

DIGLICOSIDASAS Y EL GÉNERO
ACREMONIUM

Iara Soledad Mansilla

~ 2016 ~

SANTA ROSA - LA PAMPA - ARGENTINA

PREFACIO

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Química, de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Laboratorio de Biocatálisis, dependiente de INCITAP-CONICET- Departamento de Química-FCEyN-UNLPam durante el período comprendido entre Septiembre 2014 y Mayo 2016, bajo la dirección de Dr. Javier D. Breccia.

Santa Rosa, 1 de Julio de 2016

Iara Soledad Mansilla

Laboratorio de Biocatálisis

INCITAP-CONICET

Departamento de Química - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad Nacional de La Pampa

AGRADECIMIENTOS

En las siguientes líneas, deseo dar las gracias a quienes de alguna manera han colaborado en la realización de este trabajo, tanto por sus aportes científicos como humanos.

A la Universidad Nacional de La Pampa (UNLPam), institución que nos abrió las puertas para formarnos como profesionales.

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

Al Dr. Javier D. Breccia por haber aceptado la dirección de esta tesina.

A mis compañeros del Laboratorio de Biocatálisis, especialmente a Lucas y Gise, a quienes robé gran parte de su tiempo y me llenaron de buena energía.

A mis compañeros de la facu, en particular a mis amigas Mariel y Vale, son lo más valioso que me llevo de mi paso por aquí.

A mis amigos de la vida, que por suerte son muchos, y por eso no me animo a nombrarlos. Pero ustedes saben lo importante que han sido para mi.

A mi familia, este trabajo es para ustedes.

Mamá y papá, aún con todos mis tropiezos, siempre estuvieron apoyándome y esperándome hasta el día de hoy. Mili, el angelito de la casa, gracias por darnos luz siempre. Los amo.

Ana, mi concubina de toda la vida, con etapas de amor-odio, fuiste mi pilar todos estos años. Te adoro con el alma.

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

Contenidos

Resumen	5
Abstract	6
1. Introducción	
1.1 Género <i>Acremonium</i>	8
1.2 Flavonoides	8
1.3 Glicosidasas microbianas que hidrolizan flavonoides	9
2. Materiales y Métodos	
2.1 Reactivos Químicos	13
2.2 Activación de cepas de <i>Acremonium</i> y <i>Sarocladium</i>	13
2.3 Crecimiento y producción desglicosilante de cepas de <i>Acremonium</i> y <i>Sarocladium</i> en medio específico	13
2.4 Electroforesis	13
2.5 Estimación de los parámetros de crecimiento y clarificación	14
2.6 Crecimiento y producción desglicosilante de <i>Sarocladium strictum</i> DMic 093557 en medio líquido	14
2.7 Reacciones enzimáticas	14
2.8 Cuantificación espectrofotométrica de actividad desglicosilante de rutina	15
2.9 Cromatografía en capa delgada	15
3. Resultados y Discusión	
3.1 Selección de microorganismos de los géneros <i>Acremonium</i> y <i>Sarocladium</i> capaces de degradar flavonoides	17
3.2 Producción de glicósido hidrolasas con rutina como fuente de carbono	21
3.3 Características culturales de distintas cepas de <i>Acremonium</i> y <i>Sarocladium</i> en medio sólido utilizando rutina como fuente de carbono	22
3.4 Selección de cepa de <i>Acremonium</i> productora de diglicosidasas	25
3.5 Identificación de los productos de reacción	26
4. Conclusiones	29
5. Referencias	31

Resumen

La degradación de flavonoides utilizando diglicosidasas se describió en los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Acremonium*. Este último, es un género complejo y recientemente se transfirieron algunos de sus miembros al género *Sarocladium*. En este trabajo, se realizó una búsqueda de diglicosidasas en 32 cepas pertenecientes a los géneros *Acremonium* y *Sarocladium*. La degradación de los flavonoides hesperidina y diosmina no se detectó en ninguna de las cepas ensayadas, mientras que 21 cepas fueron capaces de hidrolizar rutina. Dado que la clarificación o hidrólisis del flavonoide no indica la estrategia de desglicosilación, por ensayos zimográficos se detectaron siete cepas productoras de actividad diglicosidasa. Se seleccionó a *Sarocladium strictum* DMic 093557 como adecuado productor de enzimas, porque produjo una banda con un peso molecular aparente bajo y la mayor tasa de clarificación en medio sólido (K_c 2.01). En cultivo sumergido (25 °C, pH 5.0) con rutina como fuente de carbono, la máxima producción de actividad desglicosilante se detectó luego de 9 días de crecimiento (8.6 ± 0.8 U/L). Por otro lado, los productos de reacción de la hidrólisis de rutina se identificaron como rutinosa y quercetina, confirmando la producción de la actividad diglicosidasa. Se pretende secuenciar el péptido responsable de dicha actividad para su posterior caracterización dado su potencial de aplicación y la ventaja de tener acceso al genoma completo de *S. strictum*, que nos permitirá avanzar en estudios futuros.

Abstract

Flavonoids degradation using diglycosidases was reported in the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Acremonium*. The latter is a complex genus, and recently some of its members were transferred to the genus *Sarocladium*. In this work, a search for diglycosidases in 32 strains belonging to the genera *Acremonium* and *Sarocladium* was performed. The degradation of diosmin and hesperidin was not detected in any of the tested strains, whereas 21 strains were able to hydrolyze rutin. Although clarification or hydrolysis of the flavonoid does not indicate deglycosylation strategy, throughout zymographic analysis, seven strains were found as producers of diglycosidase activity. *Sarocladium strictum* DMic 093557 was selected among the strains as a suitable enzymatic producer due to the lower apparent molecular weight of the protein as well as the highest rate of clarification on solid medium (Kc 2.01). Furthermore, the reaction products of the rutin hydrolysis were identified as quercetin and rutinose, confirming the production of diglycosidase activity. In submerged cultures (25 °C, pH 5.0) with rutin as sole carbon source, the higher production of diglycosidase was detected at the ninth day (8.6 ± 0.8 U/L). The potential application of the peptide responsible of this activity and the advantage of having access to the complete genome of *S. strictum* will drive future studies.

Introducción

Si me caí, es porque estaba caminando. Y
caminar vale la pena aunque te caigas.

E. Galeano.

1.1 Género *Acremonium*

Acremonium es un género complejo que comprende un amplio número de especies. Diferentes revisiones del género, fundamentados en estudios moleculares, transfirieron varias especies de *Acremonium* al género *Sarocladium*. De acuerdo con Summerbell *et al.* (2011) *Sarocladium* se diferencia morfológicamente de *Acremonium* por sus fiálides elongadas que surgen solitarias desde las hifas vegetativas o que se sustentan sobre conidióforos escasa a repetidamente ramificados, por la producción de adelofiálides abundantes y por presentar conidios elongados. *Acremonium*, en cambio, se caracteriza por sus conidióforos principalmente no ramificados o escasamente ramificados cerca de la base, por la ausencia (casi absoluta) de adelofiálides y por presentar conidios de varias formas (subglobosos, ovalados, elipsoidales). Entre las especies de *Acremonium* y *Sarocladium* se han descrito patógenos humanos, animales y vegetales, como así también saprófitos (Summerbell *et al.*, 2011; Giraldo *et al.*, 2015).

1.2 Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Dada su ubicuidad forman parte de la dieta humana y presentan propiedades benéficas como, actividad antitumoral, antiviral, antiinflamatoria y antioxidante (Benavente-García *et al.*, 1997). Estructuralmente, los flavonoides constan de una base aromática, derivada del difenilpropano (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) (Figura 1.1).

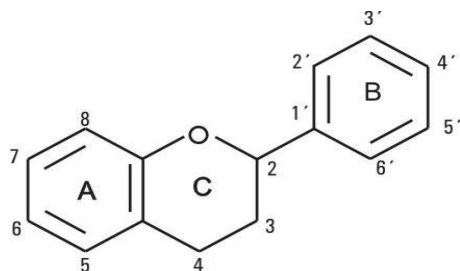


Figura 1.1: Estructura básica de los flavonoides.

Los flavonoides raramente se encuentran como moléculas libres en la naturaleza, en general están presentes como glicósidos. Los azúcares se unen preferentemente a la posición C3 y con menor frecuencia al C7 del anillo A. Rutina, hesperidina y diosmina son flavonoides glicosilados presentes mayoritariamente en el género *Citrus* (Kawaii *et al.* 2000). Debido al carácter hidrofílico de los residuos de azúcar, los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona respectiva. La desglicosilación de estos compuestos puede alterar su bioactividad, estabilidad química, biodisponibilidad y/o farmacocinética (Kren & Martinková 2001). En vista de los múltiples grupos funcionales y estereocentros presentes en los flavonoides, las enzimas representan catalizadores ideales para reacciones estereo- y regioselectivas (van Rantwijk *et al.*, 1999; Giffhorn *et al.*, 2000).

1.3 Glicosidasas microbianas que hidrolizan flavonoides

La desglicosilación enzimática es el primer paso en la degradación de los flavonoides, seguida por la oxidación de los anillos aromáticos. En el caso de flavonoides diglicosilados, los residuos glicosídicos pueden ser removidos mediante dos monoglicosidasas que actúan en modo secuencial o bien en una única reacción por acción de una diglicosidasa (Sarry & Gunata, 2004). El modo secuencial se inicia con una enzima que reconoce y cliva la unión entre los dos residuos de azúcar. Algunos ejemplos incluyen α -ramnosidasas (EC 3.2.1.40), α -arabinosidasas (EC 3.2.1.55) y β -xilosidasas (EC 3.2.1.37) (Manzanares *et al.*, 2001; Orrillo *et al.*, 2007); seguidamente una β -D-glucosidasa hidroliza el enlace heterosídico entre el residuo de glucosa y la aglicona (Figura 1.2) (Barbagallo *et al.*, 2004). Las β -glucosidasas actúan de modo “exo” y como tales son incapaces de hidrolizar el enlace si otro azúcar está unido al término no reductor de la glucosa. Esta es una de las formas, que tienen los vegetales, de proteger los glucósidos mediante la unión de otro azúcar al residuo glucosídico y contrarrestar la ubicuidad de las glucosidasas (Kren 2001). Las “diglicosidasas”, pueden realizar la desglicosilación en una sola reacción: catalizan la ruptura de la unión aglicona – diglicósido, lo que resulta en la liberación de la aglicona y el disacárido correspondiente (Figura 1.2) (Günata *et al.*, 1998). Este es un mecanismo menos frecuente y hasta el momento solo 3 actividades diglicosidasas de origen fúngico han sido descritas

(Mazzaferro *et al.*, 2010; Simcikova *et al.*, 2014; Narikawa *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2002; Tsuruhami *et al.*, 2006; Neher *et al.* 2015).

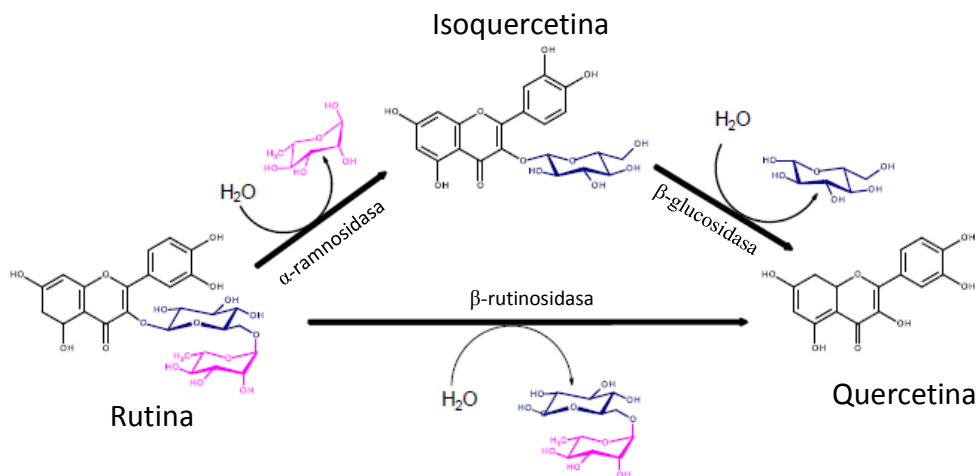


Figura 1.2: Desglucosilación enzimática de rutina mediante diferentes glicosil-hidrolasas.

Nuestro laboratorio ha descrito dos diglicosidasas. Una de ellas (EC 3.2.1.168), producida por el hongo *Acremonium* sp. DSM 24697 y la otra producida por la bacteria *Actinoplanes missouriensis*. Ambas enzimas escinden con alta especificidad el residuo disacarídico rutinoso (6-*O*- α -ramnopiranosil- β -D-glucopiranososa) a partir de hesperidina y otros 7-*O*-rutinosil flavonoides (Mazzaferro *et al.*, 2010; Neher *et al.*, 2015).

Las pocas diglicosidasas descritas hasta el momento contrastan con el uso potencial de las mismas, por ejemplo, en la modulación de aromas de alimentos (Wang *et al.*, 2001; Minig *et al.*, 2011) y la modificación de compuestos bio-activos con aplicación en la industria farmacéutica (Katayama *et al.*, 2013).

El objetivo general de este trabajo es la búsqueda de nuevos catalizadores con actividad diglicosidasa en cepas del género *Acremonium* y especies relacionadas para la degradación de los flavonoides rutina, diosmina, y hesperidina.

Objetivos específicos:

- a. Selección de una cepa con adecuada capacidad para hidrolizar flavonoides.
- b. Producción y cuantificación de las actividades glicósido- hidrolasas e identificación de los productos de reacción.

Materiales y Métodos

Mucha gente pequeña en lugares
pequeños, haciendo cosas pequeñas,
puede cambiar el mundo.

E. Galeano.

2.1 Reactivos químicos

Los reactivos 4-metilumbeliferil- α -L-ramnopiranosido (4-MURha), 4-metilumbeliferil- β -D- glucopiranosido (4-MUGlc), rutina, quercetina y hesperidina se compraron en Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). El reactivo 4-metilumbeliferil-rutinósido se sintetizó como es descrito en Mazzaferro *et al.* (2012). El resto de los reactivos se obtuvo de fuentes estándar.

2.2 Activación de cepas de *Acremonium* y *Sarcocladium*

Inóculo: Treinta y dos cepas del género *Acremonium* fueron cedidas por la Lic. Alejandra Hevia del Departamento de Micología, INEI ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires.

Las cepas fueron cultivadas en el siguiente medio de cultivo:

- Medio LB (g/L): 10.0 peptona de leche, 5.0 extracto de levadura. Los cultivos se incubaron a 25 °C en agitación durante 4 a 7 días, dependiendo de la cepa.

2.3 Crecimiento y producción desglicosilante de cepas de *Acremonium* y *Sarcocladium* en medio específico

Las cepas se cultivaron en un medio que contenía (g/L): 5.0 fuente de carbono (rutina, hesperidina o diosmina), 1.0 peptona de leche, 2.0 extracto de levadura, 50 mM buffer citrato de sodio pH 5 y 15 g/L agar. Los microorganismos se cultivaron durante 9 días a 25 °C.

2.4 Electroforesis

Se realizaron electroforesis nativas PAGE (10% p/v bis/acrilamida) de acuerdo con Laemmli (1970). Las muestras enzimáticas se obtuvieron a partir de las distintas cepas de *Acremonium* y *Sarcocladium* cultivadas con rutina como fuente de carbono en medio sólido. Se congelaron las fracciones de agar cercanas a la colonia, y luego se recuperó el sobrenadante por centrifugación (González *et al.*, 1996). El análisis zimográfico se realizó utilizando como revelador el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- rutinósido (4-MUR) (Mazzaferro *et al.*, 2012).

2.5 Estimación de los parámetros de crecimiento y clarificación

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

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

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

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

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

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

2.6 Crecimiento y producción desglucosilante de *Sarocladium strictum*

DMic 093557 en medio líquido

El cultivo sumergido de *Sarocladium strictum* DMic 093557 se realizó en un medio que contenía (g/l): 5.0 fuente de carbono (rutina, hesperidina o diosmina), 1.0 peptona de leche, 2.0 extracto de levadura, y 50 mM buffer citrato de sodio pH 5. El microorganismo se cultivó durante 9 días a 25 °C y 20 rpm.

2.7 Reacciones enzimáticas

Se incubaron 450 µl de sustrato (0.11% p/v rutina en 50 mM buffer citrato de sodio pH 5.0) con 50 µl de muestra enzimática. Se usó el cultivo completo de *Sarocladium strictum* DMic 093557 como fuente de enzimas ecto- y extracelulares. La reacción se realizó a 50 °C durante 1 h.

2.8 Cuantificación espectrofotométrica de actividad desglucosilante de rutina

El producto de la reacción enzimática quercetina se extrajo con 1 volumen de acetato de etilo y se centrifugó (2 min, 10000 rpm). Se tomaron 100 μ l de la fase orgánica y se disolvieron en 2000 μ l de 50 mM carbonato de sodio pH 10. Luego de 5 (\pm 2) min se midió la absorbancia a 323 nm, y se calculó la concentración a partir de la curva de calibrado de quercetina. Una unidad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima capaz de producir 1 μ mol de producto por minuto.

2.9 Cromatografía en capa delgada

La identificación de los productos de las reacciones enzimáticas se realizó por cromatografía en capa delgada (Silicagel 60 W) usando acetato de etilo/2-propanol/agua (3:2:2) como fase móvil y se revelaron con el reactivo de antrona (Sunderwirth *et al.*, 1964).

Resultados y Discusión

Libres son quienes crean, no copian, y
libres son quienes piensan, no obedecen.
Enseñar, es enseñar a dudar.

E. Galeano.

3.1 Selección de microorganismos de los géneros *Acremonium* y *Sarocladium* capaces de degradar flavonoides

Se estudiaron 32 cepas referenciadas de los géneros *Acremonium* y *Sarocladium* provenientes del Instituto Malbrán (Tabla 1). Las cepas: *Acremonium atrogriseum* DMic 031789, *Acremonium potronii* DMic 093598, *Sarocladium kiliense* DMic 01776 y *Sarocladium kiliense* DMic 124156, no pudieron ser reactivadas. Las demás fueron reactivadas en el medio de cultivo LB (Figura 3.1).

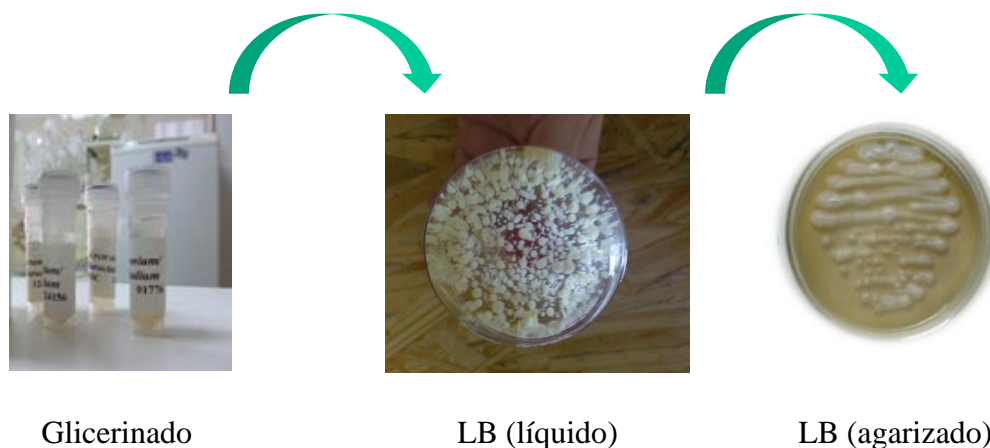


Figura 3.1: Proceso de activación de Cepas de *Acremonium* en el medio de cultivo LB.

Se estudió el crecimiento y clarificación del medio de cultivo utilizando como fuente de carbono los flavonoides rutina, hesperidina y diosmina. Del total de cepas reactivadas, 22 fueron capaces de crecer en presencia de diosmina, 24 de hesperidina y 26 de rutina. Mientras que *Acremonium sp.* 147-1 y *S. kiliense* DMic 062925 no crecieron en presencia de ninguno de los 3 flavonoides (Tabla 1). Cabe destacar el efecto inhibitorio del crecimiento de microorganismos descrito para diversos flavonoides (Tereschuk *et al.* 1997). En este caso, diosmina fue el flavonoide más deletéreo para estos microorganismos (Tabla 1).

Tabla 1: Crecimiento de cepas de *Acremonium* y *Sarocladium* en presencia de flavonoides

Microorganismo	Diosmina	Hesperidina	Rutina
<i>Acremonium</i> sp. DMic 85104	+	+	+
<i>Acremonium curvulum</i> DMic 01770	+	+	+
<i>Acremonium atrogriseum</i> DMic 093497	+	+	+
<i>Sarocladium strictum</i> DMic 993190	+	+	+
<i>Sarocladium kiliense</i> DMic 00226	+	+	+
<i>Sarocladium kiliense</i> DMic 062925	-	-	-
<i>Sarocladium kiliense</i> DMic 062926	-	-	+
<i>Sarocladium strictum</i> DMic 073153	+	+	+
<i>Sarocladium kiliense</i> DMic 093549	-	+	+
<i>Sarocladium strictum</i> DMic 093557	+	+	+
<i>Sarocladium kiliense</i> DMic 103735	+	+	+
<i>Sarocladium kiliense</i> DMic 103850	+	+	+
<i>Sarocladium strictum</i> DMic 114098	+	+	+
<i>Sarocladium strictum</i> DMic 114110	+	+	+
<i>Sarocladium kiliense</i> DMic 134632	+	+	+
<i>Acremonium</i> sp. 85-2	+	+	+
<i>Acremonium</i> sp. 147-1	-	-	-
<i>Sarocladium kiliense</i> 657-1	+	+	+

<i>Acremonium</i> sp. 693-2	+	+	+
<i>Acremonium</i> sp. 780-1	+	+	+
<i>Sarocladium kiliense</i> 799-5	+	+	+
<i>Acremonium hyalinulum</i> 862-4	+	+	+
<i>Acremonium</i> sp. 900-3	+	+	+
<i>Sarocladium kiliense</i> 937-11	-	-	+
<i>Sarocladium kiliense</i> 937-14	+	+	+
<i>Acremonium</i> sp. 959-1	+	+	+
<i>Acremonium</i> sp. 962-2	-	+	+
<i>Acremonium</i> sp. 1237-1	+	+	+

(+) crecimiento, (-) ausencia de crecimiento

Los flavonoides, debido a su baja solubilidad en agua, generan un medio opaco que permite observar a simple vista su degradación en medio sólido por la producción de halos de clarificación (Figura 3.2). La clarificación del medio de cultivo, si bien indica que los microorganismos son capaces de producir enzimas adecuadas para degradar los flavonoides, no necesariamente indica la estrategia de desglicosilación de los mismos. Nuestro grupo, previamente, describió la degradación de hesperidina en un hongo de este mismo género, sin embargo, en este trabajo ninguna de las cepas estudiadas clarificó los medios con hesperidina y diosmina (Mazzaferro *et al.* 2010). La degradación de rutina se detectó en 21 de las cepas estudiadas (Tabla 2).

Hesperidina

Rutina

Diosmina

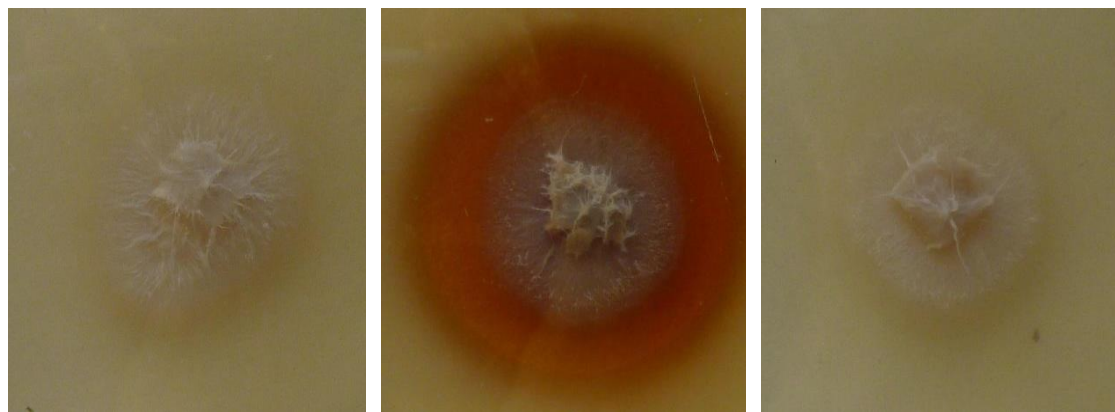


Figura 3.2: *Acremonium* sp. 1237-1 en agar con hesperidina, rutina y diosmina como fuente de carbono. Alrededor de la colonia en medio con rutina se observa el halo de clarificación.

Tabla 2. Cepas de *Acremonium* y *Sarocladium* usadas en la búsqueda de diglicosidasas activas sobre el flavonoide rutina

Microorganismo	Halo de clarificación
<i>Acremonium</i> sp. DMic 85104	+
<i>Acremonium curvulum</i> DMic 01770	+
<i>Acremonium atrogriseum</i> DMic 093497	+
<i>Sarocladium strictum</i> DMic 993190	+
<i>Sarocladium kiliense</i> DMic 00226	+
<i>Sarocladium kiliense</i> DMic 062925	-
<i>Sarocladium kiliense</i> DMic 062926	-
<i>Sarocladium strictum</i> DMic 073153	+
<i>Sarocladium kiliense</i> DMic 093549	-
<i>Sarocladium strictum</i> DMic 093557	+
<i>Sarocladium kiliense</i> DMic 103735	+
<i>Sarocladium kiliense</i> DMic 103850	+
<i>Sarocladium strictum</i> DMic 114098	+

<i>Sarocladium strictum</i> DMic 114110	+
<i>Sarocladium kiliense</i> DMic 134632	+
<i>Acremonium</i> sp. 85-2	-
<i>Acremonium</i> sp. 147-1	-
<i>Sarocladium kiliense</i> 657-1	+
<i>Acremonium</i> sp. 693-2	-
<i>Acremonium</i> sp. 780-1	+
<i>Sarocladium kiliense</i> 799-5	+
<i>Acremonium hyalinulum</i> 862-4	+
<i>Acremonium</i> sp. 900-3	+
<i>Sarocladium kiliense</i> 937-11	+
<i>Sarocladium kiliense</i> 937-14	-
<i>Acremonium</i> sp. 959-1	+
<i>Acremonium</i> sp. 962-2	+
<i>Acremonium</i> sp. 1237-1	+
(-) colonias sin halo de clarificación, (+) colonias con halo de clarificación	

3.2 Producción de glicósido hidrolasas con rutina como fuente de carbono

Con el objetivo de inducir las actividades glicósido hidrolasas, se cultivaron las 21 cepas de *Acremonium* y *Sarocladium* (Tabla 2) en medio sólido con rutina como fuente de carbono. Durante el crecimiento se observó un halo de clarificación de coloración rojiza alrededor de las colonias. Este sector de la placa se utilizó como fuente de actividad enzimática para realizar el análisis zimográfico usando el sustrato MU- β -rutinósido. Siete cepas (*Acremonium* sp. 959-1, *Acremonium* sp. 1237-1, *Acremonium* sp. 900-3, *Sarocladium strictum* DMic 093557, *Sarocladium strictum* DMic 993190, *Sarocladium strictum* DMic 114098, *Sarocladium kiliense* DMic 00226) mostraron una banda de actividad con el sustrato fluorogénico. Los diferentes valores de Rf obtenidos 0.39, 0.32, 0.31, 0.27, 0.20, 0.17, 0.19, sugirieron la presencia de al menos 3 proteínas diferentes (Figura 3.3). Estas bandas muestran la presencia de actividad diglicosidasa, es decir de enzimas capaces de escindir residuos diglicosídicos en una sola reacción. Las cepas restantes degradaron rutina, pero no se detectó una banda de actividad con el sustrato

diglicoconjugado MU- β -rutinósido. Este hecho sugiere que estos microorganismos probablemente utilizan dos monoglicosidasas (α -ramnosidasa y β -glucosidasa) como estrategia para la desglicosilación de rutina. En el caso de la cepa *Acremonium* sp. DMic 85104 la clarificación solo se produjo debajo de la colonia por lo que no se logró la cantidad suficiente de muestra para poder realizar el ensayo.

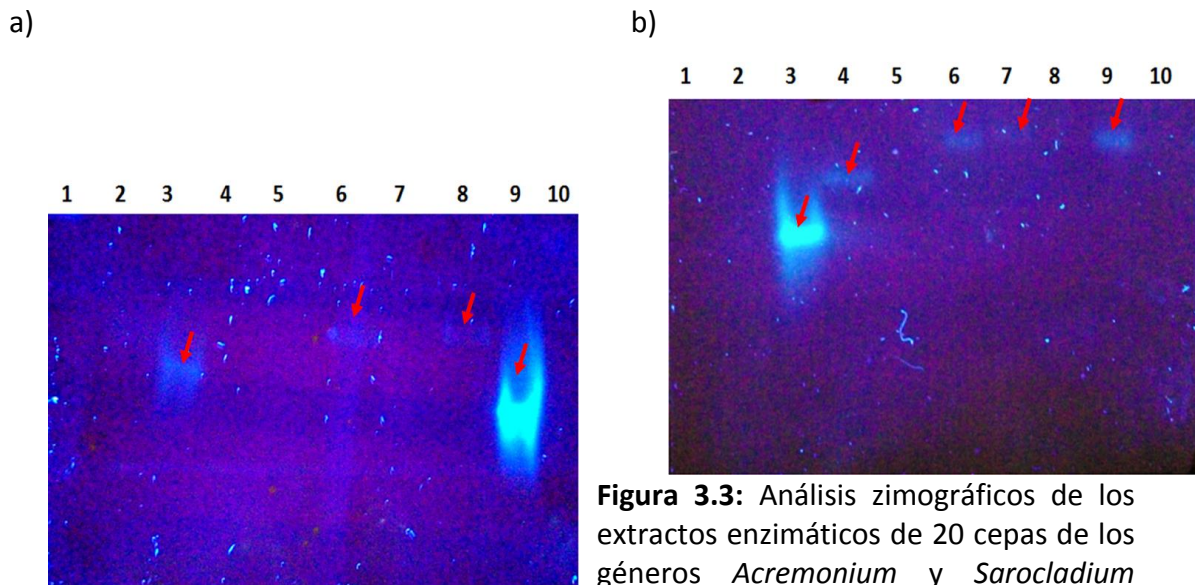


Figura 3.3: Análisis zimográficos de los extractos enzimáticos de 20 cepas de los géneros *Acremonium* y *Sarocladium*

usando MU- β -rutinósido. **a)** Calle 2: *Acremonium* sp. 780-1; Calle 3: *Acremonium* sp. 959-1; Calle 4: *Acremonium* sp. 962-2; Calle 5: *A. hyalinulum* 862-4; Calle 6: *Acremonium* sp. 1237-1; Calle 7: *A. curvulum* DMic 01770; Calle 8: *Acremonium* sp. 900-3; Calle 9: Control positivo: 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa (EC 3.2.1.168) de *Acremonium* sp. DSM24697. **b)** Calle 3: Control positivo: 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa (EC 3.2.1.168) de *Acremonium* sp. DSM24697; Calle 4: *S. strictum* DMic 093557; Calle 5: *A. atrogriseum* DMic 093497; Calle 6: *S. strictum* DMic 993190; Calle 7: *S. strictum* DMic 114098; Calle 8: *S. strictum* DMic 114110; Calle 9: *S. kiliense* DMic 00226.

3.3 Características culturales de distintas cepas de *Acremonium* y *Sarocladium* en medio sólido utilizando rutina como fuente de carbono

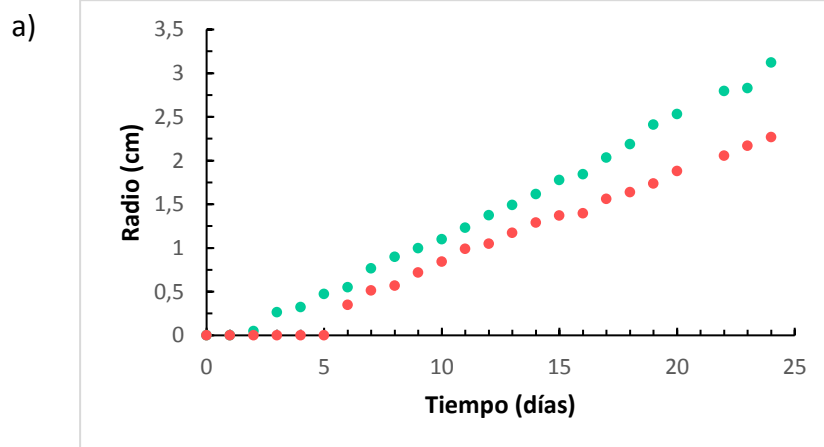
De las siete cepas capaces de hidrolizar el sustrato fluorogénico MU- β -rutinósido, cuatro se seleccionaron para estudiar los parámetros de crecimiento en un cultivo con rutina como fuente de carbono: *Acremonium* sp. 1237-1, *Acremonium* sp. 959-1, *Acremonium* sp. 900-3 y *S. strictum* DMic 093557. Se utilizaron los mayores valores de Rf como criterio de selección.

Los parámetros de crecimiento se estimaron a partir del gráfico del radio de la colonia en función del tiempo (Figura 3.4). Al cabo de 24 días, *Acremonium* sp. 1237-1 mostró

la tasa de crecimiento radial más alta (Tabla 3). Las tasas de crecimiento de *Acremonium* sp. 9591 y *S. strictum* DMic 093557 fueron similares a la obtenida previamente por *Acremonium* sp. DMS 24697 (0.70 ± 0.04 mm/día) (Weiz *et. al*, 2012). La detección del halo de clarificación alrededor de la colonia se dio de manera más temprana (día 6) en las cepas con mayor K_r (*Acremonium* sp. 1237-1, *Acremonium* sp. 900-3); mientras que, en las cepas de crecimiento más lento, el halo de clarificación se detectó a los 14 días (*Acremonium* sp. 959-1 y *S. strictum* DMic 093557). Es interesante destacar que el crecimiento de la cepa *S. strictum* DMic 093557 fue lento y se detuvo a partir del día 20, mientras que el halo de hidrólisis continuó su desarrollo, presentando la mayor tasa de clarificación (Tabla 3). En el resto de las cepas, el crecimiento de las colonias y el desarrollo de los halos de clarificación ocurrieron de manera conjunta.

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

Cepa	K_r (mm/día)	K_c (mm/día)
<i>Acremonium</i> sp.1237-1	1.32	1.04
<i>Acremonium</i> sp. 900-3	1.31	0.71
<i>Acremonium</i> sp. 959-1	0.72	0,67
<i>Sarocladium strictum</i> 093557	0.85	2.01



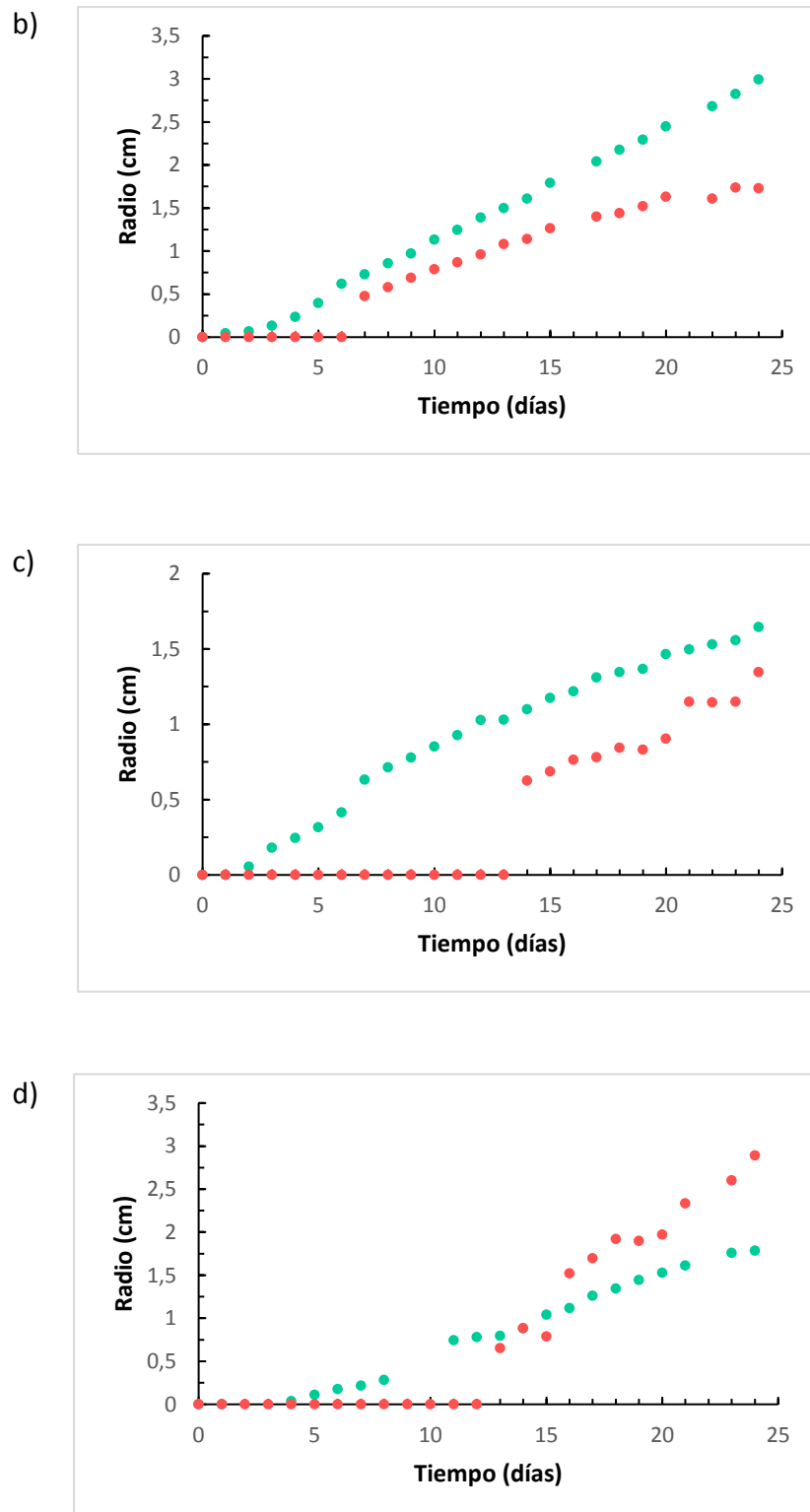


Figura 3.4: curvas de crecimiento (●) y clarificación (●) de las cepas a) *Acremonium* sp. 1237-1, b) *Acremonium* sp. 900-3, c) *Acremonium* sp. 959-1 y d) *S. strictum* DMic 093557.

Varias glicosil-hidrolasas fúngicas fueron inducidas utilizando rutina como fuente de carbono. Podemos citar: las β -glucosidasas producidas por *Penicillium decumbens*,

Aspergillus oryzae y *Aspergillus tubingensis* (Mamma *et al.* 2004; Riou *et al.* 1998; Decker *et al.* 2001); la α -ramnosidasa de *Aspergillus terreus* (Weignerová *et al.* 2012) y las β -rutinosidasas de *Penicillium rugulosum* y *Acremonium* sp. DMS 24697 (Narikawa *et al.* 2000; Weiz *et al.* 2012). Es decir, la literatura científica nos indica que, dentro de géneros relacionados e incluso dentro de un mismo género, ambas estrategias de desglicosilación de flavonoides pueden encontrarse. En el caso particular de los géneros *Acremonium* y *Sarocladium* podemos sugerir que ambas estrategias están presentes. Si bien el número de microorganismos estudiados no es no es muy numeroso, puede estimarse que dentro de estos géneros el mecanismo de en una sola reacción (diglicosidasas) se encuentra en menor proporción (~ 25%).

3.4 Selección de cepa de *Acremonium* productora de diglicosidasas

La cepa de *Acremonium* sp. 959-1, aunque presentó la banda con actividad de mayor Rf, no se desarrolló en medio líquido utilizando rutina como única fuente de carbono. Por esta razón, se seleccionó la cepa de *S. strictum* DMic 093557, que además de poseer una banda de similar Rf a la anterior, sumó la disponibilidad de la descripción de su genoma completo en la red. La información genómica es imprescindible para clonar al catalizador (Figura 3.3).

Se realizaron cultivos sumergidos de *S. strictum* 093557 con rutina como fuente de carbono. Las condiciones de pH y temperatura se fijaron a pH 5 y 25 °C. Se tuvo en cuenta que tanto rutina como quercetina son estables bajo estas condiciones (Weiz *et al.* 2016). Se utilizó el caldo de cultivo como fuente enzimática para cuantificar la actividad desglicosilante frente al sustrato rutina. Durante los primeros 7 días no se detectó actividad hidrolítica en el sobrenadante, la producción comenzó a detectarse luego de 8 días de crecimiento alcanzando una actividad de 8.6 ± 0.8 U/L en el noveno día (Figura 3.5).

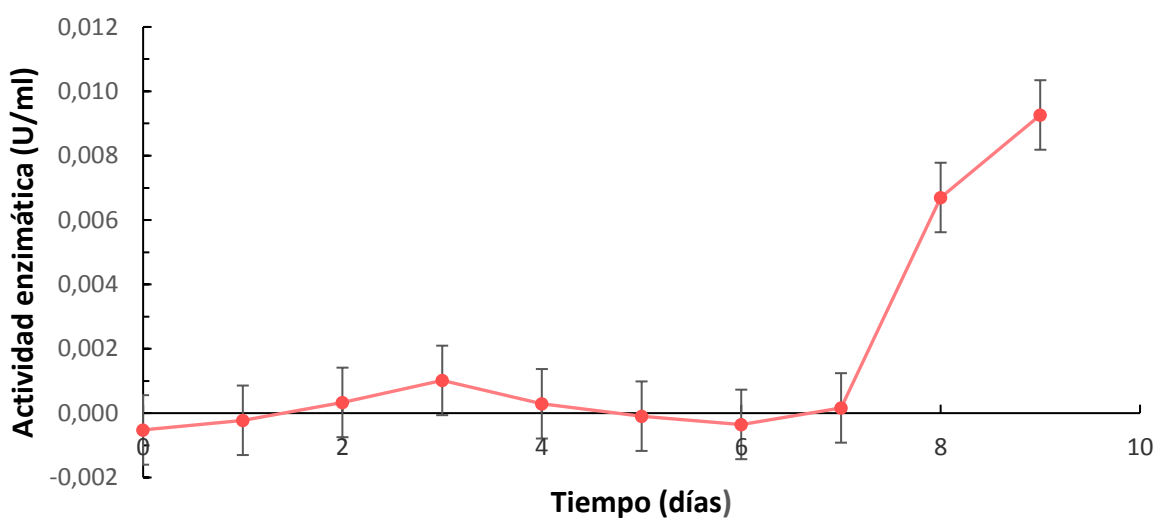


Figura 3.5: Producción enzimática de *S. strictum* DMic 093557

3.5 Identificación de los productos de reacción

Los productos obtenidos en la hidrólisis enzimática de rutina, se analizaron por cromatografía en capa delgada. Se encontraron tres productos, los cuales se corresponden con los patrones del sustrato de la reacción rutina ($R_f = 0.76$), el disacárido rutinosa ($R_f = 0.16$) y la aglicona quercetina ($R_f = 0.92$) (Figura 3. 6). Estos resultados confirman que *S. strictum* DMic 093557 desglicosila el flavonoide rutina a través de una enzima que hidroliza el enlace heterosídico, es decir, con una diglicosidasa.

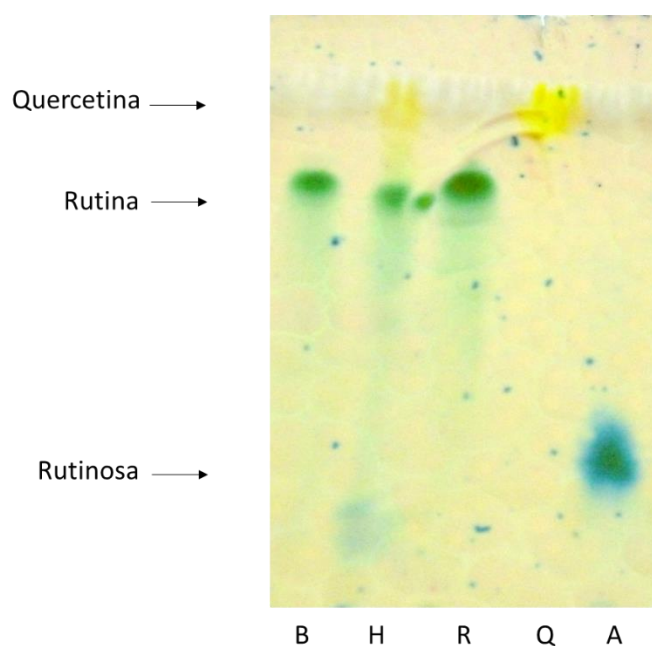


Figura 3.6: TLC de los productos de hidrólisis enzimática de rutina. B: control de reacción (sin enzima), H: reacción de hidrólisis, Estándares: R, rutina; Q: quercetina; A: rutinosa.

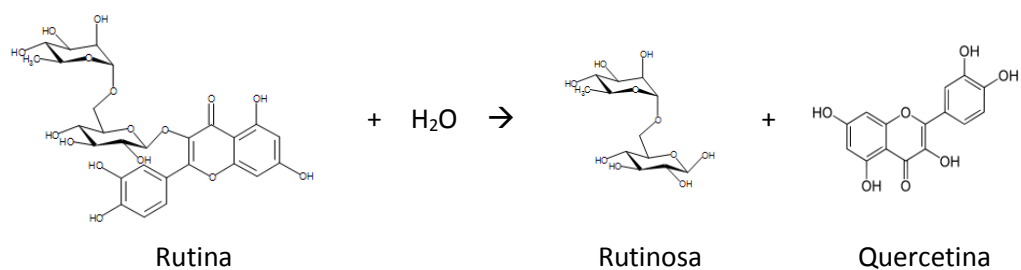


Figura 3.7: Esquema de hidrólisis enzimática de rutina en el enlace heterosídico.

Conclusiones

Ojalá podamos ser tan porfiados para seguir creyendo, contra toda evidencia, que la condición humana vale la pena, porque hemos sido mal hechos, pero no estamos terminados.

E. Galeano.

Se realizó una búsqueda de catalizadores con actividad hidrolítica sobre los flavonoides diosmina, hesperidina y rutina, en 32 cepas de los géneros *Acremonium* y *Sarocladium*.

- Veintiuna cepas fueron capaces de hidrolizar el flavonoide 3-*O*-rutinosilado (rutina), mientras que ninguna fue capaz de degradar los flavonoides 7-*O*-rutinosilados (diosmina, hesperidina).
- De las 21 cepas capaces de degradar rutina, el 33% (7 cepas) presentaron actividad diglicosidasa.
- La cepa *S. strictum* DMic 093557 se seleccionó como productora de enzimas hidrolíticas de flavonoides.
- La especificidad de los catalizadores por la aglicona y el lugar donde esta está glicosilada juegan un papel importante, dado que el disacárido rutinoso fue liberado desde rutina pero no desde hesperidina y diosmina.
- La producción de quercetina a partir de la desglicosilación enzimática de rutina presenta interés biotecnológico debido a que esta última presenta mayor actividad antioxidante que el flavonoide glicosilado, exhibiendo propiedades antialérgicas, antiproliferativa y antibacteriana. En 1999 la Agencia Internacional para Investigación en Cáncer (IARC) concluyó que Quercetina es un potencial agente anticancerígeno. En Europa y Estados Unidos, quercetina se comercializa como suplemento dietario.
- Estos resultados sugieren que dentro de los géneros *Acremonium* y *Sarocladium* existe una tasa baja de enzimas que reconocen el enlace heterosídico en un modo *endo*, respecto al sistema de liberación secuencial de los monosacáridos en 2 reacciones.

Referencias

Al fin y al cabo, somos lo que hacemos
para cambiar lo que somos.

E. Galeano.

- Barbagallo RN, Spagna G, Palmeri R, Restuccia C, Giudici P. 2004. Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. *Enzyme and Microbial Technology* 35: 58–66.
- Baumgertel A, Grimm R, Eisenbeiß W, Kreis W. 2003. Purification and characterization of a flavonol 3-O- β -heterodisaccharidase from the dried herb of *Fagopyrum esculentum Moench*. *Phytochemistry* 64: 411–418.
- Benavente-García O, Castillo J, Marin FR, Ortuño A, Del Río JA. 1997. Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 4505–4515.
- Decker CH, Visser J, Schreier P. 2001. β -Glucosidase multiplicity from *Aspergillus tubingensis* CBS 643.92: purification and characterization of four β -glucosidases and their differentiation with respect to substrate specificity, glucose inhibition and acid tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55: 157–163.
- Gerstorferová D, Fliedrová B, Halada P, Marhola P, Kren V, Weignerová L. 2012. Recombinant α -l-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* in selective trimming of rutin. *Process Biochemistry*. 47: 828–835.
- Giffhorn F, Koper S, Huwig A, Freimund S. 2000. Rare sugars and sugar-based synthons by chemo-enzymatic synthesis. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 734–742.
- Giraldo A, Gené J, Sutton DA, Madrid H, Hoog GS, Cano J, Decock C, Crous PW, Guarro J. 2015. Phylogeny of *Sarocladium* (Hypocreales). *Persoonia* 34: 10–24.
- Gonzalez C, Martinez A, Vázquez F, Baigori M, Figueroa LIC. 1996. New method of screening and differentiation of exoenzymes from industrial strains. *Biotechnology Techniques* 10: 519–522.
- Günata Z, Blondeel C, Vallier MJ, Lepoutre JP, Sapis JC, Watanabe N. 1998. An endoglycosidase from grape berry skin of cv. m. Alexandria hydrolyzing potentially aromatic disaccharide glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 2748–2753.
- Katayama S, O Fumiaki, Yamauchi Y, Kato M, Makabe H, Nakamura S. 2013. Enzymatic synthesis of novel phenol acid rutinosides using rutinase and their antiviral activity in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 9617–9622.
- Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Masamichi Ykoizumi M. 2000. Quantitative study of flavonoids of citrus plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3865–3871.
- Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M, Koizumi M, Ito C, Furukawa H. 2000. Quantitative study of flavonoids in leaves of *Citrus* plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3865–3871.
- Kren V. 2001. Chemical biology and biomedicine of glycosylated natural compounds. *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology I–III*. pp 2471–2529.

- Kren V, Martinkova L. 2001. Glycosides in medicine: "The role of glycosidic residue in biological activity". *Current Medicinal Chemistry* 8: 1303–1328.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680–685.
- Mamma D, Hatzinikolaou DG, Christakopoulos P. 2004. Biochemical and catalytic properties of two intracellular β -glucosidases from the fungus *Penicillium decumbens* active on flavonoid glucosides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 27: 183–190.
- Manzanares P, van den Broeck HC, de Graaff LH, Visser J. 2001. Purification and characterization of two different α -L-rhamnosidases, RhaA and RhaB, from *Aspergillus aculeatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2230–2234.
- Mazzaferro LS, Piñuel L, Erra-Balsells R, Giudicessi SL, Breccia JD. 2012. Transglycosylation specificity of *Acremonium* sp. α -rhamnosil- β -glucosidase and its application to the synthesis of the new fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl-rutinoside. *Carbohydrate Research*. 347: 69–75.
- Mazzaferro L, Piñuel L, Minig M, Breccia JD. 2010. Extracellular monoenzyme deglycosylation system of 7-O-linked flavonoid β -rutinosides and its disaccharide transglycosylation activity from *Stilbella fimetaria*. *Archea Microbiology* 192: 383–393. Erratum: *Archea Microbiology* 2011. 193: 461.
- Minig M, Mazzaferro L, Erra-Balsells R, Petroselli G, Breccia J D. 2011. α -Rhamnosyl- β -glucosidase catalyzed reactions for analysis and biotransformations of plant-based foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 11238–11243.
- Narikawa T, Shinoyama H, Fujii T. 2000. A β -rutinosidase from *Penicillium rugulosum* IFO 7242 that is a peculiar flavonoid glycosidase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 64: 1317–1319.
- Neher BD, Mazzaferro LS, Kotik M, Oyhenart J, Halada P, Křen V, Breccia JD. 2015. Bacteria as source of diglycosidase activity: *Actinoplanes missouriensis* produces 6-O- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase active on flavonoids. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100: 3061–3070.
- Orrillo AG, Ledesma P, Delgado OD, Spagna G, Breccia JD. 2007. Cold-active α -L-rhamnosidase from psychrotolerant bacteria isolated from a sub-Antarctic ecosystem. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 236–241.
- Riou C, Salmon J-M, Vallier M-J, Günata Z, Barre P. 1998. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -Glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3607–3614.
- Sarry JE, Gunata Z. 2004. Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chemistry* 87: 509–521.

- Simcikova D, Kotik M, Weignerova L, Halada P, Pelantova H, Adamcova K, Kren V. 2014. α -L-Rhamnosyl- β -D-glucosidase (Rutinosidase) from *Aspergillus niger*: Characterization and synthetic potential of a novel diglycosidase. *Advanced Synthesis & Catalysis* 357: 107–117.
- Summerbell RC, Gueidan C, Schroers H-J, Hoog GS, Starink M, Arocha Rosete Y, Guarro J, Scott JA. 2011. *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. *Studies in Mycology* 68: 139–162.
- Sunderwirth SG, Olson GG, Johnson G. 1964. Paper chromatography-anthrone determination of sugars. *Journal Chromatography* 16: 176–180.
- Tereschuk ML, Riera MVQ, Castro GR, Abdala LR. 1997. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. *Journal of Ethnopharmacology* 56: 227–232.
- Tsuruhami K, Mori S, Amarume S, Sarawatari S, Murata T, Hirakake J, Sakata K, Usui T. 2006. Isolation and characterization of a β -primeverosidase-like enzyme from *Penicillium multicolor*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70: 691–698.
- Van Rantwijk F, Woudenberg-van Osterom M, Sheldon RA. 1999. Glycosidase-catalyzed synthesis of alkyl glycosides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 6: 511–532.
- Wang D, Kurasawa E, Yamaguchi Y, Kubota K, Kobayashi A. 2001. Analysis of glycosidically bound aroma precursors in tea leaves. 2. Changes in glycoside contents and glycosidase activities in tea leaves during the black tea manufacturing process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 1900–1903.
- Weignerová L, Marhol P, Gerstorferová D, Kren V. 2012. Preparatory production of quercetin-3- β -D-glucopyranoside using alkali-tolerant thermostable α -L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus*. *Bioresource technology* 115: 222–227.
- Weiz G, Breccia JD, Mazzaferro LS. 2016. Development of a simple method for screening and quantification of rutin enzymatic deglycosylation. *Chemical Papers* (enviado).
- Weiz G, Piñuel L, Mazzaferro LS, Breccia JD. 2012. Desglucosilación enzimática de 3-O-rutinosil flavonoides por el hongo *Acremonium* sp. DSM 24697. Congreso Internacional Encuentro Regional de biocatálisis y Transformaciones (V EnReBB) 142.
- Yamamoto S, Okada M, Usui T, Sakata K. 2002. Isolation and characterization of a β -primeverosidase-like endo-manner β -glycosidase from *Aspergillus fumigatus* AP-20. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 66: 801–807.