

N. D. Signoretti<sup>1</sup>, G. A. Macedo<sup>2</sup>, J. Macedo<sup>3</sup>

Laboratório de Bioquímica, Departamento de Ciências dos Alimentos  
Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas  
Palavras-Chave: naringina, naringinase, fungos, isolamento

## INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A naringinase é um complexo enzimático formado por uma  $\alpha$ -L-ramnosidase e uma  $\beta$ -D-glucosidase. Essa enzima degrada de naringina em naringinina, e por isso tem um grande potencial na aplicação para a remoção do amargor em sucos cítricos. Alguns fungos já foram identificados como bons produtores de naringinase, porém são poucos. Este projeto visou a continuidade do trabalho de isolamento e seleção de fungos para produção de naringinase em meio sólido, além do estudo dos efeitos da aplicação da naringinase comercial na atividade anti-oxidante dos polifenóis presentes em suco de laranja. Esta proposta de estudo, visou a biotransformação dos flavonóides presentes na laranja por via enzimática, contribui tanto para a obtenção de novos compostos bioativos como para o entendimento das variáveis que influenciam na biodisponibilidade e ação destes compostos no organismo. Além da possibilidade de gerar produtos diferenciados a partir dos atualmente existentes no mercado brasileiro.

## METODOLOGIA

Para a seleção dos microrganismos potencialmente produtores de naringinase preparou-se o meio de cultura sólido em erlenmeyer constituído de farelo de trigo, com solução de sais preparada, naringina 5 g/L e sacarose 5 g/L. O meio de cultivo foi esterilizado e após a esterilização os frascos foram inoculados com o pré inóculo e incubados a 30°C e a 90% de umidade em estufa por 96 horas.

Após a fermentação, foram adicionados 40 mL de tampão acetato pH 5,0; 0,02M e agitados a 130 rpm por 30 minutos. A solução foi filtrada e no sobrenadante foi medida a atividade enzimática.

O método para determinação da atividade de naringinase consiste em uma reação composta de 0,8 mL de naringina a 1 g/L pipetada em tubo de ensaio previamente contendo 0,5 mL de tampão acetato de sódio 0,1M (pH 4,0) e 0,1mL de sobrenadante do cultivo. O branco da reação é composto de 0,8 mL de água destilada e 0,6 mL do mesmo tampão. Estas reações foram incubadas a 50°C por uma hora. Em seguida efetua-se a transferência de alíquota de 0,1mL em tubos de ensaio contendo 3 mL de dietilenoglicol 90% (v/v). Por último, é adicionado 0,1mL de NaOH 4 M. Os tubos serão deixados em repouso por 20 minutos para o desenvolvimento de cor que é lida a 420nm no espectrofotômetro, zerando-se o espectrofotômetro com o branco da reação.

Para iniciar a medida da atividade de naringinase construiu-se uma curva padrão onde variou-se a concentração de naringina de 0,25 a 1,0 g/L. Para a construção desta curva padrão preparou-se soluções com as concentrações desejadas de naringina e a partir dessas soluções seguiu-se o mesmo método utilizado para a determinação da atividade de naringinase, porém sem a adição do sobrenadante do cultivo.

Na segunda etapa do projeto seriam feitos os estudos das reações de biotransformação enzimática dos fenólicos do suco de laranja através do substrato sintético naringina e do estudo das reações enzimáticas, a determinação de fenólicos totais por Folin-Ciocalteu, a determinação de proteínas e a determinação de atividade antioxidante in vitro das amostras antes e após biotransformação.

## RESULTADOS

No projeto anterior encontrou-se apenas um fungo potencialmente produtor da enzima naringinase, porém, durante as análises percebeu-se que a produção da enzima por este microrganismo era incostante.

Dessa forma, testou-se diferentes meios de cultivo e métodos para a verificação da produção da enzima por este microrganismo. Testou-se realizar a precipitação da enzima com sulfato de amônia com posterior diálise do material obtido para posterior análise da atividade enzimática sem sucesso.

Tentou-se realizar a fermentação no bagaço seco de laranja, além do farelo de trigo já usado anteriormente e tentou-se ainda induzir a produção da enzima através do aumento da concentração naringina nos meios usados para a fermentação porém não obteve-se sucesso em nenhuma delas até o momento da interrupção da iniciação.

## CONCLUSÃO

Os testes continuaram a feitos principalmente com fungos, já que segundo Puri et al., 2000, são os principais produtores de naringinase.

Através dos resultados obtidos pode-se verificar que a produção da enzima pelo microrganismo é incostante sendo assim necessária melhor pesquisa e aprofundamento do meio de fermentação, do tempo de fermentação, do isolamento da enzima e da análise da atividade de naringinase.

Deve-se ainda considerar e estudar a hipótese deste microrganismo por algum motivo apresentar um resultado falso positivo no método utilizado.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à Prof. Dra. Gabriela Macedo e a Dra. Juliana Macedo pela oportunidade de compartilhar de seus conhecimentos, pelos seus ensinamentos e pela convivência que também me ensinou muito.

Também agradeço a PIBIC/CNPq pelo incentivo a pesquisa.

## BIBLIOGRAFIA

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