



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Tesis Doctoral:

Sistemas mono-enzimáticos de desglicosilación de flavonoides
(diglicosidasas) para su aplicación en procesos tecnológicos

Lic. Gisela WEIZ

Director: Dr. Javier D. BRECCIA

Codirector: Dr. Roque HOURS

-2018-

Sistemas mono-enzimáticos de desglicosilación de flavonoides (diglicosidasas) para su aplicación en procesos tecnológicos

El presente trabajo de tesis, para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Laboratorio de Biocatálisis, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de La Pampa con el financiamiento del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

A mis padres;

A Fede;

A Joaquín.

Agradecimientos

Al Dr. Javier Breccia, mi director, por mi formación, por creer en mí, por su ayuda, y por haber contado con él las veces que fueron necesarias.

Al Dr. Roque Hours, por asumir la co-dirección de este proyecto con gran interés académico.

A la Dra. Laura Mazzaferro, por su paciencia, dedicación, por transmitirme sus conocimientos y pasión por la ciencia, por hacer que todo sea más fácil.

A los Dres. Vladimir Kren y Michael Kotik, por haberme recibido en el laboratorio de Biotransformaciones-Instituto de Microbiología, Praga Republica Checa. Debo agradecer la disponibilidad y soporte profesional durante mi estadía.

A mis compañeros del Laboratorio de Biocatálisis pasados y presentes, por hacer que las largas jornadas de trabajo sean amenas.

Debo un profundo agradecimiento a la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), por permitir el desarrollo a distancia de la tesis. Al Instituto de Ciencias de la Tierra y Ambientales de La Pampa (INCITAP) y a la Universidad Nacional de la Pampa (UNLPam), por haberme brindado el lugar para realizar este trabajo.

También al soporte financiero de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la UNLPam.

Por último, mi más sentido agradecimiento a las personas sin las cuales transitar estos años no hubiese sido posible:

A mis amigos, por compartir nuestras vidas, por estar siempre. Mención especial para Vic, por su amistad incondicional.

A mi familia, por su ejemplo. Por estar siempre. Por ser el lugar al que siempre quiero volver.

A Fede por su amor, comprensión y apoyo.

A lo más valioso que tengo, Joaquín.

Publicaciones derivadas de este trabajo de tesis

1. Publicaciones Científicas

- **Weiz G**, Breccia JD, Mazzaferro LS. (2017). Screening and quantification of the enzymatic deglycosylation of the plant flavonoid rutin by UV-visible spectrometry. *Food Chemistry*. 229: 44-49.
- **Weiz G**, Braun L, Lopez R, Domínguez de María P, Breccia JD. (2016). Enzymatic deglycosylation of flavonoids in deep eutectic solvents-aqueous mixtures: paving the way for sustainable flavonoid chemistry. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 130: 70-73

2. Manuscritos

- Mazzaferro LS, **Weiz G**, Braun L, Kotik M, Pelantová H, Křen V, Breccia JD. Enzymatic rutosylation of phenolic compounds using a fungal diglycosidase. *Trabajo enviado*.
- Mazzaferro LS, Kotik M, **Weiz G**, Neher BD, Křen V, Breccia JD. Family GH5 α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase from *Acremonium* sp. DSM 24697: comparison with diglycosidases of different origin in terms of sequence and substrate specificity. *Trabajo enviado*.
- **Weiz G**, Mazzaferro LS, Kotik M, Halada P, Křen V, Breccia JD. *Enzymatic deglycosylation of rutin by Acremonium sp. DSM24697 fungus*. (Manuscrito en preparación)

3. Presentaciones a Congresos

- 13th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformation. (Biotrans). Budapest Hungría, 2017.
 - Fungal Diglycosidases.
- 4° Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos (SAProBio). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, 2016.
 - Desglicosilación enzimática de flavonoides en mezclas acuosas de líquidos altamente eutécticos, posible medio para escalar reacciones de transglicosilación.

- **VII Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones (EnReBB).** Montevideo Uruguay, 2016.
 - The genome of *Acremonium* sp. DSM 24697 codes for two diglycosidasas with different substrate specificity

- **XII Jornadas Pampeanas de Ciencias Naturales.** Santa Rosa, La Pampa, 2016.
 - Enzimas desglicosilantes del flavonoide rutina: desarrollo de un método espectrofotometrico para su cuantificación.
 - Selección de cepas del género *Acremonium* productoras de diglicosidasas.

- **3° Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos (SAProBio).** Santa Fe, Argentina, 2014.
 - Glicosilación enzimática de compuestos fenólicos dirigida a su aplicación potencial en la industria farmacéutica y cosmética.
 - Sistema de desglicosilación enzimática de rutina del hongo *Acremonium* sp. DSM 24697.
 - Clonado y expresión de dos diglicosidasas de interés biotecnológico.
 - Diglicosidasas en el género *Acremonium*.

- **Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones (EnReBB).** La Plata, Argentina, 2012.
 - Desglicosilación enzimática de 3-*O*-rutinosil-flavonoides por el hongo *Acremonium* sp. DSM 24697.

Contenido

Resumen	8
Abstract	9
Lista De Abreviaturas	10
Introducción	12
1. Glicósido hidrolasas.	14
2. Flavonoides.	19
3. Desglicosilación de flavonoides	20
4. Producción de biocatalizadores	22
5. Desglicosilación enzimática de flavonoides en solventes altamente eutécticos.	23
Objetivos	26
Materiales y Métodos	28
Resultados y Discusión	37
1. Desarrollo de un método espectrofotométrico para la cuantificación de la desglicosilación enzimática de rutina.	38
2. Selección de microorganismos productores de diglicosidasas.	
3. 6- <i>O</i> - α -Ramnosil- β -glucosidasa II de <i>Acremonium</i> sp. DSM 24697.	47
4. Ingeniería de medio de reacción. Un caso de estudio con solventes altamente eutécticos (DES).	57 78
Conclusiones	86
Referencias	88

Resumen

Los flavonoides son metabolitos secundarios vegetales y, como tales, son ubicuos en los ecosistemas. En general, se encuentran glicosilados y en su reciclo natural, la desglicosilación es el primer paso catabólico seguido de la oxidación de la estructura aromática. Las diglicosidasas son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace heterosídico y liberan el disacárido y su correspondiente aglicona en una única reacción. El hongo *Acremonium* sp. DSM 24697 ha sido descrito como productor de una diglicosidasa, denominada 6-*O*- α -ramnosil- β -glucosidasa I, específica para flavonoides 7-*O*-rutinosilados. Si bien la hidrólisis del flavonoide 3-*O*-rutinosilado rutina no ha sido detectada con esta enzima, esta cepa es capaz de crecer con rutina como fuente de carbono. Basados en estos resultados previos, en el presente trabajo se estudió el sistema enzimático de *Acremonium* sp. DSM 24697 para la desglicosilación de rutina. Además se realizó una exploración de nuevas diglicosidasas en 28 cepas de los géneros *Acremonium* y *Sarocladium* utilizando diversos flavonoides (rutina, diosmina y hesperidina) como fuente de carbono. Rutina (quercetin-3-*O*-(6-*O*- α -L-ramnopiranosil- β -D-glucopiranosido) es un flavonoide compuesto por el polifenol quercetina y el disacárido rutinosa. Su desglicosilación enzimática es usualmente cuantificada mediante HPLC debido a la carencia de un método de *screening* rápido. Así, el desarrollo y validación de un método espectrofotométrico para la cuantificación de quercetina permitió medir la actividad desglicosilante de rutina y evaluar un número mayor de muestras en el tiempo. Los valores máximos de actividad enzimática para *Acremonium* sp. DSM 24697 y *Sarocladium strictum* DMic 093557 fueron 11.04 ± 1.15 U/L y 22.4 ± 4.1 U/L, respectivamente. En ambos casos, los productos de reacción se identificaron como rutinosa y quercetina, confirmando la producción de la actividad diglicosidasa.

La diglicosidasa de *Acremonium* sp. DSM 24697 que hidroliza el flavonoide rutina, fue denominada 6-*O*- α -ramnosil- β -glucosidasa II. Esta última posee un peso molecular aparente de 85 kDa, un pH y una temperatura óptima 5.0 y 50 °C respectivamente. Este catalizador mostró una alta promiscuidad de sustratos respecto de las diglicosidasas descritas en literatura. Fue capaz de hidrolizar 3-*O*-rutinosidos, 7-*O*-rutinosidos y con menor especificidad también hidrolizó 7-*O*-neohesperidosidos y los polisacáridos xilano y laminarina. El gen que codifica esta proteína se identificó en la secuencia del genoma de *Acremonium* sp. DSM 24697 y se expresó funcionalmente en *Pichia pastoris*. La proteína se clasificó dentro de las glicosido hidrolasas de la familia 3 (GH3) a diferencia de las diglicosidasas fúngicas conocidas, que pertenecen a las familias GH1 y GH5. Dentro de esta familia, α R β G II es el primer catalizador que actúa en modo endo y, de acuerdo al mecanismo de reacción *retaining* de la familia GH3, es capaz de transglicosilar. De esta forma, se sintetizaron rutinósidos de alcoholes primarios, secundarios y fenólicos.

Un trabajo de ingeniería del medio de reacción fue llevado a cabo para incrementar la eficiencia de la desglicosilación de flavonoides. Para ello, la catálisis con las diglicosidasas de *Acremonium* sp. DSM 24697 se realizó en presencia de solventes altamente eutécticos (DES). Los mismos están compuestos por una base de nitrógeno cuaternario y un dador de hidrógeno. La enzima 6-*O*- α -ramnosil- β -glucosidasa I desglicosiló hesperidina en DESs compuestos por colina-glicerol y colina-etilenglicol en proporciones de hasta 40% v/v DES-Buffer. La actividad de desglicosilación aumentó significativamente cuando la reacción se realizó en un medio que contenía los componentes individuales de los DES (glicerol y etilenglicol) (40% v/v de glicerol produjo un incremento del 140% de la actividad enzimática).

Abstract

Flavonoids are secondary plant metabolites and, as such, are ubiquitous in ecosystems. In the natural recycling of flavonoids, deglycosylation is the first catabolic step followed by the oxidation of the aromatic structure. Deglycosylation in a single reaction is catalyzed by diglycosidases, enzymes that release the aglycone and the entire disaccharide. The fungus *Acremonium* sp. DSM 24697 has been described as a producer of a diglycosidase, α -rhamnosyl- β -glucosidase I, specific for 7-*O*-rutinosylated flavonoids. While it did not display activity against the flavonoid 3-*O*-rutinosylated rutin, this strain is able to grow with rutin as a carbon source. Based on these previous results, in this work we studied the enzymatic system of *Acremonium* sp. DSM 24697 for rutin deglycosylation. In addition, an exploration of new diglycosidases was performed. Several flavonoids (rutin, diosmin and hesperidin) were used as a carbon source to cultivate 28 strains (genera *Acremonium* and *Sarocladium*). Rutin (quercetin-3-*O*- (6-*O*- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranoside)) is a flavonoid composed of the polyphenol quercetin and the disaccharide rutinose. Herein, a simple spectrophotometric method for the quantification of quercetin was developed and validated for the quantification of rutin deglycosylating activity. The maximum values of enzymatic activity were 11.04 ± 1.15 U/L and 22.4 ± 4.1 U/L for *Acremonium* sp DSM 24697 and *S. strictum* DMic 093557 respectively. The reaction products were identified as rutin and quercetin, confirming the production of the diglycosidases.

The diglycosidase of *Acremonium* sp. DSM 24697 that hydrolyzes rutin was called α -rhamnosyl- β -glucosidase II (α R β G II). This enzyme has an apparent molecular weight of 85 kDa (optimum pH 5.0, optimum temperature 50°C). α R β G II showed higher substrates promiscuity in comparison to the diglycosidases reported. It was able to hydrolyze 3-*O*-rutinosides, 7-*O*-rutinosides and, with lower activity, it also hydrolyzed 7-*O*-neohesperidosides, xylan and laminarin. The gene of α R β G II was identified in the genome of *Acremonium* sp. DSM 24697 and functionally expressed in *Pichia pastoris*. α R β G II was classified into glycoside hydrolases family 3 (GH3) unlike known fungal diglycosidases, which belong to GH1 and GH5. It is the first GH3 endo-acting enzyme and, in agreement with the retaining mechanism of family GH3, α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase II was able to transglycosylated primary, secondary and phenolic alcohols.

A medium engineering was carried out to increase the efficiency of deglycosylation of flavonoids. The catalysis with both diglycosidases of *Acremonium* sp. DSM 24697 was performed using deep eutectic solvents (DESs) as co-solvents. DES result from the complexation of quaternary ammonium salts (hydrogen acceptor: HA, e.g. choline chloride) with hydrogen bond donors such as amines, amides, alcohols or carboxylic acids. α R β G I deglycosylated hesperidin choline-glycerol and choline-ethylene glycol DESs composed with 40% v/v DES-Buffer. The enzymatic deglycosylation of hesperidin by α R β G I was observed when DES composed of choline chloride and glycerol or ethylene-glycol was used at proportions of up to 40% (DES-Buffer, v/v), displaying a promising framework to combine enhanced flavonoid solubilities and high enzymatic activities. Whereas deleterious effects were observed when choline chloride was solely added, presumably due to its chaotropic effect. The deglycosylation activity significantly increased when the single DES components – glycerol and ethylene-glycol – were added (e.g. 140% of enzyme activity at glycerol at 40% v/v).

Lista de Abreviaturas

Å	Angstrom
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BLAST	Alineamiento de secuencias de tipo local (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
Da	Dalton
DES	Solvente altamente eutéctico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
EC	Número de la comisión de enzimas
GH	Glicósido hidrolasa
Glc	Glucosa
H	Hora
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
K_c	Tasa de clarificación
k_{cat}	Constante catalítica
K_M	Constante de Michaelis-Menten
K_M/k_{cat}	Eficiencia catalítica
Kr	Tasa de crecimiento radial
LI	Líquidos iónicos
MALDI-TOF/TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz con detector de tiempo de vuelo en tándem
min	Minuto
MM	Masa molecular
MU	4-metilumbeliferona
MUGlc	4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosido
MUR	4-metilumbeliferil-rutinósido
MURa	4-metilumbeliferil- α -L-ramnósido
NC-IUBMB	Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular
p/p	Peso/peso

p/v	Peso/volumen
PDB	Número de entrada del RCSB Protein Data Bank
<i>p</i> NGP	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-glucopiranosido
<i>p</i> NRP	<i>p</i> -nitrofenil- α -L-ramnopiranosido
Ra	Ramnosa
Rev/min	Revoluciones/minuto
Rf	Relación de frente
RNAse	Ribonucleasa A
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida
U	Unidad de enzima (μ mol producto/min)
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen/volumen
vvm	Volumen de aire/(volumen de medio x minuto)
α R β G	6- <i>O</i> - α -ramnosil- β -glucosidasa
Δ abs	Cambio de absorbancia

Introducción

Biocatálisis

Algunas reacciones químicas ocurren espontáneamente; otras requieren de un catalizador para ser llevadas a cabo a una tasa significativa. Los catalizadores son moléculas que reducen la magnitud de la barrera de energía requerida para que una sustancia se convierta químicamente en otra. Termodinámicamente, la magnitud de esta barrera de energía puede expresarse convenientemente en términos del cambio de energía libre. El catalizador no se consume ni se altera durante la reacción por lo que, en principio, se puede usar indefinidamente para convertir un sustrato en producto. Sin embargo, en la práctica esto está limitado por la estabilidad del catalizador, es decir, su capacidad para retener su estructura activa a través del tiempo en las condiciones de reacción.

La biocatálisis se refiere al uso de enzimas o células como catalizadores de procesos en condiciones artificiales (*in vitro*). Un desafío importante en la biocatálisis es transformar catalizadores fisiológicos en catalizadores de procesos, los cuales deben actuar bajo las condiciones fisicoquímicas de un proceso industrial. Las enzimas, como cualquier catalizador, actúan reduciendo la barrera de energía de las reacciones bioquímicas. En contraste a los catalizadores químicos, las enzimas son deseables cuando la selectividad de la reacción es un requerimiento (como ocurre en productos farmacéuticos y productos químicos de alto valor), cuando los catalizadores deben estar activos en condiciones suaves (debido a la inestabilidad del sustrato y/o producto o para evitar reacciones no deseadas, como ocurre en varias reacciones de síntesis orgánica), cuando las restricciones ambientales son estrictas (que ahora es una situación bastante general, esto brinda a la biocatálisis una clara ventaja sobre las tecnologías alternativas) o cuando la etiqueta del producto natural es un problema (como en caso de aplicaciones alimentarias y cosméticas) (Lange, 2017). Por lo tanto, el estudio de nuevos biocatalizadores con potencial aplicación industrial es un campo en creciente desarrollo. Sin embargo, a pesar del gran potencial de las enzimas, sus aplicaciones industriales se han obstaculizado principalmente debido a propiedades indeseables en términos de estabilidad, costos de producción y eficacia catalítica. Para superar tales deficiencias se han intentado diversos enfoques, incluyendo la búsqueda de enzimas de fuentes naturales, técnicas de biología molecular, inmovilización, etc. (Dincer & Telefoncu, 2007). Como resultado, el uso de enzimas se ha extendido a la obtención de sintones precursores de productos farmacéuticos, agroquímicos y de química fina (Griengl et al., 2000, Hills et al., 2003, Nagasawa et al., 1990).

1. Glicósido Hidrolasas

Muchos compuestos farmacéuticos modifican su actividad biológica por la presencia de azúcares en su estructura. En términos generales, una fracción glicosídica incrementa la solubilidad en agua y la biodisponibilidad de las moléculas orgánicas insolubles (Kren& Martinková, 2001). En la naturaleza, los carbohidratos constituyen las biomoléculas más abundantes, con un sinnúmero de funciones fisiológicas ya sea en forma de monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos o cuando están unidos a otras moléculas en forma de glicoconjugados. Las enzimas carbohidrato activas están involucradas en el anabolismo, el catabolismo y la modificación de glicoconjugados, oligo- y polisacáridos. En la actualidad las enzimas carbohidrato-activas, se agrupan en cuatro clases funcionales sobre la base de las secuencias de aminoácidos de sus módulos catalíticos y sus dominios funcionales: glicósido hidrolasas (GHs), glicosil transferasas (GTs), polisacárido liasas (PLs) y carbohidrato esterasas (CEs) (Cantarel et al., 2009; Lombard et al., 2014). Este tipo de clasificación permite identificar características estructurales de las enzimas, inferir su mecanismo de reacción y determinar relaciones evolutivas entre ellas (Henrissat, 1991). Estas enzimas carbohidrato-activas ("*Carbohydrate-active enzymes*", CAZymes) fueron clasificadas en numerosas "familias" en base a sus secuencias aminoacídicas. El sistema de clasificación está disponible en la base de datos "CAZy", que se actualiza de manera continua en el sitio <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>. A modo de extensión, se creó CAZypedia (www.cazypedia.org), un recurso enciclopédico cuyos curadores son reconocidos científicos del campo (Cantarel et al., 2009).

Las glicósido hidrolasas, o glicosidasas, son las enzimas carbohidrato-activas mejor caracterizadas. Estas enzimas hidrolizan el enlace glicosídico entre dos o más carbohidratos, o bien el enlace entre un carbohidrato y un residuo de otra naturaleza. Dado que los carbohidratos se diferencian por mínimas variaciones estructurales, estas enzimas han evolucionado de un limitado número de ancestros, adquiriendo tanto diversidad como especificidad. La amplia diversidad de glicósido hidrolasas (GHs) permite encontrar nuevos campos de aplicación para estos catalizadores.

La hidrólisis enzimática del enlace glicosídico llevada a cabo por glicósido hidrolasas tiene lugar mediante una catálisis ácido-base. Ésta puede ocurrir, en el mayor número de casos, por medio de dos mecanismos principales, dando por resultado una inversión (glicosidasas "*inverting*") o bien una conservación (glicosidasas "*retaining*") de la configuración anomérica. A continuación se describen los dos mecanismos clásicos (Koshland, 1953).

Glicosidasas "*inverting*". Las glicosidasas que llevan a una inversión de la configuración anomérica lo hacen mediante una sustitución nucleofílica que ocurre en un único paso e

involucra un estado de transición iónico. La hidrólisis de un enlace glicosídico β da un producto de configuración α , y viceversa. La reacción ocurre con asistencia ácido/base de las cadenas laterales de dos residuos aminoacídicos, normalmente ácido aspártico o glutámico, que están localizados a 6-11 Å de distancia entre sí.

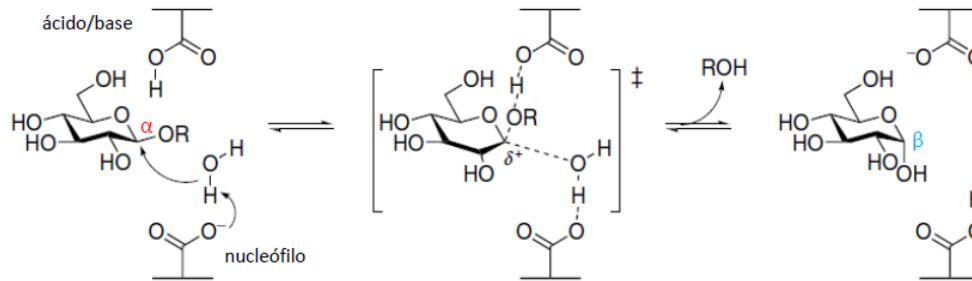


Figura 1: Mecanismo *invertig* para una α -glicosidasa (Rye & Withers, 2000).

Glicosidasas "retaining". Las glicosidasas que llevan a una conservación de la configuración anomérica lo hacen mediante un mecanismo de desplazamiento doble. Estas enzimas a menudo poseen la capacidad de transglicosilación. En el primer paso –glicosilación–, un grupo carboxílico cataliza la remoción del grupo saliente, al mismo tiempo que el otro carboxilato realiza un ataque nucleofílico sobre el sustrato para formar un intermediario covalente de la enzima glicosilada. En el segundo paso –desglicosilación–, el primer carboxilato funciona como una base para activar al nucleófilo atacante (una molécula de agua en el caso de hidrólisis, o un alcohol en el caso de una transglicosilación), el cual hidroliza el intermediario formado (Fig. 2).

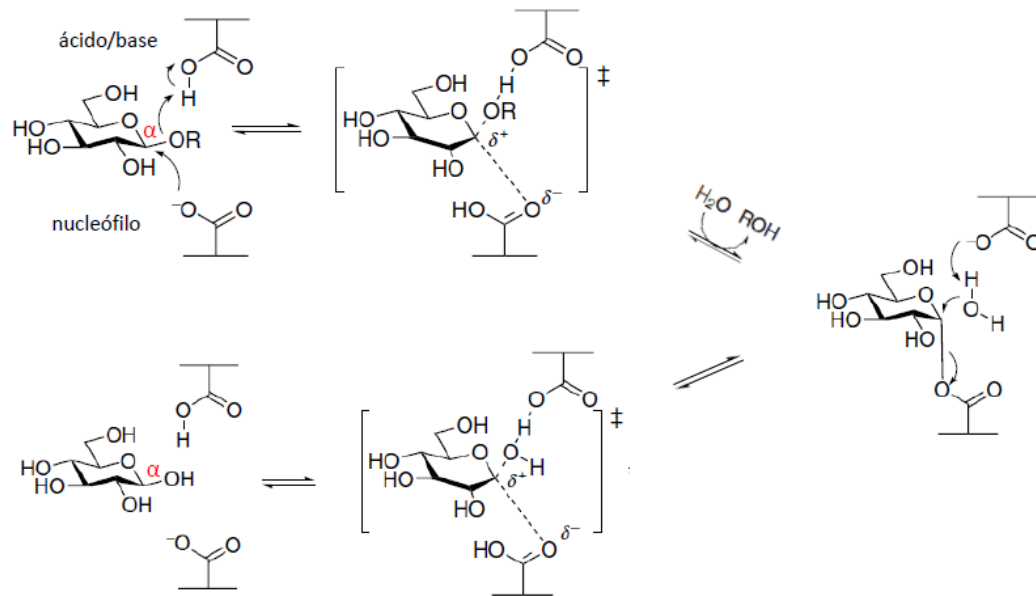


Figura 2: Mecanismo *retaining* para una β -glicosidasa (Rye & Withers, 2000).

La nomenclatura de las enzimas ha sido desde un principio un asunto complejo. Por esta razón en los años 50 se crea el sistema numérico de clasificación EC (*Enzyme Commission*) por la acción conjunta de la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) y la IUB (Unión Internacional de Bioquímica). Este sistema se basa en el tipo de reacción que catalizan las enzimas y en su especificidad de sustrato. Dado que representan reacciones y no enzimas, y que cada proteína puede tener varias funciones catalíticas, una única enzima puede poseer varios números EC. Esta clasificación resulta muy útil, especialmente para evitar ambigüedades y la proliferación de nombres triviales, además de proporcionar una clasificación única. Sin embargo, al menos en el caso de las glicosido hidrolasas, tal clasificación no refleja necesariamente las características estructurales de las enzimas. De hecho, la clasificación basada principalmente en el sustrato no tiene en cuenta eventos evolutivos que pueden dar lugar a cambios de especificidad. Otro problema de la clasificación de EC es que no es apropiado para enzimas que muestran alta promiscuidad de sustrato. Por otro lado, la clasificación en base a las secuencias (por lo tanto estructural) además de poseer un potencial predictivo importante, demostró ser una herramienta eficaz para unificar la información sobre la estructura y el mecanismo de reacción. Actualmente, las GHs se agrupan en 153 familias, dentro de cada familia existen enzimas con diferente especificidad de sustrato y productos, lo que indica una divergencia evolutiva para adquirir nuevas funciones. Sin embargo, el análisis funcional sigue siendo necesario ya que los determinantes de la especificidad de sustrato residen en detalles finos de la estructura. La base de datos "Brenda" compila caracteres funcionales de enzimas con libre acceso (www.brenda-enzymes.org). Los datos funcionales son

más difíciles de coleccionar, interpretar y estandarizar que aquellos provenientes de secuencias, ya que están distribuidos entre revistas de diferentes campos y están sujetos a condiciones experimentales diversas. Sin embargo, resultan esenciales para nuestra interpretación de la información contenida en genomas, y más aún para las posibles aplicaciones de este conocimiento en medicina, agricultura e industria. Otra clasificación de las glicosidohidrolasas, también de importancia desde el punto de vista funcional, reside en la habilidad de una enzima de clivar un enlace glicosídico en el extremo (modo “exo”) o en el medio de una cadena de azúcares (modo “endo”) (Fig. 3).

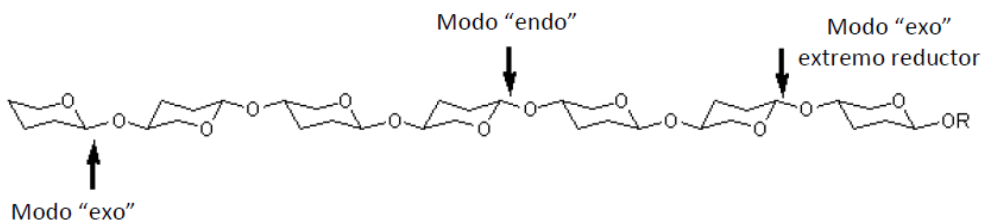


Figura 3: Sitios de corte de glicosidasas.

En un gran número de enzimas despolimerizantes, la actividad catalítica suele ser afectada por sitios de unión a sustrato distantes del enlace en el cual ocurre la hidrólisis (Davies *et al.*, 1997). Dichos subsitios pueden ser estudiados experimentalmente, y de ellos depende la especificidad de la enzima (Kang *et al.*, 2007). La nomenclatura de los subsitios que se utiliza es el sistema $-n$ a $+n$, con $-n$ en el extremo no reductor y $+n$ en el extremo reductor. En el caso de las diglicosidasas, el clivaje ocurre entre los subsitios -1 y $+1$. La figura 4 muestra un sustrato hipotético con los diferentes subsitios que componen el sitio activo de una proteína, también hipotética.



Figura 4: Esquema del sitio activo de una glicosidasa hipotética. Los círculos corresponden a los monómeros de un polisacárido y en la parte inferior los subsitios numerados en la enzima (Davies *et al.*, 1997).

Las glicosidohidrolasas, además de catalizar la hidrólisis de glicósidos, también pueden ser usadas para su síntesis. La glicosilación se utiliza frecuentemente para la modificación estructural de compuestos con actividad biológica, obteniéndose en ciertos casos productos

con modificaciones en sus propiedades. Sin embargo, es prácticamente imposible definir un patrón general de las actividades biológicas de los glicósidos en comparación con sus respectivas agliconas. En algunos casos, la introducción de un residuo glicosídico aumenta la solubilidad de compuestos hidrofóbicos, lo que influye principalmente en su transporte a través de membranas. En otros casos, las moléculas glicosiladas son menos lábiles que sus agliconas. Tal es el caso del ácido ascórbico o vitamina C, cuyo almacenamiento a largo plazo se logró mediante la síntesis de un derivado glucosilado (Yamamoto et al., 1990). También en este sentido, ha sido posible modular el espectro de actividad de los antibióticos glicopéptidos mediante la variación de su fracción glicosídica (Kren & Rezanka, 2008).

La síntesis de moléculas glicoconjugadas puede proceder mediante hidrólisis reversa –control termodinámico- o transglicosilación –control cinético- (Watts & Withers, 2004). La unión puede realizarse por transferencia del residuo glicosídico unido a la enzima a un aceptor glicosídico en vez de la molécula de agua, lo que se conoce como transglicosilación, o por condensación directa de las unidades de azúcar en condiciones de baja actividad acuosa y alta concentración de sustrato, llamada hidrólisis reversa (Fig. 5). La diferencia entre las dos formas de síntesis depende de la naturaleza del donador glicosídico. En la hidrólisis inversa, la reacción se realiza con un monosacárido (por ejemplo, glucosa), mientras que en la transglicosilación un azúcar “activado” (por ejemplo un disacárido, un polisacárido o un azúcar unido a una aglicona) se utiliza como el dador del glicósido (Martearena et al 2008; Mazzaferro et al 2012).

Transglicosilación



Hidrólisis reversa



Figura 5: Glicosilación enzimática mediada por glicosidasas.

Hasta el momento, no se han descrito transglicosilaciones catalizadas por glicósido hidrolasas *invertin* (Desmet et al., 2012; Rather & Mishra, 2013). Como ejemplo de biocatálisis, si tenemos en cuenta que hasta el presente no existen descritas ramnosidasas *retaining*, la síntesis de glicósidos con ramnosa expuesta solo fue lograda por hidrólisis reversa mediante la

transferencia de ramnosa a aceptores glucosilados con una ramnosidasa *inverting* de *Aspergillus niger* (Martearena et al., 2008).

2. Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios vegetales y se encuentran entre los compuestos fenólicos más ubicuos en la naturaleza. Estos compuestos tienen diversas actividades fisiológicas y farmacológicas, tales como los efectos estrogénicos, antitumorales, antimicrobianos, antialérgicos y antiinflamatorios. Son antioxidantes bien conocidos y quelantes de iones metálicos (Das & Rosazza, 2006). Estructuralmente, los flavonoides constan de una base aromática, derivada del difenilpirano (C6-C3-C6), y se clasifican en varias familias tales como flavonas, flavonoles, flavanonas, etc., según cambios en su estructura básica. Poseen varios grupos hidroxilo (-OH) unidos a su estructura y se encuentran normalmente como glicósidos, generalmente mono-, di- y triglicósidos. La figura 6 muestra ejemplos de flavonoides diglicosilados.

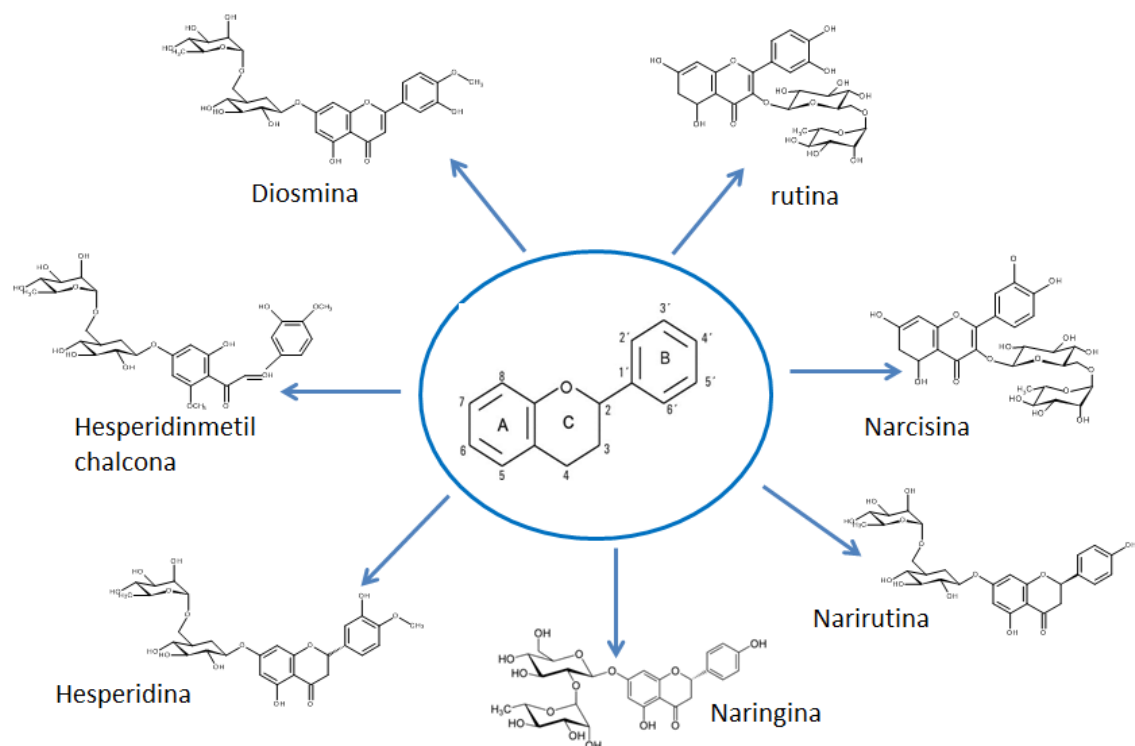


Figura 6: Flavonoides diglicosilados.

La rutina (quercetina-3-*O*-rutinosido) es un flavonoide ampliamente distribuido en el reino Plantae. Esta no se encuentra en cereales y pseudocereales, excepto en el trigo sarraceno (Kreft et al., 2006). Este último constituye una fuente de rutina en la dieta. Químicamente, está constituida por quercetina unida al disacárido rutinosa. Rutina y quercetina, presentan diferencias significativas en las propiedades físicas, químicas y biológicas. Rutina muestra mayor solubilidad en agua que quercetina, mientras que esta última tiene una mayor actividad antioxidante (Aherne & O'Brien, 2002; Dugas et al., 2000; Heim et al., 2002). La conversión de rutina en quercetina se basa en el proceso de eliminación de la fracción glicosídica, ya sea química- o enzimáticamente. La quercetina tiene propiedades bioactivas (antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígenas), convirtiéndose en un compuesto interesante para ser incorporado en productos farmacéuticos, cosméticos o alimenticios (Fahlman & Krol 2009; Gonçalves et al., 2015). Generalmente, el proceso enzimático para su obtención es preferido debido a su especificidad y condiciones operacionales suaves (Giffhorn et al., 2000; Van Rantwijk et al., 1999).

3. Desglicosilación de los flavonoides

La desglicosilación enzimática de flavonoides es el primer paso que ocurre en la vía degradativa de los mismos durante el ciclo natural de la materia orgánica. También en ciertas condiciones fisiológicas de los vegetales, la desglicosilación es un mecanismo de defensa contra la herbivoría, donde se libera la aglicona que resulta ser el metabolito tóxico. En el caso de los diglicósidos, tales como la rutina, el residuo disacárido se elimina mediante dos monoglicosidasas que actúan en dos reacciones de hidrólisis secuenciales o, más inusualmente, en una única reacción. En el modo secuencial, una α -L-ramnosidasa cataliza la hidrólisis de los residuos terminales de α -L-ramnosa liberando ramnosa e isoquercetina y, posteriormente, una β -D-glucosidasa cataliza la hidrólisis de los residuos terminales β -D-glucosa, liberando glucosa y quercetina (Sarry & Gunata, 2004; Yadav et al., 2010). La desglicosilación en una única reacción se lleva a cabo mediante diglicosidasas que catalizan la ruptura de la unión aglicona – disacárido generando quercetina y el disacárido rutinosa (Fig. 7).

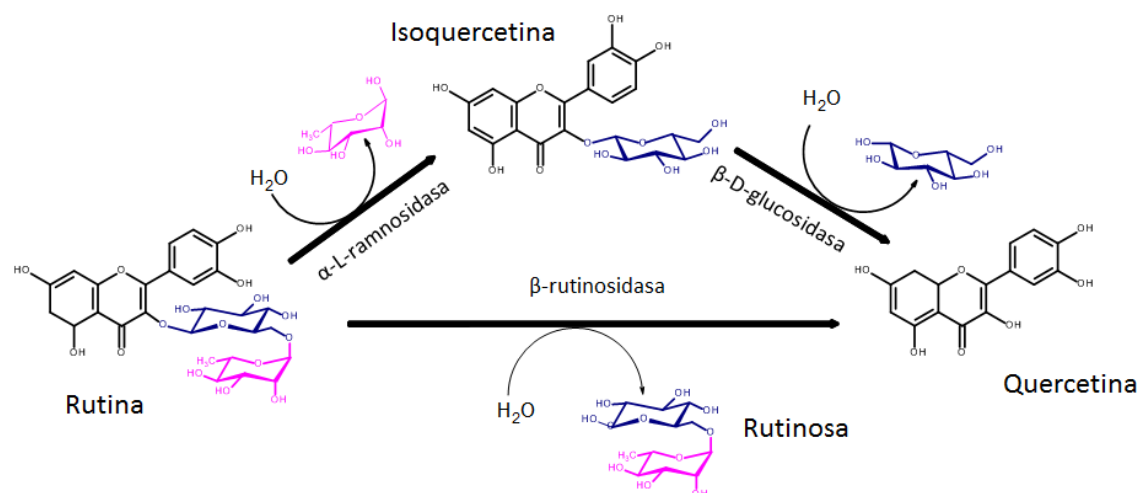


Figura 7: Diferentes vías de desglicosilación del flavonoide rutina.

Las diglicosidasas han sido descubiertas en organismos eucariotas, específicamente hongos filamentosos y plantas, y recientemente en la bacteria *Actinoplanes missouriensis* (Nam et al., 2012; Narikawa et al., 2000; Neher et al., 2015). En la tabla 1 se muestran algunas diglicosidasas descritas y sus aplicaciones propuestas.

Tabla 1 Diglicosidasas de diferentes microorganismos y su potencial aplicación.

Enzima	Origen	Aplicación	Referencia
β -primeverosidasa	<i>Penicillium multicolor</i>	Industria alimenticia	Tsuruhami et al. 2006
α -ramnosil- β -glucosidasa (β -rutinosidasa)	<i>A. niger</i>	Industria farmacéutica	Šimčíková et al. 2015
α -ramnosil- β -glucosidasa	<i>Acremonium</i> sp. DSM24697	Industria farmacéutica y alimenticia	Mazzaferro et al. 2010
β -glucosidasa /rutinosidasa	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Industria alimenticia	Nam et al. 2012
β -rutinosidasa	<i>Penicillium rugulosum</i>	Industria alimenticia	Narikawa et al. 2000
α -ramnosil- β -glucosidasa	<i>A. missouriensis</i>	Industria alimenticia	Neher et al. 2015
α -ramnosil- β -glucosidasa	<i>Aspergillus oryzae</i>	Industria alimenticia y farmacéutica	Ishikawa et al. 2018

El hongo *Acremonium* sp. DSM 24697 fue seleccionado en nuestro laboratorio por su capacidad de producir una diglicosidasa que actúa específicamente sobre 7-O-rutinosil-flavonoides, la cual se denominó 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa (Mazzaferro et al., 2010).

Considerando que las diglicosidasas previamente descritas eran específicas para 3-*O*-rutinosil-flavonoides (Baumgertel et al., 2003; Narikawa et al., 2000) el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB) reconoció a esta reacción como una nueva actividad enzimática otorgándole el número EC 3.2.1.168. La 6-*O*- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa es una diglicosidasa capaz de escindir el flavonoide hesperidina en el disacárido rutinosa y la flavanona hesperetina en una única reacción. Sin embargo, esta enzima no hidrolizó en forma detectable el flavonoide rutina. Por esta razón no se la nombró como β -rutinosidasa sino que se utilizó la nomenclatura de los dos monosacáridos que componen al disacárido (rutinosa), es decir la L-ramnosa unida al carbono 6 de la D-glucosa: 6-*O*- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa. La NC-IUBMB sugirió como nombre general de la enzima: hesperidina 6-*O*- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa y como nombre sistemático: hesperetina 7-(6-*O*- α -L-ramnopiranosil- β -D-glucopiranosido)6-*O*- α -ramnopiranosil- β -glucohidrolasa (<http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/168.html>) Para desambiguar el término con el que se nombran las enzimas en este trabajo de tesis se optó por utilizar la opción utilizada por la IUBMB de nombrar los dos azúcares que componen el sustrato que éstas reconocen y liberan. Eventualmente, el término β -rutinosidasa se utilizó al tomarlo de forma directa desde la literatura científica para las diglicosidasas que hidrolizan rutina.

4. Producción de biocatalizadores

La demanda de proteínas recombinantes ha crecido a medida que han aumentado las aplicaciones en diferentes campos. Diversas áreas de aplicación han experimentado avances sustanciales gracias a la posibilidad de producir grandes cantidades de proteínas recombinantes mediante una disponibilidad creciente de organismos genéticamente manipulados. Por muchas razones, *Escherichia coli* fue el organismo seleccionado inicialmente para elaborar proteínas recombinantes. En efecto, es una bacteria gram negativa unicelular cuya reproducción es asexual. Su simplicidad y el conocimiento de su fisiología y genética facilitan la expresión y bajan los costos de producción, mediante el uso de una fuente de alimento común y estrategias simples para cultivar y mantener el microorganismo. Sin embargo, como sistema procariota no presenta las propiedades de expresión de los sistemas eucariotas, como son el procesamiento, el plegado y las modificaciones post-traduccionales. Por otro lado, *Pichia pastoris* es una levadura metilotrófica facultativa perteneciente al grupo de los ascomicetes, que se reproduce por gemación, homotética y cuya dotación genómica permanece haploide (a menos que se someta a condiciones de limitación por nitrógeno) (Lin et

al., 2000). En particular, *P. pastoris* posee ciertas propiedades que justifican el éxito de su acrecentada utilización como sistema eucariota de expresión de proteínas heterólogas. Sin duda, la principal de estas características es la existencia de un promotor fuerte (es decir, de elevado nivel de transcripción) y altamente regulable: el promotor de la alcohol oxidasa, PAOX1. También hay que destacar que *P. pastoris* es un microorganismo que puede crecer de modo fermentativo o de forma aeróbica. Este último evita la generación de subproductos indeseables típicos de procesos fermentativos, como el etanol, lo que facilita su cultivo a elevadas densidades celulares (>100 g de peso seco l⁻¹). Alcanzar elevados niveles de biomasa es muy deseable en la expresión de proteínas que van asociadas al crecimiento celular. Respecto a las modificaciones post-traduccionales generadas por *P. pastoris*, éstas se asemejan más a las de organismos eucariotas superiores que las realizadas, por ejemplo, por *S. cerevisiae*. A diferencia de este último, *P. pastoris* no hiperglicosila, es decir, la longitud máxima de las cadenas de oligosacáridos introducidas no supera los treinta residuos de manosa, en comparación a los 50 ó 150 residuos generados por *S. cerevisiae* (Lin et., 2000). Por otra parte, *P. pastoris* prácticamente no secreta proteínas nativas al medio extracelular, lo que simplifica el proceso de recuperación y purificación de aquéllas proteínas heterólogas (cuando su expresión es extracelular). Con referencia a las técnicas de manipulación genética en *P. pastoris*, éstas son aparentemente sencillas y similares a las desarrolladas en *S. cerevisiae*.

Las primeras diglicosidasas clonadas y expresadas fueron las producidas por vegetales como la β -primeverosidasa, la furcatin hidrolasa y la viacinin hidrolasa (Mizutani et al. 2002, Ahn et al. 2004, Ahn et al. 2007, Chuankhayan et al. 2007). Además de las β -primeverosidasas de los hongos *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium multicolor* (Yamamoto et al. 2006, Tsuruhami et al. 2006), recientemente fueron clonadas y expresadas diglicosidasas de origen fúngico como la β -rutinosidasa de *A. niger* (Šimčíková et al. 2015) y la 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de *Acremonium* sp. DSM 24697 las cuales resultan de interés en vistas de su potencial aplicación en la industria farmacéutica y alimenticia (Mazzaferro et al. manuscrito en preparación).

5. Desglicosilación enzimática de flavonoides en solventes altamente eutécticos

Dada la baja solubilidad de los flavonoides, la solubilización del sustrato en medio acuoso representa un desafío para favorecer la catálisis. Sobre esta base, el uso de co-disolventes para incrementar la solubilidad del sustrato, y que sean compatibles con la estabilidad de las enzimas, resulta de interés. Sin embargo, hasta el momento las reacciones enzimáticas basadas en flavonoides sólo se han evaluado en dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilformamida

(DMF) (Mazzaferro et al. 2012; Piñuel et al., 2013, Piñuel et al. 2011; Shin et al., 2013). Aunque DMSO conduce a excelentes actividades enzimáticas y propiedades solubilizantes de flavonoides, su uso plantea considerables desventajas en cuanto a la estabilidad enzimática (Piñuel et al., 2011) y la toxicidad que este solvente orgánico presenta. En este sentido, la introducción de co-disolventes amigables con el medio ambiente ampliaría los alcances de la química de flavonoides. En la búsqueda de nuevas alternativas, se presenta el uso de líquidos iónicos (LI). Los LI pueden definirse como sales cuya temperatura de fusión está por debajo de los 100°C y están compuestos químicamente por un catión orgánico y un anión poliatómico. Existen LI descritos desde 1914, la primera patente para disolver celulosa en disolventes (LI) es suiza y data de los años 30. Varias publicaciones de los años 60 describen los LI de primera generación conformados por cationes de cloroaluminatos de piridinio e imidazolio y aniones del tipo tetrafluoroborato, hexafluorofosfato, nitrato, sulfato y acetato. Estos líquidos resultaron ser sensibles al agua y aire. En tanto que para la segunda generación se usaron cationes de monoalquilimidazolio y trialquilimidazolio, combinándolos con aniones estables en agua como bromuros, cianuros, bisulfuros, yoduros, sulfonatos, tosilatos, tartratos, etc. Los llamados LI de tercera generación junto con los solventes altamente eutécticos o DES (de su acrónimo en inglés: deep eutectic solvents), representan una prometedora alternativa porque son simples de preparar, biodegradables y más económicos comparados con los LI de primera y segunda generación. Los DES son una mezcla de sal sólida que funciona como aceptor de hidrógeno (AH) con un compuesto donador de puente hidrógeno (DH) en diferentes proporciones (Wilkes, 2002; Gorke et al., 2010). La figura 8 muestra la formación de un DES:

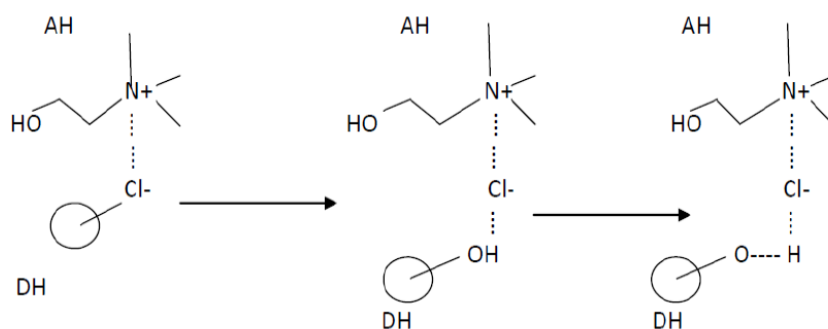


Figura 8: Interacciones de puente hidrógeno presentes en las mezclas eutécticas de bajo punto de fusión basadas en clorhidrato de colina (ChCl).

Uno de los componentes más utilizados para la generación de DES es el ChCl (clorhidrato de colina), una sal de amonio cuaternario que se comporta como un AH, mientras que la urea, ácidos carboxílicos (láctico, cítrico) o polioles naturales (glicerol y carbohidratos) funcionan

como DH (Gorke et. al 2010). Un amplio número de LI fueron utilizados con éxito para realizar reacciones catalizadas por enzimas (Maugeri et al. 2013). Sin embargo, hasta el momento, según nuestro conocimiento no se han evaluado enzimas glicósido hidrolasas en este medio.

Objetivos

OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto fue el estudio de sistemas mono-enzimáticos de desglicosilación de flavonoides (diglicosidasas) y la aplicación de los mismos en la biotransformación de alimentos y modificación de moléculas orgánicas.

Objetivos específicos

- a. Selección de organismos productores de diglicosidasas activas sobre flavonoides.
- b. Optimización de las condiciones de producción enzimática y/o extracción de las diglicosidasas seleccionadas.
- c. Caracterización de los catalizadores respecto a especificidad de sustrato y otros parámetros catalíticos.
- d. Evaluación operacional de las reacciones de desglicosilación de flavonoides, ingeniería de medio de reacción.

Reactivos y enzimas

p-nitrofenil-β-D-glucopiranosido (pNGP), *p*-nitrofenil-α-L-ramnopiranosido (pNRP), 4-metilumbeliferil-β-D-glucopiranosido (MUGlc), 4-metilumbeliferil-α-L-ramnopiranosido (MURa), 4-metilumbeliferona, hesperidina, rutina, narangina, hesperidina metilchalcona, diosmina, narirutina, narangina, isoquercetina, laminarina, xilano se compraron en Sigma Chemical (St. Louis). Narcisina, delfinidina y mirtillina se compraron en extrasynthese Company (Genay Cedex). Neohesperidina y la enzima naringinasa de *Penicillium decumbens* fueron generosamente obsequiados por el Dr. Gustavo Céliz (Universidad Nacional de Salta, Argentina). Las enzimas degradadoras de rutina fueron obtenidas a partir de diferentes harinas de trigo sarraceno compradas en mercados locales. El kit de ácido bicinonínico para determinación de proteínas se obtuvo de Aldrich Chemicals, Bélgica. El metanol grado HPLC LiChrosolv® se obtuvo de Merck (Darmstadt). Los reactivos químicos para biología molecular se adquirieron en Invitrogen. El resto de los reactivos fueron de fuentes estándar.

Activación de cepas de *Acremonium* y *Sarocladium*

Inóculo: Veintiocho cepas del género *Acremonium* fueron cedidas por la Lic. Alejandra Hevia del Departamento de Micología, INEI ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires. Las cepas fueron cultivadas en medio LB (g/l): 10.0 peptona de leche, 5.0 extracto de levadura. Los cultivos se realizaron a 25°C en agitador durante 4 a 7 días, dependiendo de la cepa.

Crecimiento y producción desglucosilante de *Sarocladium strictum* DMic 093557 y *Acremonium* sp. DSM 24697 en medio líquido

Los cultivos sumergidos de *Sarocladium strictum* DMic 093557 y *Acremonium* sp. DSM 24697 se realizaron en un fermentador (200 ml, 170 ml volumen de trabajo, 250 rpm y aereación de 0.4 vvm) a 25°C usando el siguiente medio de cultivo (g/l): 2.5 rutina; 1.0 peptona de leche, 2.0 extracto de levadura y 30 mM de buffer fosfato de sodio. El pH se mantuvo constante (pH 5.0) mediante agregado automatizado de 0.5 M H₂SO₄ o 1 M NaOH. El caldo de cultivo se conservó a -18°C para su posterior procesamiento.

Estimación de los parámetros de crecimiento y clarificación

Se midió el crecimiento micelial durante 24 días a partir de imágenes digitalizadas de las colonias cultivadas en medio sólido con rutina como fuente de carbono, usando el software ImageJ (National Institutes of Health, USA). Las curvas se ajustaron mediante el método de los mínimos cuadrados usando el software Excel. La tasa de crecimiento radial (K_r) se calculó a partir de la pendiente de la curva de crecimiento en la fase lineal:

$$K_r = \frac{dr_{colonia}}{dt}$$

donde $dr_{colonia}$ es el cambio en el radio de la colonia (cm) y dt es el tiempo (día).

La tasa de clarificación (K_c) se calculó graficando el radio del halo de clarificación en función del tiempo y la curva se ajustó a una ecuación lineal:

$$K_c = \frac{dr_{\text{clarificación}}}{dt}$$

Donde $dr_{\text{clarificación}}$ es el cambio en el radio del halo de clarificación.

Espectro UV–visible de los flavonoides

Rutina, isoquercetina y quercetina (180 mM) fueron solubilizadas en dimetilformamida y diluidas en soluciones stock acuosas para los ensayos espectrofotométricos. Para ajustar el pH se utilizaron 50 mM buffer citrato sodio pH 5.0, 50 mM buffer fosfato de sodio pH 6.0–8.0, 50 mM buffer Tris-glicina pH 8.0, 50 mM buffer Tris-HCl pH 9.0, y 50 mM carbonato de sodio pH 10.0. Los espectros de los analitos fueron obtenidos usando el espectrofotómetro USB4000 (Ocean Optics).

Curva de calibrado

Para la curva de calibración, 840 μM de quercetina y 840 μM de isoquercetina fueron solubilizados en acetato de etilo y las soluciones estándares fueron preparadas en una solución carbonato de sodio pH 10.0. Se utilizaron estándares de quercetina e isoquercetina por triplicado en el rango 0–40 μM . Se graficaron las intensidades de los máximos picos de absorción de quercetina e isoquercetina a 320 and 400 nm vs. la concentración. Los datos se ajustaron usando el método de mínimos cuadrados de acuerdo a la ecuación de Beer-Lambert:

$$A = \epsilon b C$$

donde A, absorbancia; ϵ , coeficiente de extinción molar ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$); b, camino óptico (cm); y C, concentración molar (M).

Ensayo enzimático

Se extrajeron dos gramos de las tres muestras de harina de trigo sarraceno con 30 ml of 0.2 M con buffer acetato de sodio pH 4.0 a 4 °C durante 3 h. Luego se centrifugó (10 000 rpm, 5 min, 4 °C) y el sobrenadante se recolectó y almacenó a 4 °C. La reacción enzimática contenía 100 μl de enzima extraída de las harinas de trigo sarraceno, 200 μl de sustrato (0.11% p/v de rutina en 50 mM buffer citrato de sodio pH 5.0), y se realizó durante 1 h at 40 °C. Para las preparaciones enzimáticas comerciales, la mezcla de reacción contenía 12 μl de naringinasa (20 mg/ml en 5 mM buffer citrato de sodio pH 5.0), 300 μl de sustrato (0.11% p/v de rutina en 50 mM buffer citrato de sodio pH 5.0), y se realizó durante 1 hs a 40 °C. En el caso de las enzimas desglucosilantes de rutina de los hongos *Sarocladium strictum* 093557 y *Acremonium* sp DSM 24697, se incubaron 450 μl de sustrato (0.11% p/v rutina en 50 mM buffer citrato de sodio pH 5.0) con 50 μl de muestra enzimática. Se usaron los cultivos completos de *Sarocladium strictum* DMic 093557 y *Acremonium* sp. DSM 24697 como fuente de enzimas ecto- y extracelulares. La reacción se realizó a 50°C durante 1 h en 50 mM buffer citrato de sodio pH 5.0.

Cuantificación espectrofotométrica de actividad desglicosilante de rutina

El producto de la reacción enzimática, quercetina, se extrajo con un volumen de acetato de etilo. Para separar la fase acuosa de la orgánica los tubos fueron centrifugados (15 600g, 2 min). Cien μl de la fase orgánica superior fueron adicionados a 1.9 ml de 50 mM carbonato de sodio pH 10 y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Se midió la absorbancia (320 y 400 nm) y la concentración de quercetina fue calculada utilizando la ecuación de Lambert Beer. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de quercetina por minuto (Weiz et al., 2017).

Medición de actividades enzimáticas

Actividades mono-glicosidasas. La determinación de actividades α -ramnosidasa y β -glucosidasa se realizó con 5 μl del sustrato correspondiente (70 mM pNRP o pNGP en dimetilformamida), 845 μl de 50 mM buffer citrato de sodio pH 5 y 50 μl de solución enzimática. La reacción se realizó por 1 h a 40°C y se finalizó agregando 100 μl de 0.1 M NaOH. Se midió la absorbancia a 420 nm y la cantidad de *p*-nitrofenol liberado se calculó usando el coeficiente de extinción de *p*-nitrofenolato ($\epsilon_{420\text{nm}} = 1.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Orrillo et al. 2007). Una unidad de enzima se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol of *p*-nitrofenol en 1 min a la temperatura indicada.

Especificidad de sustrato. Los flavonoides rutina, narcisina, delphinidina, mirtillina, isoquercetina, narirutina, naringina, hesperidina, hesperidin-metilchalcona, diosmina y los polisacáridos laminarina y xilano (45 mM) fueron solubilizados en dimetilformamida. La reacción enzimática contenía 10 μl del sustrato correspondiente, 190 μl de 50 mM buffer citrato de sodio pH 5 y 50 μl de enzima. La reacción se realizó durante 1 h a 50°C y se finalizó agregando 250 μl de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller et al. 1959). Los tubos se colocaron en un baño de agua hirviendo por 10 min y se enfriaron antes de medir la absorbancia a 540 nm. Una unidad de actividad 6-*O*- α -ramnosil- β -glucosidasa II se definió como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol de azúcares reductores por minuto. En el caso de rutina e isoquercetina la actividad enzimática se determinó utilizando el método espectrofotométrico anteriormente descrito (Weiz et., 2017)

Actividad de transglicosilación. Para medir actividad de transglicosilación se agregó 5% v/v de los distintos aceptores a la mezcla de reacción y se incubó a 30°C con 0.015 U/ml de enzima durante 1 h (o lo indicado en el texto).

Cuantificación de flavonoides mediante HPLC

La quercetina liberada a partir de la hidrólisis de rutina se cuantificó por HPLC usando el equipo KONIK-500-A series unido al detector KONIK UVIS 200. La columna de fase reversa utilizada fue LiChroCARTR 125-4 MERCK (12.5 cm longitud, 4 mm diametro interno) LiChrospherR 5 μm , RP 18 (tamaño de poro 100 Å). Como fase móvil se utilizó un flujo isocrático de metanol y 20 mM fosfato de sodio (40:60 v/v) (pH ajustado a 3.0 con ácido

fosfórico) con una tasa de flujo 1.0 ml/min a 25°C. Las soluciones stocks (180 mM) fueron solubilizadas en dimetilformamida. Las soluciones estándares se prepararon por dilución en fase móvil de las soluciones stock. Triplicados de soluciones stock de quercetina fueron usados en el rango 0–40 µM. La curva de calibrado de quercetina fue calculada a partir de los cromatogramas a 285 nm de las soluciones estándares (por triplicado). Los tiempos de retención de rutina y quercetina fueron 1.6 y 2.4 min respectivamente. Las muestras de la reacción enzimática (500 µl) fueron desproteinizadas por adición de 1.54 ml de metanol previo al ensayo por HPLC (Contin et al., 2008).

Cromatografía líquida con arreglo de fotodiodos acoplada a espectrometría de masas (LC-DAD-MS)

Las reacciones de transglicosilación se analizaron mediante LC-DAD-MS. Las muestras se prepararon usando concentradores Vivaspin 500 (Sartorius). Luego, el concentrado se diluyó (1: 3) usando solución 10 mM de formiato de amonio. Finalmente, se añadió acetonitrilo hasta una concentración final del 70% v/v. El análisis se realizó utilizando un sistema LC serie 1100 (Agilent) acoplado a un espectrómetro de masas QTrap 4500 (AB Sciex) con una columna APS-HP (3 µm, HILIC, 60 x 2 mm, Multospher). Un flujo isocrático de 85% de acetonitrilo y 15% de agua (caudal: 0,3 ml / min, temperatura de la columna: 30°C, volumen de inyección: 2,5 µl) se utilizó como fase móvil. Se usaron los siguientes parámetros para la detección de masas en modo de ion negativo: Q1 MS: gas de fuente iónica 1: 40 psi, gas de fuente iónica 2: 50 psi, gas de cortina: 30 psi, voltaje de pulverización iónica: -4 000 V, temperatura: 400 ° C, potencial de disgregación: -70 V, potencial de enfoque: -260 V, potencial de entrada: -10 V.

Cromatografía en capa delgada

La identificación de los productos de las reacciones enzimáticas se realizó por cromatografía en capa delgada (Silicagel 60 W) usando acetato de etilo/2-propanol/agua (3:2:2) como fase móvil y se revelaron con el reactivo de antrona.

Electroforesis

Se realizaron electroforesis nativas PAGE (10%p/v bis/acrilamida) de acuerdo a Laemmli (1970). Las muestras se obtuvieron a partir de las distintas cepas de *Acremonium* y *Sarocladium* cultivadas con rutina como fuente de carbono en medio sólido. Se congelaron las fracciones de agar cercanas a la colonia, y luego se recuperó el sobrenadante por centrifugación (González et al., 1996). El análisis zimográfico se realizó utilizando como revelador el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil-rutinósido (MUR), y los sustratos comerciales 4-metilumbeliferil- α -L-ramnopiranosido (MURa) y 4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosido (MUGlc).

Concentración de proteína

La concentración de proteína se determinó por el método del ácido bicinconínico, usando seroalbúmina bovina como estándar (Smith et al., 1985).

Purificación de 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa II

El caldo de cultivo CEPA se filtró con papel de filtro Whatman N°1. El sobrenadante (300 ml) se cargó a una columna de QAE-sephadex previamente equilibrada con buffer 5 mM de citrato de sodio pH 5.0. Luego del lavado con solución de equilibrado (2 volúmenes) se eluyó con un gradiente 0–1.0 M NaCl en 5 mM buffer citrato de sodio pH 5.0. Se agregó sulfato de amonio a las fracciones activas (32 ml) a 5°C hasta el 80 % grado de saturación. La solución se incubó por 1 h a 5°C y se centrifugó a 10 000 rpm a 6°C durante 20 min. El precipitado se resuspendió en 0.6 ml de 10 mM citrato de sodio pH 5.0 y se cargó en una columna empacada con Sephadex G-75 previamente equilibrada con buffer citrato de sodio 5 mM pH 5.0. La muestra se eluyó con buffer 5 mM citrato de sodio pH 5.0. Las fracciones activas se liofilizaron y conservaron a -18°C.

Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa II

El pH óptimo de 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa II se determinó incubando la enzima con 0.11 %p/v de rutina en diferentes soluciones buffer (50 mM) con un rango de pH de 3.0–9.0 durante 60 min a 50°C. Para el valor de pH 3 se utilizó el buffer Glicina-HCl, entre los valores 4.0–5.0 se utilizó citrato de sodio, entre 6.0–8.0 fosfato de sodio y a pH 9.0 se utilizó Tris-HCl. Después de la incubación, se determinó la cantidad de quercetina liberada por el método espectrofotométrico descrito anteriormente (Weiz et al., 2017).

La temperatura óptima se determinó incubando la enzima con 0.11 %p/v de rutina en 50 mM citrato de sodio pH 5 en un rango de temperatura entre 25–70 °C durante 1 h. La termoestabilidad fue medida a 50°C con 0.11 % p/v de rutina en 50 mM buffer citrato de sodio pH 5, luego de la incubación de la enzima en ausencia de sustrato durante 30 min a diferentes temperaturas.

Parámetros cinéticos

La constante de Michaelis-Menten (K_M), la constante catalítica (k_{cat}) y la eficiencia catalítica (K_M/k_{cat}) fueron determinadas con rutina y hesperidina como sustratos para la enzima 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa II. La hidrólisis de los sustratos fue determinada mediante HPLC. Se usaron concentraciones crecientes de ambos sustratos, hesperidina (0.0–2.0 mM) y rutina (0.0–6.0 mM). Las velocidades iniciales de reacción fueron graficadas en función de la concentración de sustrato y los datos obtenidos fueron ajustados usando la ecuación de Michaelis-Menten por el método de cuadrados mínimos.

Digestión con tripsina y espectrometría de masa MALDI-TOF

La banda de proteína teñida con Coomassie Brilliant Blue de *Acremonium* sp. DSM 24697, se cortó desde el gel SDS-PAGE, se escindió en piezas pequeñas y se desteñió en 50 mM de acetato de 4-etilmorfolina (pH 8.1) en 50 % acetonitrilo (ACN). Después de la decoloración completa, el gel se lavó con agua, se redujo por deshidratación en ACN y fue rehidratado en agua. Las piezas de gel se incubaron a 37°C por 20 horas con 100 ng de tripsina (Promega, USA)

en 25 mM de acetato de 4-etilmorfolina y 5% v/v ACN. Los péptidos resultantes se extrajeron con 40% v/v ACN/0.1% v/v ácido trifluoroacético (TFA). Una solución acuosa de ACN al 50% / TFA al 0,1% de α -ciano-4-hidroxicinámico (5 mg mL⁻¹; Sigma-Aldrich, EE. UU.) fue utilizado como matriz MALDI. Un μ l de la mezcla de péptidos se depositó en la placa de MALDI con 0.4 μ l de la matriz. Los espectros de masas de MALDI se midieron en un Ultraflex III (Bruker Daltonics, Alemania).

Análisis y secuenciado del genoma

Se cultivó *Acremonium* sp. DSM 24697 en el medio LB a 27°C con agitación. Su DNA genómico se aisló utilizando el kit *DNeasy plant mini kit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante, las cuales incluyen congelación instantánea de la biomasa filtrada en nitrógeno líquido y trituración de las células congeladas hasta obtener un polvo fino. Se preparó una librería de ADN genómico usando el kit *Nextera DNA sample preparation kit* (Illumina Inc.) y el secuenciado fue realizado por la empresa BaseClear B.V. (Holanda) con el secuenciador MiSeq Illumina.

Análisis de la secuencia de 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa II

La búsqueda de homólogos del gen de 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa II se realizó usando BLAST (Altschul et al., 1990). El péptido señal del gen de 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa II se predijo usando SignalP (Petersen et al. 2011). El árbol filogenético y el alineamiento de las secuencias de glicosidasas se realizaron con el programa *Geneious* (Biomatters Ltd.), utilizando el método de unión de vecinos y ClustalW (Thompson et al., 1994), respectivamente. La predicción de la estructura y función de la proteína 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa II se realizó con el servidor i-tasser (Yang Zhang, 2009).

Clonado de 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa II

Se cultivó *Acremonium* sp. DSM 24697 en un medio que contenía (g/l): 2.5 rutina; 1.0 peptona de leche, 2.0 extracto de levadura y 50 mM de buffer citrato de sodio pH 5 a 25 °C con agitación. Su ARN genómico se aisló usando el protocolo *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). La síntesis del ADN complementario (ADNc) se realizó utilizando la enzima Transcriptasa Reversa, el ARN como molde y el primer mRut_SP1C AATTCCTCCCATGTTCAG. Las reacciones de PCR se realizaron en el ciclador GeneE (Techne), utilizando la enzima ADN polimerasa *Pfu Ultra II Fusion HS* (Agilent Technologies), el ADNc como molde y el par de *primers* cRut_SP1_F 5'-CGCCGACAGCAATTCCTCCCATGTTCAGC-3' y cRut_SP1_R 5'-ACCTCTGGACTCGCATGTACACCACGCAGC-3'. El producto de PCR provisto de una cola de adeninas en el extremo 3' se purificó desde el gel de agarosa y se precipitó con etanol. El gen se ligó en el vector pGEM-T Easy de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Promega) y el vector resultante *pGEM-T::arbgII* se utilizó para transformar las células *E. coli* TOP10. La correcta inserción del gen se confirmó por el análisis con enzimas de restricción (Nco I y Xho I) y el secuenciado del plásmido completo.

Expresión de 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa II en *E. coli*

El clonado del gen *arbgII* inserto en los vectores pET101/D-TOPO y pET100/D-TOPO se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante, utilizando los insertos derivados de *pGEM-T::arbg*. Para el clonado en pET101/D-TOPO y pET10/D-TOPO se utilizaron los pares de primers:

RutII_pET101_F (5'-CACCATGCGGGAACAACCGTACCATGACTG-3')

RutII_pET101_R (5'-GAGCTCCGAATCACTCGTCTCCAGCTCAATC-3')

RutII_pET100_F (5'-CTAGACCTCCGAATCACTCGTCTCCAGCTCAATC-3')

RutII_pET100_R (5'-CTAGACCTCCGAATCACTCGTCTCCAGCTCAATC-3')

Los constructos *pET101::arbgII* y *pET100::arbgII* fueron transformados en *E. coli* BL21 Star (DE3) (Life Technologies). Los transformantes seleccionados, crecieron a 37 °C en medio LB que contenía ampicilina (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$). A la mañana siguiente la temperatura del cultivo se disminuyó a 22 °C, y luego de una hora se adicionó IPTG a una concentración final de 450 μM . Al día siguiente, se recolectó la biomasa por centrifugación (3 600 *g* a 8 °C, 15 min) y el *pellet* de células se lavo dos veces con 25 mM buffer Tris-HCl pH 7.0. La lisis de las células se realizó mediante un tratamiento con lisozima y DNasa (0.2 mg ml^{-1} and 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente) durante 10 h, seguidos del sonicado en hielo durante 15 min (pausa de 1 min entre pulsos de 1 min; 80% amplitud; UP50H sonicator, Hielscher Ultrasonics GmbH).

Expresión de 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa II en *P. pastoris*.

El gen de *arbg II* sin la secuencia del péptido señal predicho fue re-amplificado desde *pGEM-T::arbg II* utilizando la DNA polimerasa *PfuUltra II Fusion HS* (Agilent Technologies) y el par de primers

RUT-II_PICZ_F (5'-GAAAAGACGGGAACAACCGTACCATGACTGGAAAG-3')

RUT-II_PICZ_R (5'-CGGATCGTTGAGCTCGTCTAGATAGACCTCCGAATCACTC-3')

El producto de PCR se purificó desde el gel, se sometió a digestión con *XbaI* y se ligó en el vector pPICZ α A (Invitrogen) utilizando el kit Mighty mix DNA ligation (Takara Bio Inc.). El constructo se denominó *pPICZ α A::arbgII* y su secuencia se confirmó mediante el secuenciado del ADN. Luego, el constructo se linealizó con la enzima *SacI* (NewEngland Biolabs), se precipitó el ADN con etanol y se transformó por electroporación en células de *P. pastoris* KM71H (Invitrogen) utilizando el electroporador MicroPulser seteado para *P. pastoris* (Bio-Rad). Los transformantes se cultivaron a 28 °C en placas con medio YPDS que contenía zeocina (concentración final 1 mg/ml). El medio de cultivo BMGY se utilizó para la producción de biomasa. Luego se centrifugó (2 200 *g* a 15 °C, 20 min), y el *pellet* de células fue resuspendido

en medio BMMY, con agitación continua del cultivo. La inducción de la expresión proteica se mantuvo durante 4 días mediante la adición de metanol a una concentración final de 0.5% (v/v) cada 24 h. Todos los medios de cultivo de *P. pastoris* se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit de expresión EasySelect Pichia, Invitrogen).

Síntesis y caracterización de solventes altamente eutécticos (DES)

Los siguientes DES y condiciones se utilizaron para las reacciones de desglicosilación con 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa I: colina:urea (relación molar 1:2), con paleta de agitación 40 rpm a 90 °C por 1 h; colina:glicerol (relación molar 1:2) sin agitación a 70°C por 30 min; colina:etilenglicol (relación molar 1:2) sin agitación, sumergido 1 min a 80°C. Para la caracterización de los diferentes DES se evaluaron sus propiedades físico-químicas: conductividad ($\mu\Omega/\text{cm}$) y miscibilidad en relación 1:1 con diferentes solventes (agua, etanol, propanol, acetona, acetato de etilo, tolueno y hexano).

Actividad de 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa I

La reacción se realizó en diferentes DES: colina: urea, colina: glicerol, colina: etilenglicol y en los solventes que los componen (glicerol y etilenglicol). La mezcla de reacción (1000 μl) contenía 950 μl de 1.8 mM hesperidina y 50 μl del catalizador. Las soluciones del sustrato que contenían DES se estabilizaron en 5 mM buffer fosfato de sodio pH 6.0. La reacción se llevó a cabo durante 1 h a 60°C. El producto (hesperetina) se cuantificó por HPLC usando un sistema de HPLC de la serie KONIK-500-A unido a un detector KONIK UVIS 200 con una columna fase reversa de Kromasil®Akzo-Nobel100-5C18 (25 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno, tamaño de poro de 100 Å, tamaño de partícula 5 μm). La elución consistió en un flujo isocrático de 50% v/v de metanol y 50% v/v de agua a un caudal de 1.0 mL/min a 40 °C. Las áreas de pico y el coeficiente de extinción se calcularon a partir de cromatogramas de patrones auténticos detectados a 285 nm. La extracción de hesperetina se realizó dos veces colocando muestras (100 μl) con 400 μl de metanol al 50% v/v y DMSO al 50% v/v durante 1 h a 50 °C. Luego, las muestras se centrifugaron (10 000 rpm, 10 min), los sobrenadantes se diluyeron adecuadamente en el solvente de elución. Se utilizaron muestras triplicadas. Se definió una unidad enzimática como la cantidad de enzima requerida para producir 1 μmol de hesperetina por minuto.

Resultados y Discusión

1. Desarrollo de un método espectrofotométrico para la cuantificación de la desglicosilación enzimática de rutina.

La búsqueda de enzimas con actividad desglicosilante de rutina depende en gran parte de la disponibilidad de los métodos analíticos apropiados. En general, los métodos elegidos debido a su simplicidad son aquellos que emplean sustratos cromogénicos o fluorogénicos como *p*-nitrofenil- β -rutinosido y 4-metilumbeliferil- β -rutinosido, respectivamente. El residuo *p*-nitrofenol en los sustratos cromogénicos constituye un buen grupo saliente para las glicosidasas y permite realizar ensayos de *screening* en muestras líquidas. Sin embargo, las glicosidasas muestran especificidad de sustrato, no sólo respecto al azúcar sino también respecto a la aglicona que compone el sustrato como así también de la posición en la cual estos residuos están unidos (regioespecificidad) (Riva, 2002). Por esta razón, el uso de los sustratos naturales es prácticamente ineludible si se trata de estudiar la regio-especificidad de las glicosidasas. En estos casos, la liberación de azúcares reductores es un método simple para abordar la cuantificación de las reacciones de desglicosilación en un amplio número de muestras. Sin embargo, el flavonoide rutina interfiere con las determinaciones que requieren altos valores de pH, tales como la técnica de Miller, lo cual imposibilita la utilización de estos métodos. Por lo tanto, la cuantificación de quercetina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es el método de elección, no obstante no es una técnica confortable para aplicar a un alto número de muestras (Vojtíšková et al., 2012; Cui et al., 2012; Cho et al., 2004).

1.1 Estabilidad química de rutina y su aglicona quercetina

Para caracterizar el sustrato y el producto de la reacción enzimática, se obtuvieron los espectros UV-visible de rutina y quercetina a 40°C a distintos valores de pH (5–10). En condiciones levemente ácidas (pH 5), el máximo de absorción para rutina fue de 351 nm, mientras que a pH alcalinos (8 y 10) los picos máximos de absorción se desplazaron hacia longitudes onda mayores, 380 y 403 nm, respectivamente. No se observaron cambios significativos en los espectros de rutina a diferentes valores de pH luego de 30 min de incubación (Fig. 9).

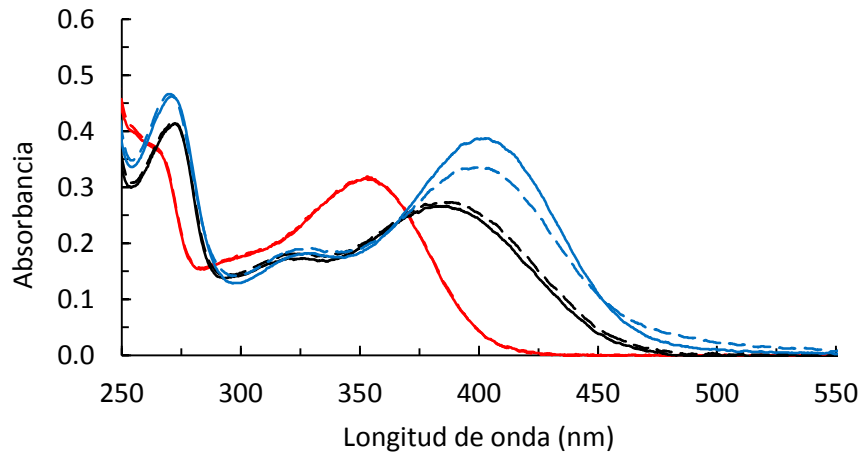


Figura 9: Espectro UV – visible de rutina 18 μ M a pH 5.0 (50 mM buffer citrato de sodio) — 0 min, - - 30 min; pH 8 (50 mM buffer fosfato de sodio) — 0 min, - - 30 min; pH 10 (50 mM solución carbonato de sodio) — 0 min, - - 30 min.

La aglicona quercetina muestra un pico máximo de absorción a 367 nm bajo condiciones levemente ácidas (pH 5). A valores de pH alcalinos, el pico máximo de absorción fue de 387 nm a pH 8, y de 414 nm a pH 10. Luego de 30 min bajo condiciones levemente ácidas (pH 5 y 6), el pico de máxima absorción se mantuvo, mientras que a pH 7 el pico de máxima absorción se modificó levemente. A pH 8 el máximo de absorción (387 nm) correspondiente a quercetina, decreció en el transcurso del tiempo junto con la aparición de un nuevo pico de absorción a 320 nm. Esta modificación es debido a la autooxidación de quercetina y este proceso es favorecido por valores de pH alcalinos, presencia de iones metálicos y altas temperaturas (El Hajji et al., 2006; Fahlman & Krol, 2009a, 2009b; Jungbluth et al., 2000; Krishnamachari et al., 2002; Sokolová et al., 2012). Para evitar la autooxidación de quercetina a pH 8 se utilizó el buffer compuesto por Tris y el antioxidante glicina. En este caso, no se observaron cambios en el espectro de absorción luego de 30 min. A pH 10, la tasa de autooxidación de quercetina aumenta, y se produce la completa desaparición del pico a 414 nm con la correspondiente aparición de un pico a 320 nm (Fig. 10).

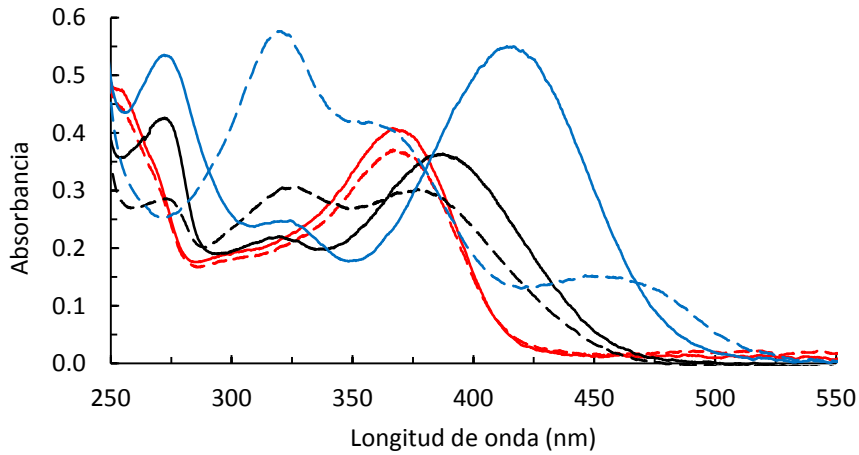


Figura 10: Espectro UV – visible de quercetina 18 μM a pH 5.0 (50 mM buffer citrato de sodio) — 0 min, - - 30 min; pH 8 (50 mM buffer fosfato de sodio) — 0 min, - - 30 min; pH 10 (50 mM solución carbonato de sodio) — 0 min, - - 30 min.

Los cambios de absorbancia a 414 y 320 nm durante la incubación de quercetina en una solución alcalina fueron graficados en función del tiempo (Fig. 11). Por otro lado, en estas condiciones, se observaron disminuciones significativas del pico de absorción de rutina (403 nm) luego de 10 min.

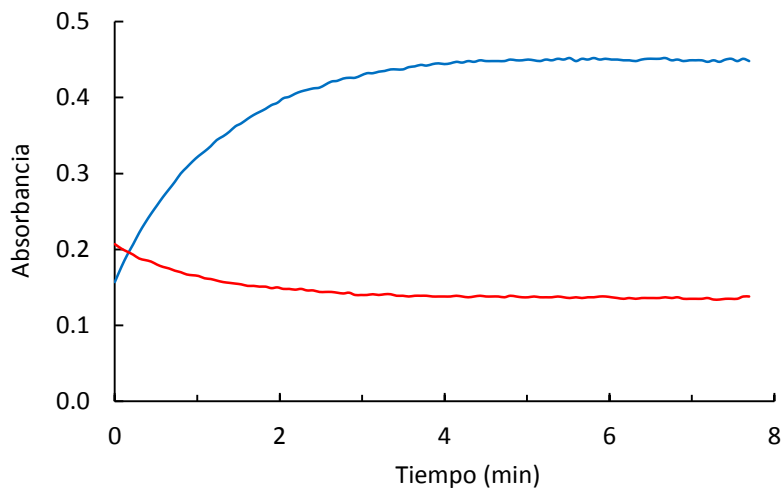


Figura 11: Autooxidación de quercetina en una solución 50 mM carbonato de sodio pH 10, — 414 nm y — 320 nm.

1.2 Curva de calibrado

La correlación entre la concentración de quercetina y la absorbancia a 320 nm correspondiente a sus productos de autooxidación fue lineal (Fig. 12). Los estándares de quercetina fueron incubados (pH 10, 25 °C) durante 5 min para lograr la autooxidación cuantitativa (ver los resultados mostrados en la figura 11). El valor del coeficiente de extinción molar de (los productos de autooxidación de) quercetina $\epsilon_{320, Q}$ fue $26.2 (\pm 0.3) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Fig. 12).

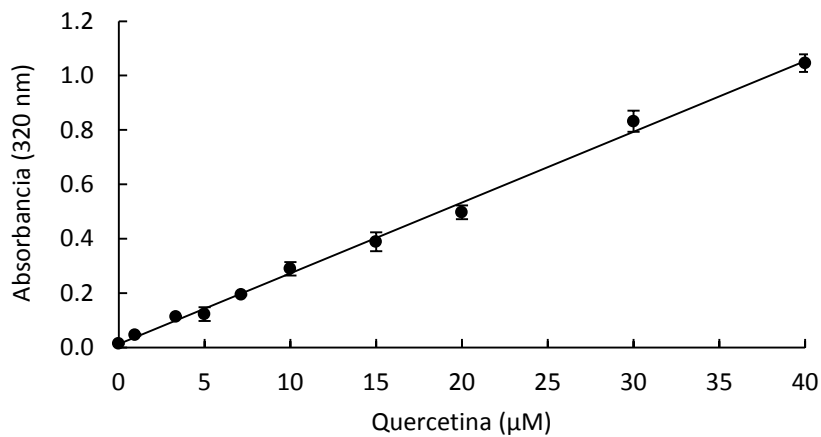


Figura 12: Curva de calibrado de quercetina.

El análisis de regresión denota una relación lineal entre la absorbancia y la concentración, con un coeficiente de correlación lineal de 0.99. Luego, la sensibilidad del método fue evaluada. Para ello, se calcularon el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) teniendo en cuenta los valores de desvío estándar (σ) y la pendiente de la curva de calibración (s), mediante las siguientes ecuaciones (Arayne et al., 2013):

$$LOD = 3.3 \frac{\sigma}{S} \qquad LOQ = 10 \frac{\sigma}{S}$$

La concentración mínima de quercetina detectada (LOD) fue $0.91 \mu\text{M}$ mientras que, la concentración mínima cuantificada de quercetina (LOQ) fue de $2.64 \mu\text{M}$.

1.3 Diseño de un ensayo enzimático para la actividad desglicosilante de rutina

Se diseñó un ensayo analítico espectrofotométrico para la medición de actividad desglicosilante basado en los ensayos de estabilidad química de rutina, quercetina y sus productos de oxidación. De acuerdo a esta información, la reacción enzimática puede ser llevada a cabo en el rango de pH 5-7 utilizando un buffer a elección. Sin embargo, si la reacción debe llevarse a cabo a pH más altos (por ej. pH 8), podría utilizarse el buffer antioxidante Tris-glicina. En el caso de valores de pH alcalinos, es posible que los productos de oxidación de quercetina afecten la estabilidad de las enzimas.

A valores de pH altos, el espectro del sustrato rutina muestra un pico de máxima absorción cercano a 400 nm con un “hombro” a 327 nm, el cual se superpone con el pico de máxima absorbancia de los productos de oxidación del producto quercetina. Para separar estos compuestos y así evitar la superposición de sus espectros se examinó un proceso de extracción líquido-líquido con el solvente acetato de etilo. Durante este paso, quercetina se extrae en la fase orgánica mientras que la fracción remanente de rutina permanece en la fase acuosa. Se demostró que un volumen de este solvente fue suficiente para producir la extracción cuantitativa de quercetina 5 μM , mientras que un 92% y 89% de extracción se alcanzó para las concentraciones 10 μM y 15 μM , respectivamente. Teniendo en cuenta estos resultados, una vez finalizada la reacción enzimática se extrajo el producto (quercetina) con un volumen de acetato de etilo. Por último, 100 μl de la fase superior, que contiene la aglicona quercetina, fue añadida a 1.9 ml 50 mM carbonato de sodio (pH 10) para obtener los correspondientes productos de oxidación de quercetina al cabo de 4 minutos y su absorbancia fue medida a 320 nm (Fig. 13).

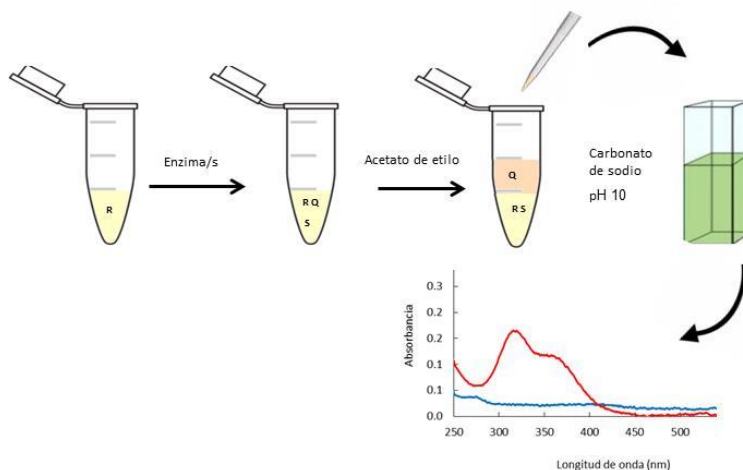


Figura 13: Esquema del método espectrofotométrico diseñado para la cuantificación de la actividad de desglicosilación de rutina. R: Rutina, Q: Quercetina, S: Azúcar.

1.4 Isoquercetina como producto intermediario de la desglicosilación de rutina

Cuando la desglicosilación de rutina ocurre mediante el modo secuencial, es decir con dos monoglicosidasas, y el paso limitante corresponde a la glucosidasa, puede ocurrir una acumulación de isoquercetina como producto intermedio (Fig. 7). Teniendo en cuenta que isoquercetina podría interferir en la cuantificación de quercetina, decidimos analizar el efecto de su agregado. Para ello se agregó la misma a las muestras conteniendo rutina y quercetina y realizó una extracción con acetato de etilo. Luego, se evaluó la presencia de isoquercetina en las fases acuosa y orgánica. Se produjo la partición de isoquercetina entre las dos fases, superponiéndose al espectro de quercetina. A pH 10 el espectro de isoquercetina muestra un máximo a 400 nm con un “hombro” a 320 nm. En contraste con quercetina, el espectro permanece sin modificaciones en el tiempo. Para superar una probable formación e interferencia de isoquercetina, se obtuvo el espectro de una solución combinada de quercetina 2.5 μM (Q) e isoquercetina 2.5 μM (I) en carbonato de sodio pH 10 (50 mM). Por otro lado, se tomaron los espectros individuales de quercetina 2.5 μM y isoquercetina 2.5 μM , los cuales fueron sumados matemáticamente. La aditividad de los espectros fue testada de acuerdo a la siguiente ecuación para cada longitud de onda:

$$A_{Q+I} = A_Q + A_I$$

La comparación de los espectros confirmó que las absorbancias de isoquercetina y quercetina a 320 y 400 nm son aditivas (Fig. 14). Por lo tanto la concentración de quercetina puede ser estimada desde el siguiente sistema de ecuaciones que considera los coeficientes de extinción molar de quercetina e isoquercetina a 320 y 400 nm.

$$A_{320} = \varepsilon_{320,Q} b C_Q + \varepsilon_{320,I} b C_I$$

$$A_{400} = \varepsilon_{400,Q} b C_Q + \varepsilon_{400,I} b C_I$$

Los coeficientes de extinción molar fueron $14.4 (\pm 0.18) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\varepsilon_{320,I}$), $5.8 (\pm 0.14) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\varepsilon_{400,I}$) y $5.2 (\pm 0.13) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\varepsilon_{400,Q}$). Para una reacción con un rendimiento de 5 μM de quercetina, que ha sido co-extraída en presencia de 5% isoquercetina, la relación entre la absorbancia a 320 nm y 400 nm es de 4.1. Por lo tanto con relaciones mayores a 4.1, considerando la curva de calibración de quercetina a 320 nm, se espera un error menor al 5% en la actividad cuantificada.

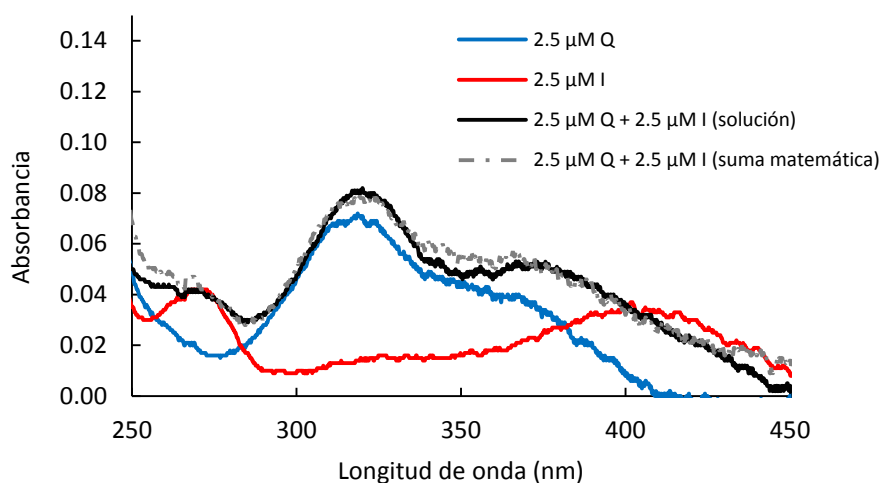


Figura 14: Aditividad de la absorbancia de las soluciones de isoquercetina (I) y quercetina (Q).

1.5 Sistemas biológicos de desglicosilación de rutina

El trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) es una planta anual herbácea de la familia de las Polygonaceas cultivada por sus granos para su consumo humano y animal. Se considera popularmente un cereal porque posee características similares, aunque realmente no lo sea, ya que no pertenece a la familia de las gramíneas. China produce el 55 % del total mundial, seguido por Rusia (20 %), Ucrania (15 %) y Estados Unidos (3.5 %). Las semillas de trigo sarraceno son la principal fuente del flavonoide rutina (0.8–1.7 % p/p rutina) (Fabjan et al., 2016). En correlación con la presencia de rutina en su composición, el trigo sarraceno también es fuente de enzimas degradadoras de rutina (RDE). Una de estas enzimas fue aislada y caracterizada, y es capaz de hidrolizar específicamente rutina, brindando una nueva preparación enzimática para la producción de quercetina (Cui & Wang, 2011). También se pueden utilizar preparaciones comerciales de origen fúngico –*Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp.– que contienen actividades α -L-ramnosidas y β -D-glucosidas. Estas mezclas se comercializan con los nombres de “naringinasa” y “hesperidinasa” pero no contienen actividad diglicosidasa y, por este motivo, usualmente conducen a una mezcla de quercetina e isoquercetina. El método desarrollado para medir la desglicosilación de rutina fue utilizado para evaluar una preparación comercial de naringinasa (Fig 7). También se midió la actividad desglicosilante de rutina en cuatro muestras comerciales de harina de trigo sarraceno. La cuantificación de quercetina liberada con el método espectrofotométrico mostró una correlación de 0.98 con el HPLC. Los datos de las harinas de trigo sarraceno I, II, y III fueron

analizadas usando el test-t para comparación de pares de medias con un 95% de confianza (Massart et al., 1997). No se detectaron diferencias significativas en la cuantificación de las RDE por ambos métodos (Fig. 15). Si bien estos métodos demostraron ser equivalentes, el método espectrofotométrico permite evaluar un mayor número de muestras en el tiempo que el HPLC. También es importante destacar que el método desarrollado se puede adaptar a un lector de microplacas.

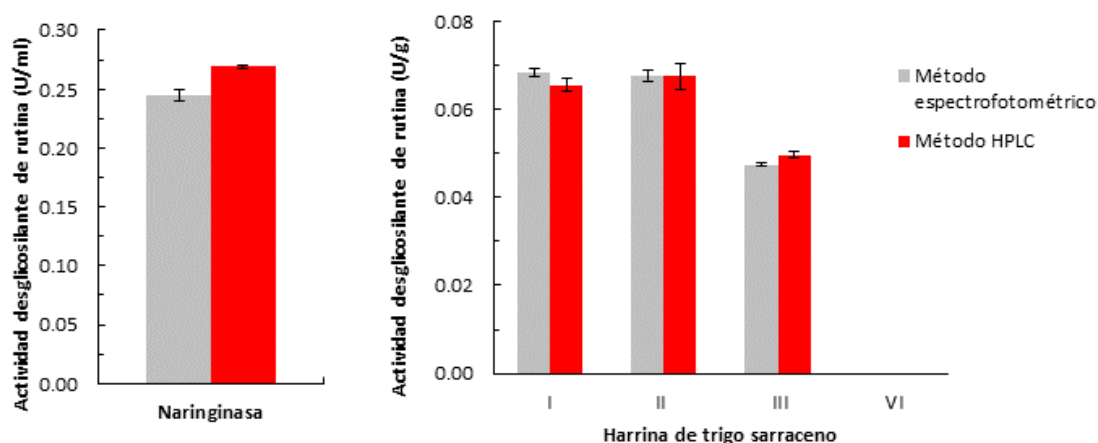


Figura 15: Medición de la actividad de desglicosilación de rutina de una preparación comercializada como “naringinasa” (A) y muestras de harina sarraceno (B) por diferentes métodos. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de dos replicas.

Un método espectrofotométrico para detectar el contenido de quercetina en muestras de semillas de trigo sarraceno a longitudes de onda isoabsortivas de rutina ha sido descrito previamente por Chen & Gu (2011). Este método es útil para el *screening* de varias muestras, sin embargo su exactitud no es suficiente para la cuantificación de actividad enzimática. A diferencia de este, el método desarrollado en nuestro trabajo puede ser aplicado a un amplio número de muestras con una exactitud comparable a la de cromatografía líquida de alta performance. Sumado a esto, el desarrollo del método considera una posible acumulación de isoquercetina y su interferencia puede ser fácilmente corregida. Por último, este método contempla el hecho de que las glicosido hidrolasas muestran reconocimiento de la aglicona y/o regioselectividad respecto de la unión entre el azúcar y la aglicona (Mazzaferro et al., 2011). Por ello, la utilización del sustrato natural permite evaluar la especificidad de sustrato (en todos sus aspectos), lo que no es posible mediante el uso de *p*-nitrofenil derivados.

2. Selección de microorganismos productores de diglicosidasas

La cepa fúngica *Acremonium* sp. DSM 24697 ha sido descrita como productora de la diglicosidasa 6-*O*- α -ramnosil- β -glucosidasa (α R β G) (EC 3.2.1.168), específica para flavonoides 7-*O*-rutinosilados (Mazzaferro et al., 2010). Si bien la hidrólisis del flavonoide 3-*O*-rutinosilado rutina no ha sido detectada con la enzima purificada (Mazzaferro et al., 2010), esta cepa es capaz de crecer con rutina como fuente de carbono. Considerando estos resultados previos, partimos de la hipótesis de que este microorganismo posee un mecanismo distinto de desglicosilación para flavonoides 3-*O*- y 7-*O*-rutinosilados. Para comprobar esta hipótesis, *Acremonium* sp. DSM 24697 fue cultivado con rutina como fuente de carbono y el sobrenadante se analizó zimográficamente con el sustrato 4-metilumbeliferil-rutinósido (MUR). La síntesis de este sustrato artificial fue desarrollada previamente en nuestro laboratorio (Mazzaferro et al., 2011). El análisis zimográfico del sobrenadante mostró dos bandas de actividad con el sustrato 4-metilumbeliferil-rutinósido (MUR), una de ellas con el mismo R_f (R_f 0.37) que la enzima α R β G y otra de menor R_f (0.13) (Fig. 16). En los análisis zimográficos con los sustratos comerciales monoglicosilados (4-metilumbeliferil-glucósido (MUGlc) y 4-metilumbeliferil-ramnósido (MURa)) no se detectaron bandas de actividad. Estos resultados revalidan la hipótesis respecto a la estrategia de este microorganismo para la desglicosilación de los flavonoides hesperidina y rutina en una sola reacción, mediante dos diglicosidasas.

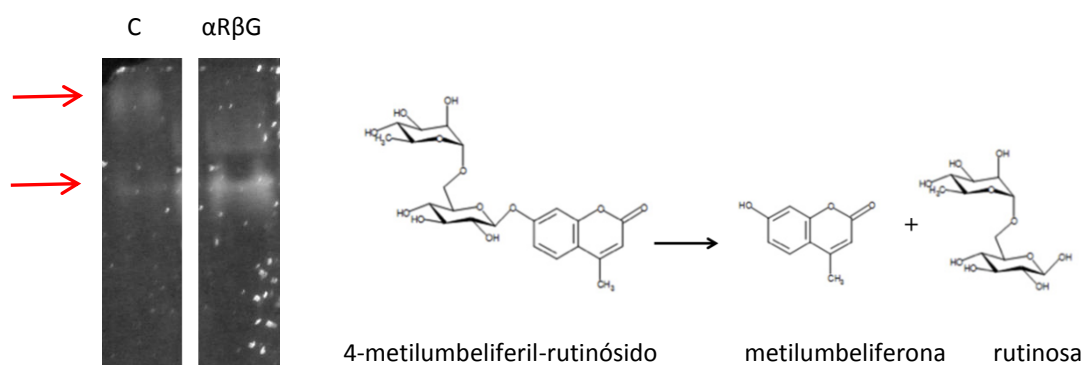


Figura 16: Análisis zimográfico con el sustrato 4-metilumbeliferil-rutinósido. C: sobrenadante de *Acremonium* sp. DSM 24697 cultivado con rutina como fuente de carbono. α R β G: 6-*O*- α -ramnosil- β -glucosidasa pura.

Basados en los resultados previamente descriptos para *Acremonium* sp. DSM 24697, se realizó una búsqueda de nuevos catalizadores con actividad diglicosidasa en cepas del género *Acremonium* y especies relacionadas para la degradación de los flavonoides rutina, diosmina y hesperidina. El género *Acremonium*, conocido anteriormente como *Cephalosporium*, es un género de clasificación taxonómica compleja que comprende aproximadamente 150 especies, comúnmente aisladas del suelo y material vegetal en degradación (Giraldo et al. 2015). Algunas especies como *Acremonium kiliense* y *Acremonium strictum* son reconocidas como patógenos oportunistas del hombre y de los animales, dado que causan infecciones tales como onicomycosis, micetoma y hialohifomicosis. En un estudio filogenético molecular reciente, la taxonomía de *Acremonium* fue revisada y algunas especies patógenas de animales y plantas fueron reclasificadas en el género *Sarocladium* (Giraldo et al., 2015). A pesar de que ambos géneros son morfológicamente similares y miembros del orden *Hypocreales*, son filogenéticamente distantes: *Acremonium* se relaciona con la familia *Bionectriaceae*, mientras que *Sarocladium* aún se considera como *incertae sedis*, es decir sin un taxón definido (Summerbell et al., 2011). Por lo general, son especies de crecimiento lento y las colonias tienen forma compacta. Las hifas son finas y septadas y los conidios son por lo general de una sola célula, aseptados, hialinos o pigmentados y globulares o cilíndricos.

2.1 Cepas de *Acremonium* y *Sarocladium* degradadoras de flavonoides

Se estudiaron 28 cepas referenciadas del género *Acremonium* provenientes de aislamientos ambientales realizados en el Instituto Malbrán (Buenos Aires). Varias de estas fueron reclasificadas dentro del género *Sarocladium*. Considerando que la taxonomía dentro del orden *Hypocreales* es compleja y actualizada de forma frecuente, y la alta relación que existe entre estos dos géneros, se decidió incluir todas las cepas en el estudio de degradación de flavonoides. Del total de cepas incluidas en el estudio (28), 22 fueron capaces de crecer en presencia de diosmina, 24 de hesperidina y 26 de rutina; mientras que *Acremonium* sp. 147-1 y *S. kiliense* DMic 062925 no crecieron en presencia de ninguno de los tres flavonoides (Tabla 2). Cabe destacar el efecto inhibitorio del crecimiento de microorganismos descripto para diversos flavonoides (Tereschuk et al. 1997). En este caso, diosmina fue el flavonoide más deletéreo para este conjunto de microorganismos (Tabla 2).

Tabla 2 Crecimiento de cepas de *Acremonium* y *Sarocladium* en presencia de los flavonoides diosmina, hesperidina y rutina. (-) ausencia de crecimiento, (+) crecimiento detectable. Presencia de halos de clarificación de rutina. (-) colonias sin halo de clarificación y (+) colonias con halo de clarificación.

Microorganismo	Diosmina	Hesperidina	Rutina	Clarificación de rutina
<i>Acremonium sp.</i> DMic 85104	+	+	+	+
<i>Acremonium curvulum</i> DMic 01770	+	+	+	+
<i>Acremonium atrogriseum</i> DMic 093497	+	+	+	+
<i>S. strictum</i> DMic 993190	+	+	+	+
<i>S. kiliense</i> DMic 00226	+	+	+	+
<i>S. kiliense</i> DMic 062925	-	-	-	-
<i>S. kiliense</i> DMic 062926	-	-	+	-
<i>S. strictum</i> DMic 073153	+	+	+	+
<i>S. kiliense</i> DMic 093549	-	+	+	-
<i>S. strictum</i> DMic 093557	+	+	+	+
<i>S. kiliense</i> DMic 103735	+	+	+	+
<i>S. kiliense</i> DMic 103850	+	+	+	+
<i>S. strictum</i> DMic 114098	+	+	+	+
<i>S. strictum</i> DMic 114110	+	+	+	+
<i>S. kiliense</i> DMic 134632	+	+	+	+
<i>Acremonium sp.</i> 85-2	+	+	+	-
<i>Acremonium sp.</i> 147-1	-	-	-	-
<i>S. kiliense</i> 657-1	+	+	+	+
<i>Acremonium sp.</i> 693-2	+	+	+	-
<i>Acremonium sp.</i> 780-1	+	+	+	+
<i>S. kiliense</i> 799-5	+	+	+	+
<i>Acremonium hyalinulum</i> 862-4	+	+	+	+
<i>Acremonium sp.</i> 900-3	+	+	+	+
<i>S. kiliense</i> 937-11	-	-	+	+
<i>S. kiliense</i> 937-14	+	+	+	-
<i>Acremonium sp.</i> 959-1	+	+	+	+
<i>Acremonium sp.</i> 962-2	-	+	+	+
<i>Acremonium sp.</i> 1237-1	+	+	+	+

La baja solubilidad en agua de los flavonoides utilizados genera un medio opaco que permite observar su degradación en medio sólido por la producción de halos de clarificación (Fig. 17). Si bien la clarificación del medio de cultivo indica que los microorganismos son capaces de

producir enzimas que degradan los flavonoides, no necesariamente indica la estrategia de deglicosilación de los mismos. La degradación de rutina (halo de clarificación) se detectó en 21 de las cepas estudiadas, mientras que ninguna clarificó los medios que contenían hesperidina y diosmina como fuente de carbono (Tabla 2). Teniendo en cuenta que la búsqueda de nuevas diglicosidasas en diversas cepas de los géneros *Acremonium* y *Sarocladium* se realizó en base al conocimiento previo de que *Acremonium* sp. DSM 24697 hidroliza hesperidina, resulta llamativo la no detección de halo de hidrólisis de hesperidina en las 28 cepas ensayadas.



Figura 17: *Acremonium* sp. 1237-1 en agar con diosmina, rutina y hesperidina como fuentes de carbono. Alrededor de la colonia en medio con rutina se observa el halo de clarificación mientras que éste no se detecta con los otros dos flavonoides.

2.2 Producción de glicósido hidrolasas con rutina como fuente de carbono.

Las 21 cepas cultivadas en medio sólido con rutina como fuente de carbono presentaron halo con una coloración rojiza alrededor de las colonias (Fig. 17). Este sector de la placa se utilizó como fuente de actividad enzimática para realizar análisis zimográficos con el sustrato MUR. Siete cepas (*Acremonium* sp. 959-1, *Acremonium* sp. 1237-1, *Acremonium* sp. 900-3, *Sarocladium strictum* DMic 093557, *Sarocladium strictum* DMic 993190, *Sarocladium strictum* DMic 114098, *Sarocladium kiliense* DMic 00226) mostraron una banda de actividad con el sustrato fluorogénico. Los diferentes valores de R_f obtenidos 0.39, 0.32, 0.31, 0.27, 0.20, 0.17, 0.19, sugieren que estamos en presencia de al menos tres proteínas diferentes (Fig. 18). Las bandas de actividad en los zimogramas con el sustrato diglicosilado constituyen un fuerte indicio de la presencia de diglicosidasas, es decir, enzimas capaces de escindir residuos diglicosídicos en una sola reacción. Esta hipótesis se basa en la probabilidad baja de que una α -

ramnosidasa y una β -glucosidasa migren con un mismo R_f en los PAGE, por lo que la hidrólisis del enlace heterosídico del MUR es indicador de actividad diglicosidasa. Las cepas restantes fueron capaces de degradar el flavonoide rutina, pero no se detectó una banda de actividad con el sustrato diglicoconjugado MUR. Este hecho sugiere que estos microorganismos probablemente utilizan dos monoglicosidasas (α -ramnosidasa y β -glucosidasa) como estrategia para la desglicosilación de rutina.

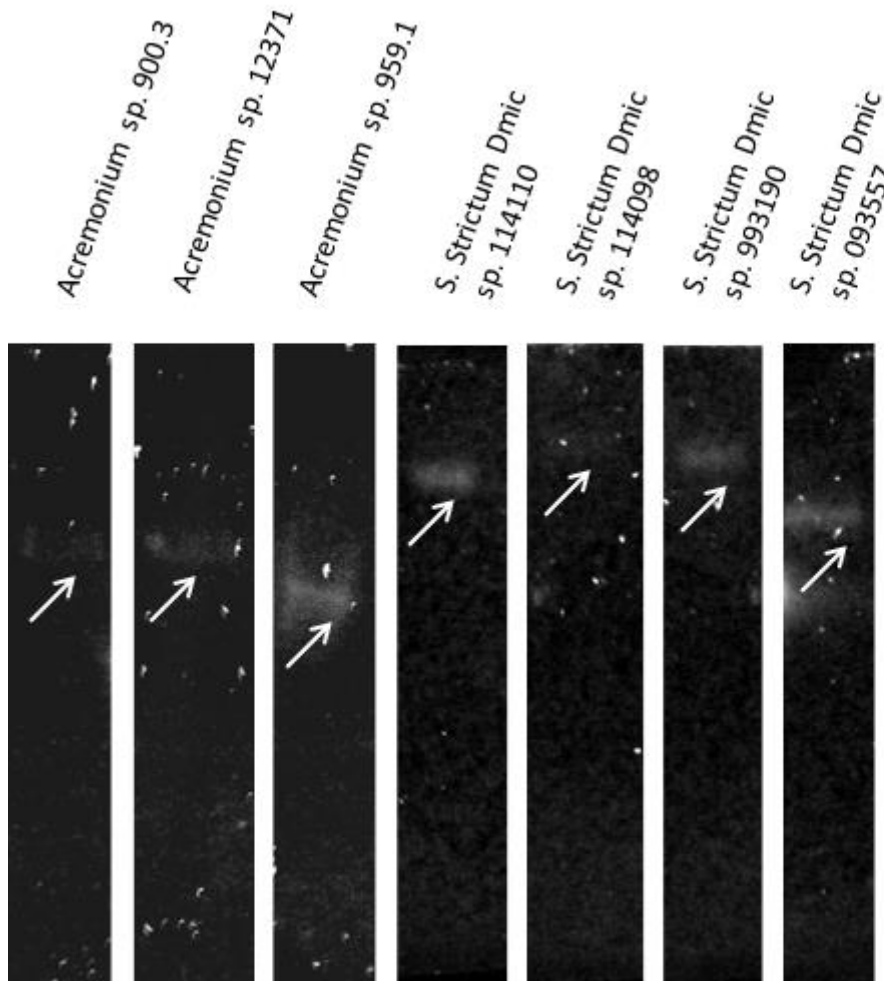


Figura 18: Análisis zimográficos positivos de los extractos enzimáticos de cepas de los géneros *Acremonium* y *Sarocladium* usando como sustrato MUR.

2.3 Características culturales de los géneros *Acremonium* y *Sarocladium* con rutina como fuente de carbono

En este trabajo, cinco de las cepas de los géneros *Acremonium* y *Sarocladium* (*Acremonium* sp. 1237-1, *Acremonium* sp. 959-1, *Acremonium* sp. 900-3 y *S. strictum* DMic 093557, junto a *Acremonium* sp. DSM 24697) fueron seleccionadas por su capacidad de hidrolizar el sustrato

fluorogénico MUR, para estudiar los parámetros de crecimiento en medio sólido con rutina como fuente de carbono (Fig. 19). Dado que las proteínas de bajo peso molecular en términos relativos poseen una mayor probabilidad de ser proteínas más estables, el criterio de selección aplicado fue tomar las cepas que presentaban las bandas de actividad con mayor valor de R_f . *Acremonium* sp. 12371 mostró la tasa de crecimiento radial más alta, mientras que las tasas de crecimiento de *Acremonium* sp. 9591 y *S. strictum* DMic 093557 fueron similares a la obtenida por *Acremonium* sp. DMS 24697 (0.70 ± 0.04 mm/día) (Tabla 3). El halo de clarificación alrededor de la colonia fue detectado antes (día seis) en las cepas con mayor K_r (*Acremonium* sp. 1237-1, *Acremonium* sp. 900-3); mientras que en las cepas de crecimiento más lento, el halo de clarificación se detectó a los 14 días para *Acremonium* sp. 959-1 y *S. strictum* DMic 093557, y a los 12 días para *Acremonium* sp. DSM 24697 (Fig. 19). Es interesante destacar que el crecimiento de las cepas *Acremonium* sp. DSM 24697 y *S. strictum* DMic 093557 se detuvo a partir de los días 13 y 20 respectivamente, mientras que el halo de hidrólisis continuó su desarrollo, presentando las mayores tasas de clarificación (Tabla 3). En el resto de las cepas, el crecimiento de las colonias y el desarrollo de los halos de clarificación ocurrieron de manera conjunta.

Tabla 3: Tasas de crecimiento y clarificación de las cepas *Acremonium* sp. 1237-1, *Acremonium* sp. 959-1, *Acremonium* sp. 900-3, *Sarocladium strictum* DMic 093557 y *Acremonium* sp. DSM 24697.

Cepa	K_r (mm/día)	K_c (mm/día)
<i>Acremonium</i> sp.12371	1.32	1.04
<i>Acremonium</i> sp. 9003	1.31	0.71
<i>Acremonium</i> sp. 9591	0.72	0,67
<i>Sarocladium strictum</i> 093557	0.85	2.01
<i>Acremonium</i> sp. DSM 24697	0.70	1.30

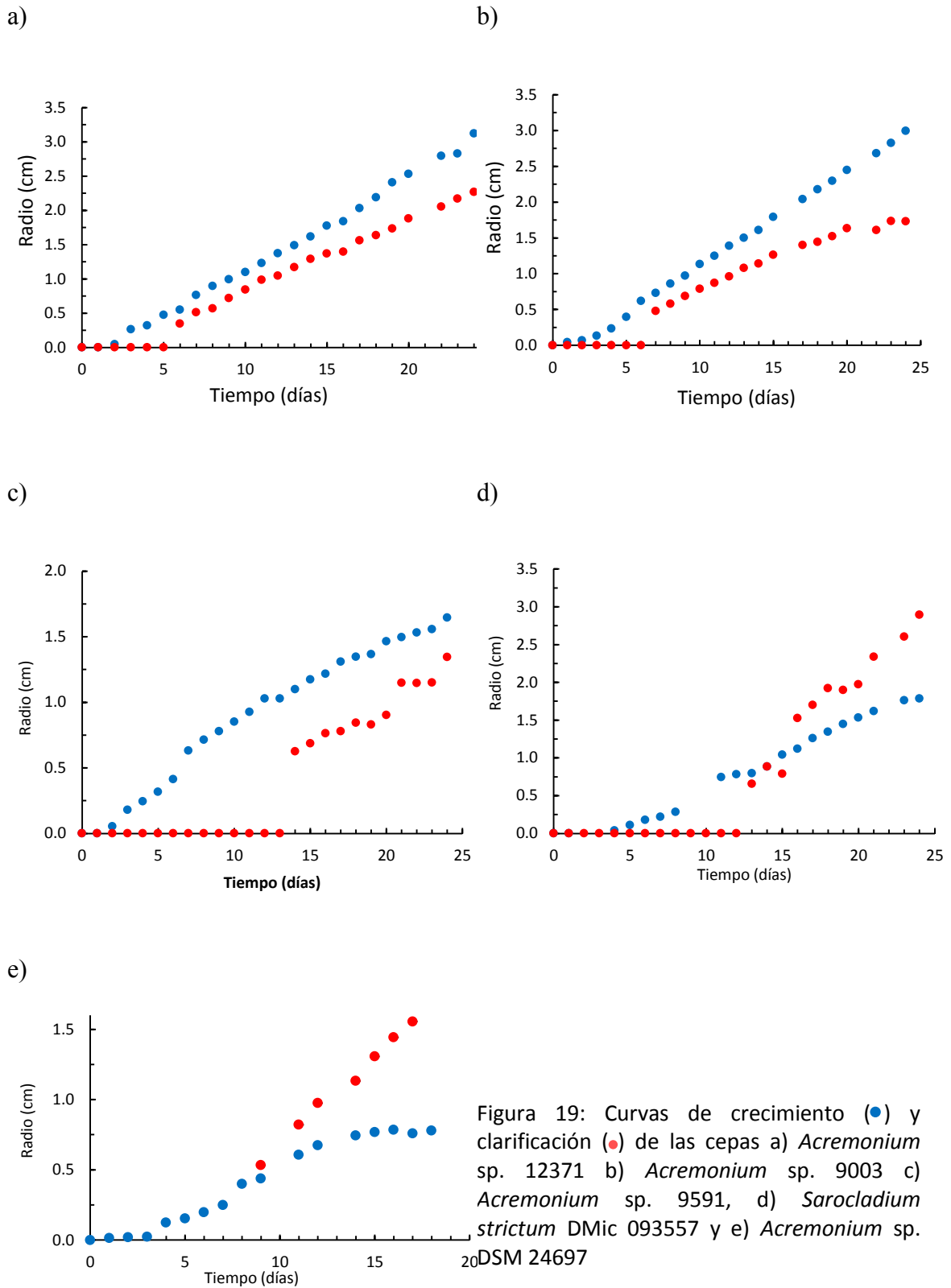


Figura 19: Curvas de crecimiento (●) y clarificación (●) de las cepas a) *Acremonium* sp. 12371 b) *Acremonium* sp. 9003 c) *Acremonium* sp. 9591, d) *Sarocladium strictum* DMic 093557 y e) *Acremonium* sp. DSM 24697

Varias glicósido hidrolasas fúngicas han sido descritas para microorganismos crecidos con rutina como fuente de carbono. Podemos citar las β -glucosidasas producidas por *Penicillium decumbens*, *A. oryzae* y *Aspergillus tubingensis* (Mamma et al., 2004; Riou et al., 1998; Decker

et al., 2001); la α -ramnosidasa de *Aspergillus terreus* (Gerstorferová et al., 2011) y las β -rutinosidasas de *P. rugulosum* y *A. niger* (Narikawa et al., 2000; Simcikova et al., 2014). Es decir, la literatura científica nos indica que podemos encontrar dentro de géneros relacionados, e incluso dentro de un mismo género, ambas estrategias de desglicosilación de flavonoides. En el caso particular de los géneros *Acremonium* y *Sarcocladium* podemos sugerir que ambas estrategias están presentes. Si bien el número de microorganismos estudiados no es estadísticamente representativo, podemos estimar que dentro de estos géneros el mecanismo de desglicosilación en una sola reacción se encuentra en menor proporción (~25 %). Para estudiar los sistemas enzimáticos de desglicosilación de rutina se seleccionaron dos cepas. La primera, *S. strictum* DMic 093557, se seleccionó por sus características de crecimiento y la libre disponibilidad de la secuencia completa del genoma de otra cepa de *S. strictum* (*Acremonium strictum* DS1bioAY4a). La segunda, *Acremonium* sp. DSM 24697, se seleccionó teniendo en cuenta la descripción previa de una diglicosidasa específica para flavonoides 7-O-rutinosilados y la presencia de una diglicosidasa extra detectada cuando este microorganismo crece con rutina como fuente de carbono, sumado a la secuenciación de su genoma lograda durante este trabajo tesis.

2.4 Desglicosilación de rutina en *Acremonium* sp. DSM 24697 y *S. strictum* DMic 093557.

La producción de enzimas desglicosilantes de rutina por *Acremonium* sp. DSM 24697 y *S. strictum* DMic 093557 se evaluó en un reactor agitado (pH 5, 25°C). El valor de pH fue seleccionado de acuerdo a los ensayos de estabilidad de rutina y quercetina, mientras que la actividad enzimática se cuantificó por el método espectrofotométrico desarrollado en este trabajo (Weiz et al., 2017). En *S. strictum* DMic 093557, la producción enzimática extracelular se detectó el octavo día de crecimiento, alcanzando un máximo de 22.4 ± 4.1 U/L en el octavo día, a partir del cual la actividad comenzó a descender registrándose un 22.7% menos el décimo día (Fig. 20). Por otro lado, en *Acremonium* sp. DSM 24697 se detectó actividad desglicosilante de rutina el segundo día de crecimiento y alcanzó el máximo de producción (11.04 ± 1.15 U/L) al tercer día. Luego de 96 h de proceso, la actividad disminuyó hasta 9.78 ± 1.65 U/L (Fig. 21). Es decir, la producción de la actividad desglicosilante de rutina en *Acremonium* sp. DSM 24697 alcanzó un máximo en un tiempo menor, sin embargo la producción de *S. strictum* DMic 093557 luego de 8 días de fermentación fue dos veces mayor.

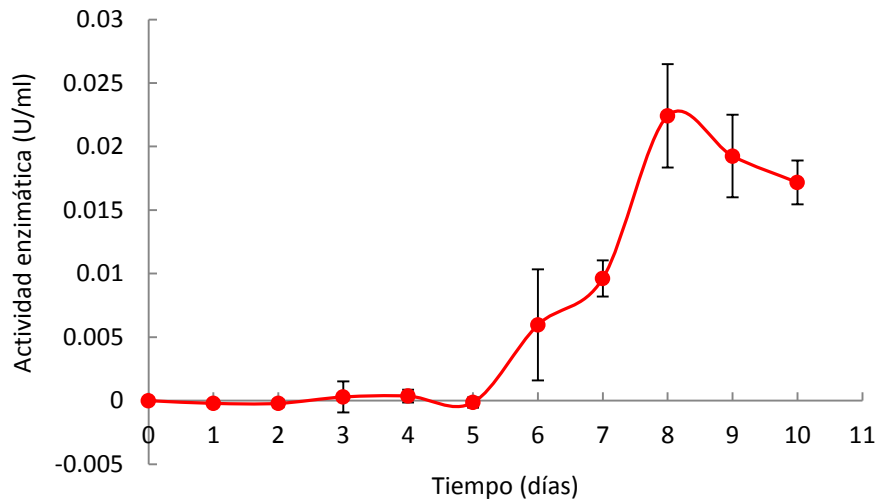


Figura 20: Producción enzimática de *S. strictum* DMic 093557 cultivado con rutina como fuente de carbono.

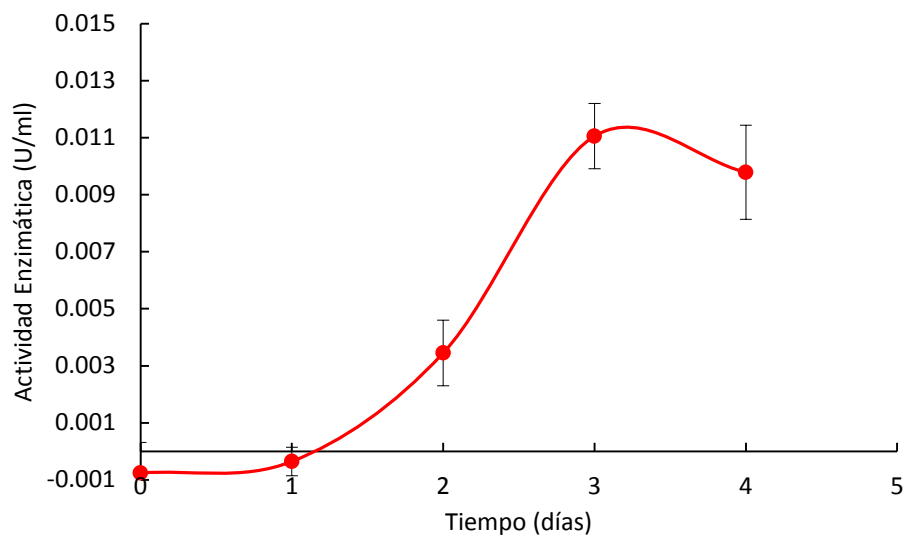


Figura 21: Producción enzimática de *Acremonium* sp. DSM 24697 cultivado con rutina como fuente de carbono.

Los productos de hidrólisis enzimática de rutina con los sobrenadantes de *S. strictum* DMic 093557 y *Acremonium* sp. DSM 24697 se analizaron por cromatografía en capa delgada. Se encontraron tres productos, los cuales se corresponden con los patrones del sustrato de la reacción rutina ($R_f = 0.76$), el disacárido rutinosa ($R_f = 0.16$) y la aglicona quercetina ($R_f = 0.92$) (Fig. 22). Los productos de reacción fueron también analizados por LC-MS/MS. Estos resultados confirmaron que *S. strictum* DMic 093557 y *Acremonium* sp. DSM 24697 desglucosilan el

flavonoide rutina en una reacción enzimática que hidroliza el enlace heterosídico, es decir, mediante una diglicosidasa (Fig. 23). Considerando que las cepas de *Acremonium* sp. DSM 24697 y *S. strictum* DMic 093557 producen diglicosidasas activas sobre el flavonoide rutina y que una 6-*O*- α -ramnosil- β -glucosidasa de *Acremonium* sp. DSM 24697 específica para 7-*O*-rutinósidos fue previamente descrita por nuestro grupo (Mazzaferro et al., 2010), para facilitar la denominación de estas enzimas hemos decidido llamar a la diglicosidasa específica para 7-*O*-rutinósidos 6-*O*- α -ramnosil- β -glucosidasa I (α R β G I) y las diglicosidasas activas sobre el flavonoide 3-*O*-rutinosilado rutina 6-*O*- α -ramnosil- β -glucosidasa II (α R β G II).

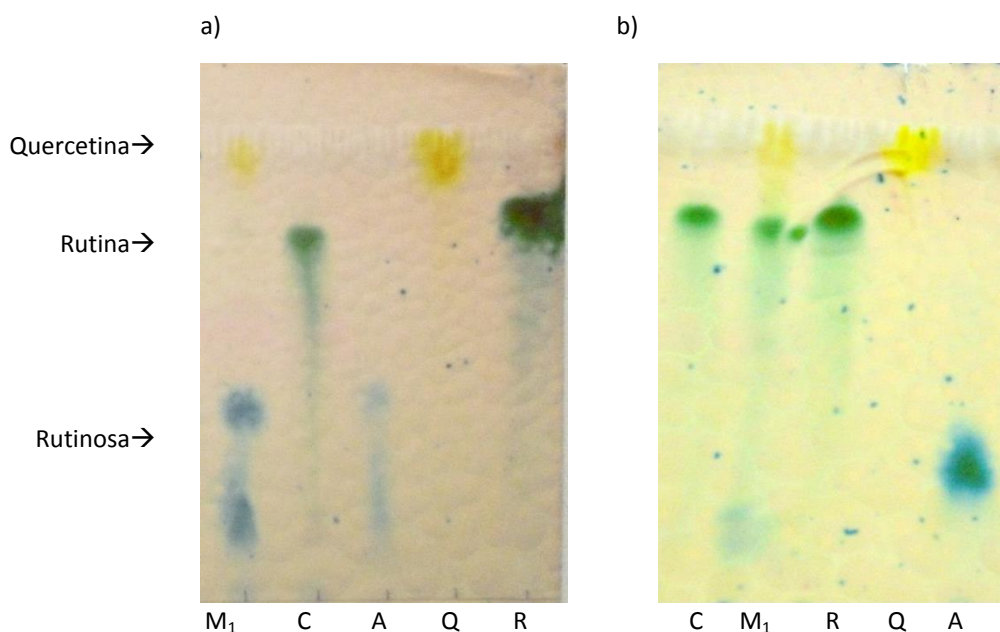


Figura 22: Productos de hidrólisis enzimática de rutina llevado a cabo por a) *Acremonium* sp. DSM 24697 b) *S. strictum* DMic 093557.

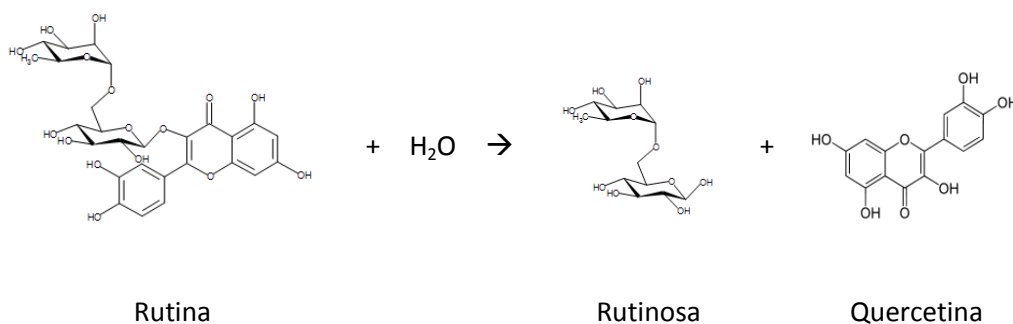


Figura 23: Esquema de hidrólisis enzimática de rutina en el enlace heterosídico.

3. 6-O- α -Ramnosil- β -glucosidasa II de *Acremonium* sp. DSM 24697.

Acremonium sp. DSM 24697 produce dos diglicosidasas, α R β G I y α R β G II. La primera es específica para flavonoides 7-O-rutinosilados y la segunda es activa sobre el flavonoide rutina, un flavonoide 3-O-rutinosilado. A fin de obtener extractos con actividad deglicosilante de rutina, *Acremonium* sp. DSM 24697 se cultivó en medio líquido y la presencia de actividad diglicosidasa se evaluó en el micelio (células enteras) y el sobrenadante. La actividad enzimática se encontró mayoritariamente unida al micelio fúngico (83%) durante todas las fases de crecimiento. La solubilización de la misma se abordó con varios detergentes (Triton X-100, Tween 20, Tween 80, Lauril sulfato de sodio) y su combinación con ultrasonido (Fig. 24). La actividad enzimática liberada se incrementó cinco veces, sin embargo la estabilidad de la misma fue baja. El uso del inhibidor de proteasas PMSF (0.2 mM) no mejoró la estabilidad de esta preparación. En este contexto, se decidió utilizar la fracción extracelular, que posee una fracción minoritaria de actividad desglicosilante del flavonoide rutina, para su purificación e identificación.

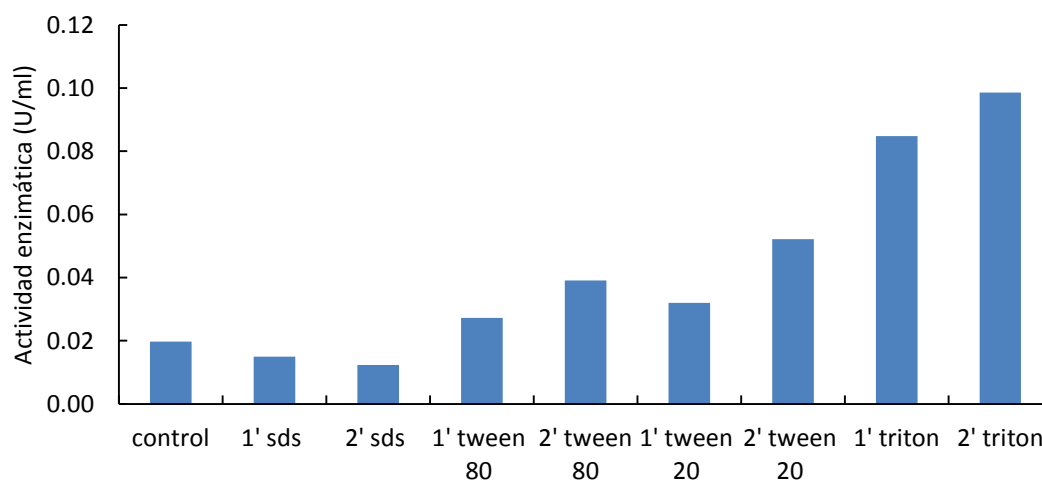


Figura 24: Actividad enzimática medida luego de la solubilización con varios detergentes (Triton X-100, Tween 20, Tween 80, Lauril sulfato de sodio) combinados con ultrasonido. 1' y 2' indican los minutos de sonicado.

El sobrenadante de *Acremonium* sp. DSM 24697 se sometió a dos pasos cromatográficos: intercambio iónico (QAE Shephadex) y cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-75) en FPLC. Los pigmentos presentes en el extracto crudo fueron removidos mayoritariamente durante la primera cromatografía de interacción iónica. Esta resina mantiene su carga positiva en un amplio rango de pH (2–12). A pH 5.0, sólo el 56% de la actividad enzimática se unió a QAE-sephadex, lo que nos indicó que la enzima poseía una red de cargas negativas a dicho

valor de pH. Las fracciones activas precipitaron con sulfato de amonio al 80% de saturación donde se recuperó el 85% de la actividad (Fig. 25). Cuando este precipitado se utilizó en una cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-75), la enzima fue purificada a homogeneidad (Fig. 26).

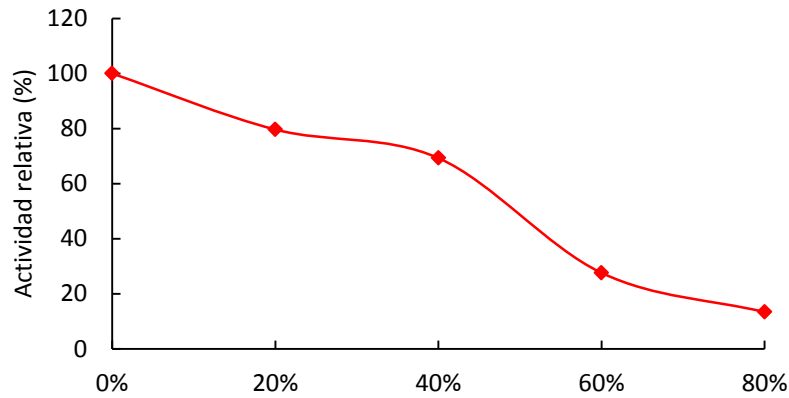


Figura 25: Actividad enzimática medida en el sobrenadante del cultivo de *Acremonium* sp. DSM 24697 luego de la precipitación con diferentes concentraciones de sulfato de amonio.

El conjunto de las fracciones activas presentaron un rendimiento del 1.1% de la carga inicial y un factor de purificación de 144 veces con una actividad específica de 0.28 U/mg (Tabla 4). El aumento de la concentración de proteínas en el segundo paso de purificación podría deberse a una interferencia del sulfato de amonio en el método de medición. La enzima se identificó con un peso molecular estimado por SDS-PAGE de ~ 85 kDa (Fig. 26).

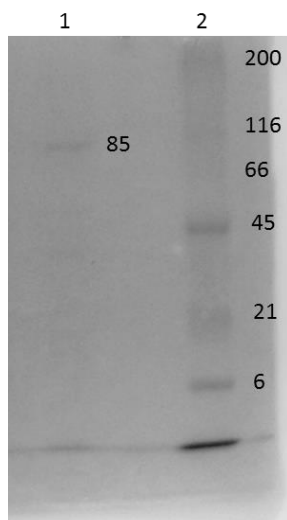


Figura 26: SDS-PAGE de la enzima $\alpha R\beta G$ II purificada de *Acremonium* sp. DSM 24697. Línea 1. Enzima purificada (ca. 85 kDa). Línea 2. Marcadores de peso molecular.

Tabla 4 Purificación de $\alpha\beta\text{G II}$ de *Acremonium* sp. DSM 24697

	Proteínas (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Factor Purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	32.1	19.1	0.002	1	100
Sephadex QAE	1.8	1.2	0.020	10.1	6
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	3.4	0.02	0.010	5.1	0.1
Sephadex G-75	0.1	0.2	0.287	144.7	1.1

El perfil de actividad de la enzima $\alpha\beta\text{G II}$ a diferentes valores de pH se evaluó a 50°C con el sustrato rutina. La máxima actividad se observó a pH 5.0; con 60% de su actividad máxima en el rango de pH 5.0–8.0 (Fig. 27). El valor óptimo de pH está dentro del rango de valores descrito para glicosidasas de origen fúngico (pH 3.0–7.0). Por ejemplo, las actividades enzimáticas de $\alpha\beta\text{G I}$ de *Acremonium* sp. DSM 24697 y β -rutinosidasa de *A. niger* fueron máximas a pH 5 y 3, respectivamente (Tabla 5) (Mazzaferro et al., 2010; Simcikova et al., 2014).

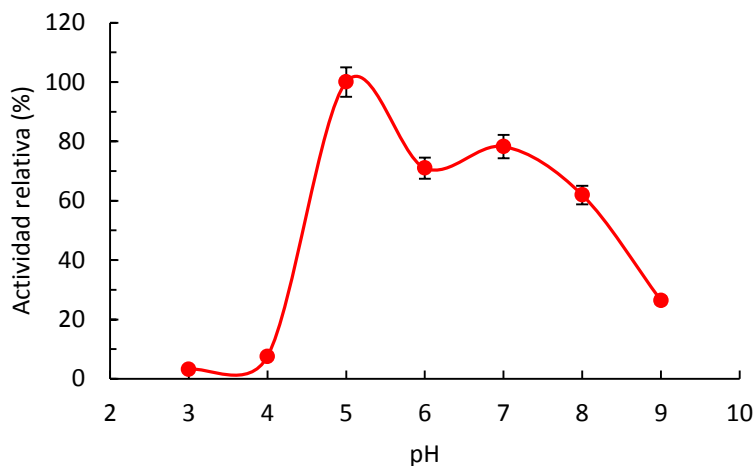


Figura 27: Perfil de actividad de la enzima en función del pH. El 100% de actividad corresponde a 6.9 U/l.

La temperatura óptima aparente fue de 50°C (1 h, pH 5), el 65% de la actividad se mantuvo hasta los 60°C, mientras que a 80°C no se detectó actividad. Cuando el extracto fue incubado a diferentes temperaturas en ausencia de sustrato, la actividad residual decreció abruptamente desde los 50°C (Fig. 28). La temperatura óptima coincide con la de las diglicosidasas producidas por *P. rugulosum* y *A. niger* (Tabla 5).

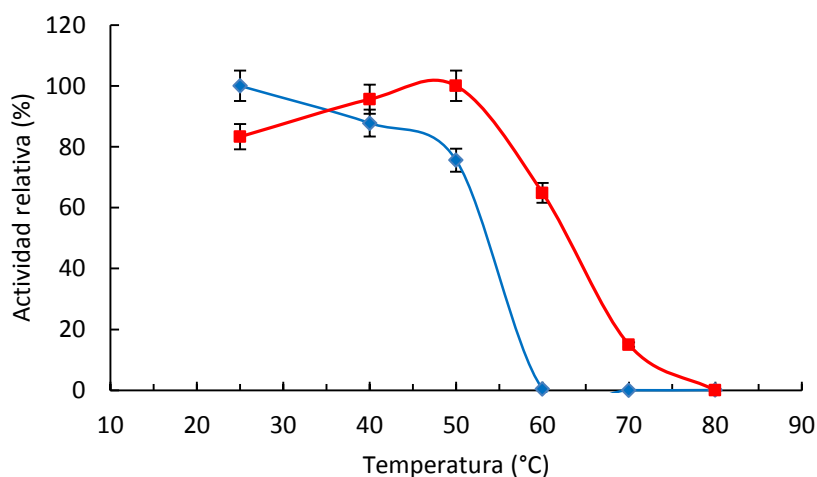


Figura 28: Efecto de la temperatura sobre (■) la actividad y (●) la estabilidad operacional de α R β G II. La actividad residual se determinó después de 30 min de incubación a cada temperatura. 100% de actividad corresponde a 4.6 U/l.

Tabla 5. Características de diglicosidasas fúngicas

Enzima	Origen	pH	MM (kDa)	T (°C)	Referencia
β -primeverosidasa	<i>P. multicolor</i>	5	75	45	Tsuruhami et al., 2005
β -rutinosidasa	<i>A. niger</i>	3	75	50	Simcikova et al., 2015
α -ramnosil- β -glucosidasa I	<i>Acremonium</i> sp. DSM24697	5	46	70	Mazzaferro et al., 2010
α -ramnosil- β -glucosidasa II	<i>Acremonium</i> sp. DSM24697	5	85	50	Weiz et al., 2018
α -ramnosil- β -glucosidasa	<i>A. oryzae</i>	4	65-75	45	Ishikawa et al., 2018
β -rutinosidasa	<i>P. rugulosum</i>	2.2	65	50	Narikawa et al., 2000

3.1 Especificidad de sustrato de α R β G II

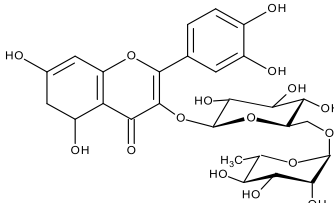
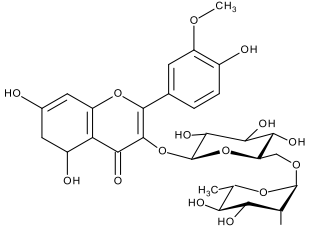
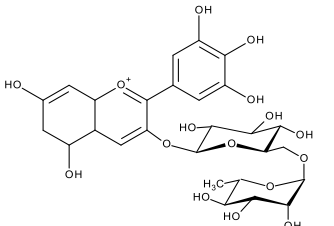
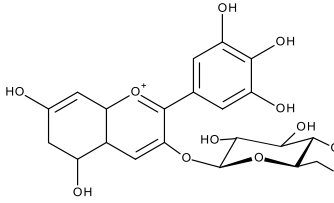
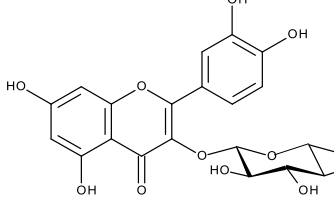
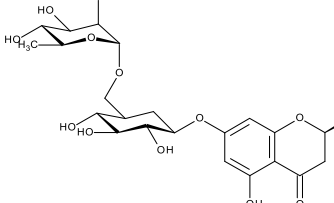
Las enzimas generalmente han evolucionado para catalizar una reacción, o una clase particular de reacciones, y el nivel de especificidad dependerá de la función de cada enzima en particular. En algunos casos, las enzimas actúan en una amplia gama de sustratos, por ejemplo, en la degradación de xenobióticos. En otros casos, las enzimas poseen una alta especificidad, tal es el caso de muchas enzimas biosintéticas. Para caracterizar la especificidad de sustrato de α R β G II se ensayaron sustratos artificiales, flavonoides y polisacáridos (Tabla 6). Las actividades más altas se obtuvieron con flavonoides β -rutinosilados (hesperidina, rutina, narcisina y

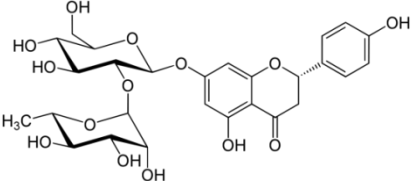
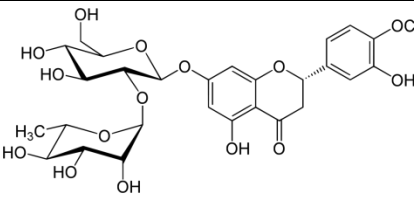
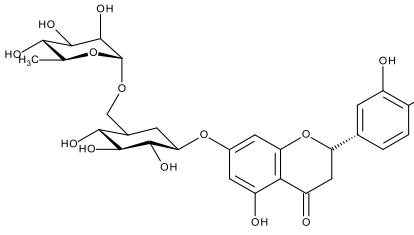
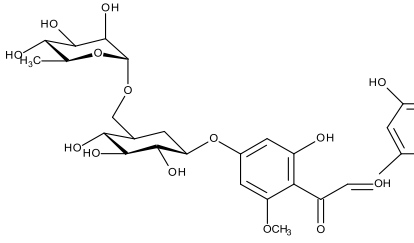
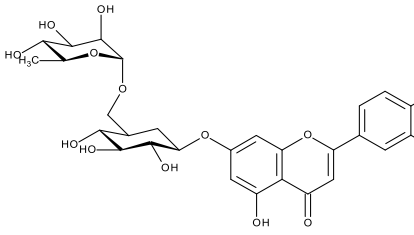
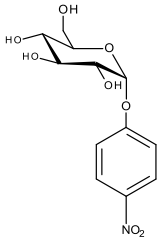
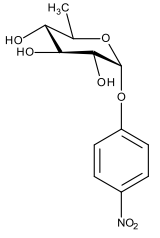
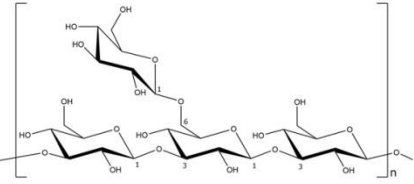
delfinidina), sin encontrar un patrón de distinción respecto de la posición del disacárido entre los 3-*O*- y el 7-*O*-rutinosil flavonoide, hesperidina. Los flavonoides β -rutinosilados hesperidin-metilchalcona y narirutina también fueron hidrolizados, pero en menor extensión, mientras que la enzima no mostró actividad con diosmina (Tabla 6). Con respecto a los sustratos monoglicosilados artificiales *p*-nitrofenil-glucósido y *p*-nitrofenil-ramnósido el catalizador no fue capaz de liberar el residuo glicosídico.

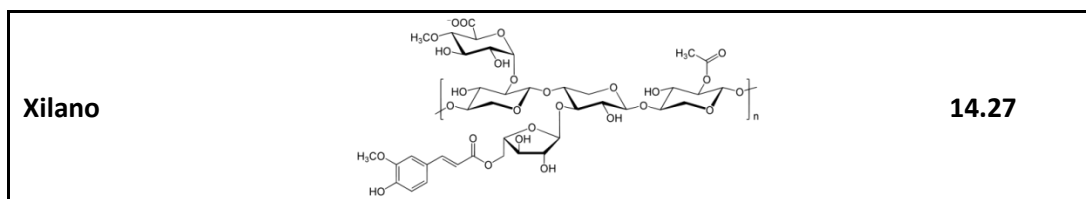
La especificidad de las glicosidasas puede describirse en función de los así llamados subsitios de unión. La nomenclatura que se utiliza es de $-n$ a $+n$, siendo “cero” el sitio de hidrólisis. Por ejemplo, para rutina el subsitio -1 corresponde a glucosa, el subsitio -2 a ramnosa y el subsitio +1 a la aglicona quercetina. La diferencia estructural entre los sustratos monoglicosilados mirtillina e isoquercetina, con delfinidina y rutina respectivamente, es la ausencia de ramnosa. El efecto de este monómero (subsitio -2) en la proteína, fue preponderante. La actividad de $\alpha\text{R}\beta\text{G II}$ con isoquercetina fue el 20% respecto de rutina y, en el mismo sentido, el sustrato delfinidina alcanzó niveles de actividad $>90\%$, en contraste con la actividad no detectada de su contraparte monoglicosilada mirtillina (Tabla 6). Estos resultados confirman la importancia del residuo de ramnosa para la catálisis, y la diferencia de $\alpha\text{R}\beta\text{G II}$ con las β -glucosidasas.

Frente a los flavonoides naringina y neohesperidina la actividad detectada fue baja. A diferencia del resto de los flavonoides utilizados como sustratos, naringina y neohesperidina contienen en su estructura el disacárido neohesperidosa. La neohesperidosa, al igual que el disacárido rutinosa, está compuesto por los monómeros α -ramnosa y β -glucosa pero unidos mediante un enlace $1\rightarrow 2$. Como se mencionó anteriormente (Capítulo 1), el término “naringinasa” usado comercialmente, y habitualmente encontrado en la literatura, se refiere a un complejo multienzimático que contiene al menos dos monoglicosidasas: α -ramnosidasa y β -glucosidasa. Por otro lado, se detectó un bajo porcentaje de azúcares reductores liberados desde los polisacáridos xilano y laminarina (Tabla 6). Laminarina es un polisacárido de reserva formado por unidades de glucosa unidas mediante enlaces glicosídicos $\beta(1\rightarrow 3)$ y $\beta(1\rightarrow 6)$ en una proporción 3:1 y el xilano es un polisacárido constituido por una cadena lineal de residuos de β -1,4-D-xilopiranososa con ramificaciones. Estos resultados indican que $\alpha\text{R}\beta\text{G II}$ es un catalizador promiscuo, al poder reconocer residuos disacarídicos y agliconas diferentes, distintas uniones entre ellos, y también polisacáridos.

Tabla 6 Especificidad de sustrato de 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa II de *Acremonium* sp. DSM 24697.

FLAVONOIDE	ESTRUCTURA	ACTIVIDAD RELATIVA
Rutina (3-O-rutinósido)		100
Narcisina (3-O-rutinósido)		97.4
Delfinidina (3-O-rutinósido)		95.7
Mirtillina (3-O-glucósido)		ND
Isoquercetina (3-O-glucósido)		21.2
Narirutina (7-O-rutinósido)		18.4

<p>Naringina (7-O-neohesperidósido)</p>		<p>14.5</p>
<p>Neohesperidina (7-O-neohesperidósido)</p>		<p>17.2</p>
<p>Hesperidina (7-O-rutinósido)</p>		<p>100</p>
<p>Hesperidin- metilchalcona (7-O-rutinósido)</p>		<p>34.5</p>
<p>Diosmina (7-O-rutinósido)</p>		<p>ND</p>
<p>p-NPGlu</p>		<p>ND</p>
<p>p-NPRam</p>		<p>ND</p>
<p>Laminarina</p>		<p>18.4</p>



Las 6-*O*- α -ramnosil- β -glucosidasas de *Acremonium* sp. DSM 24697 y *A. missouriensis* descritas previamente en nuestro laboratorio, son activas sobre los sustratos 7-*O*-rutinosilados hesperidina y hesperidin metilchalcona. Sin embargo no mostraron actividad detectable con rutina. (Mazzaferro et al., 2010; Neher et al., 2016). La β -rutinosidasa producida por la archaea *P. furiosus* si bien es activa sobre rutina, su actividad es 15000 veces mayor para con los sustratos monoglicosilados, por lo tanto la podemos definir como una β -glucosidasa “promiscua” más que como una diglicosidasa (Nam et al., 2012). Una β -rutinosidasa de *P. rugulosum* reconoce con especificidad similar los sustratos 3-*O*- mono y diglicosilados isoquercetina y rutina; mientras que no posee actividad sobre el sustrato 7-*O*-rutinosilado hesperidina (Narikawa et al., 2000). La β -rutinosidasa de *A. niger* hidroliza ambos flavonoides (rutina y hesperidina), siendo su actividad con rutina 10 veces superior a la de hesperidina. Recientemente se describió una β -rutinosidasa de *A. oryzae* activa sobre los flavonoides kampferol-3-*O*-rutinósido, rutina y hesperidina; siendo el K_M para rutina dos veces menor que para hesperidina. En resumen, las β -rutinosidasas del género *Aspergillus* y la α R β G II de *Acremonium* sp. DMS 24697 son las enzimas fúngicas capaces de hidrolizar ambos flavonoides, rutina y hesperidina. En este contexto, podemos decir que la regioselectividad y la especificidad del subsitio +1 es un tema controversial. Por un lado existen glicosidasas con reconocimiento de la aglicona, por ejemplo, la β -rutinosidasa de *P. rugulosum*, la cual fue capaz de hidrolizar rutina e isoquercetina pero no otros sustratos como *p*-nitrofenil- β -glucósido o celobiosa (Narikawa et al., 2000). Por otro lado, las β -rutinosidasas de *Aspergillus* y α R β G II son capaces de reconocer e hidrolizar diversos flavonoides 3-*O*- y 7-*O*- rutinosilados. La diferencia del catalizador de *Acremonium* respecto de los de *Aspergillus* radica en que el primero muestra una especificidad similar para ambos flavonoides, mientras que los de *Aspergillus* son más activos sobre rutina. Esta diferencia en la especificidad de reacción podría estar relacionada a la pertenencia a diferentes familias de glicósido hidrolasas.

La capacidad de α R β G II de reconocer e hidrolizar los flavonoides naringina y neohesperidina, y polisacáridos (xilanos y laminarina), indican una mayor promiscuidad del catalizador respecto a las diglicosidasas descritas. Laminarina no fue sustrato de las

6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa de *A. missouriensis*, *A. oryzae* y α R β G I de *Acremonium* sp. DSM 24697. A diferencia de éstas, α R β G II presentó ca. 18 % de la actividad encontrada con rutina (Tabla 6). Aún más remarcable es su actividad con los neohesperidósidos naringina y neohesperidina, ya que hasta el momento no se han descrito enzimas capaces de producir neohesperidosa a partir de estos sustratos. Si bien la actividad expresada con los sustratos neohesperidósidos es baja respecto de los rutinósidos, ésta permitiría hacer ensayos de evolución dirigida o mutagénesis sitio-dirigida para aumentar la eficiencia del catalizador sobre estos sustratos.

3.2 Análisis *in silico* de la enzima α R β G II

El secuenciado del genoma de *Acremonium* sp. DSM 24697 resultó en 1030 *contigs*. Éstos fueron reunidos en 355 *scaffolds* (≥ 0.3 kb; N_{50} , 235 kb), que representan un tamaño total de 26.9 Mbp. Es importante aclarar que la asignación de la especie en el género *Acremonium* o *Sarocladium* es una labor compleja incluso cuando se conoce la secuencia genómica (Giraldo et al., 2015). Así, debemos decir que aún no está definida la especie de este microorganismo por lo que lo seguiremos denominando *Acremonium* sp. DSM 24697. La predicción de los genes (y sus correspondientes intrones) se realizó con el servidor Augustus.

Por otro lado, la enzima purificada a homogeneidad (~ 85 kDa) se escindió desde un SDS-PAGE, se sometió a digestión tríptica y fue analizada por espectrometría de masas (MALDI-TOF). Los tres péptidos obtenidos a partir de la información de la huella peptídica (PMF *Peptide mass fingerprinting*) (TFNYAAGDLGIVPR, TVDFVIQR, DGQAPGYLPFTAADGS) se usaron para identificar el gen que codifica α R β G II (Fig. 29). La enzima es codificada por un gen de 2417 pb que contiene tres intrones. Según el análisis *in silico* de la secuencia codificante (2244 pb), la proteína está compuesta por 748 aminoácidos, con un péptido señal en su extremo N-terminal de 21 residuos. Su pI de 4.52 y una masa molecular de 82 KDa. Este último se corresponde con el resultado bioquímico obtenido previamente (Fig. 26).

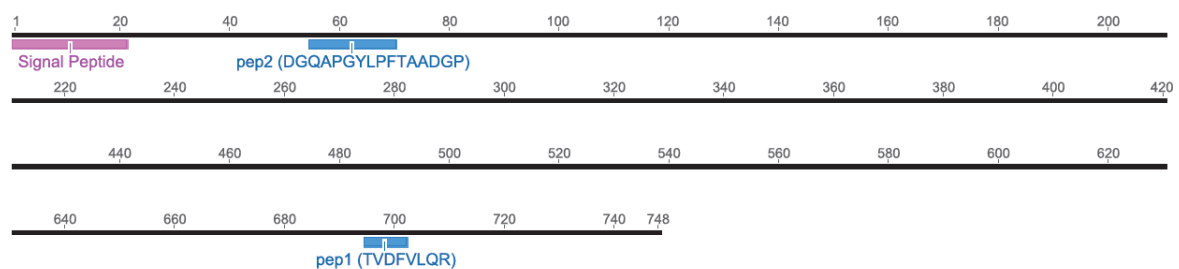


Figura 29: Análisis de la secuencia peptídica predicha y los fragmentos trípticos de α R β GII.

El análisis en BLASTP frente a proteínas no redundantes mostró la mayor semejanza con una proteína hipotética del hongo *Mycosphaerella eumusae* (KXS94026.1; 99% de cobertura, 60% de similitud). El resto de las secuencias de proteínas con alineamiento significativo también resultaron ser hipotéticas o putativas; mientras que el análisis frente a las proteínas con estructuras cristalinas determinadas (PDB) presentó la mayor similitud con una β -glucosidasa proveniente de *Hypocrea jecorina* (3ZYZ; 92% de cobertura, 37% de similitud). *H. jecorina* es el teleomorfo de *Trichoderma reesei*, un microorganismo importante respecto a su uso comercial-industrial por su capacidad de producción de celulasa (Karkehabadi et al., 2014).

3.3 Clonado y expresión heteróloga de 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa II

La producción de enzimas diglicosidasas que se alcanza en cepas silvestres es baja en comparación de otras glicosido hidrolasas (Mazzaferro et al., 2010, Zhou et al., 2012). Una alternativa para producir cantidades significativas es el clonado y sobre-expresión de estas proteínas. Con este objetivo, y considerando la presencia de 3 intrones, se purificó la fracción de RNAm, el cual se utilizó como *template* para la síntesis de ADN complementario (ADN_c) y con este material se amplificó el gen de α R β G II (~2.5 Kb) (Fig. 30).

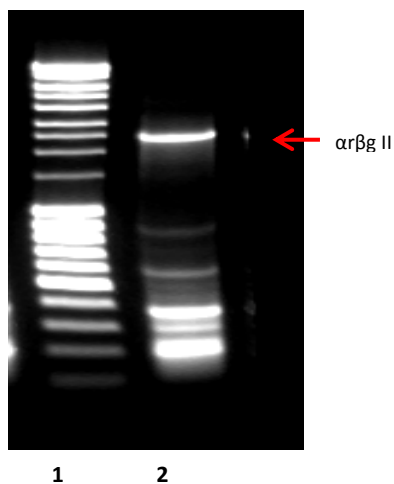


Figura 30: Gel de agarosa de los productos de PCR con *Pfu Ultra II* Línea 1 marcador de peso molecular (Thermo Scientific MassRuler DNA Ladder Mix), línea 2 producto de PCR gen de interés con péptido señal (~2.5 kpb).

La correcta ligación de estas secuencias al vector pGEM-T se testeó mediante una doble restricción con las enzimas *XhoI* y *NcoI*, con cuatro productos de acuerdo a los sitios de corte de las enzimas (Fig. 31). Además se sometieron a secuenciación para corroborar la secuencia y el correcto marco de lectura abierto. El crecimiento de las células *E. coli* TOP10 transformadas permitió la multiplicación de este plásmido, el cual se utilizó como ADN molde en la re-amplificación de la secuencia del gen de interés. El producto de PCR se purificó y se ligó a los vectores pET100/D-TOPO y pET101/D-TOPO los cuales permiten la expresión de proteínas

unidas a histidina en el extremo N-terminal y C-terminal respectivamente. Con dichos constructos se transformaron células BL21 (DE3) star para la expresión heteróloga de la enzima $\alpha\beta\text{G II}$. El análisis SDS-PAGE del sobrenadante del cultivo de *E. coli* presentó diversas bandas de proteínas, sin embargo los niveles de sobre-expresión de la proteína de interés fueron bajos. Cuando se evaluó la actividad enzimática del sobrenadante del cultivo no se detectaron productos de hidrólisis mediante TLC ni análisis zimográficos. La expresión de la enzima $\alpha\beta\text{G II}$ sin funcionalidad podría deberse a que *E. coli* como sistema de expresión procariota no presenta el procesamiento, el plegado y las modificaciones post-traduccionales de las proteínas.

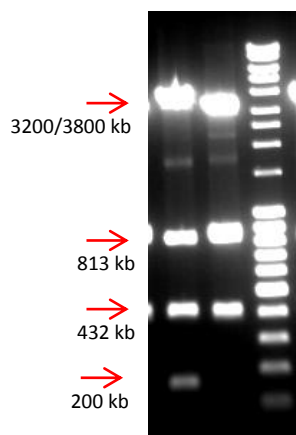


Figura 31: Gel de agarosa de los plásmidos digeridos con XhoI y NcoI. Líneas 1 y 2, productos obtenidos luego de la digestión proveniente de dos clones diferentes. Línea 3, marcador de peso molecular.

Para sortear este problema, se utilizó a continuación el huésped eucariota *P. pastoris*. El gen que codifica para $\alpha\beta\text{G II}$ sin el péptido señal fue amplificado por PCR y se ligó en el vector de expresión pPICZ α A *downstream* a la secuencia del factor α . Este constructo permitió la secreción de la proteína recombinante y funcional al medio extracelular. El análisis zimográfico del sobrenadante del cultivo de *P. pastoris* mostró actividad de hidrólisis frente al sustrato fluorogénico MUR (Fig. 32). Un sólo paso de purificación fue suficiente para obtener la enzima en aparente homogeneidad mediante cromatografía de exclusión molecular (Fig. 32). El peso molecular estimado mediante SDS-PAGE (~ 82 kDa) concuerda con la masa molecular predicha de 82 kDa (Fig. 32).

1 (Kda) 2 3

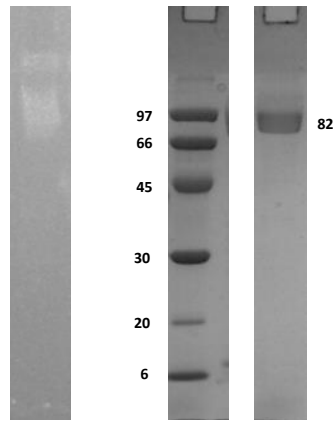


Figura 32: SDS-PAGE de la proteína recombinante 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa II producida en *P. pastoris*. Línea 1 Zimograma del sobrenadante del cultivo de *P. pastoris* revelado con el sustrato MUR. Línea 2 Marcador de peso molecular. Línea 3 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa II purificada.

La actividad de α R β G II recombinante utilizando rutina como sustrato, mostró una cinética de tipo Michaelis-Menten. Los valores de K_M y V_{max} fueron 0.13 mM y 11.7 s^{-1} respectivamente (Tabla 7, Fig. 33).

Tabla 7. Parámetros cinéticos de la enzima α R β G II

Sustrato	K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($mM^{-1}s^{-1}$)	K_i
Rutina	0.13 \pm 0.03	11.79 \pm 0.62	90.69	
Hesperidina	0.06 \pm 0.01	125.37 \pm 8.11	2089.50	0.98 \pm 0.15

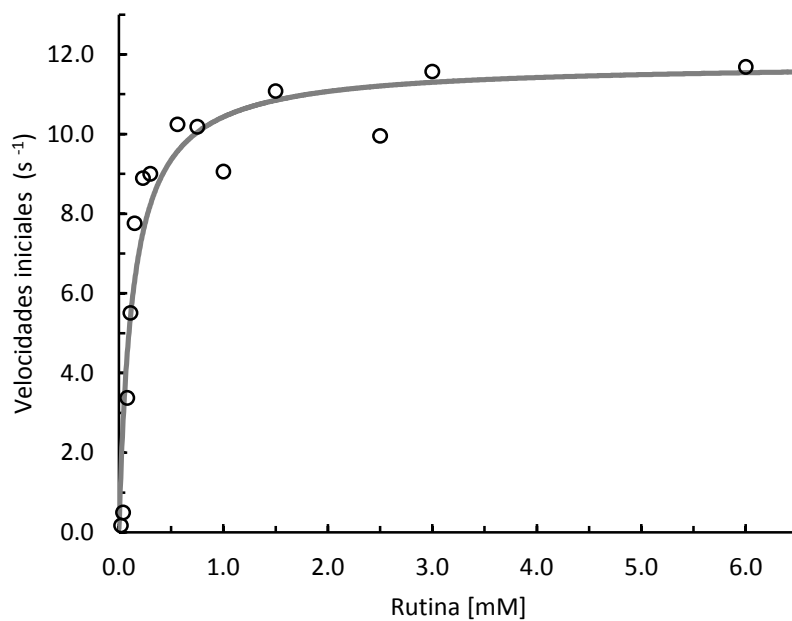


Figura 33: Cinética enzimática de α R β G II utilizando rutina como sustrato.

La especificidad de sustrato mostrada realizada con α R β G II *wild type* (Tabla 6), es decir producida por *Acremonium* sp. DSM 24697, presentó una equidad entre los sustratos hesperidina y rutina. Por otro lado, el catalizador recombinante (α R β G II) que se utilizó para hacer la medición de los K_M (Tabla 7), mostró mayor afinidad por hesperidina respecto a rutina, y también respecto a la afinidad por hesperidina que posee el otro catalizador de este microorganismo (α R β G I, K_M 1.77 mM). Este último es el catalizador mayoritario que se libera al medio extracelular cuando *Acremonium* sp. DSM 24697 crece con hesperidina como fuente de carbono. α R β G I es específica para desglicosilar flavonoides 7-*O*-rutinosilados y no posee actividad detectable con rutina y otros flavonoides 3-*O*-rutinosilados. Por otro lado, cuando crece con rutina como fuente de carbono, el catalizador α R β G II permanece mayoritariamente unido al micelio del organismo durante todas las fases de crecimiento y una fracción minoritaria se libera al medio extracelular. Es importante resaltar que α R β G II posee mayor promiscuidad y a su vez mayor afinidad por los flavonoides que reconoce. Estos resultados sugieren que este microorganismo podría expresar sistemas enzimáticos de afinidad diferentes para optimizar su capacidad de adaptación según el ambiente: un sistema mayormente unido al soma microbiano con más afinidad con el fin de incrementar la eficiencia de captación de carbono; y/o un sistema que libera al medio extracelular con menor afinidad pero más robusto, en términos de estabilidad, que le pueda proveer carbono a la distancia.

3.4 Análisis filogenético

La clasificación de las glicosido hidrolasas en familias en base a sus secuencias, además de poseer un potencial predictivo importante, demostró ser una herramienta eficaz para unificar la información sobre la estructura y el mecanismo de reacción (Wu et al., 2002). Dado que el mecanismo está gobernado por la orientación espacial de los residuos catalíticos en su estructura 3D, y ésta está dictada por la secuencia, el resultado estereoquímico de la reacción se conserva dentro de una familia de glicosido hidrolasa determinada (Rye & Withers, 2000). Sin embargo, la predicción funcional (especificidad de sustrato, tipo de acción endo o exo) sigue siendo limitada y por ello su confirmación se basa en las mediciones *in vitro* de las actividades enzimáticas.

Hasta el momento fueron descritas cuatro actividades diglicosidasas en vegetales: furcatin hidrolasa de *Viburnum furcatum* (Ahn et al. 2004), β -primeverosidasa de *Camellia sinensis* (Mizutani et al. 2002), vicianin hidrolasa de *Vicia angustifolia* (Ahn et al. 2008) y β -apiosil- β -glucosidasa de *Dalbergia nigrescens* (Chuankhayan et al., 2005). Las mismas se agrupan en un

mismo clado perteneciente a la familia uno de las glicósido hidrolasas (GH1) (Fig. 34). Las diglicosidasas de origen fúngico, β -primeverosidasa de *Penicillium multicolor* (Tsuruhami et al., 2011), β -rutinosidasa de *A. niger* (Šimčíková et al., 2014), β -rutinosidasa de *A. oryzae* (Ishikawa et al., 2018) y 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa de *Acremonium* sp. DSM 24697 (Mazzaferro et al., 2010) se agrupan en un clado diferente. Interesantemente, estas diglicosidasas junto a otras nueve enzimas fúngicas, fueron asignadas en la base de datos CAZy a la familia cinco (GH5), subfamilia 23 (Fig. 34) (Aspeborg et al., 2012). La diglicosidasa 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa de origen procariota producida por *Actinoplanes missouriensis* (Neher et al., 2015) se agrupó junto con las enzimas endo- β -1,3-glucanasa de *Arthrobacter* sp. NHB-10 (Okazaki et al., 2007) y exo- β -1,3-glucanasa de *Streptomyces* sp. (Bianchetti et al., 2015) en la familia GH55 (Fig. 34). También se describió una xylanasa de *A. oryzae* que libera residuos de isoprimeverosa desde xilooligosacaridos (Matsuzawa et al., 2016). Recientemente, Ishikawa et al. (2018) clasificaron a este catalizador como miembro de la familia GH3. Sin embargo, cuando realizamos el análisis filogenético encontramos que esta enzima se agrupa dentro de la familia GH1 alejada de las diglicosidasas GH1 de origen vegetal (Fig. 34). De acuerdo a los dominios conservados, la enzima α R β G II pertenece a la familia tres de las glicósido hidrolasas (GH3). El análisis filogenético de las proteínas fúngicas hipotéticas y de las β -glucosidasas cristalizadas con mayor similitud con α R β G II seleccionadas desde el análisis de BLAST (*H. jecorina*, *Rasamsonia emersonii*, *Thermotoga neapolitana* y *Kluyveromyces marxianus*) se agruparon dentro de la familia GH3 (Fig 34). La lista de actividades descritas para la familia GH3 [(β -glucosidasa (EC 3.2.1.21); xilano 1,4- β -xilosidasa (EC 3.2.1.37); β -glucosilceramidasa (EC 3.2.1.45); β -N-acetilhexosaminidasa (EC 3.2.1.52); α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55); glucano 1,3- β -glucosidasa (EC 3.2.1.58); glucano 1,4- β -glucosidasa (EC 3.2.1.74); isoprimeverosa oligoxiloglucano hidrolasa (EC 3.2.1.120); coniferina β -glucosidasa (EC 3.2.1.126); exo-1,3-1,4-glucanasa (EC 3.2.1.-); β -N-acetilglucosamino fosforilasa (EC 2.4.1.-)] no incluye glicosidasas que actúen en modo endo, excepto para la enzima que hidroliza xilo-oligosacáridos, EC 3.2.1.120. Sin embargo, cuando se analizó este catalizador (xylanasa de *A. oryzae*) presentó mayor similitud de secuencia con glicosidasas de la familia GH1 que con GH3, por lo tanto este fenómeno podría deberse a un error en la clasificación. La β -glucosidasa GH3 de *H. jecorina* es activa sobre celobiosa (K_M 0.35) y aunque presentó mayor afinidad por los oligómeros celotriosa y celotetraosa (K_M 0.035; K_M 0.036) el producto de hidrólisis fue glucosa desde el extremo no-reductor; por lo tanto, su clasificación como monoglicosidasa es correcta (Karkehabadi et al. 2014). Estos resultados nos sugieren que α R β G II es el primer catalizador de la familia GH3 que actúa en modo endo.

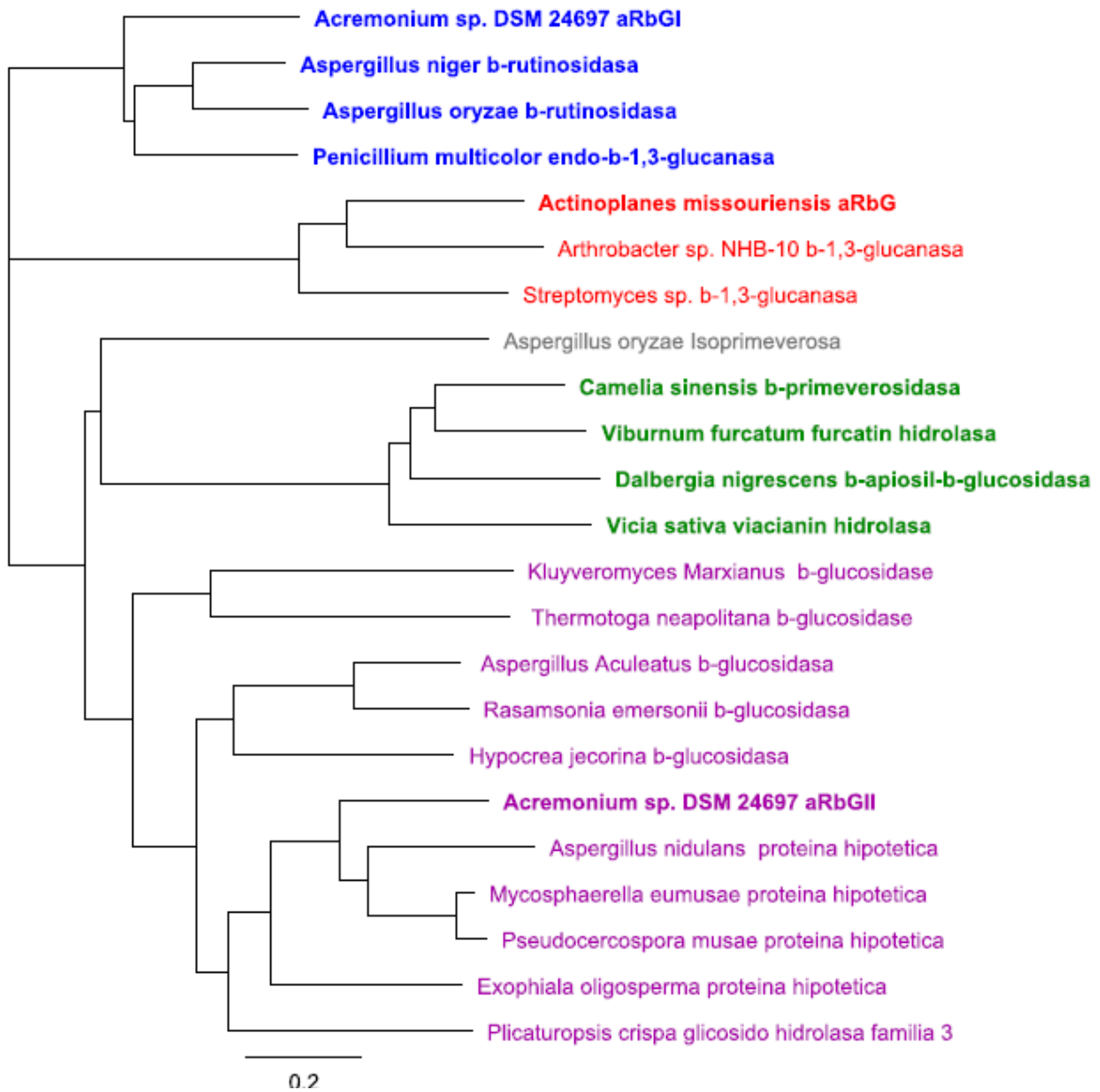


Figura 34: Árbol filogenético entre las diglicosidasas conocidas (en **negrita**), las β -glucosidasas cristalizadas y las glicosidasas fúngicas putativas con las mayores similitudes a la enzima α R β G II de *Acremonium* sp. DSM 24697. Los clados están coloreados de acuerdo a la clasificación de familias de CAZy: GH 5 (azul), GH55 (rojo), GH1 (gris y verde) y GH3 (violeta). La barra representa 0.2 sustituciones de aminoácidos por sitio. Los números de acceso desde arriba hacia abajo son los siguientes: KP972593.1, CAK39791, BAE61018.1, BAG70961.1, BAL86042, BAF52916.1, G2NFJ9, XP_001727857.1, BAC78656.1, BAD14925.1, A3RF67.1, ABD03937, 3ACO_A, 2X42, 4IIB_A, AAL69548.3, Q12715, (α R β G II), XP_661553.1, KXS94026, KXT18629.1, XP_016268161.1, KII94877.1.

El alineamiento de las secuencias de $\alpha\beta\text{G II}$ con las proteínas GH3 caracterizadas estructuralmente permitió reconocer la presencia de residuos conservados. Los resultados de este trabajo refuerzan la hipótesis de que el subsitio -1 tiene una composición conservada (Karkehabadi et al., 2014; Suzuki et al., 2013; Gudmundsson et al., 2016; Yoshida et al., 2010; Pozzo et al., 2010), siendo Asp 245, Glu 475, Asp 62, Arg 125, Lys 158 y His 159 los residuos involucrados en los enlaces puentes de hidrogeno con glucosa (Fig. 35). En el caso de $\alpha\beta\text{G II}$ estos residuos conservados ocupan las posiciones Asp 245, Glu 451, Asp 47, Arg 111, Lys 144, y His 145, siendo Asp 245 y Glu 451 los residuos catalíticos.

	D 245	E 475	D 62	R 125	K 158-H 159
<i>A. aculeatus</i> β -glucosidasa	LAGLDMSM	VDGNEGDR	MCLQDS	DGGRNW	TAKHYIL
<i>R. emersonii</i> β -glucosidasa	LAGLDMSM	VDGNEGDR	LCMQDS	DAGRNV	CAKHFIL
<i>H. jecorina</i> β -glucosidasa	NSGLDMSN	VAGNEGDR	LCLQDG	QGGRNW	TAKHYIL
A. sp DSM 24697 $\alpha\text{R}\beta\text{GII}$	LGGLDWN T	AFS KE GAD	FTAADG	LGGRAY	CGKHFIA
<i>K. marxianus</i> β -glucosidasa	KNGLDIEF	AGTK ERTK	VRVSDG	LGGRGF	TVKHFVC
<i>T. neapolitana</i> β -glucosidasa	KAGNDLIM	RIS EGYD	FVLADG	LCGRNF	CIKHFVA
	(D 245)	(E 451)	(D 47)	(R 111)	(K 144-H 145)

Figura 35: Alineamiento de las secuencias de las glicosidasas cristalizadas pertenecientes a la familia GH 3 y $\alpha\text{R}\beta\text{G II}$. Solo se muestran segmentos de la secuencia alrededor de los residuos catalíticos conservados (rojo). La numeración refiere a la secuencia de la β -glucosidasa de *H. jecorina* (en **negrita**) y de $\alpha\text{R}\beta\text{G II}$ de *Acremonium* sp. DSM 24697 (en paréntesis).

Las proteínas cristalizadas que pertenecen a la familia GH3 (Fig. 35) presentaron aminoácidos conservados de reconocimiento del residuo de glucosa en su sitio activo. Si bien esto es lógico porque todas reconocen glucosa en el subsitio -1, también debemos considerar ciertas propiedades catalíticas de algunas de estas enzimas. Por ejemplo la enzima de *H. jecorina* está anotada como β -glucosidasa y, además, reconoce oligómeros como sustratos (Karkehabadi et al., 2014). Por este motivo es importante destacar la ausencia de proteínas caracterizadas bioquímicamente entre aquéllas de mayor similitud a $\alpha\text{R}\beta\text{G II}$. Dado que es la primer actividad diglicosidasas descrita dentro de la familia GH3, es probable que dichas proteínas aún sin caracterizar sean también diglicosidasas.

El porcentaje de similitud de secuencia que presenta $\alpha\text{R}\beta\text{G II}$ con la proteína cristalizada β -glucosidasa de *H. jecorina* (Karkehabadi et al., 2014) es mayor al 30%. Esto nos permitió realizar un modelado comparativo (i-Tasser) para estimar la estructura tridimensional de la proteína (Zhang, 2009; Roy et al., 2012; Yang & Zhang, 2015). $\alpha\text{R}\beta\text{G II}$ está conformada por veintitrés hélice alfa y 30 láminas beta (Fig. 36 a). El porcentaje de residuos hidrofóbicos

representa el 54% de la estructura (Fig. 36 b). Respecto a los dominios proteicos, $\alpha\text{R}\beta\text{G II}$ presenta 3 dominios. El dominio uno abarca los residuos 45-230, el dominio dos comprende los residuos 318-580 y el dominio tres, dominio de fibronectina tipo III, se compone de los residuos 640-709 (Fig. 37 a). Las β -glucosidasas de *H. jecorina*, *T. neapolitana* y *A. aculeatus* presentan tres dominios (Karkehabadi et al., 2014; Pozzo et al., 2010; Suzuki et al., 2013) mientras que la β -glucosidasa de *K. marxianus* incluye cuatro dominios (Yoshida et al., 2010). El residuo catalítico ácido glutámico (donor de protones), E 451 esta ubicado en el dominio dos, mientras que aceptor de protones, D 245 se encuentra en una región de loops (Fig. 37 a). La figura 37 b) representa los residuos conservados del subsitio -1. Si bien los residuos catalíticos se encuentran distantes (32 Å), dada la flexibilidad del loop donde se encuentra el aceptor de protones, este podría moverse para la catálisis.

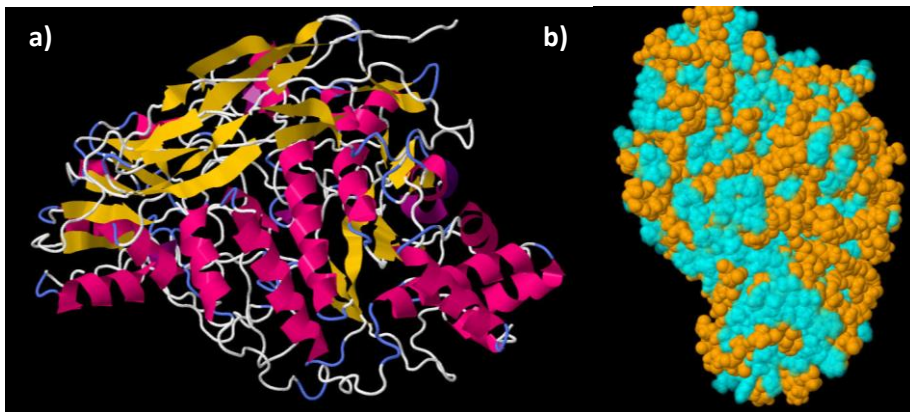
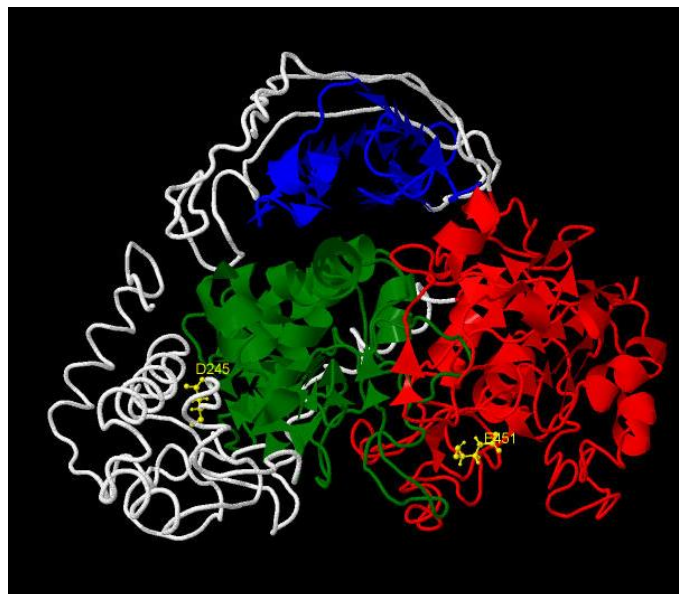


Figura 36: Representación esquemática de la estructura tridimensional de $\alpha\text{R}\beta\text{G II}$ a) estructura secundaria b) Residuos hidrofóbicos (cian).

a)



b)

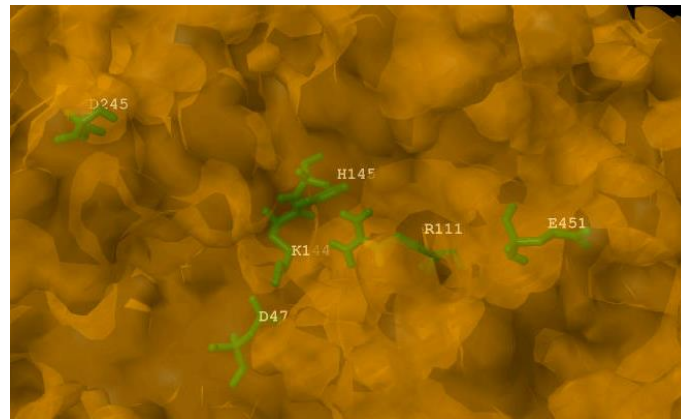


Figura 37: Identificación de los dominios Y sitio activo de $\alpha R\beta G$ II a) dominio uno (verde), dominio dos (rojo) y dominio tres (azul) y residuos catalíticos ácidos glutámico (E 451) y aspártico (D 245) (amarillo) b) residuos catalíticos Y residuos conservados del subsitio -1 (verde).

3.5 Función fisiológica de $\alpha R\beta G$ II

En hongos, los genes correspondientes a una determinada vía metabólica suelen estar agrupados en clusters. Si bien este fenómeno es más frecuente en vías anabólicas, por ejemplo, en síntesis de metabolitos secundarios, también suele ocurrir en vías catabólicas (Keller et al., 2005; Mazzaferro et al., 2015; Kappel et al., 2016; Kuivanen et al., 2017). Por ello, analizamos los genes cercanos a $\alpha R\beta G$ II, en búsqueda de otros genes que puedan estar relacionados funcionalmente. Además de genes *housekeeping*, tales como U3 (proteína nucleolar asociada al ARN), Frag 1 (Superfamilia), una proteína ribosomal, una nucleoporina, y una proteína CUE (*coupling of ubiquitin to ER degradation*), encontramos GH de las familias 16 y 1, como así también una glicosiltransferasa (Fig. 38). De acuerdo a la función de estos genes, los mismos estarían formando parte de un consorcio de proteínas para la degradación de carbohidratos. Por otro lado, el análisis de los genes vecinos a $\alpha R\beta G$ I demuestra que los genes que conforman el cluster estarían involucrados en la degradación de la aglicona hesperetina (Mazzaferro, Müller, Breccia, comunicación personal).



Figura 38: Análisis de los genes cercanos a $\alpha R\beta G$ II.

Estos resultados podrían vincularse a los de especificidad de sustrato de cada una de las enzimas (sección 3.1). Por un lado α R β G I, un catalizador específico para flavonoides 7-O-rutinosilados, formando parte de un cluster con genes vecinos que estarían involucrados en la degradación de los mismos. Por otro lado, α R β G II presenta mayor promiscuidad de sustrato respecto a las diglicosidasas descritas y genes vecinos involucrados en la degradación de carbohidratos. Estas características podrían relacionarse a la adaptabilidad a diversas fuentes de carbono.

3.6 Aplicaciones: Síntesis de diglicósidos

La exploración de la capacidad de transglicosilación de una glicosidasa promiscua de la familia GH3, la cual posee mecanismo *retaining*, abre las puertas para la síntesis de nuevos compuestos utilizando aceptores y donores diversos. Se estudió la transglicosilación con α R β G II hacia distintos aceptores hidroxilados utilizando rutina como donador de rutinosa. Se seleccionaron como aceptores alcoholes alifáticos (metanol, etanol, isopropanol, butanol y alcohol isoamílico), alcoholes primarios insaturados (nerol y geraniol), compuestos que contienen oxidrilos fenólicos (hidroquinona, 4-metilumbeliferona), el alcohol 2-fenetiletanol y el alcohol terciario linalol. El análisis semicuantitativo de las cromatografías en capa delgada se realizó con el programa de procesamiento de imagen digital ImageJ, desarrollado en el National Institutes of Health. Se encontró la mayor densidad relativa con el aceptor alifático butanol, la cual fue asociada a la mayor eficiencia de transglicosilación otorgándole un valor de 1. En base a este valor, el orden de especificidad de los aceptores es: butanol, alcohol isoamílico, etanol y metanol (Fig. 39), a diferencia de α R β G I, que mostró los mayores rendimientos con los alcoholes de cadena corta (metanol y etanol) (Mazzaferro et al., 2010). El rendimiento del producto de transglicosilación obtenido con el alcohol secundario isopropanol fue 11 veces menor que el obtenido con butanol. También se detectaron productos de síntesis utilizando como aceptores alcoholes primarios insaturados como nerol, geraniol y el 2-fenetiletanol, con rendimientos 10 y 5 veces menores, respectivamente (Fig. 39). Por lo tanto, la enzima α R β G II catalizó la transglicosilación de los compuestos que presentan OH- en carbonos primarios y secundarios, obteniéndose los mayores rendimientos con alcoholes primarios saturados de cadena corta (1-4). La síntesis de estos compuestos rutinosilados fue confirmada por LC-DAD/MS.

Respecto a los alcoholes terciarios, α R β G II no fue capaz de glicosilar linalool. Estos resultados se condicen con el comportamiento de la mayoría de las glicosidasas descritas, las cuales no aceptan alcoholes impedidos estéricamente (Simerska et al., 2006). Con respecto a los

compuestos fenólicos, la enzima fue capaz de transglucosilar 4-metilumbeliferona, mientras que no se detectó la rutinosilación de hidroquinona. La modificación de las distintas variables del sistema para cada aceptor en particular podría dar lugar a la síntesis de su derivado glicosilado. Los compuestos fenólicos ácido vanílico, ácido sinápico, ácido ferúlico, y ácido cafeico fueron glicosilados por una rutinosidasa proveniente de trigo sarraceno mediante transglucosilación con rutina como donador glicosídico (Katayama et al., 2013). En la figura 40 puede observarse la capacidad de $\alpha\beta\text{G II}$ para transglucosilar un oxidrilo fenólico cuando se utilizó como aceptor 4-metilumbeliferona. Este compuesto es utilizado como sustrato fluorogénico para el screening de actividad 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa mediante zimogramas (Mazzaferro et al., 2012). Se ha descrito la glicosilación de alcoholes primarios y secundarios utilizando glicosido hidrolasas (Minig et al., 2011; Martearena, 2007; van Rantwijk et al, 1999; Šimčíková et al., 2015), mientras que la glicosilación de compuestos fenólicos es menos frecuente (Mena-Arizmendi et al., 2011; Mazzaferro et al., 2012; De Winter et al., 2013). Dentro de este contexto, se presenta el siguiente orden de rendimiento en la transglucosilación: alcoholes primarios>secundarios>fenoles y los alcoholes terciarios por lo general son no reactivos.

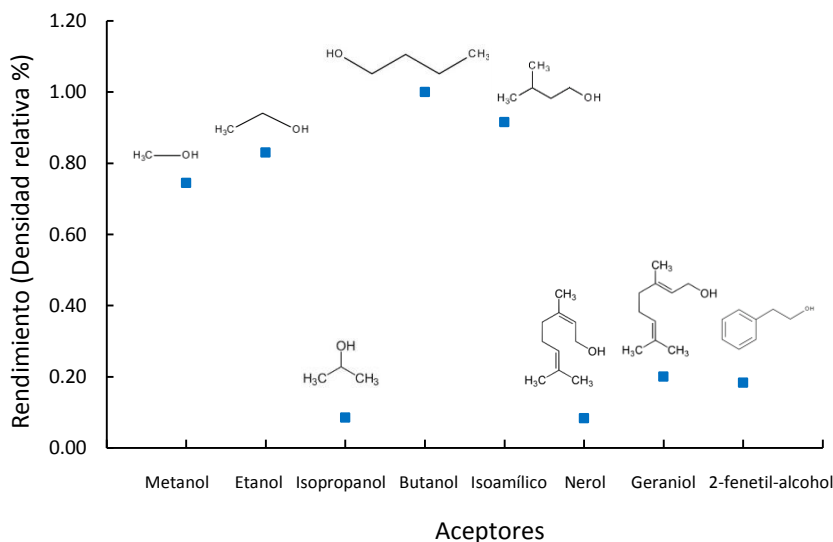


Figura 39: Semicuantificación de la reacción de transglucosilación de $\alpha\beta\text{G II}$ de *Acremonium* sp. DSM 24697 con rutina como donador de rutinosa y distintos aceptores hidroxilados.

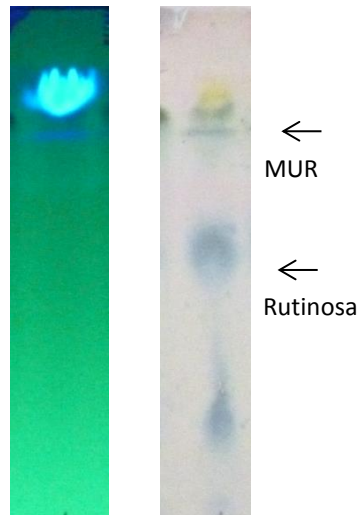


Figura 40: Transglicosilación de rutinosa desde rutina a 4-metilumbeliferona.

La capacidad de transglicosilación de α R β G II frente a los terpenos precursores de aromas en alimentos –genariol, nerol y 2-fenetiletanol– resulta promisorio para la síntesis de compuestos con potencial aplicación industrial. Por otro lado, la rutinosisilación de compuestos fenólicos posee interés farmacológico atribuido a la presencia del residuo de ramnosa en posición terminal (Robinson et al., 2004). Si consideramos que la resorción de rutinósidos ocurre sólo en el intestino delgado por la acción de la microflora intestinal humana que produce principalmente α -L-ramnosidasas y β -D-glucosidasas; los glicoconjugados que contienen rutinosa son resistentes a la hidrólisis en los tejidos humanos debido a la ausencia de α -L-ramnosidasas en mamíferos (Knaup et al., 2007). Por lo tanto, la síntesis de rutinósidos puede ser pensada como una forma de direccionamiento de drogas en una terapia inyectable.

4. Ingeniería de medio de reacción. Un caso de estudio con solventes altamente eutécticos (DES).

La desglicosilación de flavonoides representa un paso necesario en la tecnología de los alimentos para reducir el sabor amargo y clarificar los jugos de frutas (Minig et al., 2011). Así mismo, varios artículos han descrito actividades biológicas para diversas flavanonas (Benavente-García et al., 1997; Di Majo et al., 2005). Particularmente la hesperetina presenta propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antioxidantes (Fig. 41). Además, puede utilizarse como elemento constitutivo para la producción de colorantes y edulcorantes (Di Majo et al., 2005). A pesar de su importancia, se han relevado hasta la fecha sólo unos pocos bioprocesos de hidrólisis de hesperidina para producir hesperetina (Scaroni et al., 2002; Mandalari et al., 2006). La mayoría de estos procesos son llevados a cabo mediante dos etapas secuenciales catalizadas por α -L-ramnosidasa (EC 3.2.1.40) y β -D-glucosidasa (EC 3.2.1.21), liberando ramnosa y glucosa, respectivamente. La diglicosidasa α R β G I es una glicoproteína de *Acremonium* sp. DSM 24697 que ha sido estudiada exhaustivamente en nuestro laboratorio (Mazzaferro et al., 2010; Minig et al., 2011; Piñuel et al., 2011; Mazzaferro et al., 2011). Esta permite la hidrólisis de hesperidina y la transglicosilación de unidades de rutinosa utilizando los flavonoides 7-O-rutinosilados como donador de rutinosa. Como se detalló en la sección 3.1, hesperidina también es sustrato de la enzima α R β G II. Sin embargo, es importante aclarar que la mayoría de los experimentos realizados en este capítulo se llevaron a cabo con la enzima α R β G I porque al momento de su realización el conocimiento acerca del funcionamiento integral de esta última era mayor.

En este trabajo estudiamos la desglicosilación en medios no convencionales, particularmente los solventes altamente eutécticos (DES), de los flavonoides hesperidina y rutina usando α R β G I y α R β G II, respectivamente.

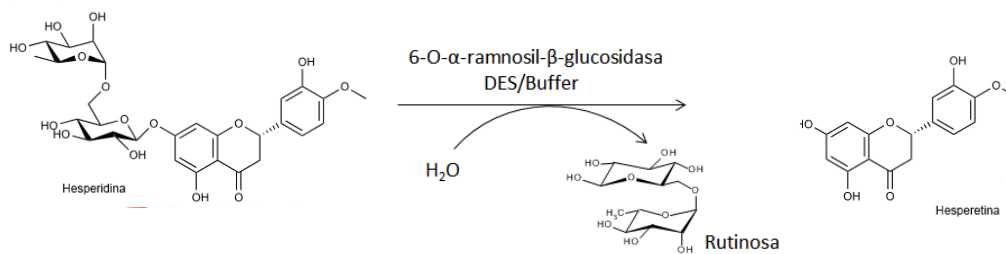


Figura 41: Desglicosilación de hesperidina en una única reacción catalizada por la enzima 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa I.

4.1 Síntesis y caracterización de los solventes altamente eutécticos (DES)

Se sintetizaron diferentes DES con una relación molar 1:2 del catión colina y los aniones urea, etilenglicol y glicerol (Maugeri et al., 2013). Para la síntesis del solvente colina:urea, se agitó la mezcla durante 1 h a 90 °C para romper los fuertes enlaces que mantienen a estas sustancias en estado sólido y de esa forma generar puentes hidrógeno, de tal manera que el DES formado es líquido y permanece en este estado a temperatura ambiente. En el caso de los DES formados por colina:etilenglicol y colina:glicerol, los polialcoholes que conforman el anión se encuentran en estado líquido a temperatura ambiente porque sus fuerzas cohesivas son más débiles que las de urea. Por lo tanto, el tiempo de agitación y las temperaturas utilizadas fueron menores, 1 min y 30 min a 80°C y 70°C respectivamente.

La capacidad de los DES de mantenerse como un líquido a temperatura ambiente se debe a que son sales formadas por iones de gran tamaño y asimétricos, por lo que las fuerzas atractivas catión-anión son más débiles que las fuerzas que intervienen en las sales iónicas convencionales (sales fundidas). A partir de dos iones poco uniformes y uno de ellos, el catión orgánico, asimétrico no puede lograrse un empaquetamiento que dé lugar a una estructura compacta. Basta un aporte energético para separar los aniones y los cationes que configuran el sólido y transformarlo en un líquido (Salvador Romero, 2008).

Para tener información acerca de las propiedades físicas y químicas de los DES diseñados y de los componentes individuales que los conforman se midió la conductividad eléctrica (Tabla 8) y se evaluó la miscibilidad de los DES en diferentes solventes para proporcionar información respecto a la interacción que pudieran tener con las enzimas y su influencia en las actividades de las mismas (Tabla 9).

Los componentes de los DES no presentan conductividad eléctrica, sin embargo las sales que se forman con colina mostraron conductividad (Tabla 8). El DES compuesto por colina:etilenglicol posee la mayor conductividad, por encima de sus pares colina: urea y colina: glicerol. Estos DES tienen menor conductividad que las disoluciones acuosas concentradas de electrolitos, lo que puede atribuirse a los grandes tamaños de los iones, que limitan la movilidad de las cargas (Boronat et al., 2010).

Tabla 8 Conductividad eléctrica de los distintos DES y sus componentes individuales. ND: no detectada.

DES	Conductividad ($\mu\Omega/\text{cm}$). 10^3
Glicerol	ND
Etilenglicol	ND
Colina:Glicerol	0.82
Colina: Urea	0.86
Colina:Etilenglicol	6

Dado que la polaridad es una propiedad físico-química que está directamente relacionada con la solubilidad, se evaluó la miscibilidad de los DES en diferentes solventes para proporcionar información respecto a la interacción que pudieran tener con las enzimas y su influencia en las actividades de las mismas (Tabla 9).

Tabla 9 Miscibilidad de los DES y sus constituyentes en diferentes solventes orgánicos. C:G: colina:glicerol, C:E: colina:etilenglicol, C:U: colina:urea. M: miscible, I: inmisible (formación de dos fases), I(P): precipitado.

Solvente	C:G	C:E	C:U	Glicerol	Etilenglicol	Urea	Colina
Agua	M	M	M	M	M	M	M
Etanol	M	M	M	M	M	I	M
Propanol	M	M	I	M	M	I (P)	I
Tolueno	M	I	M	I	I	I(P)	I
Acetona	I	I	I	I	M	I(P)	I
Hexano	I	I	I	I	I	I(P)	I
Acetato de Etilo	I	I	I	I	I	I(P)	I

La capacidad que tenga cada anión componente del DES de generar enlaces puente de hidrógeno con el solvente determina la solubilidad de éstos en diversos medios (Boronat et al., 2010). Los DES y sus componentes fueron miscibles en agua y etanol, mientras que en los solventes hexano y acetato de etilo ninguna especie fue soluble. Las conductas de miscibilidad e inmiscibilidad en los tres solventes restantes presentan una correlación compleja. En el caso del propanol, la inmiscibilidad de la urea justificaría el mismo comportamiento en el DES

colina:urea, mientras que la inmiscibilidad de los tres DES en acetona podría deberse a la inmiscibilidad de colina en este solvente. En el caso del tolueno, al ser un solvente de baja polaridad (momento dipolar 0.36 D), todos los componentes por separado son inmiscibles. Sin embargo los DES colina:glicerol y colina:urea son solubles. Esto se podría explicar por la capacidad de los electrones π del tolueno para formar puentes de hidrógeno de baja energía (-10 KJ/mol comparado con los puentes de hidrógeno clásicos de -30 KJ/mol) (Brinkley & Gupta, 2001). Mientras que la inmiscibilidad del DES colina:etilenglicol podría deberse a la elevada conductividad que presenta este DES (tabla 8).

4.2 Solubilidad de hesperidina y rutina en solventes altamente eutécticos

Dada la variedad disponible de aniones y de cationes para diseñar los DES, se pueden lograr combinaciones apropiadas para una determinada aplicación. Así, se dispone de un componente responsable del comportamiento químico (el catión), mientras que el anión aporta la mayor parte de las propiedades físicas (Salvador Romero, 2008). Los DES, por su naturaleza química, poseen la capacidad de solubilizar sustancias orgánicas e inorgánicas. Los flavonoides forman parte de los compuestos orgánicos de baja solubilidad en solventes polares que encuentran en los DES un medio capaz de solubilizarlos (Dai et al., 2012).

Rutina presenta baja solubilidad en agua (0.205 mM). En el DES colina:urea, rutina fue soluble a mayores concentraciones (82 mM). Para corroborar la hipótesis de que el aumento de la solubilidad del sustrato rutina, facilitaría la accesibilidad de la enzima al mismo, se midió la actividad enzimática en diferentes concentraciones de DES. El catalizador α R β G II, no mostró actividad en la solución formada íntegramente por los solventes altamente eutécticos de colina, incluso tampoco cuando la mezcla de reacción contenía 30% v/v de 50 mM buffer citrato de sodio. Estos resultados sugieren que la alta concentración de urea (Rossky, 2008; Scholtz et al., 1995) y la concentración de agua insuficiente produjeron un efecto deletéreo para el catalizador. Por otro lado, la solubilidad de hesperidina se evaluó en los DES de colina con glicerol, etilenglicol y urea. Si bien hesperidina presenta una baja solubilidad en agua (0.324 mM descrita por Mauludin & Müller, 2008) en los DES este flavonoide mostró una tendencia a ser más soluble que en los solventes constituyentes (Fig. 42). Por esta razón, se decidió evaluar el catalizador α R β G I sobre hesperidina (Mazzaferro et al., 2012)

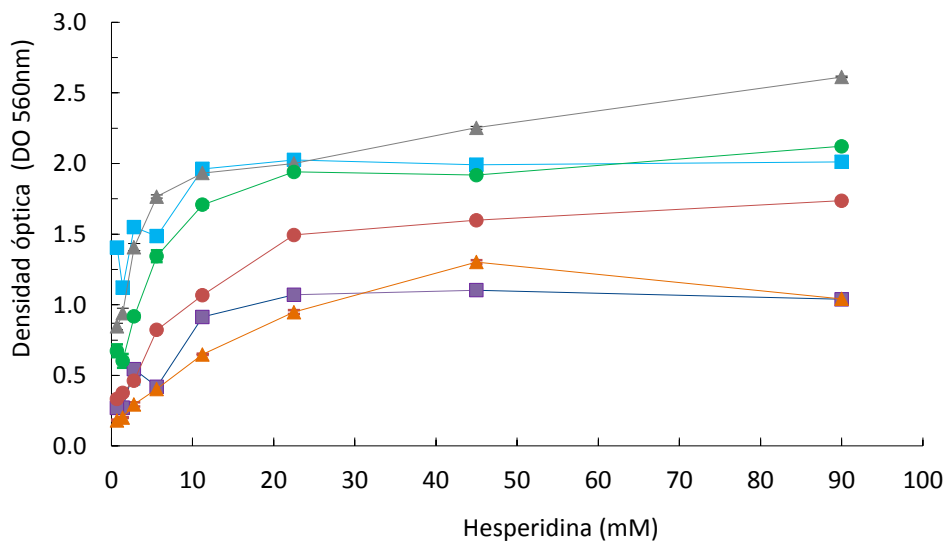


Figura 42: Densidad óptica de las soluciones-suspensiones de hesperidina en los diferentes solventes: (■) colina:glicerol; (▲) colina:urea; (●) colina:etilenglicol; (●) etilenglicol; (■) glicerol; (▲) agua.

4.3 6-O- α -Ramosil- β -glucosidasa I en solventes altamente eutécticos

En la caracterización de la enzima α R β G I, hesperidina fue descrito como el sustrato que presentó mayor afinidad. Si bien la solubilidad de hesperidina en agua es baja respecto a la chalcona de hesperidina (>300 mM) la afinidad por el sustrato insoluble fue cinco veces mayor (Mazzaferro et al., 2010). Una pregunta difícil de resolver, es saber si la velocidad de disolución del sustrato es lo suficientemente alta para no limitar la velocidad de la catálisis, o si es de hecho una catálisis heterogénea.

La actividad de la enzima en presencia de diferentes concentraciones de los DES de colina se muestra en la figura 43. Si bien en ningún caso este catalizador mostró actividad en la solución formada íntegramente por los solventes altamente eutécticos de colina, las diferencias encontradas en los perfiles de actividad claramente responden al anión utilizado. El catalizador deja de ser activo en concentraciones de DES >40, 60 y 80 %v/v para urea, etilenglicol y glicerol, respectivamente. La necesidad de un requerimiento mínimo o crítico de agua para mantener la estructura activa de las proteínas está demostrada (Hernández, 2008). Al igual que la enzima α R β G II el DES colina:urea fue deletéreo para este catalizador, sin poder detectar actividad en concentraciones mayores al 40% v/v del DES. Esto puede deberse a que la urea es un conocido agente desnaturizante de proteínas y que la alta concentración

de la misma en el DES induciría el desplegamiento del catalizador (Maugeri et al., 2013, Lindberget et al., 2010).

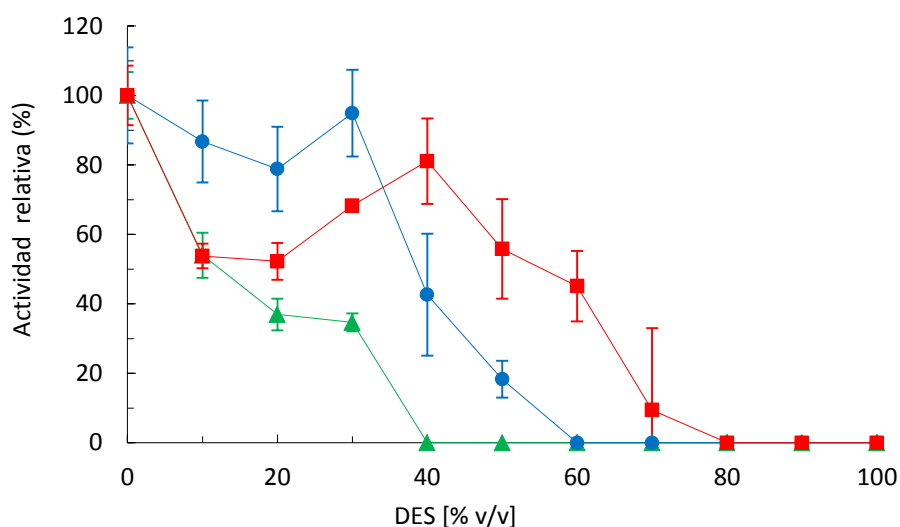


Figura 43: Efecto de la concentración de los DES sobre la actividad 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa I: (▲) colina:urea (■) colina:glicerol (●) colina:etilenglicol.

Si bien esperábamos un incremento de la actividad dado por la mayor concentración de sustrato soluble, los DES no mostraron un aumento significativo en ninguna de las concentraciones ensayadas. Dado que los dos DES que mostraron resultados más promisorios están formados por aniones solubles en agua, se llevaron a cabo estudios utilizando los componentes DES por separado como co-disolventes para la reacción. Estudios recientes sugieren que cuando se utilizan los DES como co-disolventes en soluciones acuosas, se produce la existencia de "clusters" de los DES, manteniendo su estructura incluso a concentraciones bajas (Huang et al., 2014). Por lo tanto, los DES podrían mantener una base estructural, incluso en soluciones acuosas, siendo el actual responsable del efecto (sinérgico) sobre la biocatálisis, en lugar de sus componentes separados (Huang et al., 2014).

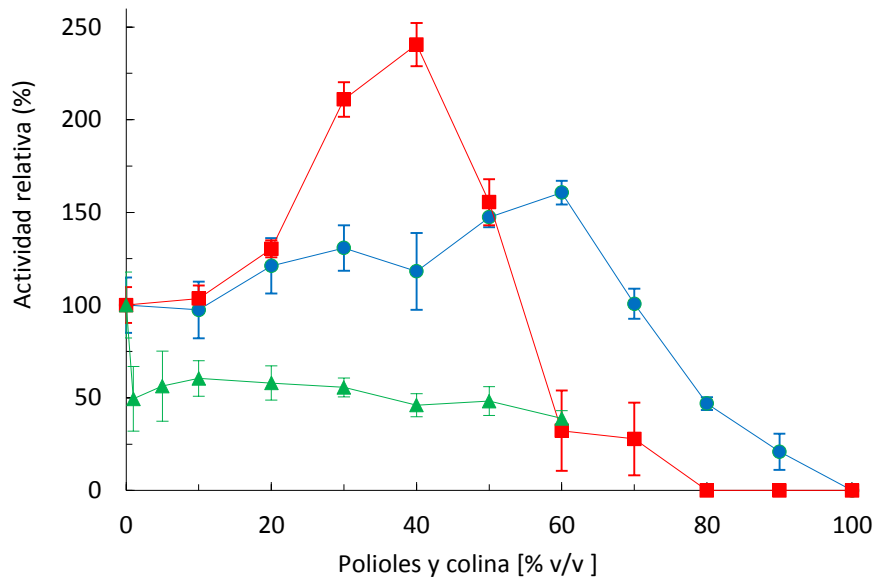


Figura 44: Efecto de los polioles sobre la actividad enzimática de 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa I: (■) glicerol (●) etilenglicol (▲) colina.

Los resultados utilizando colina, glicerol y etilenglicol como co-disolventes se muestran en la Figura 44. El cloruro de colina produjo un efecto perjudicial para la glicosidasa, incluso con bajas adiciones (en proporciones mayores que 70% p/v el cloruro de colina no es soluble en agua y, por lo tanto, no se midió en concentraciones superiores). Sorprendentemente, ambos polioles exhibieron inesperadas mejoras de la actividad enzimática. La producción de hesperetina se incrementó 140% (3.74 ± 0.44 U/ml) en glicerol al 40% v/v. Resultados posteriores del laboratorio demostraron que el incremento de la actividad se debe a la transglicosilación desde hesperidina a etilenglicol o glicerol. Además, esta reacción permitiría el acceso a nuevos compuestos potencialmente interesantes (Kurakake et al., 2015). Un trabajo piloto en estas condiciones (40% v/v de glicerol, suspensión de 1.8 mM de hesperidina (1.1 g / L) y 1.55 U/ml enzima, 1 h, 60°C), dió lugar a un rendimiento de 0.34 g de hesperetina, es decir, una conversión del sustrato del 62%, en contraste con la conversión del sustrato del 26% obtenida cuando se llevaron a cabo reacciones en medio acuoso. Por lo tanto, la catálisis también podría ser favorecida por el efecto estabilizador ejercido por los polioles (Andersson et al., 2000). Los resultados sugieren que una mejora de la solubilidad de la hesperidina favorecería la catálisis hasta el punto donde la alta viscosidad de los medios comienza a ser adversa para el proceso enzimático, presumiblemente debido a limitaciones de transferencia de masa. Por lo tanto, la viscosidad más baja de los DES en comparación con los componentes singulares –glicerol y etilenglicol– podría ser contrarrestada por el efecto

deletéreo del catión de colina (Dai et al., 2013; Zhao et al., 2011; Pinna et al., 2015). Los cationes cuaternarios de amonio son iones caotrópicos (serie de Hofmeister), por lo que se puede esperar un efecto negativo sobre la actividad enzimática (Pinna et al., 2015). Además, las interacciones entre el cloruro de colina y la hesperidina no deben ser relegadas. Teniendo en cuenta que los DES pueden ser adaptados a las necesidades (sintéticas), es posible diseñar un nuevo DES basado en los polioles y que contenga sales cuaternarias más compatibles con glicosidos hidrolasas y la disolución de flavonoides.

En resumen, se ha explorado el uso de DES como co-disolventes en biocatálisis de flavonoides. Los diferentes DES basados en cloruro de colina pueden usarse para procesos biocatalíticos usando glicosidasas en marcos prácticos de 30-40% v/v DES. Dada la importancia industrial de los flavonoides y las ventajas prospectivas (medioambientales) que el uso de estos co-disolventes puede tener, comparado con los co-disolventes convencionales como el DMSO, el uso de los DES abre las posibilidades para combinar la biocatálisis con la industria alimentaria, utilizando derivados ampliamente aceptables, tales como glicerol. Como líneas para futuras investigaciones, el diseño genético de biocatalizadores robustos que puedan ser más activos y estables en proporciones más altas de DES puede ser una opción plausible para aumentar la solubilidad de los sustratos. Además, otra aproximación sería adaptar el nuevo DES con mejores propiedades estructurales para las glicosidasas, y así ampliar los efectos positivos de los polioles, y disminuir la influencia deletérea causada por el cloruro de colina.

Conclusiones

Conclusiones

- La desglicosilación de rutina usualmente es cuantificada mediante el método estándar, HPLC. En este trabajo, hemos desarrollado y validado un método espectrofotométrico para la cuantificación de quercetina. Debido a su simplicidad y velocidad de análisis, el método es aplicable para medir actividad enzimática, abordar un gran número de muestras, incluso se puede adaptar a un lector de microplacas.
- Una selección de diglicosidasas en los géneros *Acremonium* y *Sarcocladium* (28 cepas), mostró una frecuencia considerable de 3-*O*-rutinosidasas (siete cepas positivas sobre 21 cepas que degradan rutina), mientras que no se encontraron enzimas específicas para 7-*O*-rutinosidos (hesperidina y diosmina). Esto indica que la especificidad de los catalizadores por la aglicona y la posición donde está unido el residuo glicosídico juegan un papel importante en la catálisis.
- La enzima α R β G II se purificó desde el sobrenadante de *Acremonium* sp. DSM 24697. Respecto a la especificidad de sustrato, α R β G II resultó ser promiscua. Esta enzima hidrolizó 3-*O*-rutinosidos, 7-*O*-rutinosidos (excepto diosmina); y en menor extensión también 7-*O*-neohesperidósidos, y los polisacáridos xilano y laminarina. α R β G II es una herramienta para modificar compuestos hidroxilados mediante transglicosilación: se rutinosilaron alcoholes primarios, secundarios y fenólicos. Esta modificación de compuestos posee interés farmacológico; dado que los receptores de ramnosa se encuentran en el hígado, los glicoconjugados bioactivos que contengan ramnosa expuesta serían dirigidos al tejido hepático de forma preferencial.
- Las diglicosidasas fúngicas descritas pertenecen a las familias GH1 y GH5. A diferencia de éstas, la enzima α R β G II de *Acremonium* sp. DSM 24697 pertenece a la familia GH3. Dentro de esta familia, es la primera enzima descrita que actúa de modo endo. Esta clasificación abre las puertas para la caracterización e identificación de las glicósido hidrolasas putativas de la familia GH3.
- La sobre-expresión funcional de la proteína recombinante en el sistema eucariota *P. pastoris* facilita la producción en mayor escala para futuras aplicaciones del catalizador, que en su hésped original se produce en bajas concentraciones.
- Los líquidos iónicos DES podrían ser utilizados en biocatálisis dado que permiten incrementar la solubilidad de sustratos complejos. En este trabajo se estableció una prueba de concepto con el sistema diglicosidasas-flavonoides.

Referencias

Referencias

Aherne SA, O'Brien M. (2002). Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. 18: 75–81.

Ahn YO, Mizutani M, Saino H, Sakata K. (2004). Furcatin hydrolase from *Viburnum furcatum* Blume is a novel disaccharide-specific acuminosidase in glycosyl hydrolase family 1. *J Biol Chem*. 279: 23405–23414.

Ahn YO, Saino H, Mizutani M, Shimizu B, Sakata K. (2007). Vicianin Hydrolase is a Novel Cyanogenic β -Glycosidase Specific to β -Vicianoside (6-O- α -L-arabinopyranosyl- β -D-glucopyranoside) in Seeds of *Vicia angustifolia*. *Plant Cell Physiol*. 48: 938–947.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J M Biol* 215: 403–410.

Andersson MM, Breccia JD, Hatti-Kaul R. (2000). Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase. *Biotech. Appl. Biochem*. 32: 145–153.

Arayne MS, Sultana N, Tabassum A. (2013). RP-LC simultaneous quantitation of co-administered drugs for (non-insulin dependent) diabetic mellitus induced dyslipidemia in active pharmaceutical ingredient, pharmaceutical formulations and human serum with UV-detector. *Clin. Chim. Acta*. 425: 54–61.

Aspeborg H, Coutinho PM, Wang Y, Brumer H, Henrissat B. (2012). Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glycoside hydrolase family 5 (GH5). *BMC Evol Biol*. 12: 186.

Baumgertel A, Grimm R, Eisenbeiß W, Kreis W. (2003). Purification and characterization of a flavonol 3-O- β -heterodisaccharidase from the dried herb of *Fagopyrum esculentum Moench*. *Phytochem*. 64: 411–418.

Benavente-García O, Castillo J, Marin FR, Ortuño A, Del Río JA. (1997). Uses and properties of citrus flavonoids. *J. Agric. Food. Chem*. 45: 4505–4515.

Boronat M, Climent MJ, Corma A, Iborra S, Montón R, Sabater MJ. (2010). Bifunctional acid-base ionic liquid organocatalysts with a controlled distance between acid and base sites. *Chem. Eur. J*. 16: 1221–1231.

Brinkley RL, Gupta RB. (2001). Hydrogen bonding with aromatic rings. *AIChE Journal* 47: 948–953.

- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* 37: 233–238.
- Chen P, Gu J. (2011). A rapid measurement of rutin-degrading enzyme activity in extract of tartary buckwheat seeds. *Food and Bioproducts Processing.* 89: 81–85.
- Cho MJ, Howard LR, Prior RL, Clark JR. (2004). Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 84: 1771–1782.
- Chuankhayan P, Hua Y, Svasti J, Sakdarat S, Sullivan PA, Ketudat Cairns JR. (2005). Purification of an isoflavonoid 7-O- β -apiosyl-glucoside β -glycosidase and its substrates from *Dalbergia nigrescens* Kurz. *Phytochem* 66: 1880–1889.
- Contin M, Mohamed S, Albani F, Riva R, Baruzzi A. (2008). Simple and validated HPLC–UV analysis of levetiracetam in deproteinized plasma of patients with epilepsy. *J. Chromatogr. B.* 873: 129–132.
- Cui X-D, Wang Z-H. (2011). Preparation and properties of rutin-hydrolyzing enzyme from tartary buckwheat seeds. *Food Chem.* 132: 60–66.
- Dai Y, van Spronsen J, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH. (2013). Natural deep-eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta.* 766: 61–65.
- Das S & Rosazza JP. (2006). Microbial and enzymatic transformations of flavonoids. *J Nat Prod.* 69: 499–508.
- Davies GJ, Wilson KS, Henrissat B. (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem J Lett* 321: 557–559.
- Decker CH, Visser J, Schreier P. (2001). Beta-glucosidase multiplicity from *Aspergillus tubingensis* CBS 643.92: purification and characterization of four beta-glucosidases and their differentiation with respect to substrate specificity, glucose inhibition and acid tolerance. *Appl Microbiol Biotechnol* 55: 157–63.
- Desmet T, Soetaert W, Bojarov P, Křen V, Dijkhuizen L, Eastwick-Field V, Schiller A. (2012). Enzymatic glycosylation of small molecules: challenging substrates require tailored catalysts. *Chem Eur J.* 18: 10786–10801.
- Di Majo D, Giammanco M, La Guardia M, Tripoli E, Giammanco S, Finotti E. (2005). Flavanones in Citrus fruit: structure-antioxidant activity relationships. *Food Res. Int.* 38: 1161–1166.
- Dincer A, Telefoncu A. (2007). Improving the Stability of Cellulase by Immobilization on Modified Polyvinyl Alcohol Coated Chitosan Beads. *J Mol Catal B Enzym.* 45: 10–14.

- Dugas AJ, Castaneda-Acosta J, Bonin GC, Price KL, Fischer NH, Winston GW. (2000). Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. *Journal of Natural Products*. 63: 327–331
- El Hajji H, Nkhili E, Tomao V, Dangles O. (2006). Interactions of quercetin with iron and copper ions: complexation and autoxidation. *Free Rad. Res.* 40: 303–320.
- Fabjan N, Rode J, Kosir IJ, Wang Z, Zhang Z, Kreft I. (2003). Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum Gaertn*) as a source of dietary rutin and quercitrin. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6452–6455.
- Fahlman BM, Krol ES. (2009). UVA and UVB radiation-induced oxidation products of quercetin. *J. Photochem. Photo.* 97: 123–131.
- Fahlman, BM, Krol ES. (2009). Inhibition of UVA and UVB Radiation-Induced Lipid Oxidation by Quercetin. *J. Agric. Food Chem.* 57: 5301–5305.
- Gerstorferová D, Fliedrová B, Halada P, Marhola P, Kren V, Weignerová L. (2012). Recombinant α -l-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* in selective trimming of rutin. *Process Biochemistry*. 47: 828–835.
- Giffhorn F, Koper S, Huwig A, Freimund S. (2000). Rare sugars and sugar-based synthons by chemo enzymatic synthesis. *Enzyme Microb Technol.* 27: 734–742.
- Giraldo A, Gené J, Sutton DA, Madrid H, Hoog GS, Cano J, Decock C, Crous PW, Guarro J. (2015). Phylogeny of Sarcocladium (Hypocreales). *Persoonia* 34: 10–24.
- Gonçalves VSS, Rodríguez-Rojo S, De Paz E, Mato C, Martín Á, Cocero M J. (2015). Production of water soluble quercetin formulations by pressurized ethyl acetate-in-water emulsion technique using natural origin surfactants. *Food Hydrocolloids*. 51: 295–304.
- Gorke J, Srien F, Kazlauskas R. (2010). Toward advanced ionic liquids. Polar, enzyme-friendly solvents for biocatalysis. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 15: 40–53.
- Griengl H, Schwab H, Fechter M. (2000). The synthesis of chiral cyanohydrins by oxynitrilases. 794. *Trends Biotechnol.* 18:252–256.
- Gudmundsson M, Hansson H, Karkehabadi S, Larsson A, Stals I, Kim S, Sunux S, Furdala M, Larenas E, Kaper T, Sandgren M. (2016). Structural and functional studies of the glycoside hydrolase family 3 β -glucosidase Cel3A from the moderately thermophilic fungus *Rasamsonia emersonii*. *Acta Cryst.*72: 860–870.

- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *J Nut Biochem* 13: 572–584.
- Henrissat B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem J.* 280: 309–316.
- Huang ZL, Wu BP, Wen Q, Yang TX, Yang Z. (2014). Deep eutectic solvents can be viable enzyme activators and stabilizers, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89: 1975–1981.
- Ishikawa M, Kawasaki M, Shiono Y, Koseki T. (2018). A novel *Aspergillus oryzae* diglycosidase that hydrolyzes 6-O- α -L-rhamnosyl- β -D-glucoside from flavonoids. *Appl Microbiol Biotechnol.* 102: 3193-3201.
- Jmol: un visor Java de código abierto para estructuras químicas en tres dimensiones. <http://www.jmol.org/>.
- Jungbluth G, Ruhling I, Ternes W. (2000). Oxidation of flavonols with Cu(II), Fe(II) and Fe(III) in aqueous medium. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2:* 1946–1952.
- Kang M-S, Okuyama M, Yaoi K, Mistuishi Y, Kim Y-M, Mori H, Kim D, Kimura A. (2007). Aglycone specificity of *Escherichia coli* α -xylosidase investigated by transxylosylation. *FEBS J* 274: 6074-6084.
- Kappel L, Gaderer R, Flipphi M, Seidl-Seiboth V. (2016). The N-acetylglucosamine catabolic gene cluster in *Trichoderma reesei* is controlled by the Ndt80-like transcription factor RON1. *Molecular microbiology*, 99: 640–657.
- Karkehabadi S, Helmich KE, Kaper T, Hansson H, Mikkelsen N, Gudmundsson M, Piens G, Furdala M, Banerjee G, Scott-Craig J, Walton JD, Phillips GN, Sandgren M. (2014). Biochemical Characterization and Crystal Structures of a Fungal Family 3 Glucosidase, Cel3A from *Hypocrea jecorina*. *J Biol Chem.* 289: 31624–31637.
- Katayama S, Ohno F, Yamauchi F, Kato M, Makabe H, Nakamura S. (2013). Enzymatic Synthesis of Novel Phenol Acid Rutinosides Using Rutinase and Their Antiviral Activity in Vitro. *J. Agric. Food Chem.* 61: 9617–9622.
- Keller NP, Turner G, Bennett JW. (2005). Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology.* 3: 937.
- Knaup B, Kahle K, Erk T, Valotis A, Scheppach W, Schreier P, Richling E. (2007). Human intestinal hydrolysis of phenol glycosides – a study with quercetin and *p*-nitrophenol glycosides using ileostomy fluid. *Mol. Nutr. Food Res.* 51: 1423–1429.

- Krishnamachari V, Levine LH, Pare PW. (2002). Flavonoid oxidation by the radical generator AIBN: a unified mechanism for quercetin radical scavenging. *J. Agric. Food Chem.* 50: 4357–4363.
- Kreft I, Fabjan N, Yasumoto K. (2006). Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench*) food materials and products. *Food Chem.* 98: 508–512.
- Kren V, Rezanka T. (2008). Sweet antibiotics - the role of glycosidic residues in antibiotic and antitumor activity and their randomization. *FEMS Microbiol Rev* 32: 858–889.
- Kuivanen J, Arvas M, Richard P. (2017). Clustered Genes Encoding 2-Keto-l-Gulonate Reductase and l-Idonate 5-Dehydrogenase in the Novel Fungal d-Glucuronic Acid Pathway. *Frontiers in microbiology*, 8, 225.
- Kurakake M, Okumura T, Morimoto Y. (2015). Synthesis of galactosyl glycerol from guar gum by transglycosylation of α -galactosidase from *Aspergillus* sp. MK14. *Food Chem.* 172: 150–154.
- Lang, L, Parmar V, Meyer A. (2017). Biocatalysis. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences.
- Lin Cereghino J, Cregg JM. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev.* Jan. 24: 45–66.
- Lindberg D, De la Fuente Revenga M, Widersten M. (2010) Deep eutectic solvents (DESS) are viable cosolvents for enzyme-catalyzed epoxide hydrolysis. *147: 169–171.*
- Lombard V, Ramulu HG, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZY) in 2013. *Nucleic Acids Res.* 42: 490–495.
- Mamma D, Hatzinikolaou DG, Christakopoulos P. (2004). Biochemical and catalytic properties of two intracellular β -glucosidases from the fungus *Penicillium decumbens* active on flavonoid glucosides. *J Mol Catal B: Enzymatic* 27: 183–190.
- Mandalari G, Bennett RN, Kirby AR, Lo Curto RB, Bisignano G, Waldron KW, Faulds CB. (2006) Enzymatic hydrolysis of flavonoids and pecticoligosaccharides from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel. *J. Agric. Food Chem.* 54: 8307–8313.
- Martearena MR, Daz M, Ellenrieder G. (2008). Synthesis of rutinoides and rutinose by reverse hydrolysis catalyzed by fungal α -l-rhamnosidases. *Biocatal Biotransform.* 26: 177–185.
- Massart DL, Vandeginste BGM, Buydens LMC, De Jong S, Lewi PJ, Smeyers-Verbeke J. (1997). *Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A*, 1st ed. Elsevier, Amsterdam.

- Matsuzawa T, Mitsuishi Y, Kameyama A, Yaoi K. (2016). Identification of the Gene Encoding Isoprimeverose-producing Oligoxyloglucan Hydrolase in *Aspergillus oryzae*. *J Biol Chem*. 291: 5080–5087.
- Maugeri Z, Domínguez de María P. (2014). Benzaldehyde lyase (BAL)-catalyzed enantioselective C–C bond formation in deep-eutectic-solvents-buffer mixtures, *J. Mol. Catal. B: Enzym*. 17: 120–123.
- Maugeri, Z., Domínguez de María, P. (2012). “Novel choline-chloride-based deep-eutectic solvents with renewable hydrogen bond donors: Levulinic acid and sugar-based polyols”. *RSC Adv*. 2: 421–425.
- Mauludin R, Müller RH. (2008). Hesperidin smart crystals: redispersibility and improved solubility properties. *Pharmacogenetics / Pharmacogenomics Virtual J* (<http://www.aapsj.org>) 10:S2.
- Mazzaferro L, Piñuel L, Minig M, Breccia JD. (2010). Extracellular monoenzyme deglycosylation system of 7-*O*-linked flavonoid β -rutinosides and its disaccharide transglycosylation activity from *Stilbella fimetaria*. *Arch Microbiol* 192: 383–393 [Erratum, *Archive Microbiology*. 2011, 193:461.
- Mazzaferro LS, Breccia JD. (2011). Functional and biotechnological insights into diglycosidases. *Biocat Biotransf* 29: 103–112.
- Mazzaferro LS, Breccia JD. (2012). Quantification of hesperidin in citrus-based foods using a fungal diglycosidase. *Food chem*. 134: 2338–2344.
- Mazzaferro L, Piñuel L, Erra-Balsells R, Giudicessi SL, Breccia JD. (2012). Transglycosylation specificity of *Acremonium* sp. α -rhamnosyl- β -glucosidase and its application to the synthesis of the new fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl-rutinoside. *Carb. Res*. 347: 69–75.
- Mazzaferro LS, Hüttel W, Fries A & Müller M. (2015). Cytochrome P450-catalyzed regio- and stereoselective phenol coupling of fungal natural products. *Journal of the American Chemical Society*, 137(38), 12289–12295.
- Mena-Arizmendi A, Alderete J, Águila S, Martyc A, Miranda-Molina A, López-Munguía A, Castillo E. (2011). “Enzymatic fructosylation of aromatic and aliphatic alcohols by *Bacillus subtilis* levansucrase: Reactivity of acceptors.” *J. Mol. Catal. B: Enzym*. 70: 41–48.
- Miller GL. (1959). Use of dinitrosalicylic acid (DNS) for determination of reducing sugars. *Anal Chem* 31: 426–428.

- Minig M, Mazzaferro L, Erra-Balsells R, Petroselli G, Breccia J D. (2011). α -Rhamnosyl- β -glucosidase Catalyzed Reactions for Analysis and Biotransformations of Plant-Based Foods. *J. Agric. Food Chem.* 59: 11238–11243.
- Mizutani M, Nakanishi H, Ema J, Ma SJ, Noguchi E, Inohara-Ochiai M, Fukuchi-Mizutani M, Nakao M, Sakata K. (2002). Cloning of β -primeverosidase from tea leaves, a key enzyme in tea aroma formation. *Plant Physiol* 130: 2164–2176.
- Nagasawa T, Nakamura T, Yamada H. (1990). Production of acrylic acid and methacrylic acid using *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrilase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 34: 322–4.
- Nam K, Hong S, Shin K, Oh D. (2012). Quercetin production from rutin by a thermostable β -rutosidase from *Pyrococcus furiosus*. *Biotechnol. Lett.* 34: 483–489.
- Narikawa T, Shinoyama H, Fujii T. (2000). A β -rutosidase from *Penicillium rugulosum* IFO 7242 that is a peculiar flavonoid glycosidase. *Biosci Biotechnol Biochem.* 64: 1317–1319.
- Neher BD, Mazzaferro L S, Kotik M, Oyhenart J, Halada P, Křen V, Breccia JD. (2016). Bacteria as source of diglycosidase activity: *Actinoplanes missouriensis* produces 6-O- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase active on flavonoids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 3061–3070.
- Orrillo AG, Ledesma P, Delgado OD, Spagna G, Breccia JD. (2007). Cold-active α -l-rhamnosidase from psychrotolerant bacteria isolated from a sub-Antarctic ecosystem. *Enz Microb Technol.* 40: 236–241.
- Petersen TN, Brunak S, Heijne G, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods.* 8: 785–786.
- Pinna MC, Bauduin P, Touraud D, Monduzzi M, Ninham BW, Kunz W. (2005). Hofmeister effects in biology: effect of choline addition on the salt-induced super activity of horseradish peroxidase and its implication for salt resistance of plants. *J. Phys. Chem. B* 109:16511–16514.
- Piñuel L, Breccia JD, Guisán JM, López-Gallego F. (2013). Production of hesperetin using a covalently multipoint immobilized diglycosidase from *Acremonium* sp. DSM24697. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 23: 410–417.
- Piñuel L, Mazzaferro LS, Breccia JD. (2011). Operational stabilization of fungal α -rhamnosyl- β -glucosidase by immobilization on chitosan composites. *Process Biochem.* 46: 2330–2335.
- Pozzo T, Pasten JL, Karlsson EN, Logan DT. (2010). Structural and functional analyses of glucosidase 3B from *Thermotoga neapolitana*: A thermostable three-domain representative of glycoside hydrolase 3. *J. Mol. Biol.* 397, 724–739
- Rather MY, Mishra S (2013). β -glycosidases: an alternative enzyme based method for synthesis of alkyl-glycosides. *Sustain. chem. process.* 1: 1–15.

- Riou C, Salmon J, Vallier M-J, Günata Z, Barre P. (1998). Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Appl Environ Microbiol* 64: 3607–3614.
- Riva S. (2002). Enzymatic modification of the sugar moieties of natural glycosides. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* Volumes 19: 43–54.
- Robinson, Charlton, Garnier, Wang, Davis, Perkins, Frier, Duncan, Savage, Wyatt, Watson, Davis. (2004). LEAPT: Lectin-directed enzyme-activated prodrug therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101: 14527–14532.
- Rosky PJ. (2008). Protein denaturation by urea: Slash and bond. *Proc Nat Acad Sci USA*. 105: 16825-16826.
- Roy A, Yang J, Zhang Y. (2012). COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. *Nucleic Acids Research* 40: 471–477.
- Rye CS & Withers SG. (2000). Glycosidase mechanisms. *Curr Opin Chem Biol*. 4:573–580.
- Salvador R.A. (2008). Líquidos iónicos a temperatura ambiente: Un nuevo medio para las reacciones químicas. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)* Vol. 102, N°. 1, pp 79-90
- Sarry JE, Gunata Z. (2004). Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chem*. 87: 509–521.
- Scaroni E, Cuevas C, Carrillo L, Ellenrieder G. (2002). Hydrolytic properties of crude-l-rhamnosidases produced by several wild strains of mesophilic fungi. *Lett.Appl. Microbiol*. 34: 461–465.
- Scholtz JM, Barrick D, York EJ, Stewart JM, Baldwin RL. (1995). Urea unfolding of peptide helices as a model for interpreting protein unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 185–189
- Shin KC, Nam HK, Oh DK. (2013). Hydrolysis of flavanone glycosides by α -glucosidase from *Pyrococcus furiosus* and its application to the production of flavanone aglycones from citrus extracts. *J. Agric. Food Chem*. 61: 11532–11540.
- Šimčíková D, Kotik M, Weignerová L, Halada P, Pelantová H, Adamcová K, Křen V. (2015). α -L-Rhamnosyl- β -D-glucosidase (rutinosidase) from *Aspergillus niger*: Characterization and synthetic potential of a novel diglycosidase. *Adv Synth Catal*. 357:107–117.
- Simerská P, Kuzma M, Monti D, Riva S, Mackovac M, Křen V. (2006). Unique transglycosylation potential of extracellular α -D-galactosidase from *Talaromyces flavus*. *J Mol Catal B: Enzym*. 39: 28–134.

- Smith PK, Krohn RI, Hermanson EK, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76–85.
- Sokolová R, Ramešová, Degano I, Hromadová M, Gál M, Žabka J. (2012). The oxidation of natural flavonoid quercetin. *Chem. Comm.* 48: 3433–3435.
- Summerbell RC, Gueidan C, Schroers H-J, Hoog GS, Starink M, Arocha Rosete Y, Guarro J, Scott JA. (2011). *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. *Studies in Mycology* 68: 139–162.
- Suzuki K, Sumitani JI, Nam YW, Nishimaki T, Tani S, Wakagi T, Kawaguchi T, Fushinobu S. (2013). Crystal structures of glycoside hydrolase family 3 glucosidase 1 from *Aspergillus aculeatus*. *Biochem. J.* 452: 211–221
- Tereschuk ML, Riera MVQ, Castro GR, Abdala LR. (1997). Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. *J Ethnopharmacol.* 56: 227–232.
- Tsuruhami K, Mori S, Amarume S, Sarawatari S, Murata T, Hirakake J, Sakata K, Usui T. (2006). Isolation and characterization of a β -primeverosidase-like enzyme from *Penicillium multicolor*. *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 691–698.
- Van Rantwijk M, Woudenberg-van Oosterom M, Sheldon R A. (1999). Glycosidase-catalysed synthesis of alkyl glycosides. *J Mol Catal B Enzym.* 6: 511–532.
- Vojtíšková P, Kmentová K, Kubáň V, Kráčmar S. (2012). Chemical composition of buckwheat plant (*Fagopyrum esculentum*) and selected buckwheat products. *J Microbiol Biotechnol Food Sci.* 1: 1011–1019.
- Weiz G, Breccia JD, Mazzaferro LS. (2017). Screening and quantification of the enzymatic deglycosylation of the plant flavonoid rutin by UV–visible spectrometry. *Food Chem.* 229:44–49.
- Wu CH, Huang H, Yeh L, Barker WC. (2002). Protein family classification and functional annotation. *Computational Biology and Chemistry* 27: 37–47
- Yadav PK, Yadav S, Yadav KDS. (2010). α -L-rhamnosidase: A review. *Process Biochem.* 45: 1226–1235.
- Yamamoto S, Okada M, Usui T, Sakata K, Toumoto A, Tsuruhami K. (2006). Diglycosidase isolated from microorganisms. United States patent 7109014.2006 Sep 19.
- Yang J & Zhang Y. (2015). I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research.* 43: W174–W181.

Yoshida E, Hidaka M, Fushinobu S, Koyanagi T, Minami H, Tamaki H, Kitaoka M, Katayama T, Kumagai H. (2010). Role of a PA14 domain in determining substrate specificity of a glycoside hydrolase family 3 glucosidase from *Kluyveromyces marxianus*. *Biochem. J.* 431: 39–49.

Yuntao D, Jaap van Spronsen, Geert-Jan W, Verpoor R, Young HC. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potencial media for green technology. *Anal. Chim. Acta.* 766: 61– 68.

Zhang Y. (2009). I-TASSER: Fully automated protein structure prediction in CASP8. *Proteins.* 77: 100–113.

Zhou K, Luana H, Hua Y, Gea G, Liua X, Mac X, Houc Y, Wanga X, Yanga L. (2012). Isolation and characterization of a novel β -glucosidase with transglycosylation activity from *Arthrobacter* sp. DL001. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 80: 48– 5.