

*Glicosidasas con potencial biotecnológico en la
industria alimenticia*

Laura Mazzaferro



Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad Nacional de La Pampa

2007

*Tesina para alcanzar el grado de Licenciado en Química de la
Universidad Nacional de La Pampa.*

Autor: Laura Mazzaferro

Director: Dr. Javier D. Breccia

Jurado:

Dra. Alicia Grassano

Dra. Ana Lía Ronchi

Agradecimientos:

A la Universidad Nacional de La Pampa, donde comencé y finalicé mi carrera.

A mi Director de tesina, Dr. Javier D. Breccia, por sus valiosos aportes científicos, su eterna disposición, flexibilidad e infinita confianza brindada a lo largo de estos dos años.

Al personal docente y técnico del Departamento de Química de la FCEyN, por su colaboración desinteresada.

A “las chicas”, porque sí, porque son mis amigas, me quieren y es lo único que me importa.

A mis amigos y compañeros, por haber compartido tantos momentos.

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

A mi familia, a la que le debo todo.

ÍNDICE

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Biotransformaciones industriales	4
1.2. El aroma del vino	4
1.3. Bioflavonoides y su importancia en la industria cítrica	6
1.4. Glicosidasas	7
1.4.1 Hidrólisis de diglicósidos	8
1.5 La clase Actinobacteria: fuente de enzimas extracelulares	9
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1. Origen de los aislamientos	11
3.2. Medios y condiciones de cultivo	11
3.2.1. Selección	11
3.2.2. Inóculo	12
3.2.3. Producción de actividad deglicosilante de flavonoides	12
3.3. Identificación de las cepas aisladas	13
3.4. Determinación de actividad α -L-ramnosidasa	13
3.5. Determinación de actividad β -D-glucosidasa	13
3.6. Determinación de actividad deglicosilante de flavonoides (HSPasa)	14
3.7. Determinación de los productos de la hidrólisis enzimática	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
4.1. Selección y aislamiento de microorganismos productores de enzimas deglicosilantes de flavonoides	15
4.2. Características culturales de la cepa SES201	18
4.2.1. Crecimiento y esporulación en cultivo sumergido	19
4.2.2. Efecto del valor de pH sobre el crecimiento y la producción de enzimas deglicosilantes de flavonoides	19

4.2.3. Efecto de la concentración de cloruro de sodio sobre el crecimiento y la producción de actividad glicosidasa	20
4.2.4. Cinética de la producción de actividad hesperidina glicosidasa (HSPasa)	21
4.3. Actividad glicosidasa de la cepa SES201	22
4.3.1. Modo de reacción	22
4.3.2. Efecto el pH	24
4.3.3. Efecto de la temperatura	25
4.3.4. Efecto de la concentración de etanol sobre la actividad enzimática	26
4.3.5. Localización de la actividad HSPasa	28
5. CONCLUSIONES	30
ABREVIATURAS	32
REFERENCIAS	33

RESUMEN

Se realizó un programa de aislamiento que permitió seleccionar microorganismos productores de glicosidasas extracelulares de interés en la industria alimenticia. En los procesos de elaboración del vino y los jugos de fruta resulta esencial deglicosilar terpenos y flavonoides, a fin de mejorar su calidad. Dado que dichos compuestos generalmente presentan un residuo disacárido en su estructura, se seleccionó la cepa SES201 por ser productora de una hidrolasa disacárido específica. Esta actividad mostró una temperatura óptima de 60°C y dos máximos de actividad a valores de pH 5.3 y 8.6. Al igual que otras glicosidasas descritas en la literatura, presentó una disminución importante de su actividad en presencia de etanol. La cepa SES201 fue identificada como un procarionte perteneciente a la clase *Actinobacteria*, mientras que las hidrolasas disacárido específicas descritas hasta el momento son de origen eucarionte (vegetales y hongos).

El mecanismo de reacción de la actividad glicosidasa de la cepa SES201 permitiría realizar el proceso de mejoramiento del aroma de vinos básicos o la deglicosilación de flavonoides de jugos de fruta en un solo paso y con un solo catalizador, a diferencia del proceso actual de hidrólisis enzimática secuencial con una α -L-ramnosidasa y una β -D-glucosidasa.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Biotransformaciones industriales

A través de la historia de la humanidad, los microorganismos han sido de fundamental importancia social y económica. El hombre los ha usado en la producción de alimentos y bebidas muy temprano en la historia, incluso sin saber de su existencia. Los sumerios y babilonios elaboraban cerveza antes del 6 000 a.C., se hallan referencias del vino en el Génesis, y los egipcios utilizaban levaduras para obtener pan. Sin embargo, el conocimiento de la producción de sustancias químicas tales como alcoholes y ácidos orgánicos por fermentación es relativamente reciente y los primeros datos en la literatura aparecieron en la segunda mitad del siglo XIX.

Con el transcurso del tiempo, se descubrió que los microorganismos podían modificar ciertos compuestos por reacciones químicas simples, bien definidas, catalizadas por enzimas. Hoy en día, dichos procesos son llamados “biotransformaciones”.

La biocatálisis es en cierta manera tecnología “verde”. Las reacciones enzimáticas pueden ser llevadas a cabo en agua, a temperatura ambiente y pH neutro, sin necesidad de altas presiones y condiciones extremas, con el consiguiente ahorro de energía. Es por ello que el estudio de enzimas con potencial aplicación industrial resulta prometedor, siendo un campo en creciente desarrollo (Liese et al., 2000).

1.2. El aroma del vino

En la vinificación, la fruta predominante es *Vitis vinifera*, siendo las diferencias varietales determinantes del estilo del vino, su calidad y precio. Asimismo, el suelo, el clima y las prácticas de cultivo tienen gran impacto en el sabor y el aroma del producto terminado.

Los precursores de aroma en la uva son principalmente conjugados diglicosilados de residuos alifáticos, C₁₃-norisoprenoides, metabolitos del ácido shikímico y monoterpenos (Fig. 1.1), siendo éstos últimos los más importantes (Linskens & Jackson, 1995).

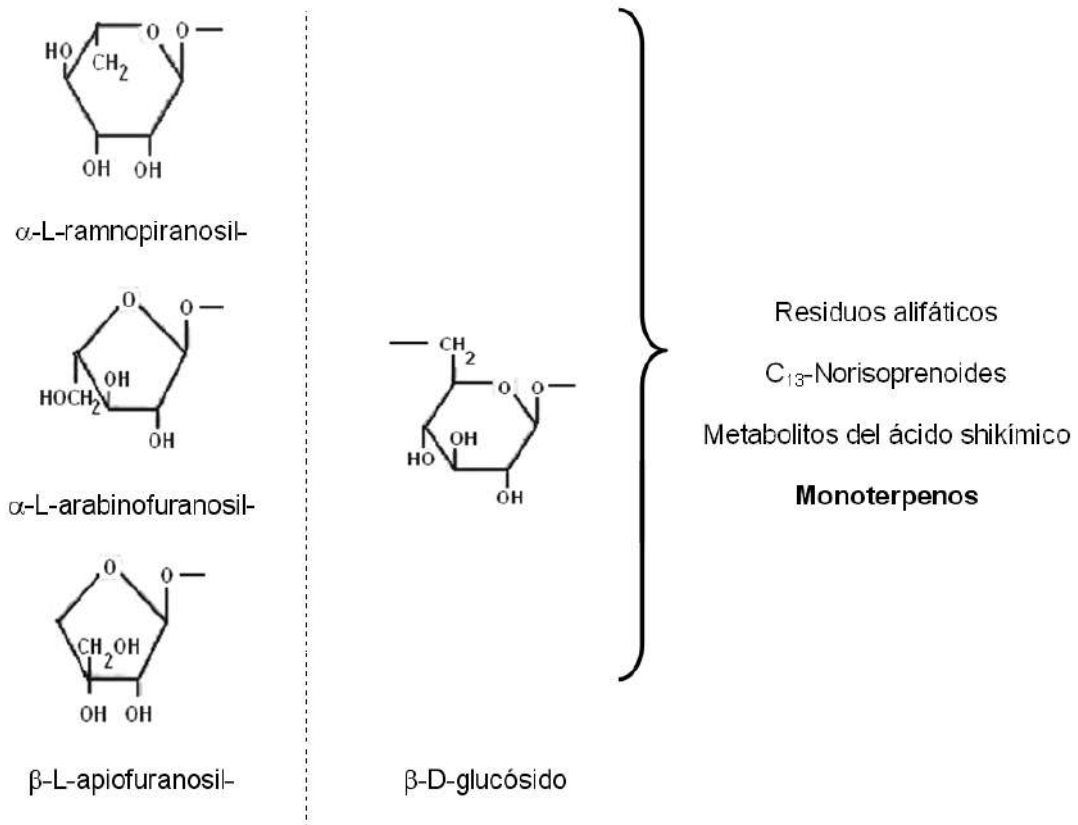


Figura 1.1. Estructura general de los precursores de aroma en el vino (Mendes Ferreira et al., 2001).

Durante el proceso de vinificación, deben ser liberados de los azúcares para dar las agliconas volátiles –y por ende aromáticas- tales como linalool y geraniol, entre otras (Fig. 1.2) (Mendes Ferreira et al., 2001).

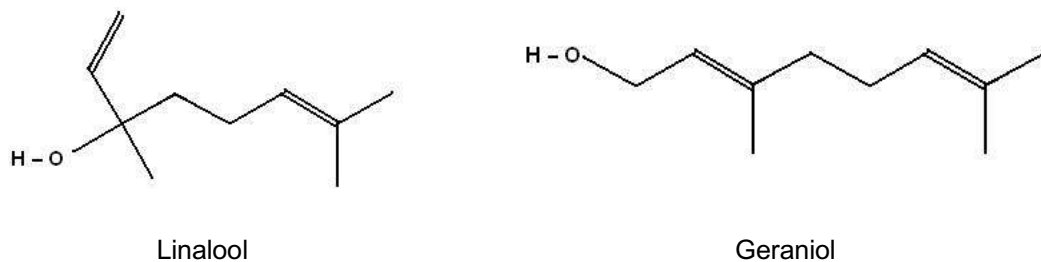


Figura 1.2. Estructura química de terpenoles volátiles presentes en el vino.

En la industria esto se logra mediante el uso de extractos enzimáticos comerciales que contienen glicosidasas específicas (Mendes Ferreira et al., 2001).

1.3. Bioflavonoides y su importancia en la industria cítrica

Los bioflavonoides ($C_6-C_3-C_6$) son metabolitos secundarios de las plantas vasculares, de naturaleza fenólica. Se pueden clasificar en varias familias –flavonas, flavonoles, flavanonas (Fig. 1.3), etc.- según cambios en su estructura básica. Poseen varios grupos hidroxilo (-OH) unidos a su estructura de anillo y se encuentran normalmente como glicósidos. La glucosa es el residuo de glicosilación más frecuente. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona o flavonoide respectivo (Pérez Trueba, 2003).

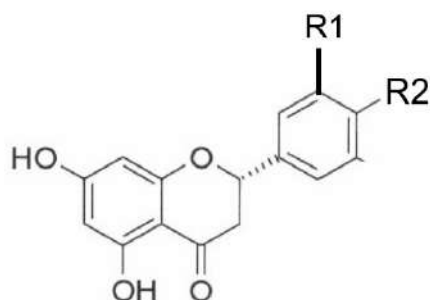


Figura 1.3. Estructura química de las flavanonas eriodictol, hesperetina y naringenina (USDA).

Flavanona	R1	R2
Eriodictiol	OH	OH
Hesperetina	OH	OMe
Naringenina	H	OH

Su función principal en las plantas es la protección ante enfermedades de orígenes bacteriano y fúngico. Dada su ubicuidad en plantas, son parte de la dieta humana y otros animales. Poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antialérgicas y anticancerígenas, entre otras (Robards & Antolovich, 1997).

Los cítricos son una fuente importante de flavonoides. Las flavanonas juegan un papel importante en la calidad del jugo de fruta y de la fruta misma. La hesperidina, por ejemplo, contribuye a la turbidez del jugo de limón y naranja; mientras que la naringina da sabor amargo al pomelo (Berhow et al., 1998). Ambos son flavonoides diglicosilados, y su hidrólisis mediante glicosidasas se emplea industrialmente para clarificación de jugos de fruta y remoción del sabor amargo, respectivamente (Manzanares et al., 1997).

1.4. Glicosidasas

Las glicosidasas (EC 3.2.1.-) son un grupo de enzimas que hidrolizan el enlace glicosídico entre dos o más carbohidratos, o bien el enlace entre un carbohidrato y un residuo de otra naturaleza (terpenos, flavononas, etc.).

La hidrólisis enzimática del enlace glicosídico tiene lugar mediante una hidrólisis ácida, que requiere dos residuos críticos: un donador de protones, y un grupo nucleófilo. Dicha hidrólisis ocurre por medio de dos mecanismos principales, dando por resultado una conservación o bien una inversión de la configuración anomérica.

Las glicosidasas que llevan a una inversión de la configuración anomérica lo hacen mediante una sustitución nucleofílica simple (Fig. 1.3). La hidrólisis de un enlace glicosídico β da un producto de configuración α , o viceversa. La maquinaria de estas enzimas involucra dos carboxilatos catalíticos para proveer:

- Una base que actúe sobre la molécula de agua para generar OH^- (grupo atacante).
- Un ácido que catalice la remoción del grupo saliente.

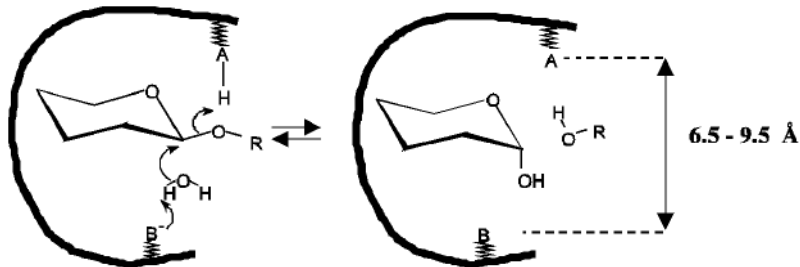


Figura 1.3. Catálisis llevada a cabo mediante sustitución nucleofílica simple.

Por otra parte, las glicosidasas que llevan a una retención de la configuración anomérica, lo hacen mediante un mecanismo de desplazamiento doble (Fig. 1.4). 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 residuo glicosídico-enzima. En el segundo paso –deglicosilación–, 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 transglicosilación), el cual hidroliza el intermediario formado.

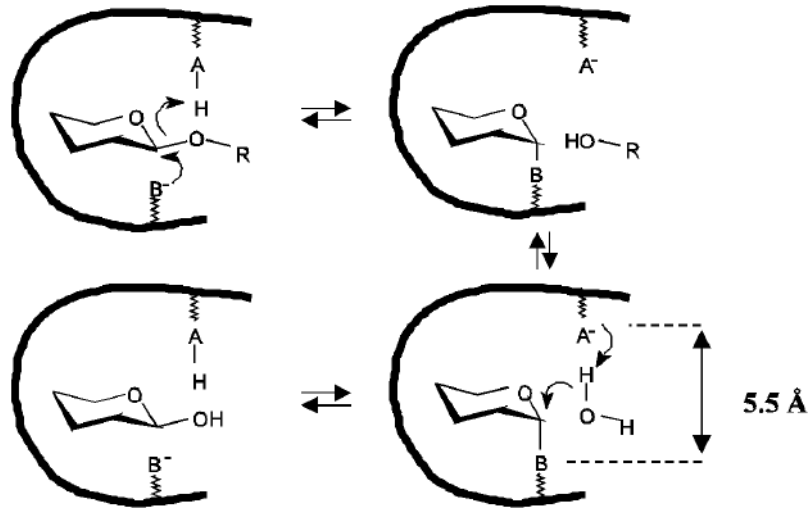


Figura 1.4. Catálisis llevada a cabo mediante una doble sustitución nucleofílica.

1.4.1 Hidrólisis de diglicósidos

La hidrólisis de diglicósidos se realiza mediante un mecanismo secuencial: una primera monosacaridasa cliva el enlace glicosídico, luego una β -D-glucosidasa libera la aglicona (Fig. 1.5) (Günata et al., 1988; 1998). En el caso de los precursores de aroma en vinos, el enlace glicosídico es clivado por una α -L-ramnosidasa, una α -L-arabinofuranosidasa o una β -D-apiosidasa, dependiendo del precursor. Luego, una β -D-glucosidasa libera la aglicona volátil (Gallego et al., 2001).

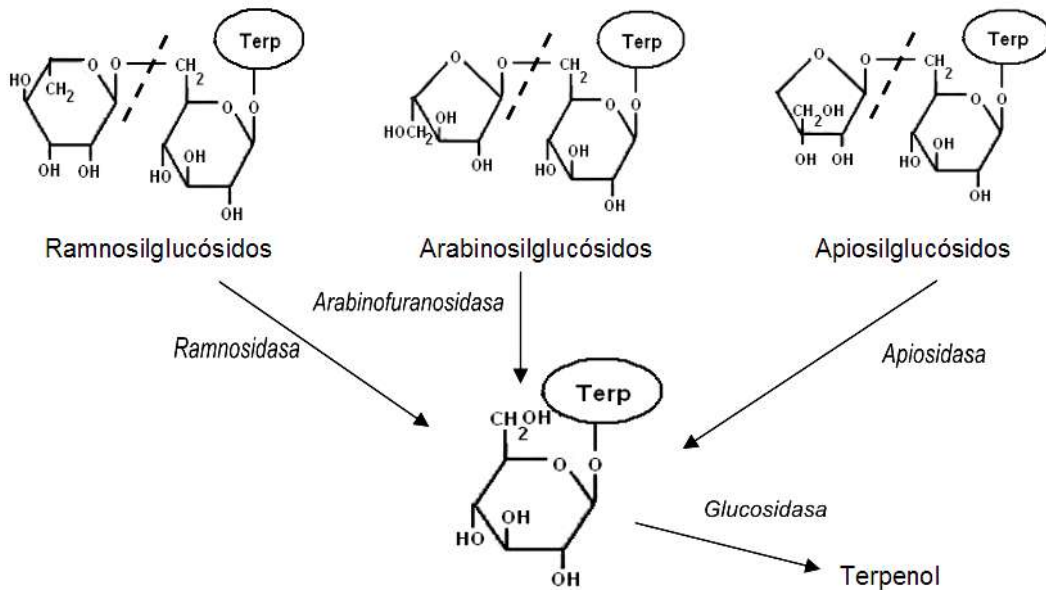


Figura 1.5. Mecanismo secuencial de hidrólisis de diglicósidos precursores de aroma en vino.

(Van Rensburg & Pretorius, 2000)

1.5 La clase Actinobacteria: fuente de enzimas extracelulares

Los actinomicetos constituyen un grupo de bacterias Gram+ filamentosas, con alto contenido en GC. En muchos sentidos son comparables con los hongos, ya que su crecimiento en red da lugar a un micelio y en su gran mayoría producen esporas. Habitan preferentemente el suelo y son los responsables del característico “olor a tierra”. Los valores de pH alcalinos y neutros, en general, son más favorables para el crecimiento. Producen enzimas extracelulares que les permiten hidrolizar polímeros tales como almidón, celulosa, quitina, e incluso gomas, para luego utilizar los productos. Es por ello que actúan como descomponedores de un gran número de sustratos, siendo especialmente importantes en la degradación de compuestos recalcitrantes (Madigan et al., 2004; Nguyen et al., 2005; USDA).

El aislamiento de cepas productoras de enzimas extracelulares apropiadas para objetivos biotecnológicos puede realizarse a partir de muestras de suelo. Para ello se utiliza un medio alcalino, que contenga un sustrato de interés como fuente de carbono. Dada la versatilidad nutricional de los actinomicetos –un aislado único puede ser capaz de utilizar por encima de 50 fuentes de carbono diferentes-, este procedimiento frecuentemente conduce a cepas interesantes (Madigan et al., 2004).

2. OBJETIVOS

2.1. Seleccionar microorganismos productores de glicosidasas capaces de escindir los azúcares de compuestos recalcitrantes –flavonoides, terpenoides-.

2.2. Estudiar la producción de enzimas deglicosilantes de la cepa seleccionada.

2.3. Lograr una caracterización preliminar de la enzima, enfocando la misma hacia características de relevancia industrial –vitivinícola y citrícola-.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Origen de los aislamientos

Los aislamientos se realizaron a partir de muestras de suelo y agua de mar del sur argentino (Antártida, Parque Nacional El Calafate, Tierra del Fuego). Las cepas aisladas pasaron a formar parte de la colección de microorganismos de la cátedra Microbiología de Alimentos, FCEyN, UNLPam. También se testearon cepas existentes previamente en el cepario del laboratorio.

3.2. Medios y condiciones de cultivo

3.2.1. Selección

a) Enriquecimiento: Se resuspendieron las distintas muestras en solución fisiológica estéril y se sembraron en tubos de ensayo con medio de cultivo. Composición (g L⁻¹): 2.0 peptona de leche; 4.0 extracto de levadura; 5.0 hesperidina y 100 mM buffer fosfato de sodio (pH 6). Se incubó en agitador rotatorio a 250 rpm con 2.5 cm de excentricidad, a 30°C, hasta observar crecimiento.

b) Aislamiento: Se sembró en placas mediante diluciones seriadas y siembra en estría, a partir de los tubos de enriquecimiento. Composición (g L⁻¹): 1.0 peptona de leche; 2.0 extracto de levadura; 5.0 hesperidina y 1.5 agar. Para ajustar el pH se utilizaron 120 mM buffer ácido cítrico/fosfato de sodio (pH 3); 100 mM buffer fosfato de sodio (pH 6) y 100 mM Na₂CO₃ (pH 10). Incubación a 30°C y 5°C hasta observar crecimiento.

c) Producción de biomasa y conservación: Las colonias aisladas fueron repicadas en 20 mL de medio Luria-Bertani (LB). Composición (g L⁻¹): 10.0 peptona de leche; 5.0 extracto de levadura; 10.0 NaCl y 100 mM buffer fosfato de sodio (pH 6). Se incubó en agitador rotatorio a 250 rpm con 2.5 cm de excentricidad, a 30°C, hasta observar crecimiento. Se centrifugó a

10000 rpm durante 10 minutos y las células se resuspendieron en 50%_{p/v} glicerol; se conservaron a -18°C.

3.2.2. Inóculo

Para realizar el inóculo de los medios de producción se utilizaron las mismas condiciones que en el apartado 3.2.1.c, pero ajustando a pH con 100 mM buffer ácido cítrico/citrato de sodio (pH 5).

3.2.3. Producción de actividad deglicosilante de flavonoides

La producción de actividad deglicosilante extracelular se realizó bajo cultivo sumergido. Composición (g L⁻¹): 1.0 peptona de leche; 2.0 extracto de levadura; 5.0 hesperidina y 100 mM buffer para ajustar el pH.

a) Influencia del pH: Se cultivó la cepa seleccionada ajustando el pH con buffer ácido cítrico/fosfato de sodio (pH 3), buffer ácido acético/acetato de sodio (pH 4.5), buffer ácido cítrico/citrato de sodio (pH 5), buffer fosfato de sodio (pH 6), buffer Tris-HCl (pH 7.5-9) y buffer carbonato de sodio (pH 10). Se incubó en agitador vaivén, a 20°C durante 7 días. Se centrifugó el cultivo y conservó el sobrenadante a -18°C. También se cultivó en medio LB bajo las mismas condiciones y se midió la producción de biomasa.

b) Influencia de la concentración de NaCl: Se cultivó la cepa seleccionada a pH 6 con concentraciones de NaCl comprendidas entre 0 y 3.0 mol L⁻¹. Se incubó en agitador vaivén, a 20°C durante 6 días. Se centrifugó el cultivo y conservó el sobrenadante a -18°C. También se cultivó en LB bajo las mismas condiciones y se midió la producción de biomasa.

c) Curva de producción de actividad: Se cultivó la cepa seleccionada en fermentador encamisado de 0.2 L de capacidad (volumen de trabajo: 0.15 L), con control de temperatura (25°C) a pH 6. Se tomaron muestras a intervalos regulares de 24 h durante 4 días y se conservaron los sobrenadantes a -18°C hasta su procesamiento.

d) Fermentación: se llevó a cabo en reactor de 1.2 L de capacidad (volumen de trabajo: 0.6 L) con aeración y agitación mecánica. Se reguló el pH con 100 mM buffer ácido cítrico/citrato de

sodio (pH 5). Se incubó a temperatura ambiente (~25°C) hasta esporulación del microorganismo (~5 días). El cultivo se filtró y se conservó el sobrenadante a -18°C.

3.3. Identificación de las cepas aisladas

Se realizó una identificación preliminar de las cepas aisladas mediante observación visual directa y microscópica.

3.4. Determinación de actividad α -L-ramnosidasa

La actividad ramnosidasa se determinó utilizando p-nitrofenil- α -L-ramnopiranosido (p-NRP) como sustrato de acuerdo al método propuesto por Romero et al. (1985). La actividad se expresa en nanokatales (katal = mol p-NRP s⁻¹). La incubación se realizó utilizando 40 mM buffer fosfato de sodio (pH 6) a 38°C. Se utilizó la cepa productora de referencia *Penicillium decumbens* CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures) 318.48.

3.5. Determinación de actividad β -D-glucosidasa

La actividad glucosidasa se determinó utilizando p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (p-NPG) como sustrato de acuerdo al método propuesto por Spagna et al. (2000). La actividad se expresa en nanokatales (katal = mol p-NPG s⁻¹). La incubación se realizó utilizando buffer 40 mM fosfato de sodio (pH 6) a 38°C.

3.6. Determinación de actividad deglicosilante de flavonoides (HSPasa)

La determinación de actividad glicosidasa se realizó cuantificando la liberación de azúcares reductores a partir de hesperidina 0.125%_{o/p/v} de acuerdo a Miller (1959). Se definió 1 katal como la cantidad de enzima que libera 1 mol de disacárido por segundo, expresado como maltosa.

a) Estudios de producción de actividad: la incubación del sobrenadante con hesperidina se realizó utilizando 40 mM buffer fosfato de sodio (pH 6) a 38°C.

b) Efecto del pH: se utilizó buffer universal en el rango de pH 3.6 a 10.8, con incubación de 2 h a 38°C.

c) Efecto de la temperatura: se realizó utilizando 40 mM buffer ácido cítrico/citrato de sodio (pH 5); con temperaturas comprendidas entre 4 y 91°C. Los tiempos de incubación se regularon de modo tal que la actividad enzimática mantuviera velocidades iniciales.

d) Efecto del etanol: se incubó el sobrenadante con el sustrato y concentraciones de etanol comprendidas entre 0 y 30%_{o/v/v}, usando 40 mM buffer ácido cítrico/citrato de sodio (pH 5), con temperaturas de 38 y 60°C.

3.7. Determinación de los productos de la hidrólisis enzimática

Se realizó una hidrólisis incubando el sobrenadante con el sustrato hesperidina 0.125 %_{o/p/v} en 50 mM buffer fosfato de sodio (pH 6) a 37°C. Los productos de dicha reacción fueron sometidos a un análisis cromatográfico en capa fina de silicagel 60W. El sistema de solventes utilizado fue acetato de etilo:isopropanol:agua (6:4:3). Se reveló con reactivo de antrona (Witham et al., 1971). El mismo procedimiento se repitió utilizando los productos de la hidrólisis enzimática, seguida de hidrólisis química (6 M HCl, 10 minutos a 100°C).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Selección y aislamiento de microorganismos productores de enzimas deglicosilantes de flavonoides

Se realizó una selección de microorganismos productores de glicosidasas partiendo de 6 muestras de suelo de diferentes regiones del sur argentino (Antártida, Parque Nacional El Calafate, Tierra del Fuego). Para el enriquecimiento se emplearon medios de cultivo con flavonoides como única fuente de carbono. Los aislamientos se realizaron a tres valores de pH: 3, 6 y 10.

Los flavonoides utilizados fueron hesperidina y naranjina. Los mismos son insolubles en agua. En su estructura cuentan con un disacárido de ramnosa y glucosa (Fig. 4.1).

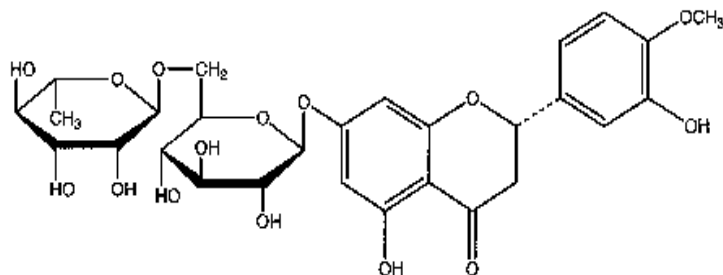


Figura 4.1. Hesperidina

Se aislaron alrededor de 150 microorganismos capaces de crecer en dichos medios y se observaron 2 aislamientos que producían halos de clarificación (Fig. 4.2). No obstante cuando se realizaron cultivos sumergidos, otros microorganismos clarificaron el medio de cultivo, indicando que estos también eran capaces de degradar el sustrato. Así, se seleccionaron 16 cepas para una posterior evaluación.

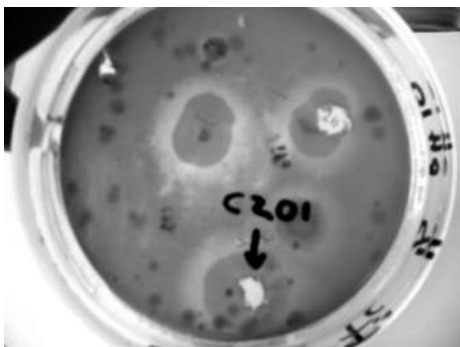
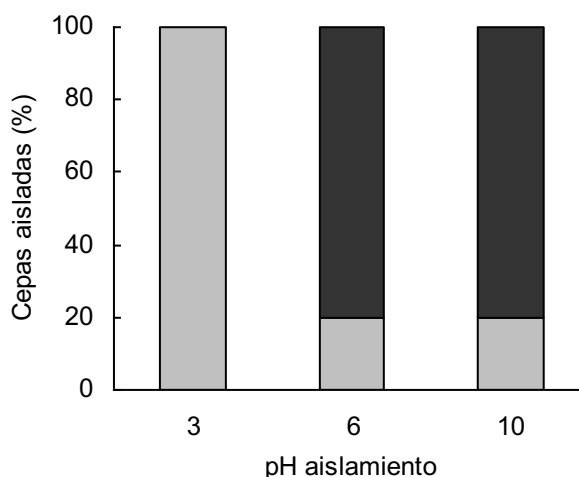


Figura 4.2. Halos de clarificación alrededor de las colonias creciendo con hesperidina como fuente de carbono.

Tanto los hongos como las bacterias –principalmente actinomicetos- descomponen un amplio espectro de sustratos recalcitrantes. Mientras que los primeros lo hacen a bajos valores de pH, las últimas son más activas a pH neutro y alcalino. Se encontró una correlación entre el pH al que se realizaron los aislamientos y los porcentajes de eucariontes y procariontes obtenidos. Mientras que a pH 3 el 100% de los aislamientos fueron eucariontes –hongos filamentosos en su mayoría de los géneros *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus*-, a pH 6 y 10 sólo representaron el 20% de los aislamientos (Fig. 4.3). El 50% de los procariontes aislados a pH 10 fueron presuntamente identificados como miembros de la clase *Actinobacteria*.

Figura 4.3. Porcentaje de procariontes (■) y eucariontes (■) en función del pH al que se realizaron los aislamientos.



Luego, se determinaron las actividades α -L-ramnosidasa, β -D-glucosidasa y deglicosilante de hesperidina en el sobrenadante de los cultivos sumergidos de los diferentes aislamientos (Fig. 4.4). Tanto la actividad α -L-ramnosidasa como β -D-glucosidasa se cuantificaron utilizando

sustratos artificiales (ver Materiales y métodos) mientras que la actividad deglicosilante corresponde a la liberación de azúcares reductores desde el sustrato natural (hesperidina).

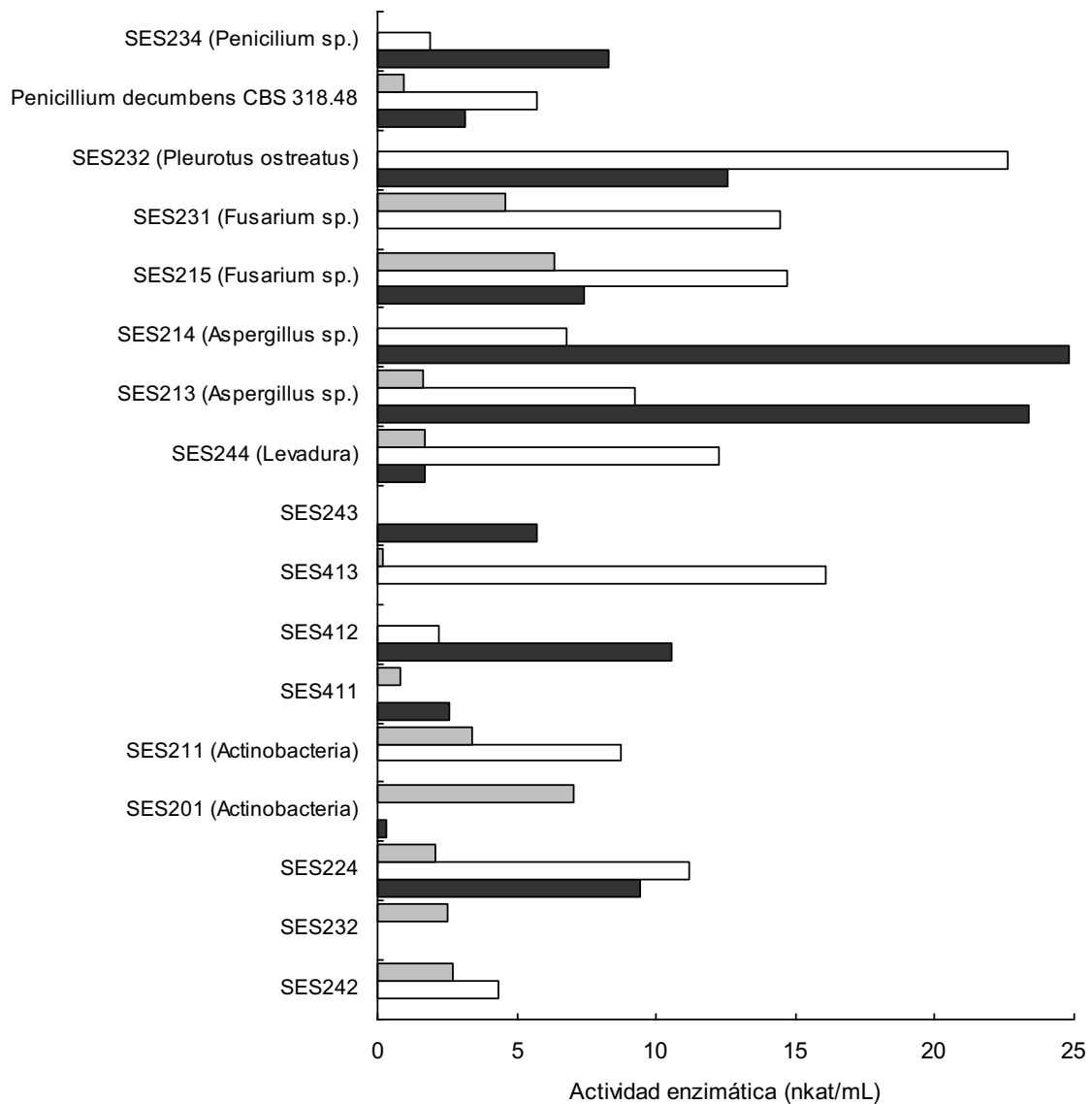


Figura 4.4. Actividad enzimática extracelular α -L-ramnosidasa (■), β -D-glucosidasa (□) y deglicosilante de hesperidina $\times 10^{-1}$ (■).

Se puede observar que los valores de actividad más altos se encontraron con los microorganismos eucariontes que están descritos en la literatura como los mayores responsables del reciclado de los flavonoides en los ecosistemas (Manzanares et al., 2001). El aislamiento SES201 no mostró actividades α -L-ramnosidasa y β -D-glucosidasa extracelulares,

mientras que sí fue capaz de deglicosilar el flavonoide hesperidina. Por esta razón se seleccionó la cepa SES201 para estudios posteriores.

4.2. Características culturales de la cepa SES201

La cepa SES201 fue identificada por observación visual directa y microscópica, como perteneciente a la clase *Actinobacteria*. Presenta colonias rugosas, opacas y compactas, de apariencia pulverulenta, de color blanco grisáceo a rosado y olor a tierra húmeda característico. Abundante presencia de hifas aéreas y en cultivo sumergido, crecimiento en pellets (Fig. 4.5).

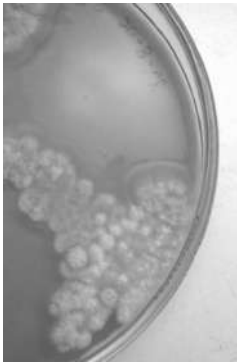
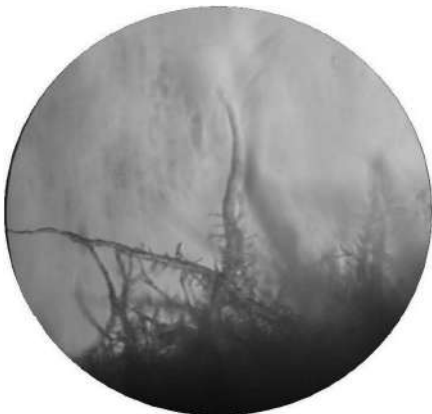


Figura 4.5. Colonias de SES201 creciendo en medio LB.

En cuanto a la morfología microscópica, presenta hifas septadas de longitud indefinida, ramificadas y formación de esporas (Fig. 4.6).

a)



b)



Figura 4.6. Micrografía de hifas aéreas (a) e hifa joven (b) de SES201.

4.2.1. Crecimiento y esporulación en cultivo sumergido

La mayoría de los actinomicetos sólo esporula en medio sólido, mientras que el crecimiento en cultivo sumergido está restringido a la formación de micelio vegetativo, en pellets. Se encontró que la cepa SES201, al ser cultivada en un medio líquido que contenía hesperidina, en condiciones adecuadas de aeración y agitación, forma micelio fragmentado y es capaz de esporular. En las mismas condiciones, pero utilizando LB, dicha cepa no esporuló, observándose crecimiento en pellets.

Se ha descrito en la bibliografía el uso de un sistema de cultivo de dos fases aplicable a estreptomicetos –clase *Actinobacteria*-. Consiste en el uso de perlas de vidrio para simular las partículas del suelo, hábitat natural de dichos microorganismos, inmersas en medio líquido, para favorecer la diferenciación (Nguyen et al., 2005). La hesperidina es un sólido pulverulento que permanece en suspensión en el medio de cultivo (solubilidad en agua 0.02 g L⁻¹). La misma podría estar actuando, al igual que las perlas de vidrio, como simulador de las partículas del suelo y explicaría por qué la cepa SES201 fue capaz de esporular en cultivo sumergido con esta fuente de carbono.

El hecho de que el microorganismo forme micelio fragmentado en lugar de pellets tiene importantes implicancias biotecnológicas, en relación con su facilidad de cultivo. En primer lugar, los nutrientes se encuentran más accesibles para todas las células. Aumentando la tasa de crecimiento y el rendimiento del producto deseado por unidad de biomasa. Además, la viscosidad es relativamente más baja, facilitando el mezclado y la aeración.

4.2.2. Efecto del valor de pH sobre el crecimiento y la producción de enzimas deglicosilantes de flavonoides

Si bien la cepa SES201 fue aislada a pH 10, la misma fue capaz de crecer en un amplio rango de pH comprendido entre 3 y 10. Se pudo establecer una correlación entre la producción de biomasa y la clarificación del medio de cultivo, siendo máximas a pH 6 (Tabla 4.1). Respecto a la actividad, en el rango de pH 5-6 se encontraron los máximos de producción.

Tabla 4.1. Comparación cualitativa de producción de biomasa y clarificación en cultivos de SES201 creciendo con hesperidina como fuente de carbono a distintos valores de pH.

pH cultivo	3.0	5.0	6.0	7.5	8.0	9.0	10.0
Biomasa	+	++++	++++	+++	+++	+++	+
Clarificación	-	++++	++++	+++	+++	++	-

Referencias: (-) ausencia de biomasa y clarificación del medio de cultivo, (+) la cantidad de cruces indica el grado de clarificación y la abundancia de biomasa.

4.2.3. Efecto de la concentración de cloruro de sodio sobre el crecimiento y la producción de actividad glicosidasa

Se estudió el incremento de biomasa y la producción de glicosidasas extracelulares en medios de cultivo con concentraciones de NaCl comprendidas entre 0 – 3.0 mol L⁻¹. Se encontró que la máxima producción de glicosidasas extracelulares ocurre en ausencia de NaCl, que correspondía con el mayor valor de biomasa. El incremento de biomasa luego de 6 días de proceso mostró el mismo perfil que la producción de la actividad (Fig. 4.7, Tabla 4.2).

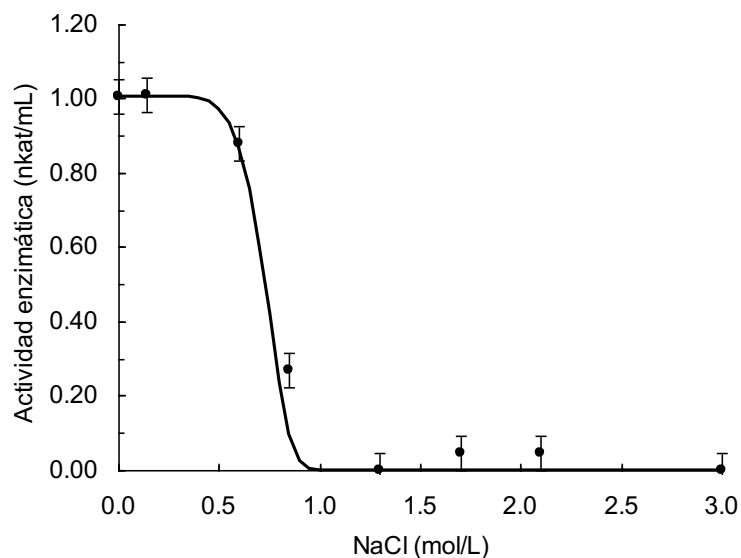


Figura 4.7. Producción de actividad hesperidina glicosidasa en el sobrenadante de SES201 cultivado con diferentes concentraciones de NaCl.

Tabla 4.2. Comparación cualitativa de la producción de biomasa y clarificación en cultivos de SES201 creciendo con hesperidina como fuente de carbono con distintas concentraciones de cloruro de sodio.

NaCl (mol L ⁻¹)	0.00	0.14	0.60	0.85	1.30	1.70	2.10	3.00
Biomasa	++++	++++	++	+	+	-	-	-
Clarificación	++++	+++	+	-	-	-	-	-

Referencias: (-) ausencia de biomasa y clarificación del medio de cultivo, (+) la cantidad de cruces indica el grado de clarificación y la abundancia de biomasa.

Muchos microorganismos que crecen en altos valores de pH (≥ 10) requieren NaCl en el medio de cultivo para mantener el pH intracelular a valores más bajos (Muntyan et al., 2004). La cepa SES201, presentó un caso atípico al respecto, dado que la misma puede crecer a pH 10 pero su óptimo crecimiento se detectó en ausencia de NaCl.

4.2.4. Cinética de la producción de actividad hesperidina glicosidasa (HSPasa)

Se estudió la producción de HSPasa de la cepa SES201 en fermentador de 0.2 L de capacidad a pH 6 con hesperidina como única fuente de carbono. Se encontró un máximo de producción a las 72 h de proceso, que correspondió con la desaparición de los pellets y una masiva esporulación del microorganismo que torna el medio de cultivo de color pardo oscuro (Fig. 4.8). A diferencia de lo que ocurre cuando se realiza el cultivo en erlenmeyers con agitación mecánica, y sin control de pH, donde sólo se observa formación de pellets. Al igual de muchas enzimas hidrolíticas de origen microbiano (Breccia et al. 1998), la máxima actividad HSPasa se encuentra en la fase estacionaria de cultivo. Si tenemos en cuenta que hesperidina es la única fuente de carbono, el microorganismo debe producir esta actividad compulsivamente para la formación de biomasa, no obstante durante la mayor parte del proceso fermentativo ésta se encuentra en los niveles mínimos de detección.

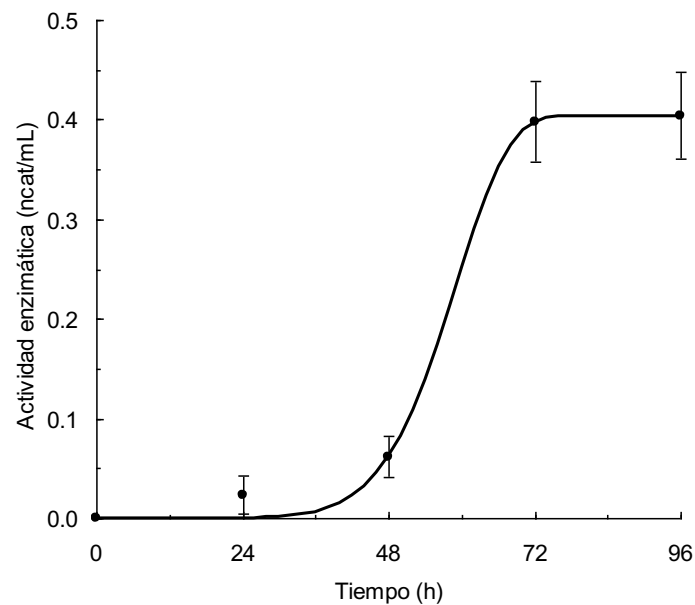


Figura 4.8. Cinética de producción de HSPasa de la cepa SES201.

4.3. Actividad glicosidasa de la cepa SES201

Con el objetivo de caracterizar la actividad glicosidasa de la cepa SES201 se realizaron los siguientes ensayos utilizando sobrenadantes de cultivos que crecieron en un medio con hesperidina como única fuente de carbono.

4.3.1. Modo de reacción

Para identificar los sitios de corte de la actividad glicosidasa sobre hesperidina, se realizó un análisis cromatográfico de los productos de reacción. Éste no correspondía a los monosacáridos constituyentes del sustrato (glucosa y ramnosa) siendo el R_f similar a maltosa, el disacárido utilizado como patrón en el ensayo. Estos datos sugieren que el mecanismo de reacción de la cepa SES201 no se relacionaba a los mecanismos descritos hasta el momento para las actividades narinjinasa y hesperidinasa que comúnmente están compuestas por 2 enzimas: α -L-ramnosidasa y β -D-glucosidasa. Por otra parte, la hidrólisis química del producto de reacción de la actividad glicosidasa SES201 sí rindió los monosacáridos constituyentes de hesperidina (Fig. 4.9).

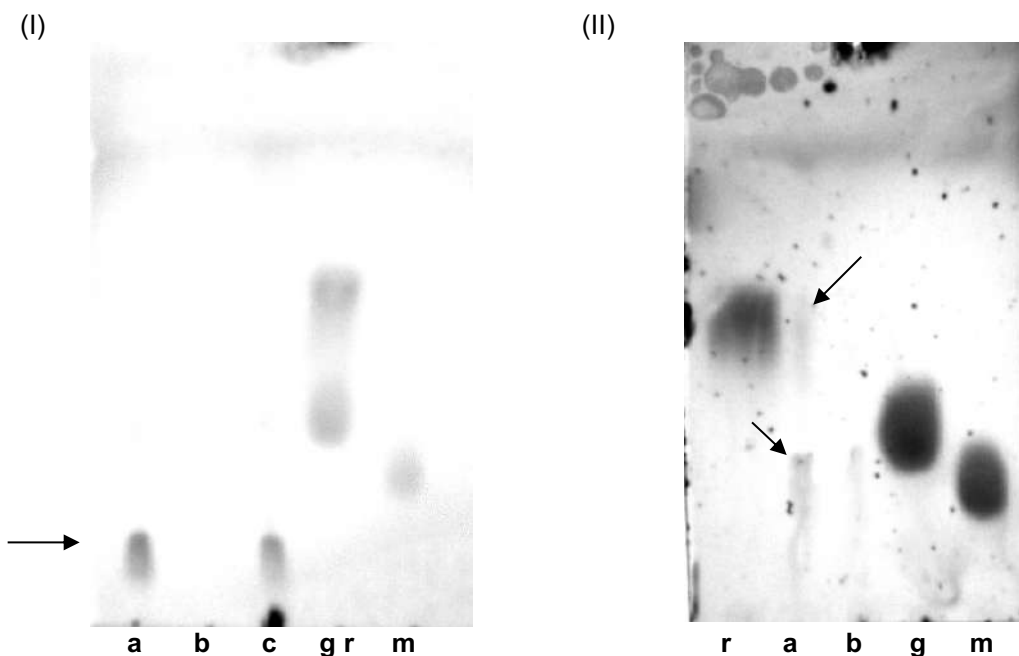


Figura 4.9. TLC de los productos de la hidrólisis enzimática de hesperidina (I) y de la hidrólisis enzimática seguida de hidrólisis química (II). [a y c. sobrenadante, b. hesperidina, g. glucosa, r. ramnosa, m. maltosa] Las flechas indican la posición de los glúcidos liberados a partir de hesperidina.

Puede concluirse, por lo tanto, que el azúcar resultante de la hidrólisis enzimática de hesperidina es el disacárido rutinosa [α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)-D-glucosa]. Estamos entonces en presencia de una enzima deglicosilante de flavonoides disacárido específica.

Se han aislado numerosas glicosidasas a partir de organismos que van desde bacterias hasta mamíferos. Las mismas se han clasificado en 83 familias de acuerdo a la similitud de la secuencia aminoacídica (CAZY). Respecto a las enzimas deglicosilantes disacárido específicas se encontraron en plantas, tales como la β -primeverosidasa hallada en *Camellia sinensis* (Mizutani et al., 2002), y la furcatín hidrolasa de *Viburnum furcatum* (Ahn et al., 2004). También en hongos filamentosos, es el caso de la β -rutinosidasa de *Penicillium rugulosum* (Narikawa et al., 2000). Sin embargo, no se encuentra descrita hasta el momento ninguna proveniente de organismos procariontes.

Las enzimas deglicosilantes de flavonoides disacárido específicas de origen vegetal, ambas fueron incluidas en la familia GH1, por su alta similitud con las glicosidasas vegetales. Dichas

enzimas se agruparon junto a las glucosidasas vegetales; siendo su estructura primaria notoriamente diferente a las glucosidasas microbianas. Esto sugiere su evolución a partir de una glucosidasa monosacárido específica vegetal (Mizutani et al., 2002; Ahn et al., 2004).

La única disacaridasa deglicosilante de flavonoides descrita en microorganismos es específica para el flavonoide rutina y no es capaz de hidrolizar hesperidina y naranjina (Narikawa et al., 2000). Estos antecedentes nos sugieren que estamos ante un biocatalizador no descrito.

4.3.2. Efecto del pH

El comportamiento de la actividad enzimática fue evaluado en el rango de pH de 3.6 a 10.8. Su actividad fue mayor al 50% en todo el intervalo estudiado, encontrándose dos máximos a pH 5.3 y 8.6. La enzima mostró un 80% de actividad remanente a pH 3.6, cercano al del vino. Esto la hace adecuada para utilizarla en los procesos de elaboración del vino y los jugos de fruta. Los dos máximos de actividad en el perfil pueden indicar la presencia de más de una glicosidasa con diferentes pH óptimos o un valor de pI en el valle del perfil (Fig. 4.10).

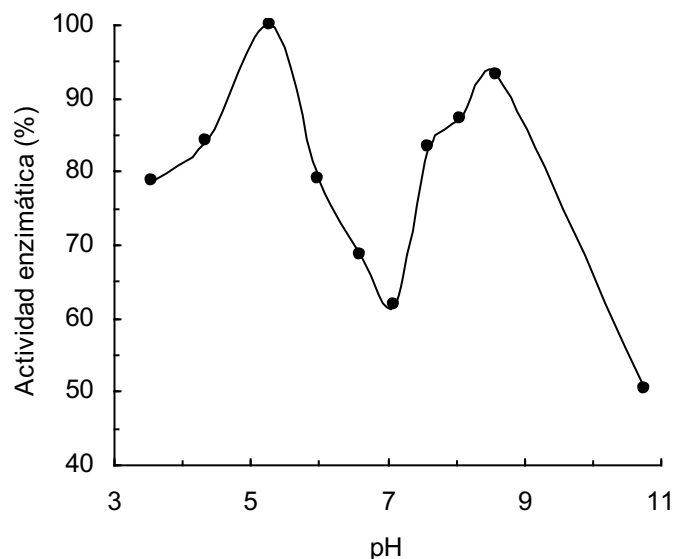


Figura 4.10. Actividad glicosidasa de SES201 en función del pH. El pH óptimo fue fijado como el 100% de la actividad relativa ($1.00 \text{ nkat mL}^{-1}$).

4.3.3. Efecto de la temperatura

La velocidad de la reacción fue determinada en un rango de temperatura de 4 a 91°C a pH 5, encontrándose un óptimo aparente alrededor de los 60°C (Fig. 4.11). Este comportamiento es beneficioso para aplicaciones en la industria cítrica, ya que las altas temperaturas favorecen la disolución de hesperidina y otros flavonoides. Aunque las fermentaciones en la industria vitivinícola se llevan a cabo a temperaturas menores de 30°C, la biotransformación puede proceder aún con bajos valores de actividad, ya que son procesos que llevan de 2 a 3 meses. Además, sólo se requiere la deglicosilación de una pequeña fracción de precursores de aroma (Van Rensburg & Pretorius, 2000).

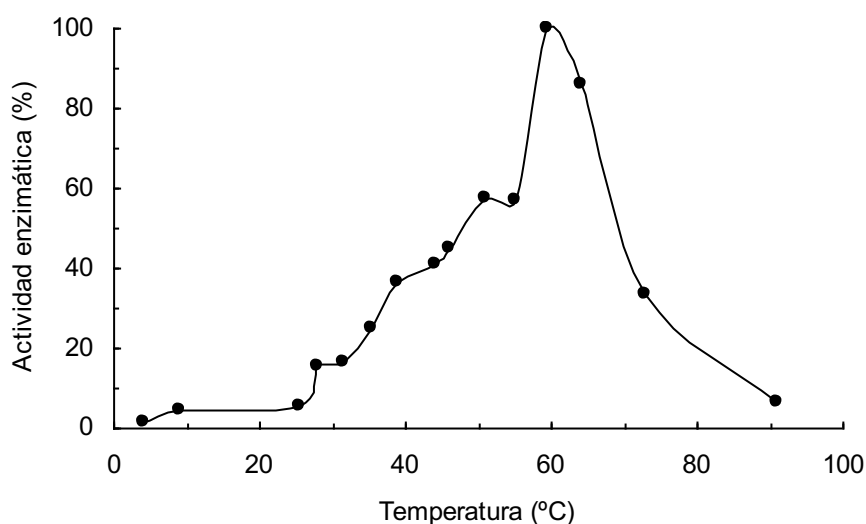


Figura 4.11. Actividad glicosidasa de SES201 en función de la temperatura. La temperatura óptima aparente fue fijada como el 100% de la actividad relativa ($3.83 \text{ nkat mL}^{-1}$).

A medida que transcurre la reacción de hidrólisis, la enzima puede verse inhibida por producto. O bien ser inestable a la temperatura de incubación, perdiendo actividad (Patnaik, 2002).

Con el fin de descartar dichas fuentes de error en la determinación, se verificó que la enzima mantuviese velocidades iniciales durante el periodo de reacción, a la temperatura y pH óptimos aparentes de 60°C y 5 respectivamente. El comportamiento de la actividad fue lineal en todo el rango estudiado (Fig. 4.10).

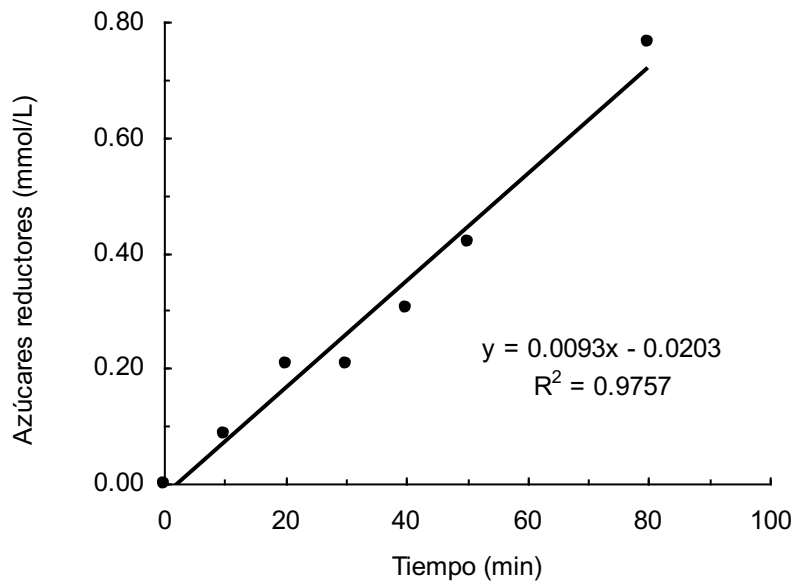


Figura 4.10. Concentración de azúcares reductores liberados a partir de hesperidina en función del tiempo de incubación de la enzima.

Estos resultados, si bien no se realizaron estudios de termoestabilidad de la enzima, nos permiten sugerir que la enzima es termoestable, dado que su actividad se mantuvo en velocidades iniciales a 60°C durante los 80 minutos de reacción, en contraste con la α -L-ranmosidasa del psicrotolerante *Pseudoalteromonas* sp. (Orrillo et al., 2007), la cual presenta una vida media de 10 minutos a 55°C.

Si bien las enzimas provenientes de microorganismos termófilos son termoestables, aquellas provenientes de microorganismos psicrófilos no son necesariamente termolábiles. Es por ello que una selección de microorganismos psicrófilos o psicrotolerantes no siempre conduce a enzimas psicoactivas y termolábiles, tal es el caso de la cepa SES201. La misma es un microorganismo que crece con dificultad a temperaturas mayores a 30°C, mientras que su actividad HSPasa presenta una considerable termoestabilidad.

4.3.4. Efecto de la concentración de etanol sobre la actividad enzimática

Para evaluar el potencial de la actividad HSPasa producida por la cepa SES201 en la mejora del aroma de vinos fue medido el efecto de diferentes concentraciones de etanol sobre la actividad, a distintas temperaturas.

Se observó una disminución abrupta de actividad en presencia de etanol, siendo totalmente inactiva a una concentración del 25%_{v/v}, independientemente de la temperatura (Fig 4.12). El cambio en la polaridad del medio producido por el etanol podría causar una alteración de la conformación de la enzima, sobre su sitio activo, y como consecuencia reducir la actividad o inducir la agregación del polipéptido.

Si se observa la actividad remanente a 12%_{v/v} de etanol –el valor medio que se encuentra en vinos-, la misma es de sólo un 11% de la actividad máxima, lo cual es desventajoso para su aplicación como aditivo en la vinificación. Dicho comportamiento contrasta con las α -ramnosidasas de *Aspergillus terreus* (Gallego et al., 2001) y *Pichia angusta* (Yanai & Sato, 2000), las cuales presentan una disminución de actividad de sólo un 20% con esa concentración de etanol. También con lo informado para la β -glucosidasa intracelular de *Saccharomyces cerevisiae* (Spagna et al., 2002), la cual presenta un máximo de actividad a concentraciones de etanol del 12-14%.

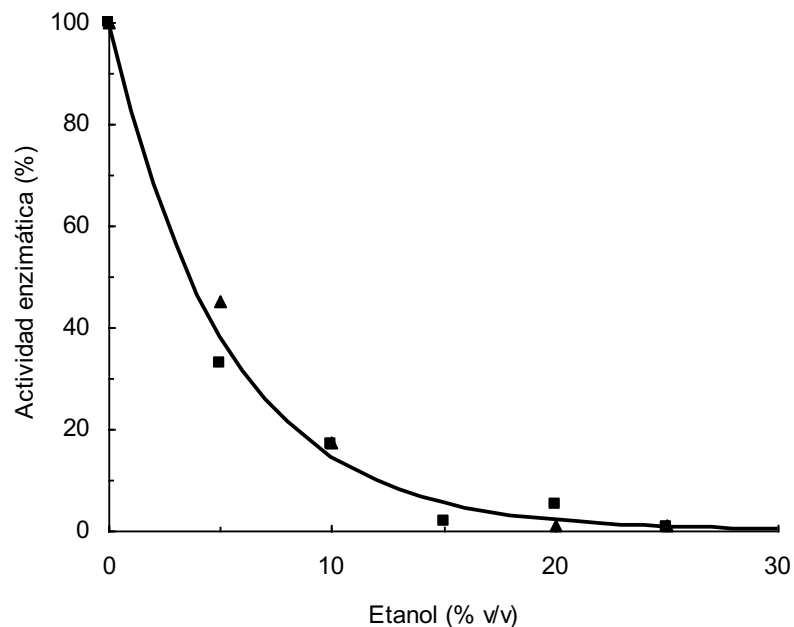


Figura 4.11. Actividad HSPasa de SES201 en función de la concentración de etanol (■ 38°C, ▲ 60°C). El 100% de la actividad corresponde a 3.11 nkat mL⁻¹.

4.3.5. Localización de la actividad HSPasa

Se encuentran descritas en la literatura glicosidasas cuya actividad disminuye hasta un 50% en presencia de 12%_{v/v} etanol, las cuales incluyen enzimas intracelulares (Orrillo et al., 2007) y extracelulares (Spagna et al., 2000). Dado que la actividad HSPasa de la cepa SES201 es significativamente menor a esa concentración de etanol, y teniendo en cuenta que en el cultivo con hesperidina como única fuente de carbono la actividad se detecta en el sobrenadante luego de la esporulación del microorganismo, se procedió a estudiar la localización de la actividad. Ésta se encontró mayoritariamente ligada a las células de la bacteria (Fig. 4.8). Esto sugiere que la actividad corresponde a una ectoenzima, y que probablemente esté asociada al crecimiento microbiano, mientras que en el sobrenadante se detecta en fase estacionaria cuando el microorganismo esporula masivamente (Fig. 4.7).

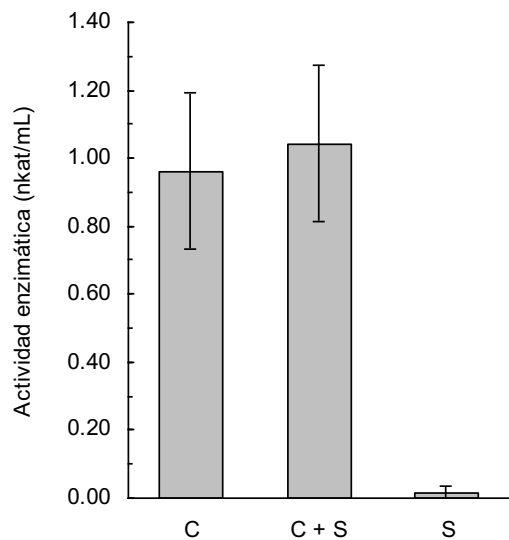


Figura 4.8. Localización de la actividad HSPasa. C: células enteras; S: sobrenadante.

Existen numerosas estrategias microbianas para la degradación de macromoléculas tales como polisacáridos. La más familiar consiste en la secreción de hidrolasas extracelulares las cuales difunden y degradan los polisacáridos cercanos, tal es el caso de la degradación de celulosa por *Nocardioopsis* 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*, la cual está implicada en la degradación del almidón. Por último, una tercera estrategia es la importación, tal como

parece que ocurre en *Bacteroides* spp., radica en la unión del polisacárido con un receptor de membrana, que luego ingresa al periplasma donde se hallan las enzimas degradativas (Salyers et al., 1996). Teniendo en cuenta la localización de la actividad HSPasa de la cepa SES201, su estrategia de degradación del flavonoide correspondería a la presentada por la pululanasa de *Klebsiella oxytoca*. Podemos inferir también que la enzima contiene en su estructura un dominio hidrofóbico que le permite estar anclada en la membrana del microorganismo. Lo que explicaría la abrupta caída de la actividad en presencia del solvente.

5. CONCLUSIONES

a) A través de una selección de microorganismos capaces de utilizar hesperidina como única fuente de carbono se procesaron muestras de suelo provenientes del sur argentino. Se seleccionaron 16 cepas. De éstas se eligió la cepa SES201, perteneciente a la clase *Actinobacteria*, por ser la única capaz de deglicosilar flavonoides en un solo paso.

b) La cepa SES201 es capaz de crecer en cultivo sumergido, en un rango de pH comprendido entre 3 y 10, y producir actividad HSPasa en el mismo rango. La máxima producción de actividad sucede en el rango de pH 5-6, en ausencia de NaCl.

c) En cuanto a la cinética de producción, se encuentra un máximo de actividad en el sobrenadante cuando el microorganismo esporula.

d) El azúcar resultante de la hidrólisis enzimática de hesperidina es el disacárido rutinosa [α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)-D-glucosa], por lo que la enzima producida por la cepa SES201 es disacárido específica.

e) El pH óptimo de la actividad deglicosilante del sobrenadante de cultivo es de 5, manteniendo un 80% de actividad a pH 3.6 -pH del vino-.

f) La temperatura óptima aparente es de 60°C, mientras que a 25°C la actividad es de 15%. Esto es beneficioso para aplicación en la industria cítrica, ya que las altas temperaturas favorecen la solubilidad de los sustratos. También en la industria vitivinícola, donde los procesos se llevan a cabo a temperaturas menores a 30°C, ya que se requieren bajas velocidades de reacción por tratarse de procesos que duran de 2 a 3 meses.

g) Se observó una disminución abrupta de actividad a concentraciones crecientes de etanol, siendo totalmente inactiva a concentraciones de 25%_{v/v} y superiores, independientemente de la temperatura.

h) La enzima se encuentra unida a las células y esta característica podría explicar la baja estabilidad en presencia de etanol.

i) Actualmente se encuentran en curso la identificación del microorganismo mediante la técnica del 16s y también la purificación de la enzima, a fin de caracterizarla.

j) Se prevé la formulación de un extracto con aplicación industrial. El mismo tendría como principal ventaja frente a los extractos presentes en el mercado, que la deglicosilación se realiza mediante una única enzima.

ABREVIATURAS

α : alfa

β : beta

μmol : micromol

a.C.: antes de Cristo

CAZY: Carbohydrate-Active Enzymes server

cm: centímetros

GC: Guanina – Citosina

g: gramos

h: horas

HCl: ácido clorhídrico

L: litros

min: minutos

mL: mililitros

mM: milimolar

N: normal

NaCl: cloruro de sodio

nkat: nanokatales

$^{\circ}\text{C}$: grados centígrados

p/v: peso en volumen

R^2 : coeficiente de regresión

R_r : frente de referencia

rpm: revoluciones por minuto

s: segundos

TLC: cromatografía en capa fina

USDA: United States Department of Agriculture

v/v: volumen en volumen

REFERENCIAS

- Ahn Y.O., 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(22)**:23405-23414.
- Berhow M., Tisserat B., Kanes, K., & Vandercook, C.** (1998) *Survey of phenolic compounds produced in citrus*, Technical Bulletin Number 1856. ARS, USDA.
- Breccia J.D., Siñeriz F., Baigori M.D., Castro G.R. & Hatti-Kaul R.** (1998) Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology.* **22**:42-49.
- CAZY.** Carbohydrate-Active Enzymes server. URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>.
- Gallego M.V., Piñaga F., Ramón D., & Vallés S.** (2001) Purification and characterization of an α -L-rhamnosidasa from *Aspergillus terreus* of interest in winemaking. *J. Food Sci.* **66**:204-209.
- Günata Z., Bitter S., Brilouel J.M., Bayonove C. & Cordonnier R.** (1988) Sequential enzymatic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carbohydr. Res.* **184**:139-149.
- Günata Z., Blondeel C., Vallier M.J., Lepoutre J.C., Sapis J.C. & Watanabe N.** (1998) An endoglycosidase from grape berry skin of cv. M. Alexandria hydrolyzing potentially aromatic disaccharide glycosidase. *J. Agric. Food Chem.* **46**:2748-2753.
- Liese A., Seelbach K. & Wandrey C.** (2000) *Industrial biotransformations*. Wiley-VCH.
- Linskens H.F. & Jackson J.F.** (1995) *Modern methods of plant analysis*, Vol. 18. Springer.
- Madigan M.T., Martinko J.M. & Parker J.** (2004) *Brock. Biología de los microorganismos*. Pearson Prentice Hall.
- Manzanares P., De Graaff L.H. & Visser J.** (1997) Purification and characterization of an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol. Lett.* **157**:279-283.
- Manzanares P, Van Den Broeck H.C., De Graaff L.H., & Visser J.** (2001) Purification and characterization of two different α -L-rhamnosidases, RhaA and RhaB, from *Aspergillus aculeatus*. *Applied and Environmental Microbiology.* **67(5)**:2230-2234.

- Mendes Ferreira A., Clímaco M.C. & Mendes Faia A.** (2001) The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components - a preliminary study. *J. Appl. Microbiol.* **91**:67-71.
- Miller G.** (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chem.* **31**:426-428.
- Mizutani M., Nakanishi H., Ema J., Ma S., 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.
- Muntyan M.S., Popova I.V., Bloch D.A., Skrinikova E.V. & Ustiyani V.S.** (2005) Energetics of alkalophilic representatives of the genus *Bacillus*. *Biochemistry (Moscow)*. **70(2)**:137-142.
- Narikawa T., Shinoyama H. & Fujii T.** (2000) A β -rutinosidase from *Penicillium rugulosum* IPO 7242 that is a peculiar flavonoid glycosidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**:1317-1319.
- Nguyen L.D., Kalachová L., Novotná J., Holub M., Kofroňová O., Benada O, Thompson C.J. & Weiser J.** (2005) Cultivation system using glass beads immersed in liquid medium facilitates studies of *Streptomyces* differentiation. *Appl. Environ. Microbiol.* **71(6)**:2848-2852.
- Orrillo A.G., Ledesma P., Delgado O.D., Spagna G. & Breccia J.D.** (2007) Cold-active α -L-rhamnosidase from psychrotolerant bacteria isolated from a sub-Antarctic ecosystem. *Enzyme and Microbial Technology.* **40**:236-241.
- Patnaik P.R.** (2002) Temperature optima of enzymes: sifting fact from fiction. *Enzyme and Microbial Technology.* **31**:198-200.
- Pérez Trueba G.** (2003) Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* **22(1)**:48-57.
- Robards K. & Antolovich M.** (1997) Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. *Analyst.* **122**:11R-34R.
- Romero C., Manjon A., Bastida J. & Iborra J.L.** (1985) A method for assaying the rhamnosidase activity of naringinase. *Anal. Biochem.* **149**:566-571.
- Salyers A.A., Reeves A. & D'Elia J.** (1996) Solving the problem of how to eat something as big as yourself: Diverse bacterial strategies for degrading polysaccharides. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **17**:5-6.

Spagna G., Barbagallo R., Martino A. & Pifferi P. (2000) A simple method for purifying glycosidases: α -L-rhamnopyranosidase of *Aspergillus niger* to increase the aroma of Moscato wine. *Enzyme and Microbial Technology*. **27**:522-530.

USDA. United States Department of Agriculture. URL: <http://www.usda.gov/>.

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**.

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 *Nocardiopsis sp.* SES28. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **22**:761-764.

Witham F.H., Blaydes D.F. & Devlin R.M. (1971) *Experiments in plant physiology*. Van Nostrand Reinhold Company. New York, U.S.A. p. 245.

Yamamoto S., Okada M., Usui T. & Sakata K. (2002) Isolation and characterization of a beta-primeverosidase-like endo-manner beta-glycosidase from *Aspergillus fumigatus* AP-20. *Biosci. Biotechnol Biochem.* **66(4)**:801-807.

Yanai T. & Sato M. (2000) Purification and characterization of an alpha-L-rhamnosidase from *Pichia angusta* X349. *Biosci. Biotechnol Biochem.* **64(10)**:2179-85.