



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FERNANDA DE OLIVEIRA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NARINGINASE DE  
*Aspergillus niger* POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO  
SÓLIDO UTILIZANDO SUBPRODUTOS DA  
AGROINDÚSTRIA**

---

Londrina  
2016

FERNANDA DE OLIVEIRA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NARINGINASE DE  
*Aspergillus niger* POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO  
SÓLIDO UTILIZANDO SUBPRODUTOS DA  
AGROINDÚSTRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Buzato

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Rodrigues de Melo

Londrina  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Oliveira, Fernanda .

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NARINGINASE DE *Aspergillus niger* POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO SUBPRODUTOS DA AGROINDÚSTRIA / Fernanda Oliveira. - Londrina, 2016.  
79 f. : il.

Orientador: João Batista Buzato.

Coorientador: Marcelo Rodrigues de Melo.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2016.

Inclui bibliografia.

1. naringinase - Teses. 2. *Aspergillus niger* - Teses. 3. delineamento de mistura - Teses. 4. fermentação em estado sólido - Teses. I. Batista Buzato, João . II. Rodrigues de Melo, Marcelo. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

FERNANDA DE OLIVEIRA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NARINGINASE DE *Aspergillus niger* POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO SUBPRODUTOS DA AGROINDÚSTRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. João Batista Buzato  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues de Melo  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Doumit Camilios Neto  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Alessandra Machado Baron  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –  
UTFPR/Apucarana/COLIQ

Londrina, 23 de maio de 2016.

Aos meus pais Soeli e  
Sebastião, que mesmo longe,  
me incentivaram e me apoiaram.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, que sempre iluminou o meu caminho.

Ao Professor Marcelo Rodrigues de Melo, pelo auxílio e orientação nos últimos passos e fechamento desta grande etapa da minha vida. Ao meu orientador João B. Buzato, pela oportunidade.

Ao Laboratório de Tecnologia da UNESP Jaboticabal, na pessoa de Tereza Cristina Luque Castellane, pós doutoranda, pelo auxílio nas análises cromatográficas e pela paciência durante meu tempo em Jaboticabal.

À CAPES (Cordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (CCE/UEL) pelo carinho e paciência durante o período de realização do trabalho. Em especial ao Nelson Janeiro, sempre pronto a ajudar, um exemplo de generosidade.

Aos meus pais Soeli e Sebastião e meu amado namorado Rodolfo, pelo apoio e incentivo, sem os quais jamais conseguiria finalizar esta etapa.

Aos amigos da turma de mestrado em biotecnologia: vocês foram ótimos companheiros nesta jornada!

“A satisfação está no esforço e não  
apenas na realização final”

Mahatma Gandhi

OLIVEIRA, Fernanda. **Otimização da produção de naringinase de *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido utilizando subprodutos da agroindústria.** 2016. 79f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## RESUMO

A naringinase hidrolisa o glicosídeo naringina, causador do amargor em frutas cítricas, tendo como principal mercado a indústria de sucos cítricos. Este trabalho foi realizado em duas etapas e empregou o delineamento experimental de mistura para potencializar a produção de naringinase por *Aspergillus niger* 426 cultivado em fermentação em estado sólido a 28 °C e 75 % (m/v) de umidade. Na primeira etapa, foi avaliada a influência de diferentes resíduos agroindústrias como substratos da fermentação. A mistura de substratos de melhor resultado foi utilizada na segunda etapa para seleção de três indutores flavonóides, ou suas misturas para produção de naringinase. A melhor condição resultou em cultivo com 2,3 g de bagaço de cidra, 2,5 g de farelo de arroz e 5,2 g de farelo de trigo e suplementação do meio com uma mistura de naringina, rutina e hesperidina em uma concentração de (g/L): 2,5; 4,5 e 3,0, respectivamente, alcançando atividade máxima de 28 U/mL (14,05 U/g de substrato seco). Este procedimento sequencial possibilitou definir uma mistura ótima de componentes que resultou em aumento de 96 % na produção de naringinase em relação aos experimentos iniciais com bagaço de laranja.

**Palavras-chave:** Naringinase. *Aspergillus niger*. Delineamento de misturas. Fermentação em estado sólido.

OLIVEIRA, Fernanda. **Optimization of the production of naringinase by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation using agroindustrial residues.** 2016. 79p. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

### ABSTRACT

Naringinase hydrolyzes the glycoside naringin, the bitter taste of grapefruit, and has as its main target the citrus juices industry. This work was carried out in two stages using an Experimental Mixture Design to enhance naringinase production by *Aspergillus niger* grown in solid-state fermentation at 28 °C and 75 % (w/v) of humidity. First, the influence of agro-industrial residues was assessed as fermentation substrates. The best mixture result of substrates was used in the second step to select the best of three inducers, or their mixtures. The best condition was under cultivation with 2.3 g of grapefruit rind, 2.5 g of rice bran and 5.2 g of wheat bran and medium supplementation with a mixture of naringin, rutin and hesperidin in a concentration of (g/L): 2.5, 4.5 and 3.0, respectively, leading to a maximum activity of 28 U/mL (14,05 U/g of dry substrate). This sequential procedure made it possible to define an optimal mixture of components resulting in an increase of 96 % in naringinase production in relation to initial experiments using 10 g of orange rind as substrate.

**Keywords:** Naringinase. *Aspergillus niger*. Mixture design. Solid-state fermentation.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Compostos que podem ser obtidos por fermentação em estado sólido a partir de diferentes resíduos e fungos filamentosos.....	23
<b>Tabela 2</b> – Composição do meio BDA utilizado para preservação do microorganismo.....	31
<b>Tabela 3</b> – Composição da solução nutriente utilizada para umedecer os suportes da fermentação.....	31
<b>Tabela 4</b> – Matriz do delineamento de misturas para seleção dos substratos.....	34
<b>Tabela 5</b> – Matriz do delineamento de misturas para seleção dos indutores.....	35

## LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

<b>Table1</b> – Summary of naringinase maximum values for the <i>A. niger</i> according to EMD, using grapefruit rind, rice bran, and wheat bran. Experiments were run using SSF for 5 days at 28 °C, with initial pH 4.5 .....	67
<b>Table 2</b> – Quantitative HPLC analysis for quantification of sugars, citric acid and flavonoids.....	68
<b>Table 3</b> – Summary of naringinase maximum values for the <i>A. niger</i> EMD, using the naringinase inducers (g/L) naringin, rutin and hesperidin. Fermentation experiments were performed based on the best condition selected from the first EMD cultivation .....	69
<b>Table 4</b> – Quantitative HPLC analysis for quantification of flavonoids in runs of the second EMD presented in Table 3 .....	70

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 –</b>	Hidrólise da naringina em prunina, ramnose, naringenina e glucose pela naringinase expressando atividades $\alpha$ -L-ramnosidase e $\beta$ -D-glucosidade .....	18
<b>Figura 2 –</b>	Estrutura tridimensional da Ramnosidase ( $\alpha$ Rha) em complexo com ramnose de <i>Bacillus sp.</i> Domínio vermelho N, domínio azul escuro D1, domínio verde D2, domínio amarelo A, domínio azul claro C .....	20
<b>Figura 3 –</b>	Delineamento Experimental de Misturas: Arranjo simplex para três componentes.....	33

## LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

<b>Figure 1 –</b>	Kinetics of the central point of the EMD 1 for naringinase production by <i>A. niger</i> 426 at 28 °C, pH 4.5 and naringin (10 g/L) as inducer. Each data point represents the mean of triplicate determinations $\pm$ SD .....	71
<b>Figure 2 –</b>	Contour plots of naringinase responses for EMD 1, using the culture medium components (10 g) grapefruit rind, rice bran and wheat bran. Fermentation experiments were run using SSF for 5 days at 28 °C, with initial pH 4.5.....	72
<b>Figure 3 –</b>	Effect of different inducers (■ naringin, ■ hesperidin and ■ rutin) on naringinase produced by <i>A. niger</i> 426 using SSF for 5 days at 28 °C, with initial pH 4.5. Fermentation experiments were performed based on the best condition selected from EMD 1 cultivation. Each data point represents the mean of triplicate determinations $\pm$ SD.....	73
<b>Figura 4 –</b>	Contour plots of naringinase responses for EMD 2, using the naringinase inducers (10 g/L) naringin, rutin and hesperidin. Fermentation experiments were performed based on the validation condition selected from EMD 1 cultivation. Each data point represents the mean of triplicate determinations $\pm$ SD .....	74

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
3.1	SUCOS CÍTRICOS .....	16
3.1.1	Produção e Mercado .....	16
3.1.2	Sabor Amargo em Cítricos .....	16
3.2	NARINGINASE: CARACTERÍSTICAS .....	17
3.3	<i>Aspergillus niger</i> : CARACTERÍSTICAS .....	21
3.4	FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....	22
3.4.1	Subprodutos da Agroindústria .....	23
3.5	PRODUÇÃO DE NARINGINASE .....	25
3.5.1	Efeito de Indutores na Produção de Naringinase .....	27
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
4.1	MATERIAIS .....	30
4.1.1	Microrganismo .....	30
4.2	MÉTODOS .....	30
4.2.1	Preparo dos Meios de Cultivo .....	30
4.2.1.1	Meio de preservação e de preparo do inóculo .....	30
4.2.1.2	Meios de fermentação .....	31
4.2.2	Preservação do Microrganismo .....	31
4.2.3	Fermentação em Estado Sólido .....	32
4.2.3.1	Preparo do inóculo .....	32
4.2.3.2	Produção de naringinase por <i>Aspergillus niger</i> .....	32
4.2.3.2.1	<i>Seleção dos substratos indutores para produção de naringinase</i> .....	32
4.2.3.2.2	<i>Cinética de fermentação</i> .....	32
4.2.3.2.3	<i>Seleção da melhor mistura de substratos</i> .....	33

4.2.3.2.4	<i>Seleção da concentração ideal de naringina, rutina e hesperidina</i> .....	35
4.2.3.2.5	<i>Seleção da melhor mistura de indutores</i> .....	35
4.2.4	Determinações Analíticas .....	35
4.2.4.1	Atividade de naringinase .....	36
4.2.4.2	Açúcares totais .....	36
4.2.4.3	Extração dos açúcares solúveis dos substratos para análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....	36
4.2.4.3.1	<i>Determinação de carboidratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i> .....	37
4.2.4.4	Extração de ácido cítrico do bagaço de cidra .....	37
4.2.4.4.1	<i>Determinação de ácido cítrico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</i> .....	38
4.2.4.5	Extração de flavonóides do bagaço de cidra .....	38
4.2.4.5.1	<i>Determinação de flavonóides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i> .....	38
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>41</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>47</b>
	APÊNDICE A .....	48
	Artigo - “Naringinase production by <i>Aspergillus niger</i> 426 using agro-industrial residues” .....	48
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>75</b>
	ANEXO A - Normas para submissão de artigo para a revista Food Chemistry .....	76

## 1 INTRODUÇÃO

A laranja é a fruta cítrica mais produzida no mundo, sendo o suco concentrado seu principal produto. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de suco de laranja concentrado, respondendo por 57 % da produção e por 80 % das exportações globais. Entretanto, o valor comercial do suco de laranja é afetado pela presença de compostos que conferem sabor amargo, como a naringina. Presente naturalmente na fruta, a naringina confere ao suco sabor desagradável, diminuindo seu valor de mercado.

Técnicas físico-químicas têm sido propostas para remoção do amargor dos sucos cítricos. Contudo, estas incluem etapas que alteram as características organolépticas dos sucos e assim têm aplicação limitada. A remoção seletiva dos compostos amargos por meio da utilização de naringinase é uma abordagem biotecnológica para remoção/redução do amargor dos sucos. A naringinase, um complexo enzimático com atividade de  $\alpha$ -L-ramnosidase (EC 3.2.1.40) e  $\beta$ -D-glucosidase (EC 3.2.1.21), tem como principal mercado a indústria de sucos cítricos por degradar a naringina, formando compostos menos amargos. Adicionalmente, este complexo enzimático apresenta potencial de aplicação na produção de ramnose, prunina, antibióticos e no realce do aroma de vinhos.

A aplicação de naringinase na indústria de cítricos baseia-se no uso de enzimas de origem microbiana, as quais podem ser obtidas por diferentes metodologias. Nas últimas décadas as técnicas de produção de enzimas por fermentação em estado sólido têm se destacado pela eficiência de produção, geração reduzida de resíduos e possível agregação de valor a subprodutos e resíduos gerados pela agroindústria. Os fungos filamentosos são os mais adaptáveis a essa metodologia, pois as condições de cultivo são mais parecidas com o habitat natural desses microrganismos. Nesse contexto, a utilização de *Aspergillus niger* para produção de naringinase por fermentação em estado sólido representa uma alternativa interessante, adicionalmente esse microrganismo tem *status* GRAS.

Considerando-se o potencial da indústria cítrica nacional, bem como da agroindústria de forma geral, a produção de naringinase utilizando resíduos agroindustriais como substrato representa uma alternativa de ganhos para as cadeias produtivas como um todo. Ainda que a utilização de resíduos agroindustriais tendem a dificultar a padronização dos processos de produção de enzimas, as

técnicas de modelagem estatística fornecem ferramentas que permitem avaliar a influência de diferentes fatores sobre a produção, auxiliando desta forma na obtenção das condições ideais de produção. Dentro desse contexto, o presente trabalho objetivou potencializar a produção de naringinase de *Aspergillus niger* em resíduos agroindustriais, por meio de fermentação em estado sólido e usando metodologias estatísticas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir naringinase de *Aspergillus niger* 426 em resíduos agroindustriais por meio de fermentação em estado sólido.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Selecionar dentre bagaço de laranja e bagaço de cidra o melhor substrato indutor para produção de naringinase;

Determinar o melhor tempo de produção de naringinase;

Selecionar, dentre bagaço de cidra, farelo de arroz e farelo de trigo ou suas misturas, a melhor composição para o suporte da fermentação em estado sólido;

Caracterizar bagaço de cidra, farelo de arroz e farelo de trigo quanto à composição de açúcares, ácido cítrico e flavonóides;

Selecionar, dentre naringina, rutina e hesperidina ou suas misturas, a melhor composição de indutor(es) de produção para naringinase;

Validar o modelo de produção de naringinase proposto.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 SUCOS CÍTRICOS

##### 3.1.1 Produção e Mercado

A citricultura brasileira está altamente concentrada na produção de laranjas doces, com cerca de 90 % do total da produção nacional de citros. Do total de laranja produzida no Brasil, 85 % são destinados à indústria para a fabricação de suco e 15 % são consumidos “*in natura*”. O cinturão citrícola brasileiro é concentrado em São Paulo e Triângulo Mineiro, regiões que detêm 80 % da produção nacional de laranja e respondem pela quase totalidade das exportações de suco concentrado de laranja. Cálculos do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA, 2016) indicam que as indústrias do estado de São Paulo podem iniciar 2016/17 com volume estocado próximo de 300 mil toneladas de suco de laranja, em equivalente concentrado. E, no final da próxima temporada (2016/17), esse número pode ser ainda menor.

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de suco de laranja concentrado; respondendo por 57 % da produção e por 80 % das exportações globais. O Brasil exporta 98 % do suco concentrado produzido, sendo os principais mercados de destino regiões desenvolvidas: Europa (72 %), EUA (20 %) e Japão (3 %). Os maiores consumidores mundiais de suco de laranja concentrado são EUA, com 38 % do consumo global, Europa, com 36 % do consumo global, Canadá, com 4,8 %, China com 5,8 % e Japão, com 3,8 % (CITRUS BR, 2014).

##### 3.1.2 Sabor Amargo em Cítricos

Frutos cítricos apresentam sabor amargo característico devido à presença principalmente de limonóides e flavonóides (SINGH et al., 2003). Os flavonóides em cítricos incluem flavanonas (naringina), flavonas (nobiletina) e flavonóis (quercetina) (BENAVENTE-GARCIA et al., 1997). Alguns flavonóides são muito amargos enquanto outros não o são, dependendo do tipo de cadeia glicosídica que os mesmos apresentam, por exemplo, naringina e neohesperidina são muito amargas, enquanto hesperidina não possui sabor.

Em geral, os flavonóides podem contribuir para a qualidade do suco de fruta influenciando na aparência, no sabor e no valor nutricional do produto. As concentrações de naringina são mais altas em folhas jovens e no albedo dos frutos imaturos (PURI; BANERJEE, 2000), porém também são detectadas no suco da fruta (TOMÁS-BARBERÁN, 2000). Apesar de certa quantidade de naringina, aproximadamente 0,4 g/L, ser comum nos sucos de laranja do tipo pomelo, as frutas colhidas precocemente podem elevar essa quantidade a níveis menos aceitáveis de 1,2 g/L (PINO, 1997).

Tendo em vista que o amargor representa um problema para a indústria de sucos cítricos, pois sua presença chega a reduzir em 50 % o valor do produto no mercado, algumas técnicas vêm sendo propostas para sua remoção (RIBEIRO; SILVEIRA; FERREIRA-DIAS, 2002) como adsorção em resina (JOHNSON; CHANDLER, 1988; KIMBALL, 1987), extração supercrítica com dióxido de carbono (KIMBALL, 1987) e tratamento com  $\beta$ -ciclodextrina (SHAW; WILSON, 1983; MONGKOLKUL et al., 2006).

Embora tenha alcançado resultados positivos quanto à remoção do amargor, as técnicas propostas têm aplicações limitadas, pois provocam a perda da acidez, sabor, doçura e turbidez do suco, alteram a composição de nutrientes ou apresentam custos elevados (PURI et al., 1996; CHEN; NIU; CAI, 2010). Algumas resinas e a  $\beta$ -ciclodextrina podem absorver os componentes do amargor completamente, mas não podem ser aplicados comercialmente, pois as resinas e a ciclodextrina podem absorver muitos outros nutrientes (JOHNSON e CHANDLER, 1988).

As limitações descritas acima justificam a necessidade de padronizar técnicas inovadoras que utilizam abordagens biotecnológicas para retirada do amargor dos sucos de frutas (PURI et al., 1996). Assim, a redução da concentração de naringina por hidrólise enzimática se destaca como técnica promissora para aplicações industriais (ŞEKEROĞLU et al., 2006).

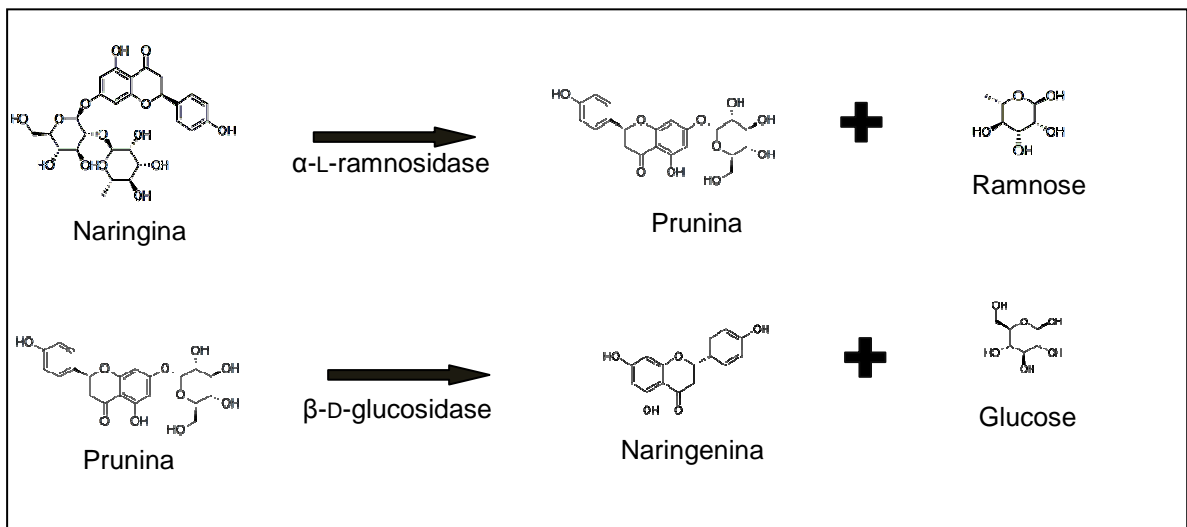
### 3.2 NARINGINASE: CARACTERÍSTICAS

A naringinase foi primeiramente isolada de fontes vegetais como sementes de salsão e folhas de pomelo (HALL, 1938). Thomas, Smythe e Labbee (1958) conseguiram obter extratos brutos de fermentação microbiana com atividade

de naringinase. Esses extratos apresentaram pH ótimo entre 5 e 6 e permaneceram por 4h a 60 °C perdendo apenas 16 % da atividade. Os extratos guardados a 5 °C não perderam atividade mesmo depois de um ano. Mais tarde, Okada et al. (1963) purificaram a naringinase e relataram as propriedades da mesma. Utilizando esse estudo como base, a companhia Tanabe Pharmaceuticals estabeleceu um processo para produção de um preparado de naringinase que foi comercializado com o nome de *Kumitanase*. Smythe e Thomas (1960) submeteram uma patente nos Estados Unidos que descreve a produção de naringinase. Outras patentes para produção de naringinase foram submetidas no Japão (ITO e TAKIGUCHI, 1970; FUKUMOTO; OKADA, 1973) e Alemanha (HOECHST, 1994).

A naringinase é um complexo enzimático composto de atividade de  $\alpha$ -L-ramnosidase (EC 3.2.1.40) e de  $\beta$ -D-glucosidase (EC 3.2.1.21) (SORIA et al., 2004). Essa enzima catalisa a conversão de naringina em naringenina em um processo de duas etapas (Figura 1). O substrato naringina (4'-5,7'-trihidroxi-flavonona-7-ramnoglicosídeo) é hidrolisado pela porção  $\alpha$ -L-ramnosidase para produzir ramnose e prunina (4'-5,7'-trihidroxi-flavonona-7-glucosídeo), que é então convertida pela porção  $\beta$ -D-glucosidase a glucose e naringenina (4'-5,7'-trihidroxi-flavonona) (PURI et al., 1996). A prunina apresenta um terço do amargor da naringina e, naringenina é quase insípida.

**Figura 1** – Hidrólise da naringina em prunina, ramnose, naringenina e glucose pela naringinase expressando atividades  $\alpha$ -L-ramnosidase e  $\beta$ -D-glucosidase.



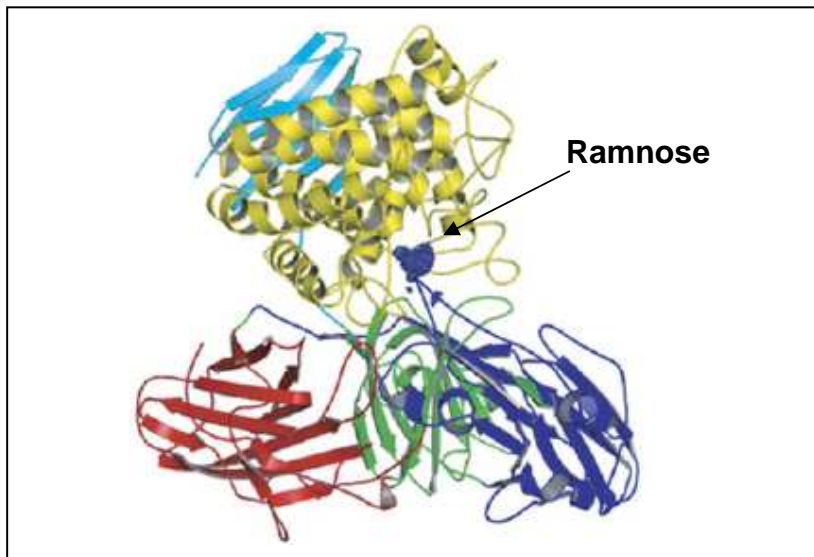
Fonte: Adaptado de Ribeiro (2010).

Chien, Sheu e Shyu (2001) reportaram que estas duas enzimas podem operar em conjunto, sem interrupção, sem que uma exerça influência sobre a atividade da outra. A  $\alpha$ -L-ramnosidase [E. C. 3.2.1.40] cliva a  $\alpha$ -L-ramnose terminal especificamente de um grande número de moléculas naturais que incluem hesperidina, naringina, rutina, quercitrina, glucosídeos terpenil e muitos outros glucosídeos naturais que contêm  $\alpha$ -L-ramnose terminal (MONTI et al., 2004; YADAVY et al., 2010). A rutina pode ser hidrolisada pela  $\alpha$ -L-ramnosidase à ramnose e 3-glucosilquercitina, que posteriormente pode ser hidrolisada pela porção  $\beta$ -D-glucosidase da naringinase em glucose e quercetina (3, 3', 4', 5, 7- penta hidroxil flavona) (BOKKENHEURSER; SHACKLETON; WINTER, 1987).

Hesperidina (6"-O-( $\alpha$ -L-ramnopiranosil)- D-glucose), um membro do grupo das flavononas, é um co-produto abundante do cultivo de cítricos e largamente disponível no Brasil. Esta molécula pode ser isolada em grande quantidade de cascas de algumas espécies cítricas e tem sido reportada por ter propriedades antioxidante, antialérgica, anticancerígena, antimicrobiana e vasodilatadora (GARG; ZANEVELD; SINGLA, 2001; HOLLMAN e KATAN, 1997). Lee et al. (2012), reportaram que a aglicona hesperitina-7-O-glucosídeo (Hes-7-G) pode ser produzida por conversão enzimática da hesperidina presente em extratos de suco e cascas de laranja pela naringinase de *Aspergillus sojae*.

A estrutura 3D da  $\alpha$ -L-ramnosidase de *Bacillus* sp foi determinada. A enzima foi cristalizada a 20 °C por Cui et al. (2007). Por cristalografia de raio X estes autores concluíram que a ramnosidase forma um homodímero na estrutura cristalina contendo 1.908 aminoácidos, 43 moléculas de glicerol, quatro íons cálcio e 1.755 moléculas de água. A estrutura completa consiste em cinco domínios, quatro com enovelamento sanduíche  $\beta$  designadas como domínios N, D1, D2 e C, e uma estrutura ( $\alpha/\alpha$ ) 6-barril designada domínio A (Figura 2).

**Figura 2** - Estrutura tridimensional da Ramnosidase ( $\alpha$ Rha) em complexo com ramnose de *Bacillus* sp. Domínio vermelho N, domínio azul escuro D1, domínio verde D2, domínio amarelo A, domínio azul claro C.



Fonte: Adaptado de Cui et al. (2007).

Ni et al. (2012) caracterizaram a enzima produzida por *Aspergillus niger*, confirmando que esta é composta por duas subunidades com peso molecular de 131 KDa, do qual aproximadamente 65,5 KDa refere-se a cada subunidade. As análises foram baseadas em cromatografia de gel de filtração (CGF) e SDS-PAGE. A enzima purificada apresentou alta atividade e estabilidade na faixa de pH de 4,5 a 5,0, similar a outros relatos (PURI e KARLA, 2005). A temperatura ótima foi entre 45 e 55 °C. Nenhuma perda significativa de atividade foi observada mediante incubação às seguintes condições: 35 °C durante 8h, 40 °C por 4 h e 50 °C por 3 h. No entanto, a atividade decresceu significativamente a 55 °C por 1 h.

Além de apresentar potencial uso na indústria de sucos cítricos (PURI e BANERJEE, 2000), a naringinase possui outras possíveis aplicações, como realizar glicosilação de diversos compostos (MARTEARENA; DAZ; ELLENRIEDER, 2008), como neohesperidina e pectinas, aumentando sua solubilidade, evitando assim a precipitação em tanques industriais (TERADA et al., 1995 e SPAGNA et al., 2000); promover o aumento no aroma de sucos de uva e vinho (OREJAS; IBANEZ; RAMON, 1999; YANAI e SATO, 2000; MANZANARES et al., 2000); catalisar a síntese de compostos aplicados na indústria de alimentos e farmacêutica com alto valor agregado, como prunina, que possui propriedades antioxidantes e anti-

inflamatórias (BENAVENTE-GARCIA et al., 1997); realizar a deraminosilação de muitos produtos naturais que contém L-raminose terminal para aplicação farmacêutica (YADAV et al., 2010); produzir bebidas funcionais (suco de groselha, suco de laranja e infusão de chá verde) pelo aumento da quantidade de flavonóides glicosídicos potencialmente biodisponíveis (GONZALEZ-BARRIO et al., 2004).

### 3.3 *Aspergillus niger*. CARACTERÍSTICAS

O *Aspergillus niger* é um fungo filamentosso negro comumente denominado como “mofo negro” (WAINWRIGHT, 1995). As colônias geralmente têm crescimento rápido e exuberante, inicialmente são brancas, amarelas, passando para marrom ou para o negro. A colônia é composta por micélio aéreo com conidióforos eretos, densamente distribuídos sobre a superfície do meio e farta produção de conídios (SANTOS, 2007).

Trata-se do gênero mais comum dos fungos filamentosos, além de ser um dos mais bem estudados. As espécies que compõem esse gênero tem ampla distribuição mundial estando presente na superfície sólida, no ar e na água, tanto em organismos vegetais bem como em animais, além de estarem associadas com a deterioração de madeiras e alimentos, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical. Muitas das espécies de *Aspergillus niger* são utilizadas para obtenção de enzimas, na biossíntese química e na transformação de compostos. Há espécies patogênicas para o homem e para os animais e há aquelas que durante seu metabolismo produzem toxinas (ROSA, 2002).

A espécie *niger* é uma das poucas consideradas GRAS (Generally Recognized as Safe) pela Food and Drug Administration (FDA). Contudo, algumas cepas desse fungo foram relatadas como produtoras de ocratoxina em baixas quantidades. Para aplicação na indústria de alimentos, somente são usadas linhagens que não produzem a micotoxina (VARGA et al., 1996; ABARCA et al., 1997).

O uso de *Aspergillus niger* apresenta algumas vantagens como facilidade de manipulação, sua habilidade de fermentar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de bioprodutos (SPIER, 2005). A longa história de utilização segura em escala industrial faz com que *A. niger*

seja extensivamente utilizado no estudo de novos processos biotecnológicos, particularmente, em fermentação em estado sólido, pois as condições de cultivo são parecidas com o seu habitat natural (SHUSTER et al., 2002).

### 3.4 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Fermentação em estado sólido (FES) é uma técnica que utiliza um suporte sólido que pode servir também como substrato, o qual é umedecido para permitir o crescimento do microrganismo. O material sólido poderá ser um substrato sólido natural, como resíduos da agricultura, ou um suporte inerte, como poliuretano ou resinas poliméricas (PANDEY, 1992, 2003).

Os principais microrganismos cultivados em meio sólido são fungos filamentosos. Os meios sólidos se assemelham aos meios naturais (solos) de desenvolvimento desses fungos e suas formas de desenvolvimento vegetativo são constituídas por hifas aéreas ramificadas. Elas são propícias à colonização de matrizes sólidas porosas. Os fungos filamentosos podem desenvolver-se em umidades muito baixas, da ordem de 12 %, porém os níveis de umidade relativa variam de 12 a aproximadamente 80 %. A umidade relativa depende do nível máximo de retenção de água do material utilizado como substrato ou suporte (LONSANE et al., 1985).

Algumas vantagens podem ser citadas para a FES em relação aos outros tipos de fermentação, como a utilização de resíduos/subprodutos agroindustriais, que constituem matérias-primas de baixo custo, simples e facilmente acessíveis, menor gasto de energia, menor quantidade de água utilizada e conseqüentemente menor saída de água para o esgoto, menor espaço de fermentação, menor possibilidade de contaminação (devido à menor atividade de água), geralmente os meios de fermentação são mais simples (LONSANE et al., 1985). Os metabólitos são normalmente produzidos em uma forma concentrada, facilitando o seu processo de recuperação do meio de fermentação. Além disso, a disponibilidade restrita de água pode estimular a produção de alguns metabólitos específicos (COUTO, SANROMÁN, 2006).

Na FES o substrato sólido não apenas fornece os nutrientes para os microrganismos, mas também serve de suporte para o crescimento destes (PANDEY, 2002). Aqueles materiais que fornecem todos os nutrientes necessários

ao crescimento celular são considerados substratos ideais. Entretanto, em muitos casos, alguns nutrientes encontram-se em concentrações abaixo da mínima, sendo necessária suplementação do meio.

### 3.4.1 Subprodutos da Agroindústria

Devido à grande extensão territorial usada para a agricultura no Brasil, há geração de grandes quantidades de resíduos e/ou subprodutos, causando impacto ambiental. Assim, deve-se considerar a busca de destinos alternativos para esses resíduos, o que simultaneamente agrega valor aos mesmos (SOUZA, 2008).

Cada vez mais, esses subprodutos têm sido considerados para aplicação industrial para produção de diversos compostos de interesse por meio da fermentação em estado sólido ou semi-sólido. Existem vários exemplos na literatura relacionando o uso de substratos naturais e suportes inertes na produção de enzimas e outros compostos de alto valor comercial por FES (Tabela 1).

**Tabela 1** - Compostos que podem ser obtidos por fermentação em estado sólido a partir de diferentes resíduos e fungos filamentosos.

<b>Produto</b>	<b>Microrganismos principais</b>	<b>Substratos</b>
<b>Enzimas</b>		
Pectinases	<i>Lentinus enodes</i> <i>Aspergillus niger</i>	Resíduos de frutas Polpa de café
Hemicelulases	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Farelo de trigo
Celulases	<i>Trichoderma reesei</i>	Palha de trigo
Amilases	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo Farelo de arroz
Proteases	<i>Rhizopus oryzae</i> <i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo Casca de maracujá
Lípases	<i>Penicillium restrictum</i>	Torta de babaçu
Invertases	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de arroz
<b>Substâncias orgânicas</b>		
Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus niger</i>	Resíduos de maçã Resíduos de abacaxi
Ácido Giberélico	<i>Gibberella fujikoroii</i>	Farelo de trigo
Pigmentos	<i>Monascus purpureus</i>	Arroz

Fonte: Adaptado de Pinto (2003).

O Brasil está entre os 10 principais produtores de arroz do mundo. Segundo o Levantamento Sistemático de Produção Agrícola (IBGE, 2016), o volume da produção de arroz na região sul será de 74,6 milhões de toneladas (36,3% do total). O farelo de arroz é obtido após o descascamento do grão, correspondendo a 5-8 % do grão. Nele estão presentes fibras, aminoácidos e sais minerais como ferro, fósforo e magnésio. Entre seus nutrientes, o farelo de arroz contém entre 11 e 13 % de proteína bruta, aproximadamente 11,5 % de fibras, sendo ainda uma boa fonte de lipídios (SILVA et al., 2006).

O trigo é o segundo cereal mais produzido no mundo, com significativo peso na economia agrícola global. No Brasil, o trigo é cultivado nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Segundo o IBGE (2016), a produção de trigo no Brasil deve crescer 14,19%, passando de 5.534,9 toneladas (na safra 2016) para 6.320,1 toneladas no próximo ciclo. O processamento do grão de trigo proporciona diversos subprodutos, e dentre estes encontra-se o farelo de trigo. O farelo de trigo é constituído por um conjunto de estruturas externas do grão de trigo, separado pelo processo de moagem. Inclui as células de aleurona, pequena parte do endosperma e parte de gérmen. As células do pericarpo contêm, aproximadamente, 30 % de celulose, 60 % de arabinosilanos e 12 % de lignina. Por outro lado, as células do aleurona apresentam em torno de 2 % de celulose, 2 % de glucomonas, 60 % de arabinosilanos e 30 % de  $\beta$ -glucano (OAKENFULL, TOPPING, 1987).

O Brasil é o maior produtor de laranjas no mundo e o bagaço da fruta é de aproximadamente 50 % do peso total. Em um período de 20 anos, o Cinturão Citrícola Brasileiro aumentou sua produção de caixas de laranja em mais de 45 % (CITRUS BR, 2014). Apesar de já ser muito aproveitado na fabricação de rações, o resíduo do processo de produção de suco de laranja demanda um aproveitamento econômico mais atraente e de baixo custo. Puri et al. (2010) reportaram que o bagaço cítrico em pó contém altas proporções de flavonóides, que são indutores na produção de naringinase.

A fermentação em estado sólido é uma tecnologia capaz de propor uso para esses resíduos. Contribuindo assim, para a diminuição de problemas ambientais e agregando valor a essas matérias-primas, através da geração de compostos de interesse econômico.

### 3.5 PRODUÇÃO DE NARINGINASE

A utilização de produtos agroindustriais como matérias-primas na produção de naringinase, além de agregar valor a materiais de baixo custo no mercado, pode vir a reduzir em muito o preço final da enzima (SHANMUGAPRAKASH et al., 2011; MENDOZA-CAL et al., 2010).

Chen, Niu e Cai (2010) otimizaram a constituição do meio de cultivo na produção de naringinase de *Aspergillus oryzae* em fermentação submersa. Diferentes fontes de carbono e nitrogênio foram analisadas. Naringina e bagaço de pomelo em pó exibiram a maior atividade de naringinase, porém o bagaço de pomelo foi selecionado como fonte de carbono por ser um resíduo agroindustrial, sendo assim de baixo custo além de trazer benefícios ambientais. A concentração ótima dos componentes, que produziu 408,28 U/mL, foram 15 g/L de bagaço de pomelo, 12 g/L de peptona 0,2 g/L CaCl<sub>2</sub>, 0,4 g/L NaCl, 2 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e 1 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

Vários estudos vêm sendo conduzidos para otimização da produção de enzimas em fermentação em estado sólido com fungos utilizando metodologia estatística. Metodologias estatísticas como o delineamento fatorial e de misturas, e metodologia de superfície de resposta são utilizadas na otimização em bioprocessos, uma vez que avaliam as interações entre os parâmetros selecionados de fermentação (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1996).

Mendoza-Cal et al. (2010) produziram naringinase por diversos fungos filamentosos utilizando bagaço de laranja e de pomelo em fermentação em estado sólido. Das 12 cepas fúngicas estudadas, apenas *Penicillium roqueforti* Milano não foi capaz de produzir naringinase. Mesmo que os dois substratos tenham induzido a produção de naringinase, o bagaço de pomelo foi escolhido por induzir maior produção da enzima. A máxima atividade foi obtida de *Aspergillus foetidus*, que produziu 18,75 U/g de bagaço de pomelo seco, durante 8 dias de fermentação nas condições ótimas. A análise de variância do delineamento fatorial 2<sup>3</sup> mostrou que a temperatura e pH foram as variáveis que mais influenciaram a produção da enzima.

Shanmugaprakash et al. (2011) produziu naringinase por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido utilizando subprodutos da agroindústria como farelo de arroz, farelo de trigo, bagaço de cana, casca cítrica e semente de café. Os melhores resultados foram obtidos tanto com farelo de arroz (58,1 U/g de

substrato seco) quanto com casca cítrica (54,76 U/g de substrato seco) contendo 10 g/L de naringina como indutor. No entanto, os autores escolheram farelo de arroz como substrato devido à alta disponibilidade e baixo custo. A concentração de 10 g/L de naringina como indutor em 96 h de cultivo e umidade 1:1 m/v resultou na máxima produção de naringinase em farelo de arroz de 413 U/g de substrato seco.

Um dos mais recentes trabalhos de otimização da produção de naringinase por fermentação em estado sólido foi descrito por Shehata e Abd El Aty (2014). Estes autores utilizaram uma cepa de *Aspergillus niger* isolada de ambiente marinho cultivada em bagaço de laranja como substrato. Estratégia de otimização sequencial foi empregada para aumentar a produção de naringinase. Primeiramente, foram analisadas 19 variáveis pelo delineamento fatorial Plackett-Burman, incluindo condições de cultivo e constituição do meio fermentativo, que resultou em uma variação de atividade de naringinase de 0,04 a 11,70 U/mL. Em seguida, parâmetros significativos foram analisados pelo arranjo ortogonal de Taguchi, dos quais os valores ótimos para uma atividade de 46,3 U/g foi 15 g de casca de laranja, 30 mL de solução umedecedora, 1% pomelo em pó e 1 % de NaNO<sub>3</sub> como fonte de nitrogênio inorgânica em pH 7,5 a 28 °C por 7 dias.

A metodologia de delineamento de misturas é uma importante área dentro da estatística aplicada. Ao contrário das técnicas de delineamento fatorial, estes métodos respeitam a restrição entre os constituintes, tanto na montagem do delineamento quanto na análise dos resultados. Na maioria dos casos, os constituintes somam 100 %, entretanto outras opções existem como modelos de restrição (CORNELL, 2002; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1996).

Segundo Cornell (2002) o delineamento de misturas pode ser entendido como variação da metodologia no cálculo de superfícies de resposta para modelar, simular e otimizar determinada propriedade de uma mistura em função de seus componentes.

Poucos estudos com aplicação do delineamento de misturas para bioprocessos estão disponíveis para discussão bibliográfica. Petri et al. (2014) otimizaram a produção de  $\alpha$ -L-ramnosidase de *Aspergillus niger* por FES utilizando metodologia estatística, que foi conduzida em duas etapas. No primeiro momento, estes autores utilizaram o delineamento de misturas com três componentes para selecionar a melhor proporção dos suportes para produção da enzima. A melhor condição foi em cultivo com 0,14 g de bagaço de cana-de-açúcar; 1,25 g de casca

de soja e 3,05 g de palha de arroz com máximo de atividade de 1,92 U/mL. Em seguida, realizaram o delineamento Box-Behnken 3<sup>2</sup> para otimização da umidade do cultivo e pH da solução de nutrientes na produção da enzima. A atividade de  $\alpha$ -L-ramnosidase foi aumentada para 3,02 U/mL (correspondente a 0,03 U/g de substrato seco) em cultivos com umidade de 75,5 % e pH 4,0.

A metodologia de superfície de resposta é, atualmente, o mais popular conjunto de técnicas para otimização. Sua primeira etapa consiste na escolha de um delineamento experimental seguida de modelagem matemática, que é realizada ajustando-se modelos lineares ou quadráticos a resultados experimentais, obtidos por meio de planejamentos fatoriais (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1996). Após esta etapa é possível deslocar-se sobre a superfície de resposta ajustada, a fim de localizar regiões que satisfaçam condições de interesse (MARQUES et al., 2007).

Alguns trabalhos utilizam a metodologia de resposta para avaliar a produção de naringinase. Shanmugaprakash et al. (2014) otimizaram a produção de naringinase por *Aspergillus brasiliensis* em fermentação sólida usando casca de mandioca como substrato. Os experimentos foram conduzidos conforme o delineamento de Plackett–Burman (PBD). Foram analisadas 12 variáveis, entre elas, fontes de carbono (maltose, ramnose, glucose e sacarose); fontes de nitrogênio (nitrato de soja, peptona e uréia); e elementos traço (cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, sulfato de zinco, cloreto férrico e sulfato de magnésio). Com base na influência positiva demonstrada pelo diagrama de Pareto, obtido a partir do PBD sobre a atividade de naringinase, três componentes do meio: maltose, peptona e cloreto de cálcio foram analisados por planejamento Box-Behnken em três níveis e analisados por superfície de resposta. As melhores condições encontradas foram maltose 7,74 g/L, peptona 4,19 g/L e cloreto de cálcio 7,63 mM para uma atividade máxima de 0,89 U/g de substrato seco em pH 5,0 a 27 °C por 5 dias.

### 3.5.1 Efeito de Indutores na Produção de Naringinase

Microrganismos são a principal fonte de naringinase. Essa enzima é produzida particularmente por fungos filamentosos, entre os quais destaca-se o *Aspergillus niger* (PURI, 2010). Quando o objetivo é elevar a produção de naringinase é comum lançar mão do uso de indutores. Segundo Puri e Banerjee

(2000), a produção de naringinase é dependente de indução, pois a adição do mesmo eleva a produção dessa enzima. Entretanto, a troca do indutor por outra fonte de carbono qualquer possibilita apenas o crescimento do fungo, mas sem a produção enzimática. Dessa maneira, diferentes flavonóides têm sido testados na produção de naringinase. Assim, alguns indutores foram relatados na produção de naringinase como a ramnose (VINOTHKUMAR, 2010; PURI; BANERJEE; BANERJEE, 2005; OREJAS; IBANEZ; RAMON, 1999); hesperidina (VINOTHKUMAR, 2010); naringina (YADAV e YADAV, 2000; VINOTHKUMAR, 2010; OREJAS; IBANEZ; RAMON, 1999); naringenina (PURI; BANERJEE; BANERJEE, 2005; VINOTHKUMAR, 2010) e rutina (VINOTHKUMAR, 2010; OREJAS; IBANEZ; RAMON, 1999). Estes indutores são usualmente substratos naturais ou substratos análogos da enzima (VINOTHKUMAR, 2010).

Yadav e Yadav (2000), utilizando *Aspergillus terreus*, adicionaram 0,33 g/L de naringina como indutor ao meio de cultivo contendo 40 g/L de sacarose como fonte de carbono. Os autores conseguiram dessa maneira, aumentar a atividade de naringinase, aferida pela atividade de  $\alpha$ -L-ramnosidase de 3,2 para 5,7 U/mL. Quando o meio foi suplementado com palha de arroz, com ou sem naringina, propiciou atividades de aproximadamente 4,7 U/mL, provavelmente agindo como fonte de carbono o que resultou em repressão catabólica.

Orejas, Ibanez e Ramon (1999) compararam os efeitos de arabinose, glucose, ramnose, xilose, hesperidina, naringina e rutina na produção de  $\alpha$ -L-ramnosidase de *Aspergillus nidulans* em fermentação submersa. Os cultivos foram conduzidos em temperatura de 37 °C, sob agitação e pH inicial de 5,5. A ramnose foi a melhor fonte de carbono, com atividade de 0,59 U/mL após 24 h de cultivo. Naringina também foi capaz de induzir a produção, porém em menor proporção (0,031 U/mL). As outras fontes de carbono foram repressoras da produção.

VinothKUMAR (2010) estudou o efeito dos indutores flavonóides naringina, naringenina, rutina e hesperidina, e do açúcar ramnose na produção de naringinase por *Aspergillus niger* em fermentação submersa a 200 rpm. O meio de cultivo utilizado foi composto, além dos indutores, de peptona e sais em pH inicial de 4,5 e temperatura de 27°C. Para a otimização, não foi utilizado delineamento estatístico, apenas foram comparadas diversas concentrações dos indutores. As concentrações ótimas em % (m/v) de naringina, ramnose, naringenina, rutina e hesperidina para produção máxima de naringinase foi de 0,1; 0,375; 0,01; 0,2 e 0,2,

respectivamente. Com a adição de naringina a 0,1 % estes autores atingiram uma máxima de atividade de 9,68 U/mL no sétimo dia de fermentação.

Puri, Banerjee e Banerjee (2005) testaram o papel indutor da ramnose e melaço (10 g/L), na produção de naringinase por *Aspergillus niger* em fermentação submersa contendo naringenina (0,05 g/L) no meio de cultivo. A ramnose induziu uma produção de 4,6 U/mL após 8 dias de fermentação, igualmente para o melaço. Apesar do glicosídeo ramnose ter sido relatado como indutor importante na síntese de naringinase por Mateles, et al. (1965), melaço foi escolhido como fonte de carbono para os experimentos posteriores, pela disponibilidade e custo. Utilizando melaço e peptona como fonte de nitrogênio, os íons (10 mM)  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  induziram atividades de 8 U/mL e 8,58 U/mL respectivamente. Entretanto, glucose, frutose, sacarose e amido foram repressores, assim como sulfato de amônio, fosfato de amônio e caseína. Um inóculo com menos de 72h ou menor que 7 % (v/v) diminuiram a produção de naringinase. Adicionalmente, os íons (5 mM)  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$  também tiveram papel repressor, não permitindo a produção de naringinase.

VinothKUMAR e RevathiBabu (2010) otimizaram a produção de naringinase por *Aspergillus niger* em fermentação submersa e compararam o efeito dos indutores naringina, naringenina, hesperidina e rutina (0,05 %, m/v), dos diferentes aminoácidos (10 mM), das diferentes fontes de carbono (1 %, m/v), das fontes de nitrogênio orgânica e inorgânica (0,5 %, m/v), da temperatura e do pH. A produção máxima da enzima de 17,28 U/mL foi observada em cultivos com 0,1 % (m/v) de naringina como indutor, 0,5 % (m/v) de ramnose como fonte de carbono, 0,25 % (m/v) de peptona como fonte de nitrogênio e 10 mM de glicina como fonte de aminoácido em pH inicial de 4,5 a 28 °C por 7 dias. Comparada como o meio de cultivo inicial, o rendimento da produção aumentou 1,8 vezes sob condições otimizadas, porém não foi utilizado delineamento estatístico.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

Foram utilizados reagentes de grau analítico requerido nos experimentos. Os substratos utilizados para FES foram bagaço de laranja, bagaço de cidra, farelo de arroz e farelo de trigo adquiridos em comércio local de Londrina. Os substratos foram secos em estufa a 70 °C durante 24 h, moídos em moinho de tipo Wiley com granulometria de cerca de 2 mm, embalados e congelados até o uso.

#### 4.1.1 Microrganismo

A cepa de *Aspergillus niger* 426 foi isolada de ameixa seca pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), UNICAMP, Brasil. Identificado e cedido gentilmente pela Professora Maria Helena Fúngaro do Departamento de Biologia Geral do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Preparo dos Meios de Cultivo

##### 4.2.1.1 Meio de preservação e de preparo do inóculo

Para a preservação e preparo do inóculo foi utilizado o meio BDA (Batata Dextrose Ágar), apresentado na Tabela 2. Os componentes foram solubilizados em água de poço artesiano nos volumes necessários para atingir as concentrações indicadas e alíquotas de 5 mL e de 20 mL foram distribuídas respectivamente em tubos de ensaio (para preservação do microrganismo) e em Erlenmeyers de 125 mL de capacidade (para preparo do inóculo). Em seguida, os frascos foram autoclavados por 20 min a 121 °C. Os tubos de ensaio acomodados em posição inclinada até solidificação e então os frascos foram estocados em câmara fria a 4 °C para posterior utilização.

**Tabela 2** – Composição do meio BDA utilizado para preservação do microorganismo.

<b>Composição</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Batata	200
Dextrose	20
Ágar	20

#### 4.2.1.2 Meios de fermentação

A composição da solução nutriente utilizada na fermentação foi a mesma de Shanmugaprakash et al. (2011) (Tabela 3). O pH inicial dos meios de cultivo foi ajustado para 4,5 com HCl 1 M ou NaOH 4 M. Foram distribuídas alíquotas de 10 mL em frascos Erlenmeyers de capacidade de 250 mL contendo os substratos sólidos. Em seguida, os frascos foram autoclavados por 20 minutos a 121 °C, resfriados à temperatura ambiente e estocados em câmara fria a 4°C para posterior utilização.

**Tabela 3** – Composição da solução nutriente utilizadas para umedecer os suportes da fermentação.

<b>Composição</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Indutor*	10,0
Extrato de levedura	5,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
KCl	0,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0
FeCl <sub>3</sub>	0,1

\*naringina, rutina ou hesperidina

Fonte: Adaptado de Shanmugaprakash et al. (2011).

#### 4.2.2 Preservação do Microrganismo

A cepa de *Aspergillus niger* foi preservada em meio BDA (Tabela 2). A repicagem foi feita a cada 30 dias. A incubação foi a 28 °C por 72 h. Após o crescimento, o microorganismo foi armazenado em câmara fria a 4 °C até a data do próximo repique.

### 4.2.3 Fermentação em Estado Sólido

#### 4.2.3.1 Preparo do inóculo

O microrganismo foi repicado em frascos Erlenmeyer contendo 20 mL do meio BDA (Tabela 2), estes foram levados à estufa a 28 °C por 72 h para formação de esporos. Em seguida, foi adicionado ao cultivo 0,1 % (v/v) de Tween-80, e diluída até à concentração desejada de esporos ( $1 \times 10^9$  esporos/g substrato seco). A contagem foi feita em câmara de Neubauer para obtenção de solução com  $10^9$  esporos/mL de solução nutriente.

#### 4.2.3.2 Produção de naringinase por *Aspergillus niger*

##### 4.2.3.2.1 Seleção dos substratos indutores para produção de naringinase

Num primeiro passo, os cultivos foram realizados com 10 g de bagaço de laranja ou de cidra, umedecidos com solução nutriente sem adição de indutor à 75 % (m/v) de umidade, de modo a selecionar o melhor substrato contendo indutores para produção de naringinase.

##### 4.2.3.2.2 Cinética de fermentação

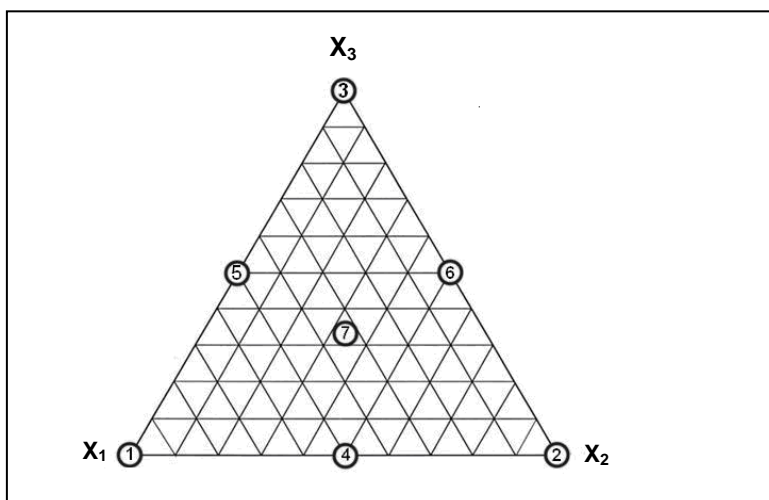
Após a escolha do melhor substrato indutor de naringinase, uma cinética de fermentação para o ponto central do delineamento de mistura foi realizada para determinar o melhor tempo de cultivo para a produção da enzima. As triplicatas de cultivo foram coletadas nos tempos 72; 96; 120; 144 e 168 horas. O ponto central foi composto de uma mistura ternária de 33,33 % de cada substrato (bagaço de cidra, farelo de arroz e farelo de trigo) na quantidade total de 10 g, conforme descrito na Tabela 4 e umedecido com solução nutriente com o indutor naringina, conforme descrito na Tabela 3. O melhor tempo de atividade de naringinase foi utilizado para conduzir todos os cultivos do delineamento de misturas.

#### 4.2.3.2.3 Seleção da melhor mistura de substratos

Foram realizados dois delineamentos de mistura. No primeiro, foram avaliados os efeitos dos substratos bagaço de cidra, farelo de arroz e farelo de trigo e suas misturas (Tabela 4) para produção de naringinase, conforme descrito na figura 3.

Para o delineamento experimental de misturas foi utilizado um arranjo simplex centróide (Figura 3), com  $2^{q-1}$  combinações de misturas, onde  $q$ , é o número de componentes ou variáveis cuja soma é 1 ou 100%, de 3 componentes e triplicatas do ponto central (Cornell, 2002).

**Figura 3** – Delineamento Experimental de Misturas: Arranjo simplex para três componentes.



Fonte: Adaptado de Cornell (2012).

Foram utilizadas 10 g de cada substrato quando usados individualmente (ensaio 1). A umidade em todos os meios de cultivo foi de 75 % (m/v), corrigida com a adição de água destilada. A concentração dos componentes da solução nutriente foram sempre as mesmas em todos os experimentos.

**Tabela 4** - Matriz do delineamento de misturas para seleção dos substratos.

<b>Ensaio</b>	<b>Mistura Codificada (x1; x2; x3)**</b>	<b>Mistura Original* (x1; x2; x3)**</b>
1	(1; 0; 0)	(10; 0; 0)
2	(0; 1; 0)	(0; 10; 0)
3	(0; 0; 1)	(0; 0; 10)
4	(½; ½; 0)	(5; 5; 0)
5	(½; 0; ½)	(5; 0; 5)
6	(0; ½; ½)	(0; 5; 5)
7	(⅓; ⅓; ⅓)	(3,33; 3,33; 3,33)
8	(⅓; ⅓; ⅓)	(3,33; 3,33; 3,33)
9	(⅓; ⅓; ⅓)	(3,33; 3,33; 3,33)

\*quantidade fixa total de 10 g do suporte

\*\*x<sub>1</sub> bagaço de cidra, x<sub>2</sub> farelo de arroz e x<sub>3</sub> farelo de trigo.

Após a execução do experimento e a coleta de dados, fez-se o ajuste de uma equação polinomial, estimando-se os respectivos coeficientes através do modelo cúbico especial descrito na Equação 1, em termos das concentrações reais de bagaço de cidra, farelo de arroz e farelo de trigo, que foram utilizados para o ajuste dos valores da variável resposta (atividade de naringinase).

$$y = \sum_{1 \leq i \leq q} \gamma_i^{\circ} x_i + \sum_{1 \leq i < j \leq q} \gamma_{ij}^{\circ} x_i x_j + \gamma_{123}^{\circ} x_1 x_2 x_3 \quad (1)$$

onde: Y é a atividade de naringinase (U/mL), x<sub>1</sub> o bagaço de cidra, x<sub>2</sub> o farelo de arroz e x<sub>3</sub> o farelo de trigo e γ os parâmetros estimados.

Para a obtenção do planejamento experimental, análise dos dados e construção dos gráficos foi utilizado o programa Statistica v. 9.0. Os modelos matemáticos ajustados a cada resposta foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para avaliar o nível de significância, o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) e a falta de ajuste. A influência das variáveis foi visualizada através de gráficos bidimensionais de superfície de resposta. Para análises de diferença de médias foi empregado teste de Tukey (nível de significância de 5 %).

#### 4.2.3.2.4 Seleção da concentração ideal de naringina, rutina e hesperidina

A melhor proporção de mistura de substratos foi utilizada para o estudo da concentração ideal de indutores naringina, hesperidina e rutina, que variou de 5 a 25 g/L. Os indutores foram adicionados à solução nutriente.

#### 4.2.3.2.5. Seleção da melhor mistura de indutores

Utilizando a melhor proporção de mistura dos substratos e a melhor concentração de indutores em g/L, o segundo delineamento de misturas foi utilizado para 3 componentes (naringina, rutina e hesperidina) e triplicatas do ponto central a uma concentração fixa total de indutor de 10 g/L. O delineamento inteiramente casualizado para estes experimentos está representado na Tabela 5. A concentração dos componentes restantes da solução nutriente foram sempre as mesmas em todos os experimentos.

**Tabela 5** - Matriz do delineamento de misturas para seleção dos indutores.

<b>Ensaio</b>	<b>Mistura Codificada (x<sub>1</sub>; x<sub>2</sub>; x<sub>3</sub>)**</b>	<b>Mistura Original* (x<sub>1</sub>; x<sub>2</sub>; x<sub>3</sub>)**</b>
1	(1; 0; 0)	(10; 0; 0)
2	(0; 1; 0)	(0; 10; 0)
3	(0; 0; 1)	(0; 0; 10)
4	(½; ½; 0)	(5; 5; 0)
5	(½; 0; ½)	(5; 0; 5)
6	(0; ½; ½)	(0; 5; 5)
7	(⅓; ⅓; ⅓)	(3,33; 3,33; 3,33)
8	(⅓; ⅓; ⅓)	(3,33; 3,33; 3,33)
9	(⅓; ⅓; ⅓)	(3,33; 3,33; 3,33)

\*concentração fixa total de 10 g/L dos indutores

\*\*x<sub>1</sub> naringina, x<sub>2</sub> rutina e x<sub>3</sub> hesperidina.

#### 4.2.4 Determinações Analíticas

Os cultivos foram interrompidos nos tempos determinados como descrito no item 4.2.3.2.2. Para a interrupção, foram adicionados, aos frascos Erlenmeyer, 5 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0, para a extração da enzima, em seguida, os cultivos foram filtrados em gaze e, o filtrado foi centrifugado em 20.000

rpm à 4 °C por 15 minutos. Os sobrenadantes foram utilizados para as determinações analíticas.

#### 4.2.4.1 Atividade de naringinase

A atividade da naringinase foi determinada segundo uma adaptação do Método de Davis (Davis, 1947). A mistura da reação foi composta de 1 mL naringina 1 % (m/v) em tampão de acetato de sódio 0,1 M (pH 4,0) e 1 mL de extrato aquoso (extrato enzimático). Essas misturas foram então incubadas à 50 °C por uma hora. Em seguida, efetuou-se a transferência de alíquota de 0,1 mL em tubos de ensaio contendo 3 mL de dietilenoglicol 90 % (v/v). Por último, foi acrescentado 0,1 mL de NaOH 4 M para interromper a reação. Os tubos foram deixados em repouso por 20 minutos em temperatura ambiente para o desenvolvimento de cor que foi lida em 420 nm, zerando-se o espectrofotômetro com o branco da reação. Os resultados de atividade enzimática foram expressos em U/mL, em relação a 5 mL de extrato enzimático, considerando uma unidade de atividade de naringinase como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 µmol de naringina por minuto de reação sob as condições descritas.

#### 4.2.4.2 Açúcares totais

Os açúcares totais do cultivo foram determinados segundo metodologia de Dubois et al. (1956). A curva padrão foi elaborada utilizando-se glucose como padrão em concentrações variando de 20 a 100 µg/mL, efetuando-se as leituras das absorvâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm.

#### 4.2.4.3 Extração dos açúcares solúveis dos substratos para análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As análises de determinação de carboidratos solúveis, ácido cítrico e flavonóides foram realizadas no Laboratório de Tecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

A extração dos açúcares solúveis dos substratos desengordurados foi realizada de acordo com a metodologia proposta por SARAVITZ et al. (1987), com

modificações. Aproximadamente 30 mg dos substratos em pó foram pesados em tubos tipo Eppendorf e utilizados para o processo de extração dos açúcares solúveis. Para desengordurar os substratos, adicionou-se 1 mL de hexano, em seguida foi agitado em vortex e levado à fervura a 40 °C por 5 min. Após a fervura, centrifugou-se em 20.000 rpm à 4 °C por 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante e repetiu-se o procedimento.

Os açúcares foram extraídos do precipitado em três etapas sucessivas de tratamento com etanol 80 %, a 100 °C, por 5 min. Após cada extração, a mistura foi centrifugada por 10 min a 14.000 rpm. O extrato alcoólico total obtido foi evaporado em estufa a 45 °C, e os açúcares ressuspensos em 1 mL de etanol 80 %. A solução contendo os açúcares foi novamente submetida à centrifugação por 10 min, filtradas em filtro de éster de celulose (Millipore) com poro 0,45 µm e o filtrado obtido foi armazenado em freezer a – 20 °C para posterior análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

#### *4.2.4.3.1 Determinação de carboidratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)*

Alíquotas de 20 µl das amostras do item 4.2.4.3 foram eluídas em uma fase móvel de acetonitrila:água (75:25, v:v) e injetadas em triplicata nas seguintes condições cromatográficas: temperatura de injeção 35 °C, volume de injeção 20 µl, fluxo de 1,0 ml/minuto, num sistema de CLAE equipado com um detector de RID (Shimadzu, modelo RID - 10A). Para a quantificação foram preparadas soluções-padrão de 50 µmolar dos monossacarídeos, sendo diluídos em quatro diferentes concentrações (glicose, xilose, rafinose e sacarose) e analisadas por CLAE. As unidades de área obtidas sob os picos em cada ponto (concentração) dos padrões de carboidratos foram utilizadas para construir curvas de calibração para calcular a quantidade do respectivo composto nas amostras de sobrenadante dos substratos.

#### *4.2.4.4 Extração de ácido cítrico do bagaço de cidra*

Após a extração dos açúcares solúveis do bagaço de cidra, de acordo com a metodologia de SARAVITZ et al. (1987), descrita no item 4.2.4.3, o material foi ressuspensado em 500 µL de metanol. A solução contendo o ácido cítrico foi

novamente submetida à centrifugação por 10 min, o sobrenadante foi filtrado em filtro de éster de celulose (Millipore) com poro 0,45 µm e o filtrado obtido foi armazenado em freezer a – 20 °C para posterior análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

#### *4.2.4.4.1 Determinação de ácido cítrico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)*

Para a quantificação de ácido cítrico, a amostra obtida no item 4.2.4.4 foi filtrada em filtro de éster de celulose (Millipore, grupo gTBP) com poro 0,20 µm e 20 µL do filtrado foi injetado em CLAE (Modelo: Hitachi L-5000) equipado com um Hitachi L-3000 detector de fotodíodos. A separação do ácido cítrico foi efetuada em coluna Aminex HPX-87C (Bio-Rad Laboratories, Inc.) com 10,8 % de acetonitrila em 0,0035 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fase móvel. O tempo de retenção de cada sinal foi gravado em um comprimento de onda de 210 nm.

#### *4.2.4.5 Extração de flavonóides do bagaço de cidra*

Após a extração dos açúcares solúveis do bagaço de cidra, o precipitado, obtido no item 4.2.4.3, foi ressuspenso em 500 µL de metanol. A solução contendo flavonóides foi novamente submetida à centrifugação por 10 min, o sobrenadante foi filtrado em filtro de éster de celulose (Millipore) com poro 0,45 µm e o filtrado obtido foi armazenado em freezer a – 20 °C para posterior análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

#### *4.2.4.5.1 Determinação de flavonóides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)*

Antes da injeção, alíquotas de 400 µL do filtrado descrito no item 4.2.4.5 foram adicionadas de 600 µL de metanol, desta mistura 20 µL foram injetados em HPLC (Hitachi L-5000) equipado com uma coluna de fase reversa Symmetry C<sub>18</sub> (4,6 × 150 mm, 3,5 µm) e detector 2487 UV (Waters Corp., Milford, MA). As análises foram realizadas a 35 °C e fluxo de 0,4 mL/min, em fase móvel contendo 11,4 %

metanol, 22,4 % acetonitrila e 62 % de água e comprimento de onda de 280 nm. Alíquotas (2 mL) das condições controle (Tabela 3) do delineamento de mistura para seleção do indutor foram analisadas sob as mesmas condições descritas a fim de quantificar a concentração de flavonóides residuais.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados em forma de artigo, intitulado “**Naringinase production by *Aspergillus niger* 426 using agro-industrial residues**”, que está apresentado no Apêndice A.

O artigo foi elaborado segundo normas da Revista Food Chemistry, as quais estão apresentadas no Anexo A.

## 6 CONCLUSÃO

Dentre bagaço de laranja e bagaço de cidra, este último aumentou a produção de naringinase, quando não se fez uso de indutor adicionado à solução nutriente.

O melhor tempo para produção de naringinase de *Aspergillus niger* 426 por FES foi 120 horas de cultivo.

Dentre os suportes analisados, a mistura ternária do bagaço de cidra, farelo de arroz e farelo de trigo, nas proporções em (g): 2,3; 2,5 e 5,2, respectivamente, foi a melhor condição para produção de naringinase (23,2 U/mL, em relação a 5 mL de extrato bruto).

Os cultivos com elevadas concentrações de sacarose e glicose, provenientes dos suportes, inibiram a produção da enzima. Resultado também observado para elevada concentração de ácido cítrico no bagaço de cidra

Dentre os indutores analisados, a mistura ternária de naringina, rutina e hesperidina nas concentrações (g/L): 2,5; 4,5 e 3,0, respectivamente, apresentou a melhor condição para produção de naringinase (28,16 U/mL, em relação a 5 mL de extrato bruto).

A metodologia empregada no desenvolvimento desse estudo resultou em aumento de 96 % na produção da naringinase por *Aspergillus niger* 426, em relação ao cultivo de bagaço de laranja sem adição de indutor à solução nutriente.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G.; CABANES, F. J. New Ochratoxigenic Species in the Genus *Aspergillus*. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 2, p. 1580-582, 1997.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Editora da Unicamp, 297p, 1996.
- BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F. R.; ORTUÑO, A.; DEL RIO, J. A. Uses and Properties of Citrus Flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.4505-515, 1997.
- BOKKENHEUSER, V.D.; SHACKLETON, C.H.L.; WINTER, J. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal bacteroides from humans. **Biochemistry Journal**, v. 248, p. 953-956, 1987.
- CEPEA: Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (2016). Disponível em <<http://cepea.esalq.usp.br/citros/>> Acesso em: 08 jun. 2016.
- CHEN, D.; NIU, T.; CAI, I. Optimizing Culture Medium for Debittering Constitutive Enzyme Naringinase Production by *Aspergillus oryzae* JMU316. **African Journal of Biotechnology**, v 9, n.31, p. 4970-978, 2010.
- CHIEN, P. J.; SHEU, F.; SHYU, Y. Monitoring the enzymatic debittering in grapefruit juice by high performance liquid chromatography. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 9, p. 115–120, 2001.
- CITRUS BR, 2014. Disponível em < <http://www.citrusbr.com/exportadores-citricos/setor/producao-192415-1.asp> > Acesso em: 28 set. 2015.
- CORNELL, J. A. **Experiments with Mixtures: Designs, Models and the Analysis of Mixture Data**. New York: John Wiley and Sons, 3rd edition, 2002.
- COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of Solid State Fermentation to Food Industry - A Review. **Journal of Food Engineering**, in press, 2006.
- CUI, Z.; MARUYAMA, Y.; MIKAMI, B.; HASHIMOTO, W.; MURATA, K. Crystal structure of glycoside hydrolase family 78  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Bacillus* sp. GL1. *J Mol Biol*, v. 374, p.384–398, 2007.
- DALE, N. Ingredient analysis table: Feedstuffs, v.71, n.31, p.24-31, 1999.
- DAVIS, W. B. Determination of Flavanones in Citrus Fruits. **Analytical Biochemistry**, v.19, p.476-478, 1947.
- ELINBAUM, S., FERREYRA, H., ELLENRIEDER, G., CUEVAS, C. (2002). Production of *Aspergillus Terreus* Rhanminosidade by Solid-State Fermentation. **Applied Microbiology**, 34, 67-71.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Tabela de composição química e valores energéticos de alimentos para suínos e aves. 3.ed. **Concórdia: CNPSA**, 1991, 97p. [Documento 19].

FUKOMOTO, J.; OKADA, S. Naringinase production by fermentation. Japanese Patent 7,306,554, 1973.

GARG, A.; GARG, S.; ZANEVELD, L. J.; SINGLA, A. K. Chemistry and pharmacology of the citrus bio flavonoid hesperidin. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 655–669, 2001.

GONZALEZ-BARRIO, R.; TRINDADE, L. M.; MANZANARES, P.; GRAAFF, L. H.; TOMAS-BARBERAN, A. F.; ESPIÁN, J. C. Production of Bioavailable Flavonoid Glucosides in Fruit Juices and Green Tea by Use of Fungal  $\alpha$ -L-Rhamnosidases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.6136-142, 2004.

HALL, D. H. A new enzyme of the glycosidase type. **Chemistry and Industry**, v. 57, p. 473, 1938.

HOECHST. Alpha-rhamnosidase production by *Penicillium* sp., and purification and characterization. German Patent EP 599, 159, 1994.

HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 51, p. 305–310, 1997.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2016. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/>> Acesso em: 14 jun. 2016.

ITO,T.; TAKIGUCHI, Y. Naringinase production by *Cochiobolus miyabeanus*. Japanese Patent, 7, 014, 875, 1970.

JANSSEN, W.M.M.A. European table of energy values for poultry feedstuffs. 3.ed. Beekbergen. **Spelderholt Center for Poultry Research and Information Services**, 1989.

JOHNSON R.L., CHANDLER B.V. Adsorptive removal of bitter principles and titrable acid from citrus juice. **Food Technology**, v.45, p.130–7, 1988.

KIMBALL, D.A. Debittering of citrus juices using supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Science**, v. 52, p. 481–2, 1987.

LEE, Y. S.; HUH, J. Y.; NAM, S. H.; MOON, S. K.; LEE, S. B. Enzymatic bioconversion of citrus hesperidin by *Aspergillus sojae* naringinase: Enhanced solubility of hesperetin-7-O-glucoside with in vitro inhibition of human intestinal maltase, HMG-CoA reductase, and growth of *Helicobacter pylori*. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2253–2259, 2012.

LONSANE, B. K.; GHIDYAL, N.P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme Microbiology and Technology**. v.7, p. 258-265, 1985.

MANZANARES, P.; OREJAS, M.; IBANEZ, E.; VALLÉS, S.; RAMÓN, D. Purification and Characterization of an  $\alpha$ -L-Rhamnosidase from *Aspergillus nidulans*. **Letters in Applied Microbiology**, v.31, p. 198-202, 2000.

MARQUES, J.; VILA-REAL, H. J.; ALFAIA, A. J.; RIBEIRO, M. H. L. Modelling of the High Pressure–Temperature Effects on Naringin Hydrolysis Based on Response Surface Methodology. **Food Chemistry**, v.105, p. 504–510, 2007.

MARTEARENA, M. R.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G. Synthesis of Rutinosides and Rutinose by Reverse Hydrolysis Catalyzed by Fungal  $\alpha$ -L-Rhamnosidases. **Biocatalysis and Biotransformation**, v.26, p.177–85, 2008.

MENDOZA-CAL, A.; CUEVAS-GLORY, L.; LIZAMA-UC, G.; ORTIZ-VÁZQUEZ, E. Optimizing culture medium for debittering constitutive enzyme naringinase production by *Aspergillus oryzae* JMU316. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 4970-4978, 2010.

MONGKOLKUL, P.; RODART, P.; PIPATTHITILORN, T.; MEKSUT, L.; SANGUANDEEKUL, R. Debittering of Tangerine *Citrus reticulata* Blanco Juice by  $\beta$ -Cyclodextrin Polymer. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.56, p.167-170, 2006.

MONTI, D.; PISVEJCOVÁ, A.; KREN, V.; LAMA, M.; RIVA, S. Generation of an  $\alpha$ -L-Rhamnosidase Library and its Application for the Selective Derhamnosylation of Natural Products. **Biotechnology and Bioengineering**, v.87, p.7763-7771, 2004.

NI H., CHEN F., CAI H., XIAO A., YOU Q., LU Y.. Characterization and Preparation of *Aspergillus niger* Naringinase for Debittering Citrus Juice. **Journal of Food Science**. v. 71, n. 1, 2012.

NI H., LI L., XIAO A., CAO Y., CHEN Y. e CAI H., Identification and characterization of a new naringinase producing strain, *Williopsis californica* Jmudeb007, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27. n12, p. 2857-2862, 2011.

NOROUZIAN, D., HOSSEINZADEH, A., INANLOU, D. N., & MOAZAMI, N. (2000). Production and partial purification of naringinase by *Penicillium decumbens* PTCC 5248. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 16(5), 471–473.

OAKENFULL, D. G.; TOPPING, D. L. The nutritional value of wheat bran. **Food Technology**, v.39, p.288-292, 1987.

OKADA, S.; KISHI, K.; HIGASHIHARA, M.; FUKUMOTO, J. Studies on the purification properties of naringinase from *Aspergillus niger*. **J. Agricultural Chemical Soc. Jap.**, v. 37, p. 142, 1963.

OREJAS, M.; IBANEZ, E.; RAMON, D. The Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans* Produces a Rhamnosidase of Potential Eonological Interest. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, p. 383-388. 1999.

PANDEY, A. Recent Process Developments in Solid-State Fermentation. **Process Biochemistry**, v. 27, p. 109-117, 1992.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.3636, p.1-4, 2002.

PANDEY, A. Solid-State Fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p.81-84, 2003.

PETRI, A. C., BUZATO, J.B., CELLIGOI M.A., BORSATO D. Optimization of the production of  $\alpha$ -L-rhamnosidase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation using agro-industrial residues. **British Microbiology Research Journal**, v.4, p.1198-1210, 2014.

PINO, J. A. Flavonoids in Citrus Fruit. **Alimentaria Havana**, v.10, p.63-79, 1997.

PINTO, G. A. S. **Produção de Tanase por *Aspergillus niger***. Tese (Doutorado-Programa de Pós-graduação de Tecnologia de Processos). 2003. 150f. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2003.

PURI, M.; BANERJEE, U.C. Production, Purification, and Characterization of the Debittering Enzyme Naringinase. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 207-217, 2000.

PURI M., BANERJEE A., BANERJEE U.C. Optimization of process parameters for the production of naringinase by *Aspergillus niger* MTCC 1344. **Process Biochemistry**, v.40, p. 195-201, 2005.

PURI M., KALRA S. Purification and characterization of naringinase from a newly isolated strain of *Aspergillus niger* 1344 for transformation of flavoids. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, p. 753–8, 2005.

PURI, M.; KAUR, A.; SINGH, R.S.; SINGH, A. Response surface optimization of medium components for naringinase production from *Staphylococcus xylosus* MAK2. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 181–191, 2010.

PURI, M.; MARWAHA, S. S.; KOTHARI, R. M.; KENNEDY, J. F. Biochemical Basis of Bitterness in Citrus Fruit Juices and Biotech Approaches for Debittering. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p.145-155, 1996.

RIBEIRO, M. H. Naringinases: occurrence, characteristics, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 90:1883–1895, 2011.

RIBEIRO, M. H. L.; SILVEIRA, D.; FERREIRA-DIAS, S. Selective Adsorption of Limonin and Naringin from Orange Juice to Natural and Synthetic Adsorbents. **European Food Research and Technology**, v.215, p.462–471, 2002.

ROSA, C. A. R.2002. **Microbiota toxígena e ocratoxinas em rações destinadas à alimentação de aves, bovinos, suínos e importância em saúde animal**. 2002. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – UFRRJ, Seropedica, 2002

SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. 2007. 148 f. Tese

(Doutorado em Engenharia Química) – Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2007.

SARAVITZ, D.M.; PHARR, D.M. & Carter, T.E. Galactinol synthase activity and soluble sugars in developing seeds of four soybean genotypes. **Plant Physiology**, 83,185-189, 1987.

SCHUSTER, E. N.; DUNN-COLEMAN, J. C.; FRISVAD, P. W.; VAN DIJCK M.. On the Safety of *Aspergillus niger* – A Review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.59, p.426–435, 2002.

SEKEROGLU, S.; FADILOGLU, S.; GOGUS, F. Immobilization and Characterization of Naringinase for the Hydrolysis of Naringin. **European Food Research and Technology**, v.224, n1, p.1438–1445, 2006.

SHANMUGAPRAKASH, M.; KIRTHIKA, J.; RAGUPATHY, J.; NILANEE, K.; MANICKAM, A. Statistical based media optimization and production of naringinase using *Aspergillus brasiliensis* 1344. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.64, p. 443– 452, 2014.

SHANMUGAPRAKASH, M.; VINOTH-KUMAR,V.; HEMALATHA, M.; POTHYAPPAN-KARTHIK, V.M. Solid-state fermentation for the production of debittering enzyme naringinase using *Aspergillus niger* MTCC 1344. **Engineering in Life Sciences**, v.11, n.3, p.322-325, 2011.

SHAW P.E., WILSON C.W. 1983. Debittering citrus juices with  $\beta$ -cyclodextrin polymer. **Journal of Food Science**, v.48, p.646–7, 1983.

SHEHATA, A.N., & ABD EL ATY, A.A. Optimization of Process Parameters by Statistical Experimental Designs for the Production of Naringinase Enzyme by Marine Fungi. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

SILVA, M. A. da.; SANCHES, C.; AMANTE, E. R. Prevention of hydrolytic rancidity in rice bran. **Journal of Food Engineering**, v. 75, n. 4, p. 487-491, 2006.

SINGH, S. V.; JAIN, R. K.; GUPTA, A. K.; DHATT, A. S. Debittering of Citrus Juices - A Review. **Journal of Food Science**, v.40, n.3, p.247 253, 2003.

SMYTHE, C. W.; THOMAS, D. W. Conversion of flavonoid glycosides. US Patent, 2, 950, 972, 1960.

SORIA, F. F.; ELLENRIEDER, G.; GRASSELLI, M.; NAVARRO DEL CANIZO, A. A.; CASCONI, O. Fractionation of the naringinase complex from *Aspergillus terreus* by dye affinity chromatography. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 1265-1268, 2004.

SOUZA, J. **Estudo da Durabilidade de Argamassas Utilizando Cinzas e Casca de Arroz**. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos), 2008. 142f. Universidade Federal de Campina Grande-UFCG, Campina Grande-PB, 2008.

SPAGNA, G.; BARBAGALLO, R. N.; MARTINO, A.; PIFFERI, P. J. A Simple Method for Purifying Glycosidases:  $\alpha$ -L-Rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* to

Increase the Aroma of Moscato Wine. **Enzyme and Microbial Technology**, v.27, p.522–530, 2000.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), 2005. 132f. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

TERADA, Y.;KOMETANI, T.; NISHIMURA, T.; TAKII, H.; OKADA, S. Prevention of Hesperidin Crystal Formation in Canned Mandarin Orange Syrup and Clarified Orange Juice by Hesperidin Glycosides. **Food Science and Technology**, v.1,n°1, p.29–33, 1995.

THOMAS, D. W.; SMYTHE, C. V.; LABBEE, M. D. Enzymatic hydrolysis of naringin, the bitter principle of grapefruit. **Food Research**, v. 23, p. 591-598, 1958.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; CLIFFORD, M. N. Flavanones, Chalcones and Dihydrochalcones - Nature, Occurrence and Dietary Burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**,v. 80, n. 7, p. 1073–1080, 2000.

VARGA, J.; KEVEL, E.; RINYU, E.; TÉREN, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62. n. 12, p. 4461-4464, 1996.

VINOTHKUMAR, V. Comparative studies on inducers in the production of naringinase from *Aspergillus niger* MTCC 1344. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n.45, p. 7683-7686, 2010.

VINOTHKUMAR, V.; REVATHIBABU, P. K. S. Optimization of Fermentation Parameters for Enhanced Production of Naringinase by Soil Isolate *Aspergillus niger* VB07. **Food Science Biotechnology**, v.19, n.3, p. 827-829, 2010.

WAINWRIGHT, M. **Introducción a la Biotecnología de los Hongos**. Zaragoza: Acribia, 228p, 1995.

YADAV, S., YADAV, K.D.S. Secretion of  $\alpha$ -L-Rhamnosidase by *Aspergillus terreus* And Its Role In Debittering Of Orange Juice. **Journal of Science & Industrial Research**, v. 59, p.1032-1037, 2000.

YADAV V., YADAV P.K., YADAV S., YADAV K.D.S.  $\alpha$ -L-Rhamnosidase: A Review. **Process Biochemistry**, v. 45, p.1226–1235, 2010.

YANAI, T., SATO, M. Purification and Characterization of an  $\alpha$ -L-Rhamnosidase from *Pichia angusta* X349. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.64, p.2179–2185, 2000.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A

**Artigo “Naringinase production by *Aspergillus niger* 426 using agro-industrial residues”**

1 Title:

2 Naringinase production by *Aspergillus niger* 426 using agro-industrial residues

3

4 Authors:

5 Fernanda de Oliveira<sup>a,\*</sup>, Tereza Cristina Luque Castellane<sup>b</sup>, Marcelo Rodrigues de Melo<sup>a</sup>, João  
6 Batista Buzato<sup>a</sup>.

7

8 Affiliations:

9 <sup>a</sup>*Department of Biochemistry and Biotechnology, State University of Londrina, 86051-980, Londrina,*  
10 *Paraná, Brazil.*

11 E-mail addresses: fer.oliveiractb@gmail.com (F. Oliveira), melomr@uel.br (M.R. Melo),  
12 buzato@uel.br (J.B. Buzato).

13

14 <sup>b</sup>*Department of Technology, UNESP – Paulista State University, Faculty of Agricultural and Veterinary*  
15 *Sciences, Rod. Prof. Paulo Donato Castellane km 5, 14884-900 Jaboticabal, São Paulo, Brazil.*

16 E-mail address: teluque@yahoo.com.br (T.C.L. Castellane).

17

18 \*Corresponding author at: Department of Biochemistry and Biotechnology, State University of  
19 Londrina, 86051-980, Londrina, Paraná, Brazil Km 380 Celso Garcia Cid Road, Campus  
20 Universitário, CCE, post box 6001, CEP: 86051-990 Londrina, Paraná, Brazil. Tel.: +55 43 3371-4711  
21 – Fax: + 55 43 3371-4879

22 E-mail address: fer.oliveiractb@gmail.com

23

24

25

26

27

28

29

30

31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## ABSTRACT

Naringinase hydrolyzes the glycoside naringin, the bitter taste of grapefruit, and has as main target the citrus juices industry. This work was carried out in two stages using an Experimental Mixture Design to enhance naringinase production by *Aspergillus niger* grown in solid-state fermentation. First, the influence of agro-industrial residues was assessed as fermentation substrates. The best mixture result of substrates was used in the second step to select the best of three inducers, or their mixtures. The best condition was under cultivation with 2.3 g of grapefruit rind, 2.5 g of rice bran and 5.2 g of wheat bran and medium supplementation with a mixture of naringin, rutin and hesperidin in a concentration of (g/L): 2.5, 4.5 and 3.0, respectively, leading to a maximum activity of 28 U/mL. This sequential procedure made it possible to define an optimal mixture of components resulting in an increase of 96 % in naringinase production.

Keywords: Solid-state fermentation, *Aspergillus niger*, optimization, Experimental Mixture Design

Chemical compounds studied in the article:

Naringin (PubChem CID: 442428)

Rutin (PubChem CID: 5280805)

Hesperidin (PubChem CID: 10621)

## 61 1. Introduction

62

63 Naringinase (EC 3.2.1.40) is a hydrolytic enzyme containing both  $\alpha$ -L-rhamnosidase and  $\beta$ -  
64 glucosidase activities, which hydrolyzes naringin to release L-rhamnose and naringenin (Puri,  
65 Banerjee, & Banerjee, 2005). The enzyme  $\alpha$ -L-rhamnosidase [E. C. 3.2.1.40] cleaves terminal  $\alpha$ -L-  
66 rhamnose specifically from a large number of natural products that include hesperidin, naringin, rutin,  
67 quercitrin, terpenyl glycosides and many other natural glycosides containing terminal  $\alpha$ -L-rhamnose  
68 (Monti, Pisvejcová, Kren, Lama, & Riva, 2004; Yadav, Yadav, Yadav, & Yadav, 2010).

69 Naringin is the major flavanone in grapefruit and it is responsible of its bitter taste. The  
70 presence of bitterness, generally, has been the major limitation for the commercial acceptance of  
71 juices (Yusof, Ghazali, & King, 1990). Enzymatic hydrolysis is a possibility to overcome the bitterness  
72 and obtain compounds with improved biological activities. Apart from its role in debittering citrus  
73 juices, naringinase also finds applications in the production of glycopeptide antibiotics, deglycosylation  
74 of flavonoids, gellan depolymerisation and many more (Puri, Banerjee, & Banerjee, 2005; Kamiya,  
75 Esaki, & Tanaka, 1985).

76 Naringinase can be obtained by fermentation of various microorganisms, especially  
77 filamentous fungi (Scaroni, Cuevas, Carrillo, & Ellenrieder, 2002). According to Puri and Banerjee  
78 (2000) naringinase production by filamentous fungi depends, besides nutritional factors and culture  
79 conditions, on the presence of inducers, which are usually natural substrates or substrates analogs for  
80 the enzyme (Vinothkumar, 2010). Due to its versatility, *Aspergillus niger* is one of the main  
81 microorganisms used in naringinase production studies, being able to produce this enzyme even  
82 when cultivated on substrates such as agro-industrial residues. (Buzato, Celligoi, Ferreira, & Borsato,  
83 2014).

84 Due to its broad application, it is necessary to increase naringinase production. This can be  
85 achieved by optimizing culture conditions, especially by adding enzyme inducers. The aim of this work  
86 was to define the concentration of three agro-industrial residues, among them grapefruit rind as  
87 specific inducer, and three known inducers of naringinase (naringin, rutin and hesperidin) by  
88 Experimental Mixture Design (EMD) using solid-state fermentation. The methodology is attractive  
89 because it can be tailored to study the proportion of the components in a given culture medium, and  
90 can aid with the identification of relationships amongst these components during naringinase

91 production. These results can provide a reference for inducer selection for similar studies in the future.  
92 To our knowledge, this is the first time that a mixture of inducers combined with the analysis of  
93 responses by Response Surface Methodology and optimization through a desirability function is used  
94 for producing naringinase.

95

## 96 **2. Materials and methods**

97

### 98 *2.1 Materials*

99

100 Orange rind, grapefruit rind, rice bran and wheat bran were used as solid substrates. The  
101 residues were provided by a local agroindustry, then dried to 2% humidity in an oven at 70 °C for 24 h  
102 and ground in a mill Wiley type in the particle size of approximately 2 mm.

103 Naringin, rutin, hesperidin, quercetin, citric acid, glucose, sucrose, xylose and raffinose were  
104 purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). HPLC-grade methanol and acetonitrile were products  
105 from Tedia Co. Inc. (Fairfield, OH). All other reagents were of analytical grade.

106

### 107 *2.2 Microorganism*

108

109 *Aspergillus niger* strain 426 was isolated from dried prunes and identified by the Institute of  
110 Food Technology (UNICAMP, Brazil). Stock cultures were stored at 4 °C on potato dextrose agar  
111 (PDA) slants. Microorganism activation was carried out in PDA plates at 28 °C for 3 days. The  
112 inoculum was prepared by harvesting the spores from 3-day-old cultures by adding 0.1% (w/v) Tween-  
113 80, and diluted to the desired spore concentration ( $1 \times 10^9$  spores/g substrate). The pour plate  
114 technique was followed to calculate the number of spores in the inoculum.

115

### 116 *2.3 Fermentation conditions*

117

118 All cultivations were carried out in 250-mL Erlenmeyer flasks at a fixed total of 10 g of dry  
119 substrate. The substrate was moistened with a nutrient solution containing in (g/L) the following  
120 ingredients:  $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$  (5.0),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1.5),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.5), KCl (0.5), yeast extract (5.0) and

121 inducer (10.0). The pH was adjusted to 4.5 prior to sterilization. A volume equal to 10% (v/v) of the  
 122 inoculum was transferred to previously sterilized Erlenmeyer flasks containing 10 mL of nutrient  
 123 solution with various amounts of the components under investigation (orange rind, grapefruit rind, rice  
 124 bran and wheat bran) and incubated for 5 days at 28 °C with 97% controlled atmospheric humidity.  
 125 The moisture content was adjusted to 75% (w/v) by the addition of distilled water into the 250-mL  
 126 Erlenmeyer. With the fermentation flasks placed in an iced bath, the cell-free enzymatic extracts were  
 127 recovered by adding 5 mL sodium acetate buffer 50 mM, pH 4 and further mixing using a glass rod.  
 128 Subsequently, the suspension was filtered and centrifuged 9000 g for 15 min at 4 °C and the clear,  
 129 brown supernatant was used for subsequent analysis.

130

#### 131 *2.4 Substrate and inducer selection for naringinase production*

132

133 In a first step, cultures were carried out in a 250-mL Erlenmeyer flask with 10 g of orange or  
 134 grapefruit rind moistened with the nutrient solution, but without addition of inducers, in order to  
 135 evaluate, between these two inducer substrates, which one is the best for naringinase production.

136 It were set up two EMD as a simplex centroid design (Table 1), with  $2^{q-1}$  combinations of  
 137 mixtures, where  $q$ , the number of components or variables whose sum is 1 or 100 %, to 3  
 138 components. First, grapefruit rind, rice bran and wheat bran were used for substrate selection for  
 139 naringinase production. Because the mixture space is a simplex, all design points must be at the  
 140 vertices, on the edges or faces, or in the interior of a simplex (Cornell, 2002). Thus, in runs with a  
 141 single substrate, called linear blending (100 %), 10 g of grapefruit rind, 10 g of rice bran and 10 g of  
 142 wheat bran was used. A special cubic model was used to represent the mean of the response variable  
 143 as a function of the factors described in Equation 1,

$$144 \quad y = \sum_{1 \leq i \leq q} \gamma_i^{\circ} x_i + \sum_{1 \leq i < j \leq q} \gamma_{ij}^{\circ} x_i x_j + \gamma_{123}^{\circ} x_1 x_2 x_3 \quad (1)$$

145 Where,  $Y$  is the naringinase activity (U/mL),  $\gamma$  the estimated parameters and  $x_i$  is the level of  
 146 the independent variable. The statistical significance of the regression coefficients was determined by  
 147 the Fischer's test for analysis of variance (ANOVA) at a significance level  $p \leq 0.05$ , and the extent of  
 148 variance explained by each model was given by the determination coefficient  $R^2$ . To minimize the error  
 149 of ANOVA, the tests corresponding to the central point were repeated three times. The experimental

150 and predicted values were compared in order to determine the validity of the models. The best mixture  
151 of substrates was used for study the ideal concentration of inducers naringin, rutin and hesperidin from  
152 5 to 25 g/L added in the nutrient solution.

153 In a second step, EMD was also set up as a simplex centroid design (Table 2) and the  
154 components studied were naringin, rutin and hesperidin at a fixed total concentration of 10 g/L. Control  
155 of each condition was conducted without the addition of spores to the nutrient solution for the  
156 subsequent quantification of residual inducers. The remaining culture solution components were  
157 always the same, and the culture conditions were as described above. All the EMD design and  
158 analysis were performed using STATISTICA 8.0 software (StatSoft Inc., 2007).

159

#### 160 *2.5 Determination of enzymes activity*

161

162 The modified method of Thammawat, Pongtanya, Juntharasri, and Wongvithoonyaporn (2008)  
163 was followed to assess the naringinase activity. 1 mL of enzyme extract was added to 1 mL of 1%  
164 (w/v) naringin in acetate buffer 0.1 M (pH 4.0). After incubation at 50 °C for 60 min, 0.1 mL was  
165 withdrawn. To this solution, 3.0 mL of diethylene glycol (90%, v/v) and 0.1 mL of (4.0 N) NaOH were  
166 added, and incubated for 10 min at room temperature. The intensity of the yellow colour produced was  
167 measured at 420 nm. One unit of naringinase activity is defined as the amount of enzyme that is  
168 required to hydrolyse 1  $\mu$ mol of naringin per ml per minute, under the assay conditions.

169

#### 170 *2.6 Quantification of sugars*

171

172 The extraction of soluble sugars from defatted substrates was performed according to the  
173 methodology proposed by Saravitz, Pharr, and Carter (1987) and filtrated through 0.45  $\mu$ m filter  
174 (Millipore). For the analysis of sugars, aliquots of 20  $\mu$ L extracted samples were injected to HPLC  
175 (Model: Hitachi L-5000) and eluted in a mobile phase of acetonitrile: water (75:25, v:v) in the following  
176 chromatographic conditions: 35 °C injection temperature, flow rate of 1.0 mL/min in a HPLC system  
177 equipped with a RID detector (Shimadzu model RID - 10A). Each analysis was performed in triplicate.  
178 The total sugar level in each culture was determined using the phenol-sulfuric method described by  
179 Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, and Smith (1956).

## 180 2.7 Quantification of citric acid from grapefruit rind

181

182 After extraction of soluble sugars from grapefruit rind, the material was resuspended in 500  $\mu$ L  
183 of methanol. Citric acid was analyzed by reversed-phase chromatography (RP-HPLC) system  
184 equipped with a model SPD-M10A VP photodiode-array (PDA) detector (Shimadzu Scientific  
185 Instruments, Kyoto, Japan). The culture supernatant was filtered through 0.22  $\mu$ m nylon filter. Citric  
186 acid was separated using RP-18 column. The mobile phase consisted of 0.1% phosphoric acid with a  
187 flow rate of 1 mL/min. The detection was at 210 nm. It was identified and quantitated by comparing the  
188 retention time and peak area with solutions of pure citric acid.

189

## 190 2.8 Quantification of flavonoids

191

192 An aliquot (2 mL) of fermentation extracts were filtered through 0.45  $\mu$ m Teflon membranes.  
193 Prior to the injection into the chromatographer column, 400  $\mu$ L of the samples were added to 600  $\mu$ L of  
194 methanol. A HPLC (Model: Hitachi L-5000) coupled with a Symmetry C<sub>18</sub> reverse phase column  
195 (bonded C<sub>18</sub> ligands on a high-purity base-deactivated silica) (4.6  $\times$  150 mm, 3.5  $\mu$ m) and a 2487 UV  
196 detector (Waters Corp., Milford, MA) was used to determine the concentrations of residual flavonoids.  
197 Following an injection of 20  $\mu$ L of reaction mixture, the column was eluted using a gradient elution at  
198 35 °C and 0.4 mL/min. The mobile phase was composed of 11.4% methanol, 22.4% acetonitrile and  
199 62% purified deionized water. The target compounds were captured in the 2487 UV detector at 280  
200 nm. The same methodology was used to quantify flavonoids impregnated in defatted grapefruit rind  
201 resuspended in 500  $\mu$ L of methanol.

202

## 203 3. Results and discussion

204

205 In previous shake-flask experiments with *Aspergillus niger* 426, which were conducted on 10 g  
206 of orange or grapefruit rind added to a nutrient solution but without any addition of inducer,  
207 naringinase was produced with both orange ( $1.2 \pm 0.26$  U/mL) and grapefruit rind, but maximal  
208 enzyme production was observed on grapefruit rind as substrate ( $1.92 \pm 0.23$  U/mL). These results  
209 were supported by Mendoza-Cal, Cuevas, Lizama-UC, and Ortiz-Vasquez (2010) who also yielded

210 higher amounts of the enzyme with grapefruit rind than with orange rind. Puri, Kaur, Barrow, and  
211 Singh (2011) reported that citrus peel powder contains high proportions of polyphenols, which act as  
212 inducers in naringinase production. The increased production of naringinase with *A. niger* on  
213 grapefruit rind is probably due to its very high naringin content and very low content of naringinase  
214 inhibitor compounds, such as monosaccharides, when compared with orange rind (Puri, Banerjee, &  
215 Banerjee 2005; Bram & Solomons, 1965). When the levels of monosaccharides decrease, naringinase  
216 synthesis is induced by naringin, leading to an increased naringinase production. This induction  
217 mechanism may help *A. niger* to degrade naringin in order to access further other nutrient supplies in  
218 the media, especially carbon (Shanmugaprakash, Vinoth-Kumar, Hemalatha, & Pothiyappan-Karthik,  
219 2011). Grapefruit rind was selected as the substrate for more in depth studies of a mixture of  
220 substrates. This is advantageous from a industrial point of view because naringinase can be produced  
221 cheaply by using agricultural waste.

222

### 223 3.1 Effect of substrate on naringinase production

224

225 Naringinase production was monitored for up to 168 h of incubation for the central point of  
226 EMD to determine the best time for enzyme production in solid-state fermentation by *A. niger* at 28 °C,  
227 pH 4.5 and naringin (10 g/L) as inducer. The central point was composed of a 33.33% ternary mixture  
228 of each supporting substrate (grapefruit rind, rice bran and wheat bran). As Fig. 1 shows, a sharp  
229 increase in naringinase activity was observed between 24 and 120 h of cultivation, coinciding with the  
230 log phase of growth. After 120 h, 97% of the carbon source contained in 5 mL of fermentation extract  
231 had been consumed and enzyme formation decreased indicating that the maximal enzymatic activity  
232 was reached after 120 h and was measured to be  $22.4 \pm 0.73$  U/mL. Therefore all the following  
233 cultivation were carried out for only 5 days.

234

235 Fig. 1.

236

237 Table 1 summarizes the different combinations of grapefruit rind, rice bran and wheat bran  
238 used for *A. niger* cultivations, and the maximum activities, in terms of naringinase. Maximum

239 naringinase values obtained in the experiments ranged from 1.6 (run 1) to 22.6 U/mL (run 7), (Table  
240 1).

241

242 Table 1.

243

244 On the basis of the results from the complete regression, the special cubic model were  
245 determined to estimate the naringinase titer in terms of the concentrations of the components  
246 grapefruit rind ( $x_1$ ), rice bran ( $x_2$ ) and wheat bran ( $x_3$ ) in the cultivation medium, as described by Eq.  
247 (2), in which terms with an asterisk are significant ( $p < 0.05$ ).

248

$$249 \quad Y = 1.6 * x_1 + 17.4 * x_2 + 18.3 * x_3 - 3.2 x_1 x_2 + 42,6 * x_1 * x_3 + 9 * x_2 * x_3 + 121.2 * x_1 * x_2 * x_3 \quad (2)$$

250

251 A preliminary analysis of this data revealed the significance of the agro-industrial residues as  
252 substrates for naringinase production. All linear blendings showed a statistically significant positive  
253 influence on naringinase activity titers, since  $p$ -values were smaller than 0.05 for each of the  
254 components. As linear blending, wheat bran was significant in the highest level, wich means that an  
255 increase of this substrate in the culture could improve the results. However, the quadratic term  $x_1 x_2$   
256 (grapefruit rind and rice bran) was not significant, with  $p > 0.05$ . The most significant effect on  
257 naringinase activity was composed of a ternary mixture of each supporting substrate ( $x_1 x_2 x_3$ ), followed  
258 by the quadratic term ( $x_1 x_3$ ). The determination coefficient for naringinase production was 99.96%.  
259 According to Silva, Bovarotti, Rodrigues, Hokka, and Barboza (2009) values of  $R^2 > 90 \%$  are very  
260 good in the experimental design of bioprocesses.

261 Since the least favorable condition was grapefruit rind as a sole substrate (run 1, Table 1) and  
262 due to presence of citric acid in grapefruit juice, it was decided to study the efect of citric acid and  
263 sugars on naringinase activity. Norouzian, Hosseinzadeh, Inanlou, and Moazami, (2000) reported that  
264 citric acid at 20 mM non-competitively inhibited naringinase activity. Repression of naringinase activity  
265 by glucose and sucrose was also reported by Puri, Banerjee, and Banerjee (2005), although these  
266 carbon sources supported excellent growth.

267 A quanitative HPLC analysis of the sugars contained in the substrates found that the grapefruit  
268 rind presented high amounts of glucose and sucrose (625.299 and 4.273 mg/g of dry substrate,

269 respectively), (Table 2). Unlike wheat bran that presented the lowest amount of glucose (12.2 mg/g of  
270 dry substrate). The quantity of sugars present in grapefruit rind might suggest a change in the  
271 metabolism of *A. niger* and a subsequent decrease in naringinase activity, this might also be due to  
272 the acid citric amount  $3055.5 \pm 0.172$  mg/g of dry substrate, which represents 160 mM present in 10 g  
273 of grapefruit rind, and could cause the inhibition of naringinase biosynthesis. Although, grapefruit rind  
274 has a high content of naringin and rutin,  $8.884 \pm 0.464$  and  $5.503 \pm 0.65$  mg/g of dry substrate,  
275 respectively, which act as flavonoid inducers of naringinase, so it can't be discarded as a substrate.

276

277 Table 2.

278

279 The models used to describe the effects of each component on naringinase production (Eq.  
280 (2)) were used to generate the contour plots shown in Fig. 2. These results revealed a broad region of  
281 elevated naringinase production. Using our data, a predictive analysis estimated the maximum  
282 naringinase activity to be 23.94 U/mL in cultures that contained 2.3 g of grapefruit rind, 2.5 g of rice  
283 bran and 5.2 g of wheat bran. An additional cultivation was performed to validate the proposed model  
284 yielded a mean naringinase activity of  $23.2 \pm 0.02$  U/mL. This result corresponded to 97% of the  
285 expected value, validating the effectiveness of the predictive model and confirming the substrate  
286 proportions.

287

288 Figure 2.

289

### 290 *3.2 Comparison of different inducers on naringinase production*

291

292 Naringinase is one of inducible enzymes, where the continuous or stepwise addition of an  
293 inducer increases its production (Mateles, Perlman, Humphery, & Deindorfer, 1965). Reported  
294 inducers for naringinase production are naringin (Bram & Solomons, 1965; Puri, Kaur, Singh, & Singh,  
295 2009), rutin (Kumar, 2010) and hesperidin (Fukumoto, & Okado, 1973).

296 In order to evaluate the effect of flavonoids concentration on naringinase production by *A.*  
297 *niger*, the addition of naringin, rutin and hesperidin with various concentrations were performed based  
298 on the best condition selected from the first EMD cultivation. Naringinase activity was observed in all

299 media (Fig. 3), maximum naringinase was produced with the presence of rutin ( $27.48 \pm 1.23$  U/mL)  
 300 followed by naringin ( $23.45 \pm 0.96$  U/mL), and hesperidin ( $23.22 \pm 1.12$  U/mL) at a concentration of 10  
 301 g/L. Increasing the inducers concentration did not have any significant effect on enzyme production.  
 302 Custodio, Otamendi, Vidal and Alventosa (1996) also reported that rutin (0.5 %, w/v) was found to be  
 303 the most effective inducers of  $\alpha$ -L-rhamnosidase production among quercitrin, naringin, naringenin,  
 304 hesperetin and hesperidin.

305

306 Figure 3.

307

### 308 *3.3 Effect of mixture inducers*

309

310 Table 3 summarizes the different blendings of naringin, rutin and hesperidin and the maximum  
 311 activities. Maximum naringinase activities can be found in the central points of the cultivation,  
 312 composed of a ternary mixture of each inducer.

313

314 Table 3.

315

316 According to the analysis of variance (ANOVA), the regression was statistically significant ( $p <$   
 317  $0.05$ ). The high value of the coefficient of determination ( $R^2 = 0.994$ ) indicates that 99.4 % of the  
 318 variability of the responses can be explained by the model. The value of the adjusted determination  
 319 coefficient (adjusted  $R^2 = 0.977$ ) is also high, showing a high significance of the model.

320 In this way, the mathematical model representing naringinase production by adding inducers  
 321 naringin ( $x_1$ ), rutin ( $x_2$ ) and hesperidin ( $x_3$ ) in the experimental region considered here can be  
 322 expressed as:

323

$$324 \quad Y = 23.56 * x_1 + 26.82 * x_2 + 25.5 * x_3 + 3.04 x_1 x_2 + 0.12 x_1 x_3 - 5.08 x_2 x_3 + 76.59 * x_1 * x_2 * x_3 \quad (3)$$

325

326 Similarly to Eq. (2), Eq. (3) indicated that the most significant effect on naringinase activity was  
 327 composed of a ternary mixture of each inducer, resulting on naringinase activity of 28.16 U/mL (run 7,  
 328 Table 3). Because  $x_2 > x_3 > x_1$  we would conclude that rutin ( $x_2$ ) increases the naringinase production.

329 Although all the linear terms as well as the cubic term had significant effects on the maximum  
330 attainable value of naringinase production, it can be seen that the effect of the quadratic terms was not  
331 significant ( $p > 0.05$ ). Furthermore, because  $x_2x_3$  is negative, blending rutin and hesperidin would have an  
332 antagonistic effect, which means that the proportion of rutin in the blending should be greater than hesperidin.

333 According to Bokkenheuser, Shackleton, and Winter (1987) rutin can be hydrolysed to the  
334 monosaccharide 3-glucosylquercetin, which could be further hydrolysed to the aglycone, quercetin by  
335 the  $\beta$ -D-glucosidase portion of naringinase.

336 A quantitative HPLC analysis of the fermentation broth, revealed the presence of the inducer  
337 rutin in Controls 4-7, which represents cultivations without inoculation, and its aglycone quercetin in  
338 Runs 4-7 of the second EMD (Table 4). This indicates that *A. niger* successfully metabolized rutin.  
339 Additionally, rutin was detected at a concentration of  $2.435 \pm 0.422$  mg/mL in Run 5 even though it  
340 was not added, according to the second EMD. A possible explanation could be that the rutin is coming  
341 from grapefruit rind, which has a rutin concentration of  $5.503 \pm 0.65$  mg/g of dry substrate (Table 2).  
342 This highlights the importance of agroindustrial residue, since this reduces the costs of production by  
343 the addition of the flavonoid rutin. This is advantageous on two levels, first because grapefruit rind is  
344 an inexpensive carbon source compared to other carbon sources and second its use in naringinase  
345 production could solve environmental problems resulting from grapefruit waste.

346 For better industry use of this waste, it could be done a pre-treatment for monosaccharides  
347 inhibitors removal, but costs has to be account so that the process would remain financially  
348 advantageous.

349

350 Table 4.

351

352 The graph of the response surface (Fig. 4) showed that maximum naringinase production  
353 could be achieved with a mixture of naringin, rutin and hesperidin at a concentration of 2.5, 4.5, 3.0  
354 g/L, respectively, and the rutin component would increase enzyme activity. Maximum predicted  
355 value was 27.86 U/mL. The mean value of the experimental validation of the optimized conditions  
356 ( $28.10 \pm 0.45$  U/mL) was in excellent correlation with the predicted value, confirming the validity of the  
357 model. This activity is comparatively higher than those obtained by Petri, Buzato, Celligoi, and Borsato  
358 (2014). After medium optimization, these authors found a final  $\alpha$ -L-rhamnosidase activity of 3.02 U/mL  
359 containing in 5 mL of the enzymatic extract from solid-state fermentation by *A. niger* 426.

360 Figure 5.

361

#### 362 4. Conclusions

363

364 Naringinase production by *A. niger* under solid-state fermentation has been investigated.  
365 According to a mixture statistical design, the ternary mixture of each solid substrate (grapefruit rind,  
366 rice bran and wheat bran) combined with also a ternary mixture of inducers (naringin, rutin and  
367 hesperidin) achieved better values of naringinase activity. This sequential procedure made possible to  
368 define an optimal mixture of components resulting in increase of 96% in naringinase production in  
369 relation when we tested 10 g of orange rind as substrate. The proportion of these components can be  
370 used for further investigation. Although grapefruit rind decreases naringinase production, it can not be  
371 dismissed as a carbon source because the amounts of flavonoids impregnated on this substrate.

372

#### 373 Acknowledgements

374

375 The authors are grateful to CAPES for financial support of this work and scholarships.

376

#### 377 References

378

379 Bokkenheuser, V. D., Shackleton, & C. H. L., & Winter, J. (1987). Hydrolysis of dietary flavonoid  
380 glycosides by strains of intestinal bacteroides from humans. *Biochemistry Journal*, 248, 953-956.

381

382 Bram, B., & Solomons, G. L. (1965). Production of the enzyme naringinase by *Aspergillus niger*.  
383 *Applied Microbiology*, 13, 842-845.

384

385 Buzato, J. B., Celligoi, M. A. P. C., Ferreira, D. C., & Borsato, D. (2014). Production optimization of  
386 *Aspergillus niger* naringinase by response surface methodology. *Biochemistry and Biotechnology*  
387 *Reports*, 3, 26-32.

388

- 389 Cornell, J. A. (2002). *Experiments with Mixtures: Designs, Models and the Analysis of Mixture Data*  
390 (3<sup>rd</sup> ed.). New York: John Wiley and Sons, (Chapter 11).  
391
- 392 Custodio, M. V. G., Otamendi, F. P., Vidal, D. R., & Alventosa, S. V. (1996). Production and  
393 characterization of an *Aspergillus terreus*  $\alpha$ -L-rhamnosidase of oenological interest. *Lebensm Unters*  
394 *Forsch*, 203, 522-527.  
395
- 396 Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for  
397 Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.  
398
- 399 Fukumoto, J., & Okado, S. (1973). Naringinase production by fermentation. Japanese Patent  
400 7306554.  
401
- 402 Kamiya, S., Esaki, S., & Tanaka, R. (1985). Synthesis of some disaccharides containing an L  
403 rhamnopyranosyl or L-mannopyranosyl residue, and the substrate specificity of alpha-L-rhamnosidase  
404 from *Aspergillus niger*. *Agricultural Biological Chemistry*, 49, 55–62.  
405
- 406 Kumar, V. V. (2010). Comparative studies on inducers in the production of naringinase from  
407 *Aspergillus niger* MTCC 1344. *African Journal of Biotechnology*, 9, 7683-7686.  
408
- 409 Mateles, R. I., Perlman, D., Humphery, A. E., & Deindorfer, F. H. (1965). Fermentation review.  
410 *Biotechnology Bioengy*, 7, 54-58.  
411
- 412 Mendoza-Cal, A., Cuevas, L., Lizama-Uc, G., & Ortiz-Vazquez, E. (2010). Naringinase Production  
413 from Filamentous Fungi Usign Grapefruit Rind in Solid State Fermentation. *African Journal of*  
414 *Microbiology Research*, 4, 1964-1969.  
415
- 416 Monti, D., Pisvejcová, A., Kren, V., Lama, M., & Riva, S. (2004). Generation of na alpha-L-  
417 rhamnosidase library and its application for the selective derhamnosylation of natural products.  
418 *Biotechnology and Bioengineering*, 87, 763–771.

- 419 Norouzian, D., Hosseinzadeh, A., Inanlou, D. N., & Moazami, N. (2000). Production and partial  
420 purification of naringinase by *Penicillium decumbens* PTCC 5248. *World Journal of Microbiology and*  
421 *Biotechnology*, 16, 471–473.
- 422
- 423 Petri, A. C., Buzato, J. B., Celligoi M. A., & Borsato D. (2014). Optimization of the production of  $\alpha$ -L-  
424 rhamnosidase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation using agro-industrial residues. *British*  
425 *Microbiology Research Journal*, 4, 1198-1210.
- 426
- 427 Puri, M., & Banerjee, U. (2000). Production, purification, and characterization of the debittering  
428 enzyme naringinase. *Biotechnology Advances*, 18(3): 207- 217.
- 429
- 430 Puri, M., Banerjee, A., & Banerjee U.C. (2005). Optimization of process parameters for the production  
431 of naringinase by *Aspergillus niger* MTCC 1344. *Process Biochemistry*, 40, 195–201.
- 432
- 433 Puri, M., Kaur, A., Singh, R. S., & Singh, A. (2009). Response surface optimization of medium  
434 components for naringinase production from *Staphylococcus xylosus* MAK2. *Applied Biochemistry*  
435 *Biotechnology*, 162, 181-191.
- 436
- 437 Puri, M., Kaur, A., Barrow, C. J., & Singh, R. S. 2011. Citrus peel influences the production of an  
438 extracellular naringinase by *Staphylococcus xylosus* MAK 2. *Applied Microbiology Biotechnology*. 89,  
439 715–722.
- 440
- 441 Saravitz, D. M., Pharr, D. M., & Carter, T. E. (1987). Galactinol synthase activity and soluble sugars in  
442 developing seeds of four soybean genotypes. *Plant Physiology*, 83, 185-189.
- 443
- 444 Scaroni, E., Cuevas, C., Carrillo, L., & Ellenrieder, G. (2002). Hydrolytic properties of crude  $\alpha$ -L-  
445 rhamnosidase produced by several wild strains of mesophilic fungi. *Letters of Applied Microbiology*,  
446 34, 461–465.
- 447

- 448 Shanmugaprasanth, M.; Vinoth-Kumar,V.; Hemalatha, M.; Pothiyappan-Karthik, V.M. (2011). Solid-  
449 state fermentation for the production of debittering enzyme naringinase using *Aspergillus niger* MTCC  
450 1344. *Engineering in Life Sciences*, 11, 322-325.
- 451
- 452 Silva, C. S., Boverotti, E., Rodrigues, M. I., Hokka C. O., & Barboza, M. (2009). Evaluation of the  
453 effects of the parameters involved in the purification of clavulanic acid from fermentation broth by  
454 aqueous two-phase systems. *Bioprocess Biosystem Engineer*, 32, 325-632.
- 455
- 456 Thammawat, K., Pongtanya, P., Juntharasri, V., & Wongvithoonyaporn, P. (2008). Isolation,  
457 preliminary enzyme characterization and optimization of culture parameters for production of  
458 naringinase isolated from *Aspergillus niger* BCC 25166. *Nature Science* 42, 61–72.
- 459
- 460 Vinothkumar, V. (2010). Comparative studies on inducers in the production of naringinase from  
461 *Aspergillus niger* MTCC 1344. *African Journal of Biotechnology*, 9, 7683-7686.
- 462
- 463 Yadav, V., Yadav, P. K., Yadav, S., & Yadav, K. D. S. (2010).  $\alpha$ -L-rhamnosidase: A review. *Process*  
464 *Biochemistry*, 45, 1226–1235.
- 465
- 466 Yusof, S., Ghazali, H.M., & King, G.S. (1990). Naringin content in local citrus fruits. *Food Chemistry*,  
467 37, 113-21.

Figure 1. Kinetics of the central point of EMD 1 for naringinase production by *A. niger* 426 at 28 °C, pH 4.5 and naringin (10 g/L) as inducer. Each data point represents the mean of triplicate determinations  $\pm$  SD.

Figure 2. Contour plots of naringinase responses for EMD 1, using the culture medium components (10 g) grapefruit rind, rice bran and wheat bran. Fermentation experiments were run using SSF for 5 days at 28 °C, with initial pH 4.5.

Figure 3. Effect of different inducers (■ naringin, ■ hesperidin and ■ rutin) on naringinase produced by *A. niger* 426 using SSF for 5 days at 28 °C, with initial pH 4.5. Fermentation experiments were performed based on the best condition selected from EMD 1 cultivation. Each data point represents the mean of triplicate determinations  $\pm$  SD.

Figure 4. Contour plots of naringinase responses for EMD 2, using the naringinase inducers (10 g/L) naringin, rutin and hesperidin. Fermentation experiments were performed based on the best condition selected from EMD 1 cultivation. Each data point represents the mean of triplicate determinations  $\pm$  SD.

Table 1. Summary of naringinase maximum values for the *A. niger* according to EMD, using grapefruit rind, rice bran, and wheat bran. Experiments were run using SSF for 5 days at 28 °C, with initial pH 4.5.

Table 2. Quantitative HPLC analysis for quantification of sugars, citric acid and flavonoids.

Table 3. Summary of naringinase maximum values for the *A. niger* EMD, using the naringinase inducers (g/L) naringin, rutin and hesperidin. Fermentation experiments were performed based on the best condition selected from the first EMD cultivation.

Table 4. Quantitative HPLC analysis for quantification of flavonoids in runs of the second EMD presented in Table 3.

Table 1

Run number	Coded mixture ( $x_1$ ; $x_2$ ; $x_3$ )**	Original mixture* ( $x_1$ ; $x_2$ ; $x_3$ )**	Naringinase activity (U/mL)
1	(1; 0; 0)	(10.0; 0; 0)	1.60
2	(0; 1; 0)	(0; 10.0; 0)	17.40
3	(0; 0; 1)	(0; 0; 10.0)	18.30
4	( $\frac{1}{2}$ ; $\frac{1}{2}$ ; 0)	(5.0; 5.0; 0)	8.70
5	( $\frac{1}{2}$ ; 0; $\frac{1}{2}$ )	(5.0; 0; 5.0)	20.60
6	(0; $\frac{1}{2}$ ; $\frac{1}{2}$ )	(0; 5.0; 5.0)	20.10
7	( $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ )	(3.3; 3.3; 3.3)	22.60
8	( $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ )	(3.3; 3.3; 3.3)	22.00
9	( $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ )	(3.3; 3.3; 3.3)	22.30

\*total amount of 10 g of substrate

\*\* $x_1$  grapefruit rind,  $x_2$  rice bran and  $x_3$  wheat bran

Table 2

Compound (mg/g of dry substrate)	Grapefruit rind	Rice bran	Wheat bran
Glucose	625.299 ± 4.202	64.126 ± 8.741	12.173 ± 0.565
Sucrose	4.273 ± 0.046	0.275 ± 0.033	0.267 ± 0.021
Xylose	ND	45.039 ± 4.504	ND
Raffinose	ND	*	*
Citric acid	3055.5 ± 0.172	ND	ND
Naringin	8.884 ± 0.464	ND	ND
Rutin	5.503 ± 0.65	ND	ND

*All procedures were performed in triplicate. Mean values (±standard deviation)*

*ND = Not detected*

*\*Values below the limit of the method*

Table 3.

Run number	Coded mixture ( $x_1$ ; $x_2$ ; $x_3$ )**	Original mixture* ( $x_1$ ; $x_2$ ; $x_3$ )**	Naringinase activity (U/mL)
1	(1; 0; 0)	(10.0; 0; 0)	23.56
2	(0; 1; 0)	(0; 10.0; 0)	25.5
3	(0; 0; 1)	(0; 0; 10.0)	26.82
4	( $\frac{1}{2}$ ; $\frac{1}{2}$ ; 0)	(5.0; 5.0; 0)	24.56
5	( $\frac{1}{2}$ ; 0; $\frac{1}{2}$ )	(5.0; 0; 5.0)	25.95
6	(0; $\frac{1}{2}$ ; $\frac{1}{2}$ )	(0; 5.0; 5.0)	24.89
7	( $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ )	(3.3; 3.3; 3.3)	28.16
8	( $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ )	(3.3; 3.3; 3.3)	27.67
9	( $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ )	(3.3; 3.3; 3.3)	27.92

\*total concentration of 10 g/L of inducers

\*\* $x_1$  naringin,  $x_2$  rutin and  $x_3$  hesperidin

Table 4.

Run number	Original mixture ( $x_1$ ; $x_2$ ; $x_3$ )**	Rutin (mg/mL)	Quercetin (mg/mL)
Control 4	(5.0; 5.0; 0)	4.071 ± 0.784	ND
Control 5	(5.0; 0; 5.0)	2.435 ± 0.422	ND
Control 6	(0; 5.0; 5.0)	5.080 ± 1.427	ND
Control 7	(3.3; 3.3; 3.3)	2.499 ± 0.472	ND
Run 4	(5.0; 5.0; 0)	*	1.873 ± 4.950
Run 5	(5.0; 0; 5.0)	*	1.578 ± 10.382
Run 6	(0; 5.0; 5.0)	*	2.634 ± 0.017
Run 7	(3.3; 3.3; 3.3)	*	1.905 ± 1.208

*All procedures were performed in triplicate. Mean values (±standard deviation)*

*ND = Not detected*

*\*\* $x_1$  naringin,  $x_2$  rutin and  $x_3$  hesperidin*

*\*Values below the limit of the method*

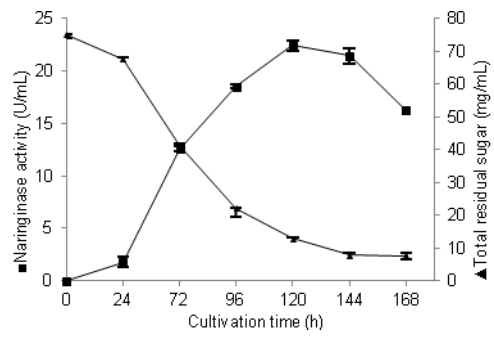


Figure 1.

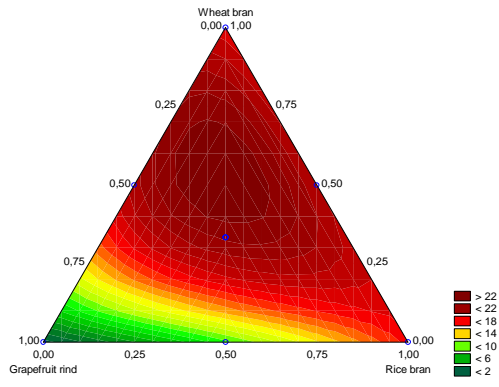


Figure 2.

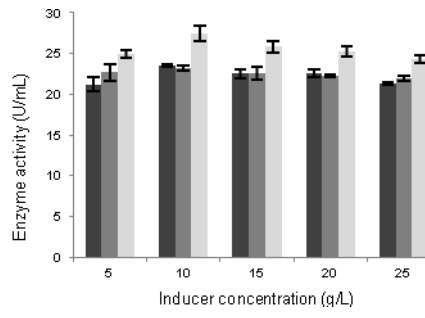


Figure 3.

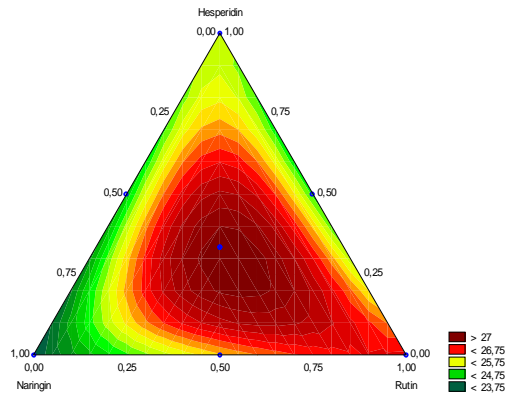
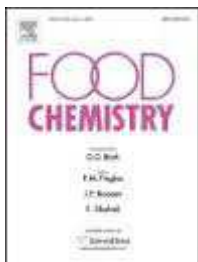


Figure 4.

**ANEXOS**

**ANEXO A****Normas para submissão de artigo para a revista food chemistry**



**Food Chemistry**  
 ISSN: 0308-8146  
 Imprint: ELSEVIER

**Impact Factor: 3.391**

#### **Article structure**

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, Appendix, References, Vitae, Figure Captions. Do not import the Figures or Tables into your text, figures and tables should be submitted as separate files. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given.

#### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### **Essential title page information**

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

#### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The abstract should not exceed 150 words.

#### **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

#### **Chemical compounds**

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). The PubChem CIDs can be found via <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>. Please position

the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below:

Chemical compounds studied in this article

Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865)

More information is available at: <http://www.elsevier.com/PubChem>.

### **Units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' is ambiguous and should not be used.

### **Artwork**

#### *Electronic artwork*

##### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

##### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Please insert the following text before the standard text - Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All illustrations should be clearly marked with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

#### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

## References

### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Example: CTAHR (College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii). Tea (*Camellia sinensis*) a New Crop for Hawaii, 2007. URL [http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/tea\\_04\\_07.pdf](http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/tea_04_07.pdf) . Accessed 14.02.11.

### *Reference management software*

Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and also others like EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/downloads/styles>). Using plug-ins to word processing packages which are available from the above sites, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style as described in this Guide. The process of including templates in these packages is constantly ongoing. If the journal you are looking for does not have a template available yet, please see the list of sample references and citations provided in this Guide to help you format these according to the journal style.

If you manage your research with Mendeley Desktop, you can easily install the reference style for this journal by clicking the link below: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/food-chemistry>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice. For more information about the Citation Style Language, visit <http://citationstyles.org>.

All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. See Types of Paper for reference number limits. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Steventon, Donald and Gladden (1994) studied the effects..." or "...similar to values reported by others (Anderson, Douglas, Morrison & Weiping, 1990)..."). For 2-6 authors all authors are to be listed at first citation. At subsequent citations use first author et al.. When there are more than 6 authors, first author et al. should be used throughout the text. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and journals, publisher and year. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

### *Reference style*

*Text:* Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from <http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067> or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

*List:* references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.