

UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS EM PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA PRODUÇÃO DA ENZIMA TANASE

USE OF AGRO-INDUSTRIAL WASTES IN BIOTECHNOLOGICAL PROCESS FOR THE PRODUCTION OF TANNASE ENZYME

Paula Rodrigues Sampaio ¹
Dra. Silvana Haddad ²
Dra. Vania Battestin Wiendl ³

Data de entrega dos originais à redação em: 28/07/2016
e recebido para diagramação em: 24/07/2017.

A tanase (E.C: 3.1.1.20) hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis produzindo glicose e ácido gálico. É uma enzima extracelular, induzível, produzida por fungos, bactérias e leveduras. O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção da enzima tanase através da fermentação sólida. Foram utilizadas duas linhagens fúngicas LAB6VW e LAB29VW e estas foram testadas nos diferentes resíduos agroindustriais. A fermentação ocorreu em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 10g de resíduos, 10 mL de solução de sais e indutor ácido tânico. A linhagem LAB29VW foi capaz de crescer e produzir a enzima tanase em todos os resíduos testados. As maiores atividades foram observadas para os resíduos de uva e farelo de trigo apresentando valores de atividade de 0,021 e 0,025 U/mL respectivamente. Esse estudo demonstrou que a concentração de ácido tânico adicionado ao meio de fermentação é fator chave na produção da tanase. A melhor concentração de indutor para a produção da enzima foi de 8%.

Palavras-chave: Enzima. Fermentação Sólida. Microorganismos.

Tannase (E.C: 3.1.1.20) hydrolyzes esters and side bonds of hydrolysable tannins producing glucose and gallic acid. It is an extracellular enzyme, inducible, produced by fungi, bacteria and yeasts. The objective of this work was to evaluate the use of different agroindustrial residues as substrates for the production of the enzyme tannase through solid fermentation. Two fungal lines LAB6VW and LAB29VW were used and these were tested in the different agroindustrial residues. The fermentation occurred in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 10 g of residues, 10 ml of saline solution and tannic acid inducer. The LAB29VW strain was able to grow and produce the enzyme tannase in all residues tested. The highest activity was observed for wheat and wheat bran residues presenting activity values of 0.021 and 0.025 U / mL, respectively. This study demonstrated that the concentration of tannic acid added to the fermentation medium is a key factor in the production of tannase. The best concentration of inducer for enzyme production was 8%.

Keywords: Enzyme. Solid Fermentation. Microorganisms.

1 INTRODUÇÃO

O estudo de utilização de novos meios industriais de fermentação para obtenção de produtos biotecnológicos tem recebido grande atenção nos últimos anos. Diversos coprodutos e resíduos da agroindústria tem sido empregados para obtenção de produtos biotecnológicos, pela alta disponibilidade e por representarem fonte alternativa de baixo custo. Entre esses produtos biotecnológicos destaca-se a produção de enzimas. O processo de produção de enzimas é frequentemente limitado pelos custos dos substratos utilizados para o cultivo dos microrganismos. Estima-se que aproximadamente 30-40% do custo envolvido na produção de enzimas é devido ao meio de cultura utilizado (MANERA et al., 2011).

Resíduos e subprodutos agroindustriais são fontes abundantes de compostos orgânicos, apresentando grande potencial de uso como matéria prima em processos industriais para a produção de alimentos, combustíveis, insumos químicos, enzimas e bens de consumo diversos (ROBERTO, MUSSATTO & RODRIGUES,

2003; CARVALHO et al., 2004; SANTOS et al., 2005). Estes materiais são os principais constituintes da biomassa vegetal, como a de resíduos agrícolas e florestais (palha de arroz, eucalipto, bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho, por exemplo), os quais são acumulados no ambiente, ocasionando problemas de poluição e representando a perda de valiosos recursos. Assim, é importante que se desenvolvam técnicas para o aproveitamento desses resíduos na obtenção de produtos úteis à humanidade e, com este objetivo, o emprego de processos biotecnológicos tem sido bastante estudado (MARTINEZ et al., 2002; CARVALHO, SILVA, SANTOS & COVERTI, 2003). Com o advento da inovação biotecnológica, principalmente na área de enzimas e tecnologia das fermentações, novas perspectivas estão sendo criadas. A aplicação de resíduos de agroindústrias em bioprocessos é uma forma de utilizar substratos alternativos e, de alguma maneira, solucionar problemas de poluição que possam causar. O uso de resíduos agroindustriais pode ajudar não somente a reduzir a poluição ambiental, mas também

1 - Licenciatura em Ciências Biológicas. <psaampaio@gmail.com >.

2 - Licenciatura em Ciências Biológicas. <vbattestin@gmail.com >.

3 - Licenciatura em Química.

agregar valor às indústrias processadoras. A utilização de resíduos provenientes de indústrias processadoras pode consistir em uma alternativa para promover a redução dos custos de produção de metabólitos de alto valor agregado (SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003)

A bioconversão dos resíduos agrícolas está recebendo bastante atenção, uma vez que essas matérias-primas representam recursos possíveis e utilizáveis para a síntese de produtos úteis. Nesse contexto, a fermentação em estado sólido desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos. Em virtude do crescimento microbiano nesse tipo de fermentação, ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industriais, além de elevado valor agregado (ROCHA, 2010). Nos últimos anos, houve um interesse crescente no uso eficiente de diversos resíduos agroindustriais. Vários bioprocessos têm sido desenvolvidos utilizando estes materiais como substratos para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado, tais como: proteínas microbianas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos. O uso de resíduos agrícolas como substratos em bioprocessos, além de ser economicamente viável, ajuda a resolver os problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza (ALEXANDRINO, FARIA, SOUZA & PERALTA, 2007)

A laranja está entre as frutas mais produzidas e consumidas no mundo, sendo que sua produção ultrapassa 80 milhões de toneladas/ano. Atualmente o uso principal dos resíduos da laranja é como complemento para a ração animal, tendo boa aceitação por bovinos e caprinos. Vários estudos têm proposto outros usos para os resíduos da laranja, incluindo a obtenção de fertilizantes orgânicos, pectina, óleos essenciais, compostos com atividade antioxidante e utilização em bioprocessos para produção de várias enzimas, incluindo pectinases e amilases. Apesar de todas essas possibilidades, os resíduos das indústrias de suco de laranja permanecem em sua maior parte inutilizados (ALEXANDRINO, FARIA, SOUZA & PERALTA, 2007).

Segundo Melo et al., (2011), dentre os diversos resíduos gerados pela diferentes agroindústrias, destacam-se os vinícolas por serem fontes ricas de compostos fenólicos e pela expressiva quantidade resultante do processamento. A soma deles, bagaço (cascas e sementes), engaço e a borra do processo fermentativo representam, em média, cerca de 30% do volume de uvas utilizadas para a produção vinícola, o que torna este resíduo uma fonte promissora de substâncias bioativas naturais.

O bagaço de cana-de-açúcar é um dos principais subprodutos da indústria sucroalcooleira. Este é caracterizado como um resíduo fibroso que é produzido após a moagem e extração do xarope da cana – de – açúcar (FILHO & BADR, 2004). No processamento industrial da cana-de-açúcar, além da produção de açúcar e álcool, os subprodutos, tais como o vinhoto e o bagaço, podem ser aproveitados como fontes geradoras de energia ou na produção de adubos, papel e plástico biodegradáveis (SIMÕES, 2011).

Tanino acil hidrolases conhecida como tanase (E.C. 3.1.1.20) são esterases capazes de hidrolisar ligações

éster (entre o grupo anel aromático e o resíduo de glicose) e ligações depsídicas (ligações éster entre os anéis aromáticos) em substratos como ácido tânico, epicatequina galato e epigallocatequina galato (LEKHA & LONSANE, 1994; BATTESIN, 2007). Tanase é uma enzima extracelular, induzível, produzida na presença de ácido tânico por fungos, bactérias e leveduras (AGUILAR, AUGUS, GONZÁLEZ & FAVELA, 1999). Vários estudos têm sido conduzidos em relação a produção e aplicações dessa enzima. Os resultados desses estudos mostram as diferentes aplicações e potencialidades que essa molécula oferece.

Battestin et al., (2008) estudaram a aplicação de tanase em chás comerciais, analisando a capacidade da enzima em hidrolisar compostos fenólicos presentes nesses chás. Os autores verificaram uma excelente atuação da enzima nesses substratos fenólicos do chá verde e constataram que a atividade antioxidante aumentou significativamente nesses chás tratados. Schons et al., (2012) estudaram o efeito *in vivo* de uma dieta elaborada a base de sorgo tratado com a tanase. Foi constatado que o tratamento enzimático do sorgo com as enzimas promoveu a diminuição nas concentrações de taninos e aumento do fósforo inorgânico nas rações. Queirós (2014) estudou a ação da enzima tanase na biotransformação de compostos fenólicos no extrato hidrossolúvel de soja, obtendo um produto rico em compostos antioxidantes, sugerindo sua utilização como ingrediente para bebidas funcionais. Considerando que o Brasil gera grandes quantidades de resíduos agroindustriais, desenvolveu-se o presente trabalho com o objetivo de avaliar o uso de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção da enzima tanase através da fermentação sólida.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Substratos Agroindustriais

Os resíduos agroindustriais utilizados, foram: resíduo de cana de açúcar (proveniente da extração do caldo de cana), resíduo de laranja (proveniente da extração de suco da laranja), resíduo de uva (proveniente do processamento para a fabricação de vinho) e farelo de trigo (adquirido em supermercado local). Os resíduos foram coletados e congelados a - 10 °C.

Neste estudo os seguintes equipamentos foram utilizados: estufa de secagem (Novatecnica - Série 10090827), balança analítica (Acculab ALC-210.4), pHmetro (Del Lab – Série 03110610), centrífuga (Sislab/Twister), banho termostático (Adamo – N 321) e espectrofotômetro (Fento, Cirrus 80).

2.2 Padronização dos Resíduos

As amostras dos resíduos agroindustriais coletadas foram caracterizadas em relação a: secagem dos resíduos em estufa (105 °C), determinação do pH, umidade e granulometria. Os resíduos úmidos foram desidratados em estufa a 45°C, até obtenção de partículas secas e não aglomeradas. Essas amostras foram trituradas em liquidificador e padronizadas com relação ao tamanho das partículas utilizando peneiras de 1,68 mm. Para a determinação do pH seguiu-se a metodologia descrita de acordo as normas do Instituto Adolfo Lutz (1985).

2.3 Determinação da Umidade dos Resíduos

Pesou-se 5,0g de amostra em cápsulas de porcelana previamente taradas. As amostras foram aquecidas em estufa a 105°C durante 3h. Em seguida resfriaram-se as amostras em dessecador até temperatura ambiente e pesou-se. Repetiu-se a operação de aquecimento e resfriamento até peso constante (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

2.4 Microrganismos e Conservação das Linhagens

Foram testadas 2 linhagens fungicas denominadas LAB6VW e LAB29VW pertencentes ao laboratório de Bioquímica do Instituto Federal de Ciências e Tecnologia de São Paulo – Campus São Roque. Em estudo anterior essas linhagens foram isoladas do solo de formigueiro e do solo do IFSP – Campus São Roque respectivamente. As linhagens fungicas foram conservadas em tubos com meio de Agar de batata dextrosado (PDA), inclinados a 4°C.

2.5 Preparo do Pré Inoculo

As linhagens foram repicadas em meio inclinado PDA com suplemento de 0,2% (p/v) de ácido tânico e incubadas em estufa à 32°C por 72 horas, para pré-indução da tanase.

2.6 Fermentação Sólida Utilizando Resíduos Agroindustriais Para Produção da Tanase

Os resíduos agroindustriais de laranja, uva, cana de açúcar e farelo de trigo foram utilizados como substratos da fermentação sólida para produção da enzima tanase. Em frascos Erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 20g da mistura de resíduos agroindustriais, na proporção inicial de 1:1 (resíduos mais solução de sais acrescida de ácido tânico), ajustável até alcançar concentração final de 5% de ácido tânico. A solução de sais foi composta por (g/L): NH₄Cl, 0,1; (NH₄)₂SO₄, 0,1; CaCl₂.2H₂O, 0,01; K₂SO₄, 0,01; MnSO₄.H₂O, 0,002; FeSO₄.7H₂O, 0,002. O meio de cultivo foi esterilizado a 120°C por 20 minutos. Após a esterilização os frascos foram inoculados com 2,5 mL de solução de esporos e incubados a 32°C em estufa, por 5 dias. Após a fermentação, foram adicionados 70 mL de solução tampão acetato pH 5,0- 20mM e agitados a 150 rpm por 2h. A solução foi filtrada em algodão e o filtrado centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos. No sobrenadante foi medida a atividade enzimática de tanase (LEKHA & LONSANE, 1994).

2.7 Medida da Atividade Enzimática de Tanase

A solução de substrato foi preparada pela adição de 0,12 % (p/v) de ácido tânico em tampão acetato pH 5,5 - 0,2 M. A reação foi realizada adicionando 0,3 mL da solução de substrato com 0,5 mL de extrato enzimático bruto e incubado a 60°C por 10 minutos. Após a incubação, a reação foi paralisada pela adição de 3 mL de solução de BSA preparada na concentração de 1 mg/mL de albumina de soro bovino (BSA) e 0,17 M de cloreto de sódio em tampão acetato pH 5,0 , 0,2 M, e em seguida centrifugada a 10000 rpm por 15 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 3 mL de solução SDS-trietanolamina

(SDS 1% (p/v) adicionado de 5% (v/v) de trietanolamina em água destilada) acrescido de 1 mL de solução de FeCl₃ (0,01M de FeCl₃ em 0,01M de ácido clorídrico). A absorbância foi medida após 15 minutos em 530 nm (MONDAL, BANERJEE, JANA & PATI, 2001). A curva padrão foi elaborada utilizando quantidades de ácido tânico comercial variando entre 0,01% e 0,15%. A atividade da enzima foi calculada pela mudança na absorbância a 530 nm: $Abs_{530} = Abs_{controle} - Abs_{teste}$

2.8 Efeito do Indutor na Atividade de Tanase

Verificou-se o efeito de diferentes concentrações de indutor (ácido tânico) no meio de fermentação. Concentrações de 2, 5 e 8% de ácido tânico foram adicionadas aos meios de fermentação com o objetivo de verificar o comportamento do microrganismo frente a diferentes concentrações de ácido tânico na síntese de tanase.

2.9 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em duplicata e os resultados submetidos ao cálculo da média e desvio padrão utilizando o Excel 2007.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Determinação de Umidade, pH e Granulometria dos Resíduos

Todos os resíduos foram secados, triturados e padronizados em relação ao teor de umidade, pH e tamanho das partículas. Na Tabela a seguir encontram-se os dados obtidos.

Tabela 1 - Determinações de umidade, pH e granulometria dos resíduos

Resíduos	Umidade (%)	pH	Granulometria (mm)
Laranja	21,9 ± 0,64	3,9 ± 0,07	1,3 ± 0,07
Uva	5,9 ± 0,42	3,7 ± 0,01	0,7 ± 0,06
Cana de açúcar	9,8 ± 0,35	4,9 ± 0,07	0,9 ± 0,07
Farelo de trigo	19,6 ± 0,49	5,5 ± 0,14	1,3 ± 0,05

Os resíduos de laranja e farelo de trigo apresentaram os maiores teores de umidade de 21,9 (%) e 19,6 (%) respectivamente. Isso se deve ao fato desses resíduos apresentarem uma maior granulometria após processo de trituração dos tecidos vegetais. Para esses resíduos os tamanhos das partículas obtidas após trituração e padronização ficaram em torno de 1,3mm. O teor de umidade dos resíduos pode influenciar no meio de fermentação sólida uma vez que os fungos filamentosos necessitam de um teor de umidade mínima para seu crescimento e metabolismo.

3.2 Produção da Tanase nos Resíduos Agroindustriais

Todos os resíduos tratados foram utilizados como substratos para a fermentação sólida. Os resultados de atividade enzimática de tanase encontram-se na Tabela 2.

De acordo com os dados da Tabela é possível verificar que a linhagem LAB6VW cresceu e produziu a enzima nos resíduos de uva, cana de açúcar e farelo de trigo. Sendo o resultado mais expressivo em resíduo de farelo de trigo apresentando atividade enzimática de 0,015 U/mL.

A linhagem LAB29VW foi capaz de crescer e produzir a enzima tanase em todos os resíduos testados. As maiores atividades foram observadas para os resíduos de uva e farelo de trigo apresentando valores de atividade de 0,021 e 0,025 U/mL respectivamente. Essa linhagem apresentou melhores resultados de produção da enzima quando comparados à linhagem LAB6VW.

De acordo aos dados apresentados é possível prever uma grande possibilidade de utilização dessas linhagens em bioprocessos, já que foi possível produzir a enzima em diferentes resíduos agroindustriais.

De acordo a Cayres (2013), em relação ao resíduo de laranja, vários estudos têm proposto a utilização do resíduo de sucos e processamento de laranja para produção de compostos de alto valor agregado, incluindo a obtenção de fertilizantes orgânicos, pectina, óleos essenciais, compostos com atividade antioxidante, na produção de várias enzimas, incluindo pectinases e amilases e a partir de agora, a enzima tanase. Apesar de todas essas possibilidades, os resíduos das indústrias de suco de laranja permanecem em sua maior parte muito pouco utilizados.

O resíduo vinícola se destaca devido a vários fatores, principalmente por serem fontes ricas de compostos fenólicos (RUBILAR et al., 2007)) e pela expressiva quantidade resultante do processamento, já que a soma deles, bagaço (cascas e sementes), engaço e a borra do processo fermentativo representam, em média, cerca de 30% do volume de uvas utilizadas para a produção vinícola (MAKRIS, BOSKOU & ANDRIKOPOULOS, 2007), o que torna este setor uma fonte promissora de substâncias bioativas naturais.

No Brasil um dos resíduos/subprodutos lignocelulósicos mais abundantes, para o qual novas tecnologias de aproveitamento são necessárias, é o bagaço de cana-de-açúcar, o qual é gerado após o processamento da cana-de-açúcar. Vários estudos têm sido desenvolvidos em busca de uma utilização sustentável do bagaço de cana-de-açúcar que contém cerca de 40-45% de celulose, 30-35% de hemicelulose e 25-30% de lignina (PANDEY, SOCOOL, NIGAN & SOCCOL, 2000).

3.3 Influência do Ácido Tânico na Síntese da Enzima Utilizando Farelo de Trigo

A linhagem LAB26VW foi testada meio de fermentação utilizando todos os resíduos como substratos. Em todos os meios foram acrescentados diferentes concentrações de ácido tânico. A Figura abaixo mostra os dados obtidos.

Tabela 2 - Produção da enzima tanase em diferentes tipos de substratos sólidos

Resíduos agroindustriais	Atividade enzimática de tanase (U/mL)	
	Linhagem LAB6VW	Linhagem LAB29VW
Uva	0,011±0.31	0,021±0.17
Laranja	0,00±0.46	0,016±0.24
Farelo de trigo	0,018±0.27	0,025±0.32
Cana de açúcar	0,015±0.39	0,019±0.43

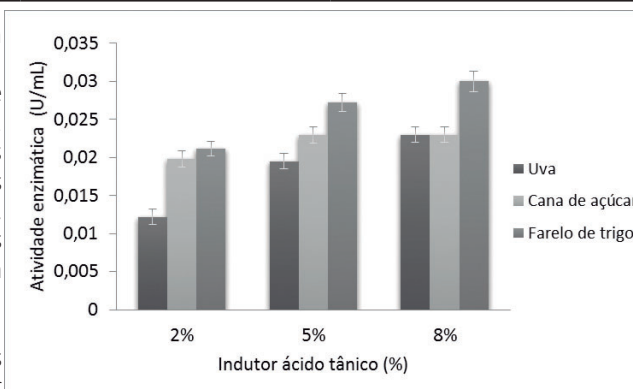


Figura 1 - Influência do ácido tânico na produção da enzima

A produção da enzima mostrou estar diretamente relacionada com a concentração de ácido tânico que é adicionada ao meio de fermentação, esta fonte de carbono favorece a produção rápida de tanase que, por sua vez, cliva os taninos fornecendo suprimento contínuo de fonte de carbono. De acordo com Battestin (2007) e Pinto (2003), o ácido tânico desempenha o papel de fonte de carbono para o microrganismo, bem como de indutor da síntese. Dessa maneira, a presença de ácido tânico é imprescindível para a síntese de tanase. Em trabalho realizado por Pinto (2003) em experimento preliminar onde não se adicionou ácido tânico ao meio de fermentação, não foi observada atividade de tanase em nenhum tempo de fermentação.

O farelo de trigo tem sido até hoje o substrato mais estudado para produção de tanase por fermentação sólida. Apesar de o farelo de trigo ser considerado um bom substrato para a produção da enzima, é necessário que se explore outros resíduos que possam ser eficientes em relação à produção da enzima.

4 CONCLUSÃO

Utilizando os resíduos de laranja, uva e cana de açúcar, foi possível produzir a enzima tanase através da técnica de fermentação em estado sólido, portanto, a utilização destes resíduos consiste em uma alternativa viável para produção da enzima. Esses resíduos mostraram ser promissores substitutos do farelo de trigo em processos biotecnológicos para a produção da tanase.

Os resultados atuais indicam que a concentração de ácido tânico é importante na indução da tanase pelos fungos estudados. Demonstrou-se que a concentração de ácido tânico no meio de cultura é fator chave na produção da tanase, sendo objeto de mais estudos em andamento. A melhor linhagem produtora de tanase foi a LAB29VW utilizando o resíduo de farelo de trigo. A melhor concentração de indutor para a produção da enzima foi de 8%.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Manera PA, Ores JC, Ribeiro VA, Rodrigues MI, Kalil SJ, Filho FM. Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. *Acta Scient Technol*. 2011; 33 (2): 155-61.
2. Roberto IC, Mussatto SI, Rodrigues RCLB. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. *Ind Crops and Prod*. 2003; 17: 171-76.
3. Carvalho W, Santos JC, Canilha L, Silva JBA, Felipe MGA, Mancilha IM, Silva SS. A study on xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by Ca-alginate entrapped cells in a stirred tank reactor. *Process Biochem*. 2004; 39 (12): 2135-41.
4. Santos JC, Converti A, Carvalho W, Mussatto SI, Silva SS. Influence of aeration rate and carrier concentration on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolyzate in immobilized-cell fluidized bed reactor. *Process Biochem*. 2005; 40 (1): 113-18.
5. Martinez EA, Villarreal LM, Almeida e Silva JB, Solenzal AIN, Canilha L, Mussatto SI. Use of different raw materials for biotechnological xylitol production. *Cienc Tecnol Aliment*. 2002; 3(5): 295-01.
6. Carvalho W, Silva SS, Santos JC, Converti A. Xylitol production by Ca-alginate entrapped cells: comparison of different fermentation systems. *Enzy Microbial Technol*. 2003; 32: 553-59.
7. Soccol, CR, Vandenberghe, LPS. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochem Engineering J*. 2003; 13: 205-15.
8. Rocha, CP. Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus Níger* em fermentação em estado sólido. [Tese]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia. 2010. 161f.
9. Alexandrino AM, Faria HG, Souza CGM, Peralta RM. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). *Cienc Tecnol Aliment*. 2007; 27(2): 364-68.
10. Melo OS, Bergamaschi KB, Tiveron AP, Massarioli AP, Oldoni TLC, Zanús MC, Pereira GE, Alencar SM. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. *Cienc Rural*. 2011; 41(6): 1088-93.
11. Filho AP, Badr O. Biomass resources for energy in North-Eastern Brazil. *Applied Energy*. 2004; 77: 51-7.
12. Simões GS. Avaliação de condições fermentativas iniciais de *Spathaspora arborariae* UFMG HM 19.1 na produção de etanol a partir do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. [Dissertação]. Lorena: Universidade Federal de São Paulo. 2011. 73f.
13. LEKHA PK, LONSANE BK. Comparative titres, location and properties of Tannin Acyl Hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. *Process Biochem*. 1994; 29: 497-03.
14. Battestin, V. Produção, purificação e aplicação de tanase de *Paecilomyces variotii*. [Tese]. Campinas: Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas; 2007. 100f.
15. Aguilar C, Augus C, González GV, Favela E. A comparison of methods to determine Tannin Acyl Hydrolase Activity. *Braz Arch Biol Technol*. 1999; 42 (3): 355-61.
16. Battestin V, Macedo GA, Freitas VAP. Hydrolysis of epigallocatechin gallate using a tannase from *Paecilomyces variotii*. *Food Chem*. 2008; 108: 228-33.
17. Schons PF. Imobilização da tanase de *Paecilomyces variotii* em reações de hidrólise e síntese. [Tese]. Campinas: Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas; 2012. .133f.
18. Queirós L D. Biotransformação de compostos fenólicos do extrato de soja para obtenção de produto rico em compostos bioativos. [Dissertação]. Campinas: Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas; 2014. 73f.
19. Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Mé- todos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 21-22.
20. Mondal KC, Banerjee D, Jana M, Pati BR. Colorimetric Assay Method for determination of the Tannin Acyl Hidrolase activity. *Anal Biochem*. 2001; 295:168-71.
21. Cayres, C. A. Transformação dos resíduos de industrialização de laranja pera (*Citrus sinensis* Osbeck) em farinhas para a obtenção de biscoito doce. Dissertação. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2013. 109f.
22. Rubilar M, Pinelo M, Shene C, Sineró J, Nunez MJ. Separation and HPLC-MS Identification of Phenolic Antioxidants from Agricultural Residues: Almond Hulls and Grape Pomace. *J Agri Food Chem*. 2007; 55 (25):101-09.
23. Makris DP, Boskou G, Andrikopoulos NK. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *J Food Compos Anal*. 2007; 20: 125-32.
24. Pandey A, Socool CR, Nigan P, Soccol V. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresour Technol*. 2000; 74: 69-80.
25. Pinto GAS. Produção de Tanase por *Aspergillus niger*. [Tese]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2003, 213f.