

N. D. Signoretti¹, G. A. Macedo²

Laboratório de Bioquímica, Departamento de Ciências dos Alimentos
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Universidade Estadual de Campinas
Campinas, São Paulo, Brasil

nathsig@fea.unicamp.br¹; gmacedo@fea.unicamp.br²;

Palavras-Chave: naringina, naringinase, fungos, isolamento

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A naringinase é um complexo enzimático formado por uma α -L-ramnosidase e uma β -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.

Além de sua aplicação em sucos cítricos, o complexo enzimático formador da naringinase tem várias outras aplicações, como por exemplo, a Ramnose, produzida através da atividade de α -L-ramnosidase de naringinase, pode ser utilizada componente de fármacos, realçador de sabor e defensivo agrícola, um outro composto formado pela hidrólise da naringina pela α -L-ramnosidase de naringinase é a prunina que possui atividade anti-viral e antiinflamatória, e pode também ser utilizada como adoçante para diabético, a α -L-ramnosidase da naringinase tem ainda o poder de catalisar a deglicosilação parcial dos glicopeptídeos que possuem grande atividade antibiótica contra bactérias gram-positivas. Alguns estudos mostram também que atividade da naringinase junto com β -arabinosidase proporcionaram o realce do aroma de vinho, além de outras possíveis aplicações.

Alguns fungos já foram identificados como bons produtores de naringinase, porém são poucos. Este projeto teve como objetivo o isolamento e seleção de fungos para produção de naringinase em meio sólido e a determinação de sua atividade enzimática.

METODOLOGIA

Foram feitas replicagem e isolamento de microrganismos de materiais como terra, frutas, pedaços de árvores e outros materiais oriundos da natureza nas regiões de Vinhedo, Valinhos, Jundiá e Itatiba. Com os microrganismos isolados iniciou-se a seleção dos que eram potencialmente produtores de naringinase.

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 na composição (g/L): KH_2PO_4 , 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5; NaNO_3 , 2,0; KCl , 0,5; FeCl_3 , 0,1; naringina 5 g/L e sacarose 5 g/L. O meio de cultivo foi esterilizado a 120°C por 15 minutos. 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.

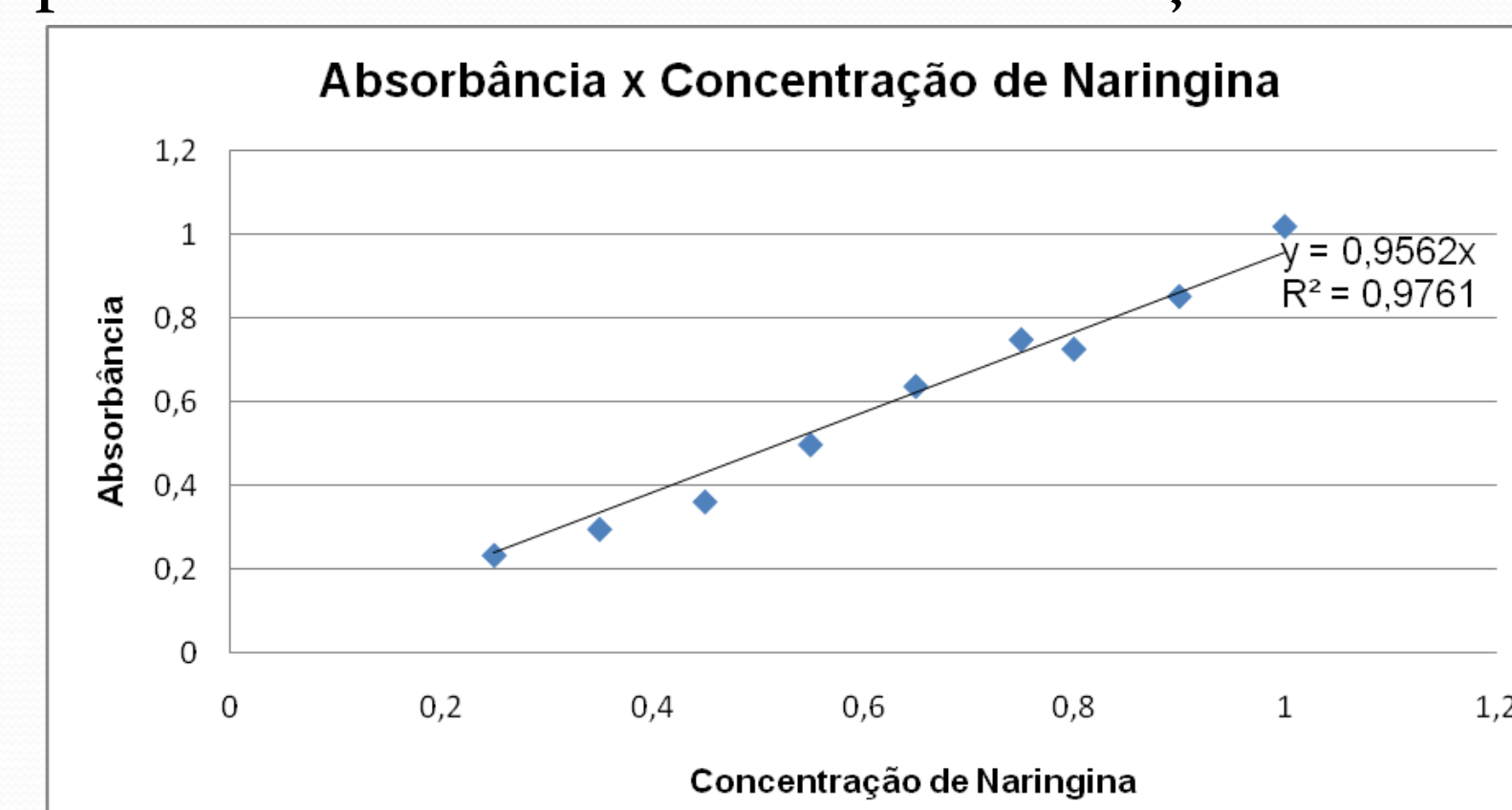
O método para determinação da atividade de naringinase consiste em uma reação será composta de 0,8 mL de naringina a 1 g/L pipetada em tubo de ensaio previamente contendo 0,5 mL de tampão acetato de sódio 0,1M (pH 4,0) e 0,1mL de sobrenadante do cultivo. O branco da reação é composto de 0,8 mL de água destilada e 0,6 mL do mesmo tampão. Estas reações são 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 em temperatura ambiente 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.

MELHORES RESULTADOS

Para determinar se existe produção da enzima naringinase e também para determinar a atividade enzimática construiu-se uma curva padrão onde variou-se a concentração de naringina de 0,25 a 1,0 g/L

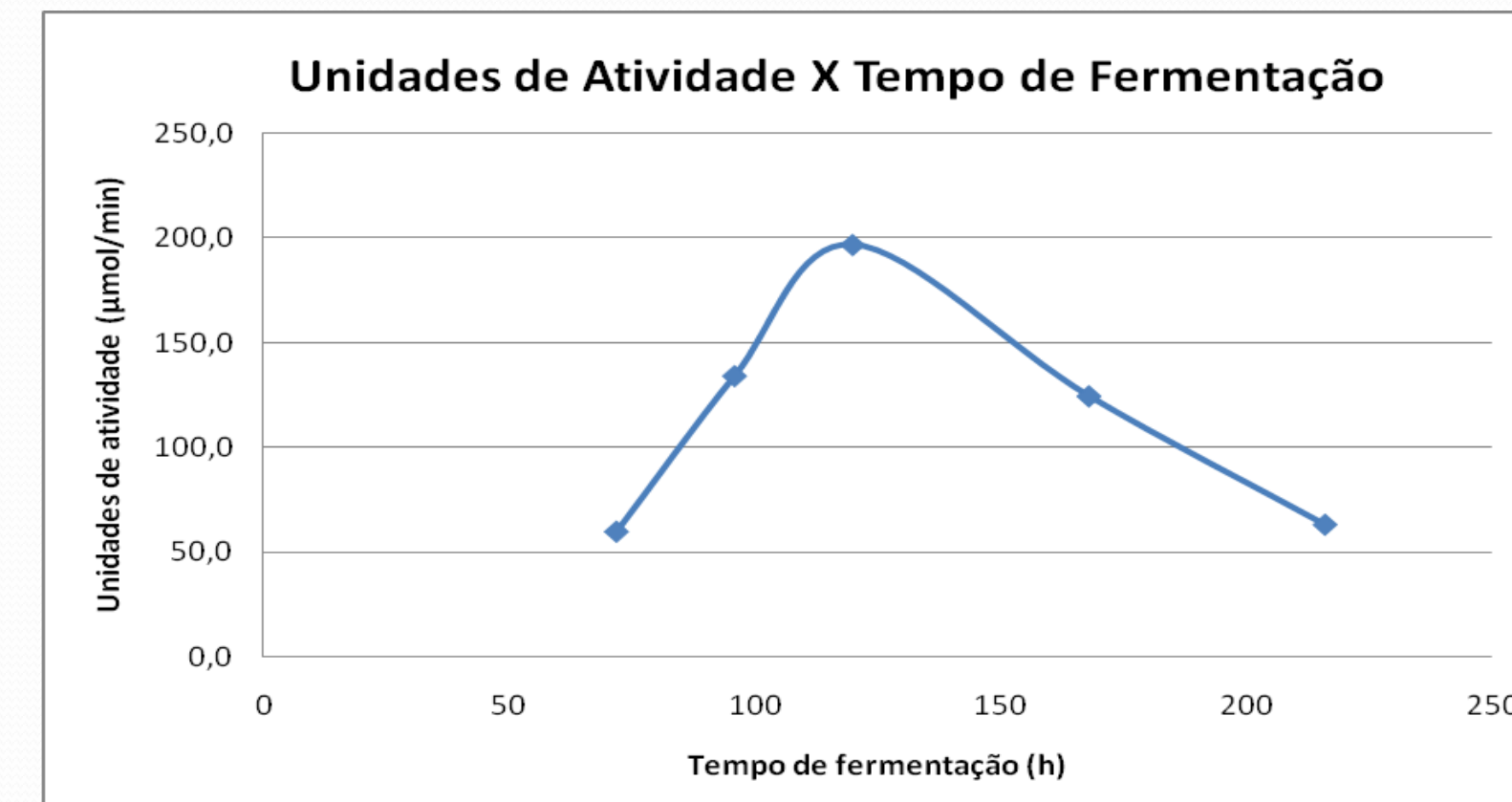
Figura 1 - Curva padrão de absorbância com a variação da concentração de naringina.



Foram isolados durante o projeto 250 microrganismos e replicados em meio sólido PDA para a conservação da cultura a 4°C.

Os microrganismos isolados foram testados para a produção de naringinase e em paralelo foram realizados os mesmos testes com os microrganismos presentes na coletânea do laboratório. Foram testados no total 430 microrganismos, dos quais 250 foram isolados e 180 pertencem a coletânea do laboratório. Encontrou-se apenas um microrganismo potencialmente produtor de naringinase e a partir deste fez-se uma curva cinética para determinar o melhor tempo de fermentação para a produção da enzima.

Gráfico 2 - Curva cinética da atividade enzimática com a variação do tempo.



Através da análise do gráfico, pode-se observar que a maior atividade de naringinase foi no tempo de fermentação de 120h, portanto, este é o melhor tempo para a fermentação do microrganismo isolado.

CONCLUSÃO

Os testes foram feitos principalmente com fungos, já que segundo Puri et al., 2000, são os principais produtores de naringinase. Foi feita em paralelo às análises para a identificação dos microrganismos produtores de naringinase dos microrganismos isolados as mesmas análises para os fungos presentes na coletânea do laboratório.

Com o término das análises, apesar da grande variedade de fungos testados obteve-se apenas um microrganismo com potencial para a produção da enzima naringinase o que demonstra a dificuldade em encontrar um microrganismo produtor da enzima.

Para melhor estudo deste microrganismo produtor devem ser realizados maior número de análises variando a composição do meio de fermentação e fatores ambientais como umidade e temperatura de fermentação e também deve-se realizar a caracterização deste fundo porém esta caracterização é complexa e será difícil identificar o microrganismo produtor.

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.