

Joanna Bodakowska-Boczniewicz, Zbigniew Garncarek

Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu

e-mails: joanna.bodakowska@ue.wroc.pl; zbigniew.garncarek@ue.wroc.pl

**PRODUKCJA NARINGINAZY
PRZEZ *ASPERGILLUS NIGER* –
OPTIMALIZACJA SKŁADU PODŁOŻA**

**PRODUCTION OF NARINGINASE
BY *ASPERGILLUS NIGER* –
CULTURE MEDIUM OPTIALIZATION**

DOI: 10.15611/pn.2016.461.02

Streszczenie: Celem przeprowadzonych badań był wybór szczepu *Aspergillus niger* o dużej zdolności do syntezy naringinazy oraz optymalizacja składu podłoża hodowlanego. Spośród przebadanych szczepów *A. niger* największą zdolność do biosyntezy naringinazy wykazywał szczep KMS, który hodowano na podłożu płynnym z dodatkiem naringiny jako czynnika indukującego. Optymalizowano, metodą czynnikowo-gradientową Boxa i Wilsona, stężenie pięciu składników podłoża: azotanu sodu, ekstraktu drożdżowego, diwodorofosforanu potasu, glukozy oraz naringiny. Przeprowadzone badania pozwoliły na ustalanie optymalnych stężeń następujących czynników: $0,78 \text{ g} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $2 \text{ g} \times 100 \text{ ml}^{-1}$ ekstraktu drożdżowego; $0,157 \text{ g} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$; $0,22 \text{ g} \times 100 \text{ ml}^{-1}$ glukozy oraz $120 \text{ mg} \times 100 \text{ ml}^{-1}$ naringiny.

Słowa kluczowe: naringinaza, *Aspergillus niger*, optymalizacja, biosynteza enzymów.

Summary: The purpose of the study was the selection of *A. niger* strain for the biosynthesis of naringinase and the optimization of culture medium composition. *A. niger* KMS strain was recognised as best for the enzyme biosynthesis. *A. niger* KMS was grown on liquid medium with naringin as an inducer. Optimization was carried out by Box-Wilson method. The concentration of sodium nitrate, yeast extract, potassium dihydrogen phosphate, glucose and naringin was optimized. The optimal concentration of the components were: $0.78 \text{ g} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $2 \text{ g} \times 100 \text{ ml}^{-1}$ yeast extract; $0.157 \text{ g} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$; $0.22 \text{ g} \times 100 \text{ ml}^{-1}$ glucose and $120 \text{ mg} \times 100 \text{ ml}^{-1}$ naringin.

Keywords: naringinase, *Aspergillus niger*, culture medium optimalization, production of enzymes.

1. Wstęp

Naringinaza jest kompleksem dwóch enzymów α -L-ramnozydazy (EC 3.2.1.40) i β -D-glukozydazy (EC 3.2.1.21), hydrolizującym naringinę do ramnozy, glukozy, pruniny i naringeniny. Ze względu na swoją aktywność hydrolityczną enzym ten ma potencjalne duże zastosowanie w technologii żywności. Naringinaza pozwala zwiększyć aromat i usunąć gorzki smak soków owocowych, wina, moszczy i wielu napojów [Busto i in. 2007; Gallego i in. 2001; Ni i in. 2012]. Ma również szerokie zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, gdzie jest stosowana do deglikozylacji glikopeptydowych antybiotyków [Sankyo 1988] oraz transformacji sterydów [Elujoba, Hardman 1987].

Pierwotnie naringinaza została wyizolowana ze źródeł roślinnych, nasion selera [Hall 1938] i liści grejpfruta [Thomas i in. 1958]. Naringinaza może być syntezowana także przez organizmy, głównie: pleśnie z rodzaju *Aspergillus* [Soria i in. 2004; Chen i in. 2013; Kumar, RevathiBabu 2010; Puri i in. 2005; Whitaker 2008], *Penicillium* [Norouzian i in. 2000)], a także bakterie *Staphylococcus* [Puri i in. 2011] i *Streptomyces* [Caraveo i in. 2014] oraz drożdże *Williopsis californica* [Ni i in. 2011].

Należy jednak podkreślić, że ze względu na zastosowanie naringinazy w przemyśle spożywczym enzym ten powinien pochodzić z mikroorganizmów zaliczonych do grupy GRAS (*Generally Recognized As Safe*), do których należy gatunek *A. niger*.

W pracach dotyczących biosyntezy naringinazy przez pleśnie z gatunku *A. niger* podaje się, że największą aktywność otrzymuje się w środowisku zawierającym ramnozę jako źródło węgla [Puri i in. 2005; Kumar 2010; Kumar i RevathiBabu 2010] przy zastosowaniu naringiny jako czynnika indukującego syntezę enzymu. W literaturze znajdują się także informacje o stosowaniu melasy, sacharozy, glukozy oraz skrobi jako źródeł węgla [Whitaker 2008, Puri i in. 2005]. W przypadku glukozy informacje podawane przez badaczy nie są jednoznaczne. Kumar i RevathiBabu [2010] oraz Puri i współpracownicy [2005] sugerują, że wytwarzanie naringinazy przez *A. niger* jest hamowane przez zawartą w podłożu glukozę.

Celem tej pracy był wybór szczepu *A. niger* zdolnego do biosyntezy zewnątrzkomórkowej naringinazy oraz optymalizacja składu podłoża hodowlanego w celu maksymalizacji produkcji tego enzymu.

2. Metodyka

2.1. Wybór szczepu *Aspergillus niger*

W badaniach użyto 6 szczepów *A. niger* pochodzących z kolekcji drobnoustrojów Katedry Biotechnologii Żywności Instytutu Chemii Technologii Żywności Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu. Hodowle prowadzono na wstrząsarce (150 obr \times min⁻¹), w temperaturze 30°C, przez 144 godziny, w kolbach z przegro-

dami firmy Duran-Schott o pojemności 500 ml, zawierającymi po 100 ml podłoża Czapka [Verbiscar i in. 1987] z dodatkiem 0,05% naringiny.

2.2. Wybór źródła węgla

Określono wpływ źródła węgla na biosyntezę naringinazy w hodowli wstrząsanej *A. niger*. W przeprowadzonych badaniach porównano aktywność naringinazy w hodowli na podłożu Czapka z ramnozą oraz tańszą od niej glukozą jako źródłami węgla. Hodowle prowadzono w trzech powtórzeniach dla każdej próby.

2.3. Oznaczenie aktywności naringinazy

Do oceny aktywności naringinazy użyto 1 ml 0,1-procentowej naringiny, 300 μ l 0,1 M buforu octanowego pH 4,0 i 200 μ l odwirowanego płynu pohodowlanego. Całość inkubowano przez 60 min w temperaturze 50°C. Aktywność naringinazy [μ mol \times min⁻¹ \times ml⁻¹] oznaczono metodą Davisa, która opiera się na spektrofotometrycznym oznaczeniu stężenia naringiny poprzez jej reakcję z glikolem dietylenowym w środowisku zasadowym [Davis 1947].

2.4. Czynnikowo-gradientowa metoda optymalizacji składu podłoża

Optymalizację składu podłoża w hodowlach wstrząsanych przeprowadzono, opierając się na eksperymencie czynnikowo-gradientowym Boxa i Wilsona, który stanowił podstawę do przeprowadzenia optymalizacji metodą powierzchni odpowiedzi RSM (*Response Surface Method*) [Box, Wilson 1951]. Optymalizacji czynnikowej poddano stężenia pięciu składników podłoża hodowlanego (tab. 1). Dla każdego z nich wyznaczono wartości poziomu dolnego (-1) i górnego (1) optymalizowanego parametru.

Tabela 1. Wykaz składników podłoża poddanych optymalizacji

Numer parametru	Składnik	Stężenie składnika				Jednostki [-]
		-1	1	0	Δ	
x1	NaNO ₃	0	1	0,5	0,5	g \times 100 ml ⁻¹
x2	ekstrakt drożdżowy	0,1	1,1	0,6	0,5	g \times 100 ml ⁻¹
x3	KH ₂ PO ₄	0,05	0,25	0,15	0,1	g \times 100 ml ⁻¹
x4	glukoza	0,5	1,5	1	0,5	g \times 100 ml ⁻¹
x5	naringina	10	90	50	40	g \times 100 ml ⁻¹

* (-1 – dolny, 1 – górny poziom stężenia czynnika (wartości bezwymiarowe).

Źródło: opracowanie własne.

W dalszym etapie optymalizacji zastosowano metodę gradientową. Opierając się na wynikach optymalizacji czynnikowej, obliczono współczynniki regresji, określające liniowy wpływ badanych stężeń składników podłoża na wyniki hodowli. Obliczone współczynniki posłużyły do wyznaczenia kierunku i wartości skoku (zmiany stężenia) każdego z optymalizowanych składników.

Na podstawie wyników kolejnych hodowli wyznaczono nowy punkt centralny oraz sporządzono plan kompozycyjny z 6 powtórzeniami w punkcie centralnym.

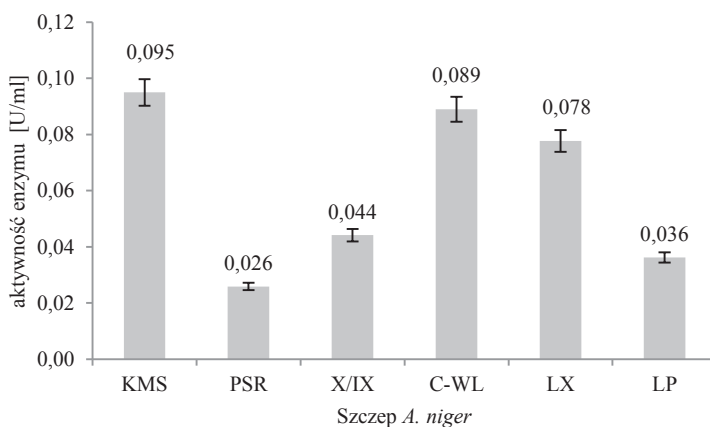
Na podstawie wyników przeprowadzonych eksperymentów wyznaczono funkcję wielomianu stopnia drugiego, uwzględniając tylko istotne statystycznie współczynniki. Otrzymaną funkcję wykorzystano do obliczenia maksimum aktywności naringinazy w analizowanym obszarze zmienności stężenia składników podłoża. Określenie punktu optymalnego przeprowadzono metodą hybrydową (połączenie algorytmu genetycznego i metody klasycznej) przy użyciu pakietu optymalizacyjnego programu MATLAB.

2.5. Analiza statystyczna

Próby wykonano w trzech powtórzeniach. Wartości średnie oraz odchylenie standardowe obliczono przy użyciu programu Excel. Jednoczynnikową analizę wariancji wykonano przy użyciu programu Statistica v.12.

3. Wyniki i dyskusja

Spośród przebadanych szczepów *A. niger* największą zdolność do biosyntezy naringinazy wykazywał szczep KMS ($0,095 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$) (rys. 1) i został wykorzystany do dalszych badań.



Rys. 1. Zdolność szczepów *A. niger* do biosyntezy naringinazy

Źródło: opracowanie własne.

W przeprowadzonych badaniach porównano aktywność naringinazy w hodowli na podłożu Czapka z ramnożą lub glukozą jako źródłem węgla. Wzrost aktywności naringinazy zaobserwowano, gdy w podłożu hodowlanym była obecna ramnoża lub glukoza (tab. 2).

Tabela 2. Tabela przekrojów statystyk opisowych

Podłoże	Średnia aktywność [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$]	Odchylenie standardowe
p. Czapka + glukoza	0,0108	0,00423
p. Czapka + ramnoża	0,0140	0,00462

Źródło: opracowanie własne.

Przeprowadzona analiza wariancji jednoczynnikowej nie wykazała statystycznie istotnej różnicy (poziom istotności $\alpha = 0,05$) między aktywnością naringinazy uzyskaną w hodowlach na glukozie i ramnozie. W związku z tym do optymalizacji składu podłoża wybrano tańszy składnik – glukozę. Brak różnic wpływu ramnoży i glukozy na biosyntezę naringinazy przez szczep *A. niger* KMS mógł wynikać z oddziaływania jonów metali na ten proces, szczególnie wapnia i magnezu. Gonzalez-Vazquez i in. [2011] stwierdzili, że obecność jonów wapnia lub magnezu w podłożu z ramnożą wpływa niekorzystnie na biosyntezę zewnątrzkomórkowej naringinazy przez szczep *A. niger* ATCC1015.

W dalszych badaniach uzupełniono skład podłoża Czapka o naringinę jako czynnik indukujący syntezę naringinazy oraz ekstrakt drożdżowy. Wyniki tych badań pozwoliły stwierdzić, że największy wpływ na syntezę naringinazy przez szczep *A. niger* KMS ma pięć składników podłoża: NaNO_3 , ekstrakt drożdżowy, KH_2PO_4 , glukoza i naringina.

Wyniki doświadczeń przeprowadzonych na podstawie planu czynnیکowego Boxa i Wilsona przedstawiono w tab. 3.

Tabela 3. Plan eksperymentu dwupoziomowego optymalizacji czynnیکowej

	x1	x2	x3	x4	x5	Aktywność naringinazy [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$]
1	2	3	4	5	6	7
1	-1	-1	-1	-1	1	0,000
2	1	-1	-1	-1	-1	0,030
3	-1	1	-1	-1	-1	0,055
4	1	1	-1	-1	1	0,120
5	-1	-1	1	-1	-1	0,002
6	1	-1	1	-1	1	0,054
7	-1	1	1	-1	1	0,140

Tabela 3, cd.

1	2	3	4	5	6	7
8	1	1	1	-1	-1	0,043
9	-1	-1	-1	1	-1	0,002
10	1	-1	-1	1	1	0,032
11	-1	1	-1	1	1	0,081
12	1	1	-1	1	-1	0,051
13	-1	-1	1	1	1	0,000
14	1	-1	1	1	-1	0,009
15	-1	1	1	1	-1	0,026
16	1	1	1	1	1	0,082

* -1 – dolny, 1 – górny poziom wartości parametru.

Źródło: opracowanie własne.

Najwyższą aktywność naringinazy, równą $0,140 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$, uzyskano dla wariantu 7. Dane z optymalizacji czynnikowej posłużyły do wyznaczenia 10-wariantowego planu optymalizacji gradientowej (tab. 4).

Tabela 4. Plan optymalizacji gradientowej

	Stężenie składnika					Aktywność naringinazy [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$]
	x1	x2	x3	x4	x5	
17	0,54	0,8	0,15	0,96	60	0,056
18	0,58	1	0,15	0,92	70	0,112
19	0,62	1,2	0,15	0,88	80	0,106
20	0,66	1,4	0,15	0,84	90	0,099
21	0,7	1,6	0,16	0,8	100	0,129
22	0,74	1,8	0,16	0,76	110	0,143
23	0,78	2	0,16	0,72	120	0,133
24	0,82	2,2	0,16	0,68	130	0,114
25	0,86	2,4	0,16	0,64	140	0,105
26	0,9	2,6	0,16	0,6	150	0,095

Źródło: opracowanie własne.

Na podstawie wyników hodowli przeprowadzonych na podstawie planu optymalizacji gradientowej (tab. 5) wyznaczono nowy punkt centralny, któremu odpowiadały następujące stężenia optymalizowanych składników: $0,78 \text{ g} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $2 \text{ g} \times 100 \text{ ml}^{-1}$ ekstraktu drożdżowego; $0,157 \text{ g} \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$; $0,72 \text{ g} \times 100 \text{ ml}^{-1}$ glukozy oraz $120 \text{ mg} \times 100 \text{ ml}^{-1}$ naringiny. Nowy punkt centralny posłużył do opra-

cowania planu kompozycyjnego pięciowartościowego z 6 powtórzeniami w punkcie centralnym (tab. 5).

Tabela 5. Wykaz optymalizowanych parametrów w planie pięciowartościowym

Zmienna	Składnik	-2	-1	0	1	2	Δ	Jednostki
x1	NaNO ₃	0,08	0,43	0,78	1,13	1,48	0,35	g × 100 ml ⁻¹
x2	ekstrakt drożdżowy	1,5	1,75	2	2,25	2,5	0,25	g × 100 ml ⁻¹
x3	KH ₂ PO ₄	0,057	0,107	0,157	0,207	0,257	0,05	g × 100 ml ⁻¹
x4	glukoza	0,22	0,47	0,72	0,97	1,22	0,25	g × 100 ml ⁻¹
x5	naringina	80	100	120	140	160	20	g × 100 ml ⁻¹

Źródło: opracowanie własne.

Na podstawie przeprowadzonych badań określono powierzchnię odpowiedzi opisaną wielomianem drugiego stopnia z uwzględnieniem tylko istotnych statystycznie współczynników:

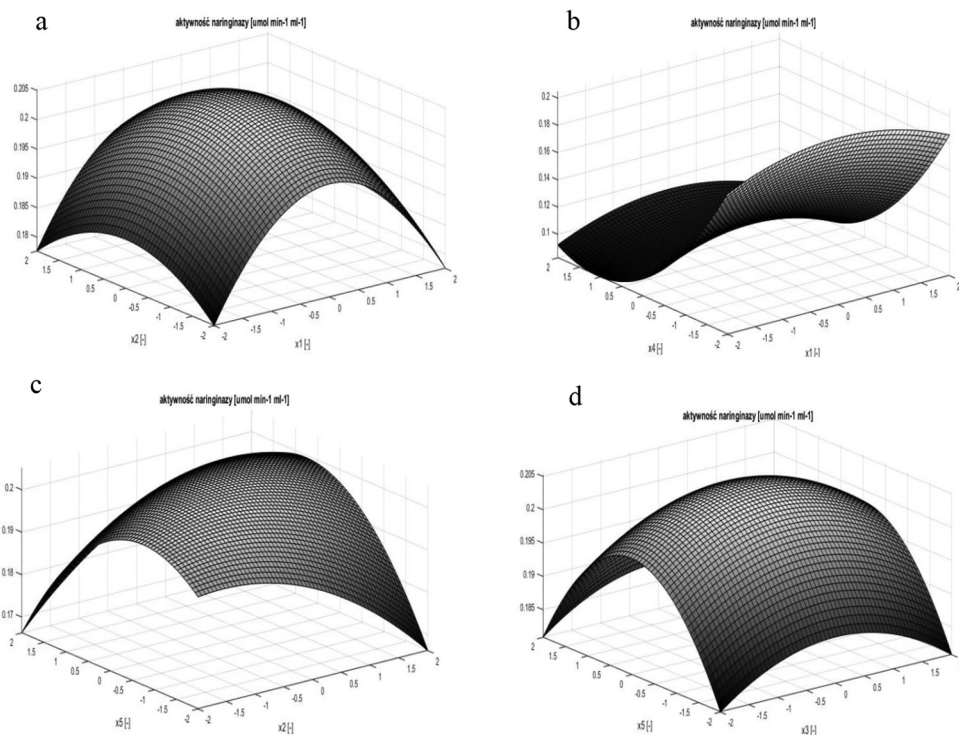
$$f = 0,11459 - 0,004834 \times x_1^2 - 0,002099 \times x_2^2 - 0,001749 \times x_3^2 - 0,023455 \times x_4 + 0,010949 \times x_4^2 - 0,004370 \times x_5^2 + 0,003298 \times x_2 \times x_5$$

gdzie: x_1 , x_2 , x_3 , x_4 , x_5 to odpowiednio stężenia NaNO₃, ekstraktu drożdżowego, KH₂PO₄, glukozy i naringiny wyrażone w wartościach bezwymiarowych.

Przeprowadzone badania pozwoliły na ustalanie, przy użyciu programu MATLAB, optymalnego składu podłoża pozwalającego na uzyskanie maksymalnej aktywności naringinazy w podłożu hodowlanym. Stężenie optymalizowanych składników podłoża było następujące: 0,78 g × 100 ml⁻¹ NaNO₃; 2 g × 100 ml⁻¹ ekstraktu drożdżowego; 0,157 g × 100 ml⁻¹ KH₂PO₄; 0,22 g × 100 ml⁻¹ glukozy oraz 120 mg × 100 ml⁻¹ naringiny. Hodowla szczepu *A. niger* KMS na takim podłożu pozwala na otrzymanie preparatu naringinazy o aktywności wynoszącej 0,205 μmol × min⁻¹ × ml⁻¹.

Na rysunku 2a przedstawiono zależność aktywności enzymu naringinazy od stężenia źródeł azotu i czynników wzrostu: NaNO₃ i ekstraktu drożdżowego, przy optymalnym stężeniu pozostałych trzech składników. Z przedstawionej zależności wynika, że najwyższą aktywność naringinazy uzyskuje się dla umiarkowanych stężeń obu źródeł azotu.

Wpływ stężenia NaNO₃ oraz glukozy na aktywność naringinazy w podłożu hodowlanym, przy optymalnych stężeniach pozostałych trzech składników, przedstawiono na rysunku 2b. Najwyższą aktywność naringinazy uzyskano przy niskich stężeniach glukozy. Taka zależność może sugerować użycie do produkcji naringinazy podłoża pozbawionego glukozy. Podłoże bez glukozy, zawierające naringinę (10 g × l⁻¹), MgSO₄ × 7H₂O (0,5 g × l⁻¹), KH₂PO₄ (1,5 g × l⁻¹), (NH₄)₂ SO₄ (4 g × l⁻¹), ZnSO₄ × 7H₂O (0,09 g × l⁻¹), CaCl₂ (0,1 g × l⁻¹), ekstrakt drożdżowy (1,0 g × l⁻¹), mączkę sojową (2,0 g × l⁻¹) oraz pepton, stosowali Ni i współpracownicy [2012] do otrzymywania naringinazy ze szczepu *A. niger* BD056.



Rys. 2. Wpływ azotanu sodu (x_1), ekstraktu drożdżowego (x_2), diwodorofosforanu potasu (x_3), glukozy (x_4) i naringiny (x_5) na aktywność naringinazy w hodowli wstrząsanej szczepu *A. niger* KMS. Stężenia składników wyrażone w wartościach bezwymiarowych

Źródło: opracowanie własne.

Na rysunku 2c przedstawiono wpływ stężenia naringiny, czynnika indukującego biosyntezę naringinazy oraz ekstraktu drożdżowego na aktywność enzymu w podłożu hodowlanym, przy stałych optymalnych stężeniach pozostałych trzech składników. Z zależności przedstawionej na rysunku wynika, że wyższe stężenia ekstraktu drożdżowego wymagają także większego stężenia glikozydu fawonoidowego dla uzyskania wyższej aktywności naringinazy w podłożu hodowlanym. Puri i in. [2005] nie zaobserwowali korzystnego wpływu ekstraktu drożdżowego na produkcję naringinazy przez *A. niger*. Należy jednak podkreślić, że nie optymalizowali oni stężenia tego źródła czynników wzrostu, a jak wynika z przeprowadzonych w pracy badań, pozytywny wpływ ekstraktu drożdżowego na biosyntezę naringinazy przez *A. niger* jest wyraźnie widoczny przy optymalnym stężeniu tego składnika podłoża.

Biosynteza naringinazy przez *A. niger* KMS była indukowana przez obecność w podłożu naringiny, substratu tego enzymu. Optymalne stężenie tego glikozydu fawonoidowego wynosiło 0,12%, co jest wartością zbliżoną do tej, którą w swoich

badaniach nad wpływem różnych induktorów na biosyntezę naringinazy uzyskali Kumar i RevathiBabu [2010]. Potwierdzenie znalazł także fakt, że tylko stężenie tego induktora bliskie optymalnemu (rys. 2d) w znacznym stopniu indukuje biosyntezę naringinazy.

Z przeprowadzonych badań wynika również, że diwodorofosforan potasu miał niewielki wpływ na biosyntezę naringinazy przez szczep *A. niger* KMS (najmniejsza wartość współczynnika w równaniu opisującym powierzchnię odpowiedzi).

Autorzy kilku opracowań uzyskali znacznie większą aktywność naringinazy w płynie pochodzonym z różnych szczepów *A. niger*. Kumar i RevathiBabu [2010], używając szczepu *A. niger* VB07, otrzymali aktywność naringinazy w płynie pochodzonym wynoszącą $17,28 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$. Zoptymalizowane podłoże zawierało naringinę (0,1%), ramnozę (0,5%), pepton (0,25%) oraz glicynę (10 mM). Nieco niższą aktywność uzyskano, gdy jako źródło węgla zastosowano melasę.

Trochę niższą aktywność naringinazy wynoszącą $6,5 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ uzyskał Puri i in. [2005]. Stosowali oni szczep *A. niger* MTCC 1344 oraz podłoże zawierające oprócz ramnoży także pepton i sole mineralne.

Trudno jednak porównywać aktywności uzyskane przez innych autorów, w pracy bowiem nie przeprowadzono optymalizacji czynników środowiskowych, takich jak temperatura oraz pH. Używany w pracy szczep *A. niger* KMS jest producentem kwasu cytrynowego i wykazuje naturalną tendencję do silnego zakwaszania podłoża, a pH środowiska mniejsze od 4, jak stwierdzili Puri i in. [2005], w sposób istotny hamując biosyntezę naringinazy.

Stosunkowo duże aktywności naringinazy uzyskali inni autorzy, którzy stosowali inne gatunki i rodzaje drożdży. Hodowla szczepu *A. oryzae* JMU316 na podłożu zawierającym między innymi albedo z pomelo pozwoliła na uzyskanie preparatu naringinazy o aktywności $0,7 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ [Chen i in. 2010]. W wyniku hodowli szczepu *A. aculeatus* JMUdb058 na zoptymalizowanym podłożu zawierającym między innymi ekstrakt drożdżowy, naringinę i mąkę sojową uzyskano aktywność naringinazy wynoszącą $1,16 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ [Chen i in. 2013b].

4. Zakończenie

Produkcja naringinazy przez szczep *A. niger* KMS, hodowany na syntetycznym podłożu, jest w największym stopniu stymulowana przez ekstrakt drożdżowy, naringinę oraz azotan sodowy. Biosyntezie naringinazy sprzyja także medium ubogie w glukozę. Uzyskane wyniki potwierdziły przydatność optymalizacji czynnikowo-gradientowej metodą Boxa i Wilsona dla maksymalizacji bioprodukcji naringinazy w hodowlach wstrząsanych *A. niger*. Dalszego zwiększenia produkcji naringinazy przez szczep *A. niger* KMS należy upatrywać w optymalizacji czynników środowiskowych, takich jak pH i temperatura hodowli.

Literatura

- Box G.E.P., Wilson K.B., 1951, *On the experimental attainment of optimum conditions*, Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological), vol. 13, no. 1, s. 1-45.
- Busto M.D., Meza V., Ortega N., Perez-Mateos M., 2007, *Immobilization of naringinase from Aspergillus Niger CECT 2088 in poly(vinyl alcohol) cryogels for the debittering of juices*, Food Chemistry, vol. 104, no. 3, s. 1177-1182.
- Caraveo L., Medina H., Rodríguez-Buenfil I., Montalvo-Romero C., Evangelista-Martínez Z., 2014, *A simple plate-assay for screening extracellular naringinase produced by streptomycetes*, Journal of Microbiological Methods, vol. 102, s. 8-11.
- Chen D.X., Niu T.G., Cai H.N., 2010, *Optimizing culture medium for debittering constitutive enzyme naringinase production by Aspergillus oryzae JMU316*, African Journal of Biotechnology, vol. 9, no. 31, s. 4970-4978.
- Chen Y., Ni H., Chen F., Cai H., Li L., Su W., 2013, *Purification and characterization of a naringinase from Aspergillus aculeatus JMUdb058*, Journal of Agricultural and Food Chemistry vol. 61, no. 4, s. 931-938.
- Davis W.B., 1947, *Determination of flavanones in citrus fruits*, Industrial and Engineering Chemistry vol. 19, no. 7, s. 476-478.
- Elujoba A.A., Hardman R., 1987, *Diosgenin production by acid and enzymatic hydrolysis of fenugreek*, Fitoterapia, vol. 58, s. 299-304.
- Gallego M.V., Pinaga F., Ramon D., Valles S., 2001, *Purification and characterization of an alpha-L-rhamnosidase from Aspergillus terreus of interest in winemaking*, Journal of Food Science, vol. 66, no. 2, s. 204-209.
- Gonzalez-Vazquez R., Azaola-Espinosa A., Osorio-Revilla G., Gallardo-Velazquez T., Cruz-Victoria T., Arana-Errasquin R., Rivera-Espinoza Y., 2011, *The effect of different carbon sources and salts in the production of naringinase by Aspergillus niger ATCC1015*, Revista Mexicana de Ingeniería Química, vol. 10, no. 1, s. 1-8.
- Hall D.H., 1938, *A new enzyme of the glycosidase type*, Nature, vol. 142, no. 3586.
- Kumar V., 2010, *Comparative studies on inducers in the production of naringinase from Aspergillus niger MTCC 1344*, African Journal of Biotechnology, vol. 9, no. 45, s. 7683-7686.
- Kumar V., RevathiBabu P.K., 2010, *Optimization of fermentation parameters for enhanced production of naringinase by soil isolate Aspergillus niger VB07*, Food Science and Biotechnology, vol. 19, no. 3, s. 827-829.
- Ni H., Chen F., Cai H., Xiao A., You Q., Lu Y., 2012, *Characterization and preparation of Aspergillus niger naringinase for debittering citrus juice*, Journal of Food Science, vol. 77, no. 1, s. 1-7.
- Ni H., Li L., Xiao A., Cao Y., Chen Y., Cai H., 2011, *Identification and characterization of a new naringinase-producing strain, Williopsis californica JMUdeb007*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, vol. 27, no. 12, s. 2857-2862.
- Norouzian D., Hosseinzadeh A., Inanlou N., Moazami N., 2000, *Production and partialcation of naringinase by Penicillium Ddcumbens PTCC 5248*, Word Journal of Microbiology & Biotechnology, vol. 16, s. 471-73.
- Puri M., Banerjee U.C., 2000, *Production, purification, and characterization of the debittering enzyme naringinase*, Biotechnology Advances, vol. 18, s. 207-217.
- Puri M., Banerjee A., Banerjee U.C., 2005, *Optimization of process parameters for the production of naringinase by Aspergillus niger MTCC 1344*, Process Biochemistry, vol. 40, no. 1, s. 195-201.
- Puri M., Kaur A., Barrow C.J., Singh R., 2011, *Citrus peel influences the production of an extracellular naringinase by Staphylococcus xylosus MAK2 in a stirred tank reactor*, Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 89, no. 3, s. 715-722.
- Sankyo C.O., 1988, *Preparation of antibiotic chloropolysporin-C*, Japanese Patent 63,146,797.

- Soria F., Ellenrieder G., Grasselli M., Navarro del Cañizo A., Cascone O., 2004, *Fractionation of the naringinase complex from Aspergillus terreus by dye affinity chromatography*, Biotechnology Letters, vol. 26, no. 16, s. 1265-1268.
- Thomas D.W., Smythe C.V., Labbee M.D., 1958, *Enzymatic hydrolysis of naringin, the bitter principle of a grapefruit*, Journal of Food Science, vol. 23, no. 6, s. 591-598.
- Verbiscar A.J., Banigan T.F., Schatz R.A., 1987, *Modification of red squill by Aspergillus niger*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 35, no. 3, s. 365-368.
- Whitaker S., 2008, *The effect of different carbon sources and salts in the production of naringinase by Aspergillus niger ATCC1015*, Revista Mexicana de Ingeniería Química, vol. 10, no. 1, s. 1-8.