

Production optimization of *Aspergillus niger* naringinase by response surface methodology

Otimização da produção de naringinase de *Aspergillus niger* por metodologia de superfície de resposta

João Batista Buzato^{1*}, Maria Antônia Pedrine Colabone Celligoi¹, Danielle Cristina Ferreira¹, Dionísio Borsato²

ABSTRACT

Citrus juice for export has a slight bitter taste which is characteristic and acceptable by the consumer but high levels of naringin reduce its quality and commercial value. Naringin (a flavonoid linked to a rhamnose and glucose) is the main bitter component of several citrus fruits. The reduction in bitterness may be achieved by naringinase, an enzyme that degrades naringin. This study aimed the production of naringinase of *Aspergillus niger* by fermentation of low-cost substrates from agroindustry. The experiment was planned according to a 2³ factorial design which included three replications at the center point having as variables (g/L): naringin (0.20; 0.30 and 0.40); soy bean molasses (0.35; 1.05 and 1.75 of total sugars) and sugar cane molasses (0.35; 1.05 and 1.75 of total sugars). Using the results of 144 hours of fermentation the statistical analysis and predictions were carried out. The statistical analysis showed that the significant variables for the production of naringinase were sugar cane molasses and soy molasses, as long as naringin was used at its lowest concentration. The predictive analysis showed a maximum value of 1.35U/mL could be achieved when naringin (0.25g/L), sugar cane molasses (1.75g/L) and soy bean molasses (1.75g/L) were used. When the validity test was carried out a value of 1.344 (99.3% of prevision) was obtained.

Keywords: *Aspergillus niger*, naringinase, rhamnosidase, response surface methodology

RESUMO

Sucos cítricos concentrados, destinados à exportação, possuem um leve sabor amargo característico e aceitável pelo consumidor, porém níveis elevados de naringina os tornam excessivamente amargos, o que reduz a qualidade e o valor comercial do produto. A naringina (flavonóide ligado a ramnose e glucose) é o principal componente amargo de diversas frutas cítricas. A redução do amargor pode ser obtida pela naringinase, enzima que degrada a naringina. O presente trabalho teve como objetivo produzir naringinase de *Aspergillus niger* 426 na fermentação de substratos de baixo custo provenientes da agroindústria. O experimento foi planejado segundo delineamento fatorial 2³ incluindo três repetições do ponto central tendo como variáveis (g/L): naringina (0,20; 0,30 e 0,40), melão de soja e melão de cana (0,35; 1,05 e 1,75 de açúcar total). As análises estatísticas e predições foram realizadas nos resultados dos ensaios de 144 horas de fermentação. Através da análise estatística verificou-se que as variáveis significativas para a produção de naringinase foram o melão de soja e melão de cana-de-açúcar, desde que a naringina fosse utilizada na menor concentração. A análise preditiva mostrou valor máximo de 1,35 U/mL poderia ser alcançado com naringina (0,25g/L), melão de cana (1,75g/L) e melão de soja (1,75g/L). Quando o teste de validação foi conduzido obteve-se 1,344U/mL (99,3% da previsão).

Palavras Chave: *Aspergillus niger*; naringinase, ramnosidase, metodologia de superfície de resposta

¹Departamento de Bioquímica e Biotecnologia – Universidade Estadual de Londrina

²Departamento de Química – Universidade Estadual de Londrina

Rodovia Celso Garcia Cid PR 445, Km 380. Caixa Postal 10011. CEP86057-970

*E-mail: buzato@uel.br

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cítricos, sendo a maior parte exportada como suco concentrado. Na safra 2009/10, o Brasil exportou para 70 países enquanto que o consumo interno também vem crescendo (LOPES et al., 2010). O suco concentrado traz um leve sabor amargo característico, porém o excesso de amargor reduz a qualidade e o valor comercial. A Naringina é o principal flavonóide que caracteriza o sabor amargo nos sucos cítricos (MONGKOLKUL et al., 2006).

Vários métodos para reduzir o amargor têm sido desenvolvidos em escala laboratorial, porém apresentam desvantagens como perda da acidez, do sabor, da doçura e da turbidez (RIBEIRO; RIBEIRO, 2008). Uma alternativa é o uso da naringinase, enzima responsável pela hidrólise da naringina em compostos praticamente insípidos (PURI et al., 2005; NOROUZIAN et al., 1999; PRAKASH; SINGHAL; KULKARNI, 2002).

A naringinase (EC 3.2.1.40) é um complexo enzimático que apresenta atividade de ramnosidase e glucosidase. Esta enzima tem-se tornado biotecnologicamente importante não somente devido ao potencial uso na redução do sabor amargo dos sucos cítricos, mas também na produção de importantes compostos de aplicação farmacêutica (BUSTO et al., 2007 e RIBEIRO; RIBEIRO, 2008).

Diversos trabalhos sobre produção de naringinase fúngica têm sido relatados, uma vez que, o cultivo desses micro-organismos é o processo exequível industrialmente de obtenção dessa enzima. *Aspergillus niger* além de ser um fungo classificado como GRAS (generally recognized as safe) também se destaca por produzir uma variedade de compostos de interesse, dentre os quais, a naringinase. Esse microrganismo mostrou ser melhor induzido por naringina na comparação com outros indutores como hesperidina, naringenina, ramnose e rutina (KUMAR, 2010). González-Vázquez et. al. (2011) relataram o efeito de diferentes fontes de carbono em cultivos de *A. niger* na produção de naringinase. Nesse aspecto, o melão de cana favoreceu o crescimento do fungo e a adição de naringina

foi melhor que ramnose. Contudo Machado et. al (2010) demonstraram a eficiência da adição do melão de cana quando em baixa concentração e não recomendaram a adição fracionada de naringina. Mendoza-Cal et. al (2010) testaram a capacidade de doze linhagens de fungos filamentosos em hidrolisar naringina em fermentação em estado sólido. Os autores relataram que *A. foetidus* e *A. niger* alcançaram valores de 80% de hidrólise de naringina presente na cultura. Assim a produção de naringinase por fermentação fúngica tem-se mostrado bastante promissora, adicionando-se também a vantagem desses micro-organismos crescerem, em substratos de baixos custos provenientes do setor agroindustrial, como o melão da cana, melão de soja e o extrato de levedura. Em cultivos de micro-organismos, o extrato de levedura é usado como fonte de nitrogênio, pois contém aminoácidos livres (40%), nucleotídeos (5%) e peptídeos (SILVA et al., 2009) enquanto que o melão da cana contém grande concentração de sacarose (CARIOCA e LEAL, 2011) e por sua vez, o melão de soja contém sacarose (28%), estaquiose (19%) e rafinose (10%) (SELLA et al., 2013).

O emprego da metodologia de planejamento fatorial tem sido amplamente utilizado em pesquisas biotecnológicas devido a crescente necessidade da otimização de produtos e processos, minimizando custos e tempos, maximizando rendimento, produtividade e qualidade do produto. Tal ferramenta associada às análises de superfícies de resposta fornece informações seguras sobre o processo, substituindo as técnicas por tentativa e erro (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

Este trabalho, teve por finalidade, otimizar a produção de naringinase de *A. niger*, pelo uso de metodologia estatística. Os resultados obtidos foram avaliados por metodologia estatística de superfície de resposta.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foi usado *Aspergillus niger* 426 isolado de ameixa seca pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). Para a manutenção e

inóculo da cepa, foi usado o meio batata-dextrose-ágar (BDA). Como inóculo foi usado uma suspensão de esporos de 10^6 /mL. Para a fermentação foram utilizados os componentes apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Composição do meio de fermentação

Componente	Concentração (g/L)
Extrato de Levedura	14,0
NaNO ₃	2,0
KH ₂ PO ₄	1,0
KCl	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1
Naringina	*
Melaço de Soja	*
Melaço de Cana	*

*As concentrações de naringina, melaço de soja e melaço de cana foram definidas de acordo com o delineamento experimental

O melaço de cana foi doado pela COROL - Cooperativa Agropecuária de Rolândia Ltda. (PR) e apresentou 41% de açúcares totais. O melaço de soja foi doado pela IMCOPA – Importação, Exportação e Indústria de Óleos S.A. – Unidade de Cambe (PR) e apresentou 32% de açúcares totais.

Os componentes da Tabela 1 foram solubilizados em água destilada nas concentrações indicadas. Alíquotas de 25mL da solução foram distribuídas em frascos Erlenmeyers de 125mL de capacidade. Em seguida, autoclavados a uma temperatura de 121°C por 20 minutos. Depois os frascos foram estocados a 4°C para posterior utilização. As fermentações foram conduzidas em mesa rotatória (shaker) sob agitação de 180rpm e temperatura controlada a 28°C

O planejamento estatístico foi descrito seguindo-se um delineamento fatorial do tipo 2³, com 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios, As variáveis codificadas e originais estão apresentadas na Tabela 2 e a resposta obtida (Y) foi a atividade de naringinase.

Utilizou-se o programa Statistic 7.0 para realizar as análises referentes à metodologia de superfície de resposta e análise de variância (ANOVA).

Também foram analisadas as diferenças entre as médias dos tratamentos pelo teste de Tukey (p≤0,05).

Tabela 2 Delineamento experimental para a produção de naringinase.

Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Originais		
	X ₁	X ₂	X ₃	Naringina (g.L ⁻¹)	Soja (g.L ⁻¹)	Cana (g.L ⁻¹)
1	-	-	-	0,20	0,35	0,35
2	+	-	-	0,40	0,35	0,35
3	-	+	-	0,20	1,75	0,35
4	+	+	-	0,40	1,75	0,35
5	-	-	+	0,20	0,35	1,75
6	+	-	+	0,40	0,35	1,75
7	-	+	+	0,20	1,75	1,75
8	+	+	+	0,40	1,75	1,75
9	0	0	0	0,30	1,05	1,05
10	0	0	0	0,30	1,05	1,05
11	0	0	0	0,30	1,05	1,05

Após a execução do experimento e a coleta de dados, fez-se o ajuste de uma equação polinomial (Equação 1) para a estimativa da variável resposta.

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_4x_1x_2 + \beta_5x_1x_3 + \beta_6x_2x_3 \quad \text{Equação (1)}$$

Onde Y é a variável dependente, β o coeficiente de regressão para cada componente do modelo, x₁ a concentração de naringina, x₂ a concentração do melaço de soja e x₃ a concentração do melaço de cana.

A atividade da naringinase foi determinada segundo Davis (1947) e foi definida 1U/mL como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1μmol de naringina por minuto. Os açúcares totais foram determinados de acordo com Dubois et al. (1956).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar a produção de naringinase, o presente trabalho testou diferentes combinações das fontes de açúcares e naringina. Um delineamento fatorial completo 2³ com dois níveis de variação (-1 e +1) foi

realizado para definir os fatores estatisticamente significativos dentre as fontes testadas: naringina (x_1), melão de soja (x_2) e melão de cana (x_3) (Tabela 2). Os valores obtidos de naringinase foram avaliados nos seguintes tempos de fermentação: 120, 144 e 168 horas. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 Atividade de naringinase em 3 tempos de fermentação obtidos a partir do delineamento fatorial 2^3

Ensaio	Naringinase (U/mL)		
	120 (hs)	144 (hs)	168 (hs)
1	0,503	0,663	0,833
2	0,672	0,736	0,728
3	0,929	1,167	1,159
4	1,089	1,126	1,299
5	0,706	0,973	0,704
6	0,856	0,811	0,973
7	1,295	1,333	1,424
8	0,920	1,062	1,287
9	1,056	1,279	1,318
10	1,102	1,317	1,237
11	1,057	1,281	1,253

Os maiores valores obtidos são aqueles do ensaio 7, assim o teste de Tukey, utilizado para comparação das médias, foi realizado com os resultados da atividade enzimática dos três tempos de fermentação desse ensaio. O teste demonstrou que não houve diferença significativa em nível de 5% na produção enzimática entre os tempos de 144 e 168 horas. Entretanto, ambos apresentaram diferença do tempo de 120 horas. Desta forma, a condução das análises estatísticas subsequentes levou em consideração o tempo de 144 horas por apresentar os melhores resultados de produtividade da enzima.

A análise de variância, elaborada a partir dos resultados de produção de naringinase em 144 horas, está apresentada na Tabela 4.

Os coeficientes de regressão de cada variável estudada estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 4 Análise de variância (ANOVA) demonstrando os efeitos da concentração de naringina, melão de soja e melão de cana na produção de naringinase.

Variáveis	SQ	gL	QM	F	p valor*
(x_1) Naringina	0,020100	1	0,20100	43,9507	0,02200
(x_2) Melão Soja	0,283128	1	0,28313	619,085	0,00161
(x_3) Melão cana	0,029646	1	0,29646	64,8239	0,01508
x_1 by x_2	0,006216	1	0,006216	13,5921	0,06633
x_1 by x_3	0,027028	1	0,027028	59,0994	0,01650
x_2 by x_3	0,010011	1	0,010011	21,8902	0,04277
Falta de ajuste	0,207596	2	0,103798	226,963	0,00439
Erro puro	0,000915	2	0,000457		
Total SQ	0,584640	10			

* Variável significativa ($p < 0,05$)

Tabela 5 Coeficientes de regressão e p-valor das variáveis do delineamento

	Coeficiente de Regressão	p valor*
Mean/Interc.	1,068000	0,000036
(x_1) Naringina (g/L)	-0,050125	0,022005
(x_2) Melão Soja (g/L)	0,188125	0,001611
(x_3) Melão Cana (g/L)	0,060875	0,015078
x_1 by x_2	-0,27875	0,066335
x_1 by x_3	-0,058125	0,016503
x_2 by x_3	-0,035375	0,042773

*Variável significativa ($p < 0,05$)

A análise de variância e o coeficiente de regressão evidenciam que houve somente uma variável não significativa no modelo em nível de 5% de variância, a interação de naringina (x_1) com melão de soja (x_2). O melão de soja e o melão de cana (variáveis x_2 e x_3 respectivamente) apresentaram efeito positivo, enquanto que a naringina (x_1) apresentou efeito negativo para a produção da enzima.

A equação polinomial obtida através da análise estatística dos dados experimentais pode ser representada pela equação 2.

$$Y = 1,068 - 0,050x_1 + 0,188x_2 + 0,061x_3 - 0,028x_1x_2 - 0,058x_1x_3 - 0,035x_2x_3$$

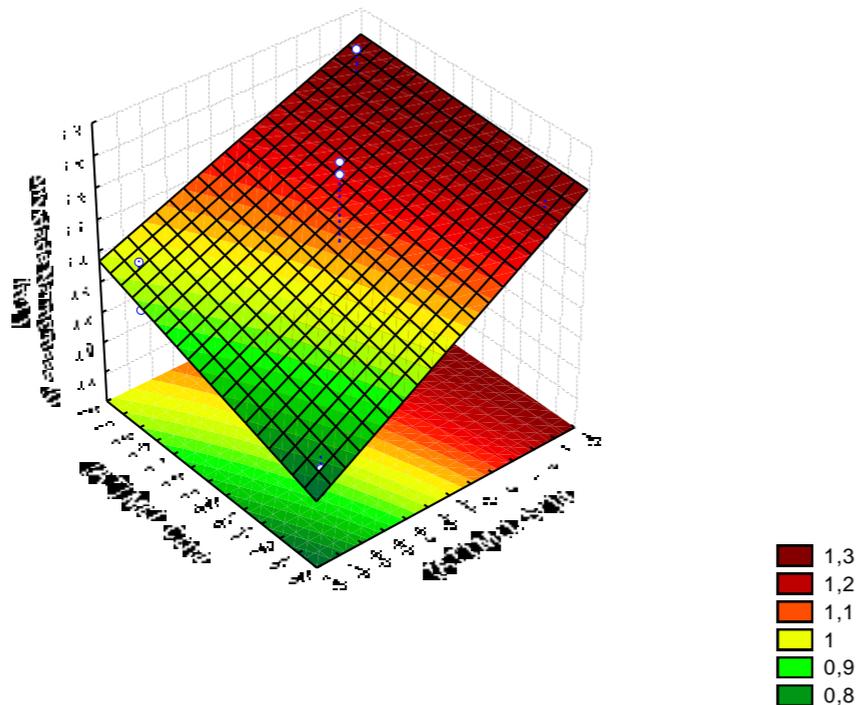
Equação (2)

Em que Y representa respectivamente a resposta estimada de atividade de naringinase em U/mL, x_1 , x_2 e x_3 representam a concentração de naringina (g/L), melão de soja (g/L) e melão de cana (g/L).

Os resultados podem ser representados pelo gráfico de superfície de resposta determinando melhores concentrações das variáveis para a produção da naringinase.

Para a confecção da superfície de resposta, a naringina (x_1) foi fixada no ponto -1 (0,20g/L), pois essa variável apresentou-se com efeito negativo na produção da enzima (Figura 1).

Figura 1 Superfície de resposta resultante da influência da concentração de açúcares do melão de soja e melão de cana(g/L) sobre a atividade de naringinase

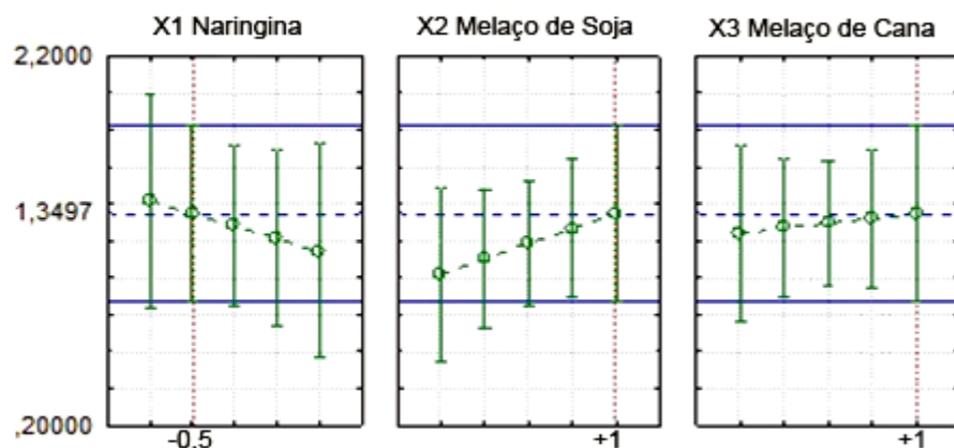


A análise do gráfico da superfície de resposta mostrou que a maior produção de naringinase foi obtida em cultivos que continham as maiores concentrações de açúcares presentes no melão de cana e melão de soja. Assim, a atividade máxima de naringinase foi de 1,333U/mL no ensaio 7, que apresentava 0,20g/L de naringina; 1,75g/L de açúcares totais no melão de cana e 1,75g/L de açúcares totais no melão de soja. Nessa condição de cultivo, a fermentação foi satisfatória pois o consumo de açúcares foi de 86,9% comparado com 95% de consumo de açúcares obtido por Puri, Banerjee e Banerjee (2005).

Puri, Banerjee e Banerjee (2005) estudaram diferentes fontes de carbono para aumentar a produção de naringinase por fermentação submersa utilizando *Aspergillus niger* MTCC 1344. Seus estudos demonstraram que a maior produção de naringinase (4,61U/mL) foi obtida em cultivos que continham melão de cana, após 192 horas de fermentação. Os resultados desses autores indicaram que o aumento da produção de naringinase foi estimulada até uma concentração máxima de melão de cana (4g/L). Entretanto, quantidades superiores de melão de cana, a produção enzimática tende a ser inibida, pois Machado et al. (2010) obtiveram maior produção de naringinase, com melão de cana em 3g/L e em 120 horas de fermentação.

Usando ainda o programa Statistic 7.0, procedeu-se a análise preditiva a partir dos resultados experimentais. De acordo com esta, o valor máximo previsto para a produção de naringinase de 1,35U/mL, (Figura 2), foi com a variável x_1 no nível -0,5 (0,25g/L de naringina) e as variáveis x_2 e x_3 estivessem no nível +1 (1,75g/L de açúcares totais no melão de soja e no melão de cana respectivamente).

Figura 2 Predição para a produção de naringinase a partir das seguintes concentrações: 0,25g/L de naringina (x_1), 1,75g/L de açúcares totais de melão de soja (x_2) e 1,75g/L de açúcares totais de melão de cana (x_3).



Os cultivos (seis repetições) baseados nessa predição apresentaram uma produção de naringinase no valor de 1,344 U/mL, caracterizando 99,3% do valor previsto pela análise estatística, validando desta forma, este modelo experimental.

Como conclusão, a metodologia estatística mostrou o ensaio 7, como a melhor condição de fermentação, dentre os parâmetros testados. A predição, por sua vez, indicou uma elevação de 1,3% na atividade de naringinase, com o aumento de naringina para 0,25g/L e manutenção dos valores para melão de cana e melão de soja.

REFERÊNCIAS

BUSTO, M.D.; MEZA, V; ORTEGA, N. ; PEREZ-MATEOS, M. Immobilization of naringinase from *Aspergillus niger* CECT 2088 (in polyvinyl alcohol) cryogels for the debittering of Juices. **Food Chemistry**, v.104, p.1177-1182, 2007.

CARIOCA, J.O.B.; LEAL, M.R.L.V. Ethanol production from sugar-based feedstocks In. MOREIRA, A. (Org.). **Comprehensive Biotechnology** London: Elsevier, 2011.p.27-35

DAVIS, W. B. Determination of flavonones. **Analytical Chemistry**, v.19, p.476-478, 1947.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, P. ; REBERS, P.A. ; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n.3, p.350-356, 1956.

GONZALEZ-VASQUEZ, R.; AZAOLA-ESPINOZA, A; OSORIO-REVILLA, G.; GALLARDO-VELAZQUEZ, T.; CRUZ-VICTORIA, T.; ARANA-ERRASQUIN, R.; RIVERA-ESPINOZA, Y. The effect of different carbon sources and salts in the production of naringinase by *Aspergillus niger* ATCC1015. **Revista Mexicana de Ingeniería Química** v.10, n.1 p.1-8, 2011

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

LOPES, F.F.L.; NEVES, M.F.; KALAKI, R.B.; TRONBIN, V.G.. **O retrato da citricultura brasileira**, 1ª edição. Ribeirão Preto: MARKESTRAT, 2010.

MACHADO, R. A, M; BUZATO, J. B.; DIAS, C. D.; CELLIGOI, M. A. P.C. Naringinase production by *Aspergillus niger* in the fermentation of different carbon and nitrogen sources. **Biotechnology: an Indian Journal**, v. 4, p. 1-7, 2010.

MENDOZA-CAL, A.; CUEVAS-GLORY, L.; LIZAMA-UE,G.; ORTIZ-VAZQUEZ, E. Naringinase production from filamentous fungi using grapefruit rind in solid state fermentation. **African Journal of Microbiology Research**, v.4,n.19,p.1964-1969, 2010

MONGKOLKUL, P.; RODART, P.; PIPATTHIRILORN, T. et al. Debittering of tangerine citrus reticulata blanco juice by β -cyclodextrin polymer. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.56, p.167-170, 2006.

NOROUZIAN, D.; HOSSEINZADEH, A.; INANLOU, D. N. ; MOAZAMI, N. Various techniques used to immobilize naringinase produced by *Penicillium decumbens* PTCC 5248. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, p. 501-502, 1999.

PRAKASH, S.; SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. Enzymic debittering of indian grapefruit (*Citrus paradise*) juice. **Journal of the Science of Food of Agriculture**, v. 82, p. 394-397, 2002.

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

RIBEIRO, I. A.; RIBEIRO, M. H. L. Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by validated HPLC method. **Food Control**, v.19, p.432-438, 2008.

RODRIGUES, M.I., IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos & otimização de processos**. 2.ed. Campinas, 2009, 357p.

SELLA, S.R.B.R.; MASETTI, C.; FIGUEIREDO, L.F.M; VANDERBERGH, M; SOCCOL, C.R. Soya bean molasses-based bioindicator system for monitoring sterilization process: designing and performing evaluation. **Biotechnology and Bioprocesses Engineering**, v.18, p.75-87, 2013.

SILVA, V. K.; AMOROSO, L.; FUKUYAMA, E. H.; DOURADO, L.R.B.; MORAES, V.M.B. Digestibilidade do extrato de levedura em frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**,v.38,n.10, p.1969-1973, 2009

RECEIVED 19 Nov 2013

ACCEPTED 18 Jun 2014