



Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de La Plata

**α -L-ramnosidasa de *Acrostalagmus*
luteo-albus: optimización de la
producción, purificación y
caracterización.**

Laboratorio de Procesos Biotecnológicos

María Elena Fernández

2010

CINDEFI



CONICET

U N L P

El presente trabajo se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI) bajo la dirección del Dr. Sebastián Fernando Cavalitto y la co-dirección de la Dra. Natalia Lorena Rojas.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, por darme la posibilidad de realizar este trabajo en sus instalaciones.

A mi Director, Dr. Sebastián Cavalitto, por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por aceptar dirigirme, por ayudarme, por su amabilidad y su buen trato de siempre. ¡Gracias Tato!

A mi co-directora, Dra. Natalia Lorena Rojas, por enseñarme tanto, ayudarme y aconsejarme siempre. Por acompañarme no sólo en la realización de este trabajo, sino en tantas cosas. Por su buena predisposición, su paciencia, su cariño y su amistad. ¡Gracias Lore!

A mi amiga Luchí, por estar conmigo siempre, por compartir toda la carrera y este trabajo final juntas, por su ayuda, su apoyo, su paciencia, su confianza y su cariño. Por su gran amistad.

A la gente del CINDEFI, especialmente los integrantes del Laboratorio 1, y a Ceci, por ayudarme y enseñarme, por su buen trato, por hacerme sentir tan bien con su compañía y cariño.

A mis amigas y amigos, Andre, Cari, Caro, Juan, y a todos mis compañeros y amigos que compartieron conmigo estos años de estudio, por su ayuda, su compañía, su apoyo, por divertirme y por compartir tantos momentos tan lindos e inolvidables.

A todas las personas que estuvieron conmigo siempre dándome todo su cariño y apoyo. A mi Tío Carlos, y mi prima y gran amiga Lore. A todos aquellos que de una manera u otra estuvieron conmigo y me dieron cariño y ánimo durante el transcurso de mis estudios.

A mis hermanas, Ceci y Lucre, por quererme y cuidarme tanto, por aguantarme, por estar a mi lado siempre, acompañándome, apoyándome y aconsejándome. Por aprender tantas cosas de ellas, por la vida compartida.

A mis padres, María Elisa y Nicanor, por todo. Por la vida que me dieron y por su infinito cariño. Por su ejemplo de voluntad y esfuerzo, de lucha, trabajo y honestidad. Por darme la posibilidad de estudiar, por enseñarme con su ejemplo tantas cosas, por confiar en mí y apoyarme siempre, por hacer que esté orgullosa de ellos. ¡Muchas Gracias!

INDICE DE CONTENIDOS

LISTA DE ABREVIATURAS	5
1. INTRODUCCIÓN	7
1. 1. α -L-RAMNOSIDASA	7
1. 2. SUSTRATOS DE α -L-RAMNOSIDASAS	9
1. 2. 1. <i>Flavonoides</i>	9
1. 2. 2. <i>Terpenos</i>	13
1. 2. 3. <i>Saponinas</i>	14
1. 3. APLICACIONES Y PRODUCTOS DE α -L-RAMNOSIDASAS.....	15
1. 3. 1. <i>Hidrólisis de flavonoides</i>	15
1. 3. 2. <i>Industria vitivinícola. Liberación de terpenos ligados</i>	17
1. 3. 3. <i>Hidrólisis de saponinas</i>	17
1. 4. <i>ACROSTALAGMUS LUTEO ALBUS</i>	19
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3. 1. REACTIVOS QUÍMICOS	25
3. 2. MICROORGANISMOS Y PRODUCCIÓN DE INÓCULOS	25
3. 3. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	25
3. 4. ANÁLISIS DE REPRESIÓN CATABÓLICA POR CARBONO	26
3. 5. PROCESAMIENTO DE LOS CULTIVOS	26
3. 6. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	26
3. 7. PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA CON ACTIVIDAD RAMNOSIDASA	27
3. 8. TÉCNICAS ANALÍTICAS Y BIOQUÍMICAS	29
3. 9. CONDICIONES ÓPTIMAS DE REACCIÓN	30
3. 10. EFECTO DE CATIONES.....	30
3. 11. PARÁMETROS CINÉTICOS SOBRE PNP-RAM	30
3. 12. HIDRÓLISIS DE FLAVONOIDES.....	31
3. 13. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)	31
3. 14. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)	31
3. 15. ANÁLISIS DE HUELLAS PEPTÍDICAS	32
4. RESULTADOS	32
4. 1. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO	32
4. 2. ESTUDIO DE LA REPRESIÓN CATABÓLICA POR CARBONO.	34
4. 3. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA CON ACTIVIDAD RAMNOSIDASA.....	35
4. 4. CONDICIONES ÓPTIMAS DE REACCIÓN	39
4. 5. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ENZIMA	41
4. 6. PARÁMETROS CINÉTICOS SOBRE PNP-RAM	42

4. 7. EFECTO DE VARIOS CATIONES SOBRE LA ACTIVIDAD RHASA.....	42
4. 8. ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO SOBRE RAMNOGLUCÓSIDOS NATURALES	43
4. 9. CARACTERIZACIÓN PROTEÓMICA.....	45
5. CONCLUSIONES GENERALES.....	49
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

Lista de abreviaturas

APD	Agar papa dextrosado
BM	Buffer MES (ácido 2-N-morfolinoetano sulfónico) 20 mM pH 6.0
BMTG	Buffer MES 40 mM, TRIS 40 mM y Glicina 40 mM
TLC	Cromatografía en capa fina
CreA	Gen de la proteína de represión catabólica por carbono
CS	Cultivo Stock
FCE	Fuente de Carbono y Energía
FN	Fuente de Nitrógeno
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
Glu	Glucosa
Gluasa	β -D-Glucosidasa
HMWM	Marcador de alto peso molecular
H-NMR	Resonancia Magnética Nuclear
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HS	Harina de soja
LMWM	Marcador de bajo peso molecular
ME	Muestra de enzima concentrada
Nar	Naringina
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
Pec	Pectina
PMF	Peptide Mass Fingerprint
Pnp	<i>p</i> -nitrofenol
Pnp-Glu	<i>p</i> -nitro-fenil-glucopiranósido
Pnp-Ram	<i>p</i> -nitrofenil-ramnopiranósido
Rhasa	α -L-ramnosidasa
Ram	Ramnosa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SN ₂	Sustitución Nucleofílica tipo 2

1. Introducción

1. 1. α -L-Ramnosidasa

La enzima α -L-ramnopiranosidasa (Rhasa, EC 3.2.1.40) es un tipo de glicosidasa que cataliza la ruptura hidrolítica de enlaces glicosídicos en ramnósidos naturales o sintéticos con liberación de ramnosa (6-deoxy-L-manosa). La L-ramnosa es un monosacárido abundante en la naturaleza, que se encuentra ampliamente distribuido en plantas y bacterias, fundamentalmente como componente de paredes celulares y de varios productos naturales. Se presenta como un constituyente común de glicolípidos y glicósidos, tales como pigmentos de plantas, polisacáridos pécticos constituyentes de las paredes celulares de plantas, gomas o biosurfactantes. Algunos ramnósidos son importantes compuestos biológicamente activos como saponinas citotóxicas, glicoalcaloides, antimicóticos de origen vegetal y factores de virulencia bacterianos. La L-ramnosa es también constituyente de diversos flavonoides como naringina y hesperidina y compuestos aromáticos como el geraniol y nerol, entre otros ⁴⁷.

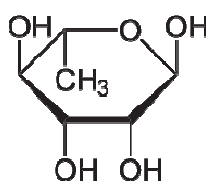


Figura 1.1: L-ramnosa

Un mecanismo propuesto para la hidrólisis enzimática del enlace glicosídico consiste en una catálisis ácida que requiere dos residuos críticos: un donador de protones y un nucleófilo/base, siendo estos residuos aún no identificados en las α -Rhasas. Dicha hidrólisis ocurre con inversión de la configuración en el carbono 1, lo cual indica un mecanismo de desplazamiento molecular sencillo (SN_2) y el posible empleo de grupos carboxílicos (de los ácidos aspártico o glutámico) en el sitio activo, como sucede en general con las enzimas de tipo glicosidasas. Por ejemplo, los espectros parciales de 1H -NMR del curso estereoquímico de la hidrólisis de pnp-Ram catalizada por la α -Rhasa de *A. aculeatus* indican que durante los primeros minutos de la hidrólisis aparece un doblete asignado como el protón anomérico de la β -L-ramnosa; luego de varios minutos, la mutrotación de β -L-ramnosa inicialmente liberada lleva a la aparición de un nuevo doblete correspondiente al protón anomérico de α -L-ramnosa. Luego de 10 min de reacción la relación de los anómeros α - y β - es de 1:10, y luego de 20 h de reacción, la relación de equilibrio mutrotacional (α : β) observado es de 3:2. Por

este motivo, se deduce que la Rhasa de *A. aculeatus* cataliza la hidrólisis con la inversión de la configuración anomérica.

Las ramnosidasas son utilizadas en diferentes aplicaciones biotecnológicas, ya que dependiendo del sustrato sobre el que actúen pueden generar diferentes productos de interés industrial. Algunos ejemplos de dichas aplicaciones son la hidrólisis industrial de ramnósidos, incluyendo la producción del estereoisómero L-ramnosa, la remoción del sabor amargo de jugos cítricos causado por la presencia de naringina (el principal flavonoide amargo del pomelo y otros cítricos), la hidrólisis de hesperidina para liberar el glucósido hesperetina (un importante precursor en la producción de edulcorantes) y la liberación de terpenoides aromáticos a partir de sus precursores terpenil glicósidos para realzar el aroma de vinos ^{42,47}. A estas aplicaciones en la industria de alimentos, se le suman importantes aplicaciones en la investigación bioquímica, como el análisis estructural de glicósidos, polisacáridos y glicolípidos.

A pesar de la existencia de interés en la aplicación industrial de esta enzima, se han llevado a cabo muy pocos estudios en relación a su caracterización y purificación, en comparación con otras glicosidasas. En la Tabla 1.1 se muestran las características de algunas Rhasas reportadas.

Las α -L-Ramnosidasas que han sido purificadas provienen principalmente de preparaciones enzimáticas comerciales de cepas de los géneros *Penicillium* ⁴⁶ y *Aspergillus* ^{15,17,24,30} y son generalmente activas a pHs ácidos ^{8,23,29,47}. Algunas pocas, de origen bacteriano, poseen actividad en medios alcalinos pero son intracelulares ^{3,27}. Ciertos sustratos de dichas enzimas (flavonoides) son poco solubles a estos valores de pH. Por este motivo, el uso de ramnosidasas activas a valores de pH alcalinos permite la hidrólisis de soluciones mucho más concentradas de sustratos.

Tabla 1.1: Propiedades generales de algunas Rhasas microbianas purificadas (nd: no determinado)

Origen	Sustratos	pH	Temp	P.M (K Da)	pI	Aplicación	Fuente
--------	-----------	----	------	------------	----	------------	--------

	(inductor)	óptimo	óptima (°C)				
<i>A. aculeatus</i>	Hesperidina	4.5–5	n.d	92 (RhaA)	6.2	Industria farmacéutica, Industria Alimenticia	Manzanares 2001 y 2003 ^(23,25)
		4.5–5		85 (RhaB)	5.2-5.9		
<i>A. niger</i>	Hesperidina	4.5	65	85	4.5–5.2		Kurosawa <i>et al.</i> , 1973; Manzanares <i>et al.</i> , 1997 ^{17,24}
<i>A. terreus</i>	Ramnosa	4	44	96	4.6		Gallego <i>et al.</i> , 2001 ¹²
<i>A. nidulans</i>	Ramnosa	4.5–6	60	102	5		Manzanares <i>et al.</i> , 2000 ²³
<i>Penicillium</i> sp.	Naringina, terpenoles glicosilados	3.5	57	90	nd	Industria Alimenticia	Romero <i>et al.</i> , 1985; Young <i>et al.</i> 1989. Maicas <i>et al.</i> 2005. ^{21,41,46}

Las propiedades buscadas en una enzima para que pueda ser usada en aplicaciones industriales son: alta actividad y estabilidad a altas temperaturas, debido a que la solubilidad del sustrato y la velocidad de reacción aumentan con la temperatura, baja inhibición por producto, ya que esto limita el rendimiento de conversión, y particularmente para la producción de ramnosa y otros productos de hidrólisis de flavonoides, buena estabilidad y actividad en soluciones básicas, debido a que la solubilidad de los sustratos de estas enzimas aumenta a valores altos de pH⁴².

Las Rhasas hasta ahora reportadas suelen estar asociadas a cierta actividad β -D-glucosidasa (Gluasa). La presencia de ésta última enzima en una preparación de Rhasa puede resultar un inconveniente, por ejemplo, en la manufactura de ramnosa a partir de naringina, debido a la formación concomitante de glucosa, que debe ser eliminada en un paso adicional. Una opción para evitar la producción de Gluasa consiste en optimizar el medio de cultivo a los efectos de evadir la formación de esta enzima. Alternativamente, una purificación parcial o una inactivación selectiva de la Gluasa pueden ser usadas como recursos para separarla de la actividad Rhasa.

1. 2. Sustratos de α -L-Ramnosidasas

1. 2. 1. Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios de las plantas cuyo esqueleto común es el 2-fenil-1,4-benzo pireno (Figura 1.2). Este esqueleto carbonado puede estar modificado, y es la porción del flavonoide que se denomina aglicón.

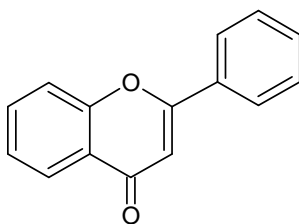


Figura 1.2: Estructura molecular del 2-fenil-1,4-benzo pireno.

Los flavonoides están presentes en casi todas las plantas, fundamentalmente en las partes aéreas, pero varían cualitativamente de una planta a otra. Desempeñan un papel importante en la biología vegetal, ya que responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de la plantas. Además incluyen un papel antifúngico y bactericida, confieren coloración y tienen una importante capacidad para fijar metales como cobre y hierro. 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 como anti-inflamatorios (antivirales o antialérgicos), antioxidantes, antimutagénicos, antiagregantes plaquetarios y protectores de vasos sanguíneos. Estas propiedades biológicas los señalan como posibles opciones para el tratamiento de enfermedades vasculares, cáncer, diabetes mellitus y otras patologías. Además, presentan otras propiedades que incluyen la estimulación de las comunicaciones a través de las uniones de hendidura, el impacto sobre la regulación del crecimiento celular y la inducción de enzimas de detoxificación ^{13,26}.

Los cítricos son una fuente importante de flavonoides y se ha encontrado en ellos la presencia de tres tipos: flavononas, flavonas y flavonoles. Las flavononas son los flavonoides más abundantes en los cítricos y se encuentran como glicósidos, con una, dos o tres unidades de azúcar. El azúcar está unido a uno de los grupos hidroxilo del aglicón y el que más comúnmente se une al aglicón es un disacárido formado por L-ramnosa (6-deoxi-manosa) y D-glucosa. Estos monosacáridos están unidos entre sí por unión glicosídica α -(1-2) o α -(1-6), obteniéndose los disacáridos neohesperidosa (2-O- α -L-rhamnosil- β -D-glucosa) y rutinosa (6-O- α -L-rhamnosil- β -D-glucosa) respectivamente. La L-ramnosa se encuentra formando parte de una gran familia de flavonoides presentes en las plantas del género *Citrus*. Entre los flavonoides glicosilados más importantes de la familia Citrus se encuentran la naringina, la hesperidina, la narirutina y la diosmina.

Los distintos flavonoides glicosilados surgen de posibles combinaciones entre aglicones y glúcidos. Estos últimos son los responsables de aportar la solubilidad a la molécula y se conocen como glicona. La glicona puede consistir en un único

monosacárido, un disacárido o un oligosacárido. (Figura 1.3)³⁶. Todas las frutas cítricas del tipo de la naranja contienen los aglicones flavonados hesperetina y naringenina que rara vez se encuentran como moléculas libres en la planta, sino que suelen estar glicosilados por los disacáridos rutinosa o neohesperidosa.

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, presente en cantidades relativamente altas en naranjas dulces y mandarinas, no aporta sabor a estos frutos debido a su 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 es abundante en pomelo y naranjas agrias e imparte un sabor amargo a los glucósidos neohesperidina y naringina de los que forma parte³⁵.

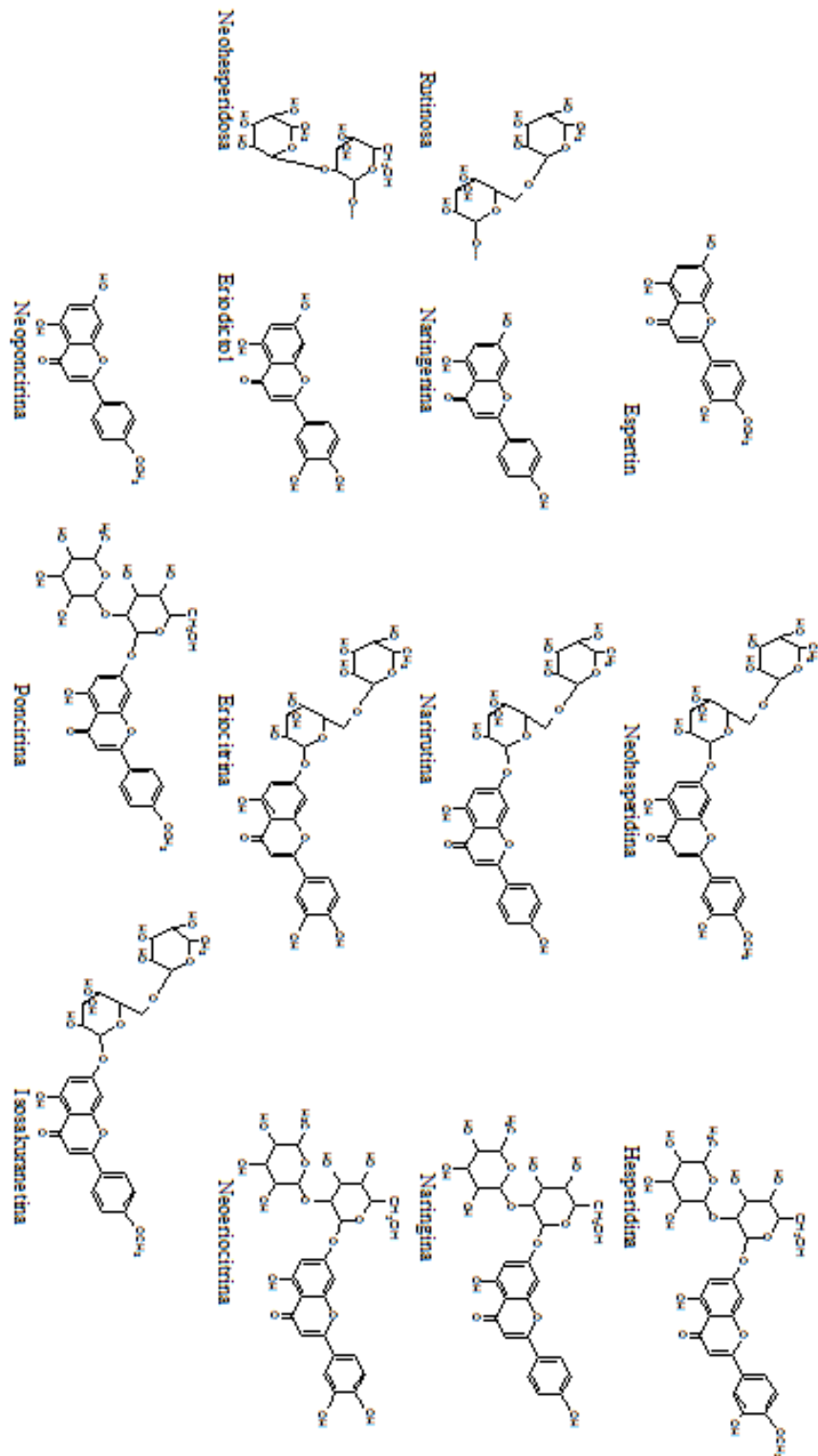


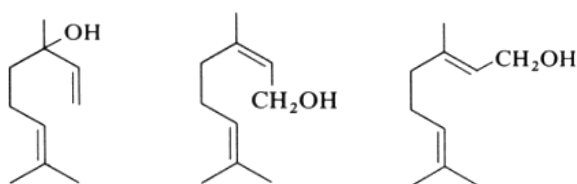
Figura 1.3: Flavonoides presentes en Citrus

1. 2. 2. Terpenos

Los terpenos son compuestos orgánicos con propiedades odorantes y colorantes derivados del isopreno (2-metil-1,3-butadieno), ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Estos lípidos se encuentran en toda clase de seres vivos, pero los productores principales son las plantas, ya que producen una variedad mucho mayor que la producida por animales y microorganismos. En las plantas los terpenos cumplen muchas funciones primarias: forman parte de algunos pigmentos carotenoides, de la clorofila y de algunas hormonas relacionadas con el crecimiento y desarrollo. Entre ellos se encuentran los alcoholes monoterpénicos o terpenoles volátiles, que están presentes en las uvas y son responsables, en gran medida, del aroma característico de los vinos. Además de esta fracción volátil, existe en la uva una fracción no volátil e inodora, que puede ser revelada por vías químicas o enzimáticas, que se encuentra principalmente en forma de precursores glicosilados. Los azúcares que constituyen estos glicósidos 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 ¹⁰.

Existe una gran variación en la composición de terpenoles libres en las diferentes partes de la uva. Desde el punto de vista morfológico, la cáscara de la uva es más rica en monoterpénicos, tanto libres como ligados, que la pulpa o el jugo ¹⁴. Generalmente, durante el proceso de maduración de la uva, los terpenos glicosilados son transportados desde la piel del grano de la uva hasta la pulpa, y pueden ser liberados de los residuos de azúcar por hidrólisis enzimática o química, contribuyendo a aumentar el aroma del vino. Los glicósidos son considerados como formas de transporte y de acumulación de terpenos en las plantas debido a que son más hidrosolubles que los compuestos libres ³⁸.

En estos precursores, los diglicósidos contienen fundamentalmente 6-O- α -L-arabinofuranosilosil- β -D-glucopiranosidos y 6-O- α -L-ramnopiranosil- β -D-glucopiranosidos, y los grupos ligados a ellos son terpenoles o polioles terpénicos, principalmente el linalol, el nerol y el geraniol, aunque también se pueden encontrar alcoholes lineales o cíclicos, C13-norisoprenoides, y fenoles volátiles ^{20,21}.



Linalol Nerol Geraniol

Figura 1.4: Terpenoles más comunes presentes en las uvas

1. 2. 3. Saponinas

Las saponinas son una serie de productos naturales de origen vegetal con características físicas, químicas y biológicas comunes: son agentes tensioactivos, hemolíticos, tóxicos para animales y para el hombre por vía endovenosa. También poseen como propiedad común la alta capacidad de formación de espumas en soluciones acuosas y la formación de complejos con colesterol. Las saponinas presentan actividades biológicas tales como acción antimicótica, antiviral, anticancerígena, hipocolesterolemica, hipoglicémica, antitrombótica, diurética y antiinflamatoria, entre otras.

Desde el punto de vista estructural, las saponinas son glicósidos en los cuales varias unidades de monosacáridos se unen mediante un enlace glicosídico a un aglicón (llamado en este caso sapogenina). Los azúcares presentes más comunes son: D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa, L-arabinosa, D-xilosa, D-fucosa, ácido galacturónico y ácido glucurónico. El aglicón puede ser de naturaleza esteroideal o triterpénica y en función de esto las saponinas se clasifican en saponinas esteroidales y saponinas triterpénicas, respectivamente. Las primeras se dividen a su vez en ácidas, básicas y neutras, mientras que las segundas se subdividen en pentacíclicas y tetracíclicas. Las saponinas esteroidales están menos distribuidas en la naturaleza que las saponinas triterpénicas pentacíclicas y se encuentran con más frecuencia en las Monocotiledóneas, especialmente en las familias Dioscórea, Amarilidácea y Liliácea.

Las saponinas esteroidales son de gran interés para la industria farmacéutica por ser precursores en la síntesis de hormonas y corticoides. Un ejemplo de una saponina esteroideal es la dioscina, que posee dos moléculas de ramnosa y una de glucosa. Por hidrólisis de sus azúcares se obtiene diosgenina, que se utiliza para la síntesis de hormonas esteroides. Este compuesto se obtiene del árbol Ñame, originario de México.

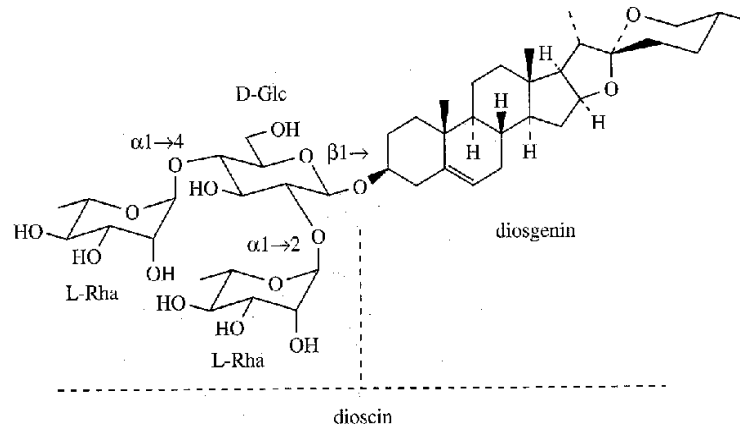


Figura 1.5: Saponina esteroideal Dioscina

1. 3. Aplicaciones y productos de α -L-Ramnosidasas

1. 3. 1. Hidrólisis de flavonoides

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

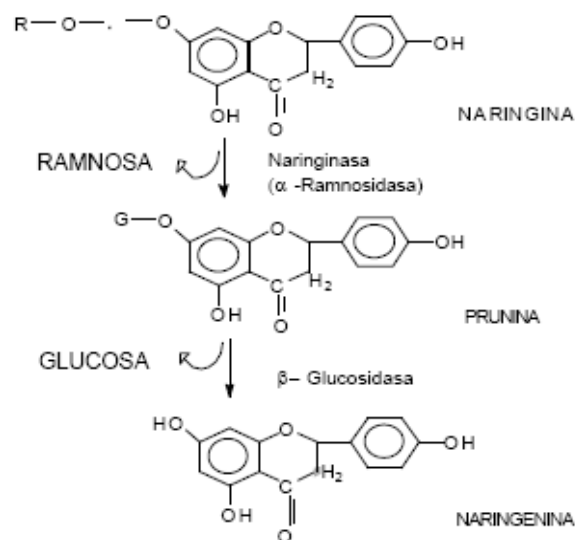


Figura 1.6: Hidrólisis de naringina por α -L-ramnosidasa y β -D-glucosidasa para dar ramnosa, glucosa, prunina y naringenina.

En el caso de la hidrólisis de naringina, la ramnosidasa libera una molécula de ramnosa, generando también una molécula de prunina, la cual está formada por el

aglicón naringenina unido a 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 hesperetina unido a una molécula de glucosa. En resumen, en el caso de los flavonoides siempre se libera una molécula de ramnosa más un aglicón.

A pesar del interés industrial de la enzima, 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 -D-glucosidasa. En este caso, en los hidrolizados obtenidos a partir de naringina se encuentra no sólo 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 ¹⁶, puede ser utilizada como edulcorante para diabéticos ³⁹ y se ha demostrado su capacidad de protección de la mucosa gástrica en modelos animales.

La hesperetina, al igual que otros flavonoides, es capaz de inhibir la agregación plaquetaria estimulada por colágeno en el plasma humano debido a la inhibición de algunas enzimas como la ciclooxygenasa-1 y la fosfolipasa C. Además, puede reducir la permeabilidad capilar, actuar como antiinflamatorio y mejorar el metabolismo lipídico en modelos experimentales ¹³.

La L-ramnosa es un químico fino que se utiliza 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 utilización como intermediario quiral en síntesis orgánica ^{18,19,22}.

En la actualidad, la ramnosa se obtiene comercialmente a partir de flavonoides tales como naringina (de cáscara de Citrus), rutina (de *Sophora japonica*) o quercitrina (de corteza de arce) mediante hidrólisis química (por medio del uso de sustancias tóxicas o corrosivas y producción de grandes cantidades de efluentes contaminantes) ¹⁹. Otra alternativa de producción de ramnosa 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 problemas similares a los antes descritos.

1. 3. 2. Industria vitivinícola. Liberación de terpenos ligados

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.

El aroma potencial contenido en los terpenos glicosilados de la uva permanece casi inalterado durante la elaboración del vino Lorenzo ^{20,21}. 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, una α -L-arabinosidasa o una β -D-apiosidasa hidrolizan el azúcar terminal liberando ramnosa, arabinosa, o apiosa y el correspondiente β -D-glucósido. La liberación de los monoterpenoles tiene lugar luego de la hidrólisis por una β -D-glucosidasa ^{6,21}. Se ha observado la liberación eficiente de monoterpenoles como linalol y geraniol de precursores de aroma extraídos de jugo de uva Moscatel.

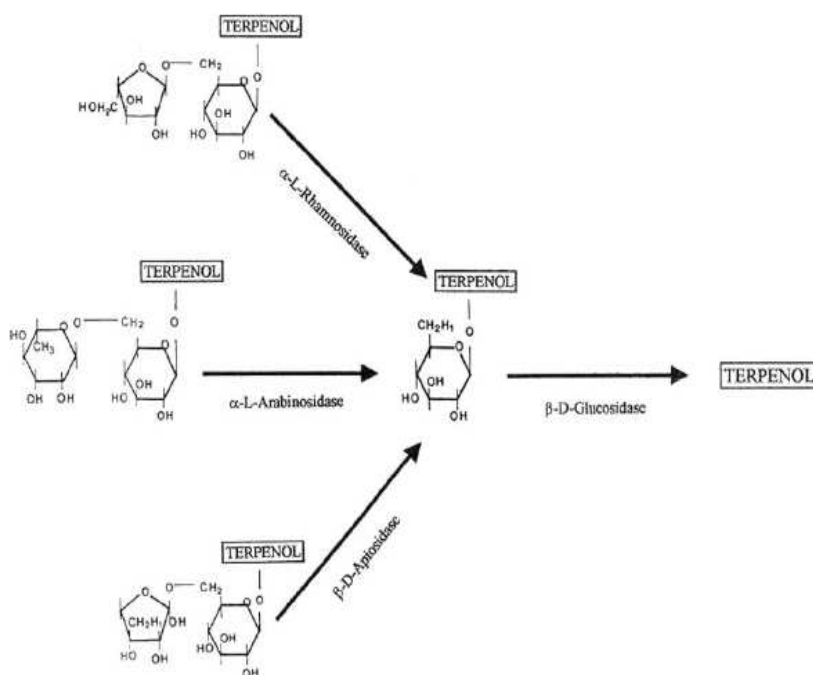


Figura 1.7: Hidrólisis enzimática secuencial de los terpenoles disacáridos, precursores del aroma del vino.

1. 3. 3. Hidrólisis de saponinas

La industria farmacéutica emplea las α -L-ramnosidasas para la producción de

antibióticos y para el desarrollo de nuevos compuestos con principios activos obtenidos a partir de productos de origen vegetal.

El derivado deglicosilado (sin ramnosa) 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. Esta estrategia es utilizada en la síntesis de sapogeninas y diosgeninas, precursores en la síntesis de drogas esteroides.

Las saponinas esteroidales son de gran interés e importancia por su relación con compuestos como las hormonas sexuales, cortisona, esteroides diuréticos, vitamina D y heterósidos cardíacos debido a que 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 glucosa⁹.

En la Figura 1.8 se presenta la obtención de progesterona a partir de dioscina con el uso de enzimas y posteriores reacciones químicas.

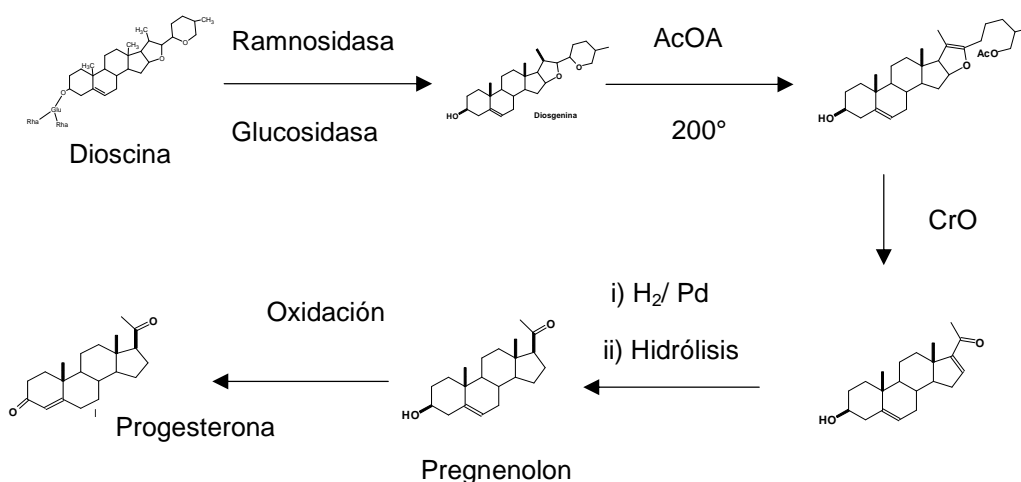


Figura 1.8: Síntesis de progesterona a partir de Dioscina por vía mixta, enzimática y química.

Otro sustrato potencial es el glicósido natural llamado desglucoruscina. Este compuesto posee propiedades farmacológicas importantes como el tratamiento de insuficiencias circulatorias crónicas y se encuentra en investigación su actividad

citoestática en células de leucemia HL-60²⁸. La hidrólisis del desglucuruscina a cargo de la α -L-ramnosidasa resulta en ramnosa y desramnodesglucuruscina, este segundo con potenciales propiedades farmacológicas²⁸ (Figura 1.9)

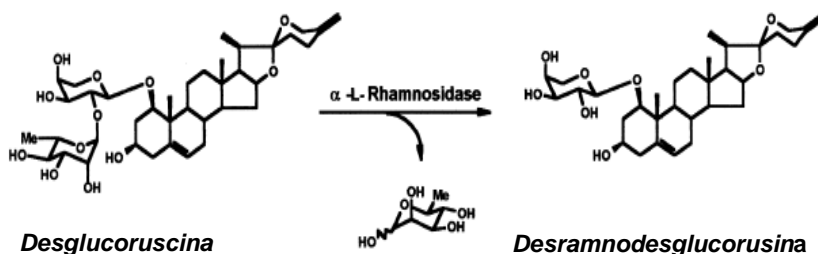


Figura 1.9: Hidrólisis de desglucuruscina por α -L-ramnosidasa

1. 4. *Acrostalagmus luteo albus*

Los miembros del reino Fungi 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), incluye hongos cuya reproducción sexual generalmente se desconoce, ya sea porque se ha perdido en el curso de la evolución o porque aún no ha sido observada. Aunque en la actualidad se han reagrupado las especies de deuteromicetes dentro de los Ascomicetes o Basidiomicetes asexuales, el término "hongos imperfectos" es aún ampliamente utilizado.

Según esta clasificación *Acrostalagmus luteo-albus* (Link: Fr) Zare, Gams et Schroers es un Deuteromicete u hongo imperfecto, dentro del phyla Ascomycota, perteneciente a la familia Hypocreaceae. Su clasificación sistemática se basa en su formación de conidios y elementos morfológicos. No tiene o no se conoce su fase sexual (fase perfecta) formadora de ascas, y sólo se conoce su reproducción por conidios, siendo las fases conídicas (fases imperfectas) similares a las de los ascomicetes. Por esta razón se los clasifica como ascomicetes que han perdido la fase ascógena o que aún no se ha observado.

Las especies de *Acrostalagmus* poseen hifas septadas hialinas, formando un micelio tabicado. Estas hifas suelen ser muy finas y estrechas y su parte especializada, el conidióforo (simple o ramificado), produce fiálides simples o solitarias erguidas, muy

largas, separadas de las hifas por un tabique y dispuestas en forma de verticilo alrededor del conidióforo. *Acrostalagmus* forma generalmente ameroconidios fusiformes, conidios unicelulares de forma elíptica alargada, con cierta curvatura central. Estos conidios suelen aparecer en grupos formando agregados, principalmente en el ápice de cada fiálide ⁴⁰.

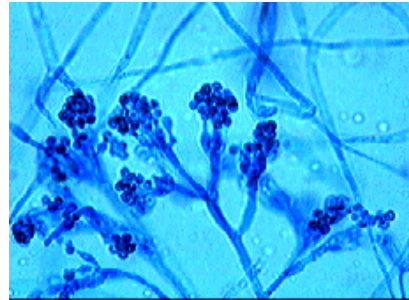
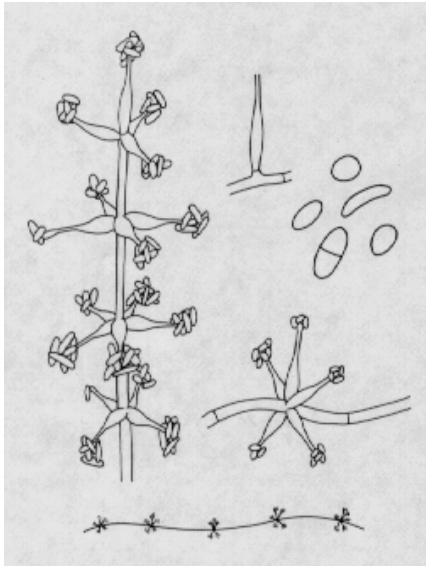


Figura 1.10: *A. luteo-albus*: la ramificación de los conidióforos aparece como un verticilo. Imagen tomada del Departamento de Botánica de la Universidad de Toronto <http://www.botany.utoronto.ca>

Las especies de especies del género *Acrostalagmus* son en su mayoría hongos saprótrofos que, como organismos descomponedores, participan en los procesos de ciclado de nutrientes, llegando a degradar compuestos recalcitrantes, reduciéndolos a componentes más simples y fácilmente asimilables por otros organismos. Son frecuentes tanto en el suelo como en restos vegetales en descomposición. Secretan enzimas hidrolíticas capaces de degradar macromoléculas, mejoran la estructura del suelo y remueven materiales que de otra manera se acumularían al punto de disminuir la productividad del ecosistema. Además, son responsables de la nutrición mineral adecuada de la mayoría de las plantas. Estos hongos tienen un enorme potencial de dispersión y un sistema enzimático eficiente que les garantiza su modo de vida ¹. Son patógenos para ciertas especies de plantas de importancia económica, como algodón, tomate, papa, así como vegetación natural, actuando como hongos parásitos. Causan verticilosis, obstrucción de los vasos conductores de vegetales, marchites y amarilleo de las hojas.

La mayoría de los hongos crecen en ambientes ácidos. Sin embargo, algunas especies son capaces de crecer en condiciones de alcalinidad o requieren de estas condiciones para su crecimiento. El suelo alcalino que constituye el ecosistema de los bosques de *Celtis tala* Gill ex Planch (Fam. Ulmaceae) (tala) y *Scutia buxifolia* Reiss (Fam. Rhamnaceae) (coronillo), situados en la región costera de la Provincia de Buenos Aires

(Partidos de Magdalena y Punta Indio) es un hábitat para *Acrostalagmus luteo-albus*. Esta región con varias especies diferentes de árboles, donde dominan las dos anteriormente nombradas, está formada sobre depósitos marinos de caracoles. *Acrostalagmus luteo-albus* se desarrolla en estos suelos calcáreos, de pH entre 7,5 y 9, donde la alcalinidad se origina por la presencia de altas concentraciones de CaCO_3 ⁷. Es decir, *A. luteo-albus* es un hongo alcalófilo que se presenta en mayor frecuencia a medida que el pH del suelo donde se desarrolla aumenta^{7,32,33}.

Se ha reportado que *A. luteo-albus* es una fuente importante de diversas enzimas alcalinas, como pectin-liasas, ramnogalacturonasas, celulasas, xilanasas, y es capaz de producir una enzima con actividad α -L-ramnosidasa con la capacidad de hidrolizar ramnósidos sintéticos y naturales a valores de pH cercanos a 9,5⁷. Dado que la mayoría de los sustratos de estas enzimas son más solubles a pH alcalino, la α -L-ramnosidasa alcalina de *Acrostalagmus luteo-albus* puede resultar de gran utilidad en la hidrólisis enzimática de flavonoides para la obtención de ramnosa.

2. Objetivos

En la actualidad los procesos enzimáticos han ido reemplazando algunos de los procesos químicos tradicionales, por cuestiones económicas, ecológicas o por especificidad. Debido al potencial de la ramnosidasa alcalina de *Acrostalagmus luteo-albus* para la hidrólisis enzimática de flavonoides, para el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Estudios de la producción de la α -L-ramnosidasa de *A. luteo albus* en medios complejos y semi-sintéticos.
- 2) Selección de un medio de cultivo adecuado para la producción de α -L-ramnosidasa.
- 3) Estudio de represión catabólica por carbono.
- 4) Purificación de la proteína con actividad ramnosidasa empleando métodos de concentración por liofilización, sistemas cromatográficos y electroforéticos.
- 5) Determinación de las propiedades cinéticas y bioquímicas relevantes (pH y temperatura óptimos, efecto de cationes sobre la actividad enzimática, PM, pI, huella peptídica)
- 6) Determinación de la capacidad de las ramnosidasas para hidrolizar flavonoides como naringina, hesperidina y quercitrina en condiciones alcalinas.
- 7) Caracterización proteómica de la enzima. Secuenciación para su posterior clonado.
- 8) Obtener adiestramiento en el manejo de técnicas de laboratorio e integrarse adecuadamente a grupo de trabajo.

3. Materiales y métodos

3. 1. Reactivos químicos

El *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pnp-Glu), el *p*-nitrofenil- α -L-ramnopiranosido (pnp-Ram), la naringina, la prunina, la hesperidina, la quercitrina y las membranas de celulosa para diálisis (corte 12400 Da) fueron obtenidos de Sigma. El Broad pl Kit, pH 3-10; los patrones de peso molecular de proteínas (Broad range MW 6500 a 205000, LMWM 14000 a 96000) fueron de GE Healthcare. El agar papa-dextrosa (APD) y las láminas de alúmina sílica gel fueron de Merck, USA y la triptona de Difco. La harina de soja fue provista por Biagro SA – Argentina. Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico

3. 2. Microorganismos y producción de inóculos

Se utilizó la cepa de *Acrostalagmus luteo-albus* LPS # 748 proporcionada por la Dra. Marta Cabello del Instituto Spegazzini de la Universidad Nacional de la Plata. Dicha cepa fue propagada a 30°C en tubos con medio APD y mantenida liofilizada en ampollas estériles con una solución crioprotectora compuesta por leche descremada (Molico, 10 % p/v) e inositol trifosfato (5 % p/v) a 4°C. Cuando fue necesario, el contenido de una ampolla se resuspendió con una solución de triptona al 1 % (p/v) por re-hidratación lenta y se sembraron en tubos con medio APD recto. El cultivo, una vez esporulado, se cubrió con 1 cm de aceite mineral estéril y se conservó refrigerado (cultivo stock, CS) por un período no mayor de 2 meses.

Para la preparación del inóculo, un loop de conidios del CS se sembró en medio APD (15 ml en pico de flauta). Después de 7 días de incubación a 30°C en la oscuridad los conidios se resuspendieron con 10 ml de solución estéril de Tween 80 al 0,05% (v/v). El recuento de conidios se efectuó en cámara de Neubauer. La concentración típica en esta suspensión fue del orden de 10^8 conidios/ml.

3. 3. Medios y condiciones de cultivo

Para los cultivos se emplearon frascos Erlenmeyer de 1.000 ml con 300 ml de medio base conteniendo triptona como FN y diferentes FCE. La composición del medio base fue la siguiente (g/l): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5; KCl 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01; ácido cítrico 0,01, naringina 0,125, solución buffer ($K_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 0,9 g/l; Na_2CO_3 1,0 g/l) 100 ml; solución de antibióticos (estreptomicina 25,0 g/l, cloramfenicol 10,0 g/l) 4 ml. La concentración de triptona utilizada fue 1,25 g/l. Como FCE se empleó harina de soja, naringina, ramnosa, pectina cítrica, glucosa, y jugo V8. Estos medios fueron

denominados HS, Nar, Ram, Pec, Glu y V-8, respectivamente. En todos los casos, las FCE, la triptona, las sales y la solución buffer fueron esterilizadas por separado en autoclave durante 15 min a 121°C. Las soluciones de antibióticos y la naringina fueron esterilizadas por filtración. Luego de la reconstitución, el pH de los medios varió entre 8,9 y 9,1. Los medios se inocularon con la suspensión de conidios para dar una concentración de 10^6 conidios/ml y luego se incubaron a 30°C en shaker (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) a 200 rpm. A intervalos de 24 h se tomaron muestras líquidas de cada uno de los cultivos y se analizaron como se describe más adelante.

3. 4. Análisis de represión catabólica por carbono

A fin de determinar el efecto de ciertos azúcares sobre la producción de Rhasa, se realizaron cultivos en medio conteniendo ramnosa como FCE, a los que se les adicionó glucosa. Los cultivos fueron desarrollados en idénticas condiciones que las indicadas anteriormente, y a intervalos de 24 h se tomaron muestras líquidas de cada uno y se analizaron como se describe más adelante. Se realizaron las siguientes combinaciones de azúcares: 5 g/l de glucosa + 5 g/l ramnosa; 10 g/l de glucosa; 10 g/l de ramnosa.

3. 5. Procesamiento de los cultivos

A diferentes intervalos de tiempo se tomaron muestras de 20 ml de cultivo, las cuales fueron centrifugadas por 10 min a 5.000 g, y fueron filtradas a través de filtros de papel de celulosa (Whatman # 40) usando un soporte de polipropileno ($\varnothing = 90$ mm). El filtrado se usó inmediatamente o bien se congeló a - 20°C. Cuando fue necesario, las muestras fueron descongeladas rápidamente en un baño de agua a 37°C con agitación a los efectos de acelerar el proceso y evitar la desnaturalización de las proteínas presentes. La solución se conservó a 5°C por un período no mayor de 3 días.

3. 6. Ensayos de actividad enzimática

Para la determinación de las actividades α -L-ramnosidasa y β -D-glucosidasa fueron utilizados como sustratos *p*-nitrofenil- α -L-ramnopiranosido (pnp-Ram) y *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pnp-Glu), respectivamente. Estos compuestos son sustancias cromogénicas que al ser hidrolizados desarrollan, en medio alcalino, un color amarillo por la aparición del anión *p*-nitrofenolato⁴¹, que posee un máximo de absorbancia a 405 nm.

Las medidas de actividad estándar se realizaron mediante una cinética de 30 min en

espectrofotómetro (Beckman DU 640) a una longitud de onda de 405 nm a 37°C. El *p*-nitrofenolato liberado posee un coeficiente de extinción molar (ϵ) de 18.500 M⁻¹cm⁻¹.

La mezcla de reacción estuvo compuesta por:

- 350 μ l Tris-HCl (20mM, pH 9,0)
- 100 μ l sustrato (pnp-Ram o pnp-Glu, 5 mM)
- 50 μ l de muestra.

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

3. 7. Purificación de la enzima con actividad Ramnosidasa

La purificación de la proteína con actividad Rhasa producida por *A. luego-albus* fue llevada a cabo a partir de cultivos con ramnosa como FCE.

Todas las fracciones colectadas luego de cada paso de purificación fueron analizadas en términos de proteínas mediante la técnica de Bradford ⁴ y de actividad enzimática como se indicó en el punto anterior.

Para las cromatografías en columna se utilizó un equipo de FPLC (ÄKTA FPLC-U900 Chromatography System, GE Healthcare). Las fracciones colectadas de cada paso cromatográfico fueron analizadas para determinar la presencia de actividad Rhasa. Este análisis se realizó cualitativamente por medio de test en placa microtiter. En cada celda se mezclaron 70 μ l Buffer Tris-HCl 20mM pH 9.0, 10 μ l reactivo pnp-Ram 5mM y 20 μ l de muestra. Las placas se incubaron a 37°C por 2 horas y se determinó la presencia del producto de hidrólisis *p*-nitrofenolato por la aparición de color amarillo en la mezcla de reacción.

El extracto de cultivo fue filtrado, concentrado por liofilización y luego resuspendido en buffer MES 20 mM pH 6,0 (BM). La purificación de enzima prosiguió mediante precipitación fraccionada del ME utilizando sulfato de amonio a distintos porcentajes de saturación a 0°C. En cada etapa de precipitación, la muestra fue agitada durante 20 min en baño de agua / hielo y luego centrifugada a 12.000 g durante 10 min. La proteína precipitada en este paso fue resuspendida en agua bidestilada, filtrada con filtro de 0.45 μ m de poro y cargada a una columna cromatográfica XK 16/100 Sephacryl[®] S100 HR (120 ml de relleno, preequilibrada con BM). La elución se llevó a cabo isocráticamente con 10 Vols. de columna de BM a un flujo de 1,5 ml/min. Las fracciones con actividad Rhasa colectadas fueron concentradas por liofilización. El

liofilizado obtenido fue resuspendido en agua bidestilada e inyectado en una columna XK 26/20 Sepharose® DEAE (36 ml de relleno, preequilibrada con BM) y las proteínas adsorbidas fueron eluidas con un gradiente lineal de NaCl (0-1,0 M) en el mismo buffer a un flujo de 3 ml/min. Las fracciones colectadas fueron dializadas contra BM durante 12 h a 5°C bajo agitación con una relación solución:buffer 1:100 y luego concentradas por liofilización. Esta última fracción fue inyectada en una columna XK 26/20 Sepharose® Q (36 ml de relleno, preequilibrada con BM) y eluida en gradiente lineal de NaCl (0-1,0 M) en el mismo buffer a un flujo de 3 ml/min. Las fracciones colectadas conteniendo actividad Rhasa fueron reunidas, dializadas y liofilizadas. Finalmente, un SDS PAGE fue llevado a cabo en condiciones desnaturalizantes para evaluar el grado de pureza alcanzado.

Con el objetivo de obtener la proteína de interés completamente pura para realizar los estudios bioquímicos posteriores se realizó un gel preparativo (PAGE nativo al 10% de simple calle). En dicho gel se sembraron 600 µl de una muestra parcialmente purificada proveniente del último paso cromatográfico (concentrada por liofilización). Las proteínas fueron visualizadas por medio de tinción con Coomassie coloidal y analizadas en términos de actividad mediante la técnica en placa microtiter. Una banda con actividad Rhasa fue escindida del gel y eluida utilizando el protocolo propuesto por Reguera y Leschine³⁷ y utilizada para estudios posteriores de caracterización. Un resumen del proceso de purificación se muestra en la figura 3.1.

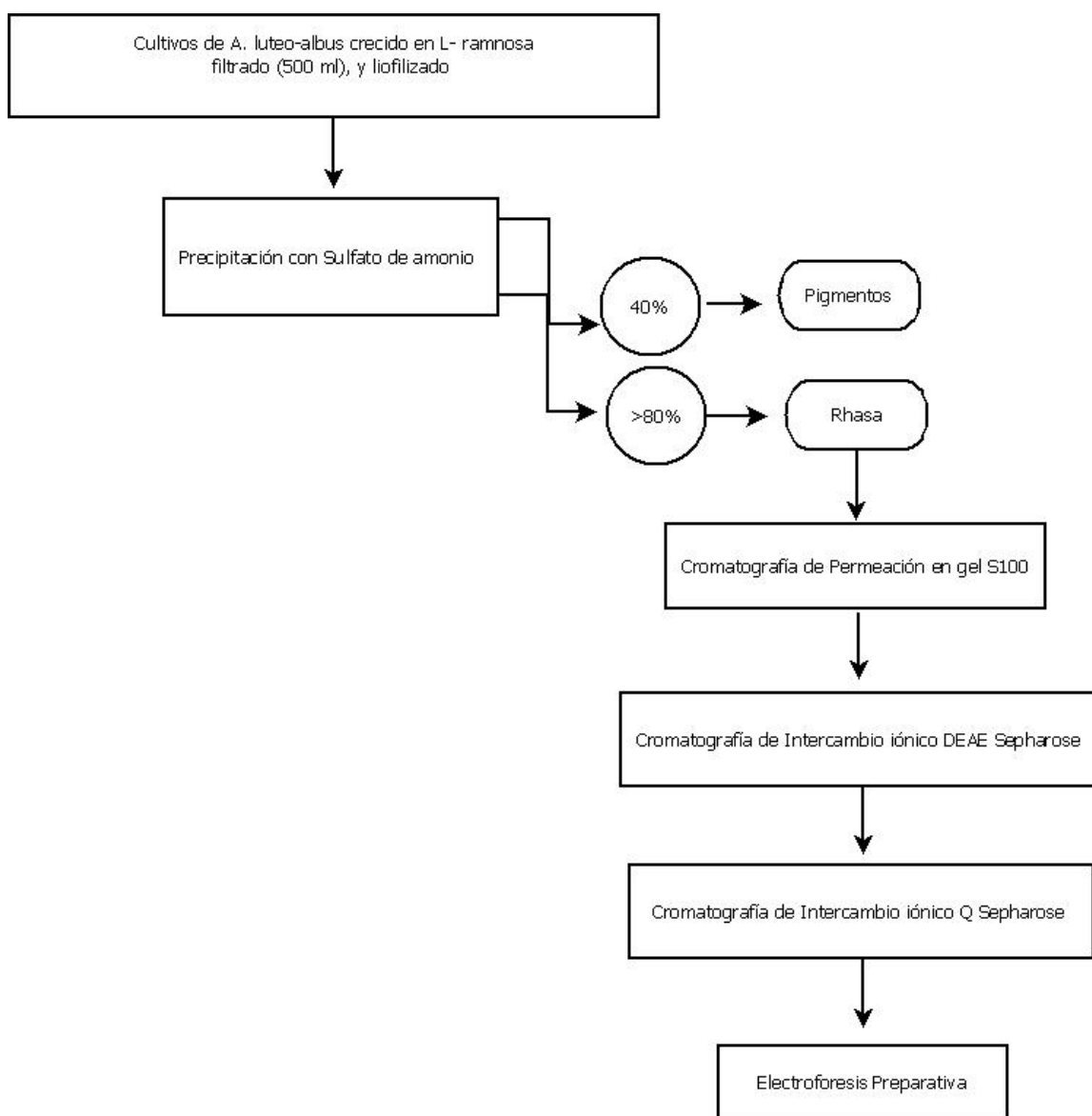


Figura 3.1: esquema representativo del proceso de purificación de la ramnosidasa de *A. luteo-albus*

3. 8. Técnicas analíticas y bioquímicas

Luego de cada paso cromatográfico, las muestras fueron analizadas en términos de actividad Rhasa y Glusasa frente a los respectivos pnp-glicósidos. La concentración de proteínas fue determinada utilizando el Método Bradford ⁴ usando seroalbúmina bobina (BSA) como patrón, y la purificación de la enzima fue monitoreada por SDS-PAGE. El peso molecular fue estimado mediante un SDS-PAGE utilizando patrones de alto y bajo peso molecular Estos análisis fueron realizados en un equipo Mighty Small II Unit (Hoefler SE 260) de acuerdo a Smith ⁴³. El isoelectroenfoque (IEF) fue realizado en una unidad de electroforesis (LKB Bromma 2117 Multiphor II) a 10°C. El gel se preparó con una capa fina de poliácridamida en el rango de pH de 3-10 de acuerdo a las

instrucciones del fabricante. Como buffer catódico se utilizó una solución de ácido sulfúrico (0,1 M) y como buffer anódico una solución de NaOH (0,1 M).

3. 9. Condiciones óptimas de reacción

El efecto del pH sobre la actividad Rhasa de *A. luteo-albus* fue estudiado frente a pnp-Ram como sustrato. El pH óptimo de la actividad Rhasa fue determinado empleando 0,02 µg de proteína purificada del PAGE, dializada a 5°C frente a BM (pH 6,0). Se determinó la actividad Rhasa frente al sustrato pnp-Ram 5 mM. Se preparó una solución madre conteniendo los buffers TRIS, MES y Glicina (BMTG), todos en concentración 20 mM. Luego se llevaron distintas alícuotas de dicha solución buffer al valor de pH a evaluar, usando NaOH o HCl, a 37°C. Los valores de pH se variaron entre 5 y 10. La mezcla de reacción estaba compuesta por 350 µl de buffer BMTG ajustado a los valores de pH mencionados, 50 µl de sustrato y 50 µl de enzima. A los efectos de evaluar la liberación de p-nitrofenolato en distintas condiciones de pH, este ensayo se realizó midiendo actividad enzimática a tiempo final (a 405 nm) y deteniendo la reacción con Na₂CO₃ en las condiciones estándar. Cada medida se realizó por duplicado.

La temperatura óptima de la Rhasa de *A. luteo-albus* se determinó siguiendo el protocolo que se detalla a continuación: se incubaron 350 µl de Tris-HCl (20 mM, pH 9,0) y 50 µl de enzima purificada de PAGE, dializada a 5°C frente a BM pH 6,0 (0,02 µg) durante 30 min a diferentes temperaturas en el rango de 25-60°C de manera que la mezcla alcance la temperatura a ensayar. Al cabo de dicho tiempo se agregaron 50 µl de sustrato pnp-Ram 5 mM a la mezcla y se comenzó la medida de actividad estándar, a la temperatura correspondiente.

3. 10. Efecto de cationes

Se determinó la influencia de varios cationes (Ca⁺², Fe⁺³, K⁺, Mn⁺², y Zn⁺²) sobre la actividad enzimática utilizando diferentes soluciones compuestas por Buffer Tris-HCl (20 mM, pH 9) y cada una de las siguientes sales: CaCl₂ 0,1 mM, FeCl₃ · 6H₂O 0,1 mM, KCl 20 mM, MnCl₂ · 4H₂O 0,1 mM o ZnSO₄ · 7H₂O 0,1 mM. En todos los casos, se determinó la actividad enzimática por medio del procedimiento estándar.

3. 11. Parámetros cinéticos sobre pnp-Ram

Los parámetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ y K_M fueron determinados a partir de medidas de

velocidad inicial empleando pnp-Ram como sustrato en el rango de concentraciones de 0,2 a 4 mM y a 37°C, al pH óptimo. El ajuste al modelo clásico de Michaelis-Menten se realizó mediante regresión no lineal empleando el programa Sigma Plot. Los estudios de inhibición se llevaron a cabo en las mismas condiciones descritas para determinar K_M y $V_{m\acute{a}x}$ usando como inhibidor ramnosa a una concentración de 1.5 mM.

3. 12. Hidrólisis de flavonoides

La actividad de la enzima Rhasa sobre hesperidina, naringina y quercitrina fue analizada por TLC y HPLC. Para el análisis por HPLC, la reacción se llevó a cabo incubando 900 μ l de cada flavonoide (3,5 mM en Buffer Tris pH 9,5) con 100 μ l de enzima purificada (0,04 μ g) durante 3 h a 37°C. Los blancos de sustrato y de muestra fueron realizados utilizando agua bidestilada en reemplazo de sustrato o de enzima, respectivamente. Se tomaron muestras de 300 μ l al principio y al final del ensayo. La reacción se detuvo añadiendo a la mezcla de reacción un volumen equivalente de solución de acetonitrilo 52 % en ácido fosfórico (60 mM), luego de lo cual la mezcla resultante se filtró a través de un filtro de nylon (0,45 μ m de tamaño de poro).

3. 13. Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

Las reacciones de hidrólisis fueron evaluadas cuantitativamente por medio de HPLC. La naringina, naringenina, quercitrina, hesperidina y prunina fueron cuantificadas por HPLC empleando una columna Symmetry C18 (Waters, Milford, MA, USA 3,9 mm x 150 mm.) a temperatura ambiente usando como fase móvil acetonitrilo / agua (0,68 / 0,32, v/v) a un flujo de 1 ml/min y un detector de arreglo de fotodiodos (2996, Waters). Las concentraciones de naringina, prunina, naringenina, hesperidina y quercitrina fueron identificadas y cuantificadas de acuerdo a sus respectivos patrones.

3. 14. Cromatografía en capa fina (TLC)

Las reacciones de hidrólisis fueron evaluadas cualitativamente por medio de TLC. Este análisis fue llevado a cabo en láminas de alúmina sílica gel (60 F254) sembrando 5 μ l de la mezcla de reacción de hidrólisis y los respectivos patrones. Se usó etil acetato / ácido fórmico / ácido acético / agua (10 / 1,1 / 1,1 / 2,7, v/v) como fase móvil. La visualización de los flavonoides fue realizada rociando la lámina con una solución de ácido fosfomolibdico (3 %), ácido sulfúrico (10 %) en etanol (96 % v/v) seguida de calentamiento a 105°C durante 5 min.

3. 15. Análisis de huellas peptídicas

Se efectuó una digestión triptica *in situ* de las proteínas separadas mediante SDS-PAGE y coloreadas por la técnica de Coomassie Blue coloidal³⁴. Las bandas seleccionadas fueron recortadas con bisturí y almacenadas en tubos Eppendorf para su procesamiento. Luego se lavaron alternativamente con agua MilliQ y acetonitrilo varias veces hasta su decoloración y finalmente fueron secadas a presión reducida. Para bloquear y reducir el sitio activo se agregaron ditioneol y iodoacetamida en NH_4HCO_3 . La digestión se realizó con buffer NH_4HCO_3 (100mM, pH 7,8) conteniendo tripsina durante 12 h, a 37°C, los productos finales se disolvieron en ácido trifluoroacético (0,1 %, v/v) y se analizaron por MALDI-TOF MS utilizando un Espectrómetro de masa MALDI TOF/TOF (modelo 4800 Analyzer, Applied Biosystems, Framingham, EE.UU.).

4. Resultados

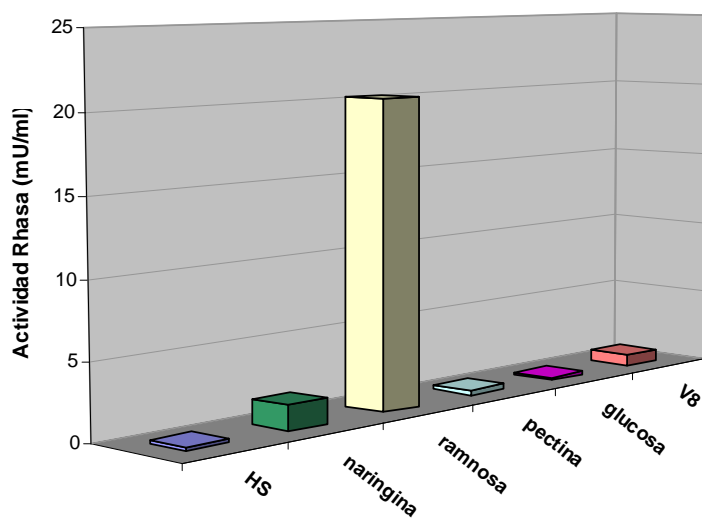
4. 1. Optimización de la producción en diferentes medios de cultivo

Se estudió la producción de α -L-ramnosidasa de *A. luteo-albus* en diferentes medios conteniendo diferentes FCE, en sistema batch en frascos agitados. Los sustratos utilizados fueron harina de soja, naringina, ramnosa, pectina, glucosa y jugo V8,

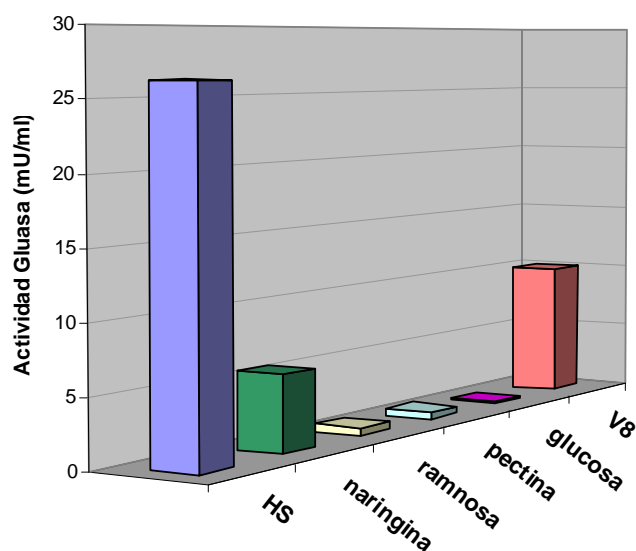
evaluándose la actividad Rhasa producida durante 24 días.

Todos los medios fueron capaces de soportar el crecimiento fúngico y la producción de Gluasa y Rhasa. Sin embargo, tanto la cinética de producción de enzimas como la cantidad final alcanzada fueron diferentes en cada caso. La Figura 4.1 compara los máximos de expresión de Rhasa y Gluasa para cada sustrato.

Al evaluar el efecto inductor que ejerce cada una de las FCE estudiadas sobre las actividades enzimáticas, se observó que la actividad Rhasa producida en medio con pectina, glucosa y HS es prácticamente despreciable, resultando el medio con HS mejor inductor de la actividad Gluasa que de la actividad Rhasa. Por esta razón, directamente se descarta su uso en la producción de esta última. En cuanto a los medios conteniendo naringina, estos mostraron un leve efecto inductor sobre la actividad Gluasa, El máximo de actividad Rhasa producida en este medio se obtuvo al día 10 de cultivo, llegando a tan solo 1.6 mU.ml^{-1} , mientras que el máximo valor de actividad Gluasa fue de 5.6 mU.ml^{-1} , alcanzadas el día 13 de cultivo. La pectina no fue capaz de sustentar la producción de ninguna de las dos enzimas (0.34 y 0.53 mU.ml^{-1} de Rhasa y Gluasa, respectivamente). El medio compuesto por jugo V8 produjo una cantidad despreciable de actividad Rhasa, pero estimuló, aunque levemente, la producción de Gluasa, llegando a 10 mU.ml^{-1} en el día 14 de cultivo. Finalmente, el medio conteniendo ramnosa resultó ser el más apropiado para la producción de Rhasa, obteniéndose el valor máximo de aproximadamente 20 mU.ml^{-1} a los 15 días de cultivo. En este caso se observó un aumento continuo en la producción de Rhasa y un bajo nivel de producción de actividad Gluasa, cuyo valor en ningún momento del cultivo sobrepasó las 0.6 mU.ml^{-1} . Se han reportado resultados similares para la producción de una Rhasa de *Aspergillus nidulans* por Manzanares *et al.*²³.



a)



b)

Figura 4.1: Producción de a) Rhasa y b) Gluasa de *A. luteo-albus* en diferentes medios en donde se comparan los máximos de expresión de Rhasa y Gluasa para cada sustrato. Las FCE usadas fueron: harina de soja (HS), naringina, ramnosa, pectina, glucosa y jugo V8. Los medios se inocularon con 10^6 conidios/ml y se incubaron a 30°C en shaker a 200 rpm, durante 24 días. Cada muestra tomada fue analizada en términos de actividad Rhasa y Gluasa.

4. 2. Estudio de la represión catabólica por carbono.

A partir de los resultados anteriores y considerando que la ramnosa es el mejor inductor de la producción de Rhasa de *A. luteo-albus*, se decidió estudiar el sistema de

represión catabólica por carbono, analizando el efecto de la glucosa en combinación con ramnosa, sobre la producción de Rhasa. Para ello, se realizaron cultivos con diferentes combinaciones de estos azúcares, tal como se detalla en Materiales y Métodos, y se determinó la actividad Rhasa producida en todos los casos.

Los resultados pueden verse en la Figura 4.2. Como resultado se obtuvo que el medio que contiene ramnosa como única FCE resulta el más apropiado para la obtención de Rhasa de *A. luteo-albus* con bajo contenido de Gluasa. Se observa que la presencia de glucosa en el medio, produce una disminución de la actividad Rhasa de aproximadamente un 30% con respecto al valor obtenido en medio conteniendo únicamente ramnosa. .

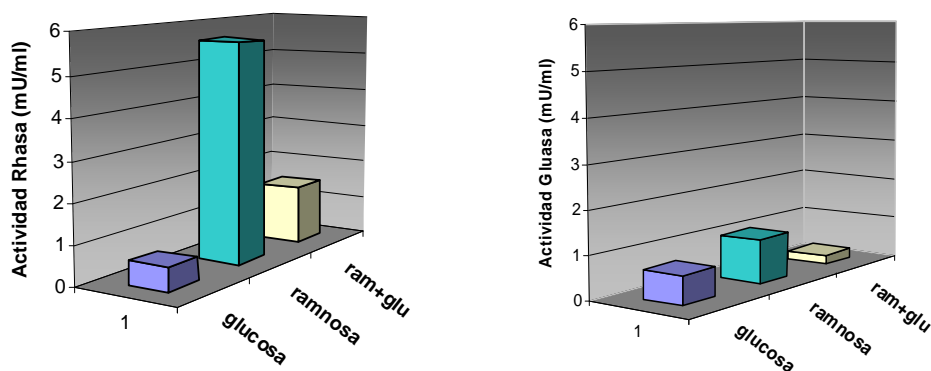


Figura 4.2: Comparación de la producción de Rhasa y Gluasa en cultivos con diferentes combinaciones de ramnosa y glucosa como FCE. Los cultivos se realizaron a 30° C y 200 rpm y se analizaron en términos de producción de Ramnosidasa y Glucosidasa.

Este comportamiento es el habitual para muchas enzimas hidrolíticas fúngicas tales como la glucosidasa de *Candida wickerhamii*, que produce altas cantidades de β -glucosidasa pero es reprimida por glucosa^{41 11}, o como en el caso de la Rhasa de *A. nidulans*, donde la represión catabólica está mediada por un mecanismo independiente al del gen creA^{42 2}.

A partir de estos resultados resulta evidente que el medio que contiene únicamente ramnosa como FCE es la opción más adecuada para llevar a cabo el proceso de producción de la enzima Rhasa. Y debido a que se trata de un medio sintético, podría simplificar el proceso de purificación de la enzima.

4. 3. Purificación de la proteína con actividad ramnosidasa

La proteína α -L-ramnosidasa fue purificada desde cultivos de *A. luteo-albus* crecido en

L- ramnosa como única fuente de carbono. La purificación de una proteína desde un medio sintético es ventajosa respecto de la misma realizada a partir de un medio complejo, donde la presencia de proteínas, péptidos y otras moléculas provenientes del medio de cultivo constituyen un serio problema a la hora de purificar, siendo necesaria su remoción previa a los distintos pasos cromatográficos. La purificación de la Rhasa fue llevada a cabo empleando técnicas de precipitación con sulfato de amonio, cromatografía por filtración en gel e intercambio iónico, y electroforesis preparativa. La primera etapa en la purificación de una proteína a partir de un medio de cultivo generalmente involucra una etapa de concentración para eliminar agua y disminuir el volumen operativo. Esta operación también puede, según la técnica empleada, eliminar contaminantes del cultivo, es decir, purificar parcialmente la proteína de interés.

El cultivo fue inicialmente filtrado (500 ml), y el filtrado obtenido fue concentrado por liofilización y luego resuspendido en 57 ml de BM. La muestra de enzima resultante de esta concentración resultó ser intensamente coloreada debido a la presencia de pigmentos de color oscuro producidos por el microorganismo durante el cultivo. Por lo tanto, en el diseño de una estrategia para la purificación de la Rhasa se buscaron dos objetivos principales: por un lado, eliminar los pigmentos y por otro, separar la actividad Rhasa de la actividad Gluasa, asumiendo para lograr este último objetivo que las actividades Rhasa y Gluasa son llevadas a cabo por enzimas diferentes. Con el fin de poner a punto el protocolo de purificación, se realizó una precipitación con sulfato de amonio a partir del extracto crudo liofilizado. Esta comenzó llevando la ME al 25% de saturación y luego sometiendo al sobrenadante a los sucesivos porcentajes de saturación (40 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % y 100 %) a 0°C. En cada etapa de precipitación, la muestra fue agitada durante 20 min en baño de agua / hielo y luego centrifugada a 12.000 g durante 10 min. A partir de estos ensayos se determinó que la actividad Rhasa precipita totalmente a partir del 80 % de saturación, mientras que los pigmentos presentes en el medio de cultivo lo hacen al 40 %. Es por ello que se decidió realizar la precipitación llevando el extracto al 40 % (para eliminar la mayor parte de los pigmentos de la muestra) y posteriormente al sobrenadante obtenido al 80 %, 90 % y 100 %. La proteína precipitada entre el 80 % y el 100 % de saturación fue resuspendida en agua bidestilada (8,5 ml; 37,4 mg de proteínas) y filtrada con filtro de 0.45 μ m de poro. Esta precipitación permitió concentrar la solución de proteína para luego someterla a una columna de exclusión molecular Sephacryl S100. Las fracciones (10 ml) con actividad Rhasa eluidas de esta columna se juntaron, obteniéndose un volumen total de 40 ml, y la solución resultante se concentró por liofilización. El empleo de esta columna al inicio de la purificación permitió separar completamente los

pigmentos restantes de la actividad Rhasa, lo cual es atribuible a su estrecho rango de separación por tamaño. La eliminación de estos pigmentos fue determinante en el proceso de purificación debido a que estos son adsorbidos inespecíficamente a los rellenos cromatográficos iónicos, de manera que compiten con la enzima en el pegado a los centros reactivos de la matriz de la columna. Esto puede deberse a la presencia en su estructura de probables grupos amino protonables originados a partir de las proteínas implicadas en la formación de pigmentos durante el cultivo. Sin embargo no pueden excluirse otro tipo de interacciones presentes como las de hidrógeno y las de Van der Waals ⁴⁴.

Como paso siguiente, el liofilizado proveniente de la cromatografía de exclusión molecular fue resuspendido en agua deionizada a un volumen final de 4 ml, el cual fue inyectado en una columna de intercambio aniónico DEAE Sepharose. En este paso de purificación fue posible eliminar la mayor parte de las proteínas contaminantes, mientras que la actividad Rhasa eluyó en un pico ancho entre 0.37 y 0.40 M de NaCl. Las fracciones con actividad Rhasa eluidas fueron colectadas (170 ml), liofilizadas y resuspendidas en 70 ml. Este volumen fue dializado, liofilizado y resuspendido en 5 ml. En el último paso de purificación, en columna Q Sepharose, los 5 ml provenientes del paso anterior fueron inyectados y la actividad Rhasa fue eluida como un pico único a 0,42-0,45 M de NaCl, obteniéndose 24 ml totales. Este volumen fue dializado y liofilizado, obteniéndose 400 µl finales. Luego de esta cromatografía se obtuvo un nivel de recuperación del 9 % de la actividad original y un aumento en la actividad específica de 14 veces (Figura 4.3).

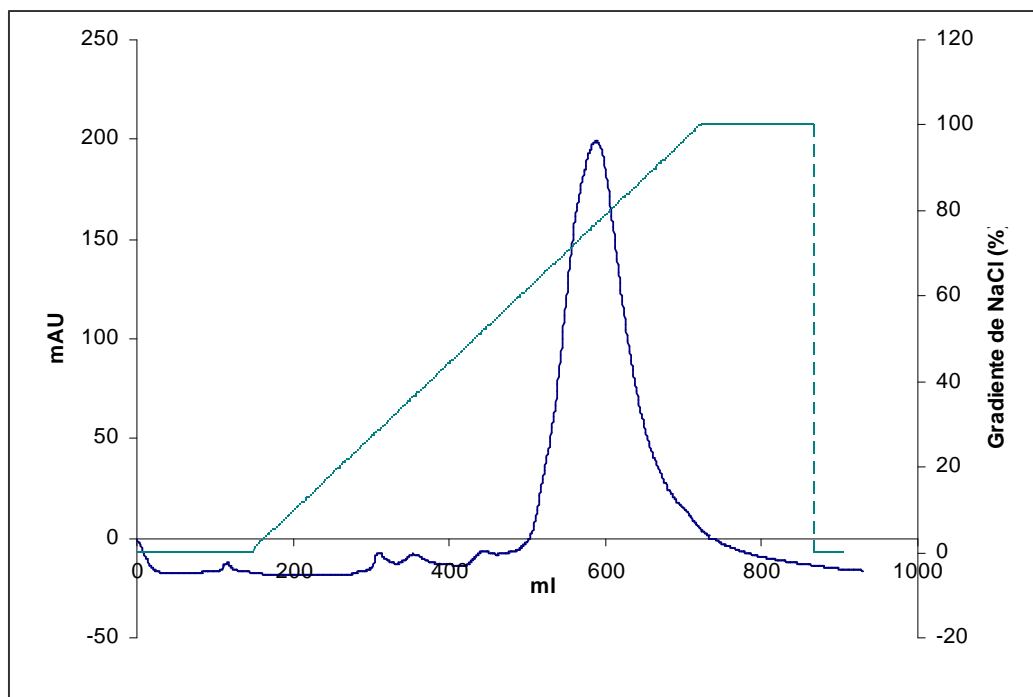


Figura 4.3: Cromatograma obtenido de la etapa de purificación de la columna XK 26/20 Sepharose® Q (con 36 ml de relleno, pre-equilibrada con BM, flujo: 3 ml/min, volumen de fracción: 15 ml). Las fracciones que presentaron actividad Rhasa fueron 12 y 13.

Luego del proceso de purificación por cromatografía no pudo eliminarse completamente la actividad Gluasa, por lo que se recurrió a una electroforesis en gel de poliacrilamida preparativa, a los efectos de obtener una fracción homogénea de la enzima para llevar a cabo su caracterización bioquímica. Esta electroforesis se desarrolló en condiciones no reductoras, y las bandas obtenidas fueron analizadas en términos de actividad Rhasa. La banda que presentó actividad fue sometida al proceso de extracción, tal como se indica en Materiales y Métodos. Una vez extraída, el grado de pureza de la proteína fue evaluado por medio de SDS PAGE, donde se observó que fue posible obtener una fracción homogénea de la enzima Rhasa. (Figura 4.4).

Esta última etapa de purificación permitió obtener una muestra con una actividad específica de $526.5 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$. La recuperación final respecto de la original fue de 4,5 %. Esta fracción fue utilizada para los siguientes ensayos de caracterización bioquímica y cinética y para los estudios de aplicación del biocatalizador. Un resumen del proceso de purificación se presenta en la Tabla 4.1.

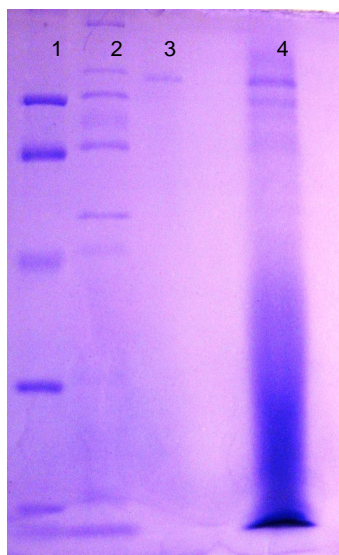


Figura 4.4: SDS PAGE de la Rhasa extraída de la electroforesis preparativa. Calle 1: LMWM; Calle 2: HMWM; Calle 5: Proteína extraída; Calle 6: ME, antes de purificar. Tinción con Coomasie coloidal.

Tabla 4.1: Resumen del proceso de purificación de la proteína Rhasa de *A. luteo-albus* a partir de medios conteniendo ramnosa como FCE.

Etapa	Proteína total (mg)	Actividad total (mU)	Actividad específica (mU/mg)	Recuperación (%)
Sobrenadante concentrado	38.7	1421	36.7	100
Precipitación con sulfato de amonio	37.4	1331	35.5	94
Filtración en gel (Sephacryl S-100)	9.6	758	79.2	53
Intercambio iónico (DEAE Sepharose)	1.2	418	363.9	29
Intercambio iónico (Q Sepharose)	0.3	128	496.8	9
Electroforesis preparativa	0.12	63	526.5	4,5

4. 4. Condiciones óptimas de reacción

Se estudiaron las condiciones óptimas de reacción de la Rhasa de *A. luteo-albus* en términos de pH y temperatura usando como sustrato pnp-Ram. El valor de pH óptimo encontrado fue de alrededor de 6, con un 25% de actividad a pH 9 (Figura 4.5). Este valor de pH óptimo es semejante a lo que ocurre con otras Rhasas de *Aspergillus* descritas^{12,24,31,39}. El hecho de que esta enzima sea estable y conserve actividad a pH 9, aún sin ser el pH óptimo de reacción, hace posible su aplicación en procesos biotecnológicos en estas condiciones de pH, por ejemplo, en la hidrólisis de flavonoides para la obtención de productos de interés industrial.

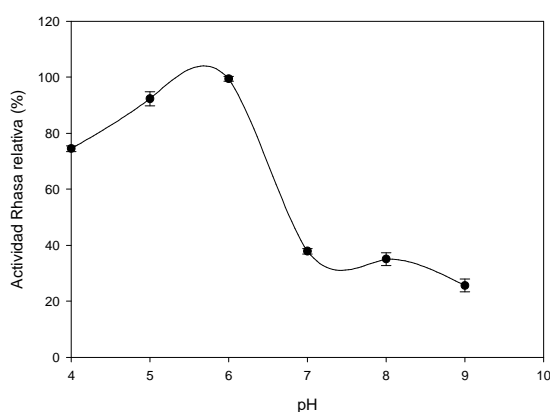


Figura 4.5: pH óptimo de la actividad Rhasa de *A. luteo-albus* frente a pnp- α -L-ramnopiranosido. Se midió actividad a tiempo final a 405 nm de una muestra conteniendo 350 μ l de BMTG ajustado a valores de pH entre 5 y 10, 50 μ l de pnp-Ram y 50 μ l de enzima purificada.

Es importante destacar la estabilidad del sustrato en las condiciones de reacción, debido a que la hidrólisis del mismo en condiciones de pH extremos podría dificultar la evaluación de los resultados. En este estudio, este efecto fue subsanado con el empleo de blancos de sustrato y de enzima correspondientes en cada análisis. Del mismo modo, se realizaron ensayos de estabilidad durante 24 h incubando el sustrato en las condiciones de reacción (conteniendo Rhasa inactivada) y analizándolo por HPLC y espectrofotométricamente a A_{405} . A partir de estos ensayos se determinó que los sustratos son estables en las condiciones de reacción, por lo que los resultados obtenidos pueden ser tomados en cuenta. Del mismo modo, y a los efectos de evaluar la liberación de *p*-nitrofenolato en distintas condiciones de pH, este ensayo se realizó midiendo actividad enzimática a tiempo final y deteniendo la reacción con Na_2CO_3 .

Por último, la temperatura óptima de la Rhasa purificada a pH 9,0 fue de 55°C frente a pnp-Ram (Figura 4.6). La mayoría de las Rhasas caracterizadas son óptimamente activas a temperaturas entre 40°C y 80°C^{12,15,31}. Estas altas temperaturas representan una ventaja operacional a la hora de diseñar un proceso enzimático, ya que la velocidad de reacción y la solubilidad de los sustratos aumentan con la temperatura, y

la enzima resistiría las condiciones de reacción industriales.

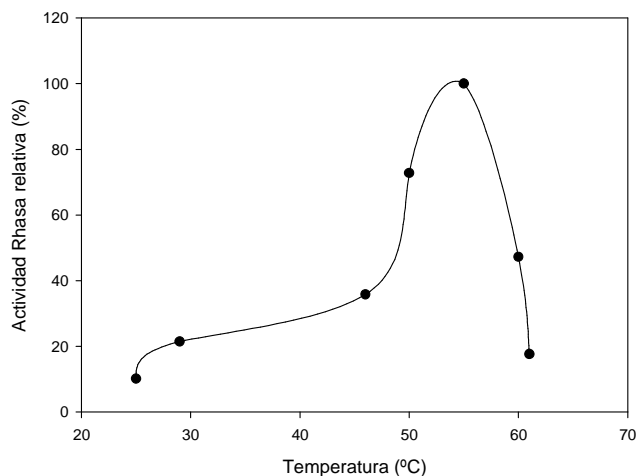


Figura 4.6: Temperatura óptima de la Rhasa de *A. luteo albus* frente a pnp-ramnopiranosido. Se determinó la actividad enzimática en las condiciones estándar.

4. 5. Caracterización bioquímica de la enzima

El peso molecular estimado por SDS-PAGE fue $109 \pm 3,1$ kDa (Figura 4.7). Valores entre 90 a 96 kDa han sido descritos para Rhasas de *Clostridium stercorarium*⁴⁷ y de *A. terreus*¹² y también para otras dos Rhasas de *A. niger*^{15,39}, mientras que valores de 70 y 72 kDa fueron reportados para las dos Rhasas N-glicosiladas de *A. aculeatus*³⁰ y de 75 kDa para otra Rhasa de *A. níger*²⁴. Por su parte, el IEF analítico mostró que la Rhasa presenta un valor de pI de $4,6 \pm 0,06$, dentro del rango de pI de 4,5 - 5,2 descrito para algunas Rhasas de *Aspergillus*^{12,24,31}.

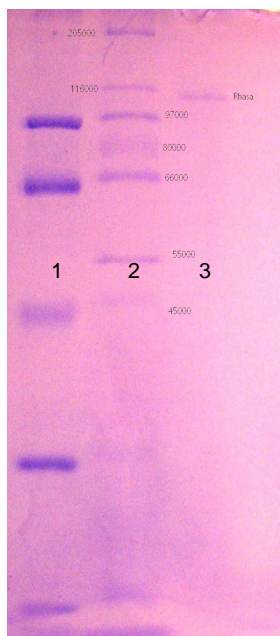


Figura 4.7: Análisis por SDS PAGE de Rhasa de *A. luteo-albus*. Calle 1: Marcador de bajo peso molecular; Calle 2: Marcador de alto peso molecular; Calle 3: Rhasa de *A. luteo-albus*. Tinción del gel con Coomassie coloidal.

4. 6. Parámetros cinéticos sobre pnp-Ram

Los valores encontrados de la constante de Michaelis, K_M , y $V_{m\acute{a}x}$ de la α -L-ramnosidasa de *A. luteo-albus* usando pnp-Ram como sustrato fueron 6.2 mM y 111,1 U/mg, respectivamente. Estos parámetros cinéticos fueron determinados en Tris-HCl, 20 mM pH 9.5 a 37° C.

Valores de K_M menores desde 1,52 a 2,9 mM han sido descritos para *Penicillium sp.*⁴¹ y algunos *Aspergillus*^{5,17}. Con respecto a los valores de $V_{m\acute{a}x}$, las enzimas ramnosidasas de *A. terreus*¹² y *Cl. Stercorarium*⁴⁷ con valores de 84 y 82 U/mg, respectivamente, han sido descritas como las más activas.

Al igual que para otras Rhasas, la ramnosa es un inhibidor competitivo de la Rhasa de *A. luteo-albus*. Se determinó el valor de K_i para ramnosa, resultando en 4,7 mM. Este azúcar ha sido reportado como inhibidor competitivo de Rhasas de *Penicillium sp.* y de *Aspergillus*, con valores mayores de K_i que oscilan entre 1.2 a 4.2 mM^{23,41}.

Un inhibidor competitivo altera la constante de Michaelis, K_M , de manera que la enzima aparenta tener menor afinidad por el sustrato. A bajas concentraciones de sustrato, la velocidad de reacción es reducida por el término $(1 + [I]/K_i)$, pero a altas concentraciones del mismo, es posible alcanzar la velocidad máxima intrínseca. Es por esto que la inhibición competitiva puede ser eliminada asegurando que el sustrato este presente en condiciones saturantes ($S \gg I$). Estos resultados sugieren la necesidad de desarrollar un proceso enzimático en sistema continuo de manera de evitar la inhibición competitiva por la acumulación del producto (ramnosa).

4. 7. Efecto de varios cationes sobre la actividad Rhasa

Se determinó el efecto de varios cationes sobre la actividad α -L-ramnosidasa de *A.*

luteo-albus,. En las condiciones ensayadas, la actividad fue inhibida completamente por Zn^{+2} , mientras que Ca^{+2} , Fe^{+3} , K^{+1} , y Mn^{+2} no mostraron efecto alguno sobre dicha actividad. Los resultados se muestran en la Figura 4.8. Un efecto similar es descrito para la enzima de *Clostridium stercorarium*⁴⁷.

Los iones metálicos reaccionan rápidamente, y a bajas concentraciones, con los grupos sulfidrilos de las proteínas. También pueden acomplejarse con otros grupos de las enzimas, incluyendo los grupos imidazol, carboxilos y peptídicos⁴⁵. Esta podría ser una explicación del efecto de los cationes evaluados sobre la actividad Rhasa de *A.luteo-albus*.

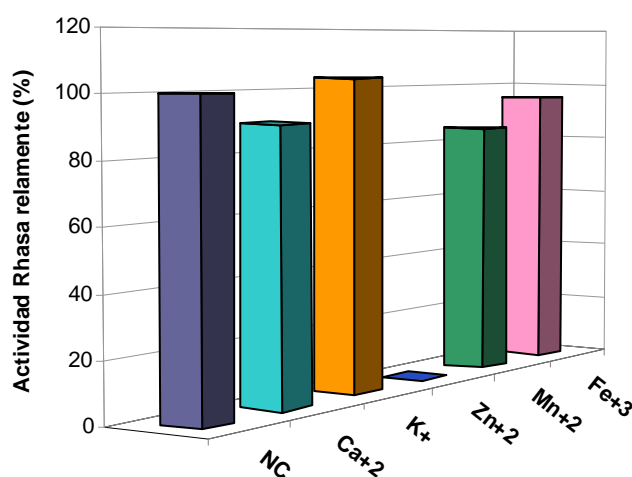


Figura 4.8: Efecto de diferentes iones metálicos sobre la actividad Rhasa de *A. luteo-albus*. La actividad enzimática fue determinada adicionando cada uno de los cationes a la mezcla de reacción estándar y se evaluó el porcentaje de actividad remanente (NM: sin catión).

4. 8. Especificidad de sustrato sobre ramnoglucósidos naturales

Como se dijo anteriormente, algunos flavonoides de origen vegetal tales como hesperidina, naringina y quercitrina son sustratos naturales de las α -L-ramnosidasas. La hidrólisis de flavonoides es de gran interés industrial debido a que sus productos poseen importantes propiedades biológicas que los transforman en potenciales opciones para el tratamiento de algunas enfermedades, además de su utilización en síntesis orgánica y en la industria alimenticia. En las Figuras 4.9, 4.10 y 4.11 puede observarse la capacidad de esta enzima para hidrolizar hesperidina, donde el residuo de ramnosa está unido por un enlace α -1,6 al β -D-glucósido, naringina, que posee uniones α -1,2 al β -D-glucósido, y también sobre quercitrina, en la cual el residuo

ramnosil está directamente unido al C-3 del aglicón quercetina. Bajo las condiciones de ensayo, la enzima demostró ser más activa sobre quercitrina respecto de los otros sustratos. En la CCF se observa que si bien este sustrato no es homogéneo, ya que antes de incubarlo con la enzima presenta una banda principal y dos de menor intensidad con Rf menor, no presenta ramnosa libre. Luego de incubarlo con Rhasa, el cromatograma muestra claramente una disminución de intensidad de la banda mayor, aparece claramente la ramnosa y una banda difusa con un Rf menor que la ramnosa atribuible al aglicón quercetina. Se han descrito algunas Rhasas de *Aspergillus* que exhiben diferentes especificidades de sustratos, pero sólo una de *A. niger*²⁴ y las dos de *A. aculeatus*³⁰ fueron reportadas como activas sobre estos tres ramnoglucósidos.

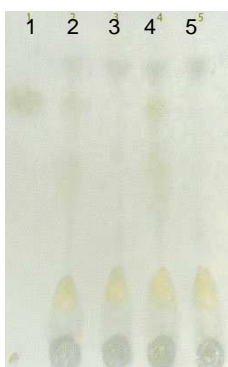


Figura. 4.9: Análisis por CCF de productos de hidrólisis de Hesperidina Calle 1 Patrón de Ramnosa (11,25 µg) Calle 2: Hesperidina incubada con Rhasa + ramnosa (11,25 µg) como patrón interno. Calle 3: Hesperidina incubada con Rhasa. Calle 4: Patrón de Hesperidina (10,5 µg) + enzima tiempo de reacción = 0 + ramnosa (11,25 µg) como patrón interno. Calle 5: Patrón de Hesperidina (10,5 µg).

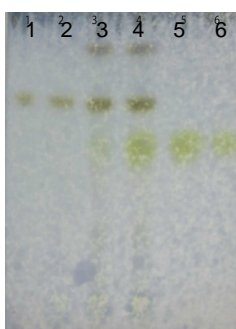


Figura. 4.10: Análisis por CCF de productos de hidrólisis de naringina. Calle 1: Patrón de naringina (10,5 µg); Calle 2: Patrón de naringina (10,5 µg) + enzima (a tiempo de reacción = 0). Calle 3: naringina incubada con Rhasa; Calle 4: naringina incubada con Rhasa + ramnosa (11,25 µg) como patrón interno; Calle 5: Patrón de ramnosa (11,25 µg). Calle 6: Patrón de ramnosa (5,62 µg).

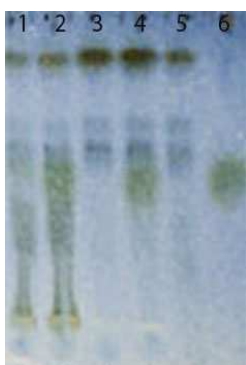


Figura 4.11: Análisis en CCF de productos de hidrólisis de quercitrina. Calle 1: quercitrina incubada con Rhasa; Calle 2: quercitrina incubada con Rhasa + ramnosa (5,62 µg) como patrón interno; Calle 3: Patrón de quercitrina (10,5 µg); Calle 4: Patrón de quercitrina (10,5 µg) + ramnosa (5,62 µg) como patrón interno; Calle 5: Patrón de quercitrina (10,5 µg); Calle 6: Patrón de ramnosa (5,62 µg). Se observa que el sustrato no es una sustancia homogénea.

Finalmente, se determinó el grado de hidrólisis en las mismas las condiciones de reacción por HPLC, donde los resultados fueron los que se detallan en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2: Resultado cuantitativo de la hidrólisis de ramnósidos naturales determinado por HPLC.

Sustrato	Hidrólisis (%)
Hesperidina	9,44
Naringina	29,60
Quercitrina	90,50

Estos resultados obtenidos son promisorios en relación a la utilización de la Rhasa de *A. luteo-albus* en la hidrólisis de ramnósidos en medio alcalino. Una aplicación potencial de las propiedades de esta enzima es la obtención de ramnosa y otros productos a partir de fuentes naturales abundantes como son los sustratos aquí estudiados.

4. 9. Caracterización proteómica

El análisis de la secuencia N-terminal de la Rhasa de *A. luteo-albus* no fue exitoso probablemente porque el N-terminal está bloqueado, tal como ocurre en el 50 % de las proteínas eucariotas.

Debido a estos resultados y a la necesidad de contar con una secuencia parcial de esta proteína para intentar su clonado y sobre expresión en futuros trabajos, se decidió analizar su huella peptídica por MS/MS a partir de una digestión trípica.

En este método, la proteína en estudio es hidrolizada mediante proteasas (comúnmente tripsina) para dar pequeños péptidos cuyas masas absolutas pueden determinarse mediante un espectrómetro de masas acoplado al detector adecuado, como el MALDI-TOF.

Para ello se trabajó con la fracción pura del extracto enzimático para obtener la huella peptídica (peptide mass fingerprint, PMF) por MALDI-TOF MS (PMF MALDI-TOF MS). La idea de la aplicación de esta técnica es que permite identificar tanto posibles secuencias comunes así como secuencias propias de enzimas de especies distintas. Con dicho mapa trípico y empleando la herramienta MASCOT4, que utiliza datos de

espectrometría de masas para identificar proteínas en las bases de datos de secuencias primarias, se realizó la búsqueda bioinformática a fin de identificar la proteína original. Sin embargo, a pesar de haberse obtenido muy buenos datos de ms y ms/ms, no fue posible identificar en las bases de datos disponibles y de manera estadísticamente significativa a la proteína. Esto podría deberse a que el genoma de la especie involucrada no está aún disponible.

Algunas veces la identificación de las proteínas mediante PMF es imposible, debido entre otras razones a las lagunas existentes en las bases de datos, o la existencia de mezclas proteicas en la mancha (spot) seleccionada para la identificación. Para solucionar este problema, una posible alternativa es optar por una fragmentación de los péptidos obteniéndose la secuencia de aminoácidos correspondiente. Para ello, puede utilizarse una ionización tipo MALDI, mediante una segunda fragmentación (MALDI TOFTOF) o “electrospray” (trampa iónica, cuadruplo, etc.). Este método de secuenciación *de novo* es la estrategia a seguir para identificar proteínas que provienen de organismos que no han sido secuenciados, o su secuencia no ha sido anotada. Mediante esta secuenciación se obtienen secuencias de aminoácidos que son comparadas con las secuencias existentes en las bases de datos en busca de secuencias homólogas. Aunque la proteína pueda no ser identificada o sea desconocida, la información obtenida a partir de la secuenciación *de novo* puede ser utilizada para clonar el gen correspondiente. Esta alternativa será empleada en trabajos posteriores a los efectos de lograr el clonado y la sobre expresión de esta enzima.

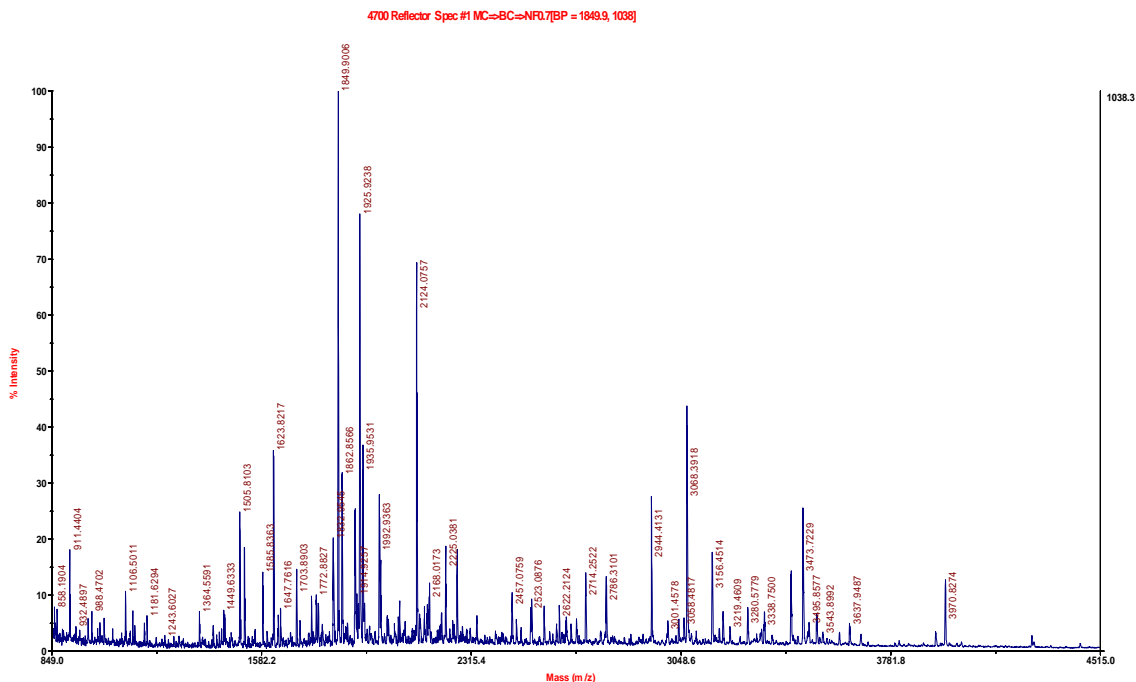


Figura 4.12: Espectro de masa obtenido en modo reflector positivo de Rhasa de *A. luteo-albus*

5. Conclusiones generales

Se estudiaron las condiciones de producción de la α -L-ramnosidasa producida por *A. luteo-albus*. El mejor inductor para la producción de la enzima fue la ramnosa, obteniéndose una fracción de actividad ramnosidasa con bajos niveles de actividad glucosidasa. La síntesis de la Rhasa producida por este microorganismo, está regulada por el mecanismo de inducción y represión catabólica como ocurre con la mayoría de las glicosidasas fúngicas. La represión por carbono, en este caso mediada por glucosa, se evidenció en una disminución de la producción de la enzima en cultivos con mezcla de ramnosa/glucosa en comparación con la producción observada con ramnosa sola como FCE. La ventaja de emplear ramnosa como fuente de carbono y energía reside no sólo en un aumento de la producción de enzima sino también en el manejo de un medio de cultivo libre de impurezas proteicas, lo cual en principio es ventajoso desde el punto de vista de la purificación de la enzima. En nuestro caso, cabe destacar la importancia de la eliminación de los pigmentos producidos en el cultivo en las primeras etapas de la purificación, habida cuenta que estos contaminantes se adsorben a las columnas de intercambio aniónico interfiriendo en el proceso de purificación.

El protocolo general para la purificación fue finalmente el siguiente: concentración por liofilización, eliminación de pigmentos por medio de cromatografía de permeación en gel, cromatografía de interacción aniónica y, por último, electroforesis preparativa. A partir de estos procesos, fue posible obtener una fracción homogénea de proteína que fue utilizada para posteriores estudios de caracterización. Dichos estudios se basaron en la determinación de las condiciones óptimas de reacción frente a distintos sustratos. En cuanto al pH y temperatura óptimos de reacción, factores que dependen del sustrato a hidrolizar, se encontró un máximo de actividad a pH 6,0 y 55°C. La propiedad de una enzima de ser activa en una determinada condición de pH y temperatura está íntimamente relacionada con su estabilidad, y limita su potencial de aplicación en diferentes procesos biotecnológicos. Se evaluaron los parámetros cinéticos de la enzima, obteniendo los valores de 6.2 mM y 111,1 U/mg, para K_M y $V_{máx}$, respectivamente.

La propiedad más representativa de esta enzima cuando se la compara con otras Rhasas fúngicas, es su capacidad para hidrolizar sustratos solubles e insolubles en el rango de pH 8,5-9,5. La Rhasa descrita en este trabajo muestra la capacidad de hidrolizar distintos sustratos, lo que permite su potencial aplicación en procesos biotecnológicos tales como la hidrólisis industrial de ramnósidos.

6. Referencias bibliográficas

1. **Allegrucci, N., L. Eliades, A. M. Bucszinsky, M. Cabello, and A. Arambarri.** 2007. Diversidad de Anamorfos de Ascomycota en bosques nativos de *Celtis tala* (Ulmaceae) en la Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Bol.Soc.Argent.Bot.* **42**:79-86.
2. **Bailey, C. and H. N. J. Arst.** 1975. Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Eur J Biochem* **51**:573-577.
3. **Birgisson, H., G. O. Hreggvidsson, O. H. Fridjonsson, A. Mort, J. K. Kristjansson, and B. Mattiasson.** 2004. Two new thermostable α -L-rhamnosidases from a novel thermophilic bacterium. *Enzyme Microb Technol* **34**:561-571.
4. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
5. **Caldini, C.** 1994. Kinetic and immobilization studies on fungal glycosidases for aroma enhancement in wine. *Enzyme Microb Technol* **16**, 286-291.
6. **Caprari, C., C. Bergman, Q. Mighelli, G. Salvi, P. Albersheim, A. Darvill, F. Cervone, and G. De Lorenzo.** 1993. *Fusarium moniliforme* secretes four endopolygalacturonases derived from a single gene product. *Physiol.Mol.Plant Pathol* **43**:453-562.
7. **Eliades, L., M. Cabello, C. E. Voget, and B. Galarza.** 2007. Actividad queratinolítica en hongos alcalofílicos y alcalino-tolerantes aislados de suelo. *Revista Argentina de Microbiología* **39**:112.
8. **Elinbaum, S., H. Ferreyra, G. Ellenrieder, and C. Cuevas.** 2002. Production of *Aspergillus terreus* α -L-rhamnosidase by solid state fermentation. *Lett Appl Microbiol* **34**:67-71.
9. **Elujoba, A. and R. Hardman.** 1987. Diosgenin production by acid and enzymatic hydrolysis of fenugreek. *Fitoterapia* **58**:299-303.
10. **Flanzy, C.** 2003. *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*. Madrid.
11. **Freer, S. N. and R. W. Detroy.** 1985. Regulation of r-1,4-Glucosidase Expression by *Candida wickerhamii*. *Appl.Environ.Microbiol.* **50**:152-159.
12. **Gallego, M. V., F. Piñaga, D. Ramón, and S. Vallés.** 2000. Purification and characterization of an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* of interest in winemaking. *J Food Sci* **66**:204-209.
13. **García Mesa M., Armenteros Herrera D.M., Vilas M.M., Coma Alfonso C., Hernández Carretero J., Díaz Batista A., and Fernández Montequini J.** 2002. Plantas cítricas en el tratamiento de enfermedades vasculares. *Rev Cubana Angiol y Circ Vasc* **3**:39-46.
14. **Gunata, Z., I. Dugelay, M. J. Vallier, J. C. Sapis, and C. Bayonove.** 1997. Multiple forms of glycosidases in an enzyme preparation from *Aspergillus niger*:

- Partial characterization of a β -apiosidase. *Enzyme Microb Technol* **21**:39-44.
15. **Hsieh, P. C. and H. Y. Tsen.** 1991. Purification and characterization for a a-rhamnosidase from two fungal naringinase preparations. *J.Chin.Agric.Chem.Soc.* **29**:61-63.
 16. **Kaul, T., E. Middleton, and P. Ogra.** 1985. Antiviral affect of flavonoids on human viruses. *J.Med.Virol.* **15**:71-79.
 17. **Kurosawa Y, K. Ikeda, and F. Egami.** 1973. α -L-Rhamnoside of the liver of Turbo cornutus. *J Biochem* **73**:31-37.
 18. **Lang, S. and D. Wullbrandt.** 1999. Rhamnose lipids - biosyntesis, microbial production and application potential. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **51**:22-32.
 19. **Linhardt, R. J., R. Bakhit, L. Daniels, F. Mayerl, and W. Pickenhagen.** 1989. Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose. *Biotechnol Bioeng* **33**:365-368.
 20. **Lorenzo Bürger, D. A., E. Bordeu Schwarze, and A. Belancic Majcenovic.** 2007. Pontificia Universidad católica de Chile. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal.
 21. **Maicas, S. and J. J. Mateo.** 2005. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **67**:322-335.
 22. **Maier, R. and G. Soberón-Chávez.** 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosyntesis and potential applications. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **54**:625-633.
 23. **Manzanares, P., M. Orejas, E. Ibañez, S. Vallés, and D. Ramon.** 2000. Purification and characterization of an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus nidulans*. *Lett Appl Microbiol* **31**:198-202.
 24. **Manzanares, P., L. H. de Graaff, and J. Visser.** 1997. Purification and characterization of an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol Lett* **157**:279-283.
 25. **Manzanares, P., M. Orejas, J. V. Gil, L. H. de Graaff, J. Visser, and D. Ramon.** 2003. Construction of a Genetically Modified Wine Yeast Strain Expressing the *Aspergillus aculeatus* rhaA Gene, Encoding an α -L-Rhamnosidase of Enological Interest. *Appl.Enviro.Microbiol.* **69**:7558-7562.
 26. **Martinez-Florez, S., J. Gonzalez Gallego, J. M. Culebras, and N. J. Tuñon.** 2002. Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria XVII* **6**:271-278.
 27. **Miake, F., T. Satho, H. Takesue, N. Yanagida, N. Kashige, and K. Watanabe.** 2000. Purification and characterization of intracellular α -L-rhamnosidase from *Pseudomonas paucimobilis* FP2001. *Arch Microbiol* **173**:65-70.
 28. **Monti, D., A. Pisevcová, V. Kren, M. Lama, and S. Riva.** 2004. Generation of an α -rhamnosidase library and its application for the selective derhamnosylation of natural products. *Biotechnol Bioeng* **87**:763-771.

29. **Munish, P. and K. Sukirti.** 2005. Purification and characterization of naringinase from a newly isolated strain of *Aspergillus niger* 1344 for the transformation of flavonoids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **V21**:753-758.
30. **Mutter, M.** 1997. PhD thesis. Wageningen University. The Netherlands.
31. **Mutter, M., G. Beidman, H. A. Schols, and A. G. Voragen.** 1994. Rhamnogalacturonan α -L-Rhamnopyranohydrolase. A novel enzyme specific for the terminal nonreducing rhamnosyl unit in rhamnogalacturonan regions of pectin. *Plant Physiol.* **106**:241-250.
32. **Nagai, K., T. Sakai, R. Rantiatmodjo, K. Suzuki, W. Gams, and G. Okada.** 1995. Studies on the distribution of alkalophilic and alkali-tolerant soil fungi I. *Mycoscience* **36**:247-256.
33. **Nagai, K., K. Suzuki, and G. Okada.** 1998. Studies on the distribution of alkalophilic and alkali-tolerant soil fungi II: Fungal flora in two limestone caves in Japan. *Mycoscience* **39**:293-298.
34. **Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube, Ehrhardt, and W.** 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**:255-262.
35. **Peterson, J., G. Beecher, S. Bhagwat, J. Dwyer, S. Gebhardt, D. Haytowitz, and J. Holden.** 2006. Flavonones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis* **19**:S74-S80.
36. **Peterson, J. J., J. T. Dwyer, G. R. Beecher, S. A. Bhagwat, S. E. Gebhardt, D. B. Haytowitz, and J. M. Holden.** 2006. 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* **19**:566-573.
37. **Reguera, G. and S. Leschine.** 2009. Fast and Efficient Elution of Proteins from Polyacrylamide Gels Using Nanosep® Centrifugal Devices. Department of Microbiology, University of Massachusetts-Amherst http://www.pall.com/laboratory_2273.asp.
38. **Riberau-Gayon, P., Y. Glories, A. Maujean, and D. Duborieu.** 1998. L'arôme des cépages, p. 41-56. *In: Dunod (ed.), Traité d'oenologie. Chimie du vin stabilisation et traitements.* Paris.
39. **Roitner, M., T. Schalkhammer, and F. Pittner.** 1984. Preparation of prunin with the help of immobilized naringinase pretreated with alkaline buffer. *Appl Biochem Biotech* **9**:483-488.
40. **Rojas, N. L., S. F. Cavalitto, M. Cabello, R. A. Hours, and C. E. Voget.** 2008. Alkaline Polysaccharidases Produced in Solid State Cultures by Alkalophilic Fungi Isolated from Argentina. *Journal of Pure and Applied Microbiology* **2**:1-10.
41. **Romero, C., A. Manjon, J. Bastida, and J. L. Iborra.** 1985. A method for assaying the rhamnosidase activity of naringinase. *Anal Biochem* **149**:566-571.
42. **Scaroni, E., C. Cuevas, L. Carrillo, and G. Ellenrieder.** 2002. Hidrolytic

- properties of crude α -L-rhamnosidases produced by several wild strains of mesophilic fungi. *Lett Appl Microbiol* **34**:461-465.
43. **Smith B.J.** 1984. *Methods in Molecular Biology*. , p. 41-56. *In*: E. e. Walker JM (ed.), New Jersey.
 44. **Spagna, G., R. N. Barbagallo, A. Martino, and P. G. Pifferi.** 2000. A simple method for purifying glycosidases: α -L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma of Moscato wine. *Enzyme Microb Technol* **27**:522-530.
 45. **Whitaker, J. R.** 1994. Enzyme inhibitors in: *Principles of enzymology for the food science*, *In*: Marcel Dekker (ed.), 2nd edition. ed. New York.
 46. **Young, N. M., R. A. Z. Johnston, and J. C. Richards.** 1989. Purification of the α -L-rhamnosidase of *Penicillium decumbens* and characterization of two glycopeptide components. *Carbohydr Res* **191**:53-62.
 47. **Zverlov, V., C. Hertel, K. Bronnrnmeier, A. Hroch, J. Kellermann, and W. Schwarz.** 2000. The thermostable α -L-rhamnosidase RamA of *Clostridium stercoarium*: biochemical characterization and primary structure of a bacterial α -L-rhamnoside hydrolase, a new type of inverting glycoside hydrolase. *Mol Microbiol* **35**:173-179.