

37
20j.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**Escuela Nacional de Estudios
Profesionales Zaragoza**

**ESTUDIOS SOBRE LA PRODUCCION FERMENTATIVA
DE NARINGINASA**

TESIS

que para obtener el título de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presenta

DONATO MOTA REYES

México, D. F. 1992

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Página

I. RESUMEN	
II. INTRODUCCION	
A. Características e importancia de la naringinasa.....	2
B. Fundamentación del tema.....	6
C. Características de la toronja y sus propiedades nutri- nutricionales.....	6
D. Importancia de la naringina en el procesamiento de la toronja.....	8
E. Técnicas empleadas para eliminar el sabor amargo de los jugos de toronja.....	14
F. Fuentes de obtención de naringinasa.....	15
G. Métodos de cultivo para la producción de naringinasa..	16
1. Fermentación semisólida.....	16
2. Fermentación sumergida.....	19
H. Factores que afectan la producción de naringinasa.....	19
III. OBJETIVOS	
A. Objetivo general.....	22
B. objetivos específicos.....	22
IV. ESTRATEGIA	
V. MATERIAL Y METODOS	
A. Reactivos.....	25
1. Reactivos grado analítico.....	25
2. Reactivos industriales.....	25
B. Microorganismos.....	26

C. Medios de cultivo.....	26
1. Medios de aislamiento.....	26
2. Medios de propagación.....	26
3. Medios de producción.....	26
D. Métodos.....	27
1. Aislamiento de microorganismos naringinoliticos.....	27
2. Preparación del inóculo.....	27
3. Producción de naringinasa.....	27
4. Determinación del crecimiento celular.....	28
5. Determinación de la actividad naringinolitica.....	28
a. Preparación de la solución estandar de naringina....	28
b. Método de Davis para la determinación de naringina..	29
6. Determinación de proteína extracelular.....	29
7. Aplicación de naringinasa a jugos de toronja.....	29
VI. RESULTADOS Y DISCUSION	
A. Aislamiento de las cepas productoras de naringinasa...	33
B. Selección del medio de cultivo.....	37
C. Selección de la cepa productora de naringinasa.....	39
D. Efecto de la oxigenación sobre la producción de naringinasa.....	46
E. Producción de naringinasa utilizando naringina en solución acuosa estéril.....	56
F. Variabilidad en la producción de naringinasa.....	60
G. Degradación de naringina durante la fermentación.....	62
H. Efecto de la concentración de naringina sobre la producción de naringinasa.....	64
I. Efecto de los sólidos de cocimiento de maíz y del extracto de levadura sobre la producción de naringinasa.	69

J. Empleo de productos de soya y salvado de trigo para la producción de naringinasa.....	71
K. Estudios de la naringinasa producida por <i>Aspergillus niger</i>	73
1. Efecto del pH sobre la actividad.....	73
2. Efecto de la temperatura sobre la actividad.....	75
3. Cinética de hidrólisis de naringina pura.....	75
4. Aplicación de la naringinasa obtenida a jugo de tonja reconstituido.....	75

VII. INTEGRACION DE RESULTADOS

VIII. CONCLUSIONES

IX. RECOMENDACIONES

IX. BIBLIOGRAFIA

LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig. 1. Degradación enzimática de la naringina.....	3
Fig. 2. Principales partes que constituyen a la toronja (<i>Citrus paradisi</i>).....	7
Fig. 3. Intermediario de la ruta biosintética de naringina aislado de las hojas y frutas verdes de la toronja.	12
Fig. 4. Estrategia seguida para llevar a cabo el presente estudio.....	24
Fig. 5. Curva de calibración para la determinación de naringina utilizando el método de Davis.....	30
Fig. 6. Curva de calibración para la determinación de proteína utilizando el método de Lowry.....	31
Fig. 7. Cepas productoras de naringinasa cultivadas en placas con medio 2.....	36
Fig. 8. Producción de naringinasa por la cepa 14 a las 90 horas de fermentación utilizando diferentes medios.	40
Fig. 9. Actividad volumétrica de naringinasa producida a las 72 horas de fermentación por varias cepas de hongos.....	41
Fig. 10. Producción de naringinasa producida por las cepas 2, 3, 10 y 14 en el medio 8 y su perfil de pH.....	44
Fig. 11. Perfiles de crecimiento de las cepas 2, 3, 10 y 14 en el medio 8.....	45
Fig. 12. Producción específica de naringinasa de las cepas 2, 3, 10 y 14 en el medio 8.....	47
Fig. 13. Productividad volumétrica máxima obtenidas en el medio 8 para las cepas preseleccionadas.....	48
Fig. 14. Efecto de la oxigenación sobre la producción de naringinasa y crecimiento de la cepa 3.....	50
Fig. 15. Efecto de la oxigenación sobre la producción de naringinasa y crecimiento de la cepa 14.....	51
Fig. 16. Efecto de oxigenación sobre la actividad específica para las cepas 3 y 14.....	53
Fig. 17. Efecto de la oxigenación sobre la productividad volumétrica de las cepas 3 y 14.....	54
Fig. 18. Efecto del tipo de matraces sobre la producción de naringinasa por la cepa 14.....	55

Fig. 19.	Efecto en la esterilización de naringina sobre la producción de naringinasa y crecimiento para la cepa 3.....	58
Fig. 20.	Efecto en la esterilización de naringina sobre la producción de naringinasa y crecimiento para la cepa 14.....	59
Fig. 21.	Seguimiento de la degradación de la naringina durante la fermentación de la cepa 14.....	65
Fig. 22.	Efecto de la concentración de naringina sobre la producción de naringinasa y crecimiento para la cepa 14.....	67
Fig. 23.	Efecto de la concentración de naringina sobre la producción específica de naringinasa para la cepa 14.....	68
Fig. 24.	Producción de actividad de naringinasa y crecimiento de la cepa 14, cultivada en el medio 8 (control), medio sin sólidos de cocimiento de maíz y medio sin extracto de levadura.....	70
Fig. 25.	Producción de naringinasa en presencia de diferentes materiales complejos.....	72
Fig. 26.	Efecto del pH sobre la actividad de la naringinasa producida por la cepa 14.....	74
Fig. 27.	Efecto de la temperatura sobre la actividad de la naringinasa producida por la cepa 14.....	76
Fig. 28.	Seguimiento de la hidrólisis de naringina pura con naringinasa producida por la cepa 14.....	77
Fig. 29.	Hidrólisis de la naringina presente en un jugo de toronja reconstituido con naringinasa producida por la cepa 14.....	78
Fig. 30.	Hidrólisis de la naringina presente en un jugo de toronja reconstituido con una naringinasa comercial producida por <i>Penicillium decumbens</i>	80

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Condiciones para la óptima actividad de naringinasa.....	4
Cuadro 2. Composición química de jugos de toronja procesados procedentes de diferentes regiones.....	9
Cuadro 3. Contenido de vitaminas de un jugo procesado de toronja.....	10
Cuadro 4. Principales hongos productores de naringinasa....	17
Cuadro 5. Producción de naringinasa en fermentación semisólida.....	18
Cuadro 6. Producción de naringinasa en fermentación sumergida.....	20
Cuadro 7. Cepas de hongos naringinolíticos empleados en este estudio.....	35
Cuadro 8. Medios de cultivos probados para la producción de naringinasa.....	38
Cuadro 9. Actividad específica de las cepas naringinolíticas preseleccionadas.....	43
Cuadro 10. Variabilidad en la producción de naringinasa.....	61
Cuadro 11. Análisis de varianza de la variabilidad en la producción de naringinasa.....	63

I. RESUMEN

La naringinasa es un sistema enzimático capaz de hidrolizar la naringina, un flavonoide presente en la toronja causante del sabor amargo característico. Este sabor amargo que en ocasiones llega a ser desagradable, es una de las razones por las que diversos productos procesados de toronja no ha tenido gran aceptación entre los consumidores. A pesar de su amplio potencial de aplicación en la industrias procesadoras de cítricos, la enzima sólo se produce comercialmente en algunos países; además de que muy pocos estudios referentes a su producción fermentativa han sido reportados en la literatura.

Con el interés de contribuir al conocimiento en este campo, el presente trabajo tuvo como objetivo estudiar los principales factores que afectan la producción de naringinasa en fermentación sumergida en un medio con ingredientes grado industrial, en el cual se cultivó una cepa productora de la actividad enzimática.

Para llevar a cabo el estudio, se aislaron hongos con capacidad naringinolítica en un medio conteniendo solamente naringina y fosfato de amonio. Como resultado se obtuvieron 11 cepas diferentes, a las cuales se agregaron tres cepas de colección. Todas las cepas fueron cultivadas en un medio conteniendo sólidos de cocimiento de maíz, extracto de levadura, naringina, fosfato de potasio y carbonato de calcio, para seleccionar las que produjeran la más alta actividad volumétrica. Como resultado de estos experimentos se seleccionaron las cepas 2, 3, 10 y 14 que produjeron 744, 821, 714 y 888 U/ml, respectivamente. Uno de los factores que fueron estudiados y que resultó ser importante para la fermentación, fue la oxigenación, la cual a nivel de matraces está determinada por la velocidad de agitación y la fracción de llenado de los matraces. La actividad más alta obtenida con la cepa 14 de 4077 U/ml se obtuvo con 200 rpm y una fracción de llenado de 0.1.

En relación al efecto de los ingredientes del medio, se observó que la naringina actúa como inductor en la producción de la enzima y su concentración más adecuada está entre 0.25 y 0.5%. Los sólidos de cocimiento de maíz soportan el crecimiento del hongo y contribuyen muy poco a la producción de la enzima.

Cuando se adicionaron diversas fuentes complejas al medio, se encontró que la harina de soya desgrasada al combinarla con extracto de levadura produce un 28% más de actividad que el medio control.

Al estudiar las características cinéticas para la enzima obtenida de la cepa 14, *Aspergillus niger* NRRL 2270, se encontró que la actividad óptima se obtuvo a un pH entre 3.9 y 4.3, y un intervalo de temperatura entre 45 y 55°C. La velocidad de reacción fue de 293 U/ml·minuto.

II. INTRODUCCION

A. Características e importancia de la naringinasa

La naringinasa es un conjunto enzimático constituido por dos actividades: una α -L-ramnosidasa (EC 3.2.1.40) y una β -D-glucosidasa (EC 3.2.1.21) cuya acción es capaz de degradar naringina (4'5,7-trihidroxi-flavanona-7-ramnoglucosa), que es el flavonoide responsable del sabor amargo de los productos procesados de la toronja (Roitner y col., 1984).

En la hidrólisis enzimática de la naringina, en primer término actúa la α -L-ramnosidasa para producir ramnosa y prunina, ésta última es convertida por la β -D-glucosidasa, a naringenina y glucosa como se muestra en la Figura 1. Además la naringinasa también puede hidrolizar flavonoides análogos como la poncirina y neohesperidina (Reyo y Saval, 1990).

La actividad de la naringinasa es afectada por el pH, la temperatura y la fuerza iónica. En el Cuadro 1 se muestran las condiciones en donde la naringinasa expresa su máxima capacidad catalítica. Como se puede apreciar, los valores de pH reportados son 3.7 y 5.0; siendo más deseable el primero ya que los jugos de toronja tienen un pH cercano a 3.5. En relación a la temperatura existe un intervalo más amplio que depende del microorganismo productor y las condiciones de cultivo utilizadas; no obstante, la temperatura de elección durante la hidrólisis comúnmente es entre 40 y 45°C.

Con respecto a la influencia de los factores sobre la actividad enzimática se disponen de muy pocos datos reportados en la literatura. Se dice que la β -glucosidasa se puede inactivar al someterla a 60°C y un pH entre 4 y 6.8 durante 30 minutos (Roitner y col., 1984).

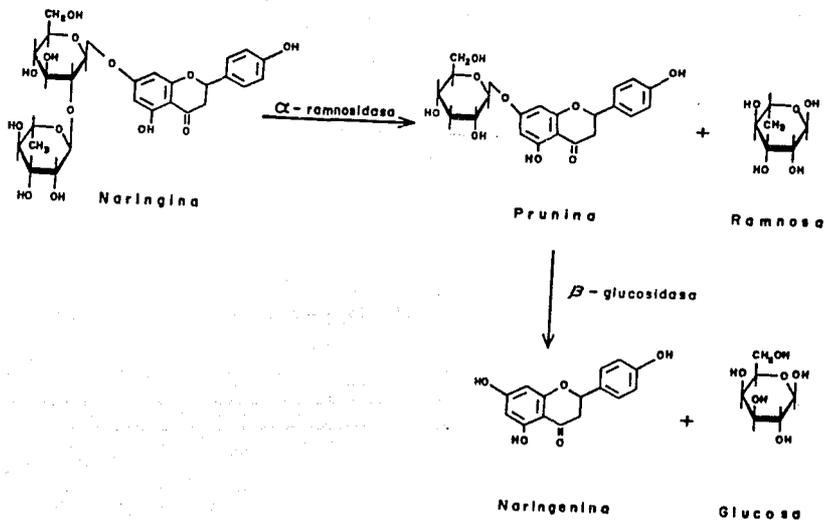


Fig. 1. Degradación enzimática de la naringina

CUADRO 1. CONDICIONES PARA LA OPTIMA ACTIVIDAD DE NARINGINASA

CEPA	pH	TEMPERATURA (°C)	REFERENCIA
<i>Aspergillus niger</i>	5.0	40-55	Park y Chang, 1979
<i>A. niger</i>	5.0	37	Roitner y col., 1984
<i>Penicillium sp.</i>	3.7	55	Tsen y col., 1989

Varios azúcares reducen la actividad de la naringinasa, por ejemplo, Tsen y Tsai (1980) reportan que glucosa, fructosa y ramnosa son inhibidores competitivos de la α -ramnosidasa de *Penicillium* sp. y actúan como inhibidores no-competitivos con la enzima de *A. niger*. Por otro lado Roitner y colaboradores (1984) establecen que la ramnosa inhibe la acción de ramnosidasa, mientras que glucosa, galactosa, maltosa y manosa inhiben a la β -glucosidasa.

Ono (1980) encontró que el ácido cítrico tiene un efecto inhibitorio sobre la naringinasa, de tal forma que al eliminarlo del jugo de toronja la hidrólisis ocurre en forma más rápida.

Utilizando una preparación comercial de naringinasa se separaron las actividades de α -L-ramnosidasa y β -D-glucosidasa por técnicas de electrocromatografía y electroforesis, las cuales se probaron de manera individual para determinar su especificidad (Dunlap y col., 1962; Okada y col., 1964; Okada y col., 1965; Roitner y col. 1984). Los resultados de estos estudios indicaron que la fracción ramnosidasa presenta baja actividad de β -glucosidasa, ya que solamente presentó actividad sobre los flavonona-glucósidos, como la prunina, pero no hidrolizó el enlace glicon-ramnoglucósido de la naringina. Estos resultados indicaron que es necesaria la acción secuenciada de las dos actividades enzimáticas para la hidrólisis completa de la naringina (Griffits y Lime, 1959; Neubeck, 1975).

No obstante, estudios recientes sobre la caracterización de la naringinasa de *A. niger* sugieren que se trata de una sola proteína con dos sitios activos, en uno de ellos esta la α -L-ramnosidasa y en el otro, la β -D-glucosidasa. La proteína tiene un peso molecular de 96,000 Daltons, su forma oligomérica y la proporción de sus actividades depende de varios factores entre ellos pH, temperatura y fuerza iónica (Roitner y col., 1984).

B. Fundamentación del tema

Los productos procesados de toronja (*Citrus paradisi*) como son jugos, néctares y concentrados, han tenido poca aceptación en el mercado por poseer un sabor amargo característico, a pesar de que contienen una gran cantidad de nutrientes que son necesarios para una buena alimentación.

El sabor amargo se adquiere durante el procesamiento del fruto a nivel industrial, cuando es sometido a grandes presiones para la extracción del jugo, lo que ocasiona que la naringina que se encuentra en el albedo pase a formar parte al jugo. De aquí la importancia de tener una enzima que sea capaz de reducir la cantidad de naringina, convirtiéndola a productos que no impartan sabor amargo al jugo como son: ramnosa, glucosa, prunina y naringenina de tal forma que no afecte su calidad nutricional y sí mejoren sus propiedades organolépticas. Se sabe que la prunina es dos terceras partes menos amarga que la naringina y la naringenina es insípida (Revo y Saval, 1990).

C. Características de la toronja y sus propiedades nutricionales

La toronja (*Citrus paradisi*) es el más grande de los cítricos comerciales y se reconoce fácilmente por su color amarillo brillante y su sabor amargo-ácido característico. Se dice que la toronja es una mutación de *Citrus dacumana* y se le dió ese nombre por crecer en racimos como las uvas. Generalmente, es más susceptible a la descomposición por efecto de bajas temperaturas en comparación con la naranja, pero considerablemente más resistente que las limas y limones (Tressler y Joslyn, 1971). Las partes principales de la toronja se presentan en la Figura 2.

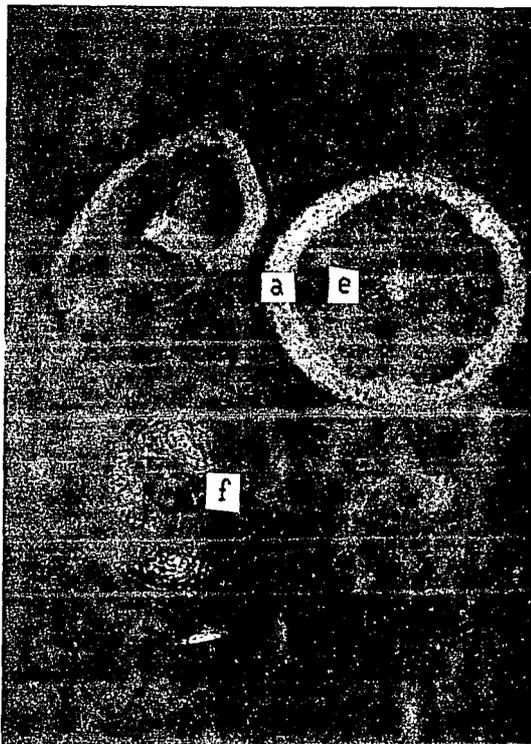


Fig. 2. Principales partes de la toronja (*Citrus paradisi*). (f) flavedo o piel exterior, contiene los cromoplastos y sacos de aceite; (a) albedo o piel interior, tejido blanco esponjoso cuya función es suministrar al fruto agua y otros nutrientes ; (e) endocarpio o pulpa, que es la porción comestible.

El árbol de la toronja mide de 6 a 8 metros de altura y produce de 550 a 1200 kilogramos de fruta al año. Sus hojas son de color verde oscuro, las flores son blancas y su aroma y apariencia son similares a las del árbol de naranja (Tressler y Joslyn, 1971).

Existen diversas variedades de toronja como son: Duncan, Foster, blanca de Marsh, rosa de Marsh y rojo rubí (Tressler y Joslyn, 1971).

El jugo contiene una gran cantidad de nutrientes y su composición depende de la variedad de toronja, el lugar y la época en que se cultive. En los Cuadros 2 y 3 se presenta la composición química de jugos procesados (Tressler y Joslyn, 1971).

Las proteínas del jugo de toronja están constituidas por aminoácidos esenciales como fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptofano y valina. Contiene además arginina e histidina que son esenciales sólo durante el crecimiento y otros que no lo son como ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína y serina (Lehninger, 1981; Tressler y Joslyn, 1971).

A pesar de las grandes propiedades nutricionales de los jugos de toronja, ya que contienen los diez aminoácidos esenciales para nuestra dieta, éstos han tenido poca aceptación por su sabor amargo, el cual se debe a la presencia de flavonoides, principalmente a la naringina.

D. Importancia de la naringina en el procesamiento de la toronja

La naringina es uno de los principales componentes amargos presentes en jugos de toronja y de naranja *natsudaidae* (Braddock y Cadwallader, 1992; Tsen y Yu, 1991). La naringina es

**CUADRO 2. COMPOSICION QUIMICA DE JUGOS DE TORONJA PROCESADOS
PROCEDENTES DE DIFERENTES REGIONES**

NUTRIENTE*	TORONJA PROCEDENTE DE:			
	FLORIDA	CALIFORNIA	ARIZONA	TEXAS
Agua	90.10	89.30	89.90	88.90
Proteina	---	0.40	---	0.60
Grasa	---	0.10	---	0.10
Cenizas**	0.40	0.40	---	0.40
Azúcares reductores	6.65	7.03	6.69	7.90
Acido cítrico	1.49	1.77	1.61	1.25

*Las cantidades se dan en porcentos y promedios.

**Las cenizas estan constituidas por: K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ , Fe^{++} , Al^{3+} , Cu^+ , Mn^+ , I^- y P^{5+} .

Fuente: Tressler y Joslyn, 1971.

CUADRO 3. CONTENIDO DE VITAMINAS DE UN JUGO PROCESADO DE TORONJA

VITAMINA	CANTIDAD EN mg/100 ml
Vitamina A	Trazas
Caroteno	Trazas
Clorhidrato de tiamina (B ₁)	0.036
Riboflavina (B ₂)	0.028
Piridoxina (B ₆)	0.030
d-Pantotenato de calcio	0.570
Acido p-aminobenzóico	0.0037
Acido ascórbico (C)	39.6000
Biotina (H)	0.0013
Vitamina D	Trazas
Clorhidrato de colina	Trazas

Fuente: Tressler y Joslyn, 1971.

insoluble en agua, por lo que cuando esta presente en altas concentraciones, puede provocar alteraciones al jugo durante su procesamiento o almacenamiento. Cuando éste se calienta para ser pasteurizado la naringina se disuelve, al enfriarse cristaliza y como consecuencia precipita; lo cual trae consigo problemas en la manipulación del jugo (Neubeck, 1975).

La naringina fué descubierta en 1857 por De Vry en las flores del árbol de toronja crecido en Java. Posteriormente se detectó su presencia en la fruta, en las semillas y en el albedo, incluyendo las membranas que dividen los gajos de fruto (Thomas y col., 1958).

La naringina se encuentra presente en el fruto y se acumula en el jugo durante el proceso de extracción al que es sometido; se dice que el fruto verde, contiene una mayor concentración de naringina, la cual disminuye cuando el fruto madura (Berhow y col., 1991; Berhow y Vandercook, 1991).

Poco se sabe de la ruta biosintética de la naringina; sin embargo, se sabe que tiene lugar en las hojas y en frutas verdes durante la fase de la división celular activa. Sus principales precursores son el acetato y la fenilalanina, teniendo como intermediario a la naringenin-6-malonato [naringenin-7-(2"-O- α -L-ramnosil) β -D-glucósido-6"-malonato], cuya estructura fue establecida mediante resonancia magnética nuclear (Figura 3). Una vez formado este compuesto transportado a otras partes de la planta, como es el tallo y la raíz (Berhow y col., 1991; Berhow y Vandercook, 1991).

Otro compuesto que contribuye al sabor amargo de los jugos de toronja es la limonina un terpenoide dilactónico. Las frutas intactas naturalmente no contiene limonina, pero sí el anillo A lactónico del ácido limonónico, un precursor no amargo que se convierte gradualmente en limonina, después de la extracción del

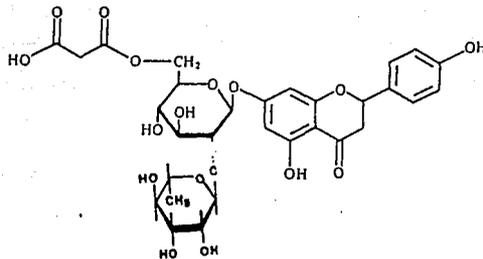


Fig. 3. Intermediario de la ruta biosintética de naringina aislada de las hojas y frutas verdes de la toronja (Berhow y col. 1991).

jugo, razón por la que el sabor amargo que imparte comunmente se denomina "amargo tardío" (Mancell y col., 1983; Roumbouts y Pilnik, 1978).

Si bien es cierto que el sabor amargo del jugo de toronja es apreciado por algunos consumidores, también es la principal razón por la cual su consumo no es generalizado. Aunque un bajo nivel de naringina es deseable para identificar su sabor característico, el problema se presenta cuando el nivel de concentración esta por arriba de 700 ppm (mg/l) (Olson y col., 1979).

Por lo general se acepta que la calidad de las toronjas varía de una estación a otra; sin embargo, con el fin de normalizar la calidad del jugo, el Departamento de Citricos del Estado de Florida en los Estados Unidos de Norteamérica, estableció una regulación para evitar que los niveles de naringina y limonina causen un sabor tan excesivamente amargo, que hagan inaceptable el jugo al paladar. La regulación sólo aplica del 1o. agosto al 1o. de diciembre de cada año, por lo que afecta a un pequeño porcentaje del total de fruta cosechada anualmente. La regulación establece que un jugo como producto enlatado deberá reunir uno de los siguientes requisitos: 1) contener menos de 600 ppm de naringina medida por el método de Davis, o bien 2) contener menos de 5 ppm de limonina medida por las técnicas de cromatografía de líquidos de alta resolución (Barmore y col., 1986; Fellers, 1989; Johnson y Chandler, 1982; McIntosh y col., 1987; Shawn y col., 1984; Wagner y col., 1988).

E. Técnicas empleadas para eliminar el sabor amargo de los jugos de toronja

Un gran número de técnicas han sido propuestas para reducir el sabor amargo en el jugo de toronja las cuales se mencionan a continuación:

- hidrólisis ácida de la naringina en el jugo.
- lavado de toronja con agua caliente previo a la extracción.
- adsorción de la naringina con resinas sintéticas.
- hidrólisis enzimática de la naringina.

De las técnicas mencionadas, la hidrólisis enzimática de la naringina es la más atractiva, ya que requiere poco equipo de uso común y un mínimo de operaciones, utilizando condiciones de proceso suaves. Adicionalmente, la especificidad de la enzima sobre la naringina permite obtener un jugo con propiedades organolépticas, funcionales y nutricionales aceptables. En México no existen recomendaciones oficiales que aseguren la calidad organoléptica de un producto de toronja en base a la concentración de naringina presente (Reyo y Saval, 1990).

La reducción de naringina en jugos de cítricos usando naringinasa inmovilizada proveniente de *Aspergillus niger* o de *Penicillium* sp. ha sido propuesta por diversos autores (Olson y col. 1979; Tsen, 1988; Tsen y col. 1989). Varios métodos han sido probados para llevar a cabo la inmovilización de la naringinasa, pero aquellos que atrapan la enzima en fibras de celulosa, parecen ser los más adecuados para el tratamiento de los jugos (Tsen y Yu, 1991; Braddock y Cadwallader, 1992).

Una de las técnicas más recientes y atractivas que se ha propuesto es la hidrólisis de la naringina y atrapamiento de la limonina simultáneamente. La técnica consiste en inmovilizar naringinasa en fibras de triacetato de celulosa lo cual permite

hidrolizar el flavonoide, al mismo tiempo, la limonina queda adsorbida en las fibras del polímero. Con esta metodología se comprobó que la actividad de la enzima y la consistencia de las fibras de triacetato de celulosa fueron estables hasta por 20 días. Las propiedades organolépticas y funcionales del jugo obtenido no se alteraron, lo que hace al procedimiento bastante atractivo para aplicarse industrialmente si se toma en cuenta el ahorro en el costo de la producción y purificación de la naringinasa (Tsen y Yu, 1991; Braddock y Cadwallader, 1992).

Otra de las técnicas probadas para la eliminación del sabor amargo de los jugos de cítricos toronja, es el uso de resinas sintéticas: se ha empleado intercambio iónico para retener la naringina y la hesperidina. Sin embargo, estas técnicas son poco atractivas debido a la alteración de las características organolépticas del jugo resultante (Braddock y Cadwallader, 1992).

F. Fuentes de obtención de naringinasa

Thomas y colaboradores (1958), mencionan que Hall en 1930 aisló una enzima a partir de semillas de cereal, la cual hidrolizó a la naringina *in vitro* a pH 7 y 37°C, dando como productos de reacción naringenina y un disacárido. También encontró esta actividad enzimática en hojas del árbol de *Citrus dacumana* y en pequeñas concentraciones en el flavedo y en el albedo de la toronja. Kishi (1955) fué el primero en obtener una naringinasa de origen microbiano proveniente de *Aspergillus niger*, aislado de naranjas ácidas.

Aparentemente la producción de la actividad de naringinasa se presenta de manera simultánea a la de pectinasas, por lo que se han realizado estudios con el fin de obtener preparaciones

conteniendo solamente la actividad naringinolítica. Para esto se han seguido dos caminos, uno de ellos es eliminar de manera selectiva la actividad de pectinasas, ya sea incubando la preparación en presencia de urea a 37°C y pH 8 durante dos horas o separando los dos tipos de actividades por solubilidad diferencial en alcohol (Reyo y Saval, 1990).

El otro camino ha sido obtener microorganismos que produzcan baja actividad pectinolítica y alta actividad naringinolítica. Los principales microorganismos productores de naringinasa se presentan en el Cuadro 4. En ésta se puede apreciar que son exclusivamente hongos filamentosos, entre los que destaca el género *Aspergillus*.

G. Métodos de cultivo para la producción de naringinasa

Como en todo proceso fermentativo, las características de la naringinasa varían de acuerdo al método de cultivo, la formulación del medio, las condiciones de operación y el microorganismo.

La información encontrada sobre la metodología para la producción de la naringinasa es escasa y poco disponible. Al respecto pueden citarse dos técnicas tradicionales, la fermentación sumergida y la semisólida.

1. **Fermentación semisólida.** En éste tipo de fermentación, el crecimiento del microorganismo se lleva a cabo sobre materiales sólidos sin la presencia de agua libre (Cannel y Moo-Young, 1980). Como puede apreciar en el Cuadro 5, esta técnica ha sido la más utilizada para la producción de naringinasa. Aunque dichos reportes son muy generales, se puede obtener alguna información: por ejemplo, en ella se observa que los productos de soya son los más utilizados y no en todos los estudios se ha incluido a la

CUADRO 4. PRINCIPALES HONGOS PRODUCTORES DE NARINGINASA

CEPA	REFERENCIAS
<i>Aspergillus niger</i>	Bram y Solomons, 1965; Kishi, 1955, 1958, 1960; Sankyo Co. Ltd., 1965; y Smythe y col., 1960
<i>A. usamii</i> var <i>shirousamii</i>	Sankyo Co. Ltd., 1965
<i>A.saitoi</i> var <i>kagoshimaensis</i>	Meiji Confectionary Co. Ltd., 1964
<i>A. oryzae</i>	Meiji Confectionary Co. Ltd., 1964
<i>Cochiobolus miyabeanus</i>	Ito y Takiguchi, 1970
<i>Sclerotinia libertiana</i>	Sankyo Co. Ltd., 1965
<i>Rhizotocnia solanii</i>	Ito y Takiguchi, 1970
<i>Phomopsis citri</i>	Ito y Takiguchi, 1970
<i>Penicillium H-3</i>	Amano Pharmaceutical Co. Ltd., 1984

CUADRO 5. PRODUCCION DE NARINGINASA EN FERMENTACION SEMISOLIDA

CEPA	INGREDIENTES PRINCIPALES	REFERENCIA
<i>Aspergillus niger</i>	salvado de arroz pasta de soya	Kishi, 1955
<i>A. niger</i>	salvado de arroz pasta de soya naringina ramnosa	Kishi, 1958
<i>A. niger</i>	harina de soya	Kishi, 1959
<i>A. niger</i>	pasta de cebada pasta de haba cascara de naranja	Kishi, 1960
<i>A.saitoi</i> var <i>kago-shimaensis</i>	harina de soya desgrasada salvado de trigo casacrilla de arroz	Meiji Confectionary Co. Ltd., 1964
<i>A. usamii shirousamii</i> <i>Coniella diplodiella</i> <i>Sclerotinia libertiana</i> <i>A. niger</i> <i>A. oryzae</i>	harina de soya	Sankyo Co. Ltd., 1965
<i>A. saitoi</i> var <i>kago-shimaensis</i>	harina de soya salvado de trigo	Meiji Confectionary Co. Ltd., 1966
<i>Cochiobolus miyabeanus</i> <i>Rhizotocnia solani</i> <i>Phomopsis citri</i>	harina de soya	Ito y Takiguchi, 1970

naringina en el medio de cultivo. Este método de fermentación tiene la desventaja de ser menos reproducible debido a que los parámetros que afectan la producción de la enzima son más difíciles de controlar, tal

es el caso de la oxigenación, el pH y la temperatura.

2. **Fermentación sumergida.** En éste tipo de fermentación, el crecimiento del microorganismo se lleva a cabo en medios líquidos en donde los sustratos están disueltos o dispersos. Esta técnica ha sido menos empleada que la fermentación semisólida. Como puede apreciarse en el Cuadro 6, se utilizan compuestos complejos lo que asegura la presencia de elementos esenciales para el crecimiento. Otra característica de los medios es la adición de naringina, aparentemente requerida como inductor para la síntesis de la actividad. Al respecto, se puede mencionar que algunos ingredientes de origen vegetal como las harinas de soya y maíz contienen saponinas, glucósidos que inducen la síntesis de la naringinasa debido a que su estructura química es similar a la naringina en el tipo de unión de los azúcares (Kishi, 1959).

H. Factores que afectan la producción de naringinasa.

En cultivo sumergido se ha encontrado que los factores que afectan la producción de naringinasa son principalmente: los ingredientes del medio, el pH, la presencia de naringina, la velocidad de agitación y la temperatura de incubación (Bram y Solomons, 1965).

Como en todo proceso fermentativo, la naturaleza de los ingredientes del medio es factor determinante para la producción de la naringinasa. Por ejemplo, Bram y Solomons (1965) encontraron que al utilizar harina de maíz entero, glucosa, sacarosa, lactosa o citrato, no se produjo actividad la enzima

CUADRO 6. PRODUCCION DE NARINGINASA EN FERMENTACION SUMERGIDA

CEPA	INGREDIENTES PRINCIPALES	REFERENCIA
<i>Aspergillus niger</i>	salvado de trigo harina de soya residuos de levadura Naringina	Smythe y col., 1960
<i>A. niger</i>	sólidos de cocimiento de maíz extracto de levadura harina de soya naringina	Bram y Solomons, 1965
<i>A. saitoi</i> var <i>kagoshimaensis</i>	sólidos de cocimiento de maíz harina de soya salvado de trigo	Meiji Confectionary Co. Ltd., 1966

aunque la naringina estuviera presente. Sin embargo, cuando en el medio se adicionó extracto de levadura y/o los sólidos de cocimiento de maíz y naringina sí se produjo la naringinasa.

El pH inicial en el que se llevan a cabo en la mayoría de las fermentaciones está entre 4.0 y 6.5, a valores de pH fuera de este intervalo la producción de la naringinasa disminuye, debido al bajo crecimiento de los hongos (Bram y Solomons, 1965).

La temperatura de incubación se reporta entre 25 y 30°C, si se utilizan temperaturas mayores la producción de la naringinasa se ve reducida debido a que el crecimiento de los hongos disminuye para muchos géneros (Bram y Solomons, 1965; Smythe y col. 1960).

La velocidad de agitación también tiene influencia sobre la producción de la naringinasa debido a que en su totalidad se emplean hongos filamentosos, los cuales son muy sensibles a cambios en su morfología, por efecto de altas velocidades de agitación. Bram y Solomons (1965), usaron fermentadores de 14 litros y encontraron que al incrementar la velocidad de agitación de 500 a 900 rpm la producción de la enzima disminuyó.

III. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Determinar los factores que afectan la producción de naringinasa en cultivo sumergido a nivel de matraces.

B. Objetivos específicos

1. Seleccionar un medio de cultivo líquido para la producción de naringinasa.
2. Seleccionar la cepa que produzca la más alta actividad naringinólítica.
3. Evaluar el efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de naringinasa.
4. Evaluar el efecto de diversas fuentes de carbono y de nitrógeno sobre la producción de la actividad.

IV. ESTRATEGIA

Para cumplir con los objetivos planteados se estableció la estrategia que se muestra en la Figura 4 en forma de diagrama. En principio se aislaron cepas de hongos con capacidad de hidrolizar naringina, las cuales se trabajaron simultáneamente con cepas de colección.

Con una de las cepas de colección se probaron 3 formulaciones de medios para elegir la que permitiera más facilidad de manipulación y que favoreciera la producción de naringinasa.

Las cepas se cultivaron simultáneamente para mantener constantes las condiciones de trabajo y seleccionar la o las cepas que produjeran las más altas actividades volumétricas.

Posteriormente se realizaron experimentos para evaluar el efecto de las variables: tipo de matraces, fracción de llenado de los mismos, la velocidad de agitación y el efecto de los ingredientes del medio sobre la producción de la naringinasa.

Antes de utilizar la naringinasa producida en este estudio para tratar jugos de toronja, se determinaron las condiciones óptimas de pH y temperatura para la actividad.

Los criterios de evaluación que se establecieron durante el estudio fueron:

- Actividad volumétrica de naringinasa (U/ml de caldo)
- actividad específica (U/mg de proteína)
- Productividad volumétrica (U/ml de caldo*hora)
- Producción específica (U/mg de células)
- Productividad específica (U/mg de células*hora)
- Crecimiento celular (mg de células/ml de caldo)

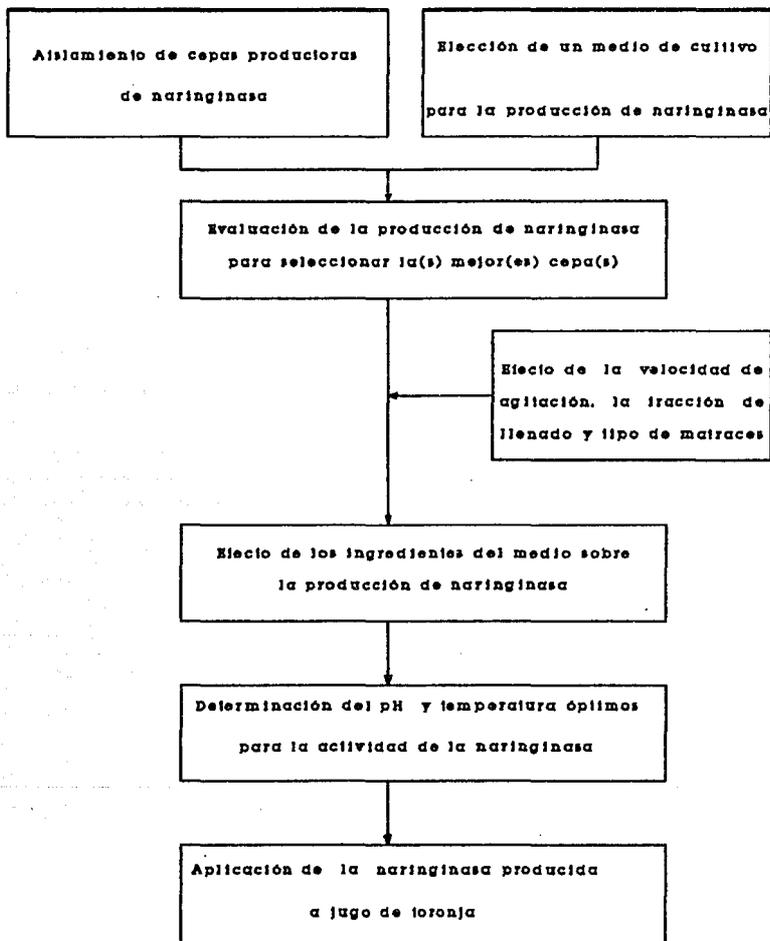


Fig. 4. Estrategia seguida para llevar a cabo el presente estudio.

IV. MATERIAL Y METODOS

A. Reactivos

1. **Reactivos grado analítico.** Naringinasa, naringina, naringenina, o-aminodifenilo y albúmina sérica bovina se obtuvieron de Sigma Chemical Co.

Reactivo de fenol, Folin-Ciocalteu se adquirió de Sigma de México, S. A.

Acido cítrico, ácido acético glacial, acetato de amonio, dextrosa, tartrato de sodio y potasio, sulfato de cobre pentahidratado, cloruro de sodio, acetato de sodio, cloroformo y fosfato de sodio dibásico, de J. T. Baker de México, S. A.

Extracto de levadura, peptona y extracto de carne de Difco Laboratories de Estados Unidos de Norteamérica.

Acetato de etilo, hidróxido de sodio, carbonato de sodio anhidro, agar de papa-dextrosa y Czapek-Dox de Merck de México S.A.

Etilenglicol de Droguería Cosmopolita, S. A. de C. V.

Placas de sílica G-25 UV₂₅₄ de Macherey-Nagel, Alemania.

2. **Reactivos Industriales.** Fosfato monobásico de potasio, fosfato monobásico de amonio y carbonato de calcio grado alimenticio, se obtuvieron de la Droguería Cosmopolita S. A. de C. V.

Nutriferin (sólidos de cocimiento de maíz) fue obsequiado por Arancia Comercial, S. A. de C. V.

Harina de soya desgrasada, harina de soya integral, pasta de soya y salvado de trigo, fueron adquiridos en tiendas naturistas.

Antiespumante Mazu DF-7940 fue obsequiado por Mazer de México, S. A.

B. Microorganismos

Se utilizaron hongos aislados de diferentes fuentes y algunas cepas de colección como: *Aspergillus niger* ATCC 20107, *Conyothinium diplodiella* ATCC 12684 y *A. niger* NRRL 2270.

C. Medios de cultivo

1. Medios de aislamiento

Medio 1. Contenia: albedo de toronja despectinizado seco y molido 4% y fosfato de amonio monobásico, 2%.

Medio 2. Contenia: naringina, 0.5%; fosfato monobásico de amonio, 0.2% y agar 1.5%.

2. Medios de propagación

Medio 3. Agar de papa y dextrosa (PDA)

Medio 4. Agar Czapeck-Dox.

Medio 5. Contenia: extracto de carne, 0.3%; peptona, 0.5%; dextrosa, 0.5% y cloruro de sodio, 0.8%.

Medio 6. Contenia: extracto de carne, 0.3%; peptona, 0.5%; dextrosa, 0.5% y agar, 1.5%.

3. Medios de producción

Medio 7. Contenia: sólidos de cocimiento de maíz, 4%; extracto de levadura, 4%; naringina, 0.5%; fosfato de potasio antiespumante, 0.025% (Bram y Solomons, 1965).

Medio 8. Contenia: salvado de trigo, 2.5%; harina de soya desgrasada, 1.5%; levadura de cerveza, 0.25%; fosfato de amonio monobásico, 1.25% y naringina, 0.125% (Smythe y col., 1960).

Medio 9. Contenia: salvado de trigo, 2.5%; sólidos de cocimiento de maíz, 4%; harina de soya desgrasada, 1.5%; naringina, 0.25% y fosfato de amonio monobásico, 0.20% (Meiji Confectionary Co., Ltd., 1966).

Todos los medios fueron esterilizados durante 15 minutos a 121°C.

D. Métodos

1. Aislamiento de microorganismos naringinoliticos. Se obtuvieron muestras de suelo las cuales se resuspendieron en agua, se dejaron sedimentar y con el sobrenadante se inocularon matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml del medio 1. Se incubaron a 29°C y 160 rpm durante 2 días. Se hicieron resiembras sucesivas en el mismo medio 1 estéril, hasta asegurarse de obtener sólo microorganismos capaces de crecer en albedo de toronja despectinizado como único sustrato. Las cepas obtenidas fueron purificadas por diluciones y resiembras sucesivas en las placas con los medios 2 y 3 para tener colonias aisladas. El mismo procedimiento se realizó para la purificación de las cepas que crecieron el albedo de toronja mantenido a la interperie.

2. Preparación del inóculo. Las cepas se propagaron durante 5 días a 29°C en tubos con medio 3. Posteriormente se preparó una suspensión de esporas en agua de la llave estéril hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 leída a 540 nm en un colorímetro (Spectronic 20, Baush & Lomb). 1 ml de esta suspensión sirvió para inocular 100 ml de medio de cultivo.

3. Producción de naringinasa. Matraces Erlenmeyer de 250 ml con deflectores conteniendo 50 ml del medio fueron inoculados e incubados a 29°C en un agitador rotatorio (New Brunswick

Scientific. Co) a 160 rpm. Cada día se tomó el contenido de un matraz y se filtró a través de papel filtro de poro abierto. con los sólidos se determinó el crecimiento celular y en el caldo libre de células se determinaron actividad naringinolitica, pH y proteína extracelular.

4. **Determinación del crecimiento celular.** El precipitado obtenido se resuspendió en 25 ml de agua y se le añadieron 5 ml de una solución de ácido clorhídrico 1 M; se agitó durante 5 minutos para disolver el carbonato de calcio remanente y se filtró utilizando el mismo papel filtro. Los sólidos obtenidos se secaron en una estufa a 55°C (Felisa Mod. FE) durante 24-48 horas para determinar el peso seco micelial.

5. **Determinación de la actividad naringinolitica.** Se preparó una solución de naringina a una concentración de 800 $\mu\text{g/ml}$ en amortiguador de acetato de amonio-ácido acético glacial 0.5 M, pH 4.0. A 2.8 ml de esta solución se le añadieron 0.2 ml del caldo libre de células. La mezcla de reacción se mantuvo en un baño a 40°C durante 30 minutos. La actividad se determinó cuantificando la naringina residual por el método de Davis (1947). Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que hidroliza una μmol de naringina en 30 minutos bajo las condiciones establecidas.

a. **Preparación de la solución estándar de naringina.** Se adicionaron 50 mg de naringina en 40 ml de amortiguador de acetatos 0.5M, pH 4.0. La mezcla se calentó a 60°C hasta que se disolvió completamente. La solución se llevó a temperatura ambiente y se aforó a 50 ml con el amortiguador de acetatos. La naringina se mantuvo soluble durante varias horas. De ésta

solución se tomaron alícuotas para determinar naringina y construir la curva de calibración.

b. **Método de Davis para la determinación de naringina.** A 10 ml de etilenglicol al 90% en agua (v/v) se le adicionaron 0.2 ml de la mezcla de reacción y se agitó vigorosamente. Enseguida se añadieron 0.2 ml de una solución de hidróxido de sodio 4 N y se agitó nuevamente. Se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos y se leyó la absorbancia a 420 nm en un colorímetro (Spectronic 20, Baush & Lomb). El color fué estable hasta por 12 horas. Se preparó un blanco usando 0.2 ml del amortiguador empleado. La cantidad de naringina se calculó a partir de la curva de calibración que se presenta en la **Figura 5**.

6. **Determinación de proteína extracelular.** El caldo libre de células se dializó en membranas de celulosa (Spectrapor, Spectrum Medical Industries, Inc., USA) contra agua destilada, manteniendo la agitación constante a 4°C durante 48 horas, con dos cambios de agua. Las muestras se centrifugaron a 5,000 rpm durante 5 minutos y se determinó la proteína en el sobrenadante utilizando el método de Lowry (Lowry y col., 1951; Lowry, 1957). La concentración de proteína se determinó a partir de una curva de calibración obtenida con albúmina sérica bovina (**Figura 6**)

7. **Aplicación de naringinasa a jugos de toronja.** A 2.8 ml de jugo de toronja reconstituido (Zano Alimentos, S. A.), se le adicionaron 0.2 ml de caldo libre de células. La mezcla de reacción se colocó en un baño de temperatura constante a 45°C, se tomaron muestras a los 0, 30, 60 y 120 minutos, para el seguimiento de la hidrólisis.

La naringina residual contenidas en las muestras de jugo tratadas fue extraída con acetato de etilo, la fase acuosa se desechó y la fase orgánica se centrifugó a 3,000 rpm durante 5

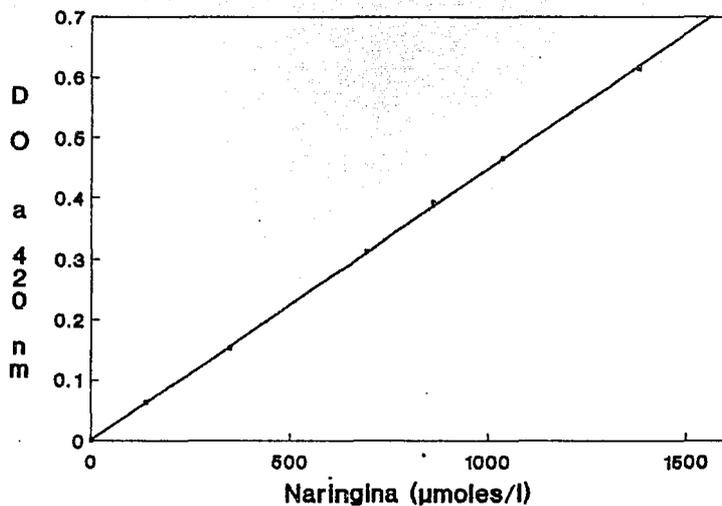


Fig. 5. Curva de calibración para la determinación de naringina utilizando el metodo de Davis (1947). Coeficiente de correlación $r = 0.99987$.

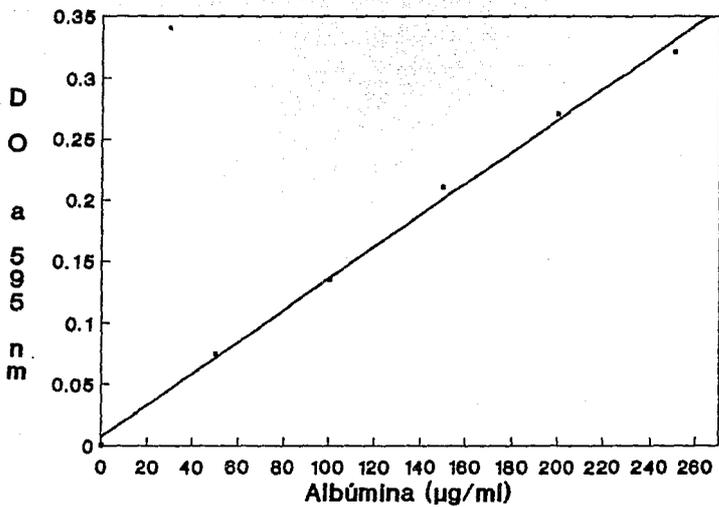


Fig. 6. Curva de calibración para la determinación de proteína utilizando el método de Lowry (1951). Coeficiente de correlación $r = 0.9982$.

minutos. El sobrenadante se evaporó a sequedad en un baño de agua hirviendo. El residuo se resuspendió en una cantidad conocida de acetato de etilo. Se tomaron alícuotas para aplicarlas en placas para cromatografía, las cuales se desarrollaron en una fase móvil conteniendo acetona-cloroformo-agua (80:20:4.8 v/v) a temperatura ambiente en un recipiente de vidrio previamente equilibrado. Este procedimiento permitió seguir la acción de la naringinasa durante el tiempo de hidrólisis.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

A. Aislamiento de las cepas productoras de naringinasa

Cuando se inició el trabajo se contaba solamente con dos cepas de colección, *Aspergillus niger* ATCC 20107 y *Convotthirium diplo-diella* ATCC 12684 pero no se tenían referencias que indicaran que estas cepas fueran especialmente productoras de naringinasa. Si bien algunos experimentos previos sugerían que estas dos cepas tenían la capacidad de hidrolizar naringina, la actividad producida era muy baja; fue entonces cuando se procedió a aislar hongos de otras fuentes como el suelo, ya que ahí es donde se puede encontrar un sinnúmero de microorganismos con capacidad de degradar materia orgánica de todo tipo, principalmente de origen vegetal. Se buscó también la posibilidad de tener muestras de suelo de toronjal, considerando ser una fuente más específica lo que podría aumentar las posibilidades de encontrar hongos naringinolíticos. Adicionalmente, se obtuvieron cáscaras de toronja las cuales fueron bien lavadas para eliminar la presencia de residuos del jugo y se colocaron a la interperie dejando la capa del albedo hacia arriba para que ahí se depositaran esporas de hongos y que sólo pudieran desarrollarse aquellos con capacidad de utilizar el albedo como sustrato.

Las muestras de suelo y el crecimiento obtenido en el albedo de las cáscaras se inocularon de manera independiente en matraces con medio 1 conteniendo albedo de toronja despectinizado como único sustrato y fosfato monobásico de amonio como fuente de nitrógeno y fosfatos. Se consideró conveniente someter el albedo a una despectinización previa con una preparación comercial de pectinasas para limitar el crecimiento de hongos pectinolíticos. El pH del medio se mantuvo a 4.5 para permitir solamente el

crecimiento de hongos, ya que no se tienen antecedentes de que bacterias o levaduras puedan producir este tipo de actividad. Adicionalmente un pH bajo permitiría aislar hongos productores de naringinasa con buena actividad a valores de pH ácidos, lo que podría asegurar su acción en jugos de toronja. Después de 5 resiembras sucesivas cada 48 horas, para asegurarse de haber enriquecido el cultivo sólo con hongos que utilizan el albedo como sustrato, se hicieron diluciones para inocular pequeñas alícuotas en placas con medios 3 y 4 con el fin observar sus características morfológicas y separar aquellas que mostraran diferencias. De este procedimiento se obtuvieron 11 cepas diferentes entre sí, que fueron numeradas de la 3 a la 13. El origen de cada una de las cepas se presenta en el Cuadro 7.

Posteriormente, las cepas aisladas y las dos de colección fueron sembradas en placas conteniendo el medio 2. Durante la preparación de las placas se tomó la precaución de no disolver la naringina, sólo resuspenderla. Esto permitió observar halos de desaparición de naringina alrededor de las colonias confirmando así que las cepas producían la actividad naringinolítica. Si bien esta prueba no pudo ser cuantitativa, sí fue muy ilustrativa, ya que a simple vista pudo observarse el halo de hidrólisis de la naringina. En la Figura 7 se presentan fotografías tomadas para algunas de las cepas.

Tiempo después de haber realizado estos experimentos, se logró adquirir una cepa de colección productora de naringinasa, *Aspergillus niger* NRRL 2270 (Peterson, 1991), a la cual se le asignó el número 14. Esta cepa se sumó a la lista de de las anteriores (Cuadro 7), ya que en el laboratorio aún no se había trabajado con ella para conocer su comportamiento.

CUADRO 7. CEPAS DE HONGOS NARINGINOLITICOS EMPLEADOS EN ESTE ESTUDIO

NUMERO DE CEPA	ORIGEN
1	<i>Coniothyrium diplodiella</i> ATCC 12684
2	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 20107
3	aislada de suelo
4	aislada de suelo
5	aislada de suelo
6	aislada en albedo de toronja
7	aislada de suelo de toronjal
8	aislada en albedo de toronja
9	aislada en albedo de toronja
10	aislada de suelo de toronjal
11	aislada de suelo de toronjal
12	aislada de suelo de toronjal
13	aislada de suelo de toronjal
14	<i>Aspergillus niger</i> NRRL 2270

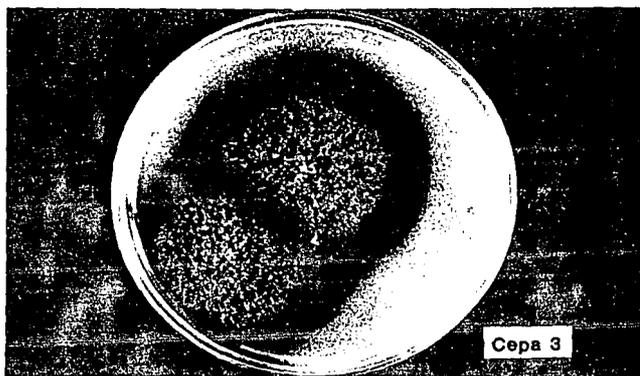


Fig. 7. Cepas productoras de naringinasa cultivadas en placas con medio 2 a 29 °C durante 4 días.

B. Selección del medio de cultivo

A pesar de que en las placas con medio 2 se pudieron observar claramente los halos de hidrólisis de la naringina, cuando se utilizó el mismo medio pero en forma líquida, los niveles de actividad naringinólítica obtenidos fueron apenas detectables, aunque sí se observó crecimiento en todas las cepas.

Dado que uno de los objetivos del presente estudio fue seleccionar un medio de fermentación que favoreciera la producción de naringinasa, la estrategia que se siguió fue probar tres formulaciones reportadas en la literatura (Tabla 8) cuyos ingredientes podían emplearse como reactivos industriales grado alimenticio de fabricación nacional. Los tres medios contenían materiales complejos como fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y elementos traza, sin faltar naringina y una fuente de fosfatos.

Para elegir el medio de cultivo se decidió utilizar la cepa 14, la cual sirvió como referencia, dado que en la literatura se reporta que es productora de naringinasa. La fermentación se mantuvo durante 90 horas a las condiciones descritas en el capítulo de Material y Métodos. Además de la cuantificación de la actividad naringinólítica, se tomó en cuenta la facilidad en la toma de las muestras y su manipulación, así como su posterior procesamiento.

El querer seleccionar un medio de cultivo para posteriormente seleccionar una cepa es un procedimiento muy discutido, pero es necesario aclarar que lo más importante en este trabajo fue primero tener un medio que aunque no fuera el ideal para alcanzar la más alta producción de actividad naringinólítica con cualquier cepa, sí fuera un buen punto de partida para realizar el estudio, ya que podría pensarse de antemano que los medios 7 y 9 darían

CUADRO 8. MEDIOS DE CULTIVO PROBADOS PARA LA PRODUCCION DE NARINGINASA

MEDIO NO.	INGREDIENTES	REFERENCIA	
7	salvado de trigo	2.5%	Smythe y col., 1960
	harina de soya	1.5%	
	naringina	0.12%	
	levadura de cerveza	0.25%	
	KH_2PO_4	1.25%	
8	agua de cocimiento de maiz	4.0%	Bram y Solomons, 1965
	naringina	0.5%	
	extracto de levadura	4.0%	
	$(NH_4)H_2PO_4$	0.2%	
	carbonato de calcio	0.5%	
9	agua de cocimiento de maiz	4.0%	Meiji Confectionary Co. Ltd., 1966
	harina de soya	1.5%	
	naringina	0.5%	
	$(NH_4)H_2PO_4$	0.2%	

problemas de manipulación, debido a la presencia de harina de soya.

Los resultados obtenidos de este experimento se presentan en la **Figura 8**. Como puede apreciarse, la mayor actividad volumétrica, de 952 U/ml, se obtuvo con el medio 8. Al utilizar el medio 7, se obtuvieron 688 U/ml, y con el 9 se alcanzaron 561 U/ml, esto corresponde al 72 y 59% de la actividad alcanzada con el medio 8, respectivamente. El pH final en los medios 7 y 9 fue de 3.0, que fue inferior con respecto al obtenido con el medio 8 cuyo valor fue de 4.0. Con los medios 7 y 9 se confirmó que se presentaron problemas al tomar las muestras y procesarlas, ya que el caldo presentó una alta viscosidad, lo que dificultó la separación de los sólidos. El caldo obtenido del medio 7 tuvo mucha turbiedad, lo que aumentaba la probabilidad de tener errores en determinaciones de tipo colorimétrico.

Tomando como base los resultados obtenidos, se decidió utilizar el medio 8 para seleccionar la cepa y llevar a cabo los estudios sobre la producción de naringinasa.

C. Selección de la cepa productora de naringinasa

Para seleccionar la cepa con la que se llevaba a cabo el estudio se decidió considerar, principalmente, la actividad volumétrica de la naringinasa como criterio para la toma de decisiones. Para esto, las cepas enlistadas en el **Cuadro 7** se cultivaron simultáneamente en el medio 8 durante 72 horas, después de las cuales se determinó la actividad volumétrica en el caldo de fermentación. Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 9**. Como puede observarse, las cepas 2, 3, 10 y 14 fueron las que produjeron las actividades volumétricas mayores.

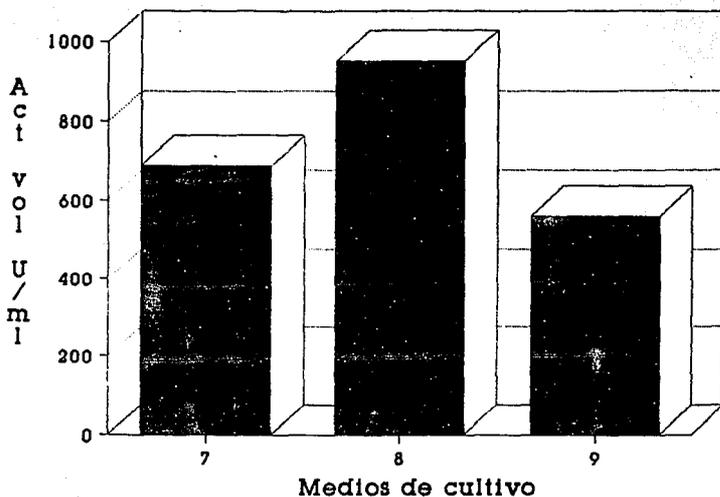


Fig. 8. Producción de naringinasa (U/ml) por la cepa 14 a las 98 horas de fermentación utilizando diferentes medios.

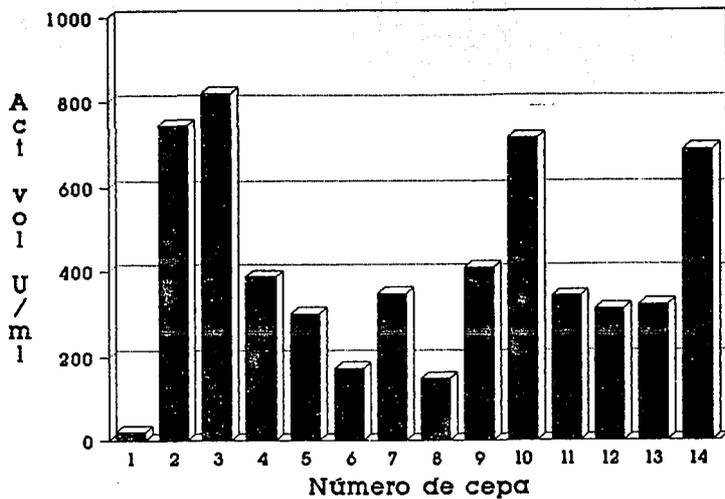


Fig. 9. Actividad volumétrica de naringinasa (U/ml) producida a las 72 horas de fermentación por varias cepas de hongos.

que fueron 744, 821, 714 y 688 U/ml; respectivamente, razón por la cual fueron preseleccionadas.

Cuando se determinó la actividad específica de estas 4 cepas (Cuadro 9), se observó que las cepas 2 y 3 dieron los valores más altos, esto podría sugerir que producen más naringinasa en relación con el resto de las proteínas excretadas al caldo.

Dado que no fue fácil decidir cual de las cuatro cepas era la mejor para realizar el estudio, nuevamente se cultivaron a las mismas condiciones, pero esta vez se siguió la cinética de fermentación con el fin de evaluar otros aspectos importantes, como son el tiempo de máxima producción de actividad, el perfil de la producción específica y la productividad.

Los resultados presentados en la Figura 10 muestran que la actividad de la naringinasa empieza a detectarse después de las 24 horas. El nivel de actividad producida por la cepa 14 a las 96 horas de fermentación fué más alto comparado con el resto de las demás, pero a las 120 horas las cuatro cepas alcanzaron títulos de actividad cercanos entre sí. En la misma Figura 10; se muestra la variación del pH durante la fermentación, como puede apreciarse al cultivarse las cepas 2, 3 y 10 el pH del medio se incrementa desde el inicio y aumenta a 8, a las 120 horas, mientras que para la cepa 14 el caldo se conserva ácido, tendiendo incluso a bajar de 6 a 4 después de las 48 horas. Esto es ventajoso, ya que podría evitar una posible contaminación por bacterias, además de asegurar una buena actividad a valores de pH ácidos.

En la Figura 11 se puede apreciar que el crecimiento alcanzado por las cuatro cepas fue muy parecido. Durante la fermentación fue posible observar que el micelio de la cepa 14 es

CUADRO 9. ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LAS CEPAS NARINGINOLITICAS PRESELECCIONADAS

CEPA NO.	ACTIVIDAD DE NARINGINASA U/ml	PROTEINA (mg/ml)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (U/mg DE PROTEINA)
2	744	1.73	428
3	821	1.60	511
10	714	2.62	272
14	688	2.27	303

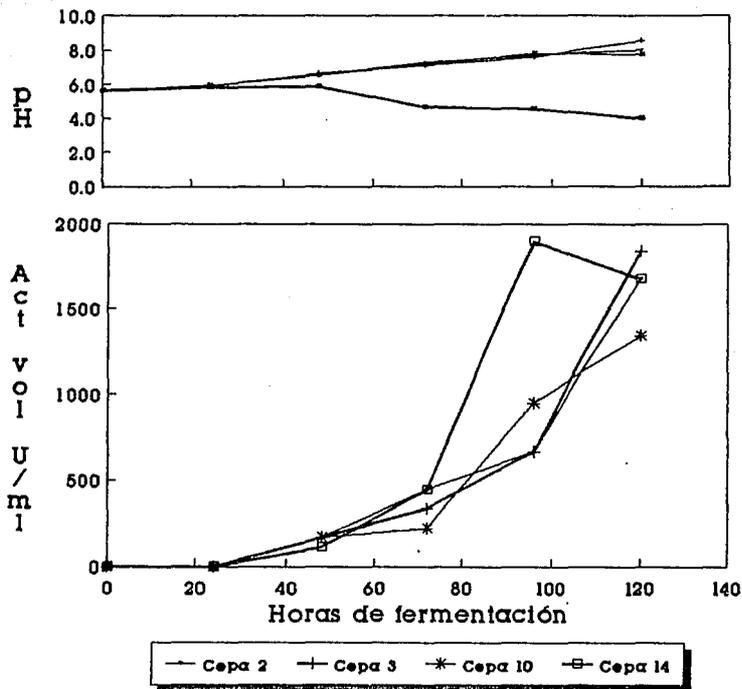


Fig. 10. Producción de naringinasa (U/ml) por las cepas 2, 3, 10 y 14 en el medio 8. En la parte superior se muestra la variación del pH durante la fermentación.

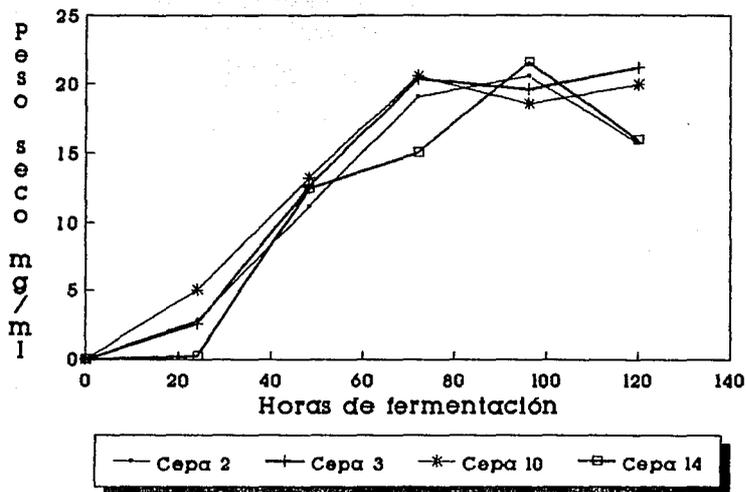


Fig. 11. Perfiles de crecimiento (mg/ml) de las cepas 2, 3, 10 y 14 en el medio 8.

fino y disperso, en cambio las cepas 2, 3 y 10 se presentaron micelio en forma de aglomerados ("pellets").

En la **Figura 12** se pueden apreciar los perfiles de producción específica que son semejantes a los encontrados en la actividad volumétrica, lo anterior está dentro de lo esperado, debido a que el crecimiento fue similar para las 4 cepas. Estos resultados sugieren que las células de la cepa 14 son más activas para la producción de la enzima de interés.

En la productividad volumétrica máxima (**Figura 13**) obtenida con las cepas 2, 3 y 10 fue de 71%, 78% y 58%, respectivamente, con respecto al valor alcanzado por la cepa 14 que resultó ser el más alto de 19.78 U/ml*hora. Estos resultados indican que la cepa 14 es más activa para la producción de naringinasa, ya que alcanza la máxima actividad en un menor tiempo con respecto a las otras cepas. Sin embargo, la cepa 3 produjo la más alta actividad volumétrica (**Figura 9**) y específica (**Cuadro 9**), por lo que podría ser otra buena alternativa para realizar el estudio.

De acuerdo con los resultados anteriores se seleccionaron las cepas 3 y 14. Esto no quiere decir que las demás cepas no puedan dar buenos rendimientos en otros medios de cultivo, sólo que, bajo las condiciones de trabajo establecidas las cepas 3 y 14 dieron los mejores resultados.

D. Efecto de la oxigenación sobre la producción de naringinasa

Para evaluar el efecto de oxigenación en matraces pueden combinarse dos variables que son: la relación entre el volumen del medio y el volumen del matraz (fracción de llenado) y la velocidad de agitación.

En los experimentos anteriores se trabajó en matraces Erlenmeyer de 250 ml con deflectores conteniendo 50 ml de medio

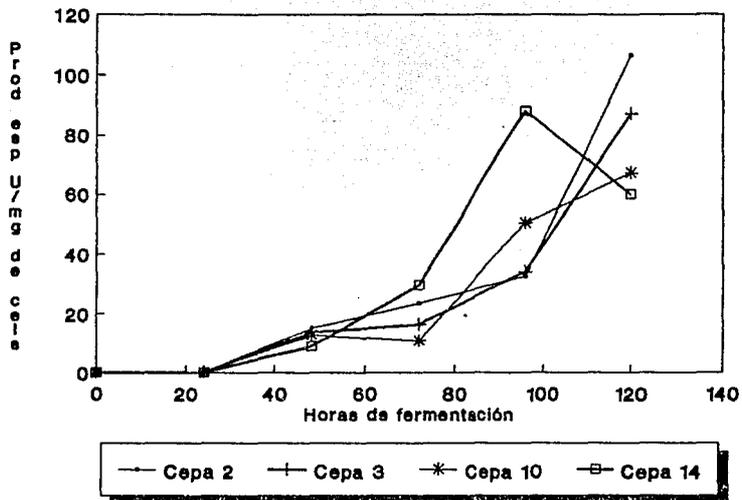


Fig. 12. Producción específica de naringinasa (U/ml) de las cepas 2, 3, 10 y 14 en el medio 8.

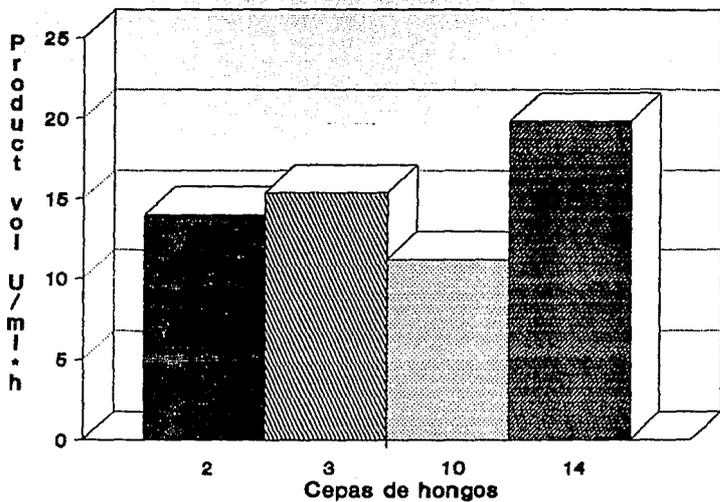


Fig. 13. Productividad volumétrica máxima (U/ml*hora) obtenidas en el medio 8 para las cepas preseleccionadas.

y una agitación de 160 rpm. Con esa fracción de llenado (0.2) no fué posible aumentar la velocidad de agitación a 200 rpm desde el inicio, debido a que los tapones se mojaban, lo que podía ocasionar contaminación además de no permitir una adecuada cuantificación. Para evaluar el efecto de este parámetro sobre la producción de naringinasa se tomaron dos acciones, la primera fué reducir la fracción de llenado a 0.1, depositando solamente 25 ml de medio, y la segunda fue mantener la velocidad de agitación a 160 rpm durante las primeras 24 horas y después incrementarla a 200 rpm, manteniendola así hasta el final de la fermentación. Esto último se hizo con la confianza de que al haber crecimiento ya no era tan grave el problema de proyecciones del líquido hacia los tapones.

En las Figuras 14 y 15 se presenta la producción de actividad y el crecimiento para la cepas 3 y 14, respectivamente. Como se observa, cuando se incrementa la velocidad de agitación de 160 a 200 rpm, la actividad volumétrica a las 96 horas de fermentación aumenta de 670 a 3295 U/ml, para la cepa 3 (Figura 14 A), lo que corresponde a un aumento de 492%. Para la cepa 14 (Figura 15 A), la actividad aumentó de 1899 a 3407 U/ml, esto es un aumento de 179%. De lo anterior se puede desprender que la oxigenación es un parámetro determinante para las dos cepas.

Con respecto al crecimiento (Figuras 14 B y 15 B) no se observó un efecto notable. Lo anterior sugiere que el oxígeno es un factor importante en la producción de la enzima, pero no en el crecimiento del hongo. Cabe resaltar que estos resultados están influenciados por un doble efecto, la disminución del volumen de medio y al incremento de la velocidad de agitación, factores que finalmente permiten una mejor transferencia de oxígeno (Freedman, 1969).

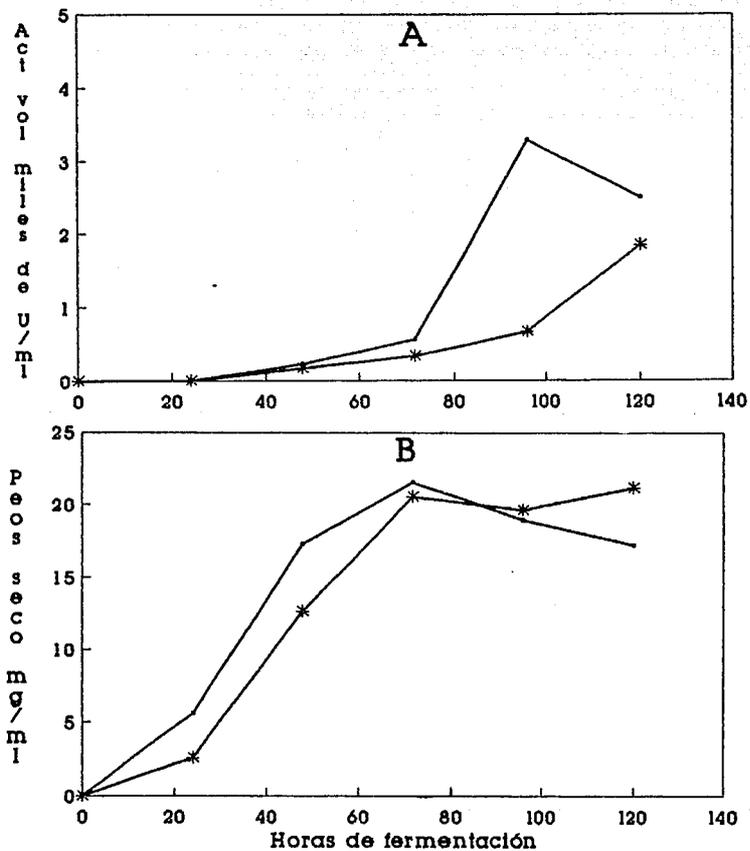


Fig. 14. Efecto de la oxigenación sobre la producción de naringinasa (A) y sobre el crecimiento (B) de la cepa 3. Condiciones:
 (*) 160 rpm y fracción de llenado 0.2
 (■) 200 rpm y fracción de llenado 0.1

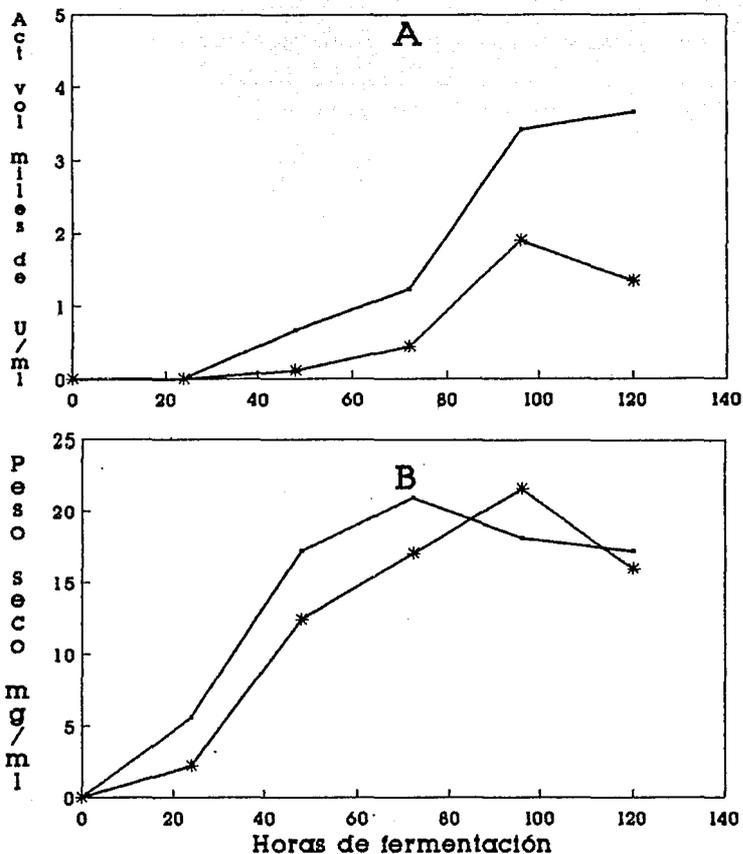


Fig. 15. Efecto de la oxigenación sobre la producción de naringinasa (A) y sobre el crecimiento (B) de la cepa 14.

Condiciones:

(*) 168 rpm y fracción de llenado 0.2

(●) 200 rpm y fracción de llenado 0.1

En la **Figura 16** se presenta la actividad específica producida por las cepas 3 y 14. Como se observa el efecto de la oxigenación es mayor sobre la cepa 14, posiblemente este parámetro estimula una mayor formación de naringinasa en relación a otras proteínas.

Con respecto a la productividad volumétrica alcanzada a las 96 horas (**Figura 17**), se observa un incremento de 124% y 79% para las cepas 3 y 14, respectivamente, como respuesta a la mejora en las condiciones de oxigenación. En este caso, también se observa que prácticamente no hay diferencia entre los valores alcanzados por ambas cepas.

Otro aspecto que tiene influencia sobre la transferencia de oxígeno en los cultivos es el tipo de matraces que se emplea. Freedman (1969) encontró que los matraces con deflectores permiten una mayor oxigenación de los cultivos debido a la turbulencia que se genera por la presencia de los deflectores, situación que no ocurre en los matraces Erlenmeyer lisos. Este aspecto, al igual que la fracción de llenado y la velocidad de agitación, tiene influencia directa sobre la transferencia de oxígeno. En los experimentos realizados hasta ahora se han venido empleando matraces con deflectores, con el objeto de proporcionar al hongo una buena oxigenación. No obstante, se consideró conveniente conocer el perfil de producción de actividad si la fermentación se llevara a cabo en matraces Erlenmeyer lisos, manteniendo constantes la velocidad de agitación y la fracción de llenado, a 200 rpm y 0.1, respectivamente. El experimento se llevó a cabo solamente con la cepa 14.

Los resultados obtenidos mostrados en la **Figura 18** indican que la actividad producida en matraces lisos corresponden a un 36% de la obtenida en los matraces con deflectores. En los matraces con deflectores durante toda la fermentación el micelio fue disperso y homogéneo, mientras que en los matraces lisos, el crecimiento

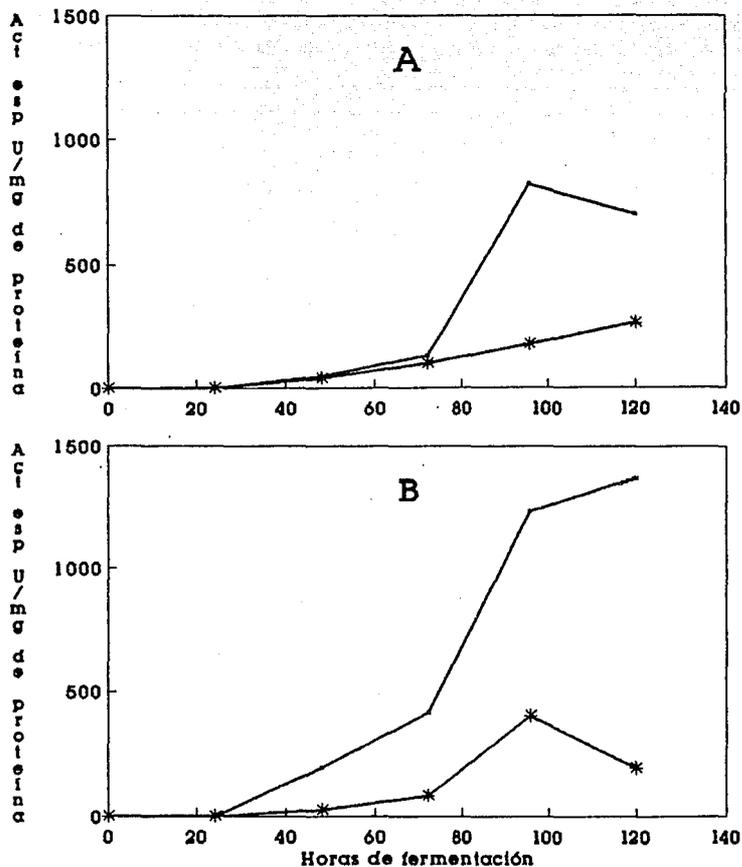


Fig. 16. Efecto de la oxigenación sobre la actividad específica de naringinasa (U/mg de proteína) de las cepas 3 (A) y 14 (B). Condiciones: (*) 160 rpm y fracción de llenado 0.2 (●) 200 rpm y fracción de llenado 0.1

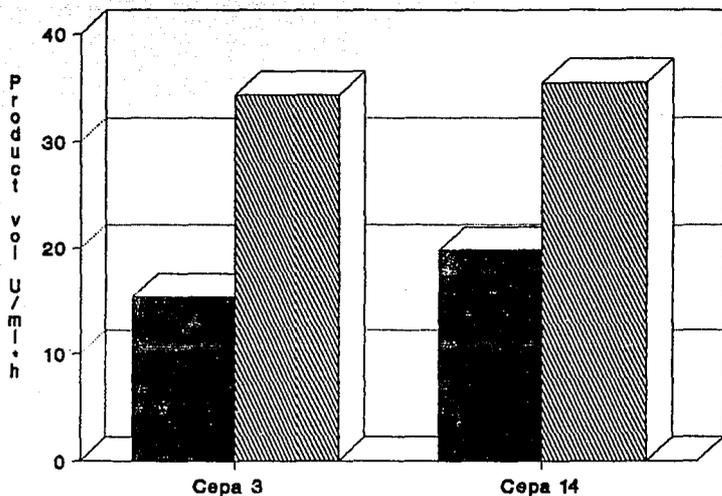


Fig. 17. Efecto de la oxigenación sobre la productividad volumétrica de naringinasa (U/ml*hora) de las cepas 3 y 14.

Condiciones:

■ 160 rpm y fracción de llenado de 0.2

▨ 200 rpm y fracción de llenado de 0.1

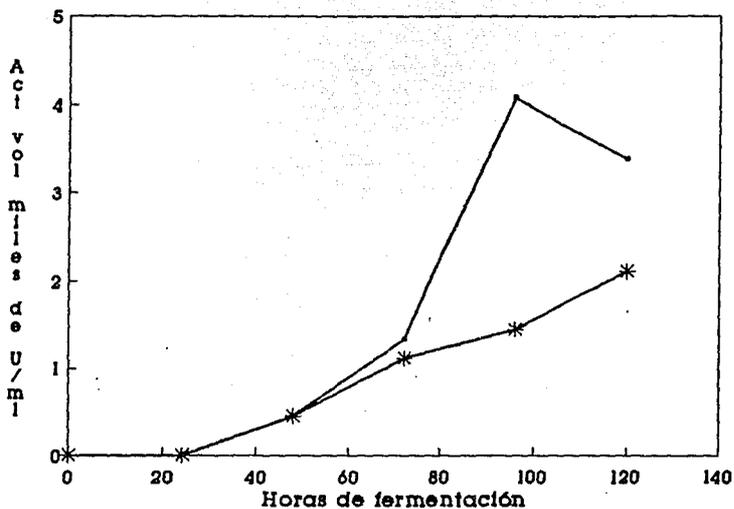


Fig. 18. Efecto del tipo de matraces sobre la producción de naringinasa (U/ml), utilizando matraces sin deflectores (*) y con deflectores (●).

del hongo se presentó en forma de "pellets", además de que en algunos casos se observó una gran acumulación del micelio formando costras en las paredes del matraz ocasionando con esto heterogeneidad en el cultivo. Lo anterior se debe a la diferencia en el tipo de movimiento del cultivo dentro del matraz, aún a la misma velocidad de agitación, que es consecuencia de la presencia de los deflectores.

Mitard y Riba (1987), han establecido que un mismo hongo puede desarrollar dos diferentes formas de crecimiento micelial: El filamentoso y en forma de "pellets", donde cada una presenta sus propias características respecto a su metabolismo. Así mismo, Cooney (1985) afirma que la forma de crecimiento tiene un efecto importante en las cinéticas de crecimiento y formación de productos.

Los resultados obtenidos demuestran que el oxígeno es un factor determinante para la producción de la naringinasa, por lo que se decidió continuar el estudio utilizando matraces con deflectores y establecer la velocidad de agitación en 200 rpm y la fracción de llenado en 0.1.

E. Producción de naringinasa utilizando naringina en solución acuosa estéril

La naringina por ser un glucósido, puede hidrolizarse a temperaturas mayores a 83°C (Merck, 1988), razón por la que durante la preparación del medio, ésta se agregaba en condiciones asepticas después de la esterilización de todos los ingredientes.

Dada la dificultad de realizar esta operación matraz por matraz, corriendo el riesgo de una posible contaminación, se decidió realizar un experimento en el que se añadiera naringina

al medio durante su preparación y esterilizarla junto con los demás ingredientes.

Para saber si la naringina sufría algún cambio por efecto del calentamiento se preparó una solución de naringina en agua, y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. Utilizando el método de Davis (1947), se cuantificó la naringina presente antes y después de la esterilización, adicionalmente se corrieron placas de cromatografía. Los resultados obtenidos en estas determinaciones indicaron que durante la esterilización, la naringina no sufrió cambios aparentes, por lo que se decidió esterilizar el medio de cultivo incluyendo todos los ingredientes. Para comprobar si la naringina puede ser utilizada por los microorganismos una vez sometida al calentamiento, se llevó a cabo un experimento en el que todos los ingredientes del medio fueron esterilizados y como control se corrió una fermentación en la que la naringina se adicionó en condiciones asépticas, después de la esterilización del resto de los ingredientes.

En las Figura 19 y 20 se presenta la actividad volumétrica y crecimiento de las cepas 3 y 14, respectivamente. La actividad producida a las 96 horas por la cepa 3 fue menor en el medio con la naringina esterilizada (Figura 19 A). Para la cepa 14 (Figura 20 A) parece no haber ningún efecto, incluso la actividad obtenida al usar naringina esterilizada es ligeramente mayor. Los perfiles de crecimiento para las dos cepas, en ambos tratamientos tuvieron un comportamiento similar (Figuras 19 B y 20 B).

Los resultados anteriores fueron determinantes para tomar la decisión de esterilizar todos los ingredientes del medio y así.

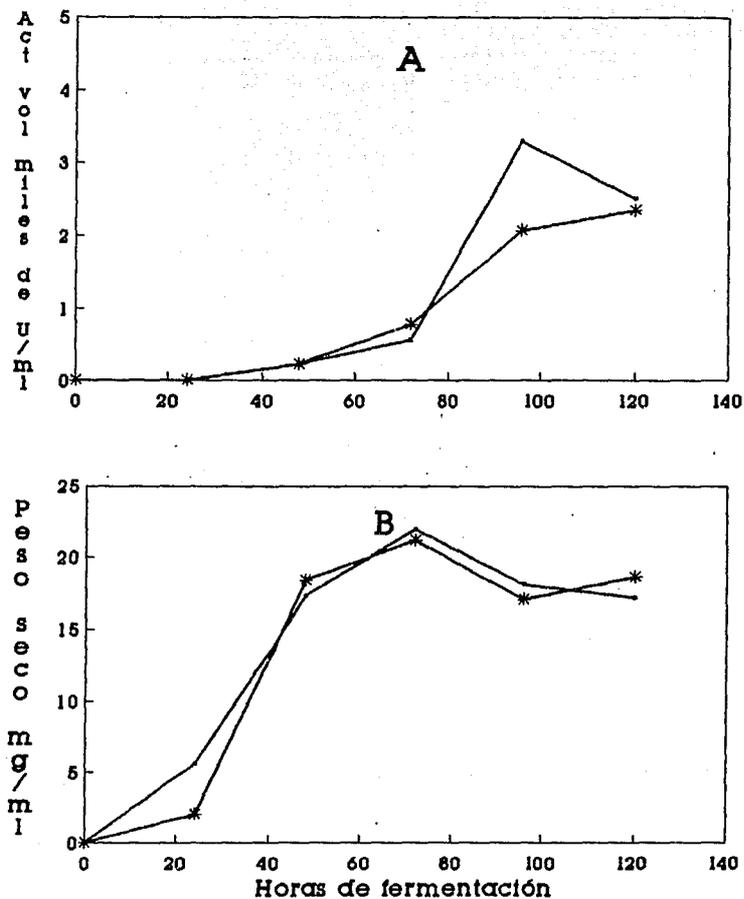


Fig. 19. Efecto de la esterilización de naringina sobre la producción de naringinasa (A) y el crecimiento (B) para la cepa 3. (*) naringina esterilizada (■) naringina no esterilizada

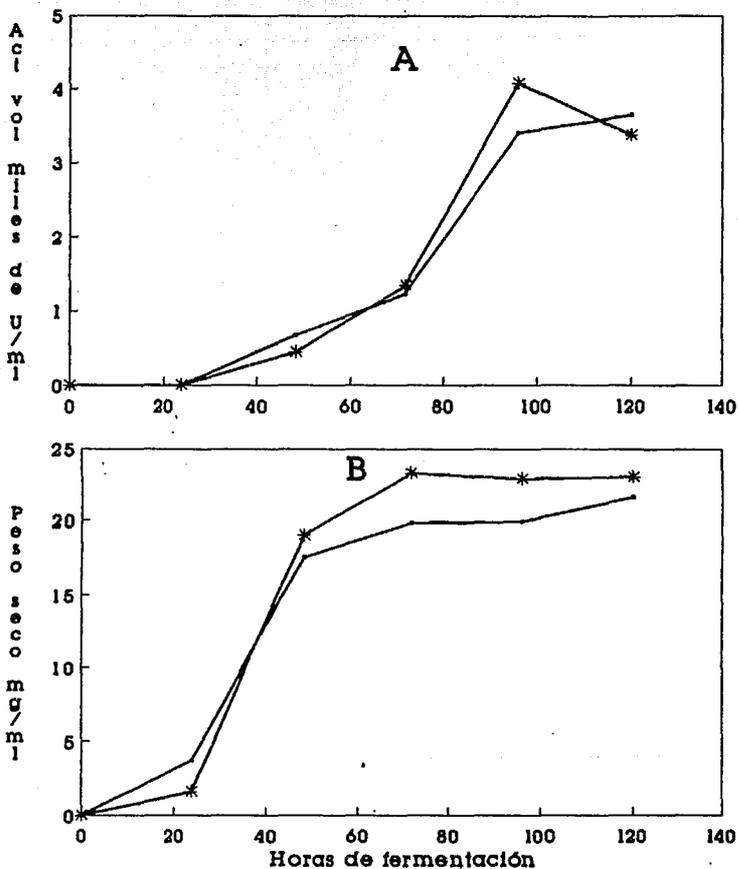


Fig. 20. Efecto de la esterilización de naringina sobre la producción de naringinasa (A) y crecimiento (B) para la cepa 14. (*) naringina esterilizada (●) naringina no esterilizada

evitar posibles contaminaciones y facilitar el trabajo. Aunado a esto se decidió continuar el estudio solamente con la cepa 14.

F. Variabilidad en la producción de naringinasa

Debido a que se están evaluando los principales factores que pueden afectar la producción de naringinasa, es necesario saber si las diferencias en las actividades obtenidas se deben al efecto de dichos factores sobre el proceso, o si se deben al error experimental asociado de manera natural al propio experimento. Para esto, se evaluó la variabilidad en la actividad naringinoltítica con la cepa 14 cultivada en el medio 8, a las condiciones previamente establecidas. Se revisaron dos aspectos: primero la variabilidad en el mismo experimento el cual dará la magnitud del error experimental y el segundo la variabilidad en experimentos realizados en fechas diferentes lo que permitiría conocer el intervalo dentro del cual varía la producción.

Para evaluar la variabilidad en un mismo experimento se utilizaron 5 matraces Erlenmeyer de 250 ml con deflectores conteniendo 25 ml del medio preparado en un sólo lote. A todos los matraces se les dió el mismo tratamiento y fueron inoculados e incubados a las mismas condiciones. Se corrió un segundo experimento con las mismas características pero en una fecha posterior.

Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 10. Se encontró que el coeficiente de variabilidad en la producción de la naringinasa es 3.64% para el primer experimento y 3.72% para el segundo, valores que son bastante aceptables más por tratarse de un sistema biológico.

CUADRO 10. VARIABILIDAD EN LA PRODUCCION DE NARINGINASA

EXPERIMENTO	NARINGINASA (U/ml)	PROMEDIO (U/ml)	DESVIACION ESTANDAR	COEFICIENTE DE VARIABILIDAD (%)
1	4105 3854 3792 4105 4021	3975.4	144.95	3.65
2	3854 3742 4021 4105 4021	3948.6	147.12	3.72

Para analizar la variabilidad entre un experimento y otro con los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza utilizando la prueba de LSD a un nivel de confianza del 95%. Los resultados mostrados en el Cuadro 11 indican que la variabilidad en la actividad naringinólítica en diferentes experimentos es similar a la que se tiene en un mismo experimento por lo que no hay diferencia significativa. Aunque este resultado es bastante bueno, si es necesario recomendar que no se deben comparar actividades naringinólíticas obtenidas en diferentes experimentos, sino sacar conclusiones para cada uno en forma independiente en el que se hayan incluido repeticiones.

G. Degradación de naringina durante la fermentación

Los ingredientes del medio de cultivo juegan un papel importante en el metabolismo de un microorganismo, por lo que al iniciar una fermentación es necesario asegurarse que se están cubriendo los requerimientos nutricionales esenciales para que lleven a cabo el proceso que uno desea. Muchos microorganismos productores de enzimas necesitan además de los nutrientes un compuesto que sirva como inductor de la enzima de interés, sin el cual su síntesis no puede llevarse a cabo.

En el caso específico de la producción de naringinasa los resultados publicados hasta la fecha no dejan muy claro el papel de la naringina en el proceso fermentativo. Sin embargo, como pudo apreciarse en los Cuadros 5 y 6, esta forma parte del medio de cultivo.

Con el fin de conocer si el hongo utilizado en este estudio utiliza la naringina como fuente de carbono y energía o solamente como inductor de la actividad, se llevó a cabo un experimento en el cual la cepa 14 se cultivó en el medio 8. Durante las primeras

CUADRO 11. ANALISIS DE VARIANZA DE LA VARIABILIDAD EN LA PRODUCCION DE NARINGINASA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F _{CAL}	NIVEL DE SIGNIFICANCIA (P < 0.5)
Diferentes experimentos	1	1796	1796	0.084	0.7821
En un mismo experimento	8	170622	21328		
Total	9	172418			

60 horas se tomaron muestras para cuantificar la naringina residual mediante el método de Davis (1947).

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 21**, en donde se puede apreciar que la naringina es utilizada después de 20 horas de haberse iniciado el crecimiento del hongo. En el momento en que empieza a ser degradada, también empieza a detectarse la actividad naringinolítica en el caldo. Llama la atención la rapidez con la cual ocurre tal degradación, ya que la naringina se agota en un intervalo de aproximadamente 12 horas. El crecimiento, que se inició desde las primeras horas de cultivo incrementó paulatinamente hasta cerca de las 72 horas, pero no se observa un cambio en el perfil después de la desaparición de la naringina. Estos resultados sugieren que la naringina no soporta el crecimiento micelial, sino más bien sirve como inductor para la síntesis de la actividad y una vez que se desencadena el mecanismo de inducción, la síntesis y excreción de la actividad continúa aunque el crecimiento ya se haya detenido.

Bram y sólomons (1965), establecen que la naringina es necesaria para la síntesis de la enzima, pero también requiere la presencia de ingredientes tales como sólidos de cocimiento de maíz, extracto de levadura y harina de soya. Para saber si esto ocurre con la cepa 14 se planearon los experimentos que se presentan en los siguientes incisos.

H. Efecto de la concentración de naringina sobre la producción de naringinasa

Como se estableció anteriormente, la naringina parece jugar un papel inductor de la síntesis de naringinasa. Ahora es necesario determinar el efecto de la concentración sobre la producción de la enzima.

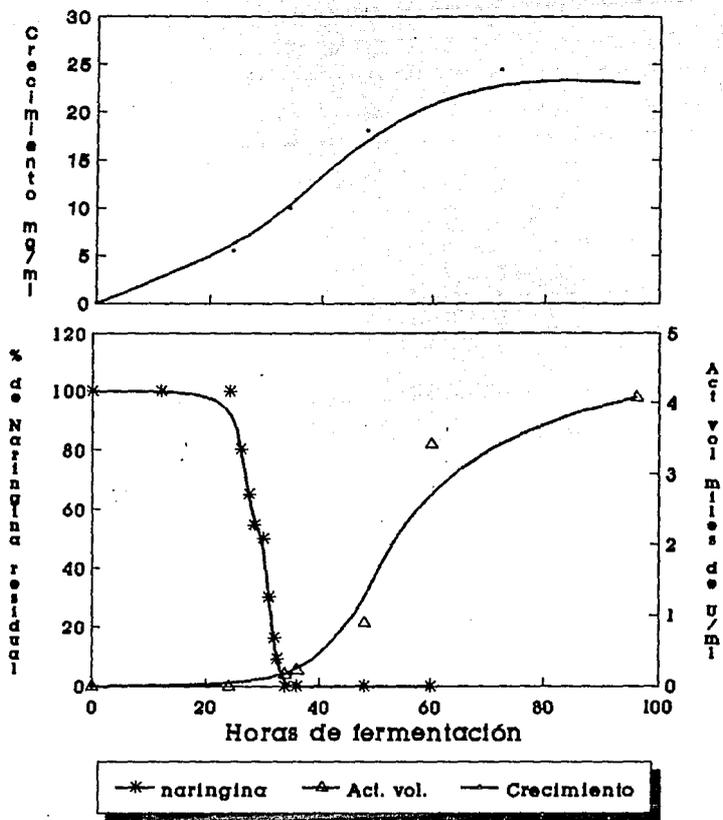


Fig. 21. Seguimiento de la degradación de la naringina durante la fermentación.

Con este fin se llevó a cabo un experimento utilizando el medio 8, pero con diferentes concentraciones de naringina (0.1, 0.25, 0.5, 0.85 y 2%); como control se utilizó el medio sin naringina. La fermentación se siguió durante 96 horas.

En la Figura 22 A se observa que la producción de actividad se incrementó conforme se aumentó la concentración de naringina. En el medio control la actividad obtenida fue de sólo 335 U/ml, al adicionar 0.1% de naringina la actividad aumentó 10 veces alcanzando una producción de 3407 U/ml. Cuando la naringinasa se incremento a 0.25% la actividad aumentó sólo un 18% con respecto a la obtenida con 0.1% de naringina. Como puede notarse, no hay un aumento proporcional entre la producción de actividad y la concentración de naringina, por lo que cuando se duplicó la concentración del inductor el incremento en la producción de actividad fue de apenas un bajo porcentaje.

En relación al crecimiento (Figura 22B), concentraciones de naringina entre 0 y 0.5% mostraron los mismos perfiles; pero concentraciones mayores provocaron un aumento en la síntesis de material celular. Estos resultados llaman la atención ya que no se esperaba que la naringina se utilizara como fuente de carbono y mucho menos que esta respuesta se presentara en las concentraciones de inductor mayores a 0.5%.

Al calcular la producción específica alcanzada a las 96 horas de fermentación en todas las concentraciones de naringina probadas, se obtuvieron los resultados presentados en la Figura 23. Se observa que la más alta producción específica de 190 U/ml*mg de células se alcanzó con una concentración de naringina de 0.85%; lo cual significa que en estas condiciones, las células son más eficientes para la producción de la actividad. Sin embargo, sería recomendable realizar más estudios para

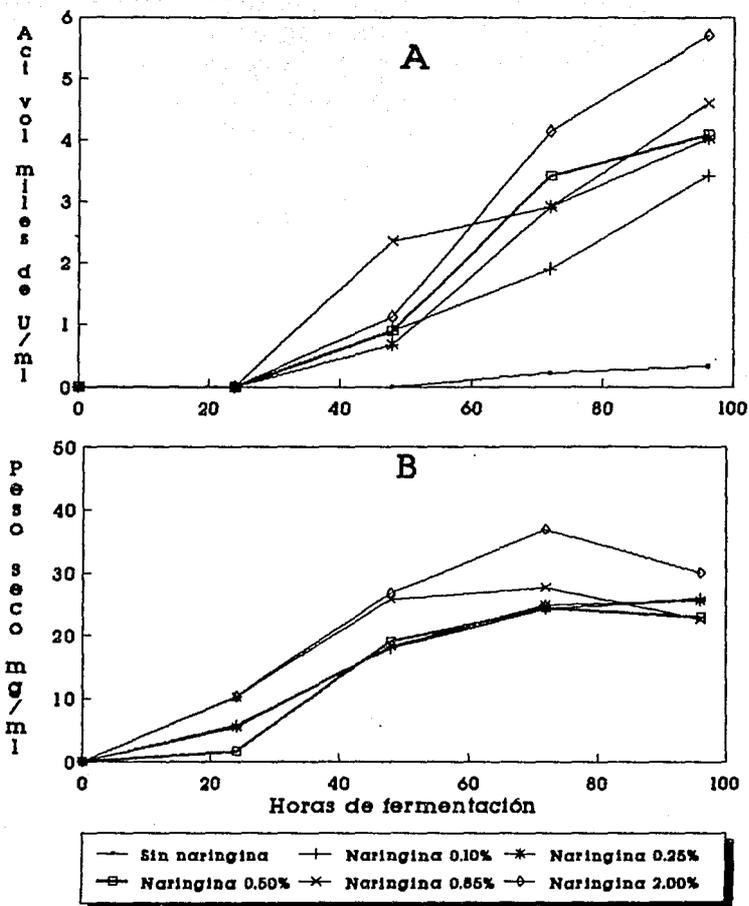


Fig. 22. Efecto de la concentración de naringina sobre la producción de naringinasa (A) y crecimiento (B) de la cepa 14. La fermentación se realizó a 200 rpm y 29 °C.

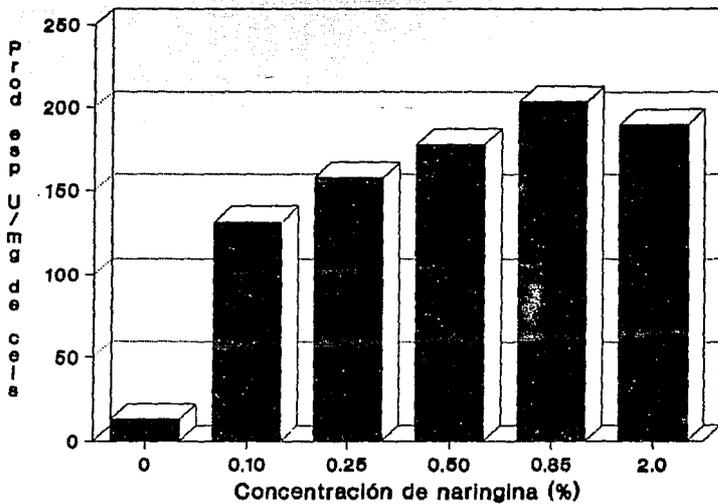


Fig. 23. Efecto de la concentración de naringina sobre la producción específica de naringinasa por la cepa 14 a las 96 horas de fermentación.

profundizar sobre el tipo de mecanismos que regulan la síntesis de la naringinasa.

I. Efecto de los sólidos de cocimiento de maíz y del extracto de levadura sobre la producción de naringinasa

Bram y sólomons (1965) aseguran que no sólo es necesaria la presencia de naringina en el medio, sino también la adición de compuestos complejos. El medio 8, que se ha venido utilizando contiene sólidos de cocimiento de maíz y extracto de levadura, por lo que se decidió evaluar el efecto de su presencia sobre la producción de naringinasa. Para ésto, se corrió un experimento utilizando el medio 8 como control, al cual se le eliminó uno de estos ingredientes cada vez, los sólidos de cocimiento de maíz o extracto de levadura, el resto de los ingredientes se mantuvo constante, la naringina se adicionó al 0.5%.

Los resultados obtenidos mostrados en la Figura 24 A indican que al eliminar el extracto de levadura la actividad producida a las 72 horas fue superior al nivel obtenido con el medio control; sin embargo, a las 96 horas sólo alcanza el 70% de lo obtenido en el medio con todos los ingredientes. La ausencia de sólidos de cocimiento de maíz afecta más drásticamente la producción de la enzima ya que además de haberse retrasado el inicio de su síntesis, la actividad alcanzada fue sólo un 32% con respecto al control.

Al analizar el efecto de estos ingredientes sobre el crecimiento (Figura 24B), se encontró que a las 96 horas de fermentación el medio al que se eliminó el extracto de levadura alcanzó sólo el 70% y el eliminado de sólidos de cocimiento de maíz un 44%, ambos con respecto al control. Los resultados sugieren que bajo estas condiciones los sólidos de cocimiento de

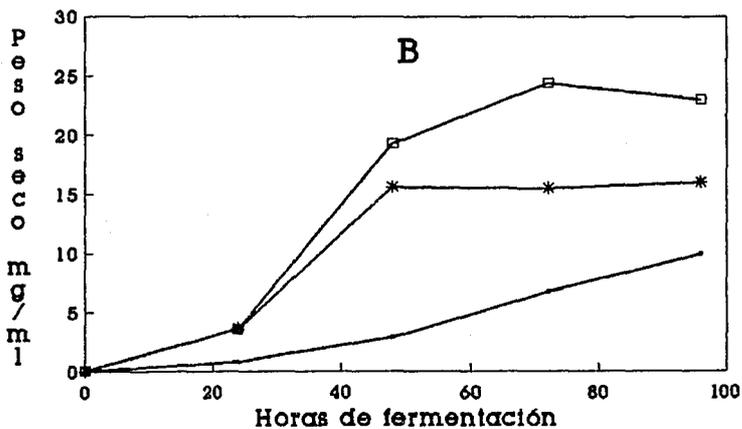
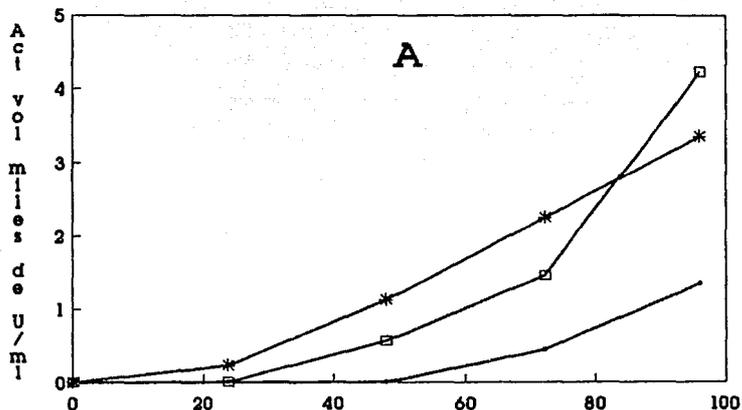


Fig. 24. Producción de actividad de naringinasa (A) y crecimiento (B) de la cepa 14 cultivada en el medio B (control) (□), medio sin sólidos de cocimiento de maíz (■) y medio sin extracto de levadura (×).

maíz son los que favorecen un mejor crecimiento y producción de la actividad. El extracto de levadura ejerce un menor efecto sobre la producción de la naringinasa y el crecimiento; tal vez los requerimientos de este material son menores a los que se están proporcionando.

Los resultados obtenidos están de acuerdo a lo establecido por Bram y sólmons (1965) en relación a la importancia de estos materiales complejos en el medio.

J. Empleo de productos de soya y salvado de trigo para la producción de naringinasa

En todo proceso fermentativo se busca que los ingredientes sean de bajo costo y de fácil adquisición. Tomando como base los reportes de la literatura (Cuadros 5 y 6) se eligieron diferentes materiales complejos para ser adicionados al medio en sustitución de los sólidos de cocimiento de maíz, extrato de levadura o ambos. Los materiales considerados fueron: harina de soya integral (HSI), harina de soya desgrasada (HSD), pasta de soya (PS) y salvado de trigo (ST), los cuales se adicionaron ya sea como única fuente compleja o en combinación con los sólidos de cocimiento de maíz o con el extracto de levadura. Como control se utilizó el medio 8.

Los resultados a las 72 horas de fermentación se presentan en la **Figura 25**, en donde se puede apreciar que las actividades más altas fueron las obtenidas con la mezcla de extracto de levadura y harina de soya desgrasada o pasta de soya con las que se obtuvo 28 y 16% más que la actividad alcanzada con el medio control, respectivamente. Sin embargo, en los medios conteniendo sólidos de cocimiento de maíz en combinación con harina de soya

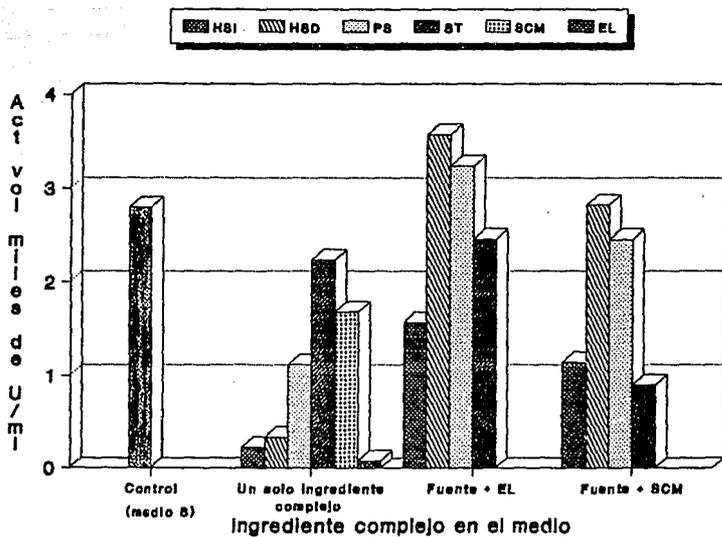


Fig. 25. Producción de naringinasa a las 72 horas de fermentación en presencia de materiales complejos: Harina de soya integral (HBI), harina de soya desgrasada (HSD), pasta de soya (PS) y salvado de trigo en combinación con extracto de levadura (EL) o con sólidos de cocimiento de maíz (SCM).

desgrasada se alcanzó la misma actividad obtenida con el medio B y al combinarlo con la pasta de soya sólo alcanzó un 88%.

De acuerdo a estos resultados se puede decir que la harina de soya desgrasada y la pasta de soya pueden sustituir a los sólidos de cocimiento de maíz, y en menor grado al extracto de levadura. Posiblemente este material contenga materiales esenciales provenientes de microorganismos, que no pueden ser proporcionados por otro ingrediente.

K. Estudios de la naringinasa producida por *Aspergillus niger*

Con el fin de conocer con detalle algunas de las características de la naringinasa producida por la cepa 14, *A. niger* NRRL 2270, se hicieron determinaciones para conocer el efecto del pH y de la temperatura sobre la actividad. Adicionalmente se siguió la cinética de hidrólisis de naringina pura y se probó la efectividad de la actividad en un jugo de toronja reconstituido.

1. Efecto del pH sobre la actividad. Se probaron valores de pH entre 2.5 y 6.5 para determinar el pH óptimo de actividad. Para ésto se utilizó una solución amortiguadora 0.2 M de ácido cítrico-fosfato de sodio dibásico. La actividad se midió a 45°C. En la Figura 26 se muestra que el pH óptimo es entre 3.9 a 4.3. Aparentemente la actividad es muy sensible a este parámetro, por ejemplo a pH 3.55 la actividad cayó en un 19% y a pH 3.12 en un 70%, en relación al nivel alcanzado en el intervalo óptimo. El pH óptimo reportado para una naringinasa comercial es entre 3.5 y 4.5 (Ting, 1958) intervalo muy similar al encontrado en este trabajo.

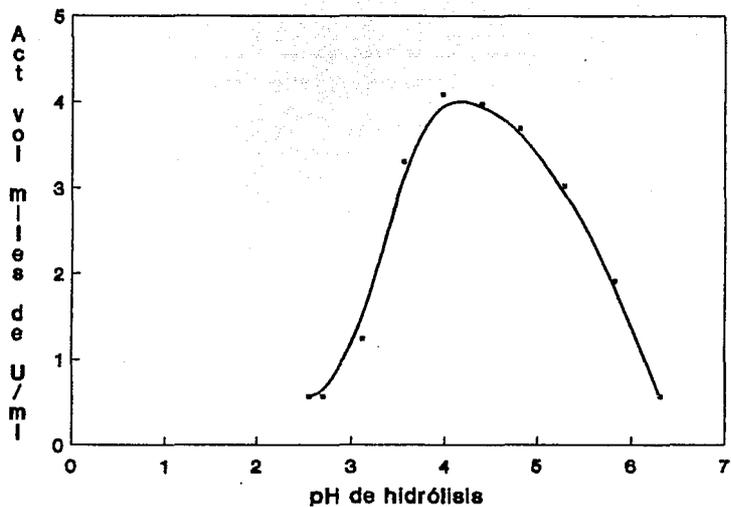


Fig. 26. Efecto del pH sobre la actividad de la naringinasa producida por la cepa 14. La reacción se llevo a cabo a 45 °C.

2. Efecto de la temperatura sobre la actividad. Se probaron temperaturas entre 30 y 70°C. En la Figura 27 se observa que la temperatura óptima fue entre 45 y 55°C. A 40°C se alcanzó sólo el 59% y a 30°C el 27%. A 70°C no se detectó actividad tal vez debido a la desnaturalización de la enzima.

El intervalo de temperatura óptima reportada para una naringinasa comercial (Ting, 1958) es entre 40 y 60°C, que es muy similar al obtenido para la actividad producida por la cepa 14.

3. Cinética de hidrólisis de naringina pura. A un pH de 4 y temperatura de 45°C se hizo el seguimiento de la hidrólisis de naringina pura, tomando muestras cada minuto durante los primeros 15 minutos para cuantificar la naringina residual. Como se observa en la Figura 28, hay un incremento prácticamente lineal entre 4 y 12 minutos. En este intervalo la velocidad de reacción fue de 293 U/ml*minuto. A los 20 minutos se alcanzó la hidrólisis total de naringina. Algunas de las muestras de reacción se corrieron en placas de cromatografía, en las que se pudo confirmar la desaparición de la naringina a los 20 minutos de reacción.

4. Aplicación de la naringinasa obtenida a jugo de toronja reconstituido. Utilizando un jugo de toronja reconstituido (Zano Alimentos, S. A.), Se probó la actividad de la naringinasa obtenida de la cepa 14, *A. niger* NRRL 2270 a un pH 3.2 y 45°C. La reacción se siguió solamente por cromatografía en placa fina, de acuerdo al método descrito en el capítulo de material y métodos, debido a que la turbiedad propia del jugo dificultó realizar las determinaciones espectrofotométricas. En la Figura 29 se puede observar, que después de una hora de reacción la naringina prácticamente desapareció, apareciendo otra mancha que posiblemente corresponde a prunina, lo que mostraría la acción de

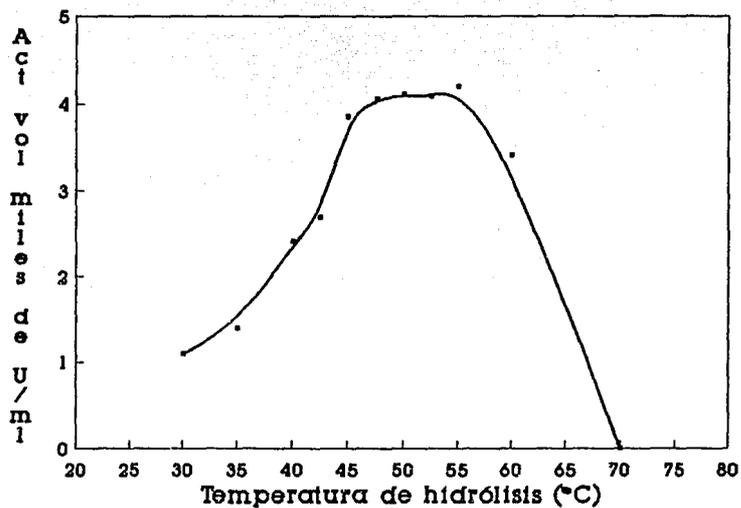


Fig. 27. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la naringinasa producida por la cepa 14. La reacción se llevó a cabo a pH 4.

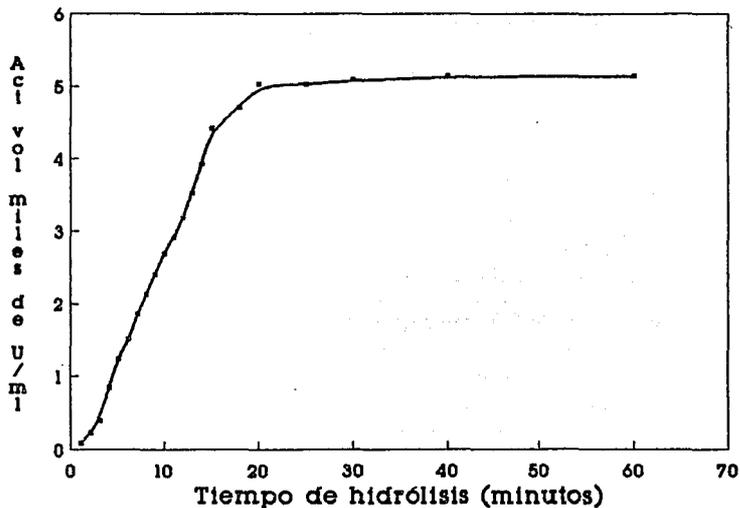
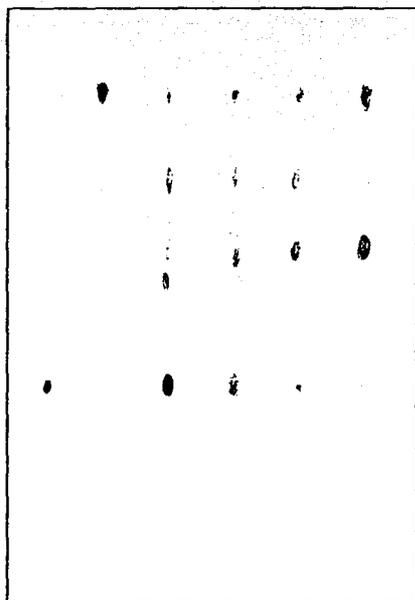


Fig. 28. Seguimiento de la hidrólisis de la naringina pura con la naringinasa producida por la cepa 14. La reacción se llevo a cabo a pH 4 y 45°C.



(Prunina)

S P 0 30 60 120

minutos de hidrolisis

Fig. 29. Hidrolisis de la naringina presente en un Jugo de toronja reconstituido con la naringinasa producida por la cepa 14. S, naringina; P, naringenina; y muestras de la mezcla de reaccion a 0, 30, 60 y 120 minutos.

la α -ramnosidasa. Aparentemente la conversión a naringenina toma aproximadamente dos horas, probablemente el pH ácido y la presencia de fructosa, glucosa y ácido cítrico contenidos en el jugo tienen efecto negativo sobre la β -glucosidasa (Ono, 1980; Roitner y col. 1984).

Resultados obtenidos en el laboratorio al utilizar una enzima comercial producida por *Penicillium decumbens* se presentan en la **Figura 30**, en ésta observa que después de 16 horas de hidrólisis, la naringina se hidrolizó totalmente. La enzima comercial requirió 12 horas más que la enzima obtenida con la cepa 14 para hidrolizar totalmente la naringina, sin embargo, cabe señalar que la cantidad de proteína cuantificada en el caldo de fermentación fue mucho mayor que la contenida en la muestra de naringinasa comercial'.

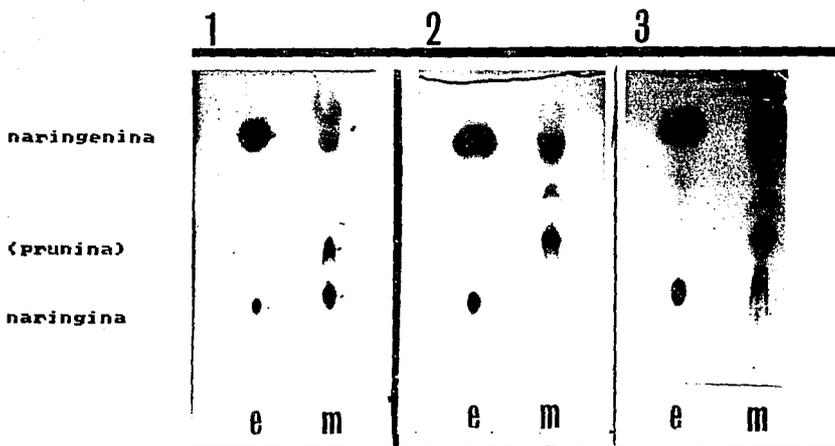


Fig. 30. Hidrolisis de la naringina presente en un jugo de toronja reconstituido con una naringinasa comercial. e: estandares de naringina y naringenina; m: muestras de jugo. Condiciones de la muestra: (1) sin reaccion, (2) despues de 16.5 horas de reaccion y (3) igual al 2 pero adicionando un estandar interno de naringenina.

VII. INTEGRACION DE RESULTADOS

El objetivo general de este trabajo fue determinar los factores que afectan la producción de naringinasa en cultivo sumergido. Para ello, se establecieron varios objetivos específicos, los cuales se fueron cubriendo durante el desarrollo del estudio. En principio se eligió el medio de cultivo reportado por Bram y Solomons (1965) ya que permitió una buena manipulación durante la toma de muestras y su procesamiento, además de que con éste se alcanzó una mayor producción de actividad. Para realizar este experimento se utilizó la cepa 14 como modelo, ya que se tenían referencias de su capacidad naringinolítica (Peterson, 1991); en este caso se podía haber empleado cualquiera de las otras cepas, pero se consideró más conveniente tomar un camino más seguro. Probablemente con otra cepa se hubiera obtenido una alta producción de actividad con otro de los medios probados, sin embargo, el muestreo y el procesamiento de las muestras hubiera sido difícil con estos, por la presencia de la harina de soya.

Los resultados obtenidos al comparar la producción y productividad de naringinasa de todas las cepas probadas, condujeron a seleccionar la cepa 14 para realizar el resto del estudio.

Entre las condiciones de cultivo que afectan la producción de naringinasa se probó la oxigenación del cultivo en matraces de manera indirecta a través de la fracción de llenado, la velocidad de agitación y el tipo de matraces. Los resultados obtenidos indicaron una marcada influencia de este parámetro sobre la síntesis de la enzima, aspecto que abre posibilidades de realizar investigaciones más profundas principalmente a nivel de fermentadores.

Algunos resultados obtenidos sugieren que la naringinasa es una enzima inducible o bien parcialmente constitutiva cuya síntesis se ve estimulada en presencia de sustrato. A este respecto no existen muchos antecedentes en la literatura pero una vez establecidas ciertas condiciones de trabajo iniciales se podría incursionar en el tema. Adicionalmente a esto, se encontró que otros materiales complejos como la harina de soya y pasta de soya dan buenas producciones de actividad aunque traen consigo muchos problemas de manipulación por la alta viscosidad y turbiedad de las muestras. El hecho de que se incremente la producción tal vez se debe a la presencia de compuestos como la saponina, contenida en productos de origen vegetal cuya estructura molecular induce o estimula la síntesis de la naringinasa (Kishi, 1959).

La literatura publicada hasta ahora aporta muy poca información en relación a la producción fermentativa de naringinasa, a pesar de tratarse de una enzima de aplicación práctica. Si bien su uso no ha sido indispensable en el mercado, sí podría asegurarse un mayor consumo de productos procesados de toronja con sabor agradable. En este sentido, los estudios conducentes a su producción juegan un papel fundamental ya que tal vez en el momento que se pueda producir a nivel comercial se abrirían mayores posibilidades de su aplicación.

La realización de este trabajo fue el inicio de un proyecto de investigación, como tal, puede considerarse el punto de partida para el estudio profundo de muchos de los parámetros aquí detectados, pero aún falta mucho por conocer. Como se mencionó anteriormente, en la literatura existe muy poca información referente a la producción fermentativa de naringinasa por lo que los aspectos que puedan ser estudiados y profundizados serán una

aportación al conocimiento del proceso, lo que podría permitir avance hacia horizontes más prometedores y exitosos dentro del proyecto global de donde surgió este trabajo.

VIII. CONCLUSIONES

1. Las 11 cepas de hongos que se aislaron en un medio conteniendo solamente naringina y fosfato de amonio mostraron capacidad para hidrolizar naringina.
2. Las cepas preseleccionadas con un medio que contenía sólidos de cocimiento de maíz, extracto de levadura, KH_2PO_4 , CaCO_3 y agua de la llave, fueron adecuadas ya que con ellas se obtuvo la mayor producción de naringinasa: *A. niger* NRRL 2270, produjo una actividad de 1676 U/ml en cuatro días y la cepa 3 de 1843 U/ml en el mismo tiempo.
3. El tipo de matraces, la fracción de llenado de los mismos y la velocidad de agitación influyeron de manera determinante en la producción de la naringinasa. La actividad volumétrica más alta de 3295 U/ml se alcanzó en matraces con deflectores de 250 ml conteniendo 25 ml de medio (fracción de llenado de 0.2) y a una velocidad de agitación de 200 rpm.
4. La naringina puede ser esterilizada con los demás ingredientes del medio sin que esto afecte negativamente la producción de la naringinasa. Lo anterior fue una ventaja ya que se evitan posibles contaminaciones y se facilita la preparación del medio.
5. La variabilidad en la producción de naringinasa por la cepa 14, *A. niger* NRRL 2270 no fue significativa.
6. La naringina parece actuar como inductor de la producción de naringinasa, aunque se requieren más experimentos que permitan dilucidar si también sirve como soporte para el crecimiento.

7. Al combinar extracto de levadura con harina de soya desgrasada la actividad producida por la cepa 14 fue mayor que el medio control.
8. El extracto de levadura es un componente necesario tanto para el crecimiento del hongo como para la producción de la enzima. en su ausencia estos parámetros se ven afectados notablemente.
9. Las condiciones óptimas para la actividad de naringinasa producida por *A. niger* NRRL 2270 son pH entre 3.9 y 4.3 y temperatura entre 45 y 55°C. siendo el primer parámetro no muy satisfactorio, ya que los jugos presentan un pH más bajo.
10. La actividad de la naringinasa producida por *A. niger* NRRL 2270 disminuyó considerablemente por la presencia de algunos componentes presentes en el jugo de toronja, de tal forma que la naringina pura es hidrolizada completamente en tan sólo 20 minutos y la que está presente en jugo en 4 horas.

IX. RECOMENDACIONES

En este trabajo se estudiaron algunas de las variables que afectan la producción de la naringinasa en cultivo sumergido a nivel laboratorio; sin embargo aún falta por definir y determinar algunos puntos importantes, por lo cual se hacen las siguientes recomendaciones:

1. Probar las demás cepas aisladas con diferentes medios y condiciones de cultivo, para establecer si se obtienen mejores niveles de producción de naringinasa.
2. Realizar estudios para el mejoramiento genético de la cepa de *A. niger* NRRL 2270 para obtener mutantes estables e hiperproductoras de la enzima de interés.
3. Cuantificar el nivel de naringinasa asociado al paquete micelial y determinar si su concentración es significativa con respecto a la que libera al caldo de cultivo.
4. Optimizar el medio de cultivo para la cepa de *A. niger* NRRL 2270.
5. Diseñar un medio químicamente definido para estudiar los fenómenos que regulan la síntesis de naringinasa, entre ellos el papel inductor o estimulador de la naringina.
6. Verificar que los hongos seleccionados para el presente estudio no liberan toxinas al medio, ya que el proyecto está encaminado en la aplicación de un producto para consumo humano.

7. Determinar la concentración óptima de oxígeno en el medio de cultivo utilizando fermentadores tipo tanque agitado.
8. Diseñar un método de purificación para la naringinasa que permita su caracterización.
9. Iniciar los estudios de su aplicación en jugos y otros productos procesados de toronja.

X. BIBLIOGRAFIA

1. **Amano Pharmaceutical Co., Ltd.**, 1984. Thermophilic and Acid Resisting Naringinase AF-3. Chem. Abstr. 101: 169100x.
2. **Barmore, C. R., Fisher, J. F., Fellers, P. J. and Rouseff, R. L.**, 1986. Reduction of Bitterness and Tartness in Grapefruit Juice with Florisil. J. Food Sci. 51(2): 415-416.
3. **Braddock, R. J. y Cadwallader, K. R.**, 1992. Citrus by Manufacture Products for Food Use. Food Technol. February: 105-109.
4. **Bram, B. and Solomons, G. L.**, 1965. Production of the Enzyme Naringinase by *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol. 13(6): 842-845.
5. **Berhow, M. A., Bennet, R. D., Kanes, K. Poling, S. M. and Vandercook, C. E.**, 1991. A Molonic Acid Ester Derivate of Naringin in Grapefruit. Phytochem. 30(12): 4198-4199.
6. **Berhow, M. A. and Vandercook, C. E.**, 1991. Sites of Naringin Biosynthesis in Grapefruit Seedlings. Chem. Abstr. 115: 68559n.
7. **Cannel, E. and Moo-Young, M.**, 1980. Solid-State Fermentation Systems. Process Biochem. Jun-Jul.: 2-7.
8. **Cooney, C. L.**, 1985. Growth of Microorganisms. Biotechnology. Vol. 1. Fundamentals. Ed. Rehm, H. J. and Reed, G., Verlag-Chemie.
9. **Davis, W. B.**, 1947. Determination of Flavonones in Citrus Fruits. Anal. Chem. 19(7): 476-478.
10. **Dunlap, W. J., Hagen, R. E. and Wender, S. H.**, 1962. Preparation and Properties of Ramnosidase and Glucosidase Fraction from a Fungal Flavonoid Glycosidase Preparation. "Naringinase C-100". J. Food Sci. 27: 597-601.
11. **Fellers, P. J.**, 1989. A Review of Limonin in Grapefruit (*Citrus paradisi*) Juice, Its Relationship to Flavour, and Efforts to Reduce It. J. Food Sci. Agric. 49: 389-404.
12. **Freedman, D.**, 1969. The Shaker in Bioengineering. Process Biochem. March: 35-40.
13. **Griffiths, F. P. and Lime, B. J.**, 1959. Debbitering of Grapefruit Products with Naringinase. Food Technol. (Chicago) 13: 430-443.
14. **Ito, T. and Takiguchi, Y.**, 1970. Naringinase. Chem. Abstr. 73: 65046w.
15. **Johnson, R. L. and Chandler, B. V.**, 1982. Reduction of Bitterness and Acidity in Grapefruit Juice by Adsorptive Processes. J. Sci. Food Agric. 33: 287-293.

16. Kishi, K., 1955. Naringinase I: Selection of Naringinase-Secreting Strains. Chem. Abstr. 49: 14106i.
17. Kishi, K., 1958. Naringinase II: Culture Conditions and Naringinase Formation. Chem. Abstr. 52: 3923a.
18. Kishi, K., 1959. The Soybean Constituent Effective for Formation of Naringinase. Chem. Abstr. 53: 4430i.
19. Kishi, K., 1960. Naringinase IV: End Products of Enzymic Hydrolysis of Naringin. Chem. Abstr. 54: 8928g.
20. Leninger, A. L., 1981. Biochemistry. 2a edition. Worth Publishers, Inc. New York. pp. 393-397, 599-594.
21. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., 1951. Protein Measurement with the Folin-Phenol-Reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
22. Lowry, O. H., 1957. Methods in Enzymology-Protein Estimation with the Follin-Ciocalteu Reagent. vol. III: 448-454.
23. Mansell, R. L., McIntosh, C. A. and Vest, S. E., 1983. An Analysis of the Limonin and Naringin Content of Grapefruit Juice Samples Collected From Florida State Test Houses. J. Agric. Food Chem. 31: 156-162.
24. McIntosh, C. A., Mansell, R. L. and Barros, S., 1987. Relationship between Limonin Concentration in Commercial Single Strength Grapefruit Juice. J. Food Sci. 52(6): 1734-1735.
25. Meiji Confectionary Co., Ltd., 1964. Purification of Naringinase. Chem. Abstr. 61: 1231c.
26. Meiji Confectionary Co., Ltd., 1966. Naringinase. Chem. Abstr. 65: 12827a.
27. Merck Index, and Encyclopedia of Chemical and Drug, 10th Edition, Merck & Co. Inc., Rahway, N. J., U. S. A., 1988.
28. Mitard, A. and Riba, J. P., 1988. Morphology and Growth of *Aspergillus niger* ATCC26036 Cultivated at Several Shear Rates. Biotechnol. Bioeng. 32: 835-840.
29. Neubeck, C. E., 1975. Flavonoid-hydrolyzing Enzymes in Citrus Technology (Naringinase and Hesperidinase), in Fruits, Fruit Products and Wines, Chapter 4, p 431-434. Enzymes in Food Processing. Ed. Academic Press, New York.
30. Okada, S., Kiski, K., Itava, K. and Fukumoto, J., 1964. Flavonoid Hydrolyzing Enzymes III. Purification of Prunin and hesperitin-7-glucoside Hydrolyzing Enzyme. Chem. Abstr. 61: 3358d.
31. Okada, S., Kiski, K., Higashihara, M. and Fukumoto, J., 1965. Flavonoid Hydrolyzing Enzymes II. Substrate Specificities of Naringinase I and Hesperidinase I. Chem. Abstr. 62: 12081g.

32. Olson, A. C., Gray, G. M. and Guadagni, D. G., 1979. Naringin Bitterness of Grapefruit Juice Debittered with Naringinase Immobilized in a Hollow Fiber. *J. Food Sci.* 44: 1358-1361.
33. Ono, M., 1980. Inhibitory Effects of Citric Acid in Enzymic Debittering of Citrus Fruit Juice. *J. Ferment. Technol.*, 58(4): 387-389.
34. Park, N. H. and Chang, H. N., 1979. Preparation and Characterization of Immobilized Naringinase on Porous Glass Beads. *J. Ferment. Technol.*, 57(4): 310-316.
35. Peterson, S. W., 1991. Personal Communication. Agricultural Research Culture Collection, Department of Agriculture, USA.
36. Revo, A. y Saval S., 1990. Los flavonoides en la Tecnología de los Cítricos. *Tecnología de Alimentos*. (México). 25(4): 5-13.
37. Roitner, M. Schalkhammer, T. and Pittner, F., 1984. Characterization of naringinase from *Aspergillus niger*. *Monatsh. Chem.* 115(10): 1255-1267.
38. Rombouts, F. M. and Pilnik, w., 1978. Enzymes in Fruit and Vegetable Juice Technology. *Process Biochem.*, August: 9-13.
39. Shaw, P. E., Tatum, J. H. and Wilson, C. W., 1984. Improved Flavor of Navel Orange and Grapefruit Juices by Removal of Bitter Components with β -Cyclodextrin Polymer. *J. Agric. Food Chem.* 32: 832-836.
40. Sankyo, Co., Ltd., 1965. Fungal Naringinase. *Chem. Abstr.* 63: 9028c.
41. Smythe, C. V., Moorestown, N. J. and Dudley, W., 1960. Conversion of Flavonoid Glycosides U.S. Patent 2,950,974.
42. Thomas, D. W., Smythe, C. V. and Labbee, M. D., 1958. Enzymatic Hydrolysis of naringin, the Bitter Principle of Grapefruit. *Food Res.* 23: 591-598.
43. Ting, S. V., 1958. Enzymatic Hydrolysis of Naringin in Grapefruit. *J. Agric. Food Chem.* 6: 546-549.
44. Tressler, D. K. and Joslyn, M. A., 1971. Fruit and Vegetable Juice Processing Technology. 2a Edition. The AVI Publishing Company. USA. pp 92-124.
45. Tsen, H. Y. and Tsai, S. Y., 1988. Comparison of the Kinetics and Factors Affecting the Stabilities of Chitin-Immobilized Naringinases from Two Fungal Sources. *J. Ferment. Technol.* 66(2): 193-198.
46. Tsen, H. Y., Tsai, S. Y. and Yu, G. K., 1989. Fiber Entrapment of Naringinase from *Penicillium* sp. and Application to Fruit Juice Debittering. *J. Ferment. Bioeng.* 67(3): 186-189.

47. Tsen, H. Y. and Yu, G. K., 1991. Limonin and Naringin Removal from Grapefruit Juice with Naringinase Entrapped in Cellulose Triacetate Fibers. *J. Food Sci.* 56(1): 31-34.
48. Wagner, C. J., Wilson C. W. and Shaw, P. E., 1988. Reduction of Grapefruit Bitter Components in a Fluidized β -Cyclodextrin Polymer Bed. *J. Food Sci.* 53(2): 516-518.