

# PURIFICACIÓN DE LA NARINGINASA DEL EXTRACTO CRUDO DE *Aspergillus foetidus*

Fernando Moguel, M.C. Elizabeth Ortiz, Dr. Marco Villanueva

División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Mérida.

Av. Tecnológico s/n, Fax: (99) 44 84 79, Mérida, Yuc, Mexico. C P. 97118.

e-mail: eortiz@labna.itmerida.mx

Palabras claves: Naringinasa, *Aspergillus*, Cítricos.

**Introducción.** Uno de los problemas que tiene la industria procesadora de cítricos es el sabor amargo que esta relacionado con el contenido de naringina y otros compuestos(1,2).

Se han propuesto diferentes métodos, incluyendo enzimáticos, para reducir este compuesto utilizando naringinasa (3).

Esta enzima es un complejo con dos actividades, una  $\alpha$ -ramnosidasa que hidroliza los residuos terminales no reductores de  $\alpha$ -L-ramnosa de la naringina a ramnosa y prunina y una  $\beta$ -glucosidasa que hidroliza los residuos terminales no reductores de  $\beta$ -D-glucosa, de la prunina a glucosa y naringenina que no es amarga (2).

En trabajos anteriores se ha demostrado que el extracto crudo obtenido de *A. Foetidus* crecido en cáscara de toronja presenta una alta actividad volumétrica y específica de dicha enzima (4).

El objetivo del trabajo es la purificación de la naringinasa del extracto crudo de *A. foetidus*, por medio de diferentes métodos de purificación.

**Metodología.** Los métodos utilizados para el fraccionamiento y purificación, fueron precipitación con sales de sulfato de amonio a diferentes concentraciones(20, 50%), que posteriormente fueron eluidos por una columna de filtración en gel (sephacril S-300); siguiendo así la actividad de la enzima por el método de Davis(3). Para la cuantificación de proteína extracelular se utilizó el método de Bradford.

**Resultados y Discusiones.** En los fraccionados obtenidas con las sales, el precipitado del 20% fue el que presentó una mayor actividad específica (0.5144U/mg.tot prot.), del resto de los otros fraccionados con sulfato de amonio, a diferentes concentraciones. Posteriormente el precipitado del 20% fue eluido por filtración en gel, donde en la fracción núm. 29 presentó una mayor actividad específica (12.8 U/mg de tot. prot.) (fig 1), ya que dicha columna fue equilibrada con

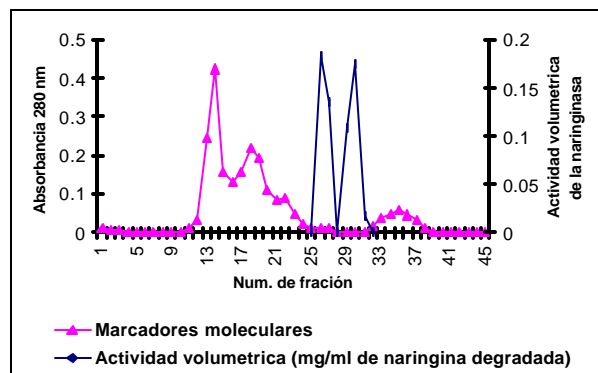


Fig. 1. Perfiles de marcadores de proteínas conocidas y fraccionado 20% en filtración en gel.

anterioridad con proteínas de peso molecular conocidos y con estos datos se estimó un peso molecular aproximado de 67000 daltons, esto es comparable con otros autores que reportan un peso molecular de 85000 daltons determinado por métodos electroforéticos (5).

**Conclusiones.** Podemos observar que la precipitación con sulfato de amonio, es muy conveniente para la concentración de la enzima, ya que nos permite retirar las proteínas contaminantes, para que posteriormente sea utilizado el método de filtración en gel, los resultados obtenidos en la columna nos indican que la enzima tiene un peso molecular aproximado de 67,000 Daltons.

## Bibliografía.

- Couture, R y Rouseff, R (1992). Debittering and Deacidifying Sour Orange Juice using Neutral and Anion Exchange Resins. *Journal of food Sciencia*. 57:380-384.
- Kimball, D y Norman, S (1990). Processing effects during commercial debittering of California Navel orange juice. *Journal Agric. Food Chem.* 38:1396-1400.
- Puri, M, Marwaha, S. y Kothari, R. (1996). Biochemical basis of bitterness in citrus fruit juices and biotechnological approaches for debittering. *Critical Reviews in Biotechnology.* 16:145-155.
- Mendoza, A. (1999). Selección de hongos filamentosos para la producción de naringinasa en estado sólido.
- Manzanares, P., Graaff, L. y Visser, J., (1997) Purification and characterization of an  $\alpha$ -L rhamnosidase from *A. niger*. *FEMS Microbiol, Letters*, 157, 279-283.-

	Actividad Vol. (Unidades)	Proteína (mg)	Actividad esp. (U/mg de prot. Tot.)	No. De veces de purificación.
Extracto	0.0732	9.3215	0.00785	1
Precipitado 20%	<b>0.2299</b>	<b>0.4469</b>	<b>0.5144</b>	<b>65.52</b>
Sobrenadante 20%	-	5.3224	-	-
Precipitado 50%	0.1869	0.439	0.4257	54.22
Sobrenadante 50%	-	2.88	-	-

Tabla 1. Fraccionamiento con sulfato de amonio a diferentes concentraciones (20, 50%).