

Naringinase de *Aspergillus niger*: Otimização da produção por metodologia de superfície de resposta e uso do ultrassom para extração

Nariginase of *Aspergillus niger*: Production optimization by response surface methodology and utilisation of ultrasound for extraction

Cristiani Barros da Silva Rosa¹; Dionísio Borsato²; João Batista Buzato^{3*}; Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi⁴

Resumo

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja e de suco concentrado destinado à exportação. Sucos cítricos concentrados para exportação com níveis elevados de naringina são excessivamente amargos, o que reduz a qualidade e o valor comercial do produto. A redução do amargor pode ser obtida pela naringinase, um complexo enzimático que degrada a naringina. Neste trabalho *Aspergillus niger* 426 foi usado como produtor de naringinase utilizando matérias-primas da agroindústria, melaço como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Naringina foi usada como indutor. Dentre as cinco fontes de nitrogênio pesquisadas, extrato de levedura apresentou o melhor resultado de 225,6 mU/mL de naringinase em 120 horas de cultivo. Para otimização da produção de naringinase, foi aplicada a metodologia de superfície de resposta, com planejamento fatorial incompleto 2², obtendo 354,26 mU/mL de atividade de naringinase, tendo como variáveis independentes o extrato de levedura (14,0g/L) e naringina (0,2g/L). Quando aplicadas ondas de ultrassom com intensidade de 20 kHz por 2 minutos na cultura, a atividade de naringinase atingiu o valor máximo de 473,6 mU/mL. Assim, a naringinase, enzima de grande potencial de aplicação biotecnológica, teve a produção aumentada pelo uso do planejamento estatístico e ultrassom.

Palavras-chave: Naringinase, melaço, metodologia de superfície de resposta, *Aspergillus niger*

Abstract

Brazil is the world's largest producer of orange and concentrated juice for export. Concentrated juice with high levels of naringin has excessive bitterness, which reduces the quality and value on the market. The debittering can be obtained by using naringinase, an enzymatic complex that degrades naringin. This study reports the production of naringinase by *Aspergillus niger* 426 utilizing both sugar cane molasses as carbon source and yeast extract as nitrogen source. Naringin was used as inducer. Five nitrogen sources were studied and yeast extract was found as the best one as 225.6 mU/mL of naringinase activity at 120 hours of fermentation was achieved. For optimization of naringinase production it was applied response-surface methodology, with 2² incomplete factorial design. An activity value of 354.26 mU/mL of naringinase was achieved when as independent variables yeast extract (14.0g/L) and

¹ Pós-graduanda do Deptº de Bioquímica e Biotecnologia do Centro de Ciências Exatas, Universidade de Londrina, UEL. Londrina, PR. E-mail: crys_barros@hotmail.com

² Prof. Dr. do Depto de Química do Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, UEL. E-mail: borsato@uel.br

³ Prof. Dr. do Depto de Bioquímica e Biotecnologia do Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, UEL. E-mail: buzato@uel.br

⁴ Prof. Dr. do Depto de Bioquímica e Biotecnologia do Centro de Ciências Exatas. Universidade Estadual de Londrina, UEL. E-mail: macelligoi@uel.br

* Autor para correspondência

naringin (0.2g/L) were used. When applied ultrasound waves at 20 kHz of intensity for 2 minutes in the fermented broth, the activity reached the highest value of 473.6 mU/mL. Thus, naringinase, this enzyme of great potential for biotechnological applications, has its production increased by using statistical design and ultrasound.

Key words: Naringinase, molasses, *Aspergillus niger*, response-surface methodology

Introdução

Frutas cítricas, especialmente a laranja, são as mais produzidas no mundo e o Brasil é o maior produtor de suco concentrado destinado à exportação. (FELISMINO, 2009). Sucos cítricos concentrados com níveis elevados de naringina, flavonoide responsável pelo amargor característico do suco, são excessivamente amargos, o que reduz a qualidade e o valor comercial do produto. Diversas tecnologias têm sido propostas para remoção do amargor, mas estas alteram as características organolépticas dos sucos e assim têm aplicação limitada. (RIBEIRO; RIBEIRO; 2008). Entretanto, destaca-se a técnica enzimática para a remoção do amargor, pela adição de naringinase ao processamento da fruta. Naringinase é um complexo enzimático constituído de α -L-raminosidase (EC 3.2.1.40) e β -D-glucosidade (EC 3.2.1.21), que hidrolisa a naringina em naringinina, glucose e raminose. Além do interesse na indústria cítrica, a naringinase tem potencial de aplicação na indústria farmacêutica, na produção de anti-inflamatórios (RIBEIRO, et al., 2008), e química na produção de biosurfatantes. (SAERENS; BOGAERT; SOETAERT, 2009). A produção de naringinase por fermentação fúngica é de interesse devido à possibilidade de utilização de substratos da agroindústria, como o melaço, peptona de soja e extrato de levedura que são de baixo custo e grande disponibilidade no Brasil. *Aspergillus niger* destaca-se por ser um fungo GRAS e produzir uma variedade de enzimas. (SCHUSTER; DUNN-COLEMAN; FRISVAD, 2002).

Na produção de enzimas por *A. niger*, a metodologia de superfície de resposta tem demonstrado ser uma ferramenta útil, pois possibilita, com número reduzido de experimentos, estabelecer a concentração ótima de cada variável

significativa e assim estabelecer uma condição otimizada de produção. (XU, et al., 2008; GE; QUIAN; ZANG, 2008).

O uso de ultrassom na extração de produtos microbianos vem se destacando por ser tecnologia destituída de geração de subprodutos (ROKHINA; LENS; VIRKUTITE, 2009; CHISTI, 2003), apresentar baixo custo de operação e não requerer equipamento sofisticado ou treinamento técnico extensivo.

O objetivo deste trabalho foi produzir naringinase por *A. niger* em fermentação submersa com o auxílio de metodologia de superfície de resposta e utilizar o uso do ultrassom para sua extração.

Materiais e Métodos

Micro-organismo

Aspergillus niger 426, 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).

Melaço de cana-de-açúcar

Foi utilizado melaço de cana-de-açúcar safra 2003 procedente da Usina de Açúcar e Álcool da COROL (Cooperativa Agropecuária Rolândia Ltda.), localizada na região Norte do Paraná. A matéria prima continha, em média, 60% de açúcares totais.

Fermentação

Os cultivos em batelada, realizados em triplicatas, foram conduzidos tendo pH inicial dos meios ajustados para 4,5; distribuídos em frascos erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio esterilizado, inoculados com 6×10^6 esporos/mL, com agitação (180rpm) a 28°C. A fermentação foi interrompida com a retirada dos frascos, nos tempos de 96, 120 e 144 horas, para realização das determinações analíticas.

Meio basal: A composição do meio foi (g/L): KH_2PO_4 1,0; KCl 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; FeCl_3 0,1; melação 3,0 e naringina 0,5. (MACHADO et al. 2010).

Meios com variação da fonte de nitrogênio: O experimento que investigou a melhor fonte de nitrogênio para a produção de naringinase por *A.niger* 426 analisou diferentes fontes de nitrogênios, incluindo peptona, peptona soja, extrato de levedura, NaNO_3 e prolina na concentração de 10,0 g/L, adicionado ao meio basal.

Meio para produção de naringinase: Os experimentos para a escolha do melhor meio de cultivo para a produção de naringinase foram realizados segundo os princípios da metodologia de superfície de resposta, tendo como variáveis independentes as concentrações de extrato de levedura, selecionado como fonte de nitrogênio e naringina como indutor no meio de fermentação.

Sonicação dos cultivos

Airradiação ultrassônica dos cultivos foi realizada com aparelho Ultrasonic Processor 20kHz, modelo GE 130PB/70W da Sonics and Materials, equipado com guia de onda tipo sonda de 9,5mm de diâmetro. A potência acústica foi controlada manualmente abaixo de 40W, sendo o guia de onda imerso numa profundidade de 2cm em 50ml da cultura, com irradiação contínua. O meio de cultivo otimizado, realizado em triplicata, foi retirado do shaquer para interrupção da fermentação no tempo de 120 horas

e irradiado nos tempos de 0,5; 1; 2 e 3 minutos, em seguida foi retirada uma amostra. centrifugada a 13400rpm por 15min sob refrigeração (4°C) para posterior análise do sobrenadante.

Determinações Analíticas

Determinação da biomassa

A biomassa foi determinada, ao término de cultivo, por gravimetria. Procedeu-se a filtragem do fermentado e posterior secagem a 80°C até peso constante.

Determinação dos açúcares totais

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

Determinação da atividade de naringinase

A atividade da naringinase foi determinada segundo uma adaptação do Método de Davis. (DAVIS, 1947). A mistura de reação foi composta de 0,8mL de naringina, dissolvida 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 teve a composição de 0,8mL de água destilada e 0,6mL do mesmo tampão. Essas misturas foram incubadas a 50°C por uma hora. Foi retirada uma alíquota de 0,1mL, em tubos de ensaio contendo 3mL de dietilenoglicol 90% (v/v). Por último, foi adicionado 0,1mL de NaOH 4N. Os tubos ficaram em repouso por 20 minutos em temperatura ambiente para o desenvolvimento de cor lida em 420nm.

Os resultados de atividade enzimática foram expressos em mU/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. Foi realizada uma curva padrão utilizando naringina em concentrações variando de 0,2 a 1,0g/L.

Delineamento estatístico

Foi empregado um delineamento composto central rotacional (BARROS; SCARMINIO; BRUNS, 2001), com dois níveis equidistantes de variação, codificados em -1 e +1; dois pontos centrais (0) e quatro pontos axiais (+ $\sqrt{2}$); (- $\sqrt{2}$), resultando em 10 experimentos (Tabela 2). A concentração das variáveis independentes no ponto central foi baseada na melhor produção de naringinase obtida por Machado et al. (2010). Os níveis foram decodificados de acordo com a equação 1, onde X_1 são os valores reais das variáveis independentes e x_1 são os valores codificados das variáveis independentes.

$$x_1 = (X_1 - \text{ponto central})/\text{faixa de variação} \quad (01)$$

As variáveis independentes foram representadas pelas concentrações de extrato de levedura(g/L) e

naringina(g/L), enquanto que a variável dependente refere-se à atividade de naringinase.

As análises referentes à metodologia de superfície de resposta, análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias dos tratamentos avaliadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) foram realizadas utilizando o programa Statistic 7.0.

Resultados e Discussão

Efeito da fonte de nitrogênio na produção enzimática

O meio de cultivo básico utilizado neste trabalho foi anteriormente otimizado na fonte de carbono, quantidade de naringina e tempo de fermentação por Machado et al. (2010) que obteve como melhor produção de naringinase o valor de 178,6 mU/mL.

Para melhorar a produção enzimática, o presente trabalho, inicialmente, testou diferentes fontes de nitrogênio. Cinco diferentes fontes de nitrogênio foram adicionadas ao meio basal na concentração de 10g/L e os valores obtidos de naringinase e biomassa foram avaliados nos seguintes tempos de fermentação: 96, 120 e 144 horas. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1:

Tabela 1. Influência da fonte de nitrogênio na atividade de naringinase de *A. niger*.

FONTES DE NITROGÊNIO	ATIVIDADE DE NARINGINASE (mU/mL) ^a		
	96 h	120 h	144 h
NaNO ₃	45,9	54,96	91,81
Extrato Levedura	135,3	225,0	203
Peptona	87,6	72,8	106
Peptona soja	71,4	116,6	208,2
Prolina	77	256,4	262,8

(a) média das triplicatas.

O teste de Tukey, utilizado para comparação das médias dos resultados da atividade enzimática entre os tempos de 96h e 120h, mostrou que são significativamente diferentes, em nível de 5%, para as fontes, prolina e extrato de levedura. A mesma análise, para NaNO_3 , peptona e peptona de soja, não apresentou diferença significativa. Os baixos valores obtidos de naringinase, quando NaNO_3 foi utilizado, também foram reportados por Bram e Solomons (1965). Contudo quando empregado por Puri, Banerjee e Banerjee (2005), não apresentou efeito inibitório para produção de naringinase. Para a produção de glucose-oxidase por *A. niger*, o NaNO_3 mostrou ser uma fonte adequada de nitrogênio. (MIRÓN, et al., 2008).

Quando considerada a fonte de nitrogênio peptona, em comparação ao nitrato de sódio, verifica-se que a peptona apresentou maior produção enzimática, confirmando os resultados apresentados por Puri, Banerjee e Banerjee (2005) e Machado (2010). Entretanto, nestes experimentos foram utilizadas linhagens diferentes do *A. niger*.

Entre os tempos de 120 e 144 horas não houve diferença significativa para todas as fontes analisadas, apesar da maior atividade ser identificada no tempo de 144 horas utilizando prolina como fonte de nitrogênio. Mediante esta análise estatística, deduz-se que o tempo de 120h é o mais indicado para a produção de naringinase.

No tempo de fermentação de 120 horas, dentre todas as fontes de nitrogênio testadas, a prolina e o extrato de levedura produziram os valores mais elevados de naringinase. O teste de Tukey, utilizado para comparar as médias dos resultados das diferentes fontes de nitrogênio, mostrou diferença significativa em nível de 5% da prolina e o extrato de levedura com as demais fontes de nitrogênio utilizadas. Entretanto, não houve

diferença significativa entre prolina e extrato de levedura. Puri, Banerjee e Banerjee (2005) testaram diferentes fontes de nitrogênio e obteve os melhores resultados com peptona, porém esses autores não testaram o extrato de levedura.

O aminoácido prolina com seu elevado custo quando comparado ao extrato de levedura foi descartado para os demais experimentos, uma vez que a análise pelo teste de Tukey não mostrou diferença significativa entre essas duas fontes para a produção enzimática no tempo de 120 horas. Assim como neste trabalho, Bram e Solomons (1965) também testaram a influência da fonte de nitrogênio em fermentação submersa para produção de naringinase por *A. niger* NRRL-72-4 e indicaram como melhor fonte o extrato de levedura. Portanto, o extrato de levedura foi escolhido como fonte de nitrogênio para os subsequentes experimentos, fixando-se o tempo em 120 horas.

Otimização da composição do meio por Metodologia de Superfície de Resposta (M.S.R).

A escolha do novo ponto central bem como dos níveis de variação levou em consideração os resultados do experimento anterior (Tabela 1) e os resultados obtidos por Machado et al.(2010).

A MSR foi aplicada para otimizar os parâmetros de fermentação (concentração do extrato de levedura e naringina) como variáveis independentes, buscando alcançar a maior atividade de naringinase por *A. niger* em melaço. Esses parâmetros foram investigados, fixando-se o tempo em 120 horas, usando o delineamento experimental central composto rotacional cujas variáveis codificadas, originais, e as respostas da atividade da naringinase e biomassa estão apresentadas na Tabela 2 sendo que todas as culturas foram realizadas em triplicatas.

Tabela 2. Valores das variáveis codificadas e decodificadas, atividade de naringinase e biomassa na fermentação de melão por *A.niger* 426 em 120 horas.

ENSAIO	CODIFICADAS		DECODIFICADAS		ATIVIDADES (mU/mL) ^a	BIOMASSA (g/L) ^a
	x ₁	x ₂	Extrato de Levedura (g/L)	Naringina (g/L)		
1	-1	-1	6	0,2	272,8	18,47
2	-1	1	6	0,8	343,1	19,97
3	1	-1	14	0,2	354,3	41,65
4	1	1	14	0,8	239,2	31,11
5	-1,414	0	4	0,5	301,3	25,75
6	+1,414	0	16	0,5	198,3	24,23
7	0	-1,414	10	0,0757	267,7	16,42
8	0	+1,414	10	0,9243	307,4	36,80
9	0	0	10	0,5	249,4	26,56
10	0	0	10	0,5	255,0	31,84

O modelo quadrático ajustado obtido pelo software Statistica 7.0, para a atividade de naringinase, está apresentado a seguir:

$$Y = 252,19 - 21,01x_1 + 1,42x_2 + 7,22x_1,2 + 26,11x_2,2 - 46,35x_1x_2 \dots\dots\dots (1)$$

No qual: Y representa a estimativa de atividade de naringinase em mU/mL, x₁ representa a concentração de extrato de levedura em g/L e x₂ a concentração de naringina em g/L.

A equação (1) apresentou um coeficiente de determinação de 75% e um desvio da regressão não significativo (6,82%) indicando que ela é um adequado modelo preditor das condições experimentais. Além disso, a análise de variância mostrou que o coeficiente linear, o termo linear de x₁, o termo quadrático de x₂ e o termo de interação entre as variáveis independentes são significativos em nível de 5%.

A análise estatística mostrou uma correlação

negativa de 64% entre o extrato de levedura e naringina indicando que essas variáveis apresentam efeitos opostos. Tal relação está apresentada na Figura 1 em que se verifica que o aumento na concentração de uma das variáveis independentes implica a redução da outra, quando se deseja alcançar um ótimo de atividade.

Quando observado o crescimento do micro-organismo em relação à concentração das variáveis utilizadas, a alta concentração de extrato de levedura e baixa de naringina proporcionou um aumento na concentração da biomassa apresentada no ensaio 3 (Tabela 2), enquanto que o baixo valor de extrato de levedura e alto de naringina reduziu consideravelmente a concentração da biomassa apresentada no ensaio 2 (Tabela 2), deduzindo que o *A. niger* utiliza esse composto para biossíntese de material celular (BRANKAR, et al., 2008), porém a biomassa não apresenta relação direta com a produção de naringinase, uma vez que ambos os experimentos apresentaram as melhores atividades de naringinase.

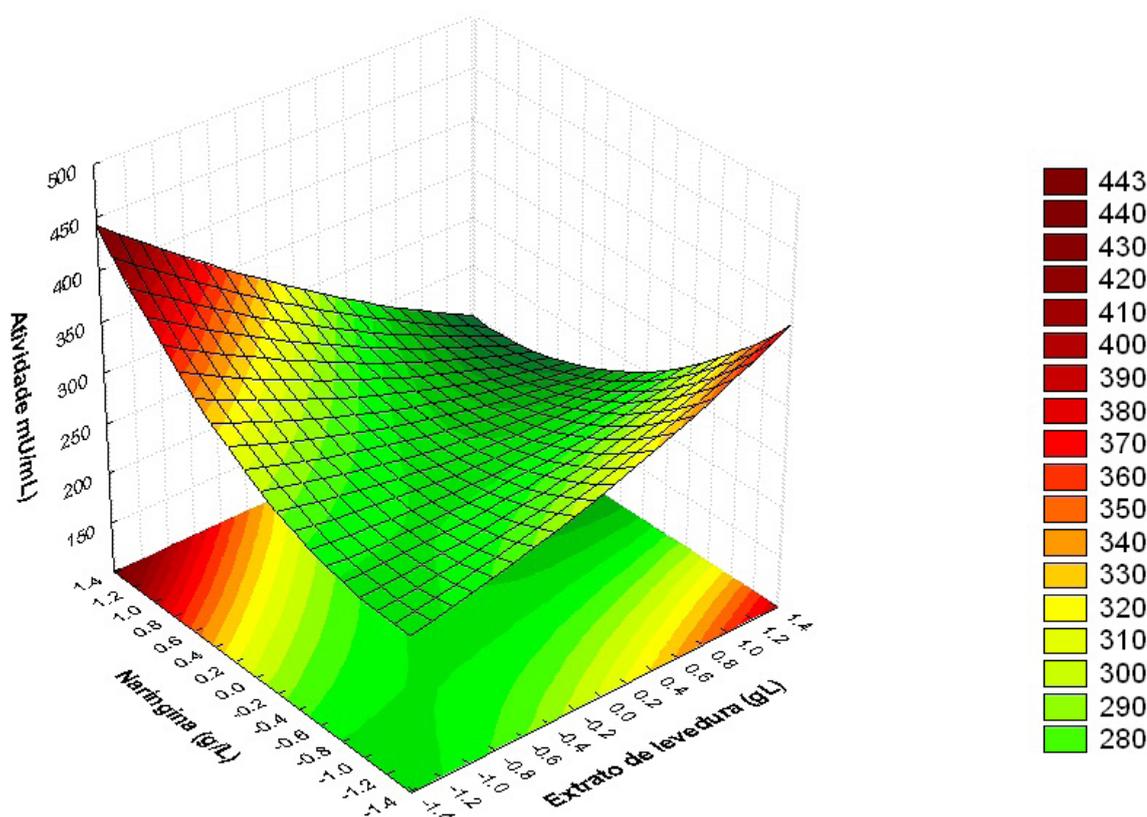


Figura 1. Gráfico da superfície de resposta e curvas de contorno resultante da influência da concentração de naringina e extrato de levedura sobre a atividade de naringinase por *A. niger* 426.

A melhor condição das variáveis apontada pela metodologia de superfície de resposta que proporcionou a atividade de naringinase de 354,3 mU/mL por *A. niger* em melaço, foi obtida com a otimização do processo, utilizando 14,0 g/L de extrato de levedura e 0,2 g/L de naringina com tempo de fermentação de 120 horas (ensaio 3 da Tabela 1). A condição otimizada foi utilizada em um cultivo visando a extração de naringinase por ultrassom.

Extração de Naringinase pela aplicação de Ultrassom

Em processos biotecnológicos, o ultrassom

vem sendo usado na liberação e extração de proteínas, principalmente enzimas (ROKHINA; LENS; VIRKUTITE, 2009), melhorar a produção de fermentação microbiana (MARQUES; BUZATO; CELLIGOI; 2006; HERRÁN et al., 2008) e lise celular de micro-organismos. (VARGAS; PIÃO; CARMONA, 2004). Assim, *A. niger* foi cultivado no meio de fermentação otimizado e, em seguida, submetido em diferentes tempos de ondas ultrassônicas (0,5; 1; 2 e 3 minutos), objetivando a liberação enzimática. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 2.

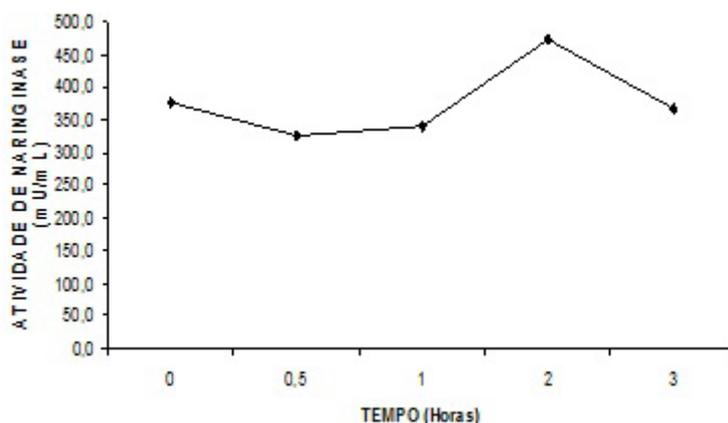


Figura 2. Efeito da aplicação do ultrassom para liberação de naringinase.

Em fermentação, a localização da enzima agregada à célula microbiana ou livre no meio de cultivo constitui importante aspecto do efeito do ultrassom sobre a atividade enzimática. Assim, a aplicação do ultrassom durante 0,5 minuto, provocou uma diminuição da atividade enzimática que pode ser compreendida como a agregação daquelas moléculas enzimáticas livres no cultivo e conseqüentemente obstrução dos sítios ativos. (ROKHINA; LENS; VIRKUTITE, 2009). Ozbek e Ulgen (2000) demonstraram o efeito do ultrassom em diferentes soluções enzimáticas. De acordo com esses autores, a natureza do fluido no qual as enzimas estão solubilizadas detém importante papel no processo de inativação. Além de promover a agregação das moléculas, também foram demonstradas modificações químicas das moléculas enzimáticas em soluções de glucose-oxidase. (GUISEPPI-ELIE; CHOI; GECKELER, 2009).

Entretanto, o efeito negativo do ultrassom apresentou-se minimizado no tempo de aplicação de 1 minuto e com 2 minutos a atividade aumentou para 473,6mU/mL. Esse valor representa uma elevação de 25,3%, quando comparado ao valor obtido do cultivo não sonicado. Esse aumento de atividade de naringinase, possivelmente devido à liberação de moléculas enzimáticas agregadas às células microbianas ou mesmo à ruptura celular, resultou em um aumento de atividade enzimática. Assim, a

quantidade de enzimas liberadas sobrepôs o efeito negativo verificado em 0,5 minuto de aplicação de ultrassom. O efeito de ultrassom em células microbianas tem sido apresentado por diversos autores. A capacidade de ultrassom provocar ruptura celular e liberar proteínas foi demonstrada em *S. cerevisiae*. (GOGATE; KABADI, 2009). Herrán et al. (2008) reportaram a dispersão de hifas em cultura de *A. terreus* enquanto que Vargas, Pião e Carmona (2004) demonstrou lise celular e liberação de invertase em *A. niger*.

O tempo de 3 minutos de aplicação de ultrassom foi excessivo uma vez que a atividade diminuiu para 325,6 mU/mL. Micro-organismos e proteínas diferem à resposta da duração do tratamento com ultrassom e a extensão do dano depende da quantidade de energia absorvida. (ROKHINA; LENS; VIRKUTITE, 2009). Cultivos de *Anabaena flos-aquae* e *Selenastrum capricornutum* tiveram o conteúdo protéico elevado com o uso de ultrassom, mas a atividade de fosfatase alcalina, agregada à superfície celular, aumentou no primeiro e diminuiu no segundo micro-organismo. (FRANCKO et al., 1990). Em *A. terreus*, o uso de ultrassom aplicado em pulsos de segundos e conteúdo energético variável, provocou o crescimento de células livres e a redução da produção de lovastatin (HERRÁN et al., 2008) enquanto que em *A. niger* CCT7415, a aplicação de ultrassom de conteúdo energético

idêntico ao do presente trabalho, porém durante 2 minutos, induziu ruptura celular e o aumento de invertase. (VARGAS; PIÃO; CARMONA, 2004).

A irradiação ultrassônica de baixa intensidade (20 kHz), durante 2 minutos apresentou como um método adequado para a extração da naringinase de *A. niger*.

Assim, a melhor atividade de naringinase alcançada por *A. niger* 426 de 473,6 mU/mL ocorreu quando cultivado em melão (3,0g/L), extrato de levedura (14,0g/L) e naringina (0,2g/L), em 120 horas de fermentação e seguido de aplicação do ultrassom com intensidade de 20 kHz por 2 minutos.

Referências

- BARROS, N. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. São Paulo: Editora Unicamp, 2001.
- BRAM, B.; SOLOMONS, G. L. Production of the enzyme naringinase by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology*, Washington, v. 13, n. 6, p. 842-845, 1965.
- BRANKAR, S. B.; BULE, M. V.; SINGHAL, R. S.; ANANTHANARAYAN, L. Glucose oxidase – an review. *Biotechnology Advances*, New York, v. 27, n. 4, p. 489-501, 2009.
- CHISTI, Y. Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity. *Trends in Biotechnology*, New York, v. 21, n. 2, p. 89-93, 2003.
- DAVIS, W. B. Determination of flavanones. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 19, p. 476-478, 1947.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- FELISMINO, R. *Jornal do Brasil*. 2009. Disponível em: <www.convista.com>. Acesso em: 01 set. 2009.
- FRANCKO, D. A.; TAYLOR, S. R.; THOMAS, B. J.; MCINTOSH, D. Effect of low-dose ultrasonic treatment on physiological variables in *Anabaena flos-aquae* and *Selenastrum capricornutum*. *Biotechnology Letters*, New York, v. 12, n. 3, p. 219-224, 1990.
- GE, X. Y.; QIAN, H.; ZHANG, W. G. Enhancement of fructanohydrolase synthesis form *Aspergillus niger* by simultaneous in vitro induction and in vivo acid stress using sucrose ester. *World Journal Microbiol Biotechnology*, New York, v. 24, n. 1, p. 133-138, 2008.
- GOGATE, P. R.; KABADI, A. M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. *Biochemical Engineering Journal*, New York, v. 44, n. 1, p. 60-72, 2009.
- GUISEPPI-ELIE, A.; CHOI, S.; GECKELER, K. Ultrasonic processing of enzymes: Effect on enzymatic activity of glucose oxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, New York, v. 58, n. 1/4, p. 118-123, 2009.
- HERRÁN, N. S.; LOPES, J. L. C.; PÉREZ, J. A. S.; CHISTI, Y. Effects of ultrasound on culture of *Aspergillus terreus*. *Journal Chemistry Technology Biotechnology*, London, v. 83, n. 5, p. 593-600, 2008.
- 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*, Gujarat, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2010.
- MARQUES, L. L. M.; BUZATO, J. B. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. Effects of Raffinose and Ultrasound pulses on invertase release by free and immobilized *Sacharomyces cerevisiae* in loofa (*Luffa cylindrica*) sponge. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v. 49, n. 6, p. 873-880, 2006.
- MIRÓN, J.; VÁZQUEZ, M. A. G.; MURADO, M. A. Joint effect of nitrogen and phosphorus on glucose oxidase production by *Aspergillus niger*: Discussion of an experimental design with a risk of co-linearity. *Biochemical Engineering Journal*, v. 40, n. 1, p. 54-63, 2008.
- OZBEK, B.; ULGEN, K. O. The stability of enzymes after sonication. *Process Biochemistry*, New York, v. 36, n. 9, p. 1037-1043, 2000.
- PURI, M.; BANERJEE, A.; BANERJEE, U. C. Optimization of process parameters for the production of naringinase by *Aspergillus niger* MTCC 1344. *Process Biochemistry*, New York, v. 40, n. 1, p. 195-201, 2005.
- RIBEIRO, I. A.; ROCHA, J.; SEPODES, B.; MOTA-FILIFE, H.; RIBEIRO, M. H. Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds, *Journal of molecular Catalysis B: Enzymatic*, New York, v. 52/53, p. 13-18, 2008.
- RIBEIRO, I. A.; RIBEIRO, M. H. L. Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method. *Food Control*, New York,

v. 19, p. 432-438, 2008.

ROKHINA, E. V.; LENS, P.; VIRKUTITE, J. Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. *Trends in Biotechnology*, New York, v. 27, n. 5, p. 298-306, 2009.

SAERENS, K.; BOGAERT, I. V.; SOETAERT, W. Production of glucolipids and specialtry fatty acids from sophorolipds by *Penicillium decubers* naringinase: optimazation and kinects. *Biotechnology Journal*, v. 4, n. 4, p. 517-524, 2009.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Darmstadt, local, v. 59, n. 4, p. 426-435, abr. 2002.

VARGAS, L. H. M.; PIÃO, A. C. S.; CARMONA, E. C. Ultrasound effects on invertase from *Aspergillus niger*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, New York, v. 20, n. 2, p. 137-142, 2004.

XU, Y.; LI, Y.; XU, S.; LIU, Y.; WANG, X.; TANG, J. Improvement of xylanase production by *Aspergillus niger* XY-1 using response surface methodology for optimizing the medium composition. *Journal of Zhejiang University Science B*, Zhejiang, v. 9. n. 7, p. 558-566, 2008.