

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA**

*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*

*”Producción de enzimas microbianas utilizando sub-  
productos de la industria citrícola”*

*Daniela A. Ortiz*

Santa Rosa La Pampa Argentina

2012

"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 Departamento de Química durante el período comprendido entre Abril de 2011 y Julio de 2012, bajo la co-dirección de la Dra. Laura S. Mazzaferro y la dirección del Dr. Javier D. Breccia."

26 de Septiembre de 2012

Daniela A. Ortiz

DEPARTAMENTO DE QUIMICA  
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.

En primer lugar a la Universidad Nacional de La Pampa (UNLPam), por otorgarme el lugar físico y los conocimientos necesarios para llevar a cabo este trabajo.

Al personal docente y técnico del Departamento de Química de la FCEyN (UNLPam) por su colaboración.

Al Director y Co-Directora del presente trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, presentes y pasados, por su solidaridad.

A mi familia. A la familia Braun.

A mis amigos, en especial a Pedro mi hermano del alma. A las "chicas"

A Lucas por el día a día.

# Contenidos

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
1. Biotransformaciones industriales	<b>4</b>
2. Enzimas Carbohidrato-activas	<b>5</b>
3. Biotransformaciones de productos de origen vegetal	<b>5</b>
4. Una nueva actividad enzimática con potencial industrial: $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa EC 3.2.1.168	<b>9</b>
5. Objetivos	<b>10</b>
<b>MATERIALES &amp; MÉTODOS</b>	
1. Reactivos químicos	<b>11</b>
2. Medios y condiciones de cultivo para la producción de actividad glicosidasa.	<b>11</b>
2.1. Inóculo	<b>11</b>
2.2. Cultivos sumergidos	<b>11</b>
2.2.1. Medio HSP YE Pep	<b>11</b>
2.2.2. Medio HSO:OP (1:4)	<b>11</b>
3. Medición de actividades enzimáticas	<b>12</b>
3.1. Actividad $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa	<b>12</b>
3.2. Actividad pectinasa, celulasa y xilanasa	<b>12</b>
3.3. Actividades monoglicosidasas	<b>12</b>
4. Ensayos analíticos	<b>12</b>
4.1. Concentración de proteína en extractos comerciales	<b>12</b>
4.2. Preparación de muestras	<b>13</b>

4.3. Electroforesis nativa	13
4.4. Zimograma con sustratos naturales	13
4.5. Zimograma con sustratos artificiales	13
4.6. Zimograma en hesperidina	

## **RESULTADOS & DISCUSIÓN**

1. Subproductos de la industria citrícola capaces de soportar el crecimiento de <i>Acremonium</i> sp. DSM24697	14
2. Cultivo sumergido de <i>Acremonium</i> sp. DSM24697: producción de actividad $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa.	15
3. Caracterización de la preparación enzimática de <i>Acremonium</i> sp. DSM24697 y comparación con contrapartes comerciales	18
4. Hidrólisis de sustratos naturales	20
5. Hidrólisis de sustratos fluorogénicos	21

<b>CONCLUSIONES</b>	<b>23</b>
---------------------	-----------

<b>REFERENCIAS</b>	<b>24</b>
--------------------	-----------

## **Resumen**

La cepa fúngica *Acremonium* sp. DSM24697 produce la enzima  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa (EC3.2.1.168) cuando cultivada en un medio que contiene hesperidina como inductor. Dada la especificidad de sustrato de esta enzima hacia flavonoides 7-O-rutinosilados, y su modo de acción que permite desglicosilar dichos flavonoides en un solo paso, la misma presenta características promisorias para aplicaciones industriales. En este trabajo se utilizaron subproductos de la industria citrícola (“pellets” de naranja y limón) de bajo costo para optimizar la producción de la actividad  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa. El cultivo sumergido de *Acremonium* sp. produjo actividad  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa, que se detectó en el sobrenadante de cultivo luego de 5-7 días. Se observó el máximo de producción con las formulaciones hesperidina-pellets en proporción 1:4, alcanzando 15.9 y 8.5 U/L para naranja y limón, respectivamente. El agregado de peptona y extracto de levadura al medio 1:4 hesperidina-pellets de naranja produjo un incremento en la producción del ~77 %. El extracto enzimático obtenido se comparó con glicosidasas comerciales. El análisis zimográfico del sobrenadante de cultivo mostró la presencia de una única banda de actividad con los sustratos 4-metilumbeliferil-rutinósido y hesperidina, correspondiente a la  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa. Por otro lado, los cócteles enzimáticos comerciales hidrolizaron xilano, carboximetilcelulosa y todos los sustratos fluorogénicos ensayados, pero no hesperidina.

## Abstract

The fungal strain *Acremonium* sp. DSM24697 produces  $\alpha$ -rhamnosyl- $\beta$ -glucosidase activity (EC 3.2.1.168) when cultivated in a hesperidin based medium. This enzyme is specific for 7-*O*-rutinosylated flavonoids, allowing their one-step deglycosylation with promising applications in several industries. The production of  $\alpha$ -rhamnosyl- $\beta$ -glucosidase activity was optimized using inexpensive by-products of the citrus industry (orange and lemon "pellets" typically used as cattle feed). The  $\alpha$ -rhamnosyl- $\beta$ -glucosidase activity was detected in the culture supernatant of *Acremonium* sp. DSM24697 after 5-7 days cultivation. The maximum production was observed with 1:4 hesperidin-pellets ratio, reaching 15.9 and 8.5 U/L for orange and lemon pellets, respectively. The addition of peptone and yeast extract to the 1:4 hesperidin- orange pellets medium increased ~77 % the enzymatic production. The enzyme preparation and bulk glycosidases were compared by zymographic analysis. The commercial enzymes showed hydrolysis of xylan, carboxymethylcellulose and fluorogenic substrates, but they were unable to hydrolyze the flavonoid hesperidin. On the other hand, the supernatant of *Acremonium* sp. DSM24697 did not show activity against polysaccharides, and presented a single band with the substrates 4-methylumbelliferyl-rutinoside and hesperidin, corresponding to the enzyme  $\alpha$ -rhamnosyl- $\beta$ -glucosidase.

## Lista de abreviaturas

BSA	Albúmina de suero bovino
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
EC	Número de la comisión de enzimas
Hsp	Hesperidina
LP	Pellets de limón
min	Minuto
Non-PAGE	Electroforesis nativa
OP	Pellets de naranja
pNGalP	p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido
pNGP	p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucósido
pNMP	p-nitrofenil- $\alpha$ -D-manósido
pNRP	p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnósido
pNXP	p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilósido
U	Unidad de enzima ( $\mu$ mol producto/min)
4-MU- <i>Glc</i>	4-metilumberifenil- $\beta$ -glucósido
4-MU- <i>Rha</i>	4- metilumbeliferil- $\beta$ -ramnósido
4-MUR	4-metilumbeliferil- $\beta$ -rutinósido
4-MU- <i>Glc</i> <sub>2</sub>	4-metilumberifenil- $\beta$ -celobiósido



# *Introducción*

---

---

## 1. Biotransformaciones industriales

Las biotransformaciones son reacciones químicas catalizadas por organismos, células o enzimas que llevan a cabo conversiones específicas sobre sustratos complejos. Éstas tienen un gran potencial en la generación de nuevos productos y en la producción de compuestos de manera más eficiente (Giri *et al.*, 2001). Las enzimas son utilizadas rutinariamente para diversas aplicaciones debido a su especificidad de sustrato, regioespecificidad, estereoespecificidad y al amplio intervalo de condiciones de reacción (Dordick *et al.*, 1998). Además constituyen una tecnología sustentable, compatible con el ambiente (Cherry & Fidantsef, 2003; Buchholz *et al.*, 2008) y se encuentran disponibles preparaciones comerciales altamente concentradas.

El Comité de Nomenclatura (*Nomenclature Committee*, NC) de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, IUBMB) clasifica a las enzimas asignándoles un código numérico (EC) de acuerdo al tipo de reacción catalizada y la especificidad de sustrato. Dentro de las enzimas involucradas en biotransformaciones industriales se destacan proteasas, quitinasas (Ramirez *et al.*, 2006), lacasas, ligninasas (Bajpai, 1999), pectinasas (Alkorta *et al.*, 1998; Kashyap *et al.*, 2001), xilanasas (Beg *et al.*, 2001; Viikari *et al.*, 2001), celulasas (Bhat, 2000), y amilasas (Gupta *et al.*, 2003; Van der Maarel *et al.*, 2002).

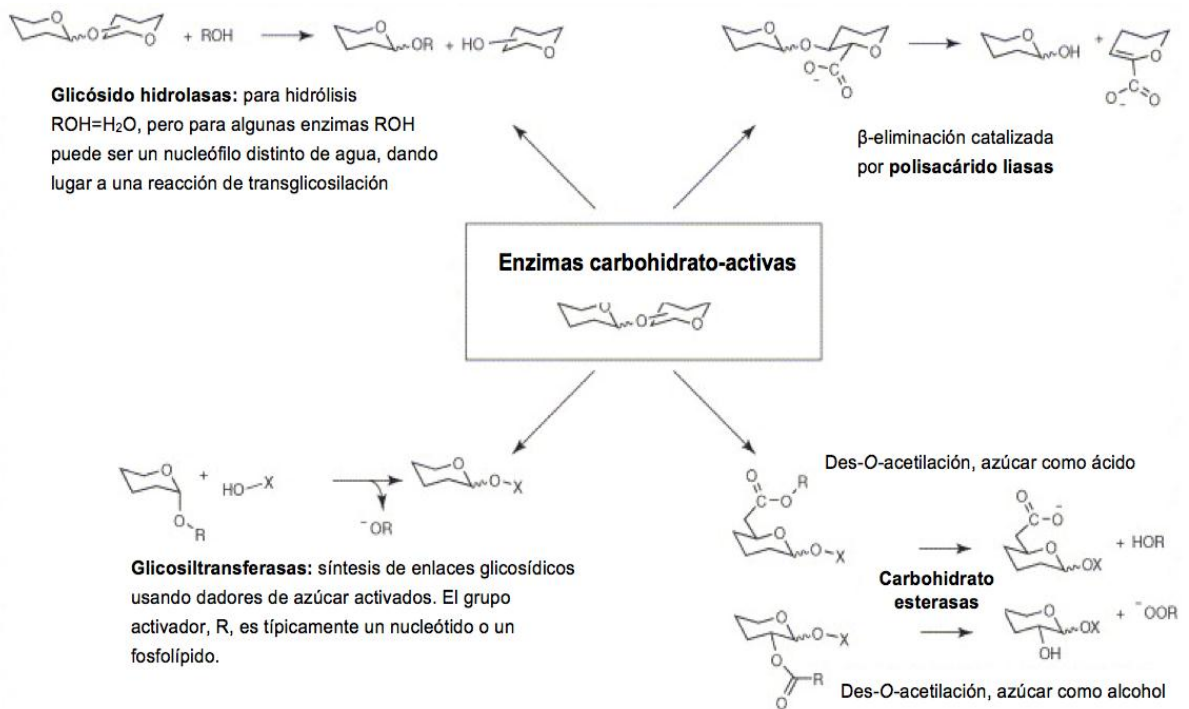
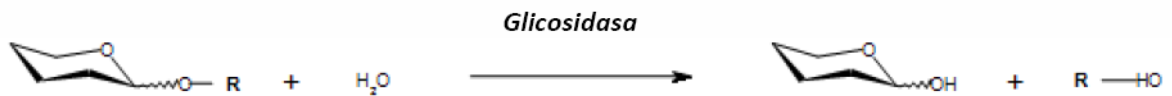


Figura 1 Clasificación de enzimas carbohidrato-activas

## 2. Enzimas carbohidrato-activas

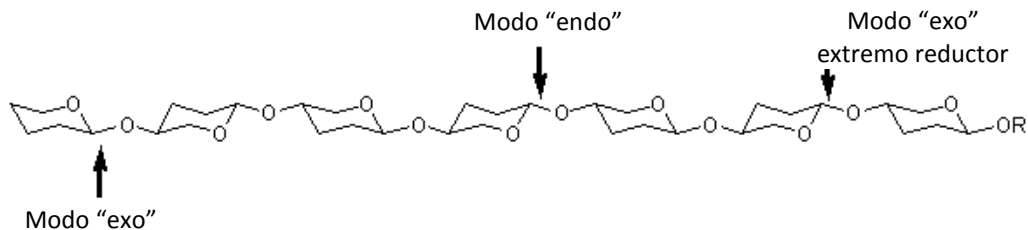
Las enzimas carbohidrato-activas incluyen glicósido hidrolasas (GHs), glicosil transferasas (GTs), polisacárido liasas (PLs) y carbohidrato esterasas (CEs) (Davies *et al.*, 2005) (Fig. 1.1). Particularmente de nuestro interés son aquellas enzimas que hidrolizan carbohidratos (GHs).

Las glicósido hidrolasas (EC 3.2.1.-), conocidas como “glicosidasas”, son enzimas capaces de escindir enlaces glicosídicos (Fig.1.2) (Cantarel *et al.*, 2009) entre dos residuos de azúcar, o bien entre un residuo glicosídico y uno de otra naturaleza.



**Figura 2** Hidrólisis de enlaces glicosídicos.

Estas enzimas carbohidrato-activas (“*Carbohydrate-active enzymes*”, CAZymes) fueron clasificadas en numerosas “familias” en base a sus secuencias aminoacídicas. El sistema de clasificación fue establecido por Henrissat *et al.*, 1991 y la versión actualizada se encuentra disponible en [www.cazy.org](http://www.cazy.org). Desde el punto de vista funcional, pueden ser clasificadas según la habilidad de clivar un enlace glicosídico en el extremo (modo “exo”) o en el medio de una cadena de azúcares (modo “endo”) (Fig.3)



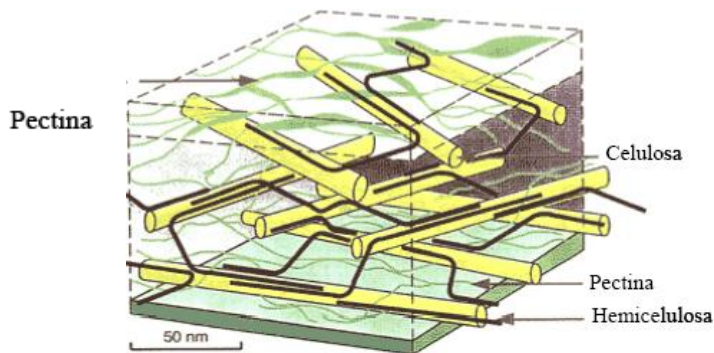
**Figura 3** Sitios de corte de glicosidasas.

Dado que los carbohidratos y glicoconjugados son las moléculas más abundantes en la naturaleza por ser los principales constituyentes de la biomasa vegetal, no es de extrañar que las glicosidasas encuentren aplicación en numerosos procesos de biotransformación industrial.

## 3. Biotransformación de productos de origen vegetal

La pared celular vegetal está compuesta por una mezcla compleja de carbohidratos, lignina y proteínas, así como otras sustancias embebidas en ella, tales como cutina, suberina y componentes inorgánicos que varían de una planta a otra (Fig.4) (Goodwin y Mercer,

1990; Showalter, 1993). Los polisacáridos constituyen el 90% de la pared celular vegetal y se pueden dividir en tres grupos: celulosa, hemicelulosa y pectina cuyas proporciones en peso seco varían de la siguiente manera: 20-55 % de celulosa, 16-85 % de hemicelulosa y alrededor del 0.1-30 % de pectina (Howard *et al.*, 2003; Singh Jayani *et al.*, 2005). Particularmente en las cáscaras de naranja las dichas proporciones son de  $16.2 \pm 0.5 \%$ ,  $13.8 \pm 0.3 \%$  y  $14.4 \pm 0.3 \%$ , respectivamente (Mamma *et al.*, 2008)



**Figura 4** Representación de la estructura de la pared celular vegetal.

Existen una gran variedad de microorganismos capaces de degradar estos polisacáridos, como hongos filamentosos (por ej. *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* spp.) y bacterias (por ej. *Streptomyces*, *Bacillus* y *Pseudomonas* spp.) cuyas enzimas resultan de gran importancia en la industria de alimentación humana y animal (Rojas, 2009; Gonzalez García *et al.*, 2005; Vries & Visser; 2001). Las preparaciones enzimáticas comerciales de polisacaridasas poseen un conjunto de actividades donde las predominantes actúan en forma “endo”. Entre estas encontramos las detalladas en la Tabla 1

Tabla 1

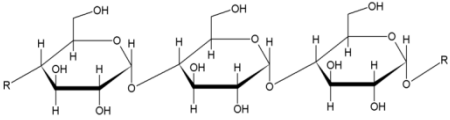
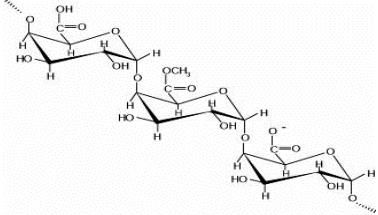
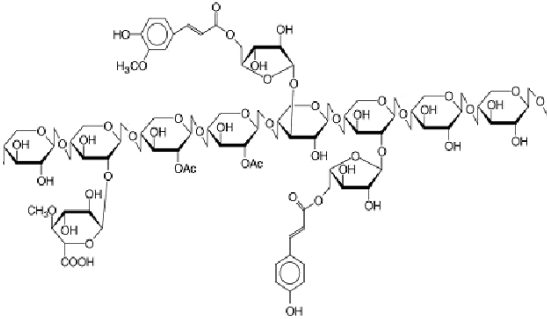
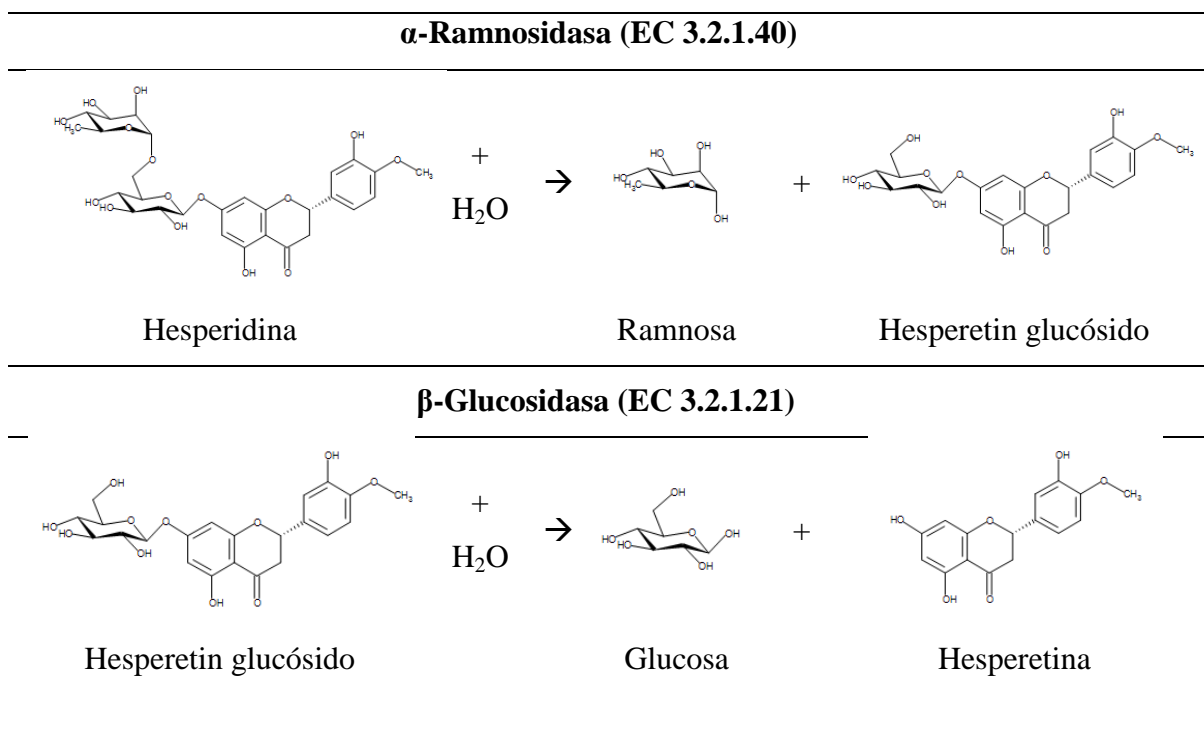
Sustrato	Tipo de enlace	Enzimas	Aplicaciones	Referencias
<p>Metabolitos Primarios</p>  <p>Celulosa</p>	<p>Unidades de <math>\beta</math>-glucopiranosas unidas mediante enlaces <math>\beta</math>-1,4-O-glucosídicos</p>	<p>Celulasas: sistema enzimático compuesto por endo <math>\beta</math>-glucanasas, exo <math>\beta</math>-glucanasas, celobiohidrolasas, y <math>\beta</math>-glucosidasa</p>	<p>Industrias de alimentación, textil, y en el procesamiento de materiales lignocelulósicos, biocombustibles</p>	<p>Mamma <i>et al.</i>, 2008; Szijárto <i>et al.</i>, 2004; Rios <i>et al.</i>, 2007</p>
 <p>Pectina</p>	<p>Unidades de ácido <math>\alpha</math>-galacturónico unidas por enlaces <math>\alpha</math>-1,4 con un número variable de metil ésteres por enlaces</p>	<p>Poligalacturonasas, polimetilgalacturonasas pectin y pectato-liasas y enzimas accesorias como : arabinoxilano hidrolasa endo-arabinasas <math>\alpha</math> y <math>\beta</math>-galactosidasas, endo- y exo-galactanasas.</p>	<p>Extracción de jugo de fruta y su clarificación, arrastre de algodón, desgomado de fibras vegetales, tratamiento de aguas residuales, extracción de aceite vegetal, etc.</p>	<p>Singh Jayani <i>et al.</i>, 2005</p>
 <p>Xilano</p>	<p>Unidades de <math>\beta</math>-D-xilopiranosas con enlaces <math>\beta</math> 1,4-glicosídicos</p>	<p>Xilanasas: <math>\beta</math>-1,4 endoxilanasas, <math>\beta</math>-xilosidasas, <math>\alpha</math>-L-arabinofuranosidasas, glucuronidasas, acetil xilano esterasa, y esterasa de ácidos fenólicos.</p>	<p>Blanqueo y aumento del brillo de la pulpa para papel, aumento en la digestibilidad de los piensos, clarificación de jugos, mejora de la textura del pan</p>	<p>Randez-Gil <i>et al.</i>, 1999; Breccia <i>et al.</i>, 1998; Beg <i>et al.</i>, 2001</p>

Tabla 1 (Continúa)

Sustrato	Tipo de enlace	Enzimas	Aplicaciones	Referencias
Metabolitos Secundarios				
	Flavonoides 7-O- $\beta$ -neohesperidósilados.	Los complejos naringinasa y hesperidinasa están constituidos por:	Reducción del sabor amargo de jugos, síntesis de productos farmacéuticos y preparación de fragancias	Kometani <i>et al.</i> 1995, Gunata <i>et al.</i> 1988; Spagna <i>et al.</i> 2000
Narinjina		$\alpha$ -L-ramnosidasa y $\beta$ -D-glucosidasa		
	Flavonoides 7-O- $\beta$ rutinosilados.		Reducción de la turbidez en jugo de naranja, preparación de fragancias	
Hesperidina				

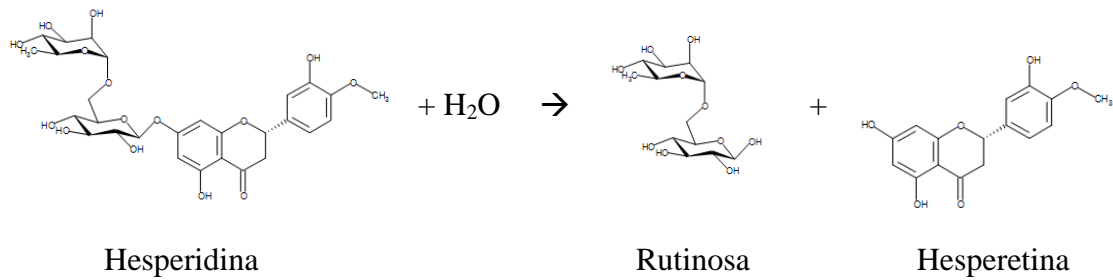
#### **4. Una nueva actividad enzimática con potencial industrial: $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa EC 3.2.1.168**

Las enzimas microbianas desglicosilantes de metabolitos secundarios están ganando interés para la hidrólisis de precursores de aroma y flavonoides en productos de la industria cítrica. La deglicosilación enzimática de los mismos puede llevarse a cabo añadiendo preparaciones comerciales, mejorando las propiedades organolépticas del producto (Puri *et al.*, 1996). El mecanismo habitualmente involucra dos monosacaridasas de fuentes microbianas que actúan de forma secuencial (Fig.5) Primero, una exoglicosidasa reconoce la unión entre la fracción de azúcares liberando un monosacárido y en un segundo paso, una  $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21) hidroliza el enlace heterosídico entre el residuo de glucosa y la aglicona (Sarry & Gunata, 2004; Barbagallo *et al.*, 2004).



**Figura 5** Desglicosilación secuencial de hesperidina.

Las  $\beta$ -glucosidasas actúan de modo “exo” y como tales son incapaces de hidrolizar el enlace si otro azúcar está unido a la glucosa. Este mecanismo puede ser reemplazado con la utilización de diglicosidasas dado que reconocen el enlace heterosídico completando la desglicosilación en un solo paso (Sakata *et al.*, 2003). Un ejemplo de esto es  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa la cual presenta actividad frente a los  $\beta$ -rutinósidos hesperidina y eriocitrina, en menor medida hesperidina, metilchalcona, narirutina y diosmina (Mazzaferro *et al.*, 2010; Fig.6).



**Figura 6** Desglicosilación de hesperidina en su solo paso por la diglicosidasa  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa de *Acremonium* sp. DSM24697.

La enzima  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa es capaz de liberar rutinosa desde flavonoides 7-O-glicosilados. Este disacárido se encuentra además habitualmente conjugado a compuestos tales como terpenoides y antocianinas. Dichos compuestos constituyen una fracción importante de la dieta humana, y como tales tienen incidencia en numerosos aspectos de la industria alimenticia (Mazzaferro & Breccia, 2012). Industrialmente los flavonoides predominantes en cítricos -hesperidina y eriocitrina- son hidrolizados enzimáticamente para eliminar la “nube” del jugo (Peterson *et al.*, 2006a y b). La actividad  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$  glucosidasa resulta prometedora para dicho proceso y también por su capacidad de dirigir la formación de aromas en otros alimentos de origen vegetal (Minig *et al.*, 2011). Los estudios de producción enzimática de dicha enzima a partir del cultivo del microorganismo *Acremonium* sp. DSM24697 son relevantes para una aplicación inmediata debido al desconocimiento de su secuencia aminoacídica y, por lo tanto, carencia de su forma recombinante.

## **5. Objetivos**

**El objetivo general de este trabajo fue la producción de glicosidasas fúngicas a partir de subproductos de la industria agropecuaria y su posterior comparación con contrapartes comerciales.** Los objetivos específicos fueron:

- a. Utilización de residuos de la industria citrícola para producción de glicosidasas por *Acremonium* sp. DSM 24697.
- b. Comparación con actividades presentes en sistemas multienzimáticos comerciales obtenidos a partir de *Aspergillus* y *Penicillium* spp..



*Materiales &  
 Métodos*

---

---

## **1. Reactivos químicos:**

p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (pNGP), p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnopiranosido (pNRP), p-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosido (pNMP), p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosido (pNXP), p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (pNGalP), 4-metilumberifenil- $\beta$ -glucósido (4-MU-Glc), 4-metilumbeliferil- $\beta$ -ramnósido (4-MU-Rha, hesperidina, xilano de abedul, pectina de manzana, carboximetilcelulosa de baja viscosidad, albúmina (suero humano) fueron adquiridos en Sigma Chemical (St. Louis). Los pellets para alimentación de ganado fueron suministrados por la Cooperativa Tabacalera de Misiones Ltda. Argentina. Las preparaciones comerciales pectinasa, celulasa y Qmax fueron provistas por la empresa Quantum SA

## **2. Medios y condiciones de cultivo para la producción de actividad glicosidasa**

**2.1. Inóculo:** *Acremonium sp.* DSM 24697 se cultivó en 10 mL de medio Luria-Bertani (LB) durante 1-2 días en agitador vaivén a temperatura ambiente. Composición (g/L): 10.0 peptona de leche; 5.0 extracto de levadura; 10.0 NaCl y 100 mM buffer fosfato de sodio (pH 8).

**2.2. Cultivos sumergidos:** Se transfirió el 1% del inóculo a los medios formulados con los distintos inductores de la actividad  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa con previo ajuste del pH en 5 utilizando buffer citrato de sodio.

**2.2.1. Medio HSP YE Pep (g/L):** La cepa fue repicada a partir del inóculo en un medio de cultivo el cual contenía: 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).

**2.2.2. Medio HSP: OP (1:4):** La cepa fue repicada a partir del inóculo en un medio de cultivo el cual contenía:

<b>Aditivo</b>	<b>Concentración</b>	
<sup>a</sup> Fuente de Carbono	5	g/L
NaNO <sub>3</sub>	20	mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30	mM
MgCl <sub>2</sub>	0,5	mM
Buffer Citrato (pH 5)	100	mM
<sup>b</sup> Oligoelementos	6	$\mu$ L

<sup>a</sup>Fuente de carbono: Hesperidina (Hsp)- Pellets de limón (LP) - Pellets de naranja (OP) y combinaciones de ellos.

<sup>b</sup>Oligoelementos: HBO<sub>3</sub> 12,54 mM, CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O 0,15 mM, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O 0,15 mM, Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>\*6 H<sub>2</sub>O 0,24 mM, 95 a 97% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,75 ml/L

### **3. Medición de actividades enzimáticas**

**3.1. Actividad  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa.** Para la determinación de actividad  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa se procedió a la cuantificación de la liberación de azúcares reductores (Miller, 1959). Se incubaron 450  $\mu$ L de sustrato (0.11% p/v hesperidina en 50 mM buffer citrato de sodio pH 5.0) con 50  $\mu$ L de extracto crudo. La reacción se llevó a cabo durante 3 h en un baño de agua a 60°C y se finalizó agregando 500  $\mu$ L de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Los tubos se colocaron en un baño de agua hirviendo por 10 min y se enfriaron antes de medir la absorbancia a 540 nm. Se definió una unidad de enzima (U) como la cantidad de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de rutinosa por minuto.

**3.2. Actividad pectinasa, celulasa y xilanasa.** Se realizó a partir de la cuantificación de la azúcares reductores (Miller 1959) liberados desde los respectivos polisacáridos como sustratos (0.5% p/v pectina, 1% p/v celulosa, xilano 1% p/v celulosa). La reacción se llevo a cabo acondicionando el pH en 6 con Buffer Fosfato 50 mM, durante 2 h en un baño a 50°C. Se definió una unidad de enzima (U) como la cantidad de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de glucosa por minuto.

**3.3. Actividades mono-glicosidasas.** La determinación de actividades  $\alpha$ -ramnosidasa,  $\beta$ -glucosidasa,  $\alpha$ -manosidasa,  $\beta$ -xylosidasa y  $\beta$ -galactosidasa se realizó colocando 5  $\mu$ l del sustrato correspondiente 70 mM pNRP, pNGP, pNMP, pNXP, pNGalP en dimetilformamida) y 895  $\mu$ L de 50 mM buffer citrato de sodio se incubaron con 100  $\mu$ L de solución enzimática. La reacción se realizó por 1 h a 40°C y se finalizó agregando 100  $\mu$ L de 0.1 M NaOH. Se midió la absorbancia a 420 nm y la cantidad de p-nitrofenol liberado se calculó usando su coeficiente de extinción ( $\epsilon_{420\text{nm}} = 1.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Orrillo *et al.* 2007). Una unidad de enzima se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de p-nitrofenol por minuto a la temperatura indicada.

### **4. Ensayos analíticos**

**4.1. Concentración de proteína en extractos comerciales.** La concentración de proteína se midió por el método de Bradford (1976), utilizando como estándar BSA.

**4.2. Preparación de las muestras.** Se realizó la correspondiente dilución de extractos comerciales, mientras que los extractos crudos fueron sometidos a un proceso de concentración por filtración con tubos centrífuga.

**4.3. Electroforesis nativa (*Non-denaturing PAGE*).** Los geles se realizaron al 10% p/v bis/acrilamida conforme a la técnica de Davis (1964), a potencial constante (90 V) y temperatura ambiente. La tinción de proteínas se realizó con azul brillante de Coomassie R 250.

**4.5. Zimogramas con sustratos artificiales.** Los geles se incubaron con sustratos fluorogénicos (4-MU-Glc, 4-MU-Rha, 4-MUR y 4-MU-Cb) en 50 mM buffer fosfato (pH 8) y se fotografiaron bajo luz UV.

**4.6. Zimogramas con sustratos naturales.** Los geles se sumergieron por 20 min en 50 mM Tris HCl (pH 6,5) que contenía 20,0 g/L del sustrato correspondiente (xilano de madera de abedul o carboximetilcelulosa de baja viscosidad). Posteriormente, se lavaron con agua destilada y se incubaron en una solución de 2,0 g/L de Rojo Congo (20 min, temperatura ambiente). Después de la unión del colorante, la solución de Rojo Congo fue sustituida por una solución 1,0 mM de NaCl hasta que las bandas clarificaron sobre fondo rojo. Para un mejor contraste, el color rojo de los geles se convirtió en azul mediante la adición de 50,0 g/L ácido acético.

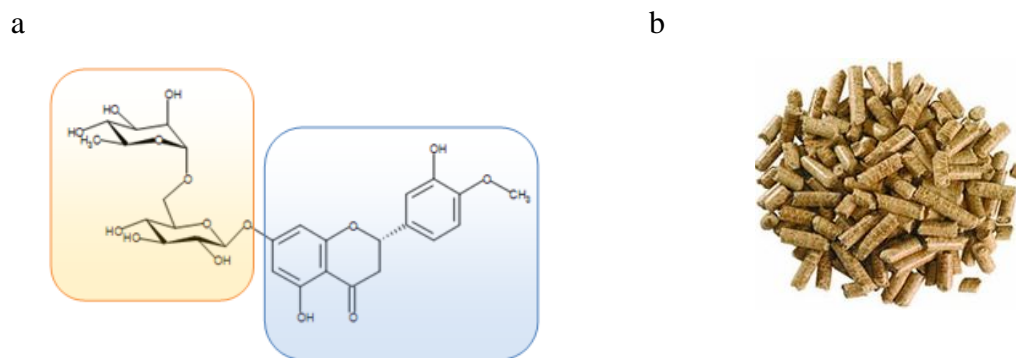
**4.7. Zimograma en hesperidina.** Se colocó el gel de poliacrilamida sobre un gel de 1-2 mm de espesor que contenía 5 g/L de hesperidina y 15 g/L de agar y se incubó durante 1 o 2 días a 30 °C en atmósfera saturada de humedad (Karsten *et al.*, 2005). La actividad enzimática fue detectada por degradación de flavonoides traducido en bandas de clarificación.

*Resultados &  
Discusión*

---

## 1. Subproductos de la industria cítrica capaces de soportar el crecimiento de *Acremonium* sp. DSM24697

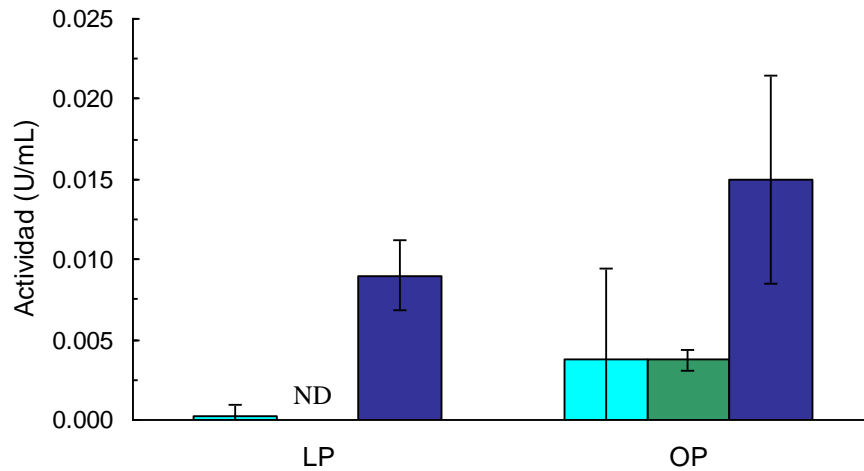
El principal inductor de la enzima  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa en *Acremonium* sp. DSM24697 descrito es el flavonoide ramnoglucosilado hesperidina (Fig. 7, a; Mazzaferro *et al.*, 2010). Las especies de plantas del género *Citrus* poseen flavanonas en altas concentraciones, siendo hesperidina el flavonoide mayoritario en mandarina (*Citrus nobilis*), limón (*Citrus lemon*) y naranja dulce (*Citrus sinensis*) (Peterson *et al.*, 2006 a y b). En este trabajo se eligieron como fuente de hesperidina alternativa subproductos de la industria cítrica. Dichos subproductos consisten en pellets que se realizan con alvedo y flavedo de naranja y limón, y son utilizados como alimento balanceado para la alimentación de ganado (Fig 7, b)



**Figura 7** a) Estructura química de hesperidina donde se señala el residuo de (■) rutinosa (6-O- $\alpha$ -L-ramnosil-D-glucosa) y (■) hesperetina; b) Sub-productos de la industria cítrica en forma de pellets

El análisis químico de los pellets de naranja y limón utilizados mostró que contienen 31 y 41% p/p de carbono, 1.03 y 1.14% p/p de nitrógeno, y 6.8 y 2.5% p/p de hesperidina, respectivamente (Guaraglia & Breccia, 2009; Cappece, 2012). La cepa DSM24697 se cultivó en medio líquido utilizando los pellets como única fuente de nutrientes. El microorganismo mostró crecimiento filamentoso en dichos medios y se detectó actividad  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa en el sobrenadante de cultivo luego de 10 días (Fig. 8). Estos resultados se condicen con trabajos anteriores en los que se describe que tanto la cáscara fresca de limón como un extracto de la misma fueron capaces de soportar el crecimiento del hongo filamentoso *Geotrichum klebahnii* (Rojas *et al.*, 2008). Esto puede deberse a que las cáscaras de cítricos contienen compuestos solubles en agua como glucosa, fructosa y

sacarosa, además de polímeros mayoritarios como pectina, celulosa y hemicelulosa (Mamma *et al.*, 2008)



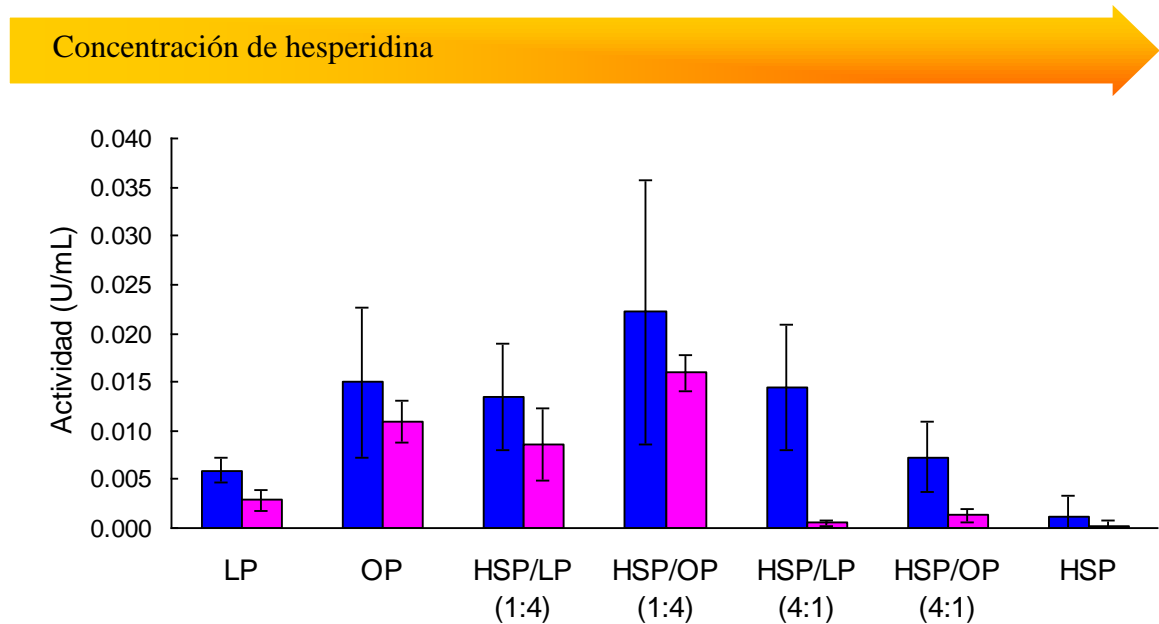
**Figura 8** Actividad  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa producida por *Acremonium* sp. DSM24697 utilizando pellets de limón (LP) y naranja (OP) como única fuente de nutrientes, luego de 5 (■), 7 (■) y 10 (■) días. ND: no detectado.

## **2. Cultivo sumergido de *Acremonium* sp. DSM24697: producción de actividad $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa**

Se realizaron cultivos sumergidos del microorganismo en un medio suplementado con sales inorgánicas como fuente de macro y micronutrientes con el fin de incrementar la productividad. Se utilizaron como inductores de la actividad  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa tanto hesperidina comercial, como pellets, y combinaciones de los mismos en distintas proporciones. En este caso, la actividad enzimática se detectó en el sobrenadante de cultivo luego de 5-7 días (Fig. 9).

En cuanto a la utilización de las distintas combinaciones de las concentraciones de hesperidina y pellets se observó que a medida que aumentó la concentración de hesperidina, la producción de actividad enzimática también aumentó hasta alcanzar un máximo con las formulaciones HSP-Pellets en proporción 1:4 (Fig. 9). En concentraciones mayores (HSP-pellets 4:1 y HSP) la producción de actividad fue menor. Estos resultados sugieren que existe una relación de compromiso entre las concentraciones de hesperidina y pellets requeridas para la producción de la enzima. Mientras que una fracción de hesperidina fácilmente accesible sería necesaria para la inducción enzimática, los pellets

proporcionarían una fuente de factores de crecimiento, como así también de nitrógeno orgánico.



**Figura 9** Actividad desglicosilante de hesperidina en cultivo completo (■) y en sobrenadante (■) a los siete (7) días de cultivo.

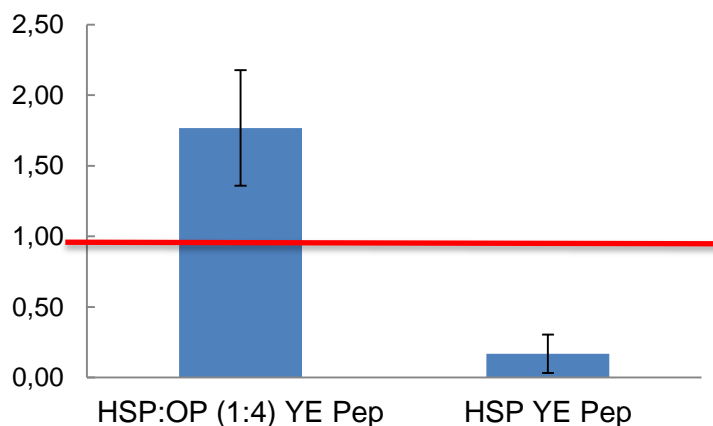
Muchos investigadores han utilizado una variedad de inductores para la producción de enzimas extracelulares (Singh *et al.*, 2007; Dheeman *et al.*, 2010), entre ellos la piel de naranja como un inductor de la producción de poligalacturonasa (Nighojkar *et al.*, 2006), naringina como inductor de la producción de naringinasapor *Aspergillus niger* MTCC1344 (Puri *et al.*, 2005), bagazo de naranja y el salvado de trigo para la producción de enzimas pectinolíticas (Martins *et al.*, 2002). Del mismo modo, el uso de hesperidina junto con residuos desoja para la producción de naringinasa con *Penicillium* sp. (Fukumoto & Okada, 1973) y la inducción de una mayor actividad específica  $\alpha$ -ramnosidasa en *Pseudoalteromonas* sp. (Mazzaferro *et al.*, 2008)

Además, se ha descrito el uso de ciertos materiales para el cultivo sumergido de hongos y actinomicetos tales como perlas de vidrio y perlita (Jecu, 2000; Rojas, 2009). Los mismos sirven como sitios de colonización creando condiciones cercanas al hábitat natural del microorganismo, lo que aumenta la capacidad de producir ciertas enzimas y metabolitos. Jecu (2000) utilizó perlas de vidrio para el cultivo de *Acremonium chrysogenum*, incrementando la secreción de compuestos activos. En el caso de *Acremonium* sp. DSM24697 se observó el crecimiento micelial del microorganismo sobre los pellets de naranja y limón, lo que sugiere que además de ser una fuente de nutrientes los pellets estarían proporcionando un soporte físico para el crecimiento fúngico.



En todas las formulaciones que contenían pellets se observó una mayor conidiogénesis (resultados no mostrados), la cual está relacionada con la liberación de la  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa al medio extracelular (Mazzaferro *et al.*, 2010). Congruentemente, cuando se cuantificó la actividad enzimática en el sobrenadante de cultivo, aquellos que contenían pellets en mayor proporción no mostraron diferencias significativas con los valores de actividad obtenidos en el cultivo completo (células y sobrenadante), lo que indicó que en dichos cultivos, luego de 7 días la enzima se había liberado al medio extracelular (Fig. 9). En el caso de los medios formulados con HSP-Pellets en proporciones 4:1 la mayor parte de la actividad se detectó unida a las células. Desde un punto de vista tecnológico, el hecho de que los medios con HSP-Pellets 1:4 proporcionaron enzima en forma soluble en el menor tiempo representa una ventaja y además se facilita el escalado del proceso de recuperación de la proteína.

Con el objetivo de incrementar el rendimiento de la producción enzimática se cultivó el microorganismo en cultivos sumergidos formulados con HSP: OP (1:4) como inductor, adicionados de con otras fuentes de nitrógeno (extracto de levadura y peptona). Se los comparó con el medio previamente descrito en la literatura y con el medio formulado con pellets en los ensayos anteriores (Mazzaferro *et al.*, 2010) (Fig. 10).



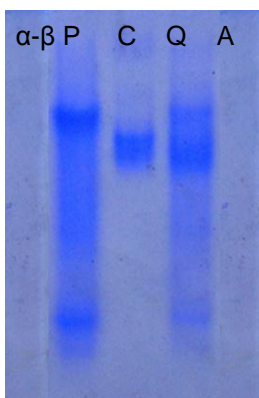
**Figura 10** Producción de  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa en los medios HSP: OP (1:4) y HSP suplementados con YE y PEP. El valor de referencia "1" se asignó al medio de cultivo HSP:OP (1:4) que contenía sales como fuente de nitrógeno

Si bien la adición de peptona aporta una fuente efectiva de nitrógeno orgánico y por otro lado el extracto de levadura provee al medio vitaminas -especialmente del complejo B- y factores de crecimiento, la fuente de carbono hesperidina no mostró favorecer la producción de  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa (medio HSP YE Pep). Por otro lado, la mayor producción de actividad extracelular se obtuvo en el medio con HSP: OP en la proporción

1:4 como fuente de carbono suplementado con nitrógeno orgánico, con un incremento de ~ 77% respecto al mismo medio suplementado con nitrógeno inorgánico (Fig. 10).

### **3. Caracterización de la preparación enzimática de *Acremonium* sp. DSM24697 y comparación con contrapartes comerciales**

El cultivo de hongos filamentosos utilizando subproductos agropecuarios generalmente produce un extracto multienzimático (Mamma *et al.*, 2008). Esto se debe a que dichos microorganismos deben producir un consorcio de enzimas con el fin de degradar los distintos componentes de las células vegetales. La preparación obtenida del cultivo de *Acremonium* sp. DSM24697 se sometió a medidas de actividad *in vitro* para cuantificar actividades glicosidasas. Se compararon con tres cócteles enzimáticos comerciales correspondientes a pectinasas (P y Q) y celulasa (C). Las preparaciones comerciales (15 µg de proteínas) mostraron la presencia de varias proteínas en geles nativos de acrilamida, mientras que en las muestras que contenían actividad  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa no se detectaron proteínas debido a su baja concentración (1.5µg de proteínas) (Fig. 11)



**Figura 11** Electroforesis nativa de extractos enzimáticos donde se muestran proteínas totales.  $\alpha$ - $\beta$ :  $\alpha$ -Ramnosil- $\beta$ -glucosidasa purificada, A: extracto enzimático extracelular de *Acremonium* sp. DSM24697, P y Q: pectinasas, C: celulasa.

El microorganismo *Acremonium* sp. DSM24697 fue capaz de producir las actividades xilanasa ( $2.8 \pm 1.5$  U/L) y pectinasa ( $4.1 \pm 1.1$  U/L), además de  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa ( $29 \pm 6$  U/L) (Tabla 2). Previamente fue descrita la producción de actividades xilanasa (14.7 U/L), pectinasa (4.5 U/L) y  $\beta$ -1,4 glucanasa (3.46 U/L) por una cepa del género *Acremonium* cultivada en un medio de extractos vegetales (zanahoria, apio, remolacha, perejil, lechuga, berro y espinaca) (Rojas, 2009). Si bien estos medios complejos a base de tejidos vegetales inducen varias enzimas carbohidrato-activas en el género *Acremonium*, sus concentraciones son bajas en comparación con otros hongos filamentosos tales como *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger* (Jecu, 2000). No se detectó actividad  $\beta$ -1,4

glucanasa de la cepa DSM24697 en este medio complejo, pero si trazas de actividad xilanas y pectinasa, mientras que la actividad mayoritaria correspondió a la glicosidasa hidrolasa activa sobre hesperidina:  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa. Cabe destacar que al igual que en cultivos de *Acremonium* sp. (cepa 1049) las actividades monoglicosidasas extracelulares no fueron detectadas (Elíades *et al.*, 2011).

**Tabla 2** Actividades específicas  $\pm$  desvío estándar (U/mg) presentes en cócteles enzimáticos comerciales y sobrenadante de cultivo de *Acremonium* sp. DSM24697.

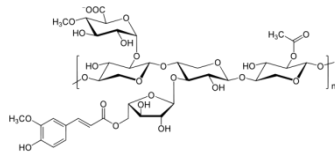
Sustrato	Pectinasa*	Celulasa*	Q máx*	<i>Acremonium</i> sp. DSM24697 **
<b>Polisacáridos</b>				
Xilano de abedul	6.6 $\pm$ 1.3	50 $\pm$ 4	22.8 $\pm$ 5.8	0.037 $\pm$ 0.02
Pectina de manzana	25 $\pm$ 12	11 $\pm$ 1	46 $\pm$ 40	0.054 $\pm$ 0.015
Carboximetilcelulosa	0.150 $\pm$ 0.008	0.11 $\pm$ 0.06	0.12 $\pm$ 0.01	ND
<b>Sustratos artificiales</b>				
	0.00045 $\pm$	0.00020 $\pm$	ND	ND
pNRP	0.00015	0.00003		
pNGP	0.072 $\pm$ 0.006	0.074 $\pm$ 0.003	0.13 $\pm$ 0.05	ND
pNMP	0.00128 $\pm$ 0	ND	ND	ND
pNGaIP	0.054 $\pm$ 0.005	ND	0.047 $\pm$ 0.018	ND
pNXP	0.102 $\pm$ 0.001	0.012 $\pm$ 0.002	0.053 $\pm$ 0.011	ND

\*Mazzaferro 2011; \*\*Este trabajo, ND, no detectada

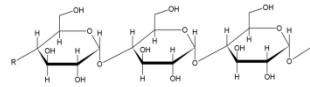
En las preparaciones comerciales se detectó un conjunto de actividades enzimáticas las cuales, esta descrito, actúan en forma sinérgica en la degradación de polisacáridos. Estas actividades podrían provenir de varias proteínas o de la inespecificidad las proteínas mayoritarias que integran estos cócteles.

#### **4. Hidrólisis de sustratos naturales**

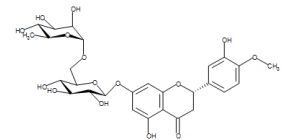
Se estudió la especificidad de las preparaciones enzimáticas mediante zimogramas utilizando tres sustratos naturales purificados: dos polisacáridos -carboximetilcelulosa (CMC) y xilano- y el flavonoide hesperidina (Fig12).



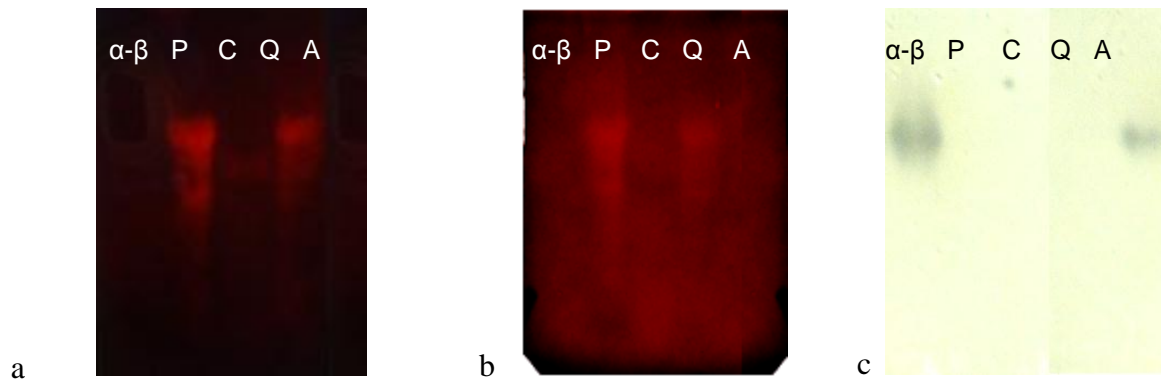
Xilano



Carboximetilcelulosa



Hesperidina

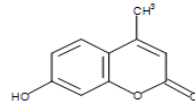


**Figura 12** Hidrólisis de sustratos naturales: a) xilano b) carboximetilcelulosa y c) hesperidina donde  $\alpha$ - $\beta$ :  $\alpha$ -Ramnosil- $\beta$ -glucosidasa purificada, A: extracto enzimático extracelular de *Acremonium* sp. DSM24697, P y Q: pectinasas, C: celulasa.

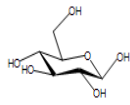
Los cócteles comerciales fueron capaces de degradar los polisacáridos, independientemente del residuo de azúcar mayoritario de la cadena principal (glucosa o xilosa). Sin embargo, no se observó hidrólisis de hesperidina, indicando que las enzimas comerciales reconocían específicamente  $\beta$ -1,4-glicanos pero no así el sustrato glicoconjugado. Por otro lado, la preparación de *Acremonium* sp. fue capaz de hidrolizar hesperidina, mientras que no se detectó actividad sobre los  $\beta$ -1,4-glicanos. Si bien dichas actividades fueron detectadas por liberación de azúcares reductores desde los polisacáridos (Tabla 2), su no detección en el análisis zimográfico podría deberse a que algunas de estas poseen puntos isoeléctricos elevados (xilanasas de la familia GH11 y pectinasas en especial pectatoliasas específicas sobre el enlace  $\alpha$ -1,4 de las familias PL1, PL3, PL9 y PL10 y en menor medida GH28; Soriano, 2004). Dado que las electroforesis realizadas en este trabajo fueron de carácter básico las proteínas con punto isoeléctrico mayor a 8.8 no ingresan al gel y por lo tanto no son detectadas (Kashyap *et al.*, 2001; Breccia *et al.*, 1998).

### **5. Hidrólisis de sustratos fluorogénicos**

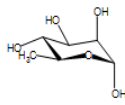
Las actividades glucosidasa, ramnosidasa, rutinosidasa y celobiosidasa fueron estudiadas en zimogramas que contenían los siguientes sustratos fluorogénicos: MUR<sub>ha</sub>, MUGlc, MUR, MUGlc<sub>2</sub>, respectivamente (Fig. 13).



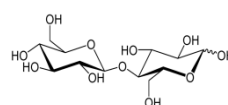
4-metilumberifenona



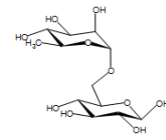
Glucosa



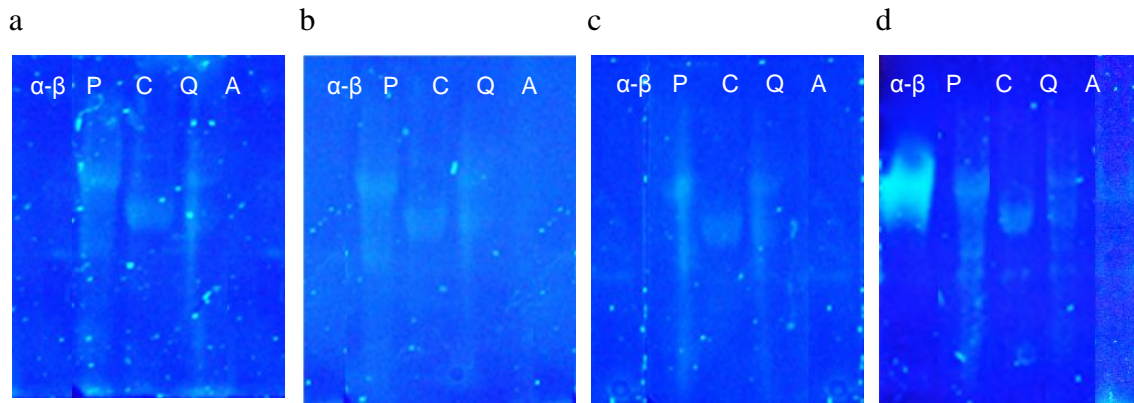
Ramnosa



Celobiosa



Rutinosa



**Figura 13** Hidrólisis de sustratos fluorogénicos: a) MUG b) MURha c) MUG<sub>2</sub> d) MUR donde  $\alpha$ - $\beta$ :  $\alpha$ -Ramnosil- $\beta$ -glucosidasa purificada, P y Q: pectinasas, C: celulasa y A: extracto enzimático extracelular de *Acremonium* sp. DSM24697

Se observó que la banda mayoritaria de proteínas de cada una de las preparaciones comerciales fue capaz de hidrolizar todos los sustratos fluorogénicos. Estos resultados se corresponden a lo encontrado previamente por Vincken *et al.* (1997) en celulasas, las cuales eran capaces de hidrolizar sustratos cromóforos de bajo peso molecular indicando que las distintas actividades presentes en las preparaciones comerciales se deben a la inespecificidad de las proteínas mayoritarias (Tabla 2 y Fig. 13)

El análisis zimográfico del sobrenadante de *Acremonium* sp. DSM24697 mostró la presencia de una única banda de actividad con MU-rutinósido, correspondiente a la enzima  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa, lo que reafirma su elevada especificidad sobre el disacárido rutinosa.

Considerando que la  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa no fue detectada en el gel teñido con *coomassie brillant blue* R250 (Fig.11) y que la enzima muestra una marcada banda de actividad en el análisis zimográfico (sustrato MU-rutinósido fig.13), podemos considerar que este último sistema es altamente sensible. Los cócteles enzimáticos presentaron bandas tenues de actividad con el sustrato MU-rutinósido que correspondían a las proteínas

mayoritarias de la preparación, indicando que esta hidrólisis del sustrato fluorescente se debe a la promiscuidad de estos catalizadores. Sin embargo estos mismos cócteles no fueron capaces de escindir el flavonoide hesperidina que contiene el mismo residuo sacarídico (rutinosa). Estos resultados sugieren que debido a que metilumbeliferona (aglicona del sustrato MUR) es un buen grupo saliente, este pudo ser ligeramente hidrolizado, mientras que hesperetina (aglicona de hesperidina) podría impedir estéricamente la catálisis.

La hidrólisis específica de hesperidina dada por el catalizador de *Acremonium* sp. DSM24697 justifica su utilización como aditivo de los cocteles enzimáticos comerciales, para la clarificación de jugos de frutas cítricas.

# *Conclusiones*



En el presente trabajo se diseñaron y optimizaron medios de cultivo para la producción de actividad  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa a partir de la cepa fúngica *Acremonium* sp. DSM24697. A partir de los estudios realizados, se pueden alcanzar las siguientes conclusiones:

- o La producción de la enzima  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa se incrementó 10.5 veces en comparación a trabajos previos, utilizando subproductos agropecuarios de bajo costo respecto del medio previamente descrito en la literatura.
- o El sobrenadante de cultivo presentó actividades  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa y polisacaridasas, que podrían ser utilizadas para la biotransformación de alimentos de origen vegetal. Dichas actividades actuarían en forma sinérgica:  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa a la cual es capaz de realizar una hidrólisis específica de flavonoides 7-O-rutinosilados, mientras que las polisacaridasas pueden hidrolizar componentes mayoritarios de las paredes celulares permitiendo un mayor acceso de  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa a dichos componentes.
- o Los cócteles enzimáticos comerciales de pectinasas y celulasas presentaron baja eficiencia, ya que hidrolizaron el sustrato artificial rutinosilado (4-metilumbeliferil-rutinósido) pero no así el flavonoide hesperidina, indicando la ausencia de la actividad diglicosidasa específica.
- o Por todo lo expuesto, la preparación enzimática producida en el presente trabajo, posee diferente especificidad a aquellas asequibles en el mercado comercial, y por ende, distintas aplicaciones potenciales.



# *Referencias*

---

---

- Alkorta I, Garbisu C, Llama MJ & Serra JL. 1998.** Industrial applications of pectic enzymes: A review. *Process Biochem* 33: 21-28.
- Bajpai P. 1999.** Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnol Progress*. 15:147-157.
- Barbagallo RN, Spagna G, Palmeri R, Restuccia C & Giudici P. 2004.** Selection, characterization and comparison of  $\beta$ -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. *Enz. Microb. Technol.* 35:58–66
- Beg QK, Kapoor M, Mahajan L & Hoondal GS. 2001.** Microbial xylanases and their industrial applications: A review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:326-338.
- Bhat MK. 2000.** Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biothechnol. Adv.* 18:355-383.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254
- Breccia JD, Mattiasson B & Siñeriz F. 1998 .**Separation of bacterial xylanase by precipitation using Eudragit S100. *J Biotechnol* 61:219-223.
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. 2009.** The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic. Acids. Res.* 37:D233-D238
- Capecce A. 2012.** Producción de rutinosa por biotransformación de subproductos agroindustriales. Tesina de Grado, Departamento de Química FCEyN UNLPam.
- Cherry JR & Fidantsef AL. 2003.** Directed evolution of industrial enzymes: An update. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 438-443.
- Davies GJ, Gloster TM, Henrissat B. 2005 .** Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. *Curr. Op. Struct. Biol.* 15:637-645.
- Davis BJ. 1964.** Disc electrophoresis. II. method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121:404-427
- Dheeman DS, Frias JM, Henehan GTM. 2010.** Influence of cultivation conditions on the production of thermostable extracellular lipase from *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37:1–17
- Dordick JS, Khmelnsky YL, Sergeeva MV. 1998.** The evolution of biotransformation technologies. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:311–318.

- Elíades LA, Rojas N L, Cabello MN, Voget CE & Saparrat NMC. 2011.**  $\alpha$ -Rhamnosidase and  $\beta$ -D-glucosidase activities in fungal strains isolated from alkaline soils and their potential in naringin hydrolysis. *J. of Basic Microbiol.* 51:1-7
- Fukumoto J, Okada S. 1973.** Naringinase production by fermentation. Japanese patent no. 7,306,554
- Giri A, Dhingra V, Giri CC, Singh A, Ward OP, Narasu ML. 2001.** Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnol. Adv.* 19:175-199.
- Gonzalez García Y, Gonzalez Reynoso O, Nungaray Arellano J. 2005.** Potencial del bagazote agave tequilero para la producción de biopolímeros por bacterias celulolíticas y para la obtención de compuestos fenólicos. *Rev. Digital Científica y Tecnológica e-Gnosis.* 3:1665-5745
- Goodwin TW & Mercer EI. 1990.** The plant cell wall. Goodwin, T. W. y Mercer, E. I. (eds.). Introduction to plant Biochemistry. Oxford: Pergamon Press pag. 55-91.
- Guaraglia F & Breccia JD. 2009.** Evaluación de la producción de  $\alpha$ -ramnosil- $\beta$ -glucosidasa. *COPROCNA*, Santa Rosa La Pampa.
- Gunata Z, Bitteur S, Brillouet JM, Bayonove C & Cordonnier R. 1988.** "Sequential enzymatic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape." *Carbo. Research.* 184:139-149.
- Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK & Chauhan B. 2003.** Microbial alpha-amylases: A biotechnological perspective. *Process Biochem* 38:1599-1616.
- Henrissat B. 1991.** A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *J. Biochem.* 280:309-316.
- Howard LR, Abotsi E, Jansen van Rensburg EL, Howard S. 2003.** Lignocellulose Biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *Afr. J. Biotechnol.* 2 (12)-602-619
- Jayani RS, Saxena S & Gupta R. 2005.** Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochem* 40: 2931-2944.
- Jecu L. 2000.** Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. *Ind. Crops and Products* 11: 1-5
- Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S & Tewari R. 2001.** Applications of pectinases in the commercial sector: A review. *Bioresource Technol* 77:215-227.
- Kometani T, Terada Y, Nishimura T, Takii H & Okada S. 1994.** Transglycosylation to hesperidin by cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic bacillus species

in alkaline pH and properties of hesperidin glycosides. *Biosci Biotechnol Biochem.* 58:1990-1994.

**Lomonte B.** Inmunología General: Manual de Laboratorio Electroforesis en gel de Poliacrilamida capítulo 13 pág. 92-101.

**Nighojkar S, Phanse Y, Sinha D, Nighojkar A, Kumar A. 2006.** Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer. *Process Biochem.* 41:1136–1140

**Mamma D, Kourtoglou E, Christakopoulos P. 2008.** Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresour. Technol.* 99:2373–2383

**Martins ES, Silva D, DaSilva R, Gomes E. 2002.** Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochem* 37:949–954

**Mazzaferro LS, Orrillo GA, Ledesma P, Breccia JD. 2008.** Dose dependent significance of monosaccharides on intracellular  $\alpha$ -L-rhamnosidase activity from *Pseudoalteromonas* sp. *Biotechnol Lett* 30:2147–2150

**Mazzaferro LS, Piñuel L, Minig M & Breccia JD. 2010.** Extracellular monoenzyme deglycosylation system of 7-O-linked flavonoid  $\beta$ -rutinosides and its disaccharide transglycosylation activity from *Stilbella fimetaria*. *Arch. Microbiol.* 192(5):383-393.

**Mazzaferro LS. 2011.**  $\alpha$ -Rhamnosil- $\beta$ -glucosidasa. Tesis Doctoral *Centro Regional Universitario Bariloche* Universidad Nacional del Comahue.

**Mazzaferro LS & Breccia JD. 2012.** Quantification of hesperidin in citrus-based foods using a fungal diglycosidase. *Food Chem.* 134: 2338-2344

**Miller GL. 1959.** Use of dinitrosalicylic acid (DNS) for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31:426–428

**Minig M, Mazzaferro LS, Erra-Balsells R, Petroselli G & Breccia JD. 2011.**  $\alpha$ -Rhamnosyl- $\beta$ -glucosidase-Catalyzed Reactions for Analysis and Biotransformations of Plant-Based Foods. *J. Agricultural and Food Chem* 59:11238–11243

**Orrillo AG, Ledesma P, Delgado OD, Spagna G, Breccia JD. 2007.** Cold-active  $\alpha$ -l-rhamnosidase from psychrotolerant bacteria isolated from a sub-Antarctic ecosystem. *Enz. Microb. Technol.* 40:236–241

- Peterson JJ, Beecher GR, Bhagwat SA, Dwyer JT, Gebhardt SE, Haytowitz DB, Holden JM. 2006a.** Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *J. Food. Comp. Anal.* 19:S74–80
- Peterson JJ, Dwyer JT, Beecher GR, Bhagwat SA, Gebhardt SE, Haytowitz DB, Holden JM. 2006b.** Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: A compilation and review of the data from the analytical literature. *J. Food. Comp. Anal.* 19:S66–73
- Puri M, Marwaha SS, Kothari RM, Kennedy JF. 1996.** Biochemical basis of bitterness in citrus fruit juices and biotech approaches for debittering. *Crit. Rev. Biotechnol.* 16:145–155
- Puri M, Banerjee A, Banerjee UC. 2005.** Optimization of process parameters for the production of naringinase by *Aspergillus niger* MTCC 1344. *Process Biochem* 40:195–201
- Ramirez ND, Serrano JAR, Sandoval HT. 2006.** Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Rev. Mexicana de Cs. Farm.* 37: 003
- Sarry JE, Gunata Z. 2004.** Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food. Chem.* 87:509–521
- Randez-Gil F, Sanz P, Prieto JA. 1999.** Engineering baker's yeast: room for improvement. *Trends. Biotechnol.* 17:237–244
- Rios MN, Crespo MC, Terrazas SL, Alvarez AM. 2007.** Aislamiento de cepas anaeróbicas termófilas productoras de celulasa y hemicelulasas implicadas en la producción de Bioetanol mediante técnicas de cultivo y aislamiento tradicionales y no tradicionales. *Biofarbo* vol. XV 43-50
- Rojas N L. 2009.** Enzimas fúngicas extremófilas de Aplicación Biotecnológica: Producción y Caracterización de Ramnosidas alcalofílicas de *Acremonium murorum* y *Acrostalagmus luteo-albus* y Poligalacturonasa acidofílica de *Aspergillus kawachii*. Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Química
- Rojas NL, Cavalitto SF, Cabello M, Hours RA & Voget CE. 2008.** Alkaline Polysaccharidases Produced in Solid State Cultures by Alkalophilic Fungi Isolated from Argentina. *J. of Pure and Appl Microbiol* 2(1):01-10
- Rose K, Fetzner S. 2006.** Identification of linear plasmid pAM1 in the Xavonoid degrading strain *Actinoplanes missouriensis*<sup>T</sup> (DSM 43046). *Plasmid* 55: 249–254

- Sakata K, Mizutani M, Ma S-J, Hiratake J. 2003.** Diglycoside-specific glycosidases. *Methods Enzymol.* 363:444–459
- Showalter AM. 1993.** Structure and function of plant cell wall proteins. *The plant cell* 5:9-23.
- Singh RS, Sooch BS, Puri M. 2007.** Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1. *Bioresour. Technol.* 98:2518–2525
- Soriano Laceras M. 2004.** Análisis de sistemas pectinolíticos bacterianos. Aislamiento y caracterización de las pectinasas PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23 e YvpA de *Bacillus subtilis*. Tesis Doctoral Departamento de microbiología Facultad de Biología Universitat de Barcelona.
- Spagna G, Barbagallo RN, Martino A & Pifferi PG. 2000.** A simple method for purifying glycosidases:  $\alpha$ -L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma of Moscato wine. *Enz. Micro. Technol.* 27:522-530.
- Szijarto N, Szengyel Z, Liden G, Reczey K. 2004.** Dynamics of cellulase production by glucose grown cultures of *Trichoderma reesei* Rut-C30 as a response to addition of cellulose. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 113: 115-124.
- Van der Maarel MJEC, Van der Veen B, Uitdehaag JCM, Leemhuis H & Dijkhuizen L. 2002.** Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *J. Biotechnol* 94:137-155.
- Viikari L, Tenkanen M & Suurnäkki A. 2001.** Biotechnology in the pulp and paper industry. En REHM, H. J. (ed.). *Biotechnology*. Weinheim: Wiley-VCH 10:523-546.
- Vincken J-P, Beldman G, Voragen AGJ. 1997.** Substrate specificity of endoglucanases: what determines xyloglucanase activity? *Carbohydr. Res.* 298, 299–310.