



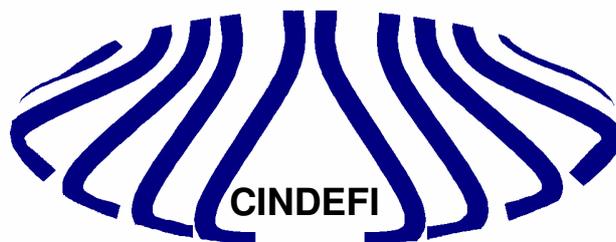
Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de La Plata

Ramnosidasa alcalina de
Verticillium tenerum: Producción y
caracterización parcial

Trabajo final del Laboratorio de Procesos Biotecnológicos

M. Dolores Blanco Fernández

Marzo de 2007



El presente trabajo se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI) bajo la dirección del Dr. Sebastián Cavalitto.

INTRODUCCIÓN	2
Verticillum tenerum	2
α-L-Ramnosidasa. Sustratos	5
Flavonoides	5
Terpenos	8
Saponinas	8
Ramnosidasas, Sustratos, productos y aplicaciones	9
Hidrólisis de flavonoides	10
Industria vitivinícola. Liberación de terpenos ligados	11
Hidrólisis de saponinas	13
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Reactivos:	18
Cepa.	18
Medios de cultivo:	18
Condiciones de cultivo	18
Medidas de actividad enzimática	19
Purificación de la enzima	19
Diseño experimental y análisis estadístico. Diseño de superficie de respuesta.	21
Estabilidad enzimática	24
HPLC	25
pH óptimo.	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	27
Optimización del medio de cultivo	27
Purificación enzimática.	31
Estabilidad enzimática	33
pH óptimo de reacción	36
CONCLUSIONES	39
REFERENCIAS	40

Introducción

Verticillium tenerum

Los miembros del reino Fungi (Hongos) se clasifican generalmente en cuatro grupos principales o phyla: Chytridiomycota -los quitridiomycetes-, Zygomycota -los zigomicetes-, Ascomycota -los ascomicetes- y Basidiomycota -los basidiomicetes-.

Un grupo adicional, los Deuteromycota -deuteromycetes u Hongos Imperfectos (Fungi Imperfecti)-, es un grupo que incluye hongos cuya reproducción sexual generalmente se desconoce, ya sea porque se ha perdido en el curso de la evolución o porque no ha sido observada. Hasta hace un tiempo, se le daba al grupo de los deuteromycetes la categoría de División, pero en la actualidad se tiende a basar la clasificación en las relaciones filogenéticas entre las especies. Aunque se han reagrupado las especies de deuteromicetes dentro de los Ascomicetes o Basidiomicetes asexuales, el término "hongos imperfectos" es aun ampliamente utilizado. *Penicillium*, *Aspergillus*, *Verticillium*, *Fusarium* son la porción más representativa de los Deuteromicetes.

Según este sistema de clasificación *Verticillium tenerum* es un Deuteromicete u hongo imperfecto, dentro del phyla Ascomycota. Su clasificación sistemática se basa en elementos morfológicos, los conidios y su formación.

Verticillium forma ameroconidios es decir, conidios unicelulares de forma elíptica o esférica. Los conidios están en hifas o conidióforos solitarios o agrupados. La ramificación de los conidióforos aparece como un verticilo, una estructura con forma de rueda con un eje central.

El genero *Verticillium* es un grupo artificial de hongos imperfectos que no tienen o no se conoce su fase formadora de ascas, es decir, no tienen o no se conoce el cuerpo fructífero. Muchos tienen la fase asexual de los ascomicetos, su fase sexual no se conoce o pudiera ser que la hayan perdido y tengan un ciclo parasexual.

El micelio fúngico se origina por la germinación de una sola espora. El crecimiento tiene la particularidad de que se produce solamente en los extremos de las hifas. Si bien los hongos son inmóviles, las esporas pueden ser

llevadas a grandes distancias por el viento. El crecimiento del micelio reemplaza a la movilidad, poniendo al organismo en contacto con nuevos nutrientes y con diferentes cepas de apareamiento.

Los hongos obtienen nutrientes absorbiendo sustancias orgánicas o inorgánicas disueltas. Secretan enzimas hidrolíticas que puedan degradar macromoléculas que, de otra forma, no serían asimilables y absorben las moléculas resultantes, más pequeñas. El micelio aparece como una masa sobre la superficie de la fuente de alimento.

La mayoría de las especies de *Verticillium* son hongos saprofitos, obtienen su alimento a partir de restos vegetales liberando sustancias que pueden ser utilizadas por otros miembros del ecosistema y está ampliamente distribuido en el suelo. Una parte menor de las especies son patógenas para especies de plantas de importancia económica como algodón, tomate, papa, así como vegetación natural, es decir son hongos parásitos. Estos hongos fitopatógenos causan verticilosis, obstrucción de los vasos conductores vegetales, marchites y amarilleo de las hojas.

El género *Verticillium* también incluye especies antagonistas de *Meloidogyne* spp, nematodos fitoparásitos que ocasionan severas pérdidas en cultivos tropicales de importancia económica. Por lo que se motivó la búsqueda y caracterización de aislamientos de *Verticillium* parásitos de huevos de esta plaga. La posibilidad de disponer de cepas nativas de nuevas especies de hongos con capacidad para regular poblaciones de nemátodos permite contar con una nueva alternativa ambientalmente segura para el desarrollo de los programas de control biológico frente al empleo de plaguicidas químicos de alto costo y elevada toxicidad.¹

Verticillium tenerum es uno de los hongos saprofitos del género *Verticillium* Nees y es además alcalino tolerante. Al crecer sobre restos vegetales secreta diversas enzimas al medio externo para poder disgregar y asimilar nutrientes. Algunas las enzimas segregadas son: pectin-lisas, pectinasas, pectato-lisas, poligalacturonasas, ramnogalacturonasas y glucosidasas².

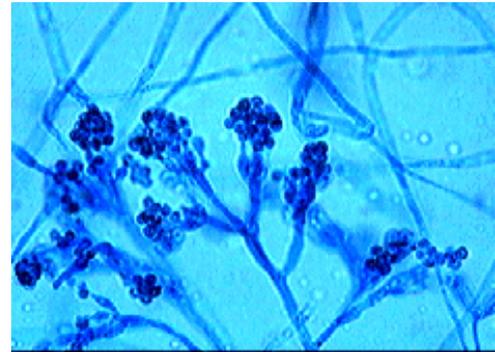
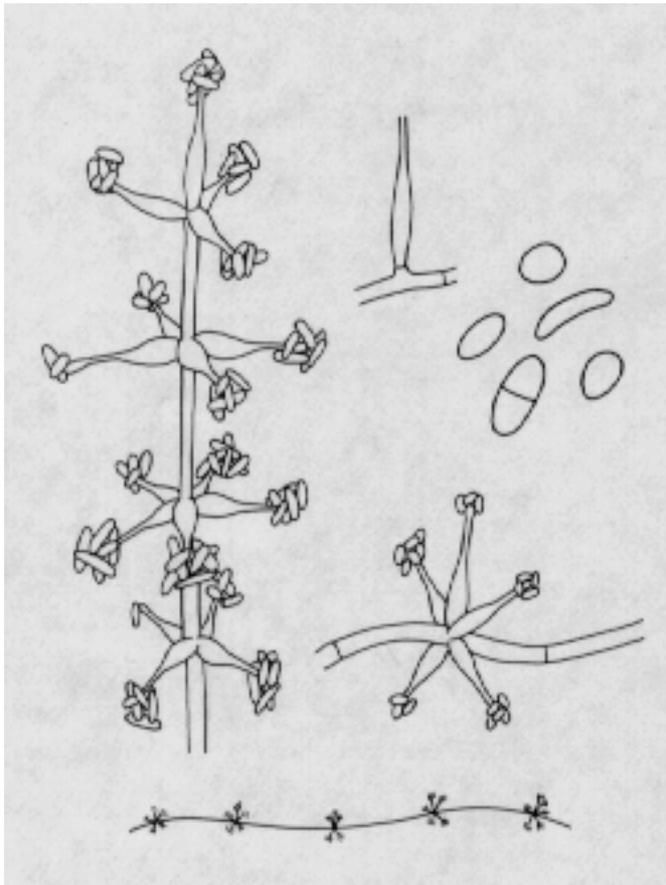


Fig. 1) *Verticillium Tenerum*: la ramificación de los conidióforos aparece como un verticilo. Imagen tomada del Departamento de Botánica de la Universidad de Toronto <http://www.botany.utoronto.ca>

Un hábitat de *Verticillium tenerum* es el suelo que constituye el ecosistema de los bosques de tala (*Celtis tala*) y coronillo (*Scutia buxifolia*) situados en la región costera de la provincia de Buenos Aires (partidos de Magdalena y Punta Indio). En estos suelos, con alto porcentaje de carbonato de calcio y pH entre 7.2 y 9.0, *Verticillium tenerum* puede desarrollarse lo que demuestra que posee la capacidad de crecer en medios altamente alcalinos (pH 9-10) ^{2;3}. Esta característica hizo interesante realizar un screening de enzimas alcalofílicas producidas por *Verticillium tenerum*.

Los resultados del screening de enzimas en cultivos en medios agarizados y fermentación en sustrato sólido de diversos hongos aislados del ecosistema citado anteriormente ³, mostraron que *Verticillium tenerum* es una fuente importante de enzimas alcalinas: Poligalacturonasas, pectin y pectato liasas, ramnogalacturanasa, celulasa, xilanasas, β -D-glucosidasa y α -L-ramnosidasa.

La ramnosidasa cataliza la hidrólisis de enlaces glicosídicos en ramnósidos naturales o sintéticos (heteropolisacáridos, flavonoides y compuestos aromáticos) con liberación de L-ramnosa (6-deoxy-L-manosa)². La presencia de una ramnosidasa activa a pH alcalino resulta de interés ya que los flavonoides son más solubles a estos pHs.

***α*-L-Ramnosidasa. Sustratos**

La α -L-ramnosidasa cataliza la ruptura hidrolítica de enlaces glicosídicos de la L-ramnosa (6-deoxy-L-manosa) en ramnósidos naturales o sintéticos tales como heteropolisacáridos, flavonoides y compuestos aromáticos (geraniol, nerol, etc.)

La L-ramnosa esta ampliamente distribuida en plantas y bacterias, también como componente de las paredes celulares y de varios productos naturales. Algunos ramnósidos son importantes compuestos biológicamente activos como saponinas citotóxicas, glicoalcaloides antimicóticos de origen vegetal y factores de virulencia bacterianos. En las plantas la L-ramnosa también se puede encontrar unida a compuestos volátiles, por ejemplo, formando parte del aroma de los vinos como compuestos terpénicos, con un posible rol de protección contra la toxicidad del aglicon lipofílico libre.

Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios de las plantas cuyo esqueleto común es el 2-fenil-1,4-benzo pireno. Este esqueleto carbonado puede estar modificado, y es la porción del flavonoide que se denomina aglicón.

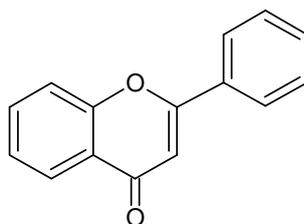


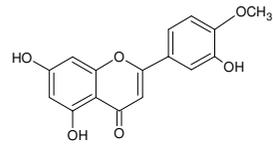
Fig. 2) Estructura molecular del 2-fenil-1,4-benzo pireno esqueleto químico de los flavonoides

Los flavonoides están presentes en casi todas las plantas, fundamentalmente en las partes aéreas, pero varían cualitativamente de una planta a otra. Se han descubierto más de 4.000 y están recibiendo gran atención por parte de la comunidad científica, debido a que se les atribuyen propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes y como protectores de vasos sanguíneos. Estas propiedades biológicas los señalan como posibles opciones para el tratamiento de enfermedades vasculares⁴.

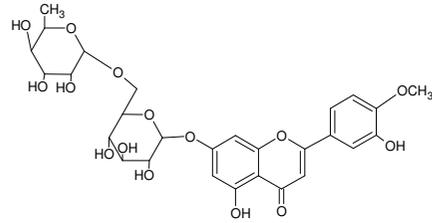
La L-ramnosa se encuentra formando parte de una gran familia de flavonoides presente en las plantas del género *Citrus*. Entre los flavonoides glicosilados más importantes de la familia *Citrus* se encuentran la naringina, la hesperidina, narirutina y diosmina.

Todas las frutas cítricas del tipo de la naranja contienen los aglicones flavonados hesperetina y naringenina pero estas mismas rara vez se encuentran como moléculas libres en la planta, sino que suelen estar glicosilados por los disacáridos rutinosa o neohesperidosa. De las posibles combinaciones entre estos aglicones y los disacáridos surgen los distintos flavonoides glicosilados. (Ver figura 3)⁵.

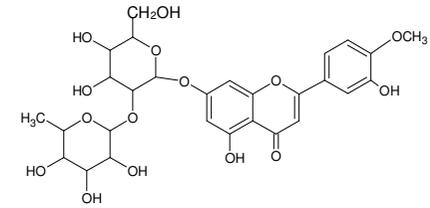
Los flavonoides glicosilados en naranjas dulces (*C.sinensis*) son hesperidina y narirutina, mientras que en las naranjas agrias (*C.aurantium*) los dos flavonoides predominantes son neohesperidina y naringina. La diferencia más significativa entre estos flavonoides glicosilados de naranjas dulces y amargas se encuentra en las propiedades de sus azúcares, las cuales influyen su sabor. El disacárido rutinosa (6-O- α -L-rhamnosil- β -D-glucosa), relativamente alto en naranjas dulces y mandarinas, provee a estos frutos de un sabor neutro. Este disacárido se encuentra unido al aglicón hesperetina formando la hesperidina y unido al aglicón naringenina para dar narirutina. En cambio el disacárido neohesperidosa (2-O- α -L-rhamnosil- β -D-glucosa) es alto en pomelo y naranjas agrias e imparte un sabor amargo a los glucósidos neohesperidina y naringina de los que forma parte.⁵



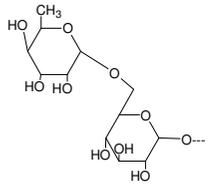
Espertina



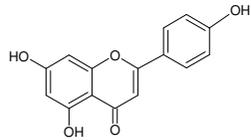
Esperidina



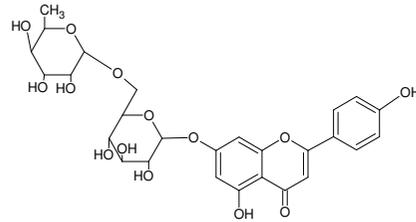
Neoesperidina



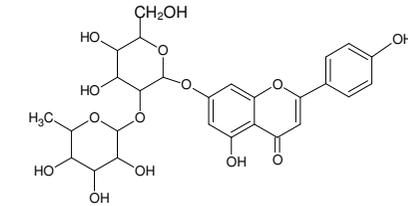
Rutinosa



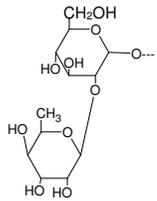
Naringenina



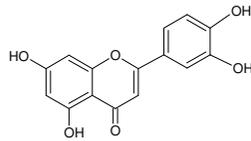
Narirutina



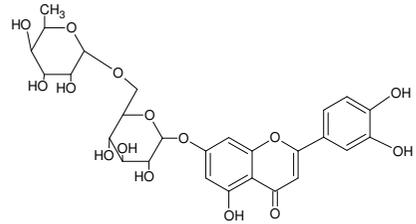
Naringina



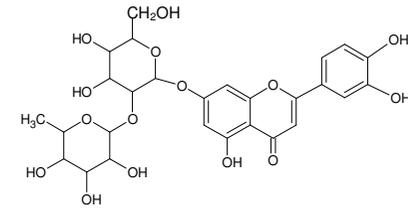
Neoesperidosa



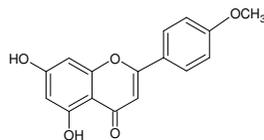
Eriodictol



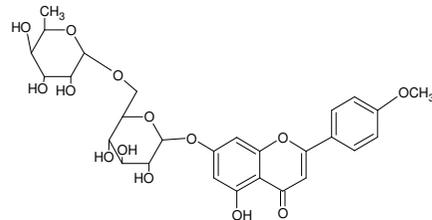
Eriocitrina



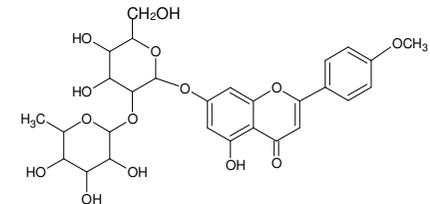
Neoeriocitrina



Isosakuranetina



Neoponcirina



Poncirina

Fig. 3) Flavonoides presentes en la familia Citrus, disacáridos y aglicones que los componen (8)

Terpenos

El aroma característico de los vinos esta dado por una serie de componentes volatiles, entre ellos terpenoles, la existencia en la uva de una fracción no volátil e inodora, capaz de ser revelada por vías químicas o enzimáticas fue demostrada por primera vez por Cordonnier y Bayonove. Posteriormente, varios investigadores han mostrado que los principales terpenoles y polioles terpénicos están presentes en las uvas Moscatel en forma de glicósidos. Los azúcares que constituyen estos precursores son glucosa, arabinosa, ramnosa y apiosa. Todas las variedades de uva poseen este tipo de precursores, pero la variedad moscatel es la más rica, teniendo en general mayor cantidad de precursores glicosilados que aromas libres.

Los diglicósidos no aromáticos contienen fundamentalmente 6-O- α -L-arabinofuranosilosil- β -D-glucopiranosidos y 6-O- α -L-ramnopiranosil- β -D-glucopiranosidos ^{6;7}.

Desde un punto de vista morfológico, la película es más rica en monoterpenos libres y ligados que la pulpa o el jugo ⁸. Existe una gran variación en la composición de terpenoles libres en las diferentes partes de la uva. Mucho más hidrosolubles que los compuestos libres, los glicósidos son considerados como formas de transporte y de acumulación de terpenos en las plantas ⁹.

Entre estos derivados glicosilados, las aglicones unidos a ellos no son sólo terpenoles o polioles terpénicos, también se pueden encontrar alcoholes lineales o cíclicos, C13-norisoprenoides, y fenoles volátiles ^{6;7}.

Saponinas

Las saponinas son una serie de productos naturales de origen vegetal con características físicas y químicas biológicas comunes: Agentes tensioactivos, hemolíticos, tóxicos para animales y el hombre por vía endovenosa. Por hidrólisis dan: azúcares y aglicones (sapogeninas). Los azúcares presentes más comunes son: D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa, L-arabinosa, D-xilosa, D-fucosa, ácido galacturónico y ácido glucurónico.

Las saponinas se encuentran clasificadas como saponinas esteroidales y triterpénicas. Las primeras se dividen a su vez en ácidas, básicas y neutras.

Las saponinas triterpénicas se subdividen en pentacíclicas y tetracíclicas. Las saponinas esteroidales están menos ampliamente distribuidas en la naturaleza que las saponinas triterpénicas pentacíclicas. Se encuentran con más frecuencia en las Monocotiledóneas, especialmente en las familias Dioscóreas, Amarilidáceas, Liliáceas. Una parte importante de las saponinas esteroidales son derivados del núcleo espiroetano.

Un ejemplo de una saponina esteroide es la dioscina, que posee dos moléculas de ramnosa y una de glucosa, que por hidrólisis de los azúcares se obtiene diosgenina, compuesto utilizado en la industria farmacológica para la síntesis de hormonas esteroides. Este compuesto se obtiene del árbol Ñame, originario de México.

Ramnosidasas, Sustratos, productos y aplicaciones

Se ha reportado la producción de α -L-ramnosidasa por tejidos de mamíferos, plantas, bacterias y hongos. Las ramnosidasas fúngicas reportadas poseen actividad a pH ácido. Unas pocas, de origen bacteriano, poseen actividad en medio alcalino débil, pero son intracelulares^{10;11}.

α -L-ramnosidasa (Origen)	Sustratos	Aplicación	Fuente
<i>Aspergillus Niger</i>	Ruscósidos, desglucoruscín	Industria farmacéutica, anti- inflamatorios	Pisvejcová <i>et al</i> ¹²
<i>Penicillium sp.</i>	Terpenoles glicosilados.	Industria alimenticia , vitivinícola.	Maicas <i>et al</i> ⁷
<i>Acremonium persicinum</i> <i>Aspergillus aculeatus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Emericella nidulans</i> , etc.	Flavonoides: naringina, hesperidina, narirutina. Glicosidos: Quercitrin, ginsenosido, etc.	Industria farmacéutica, alimenticia.	Monti <i>et al</i> ¹³

Tabla 1) Enzimas α -L-ramnosidasa de diferentes microorganismos y aplicación.

La α -L-ramnosidasa cataliza la ruptura hidrolítica de enlaces

glicosídicos de la L-ramnosa (6-deoxy-L-manosa) en ramnósidos naturales o sintéticos tales como heteropolisacáridos, flavonoides y compuestos aromáticos (geraniol, nerol, etc). En la tabla 1 se indican algunos sustratos y aplicaciones de las ramnosidasas.

Hidrólisis de flavonoides

Las aplicaciones tecnológicas de las α -L-ramnosidasas en la industria alimenticia son varias, tales como quitar el sabor amargo típico de la naringina de jugos de frutas cítricas y la eliminación de cristales de hesperidina del jugo de naranja.

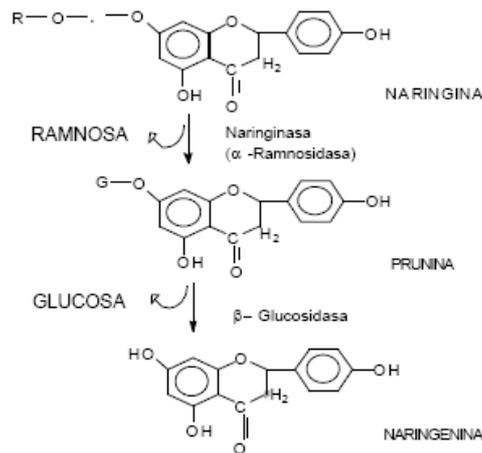


Figura 4: Hidrólisis de naringina por α -L-ramnosidasa y β -glucosidasa para dar ramnosa, glucosa, prunina y naringenina.

En el caso de la hidrólisis de naringina, libera una molécula de ramnosa y también una molécula de prunina, la cual contiene el aglicón naringenina y una molécula de glucosa. La naringina es soluble a partir de pH 9, por lo cual es conveniente que para la hidrólisis de este flavonoide la α -L-ramnosidasa utilizada sea activa a pH básico.

En el caso que el sustrato sea la hesperidina también se libera una molécula de ramnosa y el otro producto de la reacción es el aglicón flavonoide hesperitina unido a una molécula de glucosa. En resumen, en el caso de los flavonoides siempre se libera una molécula de ramnosa más un β -

D-glicósido flavonoide. La ramnosa es ampliamente usada en la industria como se comentara más adelante, mientras que el otro producto de reacción puede variar en su valor comercial.

A pesar del interés industrial, muy pocas preparaciones crudas de α -L-ramnosidasa se encuentran comercializadas. Hasta ahora, las más comunes son las llamadas naringinasas que poseen también actividad β -glucosidasa. En este caso en los hidrolizados obtenidos a partir de naringina se encuentra no solo prunina y ramnosa, una mezcla que puede ser fácilmente separada, sino una mezcla de prunina y ramnosa con cantidades significativas de naringenina y glucosa. Es por esto que la presencia de esta segunda actividad enzimática es un inconveniente en la producción de ramnosa y prunina.

La prunina posee actividad antiviral ¹⁴, puede ser utilizada como edulcorante para diabéticos ¹⁵ y se ha demostrado capacidad de protección de la mucosa gástrica en modelos animales.

La L-ramnosa es un químico fino que se utiliza tanto en ámbitos científicos e industriales como material de partida en la síntesis de compuestos orgánicos. Particularmente, se la usa en la producción de compuestos odorantes y saborizantes (Furaneol™) de alto valor agregado. Un uso potencial todavía no totalmente examinado es su uso como intermediario quirral en síntesis orgánica ¹⁶⁻¹⁸.

Como se describió hasta el momento, la ramnosa puede obtenerse comercialmente a partir de flavonoides tales como naringina (de cáscara de Citrus), rutina (de una variedad de plantas) o quercitrin (de corteza de arce), mediante hidrólisis química, con una serie de inconvenientes (uso de sustancias tóxicas o corrosivas y producción de grandes cantidades de efluentes contaminantes) ^{2;12;13;16-18}. Otra alternativa de producción es a partir de polisacáridos de plantas o microorganismos que contienen ramnosa en su estructura o bien a partir de ramnolípidos de origen microbiano. En ambos casos, el costo del proceso en su totalidad es alto y el mismo conlleva a problemas similares a los antes descritos.

Industria vitivinícola. Liberación de terpenos ligados

Existen otras aplicaciones además de la hidrólisis para la obtención de ramnosa o el tratamiento de productos derivados de los cítricos.

Una aplicación interesante de la α -L-ramnosidasa es su uso en la industria vitivinícola para aumentar el aroma de los vinos mediante la hidrólisis de enlaces glicosídicos en terpenos ligados, no volátiles, que no contribuyen al aroma, convirtiéndolos en terpenos volátiles^{6;7}.

Para que la α -L-ramnosidasa pueda ser utilizada en esta aplicación, la enzima debe ser activa en medios ácidos y en presencia de etanol a los porcentajes presentes en el vino.

El aroma potencial contenido en los terpenos glicosilados de la uva permanece casi inalterado durante la fabricación del vino^{6;7}.

La hidrólisis enzimática para la liberación de los terpenos ligados es llevada a cabo por varias enzimas que actúan secuencialmente de acuerdo a dos pasos: primero una α -L-ramnosidasa, α -L-arabinosidasa o una β -D-apiosidasa realizan el corte del azúcar terminal liberando ramnosa, arabinosa, o apiosidasa y el correspondiente β -D-glucósido. La liberación de los monoterpenoles tiene lugar luego de la hidrólisis por una β -D-glucosidasa^{7;19}.

Se ha observado la liberación eficiente de monoterpenoles como linalool y geraniol de precursores de aroma extraídos de jugo de uva Moscato.

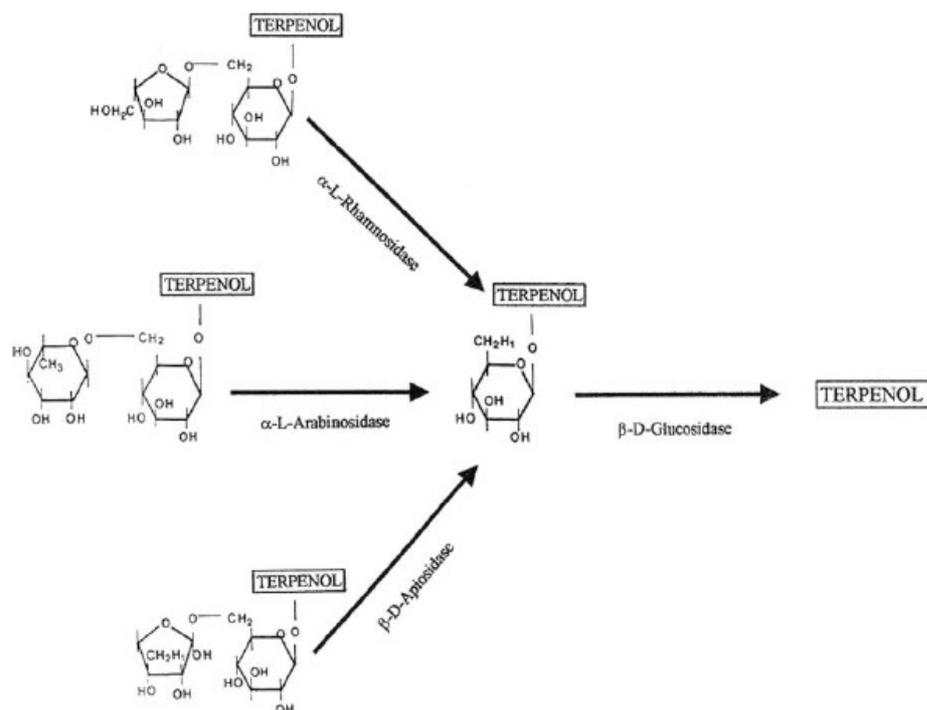


Fig. 5) Hidrólisis enzimática secuencial de los terpenos disacáridos, precursores del aroma del vino.

Hidrólisis de saponinas

La industria farmacéutica emplea también α -L-ramnosidasa para la producción de antibióticos y para la investigación de nuevos compuestos con principios activos obtenidos a partir de productos de origen vegetal.

El derivado deglicosilado (sin ramosa) del antibiótico cloropolisporina resulta en un potente antibiótico con acción sobre bacterias Gram positivas resistentes a otras drogas tales como meticilinas y otros antibióticos beta lactámicos.

La obtención y evaluación de nuevos compuestos farmacológicos a partir de compuestos naturales como saponinas y glicósidos pueden llevarse a cabo por medio de hidrólisis controladas con α -L-ramnosidasa de compuestos naturales. Esta estrategia es utilizada en la síntesis de sapogeninas y diosgeninas, precursores en la síntesis de drogas esteroides.

Dentro de las propiedades atribuidas a las saponinas se encuentran su

capacidad de actuar como estimulantes, diuréticos, inmunomoduladores e inhibidores de la agregación plaquetarias.

Las saponinas esteroides son de gran interés e importancia por su relación con compuestos como las hormonas sexuales, cortisona, esteroides diuréticos, vitamina D y heterósidos cardiacos. Algunas son utilizadas como material de partida para la síntesis de estos compuestos.

Por ejemplo, la diosgenina es la principal sapogenina empleada industrialmente. La diosgenina se obtiene por hidrólisis de la dioscina liberando dos moléculas de ramnosa y una de glucosa.²⁰

Tal como se indicó mas arriba, una fuente natural de importancia de saponinas es el árbol de ñame. Los aislados naturales contienen una mezcla de sapogeninas en forma glicosídica. Hasta 1970 se usó la diosgenina aislada del ñame de México (tubérculo de *la Dioscorea mexicana*), luego, la gran demanda de contraceptivos orales condujo a la búsqueda de nuevas fuentes de saponinas esteroidales precursoras, que por hemisíntesis pudieran conducir a la obtención de hormonas. La diosgenina puede ser utilizada para síntesis de corticoides mediante el empleo de fermentación microbiana, para introducir O en posición 11- α .

En la Fig. 6 se muestra la obtención de pogenterona a partir de dioscina con el uso de enzimas y posteriores reacciones químicas.

Otro sustrato potencial es el glicósido natural llamado desglucoruscin, este compuesto posee propiedades farmacológicas importantes como son el tratamiento de insuficiencias circulatorias crónicas y se encuentra en investigación su actividad cito estática en células de leucemia HL-60¹³.

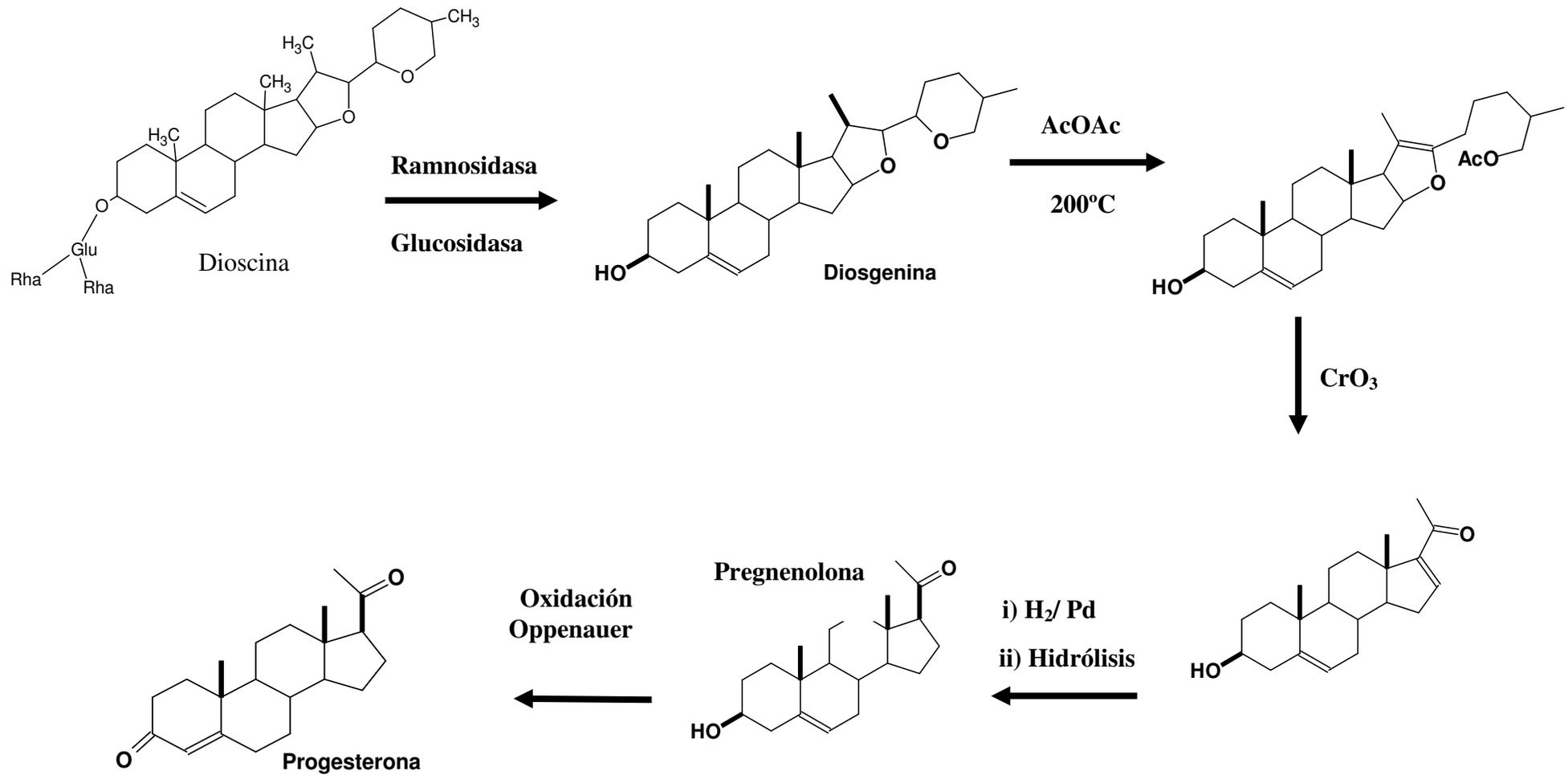


Fig. 6: Síntesis de progesterona a partir de Dioscina por via mixta, enzimática y química

La hidrólisis del desglucoruscín a cargo de la α -L-ramnosidasa da como productos de reacción ramnosa y desramnodesglucoruscín, este segundo con potenciales propiedades farmacológicas ¹³.

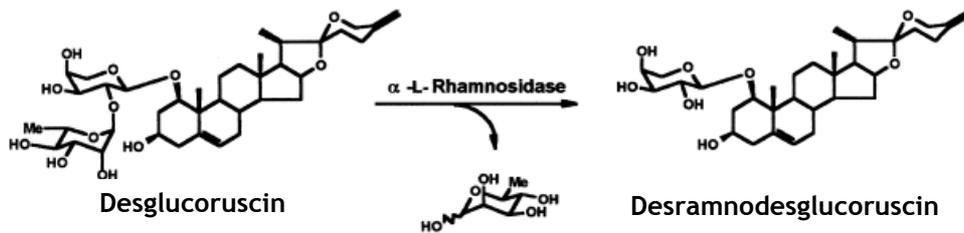


Fig. 7) Hidrólisis de desglucoruscín por α -L-ramnosidasa.

La mayoría de las reacciones descritas previamente se realizan a pH neutro o ácido. Sin embargo, los flavonoides son más solubles a pH alcalino por lo que la α -L-ramnosidasa alcalina de *Verticillum tenerum* puede resultar de gran utilidad en la hidrólisis enzimática de flavonoides para la obtención de ramnosa.

Objetivos

Los objetivos del presente trabajo fueron:

- Producir Ramnosidasa alcalina de *Verticillium tenerum* en medios con harina de soja y triptona como fuente de carbono y energía y fuente de nitrógeno respectivamente.
- Buscar condiciones de cultivo que maximicen la producción de enzima.
- Purificar parcialmente la enzima a partir del sobrenadante de los cultivos.
- Determinar parámetros de la enzima tales como pH óptimo, estabilidad térmica, etc.

Materiales y Métodos

Reactivos:

Se utilizó agar papa glucosado (APD) Merk, triptona de carne Difco, PNP-ramnopiranosido, PNP- glucopiranosido y la naringina SIGMA. La harina de soja fue provista por Biagro SA - Argentina. Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Cepa.

Microorganismo: *Verticillum tenerum* (Nees ex Pers.) El mismo se mantiene liofilizado con leche descremada (10% P/V) e inositol trifosfato (4% P/V) como crioprotector.

Medios de cultivo:

Agar papa glucosado (APG): según especificaciones del producto, pH 7.5

Medio líquido (g/l): Harina de soja (variable), triptona (variable), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, KCl 0.5, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, ácido cítrico 0.01, Naringina 1.25, Solución buffer 100 ml; solución de antibióticos 4 ml, pH 9.0 - 9.5.

Solución buffer (g/l): $K_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 0.9; Na_2CO_3 1.0.

Solución de antibióticos (g/l): estreptomicina 25.0, cloranfenicol 10.0.

La harina de soja, la triptona junto con las sales y la solución buffer se esterilizan por separado en autoclave por 30 min a 121° C. Los antibióticos se esterilizan por filtración.

Los medios de cultivo utilizados poseen idéntica composición en concentración de sales, buffer, naringina y antibióticos pero difieren en la concentración de harina de soja y triptona de acuerdo al diseño de Doehlert utilizado en este trabajo. El cultivo central (0) se realizó por triplicado para determinar la varianza de método.

Condiciones de cultivo

Cultivo stock: A partir de una muestra liofilizada, rehidratada, se siembra en agar papa glucosado (APD) y se deja crecer a 30° por 7 días. El

stock se mantiene a 4 °C bajo vaselina por 6 meses máximo.

Inóculo: A partir del cultivo stock se realizan inóculos en APD. Se mantienen 8 días a 30 °C. El tiempo de cultivo del inóculo es crítico para obtener reproducibilidad en los cultivos posteriores.

Cultivo: Se resuspenden los esporos del inóculo con 20 ml de una solución de Tween 0.05% (para obtener aproximadamente 2.5×10^5 conidios/ml) y se inocula cada uno de los erlenmeyer con 2 ml de esta suspensión.

Todos los cultivos (300 ml) se incuban durante 14 días, en un agitador rotatorio termostatzado New Brunswick a 30 °C y 200 RPM. Cada 24 o 48 horas se toma una muestra de 2 ml de cada uno de los cultivos. Estas alícuotas se centrifugan y en el sobrenadante se mide actividad enzimática (α -L-ramnosidasa y β -glucosidasa).

Medidas de actividad enzimática

Para la medición de actividad α -L-ramnosidasa y β -glucosidasa se utilizan como sustratos *p*-nitrofenil- α -L-ramnopiranosido (Sigma) y *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (Sigma) respectivamente. Estos compuestos al ser hidrolizados desarrollan en medio alcalino un color amarillo por la aparición del anión *p*-nitrofenolato u *o*-nitrofenolato²¹.

Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DU 640 a una longitud de onda de 405 nm a 37 °C. Las cinéticas se realizaron durante 30 min, con lecturas en intervalos de 20 segundos. El *p*-nitrofenolato liberado posee un coeficiente de extinción molar (ϵ) equivalente a $18500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

La mezcla de reacción contiene:

- 250 μl Buffer Tris-HCL 20mM CaCl_2 1mM
- 100 μl Reactivo pnp-ramnopiranosido o pnp-glucósido 0.014 g/l
- 100 μl Muestra

Se define la unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que hidroliza un μmol de sustrato por minuto en las condiciones de reacción.

Purificación de la enzima

Las cromatografías se realizaron en un equipo AKTA-FPLC Amersham. Todos los pasos de purificación se realizaron a temperatura ambiente.

Una vez alcanzado el máximo de actividad ramnosidasa, el cultivo se cosecha y se centrifuga a 7000 g durante 10 min (Rotor GSA - Sorval). Debido a que la enzima α -L-ramnosidasa es extracelular, se descarta el pellet del cultivo y se continúa la purificación con el sobrenadante del cultivo. A fin de extraer restos de micelio que pudieran haber quedado el sobrenadante se filtra primero con papel de filtro (Watman N°1) y luego con filtros de acetato de celulosa de 0.45 μ de poro.

El extracto filtrado se concentra por evaporación a presión reducida a 40 °C, seguida por precipitaciones sucesivas con sulfato de amonio a 0 °C. A 10 ml de extracto de cultivo concentrado por evaporación se le agrega una cantidad tal de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para llegar a una concentración de 25% de saturación. Se agita durante 20 minutos en hielo y luego se centrifuga a 10000 rpm durante 10 minutos. Se mide actividad α -L-ramnosidasa y β -glucosidasa al precipitado obtenido en la centrifugación. El sobrenadante de cada etapa se vuelve a tratar de la misma manera para llevarlo a 40%, 60%, 70% y 80% sucesivamente. Antes de cada etapa siguiente se mide ambas actividades enzimáticas.

El precipitado obtenido con 80% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se re-disuelve en buffer Tris-HCl, 20 mM pH 7.0 a una concentración 100 X respecto del original, y se desaliniza empleando una columna Sepharosa G25 equilibrada con buffer Tris HCl pH 7.0 20 mM a los efectos de desalinizar la muestra para las subsiguientes etapas secuenciales de purificación mediante cromatografías de intercambio iónico, y tamiz molecular. La solución enzimática resultante se inyecta en una columna de intercambio aniónico HiLoad 16/10 Q Sepharose®. Las proteínas adsorbidas son eluidas usando un gradiente lineal de NaCl. Las fracciones que contienen actividad α -L-ramnosidasa, obtenidas con concentraciones de NaCl de entre 0.47 y 0.55 M, se colectan y liofilizan. Las fracciones liofilizadas se disuelven en buffer Tris-HCl a pH 9 y se continúa con la purificación con una columna de exclusión molecular Sephacryl® S100 HR. La elución se lleva a cabo con el mismo buffer, los picos con actividad α -L-ramnosidasa y β -glucosidasa se juntan y liofilizan.

Diseño experimental y análisis estadístico. Diseño de superficie de respuesta.

En las últimas décadas los métodos estadísticos han sido aplicados a la optimización de medios para métodos industriales. Estos ensayos incluyen diseños de bloques y factoriales a fin de identificar aquellos componentes que poseen algún efecto sobre la variable que se desea optimizar seguido de uno o más ensayos de superficie de respuesta para obtener las concentraciones de los componentes estudiados que magnifiquen total o localmente la variable deseada²². Los métodos de superficie de respuesta permiten estudiar el efecto de distintas variables y sus interacciones con relativamente pocos experimentos.

Un diseño propuesto por Doehlert²³ se seleccionó para estudiar las superficies de respuesta tanto para la optimización del medio de cultivo como para el análisis de estabilidad de la enzima.

El método de Doehlert es un diseño de superficie de respuesta en el que los puntos experimentales se eligen de forma tal que queden equidistantes de un punto central. Este diseño permite describir una región alrededor de una respuesta óptima y contiene $k^2 + k + 1$ puntos donde k es el número de variables²³⁻²⁵. Si se estudia el efecto de dos, como se hizo en este trabajo, deben estudiarse la respuesta en 7 puntos distintos, uno central y 6 distribuidos alrededor de él. La figura resultante en este caso es un hexágono. En este caso la cantidad de experimentos necesarios es 9 debido a que el punto central se realiza por triplicado para determinar la varianza propia del experimento.

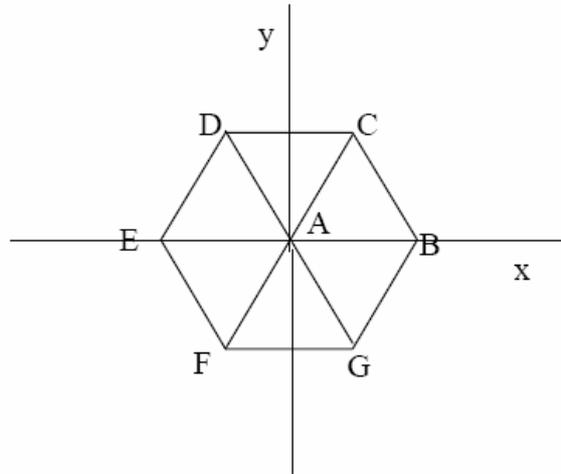


Fig.8) Puntos del hexágono utilizados en el diseño de las superficies de respuesta.

A fin de determinar el valor en todos los puntos de las variables x e y , y para asegurar que estos estén equidistantes se toma como imagen generatriz al triángulo equilátero ABC de lado unitario y se determina la posición de cada punto tomando arbitrariamente al punto A como $x = 0$, $y = 0$. Teniendo en cuenta este valor, los extremos del triángulo quedan situados en:

- A (0.000, 0.000)**
- B (1.000, 0.000)**
- C (0.500, 0.866)**

El resto de los extremos del hexágono se ubican en los siguientes puntos.

- D (-0.500, 0.866)**
- E (-1.000, 0.000)**
- F (-0.500, -0.866)**
- G (0.500, -0.866)**

A fin de generalizar las coordenadas de los vértices de la figura característica del modelo (en este caso el hexágono) se aprovecha la propiedad de que cada punto surge de la sustracción de dos puntos cualesquiera de la figura generatriz (en este caso el triángulo ABC) Por

ejemplo, el punto D resulta de C - B, E resulta de A - B, etc. Este cálculo resulta de perogrullo cuando se trabaja con dos variables pero es muy práctico cuando el modelo se complica y se usan tres variable o más.

Las coordenadas del hexágono se denominan variables codificadas y a partir de ellas se calculan los valores reales de las variables x e y. Para ello se deben definir los límites del universo muestral, es decir, los valores máximos y mínimos de las variables a ensayar. En base a ellos se calculan los rangos para cada variable (real) y se calcula el resto de los puntos basándose en una relación lineal entre el valor codificado y el valor real según la expresión:

$$x_{real} = x_{codif} \times \frac{\Delta x_{real}}{\Delta x_{codif}} + x_0$$

donde X_0 es el valor real del punto central del diseño (el valor central del rango correspondiente) X_{codif} es el valor codificado que entrega el modelo y ΔX_{real} y ΔX_{codif} son las diferencias entre el valor más alto y el valor mas bajo de los números reales y codificados respectivamente. Para dos variables, se estudian tres valores de la primera y cinco de la segunda.

Una vez realizada la experiencia y medida la variable dependiente (en nuestro caso actividad α -L-ramnosidasa) se determinan los coeficientes de un polinomio del tipo $z = b_0 + b_1x + b_2y + b_{11}x^2 + b_{22}y^2 + b_{12}xy$. Los coeficientes se determinan por el método de cuadrados mínimos. La forma más sencilla de manejar este número de datos es mediante el cálculo matricial.

Si se definen las siguientes matrices.

$$X = \begin{pmatrix} 1 & x_1 & y_1 & x_1^2 & y_1^2 & x_1y_1 \\ 1 & x_2 & y_2 & x_2^2 & y_2^2 & x_2y_2 \\ 1 & x_3 & y_3 & x_3^2 & y_3^2 & x_3y_3 \\ 1 & x_4 & y_4 & x_4^2 & y_4^2 & x_4y_4 \\ 1 & x_5 & y_5 & x_5^2 & y_5^2 & x_5y_5 \\ 1 & x_6 & y_6 & x_6^2 & y_6^2 & x_6y_6 \\ 1 & x_7 & y_7 & x_7^2 & y_7^2 & x_7y_7 \\ 1 & x_8 & y_8 & x_8^2 & y_8^2 & x_8y_8 \\ 1 & x_9 & y_9 & x_9^2 & y_9^2 & x_9y_9 \end{pmatrix} \quad B = \begin{pmatrix} b_0 \\ b_1 \\ b_2 \\ b_3 \\ b_4 \\ b_5 \end{pmatrix} \quad Z = \begin{pmatrix} z_1 \\ z_2 \\ z_3 \\ z_4 \\ z_5 \\ z_6 \\ z_7 \\ z_8 \\ z_9 \end{pmatrix}$$

Donde los x_i e y_i son los valores codificados de x e y para cada experiencia, B es el vector de los coeficientes a determinar y Z es el vector de los resultados experimentales de cada ensayo, se observa que $X * B = Z$. Este es un sistema de ecuaciones redundantes, con más ecuaciones que incógnitas, así que no puede despejarse directamente B del producto anterior. Para resolverse este sistema se debe obtener la matriz pseudo inversa de X a partir de $(X^T X)^{-1} * X^T$ donde X^T es la matriz transpuesta de X .

Como hay más ecuaciones que incógnitas los valores obtenidos para los parámetros son estimadores que minimizan la distancia entre las variables reales y las obtenidas. Realizando el análisis de varianza de los resultados obtenidos para cada parámetro del polinomio se decide cuales de ellos son significativos y cuales no. Con aquellos que son significativos se vuelven a calcular los parámetros del polinomio y con ellos puede realizarse el gráfico de la superficie de respuesta o bien calcular en forma analítica la existencia de máximos o mínimos en la zona del estudio.

En este trabajo el método de Doehlert fue aplicado en 2 casos: en el primero para encontrar las concentraciones óptimas de Harina de Soja y Triptona en el medio de cultivo líquido para la producción de la enzima α -ramnosidasa de *Verticillium tenerum* y en el segundo caso para caracterizar la estabilidad de dicha enzima en un amplio rango de pH y temperatura.

Estabilidad enzimática

Se preparó un buffer conteniendo Glicina (Gly), ácido morfolinoetansulfónico (MES) y Tris (todos presentes en una concentración 20 mM) con el cual se prepararon los buffers necesarios para el ensayo de estabilidad.

Los buffer MES, Tris y Gly son efectivos como tales en los rangos de pH 5.5 - 6.7, 7.2 - 9 y 8.8-10.6 respectivamente. Al estar los tres presentes en el buffer de los ensayos de estabilidad enzimática nos aseguramos tener pH estable entre 6 y 11, y que no sea la ausencia o presencia de alguno de los tres buffers lo que afecte el ensayo. Las condiciones del ensayo se determinaron mediante el diseño de Doehlert.

Alícuotas de 20 ml de este buffer madre fueron llevados a los valores

de pH y temperatura indicados por el diseño.

Este ensayo se realizó con un extracto enzimático del sobrenadante del cultivo que fue pasado por PD10 y liofilizado para concentrarlo 10 veces. También se realizó con enzima parcialmente purificada y liofilizada para concentrarla 10 veces.

100 μ l de ambos extractos enzimáticos fueron diluidos en 900 μ l de cada uno de los buffers preparados y se midió actividad α -L-ramnosidasa y β -glucosidasa a tiempo 0 horas. Luego fueron incubados durante 3 horas a las temperaturas y pHs indicados.

Luego de las tres horas, se llevaron los 18 tubos 20 minutos a hielo, para luego medir actividad enzimática.

HPLC

Para la determinación cuantitativa de glucosa y ramnosa se utilizo un equipo de HPLC que consta de: Detector IR 2414 Waters, Columna Shodex SC011, Bomba Binaria Waters 2996. Se uso como solvente agua desionizada filtrada a un flujo de 0.6 ml/min. Durante el análisis la temperatura de la columna fue de 85 °C y la temperatura del detector, de 45°C.

Para la separación, identificación y cuantificación de los flavonoides naringina, naringenina y prunina se utilizó un equipo de HPLC que consta de: Detector de Arreglo de Fotodiodos Waters2996, Auto inyector Waters 717 plus, Bomba Binaria Waters 2996, Columna Symmetry C18 3.9mm x 150 mm. Durante las corridas (10 minutos totales), se utilizó en los primeros 4 minutos un flujo: 0.68 ml/min acetonitrilo: 0.32 ml/min H₂O y luego de los 4 minutos un flujo de 1 ml/min de acetonitrilo²⁶.

Todos los solventes utilizados fueron filtrados con filtros con un tamaño de poro de 0.45 μ m y desgasificado mediante agitación en vacío.

pH óptimo.

Para realizar este ensayo se preparo un stock de Naringina 7 mM en buffer Tris-Mes 40 mM, esta solución, se diluyo a la mitad con agua destilada, y mediante el agregado de NaOH 0.1 M y HCl 0.1 M se llevaron 13 alícuotas a los siguientes pH: 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0,

11.5, 12.0.

Para la reacción se mezclaron 900 μl de cada uno de los buffer con 100 μl de extracto enzimático previamente purificado. En el caso de los blancos de sustrato se reemplazo el extracto enzimático por agua destilada.

Las mezclas de reacción para todos los pH se incubaron durante 3 horas a 37°C.

Se tomaron 2 alícuotas de 300 μl de cada uno de los tubos una del tiempo inicial y otra a las tres horas de reacción.

Para detener la reacción, se agregaron 300 μl de una solución de H_3PO_4 60 mM con 52% de acetonitrilo.

Las muestras se filtraron con un filtro de poro de 0.45 μm de diámetro y se cuantifico naringina, naringenina y prunina por HPLC.

Resultados y discusión.

Optimización del medio de cultivo

Luego de varios cultivos en los cuales la actividad enzimática recuperada varió sin razón aparente independientemente del medio de cultivo, se encontró que el inóculo en PDA de *Verticillium tenerum* debe tener una edad de 7 u 8 días al momento de comenzar los cultivos en medio líquido, ya que la edad del inóculo influye en la expresión tanto de la α -L-ramnosidasa como de la β -glucosidasa.

Cuando se utilizan inóculos de 11 días de antigüedad, se observa actividad α -L-ramnosidasa pero con un nivel de expresión menor al observado con inóculos de una semana y los valores de β -glucosidasa en estos casos son mucho más elevados, lo cual no es conveniente ya que uno de los objetivos es obtener un extracto enzimático con la menor cantidad posible de β -glucosidasa al momento de iniciar la purificación.

Para maximizar la expresión de la α -L-ramnosidasa se variaron las concentraciones de harina de soja y triptona acorde a un diseño de Doelhart tal cual se explicó en materiales y métodos. La concentración de peptona varió entre 0 y 6.25 g/l y la de harina de soja entre 5 y 20 g/l. Teniendo en cuenta estos valores y los codificados del modelo para dos variables, las condiciones de los 7 experimentos fueron las indicados en la tabla 2.

Cultivo	Triptona (g/l)	Harina de Soja (g/l)
A	3.12	12.5
B	6.25	12.5
C	4.69	20.0
D	1.56	20.0
E	0.00	12.5
F	1.56	5.0
G	4.69	5.0

Tabla 2: Medios de cultivo utilizados en la superficie de respuesta

En total se realizaron 9 cultivos. Hasta el día 7 de cultivo se tomaron muestras cada 48 horas, pasado dicho día se tomaron muestras cada 24 horas. A cada muestra se le determinó pH, actividad α -L-ramnosidasa y β -glucosidasa.

El perfil de pH fue similar en todos los cultivos independientemente de la composición del medio de cultivo.

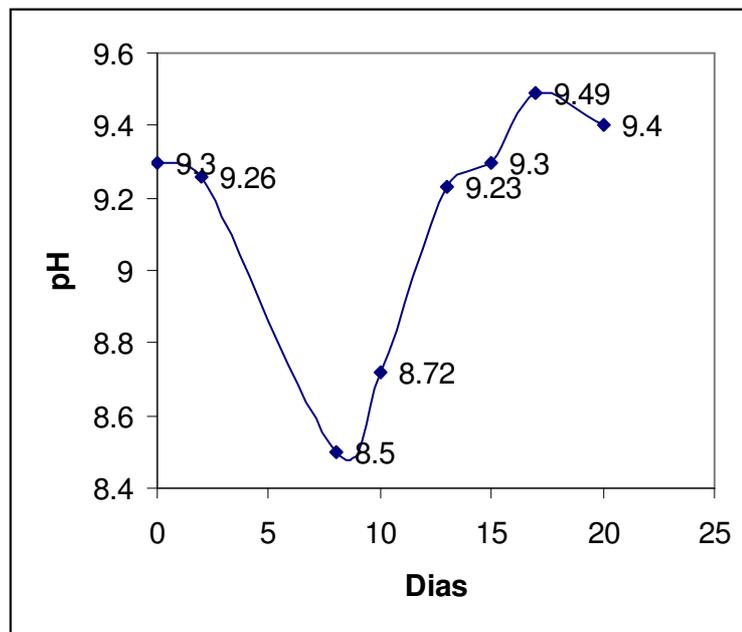


Fig.9: Perfil de pH del cultivo nº 4 de la superficie de respuesta (0 g/l triptona, 12,5 g/l harina de soja)

Al comienzo del cultivo el pH disminuye, pero luego la producción de amonio por *Verticillium tenerum* hace que el pH comience a ascender. El momento en que la actividad α -L-ramnosidasa alcanza su valor más alto coincide con el máximo de pH alcanzado durante el cultivo.

Se vio que cuando *Verticillium tenerum* crece en forma de pellet, se fija a los gránulos de harina de soja y el micelio crece hacia fuera del mismo.

En todos los casos, el valor máximo de actividad α -L-ramnosidasa se observa entre los 12 y 16 días de cultivo, independientemente de su composición, a partir del cual esta actividad comienza a disminuir.

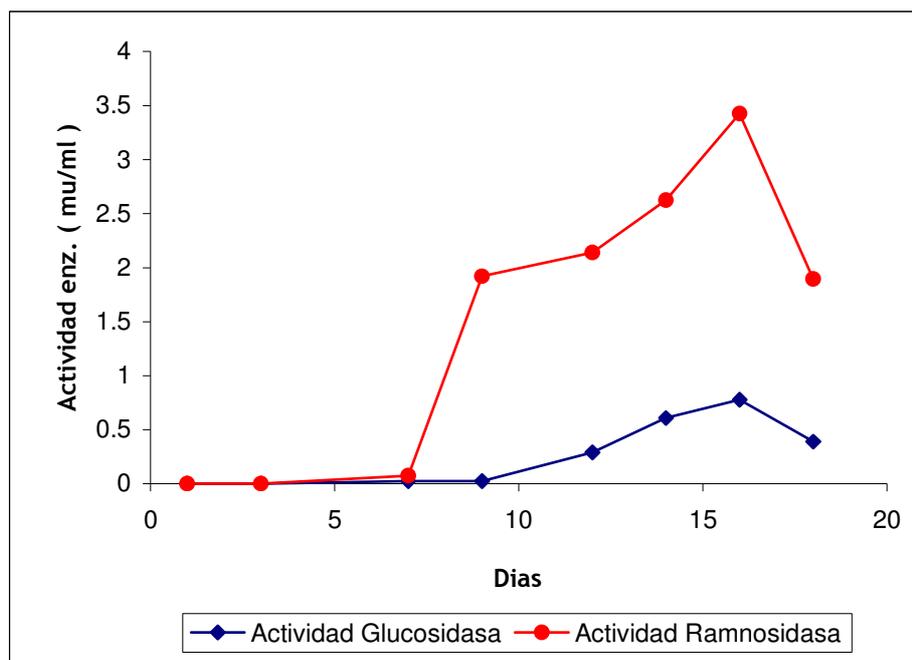


Fig.10: Perfil de actividad α -L-ramnosidasa y β -glucosidasa desarrollada a lo largo del cultivo n° 4 de la superficie de respuesta

A partir de los datos obtenidos por el seguimiento de la actividad enzimática se determinó que al día 16 se encuentra la mayor actividad α -L-ramnosidasa. Con los valores de actividad de cada uno de los cultivos de dicho día se llevo a cabo el análisis por regresión múltiple (Tablas 3 y 4).

	Triptona (g/l)	Harina de soja (g/l)	Actividad enzimática (mU / ml)
A	3.12	12.5	2.79
A	3.12	12.5	2.72
A	3.12	12.5	2.74
B	6.25	12.5	2.52
C	4.69	20	1.87
D	1.56	20	2.98
E	0	12.5	3.42
F	1.56	5	2.79
G	4.69	5	2.33

Tabla 3: Valor de las variables independientes y respuesta en el diseño de superficie de respuesta. Actividad enzimática máxima obtenida en el día 16

Con los coeficientes calculados se determinó la ecuación de un polinomio que describe la actividad α -L-ramnosidasa en función de la concentración de harina de soja y triptona.

	Coeficiente	P
Constante	2.75	
Lineal: Harina de soja	-0.0776	0.0719
Lineal: Triptona	-0.563	0.0015
Cuadrático: Harina de soja	-0.4157	0.0069
Harina de soja x Triptona	-0.3796	0.0131
Cuadrático: Triptona	0.2247	0.0229
Lack of fit		0.0181
$R^2 = 0.94$		

Tabla 4) Valor de los coeficientes, calculados por ANOVA, en el modelo obtenido de acuerdo al diseño de Doehlert.

El polinomio resultante es:

$$Act(U/ml) = 2.75 - 0.563 \cdot T - 0.0776 \cdot HS + 0.2247 \cdot T^2 - 0.3796 \cdot HS \cdot T - 0.4157 \cdot HS^2$$

Representando este polinomio en el universo elegido para confeccionar el hexágono se obtuvo la superficie de respuesta que se muestra en la figura 11.

En la superficie de respuesta puede observarse que la triptona ejerce un efecto inhibitorio sobre la expresión de la enzima con cualquier concentración de harina de soja mientras que el comportamiento de la enzima frente a la concentración de harina de soja es dependiente de la concentración de triptona. Así, mientras que a bajas concentraciones de triptona, se observan máximos en la expresión de la enzima a valores altos de harina de soja, a medida que la concentración de triptona se incrementa, se observa que los máximos se corren a valores menores de harina de soja. Si bien los datos no son categóricos, esta interacción negativa puede deberse a que ambos sustratos proveen al medio de cultivo de péptidos y que, sumados, ejerzan un efecto de inhibición sobre la expresión de proteínas. La causa de este resultado excede a los límites del presente trabajo y debe ser aun dilucidado.

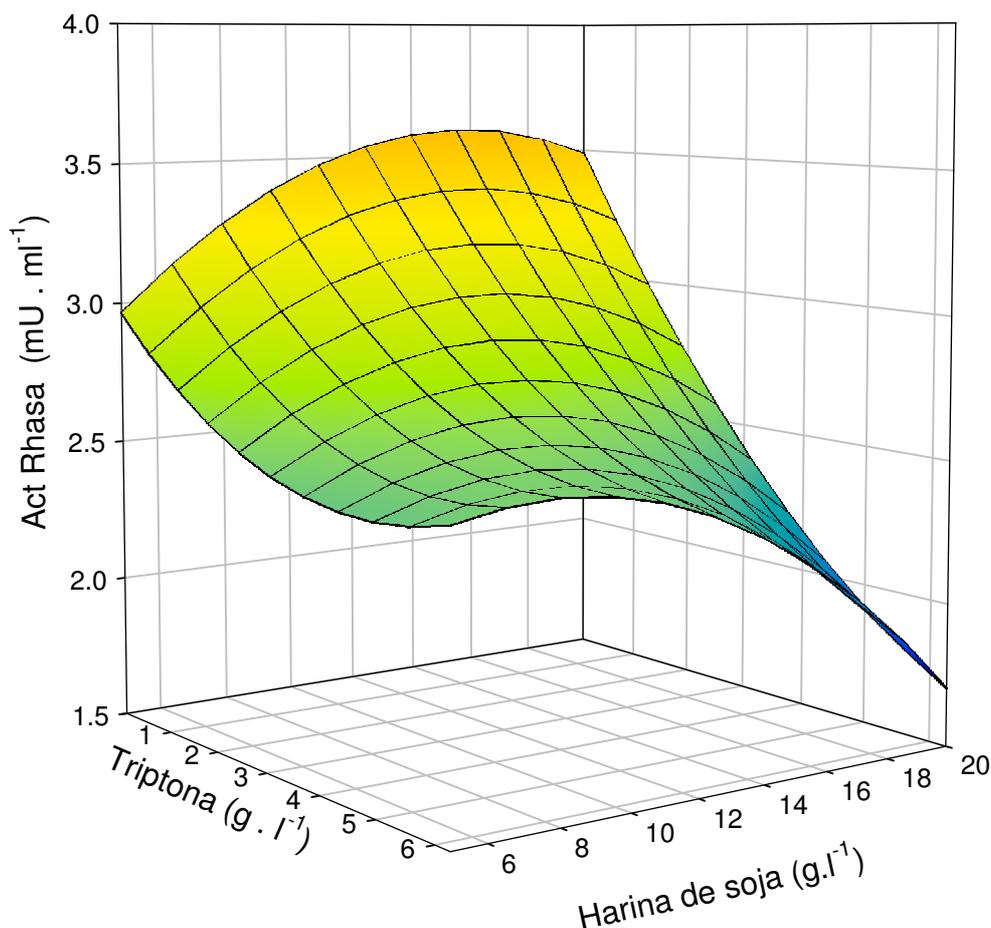


Fig. 11: Efecto de la concentración de triptona y harina de soja sobre la expresión de α -L-ramnosidasa.

Se observa un máximo absoluto en las superficies de respuesta cuando las concentraciones de triptona y harina de soja son 0 y 15 g/l respectivamente. Estas condiciones fueron elegidas para la producción de enzima para los siguientes estudios. En estas condiciones se obtuvo una actividad enzimática incrementada en tres veces con respecto a los medios utilizados anteriormente ².

Purificación enzimática.

El concentrado que se obtiene luego de la concentración es

intensamente coloreado debido a la presencia de pigmentos producidos por *Verticillium tenerum*. A partir de este extracto se realizó la precipitación con sucesivas concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El objetivo de este proceso fue, por un lado, concentrar la enzima y, por el otro, descartar una importante proporción de pigmentos.

El precipitado final con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, obtenido entre el 80 y el 90 % de saturación, se disolvió en buffer Tris-HCl pH 7.20 y se pasó por una columna G25 a fin de desalinizar, las fracciones con actividad ramnosidasa se juntaron y se inyectaron en una columna de Sepharosa Q de intercambio aniónico. Este paso no resultó efectivo para resolver las actividades enzimáticas ramnosidasa y glucosidasa en fracciones de elución diferentes y se observó que no hay una gran interacción entre la columna y las fracciones proteicas, ya que en los cromatogramas correspondientes se ven picos muy anchos y sin resolver. Es posible que los pigmentos producidos por *Verticillium tenerum* sean moléculas cargadas y por lo tanto interfieran en la separación cromatográfica al interactuar con la columna aniónica (Dr. Osvaldo Cascone, comunicación personal).

En el siguiente paso, la cromatografía de exclusión molecular, tampoco se obtienen fracciones con actividad α -L ramnosidasa y β -glucosidasa en fracciones separadas, pero si se obtuvo un aumento de la actividad específica.

Paso	Actividad total (mU)	Proteína total (mg)	Actividad específica (mU/mg)	Rendimiento (%)
Cultivo concentrado	1318.03	46.4	28.41	100.0
Eliminación de sales	769.2	17.7	43.46	58.4
Intercambio iónico	723.61	16.5	43.86	54.9
Exclusion Molecular	352.84	5.7	61.90	26.8

Tabla 5: Purificación enzimática.

Estabilidad enzimática

A fin de determinar las condiciones de reacción de la enzima para hidrolizar naringina, se estudió la estabilidad de la enzima a diferentes temperaturas y pHs. Las condiciones del ensayo se determinaron mediante el diseño de Doelhart. En este caso se variaron pH y temperatura entre 6.00 y 11.00 y 37° y 60° respectivamente. El ensayo se realizó sobre un extracto crudo del sobrenadante de cultivo cuyo único tratamiento fue la concentración por liofilización y una desalinización.

Las actividades enzimáticas iniciales α -L-ramnosidasa y β -D-glucosidasa 9.817 mU/ml y 2.722 mU/ml respectivamente.

Los valores de las variables que se usaron para generar la superficie de respuesta y los resultados obtenidos se presentan en la tabla 9.

Experimento	pH	Temperatura	Actividad β -glucosidasa %	Actividad α -L-ramnosidasa %
A	8.5	48.5	0.36	74.9
B	11.00	48.5	20.66	71.08
C	9.75	60	0	0
D	7.25	60	3.93	2.90
E	6.00	48.5	0	77.4
F	7.25	37	100	100
G	9.75	37	68.41	100

Tabla 6) Actividad β -D-glucosidasa y α -L-ramnosidasa remanente luego de 3 horas de incubación a las condiciones indicadas.

En base a los resultados encontrados, se realizó un a superficie de respuesta en la que puede verse que la estabilidad de la enzima disminuya al aumentar la temperatura y disminuir el pH. La superficie resultante puede verse en la figura 12.

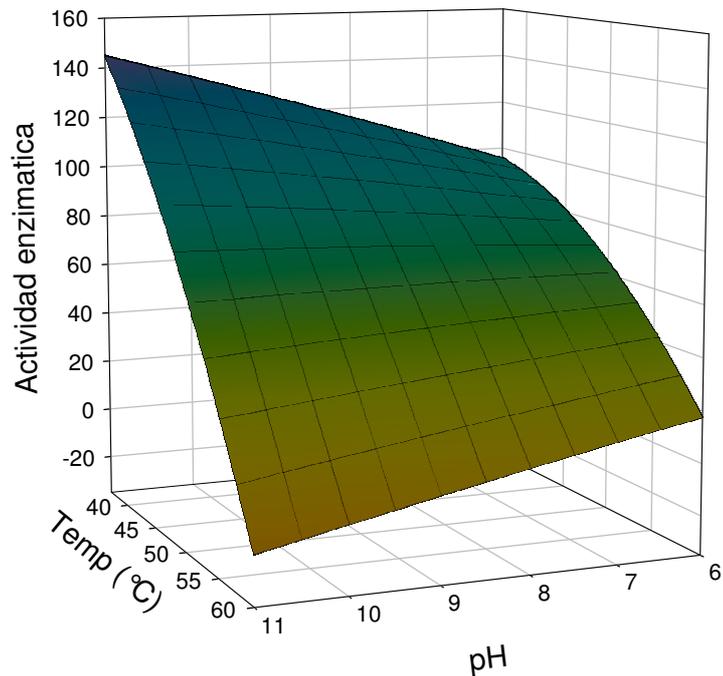


Figura 12) Efecto del pH y la temperatura sobre la estabilidad enzimática α -L-ramnosidasa.

Esta experiencia presentó además un resultado inesperado y muy positivo. La actividad β -D-glucosidasa resultó ser mucho más lábil que la α -L-ramnosidasa y luego de ser incubada por tres horas a 48 °C y pH 6.00, pierde completamente su actividad mientras que se mantiene el 77% de la actividad α -L-ramnosidasa.

En la figura 13 se indica la actividad relativa de cada una de las enzimas luego de la incubación de 3 horas.

Resulta claro que en cualquier condición de incubación, la actividad glucosidasa decae en mayor grado que la ramnosidasa.

La experiencia se repitió pero con la muestra de cultivo parcialmente purificada según el protocolo indicado en el punto anterior. Las condiciones de incubación y el protocolo de medida fue el mismo que en la experiencia anterior. En la figura 14 se muestra la actividad ramnosidasa remanente tanto de la muestra cruda como de la purificada.

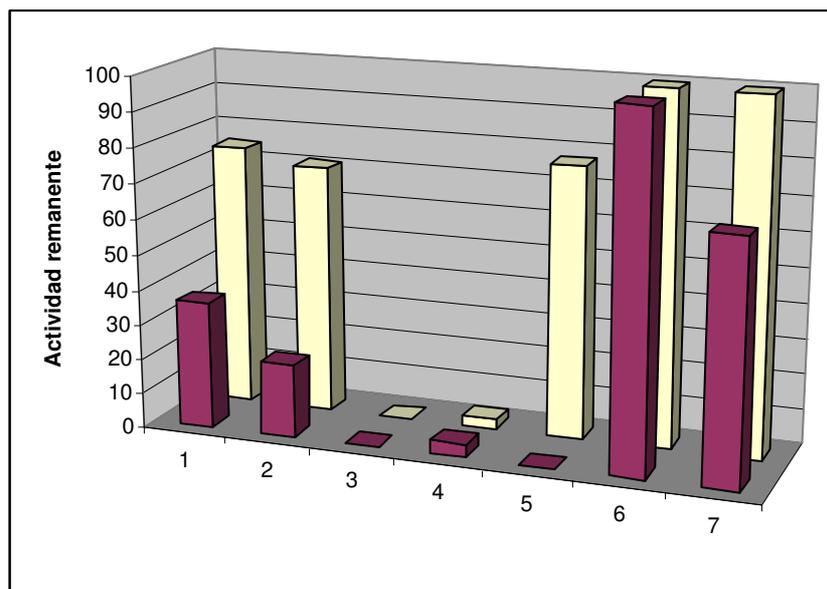


Fig.13) Esquema comparativo de la pérdida de actividad enzimática α -L-ramnosidasa ■ y β -glucosidasa ■ del extracto purificado sometido a las condiciones indicadas en la tabla 10.

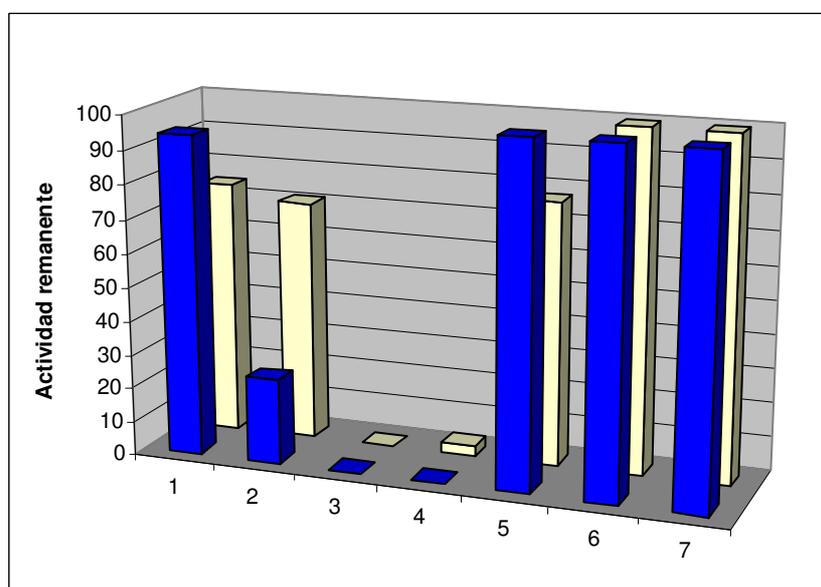


Figura 14) Esquema comparativo de la pérdida de actividad α -L-ramnosidasa ■ en el entorno del medio de cultivo y el extracto purificado ■.

Contrariamente a lo esperado, la estabilidad de la enzima purificada resultó mayor que la del extracto crudo. El perfil de estabilidad de la β -D-glucosidasa resultó semejante en ambas preparaciones. A 48°C y pH 6.00, la

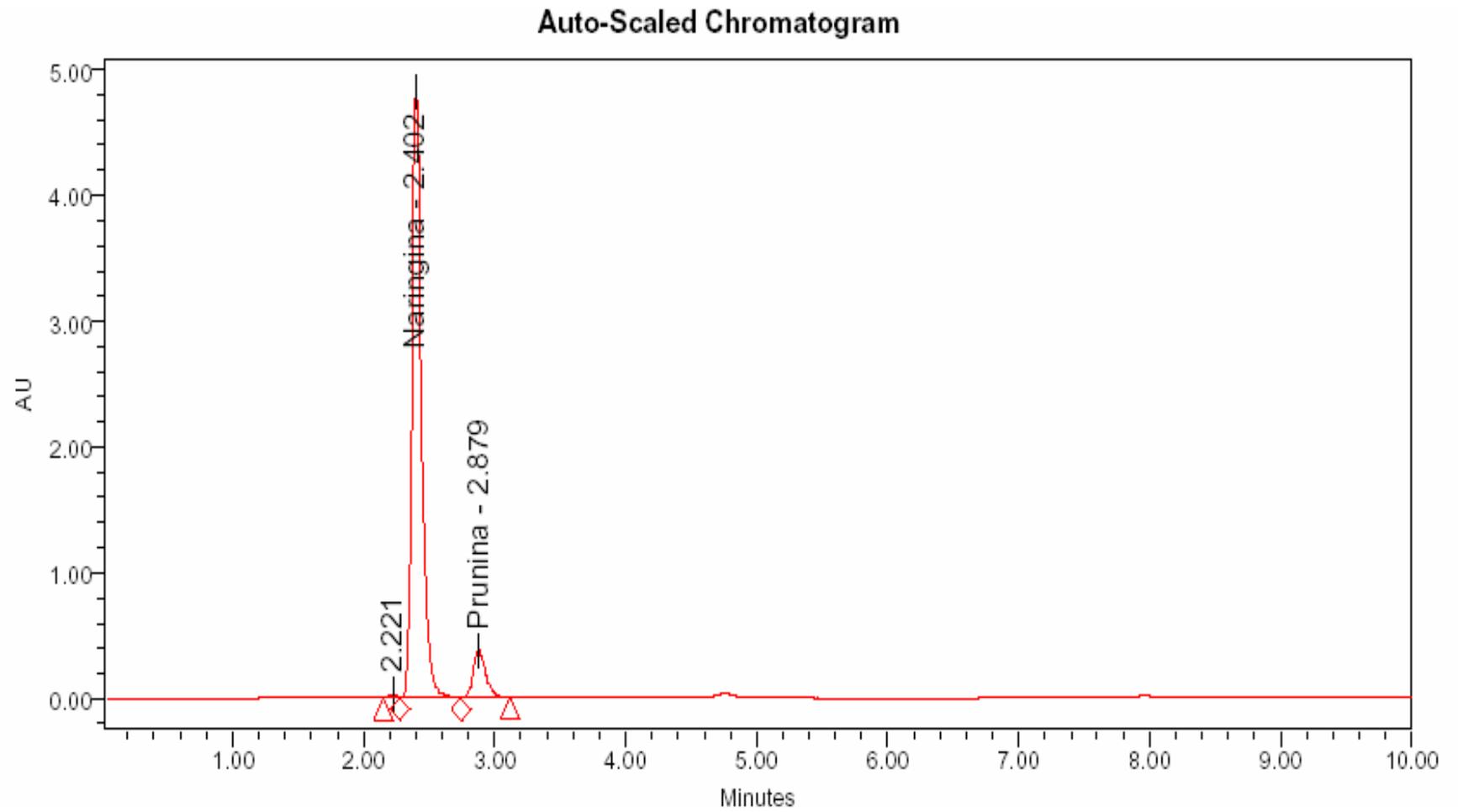
actividad de la muestra purificada se mantuvo intacta contra el 77 % recuperado en el extracto crudo. En estas condiciones, la actividad glucosidasa resultó nula.

Aunque el proceso cromatográfico no permitió la separación de las dos actividades, la inactivación por calor permite obtener una fracción que sólo contiene actividad α -L-ramnosidasa que puede ser utilizada para experimentos de caracterización posteriores y para evaluar su actividad frente a naringina y otros substratos naturales sin la interferencia de la β -glucosidasa. La ausencia de actividad glucosidasa fue luego confirmada por medidas realizadas en HPLC.

pH óptimo de reacción

Una vez obtenida una muestra con actividad α -L-ramnosidasa libre de glucosidasa se determinó el pH óptimo para la hidrólisis de naringina. Para ello se incubó la enzima con su substrato natural, naringina, en una concentración 3.5 mM durante 3 horas a 37 °C a diferentes pH en un rango entre pH 5.5 y 11.5. El extracto enzimático utilizado en este ensayo fue incubado previamente a 48.5°C y a pH 6 durante tres horas para evitar la actividad β -glucosidasa durante el ensayo. No se logró resolver la mezcla de azúcares por HPLC debido a que la ramnosa tiene un tiempo de retención igual a impurezas del medio de cultivo. Por esta causa se decidió cuantificar naringina, prunina y naringenina mediante una columna C18 según lo indicado en materiales y métodos. Los tiempos de retención de los flavonoides son de 2.40 minutos para la naringina, 2.88 para la prunina y 7.86 para naringenina.

No se encontró naringenina en las muestras analizadas lo que indica la ausencia de actividad β -glucosidasa lo que hace suponer que la inactivación térmica es irreversible. En la figura 15 se muestra un cromatograma típico luego de la acción de la mezcla enzimática inhibida por calor.



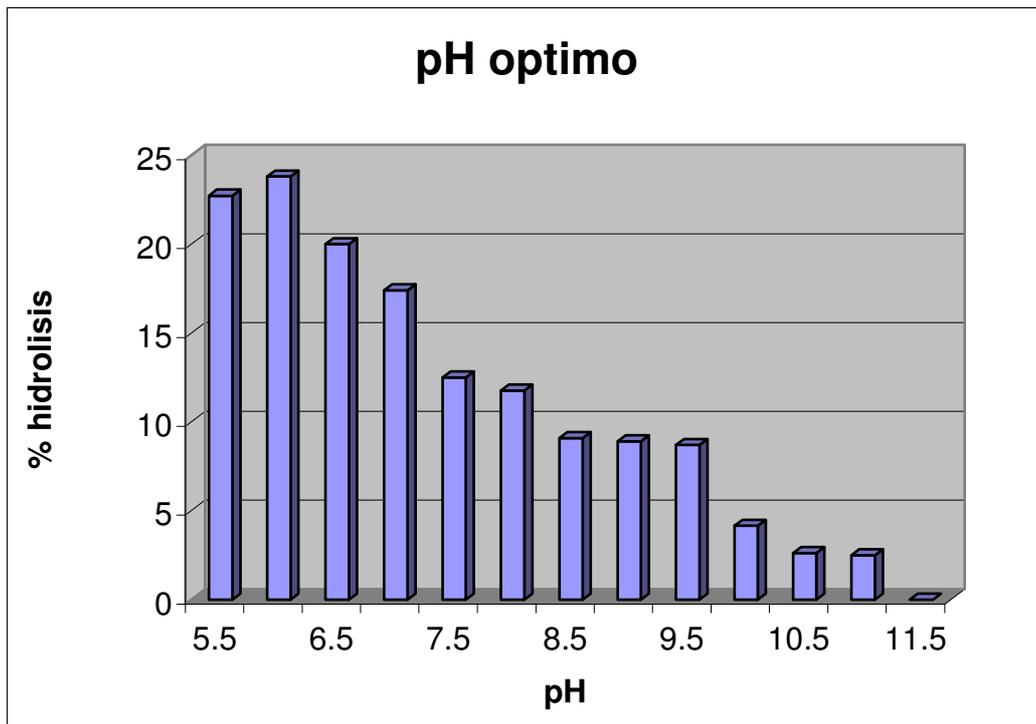


Fig.16) Porcentaje de hidrólisis de naringina por la α -L-ramnosidasa del extracto inactivado en diferentes condiciones de pH.

Los porcentajes de hidrólisis encontrados se presentan en la figura 22. Contrariamente a lo esperado, el máximo de actividad se encuentra a pH ligeramente ácido. Este resultado no es favorable ya que la naringina sólo es soluble a pH mayor a 9 por lo cual una de las ventajas es tener una enzima activa a pH alto. No obstante la enzima α -L-ramnosidasa de *Verticillium tenerum* a pH 9.5 todavía conserva el 37% de su actividad por lo que puede utilizarse en condiciones donde la solubilidad del sustrato sea buena. Otras condiciones posibles de hidrólisis exceden los límites de este trabajo y deben aun ser estudiadas.

Conclusiones

- *Verticillium tenerum* es capaz de crecer en medios con harina de soja como fuente de carbono y energía sin el agregado de triptona como fuente de nitrógeno, en cuyo caso la expresión de la α -L-ramnosidasa es mayor.
- La enzima es estable a temperaturas de hasta 48.5°C en un amplio rango de pH de 6 a 11.
- Se pudo obtener una preparación de α -L-ramnosidasa de *Verticillium tenerum* libre de actividad β -glucosidasa, mediante un simple tratamiento térmico a pH 6.
- El pH óptimo de reacción de la enzima es 6 pero conserva el 37% de su actividad a pH 9.5.

El medio con harina de soja resultó una buena opción para la producción de α -L-ramnosidasa. La optimización del medio de cultivo permitió incrementar en un factor de 3 la actividad enzimática con respecto a la obtenida anteriormente. Si bien no pudo cumplirse con el objetivo de separar mediante pasos de purificación a las dos enzimas, pudo obtenerse un preparado libre de actividad β -D-glucosidasa mediante una incubación a 43°C a pH controlado (pH 6). Con este preparado se pudo caracterizar, al menos parcialmente, a la α -L-ramnosidasa. La misma resultó muy estable a temperaturas menores de 50 °C en cualquier condición de pH. Si bien el pH óptimo de la enzima resultó ser más bajo de lo esperado dada la naturaleza alcalofílica del *Verticillium tenerum*, la enzima conserva una actividad aceptable a pH 9, medio en el que la naringina tiene su máximo de solubilidad. Los resultados obtenidos durante la realización del presente trabajo permitirán la puesta a punto de un futuro procesos de producción de ramnosa a partir de subproductos de la industria cítrica.

Referencias

1. Diaz, Leopoldo Hidalgo. Potencialidades de cepas autoctonas de *Verticillium chlamydosporium* (Goddard) como agentes de control biológico de *Meloydogine* spp. 2000. Universidad Central de las Villas. Cuba. 2000.
2. Rojas, N L, Cavalitto, S. F., and Voget, C. E. Hongos alcalinotolerantes como potencial fuente de enzimas de interés biotecnológico. 2004. Universidad Nacional de Quilmes. 7-4-2004.
3. Cabello M, Arambarri A. Diversity in soil fungi from undisturbed and disturbed *Celtis tala* and *Scutia buxifolia* forests in the eastern Buenos Aires province (Argentina). *Microbiol Res* 2002;157:p 1-11.
4. Garcia Mesa M, Armenteros Herrera DM, Vilas MM, Coma Alfonso C, Hernandez Carretero J, Diaz Batista A, Fernandez Montequini J. Plantas citricas en el tratamiento de enfermedades vasculares. *Rev Cubana Angiol y Circ Vasc* 2002;3:p 39-46.
5. Peterson JJ, Dwyera JT, Beecher GR, Bhagwatc. Seema A., Gebhardt SE, Haytowitcz DB, Holden JM. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis* 2006;19:p 566-573.
6. Lorenzo Bürger, Daniela Andrea, Bordeu Schwarze, Edmundo, and Belancic Majcenovic, Andrea. Evaluación analítica y sensorial de aromas en vinos Carménère producidos con cuatro cepas de levaduras. 2007. Pontificia Universidad católica de Chile. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal.
7. Maicas S, Mateo JJ. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005;67:p 322-335.
8. Gunata Z, Bayonove CL, Baumes RE, Cordonnier RE. The aroma of grapes. I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *J Chromatogr* 1985;331:p 83-90.
9. Riberau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Duborieu D. L'arôme des cépages., In: Dunod editor. *Traité d'oenologie. 2. Chimie du vin stabilisation et traitements.* Paris: 1998.
10. Miake F, Satho T, Takesue H, Yanagida N, Kashige N, Watanabe K. Purification and characterization of intracellular α -L-rhamnosidase from *Pseudomonas paucimobilis* FP2001. *Archives of Microbiology* 2000;173:p 65-70.
11. Birgisson H, Hreggvidsson GO, Fridjonsson OH, Mort A, Kristjansson JK, Mattiasson B. Two new thermostable α -L-rhamnosidases from a novel thermophilic bacterium. *Enzyme and Microbial Technology* 2004;34:p 561-571.
12. Pisvejcová, Andrea, Monti, Daniela, Sedmera, Petr, Tarabiono, Chiara, Lama, Marco, Riva, Sergio, and Kren, Vladimir. α -L-Rhamnosidases and their use in selective trimming of natural compounds. *An .Chem.Listy* 97, p 363-520. 1989.
13. Monti D, Pisvejcová A, Kren V, Lama M, Riva S. Generation of an α -rhamnosidase library and its application for the selective derhamnosylation of natural products. *Biotechnology and Bioengineering* 2004;87:p 763-771.
14. Kaul T, Middleton E, Ogra P. Antiviral affect of flavonoids on human viruses. *J Med Virol* 1985;15:p 71-79.

15. Roitner M, Schalkhammer T, Pittner F. Preparation of prunin with the help of immobilized naringinase pretreated with alkaline buffer. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1984;9:p 483-488.
16. Linhardt RJ, Bakhit R, Daniels L, Mayerl F, Pickenhagen W. Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose. *Biotechnology and Bioengineering* 1989;33:p 365-368.
17. Lang S, Wullbrandt D. Rhamnose lipids - biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999;51:p 22-32.
18. Maier R, Soberón-Chávez G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000;54:p 625-633.
19. Caprari C, Bergman C, Mighelli Q, Salvi G, Albersheim P, Darvill A, Cervone F, De Lorenzo G. *Fusarium moniliforme* secretes four endopolygalacturonases derived from a single gene product. *Physiol Mol Plant Pathol* 1993;43:p 453-562.
20. Elujoba A, Hardman R. Diosgenin production by acid and enzymatic hydrolysis of fenugreek. *Fitoterapia* 1987;58:p 299-303.
21. Romero C, Manjon A, Bastida J, Iborra JL. A method for assaying the rhamnosidase activity of naringinase. *Analytical Biochemistry* 1985;149:p 566-571.
22. Kennedy M, Krouse D. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1999;23:p 456-475.
23. Doehlert DH. Uniform shell designs. *Applied Statistics* 1970;p 231-239.
24. Sautour M, Rouget A, Dantigny P, Divies C, Bensoussan M. Application of Doehlert design to determine the combined effect of temperature, water activity and pH on conidial germination of *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Applied Microbiology* 2001;91:p 900-906.
25. Cavalitto SF, Mignone CF. Application of factorial and Doehlert designs for optimization of protopectinase production by a *Geotrichum klebahnii* strain. *Process Biochemistry* 2007;42:p 175-179.
26. Chien PJ, Sheu F. Monitoring Enzymatic Debittering in Grapefruit Juice by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis* 2001; 9:p 115-120.