

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

**ACTIVIDAD DIGLICOSIDASA DE
*CRYPTOCOCCUS CARNESCENS***

ROMINA LIS FERRERO

2014

PREFACIO

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Química, de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Laboratorio de Biocatálisis, dependiente de INCITAP-CONICET- Departamento de Química-FCEyN-UNLPam durante el período comprendido entre el 1 de octubre de 2013 y el 23 de Septiembre de 2014, bajo la dirección de Dr. Javier D. Breccia; y bajo la codirección de Lic. Bárbara D. Neher.

Santa Rosa, 23 de Septiembre de 2014

Romina Lis Ferrero

Laboratorio de Biocatálisis

INCITAP-CONICET

Departamento de Química - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad Nacional de La Pampa

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de La Pampa, por formarme como profesional.

A mi Director, Dr. Javier D. Breccia, por aceptar la dirección de esta tesina y por su tiempo dedicado.

A mi co-directora, Lic Bárbara Neher, por sus aportes científicos, dedicación, e inmensa confianza. Gracias Barby!

A mis compañeros de laboratorio, por su paciencia, consejos y solidaridad.

A mis amigas y compañeros, por compartir tantos momentos.

A mi novio, por su apoyo y comprensión.

A mi familia, a la que le debo todo.

A todos aquellos que directa e indirectamente contribuyeron a la realización de este trabajo.

CONTENIDOS

Resumen	5
Abstract	6
1. Introducción	
1.1 Flavonoides	7
1.2 Glicosil-hidrolasas	8
1.3 <i>Cryptococcus carnescens</i>	11
1.4 Objetivo General	12
1.5 Objetivos Específicos	12
2. Materiales y Métodos	
2.1. Reactivos químicos	13
2.2. Cultivo de <i>C. carnescens</i> Y1503	13
2.3. Medición de Actividades enzimáticas	13
2.4. Efecto del pH y la temperatura	14
2.5. Cromatografía en capa delgada	14
2.6. Electroforesis	14
3. Resultados y Discusión	
3.1. Características culturales de <i>C. carnescens</i>	15
3.2. Actividad glicosidasa de <i>C. carnescens</i>	17
3.3. Localización de la actividad 6-O- α ramnosil- β glucosidasa	18
3.4. Caracterización de la actividad 6-O- α ramnosil- β glucosidasa de <i>C. carnescens</i>	19
3.5. Transglicosilación	21
3.6. Especificidad de sustrato	21
3.7. Comparación con otras diglicosidasas	22
4. Conclusiones	24
5. Referencias	25

Resumen:

La actividad diglicosidasa de *Cryptococcus carnescens* fue descrita previamente en sustratos que contienen el disacárido primeverosa (6-*O*- β -D-xilopiranosil- β -D-glucopiranosido). En este trabajo se evaluó su capacidad para desglicosilar metabolitos con el disacárido rutinosa (6-*O*- α -L-ramnopiranosil- β -D-glucopiranosido). La levadura se cultivó en condiciones aeróbicas en medio sólido con los flavonoides, hesperidina, rutina y diosmina, como fuentes de carbono y solo se detectó la hidrólisis sobre los dos primeros. El perfil de actividad a diferentes valores pH y temperatura, mostró un máximo a pH 6 y una temperatura de 55°C. El cultivo con hesperidina como fuente de carbono no exhibió actividad con los sustratos monoglicosilados (4-metilumbeliferil-glucósido y 4-metilumbeliferil-ramnósido). Sin embargo, el análisis zimográfico mostró una banda de actividad, con un Rf de 0.70, con el sustrato artificial 4-metilumbeliferil-rutinósido. Cuando *C. carnescens* fue cultivado en rutina como fuente de carbono también produjo una banda de actividad diglicosidasa con el mismo Rf de la anterior. Estos resultados sugieren que este microorganismo produce actividad diglicosidasa específica para rutinosa y que podría ser la misma hidrolasa para ambos flavonoides. Por otro lado, no se detectó actividad de transglicosilación sobre aceptores con oxhidrilos primarios.

Abstract

Diglycosidase activity from *Cryptococcus carnescens* was previously described for an artificial substrate containing the disaccharide primeverose (6-O- β -D-xylopyranosyl- β -D-glucopyranoside). Herein, the deglycosylation of metabolites containing a rutinose moiety (6-O- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranose) was evaluated. Hydrolysis was detected with hesperidin and rutin but not with diosmin. Deglycosylation activity from broth cultures with hesperidin as carbon source showed a maximum at pH 6 and 55 ° C. Although the activity against the monoglycosylated substrates (4-methylumbelliferyl-glucoside and 4-methylumbelliferyl-rhamnoside) was not detected, the zymographic analysis showed a positive band of activity with the substrate MU-rutinoside (4-methylumbelliferyl-rutinoside, Rf 0.70) indicating the presence of a diglycosidase. Transglycosylation activity with primary OH-acceptors was not detected. The supernatant from cultures with rutin as carbon source also showed a diglycosidase activity band with the same Rf. Therefore, the results indicated that *C. carnescens* produces at least one diglycosidase able to hydrolyze hesperidin and rutin. The equal Rf found in the zymographic assays with both flavonoids suggest the presence of a promiscuous enzyme.

Introducción

1.1 Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios de las plantas, de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). 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 de anillo y se encuentran normalmente como glicósidos, generalmente mono-, di- y triglicósidos. Entre otras funciones protegen a los organismos vegetales del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, los metales y también los protegen de la herbivoría e infecciones por sus actividades bactericida y fungicida (Thongnest *et al.* 2013). Los flavonoides dietéticos han sido descritos por su amplia gama de actividades en la prevención de enfermedades comunes, y la evidencia reciente sugiere que poseen propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias. Estos efectos están relacionados con las diversas actividades farmacológicas y biológicas de los flavonoides (Lewin., 2014).

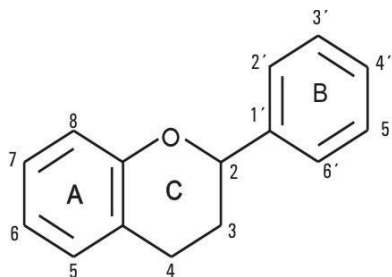


Fig. 1. Estructura molecular del difenilpirano, esqueleto químico de los flavonoides.

En vista de los múltiples grupos funcionales y estereocentros presentes en los flavonoides, las enzimas representan catalizadores ideales para reacciones estereo- y regioselectivas (van Rantwijk *et al.*, 1999; Giffhorn *et al.*, 2000). La biodiversidad microbiana es una fuente importante de enzimas con características apropiadas para aplicaciones específicas. Encontrar estos microorganismos es el primer paso en el desarrollo de procesos de biocatálisis industrial (Marrs *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 1990).

1.2 Glicosil-hidrolasas

La biocatálisis representa hoy en día una biotecnología versátil y valiosa para los procesos industriales. El uso de enzimas como biocatalizadores trae beneficios significativos en

comparación con tecnologías químicas convencionales, para lograr una alta selectividad de la reacción, mayor tasa de reacción, de pureza del producto, y una disminución significativa de la producción de productos colaterales. Dentro de esta variedad, las glicosil-hidrolasas constituyen un grupo amplio y variado de enzimas cuya característica común es la capacidad de hidrolizar el enlace glicosídico que forma el eslabón de enlace de los azúcares (Izzo *et al.*, 2014). Su clasificación se establece en un Catálogo de Enzimas (abreviado EC) que asigna a cada enzima un código numérico basado en el tipo de reacción catalizada y en la especificidad de sustrato. Las glicosil hidrolasas son definidas como (EC 3.2.1.x), donde los tres primeros dígitos indican la propiedad de hidrolizar enlaces glicosídicos entre dos o más carbohidratos o entre un carbohidrato y alguna otra molécula no carbohidrato. El cuarto (x) indica el tipo de sustrato sobre el cual actúa. 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).

Históricamente, el mayor interés biotecnológico se ha ubicado en polisacaridasas tales como amilasas y pectinasas para procesamiento de alimentos, xilanasas para blanqueado de pulpa y papel, celulasas para el suavizado de telas (Breccia *et al.*, 1998; Juge *et al.*, 2006; Yeoman *et al.*, 2010). Actualmente, las enzimas que hidrolizan glicoconjugados han ganado el interés tecnológico para la biotransformación de numerosos alimentos de origen vegetal. Una fracción importante de los precursores de aroma de té, vino y otros alimentos está constituida por moléculas glicosiladas (Hemingway *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001). Los flavonoides en los cítricos tienen un impacto significativo en prácticamente todos los aspectos de la producción de jugos de frutas y su procesamiento, sin embargo estos poseen un aporte negativo y contribuyen al sabor amargo y a la nube de los jugos (Manthey & Grohmann, 1996). De esta forma, puede llevarse a cabo una desglicosilación enzimática añadiendo cócteles comerciales para hidrolizar precursores de aroma y flavonoides, mejorando las propiedades organolépticas del producto (Puri *et al.*, 1996).

Dentro de las glicosil-hidrolasas encontramos las diglicosidasas (glicosidasas disacárido específicas) capaces de liberar residuos disacáridicos que se encuentran en la naturaleza unido a diversas moléculas, e.j: flavonoides, terpenos, isoprenoides, etc. Algunos flavonoides comunes incluyen naringina, narirutina, rutina, diosmina y hesperidina. Hesperidina se encuentra en frutas cítricas, como limón, naranjas y pomelos, y su hidrólisis mediante glicosidasas se emplea industrialmente para clarificación de jugos de fruta y

remoción del sabor amargo (Manzanares *et al.*, 2001). Rutina es un compuesto abundante en alimentos como trigo sarraceno, los cítricos, el té negro, cáscaras de manzana, cebollas, uvas y avena (Herrmann, 1976), su desglicosilación enzimática se utiliza en la industria para la obtención de quercetina. La quercetina tiene una mayor actividad antioxidante que su diglicósido rutina, exhibiendo propiedades antialérgicas, antiproliferativa y antibacteriana (Gaberscik *et al.*, 2002) (Fig. 2).

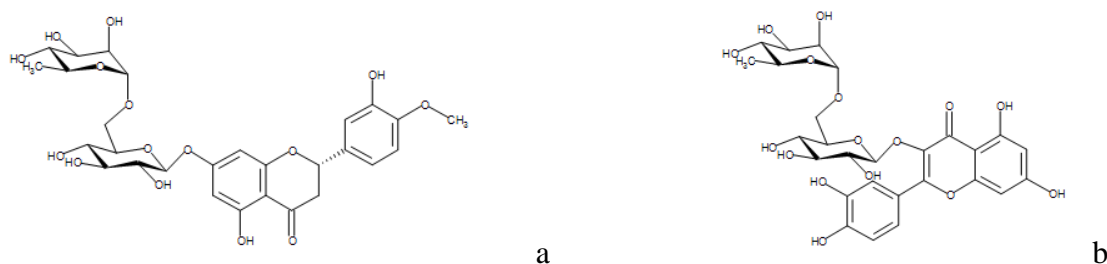


Fig.2. Estructura química de los flavonoides (a) hesperidina (hesperetina 7-O-(6-O-α-L-ramnopiranosil-β-D-glucopiranosido) y (b) rutina (quercetina 3-O-(6-O-α-L-ramnopiranosil-β-D-glucopiranosido).

El mecanismo de desglicosilación de flavonoides habitualmente involucra dos enzimas que actúan de forma secuencial (Sarry & Gunata, 2004), primero una monosacaridasa cliva el enlace glicosídico, luego una β-D-glucosidasa libera la aglicona (Günata *et al.*, 1998). Las endoglicosidasas tienen la habilidad de clivar un enlace glicosídico en el medio de una cadena de azúcares (modo “endo”) y por lo tanto la desglicosilación en un solo paso de los flavonoides diglicosilados requiere la ruptura de la unión aglicona – diglicosido, lo que resulta en la liberación de la aglicona y el disacárido correspondiente, es decir un mecanismo endo de acción (Ogawa *et al.*, 1997). Las diglicosidasas hidrolizan el mismo enlace que las beta-glucosidasas, y en la actualidad se han descrito solo cuatro actividades que reconocen los disacáridos, la primeverosa, acuminosa, rutinosa y vicianosa (Mazzaferro & Breccia, 2011).

Algunas glicosil-hidrolasas actúan mediante el mecanismo de retención, el cual conserva la configuración anomérica del compuesto y le confiere la capacidad de transglicosilación, aplicable en síntesis y modificación de fármacos.

Nuestro laboratorio describió en el año 2010 una nueva actividad enzimática, la enzima llamada 6-O-α-ramnosil-β-glucosidasa EC 3.2.1.168 (6-O-αRβG), producida por *Acremonium* sp DSM 24697. Esta escinde con alta especificidad el residuo o disacárido

rutinosa (6-*O*- α -L-ramnopiranosil- β -D-glucopiranososa) a partir de hesperidina y otros 7-*O*-rutinosil flavonoides (Mazzaferro *et al.*, 2010). Sin embargo este microorganismo produce otra enzima que hidroliza rutina de modo endo (Weiz., 2012) (Fig. 3).

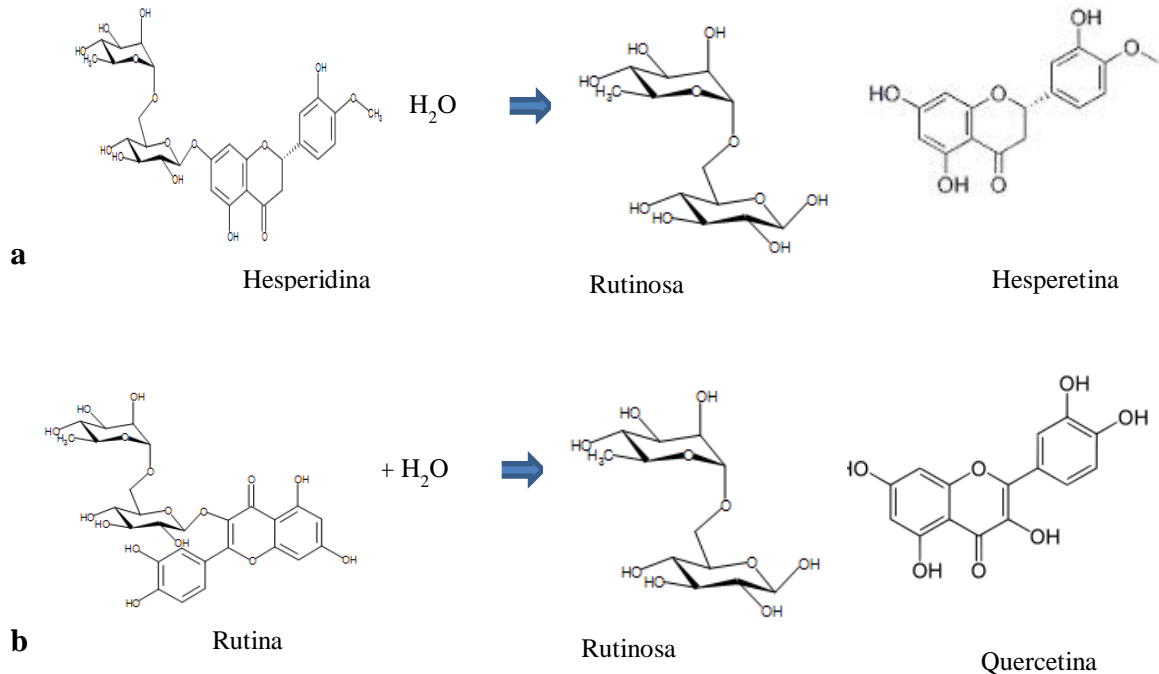


Fig. 3. Reacción catalizada por 6-*O*- α R β G (a); rutinosa (b) sobre el sustrato 7-*O*-rutinosilado hesperidina y 3-*O*-rutinosilado rutina respectivamente.

Estas diglicosidasas se describieron casi exclusivamente a partir de fuentes eucarióticas, específicamente en los hongos filamentosos y plantas. Por lo tanto, microorganismos tales como levaduras y bacterias son todavía una fuente inexplorada de las mismas. Si bien, una patente menciona varios géneros bacterianos como productores, no existen estudios detallados sobre ellos (Yamamoto *et al.*, 2006). Las levaduras y cepas de bacterias capaces de degradar flavonoides, ofrecen ventajas sobre los hongos filamentosos para aplicaciones biotecnológicas, como la expresión de proteínas recombinantes a gran escala y menor tiempo generacional. *Cryptococcus carnescens* integra una lista de microorganismos productores de actividad primeverosidasa, por hidrolizar el sustrato artificial pNP-primaverosido en β -primeverosa (6-*O*- β -D-xilopiranosil- β -D-glucosa) y p-Nitrofenol (Yamamoto *et al.*, 2006). Por otro lado, una búsqueda de microorganismos productores de diglicosidasas realizada en nuestro laboratorio, describió la levadura *Cryptococcus carnescens* como productora de esta actividad sobre hesperidina (Neher *et al.* enviado).

1.3 Cryptococcus carnescens

Las especies de *Cryptococcus* crecen en cultivo como levaduras. Las formas perfectas (sexuales) de las especies de *Cryptococcus* son hongos filamentosos del género *Filobasidiella*. El nombre *Cryptococcus* se usa para las formas imperfectas del hongo. Estas son redondas u ovals (3,5-8 μm), se reproducen por gemación única, con un cuello estrecho entre la célula madre y la hija. Excepcionalmente se observa gemación múltiple, formas alargadas y pseudohifas. Forman colonias mucosas, aunque con el tiempo pueden aparecer secas; el color es variable (crema, ocre, rosa, amarillo), virando a tonos más oscuros con la edad (Mazuelos & Conde, 2001). *Torulopsis carnescens* fue descrita por Verona & Luchetti (1936) y se trataron como un sinónimo de *Cryptococcus laurentii* por Lodder & Kreger-van Rij (1952). Tras la secuenciación del ADNr 18S de *C. laurentii* y su análisis filogenético (Takashima *et al.*, 2003) se obtuvieron datos suficientes para confirmar la identidad de *C. carnescens*, similar a la descrita por Verona & Luchetti (1936). *C. carnescens* puede metabolizar glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, celobiosa, melibiosa, rafinosa, melezitosa, almidón soluble, D-xilosa, L-arabinosa pero no metanol, hexadecano y 2,3-butanodiol. Esta levadura no es capaz de fermentar glucosa ni producir ácido a partir de glucosa (Takashima *et al.*, 2003).

1.4 Objetivo General:

Caracterización de la actividades glicosídicas producidas por *C. carnescens* cuando crece en flavonoides rutinosilados como fuente de carbono.

1.5 Objetivos Específicos:

- a) Cultivar la levadura *C. carnescens* y optimizar las condiciones para la producción de la/s enzima/s desglicosilante/s de/los sustratos.
- b) Detección cualitativa y cuantitativa de la actividad enzimática con el empleo de sustratos naturales y sintéticos.

Materiales y Métodos

2.1. Reactivos químicos:

4-metilumbeliferil- α -L-ramnopiranosido (4-MURha), 4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosido (4-MUGlc), 4-metilumbeliferil- β - celobiosido (4-MUC), p-nitrofenil- α -L-ramnopiranosido (pNRP), p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNGP), hesperidina, rutina y diosmina se compraron en Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). El reactivo 4-metilumbeliferil-rutinósido fue sintetizado mediante transglicosilación por α -ramnosil- β -glucosidasa como se describe en Mazzaferro *et al.*, (2012).

2.2. Cultivo de *C.carnescens* Y1503

La levadura *C.carnescens* se cultivó en los siguientes medios: Yeast Malt (YM), cuya composición es (g/l): 5.0 peptona de carne, 3.0 extracto de levadura, 3.0 extracto de malta, 10.0 glucosa. Un mililitro de un caldo cultivado en YM de 48 h se utilizó como inóculo en los cultivos en lote de 150 ml (Inóculo: 0.67%). Los cultivos en lote se realizaron en medio YM y en medio FPY que contenía (g/l): 2.5 fuente de carbono (flavonoide), 1.0 peptona de carne, 2.0 extracto de levadura. Ambos medios sólidos contenían 15 g/l agar. Los cultivos se realizaron a 25°C en agitador rotatorio (250 rpm).

2.3. Medición de Actividades enzimáticas

Para la determinación de la actividad desglicosilante de hesperidina se procedió a la cuantificación de la liberación de azúcares reductores (Miller, 1959). Se incubaron 450 μ l de sustrato hesperidina con 50 μ l de muestra. En el caso de los cultivos en medio sólido, la muestra se obtuvo congelando distintas fracciones de agar clarificado cercanas a la colonia, y luego se recuperó el sobrenadante por centrifugación (González *et al.*, 1996). En el caso de los cultivos sumergidos, se usó el cultivo completo como fuente de enzimas ecto- y extracelulares. Para la localización de la actividad enzimática, las células fueron lavadas con solución fisiológica. La reacción se llevó a cabo durante 1 hora en un baño de agua a 55°C y se finalizó agregando 500 μ l de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Los tubos se colocaron en un baño de agua hirviendo por 10 min y se enfriaron antes de medir la absorbancia a 540nm. Se definió una unidad de enzima (U) como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μ mol de rutinosa por minuto.

2.4. Efecto del pH y la temperatura

Se utilizó buffer universal (30mM) en el rango de pH 2,5 - 10 a 30°C. Para la determinación de la temperatura óptima aparente se testearon temperaturas comprendidas entre los 30 y 70°C, con el buffer universal (pH 6). Todas las reacciones se incubaron durante 2 horas.

2.5. Cromatografía en capa delgada (TLC)

La identificación de los productos de las reacciones enzimáticas (hidrólisis y transglicosilación) se realizó por cromatografía en capa delgada (Silicagel 60 W) usando acetato de etilo/isopropanol/agua (3:2:2) como fase móvil y se revelaron con el reactivo de antrona (Witham *et al.* 1971). Para medir actividad de transglicosilación se agregó 1 y 5 %v/v de los distintos alcoholes (etanol y fenol) a la mezcla de reacción (detallada en el apartado 3) y se incubó a 55°C con 50 µl de enzima durante 1 h en buffer universal 30mM (pH 6).

2.6. Electroforesis

Se realizaron electroforesis nativas PAGE (10% p/v bis/acrilamida), a potencial constante (120 V) y temperatura ambiente. Para la detección de la actividad de la enzima producida cuando el microorganismo es cultivado con hesperidina y rutina, se realizó un análisis zimográfico utilizando como revelador los sustratos fluorogénicos 4-metilumbeliferil-rutinosido (4-MUR), 4-metilumbeliferil-ramnósido y 4-metilumbeliferil-glucósido.

Resultados y Discusión

3.1. Características culturales de *C. carnescens*

Las colonias de *C. carnescens* en medio YM agar tienen un aspecto mucoso, de color crema, virando a tonos más oscuros y apariencia seca en la madurez (Fig. 4a). Las células son redondas u ovaladas, típicas de las levaduras (Fig. 4b).

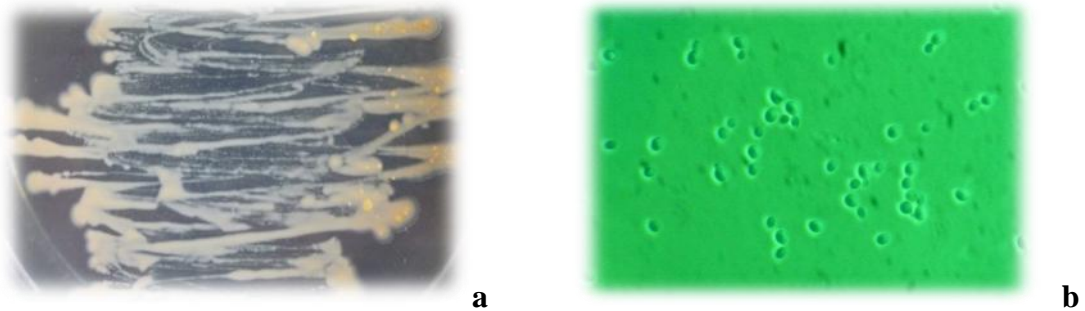


Fig. 4. (a) Cultivo de *C. carnescens* en medio sólido YM (25°C, 48 h). (b) Micrografía (1000x) de una muestra de cultivo sumergido.

Las colonias de *C. carnescens* en cultivos con diferentes flavonoides rutinosilados (hesperidina, rutina y diosmina) como fuentes de carbono presentaron colores diferentes. Un tono rosado en el medio FPY con hesperidina; blanco con rutina y amarillento con diosmina (Fig. 5). Cabe destacar que el microorganismo fue capaz de crecer en todos los medios que contenían flavonoides en su composición y con un desarrollo importante en solo 48 h de cultivo.

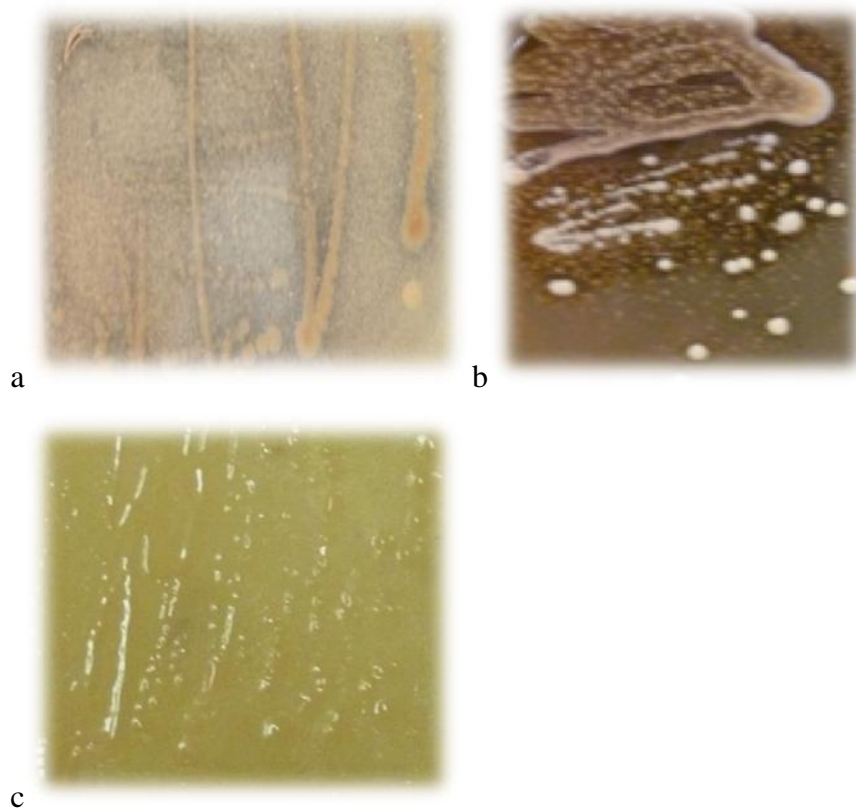


Fig. 5. *C. carnescens* en medio sólido con: (a) hesperidina, (b) rutina y (c) diosmina como fuentes de carbono.

El crecimiento del organismo en cultivo sumergido en medio YM y FPY, este último con el flavonoide hesperidina como fuente de carbono, alcanzó la fase estacionaria alrededor de las 55 h en YM mientras que en FPY alcanzó esta fase a las 45 h (Fig. 6). El medio FPY es más limitado en nutrientes que el medio YM, y esta condición puede explicar las diferencias en los bajos recuentos celulares y la temprana fase estacionaria en el medio con el flavonoide.

La actividad desglicosilante de hesperidina (6-O- α R β G) durante cuatro días de crecimiento en medio FPY-hesperidina presentó niveles mínimos durante la fase de adaptación y la fase exponencial del proceso fermentativo (Fig. 7). Mientras que el pico de máxima producción se encontró en la fase estacionaria de crecimiento, de forma similar a otras enzimas hidrolíticas de origen microbiano (Breccia *et al.*, 1998)

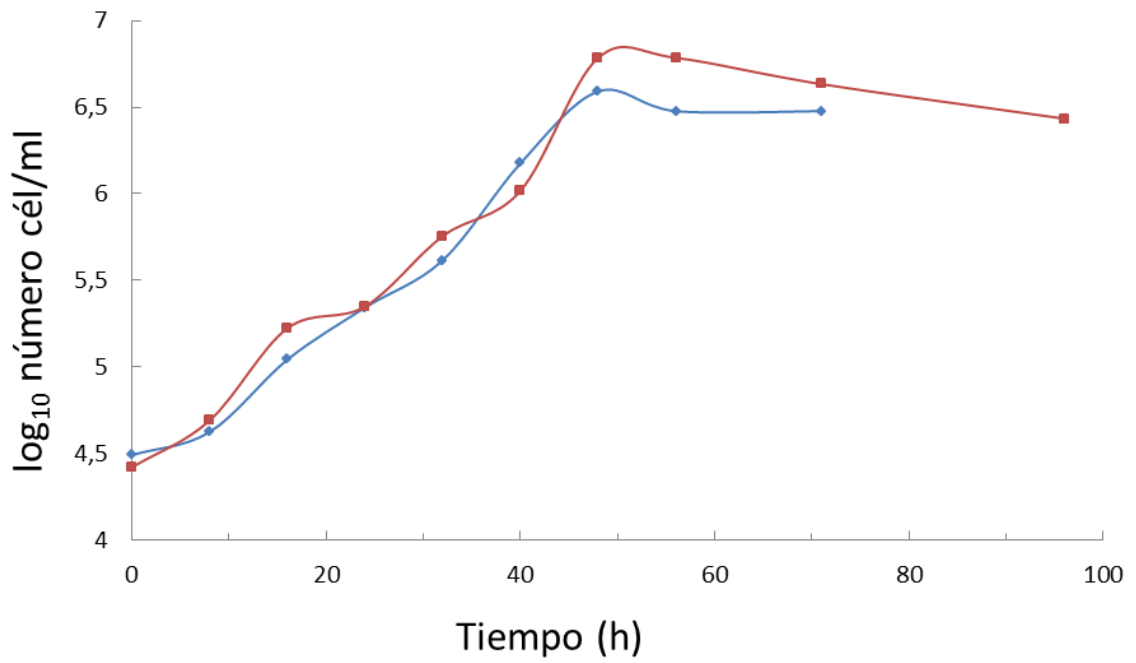


Fig. 6. Crecimiento en lote de la cepa *C. carnescens* Y1503 en medio YM (■) y FPY-hesperidina (◆).

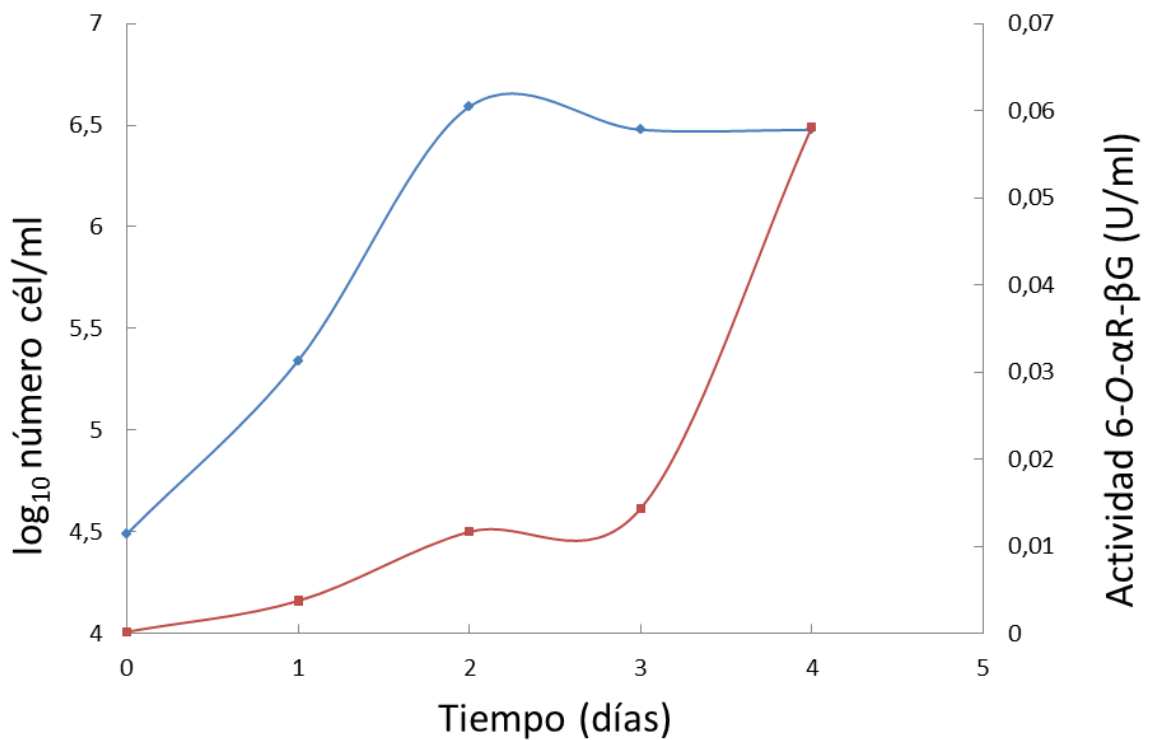


Fig.7. Curva de producción de Actividad 6-O- α R- β G por *C. carnescens* Y1503 en medio FPY-hesperidina. Cél/ml (◆), Actividad 6-O- α R- β G (■)

3.2. Actividad glicosidasa de *C. carnescens*

Luego de cuatro días de crecimiento de *C. carnescens* en un medio agarizado con hesperidina como fuente de carbono, se pueden observar halos de clarificación alrededor de las colonias. Estas zonas de clarificación se utilizaron como fuente de enzimas extracelulares para la hidrólisis enzimática de hesperidina. Los productos de reacción obtenidos mostraron una mancha de naturaleza sacarídica, cuyo Rf difirió de aquellos correspondientes a los monosacáridos (glucosa y ramnosa) y que coincidía con el Rf del disacárido rutinosa (Fig. 8). Además de no encontrar los monosacáridos en la TLC, cuando se utilizó el caldo de cultivo sumergido (FPY-hesperidina), las actividades α -ramnosidasa y β -glucosidasa medidas con sustratos artificiales tampoco fueron detectadas. Estos resultados indican la presencia de una actividad glicosidasa, capaz de clivar el flavonoide hesperidina en una forma endo, es decir liberando rutinosa y hesperetina. Por lo tanto sugieren fuertemente la presencia de una diglicosidasa con especificidad para con el flavonoide 7-O-rutinosilado.

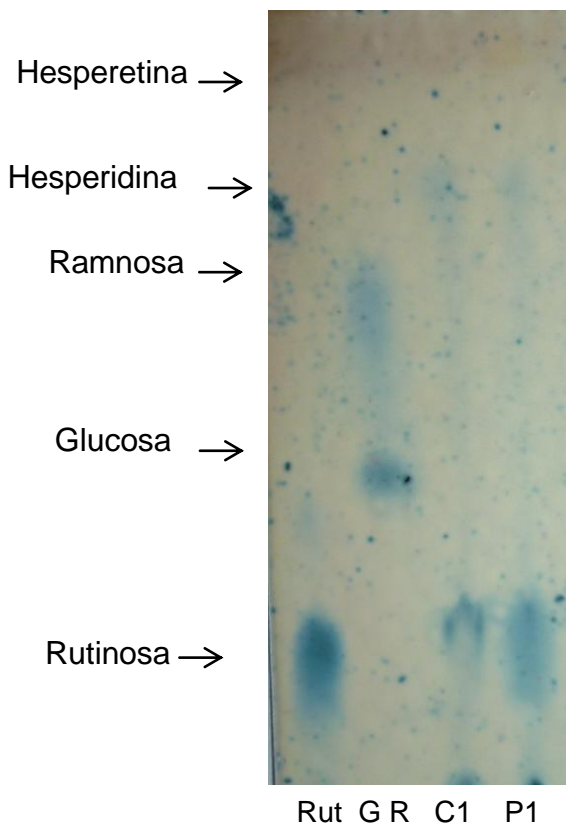


Fig. 8. Cromatografía de los Productos de hidrólisis generados por la actividad 6-O- α R β G de *C. carnescens* con hesperidina como sustrato. Estándares: *Rut*: rutinosa, *G-R* glucosa y ramnosa, *C* control con sobrenadante inactivado (10 min 100°C), *R* reacción de hidrólisis.

Se procedió a estudiar la localización de la actividad diglicosidasa de *C. carnescens* en cultivos de 48h de crecimiento en FPY-hesperidina. Ésta se encontró mayoritariamente ligada a las células (aproximadamente 60%), y en menor medida en el extracto extracelular (Fig 9). Resultados similares se detallan en McMahon *et al.* (1999) donde se determinó que la actividad β -glucosidasa de *Cryptococcus* se encuentra mayoritariamente en la fracción celular.

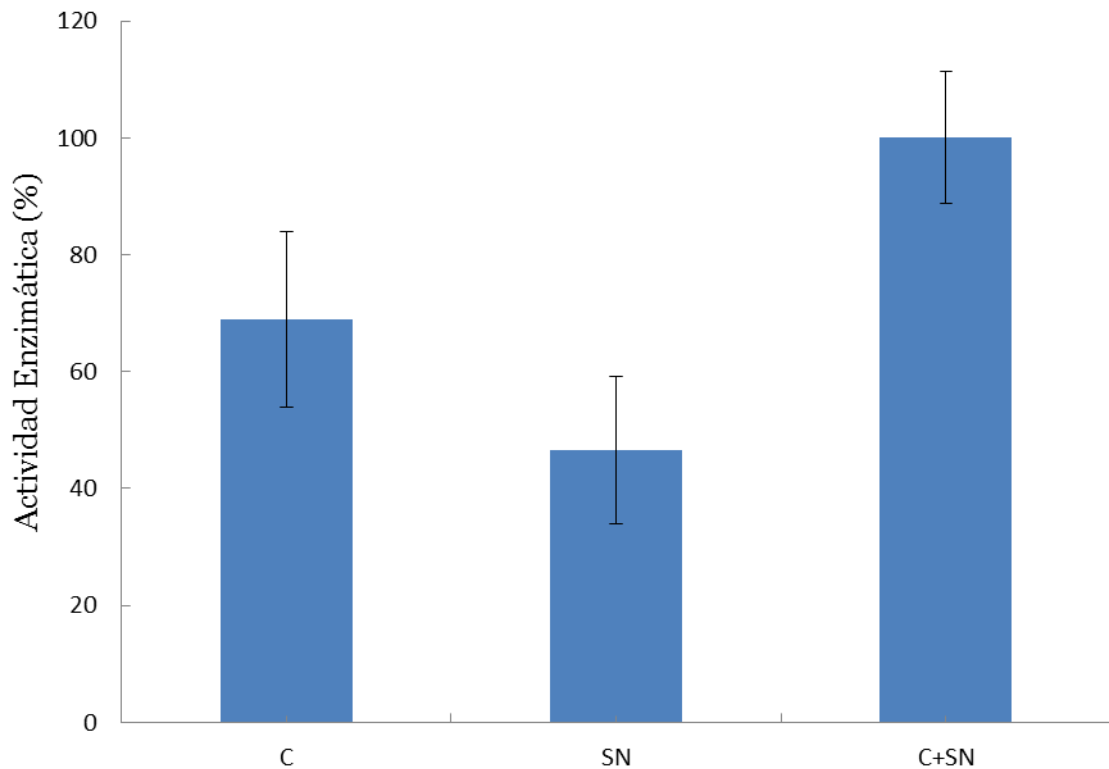


Fig. 9. Localización de la actividad 6-O- α R β G de *C. carnescens* en un cultivo de 48h. C: unida al soma microbiano, SN: extracelular y C+SN caldo de cultivo. Se toma como 100% la actividad encontrada en el caldo de cultivo la cual corresponde a 0,03 U/mL.

Existen numerosas estrategias microbianas para la degradación de macromoléculas tales como polisacáridos. La más común consiste en la secreción de endoglicosidasas extracelulares las cuales hidrolizan los polisacáridos y los oligómeros resultantes incorporados, tal es el caso de la degradación de la celulosa por *Nocardopsis* sp. (Walker *et al.*, 2006) o del xilano, por *Bacillus halodurans* (Breccia *et al.*, 1998).

Una segunda estrategia es la presencia de hidrolasas en la superficie celular, en contacto con el medio externo; ejemplificada por la pululanasa de *Klebsiella oxytoca*. Por último, una tercera estrategia es la importación del polisacárido, tal como ocurre en *Bacteroides* spp., éste a través de un receptor de membrana ingresa al periplasma donde se hallan las

enzimas degradativas (Salyers *et al.*, 1996). Teniendo en cuenta la localización de la actividad 6-O- α R β G de la cepa Y1503, su estrategia de degradación del flavonoide sería similar a la descrita para la pululanasa de *Klebsiella oxytoca*.

3.4. Caracterización de la actividad 6-O- α R β G de *C. carnescens*

Se detectó actividad desglicosilante de hesperidina en el intervalo entre los pH 4- 6, el pico máximo fue a pH 6. Otro pico con un 90% de actividad fue a pH 5 (Fig. 10). El extracto enzimático mantiene más del 60% de la actividad en el rango de pH 4.5 a 6.0 y actividades detectables a pH 4.0, que incrementan las posibilidades de aplicación para la biotransformación de alimentos.

El efecto de la temperatura fue ensayada a pH 6, se encontró un óptimo aparente alrededor de los 55°C (Fig.11). Este comportamiento es beneficioso para aplicaciones en la industria cítrica, ya que las altas temperaturas favorecen la disolución de hesperidina y otros flavonoides (Van Rensburg & Pretorius, 2000). No obstante el biocatalizador exhibió actividad enzimática en un amplio rango de temperaturas.

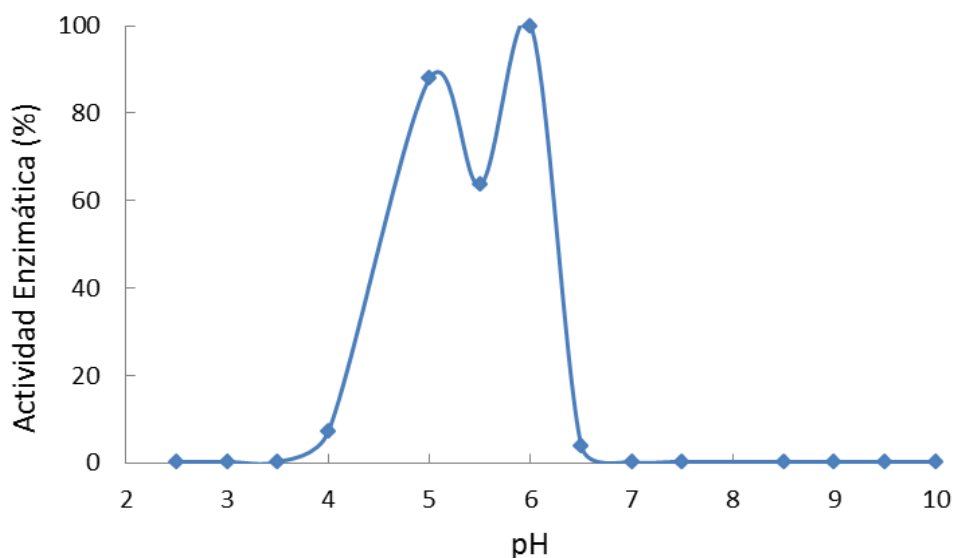


Fig. 10. Actividad glicosidasa de *C. carnescens* en función del pH. El 100% de la actividad corresponde a 0,03 U/ml.

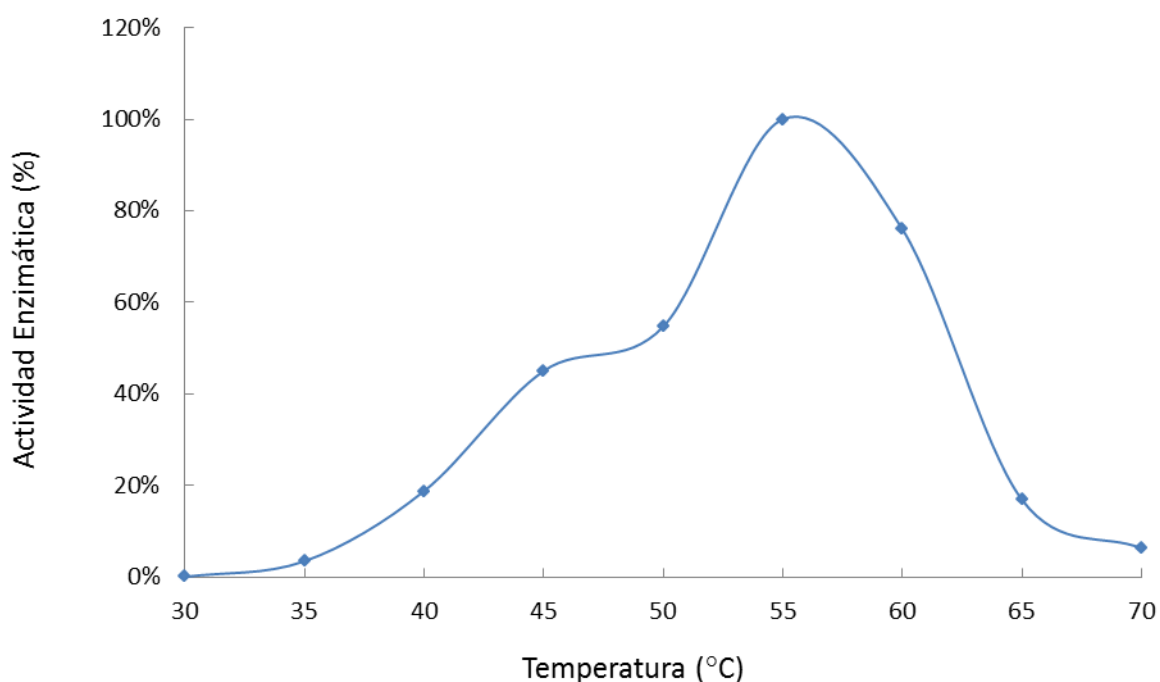


Fig. 11. Actividad 6-O- α R β G de *C. carnescens* en función de la temperatura. El 100% de la actividad corresponde a 0,03 U/ml.

3.5. Transglicosilación

Numerosas glicosidasas han sido descritas para la síntesis de glicoconjugados por transglicosilación o hidrólisis reversa. Si bien serían aplicables para la modificación de fármacos, con el consiguiente aumento en su solubilidad y biodisponibilidad. Nuestro grupo describió la capacidad de 6-O- α R β G de *Acremonium* sp. DSM24697, para producir y transferir por transglicosilación el disacárido rutinosa usando como donores 7-O-rutinosidos de flavonoides (Mazzaferro *et al.*, 2010). Si bien esta enzima puede transferir el disacárido a diferentes aceptores hidroxilados esta no puede hacerlo en moléculas que tienen grupos oxidrilos terciarios o moléculas que carecen de estos (Minig *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta que *C. carnescens* es capaz de hidrolizar el flavonoide hesperidina en rutinosa y hesperetina, se evaluó la capacidad de transferir este residuo sacarídico a otros aceptores diferentes del agua, como etanol y fenol. No se pudo detectar mediante cromatografía de capa fina los productos de transglicosilación (alcoholes rutinosilados). Hasta el momento, no hemos encontrado en la literatura descripciones de reacciones de transglicosilación con enzimas provenientes del género *Cryptococcus*.

3.6. Especificidad de sustrato

El cultivo con hesperidina como fuente de carbono de *C. carnescens* no presentó actividad con los sustratos monoglicosilados (4-metilumbeliferil-glucósido y 4-metilumbeliferil-ramnósido). Sin embargo, el análisis zimográfico mostró una banda de actividad, con un R_f de 0.70, con el sustrato artificial 4-metilumbeliferil-rutinósido. Se observó que esta banda, tiene un R_f mayor al de la enzima 6-*O*- α -ramnosil- β -glucosidasa de *Acremonium* sp. DSM24697 (R_f 0,54) y no se detectaron bandas de actividad con otro sustrato disacárido como el MU-celobiosido (Fig. 12). Estos resultados indican que la actividad encontrada es una endo-glicosidasa específica para el disacárido rutinosa, a diferencia de la β -rutinosidasa promiscua descrita por Nam *et al.*, (2012) la cual es capaz de hidrolizar rutina pero tiene una actividad 15000 veces mayor con el sustrato monoglicosilado.

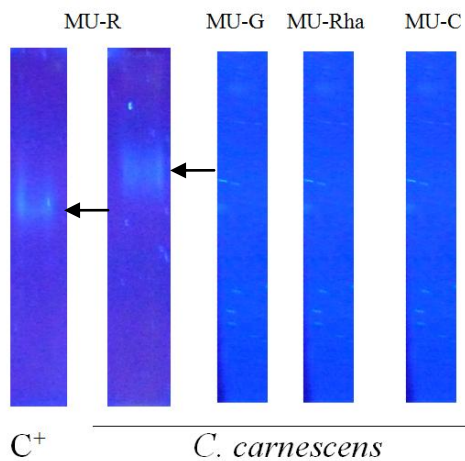


Fig. 12 Análisis zimográfico del caldo de cultivo de *C. carnescens* en medio FPY-hesperidina. Sustratos: MUR: rutinósido, MUG: glucósido, MURha: ramnósido, MUC: celobiosido. C⁺ control 6-*O*- α R β G de *Acremonium* sp. DSM24697).

Estos resultados, confirman que la única actividad detectada luego de 48 h de crecimiento con hesperidina como fuente de carbono fue la diglicosidasa (0,03 U/ml). Sin embargo, cultivos de *C. carnescens* de 96 h de crecimiento produjeron mayor concentración de actividad 6-*O*- α R β G (Fig. 7) y trazas de monoglicosidasas fueron detectadas (≤ 0.001 U l⁻¹ de β -glucosidasa y α -ramnosidasa). Otra cepa del mismo género (*C. bestiolae*) estudiada en el laboratorio produjo actividad monoglicosidasas (β -glucosidasa y α -ramnosidasa) en el mismo medio de cultivo (Neher *et al.* enviado).

A fin de comparar la producción de las actividades enzimáticas desglicosilantes de hesperidina y rutina se cultivó *C. carnescens* en medios sólidos FPY con ambos flavonoides como fuente de carbono. Nuevamente, el análisis zimográfico con muestras de cuatro días de crecimiento en hesperidina mostró una clara banda de actividad con el

sustrato artificial 4-metilumbeliferil-rutinósido. Cuando *C. carnescens* fue cultivado en rutina como fuente de carbono también produjo una banda de actividad diglicosidasa con el mismo Rf de la anterior (Fig.13). Estos resultados sugieren que este microorganismo produce actividad diglicosidasa específica para rutinosa y que podría ser la misma hidrolasa para ambos sustratos.

3.7. Comparación con otras diglicosidasas

Hasta el presente, han sido descritas pocas enzimas que liberan unidades disacáridicas encontradas en plantas y microorganismos. Estas últimas fueron descritas en los géneros *Arthrobacter*, *Aspergillus* y *Penicillium*. En nuestro laboratorio, el hongo *Acremonium* sp. DSM 24697 fue descrito como productor de la diglicosidasa 6-O- α R β G (EC 3.2.1.168), específica para flavonoides 7-O-rutinosilados. Esta misma cepa creciendo con el flavonoide rutina (3-O-rutinosido) produjo una herramienta diferente a la utilizada sobre el sustrato hesperidina, mientras que los resultados obtenidos con *C. carnescens* sugieren la presencia de una diglicosidasa promiscua capaz de hidrolizar ambos flavonoides.

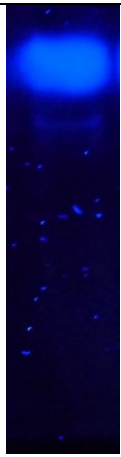

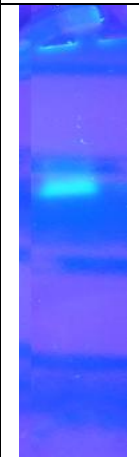



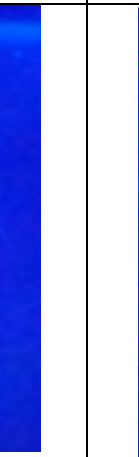
Diglicosidasas eucariotas				Diglicosidasas procariotas		
Rut	Hesp	Hesp	Rut	Hesp	Rut	Hesp
						
<i>Acremonium</i> DSM24697		<i>Cryptococcus</i> <i>carnescens</i>		<i>Actinoplanes</i> <i>missouriensis</i>	<i>Actinoplanes</i> <i>liguriae</i>	<i>Streptomyces</i> SES405

Fig. 13. Análisis zimográfico de diglicosidasas microbianas de diferentes microorganismos.

Por otra parte, no se encuentran descritas en la literatura científica diglicosidasas procariotas. Encontramos dos cepas *Actinoplanes missouriensis* y *Actinoplanes liguriae*, que mostraron bandas de actividad diglicosidasa sobre sustratos rutinosilados, pero A.

missouriensis creció con mayor dificultad en rutina respecto a hesperidina, mientras que *A. liguridae* presento una conducta opuesta. Por último la vía más común de desglicosilación de flavonoides en microorganismos esta aquí ejemplificada con la cepa de *Streptomyces sp.* el cual crece en flavonoides rutinossilados pero no se detectó actividad diglicosidasa, debido a que producen monoglicosidasas (Fig. 13).

4. Conclusiones

C. carnescens es capaz de utilizar los flavonoides hesperidina y rutina como fuentes de carbono.

Con hesperidina no se detectaron actividades monoglicosidasas y produjo una diglicosidasa: 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa EC 3.2.1.168.

La actividad se encontró en forma mayoritaria unida al soma microbiano, fue máxima en la fase estacionaria de crecimiento. Exhibió valores máximos de actividad a pH 6.0 y 55°C.

Con rutina como fuente de carbono produjo una banda de actividad diglicosidasa con el mismo Rf que la encontrada con hesperidina.

Estos resultados sugieren que este microorganismo utiliza el mecanismo de desglicosilación en un solo paso para ambos flavonoides y probablemente la misma hidrolasa en ambos casos.

5. Referencias

- Breccia JD, Siñeriz F, Baigorí MD, Castro R, Hatt-Kaul R. 1998. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Enzyme Microb Technol* 22:42–42
- 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:D233-D238
- Gaberscik A, Voncina M, Trost T, Germ M. 2002. Growth and production of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) treated with reduced, ambient, and enhanced UV-B radiation. *J Photochem Photobiol B: Biology* 66: 30–36
- 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
- Gonzalez C, Martinez A, Vázquez F, Baigori M, Figueroa LIC. 1996. New method of screening and differentiation of exoenzymes from industrial strains. *Biotechnol Techniques*. 10: 519-522
- Günata Z., Blondeel C., Vallier M.J., Lepoutre J.C., Sapis J.C. & Watanabe N. (1998) Anendoglycosidase from grape berry skin of cv. M. Alexandria hydrolyzing potentially aromaticdisaccharide glycosidase. *J. Agric. Food Chem.* 46:2748-2753
- Hemingway KM, Alston MJ, Chappell CG, Taylor AJ. 1999. Carbohydrate-flavour conjugates in wine. *Carbohydr Polym* 38:283–286
- Herrmann K. 1976. Flavonols and flavones in food plants: a review. *J Food Technol* 11: 433–448
- Izzo V, Tedesco P, Notomista E, Pagnott E, Donato A, Trincone A, Tramice A. 2014. α -Rhamnosidase activity in the marine isolate *Novosphingobium* sp.PP1Y and its use in the bioconversion of flavonoids. *J Ind Microbiol Biotechnol* ,105: 95–103
- Juge N, Nøhr J, Le Gal-Coëffet M-F, Kramhøft B, Furniss CSM, Planchot V, Archer DB, Williamson G, Svensson B. 2006. The activity of barley α -amylase on starch granules is enhanced by fusion of a starch binding domain from *Aspergillus niger* glucoamylase. *Biochim Biophys Acta* 1764:275–284
- Lewin, G. 2014. A straightforward access to neohesperidose from naringin by acetolysis. Comparative behaviour of some flavonoid neohesperidosides and rutosides under acetolysis. *Tetrahedron* 70:1492-1496

- Lodder, J. & Kreger-van Rij, N. J. W. (1952). *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Amsterdam: North Holland.
- Manthey JA, Grohmann K. 1996. Concentrations of hesperidin and other orange peel flavonoids in citrus processing byproducts. *J Agric Food Chem* 44:811–814
- Manzanares P, van den Broeck HC, de Graaff LH & Visser J. 2001. Purification and Characterization of Two Different α -L-Rhamnosidases, RhaA and RhaB, from *Aspergillus aculeatus*. *Appl Environ Microbiol* 67:2230-2234
- Marrs B, Delagrave S, Murphy D. 1999. Novel approaches for discovering industrial enzymes. *Curr Opin Microbiol* 2: 241–245
- Mazuelos E M, Conde A V. 2001. Cryptococcosis: microbiological diagnosis and study of in vitro sensitivity. *Quality control SEIMC* 1–5
- Mazzaferro LS, 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. *Carbohydr Res* 347:69–75
- Mazzaferro LS, Breccia JD. 2011. Review: functional and biotechnological insights into diglycosidases. *Biocatalysis and Biotransformations* 29:1-10
- 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
- McMahon H, Zoecklein BW, Fugelsang K & Jasinski Y. 1999. Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol* 23:198-203
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid (DNS) for determination of reducing sugars. *Anal Chem* 31:426–428
- Mining M, Mazzaferro LS, Erra-Balsells R, Petroselli G, Breccia JD. 2011. α -rhamnosyl- β -glucosidase-catalyzed reactions for analysis and biotransformations of plant-based foods. *J Agr Food Chem*. 59:11238-11243
- Nam K, Hong S, Shin K, Oh D. 2012. Quercetin production from rutin by a thermostable β -rutinosidase from *Pyrococcus furiosus*. *Biotechnol Lett* 34:483–489

- Neher B D, Mazzaferro L S, Breccia J D. Bacteria and yeasts as an underexplored source of diglycosidase activity. (Enviado)
- Ogawa JR, Sroufe LA, Weinfield NS, Carlson EA, Egeland B. 1997. Development and the fragmented self: longitudinal study of dissociative symptomatology in a nonclinical sample. *Dev Psychopathol* 9: 855–879
- Puri M, Marwaha SS, Kothari RM, Kennedy JF. 1996. Biochemical basis of bitterness in citrus fruit juices and biotech approaches for debittering. *Crit Rev Biotechnol* 16:145–155
- Salyers A.A., Reeves A. & D’Elia J. 1996. Solving the problem of how to eat something as bigas yourself: Diverse bacterial strategies for degrading polysaccharides. *J. Ind. Microbiol.Biotechnol.* 17:5-6.
- Sarry JE & Gunata Z. 2004. Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chem* 87:509–521
- Takashima M, Sugita T, Shinoda T, Nakase T. 2003. Three new combinations from the *Cryptococcus laurentii* complex: *Cryptococcus aureus*, *Cryptococcus carnescens* and *Cryptococcus peneaus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53:1187–1194
- Thongnest T, Lhinhatrakool T, Wetprasit N, Sutthivaiyakit P, Sutthivaiyakit S. 2013. *Eriosema chinense*: A rich source of antimicrobial and antioxidant flavonoids. *Phytochemistry* 96: 353–359
- Van Rantwijk M, Woudenberg-van Oosterom M, Sheldon RA. 1999. Glycosidase-catalysed synthesis of alkyl glycosides. *J Mol Catal B: Enzymatic* 6: 511–532
- Van Rensburg P. & Pretorius I.S. (2000) Enzymes in Winemaking: harnessing natural catalysts for efficient bio-transformations. *South African Journal of Enology and Viticulture.* 21.
- Verona, O. & Luchetti, G. (1936). Ricerche microbiologiche su dialcuni vini ed alcune uve delle marche. *Boll Reg Inst Super Agrar Pisa* 12, 256–311.
- Walker D., Ledesma P., Delgado O.D. & Breccia J.D. (2006) High endo-beta-1,4-D-glucanase activity in a broad pH range from the alkali-tolerant *Nocardopsis sp.* SES28. *World J. Microbiol.Biotechnol.* 22:761-764.
- Wang D, Kurasawa E, Yamaguchi Y, Kubota K, Kobayashi A. 2001. Analysis of glycosidically bound aroma precursors in tea leaves. 2. Changes in glycoside contents and glycosidase activities in tea leaves during the black tea manufacturing process. *J Agric Food Chem* 49:1900–3

Weiz G. 2012. Enzymatic deglycosylation of 3-O-rutinosil-flavonoids by the fungus *Acremonium* sp. DSM 24697. Thesis UNLPam

Witham , F H, Blaydes, D.F and Devlin, R.M. (1971). Experiments in plant physiology. Van Nostrand Reinhold Company. New York, USA. pp 167-200

Yamamoto S, Okada M, Usui T, Sakata K, Toumoto A, Tsuruhami K. 2006. Diglycosidase isolated from microorganisms. US Patent 7109014

Yamamoto I, Muto N, Nagata E, Nakamura T, Suzuki Y. 1990. Formation of a stable L-ascorbic acid alpha-glucoside by mammalian alpha-glucosidase-catalyzed transglucosylation. *Biochim Biophys Acta* 1035: 44–50

Yeoman CJ, Han Y, Dodd D, Schroeder CM, Mackie RI, Cann IK. 2010. Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. *Adv Appl Microbiol* 70:1–55