



Universidad Nacional de La Pampa
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Producción de rutinosa por
biotransformación de subproductos
agroindustriales

Agostina Capecce

- 2012 -

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

Autor: Agostina Capecce

Co-director: Lic. Paola Marisol Minig

Director: Dr. Javier D. Breccia

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional de La Pampa (UNLPam) y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN), donde realicé mis estudios.
- A mi director Dr. Javier Breccia, por brindarme el espacio para la realización de mi tesina.
- A mi codirectora Lic. Marisol Minig, por su paciencia, dedicación y apoyo incondicional durante todo este tiempo.
- A mis compañeros del Laboratorio de Biocatálisis.
- Al Departamento de Cooperación Internacional de la UNLPam y a la FCEyN por el incentivo y el apoyo en la realización de actividades extracurriculares que contribuyeron a mi formación profesional.
- A María Eugenia Beily por recibirme en el Laboratorio de Transformación de Residuos del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)-Castelar.
- A Pablo Lodeiro Fernandez y a Irina Levchuk por los momentos compartidos en Laboratory of Green Chemistry-Lappeenranta University of Technology.
- A mis amigos de siempre y a los que me dejó la facultad, en especial a Silvana.
- A mi familia, por estar siempre.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
1. Biotransformaciones industriales	3
2. Rutinosa y la industria citrícola	4
3. Glicosilhidrolasas	6
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
1. Extracto enzimático	9
2. Métodos analíticos	9
2.1 Determinación de actividad enzimática	9
2.2 Análisis del producto de reacción enzimática	10
2.3 Cuantificación de hesperidina en pellets de naranja y limón	10
2.4 Tratamiento termo-alcalino de pellets de naranja	10
3. Inmovilización de α -ramnosil- β -glucosidasa	10
3.1 Síntesis del soporte	10
3.2 Recubrimiento de microfibras magnéticas (MM) con polietilenimina (PEI)	11
3.3 Inmovilización enzimática	11
4. Reactores enzimáticos	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
1. Inmovilización de α -ramnosil- β -glucosidasa sobre MM	13
2. Caracteres de la enzima inmovilizada sobre MM	13
3. Recubrimiento de MM con PEI	15
4. Efecto de la temperatura sobre la actividad de α -ramnosil- β -glucosidasa inmovilizada sobre microfibras magnéticas recubiertas con PEI (MM-PEI)	17
5. Caracterización de los subproductos de la industria citrícola (pellets de naranja y limón)	18
6. Reactor enzimático para la producción de rutinosa	21
CONCLUSIONES	23
REFERENCIAS	24

RESUMEN

El disacárido rutinosa es un producto de reacción de la enzima α -ramnosil- β -glucosidasa cuando esta actúa sobre flavonoides 7-O-rutinosilados. El catalizador se inmovilizó en microfibras magnéticas (MM), con un rendimiento (YI) del 31.2%, mientras que la actividad expresada en el soporte o eficiencia del proceso (EI) fue del 8.9%. La producción de rutinosa en un reactor enzimático (50 ml) con 0.5 mM del flavonoide hesperidina como sustrato y 0.009 U/g de enzima, rindió un 86% de conversión de sustrato en 24 h, mientras que en los siguientes ciclos de reutilización del catalizador este porcentaje se mantuvo ligeramente por encima del 50%.

La temperatura óptima del catalizador inmovilizado fue de 50°C, mientras que para la enzima libre fue de 60°C. Este desplazamiento de 10°C, podría deberse a la oxidación de la enzima catalizada por cantidades trazas de iones hierro provenientes del soporte. Por esta razón, las MM se recubrieron con el polímero catiónico polietilenimina (PEI) y la enzima inmovilizada sobre MM-PEI expresó la misma temperatura óptima que la enzima libre. Además, a 70°C no se detectó actividad residual de la enzima libre, y la inmovilizada sobre MM mantuvo sólo un 15% de la actividad en comparación con el 34% que mostró la preparación MM-PEI. Estos datos nos indicaron un efecto estabilizante de la polietilenimina sobre la enzima, apoyando la hipótesis sugerida de la pérdida de estabilidad del catalizador por un proceso de oxidación proteica.

Los pellets de naranja (subproducto de la industria citrícola) se seleccionaron para la producción de rutinosa por su alto contenido de hesperidina (6.8% p/p). Una suspensión (2.5% p/v) fue sometida a un tratamiento termo-alcálico (1.25% p/v Ca(OH)_2 -60°C-1 h) y el sobrenadante contenía 2.7 mM hesperidina y 15.6 mM de azúcares reductores. La preparación cruda de pellets tratados fue neutralizada y se utilizó para la producción de rutinosa en un reactor enzimático (20 ml) con MM-PEI (0.007 U/g). En dos ciclos de producción se obtuvieron porcentajes de conversión del 21.6% y del 13.6% luego de 2 h de proceso. Se logró la biotransformación utilizando un sustrato de bajo costo con un rendimiento de 0.32 g/L de rutinosa en 4 h de reacción.

ABSTRACT

The disaccharide rutinose is a product of the enzyme α -rhamnosyl- β -glucosidase when it acts on 7-O-linked flavonoid- β -rutinosides. The catalyst was immobilized on magnetic microfibers of aniline-iron (MM), with a yield (YI) of 31.2% and an immobilization efficiency (EI) of 8.9%. Rutinose production was assessed in an enzymatic reactor (50 ml) with 0.5 mM hesperidin as substrate and 0.009 U/g enzyme. The biotransformation achieved 86% hydrolysis after 24 h reaction, while in the following cycles of reutilization of the biocatalyst; the substrate conversion remained slightly above 50%.

The optimum temperature for the free enzyme was 60°C and for the immobilized catalyst it was 50°C. We hypothesized that the reduction of 10°C might be due to metal catalyzed oxidation promoted by leaked iron traces from the support. For that reason, the MM were coated with polyethyleneimine (PEI) and the new preparation (MM-PEI) showed the same optimum temperature than the free enzyme. In addition, at 70°C no residual activity was detected for the free enzyme, while the MM preparation exhibited 15%, and MM-PEI presented 34% of the maximum activity. This data indicated a stabilizing effect of polyethyleneimine on α -rhamnosyl- β -glucosidase.

In Misiones, Argentina, citric wastes are pelleted for animal feed. This by-product (Orange pellets) was selected for rutinose production due to its high content of hesperidin (6.8% w/w). In order to make the material more accessible to enzymatic hydrolysis, the pellets were subjected to thermal-alkaline treatment (1.25% w/v $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -60°C-1 h). The thermo-alkaline treated (2.5% w/v) pellets yielded a preparation containing 2.7 mM hesperidin and 15.6 mM reducing sugars. The neutralized preparation was used as substrate in an enzymatic reactor (20 ml) with MM-PEI (0.007 U/g). In two cycles of production (2 h) the substrate conversions were 21.6% and 13.6%, yielding 0.32 g/L rutinose solution after 4 h process.

INTRODUCCIÓN

1. Biotransformaciones industriales

La biotecnología industrial o de bioprocesos es una especialidad clave para el desarrollo de una industria química sostenible. Algunas aplicaciones han sido orientadas a la obtención de productos farmacéuticos, colorantes, bioplásticos, vitaminas, aditivos alimentarios, pesticidas y biocombustibles. Dentro del amplio marco de estrategias biotecnológicas donde confluyen muchas disciplinas del conocimiento encontramos los procesos de biotransformación. Estos involucran un número reducido de reacciones químicas realizadas a gran escala donde los reactantes y los productos mantienen una marcada similitud molecular, a diferencia de los procesos de fermentación donde el número de reacciones es muy elevado y los productos tienen una relación molecular escasa o nula con las materias primas. Los procesos de biotransformación a escala industrial están en continuo crecimiento y la mayor variedad de ellos se aplica a industrias de química fina (farmacéutica y agroquímica) para la obtención de productos de alto valor agregado (Liese *et al.*, 2000; Wandrey *et al.*, 2000). Estos procesos son conocidos como “procesos verdes” porque operan a temperaturas bajas, producen menos residuos tóxicos, menos emisiones y productos secundarios comparados con los procesos de catálisis química convencional, reduciendo así la demanda energética y el impacto medioambiental.

A pesar de las claras ventajas del empleo de enzimas en los procesos industriales de biotransformación y síntesis orgánica, existen serios obstáculos para su aplicación. Entre ellos, al ser en su mayoría solubles en agua, su separación de los sustratos y productos es difícil, y por tanto, no se pueden reutilizar. Una estrategia para resolver estos problemas es la inmovilización de los catalizadores en diversos soportes (Arroyo, 1998). En este proceso se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas. De este modo, es posible disminuir los costos del proceso (Katchalski Katzir, 1993). Otra ventaja que presenta la inmovilización de enzimas es que permite detener la reacción enzimática por un simple proceso de remoción física (por ejemplo por filtración) y de esta manera es posible realizar un control cinético de la reacción (Morana *et al.*, 2006).

2. Rutinosa y la industria cítrica

El uso doméstico e industrial de grandes cantidades de cítricos, especialmente para la producción de jugo, resulta en la acumulación de importantes cantidades de desechos como piel, semillas, membranas y otros, que representan la mitad del peso de la fruta. De no ser procesados, estos materiales se convierten en una fuente de contaminación ambiental (Wang *et al.*, 2008; Masmoudi *et al.*, 2007). Sin embargo, estos se pueden utilizar para la producción de subproductos: enzimas, aceites esenciales y productos de bajo costo como pellets, que se utilizan en nutrición animal (Khan *et al.*, 2010). Estos materiales contienen cantidades significativas de compuestos polifenólicos, incluyendo flavonoides que se encuentran en forma de glicósidos.

Los flavonoides son metabolitos secundarios de las plantas (Wang *et al.*, 2008; Pawlowska *et al.*, 2009) y son responsables del color de las frutas y las flores. En cuanto a su estructura molecular, se clasifican en: flavonas, flavanos, flavanonas, flavonoles, isoflavonas y antocianinas (Tripoli *et al.*, 2007).

Han sido descritos entre 4000 y 5000 compuestos diferentes formados por diversas estructuras fenólicas combinadas con los sacáridos constituyentes. Estas estructuras y sus respectivos patrones de glicosilación están relacionados con la taxonomía de las plantas y con un amplio rango de propiedades químicas diferentes (Lin y Harnly, 2007). Las formas mayoritarias diglicosiladas de los flavonoides se clasifican en neohesperidósidos y rutinósidos por el nombre de los respectivos disacáridos (neohesperidosa y rutinosa, Fig. 1).

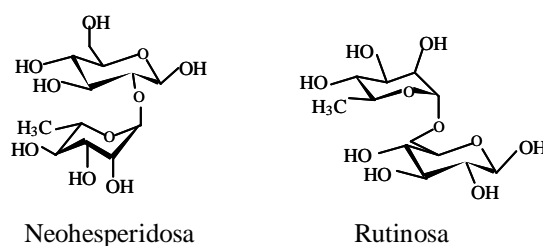


Figura 1. Estructura química de neohesperidina y rutinosa

Entre los flavonoides que poseen neohesperidosa encontramos: naringina, neohesperidina y neoeriocitrina, que aportan sabor amargo a los jugos cítricos. Por otro lado, los rutinósidos tienen un sabor más suave y entre ellos se encuentran: hesperidina, narirutina, diosmina, rutina, eriocitrina y didimina. Respecto a su localización en los frutos cítricos, se hallan principalmente en la cáscara (1.7-2.0% en peso seco) y su

mayor concentración se encuentra en el albedo (Fig. 2) (Manthey y Grohmann, 1996; Nogata *et al.*, 2006).

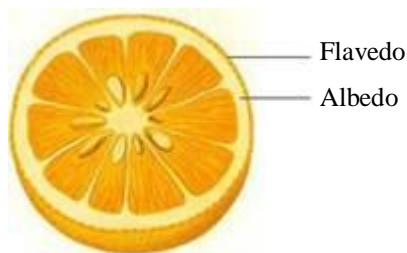


Figura 2. Estructura interna de la naranja

Naringina, neohesperidina y hesperidina son los flavonoides glicosilados más abundantes en los cítricos (Fig. 3). La naringina y la neohesperidina predominan en la naranja amarga y la primera también en el pomelo, mientras que la hesperidina predomina en la naranja dulce y el limón (Peterson *et al.*, 2006).

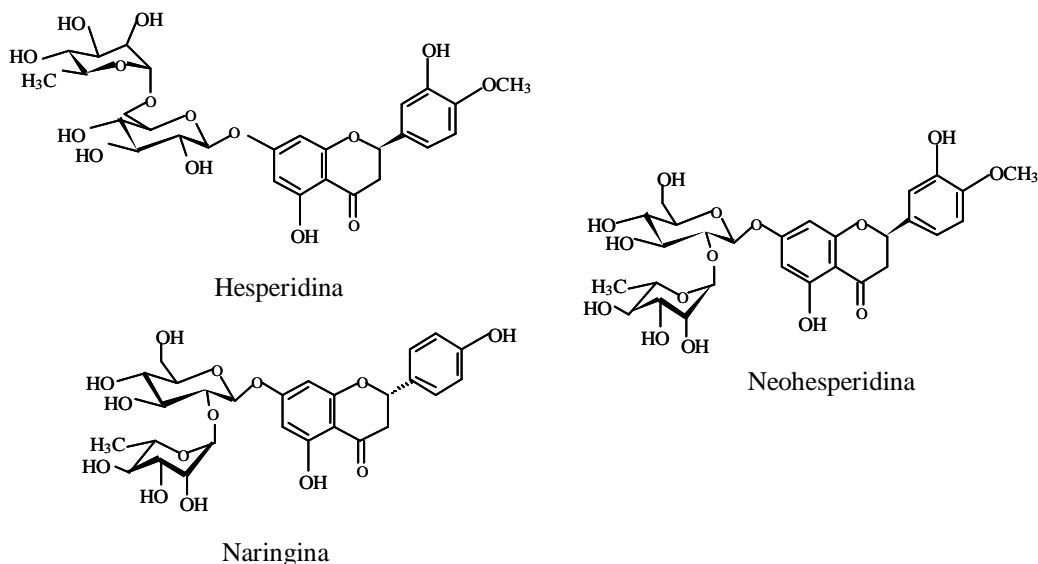


Figura 3. Flavonoides diglicosilados abundantes en cítricos

Estos disacáridos, especialmente rutinosa, forman parte de preparaciones tópicas para el tratamiento de lesiones de la piel, en particular de úlceras dérmicas, heridas y quemaduras (Patrick y Jacques, 1995). La rutinosa es un componente natural del alforfón o trigo sarraceno – *Fagopyrum esculentum*- y el haba francesa – *Phaseolus vulgaris*- (Coniglio y Kres, 2009). Esta forma parte de numerosos glicósidos de flavonoides pero no se ha descrito como azúcar libre. Está involucrada en el metabolismo del carbono de plantas como *Datisca glomerata* (Schubert *et al.*, 2010) y su obtención por medios químicos es compleja e implica el uso de solventes (Quintin y Lewin, 2004). Uno de los métodos alternativos implica una secuencia de bromación-

saponificación para la hidrólisis suave de los flavonoides que facilita la obtención del disacárido (Quintin y Lewin, 2005). También puede ser producida por hidrólisis reversa utilizando ramnosidasas fúngicas (Martearena *et al.*, 2008) o por degradación química de rutina (Zhou *et al.*, 2009).

3. Glicosilhidrolasas

Las glicosil hidrolasas (EC 3.2.1.-) son un extenso conjunto de enzimas que hidrolizan las uniones glicosídicas. Desde un punto de vista biotecnológico estas enzimas están involucradas en numerosos procesos industriales de transformación de alimentos, que incluyen clarificación de jugos de frutas y de vinos, levado de masas de panificación, sacarificación de almidón de maíz y de cebada, aumento de la digestibilidad de alimento para animales, etc. Las enzimas deglicosilantes (β -glucosidasa, α -ramnosidasa y α -arabinofuranosidasa) están involucradas en la liberación de los precursores de aroma de alimentos (geraniol, nerol, citronelol, fenetilalcohol, linalol, etc) que se encuentran en su forma no-volátil unidos a residuos sacarídicos. Por otro lado, el sabor amargo de ciertos jugos de frutas producidos en los procesos de elaboración es neutralizado hidrolizando la fracción glicosídica de los flavonoides naturales (Spagna *et al.*, 2000; Tsuruhami *et al.*, 2006; Daiyasu *et al.*, 2008; Mazzaferro *et al.*, 2008).

Dentro de las glicosilhidrolasas encontramos las diglicosidasas (glicosidasas disacárido-específicas) que son capaces de liberar disacáridos por hidrólisis selectiva del enlace β -glicosídico entre la glicona (el disacárido) y la aglicona y, por lo tanto, no hidrolizan el enlace entre dos azúcares (Mazzaferro y Breccia, 2011).

Nuestro laboratorio describió en el año 2010 una nueva actividad enzimática, la enzima llamada α -ramnosil- β -glucosidasa (3.2.1.168), producida por *Acremonium* sp. DSM 24697 (Mazzaferro *et al.*, 2010). Esta es capaz de hidrolizar la hesperidina en hesperetina (aglicona) y rutinosa (Fig. 4):

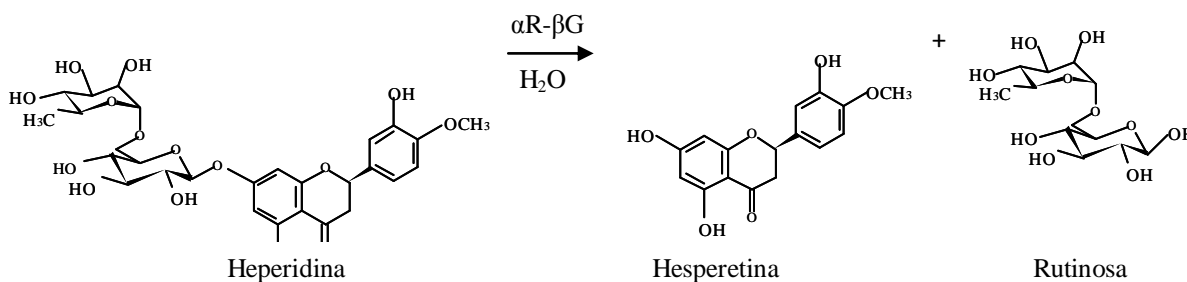


Figura 4. Reacción catalizada por α -ramnosil- β -glucosidasa

Las diversas aplicaciones descritas para el disacárido rutinosa, su reciente disponibilidad en el mercado (desde el año 2010) y el elevado costo que este presenta como reactivo analítico (106969 \$/g, Sigma-Aldrich) demarcan el objetivo general del presente trabajo: el estudio de las condiciones de obtención de rutinosa a través de un proceso de biotransformación de subproductos industriales utilizando como catalizador la diglicosidasa de *Acremonium* sp. DSM 24697.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Inmovilización de α -ramnosil- β -glucosidasa en un soporte apropiado para el control cinético del proceso de biotransformación.
2. Estabilización de la preparación catalítica.
3. Obtención de rutinosa a partir de subproductos de la industria citrícola.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Extracto enzimático

Para la obtención del catalizador α -ramnosil- β -glucosidasa se realizaron cultivos sumergidos de *Acremonium* sp. DSM 24697 en un medio que contenía (g/L): 5.0 fuente de carbono (hesperidina), 1.0 peptona de leche, 2.0 extracto de levadura y 100 mM buffer citrato de sodio (pH 5.0), en un agitador rotatorio (250 rpm). Luego de 96 h, el extracto enzimático fue filtrado (papel Whatman N° 1), liofilizado y guardado a -20°C.

2. Métodos analíticos

2.1. Determinación de actividad enzimática

La actividad enzimática fue medida siguiendo la producción de hesperetina o rutinosa en el tiempo.

2.1a. Determinación de hesperetina. La actividad se midió luego de incubar el catalizador con 0.11% hesperidina durante 2 h a 40°C y pH 8.0 (50 mM buffer fosfato de sodio). La hesperetina es el producto resultante de la actividad de α -ramnosil- β -glucosidasa sobre hesperidina. Esta se cuantificó mediante el método descrito por Lai (1992) modificado, a través de la medida de absorbancia a 323 nm (pico característico de hesperetina) y a 450 nm (línea de base).

2.1b. Determinación de rutinosa. Esta fue estimada mediante la cuantificación de azúcares reductores liberados a partir de hesperidina por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Sigma-Aldrich, Buenos Aires) (Miller, 1959). La reacción se realizó con 50 μ l del extracto enzimático incubados con 450 μ l de una suspensión 0.11% p/v de flavonoide hesperidina en 50 mM buffer citrato de sodio (pH 5.0), durante 30 min a 60°C (o las condiciones que se especifiquen en el texto). La reacción se detuvo por el agregado de 500 μ l de una solución de DNS (20 g de DNS disueltos en 700 ml de 1 M NaOH y posteriormente llevados a 1 L con agua destilada). Las muestras fueron sometidas a 100°C durante 10 min, se enfriaron en baño de hielo y luego se midió la absorbancia a 540 nm. Se definió la unidad enzimática (U) para ambos métodos como la cantidad de enzima necesaria para la liberación de 1 μ mol de hesperetina (aglicona) o rutinosa (disacárido) por minuto.

2.2. Análisis del producto de reacción enzimática

Los productos de la reacción enzimática se evaluaron a través de un análisis de cromatografía en capa fina (TLC) utilizando Sílica gel 60W con indicador fluorescente (Fluka, Buenos Aires). La fase móvil utilizada fue acetato de etilo:isopropanol:agua (6:4:4) y se reveló con el reactivo de antrona (Witham *et al.*, 1971).

2.3. Cuantificación de hesperidina en pellets de naranja y limón

La Cooperativa Tabacalera de Misiones produce pellets para alimentación de ganado con los residuos del procesamiento de los cítricos. Los pellets de naranja (*Citrus sinensis*) y limón (*Citrus limon*) que fueron gentilmente cedidos por la empresa. Estos se molieron y se secaron a 50°C hasta peso constante. La extracción de hesperidina se realizó colocando 0.1 g de pellets en contacto con 1 ml de una solución de metanol:dimetilsulfóxido (DMSO) 50:50 a 30°C con agitación durante 24 h. Las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se utilizó para la cuantificación de hesperidina de acuerdo al procedimiento descrito en el punto 2.1a. La hidrólisis total de diferentes diluciones del sustrato permite la cuantificación de hesperidina que es estequiométricamente equivalente a la concentración de hesperetina producida en la reacción. (Mazzaferro y Breccia, 2012)

2.4. Tratamiento termo-alcalino de pellets de naranja

Se pesaron 0.5 y 1 g de pellets de naranja y se suspendieron en un volumen final de 20 ml de 1.25% p/v de Ca(OH)₂, obteniéndose suspensiones de 2.5 y 5% p/v de pellets respectivamente. Las muestras se sometieron a diferentes tratamientos térmicos (25 y 60°C durante 1 h), y luego se neutralizaron con 6 N HCl. La hesperidina se cuantificó en el sobrenadante de la reacción luego de remover los sólidos suspendidos por centrifugación (2 min-10000 rpm).

3. Inmovilización de α -ramnosil- β -glucosidasa

3.1. Síntesis del soporte

Las microfibras magnéticas (MM) se prepararon incubando 4.5 ml de anilina, 0.5 ml de 12 M HCl, 1 g de Fe₂O₃ y 50 μ l de 10% p/v de persulfato de amonio por 10 min a 25°C. (Gowoun Lee *et al.*, 2008). Se realizaron 3-4 lavados con agua destilada y se colocaron en baño de ultrasonido para aumentar la dispersión. Se separaron del agua de lavado

utilizando un imán. Finalmente, se almacenaron en 50 mM buffer fosfato (pH 8.0) a 5°C hasta su posterior uso.

3.2. Recubrimiento de microfibras magnéticas (MM) con polietilenimina (PEI)

Se suspendieron MM (1.5 g) en 10 ml de 1% p/v de PEI (Peso molecular promedio 2000 Da) y se agitaron en tabla rocker a temperatura ambiente 3 h. Se agregaron 100 mg de borohidruro de sodio sólido y se continuó en agitación por 2 h. Las fibras magnéticas recubiertas (MM-PEI) fueron separadas magnéticamente y lavadas 2 veces con 20 ml de cada una de las siguientes soluciones: 100 mM buffer acetato de sodio (pH 4.0), 100 mM borato de sodio y agua mili-Q. La concentración de PEI unido a las fibras se estimó mediante la cuantificación del complejo PEI-Cu²⁺ a 273 nm (Breccia *et al.*, 2002). Se realizó una curva de calibración a 273 nm con 0.1% p/v de PEI agregando concentraciones crecientes de CuSO₄. MM-PEI (50 mg) se incubaron en 250 µl de una solución 1 mM CuSO₄ a temperatura ambiente en agitador rocker durante 15 min.

3.3. Inmovilización enzimática

La inmovilización se realizó poniendo en contacto 500 mg de MM-PEI con 1 ml de una solución que contenía 25 mg de sobrenadante liofilizado de *Acremonium* sp. DSM 24697 en 100 mM fosfato de sodio (pH 8.0). Se incubó por 10 min a 25°C en un agitador vaivén (50 rpm), luego en refrigerador durante 12 h a 5°C. Se adicionaron 10 µl de 50% v/v de glutaraldehído (GA) (concentración final 0.5% p/v de GA) y se incubó durante 30 min a 5°C. Las fibras se separaron magnéticamente y se lavaron 4 veces con 5 mM fosfato de sodio (pH 8.0) y se incubaron en 100 mM buffer Tris-HCl (pH 7.5) por 30 min a 25°C para bloquear los grupos aldehídos libres. Se lavaron reiteradas veces con 5 mM buffer fosfato de sodio (pH 8.0) y se guardaron en 10 mM buffer fosfato de sodio (pH 8.0) a 5°C.

La inmovilización fue estimada a través del cálculo de rendimiento de inmovilización (YI) y eficiencia de inmovilización (EI) de la siguiente manera:

$$YI = \frac{A_{total} - A_{noinmovilizada}}{A_{total}} \times 100 \quad EI = \frac{A_{inmovilizada}}{A_{total} - A_{noinmovilizada}} \times 100$$

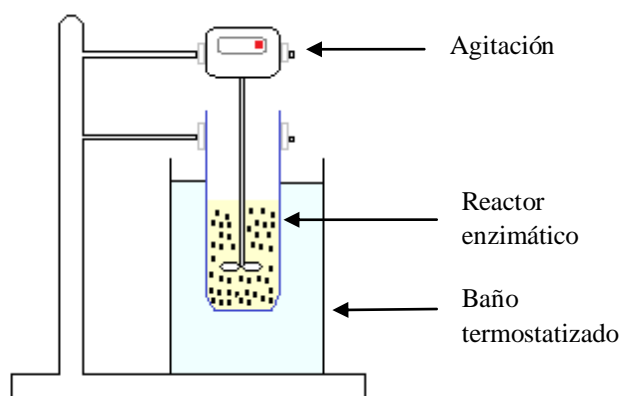
donde: A_{total} es el número total de unidades enzimáticas adicionadas por gramo de soporte durante la reacción de inmovilización, $A_{no\ inmovilizada}$ es el número de unidades

por gramo de soporte remanentes en el sobrenadante y $A_{inmovilizada}$ es el número de unidades detectadas en el soporte después de la inmovilización.

4. Reactores enzimáticos

Se construyó un reactor (50 ml) para la producción de rutinosa a partir de hesperidina (esquema 1). Se utilizó como catalizador la enzima α -ramnosil- β -glucosidasa inmovilizada en MM (0.009 U/g soporte). La reacción se llevó a cabo a 40°C y con agitación continua de 100 rpm. La mezcla de reacción contenía 50 ml de 0.5 mM hesperidina suspendida en 50 mM buffer fosfato de sodio (pH 8.0) y 0.5 g de catalizador (0.28 U/g de hesperidina). Se tomaron muestras (500 μ l) a diferentes intervalos de tiempo. Las fibras se separaron del producto de reacción utilizando un imán, se lavaron con agua destilada y se guardaron en 50 mM buffer fosfato de sodio (pH 8.0) a 5°C para su reutilización.

Cuando se utilizaron como sustrato pellets de naranja, el reactor fue de 20 ml. Se utilizó como catalizador la enzima α -ramnosil- β -glucosidasa inmovilizada en MM-PEI (0.007 U/g soporte). La reacción se llevó a cabo a 60°C y con agitación continua de 250 rpm.



Esquema 1. Reactor enzimático para la producción de rutinosa.

Se colocaron 0.7 g de catalizador en 20 ml de 2.5% p/v de pellets de naranja tratados con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en 100 mM buffer fosfato (pH 8.0) (1.63 U/g de hesperidina). Se tomaron muestras de 150 μ l cada 10 min durante 130 min. Las fibras se separaron del producto de reacción utilizando un imán, se lavaron con agua destilada y se guardaron en 50 mM buffer fosfato de sodio (pH 8.0) a 5°C para su reutilización.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Inmovilización de α -ramnosil- β -glucosidasa sobre MM

Se decidió realizar la inmovilización del catalizador sobre MM debido a que estas presentan una extensa área superficial y la separación del mismo desde la mezcla de reacción se puede realizar por un simple proceso de aplicación de un campo magnético (Lee *et al.*, 2008). El rendimiento de inmovilización (YI) fue del 31.2%, mientras que la actividad expresada en el soporte o eficiencia de la inmovilización (EI) fue del 8.9% (Fig. 5). Si bien la eficiencia fue menor a la descrita previamente (20%) para otra enzima perteneciente a la familia de las glicosidasas inmovilizada (lactasa) sobre un soporte de magnetita (Dekker, 1989), este valor fue superior al alcanzado para α -ramnosil- β -glucosidasa cuando se emplearon como soporte perlas de quitosano-sílica (3.14%) (Piñuel *et al.*, 2011). Estos valores pueden deberse a la mayor área superficial que presentan las fibras respecto de las perlas de quitosano-sílica, mientras que la mayor eficiencia encontrada para la lactasa se podría explicar por la utilización de un sustrato soluble (lactosa) que no presenta problemas de difusión al interior de las partículas del soporte de magnetita, a diferencia de hesperidina que es un sustrato poco soluble (<0.324 mM).

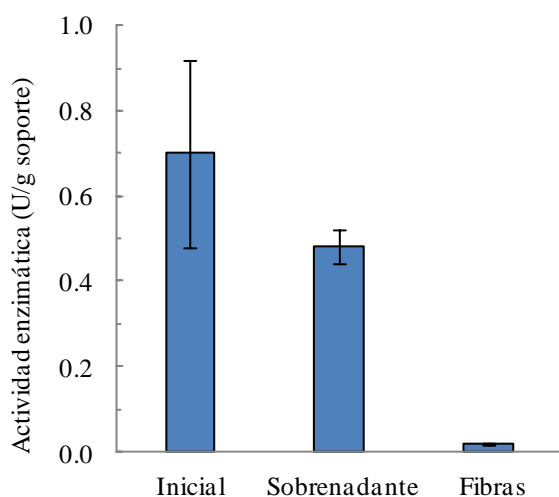


Figura 5. Balance del proceso de inmovilización de α -ramnosil- β -glucosidasa sobre MM (método 2.1a)

2. Caracteres de la enzima inmovilizada sobre MM

Se llevaron a cabo cuatro ciclos de reutilización del catalizador utilizando como sustrato 0.3 g/L de hesperidina comercial. La producción fue lineal durante las primeras 24 h y

el rendimiento máximo (0.13 g/L de rutinosa) se alcanzó luego de 43 h (Fig. 6A). Este rendimiento disminuyó en los ciclos posteriores (0.070 ± 0.008 g/L en 24 h). Esto significa que en 24 h el catalizador logró un valor de conversión del sustrato del 86% en el primer ciclo, mientras que en los ciclos de reutilización este porcentaje se mantuvo ligeramente por encima del 50% (Fig. 6B).

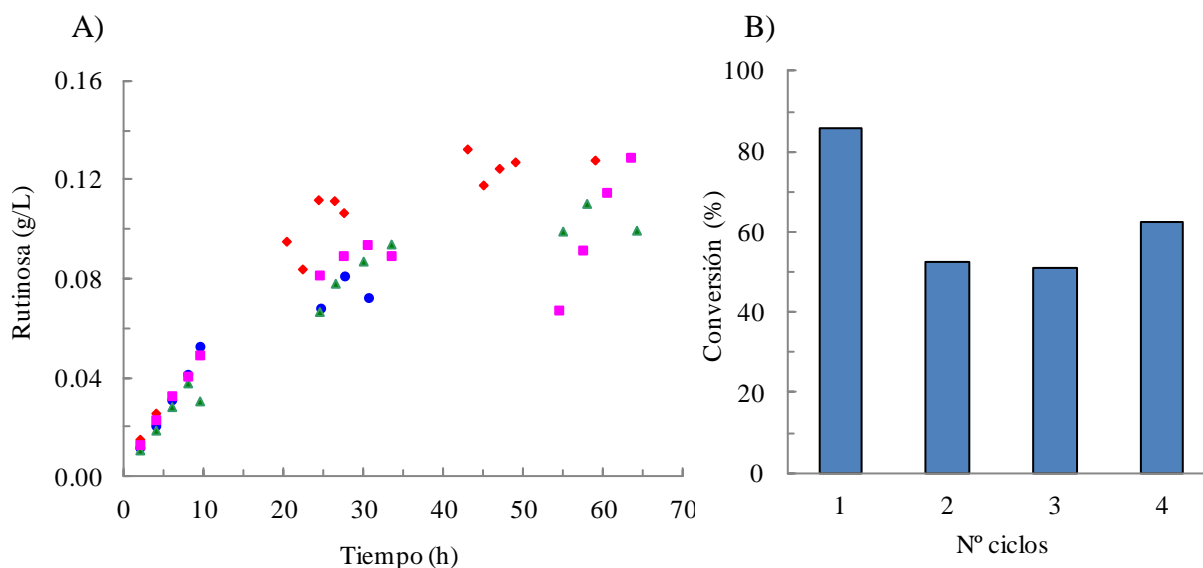


Figura 6(A). Perfil de producción de rutinosa desde 0.5 mM hesperidina en un reactor enzimático (50 ml). El catalizador (500 mg de MM) que contenía 0.009 U/g de α -ramnosil- β -glucosidasa fue reutilizado 4 veces (pH 8.0, 40°C). \blacklozenge 1^{er} ciclo, \bullet 2^{do} ciclo, \blacktriangle 3^{er} ciclo, \blacksquare 4^{to} ciclo. (B) Porcentaje de conversión del sustrato (0.5 mM hesperidina) en los 4 ciclos de reutilización del catalizador a las 24 h.

La enzima α -ramnosil- β -glucosidasa fue evaluada previamente en su forma soluble. El extracto crudo y la enzima pura presentaron sus actividades máximas a 60 y 70°C respectivamente (Mazzaferro *et al.*, 2010). Mientras que la actividad del extracto crudo no fue detectable a 70°C, la enzima pura mantuvo una actividad significativa incluso a los 80°C (Fig. 7). La disminución de la temperatura óptima del extracto crudo de *Acremonium* sp. DSM24967 respecto de la enzima pura podría deberse a la presencia de proteasas extracelulares que este microorganismo libera durante su crecimiento. Cuando se evaluó el perfil de actividad del catalizador inmovilizado respecto de la temperatura, se encontró la mayor actividad a 50°C mientras que a 70°C mantuvo un 15% de la actividad (Fig. 7).

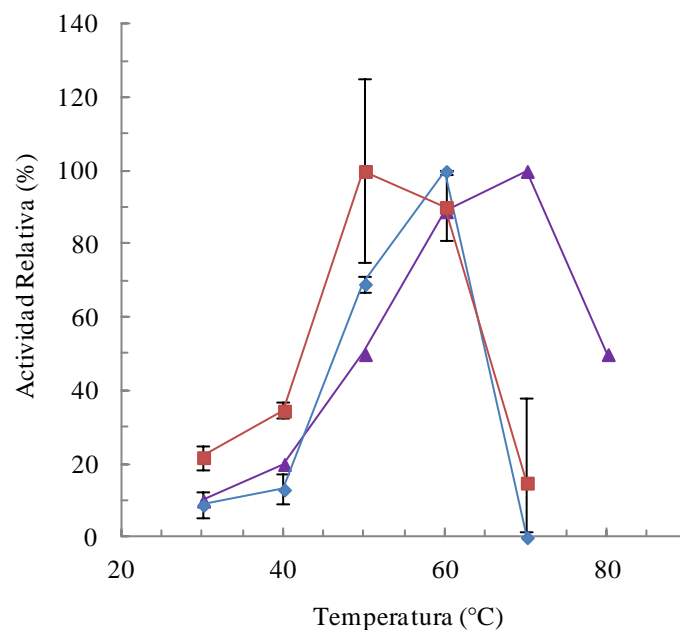


Figura 7. Comparación de los perfiles de actividad respecto a la temperatura de la enzima inmovilizada en MM (■) (0.019 U/g), la enzima libre en el extracto crudo (◆) (0.893 U/ml) y en estado puro (▲) (1.02 U/ml). Los valores indicados corresponden al 100% de actividad.

Estos datos nos indican que la enzima inmovilizada tiene un comportamiento similar a la enzima soluble del extracto extracelular, aunque la detección de actividad a 70°C nos indicaría una ligera estabilización del péptido. Sin embargo, este mostró una temperatura óptima menor (50°C) respecto a las 2 preparaciones solubles. Dado que la temperatura favorece la oxidación catalizada por metales y esta es una causa común de pérdida de actividad de las preparaciones enzimáticas (Andersson *et al.*, 2000), los resultados sugieren que esta disminución podría deberse a una oxidación de la proteína catalizada por trazas de iones hierro provenientes del soporte.

3. Recubrimiento de MM con PEI

Existen diferentes compuestos estabilizantes de proteínas que son efectivos contra la oxidación catalizada por metales (Andersson *et al.*, 2000). Si bien el quelante deferoxamina es utilizado específicamente para inhibir la acción del hierro, este no es una molécula simple de co-inmovilizar junto a la enzima. En cambio, el polímero catiónico polietilenimina (PEI) representa un sistema simple para su co-inmovilización (Piñuel *et al.*, 2011). Además, fue descrito como estabilizante de proteínas contra la oxidación catalizada por metales (Mazzaferro *et al.*, 2010) y específicamente contra la oxidación catalizada por hierro (Breccia *et al.*, 2002). La actividad estabilizante está

relacionada a su capacidad de quelar iones metálicos al igual que EDTA o deferoxamina. Sin embargo, PEI posee una actividad extra que lo hace más eficiente que los quelantes mencionados, puesto que actúa como secuestrador “*scavenger*” de radicales libres generados en el proceso de oxidación (Breccia *et al.*, 2002). Estos radicales libres (principalmente OH^\bullet) son los responsables de la inactivación de las enzimas (Stadtman y Berlett, 1991).

Previamente se demostró que PEI y Cu^{2+} forman un complejo con un pico de absorbancia a 273 nm y la relación de 10 moles del monómero etilenimina por mol de Cu^{2+} se mantiene para todos los pesos moleculares disponibles del polímero (Breccia *et al.*, 2002). Esta relación se utilizó para conocer la cantidad de PEI adsorbido a las MM. Si bien tanto la polianilina como la polietilenimina son capaces de unir Cu^{2+} , las MM y las MM-PEI mostraron diferencias significativas respecto al acomplejamiento de Cu^{2+} (Fig. 8). Esta diferencia nos permitió estimar que las MM-PEI contienen aproximadamente 0.84 mg PEI/g fibras.

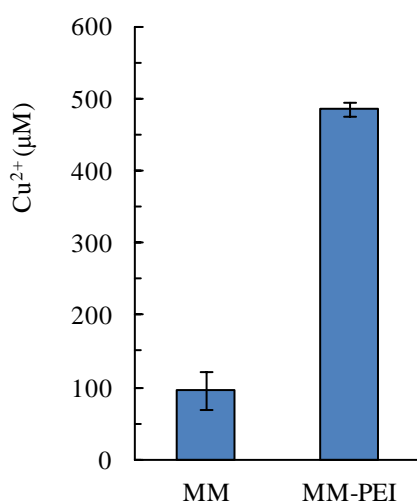


Figura 8. Adsorción diferencial de Cu^{2+} de las microfibras magnéticas recubiertas con el polímero catiónico polietilenimina. MM microfibras magnéticas, MM-PEI microfibras magnéticas recubiertas con PEI.

Por otro lado, el recubrimiento con PEI cambió las propiedades físicas del soporte. La Fig. 9 (1 y 2) denota el aspecto macroscópico de las fibras 20 segundos después de ser agitadas. Se puede observar que la sedimentación de la preparación MM-PEI fue prácticamente completa, mientras que la preparación sin PEI presentó un comportamiento coloidal que se mantuvo por largos períodos de tiempo, incluso días (Fig 9A). Este fenómeno implica que el tiempo de separación del soporte recubierto con polietilenimina desde la mezcla de reacción, en un proceso a mayor escala, sería significativamente menor. Esto está correlacionado al tamaño microscópico de las

microfibras: el tamaño de las MM-PEI es de 4-10 veces mayor que el de las MM, y en el sobrenadante la preparación MM-PEI denota la ausencia de partículas coloidales de menor tamaño (Fig. 9 A, B, C y D).

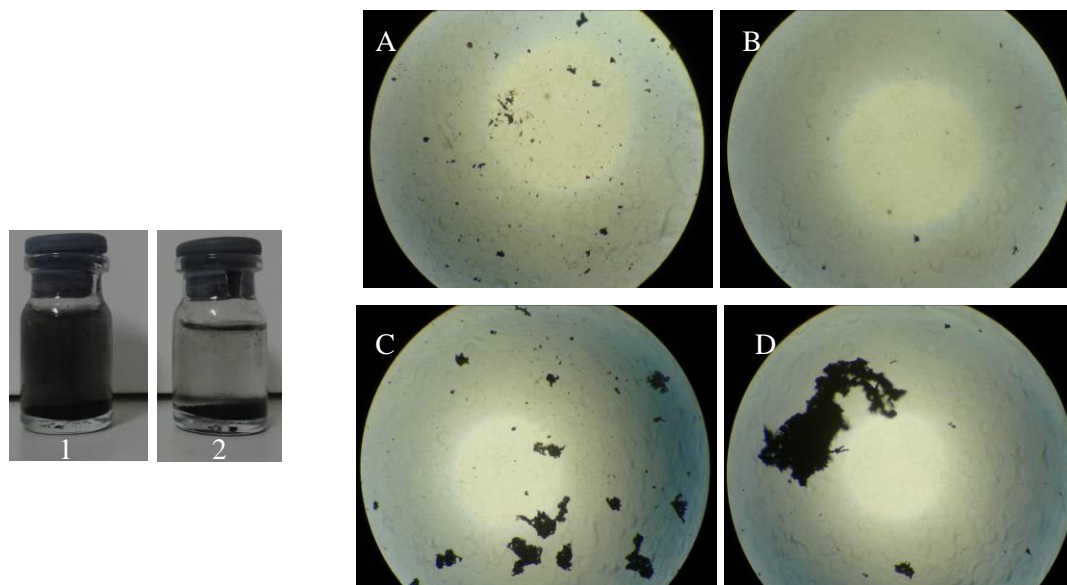


Figura 9. Propiedades físicas diferenciales de las MM y MM-PEI. A la izquierda se muestran las preparaciones 20 segundos después de ser agitadas. La velocidad de sedimentación es superior en las MM-PEI (1: MM y 2: MM-PEI). Este comportamiento está correlacionado con el incremento del tamaño de las partículas (microfotografía C y D) y la disminución de las fibras de menor tamaño que permanecen en el sobrenadante de la muestra de MM (microfotografía A y B). A la derecha microfotografías (200x): sobrenadante A: MM, B: MM-PEI y sedimento C: MM, D: MM-PEI.

4. Efecto de la temperatura sobre la actividad de α -ramnosil- β -glucosidasa inmovilizada sobre microfibras magnéticas recubiertas con PEI (MM-PEI)

La enzima inmovilizada sobre MM-PEI muestra la misma temperatura óptima que la enzima libre (extracto crudo), a diferencia de la preparación inmovilizada sin polietilenimina que mantiene una temperatura óptima inferior. Asimismo, a 70°C la enzima inmovilizada sobre MM mantuvo sólo un 15% de actividad residual, mientras que el catalizador recubierto con polietilenimina mostró un 34% de actividad residual (Fig.10). La actividad máxima a 60°C y el incremento de actividad residual a 70 °C nos indican que la cobertura con el polímero catiónico ejerce un efecto estabilizante sobre el catalizador que podría deberse a una inhibición de la oxidación catalizada por trazas de hierro provenientes del soporte.

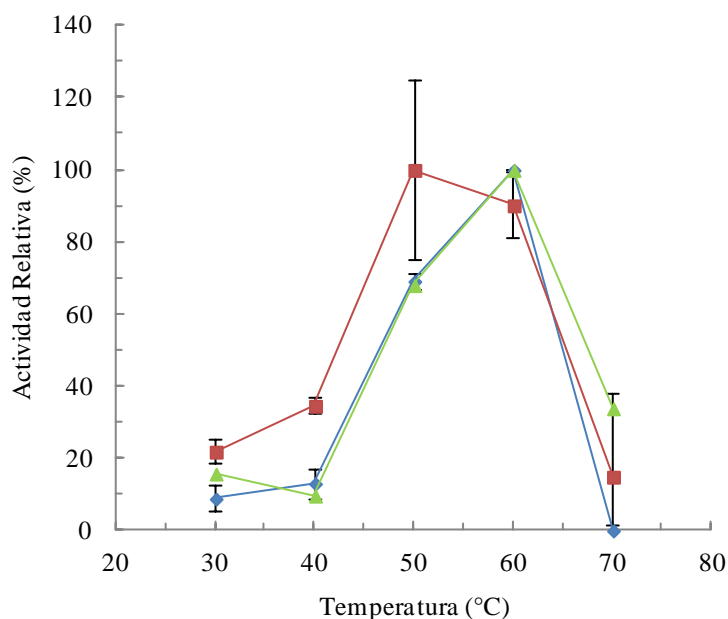


Figura 10. Efecto del polímero catiónico (PEI) en el perfil de la actividad α -ramnosil- β -glucosidasa respecto a la temperatura. \blacklozenge Extracto crudo (0.893 U/ml); \blacksquare enzima inmovilizada en MM (0.019 U/g) e \blacktriangle inmovilizada en MM-PEI (0.031 U/g). Los valores indicados corresponden al 100% de la actividad.

Las fibras magnéticas presentan una liberación significativa de iones hierro a bajos valores de pH que dificulta su utilización; este fenómeno es despreciable a valores superiores a la neutralidad. Sin embargo, no existen descripciones respecto a la liberación de cantidades trazas del metal en estas condiciones. Considerando que la enzima α -ramnosil- β -glucosidasa es proclive a la oxidación catalizada por metales (Piñuel *et al.*, 2011), nuestros resultados sugieren que esta representa un sistema lo suficientemente sensible para detectar el desprendimiento del metal desde MM a valores de pH superiores a la neutralidad.

5. Caracterización de los subproductos de la industria citrícola (pellets de naranja y limón)

La estimación del contenido de hesperidina en los pellets de naranja (*Citrus sinensis*) y limón (*Citrus limon*) se realizó mediante una extracción con solventes (metanol:DMSO 50:50), seguida de una determinación enzimática (Mazzaferro & Breccia, 2012 en prensa). La concentración de hesperidina en los pellets de limón fue del 2.5% p/p mientras que en los pellets de naranja alcanzó un 6.8% p/p (Fig. 11). Si bien estos valores dependen de factores como la variedad y el tiempo de maduración de la fruta, la

concentración de hesperidina en pellets de naranja obtenida es comparable con los valores descriptos para cáscara de naranja (Al Ashaal *et al.*, 2011). Dado que la concentración de hesperidina es mayor en pellets de naranja que en pellets de limón, se seleccionaron los primeros como sustrato para la obtención de rutinosa.

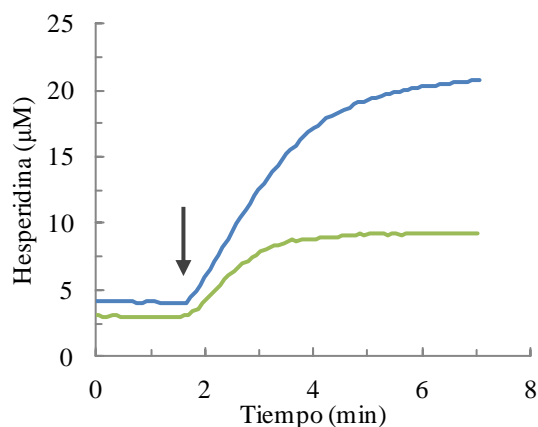


Figura 11. Cuantificación de hesperidina en los pellets de (—) naranja y (—) limón. La flecha indica el agregado del catalizador.

Suspensiones acuosas de pellets sometidas a diferentes temperaturas, mostraron baja extracción de hesperidina y por lo tanto, estas no constituían un buen sustrato para el catalizador (Fig. 12). Para solucionar este inconveniente, los pellets se sometieron a un tratamiento termo-alkalino. En este caso, la solubilidad de hesperidina (<0.324 mM) aumenta debido a la apertura del anillo de la aglicona, rindiendo la correspondiente chalcona (hesperidina metil chalcona, solubilidad en agua: >300 mM) (Di Mauro *et al.*, 1999). Además, en presencia de Ca(OH)_2 los pellets se disgregan e incrementan su superficie y en consecuencia aumenta la disponibilidad del sustrato al catalizador.

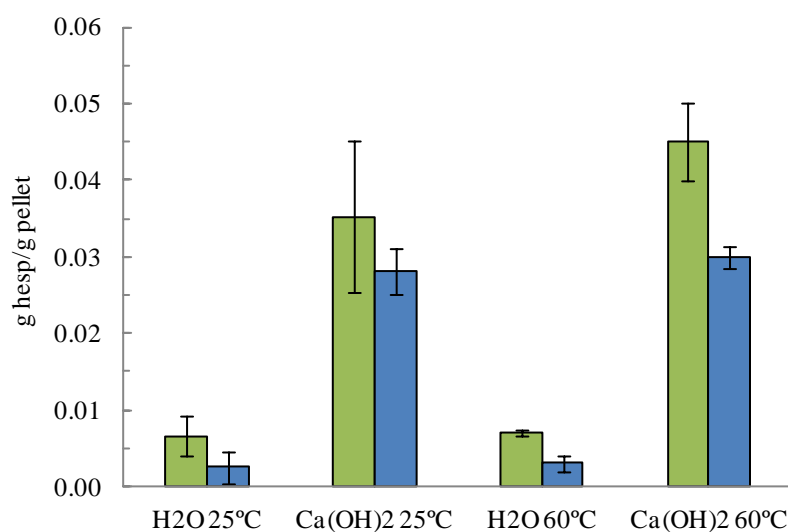


Figura 12. Cuantificación de hesperidina luego de someter los pellets de naranja (■ 2.5 %p/v; ■ 5%p/v) a un tratamiento termo-alkalino durante 1h.

La concentración de hesperidina en el sobrenadante de una suspensión que contenía 2.5% p/v de pellets luego del tratamiento termo-alcálico se incrementó por ambas variables, el pH y la temperatura. El uso de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ evita la utilización de solventes orgánicos, que suelen incluirse en el medio de reacción para aumentar la eficiencia de síntesis en los procesos catalizados por glicosidasas (Heidecke *et al.*, 2009). Sin embargo, las enzimas en general son inestables en presencia de solventes orgánicos y estos son altamente costosos para un proceso a mayor escala.

El tratamiento de 2.5% p/v de pellets de naranja con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ extrajo una mayor cantidad de hesperidina respecto del mismo tratamiento con mayor concentración de pellets, tanto a temperatura ambiente como a 60°C (Fig. 12). Las suspensiones de pellets tratados con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y temperatura se caracterizaron respecto al contenido de azúcares reductores. Es necesario evitar las altas concentraciones de azúcares reductores en el medio de reacción, dado que estos están descritos como inhibidores del glicosil hidrolasas (Mazzaferro *et al.*, 2008). La suspensión que contenía 5% p/v de pellets presentó un contenido mayor de azúcares reductores (40.6 mM) respecto a la suspensión de 2.5% p/v de pellets (15.6 mM) (Fig. 13).

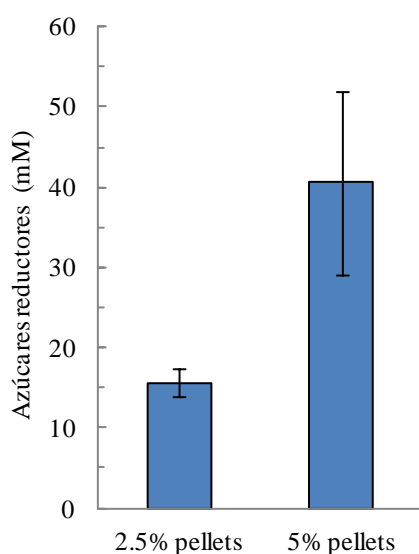


Figura 13. Concentración de azúcares reductores presente en ambas suspensiones de pellets de naranja.

Cuando estas suspensiones se utilizaron como sustrato de la enzima α -ramnosil- β -glucosidasa, se observó la mayor liberación de rutinosa con la suspensión de 2.5% p/v de pellets de naranja sometidos al tratamiento termo-alcálico (Fig. 14). La suspensión de 5% p/v de pellets presentó un medio de reacción de alta viscosidad. Este fenómeno puede deberse a la alta concentración de pectatos de calcio que contienen los pellets de naranja. El objetivo de lograr un medio de reacción con baja viscosidad para evitar

barreras difusionales en la catálisis, sumado a la mayor extracción de hesperidina (y, en consecuencia, la mayor liberación de rutinosa) condujo a la elección de la suspensión de 2.5% p/v de pellets de naranja para la producción de rutinosa.

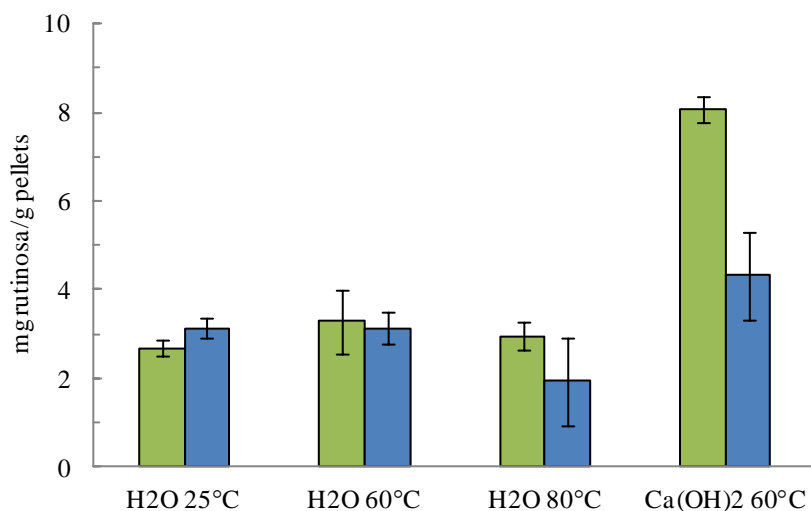


Figura 14. Rutinosa liberada por acción de la enzima α -ramnosil- β -glucosidasa sobre pellets de naranja sometidos a diferentes tratamientos.

6. Reactor enzimático para la producción de rutinosa

Se utilizó la preparación de 2.5% p/v de pellets de naranja sometidos al tratamiento termo-alcálico, previamente descrito, para la construcción de un reactor enzimático con α -ramnosil- β -glucosidasa inmovilizada sobre MM-PEI. El perfil de producción de rutinosa a partir de pellets de naranja mostró en un primer ciclo una producción lineal hasta los 80 min con un porcentaje de conversión del sustrato del 21.6% luego de 2 h. El catalizador inmovilizado fue reutilizado en un segundo ciclo, donde se obtuvo un 13.6% de conversión (Fig. 15). Esta disminución podría ser originada por la pérdida del catalizador desde el soporte dada por las altas temperaturas operacionales (60°C) como fue demostrado previamente para la enzima inmovilizada en el soporte quitosano-sílica (Piñuel *et al.*, 2011). A pesar de los bajos valores de conversión en ambos ciclos (21.6 y 13.6 % respectivamente), se logró obtener una solución de rutinosa de 0.32 g/L luego de un proceso de 2 ciclos de catálisis de 2 h cada uno, utilizando un subproducto de la industria cítrica de bajo costo.

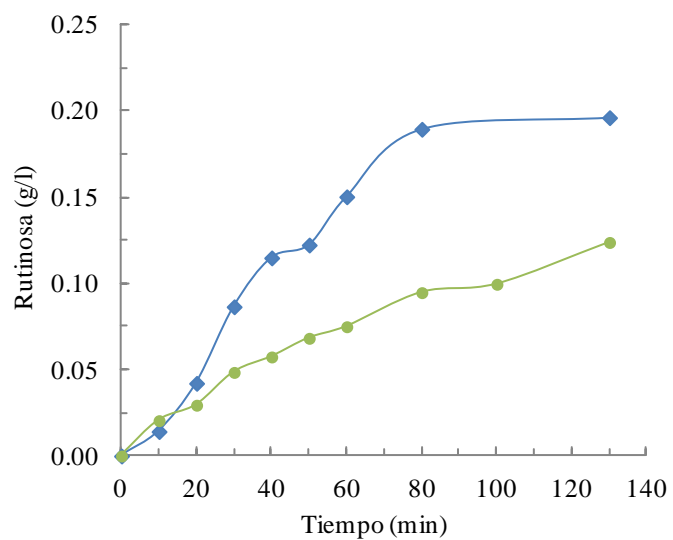
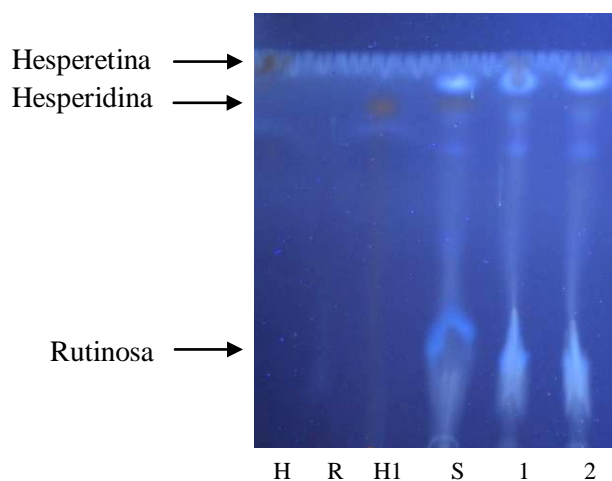


Figura 15. (A) Producción de rutinosa en 2 ciclos desde pellets de naranja con MM-PEI a pH 8.0 y 60°C. ♦ 1^{er} ciclo, ● 2^{do} ciclo. (B) TLC: H hesperetina, R rutinosa, H1 hesperidina, S sustrato, 1 producto de reacción del 1^{er} ciclo, 2 producto de reacción del 2^{do} ciclo



CONCLUSIONES

- Se inmovilizó la enzima α -ramnosil- β -glucosidasa sobre MM lo que permitió el control cinético de la reacción por la simple remoción del catalizador mediante la aplicación de un campo magnético y la reutilización del mismo.
- El recubrimiento de las MM con PEI permitió estabilizar la preparación catalítica posiblemente por inhibición de la oxidación catalizada por iones hierro desprendidos del soporte.
- Se logró la obtención de rutinosa a través de la biotransformación de una suspensión de pellets de naranja, sometida previamente a un tratamiento termoalcalino, con la enzima inmovilizada sobre MM-PEI. Se destaca en este trabajo la obtención de un compuesto de alto valor agregado a partir de un subproducto de bajo costo de la industria citrícola.
- A diferencia del proceso químico de obtención de rutinosa, se logró la biotransformación a valores de pH cercanos a la neutralidad y sin el uso de solventes orgánicos que son económicamente inviables en los procesos a mayor escala.
- De los datos obtenidos se propone, para continuar esta línea de investigación, la implementación de un sistema continuo que permita remover el producto de reacción durante el proceso para evitar la inhibición de la catálisis. Se sugiere también el estudio de la purificación del disacárido desde la mezcla de reacción.

REFERENCIAS

- Al-Ashaall H.A., El-Sheltawy S.T. 2011. Antioxidant capacity of hesperidin from citrus peel using electro spin resonance and cytotoxic activity against human carcinoma cell lines. *Pharmaceutical Biology*. 49(3): 276–282.
- Andersson M.M., Breccia J.D., Hatti-Kaul R. 2000. Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 32: 145-153.
- Arroyo M. 1998. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*. 39(2): 23-29.
- Breccia J.D., Andersson M.M., Hatti-Kaul R. 2002. The role of poly(ethyleneimine) in stabilization against metal-catalyzed oxidation of proteins: a case study with lactate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta*.1570: 165-173.
- Coniglio M., Kreis W. 2009. ImMobilization of flavonol 3-O- β -heterodisaccharidase on porous glass and production of rutinosa from rutin. *Planta Medica*. 75: 1459-146.
- Daiyasu H., Saino H., Tomoto H., Mizutani M., Sakata K, Toh H. 2008. Computational and experimental analyses of furcatin hydrolase for substrate specificity studies of disaccharide-specific glycosidases. *Journal of Biochemistry*. 144: 467-475.
- Dekker R.F.H. 1989. ImMobilization of a lactase onto a magnetic support by covalent attachment to polyethylenimine-glutaraldehyde-activated magnetite. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 22.
- Di Mauro A., Fallico B., Passerini A., Rapisarda P., Maccarone E. 1999. Recovery of hesperidin from Orange peel by concentration of extracts on styrene-divinylbenzene resin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.47: 4391-4397.
- Gowoun L., Jungbae K., Jung-heon L. 2008. Development of magnetically separable polyaniline nanofibers for enzyme imMobilization and recovery. *Enzyme and Microbial Technology*. 42: 466-472.
- Heidecke C.D., Parsons T.B., Fairbanks A.J. Endohexosaminidase-catalysed glycosylation with oxazoline donors: effects of organic co-solvent and pH on reactions catalysed by Endo A and Endo M. 2009. *Carbohydrate Research*. 344: 2433-2438.

- Khan M.K., Abert Vian M., Fabiano Tixier A.S., Dangles O., Chemat F. 2010. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*. 119: 851-858.
- Lai L.B., Gopalan V., Glew R.H. 1992. Continuous spectrophotometric assays for β -glucosidases acting on the plant glucosides L-picein and prunasin. *Analytical Biochemistry*. 2: 365–369.
- Lee G., Kim J., Lee J.H. 2008. Development of magnetically separable polyaniline nanofibers for enzyme immobilization and recovery. *Enzyme and Microbial Technology*. 42: 466-472.
- Liese A., Seelbach K., Wandrey C. 2001. Putting enzymes to work. *Biotechnology Advances*. 19: 317-318.
- Lin L.Z. y Harnly J.M. 2007. A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 55: 1084-1096.
- Manthey J.A., Grohmann K. 1996. Concentrations of hesperidin and other peel flavonoids in citrus processing byproducts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 44: 811-814.
- Martearena M.R., Daz M., Ellenrieder G. 2008. Synthesis of rutinoides and rutinose by reverse hydrolysis catalyzed by fungal α -L-rhamnosidases. *Biocatalysis and Biotransformation*. 26(3): 177-185.
- Masmoudi M, Besbes S, Chaabouni M, Robert C, Paquot M, Blecker C, Attia H. 2008. Optimization of pectin extraction from lemon by-product with acidified date juice using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*. 74(2): 185-192.
- Mazzaferro L.S., Orrillo G.A., Ledesma P., Breccia J.D. 2008. Dose-dependent significance of monosaccharides on intracellular α -L-rhamnosidase activity from *Pseudoalteromonas* sp.. *Biotechnology letters*. 30: 2147-2150.
- Mazzaferro L., Piñuel L., Minig M. Breccia J.D. 2010. Extracellular monoenzyme deglycosylation system of 7-O-linked flavonoid β -rutinosides and its disaccharide transglycosylation activity from *Stilbella fimetaria*. *Archives of Microbiology*. 192: 383-393.
- Mazzaferro L.S., Breccia J.D. 2011. Functional and biotechnological insights into diglycosidases. *Biocatalysis and Biotransformation*. 29(4): 103-112.
- Mazzaferro L.S., Breccia J.D. 2012. Quantification of hesperidin in citrus-based foods using a fungal diglycosidase. *Food Chemistry*. En prensa.

- Miller G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31: 426-428.
- Morana A., Mangione A., Maurelli L., Fiume I., Paris O., Cannio R., Rossi M. 2006. ImMobilization and characterization of a thermostable β -xylosidase to generate a reusable biocatalyst. *Enzyme and Microbial Technology*. 39: 1205-1213.
- Nogata Y., Sakamoto K., Shiratsuchi H., Ishii T., Yano M., Ohta H. 2006. Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 70(1): 178-192.
- Patrick K. Jacques, E. J. 1995. European Patent Application EP0648496. Therapeutic compositions for use in the treatment of skin lesions and method of making same. <http://www.freepatentsonline.com/EP0648496.html>
- Pawlowska A.G., Camangi F., Bader A., Braca A. 2009. Flavonoids of *Zizyphus jujuba* L. and *Zizyphus spina-christi* (L.) Willd (Rhamnaceae) fruits. *Food Chemistry*. 112: 858-862.
- Pawlowski K. 2010. Two novel disaccharides, rutinose and methylrutinose, are involved in carbon metabolism in *Datisca glomerata*. *Planta*. 231: 507-521.
- Peterson J.J., Beecher G.R., Bhagwat S.A., Dwyer J.T., Gebhardt S.E., Haytowitz D.B., Holden J.M. 2006. Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: a compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19: S74-S80.
- Piñuel L., Mazzaferro L.S., Breccia J.D. 2011. Operational stabilization of fungal α -rhamnosyl- β -glucosidase by imMobilization on chitosan composites. *Process Biochemistry*. 46: 2330-2335
- Quintin J., Lewin G. 2004. Regioselective 6-iodination of 5,7-dioxygenated flavones by benzyltrimethylamMonium dichloroiodate. *Tetrahedron Letters*. 45: 3635-3638.
- Quintin J., Lewin G. 2005. Mild alkaline hydrolysis of some 7-O-flavone glycosides. Application to a novel access to rutinose heptaacetate. *Tetrahedron Letters*. 46: 4341-4343.
- Schubert M., Melnikova A.N., Mesecke N., Zubkova E.K., Fortte R., Batashev D.R., Barth I., Sauer N., Gamalei Y.V., Mamushina N.S. Tietze L.F., Voitsekhovskaja O.V., Spagna G., Barbagallo R.N., Martino A., Pifferi P.G. 2000. A simple method for purifying glycosidases: α -L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma of moscato wine. *Enzyme and Microbial Technology*. 27: 522-530.

- Stadtman, E.R., Berlett, B.S. 1991. Fenton chemistry: amino acid oxidation. *Journal of Biological Chemistry*. 266 (26): 17201-17211.
- Tripoli E., La Guardia M., GiamManco S., Di Majo D., GiamManco M. 2007. Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties. *Food Chemistry*. 104: 466-479.
- Tsuruhami K., Mori S., Amarume S., Saruwatari S., Murata T., Hirakake J, Sakata K., Usui T. 2006. Isolation and characterization of a β -Primeverosidase-like enzyme from *Penicillium multicolour*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 70(3): 691-698.
- Witham F.H., Blaydes D.F., Devlin R.M. 1971. Experiments in plant physiology. Van Nostrand Reinhold Company. New York, USA. p 245.
- Wandrey C., Liese A., Kihumbu D. 2000. Industrial biocatalysis: past, present and future. *Organic Process Research and Development*. 4: 286-290.
- Katchalski Katzir E. 1993. ImMobilized enzymes, learning from past successes and failures. *Trends in Biotechnology*. 11(11): 471-478.
- Wang Y.C., Chuang Y.C., Hsu H.W. 2008. The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. *Food Chemistry*. 106: 277-284.
- Zhou L., Lu Ch. Wang G.L., Geng H.L., Yang J.W., Chen P. 2009. Synthesis of R- β -rutinosides by rutin degrading reaction. *Journal of Asian Natural Products Research*. 11(1): 18-23.