



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ADRIANA CASAVECHIA PETRI

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE A-L-RAMNOSIDASE DE
ASPERGILLUS NIGER POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA**

ADRIANA CASAVECHIA PETRI

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE A-L-RAMNOSIDASE DE
ASPERGILLUS NIGER POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA**

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

Orientador: Prof. Dr. João B. Buzato.

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P495o Petri, Adriana Casavechia
I Otimização da produção de a-L-ramodidase de *Aspergillus niger* por
fermentação em estado sólido utilizando resíduos da agroindústria / Adriana
Casavechia Petri.. – Londrina, 2011.
70 f.: il.

Orientador: João Batista Buzato.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, 2011.
Inclui bibliografia

1. Enzimas – Aplicações industriais – Teses. 2. *Aspergillus niger* – Teses. 3.
Biotecnologia – Teses. 4. Fungos filamentosos – Teses. 5. Sucos cítricos –
Indústria – Teses. I. Buzato, João Batista. II. Universidade Estadual de Londrina.
Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III.
Título.

CDU 663.1

ADRIANA CASAVECHIA PETRI

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE A-L-RAMNOSIDASE DE
ASPERGILLUS NIGER POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO
UTILIZANDO RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João B. Buzato
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Cristina Giatti Marques de Souza
UEM – Maringá – PR

Dr. Doumit Camilios Neto
UTFPR – Curitiba – PR

Londrina, 02 de Agosto de 2011

Aos meus pais e irmãos, que mesmo longe, foram
meus grandes incentivadores.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor João Batista Buzato pelo carinho, dedicação, orientação, paciência e ensinamentos fundamentais para realização deste trabalho;

Aos Professores Doutor Dionísio Borsato e Doutora Suzana Mali pelo auxílio na análise estatística dos dados do presente trabalho;

Aos docentes do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia pelos ensinamentos valiosos durante todo o curso;

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (CCE/UEL): Nelson Janeiro Rodriguez, Sérgio Nascimento Evangelista, Elda Jonas Aguiar, Sandra Aparecida Defende pela amizade, colaboração e auxílio;

Aos estagiários e colegas de laboratório Giuliana C. Coatti, Diego L. Souza e Danielle C. Ferreira;

Aos meus pais, Maria do Carmo e Valmir Petri, e irmãos, Fernanda e Matheus Petri, pelo carinho, amor, incentivo e confiança depositada em todos os meus sonhos;

Aos amigos Ana Elisa Stefani Vercelheze, Gustavo Jabor Gozzi, Rafael dos Santos, Aline Francisca de Souza, Carolina Nachi Rossi, Luciana Von Hohendorff Ferreira, Francine Fernandes, Patrícia Bittencourt, Luciana Carvalho Grade, Paulo Ricardo Franco, Kelly Goes, Karita R. Costa, Fernando Bazani, Douglas Gomes e Leonardo Cardoso pela amizade, apoio, companheirismo, incentivos indispensáveis nos momentos difíceis durante o curso e pela alegria que sempre me proporcionaram,

A CAPES pelo apoio financeiro.

“Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando...”
Luiz Fernando Veríssimo

PETRI, Adriana Casavechia. **Otimização da produção de α -L-ramnosidase de *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido utilizando resíduos da agroindústria.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

α -L-Ramnosidase cliva especificamente a raminose terminal de uma grande variedade de produtos naturais. Essa propriedade confere à enzima importante potencial biotecnológico, uma vez que possibilita uma diversidade de aplicações, tais como remoção do amargor de concentrados cítricos, melhoria do aroma de vinhos e conversão de esteróides de importante aplicação clínica. Este trabalho otimizou a produção de α -L-ramnosidase de *Aspergillus niger* 426 por FES utilizando metodologia estatística e foi conduzido em duas etapas. No primeiro momento, utilizou-se 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 0,14g de bagaço de cana-de-açúcar, 2,25g de casca de soja e 3,05g de palha de arroz com máximo de atividade de 1,92U/mL. Em seguida, realizou-se o delineamentos Box-Behnken para otimização da umidade do cultivo, granulometria do suporte e pH da solução de nutrientes na produção da enzima. A atividade de α -L-ramnosidase foi aumentada para 3,02U/mL em cultivos com umidade de 75,5% e pH 4,0, a granulometria não foi significativa para a produção de α -L-ramnosidase, sendo assim foi fixada em 1,5mm.

Palavras-chave: α -L-ramnosidase. *Aspergillus niger*. Delineamento de misturas. Fermentação em estado sólido

PETRI, Adriana Casavechia. **Production optimization of *Aspergillus niger* α -L-rhamnosidase by solid state fermentation using agro-industrial residues.** Dissertation (Master's Degree Dissertation) – State University of Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

α -L-Rhamnosidase cleaves specifically the terminal ramosose found in a wide variety of natural products. This capacity gives to this enzyme an important biotechnological potential, since it allows many applications, such as removing the bitterness of concentrated citrus, improve the aroma of wines and conversion of steroid for important clinical usage. This work has optimized the production of α -L-rhamnosidase of *Aspergillus niger* 426 by solid state fermentation using statistical methodology. This has been carried out in two stages. At first an mixture design with three components has been used in order to select the best ratio of supports for enzyme production. The best condition was under cultivation with 0.14 g of sugar cane bagasse, 2.25 g of soybean hulls and 3.05 g of rice straw and a maximum activity of 1.92 U / mL was achieved. Then was conducted the Box-Behnken design for optimization of cultivation moisture, particle size of support and pH of the nutrient solution on enzyme production. The activity of α -L-rhamnosidase was increased up to 3.02 U / mL in cultivation with moisture content of 75.5% and pH 4.0. The particle size was not significant for the production of α -L-rhamnosidase and was fixed at 1.5 mm.

Keywords: α -L-rhamnosidase. *Aspergillus niger*. Mixture design. Solid-state fermentation

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Enzimas produzidas por <i>Aspergillus niger</i> : classes e aplicações.....	21
Tabela 2 – Composição química e estrutural dos resíduos agroindustriais	22
Tabela 3 – Enzimas de <i>Aspergillus niger</i> em fermentação em estado sólido a partir de diferentes resíduos da agroindústria.....	24
Tabela 4 – Meio Batata-Dextrose-Ágar	27
Tabela 5 – Composição da solução base de nutrientes	28
Tabela 6 – Matriz do delineamento incompleto Box-Behnken 3 ³	30
Tabela 7 – Matriz do delineamento completo Box-Behnken 3 ²	30

ARTIGO

Tabela 1 – Atividade de α -L-ramnosidase em diferentes suportes de acordo com o delineamento de misturas	60
Tabela 2 – Valores de α -L-ramnosidase, açúcar total inicial, consumo de açúcar e invertase dos ensaios 1, 2, 3 e 4	60
Tabela 3 – Variáveis e níveis testados no delineamento incompleto 3 ³ Box-Behnken.....	60
Tabela 4 – Atividades de α -L-ramnosidase para o delineamento completo 3 ² Box-Behnken.....	61
Tabela 5 – Análise de variância (ANOVA) para as atividades de α -L-ramnosidase obtidas pelo delineamento completo 3 ² Box-Behnken.....	61

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Hidrólise da naringina em prunina, raminose, naringinina e glucose pela naringinase expressando atividades α -L-ramnosidase e β -D-glucosidade..... 17
- Figura 2** – Arranjo simplex para três componentes: (a) sem pontos no centróide e (b) com pontos no centróide 28

ARTIGO

- Figura 1** – Delineamento experimental simplex centróide para 3 componentes 62
- Figura 2** – Cinética do ponto central do delineamento de misturas para produção de α -L-ramnosidase..... 62
- Figura 3** – Curva de contorno resultante da influência dos suportes sobre a atividade de α -L-ramnosidase..... 63
- Figura 4** – Otimização da produção de α -L-ramnosidase utilizando o aplicativo Statistica v.9.0 63
- Figura 5** – Comparação da produção de α -L-ramnosidase nas diferentes condições de cultivo do delineamento Box-Behnken 3^3 64
- Figura 6** – Superfície de resposta resultante da influência da interação entre pH e umidade na atividade de α -L-ramnosidase segundo planejamento Box-Behnken 3^2 64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1	SUCOS CÍTRICOS	14
3.1.1	Produção e Mercado	14
3.1.2	Sabor Amargo em Cítricos	14
3.2	A-L-RAMNOSIDASE	16
3.2.1	Produção de α -L-Ramnosidase	18
3.3	ASPERGILLUS NÍGER	19
3.4	RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA	20
3.4.1	Fermentação em Estado Sólido	22
3.5	METODOLOGIA ESTATÍSTICA	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	MATERIAIS	26
4.1.1	Micro-organismo	26
4.1.2	Suportes para Fermentação em Estado Sólido	26
4.1.3	Meios de Cultivo	26
4.1.3.1	Meio de preservação e inóculo	26
4.1.3.2	Meio de fermentação	27
4.1.3.2.1	<i>Seleção de suporte para FES</i>	27
4.1.3.2.2	<i>Otimização das condições de FES para produção de α-L-ramnosidase</i>	30
4.2	MÉTODOS	30
4.2.1	Preparo dos Meios de Cultivo	30
4.2.1.1	Meio de preservação e inóculo	30
4.2.1.2	Meios de fermentação	30
4.2.2	Preservação do Micro-organismo	30
4.2.3	Preparo do Inóculo	31

4.2.4	Fermentações.....	31
4.2.4.1	Seleção de suporte para FES	31
4.2.4.2	Otimização das condições de FES para produção de α -L-ramnosidase.....	31
4.2.5	Determinações Analíticas.....	31
4.2.5.1	Atividade de α -L-ramnosidase	32
4.2.5.2	Atividade de invertase.....	32
4.2.5.3	Açúcares totais	33
4.2.6	Análise Estatística	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6	CONCLUSÃO	35
7	REFERÊNCIAS	36
	APÊNDICES	44
	APÊNDICE A – Artigo “Otimização da produção de α-L-ramnosidase de <i>Aspergillus niger</i> por fermentação em estado sólido utilizando resíduos da agroindústria.”	45
	ANEXOS	64
	ANEXO A – Normas para submissão de artigo para a revista Process Biochemistry	65

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o primeiro produtor mundial de citros e o suco concentrado de laranja ocupa posição importante entre os produtos agrícola de exportação. Um leve sabor amargo no produto é característico e aceitável, porém, o excesso de amargor, devido à quantidades elevadas de naringina, reduz a qualidade e diminui o valor comercial do produto.

Algumas alternativas tecnológicas têm sido propostas para remover o amargor dos sucos cítricos, porém, estas apresentam custos elevados e alteram as características organolépticas do produto, daí terem pouca eficiência e aplicação limitada. Uma alternativa é a adição de ramnosidase ao processamento do suco concentrado. A ramnosidase é uma enzima que pertence ao complexo enzimático da naringinase, que hidrolisa a naringina pela porção α -L-ramnosidase (EC 3.2.1.40) para produzir raminose e prunina, então convertida pela porção β -D-glucosidase (EC 3.2.1.21) em glicose e naringinina.

A produção de enzimas por fermentação em estado sólido tem recebido atenção nas últimas décadas, pois além de gerar reduzido volume de resíduo líquido, se apresenta como uma tecnologia capaz de agregar valor às matérias-primas (melaço e extrato de levedura) e resíduos gerados pela agroindústria (palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e casca de soja).

Os fungos filamentosos são os mais adaptáveis a essa metodologia, pois as condições de cultivo são mais parecidas com o habitat natural desses micro-organismos. Nesse contexto, *Aspergillus niger* (micro-organismo Generally Recognized as Safe - GRAS) se destaca por produzir diversos compostos de interesse como enzimas extracelulares.

A produção enzimática fúngica, conduzida por fermentação em estado sólido, possibilita a obtenção de extratos enzimáticos concentrados, o uso de subprodutos da agroindústria e a geração de menor volume de resíduo. Considerando-se que a região de Londrina tem-se consolidado como produtora de cítricos, a produção de ramnosidase é de interesse, pois agrega valor ao suco concentrado destinado à exportação, pela diminuição do amargor no produto.

Para produção de enzimas fungicas, é importante estabelecer condições otimizadas de fermentação. Cada vez mais, utiliza-se planejamento experimental, como o delineamento de misturas e fatorial, visando a diminuição do número de ensaios.

O presente trabalho teve por finalidade otimizar a produção de ramnosidase de *Aspergillus niger*, por meio de metodologia estatística, para o desenvolvimento de um processo de fermentação em estado sólido utilizando diferentes suportes e condições de cultivo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar a produção de α -L-ramnosidase de *Aspergillus niger* 426 por fermentação em estado sólido através de planejamentos estatísticos e análise de superfície de resposta.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conduzir cinética da fermentação para estabelecer o melhor tempo de cultivo na produção de α -L-ramnosidase;
- Selecionar os suportes e os níveis dos mesmos para a produção de α -L-ramnosidase em FES utilizando metodologia de delineamento de misturas;
- Otimizar as condições de fermentação utilizando delineamento Box-Behnken, tendo como variáveis a umidade, granulometria e pH do cultivo;
- Acompanhar as atividades de α -L-ramnosidase e invertase;
- Avaliar os valores obtidos de atividade de α -L-ramnosidase por metodologia de superfície de resposta;
- Acompanhar o consumo de açúcares totais nos cultivos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 SUCOS CÍTRICOS

3.1.1 Produção e Mercado

Segundo a Citrus BR (2010), em 2009 o Brasil embarcou 1,30 milhões de toneladas de suco de laranja concentrado. É em São Paulo, com 78,4% de participação na produção, que quase toda a matéria-prima é processada e o suco, exportado. Estados que também têm importante participação na citricultura brasileira são: Bahia (6,0%), Sergipe (4,2%), Minas Gerais (3,1%), Paraná (2,8%) e Rio Grande do Sul (1,8%). O Paraná vem se destacando como pólo agroindustrial e sua produção é exportada para países da Europa e Oriente Médio. A citricultura paranaense está em plena expansão e apresenta produtividade superior a todos os estados produtores, inclusive em relação a São Paulo (IBGE, 2009).

Além de maior produtor, o Brasil é também o maior exportador global de suco de laranja concentrado. Por deter 50% da produção mundial de suco de laranja, e exportar 98% do que produz, o país consegue 85% de participação no mercado mundial (IBGE, 2007, 2008). Esse domínio de mercado está muito à frente dos Estados Unidos e Espanha, responsáveis por 7% e 4% da exportação mundial, respectivamente. Os principais destinos da produção brasileira da commodity suco de laranja concentrado são: Bélgica, Luxemburgo, Holanda, Estados Unidos e Japão (FUNDECITRUS, 2009).

A laranja e seu suco são apreciados no mundo todo. Um leve sabor amargo, no fruto e no suco, é característico e aceitável. Entretanto, o excesso de amargor, causado pela presença de alguns flavonóides e limonenos, desagradam o consumidor e reduzem seu valor de mercado (MONGKOLKUL et al., 2006). Frutas e sucos muito amargos têm pouca aceitação e baixo valor de mercado, necessitando de processamento industrial adequado para evitar tais características (KIMBALL, 1991; PURI et al., 1996; SINGH et al., 2003).

3.1.2 Sabor Amargo em Cítricos

Os principais constituintes que afetam o sabor e estabilidade dos sucos de frutas são açúcares solúveis, celulose, pectina, óleos essenciais, limonóides, flavonóides e polifenóis. A concentração desses componentes no suco é dependente de muitos fatores,

incluindo as configurações do extrator e a variedade, maturidade e safra dos frutos (BRADFORD et al., 2007).

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. Em sucos de laranja do tipo pomelo e bergamota, principalmente, a naringina influencia diretamente na amargura (GATTUSO et al., 2007).

As concentrações de naringina são mais altas em folhas jovens e no albedo dos frutos imaturos (DEL RIO et al., 1998; PURI e BANERJEE, 2000; MONGKOLKUL et al., 2006; RIBEIRO e RIBEIRO, 2008), porém também são detectadas no suco da fruta (TOMÁS-BARBERÁN, 2000). Apesar de certa quantidade de naringina, aproximadamente 0,4g/L, ser comum nos sucos de laranja do tipo pomelo, as frutas colhidas precocemente podem elevar essa quantidade a níveis menos aceitáveis de 1,2g/L (PINO, 1997).

Tendo em vista que o amargor, devido à presença de flavonóides e limonóides, representa um grande 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 e FERREIRA-DIAS, 2002).

Chandler et al. (1968) conseguiram amenizar o amargor do suco de laranjas navel por adsorção em poliamidas e polímeros de nylon. Puri (1984) patenteou um processo no qual conseguiu remover mais de 80% de limonina e mais de 70% de naringina utilizando uma resina de poliestireno-divinil-benzeno Duolite S-861. Barmore et al. (1986) utilizaram silicato de magnésio ativado (Florisi) e conseguiram significativa diminuição de compostos como limonina, naringina, narirutina. Shaw e Wilson (1983) utilizaram β -ciclodextrina, que atua formando um complexo com a naringina, para reduzir o amargor de sucos de pomelo em aproximadamente 58%. Resultados semelhantes foram alcançados com α -ciclodextrina por Shaw, Tatum e Wilson (1984).

Embora alcançando resultados positivos quanto à remoção do amargor, as técnicas propostas têm aplicações limitadas, pois provocam a perda da acidez, sabor, doçura e

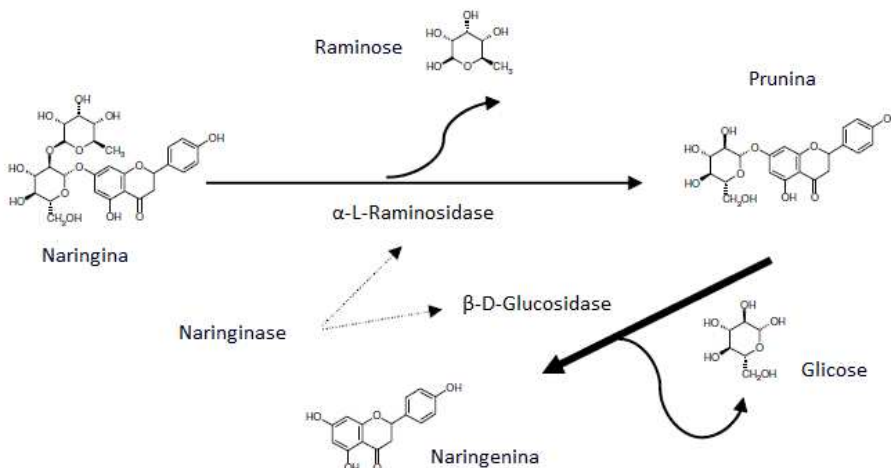
turbidez do suco, alteram a composição de nutrientes ou apresentam custos elevados (PURI et al., 1996; CHEN, NIU e CAI, 2010). Outro problema com certos tratamentos é que os produtos químicos usados não podem ser reciclados, aumentando o custo do processo com a proibição da eliminação desses poluentes.

As limitações acima descritas 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; VILA-REAL et al., 2007, PEDRO et al, 2007).

3.2 α -L-RAMNOSIDASE

Segundo Yanai e Sato (2000), α -L-ramnosidase é uma enzima que hidrolisa a quebra das ligações glicosídicas entre a raminose e outros compostos. Juntamente com a β -D-glucosidase (EC 3.2.1.21), a α -L-ramnosidase (EC 3.2.1.40) forma um complexo enzimático referido como naringinase (SORIA et al., 2004). Esta enzima catalisa a conversão de naringina em naringinina em um processo de duas etapas, descritos na Figura 1. O substrato naringina (4'-5,7'-trihidroxi-flavonona-7-raminoglicosídeo) é hidrolisado pela porção α -L-ramnosidase para produzir raminose e prunina (4'-5,7'-trihidroxi-flavonona-7-glucosídeo), que é então convertida pela porção β -D-glucosidase a glucose e naringinina (4'-5,7'-trihidroxi-flavonona) (PURI et al., 1996).

Figura 1 – Hidrólise da naringina em prunina, raminose, naringinina e glucose pela naringinase expressando atividades α -L-ramnosidase e β -D-glucosidase.



Fonte: RIBEIRO e RIBEIRO, 2008.

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. Entretanto, prunina apresenta um terço do amargor da naringina e, naringinina é quase insípida. Assim, apenas a primeira reação é essencial para a remoção do amargor, o que justifica maior interesse pela α -L-ramnosidase quando o objetivo é a remoção do amargor por degradação enzimática (PURI et al., 1996; YADAV; YADAV, 2000).

Além de apresentar potencial uso na indústria de sucos cítricos (SOARES;HOTCHKISS,1998; PURI e BANERJE, 2000), α -L-ramnosidase possui outras possíveis aplicações, como realizar glicosilação de diversos compostos (MARTEARENA et al., 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 (GALLEGO et al., 1996; OREJAS et al., 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, 2004).

Ellenrieder et al. (1998), Scaroni et al. (2002) e Rajal et al. (2009) destacaram algumas características da α -L-ramnosidase fúngica: temperatura ótima em redor de 40°C, porém apresenta estabilidade em temperaturas mais elevadas; pH ótimo de 4,5 podendo apresentar atividade ainda em pH mais básico. A enzima é inibida por glicose, ácido cítrico e alguns íons metálicos como o cobre e o mercúrio (YANAI e SATO, 2000; RAJAL et al., 2009; YADAV et al., 2010).

α -L-Ramnosidase é uma glicoproteína, não contém co-fatores metálicos e pontes dissulfeto. O pH isoelétrico situa-se em redor de 6 e o peso molecular aproximadamente 90 kDa (MANZANARES, 1997; OREJAS et al., 1999; YANAI e SATO, 2000; KOSEKI et al., 2008).

Técnicas de determinação da atividade do complexo da naringinase usualmente são variações colorimétricas do teste de Davis (Davis, 1947), porém estes não são específicos na diferenciação entre naringina, seu isômero insípido narirutina e seus produtos hidrolisados (CHIEN, SHEU e SHYU, 2001), não sendo específico para determinação da atividade de α -L-ramnosidase (YADAV et al., 2010). Sendo assim, é importante acompanhar

a atividade por técnicas de maior especificidade, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com coluna para carboidratos e detector de índice de refração para detecção da raminose liberada (KOSEKI et al., 2008).

3.2.1 Produção de α -L-Ramnosidase

Como nos demais seres vivos, os principais macronutrientes para o crescimento dos micro-organismos são as fontes de carbono e o nitrogênio. As quantidades desses compostos na nutrição afetam diretamente o metabolismo. Além dos componentes do meio de cultivo, outros fatores como temperatura, pH, velocidade de agitação, tamanho do inóculo, bem como o tipo de fermentação (submersa ou em estado sólido) podem influenciar na produção de metabólitos. Assim, devido a sua importância, esses fatores têm sido estudados para produção de ramnosidase por diversos autores.

São escassas as informações sobre a produção de ramnosidase por FES, o único trabalho encontrado na literatura foi o de Elinbaum et al. (2002). Esses autores estudaram a produção de α -L-ramnosidase por *Aspergillus terreus* em fermentação em estado sólido utilizando como suporte/substrato o farelo de trigo, o bagaço de cana-de-açúcar e a espuma de poliuretano. Os melhores resultados foram obtidos com bagaço de cana-de-açúcar (1,7 U/mL). Um aumento na concentração de naringina para 10 g/L aumentou a atividade para 4,2 U/mL. As melhores condições de cultivo foram temperatura ótima de 30 °C, inóculo de 10^9 esporos/mL de solução nutriente e a naringina foi considerada a melhor fonte de carbono. A umidade atmosférica ótima foi em torno de 99 %, quando diminuída para 95 % a produção da enzima foi reduzida, confirmando a influência direta desse fator em cultivos de fermentação em estado sólido (FES).

A produção de α -L-ramnosidase por *A.terreus* também foi estudada por Gallego et al. (1996). O micro-organismo foi cultivado em fermentação submersa tendo a glicose como principal fonte de carbono, com inóculo de 10^5 esporos/mL a 37 °C por 168 horas, com um máximo de atividade de 0,522 U/mL em cultivos com raminose como indutor.

Soria, Cuevas e Ellenrieder (1999) produziram α -L-ramnosidase por *A.terreus* em fermentação submersa, com inóculo de 10^6 esporos/mL, em temperatura de 35°C. O máximo de atividade enzimática, 8,8 U/mL, foi obtido em 216 horas de cultivo utilizando a raminose como fonte de carbono.

Orejas et al. (1999) compararam os efeitos de diversas fontes de carbono na produção de α -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 raminose 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).

Yanai e Sato (2000) analisaram a produção de ramnosidase por diversas linhagens de leveduras. *Pichia angusta* foi selecionada como melhor produtora da enzima, com máximo de atividade de 0,85 U/mg proteína, em cultivos com raminose, pH inicial de 4 a 28 °C por 48 h.

Scaroni et al. (2002) analisaram a produção de α -L-ramnosidase de diferentes cepas de fungos mesofílicos cultivados em fermentação submersa com raminose como fonte de carbono. A cepa selecionada como melhor produtora da enzima foi a de *Fusarium sambucinum* 310, com atividade de 1,2 U/mL.

Rajal et al. (2009) produziram α -L-ramnosidase de *Penicillium ulaiense* 004 com raminose como fonte de carbono, com inóculo de 5×10^4 esporos/mL de meio. A enzima foi produzida para purificação parcial e posterior caracterização e apresentou termoestabilidade à 60 °C.

3.3 ASPERGILLUS NIGER

As culturas de *A. niger* desenvolvem colônias com crescimento rápido e exuberante, inicialmente são brancas ou 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).

A. niger é uma das poucas espécies de fungos consideradas GRAS (Generally Regarded as Safe) conferido pela Food and Drug Administration (FDA) devido a sua baixa toxicidade. Apenas 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).

A. niger tem sido objeto de estudos para aplicação industrial por várias décadas. Desde 1960 esse micro-organismo vem sendo utilizado como produtor de uma variedade de enzimas (Tabela 1), principalmente para o setor alimentício e farmacêutico (PARIZA e JOHNSON, 2001; SCHUSTER et al., 2002).

Tabela 1 – Enzimas produzidas por *Aspergillus niger*: classes e aplicações.

Classe	Aplicação	Refêrencia
Poligalacturonase	Clarificação de sucos de fruta Extração de óleo de azeitona	Santos e Macedo, 2008.
Pectinases	Clarificação e redução de viscosidade em sucos de frutas Degomagem de fibras	Patil e Dayanand, 2006.
Naringinase	Remoção do amargor em citros	Puri et al., 2005
Celulase	Limpeza, clarificação Amaciamento de tecidos de algodão	Cardoso et al., 2008.
Protease	Remoção de manchas de proteínas Remoção de biofilmes	Paranthaman et al., 2009.
Amilase	Remoção de manchas de amido Aumenta maciez e volume do pão	Gupta et al., 2008.
Glicoamilase	Produção de dextrose	Arasaratnam et al., 2001
Lipase	Tratamento de efluentes	Falony et al., 2006
Frutofuranosidase	Adoçantes artificiais	Ashokkumar et al., 2001

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 RESÍDUOS 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 resíduos têm sido considerados para aplicação industrial para produção de diversos compostos de interesse por meio da fermentação em estado sólido ou semi-sólido. Dentre os resíduos mais estudados pode-se citar os da polpa de café (OROZCO et al., 2008), abacaxi (IMANDI et al., 2008), trigo (CHENYU et al., 2008), farelo de trigo, casca de arroz (NIZAMUDDIN et al., 2008), torta de soja (SOCCOL et al., 2003), bagaço de cana-de-açúcar (PANDEY, 2003), casca e farelo de soja (PANDEY et al., 1999). Os principais constituintes da estrutura desses resíduos são: celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina, proteínas e açúcares, fontes de carbono e nitrogênio para o crescimento de micro-organismos e produção de metabólitos.

Em termos mundiais, o Brasil está entre os 10 principais produtores de arroz do mundo. Segundo o Levantamento Sistemático de Produção Agrícola (IBGE, 2008) a produção de arroz no Brasil em 2008 foi superior a 12,1 milhões de toneladas (em casca), no ano seguinte a produção aumentou para 13 milhões de toneladas. A casca do arroz, gerada no beneficiamento do grão, corresponde a aproximadamente 20 % do total de arroz. É um material abrasivo, de baixo valor nutritivo e, dada a sua reduzida densidade, seu simples armazenamento e eliminação constituem um grave problema ambiental (DELLA e HOTZA, 2006).

O Brasil é o maior exportador e segundo produtor mundial de soja. A casca de soja é um produto resultante do esmagamento do grão de soja para extração de óleo, produção do farelo de soja e da lecitina. No beneficiamento dessa leguminosa, produz-se 8kg de casca/100kg soja esmagada (BLASI et al., 2000).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (IBGE, 2009). A safra de 2009, anunciada pelo Ministério da Agricultura, ultrapassou 600 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, o que representa em torno de 180 milhões de toneladas de bagaço. A quantidade produzida de bagaço depende da quantidade de fibra da cana-de-açúcar processada, apresentando em média 46 % de fibra e 50% umidade, resultando aproximadamente 280 Kg/tonelada de cana beneficiada. Desta vasta quantidade de bagaço originado apenas parte é utilizado para geração de energia (PARANHOS, 1987).

A composição química e estrutural desses resíduos está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição química e estrutural dos resíduos agroindustriais

	Composição		
	Palha de arroz ^(a)	Casca de soja ^(b)	Bagaço de cana-de-açúcar ^(c)
Açúcares solúveis (g/g)	0,04	0,09	0,76
Proteína bruta (%)	2,5	9,4	2,3
Celulose (%)	43	47	50
Hemicelulose (%)	22	23	30
Lignina (%)	17	3	15

(a) - MUSSATTO, (2002); (b) - MORAIS, 2003; (c) – TEIXEIRA (2007)

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 e com isso, contribuir para uma maior diversificação do agro-negócio nacional.

3.4.1 Fermentação em Estado Sólido

Fermentação em estado sólido (FES) é uma técnica que utiliza um suporte que pode servir também como substrato, o qual é umedecido por solução nutriente para permitir o crescimento do micro-organismo (RAIMBAULT, 1998; ALONSO, 2001; PANDEY, 1992; 2003). A disponibilidade restrita de água pode estimular a produção de alguns metabólitos específicos (COUTO e SANROMÁN, 2006).

É um processo simples, de baixo capital de investimento, pouco consumo de energia e fácil controle de contaminação devido à baixa quantidade de água livre aparente no sistema. Outra vantagem é a obtenção de extratos mais concentrados (MITCHELL et al., 2000; ROBINSON e NIGAM, 2003).

Algumas propriedades dos suportes/substratos que influenciam a FES e afetam diretamente o rendimento do processo são: porosidade, formato das partículas e composição química e estrutural (PANDEY, 2003; ROCHA, 2010).

Geralmente, realiza-se um pré-tratamento (esmagamento, quebra, moagem e peneiramento) resultando na granulometria específica do suporte, que define boas condições de crescimento e produção microbiana (ROCHA, 2010). Pequenos grânulos de suportes/substratos fornecem uma grande superfície de contato com o micro-organismo, mas, por dificultar o acesso aos nutrientes, resulta num baixo crescimento. Portanto o tamanho da partícula deve ser selecionado de acordo com cada processo e micro-organismo a ser empregado (DEL BIANCHI, MORAES e CAPALBO, 2001).

A água também apresenta papel de destaque em FES por seu elevado grau de interação com as substâncias que compõem a fase sólida (suporte/substrato) (GERVAIS e MOLIN, 2003). A umidade do meio de fermentação é um fator determinante no sucesso do cultivo. Ressalta-se que, elevada umidade causa diminuição da porosidade e dificulta a transferência de oxigênio, baixos níveis de umidade dificultam a disponibilidade dos nutrientes, ambas as situações podem resultar em baixo crescimento microbiano (MAHADIK et al., 2002).

O controle e monitoramento do pH é outro fator de grande importância durante as fermentações em estado sólido, porém, não é fácil de ser realizado (PANDEY, 2003). De acordo com Bajracharya e Mudgett (1985), a forma da água nos substratos sólidos constitui um obstáculo para a medida do pH. O pH inicial de um cultivo é ajustado ao ótimo pela adição de uma solução (mineral, tampão, ácido- básica) que impregna o substrato, mas a determinação exata do pH só poderá ser efetuada novamente no final do processo de FES.

Com o conhecimento dos fatores que influenciam diretamente a FES é possível selecionar o melhor tipo de suporte/substrato para a produção de diferentes enzimas. Na Tabela 3 estão apresentadas algumas enzimas produzidas a partir de diversos resíduos agroindustriais.

Tabela 3 – Enzimas de *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido a partir de diferentes resíduos da agroindústria.

Enzimas	Substratos
Pectinases	Polpa de café
Celulases	Casca de maracujá
	Palha de arroz
Amilases	Bagaço de cana-de-açúcar
	Farelo de trigo
Glicoamilase	Palha de arroz
	Farelo de arroz
Invertase	Farelo de arroz
	Farelo de trigo
Hemicelulases	Bagaço de cana-de-açúcar
	Farelo de trigo
Xilanase	Bagaço de cana-de-açúcar
	Farelo de trigo
β -galactosidase	Casca de soja

Fonte: Adaptado de Pinto (2003) e Pandey et al., (1999)

Elinbaum et al. (2002) relataram o único trabalho de produção de α -L-ramnosidase em fermentação em estado sólido. Esses autores utilizaram farelo de trigo, bagaço de cana pré-tratado e espuma de poliuretano para a produção da enzima por *A. terreus*.

3.5 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

Metodologias estatísticas como o delineamento fatorial e de misturas e metodologia de superfície de resposta são utilizados na otimização em bioprocessos, uma vez

que avalia as interações entre os parâmetros selecionados de fermentação (BRUNS et al., 2006).

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 et al., 1995).

Segundo Cornel (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.

A produção de β -1,3-glucanase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 e *Trichoderma harzianum* Rifai foi otimizada através metodologia estatística de delineamento de misturas, analisando quais as proporções ideais das fontes de carbono (glicose, lactose e botriosferana) para a produção da enzima (GIESE et al., 2010)

Soares, Bruns e Scarminio (2009) utilizaram o delineamento de misturas para determinar a proporção ideal de solventes (etanol, hexano, acetona e diclorometano) para extração das frações orgânica, neutra e básica de extratos de *Erythrina speciosa*.

Com objetivo de aumentar as propriedades funcionais do suco misto de frutas e hortaliças, Leoni (2009) utilizou delineamento de misturas para analisar 10 formulações contendo duas frutas e uma hortaliça.

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 et al., 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).

Vários estudos vêm sendo conduzidos para otimização da produção de enzimas em fermentação em estado sólido com *A. niger* utilizando metodologia estatística.

Rocha (2010) avaliou a produção de invertase, amilase, celulase, pectinase e protease de *A. niger* em fermentação em estado sólido utilizando biomassa de maracujá e

resíduos do arroz. A produção das enzimas foi otimizada utilizando metodologia de superfície de resposta.

A produção de amilase por *A. niger* UO-01 utilizando bagaço de cana-de-açúcar como suporte foi otimizada utilizando metodologia de superfície de resposta (Pérez Rosés e Pérez Guerra, 2009). Estes autores testaram granulometria do suporte, temperatura de incubação, pH, umidade do suporte e concentrações do inóculo.

Maciel et al. (2008) produziram xilanase de *A. niger* LPB 326 por fermentação em estado sólido utilizando substrato lignocelulósico (bagaço de cana-açúcar e farelo de soja). Os cultivos foram definidos conforme delineamento estatístico e os efeitos das variáveis foram observados e otimizados por metodologia de superfície de resposta.

A metodologia de superfície de resposta também tem sido usada para otimizar a produção de enzimas por FES com outras espécies de *Aspergillus*.

A produção de xilanase de *A. carneus* utilizando torta de soja e farelo de arroz foi investigada por Fang et al. (2010). A otimização do meio de cultivo foi feita segundo delineamento composto central para as variáveis: concentrações de NH_4NO_3 ; CaCl_2 e $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. A análise da produção da enzima foi feita por metodologia de superfície de resposta.

Ustok et al. (2006) utilizaram a metodologia de superfície de resposta para estabelecer as melhores condições de cultivo para as variáveis analisadas (substratos sólidos, tamanho do inóculo e tempo de incubação) na produção de poligalacturonase de *A. sojae*.

É bastante escassa a produção bibliográfica de trabalhos que utilizam planejamento experimental na produção de ramnosidase e naringinase. Puri et al. (2009) utilizaram a metodologia de superfície de resposta para otimizar a composição do meio para a produção de naringinase de *Staphylococcus xylosus*. Os experimentos foram conduzidos conforme planejamento fatorial composto central testando as variáveis concentração de sacarose, nitrato de sódio e naringina, pH e inóculo. A partir da metodologia de superfície de resposta foi possível estabelecer quais os valores críticos de cada variável para produção da enzima.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Micro-organismo

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

4.1.2 Suportes para Fermentação em Estado Sólido

Os suportes utilizados para FES foram bagaço de cana-de-açúcar, casca de soja e palha de arroz, cedidos gentilmente por indústrias de processamento de grãos da região de Londrina/PR. Esses suportes não foram previamente lavados.

4.1.3 Meios de Cultivo

4.1.3.1 Meio de preservação e inóculo

A composição do meio de preservação e inóculo, meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 – Meio Batata-Dextrose-Ágar.

Componentes	Concentração (g/L)
Infusão de batata	200,0
Glucose	20,0
Ágar	15,0

4.1.3.2 Meio de fermentação

A solução de nutrientes utilizada em todos os experimentos é a mesma de Elinbaum et al. (2002), e está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 – Composição da solução base de nutrientes.

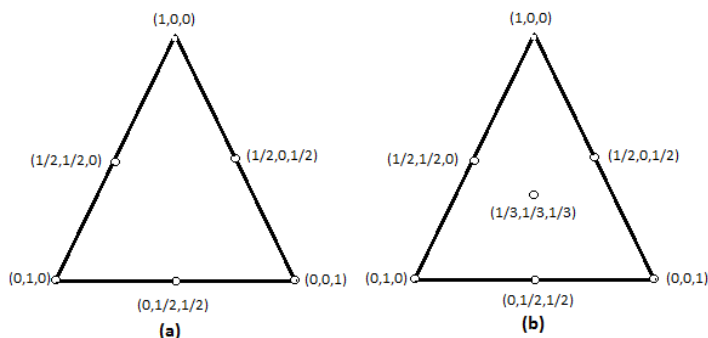
Composição	Concentração (g/L)
Naringina	10,0
Extrato de levedura	5,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
KCl	0,5
K ₂ HPO ₄	1,5
(NH ₄)H ₂ PO ₄	5,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0008
MnSO ₄ .7H ₂ O	0,0008
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,00008
Na ₂ MO ₄ .2H ₂ O	0,0008
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0004
Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	0,00004

Fonte: Elinbaum et al., 2002

4.1.3.2.1 Seleção de suporte para FES

Os cultivos foram conduzidos em diferentes suportes (bagaço de cana-de-açúcar, casca de soja e palha de arroz). As combinações analisadas dos mesmos foram definidas conforme delineamento experimental de misturas descrito na Figura 2.

Figura 2 – Arranjo simplex para três componentes: (a) sem pontos no centróide e (b) com pontos no centróide.



Fonte: Cornel, 2002.

A quantidade (em gramas) utilizada de cada suporte foi correspondente àquela necessária para absorver 12 mL da solução de nutrientes sem que houvesse a presença de água livre aparente. Assim, foram utilizadas 5 g de palha de arroz, 5 g de casca de soja e 1 g de bagaço de cana-de-açúcar quando usados individualmente (nível 1). Um volume de 12 mL da solução de nutrientes foi utilizado em cada ensaio para umedecer os suportes.

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 cana-de-açúcar, casca de soja e palha de arroz foram utilizados para o ajuste dos valores da variável resposta (atividade de α -L-ramnosidase).

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

onde: Y é a atividade de α -L-ramnosidase (U/mL), x_1 o bagaço de cana-de-açúcar, x_2 a casca de soja e x_3 a palha de arroz e γ os parâmetros estimados. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Statistica v.9.0

4.1.3.2.2 Otimização das condições de FES para produção de α -L-ramnosidase

A otimização das variáveis para FES foi realizada com a proporção de suporte selecionado no delineamento de misturas. O controle do pH inicial foi feito com tampão ftalato-HCl ou ftalato-NaOH, de acordo com os níveis de pH a serem testados nos delineamentos experimentais.

Foi utilizado o planejamento fatorial incompleto 3^3 de Box-Behnken (Tabela 6) para determinar a melhor condição para produção de α -L-ramnosidase. Foram analisadas três variáveis independentes (umidade do cultivo, granulometria e pH da solução de nutrientes) com três níveis.

Tabela 6 – Matriz do delineamento incompleto Box-Behnken 3³

Ensaio	Variáveis codificadas			Variáveis Decodificadas		
	Umidade	Granulometria	pH	Umidade	Granulometria	pH
1	-1,0	-1,0	0,0	43	0,8	4,5
2	1,0	-1,0	0,0	73	0,8	4,5
3	-1,0	1,0	0,0	43	2,2	4,5
4	1,0	1,0	0,0	73	2,2	4,5
5	-1,0	0,0	-1,0	43	1,5	4,0
6	1,0	0,0	-1,0	73	1,5	4,0
7	-1,0	0,0	1,0	43	1,5	5,0
8	1,0	0,0	1,0	73	1,5	5,0
9	0,0	-1,0	-1,0	58	0,8	4,0
10	0,0	1,0	-1,0	58	2,2	4,0
11	0,0	-1,0	1,0	58	0,8	5,0
12	0,0	1,0	1,0	58	2,2	5,0
13	0,0	0,0	0,0	58	1,5	4,5
14	0,0	0,0	0,0	58	1,5	4,5
15	0,0	0,0	0,0	58	1,5	4,5

Em seguida, um planejamento fatorial completo 3² de Box-Behnken (Tabela 7) foi empregado para estudar as melhores condições para produção de α -L-ramnosidase. Foram analisadas duas variáveis independentes (umidade do cultivo e pH da solução de nutrientes) com três níveis (Calado e Montgomery, 2003).

Tabela 7 – Matriz do delineamento completo Box-Behnken 3².

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Decodificadas	
	X ₁	X ₂	Umidade	pH
1	-1,0	-1,0	43	4,5
2	1,0	-1,0	73	4,5
3	-1,0	1,0	43	4,5
4	1,0	1,0	73	4,5
5	-1,0	0,0	43	4,0
6	1,0	0,0	73	4,0
7	-1,0	0,0	43	5,0
8	1,0	0,0	73	5,0
9	0,0	-1,0	58	4,0
10	0,0	1,0	58	4,0
11	0,0	-1,0	58	5,0
12	0,0	1,0	58	5,0
13	0,0	0,0	58	4,5
14	0,0	0,0	58	4,5
15	0,0	0,0	58	4,5

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo dos Meios de Cultivo

4.2.1.1 Meio de preservação e inóculo

Os componentes da Tabela 4 foram solubilizados em água destilada nas concentrações indicadas e alíquotas de 5 mL e de 20 mL foram distribuídas respectivamente em tubos de ensaio e em Erlenmeyers de 250 mL de capacidade. 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.

4.2.1.2 Meios de fermentação

Os suportes foram triturados para obter granulometria desejada para cada experimento, em seguida secos e estocados congelados até o uso. Os suportes utilizados em cada ensaio estão apresentados nos itens 4.1.3.2.1 e 4.1.3.2.2.

O pH inicial da solução de nutrientes foi corrigido para 4,5 com HCl 1 M ou NaOH 4 M. Nos experimentos em que o pH foi uma variável analisada, o pH dos cultivos foi mantido nos níveis desejados com o uso de soluções tamponantes. Foram distribuídas alíquotas de 12 mL em frascos Erlenmeyers de capacidade de 125 mL contendo os suportes 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.

4.2.2 Preservação do Micro-organismo

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

4.2.3 Preparo do Inóculo

O micro-organismo foi repicado em frascos Erlenmeyer contendo 20 mL do meio BDA (Tabela 4), estes foram levados à estufa a 28°C por 72h para formação de esporos. Em seguida, 50mL da solução base de nutrientes (Tabela 5) foram adicionados aos frascos, estes foram agitados por 2 minutos para liberação dos esporos. A contagem foi feita em câmara de Neubauer para obtenção de solução com 10⁹ esporos/mL de solução de nutrientes.

4.2.4 Fermentações

4.2.4.1 Seleção de suporte para FES

Inicialmente conduziu-se a cinética do ponto central do delineamento de misturas para determinar o melhor tempo de produção de α -L-ramnosidase. As fermentações foram conduzidas a 28°C, sem agitação e com umidade atmosférica controlada a 97%. As triplicatas de cultivo foram coletadas nos tempos 72; 96; 120; 144; 168 e 192 horas. O melhor tempo de atividade de ramnosidase foram utilizados para conduzir todos os cultivos do delineamento de misturas (Figura 2).

4.2.4.2 Otimização das condições de FES para produção de α -L-ramnosidase

Para otimização das condições do cultivo, conduziu-se os ensaios dos delineamentos Box-Behnken 3³ e 3² (Tabelas 6 e 7). Para controle do pH inicial utilizou-se tampão ftalato-HCl ou ftalato-NaOH nos níveis de pH a serem testados nos delineamentos experimentais. As fermentações foram conduzidas a 28 °C, com umidade atmosférica controlada a 97 %. As triplicatas de cultivo foram coletadas em 120 horas.

4.2.5 Determinações Analíticas

Os cultivos foram interrompidos nos tempos determinados para cada experimento como descrito nos itens 4.2.4.1 e 4.2.4.2. Para a interrupção, foram adicionados, aos frascos Erlenmeyer, 5 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0, para facilitar a extração da enzima, em seguida, os cultivos foram filtrados em tecido e, o filtrado foi

centrifugado em 9.000 rpm à 4 °C por 30 minutos. Os sobrenadantes foram utilizados para as determinações analíticas.

4.2.5.1 Atividade de α -L-ramnosidase

A atividade de α -L-ramnosidase foi determinada segundo uma adaptação da metodologia utilizada por Koseki et al. (2008). A reação da enzima era composta pelo substrato naringina 0,5 % acrescido de 1,6 mL tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5 e 0,5 mL do extrato enzimático, a reação era incubada à 40°C por 20 min. Em seguida, era acrescentado 0,1 mL de NaOH 1 M para interromper a reação e 0,1 M de HCl 1 M para neutralizá-la. As reações foram armazenadas para posterior análise em CLAE-IR com coluna Aminex® HPX-87C, fase móvel água ultra pura, com fluxo de 0,6 mL/min a 55 °C, para quantificação da raminose liberada pela ação da enzima ramnosidase.

Os resultados de atividade enzimática foram expressos em U/mL, considerando uma unidade de atividade de α -L-ramnosidase como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 u mol de raminose por mililitro por minuto de reação sob as condições descritas. A solução de raminose 1mg/mL foi utilizada como padrão em CLAE, utilizando a área conhecida do padrão para converter a área de raminose, detectada na alíquota, em unidades de atividade enzimática.

4.2.5.2 Atividade de invertase

A atividade da invertase foi determinada de acordo com o método de Miller (1959). A reação enzimática era composta de 0,5 mL de sacarose 0,5 M adicionada em 1,5 mL de tampão acetato de sódio 0,2 M (pH 5,0) e 0,5 mL de sobrenadante. O branco da reação era composto de 2,5 mL do mesmo tampão. Como controles, foram preparados brancos do substrato e o sobrenadante também para todos os experimentos. Essas misturas foram incubadas a 30 °C por 10 min. Um mililitro do reagente DNS era então adicionado e em seguida os tubos eram submetidos a banho fervente por 10 min com posterior adição de 6,5 mL de água destilada. A intensidade da cor formada foi aferida em espectrofotômetro a 540nm.

Uma unidade de atividade enzimática foi determinada como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 u mol de açúcares redutores por mililitro por minuto de reação sob as condições descritas.

4.2.5.3 Açúcares totais

Os açúcares impregnados nos suportes foram quantificados e qualificados por CLAE-IR com coluna Aminex® HPX-87C, fase móvel água ultra-pura, com fluxo de 0,6 mL/min a 55 °C. Um volume de 30 mL de água ultra pura foi adicionada à 1 g dos suportes, a água de lavagem foi submetida a filtração e posterior análise cromatográfica.

Os açúcares totais do cultivo foram determinados segundo metodologia de fenol-sulfúrico, utilizada por Dubois et al. (1956).

4.2.6 Análise Estatística

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^2) e a falta de ajuste. A influência das variáveis foi visualizada através de gráficos tridimensionais de superfície de resposta. Para análises de diferença de médias foi empregado teste de Tukey (nível de significância de 5%).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados em forma de artigo, intitulado “**Otimização da produção de α -L-ramnosidase de *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido utilizando resíduos da agroindústria**”, que está apresentado no Apêndice A.

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

6 CONCLUSÃO

Os melhores tempos para produção de α -L-ramnosidase de *A. niger* por FES são 120, 144 e 168 horas de cultivo.

Dentre os suportes analisados, a mistura ternária do bagaço de cana-de-açúcar, casca de soja e palha de arroz, nas proporções 14, 25 e 61%, respectivamente, foi a melhor condição para produção de α -L-ramnosidase (1,92 U/mL). Os cultivos com elevadas concentrações de sacarose, provenientes dos suportes, inibiram a produção da enzima e induziram a produção de invertase.

A produção de α -L-ramnosidase pode ser aumentada com a otimização das condições de FES. O máximo de atividade obtido foi de 3,02 U/mL em cultivos com umidade de 75,5% e pH 4,0.

Obteve-se um valor 37 % maior que aquele obtido com o delineamento de misturas, destacando a importância da utilização de ferramentas estatísticas na otimização de bioprocessos e elevado aumento na produção dessa importante enzima de potencial biotecnológico.

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.
- ALONSO, F.O.M. Efeito da Agitação e Aeração na Produção de Lipases por *Yarrowia Lipolytica* (IMUFRJ 50682). Tese de Dissertação - Mestrado em Ciências da Saúde - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.
- ARASARATNAM, V.; MYLVAGANAM, K.; BALASUBRAMANIAM, K. Glucoamylase Production by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation with Paddy Husk as Support. *Journal of Food Science and Technology*, v.38, p.334–338, 2001.
- ASHOKKUMAR, B.; KAYALVIZHI, N.; GUNASEKARAN, P. Optimization of Media for β -Fructofuranosidase Production by *Aspergillus niger* in Submerged and Solid State Fermentation. *Process Biochemistry*, v.37, p.331–338, 2001.
- BAJRACHARYA, R.; MUDGETT, R. Effects of controlled gas environments in solid-substrate fermentations of rice, *Biotechnology and Bioengineering*. v.22, p.2219-2235, 1985.
- BARMORE, C. R.; FISHER, J. F.; FELLER, P. J.; ROUSEFF, R. L. Reduction of Bitterness and Tartness in Grapefruit Juice with Florisil. *Journal of Food Science*, v. 51, p. 415, 1986.
- 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.
- BLASI, D. A.; DROUILLARD, J. S.; TITGEMEYER, E. C. Soybean Hulls: Composition and Feeding Value for Beef and Dairy Cattle. MF-2438. Kansas State University. Manhanttan, KS, 2000.
- BRADFORD, A. M. Debittering and Upgrading Citrus Juice and By-Products Using Combined Technology, Koch Membrane Systems, 2007.
- CARDOSO, I. C.; PEREIRA, K. C.; SILVA, N. K. G.; BARBOSA, R. C.; CARDOSO, V. L.; FILHO, U. C. Fermentação do Soro do Leite por *Aspergillus niger* para Produção Enzimática. 4º Semana do Servidor e 5º Semana Acadêmica, Universidade Federal de Uberlândia, 2008.
- CHANDLER, B. V.; KEFFORD, J. F.; ZEMELIS, G. Removal of Limonin from Bitter Orange Juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, v.19, p.83-86, 1968.
- 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.

CHENYU, D.; LIN, S. K. C.; KOUTINAS, A.; WANG, R.; DORADO, P.; WEEB, C. A. Wheat Biorefining Strategy Base Don Solid State Fermentation for Fermentative Production of Succinic Acid. *Bioresource Technology*. Doi:10.1016/j.biortech.2008.03.019, 2008.

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, 2009. Disponível em <<http://www.citrusbr.com/exportadores-citricos/noticias/análise-citricultura-189733-1.asp>> Acesso em 28/10/2010.

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.

CUSTODIO, G. M. V.; PINAGA-OTAMENDI, F.; VIDAL, D. R.; VALLES ALVENTOSA, S. Production and Characterization of an *Aspergillus terreus*: Alpha-L-Rhamnosidase of Oenological Interest. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, v.203, p.522-527, 1996.

DAVIS, W. B. Determination of Flavanones in Citrus Fruits. *Analytical Biochemistry*, v.19, p.476-478, 1947.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. *Biotecnologia Industrial: Fermentação em Estado Sólido*. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, v. 2, 2001.

DEL RIO, J. A.; ARCAS, M. C.; BENAVENTE, O.; SABATER, F.; ORTUÑO, A. Changes of Polymethoxylated Flavones Levels During Development of *Citrus aurantium* (Cv. Seviliano) Fruits. *Planta Médica* v.64, p.575-576, 1998.

DELLA, V. P.; HOTZA, D. Estudo Comparativo entre Sílica Obtida por Lixívia Ácida da Casca de Arroz e Sílica Obtida por Tratamento Térmico da Cinza de Casca de Arroz. *Quimica Nova*, v. 29, n. 6, p.1175-179, 2006.

DUBOIS, M.; GILLES K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, v.28, p.350-356, 1956.

ELINBAUM, S.; FERREYRA, H.; ELLENRIEDER, G.; CUEVAS, C. Production of *Aspergillus terreus* Rhamnosidase by Solid-State Fermentation. *Applied Microbiology*, v.34, p.67-71, 2002.

ELLENRIEDER, G.; BLANCO, S.; DAZ, M. Hydrolysis of Supersaturated Naringin Solutions by Free and Immobilized Naringinase. *Biotechnology Techniques*, v.12, p.63-65, 1998.

FALONY, G.; ARMAS, J. C.; MENDOZA, J. C. D.; HERNANDEZ, J. L. M. Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, v.44, n.2, p.235–240, 2006.

FANG, T. J.; LIAO, B.; Lee, S. Enhanced Production of Xylanase by *Aspergillus carneus* M34 in Solid State Fermentation with Agricultural Waste Using Statistical Approach. *New Biotechnology*, v.27, n. 1, 2010.

FUNDECITRUS - FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. Divulgado o novo mapeamento do sistema agroindustrial citrícola. Disponível em <http://www.fundecitrus.com.br/informativo/nota_mapcadeia0404.html>. Acesso em: 08/02/2010.

GATTUSO, G.; BARRECA, D.; GARGIULLI, C.; LEUZZI, H.; CARIST, C. Flavonoid Composition of Citrus Juices. *Molecules*, v. 12, p.1641-1673, 2007.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The Role of Water in Solid State Fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, n.2/3, p.85-101, 2003.

GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; SCARMINIO, I. S.; BARBOSA, A. M.; SILVA, R. Comparison of β -1,3-Glucanase Production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 and *Trichoderma harzianum* Rifai and its Optimization Using a Statistical Mixture-Design. *Biochemical Engineering Journal*, doi:10.1016/j.bej.2010.10.013, in press, 2010.

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 α -L-Rhamnosidases, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, p.6136-142, 2004.

GUPTA, A.; GUPTA, V. K.; MODI, V. R.; YADAVA, L. P. Production and Characterization of α -Amilase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology*, v.3, p.551-56, 2008. IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Produção Agrícola Municipal, v. 34, p.1-69, 2007.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2008. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/>> acessado em outubro de 2010.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2009. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/>> acessado em outubro de 2010.

IMANDI, Z. S. B; BANDARU, V. V. R.; SOMALANKA, S. R.; BANDARU, S. R.; GARAPATI, H. R. Application of Statistical Experimental Designs for the Optimization of Medium Constituents for the Production of Citric Acid from Pineapple Waste. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 4445-450, 2008.

KIMBALL, DAN A. *Citrus Processing: Quality Control and Technology*, 1991.

KOSEKI, T.; MESE, Y.; NISHIBORI, N.; MASAKI, K.; FUJII, T.; HANDA T.; YAMANE, Y.; SHIONO, Y.; MURAYAMA, T.; IEFUJI, H. Characterization of an α -L-Rhamnosidase from *Aspergillus kawachii* and its Gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 80, p.1007–1013, 2008.

LEONI, R.S. Desenvolvimento de Suco Misto de Frutas e Hortaliça para Melhoria da Qualidade Nutricional e Funcional. Tese de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Viçosa, 2009.

- MACIEL, G. M.; VANDENBERGHE, L. P. S.; HAMINIUK, C. W. I.; FENDRICH, R. C.; BIANCA, B. E. D.; BRANDALIZE, T. Q. S.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Xylanase Production by *Aspergillus niger* LPB 326 in Solid-State Fermentation Using Statistical Experimental Designs. *Food Technology and Biotechnology*, v.46, n.2, p. 183–189, 2008.
- MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of Acidic Lipase by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation. *Process Biochemistry*, v.38, p.715-721, 2002.
- MANZANARES, P.; OREJAS, M.; IBANEZ, E.; VALLÉS, S.; RAMÓN, D. Purification and Characterization of an α -L-Rhamnosidase from *Aspergillus nidulans*. *Letters in Applied Microbiology*, v.31, p. 198-202, 2000.
- MANZANARES, P.; GRAAFF, L. H.; VISSER, J. Purification and Characterization of an α -L-Rhamnosidase from *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiology Letters*, v.157, p. 279-283, 1997.
- 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 α -L-Rhamnosidases. *Biocatalysis and Biotransformation*, v.26, p.177–85,2008.
- MILLER G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugars. *Analytical Chemistry*, v.31, p. 426-428, 1959.
- MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Overview of Solid State Bioprocessing and Biotechnology, *Annual Rev.*, v. 8, p. 183-225, 2002.
- MONGKOLKUL, P.; RODART, P.; PIPATTHITILORN, T.; MEKSUT, L.; SANGUANDEEKUL, R. Debittering of Tangerine *Citrus reticulata* Blanco Juice by β -Cyclodextrin Polymer. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v.56, p.167-170, 2006.
- MORAIS, J. B. Substituição do Feno de Coastcross (*Cynodon Spp*) por Casca de Soja na Alimentação de Borregas(Os) Confinadas(Os). Tese de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003.
- MUSSATTO, S. I. Influência do Tratamento do Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz na Produção de Xilitol por *Candida guilliermondii*. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena (SP), pp. 173, 2002.
- NIZAMUDDIN, S.; SRIDEVI, A.; NARASIMHA, G. Production of α -Galactosidase by *Aspergillus oryzae* in Solid State Fermentation. *African Journal of Biotechnology*, v.7, n. 8, p. 1096-100, 2008.
- OREJAS, M.; IBANEZ, E.; RAMON, D. The Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans* Produces a Rhamnosidase of Potential Ecological Interest. *Letters in Applied Microbiology*, v. 28, p. 383-388. 1999.

- OROZCO, A. L.; PÉRE, M. I.; GUEVARA, O.; RODRIGUEZ, J; HERNANDEZ, M.; GONZALEZ-VILA, F. J.; POLVILLO, O.; ARIAS, M. E. Biotechnological Enhancement of Coffee Pulp Residues by Solid State Fermentation with *Streptomyces*. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v.81, p. 247-52, 2008.
- 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. 13, p.81-84, 2003. PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes. *Current Science.*, v. 77, p.149-162, 1999.
- PARANHOS, S. B. Cana-de-Açúcar: Cultivo e Utilização. Campinas, Fundação Cargill v2, 856p,1987. PARANTHAMAN, R.; ALAGSUNDARAM, K.; NIGAM, P. Production of Protease from Rice Mill Wastes by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation. *World Journal of Agricultural Sciences*, v. 5, n. 3, p. 308-12, 2009.
- PARIZA M. W.; JOHNSON, E. A. Evaluating the Safety of Microbial Enzyme Preparations Used in Food Processing: Update for a New Century. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.33, p.173–186, 2001.
- PATIL, S. R.; DAYANAND, A. Optimization of Process for the Production of Fungal Pectinases from Deseeded Sunflower Head in Submerged and Solid-State Conditions. *Bioresource Technology*, v.97, p. 2340-344, 2006.
- PEDRO, H. A. L.; ALFAIA, A. J.; MARQUES, J.; VILA-REAL, H. J.; CALADO, A.; RIBEIRO, M. H. L. Design of an Immobilized Enzyme System for Naringin Hydrolysis at High-Pressure. *Enzyme and Microbiol Technology*, v.40, p.442–446, 2007.
- PÉREZ-ROSES, R.; PÉREZ-GUERRA, N. Optimization of Amylase Production by *Aspergillus niger* in Solid-State Fermentation Using Sugarcane Bagasse as Solid Support Material. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 25, p.1929–939, 2009.
- 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 de Doutorado-Programa de Pós-graduação de Tecnologia de Processos. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2003.
- PURI, A. Preparation and Properties of Citrus Juices, Concentrates and Dried Powders Which are Reduced in Bitterness. U.S. Patente 2816033. 1984.
- 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 Bioch.*,v.40, p.195-201, 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*, DOI 10.1007/s12010-009-8765-y, 2009.

- 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.
- RAIMBAULT, M. General and Microbiological Aspects of Solid Substrate Fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.1, n.3, 1998.
- RAJAL, V. B.; CID, A. G.; ELLENRIEDER, G.; CUEVAS, C. M. Production, Partial Purification and Characterization of α -L-Rhamnosidase from *Penicillium ulaiense*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.25, p.1025-1033, 2009.
- RIBEIRO I. A.; RIBEIRO, M. H. L. Naringin and Naringenin Determination and Control in Grapefruit Juice by a Validated HPLC Method. *Food Control*, v.19, p.432–438, 2008.
- 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.
- ROBINSON, T.; NIGAM, P. Bioreactor Design for Protein Enrichment of Agricultural Residues by Solid State Fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 197-203, 2003.
- ROCHA, C. P.; RODRIGUES, A. B. C.; ALMEIDA, C. A. V.; CARDOSO V. L. and COUTINHO FILHO U. Cellulase and Amilase Production by *Aspergillus niger* in Solid State Processes Using Fixed-Bed Column Reactors and Waste from Rice and Passion Fruit Production. *Symposium on biotechnology for Fuels and Chemicals*, 2010.
- SANTOS, S. F. M.; MACEDO, G. R. Aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta no Estudo da Produção de Poligalacturonase. *Quimica Nova*, v. 31, n. 8, p. 1973-978, 2008.
- SANTOS, S. F. M. Estudo da Produção de Pectinases por Fermentação em Estado Sólido Utilizando Pedúnculo de Caju como Substrato. *Tese De Doutorado, Universidade Federal Do Rio Grande Do Norte*, 2007.
- SCARONI, E.; CUEVAS, C.; CARRILLO, L.; ELLENRIEDER, G. Hydrolytic Properties of Crude α -L-Rhamnosidases Produced by Several Wild Strains of Mesophilic Fungi. *Letters in Applied Microbiology*, v. 34, p.461-465, 2002.
- 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.; FADILUOLU, 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.
- SHAW, P. E.; TATUM, J. H.; WILSON, C. W. Improved Flavour of Navel Orange and Grapefruit Juices by Removal of Bitter Components with β -Cyclodextrin Polymer. *Journal of agricultural and food chemistry*,v.32, p.832-836, 1984.
- SHAW, P. E.; WILSON, C. W. Debittering Citrus Juices with β -cyclodextrin Polymer. *Journal of Food Science*, v. 48, p.646, 1983. 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.

SOARES P. K.; BRUNS R. E.; SCARMINIO I. S. Statistical Mixture Design Investigation of Fractionated and Total Extracts from *Erythrina speciosa* Andrews Leaves. *Journal of Separation Science*, v.32, n.4, p.644-52, 2009.

SOARES, N. F. F.; HOTCHKISS, J. Bitterness Reduction in Grapefruit Juice Through Active Packaging. *Packaging Technology and Science*, v.11, p.9-18, 1998.

SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of Applied Solid State Fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 205-218, 2003.

SORIA, F.F.; CUEVAS, C.; ELLENRIEDER, G. Purification and Some Properties of α -L-Rhamnosidase of *Aspergillus terreus*. *Applied Biological Science*, v.5, p.109-120, 1999.

SORIA, F.; ELLENRIEDER, G.; GRASSELLI, M.; NAVARRO del CAÑIZO, 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 – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, 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: α -L-Rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* to Increase the Aroma of Moscato Wine. *Enzyme and Microbial Technology*, v.27, p.522-530, 2000.

TEIXEIRA, F. A. REDVET. Revista eletrônica de Veterinária 1695-7504, 2007 Volume VIII Número 6. Disponível em <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060607/060708.pdf> Acesso em 09/11/2010.

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.

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.

USTOK, F. I.; TARI, C.; GOGUS, N. Solid State Production of Polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. *Journal of Biotechnology*, v.127, p. 322-334, 2007.
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.

VILA-REAL, H. J.; ALFAIA, A. J.; CALADO, A. T.; RIBEIRO, M. H. L. High Pressure-Temperature Effects on Enzymatic Activity. Naringin Bioconversion. *Food Chemistry*, v.102, p.565-570, 2007.

YADAV, S., YADAV, K.D.S. Secretion of α -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. α -L-Rhamnosidase: A Review. Process Biochemistry, v. 45, p.1226–1235, 2010.

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

APÊNDICES

APÊNDICE A

Artigo “Otimização da produção de α -L-ramnosidase de *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido utilizando resíduos da agroindústria.”

Título:

“Otimização da produção de α -L-ramnosidase de *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido utilizando resíduos da agroindústria.”

"Optimization of the production of α -L-rhamnosidase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation using agro-industrial residues."

Autores: Adriana Casavechia Petri¹, Dionisio Borsato², Maria Antonia P. C. Celligoi¹ e João Batista Buzato¹.

Afiliação: ¹ Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, caixa postal 6001, CEP: 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

² Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, caixa postal 6001, CEP: 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

Correspondência do autor: João Batista Buzato¹

E-mail: buzato@uel.br Tel: +55 43 3371-4270 – Fax: + 55 43 3371-4054

RESUMO: α -L-Ramnosidase cliva especificamente a raminose terminal de uma grande variedade de produtos naturais. Essa propriedade confere a enzima importante potencial biotecnológico, uma vez que possibilita uma diversidade de aplicações, tais como remoção do amargor de concentrados cítricos, melhoria do aroma de vinhos e conversão de esteróides de importante aplicação clínica. Este trabalho otimizou a produção de α -L-ramnosidase de *Aspergillus niger* 426 por FES utilizando metodologia estatística e foi conduzido em duas etapas. No primeiro momento, utilizou-se 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, realizou-se o delineamento Box-Behnken ³² para otimização da umidade do cultivo e pH da solução de nutrientes na produção da enzima. A atividade de α -L-ramnosidase foi aumentada para 3,02U/mL em cultivos com umidade de 75,5% e pH 4,0.

Palavras-chave: α -L-ramnosidase. *Aspergillus niger*. Delineamento de misturas. Delineamento de Box-Behnken. Fermentação em estado sólido.

1 INTRODUÇÃO

A α -L-ramnosidase é uma enzima que cataliza a hidrólise das ligações glicosídicas entre a raminose e outros compostos [1]. Faz parte do complexo enzimático denominado de naringinase, que hidrolisa a naringina pela porção α -L-ramnosidase (EC 3.2.1.40) para produzir raminose e prunina, então convertida pela porção β -D-glucosidase (EC 3.2.1.21) em glicose e naringinina [2]. Apresenta potencial uso na indústria de sucos cítricos na retirada do amargor [3]; aumenta a solubilidade de pectinas e neohesperidina [4], evitando a precipitação em tanques da indústria de sucos de frutas [5]; na indústria vinícola, promove o aumento no aroma de sucos de uva e vinho [1,6], na indústria de bebidas funcionais, aumenta a biodisponibilidade de flavonóides glicosídicos [8]; na indústria farmacêutica, realiza a deraminosilação de uma vasta variedade de produtos naturais que contém L-raminose terminal [7].

A produção do complexo enzimático naringinase vem sendo estudada por processos de fermentação em estado sólido (FES) [9,10]. Em FES, o crescimento do microrganismo ocorre em substratos/suportes na ausência de água livre [11], sendo uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais [12,13].

Na produção de enzimas fungicas, o estabelecimento das condições otimizadas de fermentação tem sido extensivamente usado o delineamento fatorial em FES [14-16]. Mais recentemente, tem sido aplicado o delineamento de misturas quando objetiva a otimização da proporção de três ou mais componentes [17,18].

O presente trabalho objetivou a otimização, por meio de delineamento de mistura e fatorial, da produção de α -L-ramnosidase de *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido utilizando resíduos da agroindústria.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMO

A cepa de *Aspergillus niger* 426 foi isolada de ameixa seca e identificada pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), UNICAMP, Brasil.

2.2 CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

Bagaço de cana-de-açúcar, casca de soja e palha de arroz foram utilizados como suporte para FES. Os cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer 125mL e os suportes misturados em 12 mL de solução nutriente (g/L): $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 5,0; K_2HPO_4 1,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; KCl 0,5; Extrato de levedura 5 e Naringina 10. Para cada litro de solução de nutrientes foi adicionado 1 mL da solução de micronutrientes (g/L): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,8; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,8; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,008; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,8; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,4; $\text{NaB}^4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0,04. O pH inicial dos cultivos foi ajustado para 4,5. O inoculo foi de 10^9 esporos/mL. Os frascos de cultivo foram incubados a 28 °C, com umidade atmosférica controlada a 97 %. O extrato enzimático, livre de células, foi obtido por centrifugação (7700 g / 30 min a 4 °C) e utilizado para as determinações analíticas.

2.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

2.3.1 Seleção do Suporte para Produção de α -L-ramnosidase

Foi utilizado o planejamento simplex-centróide (Figura 1), com 2^{q-1} combinações de misturas onde q é o número de componentes ou variáveis cuja soma é 1 ou 100 %, para 3 componentes (bagaço de cana-de-açúcar, casca de soja e palha de arroz) com duas repetições no ponto central [18]. A quantidade utilizada de cada suporte foi correspondente àquela necessária para absorver 12mL da solução de nutrientes sem que houvesse a presença de água livre aparente [9]. Sendo assim, nos ensaios de suporte único (100%) utilizou-se 1 g para bagaço de cana-de-açúcar, 5 g para casca de soja e 5 g para palha de arroz.

Figura 1.

Utilizou-se o modelo cúbico especial para representar a média da variável 108 resposta em função dos fatores, descrito na Equação 1.

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

onde: Y é a atividade de α -L-ramnosidase (U/mL), x_1 o bagaço de cana-de-açúcar, x_2 a casca de soja e x_3 a palha de arroz e γ os parâmetros estimados . As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Statistica v.9.0 [19].

2.3.2 Otimização das Variáveis para FES na Produção de α -L-ramnosidase

A otimização das variáveis para FES foi realizada com a proporção de suporte 119 selecionado no delineamento de misturas. O controle do pH inicial foi feito com 120 tampão ftalato-HCl ou ftalato-NaOH, de acordo com os níveis de pH a serem 121 testados nos delineamentos experimentais.

Foi utilizado o planejamento fatorial incompleto 3^3 de Box-Behnken para determinar a melhor condição para produção de α -L-ramnosidase. Foram analisadas três variáveis independentes (umidade do cultivo, granulometria do suporte e pH da solução de nutrientes) com três níveis (-1, 0 e 1).

Em seguida, um planejamento fatorial completo 3^2 de Box-Behnken foi empregado para estudar as melhores condições para produção de α -L-ramnosidase. Foram analisadas duas variáveis independentes (umidade do cultivo e pH da solução de nutrientes) com três níveis (-1, 0 e 1) [20].

2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

O extrato enzimático foi obtido pela adição de 5 mL de tampão acetato de sódio (50 μ M pH 4) no cultivo e seguido de homogeneização, filtração e centrifugação (7700g durante 30 minutos a 4°C). No sobrenadante obtido, dosou-se α -L-ramnosidase, invertase e açúcar total. A atividade de α -L-ramnosidase foi determinada segundo uma adaptação de Koseki et al. [21]. A mistura reacional constituía de 0,8 mL naringina (5 g/L) acrescido de 1,6

mL tampão acetato de sódio (50 mM, pH 4) e 0,5 mL do extrato enzimático. A mistura foi incubada à 40 °C por 20 min. Para interromper a reação, adicionou-se 0,1 mL de NaOH 1 M, seguida de neutralização com 0,1 mL de HCl 1M. A seguir, eram retiradas alíquotas para quantificação de raminose por CLAE-IR com coluna Aminex[®] HPX-87C, fase móvel água ultra pura, com fluxo de 0,6 mL/min a 55 °C. Uma unidade de atividade de α -L-ramnosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de raminose por minuto de reação sob as condições descritas. A atividade da invertase foi determinada de acordo com o método de Miller [22]. Os açúcares totais do cultivo foram determinados segundo metodologia de fenol-sulfúrico, utilizada por Dubois et al [23]. Os açúcares solúveis, impregnados nos suportes, foram qualificados por CLAE- IR com coluna Aminex[®] HPX-87C, fase móvel água ultra-pura, com fluxo de 0,6 mL/min a 55 °C. Um volume de 30 mL de água ultra pura foi adicionada à 1 g do suporte e homogeneizado por 60 min. Após a filtração, conduziu-se a análise cromatográfica.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SELEÇÃO DE SUPORTE PARA PRODUÇÃO DE α -L-RAMNOSIDASE

Na etapa de seleção do suporte, inicialmente foi conduzida uma cinética de fermentação do ponto central do delineamento de misturas para determinar o melhor tempo para produção da enzima. O ponto central foi composto de uma mistura ternária de 33,33% de cada suporte (bagaço de cana-de-açúcar, casca de soja e palha de arroz). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 2 que mostra que as maiores atividades enzimáticas de 1,71; 1,67 e 1,65 U/mL foram obtidas nos tempos de 120; 144 e 168 horas de cultivo, respectivamente. Em fermentação submersa, esses foram os melhores tempos na seleção da fonte de carbono e nitrogênio nos estudos de Puri et al [2], Rosa et al [24] e Machado et al [25] utilizando meio complexo e de Custodio et al [26] em meio definido. Em FES, esses também foram os melhores tempos para produção de ramnosidase no estudo de Elinbaum et al [9] que estudaram a seleção do suporte e outros fatores de fermentação.

Figura 2.

A análise do teste de Tukey não mostrou diferença significativa para as médias 187 de produção enzimática entre os dois primeiros tempos ($p < 0,05$). Sendo assim, 188 conduziu-se os ensaios do delineamento de misturas no tempo de 120 horas por 189 apresentar maior produtividade ($0,014 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Os resultados obtidos estão 190 apresentados na Tabela 1.

Tabela 1.

Os dados foram analisados estatisticamente com o objetivo de selecionar a 195 melhor proporção dos suportes para produção da enzima e ajustados ao modelo 196 cúbico especial, apresentado pela equação 2, onde os termos com asterisco são 197 significativos em nível de 5%

$$Y = 0,362x_1 + 0,648^*x_2 + 1,940^*x_3 + 6,000^*x_1x_2 + 1,8696x_1x_3 + 2,572^*x_2x_3 - 5,379x_1x_2x_3 \quad (2)$$

Os valores obtidos mostram que a palha de arroz teve maior influência na produção da enzima, sua presença nos cultivos é essencial para aumento da atividade.

Observa-se na equação 2 que os parâmetros de x_2 ; x_3 ; x_1x_2 e x_2x_3 são significativos ($p < 0,05$), com R^2 ajustado de 0,989, indicando que o modelo explicou 98,9 % da variação dos dados experimentais. Além disso, a análise da variância mostrou que o modelo é significativo em nível de 1,37 %, e, portanto, a equação pode ser utilizada para fins preditivos.

A região de combinação ternária entre as variáveis independentes x_1 , x_2 e x_3 pode ser observada através das curvas de nível apresentadas na Figura 3. A figura mostra as regiões de contorno da superfície de resposta para a variável dependente, produção de α -L-ramnosidase, obtidas pelo modelo matemático (eq. 2). A figura 3 mostra uma ampla região de elevada produção de ramnosidase. A figura também mostrou que as regiões com grande proporção tanto de bagaço de cana-de-açúcar, como de casca de soja promoveram um decréscimo na atividade de ramnosidase.

Figura 3

A resposta da produção de ramnosidase pode ser classificada em dois grupos: cultivos com baixa atividade de ramnosidase (ensaios 1 e 2) e os demais cultivos com elevada atividade de ramnosidase. Os ensaios 1, 2, 3 e 4 requerem discussão e as determinações de ramnosidase, invertase e consumo de açúcar estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2

No ensaio 1 (bagaço de cana-de-açúcar) o consumo de açúcar foi satisfatório. O valor de invertase foi o mais alto (Tabela 2) que sugere a maior quantidade de sacarose impregnada no suporte, o que resultou em inibição de ramnosidase. No ensaio 2 (casca de soja) o consumo de açúcar foi o menor. Sugere-se que a variedade de açúcares impregnados no suporte resultou na inibição da atividade de ramnosidase. A atividade de invertase foi menor que no ensaio 1 (Tabela 2) assim, a quantidade de sacarose era moderada, insuficiente para inibir a ramnosidase. No ensaio 3 (palha de arroz) obteve-se o maior consumo de açúcar. A atividade de invertase foi a mais baixa (Tabela 2) que sugere a menor quantidade de sacarose e ausência da inibição e portanto, a atividade de ramnosidase foi elevada. No ensaio 4 (mistura de bagaço de cana-de-açúcar e casca de soja) o consumo de açúcar foi semelhante ao ensaio 1. A atividade de ramnosidase foi elevada devido aos fatores seguintes: a quantidade da variedade de açúcares, impregnados na casca de soja, era a metade

em comparação com o ensaio 2 e a quantidade de sacarose era moderada (invertase semelhante ao ensaio 2).

Esses resultados mostraram que a atividade de α -L-ramnosidase estava relacionada à quantidade e à variedade de açúcares impregnados nos suportes utilizados. Concentrações elevadas de sacarose causou repressão do complexo naringinase, que contém α -L-ramnosidase [3, 25]. Kumar et al [27] também reportaram que a presença de carboidratos induz a produção da enzima desde que em baixas concentrações. A análise qualitativa em HPLC dos açúcares impregnados nos suportes mostrou que a casca de soja apresentava glicose, sacarose, arabinose, galactose e estaquiase. Enquanto que, o bagaço de cana-de-açúcar continha sacarose e glicose e a palha de arroz somente sacarose. A variedade de açúcares presentes na casca de soja sugere uma mudança no metabolismo de *A. niger* e, como consequência diminuição da atividade de α -L-ramnosidase. Monti et al. [28] reportaram que a escolha dos açúcares para o cultivo assegura o metabolismo do micro-organismo direcionado na produção de α -L-ramnosidase, evitando a presença de outras enzimas. Mendoza-Cal et al [10] reportaram que a atividade de naringinase era elevada em cultivos que continham o menor variedade de monossacarídeos inibidores de naringinase.

Os resultados obtidos foram objeto de uma análise preditiva, que estimou uma atividade máxima de α -L-ramnosidase 2,03 U/mL, em cultivo com 14% do bagaço de cana-de-açúcar, 25 % de casca de soja e 61% de palha de arroz (Figura 4). Um cultivo adicional foi feito para a validação do modelo proposto. O resultado obtido foi de $1,92 \pm 0,02$ U/mL, o que corresponde à 94,7 % do valor esperado, comprovando a eficácia preditiva do modelo, o que confirma a escolha das proporções do suporte.

Figura 4

A produção de α -L-ramnosidase, com a mistura dos três suportes, em nosso trabalho foi maior que de Elinbaum et al [9]. Na etapa de seleção de suporte, em cultivo utilizando bagaço de cana-de-açúcar lavado, esses autores obtiveram uma produção de 1,7 U/mL de α -L-ramnosidase de *A. terreus*. Mendoza-Cal et al [10] também reportaram uma produção inferior (1,46 U/mL) de naringinase de *A. niger* em FES, usando somente casca de pomelo como suporte. A busca por melhoria de produção em FES estuda características dos suportes (porosidade, granulometria e formato das partículas) [12]. Além disso, também são importantes a umidade e o pH do cultivo. Tendo como base os resultado obtidos a partir do

delineamento de misturas (Figura 4), conduziu-se os delineamentos de Box-Behnken para otimização das condições de FES para produção de α -L-ramnosidase.

3.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE FES PARA PRODUÇÃO DE α -L-RAMNOSIDASE

Os experimentos foram conduzidos de acordo com o delineamento Box-Behnken 3^3 para analisar a produção de α -L-ramnosidase. Os níveis de variação estão apresentados na Tabela 3 e as atividades enzimáticas obtidas estão apresentados na Figura 5.

Tabela 3

Figura 5

Os dados obtidos da produção de ramnosidase foram submetidos a análise de variância (ANOVA). A análise mostrou que as variáveis independentes umidade do cultivo e o pH da solução de nutrientes foram significativas ($p < 0,05$) enquanto que, a granulometria do suporte não foi significativa, no processo, podendo ser utilizada em qualquer nível estudado. Ainda que outros autores tenham reportado os efeitos da granulometria dos suportes para produção de outras enzimas de *A. niger* [29-31], nenhum estudo determinou que a granulometria foi a variável fundamental para produção do complexo naringinase. Considerando a análise dos resultados do delineamento incompleto 3^3 de Box-Behnken, conduziu-se os ensaios do delineamento completo 3^2 fixando-se a granulometria em 1,5mm. As atividades da enzima estão apresentadas na Tabela 4. A melhor atividade de α -L-ramnosidase obtida foi de 2,96 U/mL em cultivo com pH 4,0 e umidade do cultivo de 73 %.

Tabela 4

A significância dos efeitos das variáveis na produção de α -L-ramnosidase foi analisada por análise de variância (ANOVA) e os dados estão apresentados na Tabela 5. A umidade e o pH do cultivo foram altamente significativas para a produção da enzima ($p < 0,05$). Estudos de Singhanian et al [11] e Hamidi-Esfahani et al [32] enfatizaram a importância dessas variáveis na produção de enzimas por *A. niger*.

Tabela 5.

A superfície de resposta (Figura 6) mostra que, nos níveis estudados, a atividade de α -L-ramnosidase foi maior no menor valor da umidade (73 %) e no maior valor de pH do cultivo (4,0).

Figura 6

Esses resultados foram submetidos a uma análise preditiva, que estimou uma atividade máxima de α -L-ramnosidase 3,10 U/mL, em cultivo com umidade de 75,5 % e pH 4,0. Um cultivo adicional foi feito para a validação. O resultado obtido foi de $3,02 \pm 0,03$ U/mL, o que corresponde à 97,4 % do valor esperado, comprovando a eficácia preditiva do modelo, confirmando a determinação das condições ótimas do cultivo.

Tem sido reportado que, para fungos filamentosos, baixas umidades (40-60 %) são adequadas para produção enzimática [33]. Entretanto, os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que a umidade de 75,5 % proporcionou a melhor produção de α -L-ramnosidase. Essa alta produção da enzima em elevada umidade está em concordância com Singhania et al [11], que afirmaram que baixas umidades reduzem a acessibilidade de nutrientes resultando em diminuição de crescimento.

O valor ótimo encontrado para pH foi de 4,0. Trabalhos recentes têm relatado que a produção de α -L-ramnosidase por *Aspergillus* é favorecida em valores de pH entre 4-6,5 [7,31,34].

O valor máximo de 3,02U/mL deste trabalho foi superior ao de Mendoza-Cal et al. [10] que usaram casca de pomelo como suporte. Esses autores conseguiram 2,58 U/mL de produção após otimizar o pH, a atividade de água e a temperatura do cultivo. A produtividade obtida neste trabalho foi superior à de Elinbaum et al. [9] que usaram bagaço de cana-de-açúcar como suporte.

Com a aplicação de metodologia estatística, obteve-se um valor 37 % maior que aquele obtido com o delineamento de mistura para produção dessa importante enzima de potencial biotecnológico.

REFERÊNCIAS

- [1] Yanai T, Sato M. Purification and Characterization of an α -L-Rhamnosidase from *Pichia Angusta* x349. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2000, 64: 2179- 2185.
- [2] Puri M, Banerjee A, Banerjee UC. Optimization of Process Parameters for the Production of Naringinase by *Aspergillus Niger* MTCC 1344. *Process Biochemistry* 2005, 40:195-201.
- [3] Puri M, Banerjee UC. Production, Purification, and Characterization of the Debittering Enzyme Naringinase. *Biotechnology Advances* 2000, 18: 207-217.
- [4] Martearena MR, Daz M, Ellenrieder G. Synthesis of Rutinosides and Rutinose by Reverse Hydrolysis Catalyzed by Fungal α -L-Rhamnosidases. *Biocatalysis and Biotransformation* 2008, 26:177-85.
- [5] Spagna G, Barbagallo RN, Martino A, Pifferi PJ. A Simple Method for Purifying Glycosidases: α -L-Rhamnopyranosidase from *Aspergillus Niger* to Increase the Aroma of Moscato Wine. *Enzyme and Microbial Technology* 2000, 27:522-530.
- [6] Manzanares P, Orejas M, Ibanez E, Vallés S, Ramón D. Purification and Characterization of an α -L-Rhamnosidase from *Aspergillus Nidulans*. *Letters in Applied Microbiology* 2000, 31:198-202.
- [7] Gonzalez-Barrio R, Trindade LM, Manzanares P, Graaff LH, Tomas-Barberan AF, Espián JC. Production of Bioavailable Flavonoid Glucosides in Fruit Juices and Green Tea by Use of Fungal α -L-Rhamnosidases, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004, 52:6136-6142.
- [8] Yadav V, Yadav PK, Yadav S, Yadav KDS. α -L-Rhamnosidase: A Review. *Process Biochemistry* 2010, 45:1226-1235.
- [9] Elinbaum S, Ferreyra H, Ellenrieder G, Cuevas C. Production of *Aspergillus Terreus* Rhamnosidase by Solid-State Fermentation. *Applied Microbiology* 2002, 34:67-71.
- [10] Mendoza-Cal A, Cuevas L, Lizama-Uc, G, Ortiz-Vazquez E. Naringinase Production from Filamentous Fungi Using Grapefruit Rind in Solid State Fermentation. *African Journal of microbiology Research* 2010, 4(9):1964-1969.
- [11] Singhania RR, Patelb AK, Soccol CR, Pandey A. Recent advances in solid- state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 2009, 44(1):13-18.
- [12] Pandey A. Solid-State Fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 2003, 13:81-84.
- [13] Hölker U, Höfer M, Lenz J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2004, 65:175-186.
- [14] Lakshmi GS, Rao SC, Rao RS, Hobbs PJ and Prakasham RS. Enhanced production of xylanase by a newly isolated *Aspergillus terreus* under solid state fermentation using palm industrial waste: A statistical optimization. *Biochemical Engineering Journal* 2009, v. 48 (1): 51-57.

- [15] Balasubramaniam AK, Nagarajan KV, Paramasamy G. Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochemistry* 2001, v.36 (12): 1241-1247.
- [16] Chen H, Chen X, Chen T, Xu X, Jin Z. Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers* 2011, v.86 (1): 249-254.
- [17] Giese EC, Dekker RFH, Scarlinio IS, Barbosa AM, Silva R. Comparison of β -1,3-glucanase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 and *Trichoderma harzianum* Rifai and its optimization using a statistical. *Biochemical Engineering Journal* 2010, doi: 10.1016/j.bej.2010.10.013.
- [18] Cornell JA. *Experiments with Mixtures: Designs, Models and the Analysis of Mixture Data*. New York: John Wiley and Sons, 3rd edition, 2002.
- [19] Statistica for Windows Software, 9.0, Tulsa, OK, USA, 2009.
- [20] Calado V, Montgomery D. *Planejamento de experimentos usando o Statistica*. Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais, 2003.
- [21] Koseki T, Mese Y, Nishibori N, Masaki K, Fujii T, Handa T, Yamane Y, Shiono Y, Murayama T, Iefuji H. Characterization of an α -L-Rhamnosidase from *Aspergillus Kawachii* and its Gene. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008, 80:1007-1013
- [22] Miller G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugars. *Analytical Chemistry*, v.31, p. 426-428, 1959.
- [23] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* 1956, 28:350-356.
- [24] Rosa CBS, Borsato D, Buzato JB, Celligoi MAPC. Naringinase de *Aspergillus niger*: Otimização da produção por metodologia de superfície de resposta e uso do ultrassom para extração. *Semina Ciências Agrárias* 2011, v. 32 (3): 1049-1058.
- [25] Machado RAM, Buzato JB, Dias CD, Celligoi MAC. Naringinase production by *Aspergillus niger* in the fermentation of different carbon and nitrogen sources. *Biotechnology: An Indian Journal* 2010, 4:1-7.
- [26] Custodio GMV, Pinaga-Otamendi F, Vidal DR, Valles AS. Production and Characterization of an *Aspergillus Terreus*: α -L-Rhamnosidase of Oenological Interest. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 1996, 203:522- 527.
- [27] Kumar VV. Comparative studies on inducers in the production of naringinase from *Aspergillus niger* MTCC 1344. *African Journal of Biotechnology* 2010, 9(45):7683-7686.
- [28] Monti D, Pisvejcová A, Kren V, Lama M, Riva S. Generation of an α -L-Rhamnosidase Library and its Application for the Selective Derhamnosylation of Natural Products. *Biotechnology and Bioengineering* 2004, 87(6):7763-7771.

- [29] Darah SI, Omar I. Utilization Of Palm Kernel Cake For The Production Of Mannanase by an Indigenous Filamentous Fungus, *Aspergillus Niger* USM F4 Under Solid Substrate Fermentation. *The Internet Journal of Microbiology* 2011, 9(1).
- [30] Mishra A. Production of L-Asparaginase, an Anticancer Agent, From *Aspergillus niger* Using Agricultural Waste in Solid State Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2006, 135.
- [31] Upadhyay, MK.; Pandey, AK. Production and optimization of α -amylase from *Aspergillus niger* MTCC 281 under solid state fermentation. *Journal of Plant Science Research* 2009, 25(1):49-52.
- [32] Hamidi-Esfahani Z, Shojaosadati SA, Rinzema A. Modelling of simultaneous effect of moisture and temperature on *A. niger* growth in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 2004, 21:265-272.
- [33] Raimbault M. General and Microbiological Aspects of Solid Substrate Fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology* 1998, 1(3).
- [34] Thammawat K, Pontanya P, Juntharasri V, Wongvithoonyaporn P. Isolation, Preliminary Enzyme Characterization and Optimization of Culture Parameters for Production of Naringinase Isolated from *Aspergillus niger* BCC 25166. *Kasetsart Journal (Natural Science)* 2008, 42:61-72.

Legenda das Figuras e Tabelas

Tabela 1 – Atividade de α -L-ramnosidase em diferentes suportes de acordo com delineamento de misturas.

Tabela 2 – Valores de α -L-ramnosidase, açúcar total inicial, consumo de açúcar e invertase dos ensaios 1, 2, 3 e 4.

Tabela 3 – Variáveis e níveis testados no delineamento incompleto 3^3 de Box-Behnken.

Tabela 4 – Atividades de α -L-ramnosidase para o delineamento completo 3^2 de Box-Behnken.

Tabela 5 – Análise de variância (ANOVA) para as atividades de α -L-ramnosidase obtidas pelo delineamento completo 3^2 de Box-Behnken.

Figura 1 – Delineamento experimental simplex centróide para 3 componentes.

Figura 2 – Cinética do ponto central do delineamento de misturas para produção de α -L-ramnosidase.

Figura 3 – Curva de contorno resultante da influência dos suportes sobre a atividade de α -L-ramnosidase.

Figura 4 – Otimização da produção de α -L-ramnosidase utilizando o aplicativo Statistica v.9.0.

Figura 5 – Comparação da produção de α -L-ramnosidase nas diferentes condições de cultivo do delineamento Box-Behnken 3^3 .

Figura 6 – Superfície de resposta resultante da influência da interação entre pH e umidade na atividade de α -L-ramnosidase segundo planejamento Box-Behnken 3^2

TABELAS

Tabela 1

Ensaio	Mistura Codificada (x ₁ ; x ₂ ; x ₃)**	Mistura Original* (x ₁ ; x ₂ ; x ₃)**	Atividade α-L-Ramnosidase (U/mL)
1	(1; 0; 0)	(1; 0; 0)	0,362
2	(0; 1; 0)	(0; 5; 0)	0,648
3	(0; 0; 1)	(0; 0; 5)	1,94
4	(½; ½; 0)	(0,5; 2,5; 0)	2,005
5	(½; 0; ½)	(0,5; 0; 2,5)	1,575
6	(0; ½; ½)	(0; 2,5; 2,5)	1,937
7	(⅓; ⅓; ⅓)	(0,33; 1,66; 1,66)	1,988
8	(⅓; ⅓; ⅓)	(0,33; 1,66; 1,66)	1,959
9	(⅓; ⅓; ⅓)	(0,33; 1,66; 1,66)	1,828

*quantidade (g) do suporte capaz de absorver 12 mL da solução de nutrientes

**x1 bagaço de cana-de-açúcar, x2 casca de soja e x3 palha de arroz

Tabela 2

Ensaio	Atividade α-L- ramnosidase (U/mL)	Consumo Açúcar (%)	Atividade Invertase (U/mL)
1	0,362	67	7,200
2	0,648	41	5,425
3	1,940	85	1,426
4	2,005	61	5,810

Tabela 3

Variável	Níveis		
	-1	0	1
X ₁ - Umidade (%)	43	58	73
X ₂ - granulometria (mm)	0,8	1,5	2,2
X ₃ - pH	4	4,5	5

Tabela 4

Ensaio	Variáveis decodificas		Atividade α -L-Ramnosidase (U/mL)
	Umidade (%)	pH	
1	73	3,4	0
2	73	3,7	2,823
3	73	4	2,960
4	78	3,4	0
5	78	4	2,603
6	83	3,4	0
7	83	3,7	0
8	83	4	2,416
9	78	3,7	2,260
10	78	3,7	2,299
11	78	3,7	2,273

Tabela 5

	SQ	GL	QM	F	p
(1)Umidade (%) L+Q	2,27036	2	1,135180	2878,73	0,000347
(2)pH L+Q	11,23842	2	5,619210	14249,90	0,000070
1*2	0,07398	1	0,073984	187,62	0,005288
Falta de ajuste	2,69271	3	0,897568	2276,17	0,000439
Erro Puro	0,00079	2	0,000394		
Total SQ	16,63422	10			

FIGURAS

Figura 1

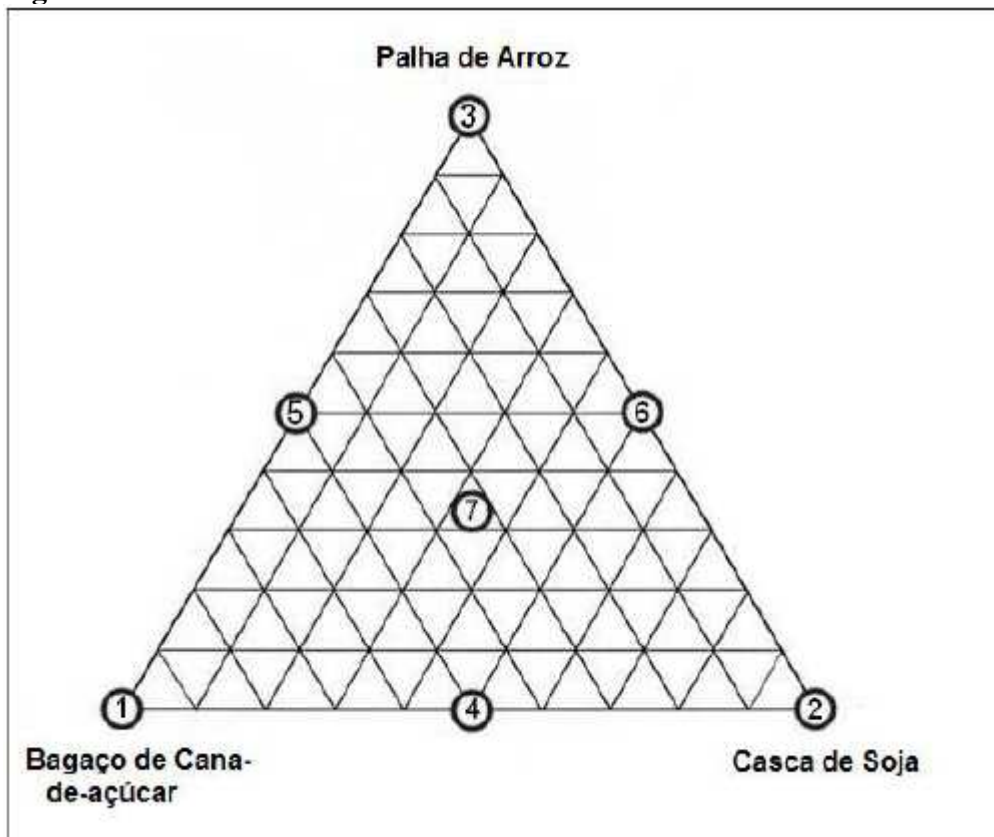


Figura 2

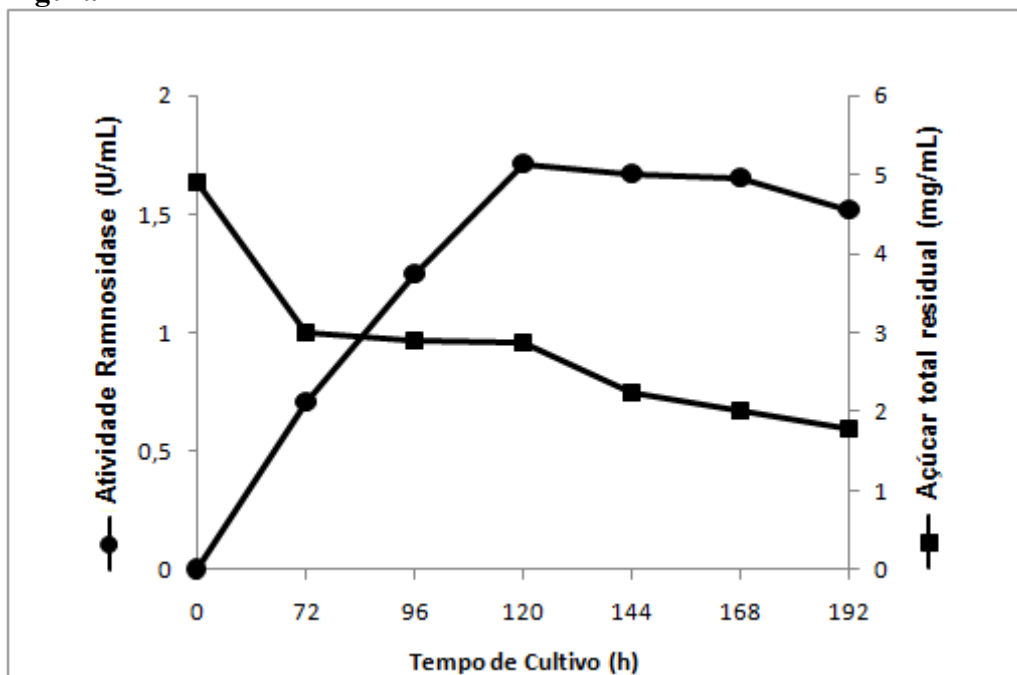


Figura 3

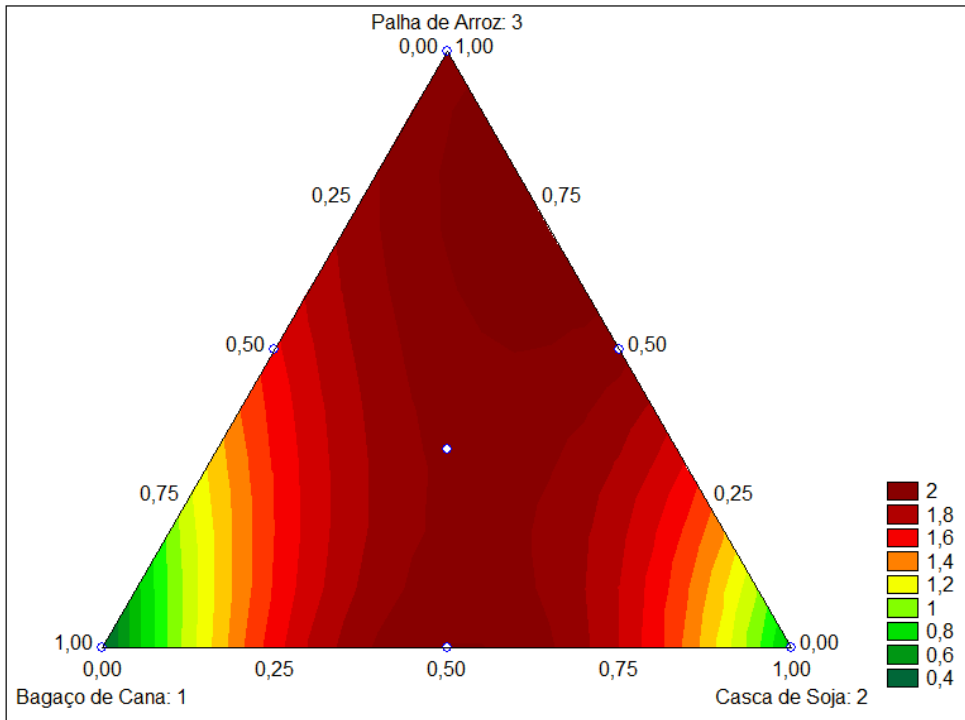


Figura 4

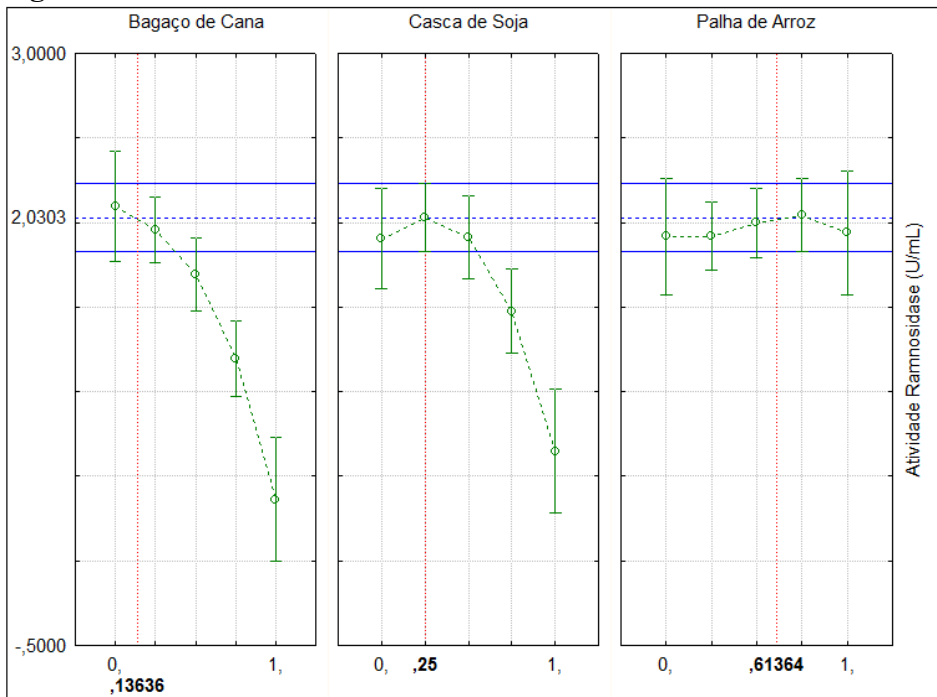


Figura 5

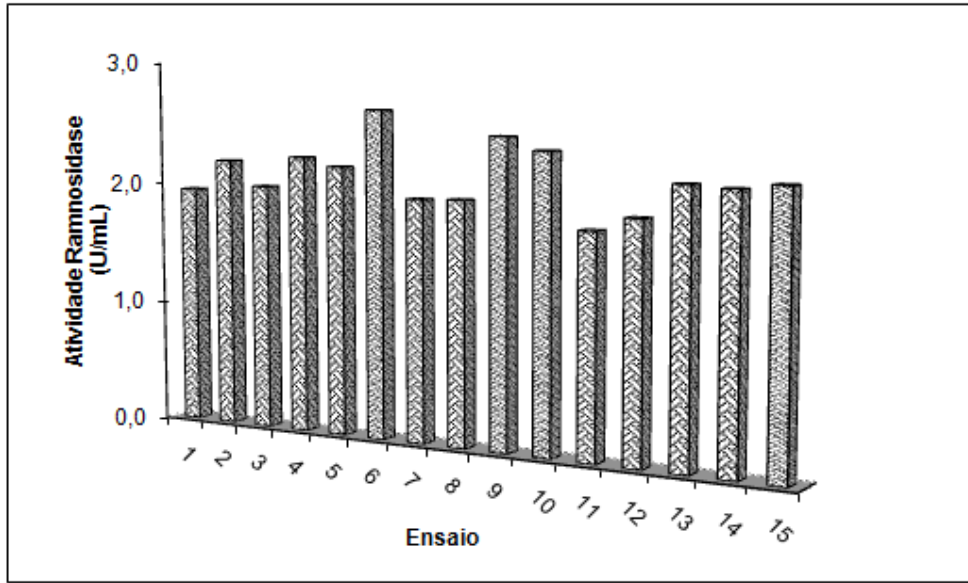
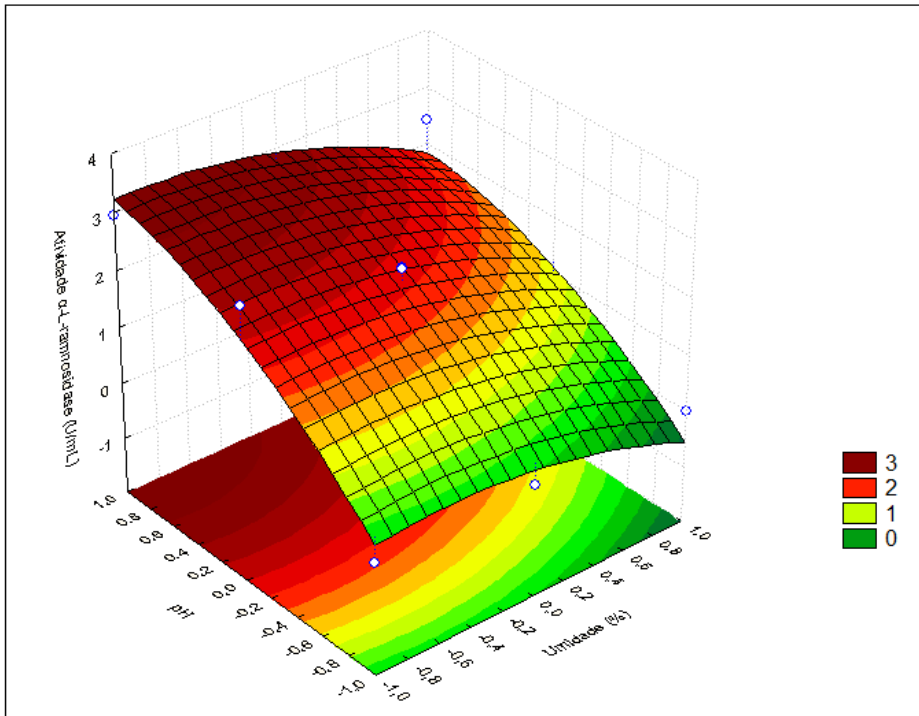


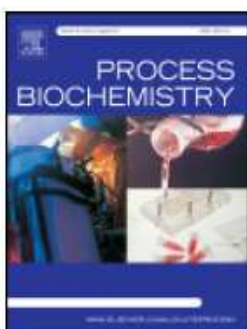
Figura 6



ANEXOS

ANEXO A

Normas para submissão de artigo para a revista Process Biochemistry



Process Biochemistry

ISSN: 1359-5113

Imprint: ELSEVIER

Impact Factor: 2.648

Process Biochemistry is an application-orientated research journal devoted to reporting advances with originality and novelty, in the science and technology of the processes involving bioactive molecules and living organisms. These processes concern the production of useful metabolites or materials, or the removal of toxic compounds using tools and methods of current biology and engineering. Its main areas of interest include novel bioprocesses and enabling technologies (such as nanobiotechnology, tissue engineering, directed evolution, metabolic engineering, systems biology, and synthetic biology) applicable in food (nutraceutical), healthcare (medical, pharmaceutical, cosmetic), energy (biofuels), environmental, and biorefinery industries and their underlying biological and engineering principles.

Process Biochemistry accepts three types of manuscripts: Full length articles, Short communications and Reviews.

Full length articles (FLA) should not generally exceed 25 double-spaced pages of text (not including the references) and should not contain more than 15 figures and/or tables.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-

submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

A cover letter should be submitted on-line by the authors together with the manuscript, which includes the following points: 1) all authors agree to submit the work to *Process Biochemistry*, 2) the work has not been published/submitted or being submitted to another journal, 3) the novelty and significant contribution of the submitted work are briefly described.

In their on-line submission, authors are required to suggest at least three independent referees (and preferably up to five, outside their own institution) with their position, institution, and email address; and preferably the suggested referees are of international standing and are working on the same or similar topics. The final choice of referees is up to the Editors. All submissions will be reviewed by at least two referees. But, manuscripts will be pre-screened for suitability and may be returned to the authors without peer review if they do not meet the criteria for originality and novelty or cause misunderstanding.

When a manuscript is rejected by an editor, generally it should not be resubmitted in its original version, but may be resubmitted after substantial modifications and/or addition of significant experimental data. It is up to the discretion of the editors to reconsider such resubmitted manuscripts as new submissions. Please include a letter of transmittal explaining why a resubmitted manuscript should be reconsidered by the editors, a detailed response to the issues raised by the editors/reviewers and the editor for the original version, and a concise outline of the revisions. Any corresponding author or co-author of one manuscript which has been rejected (without resubmission encouragement) must not resubmit a similar manuscript. If so, these authors will have a punishment of two years of prohibition to submit.

It is highly recommended to validate the pertinent and main data of the manuscripts by reproducibility assays, that is to say, to give in the corresponding (parts of the) Tables their mean values and standard deviations, and in the corresponding (parts of the) Figures their error bars. These data should be then obtained with a minimum of triplicate assays.

Moreover the authors must give a list of all related manuscripts/papers, whether in submission or in press.

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

Article Structure

The texts should be double-spaced with all lines numbered and be as concise as possible. All manuscripts must be submitted in the following format: Title page; second page contains the Abstract and keywords; subsequent pages include the Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgement(s), References, Figure legends, Tables, and Figures. Figure legends should be

gathered on a separate page(s), followed by Tables and Figures with a separate page for each one. For experimental design results, as they are scientifically not usable, 3D figures are generally discouraged. Indicate then only the pertinent data in 2D diagrams. Page numeration starts from the first page. The Results and Discussion sections may be combined but should be thorough in the discussion about the novelty and impact of the submitted work. Articles without sufficient discussion will be systematically rejected. Legends for tables and figures should be complete and concise: one figure or one table should be perfectly understandable with its own legend, and incomplete legends will not be accepted. It is recommended to use a concise and short title, followed by another sentence(s) including specific details.

Introduction

Should be concise in the related background description and lead to the objectives and novelty of the work.

Material and Methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced, including the information about suppliers and catalogue numbers when appropriate. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results and discussion

These two parts can be separated as "Results" and "Discussion" or combined into one section. The discussion about each major point of the results is very important, and should not repeat the experimental results; generally citation of related references is necessary.

Conclusions

This section is not obligatory and can exist as a short paragraph at the end of "Results and Discussion" section. **When it exists as a section**, it should be short and concise but should not repeat the Abstract. Generally the Conclusion does not cite references, and it is different from the discussion.

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.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case 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 telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be 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

Each paper should be provided with an abstract of 100-150 words for Short Communications and 150-200 words for Full Length Articles and Reviews, reporting concisely on the purposes and results of the paper.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and / should be

used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

Nomenclature and Units

The SI system should be used for all scientific and laboratory data: if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion': 10^9 in America (ten to the power 9), and 10^{12} in Europe (ten to the power 12), is ambiguous and should not be used.

Footnotes

Footnotes should be avoided especially if they contain information which could equally well be included in the text. The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure 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

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, 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: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply "as is".

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS 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 on the Web (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 on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

References

References should be cited at the appropriate point in the text by a number in square brackets. A list of references, in numerical order, should appear at the end of the paper. All references in this list should be indicated at some point in the text and vice versa. Unpublished data or private

communications **AND WEBSITE ADDRESSES** should not appear in the list. Examples of layout of references are given below.

[1] Hsieh C, Hsu TH, Yang FC. Production of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (CCRC36021) by reusing thin stillage. *Process Biochem* 2005;40:909-916.

[2] Stephanopoulos GN, Aristidou AA, Nielsen JE. *Metabolic engineering: principles and methodologies*. New York: Academic Press; 1998. p. 494

[3] Zhong JJ, Yoshida T. Rheological characteristics of suspended cultures of *Perilla frutescens* and their implications in bioreactor operation for anthocyanin production. In: Ryu DDY, Furusaki S editors. *Advances in Plant Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier Science; 1994. p. 255-279.

[4] Lima R, Salcedo, RL. An optimized strategy for equation-oriented global optimization. In: Grievink J, Schijndel JV. editors. *10th European Symposium on Computer Aided Chemical Engineering*. New York: Academic Press; 2002. p. 913-918.

[5] Curtin CD. *Towards molecular bioprocessing as a tool to enhance production of anthocyanins in Vitis vinifera L. cell suspension culture*. Australia: Flinders University; Ph.D. thesis; 2004. p.250.

[6] Snow-Brand-Milk-Prod. Lysozyme purification by affinity chromatography on crosslink chitosan sulfate. *Jpn. Patent*. JP 05260-966. 92.03.24.

[7] Enfors SO, editor. *Physiological stress responses in bioprocesses*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. vol. 89. Berlin: Springer; 2004. p. 244.

[8] Schweder T, Hecker M. Monitoring of stress response, In: Enfors SO, editor. *Physiological stress responses in bioprocesses*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* vol. 89. Berlin: Springer; 2004. p. 47-71.

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.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, 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 which is described below.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Supplementary material captions

Each supplementary material file should have a short caption which will be placed at the bottom of the article, where it can assist the reader and also be used by search engines.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.