.4.5.2. Teste de Atividade Tóxica em Cultura de Células

O teste foi realizado na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos com o auxílio da Professora Olga Lima Tavares Machado. Foram utilizadas células Vero (provenientes do rim de *Cercopithecus aethiops*) para o ensaio. Este tipo de célula apresenta uma característica de aderir ao substrato enquanto vivas, ao morrerem se desprendem, facilitando assim a contagem dessas células em microscopia. Estas células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 5% de soro fetal bovino, a 37°C e na presença de 5% de CO₂.

O biofilme de células foi desprendido da parede de uma garrafa de 25 cm² (TPP/90025) contendo uma cultura em monocamada. Para isso foi utilizado uma solução de

tripsina 0,5 mg/mL e EDTA 0,2 mg/mL, durante 5 minutos a 37°C. As células em suspensão foram contadas em microscopia óptica, e esta suspensão foi dividida em uma placa de 24 poços, na proporção de $2,0 \times 10^4$ células por poço. A cultura foi mantida a 37°C por 48 horas, para atingir o estágio de monocamada. O material teste filtrado foi então incubado com as células, em duplicata, numa concentração de 10 µg/mL (Fernandes, 2010).

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização do Resíduo

Os resultados do pH, quantidade de água (porcentagem de água presente na amostra) e umidade relativa da torta de mamona *in natura* estão representados na Tabela 4.

Tabela 4. pH, quantidade de água e umidade relativa da torta de mamona *in natura*.

Torta de Mamona	
Teste	Média
pH	5,95 ± 0,04
Água (%)	4,78 ± 0,07
Umidade (%)	6,7 ± 0,16

A composição da torta pode variar de acordo com a variedade da semente usada na extração do óleo, da sua qualidade, condições de crescimento, dos métodos de extração e parâmetros de estocagem. Assim, a solução com torta de mamona apresentou pH de 5,95. Alguns trabalhos citam que a torta de mamona apresenta um pH básico, devido alguns componentes alcalóides como a ricinina, albumina 2S, que pode representar cerca de 12,5% do peso da torta (Fernandes, 2010).

A baixa quantidade de água presente na torta, em torno de 4,8% e umidade de 6,7 em relação ao peso total, se devem: a extração do óleo, secagem da torta e da presença do extrato etéreo, impedindo a água em se ligar ao substrato. As baixas concentrações de fibras presentes na torta também diminuem a concentração de água livre.

4.2. Cinética de fermentação

Utilizando a torta de mamona como substrato, o melhor tempo de fermentação para produção enzimática da tanase foi após 48 horas, como indicada na Tabela 5.

Tabela 5. Avaliação da cinética de fermentação para a atividade tanásica em Torta de Mamona.

Tanase (U/mL)	
Tempo de Incubação (horas)	Média*
24	162 ± 10,2 a
48	428 ± 10,1 b
72	249 ± 16,9 c
96	211 ± 17,3 c

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

A partir de 48 horas de incubação a atividade enzimática diminuiu para 249 U/mL após 72 horas e manteve-se estatisticamente constante.

Para enzima fitase, o melhor tempo de incubação para sua produção foi após 72 horas, após 96 horas a atividade diminuiu para 13,89 U/mL, como indicados na Tabela 6.

Tabela 6. Avaliação da cinética de fermentação para a atividade fitásica em Torta de Mamona.

Fitase (U/mL)	
Tempo de Incubação (horas)	Média*
24	12,28 ± 0,28 a
48	9,19 ± 0,03 b
72	49,79 ± 0,16 c
96	13,89 ± 1,53 a

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

4.3. Delineamento Experimental

Foram realizados dois delineamentos compostos centrais rotacionais (DCCR), com as variáveis independentes umidade relativa do ar (%), volume da solução salina (%) e concentração de ácido tânico (%), o primeiro delineamento foi realizado com a variável dependente atividade enzimática da tanase após 48 horas de fermentação, o segundo delineamento para variável dependente atividade enzimática da fitase após 72 horas de fermentação.

4.3.1. DCCR para Produção de Tanase

A Tabela 7 demonstra a matriz das variáveis independentes em estudo, com valores reais, codificados e a variável dependente tanase após 48 horas de fermentação.

Tabela 7. Matriz DCCR 2³ e a resposta da atividade enzimática da tanase após 48 horas de fermentação.

Ensaio	Valores Codificados			Valores Reais			Resposta
	x ₁	x ₂	x ₃	UR (%)	volume SS (%)	AT (%)	Tanase (U/mL)
1	-1	-1	-1	66	31	6	384
2	1	-1	-1	84	31	6	573
3	-1	1	-1	66	49	6	124
4	1	1	-1	84	49	6	216
5	-1	-1	1	66	31	10	199
6	1	-1	1	84	31	10	206
7	-1	1	1	66	49	10	218
8	1	1	1	84	49	10	204
9	-1,68	0	0	60	40	8	120
10	1,68	0	0	90	40	8	430
11	0	-1,68	0	75	25	8	358
12	0	1,68	0	75	55	8	104
13	0	0	-1,68	75	40	4,6	386
14	0	0	1,68	75	40	11,4	172
15	0	0	0	75	40	8	326
16	0	0	0	75	40	8	302
17	0	0	0	75	40	8	288

x₁ = UR (%) = umidade relativa do ar (%); x₂ = volume SS (%) = % do volume da Solução Salina em relação ao peso total (v/p); x₃ = AT (%) = % do peso do ácido tânico em relação ao peso total (p/p).

Analisando-se os valores de atividade tanásica obtidos. Na Tabela 7, verifica-se um aumento na atividade, variando de 104 U/mL no ensaio 12 (75% de umidade relativa do ar, 55% do volume da solução salina adicionado em relação ao peso total do meio e 8% de ácido tânico suplementado no meio) para 573 U/mL no ensaio 2 (84% de umidade relativa do ar, 31% do volume da solução salina e 6% de ácido tânico).

A Tabela 8 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, t, p-valor e limite de confiança das variáveis e suas interações, em resposta a atividade da tanase com limite de confiança estatística de 90% ($p < 0,10$).

Tabela 8. Resultados do Coeficiente de Regressão, Erro Padrão, t, p e Limite de Confiança na otimização dos componentes do meio de cultivo (umidade relativa do ar, volume da Solução Salina e ácido tânico) na atividade de tanase.

	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(7)	p-valor	Limite de Confiança -90,%	Limite de Confiança +90,%
Média*	305	25	12,4	0,000005	258	352
(1)UR (%) (L)*	58	12	5,0	0,001504	36	80
UR (%) (Q)	-9	13	-0,7	0,489433	-33	15
(2)volume SS (%) (L)*	-75	12	-6,5	0,000333	-97	-53
volume SS (%) (Q)*	-25	13	-1,9	0,091974	-49	-0,7
(3)AT (%) (L)*	-61	12	-5,3	0,001181	-83	-39
AT (%) (Q)	-8	13	-0,6	0,555943	-32	16
1L x 2L	-15	15	-1,0	0,361548	-43	14
1L x 3L*	-36	15	-2,4	0,048719	-65	-7
2L x 3L*	79	15	5,2	0,001194	51	108

* parâmetros estatisticamente significativos a 90% de nível de confiança.

L = parâmetro linear; Q = parâmetro quadrático.

Com os resultados da Tabela 6, as variáveis UR (%) quadrático (umidade relativa do ar), AT (%) quadrático (concentração de ácido tânico) e interação UR (%) e volume SS (%) não foram significativos, apresentando p-valor igual a 0,48, 0,55 e 0,36, respectivamente. Assim, somente as variáveis UR (%) (L), volume SS (%) (L), volume SS (%) (Q), AT (%) (L), interação UR (%) com AT (%) e interação volume SS (%) com AT (%) foram avaliados para Regressão na Fonte de Variação no ANOVA.

A análise de variância (ANOVA) está representada na Tabela 9.

Tabela 9. Análise de Variância no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (UR (%), volume SS (%) e AT (%)) na atividade de tanase.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{cal}	p
Regressão	240329	6	40055	25,3	0,00001
Resíduos	15826	10	1583		
Falta de Ajuste	15086,9	8	1886	5,11	
Erro Puro	738,7	2	369		
Total	256154,5	16			
R²=0,94 F_{tab(0,1;6;10)}=2,46 F_{tab(0,1;8;2)}=9,37					

Para o coeficiente de correlação (R) o valor obtido foi de 0,97, para o coeficiente de determinação (R²) foi de 0,94, 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 5,11 (1,83 vezes menor do que o valor de F_{tabelado}=9,37), resultando em uma falta de ajuste do modelo menor que o indicado pelo valor tabelado. O valor de F da Regressão obtido foi de 25,3 (10,2 vezes maior do que o valor de F_{tabelado}=2,46), indicando que o modelo para a atividade de tanase pode ser considerado estatisticamente significativo a 90% de nível de confiança.

Estes resultados podem ser obtidos por 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 (3):

$$\text{Tanase (U/mL)} = 288 + 58,24*(UR) - 75,21*(\text{volume SS}) - 20,93*(\text{volume SS})^2 - 60,77*(AT) - 36*(UR)*(AT) + 79,25*(\text{volume SS})*(AT) \quad (3)$$

O modelo polinomial quadrático foi utilizado para construir as superfícies de resposta e curvas de contorno. As Figuras 1(a), 1(b) e 1(c) ilustram os efeitos dos componentes umidade relativa do ar, concentração de ácido tânico e porcentagem do volume da solução salina em relação ao peso total do meio, na produção de tanase pelo *Paecilomyces variotii*.

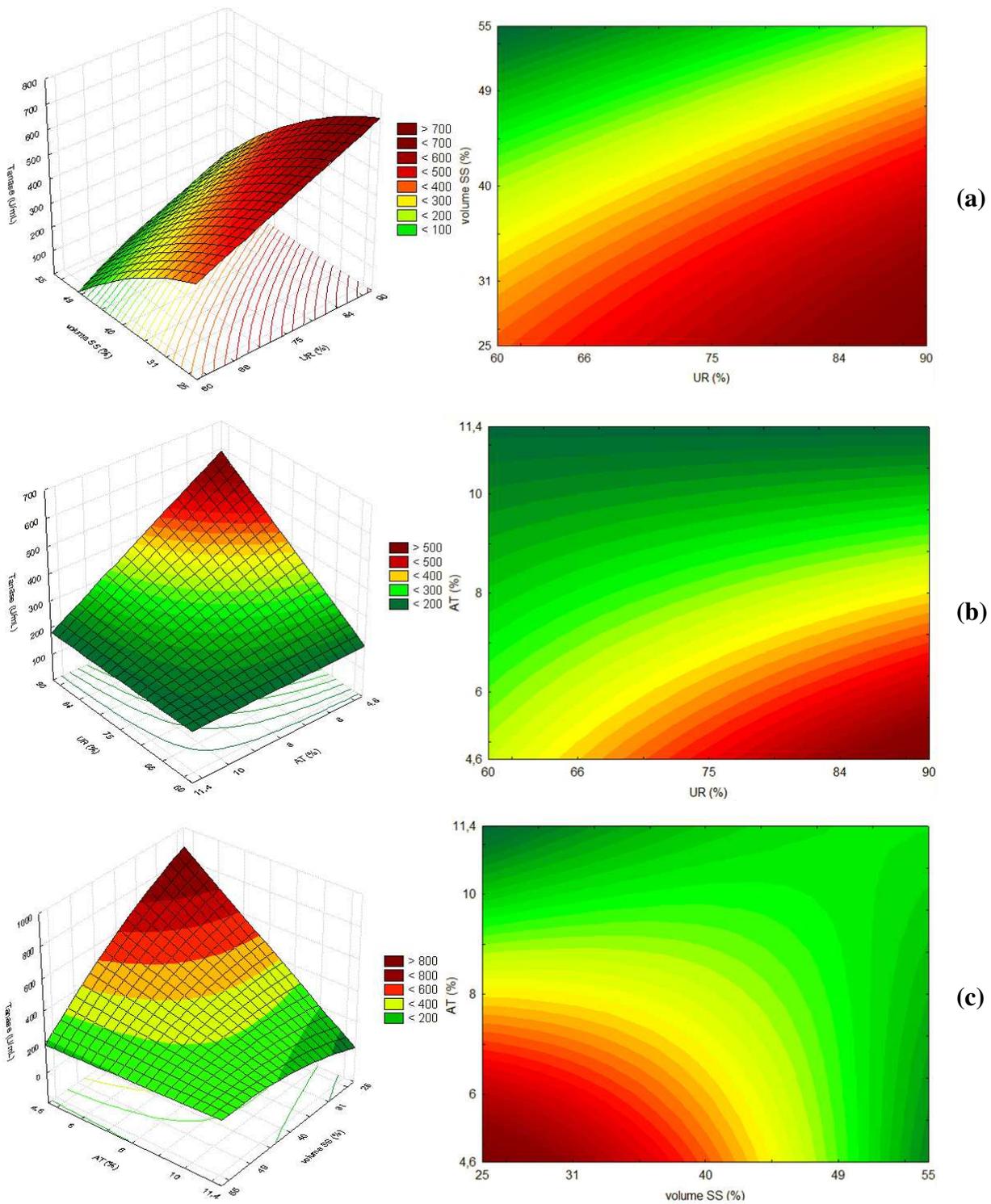


Figura 1. Superfície de Resposta e Curva de Contorno Atividade da Tanase (U/mL): (a) em função do volume da solução salina e umidade relativa do ar, (b) em função da umidade relativa do ar e ácido tânico e (c) em função do ácido tânico e volume da solução salina.

A Figura 1 indica que para variável UR (%) a faixa em que se obteria a maior atividade enzimática seria entre 84 a 90%, com porcentagem de umidade ótima de 90%. Valores acima de 90% provocam desequilíbrio entre umidade e temperatura na Câmara Climática, tornando a temperatura como uma variável independente. Condições de umidade do ar menores a 84% diminuiria a atividade enzimática supostamente pela perda de equilíbrio que a faixa de 90% traz entre a umidade relativa do ar e a umidade presente no meio, que conseqüentemente diminuiria o crescimento do microrganismo.

A atividade da enzima tanase seria maior em concentrações entre 4,6 a 6% de ácido tânico, com atividade enzimática ótima em 4,6%. Concentrações maiores de ácido tânico poderiam diminuir a atividade tanásica, devido supostamente a inibição que o composto exerceria sobre a enzima. Concentrações menores poderiam aumentar a atividade, devido supostamente a utilização da torta de mamona como fonte de carbono e outros nutrientes para crescimento do microrganismo. O resultado obtido foi satisfatório pela baixa concentração necessária do indutor para produção da tanase. Outros trabalhos publicaram a necessidade de se utilizar concentrações de 10% do ácido tânico no meio otimizado para produção da enzima (Battestin, 2007).

Para a concentração do volume da solução salina em relação ao peso total do meio, a faixa de 25 a 33% estimularia a produção da enzima, com concentração ótima de 25%.

De acordo com a melhor faixa do volume da solução salina adicionada no meio para produção de tanase, que foi de 25%, foi quantificada a umidade antes e após 48 horas de incubação na câmara climática 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 10.

Tabela 10. Umidade relativa do meio de cultivo antes e após incubação na câmara climática para o meio otimizado para produção de tanase em torta de mamona.

Umidade Relativa do Meio de Cultivo (%)			
Amostra*	Tempo de Incubação**	Umidade Inicial	Umidade Final
TM 48h	48 horas	25%	27%

* TM 48h = meio de cultivo de torta de mamona com 4,6% do peso do ácido tânico em relação ao peso total do meio (p/p) e 25% 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.

A umidade relativa do meio presente antes da fermentação foi de 25% e após incubação na Câmara houve um pequeno aumento de 2%, resultando em 27%. 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 equilíbrio da água presente no meio com o ar.

Concentrações menores da solução salina iriam impedir o crescimento do microrganismo no meio, supostamente pela baixa quantidade de água presente. O aumento da solução salina no meio de cultivo diminuiu a atividade tanásica, apresentando uma possibilidade de que os sais poderiam limitar a produção enzimática. Portanto foi realizado um estudo comparativo entre um meio de cultivo de torta de mamona composto de solução salina e um outro com água destilada, sem adição de sais. O resultado está representado na Tabela 11.

Tabela 11. Estudo Comparativo da Dependência de Sais no Meio de Cultivo na Torta de Mamona.

Atividade Enzimática da Tanase (U/mL)	
Amostra*	Média
TM 4,6% F48h	523 ± 33,5
TM 4,6% F48h H₂O	655 ± 49,5

* TM 4,6% F48h = Meio de Cultivo de Torta de Mamona com 4,6% de Ácido Tânico e 25% de Solução Salina; TM 4,6% F48h H₂O = Meio de Cultivo de Torta de Mamona com 4,6% de Ácido Tânico e 25% de Água Destilada.

De acordo com os resultados o meio de cultivo suplementado com água destilada somente, apresentou maior atividade enzimática, em torno de 655 U/mL, em comparação ao meio suplementado com solução salina, com uma atividade de apenas 523 U/mL. Confirmando assim que em meio de cultivo utilizando torta de mamona como substrato, a solução salina limita a produção da enzima tanase, sendo necessário a utilização de água destilada apenas, tornando um meio mais simples e viável financeiramente.

Utilizando o processo de otimização, as melhores condições para a produção da tanase, em 10 g de meio, seriam: 3 mL de SS (%); 0,46 g de AT (%); 6,54 g de torta de mamona, incubados à 90% de UR. Obtendo-se dessa forma uma atividade de 700 U/mL ou 2800 U/g de substrato na fermentação pela linhagem *P. variotii*.

Mahapatra e colaboradores (2009) utilizaram o microrganismo *Rhizopus oryzae* para produção de tanase em fermentação em estado sólido com meio de cultivo apresentando farelo de trigo, ácido tânico e solução salina, incubados a 32°C durante 72 horas, a atividade enzimática obtida foi de 320 U/g de substrato.

Sabu e colaboradores (2006) publicaram a produção de tanase via fermentação em estado sólido com *Lactobacillus* sp. ASR1, utilizando torta de dendê como substrato e 44% do peso do meio representado por umidade. Foi obtida uma atividade enzimática de 550 UA/g de matéria seca, após 48 horas de fermentação a 30°C de temperatura.

Outro trabalho utilizando como substrato torta de dendê, umidade inicial de 54% (v/p) e inóculo de 3×10^9 esporos em 5 gramas de substrato para fermentação em estado sólido. Foi utilizado o fungo *Aspergillus niger* ATCC 16620 com período de fermentação de 96 horas a 30°C. O rendimento máximo adquirido foi de 13 UA/g de substrato seco (Sabu, 2005).

Raaman e colaboradores (2009) publicaram a fermentação em estado sólido como o melhor processo biotecnológico para produção de tanase extracelular por *Paecilomyces variotii*, apresentando 167 UA/mL de amostra em apenas 60 horas de incubação, em comparação ao processo submerso que obteve apenas 123 UA/mL após 72 horas. Entretanto os resultados obtidos não foram superiores ao presente trabalho que também obteve um menor período de incubação do meio para produção da enzima.

Battestin e colaboradores (2007b) estudaram a otimização do meio de cultivo com resíduos para produção de tanase pelo *Paecilomyces variotii*. O meio otimizado apresentou

como substrato de suporte farelo de trigo com resíduo de café, suplementado com aproximadamente 10% do peso em ácido tânico a temperatura de 30°C durante 120 horas de incubação. A atividade máxima foi de 1200 UA/mL de amostra, resultando em uma atividade maior, entretanto o tempo de incubação do presente trabalho foi menor, produzindo a enzima em menor tempo.

4.3.2. DCCR para Produção de Fitase

O delineamento composto central rotacional foi também utilizado para avaliar a resposta ou variável dependente atividade enzimática da fitase. Os ensaios foram incubados com o microrganismo durante 72 horas, que foi o tempo que apresentou atividade fitásica mais alta. As variáveis independentes estudadas foram: a umidade relativa do ar, concentração do ácido tânico e a porcentagem do volume da solução salina adicionada em relação ao meio.

Apresenta-se na Tabela 12 a matriz das variáveis independentes em estudo, com valores reais e codificados, e a variável dependente fitase durante 72 horas de incubação.

Tabela 12. Matriz DCCR 2³ e a resposta da atividade enzimática da fitase após 72 horas de incubação.

Ensaio	Valores Codificados			Valores Reais			Resposta
	x ₁	x ₂	x ₃	UR (%)	volume SS (%)	AT (%)	Fitase (U/mL)
1	-1	-1	-1	66	31	6	17,4
2	1	-1	-1	84	31	6	42,01
3	-1	1	-1	66	49	6	1,97
4	1	1	-1	84	49	6	8,8
5	-1	-1	1	66	31	10	10,69
6	1	-1	1	84	31	10	28,32
7	-1	1	1	66	49	10	2,51
8	1	1	1	84	49	10	4,96
9	-1,68	0	0	60	40	8	2,41
10	1,68	0	0	90	40	8	37,84
11	0	-1,68	0	75	25	8	29,19
12	0	1,68	0	75	55	8	5,38
13	0	0	-1,68	75	40	4,6	6,91
14	0	0	1,68	75	40	11,4	7,18
15	0	0	0	75	40	8	4,81
16	0	0	0	75	40	8	5,58
17	0	0	0	75	40	8	4,62

x₁ = UR (%) = porcentagem da umidade relativa do ar; x₂ = volume SS (%) = % do volume da Solução Salina em relação ao peso total (v/p); x₃ = AT (%) = % do peso do ácido tânico em relação ao peso total (p/p).

Analisando-se os valores de atividade obtidos na Tabela 12, verifica-se um aumento na de atividade enzimática, variando-se de 1,97 U/mL para o ensaio 3 (66% de umidade relativa do ar, 49% do volume da Solução Salina em relação ao peso total e 6% de ácido tânico) até uma atividade máxima de 42,01 U/mL, para o ensaio 2 (84% de umidade relativa do ar, 31% do volume da Solução Salina e 6% de ácido tânico).

A Tabela 13 apresenta os valores dos coeficientes de regressão, t e p-valor para avaliar quais são as variáveis e suas interações, estatisticamente significativo, acima de 90% ($p < 0,10$).

Tabela 13. Resultados do Coeficiente de Regressão, Erro Padrão, t, p e Limite de Confiança na otimização dos componentes do meio de cultivo (umidade relativa do ar, volume da solução salina e ácido tânico) na atividade de fitase.

	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(7)	p-valor	Limite de Confiança -90, %	Limite de Confiança +90, %
Média*	5,06	2,37	2,13	0,0703	0,56	9,54
(1)UR (%) (L)*	8,14	1,11	7,31	0,0001	6,02	10,24
UR (%) (Q)*	5,16	1,23	4,21	0,0039	2,84	7,48
(2)volume SS (%) (L)*	-8,80	1,11	-7,91	0,0001	-10,91	-6,69
volume SS (%) (Q)*	4,16	1,23	3,39	0,0115	1,83	6,47
(3)AT (%) (L)	-1,70	1,11	-1,53	0,1701	-3,81	0,40
AT (%) (Q)	0,54	1,23	0,44	0,6742	-1,78	2,85
1L x 2L*	-4,12	1,46	-2,83	0,0253	-6,87	-1,36
1L x 3L	-1,42	1,46	-0,98	0,3614	-4,17	1,33
2L x 3L	2,14	1,46	1,47	0,1851	-0,61	4,89

* parâmetros estatisticamente significativos a 90% de nível de confiança.

L = parâmetro linear; Q = parâmetro quadrático.

Com os resultados da Tabela 13, as variáveis linear e quadrática de AT (%) (concentração de ácido tânico) e interação UR (%) com AT (%) e UR (%) com AT (%) não foram significativos, sendo avaliados para Resíduos na Fonte de Variação, apresentando p-valor igual a 0,17, 0,67, 0,36 e 0,18, respectivamente. Assim, somente as variáveis Média, UR (%) (L) e (Q), volume SS (%) (L) e (Q) e interação UR (%) e volume SS (%) foram avaliados para Regressão na Fonte de Variação no ANOVA.

A análise de variância (ANOVA) está representada na Tabela 14.

Tabela 14. Análise de Variância no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (UR (%), volume SS (%) e AT (%)) na atividade de fitase.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{cal}	p
Regressão	2514	5	503	25,8	0,00001
Resíduos	214	11	20		
Falta de Ajuste	213,5	9	23,72	91,2	
Erro Puro	0,517	2	0,26		
Total	2727,6	16			

R²=0,92 F_{tab(0,1;5;11)}=2,45 F_{tab(0,1;9;2)}=9,38

Para o coeficiente de correlação (R) o valor obtido foi de 0,96, para o coeficiente de determinação (R²) foi de 0,92, indicando uma correlação satisfatória 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 91,2 (9,72 vezes maior do que o valor de F_{tabelado}=9,38) e indicou uma falta de ajuste do modelo maior que o indicado pelo valor tabelado. O valor de F da Regressão obtido foi de 25,8 (10,53 vezes maior do que o valor de F_{tabelado}=2,45), indicando que o modelo para a atividade de fitase pode ser considerado estatisticamente significativo a 90% de nível de confiança.

Estes resultados podem ser considerados satisfatório e suficientes, permitindo 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 (4):

$$\text{Fitase (U/mL)} = 5,74 + 8,14*(\text{UR}) + 5*(\text{UR})^2 - 8,8*(\text{volume SS}) + 4*(\text{volume SS})^2 - 4,12*(\text{UR})*(\text{volume SS}) \quad (4)$$

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

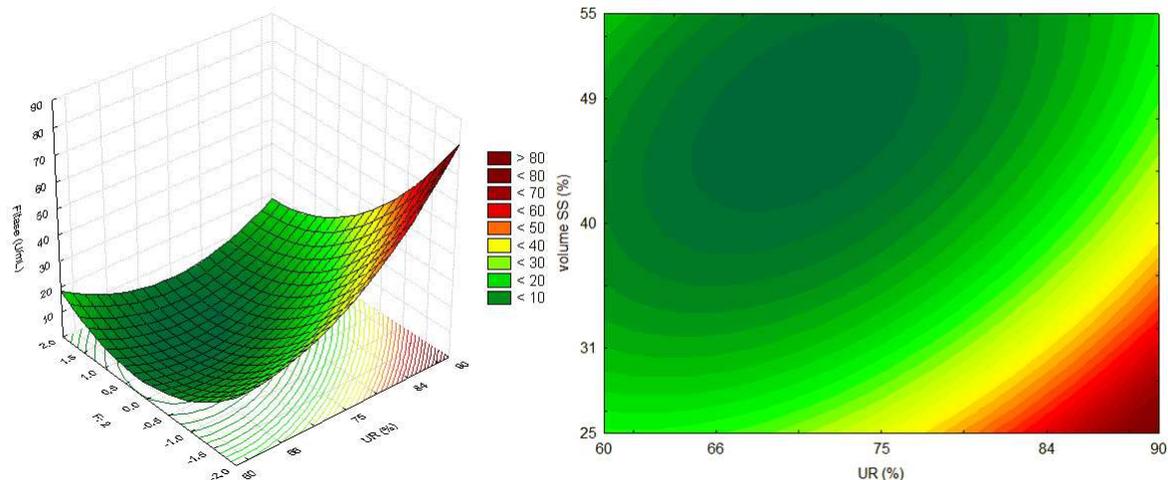


Figura 2. Superfície de Resposta e Curva de Contorno para Atividade da Fitase (U/mL)

A Figura 2 indica que para variável UR (%) a faixa em que se obteria a maior atividade enzimática seria entre 85 a 90% de umidade presente no local de incubação do meio, com porcentagem ótima de 90%. Valores acima de 90% provocariam desequilíbrio entre temperatura e umidade na Câmara Climática, desfavorecendo ao ambiente ótimo para produção enzimática pelo *Paecilomyces variotii*. Concentrações menores de umidade em relação à faixa dita anteriormente produziram menos fitase, devido supostamente pela perda do equilíbrio entre a umidade relativa do ar e a umidade presente no meio de cultivo, trazendo possível perda de umidade do meio e conseqüente diminuição do crescimento do microrganismo.

A variável ácido tânico não interferiu na produção da enzima fitase, sendo desnecessário sua suplementação ao meio de cultura com torta de mamona. Também não foi necessária a suplementação do ácido fítico, que geralmente se usa para produção da fitase, resultando em uma produção com maior viabilidade econômica.

Para a porcentagem do volume da solução salina em relação ao peso total do meio, a faixa de 25 a 28% estimularia a produção da enzima, com concentração ótima de 25%. Porcentagens menores do volume da solução inibiriam o crescimento do microrganismo, provavelmente devido a falta de água livre presente no meio.

De acordo com a melhor faixa do volume da solução salina adicionada no meio para produção de fitase, que foi de 25%, foi quantificada a umidade antes de incubá-lo e após 72

horas na câmara climática sem a inoculação do microrganismo, para relacionar o volume da solução salina adicionada e a umidade presente no meio de cultivo. Também para avaliar o desempenho da umidade durante a incubação na câmara climática. Os resultados estão apresentados na tabela 15.

Tabela 15. Umidade relativa do meio de cultivo antes e após incubação na câmara climática para o meio ótimo para produção de fitase em torta de mamona.

Umidade Relativa do Meio de Cultivo (%)			
Amostra*	Tempo de Incubação**	Umidade Inicial	Umidade Final
TM 72h	72 horas	27%	27%

* TM 72h = meio de cultivo de torta de mamona com 25% 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.

A umidade relativa do meio presente antes e após a fermentação foi de 27%, encontrando um equilíbrio entre a umidade presente no meio de cultivo e a relativa do ar, não havendo perda de água do meio para o ar.

Concentrações menores da solução salina iriam impedir o crescimento do microrganismo no meio, supostamente por falta de água livre presente. O aumento da solução salina no meio de cultivo diminuiu a atividade fitásica, apresentando uma possibilidade de que os sais poderiam limitar a produção enzimática. Portanto foi realizado um estudo comparativo entre um meio de cultivo de torta de mamona composto de solução salina e um outro com água destilada, sem adição de sais. O resultado está representado na Tabela 16.

Tabela 16. Estudo Comparativo da Dependência de Sais no Meio de Cultivo na Torta de Mamona.

Atividade Enzimática da Fitase (U/mL)	
Amostra*	Média
TM F72h	60,13 ± 2,83
TM F72h H₂O	66,35 ± 3,03

* BL F72h = Meio de Cultivo de Torta de Mamona com 25% de Solução Salina; BL F72h H₂O = Meio de Cultivo de Torta de Mamona com 25% de Água Destilada.

De acordo com os resultados o meio de cultivo suplementado com água destilada apresentou maior atividade fitásica, em torno de 66 U/mL, em comparação ao meio suplementado com solução salina, com uma atividade de apenas 60 U/mL. Confirmando assim que em meio de cultivo utilizando torta de mamona como substrato, a solução salina limita a produção da enzima, sendo necessário a utilização de água destilada apenas, tornando um meio mais simples e barato.

Utilizando o processo de otimização, as melhores condições para a produção da fitase, em 10 g de meio, seriam: 2,5 mL de SS (%); 7,5 g de torta de mamona, incubados à 90% de UR. Obtendo-se dessa forma uma atividade de 70 U/mL ou 280 U/g de substrato na fermentação pela linhagem *P. variotii*. Não existem estudos científicos relacionando a produção de fitase por este microrganismo, representando este estudo uma inovação quanto à produção de fitase por fermentação em estado sólido.

Ries e colaboradores (2009) promoveram uma seleção de microrganismos com intuito de identificar produtores de fitase em meios de cultura com ácido fítico, que hidrolisam e formam halo transparente ao redor da colônia estudada. Para os microrganismos selecionados, foi realizada a atividade enzimática para encontrar o microrganismo que produzia mais a enzima. De acordo com os resultados a levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresentou maior rendimento enzimático, com valor de 0,07 UA/mL de amostra, incubado a 35°C após 72 horas do meio de cultivo composto por: fitato de sódio, sucrose e sais minerais como sulfato de magnésio e cloreto de potássio.

Foi realizado um estudo comparativo entre fermentação em estado sólido e submersa para analisar qual processo obtém maior rendimento de fitase e também foi

realizado um estudo utilizando alguns substratos como torta de canola, côco e farelo de trigo para produção enzimática, utilizando os gêneros *Mucor* e *Rhizopus* como inóculos. Os resultados mostraram que a fermentação em estado sólido produziu maior quantidade de fitase, apresentando interesse para a indústria de ração animal, já que se pode ser usado de forma direta, diferente do processo submerso em que a enzima está diluída no meio e há necessidade de varias etapas de purificação, que acaba aumentando seu valor comercial. Entre os substratos testados, a torta de côco com 71% de umidade do meio, suplementado com glicose, caseína e sulfato de amônio apresentou maior atividade, com 26 UA/g de matéria seca a 25°C de incubação após 72 horas (Bogar, 2003).

Ramachandran e colaboradores (2005) publicaram o estudo de varias tortas de sementes oleaginosas para uso como substrato para fermentação em estado sólido para produção de fitase com linhagens do gênero *Rhizopus*. O rendimento máximo de fitase produzida foi de 64 UA/g de matéria seca, utilizando torta de côco suplementado com 1% de glicose e 0,5% de nitrato de amônio após 72 horas de incubação.

Foi utilizada torta de gergelim como substrato para fermentação sólida com o fungo *Sporotrichum thermophile* TLR50. A produção enzimática foi de 180 UA/g de substrato seco que em seguida foi suplementada com glicose e sulfato de amônio, umidade de 71,5%, temperatura de incubação de 45°C após 120 horas, resultando em uma atividade de 282 UA/g de substrato seco (Singh, 2006).

Roopesh e colaboradores (2006) compararam a produção de fitase usando farelo de trigo, torta de sementes oleaginosas e interação entre eles como substratos para fermentação em estado sólido pelo fungo *Mucor racemosus* NRRL 1994. Dentre as oleaginosas foram testados o gergelim e amendoim. Foi reportado que a torta de gergelim serviu como a melhor fonte de carbono para o microrganismo produzir a fitase, traduzindo em uma atividade de 30,6 UA/g de substrato. A interação entre torta de gergelim e farelo de trigo na proporção de 1:1 apresentou atividade enzimática de 32,2 UA/g de substrato.

4.4. Determinações Analíticas

4.4.1. Determinação de Fenóis Totais, Taninos Hidrolisáveis e Condensados na Torta de Mamona

Foi realizada inicialmente a escolha do solvente para extração de Fenóis Totais nas amostras em estudo. Na Tabela 17 estão representadas as concentrações de Fenóis Totais em cada grama de amostra extraída por quatro diferentes solventes diluídos a 1:1 com água destilada, com exceção ao Hexano: Acetato de Etila, Acetona e Metanol, em torta de mamona não fermentada.

Tabela 17. Concentração de Fenóis Totais em torta de mamona não fermentada em diferentes tipos de solventes.

Fenóis Totais (mg/g de amostra)	
Solvente*	Média
Acetato de Etila	42,93 ± 1,75
Acetona	46,99 ± 1,55
Metanol	32,25 ± 2,41
Hexano	3,28 ± 0,37

*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.

Os resultados mostram que o solvente Acetona diluído a 1:1 com água destilada apresentou maior concentração de fenóis, com uma média de 47 miligramas por grama de amostra.

Como já discutido no capítulo do bagaço de laranja, não há um consenso para utilização de um solvente para extração dos compostos fenólicos na maioria das amostras na área de alimentos, principalmente em vegetais. Mas os resultados acima indicam que o melhor solvente para extração de compostos fenólicos são aqueles que apresentam polaridade, o que não ocorre com o Hexano por ser um solvente apolar e não interage com compostos polares, somente com apolares.

Para melhor extração de Fenóis Totais e também para Taninos Hidrolisáveis e Condensados, foi utilizada a solução de Acetona para analisar os seus teores antes e após a fermentação da torta de mamona.

Os teores de Fenóis Totais e Taninos Hidrolisáveis das amostras, torta de mamona *in natura* e meio de cultivo otimizado e fermentado para produção de fitase (após 72 horas de fermentação), estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Concentração de Fenóis Totais e Taninos Hidrolisáveis antes e após fermentação.

Fenóis Totais e Taninos Hidrolisáveis (mg/g de amostra)		
Amostras*	FT	TH
TM	28,14 ± 2,16	3,34 ± 0,19
TM F72h	14,03 ± 5,4	0,52 ± 0,18

*TM = Torta de Mamona *in natura*; TM F72h = meio de cultivo otimizado e fermentado para produção de fitase (após 72 horas de fermentação).

Os resultados mostraram que a fermentação da torta de mamona por *Paecilomyces variotii* após 72 horas de incubação diminuiu a concentração de fenóis totais e também de taninos hidrolisáveis. Provavelmente o microrganismo produziu enzimas que hidrolisaram estes compostos, como a tanase, que tem capacidade de clivar taninos hidrolisáveis. Para estas amostras, não foram detectados concentrações suficientes de taninos condensados, provavelmente não foram postados quantidades suficientes das amostras no processo de extração para determinar os taninos condensados.

Não foram encontradas na literatura recente, pesquisas que envolvessem a determinação de compostos fenólicos em torta de mamona, já que estes resíduos não apresentam ainda interesse na produção de ração animal e consequentemente não há estudos para análises de compostos de interesse funcional ao animal.

Xu e colaboradores (1998) quantificaram a presença de compostos fenólicos em canola, uma semente utilizada para extração de seu óleo para o setor de biocombustíveis. Foi realizado uma etapa de extração em que a amostra passou por uma extração ácida de acetona em seguida por uma hidrólise alcalina, depois passou por uma acidificação, depois

por uma extração de éter etílico com acetato de etila e finalmente por uma evaporação e dissolução em metanol. Essa extração foi realizada para que se obtivesse três tipos de fenóis: os livres, os esterificados e os insolúveis, favorecendo um maior amplo de compostos identificados na análise colorimétrica. De acordo com os resultados, a canola apresentou 1683 miligramas de compostos fenólicos a cada 100 gramas de amostra.

Segundo Kozłowska e colaboradores (1991) a concentração de ácidos fenólicos em farelo de canola está na ordem de 6,4 a 12,8 gramas por kg de amostra.

A partir destes resultados a torta de mamona apresentou uma composição de compostos fenólicos mais expressivos em relação à canola, apresentando vantagem em relação a sua composição fenólica para um futuro uso como ração animal.

Foi publicado também que taninos hidrolisáveis estão presentes em algumas espécies vegetais de interesse econômico como: castanha de caju, pistache, avelã, manga, caqui, goiaba, romã, damasco, pêsego, morango, framboesa, amora e uva, sendo na maioria das vezes encontrada em folhas (Clifford, 2000).

Aguilar e colaboradores (2008) quantificaram taninos hidrolisáveis em folhas de *Larrea tridentata* durante processo fermentativo em estado sólido utilizando *Aspergillus niger* GH1. O substrato foi hidrolisado pelo microrganismo para ácido gálico e ácido elágico após 96 horas de fermentação. Mostrando que o microrganismo utilizou estes compostos como fonte de carbono para seu crescimento.

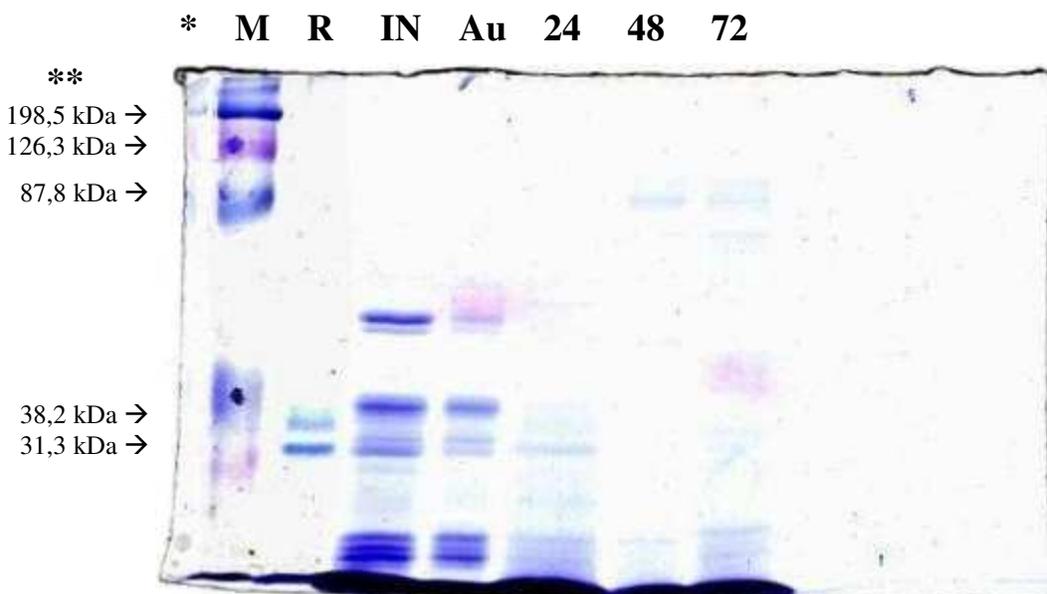
Foi determinada a concentração de taninos hidrolisáveis antes e após fermentação por *Paecilomyces variotii* em farinha de sorgo e suplementação de tanase e fitase. A farinha de sorgo apresentava 64 miligramas de taninos hidrolisáveis em 100 gramas de amostra, depois da aplicação das enzimas e/ou microrganismo a concentração caiu 90%. Entre as amostras não houve diferença estatística, demonstrando possível hidrólise por tratamento enzimático ou biológico (microrganismo). Entretanto não podemos afirmar com certeza, pois a diminuição pode ter ocorrido pelo tratamento físico, que foram maceração e aquecimento (Schons, 2009).

4.4.2. Avaliação da detoxificação da torta de mamona por fermentação em estado sólido

4.4.2.1. Detecção de Ricina por SDS-PAGE

Para avaliar a detoxificação da torta de mamona via fermentação em estado sólido por *Paecilomyces variotii*, foi identificada a presença da ricina por SDS-PAGE. A ricina apresentavam 2 cadeias que quando clivados pelo SDS e corridos no gel de poliacrilamida apresentam duas bandas, uma chamada de cadeia A com 32 kDa e outra de cadeia B com 34 kDa (Anandan, 2005).

Foi avaliado o extrato protéico do produto fermentado em diferentes tempos de incubação, entre 24 a 72 horas, comparando com a ricina purificada, a torta de mamona *in natura* e a autoclavada (Figura 3).



* M = Marcador; R = Ricina purificada; IN = Torta de Mamona in natura; Au = Torta de Mamona Autoclavada; 24 = Torta de Mamona Fermentada durante 24 horas; 48 = Torta de Mamona Fermentada durante 48 horas; 72 = Torta de Mamona Fermentada durante 72 horas.

** Massa Molecular de cada cadeia do Marcador.

Figura 3. SDS-PAGE 12% do extrato protéico de cada amostra testada.

De acordo com a Figura 3 as bandas em que a ricina aparecem no gel estão na faixa entre 31,3 e 38,2 kDa, sendo também visualizadas na corrida com a ricina purificada. As amostras torta de mamona *in natura* e torta de mamona autoclavada apresentaram as duas bandas da ricina no gel, mostrando que a metodologia é válida para identificação deste composto em amostras de extrato protéico. O processo de autoclavagem, à 121°C durante 15 minutos, não destruiu as cadeias da ricina. Na amostra de extrato protéico fermentado após 24 horas, a presença de ricina é fracamente visível, demonstrando uma provável inicialização da hidrólise do composto. Nas amostras de 48 e 72 horas de fermentação, as bandas onde a ricina se localizam estão completamente ausentes, mostrando possivelmente que o microrganismo *Paecilomyces variotii* hidrolisou a ricina, tornando possível uma torta detoxificada e viável para uso em ração animal. A detecção mínima de proteínas em SDS-PAGE por Coomassie Blue é de 10 µg/mL de amostra, concentrações mais baixas dificilmente são detectáveis pelo método (Anandan, 2005; Godoy, 2009; Schägger, 2006). Uma alternativa seria a utilização do corante de prata para uma detecção de compostos com menores concentrações.

Marsden e colaboradores (2004) publicaram a inserção de um peptídeo na cadeia A da ricina para redução de sua atividade citotóxica. Foi realizada com ajuda do microrganismo *E. coli* JM101 que induziu a inserção e foi produzida para sintetização na forma de vacina e injetada em ratos. De acordo com os resultados, a atividade reduziu em aproximadamente 300 vezes, sendo que os ratos apresentaram resistência completa a toxina, sugerindo uma possível produção de vacina.

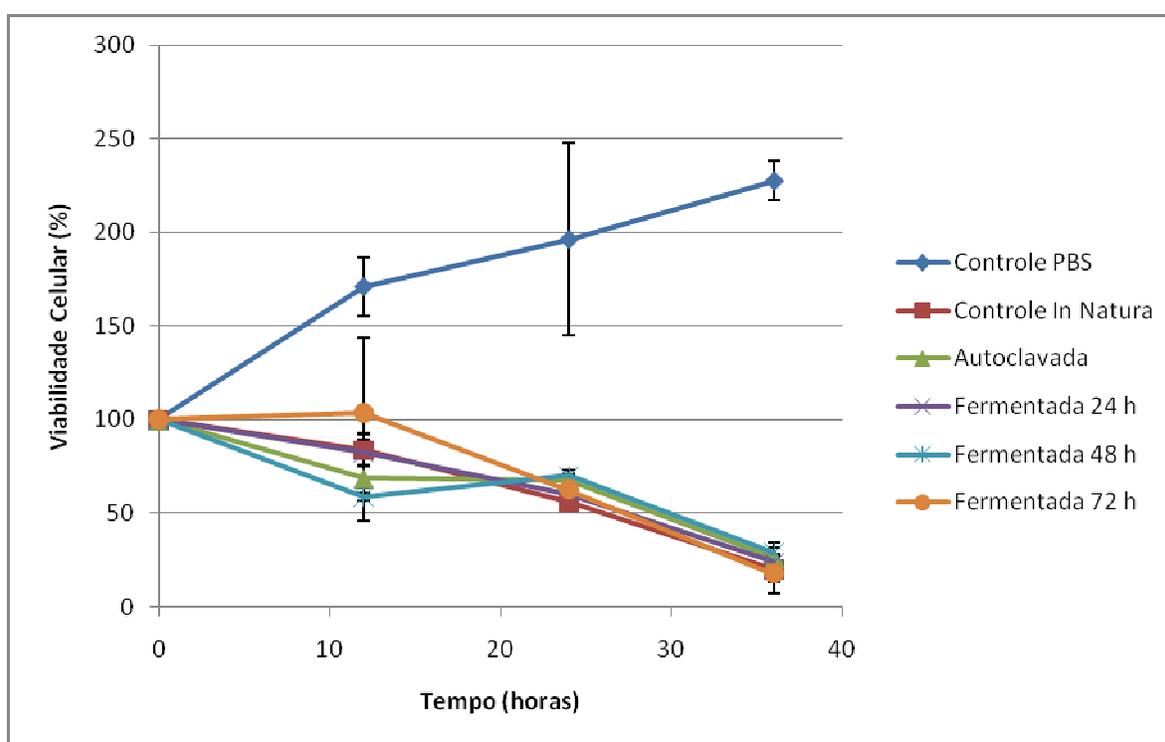
Foram realizados vários tratamentos químicos e físicos como autoclavagem, aquecimento por ebulição e vapor, adição de amônia, solução de hidróxido de cálcio, formaldeído, cloreto de sódio, ácido tânico e hidróxido de sódio. De acordo com os resultados a autoclavagem após 60 minutos a 15 psi ou adição da solução de hidróxido de sódio na concentração de 40 g/kg de torta de mamona destruíram completamente a ricina presente, apresentando uma alternativa para o processo de detoxificação da torta (Anandan, 2005).

Godoy e colaboradores (2009) publicaram a fermentação da torta de mamona do tipo estado sólido pelo fungo *Penicillium simplicissimum*, que apresentou atividade lipásica

de 44,8 UA/g de substrato e também o microrganismo conseguiu reduzir a quantidade de ricina presente na amostras em concentrações não detectáveis no gel SDS-PAGE.

4.4.2.2. Teste de Atividade Tóxica em Cultura de Células

Através dos resultados obtidos pela análise em eletroforese, as amostras foram testadas em culturas de células vivas para verificação da viabilidade da mesma em presença da torta de mamona *in natura* e fermentada. Os resultados estão representados na Figura 4.



* Controle PBS = cultura celular incubado em solução tampão PBS; Controle In Natura = cultura celular incubado em solução tampão PBS e extrato protéico de torta de mamona *in natura*; Autoclavada = cultura celular incubado em solução tampão PBS e extrato protéico da torta de mamona autoclavada; Fermentada 24 h = cultura celular incubado em solução tampão PBS e extrato protéico da torta de mamona fermentada após 24 horas; Fermentada 48 h = cultura celular incubado em solução tampão PBS e extrato protéico da torta de mamona fermentada após 48 horas; Fermentada 72 h = cultura celular incubado em solução tampão PBS e extrato protéico da torta de mamona fermentada após 72 horas.

Figura 4. Comportamento celular (quanto à sobrevivência) após tratamento com as amostras em estudo.

De acordo com a Figura 4 o controle PBS foi quem apresentou crescimento contínuo no número de células durante as 36 horas de incubação. As amostras da torta de mamona *in natura* e autoclavadas apresentaram declínio no número de células vivas durante as 36 horas de incubação e já sendo observado nas primeiras 12 horas. Estes extratos como avaliado no item 5.4.4.1 apresentaram ricina, que promoveu sua atividade tóxica nas células. As amostras dos extratos protéicos de torta de mamona fermentada entre 24 a 72 horas também apresentaram declínio na viabilidade celular durante o período de 36 horas de incubação. Entretanto, não se pode confirmar que a ricina atuou nessas culturas celulares, já que no item 5.4.4.1 foi demonstrado que a ricina não foi detectada nas amostras fermentadas em concentrações de 10 µg/mL. Provavelmente existam pequenas concentrações de ricina na amostra em que o corante Coomassie-Brilliant-Blue não detectou, mas que são suficientes para atuação tóxica nas células. Um trabalho publicado mostrou que a concentração mínima de ricina para que a célula fosse induzida a morte era de 10 ng/mL de amostra (Fernandes, 2010). Outra possibilidade é que o microrganismo tenha conseguido hidrolisar a ricina presente na torta, mas que tenha sintetizado outros compostos tóxicos que inviabilizaram o crescimento das células Vero. Uma alternativa para esta questão seria a utilização de anticorpo IgG anti-cadeia A da ricina, para avaliar a viabilidade das células Vero. Caso as células apresentem o mesmo desempenho das amostras anteriores, provavelmente o *P. variotii* produziu toxinas fúngicas, que não foram avaliadas e por fim, induziram a morte das células. Se as células mantiverem vivas durante o período de incubação com a inoculação do IgG anti-ricina, provavelmente exista uma quantidade de ricina em que o corante Coomassie-Brilliant-Blue não detectou e que está sendo suficiente para indução da morte celular.

5. Conclusões Parciais

Foi obtido pela primeira vez uma produção simultânea das enzimas tanase e fitase utilizando o processo de fermentação em estado sólido. Estas enzimas são de grande interesse para indústria de ração animal e foram obtidas a partir de um único microrganismo, o fungo filamentosso *Paecilomyces variotii*.

Foi possível produzir as enzimas tanase e fitase a partir da torta de mamona, utilizando um sub-produto do setor de biodiesel. Foi observado que houve um decréscimo na concentração do indutor ácido tânico para produção da enzima tanase, podendo diminuir o custo de produção.

Através do processo fermentativo, foi possível diminuir a concentração de ricina na torta. Entretanto não se pode confirmar sua total hidrólise no sub-produto, pois o material fermentado apresentou atividade citotóxica. Assim, a torta provavelmente apresentou quantidades mínimas de ricina que não foram detectáveis no SDS-PAGE ou o microrganismo, durante a fermentação, produziu compostos tóxicos, como micotoxinas.

6. Referências Bibliográficas

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 tridentate*) leaves. *Food Technology and Biotechnology* 46, p. 218-222, 2008.

Anandan, S.; Kumar, G. K. A.; Ghosh, J.; Ramachandra, K. S. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. *Animal Feed Science and Technology* 120, p. 159-168, 2005.

Battestin, V.; Macedo, G. A. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. *Bioresource Technology* 98, p. 1832-1837, 2007b.

Bogar, B.; Szakacs, G.; Pandey, A.; Abdulhameed, S.; Linden, J. C.; Tengerdy, R. P. Production of phytase by *Mucor racemosus* in solid-state fermentation. *Biotechnology Progress* 19, p. 312-319, 2003.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, p. 248, 1976.

Brune, M. Hallberg, L. Skånberg, A. Determination of iron-binding phenolic groups in foods. *Journal of Food Science* 56, p. 128-131, 1991.

Clifford, M. N.; Scalbert, A. Review: Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, p. 1118-1125, 2000.

Fernandes, K. V. Desenvolvimento de um bioensaio para detecção de ricina e utilização da fermentação em estado sólido para detoxificação da torta de mamona e produção de lipase. *Dissertação de Mestrado*, LQFPP-CBB-UENF – RJ, 2010.

Godoy, M. G. Produção de lipase microbiana e detoxificação simultânea de rejeitos agroindustriais. *Dissertação de Mestrado*, IQ-UFRJ - RJ, 2009.

Gowda, N. K. S.; Pal, D. T.; Srinivas, R. B.; Bharadwaj, U.; Sridhar, M.; Satyanarayana, M. L.; Prasad, C. S.; Ramachandra, K. S.; Sampath, K. Evaluation of castor (*Ricinus communis*) seed cake in the total mixed ration for sheep. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89, p. 216-220, 2008.

Jones, D. B. Proteins of the castor bean-their preparation, properties, and utilization. *The Journal of The American Oil Chemists' Society*, July, p. 247-251, 1947.

Kozłowska, H.; Naczka, M.; Shahi, F.; Zadernowski, R. Phenolic acids and tannins in rapeseed and canola. In *Canola and Rapeseed: Production, Chemistry, Nutrition and Processing Technology*, ed. F. Shahidi, AVI Book, New York, NY, p. 193-210, 1991.

Laitnen, H. A. Boyer, K. W. Automobile exhaust particulates properties of environmental significance. *Environmental Science and Technology* 79, p. 457-1086, 1975.

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.

Macedo, G. A.; Matsuda, L. K.; Battestin, V. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais. *Ciência e Agrotecnologia* 29, p. 833-838, 2005.

Mahapatra, S.; Banerjee, D. Extracellular tannase production by endophytic *Hyalopus* sp.. *The Journal of General and Applied Microbiology* 55, p. 255-259, 2009.

Marsden, C. J.; Knight, S.; Smith, D. C.; Day, P. J.; Roberts, L. M.; Phillips, G. J.; Lord, J. M. Insertional mutagenesis of ricin A chain: a novel route to an anti-ricin vaccine. *Vaccine* 22, p. 2800-2805, 2004.

Mondal, K. C. Banerjee, D. Jana, M. Pati, B. R. Colorimetric assay method for determination of the tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity. *Analytical Biochemistry* 295, p. 168-171, 2001.

Naczk, M.; Shahidi, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* 1054, p. 95-111, 2004.

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.

Raaman, N.; Mahendran, B.; Jaganathan, C.; Sukumar, S.; Chandrasekaran, V. Optimisation of extracellular tannase production from *Paecilomyces variotii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26, p. 1033-1039, 2009.

Ramachandran, S.; Roopesh, K.; Nampoothiri, K. M.; Szakacs, G.; Pandey, A. Mixed substrate fermentation for the production of phytase by *Rhizopus* spp. using oilcakes as substrates. *Process Biochemistry* 40, p. 1749-1754, 2005.

Ries, E. F., Macedo, G. A. Progressive screening of thermostable yeasts for phytase production. *Food Science and Biotechnology* 18, p. 655-660, 2009.

Rodrigues, M. I. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos. 1a.Ed. – Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.

Sabu, A.; Augur, C.; Swati, C.; Pandey, A. Tannase production by *Lactobacillus* sp. ASR-S1 under solid-state fermentation. *Process Biochemistry* 41, p. 575-580, 2006.

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. 1223-1228, 2005.

Savy Filho, A. *Mamona: Tecnologia Agrícola*. Campinas. SP: EMOPI, 2005.

Schägger, H. Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols* 1,p. 16-22, 2006.

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.

Singh, B.; Satyanarayana, T. Phytase production by thermophilic mold *Sporotrichum thermophile* in solid-state fermentation and its application in dephytinization of sesame oil cake. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 133, p. 239-250, 2006.

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.

Stockmann, C.; Losen, M.; Dahlems, U.; Knocke, C.; Gellissen, G.; Buchs, J. Effect of oxygen supply on passaging, stabilizing and screening of recombinant *Hansenula polymorpha* production strains in test tube cultures. *FEMS Yeast Research* 4, p. 195-205, 2003.

Tripodo, M. M.; Lanuzza, F.; Micali, G.; Coppolino, R.; Nucita, F. Citrus waste recovery: a new environmentally friendly procedure to obtain animal feed. *Bioresource Technology* 91, p. 111-115, 2004.

Xu, L.; Diosady, L. L. Rapid method for total phenolic acid determination in rapeseed/canola meals. *Food Research International* 30, p. 571-574, 1997.

Conclusão Final

Foi obtida pela primeira vez uma produção simultânea de tanase e fitase interessante para indústria de ração animal a partir de um único microrganismo, o fungo filamentoso *Paecilomyces variotii*.

Foi possível obter as enzimas tanase e fitase a partir do bagaço de laranja e torta de mamona, subprodutos do setor agroindustrial, o que podem ser mais viáveis financeiramente. Foi observado que houve decréscimo na concentração do indutor ácido tânico para produção da enzima tanase, podendo baratear o custo de produção.

O processo fermentativo conseguiu aumentar a capacidade antioxidativa do bagaço de laranja, tornando um produto de maior interesse na sua utilização como ração animal. Ao mesmo tempo, houve um decréscimo na quantidade de fibras presentes no bagaço após a sua fermentação, prejudicando sua utilização em relação ao processo de digestibilidade durante a passagem do trato gastrointestinal.

Após o processo fermentativo, a torta de mamona apresentou menor concentração de ricina, entretanto não podemos confirmar sua total hidrólise no resíduo, pois ela apresentou atividade citotóxica durante sua incubação. Assim a torta provavelmente apresentou quantidades mínimas de ricina que não foram detectáveis no SDS-PAGE ou o microrganismo durante a fermentação produziu compostos tóxicos, como micotoxinas.

Trabalhos Futuros

Caracterização da fitase produzida pelo *Paecilomyces variotii*.

Produção enzimática e detoxificação de outros substratos como torta de Crambe, Pinhão-Manso, Tung e outros.

Teste de citotoxicidade das células Vero com a utilização de anticorpo IgG anti-cadeia A da ricina.

Testar os substratos fermentados para nutrição animal.