

**UTILIZAÇÃO DO RESÍDUO LÍQUIDO DE INDÚSTRIA DE PROCESSAMENTO DE SUCO DE LARANJA COMO MEIO DE CULTURA DE *PENICILLIUM CITRINUM*: DEPURAÇÃO BIOLÓGICA DO RESÍDUO E PRODUÇÃO DE ENZIMA****Valquíria Barco Tavares, Kátia Sivieri, Carlos Roberto Ceron, Roberto da Silva e Elizeu Trabuco**

Departamento de Química e Geociências - Instituto de Biociências - Letras e Ciências Exatas - IBILCE - UNESP - CP 136 - 15054-000 - São José do Rio Preto - SP

**Fábio Renato Lombardi e Eleni Gomes\***

Departamento de Biologia - Instituto de Biociências - Letras e Ciências Exatas - IBILCE - UNESP - CP 136 - 15054-000 - São José do Rio Preto - SP

Recebido em 22/8/97; aceito em 8/4/98

**UTILIZATION OF RESIDUAL LIQUID ORANGE FROM JUICE PROCESSING AS CULTIVATION MEDIUM OF *PENICILLIUM CITRINUM*: BIOLOGICAL DEPURATION OF THE RESIDUE AND ENZYME PRODUCTION.** *Penicillium citrinum* grown in orange juice processing wastes medium under continuous agitation was studied in order to establish optimal conditions (incubation period, incubation temperature, initial pH and nitrogen addition) for biomass and ribonuclease production, as well as, biological depuration of the wastes. Nitrogen addition to wastes medium increased the biomass and ribonuclease production and provides COD reduction. The soy meal shows to be the best nitrogen source. The conditions for a more favorable enzyme and biomass production and COD reduction were initial pH 6.0 and temperature of 27°C. The maximum value obtained for these parameters on optimal conditions of cultivation was 11 U/mL of enzyme, 4 mg/mL of biomass (dry matter) and 55% of COD reduction, in 96 hours of incubation.

**Keywords:** wastes; fungal grown; COD.**INTRODUÇÃO**

Um dos principais problemas enfrentados pelas indústrias processadoras de suco de laranja é o grande volume de resíduos sólidos e líquidos, produzidos diariamente. Os sólidos, constituídos pelas cascas, sementes e polpas são, na grande maioria dos casos, transformados em "pellets", os quais podem ser utilizados como componente de ração animal. Dentre os despejos líquidos, a "água amarela", formada por proteínas, óleos essenciais, pectinas, açúcares, ácidos orgânicos e sais, é aquela que mais preocupa, pelos seus altos índices de matéria orgânica, o que a torna um agente de alto potencial poluidor.

Na busca de soluções alternativas para o problema do descarte dos resíduos, muitas indústrias têm optado pelo uso de microrganismos como agentes redutores de matéria orgânica desses materiais ou para a eliminação ou redução de compostos tóxicos<sup>1,2,3</sup>.

Os fungos, em função de suas características de reprodução e crescimento, adaptam-se a uma grande variedade de substratos, entre eles, efluentes de indústrias processadoras de alimentos, resíduos agrícolas e agro-industriais e resíduos derivados de petróleo<sup>4,5,6,7,8,9</sup>. Ao se desenvolverem nesses meios os microrganismos consomem a matéria orgânica dos mesmos, promovendo a redução de sua capacidade poluidora. Este fato é constatado pela acentuada redução da DQO (Demanda Química de Oxigênio) e da DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio)<sup>10,11</sup>. Fungos filamentosos de diversos gêneros promoveram a redução de 70 a 80% da DQO inicial de substratos como água de café, vinhaça, resíduos de banana e lodo de filtro de usina de açúcar<sup>12,13</sup>.

O uso do crescimento microbiano para a redução do poder poluidor de resíduos permite ao mesmo tempo a bioconversão do substrato residual em biomassa microbiana, a qual tem servido para a extração de proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos, ou mesmo para uso direto em ração animal<sup>14,15</sup>, além do aproveitamento de compostos como ácidos orgânicos, vitaminas e enzimas, excretados pelo microrganismo durante seu crescimento<sup>16,17,18</sup>.

Resíduos de agro-indústrias como as processadoras de sucos cítricos têm sido utilizados como substrato para a produção de pectinases fúngicas<sup>19,20,21,22,23,24</sup>, metano<sup>24</sup> e para adsorção de corantes residuais<sup>25</sup>.

Neste trabalho foram avaliadas as possibilidades de utilização do resíduo líquido da indústria de beneficiamento de suco de laranja, conhecido como "água amarela", como componente do meio de cultura para o crescimento de *Penicillium citrinum*, visando a associação entre a redução da DQO e a produção de uma ribonuclease, a RNase P1. Esta enzima ultra excretada por *P. citrinum* tem sido explorada comercialmente no Japão para a obtenção de nucleotídeos de sabor (5'-GMP e 5'-IMP) os quais são obtidos em milhares de toneladas/ano e comercializados em países asiáticos, europeus e recentemente na América, adicionados a condimentos e alimentos pré-preparados<sup>26,27,28</sup>. Foram realizados variados testes com diferentes espécies fúngicas, constatando-se boa adaptação do *P. citrinum* ao resíduo estudado, além da produção da enzima em quantidades consideráveis e à redução da DQO do resíduo. Testes empregando água amarela, suplementada com nutrientes minerais, indicaram uma influência positiva no crescimento fúngico, na produção de enzimas e na redução da DQO.

**MATERIAL E MÉTODOS**

O microrganismo utilizado, *Penicillium citrinum* (IZ:1501), foi fornecido pelo Departamento de Tecnologia Rural, ESALQ/USP (Piracicaba). O RNA de *Candida utilis* foi extraído e fornecido pela Companhia Agroindustrial Ometto (Iracemápolis -SP). O resíduo líquido (água amarela) foi fornecido pela Citrovita Ind. S/A (Catanduva-SP). O adubo mineral, contendo os elementos Nitrogênio, Fósforo e Potássio, NPK (19:10:19-Manah) e a farinha de soja (Macrobrasil) foram adquiridos no comércio. Os componentes do meio de cultura foram adquiridos da Oxoid e os demais reagentes da Sigma e Merck.

## Meios de cultura

Foram utilizados 100 mL dos seguintes meios de cultura:

Meio 1- Semi-sintético, composto por (p/v) 5 % de glicose, 0,5% de peptona, 0,2% de KNO<sub>3</sub>, 0,4% de CaCl<sub>2</sub>, 0,4% de MgSO<sub>4</sub> e 1 mL de solução de micronutrientes (5% de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1% de Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O, 0,25% de CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O, 0,05% de MnSO<sub>4</sub>·1 H<sub>2</sub>O, 0,05% de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> e 0,05% de NaMoO<sub>4</sub>).

Meio 2 - Água amarela

Meio 3 - Água amarela suplementada com 0,2% de KNO<sub>3</sub>, 0,4% de CaCl<sub>2</sub>, 0,4% de MgSO<sub>4</sub> e 1 mL de solução de micronutrientes.

Meio 4 - Meio 3 sem adição de KNO<sub>3</sub>.

Meio 5 - Meio 3 sem a solução de micronutrientes.

## Cultivo do Microrganismo

Uma suspensão equivalente a 10<sup>7</sup> esporos foi transferida para 50 mL do meio 1, em frasco Erlenmeyer, o qual foi mantido sob agitação (250 rpm) por 24 horas. Parte desse material (5 mL) foi utilizado para inocular 100 mL de cada meio descrito anteriormente, contido em frascos Erlenmeyer. A incubação ocorreu por períodos de 24 a 120 horas, sob agitação, a 28°C.

## Medida da atividade enzimática

A atividade ribonucleolítica foi avaliada em mistura contendo 1 mL de tampão acetato 0,25M pH 5,0, 0,2 mL de solução enzimática (meio de cultura livre da biomassa) e 0,3 mL de solução de RNA, à temperatura de 65°C. Após 30 minutos, a reação foi interrompida por resfriamento em banho de gelo e o RNA não hidrolisado foi precipitado com a adição de etanol a 0°C. Após centrifugação, foi determinado o valor da absorbância do sobrenadante a 260 nm para a determinação da quantidade de nucleotídeos liberada, de acordo com o método proposto por FUJIMOTO et al.<sup>26</sup>. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade que libera 1 mmol de nucleotídeos por minuto, nas condições do ensaio. Foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 10.600.

## Procedimentos analíticos

Após o período de crescimento, a suspensão foi filtrada a vácuo em papel Whatman n° 1 e a massa micelial foi mantida a 105°C por 24 horas para a determinação do peso seco. A Demanda Química de Oxigênio (DQO) foi determinada através de método colorimétrico<sup>29</sup>. Os açúcares redutores totais (ART) foram dosados pelo método do ácido 3,5 dinitro-salicílico<sup>30</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Crescimento de *Penicillium citrinum* em meio contendo água amarela

Na figura 1 estão representados os dados da produção de biomassa e da atividade enzimática, além da variação dos valores da DQO da água amarela, durante o período de crescimento do *Penicillium citrinum*.

A quantidade máxima de biomassa, produzida nos meios contendo água amarela (meios 2 e 3), foi praticamente a metade daquela obtida em meio semi-sintético (meio 1), embora o microrganismo tenha atingido o crescimento máximo entre 96 e 120 horas de cultivo, em todos os meios. Por outro lado, a produção de ribonuclease, nos meios de cultivo compostos pelo resíduo e suplementados com nutrientes minerais (Fig. 1b), foi maior quando comparada ao meio semi-sintético (Fig. 1a), descrito em literatura como ótimo para a produção de ribonuclease<sup>31</sup>. Este fato sugere a existência de certos componentes no resíduo que estimularam a produção e liberação da enzima.

A redução da DQO do meio de cultura contendo água amarela, a qual manteve-se em torno de 16500 mg/L no início do tratamento, atingiu 45% em 96 horas, quando houve a suplementação com macro (N, P, Mg, K) e micronutrientes (Zn, Mo, Mn, Fe, Bo). Na ausência dos suplementos minerais (meio 2) a redução foi de apenas 35% (Fig. 1). Os demais meios testados (meios 4 e 5) apresentaram resultados semelhantes ao meio 3 (suplementado) indicando que apenas os macronutrientes influenciaram no crescimento fúngico e na produção da enzima. A falta desses nutrientes provocaria, provavelmente, o desbalanceamento da relação C:N:P, necessária ao desenvolvimento microbiano. Vários trabalhos têm demonstrado que a suplementação de Nitrogênio e Fósforo inorgânicos pode aumentar a produção de biomassa e de proteínas microbianas em meios de cultivo compostos por resíduos agro-industriais<sup>32, 33</sup>.

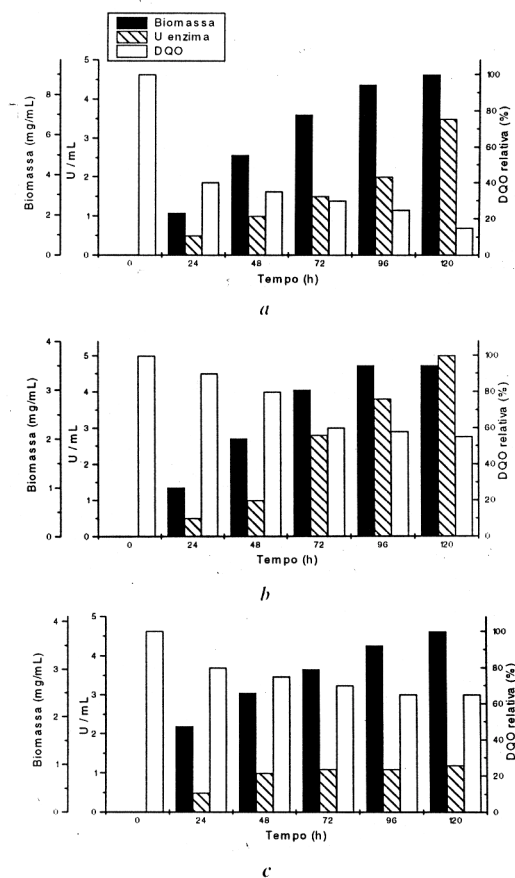


Figura 1. Produção de Biomassa e de Ribonuclease por *Penicillium citrinum* e redução da DQO do meio de cultivo, função do tempo de incubação. Fig. 1a = meio semi-sintético; Fig. 1b = água amarela suplementada com macro e micronutrientes; Fig. 1c = água amarela não suplementada.

### 2. Efeito da fonte de Nitrogênio sobre o crescimento fúngico

A tabela 1 mostra que a adição de Nitrogênio levou a um aumento da produção de biomassa e de ribonuclease, assim como à redução da DQO do resíduo. As fontes de nitrogênio que proporcionaram os melhores resultados foram o adubo inorgânico NPK e farinha de soja. Entretanto, a produção de ribonuclease foi cerca de 4 vezes superior quando a fonte de nutrientes foi a farinha de soja. Esta última foi, portanto, a fonte de nitrogênio escolhida para suplementar os meios nos ensaios posteriores.

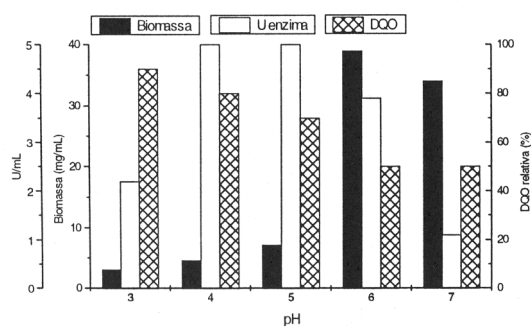
**Tabela 1.** Efeito da fonte de Nitrogênio sobre a produção de biomassa, de ribonuclease e redução da DQO

FONTE DE N (0,5%)	BIOMASSA (mg/ mL)	UNIDADE DE ENZIMA (U)	REDUÇÃO DA DQO (%)
controle	1,24	3,0	52,3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1,64	1,7	51,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,31	2,1	53,3
NPK	2,00	2,0	60,3
KNO <sub>3</sub>	1,43	4,1	48,7
Farinha de soja	1,88	8,6	56,5

O microrganismo *Penicillium citrinum*, foi incubado por 96 horas a 27°C, em meio de cultivo composto pelo resíduo líquido da indústria processadora de suco de laranja, a água amarela .

### 3. Efeito da temperatura e pH de cultivo sobre o crescimento fúngico

Em meio residual contendo apenas farinha de soja, o maior crescimento microbiano foi obtido quando o pH inicial do meio foi 6,0, enquanto que a maior produção da ribonuclease deu-se em pH 4,0 e 5,0 (Fig. 2). Esses resultados corroboram os citados em literatura<sup>34</sup>, nos quais a neutralização do meio de cultura (pH 6,0 e 7,0) reduz a estabilidade da ribonuclease de *P. citrinum*.

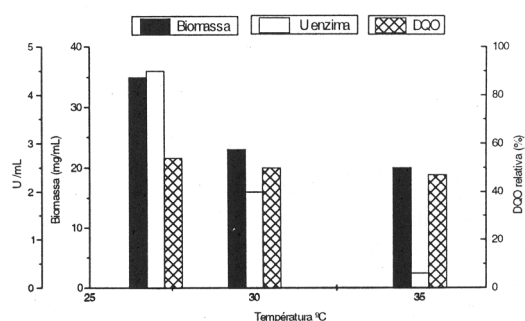


**Figura 2.** Efeito do pH inicial do meio de cultivo sobre a produção de biomassa, e de ribonuclease por *P. citrinum* e sobre a redução da DQO, em meio composto por água amarela suplementada com macro e micronutrientes.

Embora a produção de ribonuclease tenha sido 20% maior em pH 5,0 pode-se considerar que o cultivo do fungo em pH 6,0 torna-se mais interessante, visto que, nesse pH, a redução da DQO chegou a 55% contra 30% obtida em pH 5,0.

A temperatura de incubação que proporcionou maior produção de biomassa foi 27°C (Fig. 3). Entretanto, não foram constatadas diferenças significativas com relação à redução da DQO, a qual ficou em torno de 55% nas temperaturas de cultivo estudadas. Uma possível explicação para este fato seria a eliminação da matéria orgânica em forma de CO<sub>2</sub> ou como outros compostos voláteis em temperatura acima de 30°C, os quais não passariam a fazer parte da biossíntese de massa celular<sup>35</sup>. Cabe destacar porém, que a DQO pode ser diminuída não somente pela utilização da matéria orgânica para crescimento e manutenção da biomassa microbiana, mas também pelo processo de adsorção de componentes do resíduo à superfície da célula<sup>36,37</sup>.

A redução na produção da enzima em função da temperatura não foi proporcional à redução da produção de biomassa, a qual foi a mesma em temperaturas de 30 e 35°C. Estudos com bactérias demonstraram que a variação da temperatura de cultivo leva também a uma modificação no tipo de enzima despolimerizante liberada, em decorrência de modificações no sistema de transporte dos indutores das mesmas<sup>38</sup>.



**Figura 3.** Efeito da temperatura de cultivo sobre a produção de biomassa e de ribonuclease por *P. citrinum* e sobre a redução da DQO do meio, composto por água amarela suplementada com macro e micronutrientes em pH 6,0.

O crescimento de *Penicillium citrinum*, determinado pela variação da massa micelial, ficou abaixo do valor esperado (8 mg/mL), tomando-se como referência o meio semi-sintético, mesmo após as otimizações feitas. Este resultado deve-se, provavelmente, à complexidade do resíduo estudado, o qual contém polímeros não prontamente disponíveis ao fungo. Os resíduos agro-industriais, entre eles o resíduo de indústrias processadoras de sucos, contêm apreciáveis quantidades de celulose, hemicelulose e pectina, os quais, sendo componentes da parede vegetal, são arrastados pelo esmagamento da polpa<sup>20</sup>.

O valor do ART, determinado no resíduo, ficou ao redor de 2 mg/mL, aumentando cerca de 120% após 24 horas do início do crescimento do fungo. Este dado sugere a ação de enzimas líticas produzidas pelo microrganismo durante a fase de adaptação ao meio (lag fase), as quais atuam sobre os polímeros de açúcar presentes no mesmo.

O uso da água amarela para cultivo de *P. citrinum* mostrou-se viável tanto para a produção de ribonuclease quanto para a redução da matéria orgânica da mesma. O valor de DQO do resíduo inicial foi reduzido em 55%, ficando em torno de 9.000 mg O<sub>2</sub> / L, o que ainda não permite o seu descarte direto na natureza, mas facilita o tratamento biológico em lagoas de depuração.

Deve ser considerado no entanto, a necessidade do monitoramento da produção da toxina citrinina durante o crescimento do fungo. Vários trabalhos têm indicado a presença dessa toxina em determinadas condições de cultivo<sup>39,40, 41</sup>. Por outro lado, tem sido demonstrado ser possível a inibição da síntese da mesma variando-se a composição do meio de cultura<sup>42,43</sup>. Este aspecto necessita ser melhor investigado.

### REFERÊNCIAS

- Samkutty, P. J., Gouth, R. H., McGrew, P.; *J. Environ. Sc. Helt. Environ. Sc. Engen. Toxic Haz. Subs. Control.* **1996**, *30*, 2143.
- Kumar, V., Wati, L., Banat, I. M., McMullan, G., Singh, D., Marchant, R.; *Microbios* **1997**, *89*, 81.
- Vinci Guerra, V. V., Dannbale, A., Gacsbaiz, E.; *J. Mol. Catalysis* **1997**, *3*, 213.
- Spicer, A; *Tropical Sc.* **1971**, *13*, 239.
- Moyson, E., Veracheti, H.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1991**, *36*, 421.
- Gray, W. D.; *Adv. Chem.* **1966**, *57*, 261.
- Nigami, P., Prabhu, K. A; *J. Basic Microbiol.* **1990**, *10*, 747.
- Kuzmanova, S.; Vandeska, E.; Dimitrovski, A; *J. Ind. Microbiol.* **1991**, *7*, 257.
- Cimerman, A.; Friedrich, J.; *Enzyme Microb. Technol.* **1991**, *13*, 848.
- Tauk, S. M.; *Environ. Technol. Lett.* **1982**, *3*, 411.
- Céspedes, R.; Maturana, A.; Bumann, U.; Bronfman, M.; Gonzales, B.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, *46*, 631.

12. Nalin, D.; Kiyani, C.; *Rev. Microbiol.* **1988**, 20, 233.
13. Enwefa, C.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1991**, 36, 283.
14. Murty, M. V. S., Chandra, T. S.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, 47, 212.
15. Kaligan, A. E., Krishnan, M. R. V.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, 47, 226.
16. Das, K., Anis, M., Azemi, B. M. N. M., Ismail, N. *Biotechnol. Bioengn.* **1995**, 48, 551.
17. Nigam, P., Prabhu, K. A.; *J. Basic Microbiol.* **1990**, 10, 747.
18. Gomes, E., Serzedello, A.; *Microbios.* **1996**, 87, 227.
19. Ferderici, F., Petruccioli, M.; *Microb. Alim. Nutr.* **1985**, 3, 39.
20. Aguilar, G., Huitron, C.; *Enzyme Microb. Technol.* **1986**, 9, 541.
21. Larios, G., Garcia, J. M., Huitron, C.; *Biotechnol. Letters.* **1989**, 11, 729.
22. Garzon, C. G., Hours, R. A.; *Bioresource Technol.* **1992**, 39, 93.
23. Fonseca, M. J. V., Said, S.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1994**, 42, 32.
24. Kaju, K. *Indian J. Environ. Health.* **1997**, 39, 20.
25. Namasivayan, C., Muniasamy, N., Rami, M., Ranganathan, K.; *Bioresource Technol.* **1996**, 57, 37.
26. Fujimoto, M., Kuninaka, A., Yoshino, H.; *Agric. Biol. Chem.* **1974**, 38, 777.
27. Samejima, H., Kimura, K., Ado, Y.; *Biochemie.* **1980**, 62, 299.
28. Zhu, Y., Knol, W., Smits, J. P., Bol, J.; *Enzyme Microb. Technol.* **1996**, 18, 108.
29. Apha. *American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* 14<sup>a</sup> ed., Washington, 1975.
30. Miller, G. L.; *Anal. Chem.* **1956**, 31, 426.
31. Nakao, Y., Ogata, K.; *Agric. Biol. Chem.* **1963**, 27, 291.
32. Rosalem, P. L., Tauk, S. M., Santos, M. C. N.; *Rev. Microbiol.* **1985**, 16, 299.
33. El-Hawary, F. I., Mehanna, A. S.; *Acta Alimen.* **1991**, 20, 205.
34. Kuninaka, A.; *J. Agric. Chem.* **1960**, 34, 489.
35. Humphrey, A. E.; In *Biotechnology and Applied Microbiology*; Alani, I., Moo-Young, M.; Ed. Elsevier Applied Science, London 1986; p. 166.
36. Cecato-Antonini, S. M., Tauk-Tornisielo, S. M.; *Rev. Microbiol.* **1994**, 25, 129.
37. Corso, C. R., Marcanti, I., Yamaoka, E. M. T.; *Brazilian J. Med. Biol. Research.* **1987**, 20, 623.
38. Stutzenberger, F., Jenkins, T.; *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1991**, 7, 526.
39. Abramson, D., Clear, R. M.; *J. Food Prot.* **1996**, 59, 642.
40. Franco, C. M., Fente, C. A., Vazquez, B., Lallaoui, A. C. L., Prognon, P., Mahuzier, G.; *J. Chromatog.* **1996**, 723, 69.
41. Giridhar, P., Reddy, S. M.; *National Acad. Sc. Letters.* **1997**, 20, 59.
42. Pimentel, M. C. B., Melo, E. H. M., Lima-Filho, J. L., Duran, N.; *Mycopathologia.* **1996**, 133, 119.
43. Giridhar, P., Reddy, S. M.; *National Acad. Sc. Letters.* **1997**, 20, 62.