



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102018000970-2 A2



(22) Data do Depósito: 17/01/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 30/07/2019

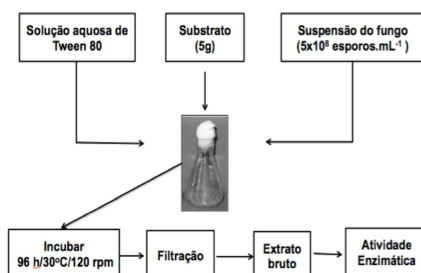
(54) **Título:** MEIO DE CULTURA A BASE DE FOLHAS DE MANGIFERA INDICA L. PARA PRODUÇÃO EXTRACELULAR DE TANASE POR ASPERGILLUS ALABAMENSIS URM 4347 E O PROCESSO DE OBTENÇÃO DESSE MEIO

(51) **Int. Cl.:** C12N 1/14; C12N 9/16; C12R 1/66.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) **Inventor(es):** ANA CRISTINA REGIS DE BARROS CORREIA; CRISTINA MARIA DE SOUZA MOTTA; RENAN DO NASCIMENTO BARBOSA.

(57) **Resumo:** MEIO DE CULTURA A BASE DE FOLHAS DE Mangifera indica L. PARA PRODUÇÃO EXTRACELULAR DE TANASE POR *Aspergillus alabamensis* URM 4347 E O PROCESSO DE OBTENÇÃO DESSE MEIO. A presente invenção compreende meio de cultura capaz de viabilizar a produção da enzima tanase. Esta invenção especificou o meio de cultura que utiliza folhas desidratadas de Mangifera indica L. (mangueira) adicionada de água destilada para o processo de obtenção da enzima tanase por meio de fermentação líquida submersa (FLS) pelo micro-organismo *Aspergillus alabamensis* URM 4347. Dessa forma, o presente invento permite a confecção de um meio de cultura contendo folhas de mangueira, por apresentar composição interessante, para o processo de produção de baixo custo da enzima tanase prescindida de ácido tânico.



MEIO DE CULTURA A BASE DE FOLHAS DE *Mangifera indica* L. PARA PRODUÇÃO EXTRACELULAR DE TANASE POR *Aspergillus alabamensis* URM 4347 E O PROCESSO DE OBTENÇÃO DESSE MEIO

1. Refere-se a presente invenção ao processo de produção de um meio de cultura a base de folhas de manga (*Mangifera indica* L.) e obtenção de um meio para produção de tanase por *Aspergillus alabamensis* URM 4347.

2. A utilização de enzimas em vários processos industriais, como no segmento têxtil, na produção de cosméticos, alimentos, medicamentos e bebidas é bem conhecida e explorada. A maior dificuldade de expandir o uso de enzimas ainda é o custo de produção. Uma alternativa para isto seria a utilização de resíduos agroindustriais como substrato da fermentação para produção de enzimas.

3. A espécie *Mangifera indica* L. mais conhecida por sua importância na comercialização das frutas, e suas folhas são comumente utilizadas na medicina tradicional [ANITHA, R.; SUJA, A. Pharmacocognosy and phytochemical analysis of leaf galls of *Mangifera indica* L. **IJP**. Tamilnadu India, v. 2, n. 6, p 301-305, 2015] por possuírem propriedades medicinais, devido ao seu perfil fitoquímico. As folhas possuem atividade antimicrobiana, antibacteriana, ação antiulcerogênica [SEVERI, J.A.; LIMA, Z.P.; KUSHIMA, H.; BRITO, A. R. M.; CAMPANER S. L; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, A.H. Polyphols with antiulcerogenic action from aqueous decoction of mango leaves (*Mangifera indica* L.). **Molecules**; Basel, Switzerland, v. 14, n. 3, p.1098-1110, 2009], atividade hipoglicêmica, anterogênica [MURUGANANDAN, S.; SRINIVASAN, K.; GUPTA, S.; GUPTA, P. K.; LALA, J. Effect of Mangiferin on hyperglycemia and antherogenicity in Streptozotocin diabetic rats. **J Ethnopharmacol**. Pretoria, South Africa, v. 97, p .497-501, 2005;].

4. O extrato das folhas de manga apresenta atividade anticarcinogênica [BONTEMPO, N. J. S.; ORSOLIN, P. C. Avaliação do efeito anticarcinogênico do extrato de folhas de manga (*Mangifera indica* L.) por meio do teste para detecção

de clones de tumores epiteliais em *Drosophila melanogaster*. **Revista Perquirere**. Patos de Minas, v. 13 n. 1, p. 238-254, jul. 2016] e representa importante fonte de compostos fenólicos, especialmente mangiferina [MASIBO, M.; HE, Q. Mango Bioactive Compounds and Related Nutraceutical Properties – A Review. **Food Rev. Inter**. London, v. 25, n. 346–370, sept. 2009].

5. Ao contrário da casca da manga, estudos dos potenciais biotecnológicos das folhas de *Mangifera indica* têm sido pouco documentados [BARRETO, J. et al. Characterization and Quantitation of Polyphenolic Compounds in Bark, Kernel, Leaves, and Peel of Mango (*Mangifera indica* L.). **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 56, p. 5599–5610, 2008].

6. A economia brasileira é baseada na produção agrícola, em que se pode destacar a manga. Além da comercialização deste produto *in natura*, o setor agroindustrial também está envolvido com o processamento e na produção de suco de manga. [SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHER, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal** 13, p. 205-218, 2003].

7. O que pode dificultar a expansão do uso de enzimas ainda é o custo de produção que é determinado pelos títulos (unidades de enzima) produzidos durante a fermentação e pela localização celular além das propriedades da enzima. Assim, os resíduos agroindustriais utilizados como substratos de fermentação para produção de enzimas, representam uma matéria-prima de baixo custo. [LEKHA, P.K.; LONSANE, B.K. Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. **Process Biochemistry**. v. 29, n. 6 p. 497-503.1994]

8. Dentre os resíduos agroindustriais 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, A.; STINTZING, F. C; Carie, R.

By-products of plant food processing as a source of functional compounds - recent developments. Trends in **Food Science Technology**, v. 12, p. 401-413, 2001].

9. Para atender à indústria e ao comércio de diversas variedades manga, as técnicas de manejo da indução floral exigem uma série de práticas que envolvem nutrição equilibrada, irrigação, controle fitossanitário adequado, poda, ajustados de acordo com cada fase fenológica. Durante a poda que pode ser básica, de formação, de limpeza no período da entressafra ou para que a copa da planta fique arejada [COSTA, Aureliano Nogueira et al. Recomendações técnicas para a produção de manga, Vitória, ES. 2008.: Incaper, 56 p. il.] gera-se resíduos os quais podem, por exemplo, ser utilizados em compostagem ou como substrato em processos fermentativos.

10. As folhas de *Mangifera indica* L. apresentam potencial nutricional e assim, apresentam inúmeras possibilidades para aplicação, como o uso como substratos para cultivo de micro-organismos capazes de biodegradá-los para obtenção de nutrientes para seu desenvolvimento [SAMI, A. J.; SHAKOORI, A.R. Cellulase activity inhibition and growth retardation of associated bacterial strains of *Aulacophora foviecollis* by two glycosylated flavonoids isolated from *Mangifera indica* leaves. **Journal of Medicinal Plants Research** vol. 5, n.2, p. 184-190, 2011; ARAÚJO, B.M. Bioatividades do extrato da folha da mangueira (*Mangifera indica*, variedade Ubá) e da mangiferina em camundongos ApoE^{-/-}. Viçosa, MG. Tese. 2012].

TANINOS E TANASE

11. Os taninos são um grupo de compostos fenólicos com alta massa molecular, solúveis em água, capazes de precipitar proteínas e de se ligarem à metais (quelantes). Estes compostos se complexam com a celulose, pectina e amido tornando-os insolúveis. São classificados em dois grupos, os taninos hidrolisáveis, como os elagitaninos e galotaninos, e condensados, também nomeados por proantocianidinas [GROSS, G. G. From lignins to tannins: forty

years of enzyme studies on the biosynthesis of phenolic compounds. **Phytochemistry**. Waghorn, v. 69, p. 3018-3031, 2008].

12. 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 da celulose, hemicelulose e lignina [MANJIT, Yadav A.; AGGARWAL, N. K.; KUMAR, K.; KUMAR, A. Tannase production by *Aspergillus fumigatus* under solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 24, p. 3023-3030, 2008].

13. As enzimas de origem microbiana apresentam características peculiares, que favorecem seu emprego em diversos processos biotecnológicos existentes, sendo relevantes as vantagens de conversões enzimáticas em diferentes processos industriais e ambientais. A sua produção, na maioria das vezes, ainda é economicamente dispendiosa, portanto há necessidade de selecionar novos micro-organismos com elevado potencial na produção de substâncias de alto valor agregado. Os rejeitos agroindustriais, principalmente os da indústria de alimentos como, por exemplo, cascas de café, tangerina e uva, que muitas vezes são descartados de maneira incorreta no meio ambiente e apresentam um elevado poder nutricional que poderia ser aproveitado na formulação de meios para produção de enzimas. [NASCIMENTO, K.B.M.; NASCIMENTO, A. G.I. R. M.; TAKAKI, G. M. C.; SILVA, C. A. S.; OKADA, K. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de tanase por *Aspergillus* sp isolado do solo da caatinga de Pernambuco, **Brasil. exacta**. Belo Horizonte, v. 7, n.1, p. 95-103. (2014). Editora UniBH].

14. Tanino acil hidrolase conhecida como tanase (E.C: 3.1.1.20) é uma enzima hidrolase capaz de atuar em ligações éster e ligações depsídicas laterais de taninos hidrolisáveis produzindo glicose e ácido gálico.

15. Diferentes estudos a respeito da produção de tanase têm sido realizados e relatados na forma de artigos de:

16. revisão: CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M.; RODRÍGUEZ-DURÁN, L. V.; BALAGURUSAMY, N.; PRADO-BARRAGÁN, A.; RODRÍGUEZ, R.; CONTRERAS, C.; AGUILAR, C. Biotechnological Advances and Challenges of Tannase: An Overview. **Food Bioprocess Technol** (2012) no.5, p. 445–459. DOI 10.1007/s11947-011-0608-5; MEHTA, M.; MUDDAPUR, Dr. U. M.; SHANMUGA PRIYA, V. G. Fungal Production of Tannase: A Review. **International Journal of Scientific Engineering and Technology**. Volume No.2, Issue No.8, p. 752-755 (ISSN: 2277-1581);

17. otimização: LIMA, Camilla S. de. **Bioprospecção de tanases: otimização e caracterização de extrato enzimático de *Pestalotiopsis mangiferae***. – Ilhéus, BA: UESC, 2014. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular; ROUSHDY, M.M.; DESOUKY, S.E.; ESMAEL, M.E.; EL-LOUBOUDY, S.S.; ELSHIKH, H.H. **Optimization and characterization of Tannin Acyle Hydrolase produced by *Aspergillus flavus* var. *columnaris* using Solid State Fermentation Technique**. **Science Journal** No.7, v.3 <http://www.sciencepub.net/newyork>. New York 2014; MALGIREDY, N. R.; NIMMA, L. N. R. **Optimal conditions for production of Tannase from newly isolated *Aspergillus terreus* under solid state fermentation**. **European Journal of Biotechnology and Bioscience** 2015; No. 3 v.2, p. 56-64. www.biosciencejournals.com. ISSN: 2321-9122; ANGROLA, A.V. M. et al. **Optimization of cultural conditions for tannase production in submerged fermentation by *Aspergillus niger* AVM-1**. **International Journal of Biological & Pharmaceutical Research Journal**. Disponível em: < www.ijbpr.com >. e- ISSN 0976 – 3651; MELO, A. G; PEDROSO, R. C. F.; GUIMARÃES, L. H. S. ; ALVES, J. G. L; DIAS, E. S. ; RESENDE, M. L. V. ; CARDOSO, P. G. **The Optimization of *Aspergillus* sp. GM4 Tannase Production under Submerged Fermentation**. **Advances in Microbiology**, 2014, 4, p. 143-150. <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2014.43019>;

18. produção: LIMA, Juliana Silva de. **Produção de tanases por espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* para clarificação de suco de uva (*Vitis vinífera* L.)** – Recife. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2014; REDDY, M. N.; REDDY, N. L. N. **Production of tannase by isolates *Aspergillus terreus* under submerged fermentation.** International Journal of Science, Technology & Management. Volume No.04, Issue No. 02: 2394-1537, 2015. ISSN (online www.ijstm.com).

19. As patentes nacionais que buscam, de alguma forma, a produção ou uso de tanase são as seguintes: **BR 10 2015 00163-6 A2**, depósito 19/01/2015 – Suco de jamelão e processo para fabricação de suco de jamelão utilizando extrato enzimático a base de tanase, **PI 1103789-0 A2**, depósito 05/08/2013 – Meios de culturas de torta de mamona para produção simultânea das enzimas fitase e tanase pelo micro-organismo *Paecilomyces variotti* através de fermentação sólida, enzimas obtidas e seus usos, **PI 1103791-1 A2**, depósito 05/08/2011 – Meios de culturas de resíduos de bagaço de laranja para produção simultânea das enzimas celulase e tanase pelo micro-organismo *Paecilomyces variotti* através de fermentação sólida, enzimas obtidas e seus usos, **PI 0008069-1 A**, depósito 08/02/2000 – Métodos para preparar chá de folha de infusão em água fria e para gerar espécies coloridas em um produto de chá de infusão em água fria, chá de folha de infusão em água fria, e, pó de chá de infusão em água fria.

20. As patentes internacionais que averiguam, de alguma forma, a produção ou uso de tanase são as seguintes: **US2017119647 (A1)**, depósito 04/05/2017 – Mineral-enzyme complex for strengthening and whitening tooth enamel, oral hygiene composition, and toothpaste; **JP2016127809 (A)**, depósito 14/07/2016 – Method for producing protein having tannase activity using Thaumochytrids; **CN104673766 (A)**, depósito 03/06/2015 – Method for performing simulates solid-states fermentation on tannase; **CN104357421 (A)**, depósito 18/02/2015 – Method for producing tannase; **CN104263650 (A)** depósito 07/01/2015, — A high-tannase-yield strain and a preparing method thereof;

CN103436505 (A), depósito 11/12/2013 – Preparation method of tannase; **CN102321681 (A)**, depósito 18/01/2012 – Method and device for preparing gallic acid e **US2004137549 (A1)**, depósito 5/07/2004 – Diagnostic and examination method for cancer of the colon using tannase as indication.

21. O meio de produção da tanase é simples, e pode ser utilizado resíduos vegetais de uva, cajú, café ou subprodutos como farelo de trigo, arroz ou aveia, acrescidos de ácido tânico. A aplicação de resíduos é uma forma de utilizar substratos alternativos e solucionar problemas de poluição que possam causar.

22. A enzima tanase também pode ser obtida utilizando folhas maduras de jambolão, cafeiro ou de mangueira pelo método de fermentação em estado sólido na presença ou ausência de ácido tânico ou nitrato de potássio [COSTA, Patrícia Nirlane da. Otimização da produção de tanase por *Aspergillus* sp. em fermentação em estado sólido (FES) / Patrícia Nirlane da Costa. – Lavras : UFLA, 2012. 73 p.: il].

23. A tanase possui inúmeras aplicações biotecnológicas e tem vasta aplicação na indústria de alimentos, sucos, cervejaria e indústria farmacêutica [MACEDO, G. A.; MATSUDA, L. K.; BATTESTIN, Vania. **Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos**. Ciênc. agrotec., Lavras, v. 29, n. 4, p. 833-838, jul./ago., 2005]. A tanase apresenta inúmeras aplicações como:

24. Na clarificação de suco de uva (*Vitis vinifera* L). [LIMA, Juliana Silva de. Produção de tanases por espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* para clarificação de suco de uva (*Vitis vinifera* L) 2014. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2014]

25. Preparação de Chás Instantâneos: é uma bebidas consumida no mundo, pelo seu aroma, sabor e principalmente efeitos medicinais. Na preparação de chás pode haver formação um precipitado insolúvel. A tanase, adicionada ao

processo do produto, catalisa a quebra das ligações ésteres, clivando os compostos insolúveis e, desta forma, diminui a turbidez e liberação de compostos fenólicos e voláteis [LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Production and application of tannin acyl hydrolase: State of the art. **Advances in Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 44, p. 215-260, 1997].

26. Produção de Ácido Gálico: usado principalmente nas indústrias farmacêuticas, como na síntese de trimetoprima, agente antibacteriano e sulfonamida [AGUILAR, C. N.; AUGUR, C; FAVELA-TORRES, E.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid-state fermentation: influence of glucose and tannic acid. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 26, p. 296-302, 2001].

27. Produção de Antioxidantes: a tanase cliva compostos polifenólicos resultando em compostos como epigallocatequina, epicatequina e ácido gálico, que são estruturas moleculares com capacidade antioxidante [BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A.; DE FREITAS, V. A. P. Hydrolysis of epigallocatechin gallate using a tannase from *Paecilomyces variotii*. **Food Chemistry**. v.108, p. 228-233, 2008].

28. Na adição em creme dental como clarificante e para fortalecer o esmalte dentário [Elena Yurievna Belous; Svetlana Alekseevna Maltabar; Anna Zufarovna Galimova. **Mineral-enzyme complex for strengthening and whitening tooth enamel, oral hygiene composition, and toothpaste**. US2017119647 (A1), 20 Aug. 2012, 04 May 2017].

29. Como agente de diagnóstico para o câncer colon [Sasatsu Mesanori [JP]; Noguchi Masahisa [JP]; Shiratori Taisei [JP]. **Diagnostic and examination method for cancer of the colon using tannase as indication**. US2004137549 (A1), 26 Oct. 2000, 05 Jul. 2004].

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

30. A presente invenção compreende o processo de produção e obtenção de um meio de cultura a ser utilizado na fermentação de folhas de *Mangifera indica* L. utilizado como substrato capaz de viabilizar a produção da enzima tanase pelo fungo filamentoso *Aspergillus alabamensis* URM 4347.

31. O substrato utilizado no processo proporciona nutrientes suficientemente adequados ao crescimento do micro-organismo. A obtenção das enzimas se dá através de processos de fermentação líquida (FL) no qual a célula produtora se desenvolve, sob agitação. Este processo oferece vantagem em relação aos de superfícies, por distribuir uniformemente os nutrientes além da facilidade de controle de variáveis do processo (medição e controle de pH, temperatura, oxigênio, produto, substrato) as quais podem ser ajustadas em valores ótimos, resultando em maior eficiência e produtividade; separação e purificação do produto e maior facilidade de se ter um processo contínuo e automatizado.

32. A Figura 1 representa o fluxograma simplificado do processo de Fermentação líquida (FL) do extrato de folhas de *Mangifera indica*.

33. O processo para produção do meio de cultura e obtenção da tanase, consta das seguintes etapas principais:

CARACTERIZAÇÃO DAS FOLHAS DE *Mangifera indica* L. UTILIZADAS COMO SUBSTRATO

34. **Coleta, Identificação e tombamento** – as folhas de *Mangifera indica* L. foram coletadas nas dependências do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, no mês de setembro de 2014, coordenadas Latitude Latitude -8° 2' 47,10408" e Longitude -34° 57' 1,9782". As folhas foram encaminhadas ao Herbário IPA - Dárdano de Andrade Lima, Instituto Agrônomo de Pernambuco, Recife-PE, para identificação botânica, para identificação e tombamento, FIB Nº 50/2014.

35. **Dessecação e determinação da granulometria das folhas** – as folhas de *Mangifera indica* L. devem ser dessecadas a temperatura entre 28 °C e 32 °C, trituradas em moinho de facas e submetidas a processo granulométrico em tamises de malhas 425, 250 e 150 µm (valor médio das partículas 367µm).

36. **Composição do substrato** – as amostras das folhas utilizadas como substrato, foram analisadas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte S/A - EMPARN (Laboratório de Análise de Solo, Água e Planta) Certificado de Análise N° 248/15 quanto o teor de macro e micronutrientes (Tabela 1).

Tabela 1 – Teor de Macronutrientes (g.kg⁻¹) e micronutrientes (mg.kg⁻¹)

Macronutrientes (g.kg ⁻¹)						Micronutrientes (mg.kg ⁻¹)			
N	P	K	Ca	Mg	Na	Zn	Cu	Fe	Mn
13,17	1,02	5,33	34,53	2,70	1,01	17	7	84	161

37. **Determinação físico-química** - a determinação físico-química das folhas foi realizada no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas-SP, relatório de Ensaio N° RE-CQ 03.1391/16. Foram determinados teores de: umidade e voláteis, cinzas, lipídios totais, proteína, carboidratos totais, calorias e fibra detergente ácido e fibra detergente neutro.

38. **Dosagem de taninos** – a dosagem do teor de tanino foi feita seguindo o método de precipitação de proteína [Hagerman, A. E; Butler, L. G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **Journal of agricultural food and chemistry**, 26: 809-812, 1978]. As folhas secas foram trituradas em partículas de 50 µm em metanol e mantidas durante a noite à 4 °C. Um mL de extrato foi adicionado em um tubo e 3 mL de solução de albumina bovina sérica foi adicionada e mantida durante 15 minutos à temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados a 5000g durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi dissolvido em 3 mL de solução de dodecil sulfato de sódio-trietanolamina. Um mL de solução de cloreto férrico foi adicionado e os tubos foram mantidos durante 15 minutos à 25 °C, para a

estabilização da cor. A absorbância foi avaliada a 530 nm contra o branco. O teor de taninos total foi de 4,01%.

PROCESSO FERMENTATIVO

39. **Micro-organismo e preparo do pré-inóculo** – *Aspergillus alabamensis* URM 4347 precedente da Micoteca URM, coleção de culturas do Departamento de Micologia da UFPE, deve ser mantido em meio de Ágar Malte e, antes de ser utilizado no meio de cultura para fermentação, deve permanecer incubado em estufa a 25°C durante 5 a 7 dias.

40. Após incubação, deve ser preparada uma suspensão de esporos em solução aquosa de polissorbato 80 (0,1%) e obter uma suspensão cuja concentração final seja 5×10^8 esporos.mL⁻¹.

41. **Meio de fermentação** – devem-se ser misturados, na proporção de g/mL, 1 parte de folhas de *Mangifera indica* L. para 9 partes de solução aquosa de polissorbato 80 (0,1%). Em seguida, o recipiente no qual foi feita a mistura deve ser esterilizado em autoclave a temperatura de 121°C durante 20 minutos.

42. **Processo fermentativo** – os recipientes com o meio de fermentação devem ser inoculados com da solução de esporos de forma que a concentração final seja 5×10^8 esporos.mL⁻¹ e incubados a 30 °C durante 96h em agitador rotativo (*Shaker*) a 150 rpm.

43. **Obtenção do extrato bruto** – em seguida o material fermentado deve ser submetido a filtração sob vácuo usando em papel de filtro (22,15 µm). O filtrado (extrato bruto enzimático) deve ser esterilizado por membrana filtrante (membrana hidrofílica de polietersulfona com 0,22 µm de porosidade) e recolhidos em recipientes estéreis e preservado em 4 °C.

44. **Atividade Enzimática da Tanase** – a atividade de tanase deve ser determinada por meio espectrofotometria de acordo com o método de Sharma [SHARMA, S.; BHAT, T. K.; DAWRA, R. K. A Spectrophotometric Method for

Assay of Tannase Using Rhodanine. **Analytical Biochemistry**, v. 279, p. 85–89, 2000]. Este método baseia-se na formação de um cromógeno entre ácido gálico (liberado pela atividade de tanase esterase) e a rodamina (2-thio-4-ketothiazolidine). Para determinar o ácido gálico, 100 µl do extrato enzimático bruto devem ser incubado com ácido tânico (0,3 mM) em tampão de fosfato de sódio (10 mM, pH 5.5) durante 30 min a 30 °C. Em seguida, 300 µl da solução metanólica de rodamina (0,667 % w/v de rodanina em metanol 100 %) e 100 µl de KOH 500 mM devem ser adicionado à mistura previamente diluída com 900 µl de água destilada e incubados durante 10 min a 30 °C. Após esse período, as amostras devem ser lidas em espectrofotômetro a absorbância de 520 nm. A curva padrão deve ser realizada, utilizando ácido gálico em dez diferentes concentrações [10 µg.mL⁻¹ a 100. µg.mL⁻¹]. Uma unidade de atividade de tanase (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um µmol de ácido gálico por minuto sob condições de reação definida. Rendimento da enzima, expresso em U/mL, foi de 39,5 U.mL⁻¹.

45. Qualificação dos extratos bruto enzimático – os extratos foram qualificados por cromatografia em Camada delgada em placas cromatograficas de silica gel 60 – F₂₅₄ (Machereel-Nagel®, Germany) os quais apresentaram reação positiva para os seguintes classes de metabólitos: polifenóis (taninos hidrolisáveis, ácido gálico como padrão), flavonóides (quercetina e rutina), derivados cinâmicos (ácido cafeico e ácido clorogênico) e açúcares redutores (d-frutose).

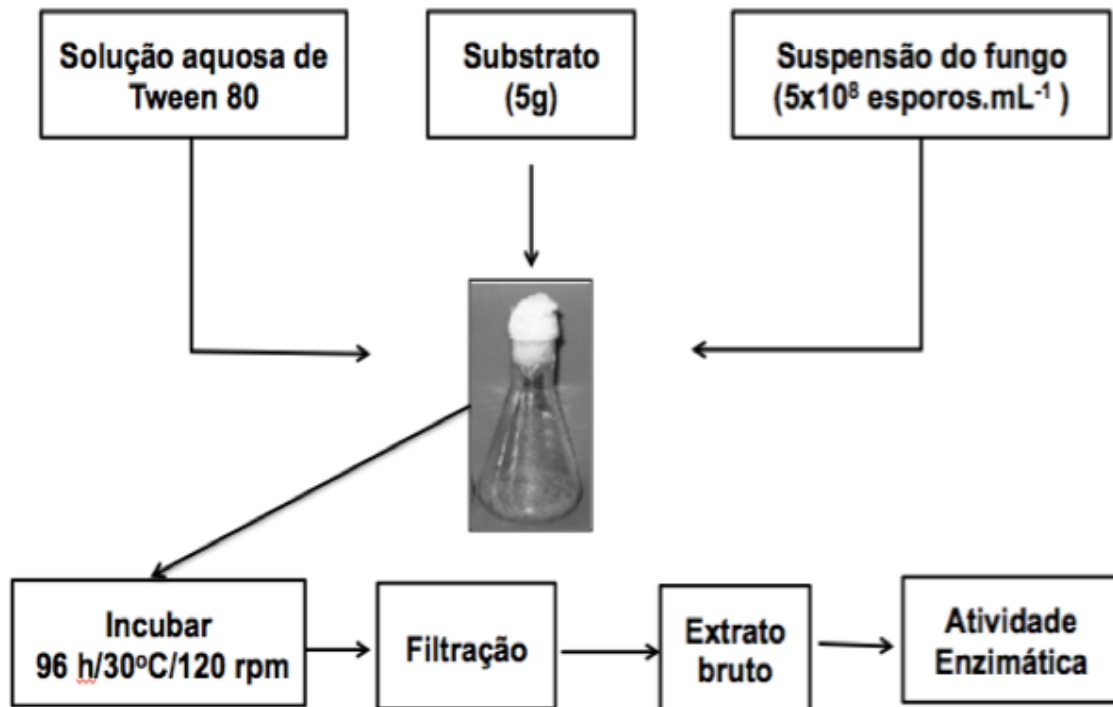
46. A análise por CLAE foi realizada num sistema de HPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific®, EUA), acoplado a um detector arranjo de fotodiodo (DAD; Thermo Fisher Scientific®) e equipado com bomba binária (HPG-3x00RS, Thermo Fisher Scientific®), desgaseificador e amostrador automático equipado com um loop de 20 µL (ACC-3000, Thermo Fisher Scientific®). Por análise comparativa, os espectros de varredura correspondem a presença de ácido gálico, flavonóide (possivelmente quercetina) e ácido elágico.

REIVINDICAÇÕES

1. Meio de cultura para produção de tanase por *Aspergillus alabamensis* URM 4347, caracterizado por conter folhas desidratadas de *Mangifera indica* L. com granulometria aproximada de 367 µm, água destilada e 0,1% de polissorbato 80.
2. Meio de cultura para produção de tanase por *Aspergillus alabamensis* URM 4347, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por conter preferencialmente 10% de folhas de *Mangifera indica* L. em relação ao volume total do meio.
3. Meio de cultura para produção de tanase por *Aspergillus alabamensis* URM 4347, de acordo com as reivindicações de 1 e 2, caracterizado por prescindir de ácido tânico.
4. Processo de obtenção da enzima tanase caracterizado por utilizar *Aspergillus alabamensis* URM 4347 através de fermentação líquida (FL).
5. Processo de obtenção da enzima tanase de acordo com a reivindicação 4, caracterizada por ser obtida preferencialmente em ambiente com temperatura aproximada de 30 °C.
6. Processo de obtenção da enzima tanase produzida pelo micro-organismo *Aspergillus alabamensis* URM 4347 através de fermentação líquida (FL) em meio de cultura de acordo com as reivindicações de 4 e 5, caracterizado por ser obtida próximo de 96 horas de incubação e aproximadamente a 30 °C.
7. Processo de obtenção da enzima tanase produzida por *Aspergillus alabamensis* URM 4347 através de fermentação líquida (FL) em meio de cultura de acordo com as reivindicações 4, 5 e 6 caracterizado por ser obtida preferencialmente com rotação aproximada de 120 rpm.

FIGURAS

FIGURA 1



RESUMO

MEIO DE CULTURA A BASE DE FOLHAS DE *Mangifera indica* L. PARA PRODUÇÃO EXTRACELULAR DE TANASE POR *Aspergillus alabamensis* URM 4347 E O PROCESSO DE OBTENÇÃO DESSE MEIO

A presente invenção compreende meio de cultura capaz de viabilizar a produção da enzima tanase.

Esta invenção especificou o meio de cultura que utiliza folhas desidratadas de *Mangifera indica* L. (mangueira) adicionada de água destilada para o processo de obtenção da enzima tanase por meio de fermentação líquida submersa (FLS) pelo micro-organismo *Aspergillus alabamensis* URM 4347.

Dessa forma, o presente invento permite a confecção de um meio de cultura contendo folhas de mangueira, por apresentar composição interessante, para o processo de produção de baixo custo da enzima tanase prescindida de ácido tânico.