



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ROBSON ALESSANDRO MATTOS MACHADO

**PRODUÇÃO DE NARINGINASE POR *Aspergillus niger* 426
NA FERMENTAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE
CARBONO E NITROGÊNIO**

Londrina
2007

ROBSON ALESSANDRO MATTOS MACHADO

**PRODUÇÃO DE NARINGINASE POR *Aspergillus niger* 426
NA FERMENTAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE
CARBONO E NITROGÊNIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: João Batista Buzato

Londrina
2007

ROBSON ALESSANDRO MATTOS MACHADO

**PRODUÇÃO DE NARINGINASE POR *Aspergillus niger* 426
NA FERMENTAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE
CARBONO E NITROGÊNIO**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Batista Buzato
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Antonio Sérgio de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Raul Jorge Hernan Castro Gomez
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 27 de fevereiro de 2007.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, por terem acreditado que eu chegaria até aqui. E por saberem que chegarei além.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Waldemar e Marilei, pela educação que tive, pelo suporte financeiro e principalmente emocional durante todo o tempo e pelo apoio nas decisões e momentos críticos.

Ao meu irmão, Bruno, pelos momentos de descontração e pelas risadas.

À Michelle Laza Tanoue, em especial, pela companhia agradável em todos os momentos e pela cumplicidade ao longo desses dois anos que serão memoráveis.

Ao amigo Cassiano Silva e outros colegas e amigos que, de uma forma ou de outra, me ajudaram a concluir este trabalho. À Cecília Dias, meu braço direito, pela ajuda no laboratório.

Ao Nelson, Sérgio, Elda, Sandra, Neuza, Joelma, Regina e todos os funcionários do departamento, por realizarem o trabalho que permite que todo o resto aconteça.

Ao professor João Batista Buzato pela oportunidade de trabalho, atenção e compreensão.

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

À Providência Divina por tudo.

*“O único mal a temer é aquele que ainda
existe em nós” (André Luiz)*

MACHADO, Robson Alessandro Mattos. **Produção de Naringinase por *Aspergillus niger* 426 na Fermentação de Diferentes Fontes de Carbono e Nitrogênio**. 2007. 76f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

A produção de cítricos e de suco de laranja congelado concentrado é de grande importância comercial para o Brasil. O amargor, quando em excesso, é o principal depreciador do valor do suco no mercado. A naringinase, um complexo enzimático que degrada a naringina, tem potencial aplicação para a remoção do amargor. Nesse trabalho foi estudada a produção de naringinase por *Aspergillus niger* pela fermentação de sacarose, naringina, melaço e garapa de cana-de-açúcar, suplementada de peptona e nitrato de sódio. Naringina, quando utilizada no meio de cultivo como indutor, foi adicionada em dose única ou fracionada. O meio basal continha (g/L): KH_2PO_4 1,0; KCl 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 e FeCl_3 0,1. As fermentações foram conduzidas em frascos erlenmeyers de 500mL com 100mL de meio de cultivo, pH inicial de 4,5, inóculo de 10^6 esporos/mL, 28°C e 180rpm. O melaço foi mais eficiente quando utilizado em baixas concentrações para produção de naringinase, enquanto que em elevadas concentrações aumentou apenas a produção de invertase. O maior valor de naringinase de 178,6mUI/mL foi alcançado com a combinação de melaço (3g/L), peptona (10g/L) e naringina (0,5g/L). A adição fracionada de naringina como indutor não melhorou a produção e, portanto, não é recomendada. *A. niger* demonstrou potencial promissor, como ferramenta biotecnológica, para produção de naringinase utilizando substrato de bom custo-benefício.

Palavras-chave: Naringinase. Melaço. *Aspergillus niger*. Indução.

MACHADO, Robson Alessandro Mattos. **Naringinase production by *Aspergillus niger* in the fermentation of different carbon and nitrogen sources.** 2007. 76f. Dissertation (Master's Degree Dissertation) – State University of Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

Citrus fruit and frozen concentrated orange juice production is of great commercial importance for Brazil. Excessive bitterness is the main depreciator of juice value on the market. Naringinase, an enzymatic complex that degrades naringin, has potential application for debittering. This study investigated naringinase production by *Aspergillus niger* through sucrose, naringin, molasses and sugarcane juice, supplemented with peptone and sodium nitrate. Naringin, when used in the culture medium as inducer, was added in a single or fractioned doses. The base culture medium contained (g/L): 1.0 KH₂PO₄; 0.5 KCl; 0.5 MgSO₄·7H₂O and 0.1 FeCl₃. The fermentations were carried out in 500mL Erlenmeyer flasks with 100mL culture medium, at initial pH 4.5, inoculum with 10⁶ esporos/mL, 28°C and 180rpm. The molasses was more efficient when used at low concentrations for naringinase production, while at high concentrations it only increased invertase production. The greatest naringinase value of 178.6mUI/mL was attained with a combination of molasses (3g/L), peptone (10g/L) and naringin (0.5g/L). The fractioned addition of naringin as inducer did not improve production and therefore it is not recommended. *Aspergillus niger* showed promising potential as a biotechnological tool for naringinase production using a low-cost substrate.

Keywords: Naringinase. Molasses. *Aspergillus niger*. Induction.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Algumas enzimas produzidas por <i>A. niger</i> com relevância comercial e suas aplicações	20
Tabela 2 – Composição do melaço de cana-de-açúcar	22
Tabela 3 – Composição média da cana-de-açúcar	23
Tabela 4 – Resumo dos resultados de produção de naringinase obtidos por diversos autores	29
Tabela 5 – Composição dos meios de manutenção e inóculo	31
Tabela 6 – Composição dos meios de fermentação de naringina e sacarose	31
Tabela 7 – Composição dos meios de fermentação de melaço, garapa, peptona e nitrato de sódio	32
Tabela 8 – Composição dos meios de melaço em diferentes concentrações	32
Tabela 9 – Composição dos meios de fermentação de peptona em diferentes concentrações	33
Tabela 10 – Composição dos meios de fermentação de peptona e melaço com adição única de naringina	33
Tabela 11 – Adição das frações de naringina (g/L) nos diferentes tempos de fermentação	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 SUCOS CÍTRICOS	13
3.1.1 Produção e Mercado	13
3.1.2 Sabor Amargo	14
3.2 NARINGINASE	15
3.3 ASPERGILLUS NIGER	19
3.3.1 Características e Aplicações	19
3.3.2 Meios Utilizados Para Cultivo	20
3.3.2.1 Substratos alternativos	20
3.3.2.2 Garapa e melaço de cana-de-açúcar	22
3.3.3 Indução da Produção de Enzimas por <i>Aspergillus spp</i>	23
3.4 PRODUÇÃO DE NARINGINASE	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 MATERIAIS	30
4.1.1 Microrganismo	30
4.1.2 Melaço de Cana-de-açúcar e Garapa	30
4.1.3 Meios de Cultivo	30
4.1.3.1 Meio de manutenção e inóculo	30
4.1.3.2 Fermentação de naringina e sacarose	31
4.1.3.3 Fermentação de melaço, garapa, peptona e nitrato de sódio combinados ...	31
4.1.3.4 Fermentação de melaço em diferentes concentrações	32
4.1.3.5 Fermentação de peptona em diferentes concentrações	32
4.1.3.6 Fermentação de peptona e melaço com diferentes formas de indução	33

	0
4.2 MÉTODOS	34
4.2.1 Preparo de Meios de Cultivo	34
4.2.1.1 Manutenção e inóculo	34
4.2.1.2 Meios de fermentação	34
4.2.2 Manutenção do Microrganismo	34
4.2.3 Preparo de Inóculo	35
4.2.4 Fermentações	35
4.2.5 Amostragem dos Cultivos.....	36
4.2.6 Determinações Analíticas.....	38
4.2.6.1 Atividade de naringinase	38
4.2.6.2 Atividade de invertase	38
4.2.6.3 Açúcares totais.....	39
4.2.6.4 Biomassa.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS.....	42
APÊNDICES	49
APÊNDICE A – Artigo “Naringinase production by <i>Aspergillus niger</i> in the fermentation of different carbon and nitrogen sources”.....	50
ANEXOS	67
ANEXO A – Normas para submissão do artigo para a revista Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology	68

1 INTRODUÇÃO

Frutas cítricas, em sua grande maioria laranjas, são umas das mais produzidas no mundo. Em 2005, cerca de 9,0% da produção mundial de frutas foi de laranjas, sendo essa fruta a quarta mais produzida. O Brasil mantém a posição de maior produtor mundial de laranja e o setor exportou US\$790 milhões em 2005.

A laranja é apreciada no mundo todo. Entretanto, a presença de uma grande concentração de naringina, composto responsável pelo sabor amargo característico do suco, deixa-o com sabor desagradável e pouca aceitação por parte do consumidor, diminuindo seu valor de mercado.

Algumas técnicas físico-químicas têm sido propostas para remoção do amargor dos sucos cítricos. Mas estas incluem etapas que alteram as características organolépticas dos sucos e assim têm aplicação limitada. Entretanto, destacam-se, as técnicas enzimáticas para a remoção do amargor, como a adição de naringinase aos processos.

A naringinase, um complexo enzimático com atividade de α -L-ramnosidase (EC 3.2.1.40) e β -D-glucosidase (EC 3.2.1.21), apresenta potencial de aplicação na produção de ramnose, prunina e antibióticos, no realce do aroma de vinhos e na indústria de sucos cítricos por degradar a naringina, formando compostos menos amargos.

A produção de naringinase por fermentação fúngica é interessante devido à possibilidade de utilização de substratos como o melaço e a garapa, uma vez que são matérias-primas da agroindústria, de bom custo-benefício e de grande disponibilidade no Brasil.

O fungo filamentosso *Aspergillus niger*, um dos mais comuns do gênero *Aspergillus*, causa bolores negros em certas frutas e vegetais. Em processos biotecnológicos, *A. niger* se destaca por produzir diversos compostos de interesse, entre eles a naringinase.

O presente trabalho utilizou *A. niger* na fermentação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio para produção de naringinase.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir naringinase utilizando *Aspergillus niger* 426 na fermentação de substratos alternativos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar as fontes de carbono naringina, sacarose, melação de cana-de-açúcar e garapa para a produção de naringinase.

Avaliar as fontes de nitrogênio peptona e nitrato de sódio para a produção de naringinase.

Determinar as melhores concentrações das fontes de carbono e de nitrogênio para a produção de naringinase.

Testar a ação indutora da naringina e repressora da sacarose na produção de naringinase.

Comparar a adição do indutor em dose única e fracionada na produção de naringinase.

Acompanhar as atividades de naringinase e invertase durante os cultivos.

Medir a biomassa produzida e o pH no final do cultivo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SUCOS CÍTRICOS

3.1.1 Produção e Mercado

Frutas cítricas são umas das mais produzidas no mundo. Laranjas representam a grande maioria da produção, que chegou a 9,0% do total de frutas produzidas mundialmente em 2005. O Brasil mantém a posição de maior produtor e exportador mundial de laranja, cuja área cultivada é de 820 mil hectares dos quais 77% estão na Região Sudeste. Essa cultura correspondeu a 49% de toda a produção brasileira de frutas em 2003 (FUNDECITRUS, 2004).

Segundo Neves et al. (2001), aproximadamente 72% das laranjas produzidas são transformadas em suco. Nesse setor, o Brasil também lidera, tendo sido responsável em 2000 por 47% da fabricação e 83% do total de exportação mundial de suco de laranja concentrado congelado. Segundo mapeamento recente, o sistema citrícola representa 1,87% da pauta total de exportações brasileiras e 4,47% das exportações de agronegócios (FUNDECITRUS, 2004). Apenas para o suco de laranja concentrado congelado, as exportações foram de US\$910, 789 e 796 milhões em 2003, 2004 e 2005 respectivamente. Para 2006, até setembro, US\$681 milhões foram negociados no mercado externo, contra US\$603 milhões no mesmo período de 2005.

No Paraná foram exportados US\$12,03 milhões em suco de laranja concentrado congelado em 2005. Outros US\$12,27 milhões já foram negociados até setembro de 2006, o que indica um aquecimento no mercado citrícola. Apenas para os cooperados da COROL (Cooperativa Agropecuária de Rolândia Ltda), a citricultura ocupa 3.200 hectares e produz 1,5 milhões de caixas por ano. Quando todos os pomares estiverem na fase adulta, em 2006, a produção chegará a 4 milhões de caixas/ano (OLIVEIRA, 2003).

3.1.2 Sabor Amargo

A Laranja e o seu suco são apreciados no mundo todo. Um leve sabor amargo é característico e aceitável na fruta e no suco. Entretanto, o excesso de amargor, causado pela presença de uma grande concentração de naringina, desagrada o consumidor. Frutas e sucos muito amargos têm pouca aceitação e baixo valor de mercado.

O sabor amargo em excesso nos alimentos tende a ser interpretado como perigo e com fundamentação fisiológica. Gorduras rançosas, proteínas hidrolisadas, alcalóides derivados de plantas e outras toxinas geralmente possuem um sabor amargo desagradável (MAGA, 1990).

O limiar de detecção para o sabor amargo é extremamente baixo. Compostos amargos, alguns letais, são detectados por humanos em quantidades micromolares (HLADIK e SIMMEN, 1996; MCBURNEY, 1978). No entanto, segundo Glendenning et al. (1994) não existe relação direta entre amargor e toxicidade.

Os principais compostos que conferem sabor amargo aos sucos cítricos são limonóides e flavonóides. Mais de 37 limonóides são encontrados em sucos cítricos. Entre eles os mais amargos são nomilina, ichangina, ácido nomilínico e limonina, sendo o último o principal responsável pelo chamado amargor tardio dos sucos cítricos. Um precursor sem sabor da limonina é liberado quando o tecido da fruta sofre injúria e é gradualmente convertido em limonina caracterizando o amargor tardio (SINGH, 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. Naringina e neohesperidina são muito amargas, enquanto hesperidina não possui sabor. As concentrações de naringina são mais altas em folhas jovens e no albedo dos frutos imaturos (DEL RIO et al., 1998). Apesar de certa quantidade de naringina, aproximadamente 0,4g/L, ser comum no suco de laranjas do tipo pomelo, as frutas colhidas precocemente podem elevar essa quantidade a níveis menos aceitáveis de 1,2g/L (PINO, 1997).

O amargor devido a flavonóides e limonóides representa um grande problema para a indústria de sucos cítricos.

Algumas técnicas foram propostas para remoção do amargor do

suco. Chandler et al. (1968) conseguiram amenizar o amargor do suco de laranjas navel por adsorção em poliamidas e polímeros de nylon. Também por adsorção, McColloch (1950) diminuiu o amargor utilizando carbono ativado, mas o suco ganhava um sabor desagradável devido aos compostos sulfíticos. 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. Shaw e Wilson (1983) removeram a naringina e a limonina de soluções aquosas e de sucos filtrados de laranja e uva utilizando polímeros de β -ciclodextrina. Resultados semelhantes foram alcançados com α -ciclodextrina por Shaw et al. (1984). Embora alcançando resultados positivos quanto a remoção do amargor, todas essas técnicas propostas alteram as características organolépticas padrão dos sucos e por esse motivo têm aplicação limitada.

Coghlan (1997) descreveu um processo que utiliza cromatografia de fluxo radial para remoção do amargor de sucos. Em comparação com processos tradicionais de cromatografia, o sistema de fluxo radial é mais rápido e opera em pressões mais baixas. A resina, nesse processo patenteado, captura a naringina do suco quando este passa pelo sistema. O suco processado possui o sabor e outras características desejáveis, mas não o sabor amargo. Entretanto, segundo Puri e Banerjee (2000) a aceitação comercial do processo ainda precisa ser estabelecida.

Diante das limitações de eficiência e custo de implantação no uso dessas tecnologias na indústria de sucos, uma técnica mostra-se promissora: a retirada do amargor do suco pela naringinase.

3.2 NARINGINASE

Historicamente, a naringinase foi isolada de fontes vegetais como sementes de salsão e folhas de pomelo (HALL, 1938). Thomas et al. (1958) conseguiram obter extratos brutos de fermentação microbiana com atividade de naringinase. Esses extratos apresentaram pH ótimo entre 5 e 6 e podiam permanecer por 4h a 60°C perdendo apenas 16% da atividade. Os extratos guardados a 5°C não perderam atividade mesmo depois de um ano.

Mais tarde, Okada et al. (1963) purificaram naringinase e reportaram

as propriedades da mesma. Utilizando esse estudo como base, a companhia Tanabe Pharmaceuticals estabeleceu um processo para produção de um preparado de naringinase que foi comercializado com o nome de *Kumitanase*. Smythe e Thomas (1960) submeteram uma patente nos Estados Unidos que descreve a produção de naringinase. Outras patentes para produção de naringinase foram submetidas no Japão (ITO e TAKIGUCHI, 1970; FUKUMOTO e OKADA, 1973) e Alemanha (HOECHST, 1994). Atualmente, a naringinase disponível comercialmente é produzida por *Penicillium decumbers*.

A naringinase é um complexo enzimático composto de uma α -L-ramnosidase (EC 3.2.1.40) e uma β -D-glucosidase (EC 3.2.1.21) (SORIA et al., 2004). Essa enzima catalisa a conversão de naringina em naringinina em um processo de duas etapas (Figura 1). O substrato naringina (4'-5,7'-trihidroxiflavonona-7-ramnoglicosídeo) é hidrolisado pela porção α -L-ramnosidase para produzir ramnose e prunina (4'-5,7'-trihidroxiflavonona-7-glucosídeo), que é então convertida pela porção β -D-glucosidase a glucose e naringinina (4'-5,7'-trihidroxiflavonona).

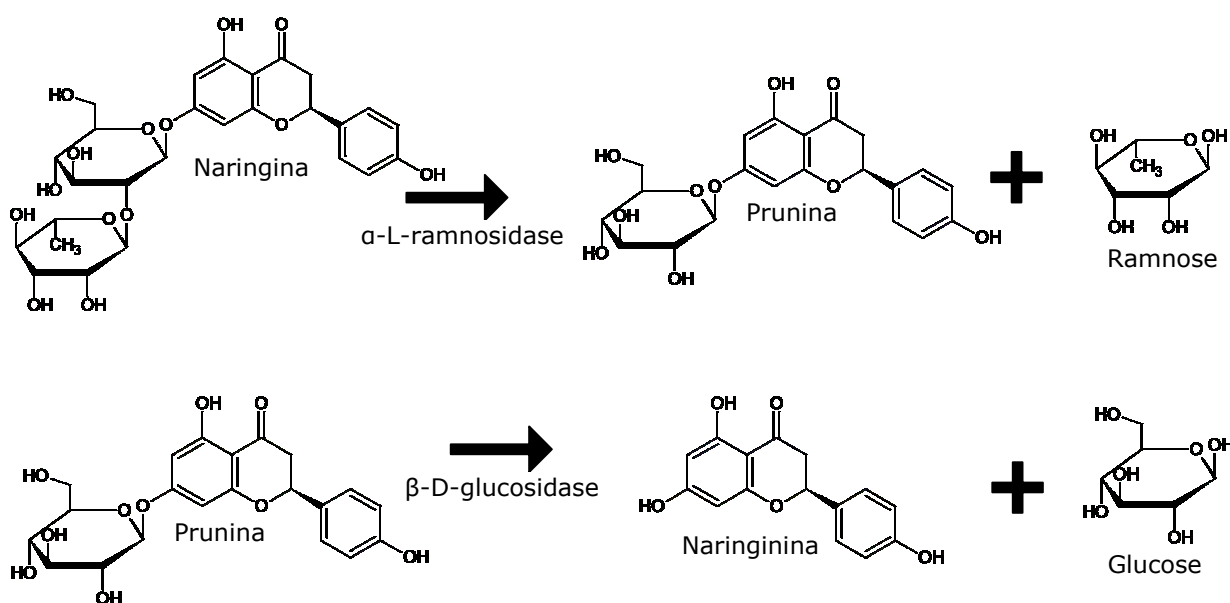


Figura 1 – Etapas da degradação da naringina pelo complexo naringinase (NOROUZIAN et al., 2000).

Por degradar a naringina em prunina e naringinina, compostos menos amargos, a naringinase tem potencial aplicação na indústria de sucos cítricos. A naringinina tem apenas um terço do amargor da naringina, no entanto a prunina é menos amarga que a naringinina. Sendo assim, apenas a primeira reação é essencial para a remoção do amargor causado pela naringina, o que justifica um maior interesse na atividade de α -L-ramnosidase quando o objetivo é a remoção do amargor pela degradação da naringina.

Com o objetivo de obter e caracterizar extratos enzimáticos com atividade apenas de α -L-ramnosidase, técnicas cromatográficas têm sido usadas para separar as duas enzimas do complexo enzimático e as principais características físico-químicas de α -L-ramnosidase têm sido investigadas.

Manzanares et al. (1997) utilizaram cromatografia de troca iônica para separar, purificar e caracterizar naringinase de *A. niger* com ênfase na atividade de α -L-ramnosidase. A enzima de massa molar de 85kD apresentou pH ótimo de 4,5 e 90% da sua atividade máxima era mantida na faixa de pH de 3,5 a 5,0. A enzima se mostrou estável por mais de 8h nessa faixa de pH a 30°C. A temperatura ótima em pH 4,5 foi de 65°C, sendo que, nessa temperatura a enzima mantinha 60% da atividade após uma hora de incubação.

Soria et al. (1999), após precipitação com sulfato de amônio, utilizaram cromatografia de troca iônica e de exclusão molecular para purificar naringinase com interesse na atividade de α -L-ramnosidase de *Aspergillus terreus*. A massa molar da enzima era de 89kD. O pH e temperatura ótimos foram de 5,5 e 60°C respectivamente.

Yanai e Sato (2000) utilizaram várias etapas para conseguir uma fração pura de α -L-ramnosidase do complexo naringinase. O extrato bruto do cultivo da bactéria *Pichia angusta* foi precipitado por sulfato de amônio após lise das células, concentrado por ultrafiltração e aplicado a uma série de colunas cromatográficas para purificação. Os autores conseguiram uma purificação de 50 vezes e uma recuperação de 2,5% do total de atividade de α -L-ramnosidase. A massa molar da enzima obtida foi de 88kD, o pH ótimo foi de 6,0 e esta apresentou boa estabilidade na faixa de pH 5,0 a 7,0 a 40°C. A temperatura ótima foi de 40°C com mais de 70% de estabilidade, no entanto apenas 10% da atividade era mantida em pH menor que 3,8.

Manzanares et al. (2000) utilizaram cromatografia de exclusão

molecular para separar e purificar naringinase produzida por *Aspergillus nidulans* com objetivo de estudar a atividade de α -L-ramnosidase. A enzima purificada teve massa molar de 102kD, pH ótimo na faixa de 4,5 a 6 e mais de 95% da atividade era mantido na faixa de pH 4,0 a 7,0. Já em pH 3,5 apenas 55% da atividade era mantido. Após 24h de incubação, a enzima permaneceu estável em pH 4,5, no entanto apenas 40% era mantido em pH 4,0. A temperatura ótima em pH 5,0 foi de 60°C.

Orejas et al. (1999) caracterizaram naringinase de *A. nidulans* também com interesse na atividade de α -L-ramnosidase. Os autores encontraram apenas uma banda com atividade de α -L-ramnosidase utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A massa molar da enzima foi de 90kD e esta teve uma faixa de pH ótimo entre 4,5 a 8,0, temperaturas ótimas entre 40 e 50°C e boa estabilidade (6 horas) entre 20 e 40°C. No entanto, a mesma perdeu mais de 90% da atividade após uma hora de incubação a 60°C.

Norouzian et al. (2000) utilizaram apenas precipitação para separar naringinase de *Penicillium decumbers*. Para tanto os autores utilizaram isopropanol na proporção de 1:1 com o sobrenadante, assim conseguiram uma purificação de 25 vezes e uma recuperação de 34,6% do total de naringinase. A atividade de naringinase parcialmente purificada teve pH e temperatura ótimos de 4,5 e 55°C.

A porção α -L-ramnosidase da naringinase tem especificidade relativa e degrada outros compostos. Por esse motivo, outras atividades de naringinase com aplicação comercial têm sido estudadas.

Daniels et al. (1990) descreveram a utilização da atividade de α -L-ramnosidase de naringinase para a produção de ramnose a partir de naringina. Ramnose, um intermediário quiral de sínteses orgânicas, é usada como componente de fármacos, realçador de sabor e defensivo agrícola. Os autores utilizaram uma mistura parcialmente purificada com alta atividade de α -L-ramnosidase e baixa atividade de β -D-glucosidase. Por outro lado, Roitner et al. (1984) descreveram a produção de prunina, o segundo composto formado pela hidrólise da naringina pela α -L-ramnosidase de naringinase. A prunina possui atividade anti-viral e antiinflamatória, além de poder ser utilizada como adoçante para diabéticos.

Sankyo (1988) patenteou um processo no qual a atividade de α -L-ramnosidase da naringinase catalisa a deglicosilação parcial dos glicopeptídeos cloropolisporina A, B e C de *Faenia interjecta*. Esses glicopeptídeos parcialmente

deglicosilados possuem grande atividade antibiótica contra bactérias gram-positivas, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente a metilina, um dos principais responsáveis por diversos surtos de infecção hospitalar.

Caldini et al. (1994) conduziram estudos sobre a aplicação de enzimas na melhoria de vinhos. Nesses estudos, *A. niger* produziu uma mistura de enzimas contendo ambas as atividades de naringinase (α -ramnosidase e β -glucosidase) e β -arabinosidase em uma proporção considerada apropriada para o realce do aroma de vinho.

Outra possível aplicação foi estudada por Elujoba e Hardman (1987). Esses autores imobilizaram naringinase para hidrolisar um preparado de sementes de feno grego (*Trigonella foenum-graecum*). Um dos produtos dessa hidrólise, a diosgenina, constitui um precursor na preparação de drogas esteróides de uso clínico.

3.3 ASPERGILLUS NIGER

3.3.1 Características e Aplicações

O *A. niger* possui colônias com conídios globosos de 4 a 5 μ de diâmetro, cabeças conidiais radiadas, de cor marrom escuro a preto, micélio branco a amarelo e esterígmas bisseriados (KLICH e PITT, 1988). Ele é classificado como deuteromiceto devido à não existência ou evidência de ciclo sexual. Segundo Schuster et al. (2002) *A. niger* pode ser considerado como "GRAS" (*generally regarded as safe* - geralmente considerado como seguro) desde que linhagens não patogênicas e não toxigênicas e boas práticas de produção sejam utilizadas. Dessa maneira, a espécie se destaca na produção de diversas enzimas com aplicação comercial conforme destaca a Tabela 1.

Tabela 1 – Algumas enzimas produzidas por *A. niger* com relevância comercial e suas aplicações

Classe da Enzima	Setor da indústria	Aplicação	Referência
Protease	Detergentes	Remoção de manchas de proteínas	Couri et al., 2000
	Alimentação	Produtos infantis (hipoalergênicos)	
	Papel e celulose	Remoção de biofilmes	
Celulase	Couro	Purga do couro	Kang et al., 2004
	Detergentes	Limpeza, descoloração	
	Têxtil	Amaciamento de tecidos de algodão	
Lipase	Papel e celulose	Remoção de tinta, modificação das fibras	Mahadik et al., 2002
	Detergentes	Remoção de manchas de gordura	
	Alimentação	Realce do sabor de queijos	
Amilase	Gorduras e óleos	Transesterificação	Hernández et al., 2006
	Detergentes	Remoção de manchas de amido	
	Panificação	Aumenta maciez e volume do pão	
Invertase	Bebidas	Tratamento de sucos, cerveja light	Ashokkumar et al., 2001
	Panificação	Produção de açúcar invertido	
	Alimentação	Produção de xarope rico em frutose	
	Saúde	Higiene bucal	

Além disso, vários outros metabólitos de *A. niger* são de interesse humano como ácidos orgânicos (SCHUSTER et al., 2002), anticorpos (WARD et al., 2004), fármacos (SEKHAR RAO et al., 2005) e pigmentos (ZAJIC e KUEHN, 1962).

3.3.2 Meios Utilizados Para Cultivo

3.3.2.1 Substratos alternativos

A. niger, além de ser cultivado em meio mínimo, tem a versatilidade de utilizar substratos que aumentam o custo-benefício, como resíduos da agroindústria, para a produção de diferentes metabólitos, agregando valor aos mesmos.

Leonel e Cerada (1995) utilizaram a manipueira, resíduo líquido resultante da prensagem da massa ralada de mandioca, como suplemento na biossíntese de ácido cítrico por *A. niger*. Os autores não encontraram diferença significativa na produção de ácido cítrico no meio com manipueira quando comparada com a produção com os meios sintéticos tradicionais, o que favorece o uso desse substrato devido ao seu baixo custo.

Menezes et al. (2005) utilizaram resíduos de maracujá como suplemento, e farelo de trigo como suporte e fonte de carbono para produção de poligalacturonase em fermentação em estado sólido por *A. niger*. Os autores estudaram diferentes proporções de resíduo de maracujá e farelo de trigo. O resíduo de maracujá apresentou potencial de aplicação na produção de poligalacturonase por aumentar a atividade de 5,77U/mL para 8,40U/mL quando presente no meio em proporção de 25% para 75% de farelo de trigo.

Asther et al. (2002) avaliaram polpa de beterraba em fermentação submersa e em estado sólido para produção de feruloil esterase por *A. niger*. Os autores obtiveram uma produção maior na fermentação em estado sólido (9,6nkat/g de substrato seco) quando comparada com a fermentação submersa (2,26nkat/g de substrato seco).

Panarotto et al. (2003) fizeram uso de cascas de limão para produção de exo-poligalacturonase em fermentação em estado sólido por *A. niger*. Os autores compararam o papel indutor do resíduo casca de limão com pectinas cítricas comerciais, utilizando farelo de trigo como suporte e principal fonte de carbono na fermentação em estado sólido. A casca de limão mostrou melhores atividades (70,5U/g de matéria seca) do que as pectinas comerciais (34,7 e 35,3U/g de matéria seca).

Couri et al. (2000) estudaram a produção de poligalacturonase, xilanase, celulase e protease de *A. niger* em fermentação em estado sólido nos substratos casca de manga, casca de banana, farelo de trigo e farelo de mandioca. Farelo de trigo foi o melhor substrato para a produção de poligalacturonase, xilanase e protease, enquanto casca de manga foi o melhor substrato para a produção de celulase.

Apesar da diversidade de substratos disponíveis para utilização em processos biotecnológicos, melaço de cana-de-açúcar e garapa destacam-se no Brasil pela sua grande disponibilidade e bom custo-benefício.

3.3.2.2 Garapa e melaço de cana-de-açúcar

O melaço de cana-de-açúcar é um subproduto da indústria de açúcar. É um líquido denso, escuro e viscoso, sendo no Brasil, utilizado pelas destilarias como substrato para produção de etanol. O melaço é um substrato prontamente disponível, apresenta alta concentração de sacarose, além de outras substâncias importantes para processos fermentativos, o que o torna um substrato amplamente utilizado. Todavia, possui alguns componentes que inibem o crescimento celular. Na Tabela 2 é mostrada a composição média do melaço de cana-de-açúcar.

Tabela 2 – Composição do melaço de cana-de-açúcar (CURTIN, 1983)

Composição do melaço de cana-de-açúcar	
Concentração de sólidos – Brix (°B)	79,5
Sólidos totais (%)	75,0
Açúcares totais (%)	46,0
Proteínas (%)	3,0
Extrato livre de nitrogênio (%)	63,0
Lipídios totais (%)	0,0
Fibras totais (%)	0,0
Cinzas (%)	8,1
Minerais	
Cálcio (%)	0,8
Fósforo (%)	0,08
Potássio (%)	2,4
Sódio (%)	0,2
Cloro (%)	1,4
Enxofre (%)	0,5
Minerais traço	
Cobre (mg/Kg)	36,0
Ferro (mg/Kg)	249,0
Manganês (mg/Kg)	35,0
Zinco (mg/Kg)	13,0
Vitaminas	
Biotina (mg/Kg)	0,36
Colina (mg/Kg)	745,0
Ácido pantotênico (mg/Kg)	21,0
Riboflavina (mg/Kg)	1,8
Tiamina (mg/Kg)	0,9

A garapa é uma fonte renovável e relativamente barata de sacarose, que é obtida a partir do esmagamento da cana-de-açúcar. No Brasil é o principal substrato para a produção de etanol e açúcar. Na Tabela 3 é mostrada a composição cana-de-açúcar.

Tabela 3 – Composição média da cana-de-açúcar (COPERSUCAR, 2006)

Composição média da cana-de-açúcar	
Composição	Teor (%)
Água	65 - 75
Açúcares	11 - 18
Fibras	8 - 14
Sólidos solúveis	12 - 23
Principais constituintes da cana-de-açúcar	
Constituintes	Sólidos solúveis (%)
Açúcares	75 a 93
Sacarose	70 a 91
Glicose	2,0 a 4,0
Frutose	2,0 a 4,0
Sais	3,0 a 5,0
Sais de ácidos inorgânicos	1,5 a 4,5
Sais de ácidos orgânicos	1,0 a 3,0
Proteínas	0,5 a 0,6
Amido	0,001 a 0,05
Ceras e graxas	0,05 a 0,15
Corantes	3,0 a 5,0

3.3.3 Indução da Produção de Enzimas por *Aspergillus spp*

Os microrganismos na natureza, para competir contra outras formas de vida e sobreviver as constantes alterações físico-químicas do ambiente, possuem mecanismos de regulação que controlam a produção de seus metabólitos. Dentro de certos limites, ocorrem variações na quantidade de metabólitos produzidos em consequência de variações da expressão gênica. Comumente a presença ou ausência da síntese de enzimas em uma célula microbiana depende da presença de um composto específico que atua como indutor ou repressor. O indutor sinaliza o início da produção enquanto que o repressor reprime ou interrompe a produção de algum metabólito: proteína estrutural ou dinâmica (p.ex. enzimas). Os processos fermentativos industriais procuram linhagens superprodutoras raras de metabólitos de interesse as quais são ainda otimizadas através da desregulação de seu metabolismo por diversas ações: alterações das condições de cultivo e uso de manipulações genéticas. Esses esforços tentam contornar os mecanismos regulatórios negativos e realçar os positivos. Diversas enzimas são induzidas pelo seu próprio substrato. Assim, o uso de indutores bem como o de repressores tem sido pesquisado em *A. niger* por diversos autores.

Kang et al. (2004) investigaram o papel indutor de celulose e xilana na produção de celulase e xilanase em fermentação em estado sólido por *A. niger*.

Os autores conseguiram aumentar em 1,8 vezes a atividade de celulase e 2,8 vezes a atividade de xilanase, demonstraram dessa maneira o papel indutor da celulose e da xilana na produção de enzimas. No entanto, a suplementação do meio com palha de trigo diminuiu a produção das enzimas, provavelmente devido à repressão catabólica. Esse mecanismo regulatório assegura uma utilização seqüencial e organizada das fontes de carbono quando mais de uma está presente no meio, iniciando pelas que mais disponibilizam energia e carbono para o crescimento (SANCHEZ e DEMAINE, 2002).

Mahadik et al. (2002) utilizaram diversos óleos, como fontes de triacilgliceróis, para induzir a produção de lipase por *A. niger* em fermentação submersa. Utilizando meio mínimo com glucose, a atividade alcançada foi de 0,02UI/mL, enquanto que no meio mínimo com óleo de oliva era de 3,5UI/mL. Entretanto, no meio mínimo com óleo de oliva e sacarose foi de 6,8UI/mL. Assim, os resultados demonstraram o papel indutor dos triacilgliceróis, que foi potencializado quando existia sacarose no meio para promover um crescimento inicial.

Ashokkumar et al. (2001) utilizando *A. niger* em fermentação, otimizaram o meio para produção de invertase com sacarose como fonte de carbono e indutor da produção da enzima. Aumentando a concentração de sacarose do meio padrão de 20g/L para 100g/L obteve-se um aumento de 18,3UI/litro/h para 58,3UI/litro/h.

Kona et al. (2001) estudaram o papel indutor da glucose e sacarose em meio suplementado com milhocina na produção de glucose oxidase por *A. niger*. Os autores verificaram que a produção de glucose oxidase era induzida por glucose e sacarose, enquanto que maltose, frutose, amido e melão reprimiram a produção da enzima.

Couri et al. (2000) estudaram o papel indutor da celobiose na produção de celulase por *A. niger*. Os autores verificaram que a celobiose induziu a produção de celulase. As atividades dessa enzima aumentaram de 2,48UI/mL para 3,5UI/mL com a adição de celobiose 2g/L. Em contra partida, palha de trigo reduziu a produção de celulase, resultando em atividades sempre menores que 1,0UI/mL, provavelmente devido a repressão catabólica.

Papagianni et al. (1999) pesquisaram o papel indutor do fitato na produção de fitase por *A. niger* em fermentação submersa com meio suplementado com palha de trigo. A adição do fitato aumentou a produção de fitase e de biomassa

pelo microrganismo. A atividade de fitase aumentou de 6.770 para 8.090u/L devido à adição de fitato na composição do meio.

Em alguns casos, substâncias com características químicas semelhantes ao substrato de uma enzima podem atuar como indutores. Goto et al. (1998) investigaram o papel indutor de α -metil-D-glucosídeo, um análogo sintético da maltose, como fonte de carbono na produção de glucoamilase e α -amilase por *Aspergillus fumigatus*. Os autores verificaram um aumento na atividade de glucoamilase de 15U/mg para 51U/mg e de α -amilase de 6U/mg para 29U/mg quando maltose foi substituída pelo seu análogo. Por outro lado, glucose e rafinose foram repressores da produção, diminuindo as atividades para 1,5U/mg e 8,1U/mg respectivamente.

A produção de naringinase também pode ser induzida pela presença de naringina ou de ramnose, ou sofrer repressão por alguns componentes (Puri et al., 2000). Alguns autores estudaram o papel indutor e repressor desses componentes na produção de naringinase.

Puri et al. (2005) testaram o papel indutor da ramnose e do melão na produção de naringinase por *A. niger* em fermentação submersa. A atividade da enzima quando nenhuma fonte de carbono ou nitrogênio foi utilizada foi de 2100mUI/mL. Ramnose e melão induziram uma atividade de 4600mUI/mL sem fonte de nitrogênio. Utilizando melão, peptona induziu uma atividade de 6500mUI/mL. Com melão e peptona, os íons (10mM) Ca^{2+} e Mg^{2+} induziram atividades de 8000mUI/mL e 8580mUI/ml respectivamente. Entretanto, glucose, frutose, sacarose e amido foram repressores, assim como sulfato de amônio, fosfato de amônio e caseína. Um inóculo com menos de 72h ou menor que 7% (v/v) diminuiram a produção de naringinase. Adicionalmente, os íons (5mM) Cu^{2+} , Co^{2+} e Ni^{2+} também tiveram papel repressor, não permitindo a produção de naringinase.

Elinbaum et al. (2002) fizeram uso de *A. terreus* em fermentação em estado sólido em diversos suportes com naringina como indutor da produção de naringinase. A atividade da enzima, avaliada como α -L-ramnosidase, teve aumento de 2,0 para 4200mUI/ml com o aumento da concentração de naringina de 5 para 10g/L. Entretanto, palha de trigo como suporte provavelmente agiu como fonte de carbono e causou repressão catabólica.

Yadav e Yadav (2000), utilizando *A. terreus*, adicionaram 0,33g/L de naringina como indutor ao meio de cultivo contendo 40g/L de sacarose como fonte

de carbono. Os autores conseguiram dessa maneira, aumentar a atividade de naringinase, aferida pela atividade de α -L-ramnosidase de 3200 para 5700mUI/mL. Palha de arroz quando suplementada no meio, com ou sem naringina, propiciou atividades de aproximadamente 4700mUI/mL, provavelmente agindo como fonte de carbono o que resultou em repressão catabólica.

Soria et al. (1999) estudaram *A. terreus* para produção naringinase em fermentação submersa com naringina ou ramnose como fontes de carbono e indutores. Os autores conseguiram aumentar de 1,41 para 2840mUI/mL a atividade da enzima, avaliada pela atividade α -L-ramnosidase, quando aumentaram a concentração de naringina de 5 para 20g/L. No entanto, ramnose foi um melhor indutor que a naringina possibilitando uma atividade de 8800mUI/mL na concentração de 5g/L.

Ramnose também foi o melhor indutor nos estudos de Orejas et al. (1999). Esses autores utilizaram *Aspergillus nidulans* para produção de α -L-ramnosidase em fermentação submersa e testaram diferentes compostos como fontes de carbono e indutores. Os autores conseguiram aumentar a atividade da enzima de 2,14mUI/mL quando o cultivo foi feito com glucose para 30,93mUI/mL quando naringina foi utilizada. Entretanto, ramnose aumentou para 588mUI/mL a atividade da enzima. Em contrapartida, arabinose, glucose, hesperidina, rutina e xilose foram repressores da atividade da naringinase.

Bram e Solomons (1965) avaliaram o papel indutor da naringina na fermentação de milhocina e extrato de levedura por *A. niger*. Os autores verificaram o aumento da atividade de 124mUI/mL para 328mUI/mL quando adicionaram 0,5g/L de naringina ao meio. No entanto, a adição de pequenas quantidades de naringina ao longo da fermentação foi mais eficiente do que uma adição única ao início da fermentação, propiciando uma atividade de 440mUI/mL.

3.4 PRODUÇÃO DE NARINGINASE

Carbono e nitrogênio são os principais macronutrientes para os seres vivos. As quantidades desses compostos na nutrição afetam diretamente o metabolismo e dessa maneira o ciclo biológico. Além dos componentes do meio de

cultivo, outros fatores como temperatura, pH, velocidade de agitação, tamanho do inóculo, bem como a fermentação ser do tipo submersa ou em estado sólido podem influenciar na produção de metabólitos. Assim, devido a sua importância, esses fatores têm sido estudados para produção de naringinase por diversos autores.

Puri et al. (2005) testaram as fontes de carbono (10g/L) glucose, frutose, ramnose, maltose, sacarose, melação, amido e milhocina para a produção de naringinase por *A. niger* em fermentação submersa. Os cultivos eram realizados na temperatura de 28°C, agitação de 200rpm e pH inicial de 4,5. Foi utilizado um inóculo de 10% (v/v). Melação e ramnose possibilitaram as melhores atividades de 4,6UI/mL após 8 dias de fermentação. Dentre as diversas fontes de nitrogênio testadas (orgânicas e inorgânicas), peptona propiciou a melhor produção de naringinase (6,5 UI/mL). A adição do íon Mg^{2+} aumentou a produção para 8,5UI/mL.

Elinbaum et al. (2002) estudaram a produção de naringinase por *A. terreus* em fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e espuma de poliuretano como diferentes suportes. Os cultivos foram conduzidos em temperatura de 30°C, umidade controlada de 99%, inóculo de 10^9 esporos/mL de solução nutriente e naringina (5g/L). Os melhores resultados foram obtidos com bagaço de cana-de-açúcar (1,7U/mL) em relação ao uso de espuma de poliuretano (1,25U/mL) e de farelo de trigo (1,0U/mL). Um aumento na concentração de naringina para 10g/L aumentou a atividade para 4,2UI/mL com bagaço de cana-de-açúcar como suporte. Entretanto, a umidade quando reduzida de 99% para 95% reduziu a produção de naringinase.

Yanai e Sato (2000) utilizaram ramnose (1%), peptona (0,5%), extrato de levedura (0,3%) e extrato de malte (0,3%) para a produção de naringinase durante 48h por 386 linhagens de leveduras. As linhagens foram cultivadas aerobicamente a 28°C, pH inicial de 4 e por 48h. O gênero *Pichia* mostrou os melhores resultados com 34mUI/ml e 29mUI/mL para *Pichia angusta* e *Pichia capsulata* respectivamente.

Norouzian et al. (2000) utilizaram naringina ou ramnose como fontes de carbono para *Penicillium decubens* em fermentação submersa. Os cultivos foram feitos na temperatura de 25°C, agitação de 250rpm, com um inóculo de 10^7 esporos/mL e durante 120h. A combinação naringina (10g/L) e peptona (10g/L) foi a melhor encontrada pelos autores.

Orejas et al. (1999) investigaram como fontes de carbono a

arabinose, glucose, hesperidina, naringina, ramnose, rutina e xilose suplementadas a um meio mínimo para a produção de naringinase por *Aspergillus nidulans* em fermentação submersa. Os cultivos foram feitos na temperatura de 37°C, sob agitação e pH inicial de 5,5. Um pré-inóculo de 18h e aproximadamente 1g de peso seco de micélio foi utilizado para 15mL de meio de cultivo. A ramnose foi a melhor fonte de carbono, com atividade de 588,320mUI/mL após 24h de cultivo. Naringina também foi capaz de induzir a produção, mas em menor proporção (30,935mUI/mL). As outras fontes foram todas repressoras da produção.

Soria et al. (1999) estudaram ramnose e naringina como fontes de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio na produção de naringinase por *Aspergillus terreus* em fermentação submersa. Os cultivos foram feitos na temperatura de 35°C, sob agitação de 200rpm e um inóculo de 10⁶ esporos/mL. A atividade 1,41UI/mL foi atingida com naringina como fonte de carbono na concentração de 5g/L no oitavo dia de cultivo. Com o aumento da concentração de naringina para 20g/L observou-se um aumento na atividade para 2,84UI/mL no décimo dia. No entanto, a ramnose na concentração de 5g/L foi a melhor fonte, com atividade de 8,8UI/mL no nono dia.

Bram e Solomons (1965) testaram milhocina e farelo de soja como fontes de carbono e como fontes de nitrogênio extrato de levedura e nitrato de sódio em fermentação submersa. Os cultivos foram feitos na temperatura de 30°C, agitação de 240rpm e pH controlado entre 5,0 e 5,5. Os autores definiram a combinação milhocina (4%) e extrato de levedura (4%) como melhores fontes de carbono e nitrogênio para a produção de naringinase por *A. niger* (380mUI/mL) após 6 dias de cultivo.

A Tabela 4 resume os resultados de produção de naringinase obtidos pelos autores citados. Considerando o exposto e as diversas aplicações de substratos alternativos, este trabalho objetivou a fermentação de melaço, garapa e sacarose por *A. niger* para a produção de naringinase, devido a importância do potencial uso dessa enzima para a remoção do excesso de amargor nos sucos cítricos e outras aplicações biotecnológicas.

Tabela 4 – Resumo dos resultados de produção de naringinase obtidos por diversos autores.

Autores	Atividade de naringinase (mUI/mL)
Puri et al. (2005)	8.500
Elinbaum et al. (2002)	4.200
Yanai e Sato (2000)	34
Orejas et al. (1999)	588
Soria et al. (1999)	8.800
Bram e Solomons (1965)	380

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Microrganismo

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

4.1.2 Melaço de Cana-de-açúcar e Garapa

O melaço safra 2003 foi gentilmente cedido pela Usina de Açúcar e Álcool da COROL (Cooperativa Agropecuária de Rolândia Ltda) e apresentou 60% de açúcares totais.

A garapa foi adquirida no comércio local e apresentou 17,5% de açúcares totais.

Os valores de melaço e garapa apresentados na composição dos meios são referentes aos açúcares totais.

4.1.3 Meios de Cultivo

4.1.3.1 Meio de manutenção e inóculo

A composição do meio de manutenção e inóculo, meio batata-

dextrose-ágar (BDA), está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 – Composição dos meios de manutenção e inóculo.

Composição	Concentração (g/L)
Infusão de batata	4,0
Glucose	20,0
Ágar	15,0

4.1.3.2 Fermentação de naringina e sacarose

A composição dos meios de fermentação de naringina e sacarose está indicada na tabela a seguir.

Tabela 6 – Composição dos meios de fermentação de naringina e sacarose.

Composição	Concentração (g/L)		
	Meio I	Meio II	Meio III
Naringina	10,0	-	5,0
Sacarose	-	10,0	5,0
KH ₂ PO ₄	1,0	1,0	1,0
KCl	0,5	0,5	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5	0,5	0,5
FeCl ₃ .6 H ₂ O	0,175	0,175	0,175
Peptona	10	10	10

4.1.3.3 Fermentação de melaço, garapa, peptona e nitrato de sódio combinados

A composição do meio de fermentação de melaço, garapa, peptona e nitrato de sódio combinados, está apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 – Composição dos meios de fermentação de melaço, garapa, peptona e nitrato de sódio

Componentes (g/L)	Meios					
	1	2	3	4	5	6
Melaço	10,0	10,0	-	-	5,0	5,0
Garapa	-	-	10,0	10,0	5,0	5,0
Peptona	10,0	-	10,0	-	10,0	-
NaNO ₃	-	10,0	-	10,0	-	10,0
KH ₂ PO ₄	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
KCl	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
FeCl ₃ .6 H ₂ O	0,175	0,175	0,175	0,175	0,175	0,175
Naringina	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

4.1.3.4 Fermentação de melaço em diferentes concentrações

A composição dos meios de fermentação de melaço em diferentes concentrações está apresentada na tabela a seguir.

Tabela 8 – Composição dos meios de melaço em diferentes concentrações

Composição	Concentração (g/L)
Melaço	1,0; 3,0; 5,0 e 10,0
Peptona	10,0
KH ₂ PO ₄	1,0
KCl	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
FeCl ₃ .6 H ₂ O	0,175
Naringina	0,5

4.1.3.5 Fermentação de peptona em diferentes concentrações

A composição dos meios de fermentação de peptona em diferentes concentrações está apresentada na Tabela 9.

Tabela 9 – Composição dos meios de fermentação de peptona em diferentes concentrações

Composição	Concentração (g/L)
Peptona	6,0; 8,0; 10,0; 12,0 e 14,0
Melaço	3,0
KH ₂ PO ₄	1,0
KCl	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
FeCl ₃ .6 H ₂ O	0,175
Naringina	0,5

4.1.3.6 Fermentação de peptona e melaço com diferentes formas de indução

A adição do indutor foi de forma única ou fracionada. A composição do meio de fermentação de peptona e melaço com adição única está apresentada na tabela a seguir.

Tabela 10 – Composição dos meios de fermentação de peptona e melaço com adição única de naringina

Composição	Concentração (g/L)
Peptona	10,0
Melaço	3,0
KH ₂ PO ₄	1,0
KCl	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
FeCl ₃ .6 H ₂ O	0,175
Naringina	0,5

Nos experimentos em que a naringina foi adicionada fracionadamente, a composição dos meios é a descrita na Tabela 10 exceto que não continha naringina. Utilizou-se uma solução aquosa de naringina 10g/L.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo de Meios de Cultivo

4.2.1.1 Manutenção e inóculo

Os componentes da tabela 4 eram solubilizados em água destilada nas concentrações indicadas e alíquotas de 5mL e de 20mL eram distribuídas respectivamente em tubos de ensaio e em erlenmeyers de 250mL de capacidade. Em seguida, os frascos eram autoclavados por 20 minutos a 121°C. Os tubos de ensaio eram acomodados em posição inclinada até solidificação e então os frascos eram estocados em câmara fria a 4°C para posterior utilização.

4.2.1.2 Meios de fermentação

Os componentes das tabelas 5, 6, 7, 8 e 9 eram solubilizados em água destilada nas concentrações indicadas, o pH era corrigido para 4,5 com HCl 1M ou NaOH 4M e alíquotas de 100mL eram distribuídas em erlenmeyers de 500mL. Em seguida, os frascos eram 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 Manutenção do Microrganismo

Para manutenção, *A. niger* era repicado a cada 30 dias em tubos com o meio de manutenção conforme descrito no item 4.1.3.1. Em seguida procedia-se a incubação a 28°C por 72h. Então os tubos eram armazenados em câmara fria a 4°C.

4.2.3 Preparo de Inóculo

O fungo era repicado de tubos de manutenção em três frascos erlenmeyer de 250mL contendo 20mL meio de inóculo sólido BDA, descrito na Tabela 4, e levado à estufa por 72h para formação de esporos. Após esse tempo, 50mL de TWEEN 80 0,1% (v/v) autoclavados eram adicionados ao primeiro dos três erlenmeyers e levemente homogeneizados. A suspensão de esporos era transferida do primeiro erlenmeyer para o segundo e novamente homogeneizado. A suspensão era então transferida para o terceiro erlenmeyer e por ultimo transferida para um tubo de ensaio. Em seguida era retirada uma alíquota da suspensão e procedia-se a contagem de esporos em câmara de Neubauer. Então, preparava-se um volume de suspensão de esporos para obter um inóculo de 10^6 esporos/mL. O volume final do inóculo era sempre menor que 1mL (Figura 2).

4.2.4 Fermentações

Os experimentos foram realizados em triplicatas, utilizando os meios descritos nas Tabelas 5; 6; 7; 8 e 9 e preparados segundo metodologia descrita no item 4.2.1.2. As fermentações eram conduzidas em mesa rotatória tipo shaker com agitação de 180rpm e temperatura controlada a 28°C.

Na fermentação de peptona e melão, com adição fracionada de naringina, foram conduzidos quatro experimentos e cada fração era de 1mL de naringina aquosa (10g/L). No primeiro experimento as frações foram adicionadas nos tempos (0h, 24h, 48h, 72h, e 96h); no segundo nos tempos (24h, 48h, 72h, 96h e 120h); no terceiro nos tempos (48h, 72h, 96h, 120h e 144h) e no quarto nos tempos (72h, 96h, 120h, 144h e 168h). Assim, a concentração total de naringina adicionada aos meios de cultivo foi de 0,5g/L, conforme a Tabela 11. A adição das parcelas de naringina foi realizada em condições assépticas.

Tabela 11 – Adição das frações de naringina (g/L) nos diferentes tempos de fermentação

Tempo de fermentação (h)	Frascos de fermentação (triplicatas)			
	1	2	3	4
0	0,1	-	-	-
24	0,1	0,1	-	-
48	0,1	0,1	0,1	-
72	0,1	0,1	0,1	0,1
96	0,1	0,1	0,1	0,1
120	-	0,1	0,1	0,1
144	-	-	0,1	0,1
168	-	-	-	0,1

4.2.5 Amostragem dos Cultivos

Amostras de 1,2mL dos cultivos eram retiradas em condições assépticas, a cada 24h no decorrer das fermentações. As amostras eram centrifugadas por 15 minutos a 20.000g e 4°C. O sobrenadante era utilizado para as determinações analíticas de: atividade de naringinase, atividade de invertase e açúcares redutores totais (Figura 2).

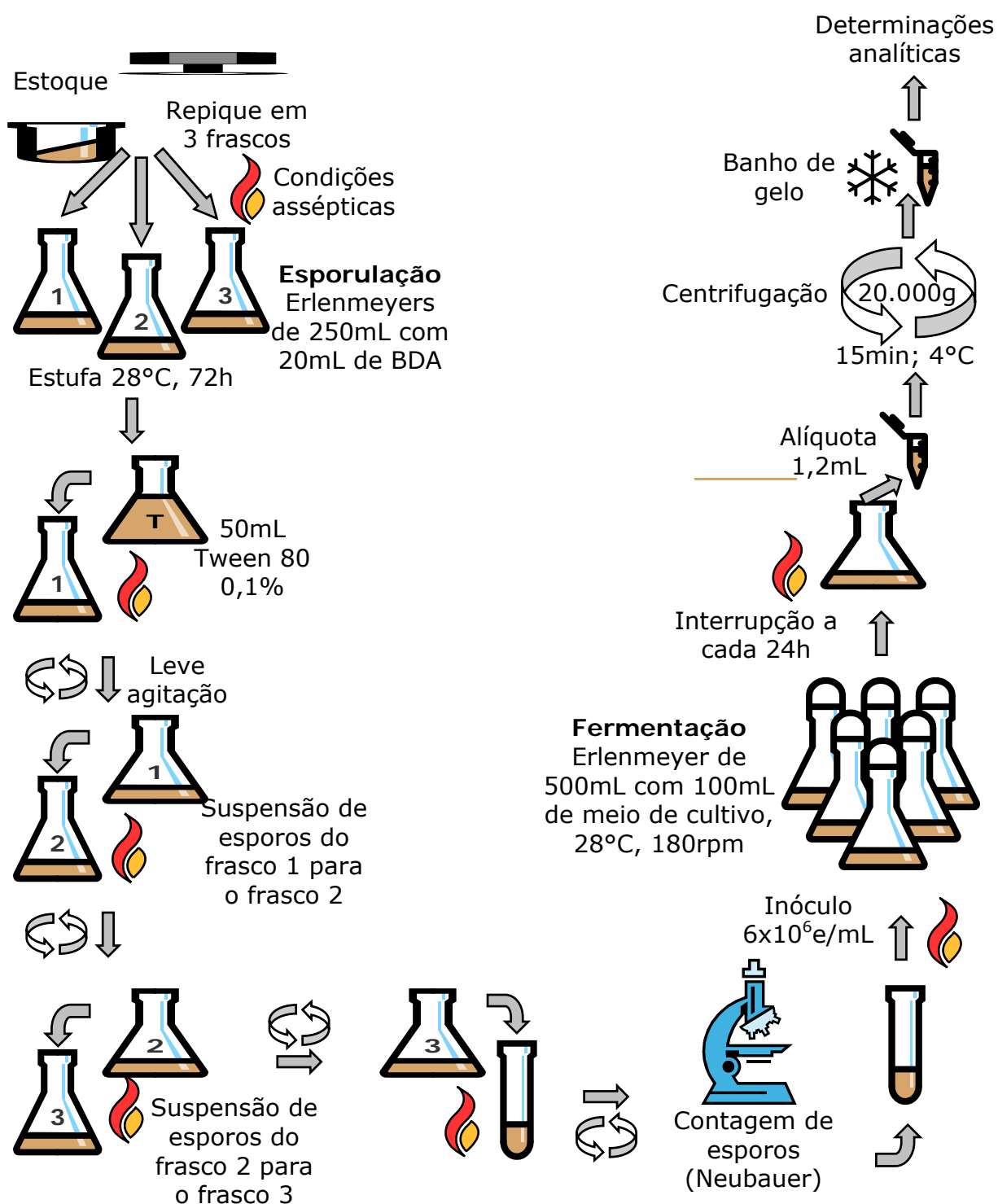


Figura 2 – Ilustração da metodologia de inóculo e interrupção.

4.2.6 Determinações Analíticas

4.2.6.1 Atividade de naringinase

A atividade da naringinase foi determinada segundo uma adaptação do Método de Davis (DAVIS, 1947). A mistura de reação era composta de 0,8mL de naringina a 1g/L pipetada em tubo de ensaio previamente contendo 0,5mL de tampão acetato de sódio 0,1M (pH 4,0) e 0,1mL de sobrenadante do cultivo. O branco da reação era composto de 0,8mL de água destilada e 0,6mL do mesmo tampão. Brancos do substrato e do sobrenadante também foram preparados para todos os experimentos. Essas misturas eram então incubadas a 50°C por uma hora. Em seguida efetuava-se a transferência de alíquota de 0,1mL em tubos de ensaio contendo 3mL de dietilenoglicol 90% (v/v). Por último, eram adicionados 0,1mL de NaOH 4M. Os tubos eram deixados em repouso por 20 minutos em temperatura ambiente para o desenvolvimento de cor que era lida em 420nm, zerando-se o espectrofotômetro com o branco da reação.

Os resultados de atividade enzimática eram expressos em mUI/mL, considerando uma unidade de atividade de naringinase como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 μ mol de naringina por minuto sob as condições descritas. Os resultados de atividade enzimática em relação à biomassa (AEB) eram expressos em mUI/g, considerando uma unidade de atividade enzimática em relação à biomassa como a atividade enzimática (mUI/mL) dividida pela biomassa (g/L). Uma curva padrão foi confeccionada utilizando naringina em concentrações variando de 0,25 a 1,0g/L.

4.2.6.2 Atividade de invertase

A atividade da invertase foi determinada de acordo com o Método de Miller (1959). A mistura de reação era composta de 0,5mL de sacarose 0,5M adicionada em 1,5mL de tampão acetato de sódio 0,2M (pH 5,0) e 0,5mL de

sobrenadante. O branco da reação era composto de 2,5mL do mesmo tampão. Brancos do substrato e do sobrenadante também foram preparados para todos os experimentos. Essas misturas eram então incubadas a 30°C por 10 minutos. Um mililitro do reagente DNS era então adicionado a cada tubo e seguia-se um banho fervente por 10 minutos e posterior adição de 6,5mL de água destilada aos tubos. A intensidade da cor formada, era aferida em espectrofotômetro a 540nm. Uma unidade de atividade enzimática era a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de açúcares redutores por minuto sob as condições descritas. A curva padrão foi elaborada utilizando-se glucose como padrão em concentrações variando de 25 a 500µg/mL, efetuando-se as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540nm.

4.2.6.3 Açúcares totais

Os açúcares redutores totais foram determinados pelo método do Fenol Sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). A curva padrão foi elaborada utilizando-se glucose como padrão em concentrações variando de 20 a 100µg/mL, efetuando-se as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490nm.

4.2.6.4 Biomassa

A biomassa foi determinada, após o último dia de cultivo, por gravimetria, após filtragem e secagem a 80°C até peso constante.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados na forma de artigo, intitulado “Produção de Naringinase por *Aspergillus niger* na Fermentação de Diferentes Fontes de Carbono e Nitrogênio”, que está apresentado no Apêndice A.

O artigo foi elaborado segundo normas da revista Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, as quais estão apresentadas no Anexo A.

6 CONCLUSÕES

A produção de naringinase foi induzida pela presença do substrato naringina. Mas, como única fonte de carbono a naringina não apresentou a maior produção. Sacarose exerceu papel repressor da produção de naringinase. No entanto, a combinação das duas fontes foi apropriada, pois possibilitou um ganho inicial de biomassa pela utilização da sacarose e posterior produção de naringinase induzida pela naringina.

A melhor produção de naringinase foi com a concentração de 3g/L de melão e 10g/L de peptona com atividade de 178,6mUI/mL. A maior biomassa (13,1g/L) foi obtida com a maior concentração de melão (15g/L). Assim como a biomassa, a atividade de invertase foi diretamente proporcional à concentração de melão e detectada em todos os experimentos.

A melhor condição para a produção de naringinase (melão 3g/L e peptona 10g/L) também foi boa para a produção de invertase, sugerindo que o metabolismo como um todo foi influenciado de maneira positiva por essa condição.

Os valores de pH dos meios de cultivo apresentaram gradativo aumento dos 4,5 inicial e ficaram entre 6,0 e 7,0 para todos os cultivos após o fim da fermentação.

As fermentações foram eficientes, com consumo dos açúcares totais dos meios de cultivo sempre maior que 85%.

REFERÊNCIAS

- ASHOKKUMAR, B.; KAYALVIZHI, N.; GUNASEKARAN, P. Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. **Process Biochemistry**, Madurai, v.37, p.331–338, mar. 2001.
- ASTHER, M.; HAON, M.; ROUSSOS, S.; RECORD, E.; DELATTRE, M.; LESAGE-MEESSEN, L.; LABAT, M.; ASTHER, M. Feruloyl esterase from *Aspergillus niger* a comparison of the production in solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, Marseille, v.38, p.685-691, jun. 2002.
- 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**, Murcia, v.45, p.4505-4515, 1997.
- BRAM, B.; SOLOMONS, G. L. Production of the enzyme naringinase by *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology**, Jerusalem, v.13, p.842-845, fev. 1965.
- CALDINI, C. et al. Kinetic and immobilization studies on fungal glycosidase for aroma enhancement in wine. **Enzyme Microbial Technology**, Milão, v.16, p.286-291, 1994.
- 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.
- COGHLAN, A. Squeezing bitterness out of grapefruit. **Nature Biotechnology**. v.15, p.202, 1997.
- COPERSUCAR. **Cana-de-açúcar**. Disponível em <http://www.copersucar.com.br/institucional/por/academia/cana_acucar.asp>. Acesso em: 20 out. 2006.
- COURI, S.; TERZI, S. C.; PINTO, G. A. S.; FREITAS, S. P.; COSTA, A. C. A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, Rio de Janeiro, v.36, p. 255-261, jun. 2000.
- CURTIN, L. V. Molasses – General considerations. In:_____. **Molasses in animal nutrition**. West Des Moines: National Feed Ingredients Association, 1983. p. 1-11.

DANIELS, L.; LINHARDT, R. J.; BRYAN, B. A.; MAYERL, F.; PICKENHAGEN, M. Methods for producing rhamnose. **US Patent** 4,933,281. 1990.

DAVIS, W. B. Determination of flavanones in citrus fruits. **Analytical Chemistry**, Los Angeles, v.19, p.476-478, 1947.

DEL RIO, J. A.; ARCAS, M. C.; BENAVENTE, O.; SABATER, F.; ORTUÑO, A. Changes of polymethoxylated flavones levels during development of *Citrus aurantium* (cv. Sevilano) fruits. **Planta Medica**, Murcia, v.64, p.575-576, 1998.

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

ELINBAUM, S.; FERREYRA, H.; ELLENRIEDER, G.; CUEVAS, C. Production of *Aspergillus terreus* α -L-rhamnosidase by solid state fermentation. **Letters in Applied Microbiology**, Salta, v.34, p.67-71, out. 2002.

ELUJOBA, A. A.; HARDMAN, R. Diosgenin prodction by acid and enzymatic hydrolysis of fenugreek. **Fitoterapia**, Ilê Ifé, v.58, p.299-303, 1987.

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

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: 20 mai. 2006.

GLENDENNING, J. I. Is the bitter rejection response always adaptive? **Physiology and Behavior**, Tucson, v. 56, p.1217–1227, 1994.

GOTO, C. E.; BARBOSA, E. P.; KISTNER, L. C. L.; MOREIRA, F. G.; LENARTOVICZ, V.; PERALTA, R. M. Production of amylase by *Aspergillus fumigatus* utilizing K-methyl-D-glycoside, a synthetic analogue of maltose, as substrate. **FEMS Microbiology Letters**, Maringá, v.167, p139-143, ago. 1998.

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

HERNÁNDEZ, M. S.; RODRÍGUEZ, M. R.; GUERRA, N. P.; ROSES, R. P. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. **Journal of Food Engineering**, Santiago de Cuba, v.73, p.93-100, jan. 2006.

HLADIK, C. M.; SIMMEN, B. Taste perception and feeding behavior in nonhuman primates and human populations. **Evolutionary Anthropology**. v.5, p.58–71, 1996.

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

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

KANG, S. W.; PARK, Y. S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Seoul, v.91, p.153-156, abr. 2004.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. **A laboratory Guide to Common Aspergillus Species and their Teleomorphs**. North Ryde, CSIRO Division of Food Processing, 1988.

KONA, R. P.; QURESHI, N.; PAI, J. S. Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor. **Bioresource Technology**, Matunga, v.78, p.123-126, dez. 2001.

LEONEL, M.; CERADA, M. P. Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. **Scientia Agricola**, Botucatu, v.52, n.2, p.299-304, ago. 1995.

MAGA, J. A. Compound structure versus bitter taste. In: ROUSSEFF, R. L. **Bitterness in foods and beverages**. 1.ed. Amsterdam: Elsevier, 1990. p.35–48.

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**, Maharashtra, v.38, p.715-721, jun. 2002.

MANZANARES, P. et al. Purification and characterization of an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus nidulans*. **Letters in Applied Microbiology**, Valencia, v.31, p. 198-202, maio 2000.

MANZANARES, P.; GRAAFF, L. H.; VISSER, J. Purification and characterization of an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus niger*. **FEMS Microbiology Letters**, Dreijenlaan, v.157, p. 279-283, out. 1997.

MCBURNEY, D. H. Psychological dimensions and perceptual analyses of taste. In: CARTERETTE, E. C.; FRIEDMAN, M. P. **Handbook of perception: tasting and smelling**. 1.ed. New York: Academic Press,1978. v.6A.

MCCOLLOCH, R. J. Preliminary studies on debittering Navel orange products. **Californian Citrograph**. v.35, p.290, 1950.

MENEZES, G. D. G.; OLIVEIRA, A. C. P.; SARAIVA, S. H.; DAMASO, M. C. T.; OLIVEIRA, M. A. C. L.; COURI, S. Efeito da concentração das fontes de nitrogênio e de carbono na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* 3TSB8 em fermentação semi-sólida. In: V Congresso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, n.5, 2005, Puerto Vallarta. **Anais...** Puerto Vallarta: 2005.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**. v. 31, p.426–428, 1959.

NEVES M.F.; VAL A.M.; MARINO M.K. The Orange Network in Brazil, 2001. Disponível em <http://www.abecitrus.com.br/works/orange_network_us.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2005.

NOROUZIAN, D.; HOSSEINZADEH, A.; NOURI INANLOU D.; MOAZAMI M. Production and partial purification of naringinase by *Penicillium decumbens* PTCC 5248. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, Tehran, v.16, p.471-473, jun. 2000.

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

OLIVEIRA J. Industrialização já responde por 34% do faturamento das cooperativas do Paraná, 2003. Disponível em <<http://www.srb.org.br/index.php3?news=2392>>. Acesso em: 20 mai. 2005.

OREJAS, M.; IBANEZ, E.; RAMON D. The filamentous fungus *Aspergillus nidulans* produces an α -L-rhamnosidase of potential oenological interest. **Letters in Applied Microbiology**, Valencia, v.28, n.5, p.383-388, fev. 1999.

PANAROTTO C.; MALVESSI E.; SILVEIRA M. M. Avaliação de Cascas de Limão Taiti como Fonte de Indutor na Produção de Poligalacturonases por *Aspergillus niger* em Estado Sólido. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações - SINAFERM 2003, n.14, 2003, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: 2003.

PAPAGIANNI, M.; NOKES, S. E.; FILER, K. Production of phytase by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, Lexington, v.35, p.397-402, jun. 1999.

PINO, J. A. Flavonoids in citrus fruit. **Alimentaria**, Havana, v.10, p.63-79, 1997.
PURI, A. Preparation of citrus juices concentrates and dried powders which are reduced in bitterness. **US Patent** 4,439,458. 1984.

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

PURI, M.; BANERJEE, U. C.; Production, purification, and characterization of the debittering enzyme naringinase. **Biotechnology Advances**, Chandigarh, v.18, p.207-217, maio 2000.

ROITNER, M.; SCHALKHAMMER, T.; PITTNER, F. Preparation of prunin with the help of immobilized naringinase pretreated with alkaline buffer. **Applied Biochemistry Biotechnology**, Viena, v.9, p.483-488, 1984.

SANCHEZ, S.; DEMAINE A. L. Metabolic regulation of fermentation processes. **Enzyme and Microbial Technology**, Mexico D.F., v.31, p.895-906, jun. 2002.

SANKYO. Preparation of antibiotic chloropolysporin-C. **Japanese Patent** 63,146,797. 1988.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Darmstadt, v.59, p.426-435, abr. 2002.

SEKHAR RAO, K. C.; KARANTH, N. G.; SATTUR, A. P. Production of nigerloxin, an enzyme inhibitor and a free radical scavenger, by *Aspergillus niger* using solid state fermentation. **Process Biochemistry**, Mysore, v.40, p.2517-2522, out. 2005.

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**, Winter Haven, v.32, p.832-836, 1984.

SHAW, P. E.; WILSON, C. W. Debittering citrus juices with β -cyclodextrin polymer. **Journal of Food Science**, Winter Haven, v.48, p.646-647, 1983.

SINGH, S. V.; JAIN, R. K.; GUPTA, A. K.; DHATT, A. S. Debittering of citrus juices - A review. **Journal of Food Science and Technology**, Abohar, v.40, n.3, p.247-253, 2003.

SMYTHE, C. W.; THOMAS, D. W. Conversion of flavonoid glycosides. **US Patent** 2,950,974. 1960.

SORIA, F. F.; CUEVAS, C.; ELLENRIEDER, G. Purification and some properties of a α -L-rhamnosidase of *Aspergillus terreus*. **Applied Biological Science**, Salta, v.5, p.109-120, maio 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**, Salta, v.26, p.1265-1268, jun. 2004.

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

WARD, M.; LIN, C.; VICTORIA, D. C.; FOX, B. P.; FOX, J. A.; WONG, D. L.; MEERMAN, H. J.; PUCCI, J. P.; FONG, R. B.; HENG, M. H.; TSURUSHITA, N.; GIESWEIN, C.; PARK, M.; WANG, H. Characterization of Humanized Antibodies Secreted by *Aspergillus niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, Palo Alto, v.70, p.2567-2576, jan. 2004.

YADAV, S.; YADAV, K. D. S. Secretion of α -L-rhamnosidase by *Aspergillus terreus* and Its Role in Debittering of Orange Juice. **Journal of Scientific & Industrial Research**, Gorakhpur, v.59, p.1032-1037, ago. 2000.

YANAI, T.; SATO, M. Purification and characterization of an α -L-rhamnosidase from *Pichia angusta* X349. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Fujisawa, v.64, p.2179-2185, maio 2000.

ZAJIC, J. E.; KUEHN, H. H. Biosynthesis of yellow pigments by *Aspergillus niger*.
Mycopathologia. v.17, n.2, p. 149-158, 1962.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Artigo “Naringinase production by *Aspergillus niger* in the fermentation of different carbon and nitrogen sources”

Authors:

Robson Alessandro Mattos Machado¹, João Batista Buzato¹, Cecília Duarte Dias¹, Maria Antonia P. C. Celligoi¹

Title:

Naringinase production by *Aspergillus niger* in the fermentation of different carbon and nitrogen sources

Affiliation:

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

Corresponding author:

João Batista Buzato¹

E-mail: buzato@uel.br Tel: +55 43 3371-4270 – Fax: + 55 43 3328-4216

Abstract

Citrus fruit and frozen concentrated orange juice production is of great commercial importance for Brazil. Excessive bitterness is the main depreciator of juice value on the market. Naringinase, an enzymatic complex that degrades naringin, has potential application for debittering. This study investigated naringinase production by *Aspergillus niger* through sucrose, naringin, molasses and sugarcane juice, supplemented with peptone and sodium nitrate. Naringin, when used in the culture medium as inducer, was added in a single or fractioned doses. The base culture medium contained (g/L): 1.0 KH₂PO₄; 0.5 KCl; 0.5 MgSO₄.7H₂O and 0.1 FeCl₃. The fermentations were carried out in 500mL Erlenmeyer flasks with 100mL culture medium, at initial pH 4.5, inoculum with 10⁶ esporos/mL, 28°C and 180rpm. The molasses was more efficient when used at low concentrations for naringinase production, while at high concentrations it only increased invertase production. The greatest naringinase value of 178.6mUI/mL was attained with a combination of molasses (3g/L), peptone (10g/L) and naringin (0.5g/L). The fractioned addition of naringin as inducer did not improve production and therefore it is not recommended. *Aspergillus niger* showed promising potential as a biotechnological tool for naringinase production using a low-cost substrate.

Keywords: naringinase, molasses, *Aspergillus niger*, induction

Introduction

Citrus fruit, mostly oranges, are one of the most produced fruit in the world. In 2005, about 9% of world fruit production was of oranges. Brazil is the largest world producer of oranges and the greatest producer and exporter of concentrated frozen orange juice, with a turnover of US \$790 million in 2005 [5].

The orange and its juice are appreciated throughout the world. However, the presence of a high concentration of naringin, a compound responsible for the characteristically bitter flavor of the juice, gives it an unpleasant flavor that reduces consumer acceptance and thus decreases its market value.

Several technologies have been suggested to debitter citrus juices, but these alter the organoleptic characteristics of the juices and thus have limited application. However, enzymatic techniques are indicated for debittering, such as the addition of naringinase to the processes [17].

Naringinase, an enzymatic complex with α -L-rhamnosidase (EC 3.2.1.40) and β -D-glucosidase (EC 3.2.1.21) activity, has potential for application in rhamnosidase, prunin and antibiotic production, wine aroma enhancement and in the citric juice industry because it degrades naringin, forming less bitter compounds [17].

Naringinase production by fungal fermentation is interesting because of the possibility of using substrates such as sugarcane juice and molasses, a raw material and byproduct, respectively, from agroindustry that are cheap and widely available in Brazil.

Aspergillus niger is outstanding in biotechnological processes because it produces a variety of enzymes such as cellulase [9], lipase [11], amylase [8] and invertase [1], in addition to several compounds of interest [19, 20, 22]. Kishi et al. [10] reported *Aspergillus niger* as the best naringinase producer when they tested 96 mold strains and more recently it has been used by several other authors [2, 12, 16]

The present study used *Aspergillus niger* in sucrose, naringin, sugarcane juice and molasses fermentation for naringinase production.

Material and methods

Microorganism

The filamentous fungus *Aspergillus niger* isolated from prunes was used, kept in BDA at 4°C and replicated every 30 days.

Fermentation culture medium and culture conditions

The cultures were carried out in 500mL Erlenmeyer flasks containing 100mL sterilized culture medium. The base culture medium contained (g/L): 1.0 KH₂PO₄; 0.5 KCl; 0.5 MgSO₄·7H₂O and 0.1 FeCl₃. Naringin was added as inducer to the culture medium in a single dose (0.5g/L) or in fractioned addition, as reported later. The initial culture medium pH was corrected to 4.5, the inoculum was 10⁶ esporos/mL, the incubation temperature was 28°C and rotation was 180 rpm. The cultures were made in triplicate. The culture medium samplings and naringin addition (Sigma, St. Louis, USA) were carried out under aseptic conditions. The molasses and sugarcane juice concentration referred to the total sugars.

To study the effects of naringin and sucrose as carbon sources for naringinase production, cultures were conducted with naringin (10g/L), sucrose (10g/L) and the combination of naringin (5g/L) and sucrose (5g/L) added to the base culture along with peptone (10g/L).

To determine the best carbon and nitrogen sources, cultures were carried out with molasses (10g/L) or sugarcane juice (10g/L) or a combination of molasses (5g/L) and sugarcane juice (5g/L) with peptone (10g/L) or sodium nitrate (10g/L) added to the base culture medium. The following concentrations were used to determine the best molasses concentration (g/L): 1.0; 3.0; 5.0; 10.0 or 15.0 with peptone (10g/L). Later peptone was used at concentrations (g/L): 6.0; 8.0; 10.0; 12.0 or 14.0 with molasses (3g/L).

The importance of adding the inducer during fermentation was investigated

by adding naringin in a single dose (0.5g/L) at the start of fermentation or in five fractions (0.1g/L) at different fermentation times and at 24 hour intervals to the base culture medium with molasses (3g/L) and peptone (10g/L). Thus four experiments were carried out with fractioned naringin addition. In the first experiment, the naringin fractions were added at the times (0h, 24h, 48h, 72h, and 96h); in the second at times (24h, 48h, 72h, 96h and 120h); in the third at times (48h, 72h, 96h, 120h and 144h) and in the fourth at times (72h, 96h, 120h, 144h and 168h).

Samples of 1.2mL of the cultures were removed every 24 hours and centrifuged for 15 minutes at 20.000g and 4°C. The supernatant was used for the analytical determinations of naringinase activity, invertase activity and total reducing sugars.

Assay methods

Naringinase activity was estimated by determining residual naringin using an adaptation of the Davis method [3]. A typical assay mixture comprised of 0.8mL 1g/L naringin dissolved in 0.5mL 0.1M sodium acetate buffer (pH 4) and 0.1mL culture centrifuged sample. The assay mixture was incubated at 50°C for 60min after which 0.1mL aliquot was added to 3mL 90% diethyleneglycol followed by the addition of 0.1mL 4N NaOH. Samples were kept at room temperature (28°C) for 10min. The intensity of the resultant yellow color was determined at 420nm. One unit of naringinase activity was defined as 1µmol of naringin hydrolyzed under the above assay condition. The results were expressed in mUI/mL. Invertase activity was measured by estimating the release of reducing sugars due to invertase activity on sucrose by the reaction with dinitrosalicylic acid (DNS) [13]. The reaction mixture containing 0.5mL of culture centrifuged sample and 0.5mL of 0.5M sucrose in 1.5mL 0.2M acetate buffer (pH 5.0) was incubated at 30°C for 10min. One invertase unit was defined as the amount of enzyme needed to produce one µmol reducing sugar per min under the above assay condition. Total sugars was measured by the method of Dubois et al. [4]. The dry weight of the *A. niger* mycelium was determined after the last day of cultivation by

gravimetry after filtering through filter paper and drying overnight at 80 °C.

Results and discussion

Effect of naringin and sucrose

Additions were made to the fermentation base culture medium of the nitrogen source peptone (10g/L) and the carbon source naringin or sucrose (10g/L) or a mixture of naringin and sucrose (5g/L of each). The results are presented in Figure 1.

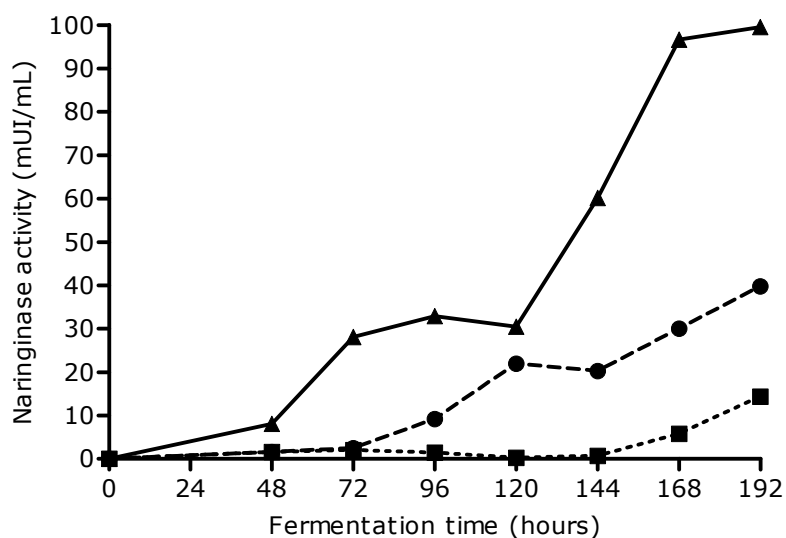


Figure 1. Naringinase production by *Aspergillus niger* in sucrose and naringin fermentation. The values represent the mean of three replications. ▲ Sucrose (5g/L) and naringin (5g/L); ● Naringin (10g/L); ■ Sucrose (10g/L).

Sucrose as single carbon sources did not present significant naringinase activity until 144 hours culture, confirming its repressive role [16, 18]. The naringinase value of 14.33mUI/mL (with standard deviation \pm 2.3mUI/mL) was reached at 192 hour

fermentation. The low naringinase activity, in the stationary phase of the culture, may have resulted from cell lysis and consequent extravasation of constitutional naringinase.

When naringin was used as a single carbon source the maximum activity was 39.80 ± 3.0 mUI/mL with 192 hours culture. The results are line with those reported by Orejas et al. [15] who obtained 30.93 mUI/mL in naringin fermentation (10g/L) as the only carbon source for *Aspergillus niger*. The results obtained showed that naringin acted as an inducer and can be used as a single carbon source for *Aspergillus niger*. However, due to the high cost of naringin and the values obtained of naringinase and biomass production, (values not shown), the use of naringin as a single carbon source is not recommended for large-scale naringinase production.

The best activities of 96.61 ± 8.0 mUI/mL and 99.51 ± 4.5 mUI/mL were obtained when the carbon sources were combined, from 168 to 192 hours fermentation, respectively. The late naringinase production can be explained by catabolic repression by the sucrose. The microorganism used the sucrose initially, producing biomass, and then used naringin. The catabolite repression by glucose in naringinase production was also reported by Orejas et al. [15].

Therefore, in the subsequent experiments naringin was used only as inducer. Naringin was used as inducer at the concentration of 0.5g/L [2].

Effect of the carbon and nitrogen sources

Additions were made to the fermentation base culture medium, containing naringin as inducer at the concentration of 0.5g/L , of molasses or sugarcane juice or a combination of molasses and sugarcane juice with peptone or sodium nitrate added. The results are presented in Figure 2.

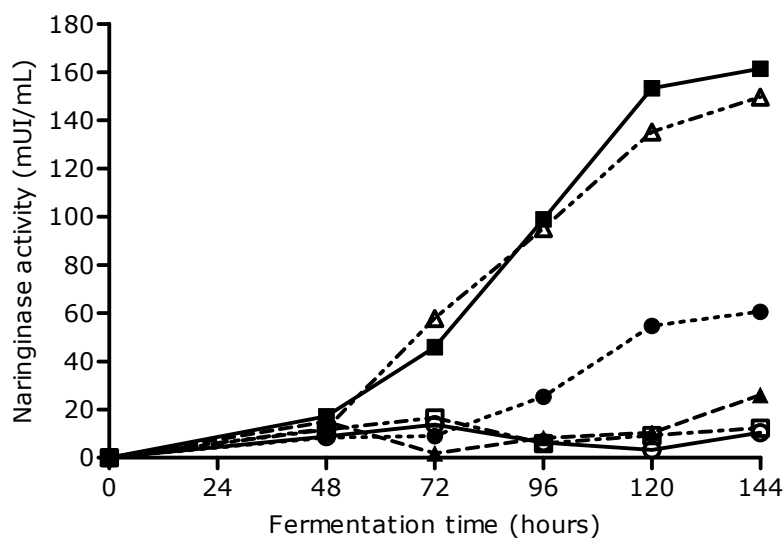


Figure 2. Naringinase production by *Aspergillus niger* in the fermentation of different carbon and nitrogen sources. The values represent the mean of three replications. ■ Molasses (10g/L) and Peptone (10g/L); ▲ Molasses (10g/L) and NaNO₃ (10g/L); ● Sugarcane juice (10g/L) and Peptone (10g/L); □ Molasses (10g/L) and NaNO₃ (10g/L); ▲ Molasses (5g/L) and sugarcane juice (5g/L) and Peptone (10g/L); ○ Molasses (5g/L) and Sugarcane juice (5g/L) and NaNO₃ (10g/L).

The use of sodium nitrate or sugarcane juice in the culture medium did not favor naringinase production. Furthermore, the biomass values obtained were less than 4.6g/L. Low naringinase productions with sodium nitrate by *Aspergillus niger* were also reported by Bram and Solomons [02] and Puri et al. [16], while Gallego et al. [6] obtained good production with ammonia phosphate using *A. terreus*.

The greatest activity of 161.5 ± 6.0 mUI/mL and 6.0g/L biomass was obtained with the combination of molasses and peptone at 145 hours culture, while with the combination of molasses and sugarcane juice with peptone the activity was 149.6 ± 1.9 mUI/mL. Molasses, in addition to supporting the greatest naringinase production, is a byproduct of the sugar industry, cheap and available throughout the year. Puri et al. [16] also reported the combination of molasses and peptone as the best for naringinase production by

Aspergillus niger with 6.5UI/mL activity.

The invertase activity was measured because it is also important. The best condition for naringinase production (molasses and peptone) was also the most appropriate for invertase production, reaching 394 ± 15 mUI/mL com 144h culture.

Although molasses and peptone have been used as carbon and nitrogen sources, in combination with naringin as inducer, it is important to establish an ideal concentration of these compounds that favors naringinase production. Thus peptone and molasses were used at different concentrations in the subsequent experiments.

Effect of molasses concentration

Additions were made to the fermentation base culture medium, containing naringin as inducer, of peptone (10g/L) and molasses at the concentrations (g/L): 1.0; 3.0; 5.0; 10.0 and 15.0. The results are shown in Figure 3.

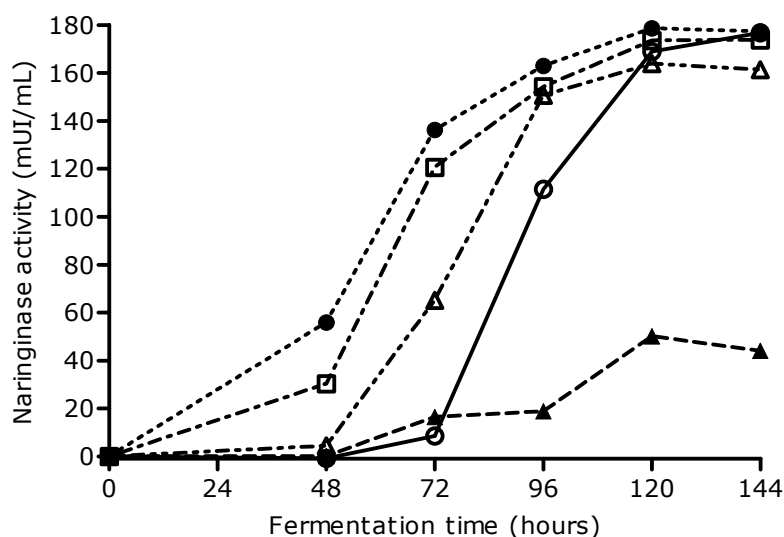


Figure 3. Naringinase production by *Aspergillus niger* in the peptone fermentation (10g/L) and different molasses concentrations. The values represent the mean of three replications. Molasses concentrations: ▲ 1g/L; ● 3g/L; □ 5g/L; △ 10g/L; ○ 15g/L).

The best molasses concentration for naringinase production was 3g/L with 178.6 ± 13.1 mUI/mL and 120 hours fermentation. Puri et al. [16] also obtained the best production with the lowest molasses concentration (4g/L) at the tested concentrations of 4.0; 6.0; 8.0 and 10.0g/L. The biomass values obtained were proportional to the molasses concentration used (results not shown) but the same did not occur with naringinase. The quantity of molasses influenced the start of enzyme production in the course of the culture, although the final naringinase values were similar. Thus at concentrations of 3g/L and 5g/L activity was detected at 48 hours, while with 10g/L and 15g/L the activity was detected at 72 hours and 96 hours, respectively. Yadav and Yadav [23] also reported influence of the concentration of the carbon sources on the start of naringinase activity during culture.

The comparison of naringinase with invertase, at different molasses concentrations during growth is shown in Figure 4.

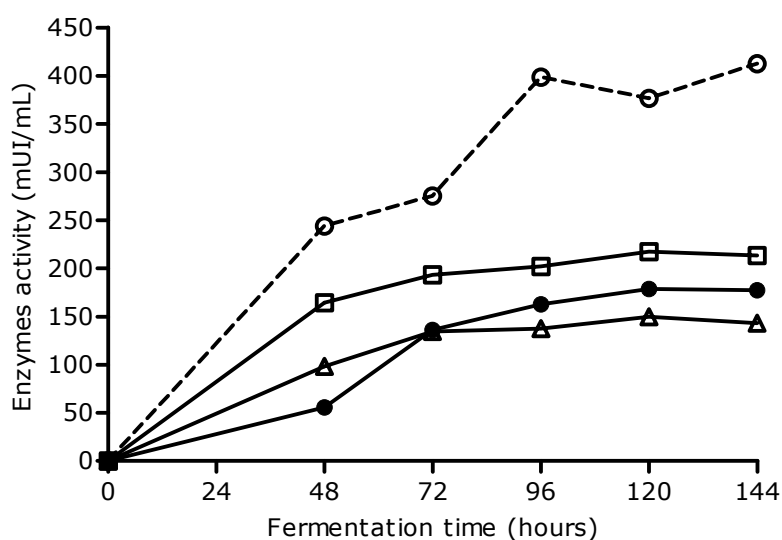


Figure 4. Naringinase and invertase in peptone (10g/L) and different molasses concentrations fermentation by *Aspergillus niger*. The values represent the mean of three replications. Naringinase – molasses: ● 3g/L; Invertase - molasses: ▲ 1g/L; □ 5g/L; ○ 15g/L.

The highest molasses concentration (15g/L) resulted in the greatest

invertase activity ($413 \pm 20\text{mUI/mL}$). Molasses quantities greater than 3g/L did not favor naringinase production, but did induce an increase in invertase production. The repressive effect of a sugar easily fermented on another was reported by Orejas et al. in *A. nidulans* [15] when studying α -L-rhamnosidase production (enzyme belonging to the naringinase complex) when glucose and rhamnose were present in the culture medium. In *Aspergillus niger*, the repressive effect of the glucose was also reported by Hanif et al. [7] in wheat bran fermentation and glucose for cellobiohydrolase production.

Therefore, the molasses concentration 3g/L was used in the following experiments to provide a greater activity and early naringinase production, and higher concentrations of molasses only favored invertase activity.

Effect of peptone concentration

Additions were made to the fermentation base culture medium, containing naringin as inducer, of molasses (3g/L) and peptone at the following concentrations (g/L): 6.0; 8.0; 10.0; 12.0 and 14.0. The results are presented in Figure 5.

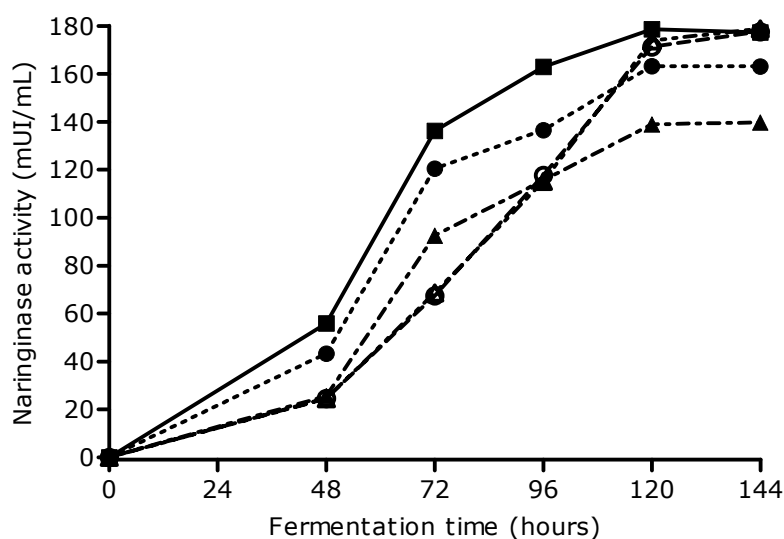


Figure 5. Naringinase production by *Aspergillus niger* in the molasses fermentation (3g/L) and different peptone concentrations (▲ 6g/L; ● 8g/L; ■ 10g/L; △ 12g/L; ○ 14g/L). The

values represent the mean of three replications.

The best naringinase production (178.6 ± 13.1 mUI/mL) was obtained with 10g/L peptone up to 120 hours fermentation. The increase in the peptone concentration up to 10g/L increased naringinase production but higher concentrations did not improve production. Thus the use of peptone (10g/L) and molasses (3g/L) at a nitrogen:carbon proportion (N:C) of approximately 3:1 seemed to be correct. Bram and Solomons [2] reported a higher proportion of nitrogen (N:C) 16:1 as best when they used two combined sources of nitrogen (yeast extract and corn steep liquor) for naringinase production by *Aspergillus niger*. However, Norouzian et al. [14] showed that the 1:1 ratio was the best condition with *Penicillium decumbens* using peptone, while Soria et al. [21] obtained greater production with peptone at the proportion of (N:C) 1:4 with *A. terreus*.

The final experiment was planned to investigate the effects of the method of adding naringin to the enzyme production, because different methods of using this inducer have been studied in naringinase production [02].

Induction method effect

Molasses (3g/L), peptone (10g/L) and the inducer naringin were added to the fermentation base culture medium in a single or fractioned dose. The results are shown in Figure 6.

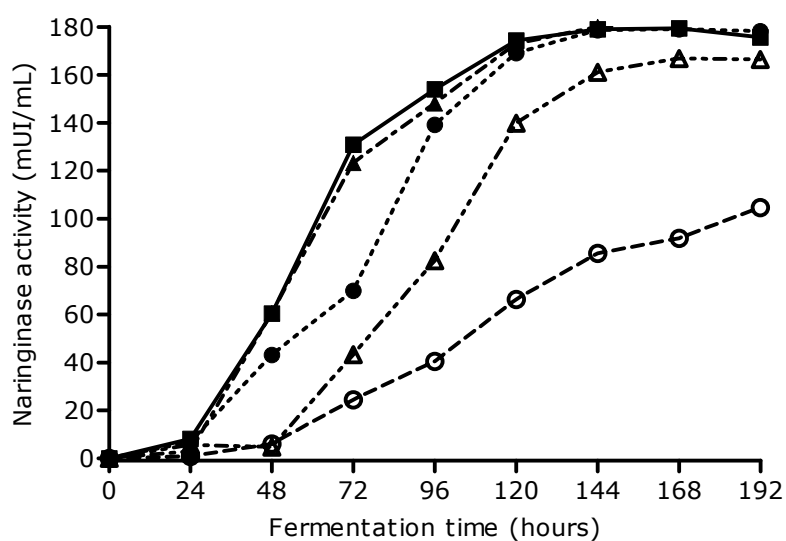


Figure 6. Naringinase production by *Aspergillus niger* in the fermentation of molasses (3g/L), peptone (10g/L) and naringin in a single dose (▲ 0.5g/L) or fractioned, with the addition of the first of five doses of 0.1g/L at different times (● 0h; ■ 24h; ▲ 48h; ○ 72h). The values represent the mean of three replications.

The greatest naringinase production ($179.9 \pm 5,1\text{mUI/mL}$) was obtained with 144 hours fermentation and the addition of the inducer in a single dose at the start of fermentation. However, the results for the fermentations whose first inducer doses were added at the times zero and 24 hours were similar to those of the best condition obtained. The start of inducer addition at later times (48 and 72 hours) decreased and delayed production. Bram and Solomons [2] obtained results that were not conclusive when they varied the naringin concentration added in a single dose. However, when they used a low naringin concentration, added in fractions to the culture medium, there was an increase from 328mUI/mL to 440mUI/mL in naringinase production by *A. niger*.

The results showed that for the line used in this study the fractioned addition of the inducer for naringinase production was not necessary.

Aspergillus niger showed promising potential in naringinase production using efficiently (consumption superior to 85% in all the experiments) molasses (3g/L)

supplemented with peptone (10g/L) and in the presence of naringin. The use of this microorganism of biotechnological importance, fermenting an inexpensive and widely available culture medium, represented an advance for the biotechnological production of this important enzyme, particularly in a developing country such as Brazil.

Acknowledgments

The authors thank CAPES for financial support.

References

1. Ashokkumar B, Kayalvizhi N, Gunasekaran P (2001) Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochemistry* 37:331–338
2. Bram B, Solomons GL (1965) Production of the enzyme naringinase by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology* 13:842-845
3. Davis WB (1947) Determination of flavanones in citrus fruits. *Analytical Chemistry* 19:476-478
4. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* 28:350-356
5. Fundecitrus – Fundo de Defesa da Citricultura. Divulgado o novo mapeamento do sistema agroindustrial citrícola. Available in <http://www.fundecitrus.com.br/informativo/nota_mapcadeia0404.html>. Accessed: may 20 2006.
6. Gallego Custodio MV, Pinaga Otamendi F, Vidal DR, Valles Alventosa S (1996) Production and characterization of an *Aspergillus terreus* -L-rhamnosidase of oenological interest. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 203:522-527

7. Hanif A, Yasmeen A, Rajoka MI (2004) Induction, production, repression, and de-repression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* 94:311-319
8. Hernández MS, Rodríguez MR, Guerra NP, Roses RP (2006) Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal of Food Engineering* 73:93-100
9. Kang SW, Park YS, Lee JS, Hong SI, Kim SW (2004) Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 91:153-156
10. Kishi K (1955) Production of naringinase from *Aspergillus niger*. *Kagaku to Kogyo (Chemistry and Industry, Japan)* 29:140
11. Mahadik ND, Puntambekar US, Bastawde KB, Khire JM, Gokhale DV (2002) Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry* 38:715-721
12. Manzanares P, Graaff LH, Visser J (1997) Purification and characterization of an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiology Letters* 157:279-283
13. Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry* 31:426-428
14. Norouzian D, Hosseinzadeh A, Nouri Inanlou D, Moazami M (2000) Production and partial purification of naringinase by *Penicillium decumbens* PTCC 5248. *World Journal of Microbiology e Biotechnology* 16:471-473
15. Orejas M, Ibanez E, Ramon D (1999) The filamentous fungus *Aspergillus nidulans* produces an α -L-rhamnosidase of potential oenological interest. *Letters in applied microbiology* 28:383-388

16. Puri M, Banerjee A, Banerjee UC (2005) Optimization of process parameters for the production of naringinase by *Aspergillus niger* MTCC 1344. *Process Biochemistry* 40:195-201
17. Puri M, Banerjee UC (2000) Production, purification, and characterization of the debittering enzyme naringinase. *Biotechnology Advances* 18:207-217
18. Sanchez S, Demain AL (2002) Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzyme and Microbial Technology* 31:895-906
19. Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC, Dijck PWM (2002) On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59:426-435
20. Sekhar Rao KC, Karanth NG, Sattur AP (2005) Production of nigerloxin, an enzyme inhibitor and a free radical scavenger, by *Aspergillus niger* using solid state fermentation. *Process Biochemistry* 40:2517-2522
21. Soria FF, Cuevas C, Ellenrieder G (1999) Purification and some properties of a α -L-rhamnosidase of *Aspergillus terreus*. *Applied Biological Science* 5:109-120
22. Ward M, Lin C, Victoria DC, Fox BP, Fox JA, Wong DL, Meerman HJ, Pucci JP, Fong RB, Heng MH, Tsurushita N, Gieswein C, Park M, Wang H (2004) Characterization of Humanized Antibodies Secreted by *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 70:2567-2576
23. Yadav S, Yadav KDS (2000) Secretion of α -L-rhamnosidase by *Aspergillus terreus* and Its Role in Debittering of Orange Juice. *Journal of Scientific and Industrial Research* 59:1032-1037

ANEXOS

ANEXO A

**Normas para submissão de artigo para a revista Journal of
Industrial Microbiology and Biotechnology**



Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology

Official Journal of the Society for Industrial Microbiology

Editor-in-Chief: J.J. Cooney

ISSN: 1367-5435 (print version)

ISSN: 1476-5535 (electronic version)

Journal no. 10295

Springer Berlin Heidelberg

Description

The Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (JIM&B) builds bridges between academia and industry whilst keeping you informed of the most important developments. On a truly international basis, JIM&B covers all aspects of the industrial applications of biotechnology, fermentation, environmental microbiology, biodegradation, biodeterioration, genomics, bioinformatics, quality control and other areas of applied microbiology.

A publication of the Society of Industrial Microbiology & Biotechnology.

Impact factor: 1.273 (2005)

Section "Biotechnology & applied microbiology": Rank 83 of 139

Abstracted/Indexed in:

Abstracts in Anthropology, BIOSIS, Chemical Abstracts Service, Current Awareness in Biol. Sci., Current Contents, Current Contents/ Life Sciences, Index Medicus/MEDLINE, Research Alert, Science Citation Index, SciSearch

Instructions for authors

Editorial procedure

Manuscripts should be in English and should be submitted electronically, via e-mail, to the Society of Industrial Microbiology at JIMB@capecod.net. For the subject line of the e-mail, please use: "JIMB: [Abbreviated title...], [First author et al.]" (e.g. JIMB: "Enhanced production of...", Smith et al.). The initial e-mail will serve as a cover letter for the submission and should include a mailing address, e-mail address, telephone number, and fax number of the author for correspondence.

Manuscripts are handled in electronic form and should be submitted to the Editor-in-Chief as e-mail attachments. They should be submitted in the current version of MS Word or as a PDF file. Those using an earlier version of WORD should submit their manuscript as an RTF

file. Please contact the Editor-in-Chief (JIMB@capecod.net) if you are unable to conform to these instructions or if your manuscript file is greater than 500 kB in size. For the initial submission, legible lower-quality images may be submitted in order to meet file size restrictions. If required, print-quality images will be requested during the review process. Details on acceptable file formats for electronic submission are listed under "Preparing your manuscript".

All manuscripts are subject to review by at least two members of the journal's editorial board or other experts.

Upon receipt, manuscripts will be assigned a manuscript tracking number and forwarded to a Senior Editor. The corresponding author will be notified via e-mail when the manuscript is received and informed of the manuscript tracking number and the Senior Editor who will be handling the review. Queries regarding the review and revisions of the manuscript should be directed to the Senior Editor. The manuscript tracking number should be included in all correspondence regarding the submission.

The Senior Editor advises the corresponding author of his/her and the reviewers' comments. If minor or major revisions are recommended, revised manuscripts should be returned to the Senior Editor handling the manuscript. Revised manuscripts should be submitted directly to the Senior Editor as e-mail attachments. At this point in the review process, higher-quality figures may be requested if necessary. Accepted manuscripts will not be forwarded to the publisher without an electronic copy of the final revision. Papers that do not conform to the journal norms will be returned to the authors for revision before being considered for publication. When the Senior Editor is satisfied that the manuscript is ready for acceptance, s/he forwards it to the Editor-in-Chief for final acceptance.

The journal accepts manuscripts for the following sections:

- Original Papers should normally not exceed 16 printed pages (one printed page corresponds to about 850 words of text or 3 illustrations with their legends).
- Short Communications should not exceed 3 printed pages.
- Letters to the Editor should not exceed 2 printed pages.
- Review Papers, including mini-reviews, should be critical reviews on subjects of interest to industrial and applied microbiologists. The length of the article will depend on the subject. Authors considering preparation of a review should contact the Editor-in-Chief in advance to determine the suitability of the topic.

All manuscripts are subject to copy-editing after acceptance.

Manuscript preparation

General remarks:

Manuscripts should be typed double spaced, including figure legends, any footnotes to tables or figures, and references.

All manuscripts must conform to the current edition of the CBE Style Manual for Biological Editors and are subject to copy-editing.

Title page:

The title page must include the name(s) of the author(s), a concise and informative title, the affiliation(s) and address(es) of the author(s), and the e-mail address and telephone and fax numbers of the corresponding author.

Abstract:

Each paper, including Reviews, must be preceded by an abstract of approximately 250 words or less presenting the questions being addressed or the hypothesis being tested, the general methods used (e.g. liquid chromatography and mass spectroscopy) and the most important results and conclusions.

Keywords:

Up to 5 keywords should be supplied after the Abstract for indexing purposes.

Abbreviations:

All abbreviations should be introduced parenthetically in the text when the term first appears (except for standard physiological and biochemical abbreviations). Subsequently only the abbreviation should be used.

Footnotes:

Footnotes to the text are numbered consecutively. Those to tables should be indicated by superscript lower-case letters, beginning with "a" in each table. (Asterisks may be used for statistical values or data.)

Introduction:

The Introduction should state the purpose of the investigation and give a short review of the pertinent literature. It should conclude with a concise statement of the author's objectives.

Materials and Methods:

The Materials and Methods section should follow the Introduction and should provide enough information to permit repetition of the experimental work. The name of suppliers or sources of equipment and chemicals should be given parenthetically, with the city, state/province/county and country. This information need not be given for common equipment found in most laboratories (balances, pH meters, spectrophotometers) or common chemicals (NaCl, DNA) the source of which is not crucial to repetition of the work. The grade of chemicals should be stated if it is important for repetition of the work.

Results:

Present your findings, stating the major trends shown by data in figures or tables, but do not

repeat in the text data that are obvious from the figures or tables. The number of replicates involved and the number of independent repetitions of the experiment or measurement should be stated here or as a footnote to a table.

Discussion:

State your conclusions from the data and discuss how they compare with previously published information on the subject. If appropriate, suggest theoretical implications and propose future studies. It may be appropriate to combine Results and Discussion, particularly where the results of one experiment are the basis for the next experiment reported in this paper.

Acknowledgements:

These should be as brief as possible. Any grant that requires acknowledgement should be mentioned. The names of funding organizations should be written in full.

References:

The list of references should include only works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Abstracts, theses and presentations at meetings are not acceptable as references. Personal communications should be mentioned in the text with the affiliation of the individual providing the communication and not included in the list of references.

Citations in the text should be identified by numbers in square brackets, and the list of references at the end of the paper should be both alphabetized under the first author's name and numbered. References by the same author or team of authors should be listed in chronological order. Here are a few examples of the style of references:

1. Atlas RM (2005) Handbook of media for environmental microbiology. CRC Press, Boca Raton, Fla, USA
2. van Ginkel CG, Middlehuis BJ, Spijk F, Abma WR (2005) Cometary reduction of bromate by a mixed culture of microorganisms using hydrogen gas in a gas-lift reactor. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32:1-6
3. Heeschan W, Hahn G (1982) Quality control of media for *Lactobacillus* and *Streptococcus*. In: Corry JE (ed) Culture media. GIT, Darmstadt, Germany, pp 109--119

If available, the Digital Object Identifier (DOI) of the cited literature should be added at the end of the reference in question, e.g. "...*J Ind Microbiol Biotechnol* 30:1-5. DOI 10.1007/s10295-002-0001-5"

Illustrations and Tables:

All figures (photographs, graphs or diagrams) and tables should be cited in the text, and both figures and tables should be numbered separately and consecutively throughout. Figure parts should be identified by lower-case letters.

Line drawings:

Please submit high-quality images. Inscriptions should be clearly legible. See "Preparing your manuscript" for preferred file formats.

Halftone illustrations:

Black-and-white and color halftone illustrations should be submitted as well-contrasted images correctly aligned with the top facing up. Magnification should be indicated by a scale bar.

Size of figures:

Figures should match the width of either one column (8.6 cm) or two columns (17.6 cm). The maximum length is 23.5 cm, including the legend.

Figure legends:

Legends must be brief, self-sufficient explanations of the illustrations. The legends should be placed together at the end of the text.

Tables:

Each table should have a title. Abbreviations, except widely used ones (e.g. s, M, or cm), should be identified in a footnote. Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters, beginning with "a" in each table. (Asterisks may be used for significance values and other statistical data.)

Color illustrations

Since JIMB does not have funds to support color illustrations, authors wishing to have illustrations in color will be required to pay € 950 (plus 16% VAT), irrespective of the number of color figures in the article.

Preparing your manuscript*Layout guidelines:*

1. Use a normal, plain font (e.g., Times Roman) for text.

Other style options:

a) For textual emphasis, use italics.

b) For special purposes, such as for vectors, use boldface.

2. Use the automatic page-numbering function to number the pages.

3. Lines should be numbered consecutively throughout the text.
4. Do not use field functions.
5. For indents use tab stops or other commands, not the space bar.
6. Use the table functions of your word processing program, not spreadsheets, to make tables.
7. Use the equation editor of your word processing program or MathType for equations.
8. Place any figure legends or tables at the end of the manuscript.
9. Submit all figures as separate files and do not integrate them into the text.

Data formats:

Save your text file in an MS Word-compatible format.

Illustrations:

The preferred figure formats are EPS for graphics exported from a drawing program and TIFF for halftone illustrations. Legible, lower-quality formats (JPG, JPEG) may be used in order to meet file size restrictions on initial submission, but the original, higher-quality files may be requested during the review process. Each figure should be in a separate file, and the file name should include the figure number. Figure legends should be appended to the text after the reference list and not placed in the figure files.

Color illustrations:

Store color illustrations as RGB (8 bits per channel) in TIFF format. Legible, lower-quality formats (JPG, JPEG) may be used in order to meet file size restrictions on initial submission, but the original, higher-quality files may be requested during the review process.

Scan resolution:

Scanned line drawings should be digitized with a resolution that will yield a resolution of at least 800 dpi in the published figure. For digital halftones, 300 dpi is usually sufficient.

Vector graphics:

Fonts used in the vector graphics must be included. Do not draw with hairlines. The minimum line width is 0.2 mm (0.567 pt) in the published figure.

General information on data delivery:

After acceptance of a manuscript, it will be forwarded electronically to the publisher at the following address:

Journal Production Life Sciences/Chemistry

Springer-Verlag

Tiergartenstr. 17

69121 Heidelberg

Germany

Tel: +49-6221-487-8500

Fax: +49-6221-487-8527

e-mail: Gabriele.Schmitz@springer.com

If additional materials (i.e. print-quality figures) are required, the publisher will contact the corresponding author at the e-mail address listed on the submission. The publisher will also provide proofs electronically to the corresponding author for review prior to publication.

Electronic supplementary material

Electronic supplementary material (ESM) for a paper will be published in the electronic edition of the journal provided the material is:

1. Submitted in electronic form together with the manuscript
2. Accepted after peer review

ESM may consist of:

- Information that cannot be printed: animations, video clips, sound recordings (use QuickTime, AVI, MPEG, animated GIFs, or any other common file format)
- Information that is more convenient in electronic form: sequences, spectral data, etc.
- Large quantities of original data that relate to the paper: additional tables, large numbers of illustrations (color or black-and-white), etc.

Legends for ESM tables and figures must be brief, self-sufficient explanations. ESM is to be numbered and referred to as S1, S2, etc. After acceptance for publication, ESM will be published as received from the author in the online version of the article only. It is referred to in the printed version.

Proofreading

Authors are informed by e-mail that a temporary URL has been created from which they can obtain their proofs. Proofreading is the responsibility of the author. Authors should make their proof corrections (formal corrections only) on a printout of the PDF file supplied, checking that the text is complete and that all figures and tables are included. Substantial changes in content, e.g. new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the responsible editor. In such a case please contact the journal's Editorial Office before returning the proofs to the publisher. After online publication, corrections can only be made in exceptional cases and in the form of an erratum, which will be hyperlinked to the article.

Offprints

Twenty-five offprints of each contribution are supplied free of charge. Orders for additional offprints can be placed by filling out the order form that is provided with the proofs and returning it together with the corrected proofs. When ordering additional offprints, an author is entitled to receive, upon request, a PDF file of the article for personal use.

Online First

Papers will be published online about one week after receipt of the corrected proofs. Papers published online can be cited by their DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Legal requirements

The author(s) guarantee(s) that the manuscript will not be or has not been published elsewhere in any language without the consent of the copyright holder (the Society for Industrial Microbiology); that the rights of third parties will not be violated; and that the reviewers, editors, publisher, or SIM will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Authors wishing to include figures, tables or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright holder(s) and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors. Authors of an article published in JIMB may use figures and tabular material in their own subsequent publications without permission, as long as the original JIMB paper is credited.

The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill these requirements.

Authors must provide a signed Copyright Transfer Statement for their paper.

The form will be issued by the typesetter along with the proofs. It should be signed and returned by fax together with the corrected proofs. If the Copyright Transfer Statement is not signed and returned, the article cannot be published.