



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE
Centro Regional Universitario Bariloche

**PROSPECCIÓN DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE
FLAVONOIDES: DIGLICOSIDASAS, ASPECTOS FISIOLÓGICOS Y
BIOTECNOLÓGICOS**

Bárbara Daniela Neher
Tesis Doctoral
2016

Trabajo de Tesis para optar el Título de Doctor en Biología

Tesista: Lic. Bárbara Daniela Neher

Director de la Tesis: Dr. Javier Darío Breccia

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis Dr. Javier Breccia, por haber aceptado dirigirme, por haberme brindado la posibilidad de viajar y conocer otro laboratorio, por el interés en el éxito de mi trabajo.

Al Dr. Vladimir Kren, a quien agradezco por recibirme en el laboratorio de Biotransformaciones del Instituto de Microbiología, en la ciudad de Praga Republica Checa.

Al Dr. Michael Kotik por su asesoria y valiosos conocimientos transmitidos en este tiempo. Fue muy interesante trabajar con vos!

A la Dra. Laura Mazzaferro, por haberme brindado su colaboración desinteresada en la interpretación de resultados. Gracias Lau por esas largas horas sentada al lado mio!

Al Dr. Jorge Oyhenart, por su paciencia y sus aportes en este trabajo.

A la Dra. Susana Beatriz Alvarez, por su apoyo en ese primer día!

A los chicos del Laboratorio de Biocatálisis que trabajaron junto a mi este tiempo, por la paciencia interminable, por las largas horas de trabajo compartidas, por su alegría en el laboratorio.

Debo un profundo agradecimiento a la Universidad Nacional del Comahue, por permitir el desarrollo a distancia de la tesis, a la Universidad Nacional de La Pampa (UNLPam) y el Instituto INCITAP por haberme brindado el lugar para realizar este trabajo.

A los Profesores del Departamento de Química y Biología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UNLPam que de alguna manera se interesaron en mi carrera.

También un profundo agradecimiento al soporte financiero del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), y a la UNLPam.

A todos aquellos que de una manera u otra colaboraron para el desarrollo de este trabajo.

A toda mi familia, que siempre apoyaron y animaron en mi carrera.

A Fer, por sus consejos, su aliento y apoyo incondicional. Me encanta compartir nuestro interés por la biología y recorrer este camino juntos! Gracias mi amor por todo!!!

A Hebe, amiga si las hay....Gracias por estar siempre!!!

A mis amigos, por compartir nuestras vidas, el apoyo y la confianza.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	
Microorganismos heterótrofos involucrados en el reciclado del material vegetal y sus beneficios	3
Flavonoides	5
Degradación de flavonoides por enzimas microbianas	7
Clonado y expresión de biocatalizadores	10
α -ramnosil- β -glucosidasa de <i>Acremonium</i> sp. DSM24697	11
Aplicaciones e importancia de α -ramnosil- β -glucosidasa del hongo <i>Acremonium</i> sp. DSM24697	12
OBJETIVOS	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
Selección de microorganismos capaces de degradar flavonoides	24
Actividades enzimáticas de los microorganismos estudiados	29
Selección de microorganismos productores de enzimas diglicosidasas	31
Caracterización de la producción de la diglicosidasa por la levadura <i>C. carnescens</i>	33
Producción, localización celular y purificación de la enzima diglicosidasa de <i>A. missouriensis</i>	38
Análisis <i>in silico</i> de la secuencia de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de <i>A. missouriensis</i>	44
Análisis <i>in silico</i> de la secuencia de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa del hongo <i>Acremonium</i> sp. DSM24697	48
Clonado y expresión heteróloga de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de <i>A. missouriensis</i>	51
Clonado y expresión heteróloga de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de <i>Acremonium</i> sp. DSM 24697	59
Producción y purificación de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa recombinante en <i>P. pastoris</i>	64
Reconocimiento del sitio activo y mecanismo de hidrólisis: bases moleculares	65
Breve resumen de los trabajos realizados con diglicosidasas en plantas y microorganismos	68
CONCLUSIONES	69
BIBLIOGRAFÍA	71
ARTÍCULO CIENTÍFICO DE RESPALDO	77

Resumen

Microorganismos como levaduras y bacterias son una fuente inexplorada de diglicosidasas. Treinta y tres cepas fueron seleccionadas por su capacidad de crecer en medios con flavonoides diglicosilados (hesperidina y/o rutina) como principal fuente de carbono. Se exploró la capacidad de escindir el residuo disacáridico en un solo paso, sin embargo la estrategia más común fue la vía de dos pasos (actividades β -D-glucosidasa y α -L-ramnosidasa). Solo las bacterias *Actinoplanes missouriensis*, *Actinoplanes liguriae* y la levadura *Cryptococcus carnescens* exhibieron actividad desglicosilante de hesperidina en varios órdenes de magnitud mayor que las actividades monoglicosidasas. Se seleccionó la cepa *A. missouriensis* se cultivó en un biorreactor y se detectó una actividad diglicosidasa máxima a los cuatro días (27,7 U/l). También se detectaron actividades monoglicosidasas en el medio de crecimiento (0,11 U/l de α -L-ramnosidasa y 0,42 U/l β -D-glucosidasa). La enzima se purificó a homogeneidad en tres etapas, el zimograma reveló una banda positiva (Rf 0,45) para ambos sustratos, MU- β -glucósido y MU- β -rutinosido. Sin embargo, se confirmó por NMR ^1H y ^{13}C el disacárido rutinosa como el producto principal de hidrólisis de hesperidina. El gen que codifica la 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa se identificó en la secuencia del genoma de *A. missouriensis* 431^T (número de acceso GenBank BAL86042.1) y se expresó funcionalmente en *Escherichia coli*. La proteína recombinante hidroliza hesperidina y hesperidina metilchalcona, pero no rutina, lo cual indica su especificidad para los flavonoides 7-O-rutinosilados. La proteína se clasificó dentro de las glicosil-hidrolasas de la familia 55 (GH55) en contraste con las diglicosidasas eucariotas conocidas, que pertenecen a GH1 y GH5. Estos hallazgos demuestran que organismos distintos de plantas y hongos filamentosos pueden contribuir a una expansión del conocimiento de diglicosidasas.

Además, se describe el clonado y expresión de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de *Acremonium* sp. DSM24697. La expresión heteróloga de la enzima se realizó en los hospedadores *E. coli* y *Pichia pastoris*. En ambos sistemas se logró la producción de la proteína activa, sin embargo la expresada por *E. coli* mostró actividad hidrolítica pero no transglicosilación, mientras que la producida por la levadura mostró ambas actividades al igual que la proteína original.

Abstract

Microorganisms such as yeasts and bacteria are still an underexplored source of diglycosidases. Thirty-three strains were selected for their ability to grow in diglycosylated flavonoid-based media (hesperidin and/or rutin) as main carbon source. The ability to split off the entire disaccharide moiety in a single reaction was explored, but the two-step pathway (α -L-rhamnosidase and β -D-glucosidase activities) was found as the most common strategy. Nevertheless, the strains *Actinoplanes missouriensis*, *Actinoplanes liguriae* and the yeast *Cryptococcus carnescens* exhibited hesperidin deglycosylation activity in several orders of magnitude higher than monoglycosidase activities. The strain *A. missouriensis* was selected and cultivated in a bioreactor, a maximum diglycosidase activity was detected after four days (27.7 U/l). Minor monoglycosidase activities were also detected in the growth medium (0.11 U/l α -L-rhamnosidase and 0.42 U/l β -D-glucosidase). The enzyme was purified from *A. missouriensis* using a three-step purification protocol. The zymographic assay revealed a positive band (R_f 0.45) for both substrates, MU- β -glucoside and MU- β -rutinoside. The main product of hesperidin hydrolysis was confirmed by ^1H and ^{13}C NMR to be rutinose. The gene encoding the 6-O- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase was identified in the genome sequence of *A. missouriensis* 431^T (GenBank accession number BAL86042.1) and functionally expressed in *Escherichia coli*. The recombinant protein hydrolyzed hesperidin and hesperidin methylchalcone, but not rutin, which indicates its specificity for 7-O-rutinosylated flavonoids. The protein was classified into the glycoside hydrolase family 55 (GH55) in contrast to the known eukaryotic diglycosidases, which belong to GH1 and GH5. These findings demonstrate that organisms other than plants and filamentous fungi can contribute to an expansion of the diglycosidase toolbox.

Moreover, the cloning and expression of 6-O- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase from *Acremonium* sp. DSM24697 is described. For the heterologous expression of the enzyme two hosts were selected: *E. coli* and *Pichia pastoris*. The active protein production in both systems was achieved, but that expressed by *E. coli* showed hydrolytic activity but not transglycosylation, while that produced by the yeast showed both activities as the original protein.

INTRODUCCIÓN

Microorganismos heterótrofos involucrados en el reciclado del material vegetal y sus beneficios

Los microorganismos dominan las líneas evolutivas de los tres dominios de la vida (Bacteria, Archaea y Eukarya) y aparecen en todos los ecosistemas (Figura 1). Algunos son capaces de crecer bajo condiciones extremas. Los ecosistemas naturales terrestres y acuáticos dependen de los microorganismos para sostener sus requerimientos nutricionales, muchas veces a través de relaciones simbióticas con plantas (*Rhizobium*, *Frankia*, micorrizas) (Xavier y Germida 2002) y con animales. Los microorganismos son responsables del reciclado de la mayoría de la materia en la naturaleza y son elementos básicos en las cadenas tróficas. La microbiota cumple funciones únicas en los ciclos biogeoquímicos (fijación del nitrógeno, nitrificación, desnitrificación, fijación quimiolitotrófica del dióxido de carbono, formación de metano, reducción de sulfatos), en la formación del suelo, en la regulación del clima, en la composición atmosférica. Considerando que los primeros microorganismos comenzaron su evolución hace más de 3 mil millones de años no es extraño que muestren una diversidad genética y metabólica mucho mayor que animales y plantas (Madigan et al. 2010).

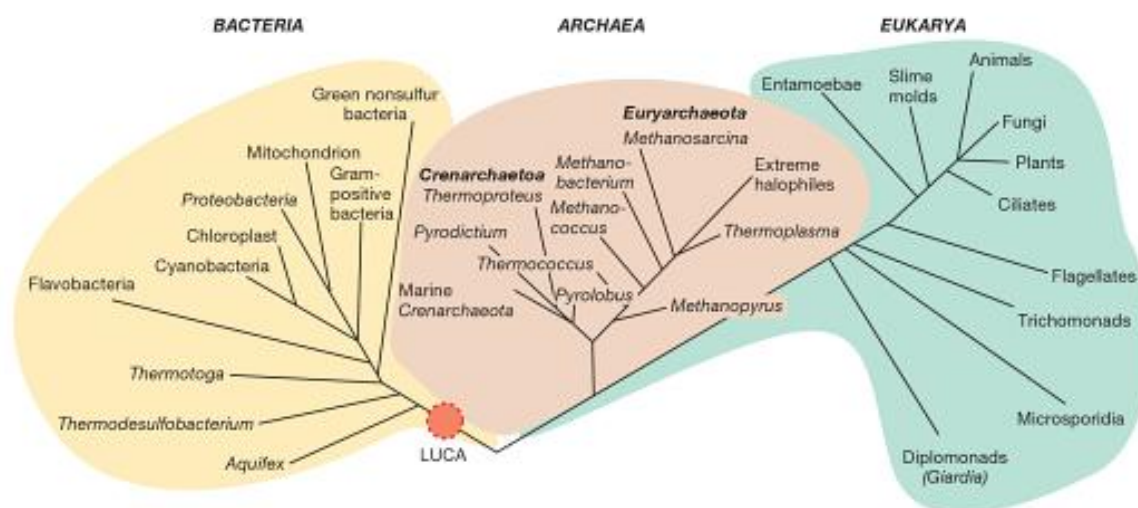


Figura 1: Árbol filogenético de la vida definido por comparación de secuencia de ADN ribosomal: El árbol muestra los tres dominios de organismos y unos pocos grupos representativos en cada dominio. Todos los procariontes Bacteria y Archaea; y la mayoría de los Eukarya son organismos microscópicos, solo plantas, animales y algunos hongos contienen macroorganismos. LUCA last universal common ancestor. Fuente: Brock Biology of Microorganisms (Madigan et al. 2010).

Esta diversidad metabólica y genética de los microorganismos ha sido altamente explotada durante años en aplicaciones de biotecnología como en la producción de antibióticos, por ejemplo, Teicoplanina con actividad bactericida, sintetizado por *Actinoplanes teichomyceticus* (Jung et al. 2008); producción de vitaminas, la vitamina B12 es producida por varias cepas, entre ellas *Propionibacterium fredenreichii* (Gomez et al. 2009); obtención de alimentos como queso, yogur, vinagre, vino, cerveza y en química fina para lograr la producción de moléculas bioactivas o precursores de fármacos (Liese et al. 2006).

El descubrimiento y estudio de nuevos microorganismos que pueden ser utilizados en procesos biotecnológicos es de gran importancia para la economía, la salud y el bienestar de las personas; ya que debido a su diversidad genética producen servicios ecológicos que mantienen la vida en la Tierra: regulan el clima, la calidad del aire, agua y suelos (Portugal y Gómez 2008). Además nos proporcionan alimentos, fibras, energía, medicinas (Adhikari et al. 2003, Kallio et al. 2014). Mantener una base suficiente de capital natural es necesario para que los ecosistemas sigan suministrándonos esos servicios vitales e insustituibles.

El éxito evolutivo de las bacterias se debe en parte a su versatilidad metabólica. Casi todos sus mecanismos posibles de obtención de materia y energía benefician a los humanos biotecnológicamente hablando. Un grupo numeroso dentro de ellas son los actinomicetos (bacterias Gram+ filamentosas). En muchos sentidos son comparables con los hongos, ya que su crecimiento en red da lugar a un micelio y en su gran mayoría producen esporas. Habitan preferentemente el suelo y son los responsables del característico “olor a tierra”. Los valores de pH alcalinos y neutros, en general, son más favorables para su crecimiento. Producen enzimas extracelulares que les permiten hidrolizar polímeros tales como almidón, celulosa, quitina, e incluso gomas, para luego utilizar los productos. Es por ello que actúan como descomponedores de un gran número de sustratos, siendo especialmente importantes en la degradación de compuestos recalcitrantes (Madigan et al. 2010, Kuddus y Ahmad 2013).

Otro grupo no procariota importante es el de las levaduras. Existe un gran número de especies que se diferencian por su aspecto, sus propiedades, sus formas de reproducción y por la forma en la que metabolizan los azúcares. Se encuentran en la superficie de las plantas (Limtong y Koowadjanakul, 2012) y en el suelo (Botha 2011). Como tales tienen la capacidad de segregar enzimas requeridas para la degradación de los sustratos presentes en el suelo (Strauss et al. 2001). Levaduras *no-Saccharomyces* como las del género *Cryptococcus* puede metabolizar glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, celobiosa, melibiosa, rafinosa, melezitosa, almidón soluble, D-xilosa, L-arabinosa pero no metanol, hexadecano y 2,3-butanodiol (Takashima et al. 2003).

Flavonoides

Los flavonoides son moléculas complejas, constituyentes de los detritos de plantas superiores que junto con el material lignocelulósico representan una fuente rica en carbono para aquellos microorganismos que poseen las enzimas catabólicas apropiadas (Shaw et al. 2006). Estos están agrupados dentro de los metabolitos secundarios vegetales y se encuentran involucrados en varias funciones fisiológicas. Constituyen los pigmentos naturales de plantas que se visualizan en otoño y que entre otras funciones protegen a los organismos vegetales del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, los metales y también los protegen de la herbivoría e infecciones por sus actividades bactericida y fungicida. Los flavonoides comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Estos metabolitos al igual que otros relacionados como los terpenos se encuentran generalmente glicosilados. Los residuos glicosídicos más abundantes son disacáridos tales como α -L-arabinofuranosil-, α -L-ramnopiranosil-, β -D-xilopiranosil- y β -D-apiofuranosil- β -D-glucopiranososa (Figura 2).

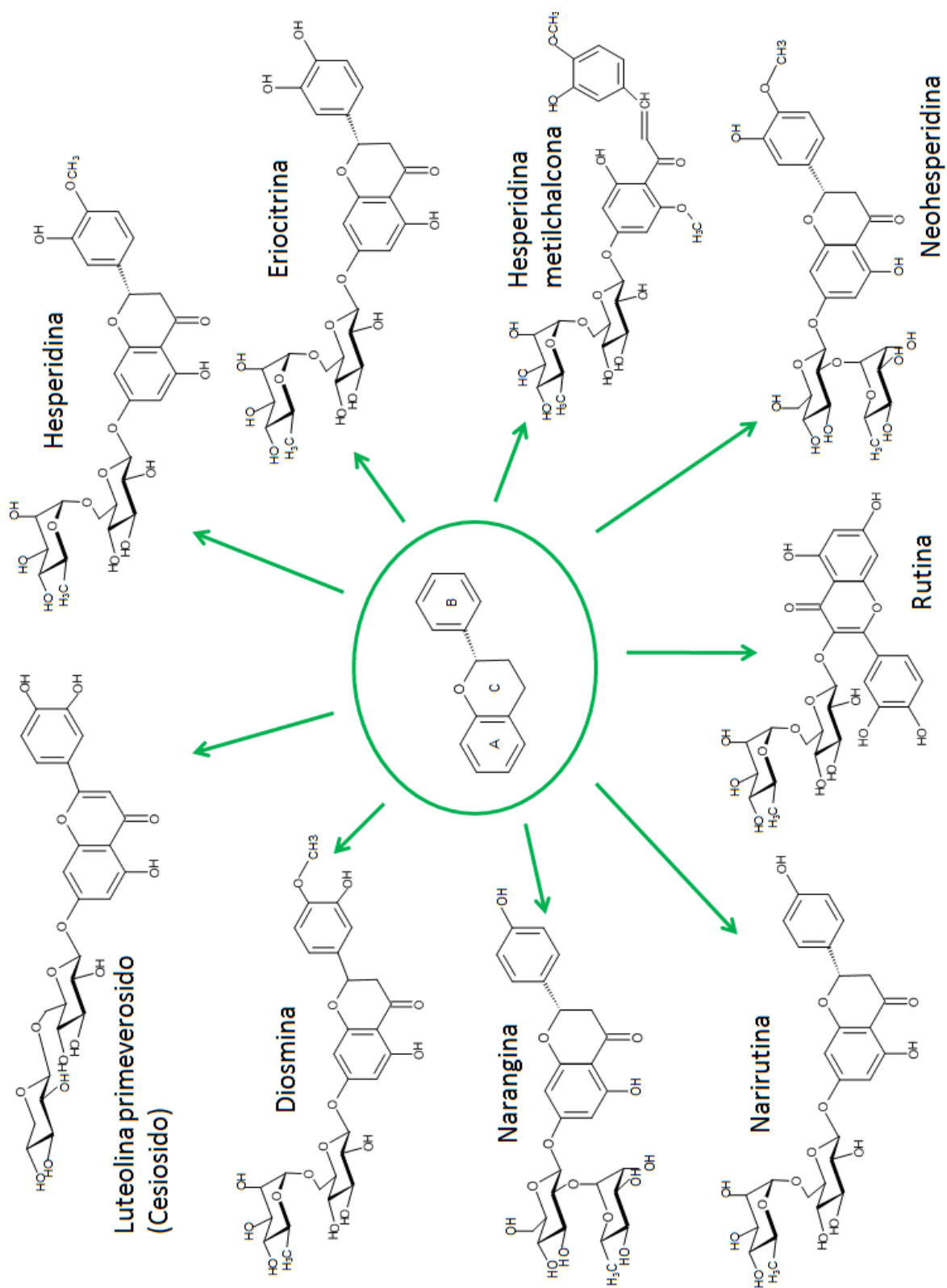


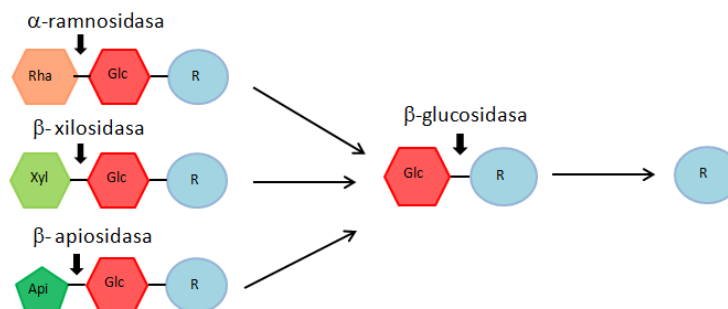
Figura 2: Flavonoides diglicosilados.

La desglicosilación de estos flavonoides está implicada en la biotransformación de alimentos de origen vegetal, como por ejemplo la modulación de aromas en vinos; la disminución del sabor amargo y turbidez de los jugos de frutas (Shin et al. 2015). Por lo tanto las glicosidasas juegan un papel importante en las fases de inicio de la degradación de estos compuestos orgánicos (Klose y Tabatabai 2002).

Degradación de flavonoides por enzimas microbianas

El mecanismo microbiano más común para la desglicosilación de flavonoides habitualmente involucra dos enzimas que actúan de forma secuencial sobre el disacárido (Sarry y Gunata, 2004). Primero, una enzima que reconoce la unión entre los dos residuos de azúcar libera un monosacárido. Algunos ejemplos incluyen α -ramnosidasas (EC 3.2.1.40), α -arabinosidasas (EC 3.2.1.55), β -xilosidasas (EC 3.2.1.37) (Manzanares et al. 2001; Orrillo et al. 2007). Luego, una β -glucosidasa (EC 3.2.1.21) hidroliza el enlace heterosídico entre el residuo de glucosa y la aglicona (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). Existe otro mecanismo de degradación de los flavonoides donde la desglicosilación se realiza en un solo paso (Mazzaferro et al. 2010). Fueron descritas unas pocas enzimas de origen vegetal y fúngico capaces de hidrolizar el enlace glucosídico en un modo “endo” liberando los disacáridos. A estas enzimas se las denominó diglicosidasas (Mazzaferro y Breccia 2011) (Figura 3).

Desglicosilación secuencial



Desglicosilación en un solo paso

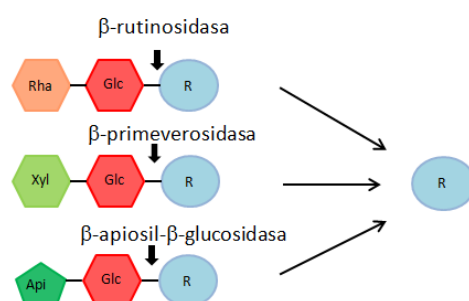


Figura 3: Esquema de los mecanismos de desglicosilación de flavonoides diglicosilados.

A su vez, estas enzimas pueden presentar un mecanismo de hidrólisis de sustitución nucleofílica doble, donde la configuración del carbono anomérico del glicósido se mantiene (mecanismo de retención o *—retaining—*). Por su modo de acción de doble desplazamiento, estas enzimas son capaces de transferir el residuo glicosídico a otra molécula diferente del agua que posea un grupo hidroxilo aceptor. En un primer paso *—glicosilación—*, un grupo carboxilo, de un residuo aminoacídico de la proteína, cataliza la remoción del grupo saliente al mismo tiempo que otro carboxilato realiza un ataque nucleofílico sobre el sustrato formando un intermediario covalente con la enzima (enzima glicosilada). En el segundo paso *—desglicosilación—*, el primer carboxilato funciona como una base para activar al nucleófilo atacante (una molécula de agua en el caso de hidrólisis, o un aceptor hidroxilado en el caso de una transglicosilación), el cual hidroliza el intermediario formado (Plou et al. 2007).

Por otro lado, pueden presentar un mecanismo de inversión *—invertig—*. Donde estas enzimas utilizan dos residuos, normalmente residuos carboxílicos, que actúan como un ácido y una base respectivamente (Vuong y Wilson 2010). El rol del ácido catalítico es protonar el O anomérico y así estabilizar al grupo

hidroxilo saliente, mientras que la base catalítica activa la molécula de agua nucleofílica para el ataque en el carbono anomérico. En este mecanismo no ocurre la transglucosilación (Figura 4).

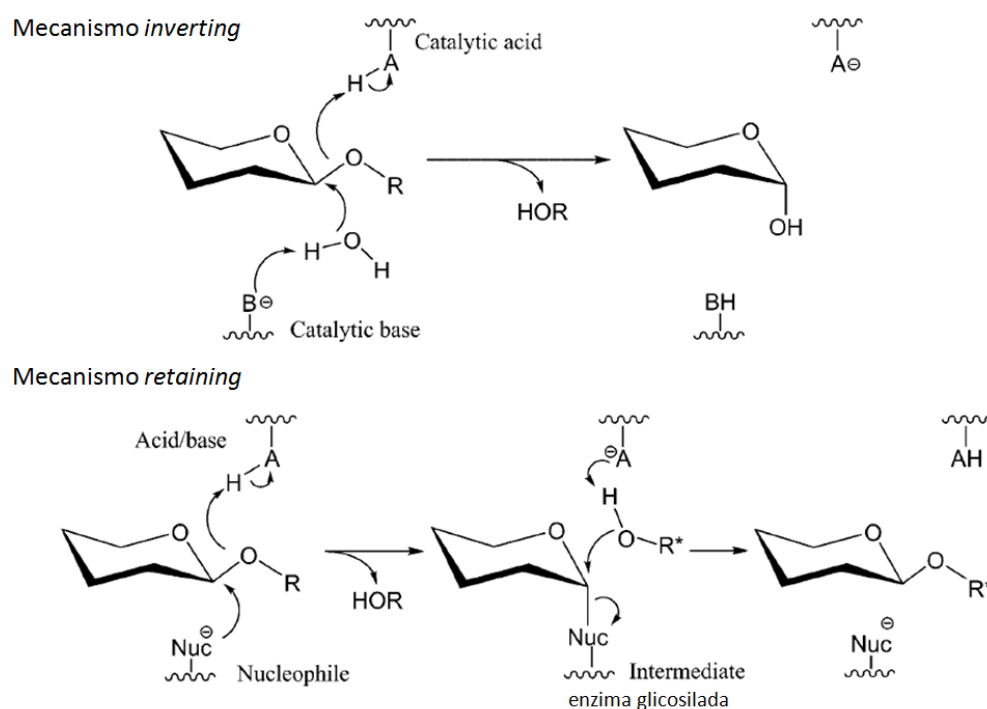


Figura 4: Mecanismo *invertin* y *retin* catalizado por glicosil-hidrolasas. AH: residuo catalítico ácido, B-: residuo catalítico base, Nuc: nucleófilo y R: aceptor hidroxilado, HOR-: nucleófilo exógeno, generalmente una molécula de agua (Vuong y Wilson 2010).

La biocatálisis es en cierta manera tecnología “verde”. Es por ello que el estudio de enzimas con potencial aplicación industrial resulta prometedor, siendo un campo en creciente desarrollo (Liese et al., 2000, Choct 2006). La principal ventaja que nos ofrece la aplicación de enzimas en procesos industriales se basa en su alto grado de especificidad y adaptabilidad volviendo los procesos más eficientes y menos costosos. De esta forma, es posible obtener menos subproductos indeseados y mayor capacidad de planta con un incremento en el rendimiento de producto. Debido a la creciente demanda industrial de biocatalizadores que puedan adaptarse a las distintas condiciones de los procesos industriales, se han realizado considerables esfuerzos para conseguir las enzimas adecuadas.

Se ha reportado la producción de diglicosidasas por plantas y hongos (Mazzaferro y Breccia 2011, Šimčíková et al. 2015). Las diglicosidasas fúngicas reportadas poseen un máximo de actividad a pH ácido. Solo una de origen bacteriano, es estable a pH alcalino y posee un 50% de la actividad máxima a pH 8.0 (Sang Joon et al. 1920). La búsqueda y caracterización de nuevos biocatalizadores con distintas propiedades contribuirá a la diversidad de aplicaciones en la industria. En la tabla 1 se indican algunas diglicosidasas reportadas y sus aplicaciones.

Tabla 1: Diglicosidasas de diferentes microorganismos y su aplicación

Enzima	Origen	Aplicación	Referencia
β -primeverosidasa	<i>Penicillium multicolor</i>	Industria alimenticia	Tsuruhami et al. 2006
β -rutinosidasa	<i>Aspergillus niger</i>	Industria alimenticia	Šimčíková et al. 2015
α -ramnosil- β -glucosidasa	<i>Acremonium</i> sp. DSM24697	Industria farmacéutica y alimenticia	Mazzaferro 2011 Minig et al. 2011; 2015
β -glucosidasa/rutinosidasa	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Industria alimenticia	Shin et al. 2013

A pesar del interés industrial, las diglicosidasas no se encuentran comercializadas. Hasta ahora, las más comunes son las llamadas naringinasas y hesperidinasas, que consisten en un complejo enzimático que contiene dos tipos de actividades: β -glucosidasa y α -ramnosidasa. El complejo hesperidinasas cataliza la degradación de hesperidina en glucosa, ramnosa y hesperetina. Si bien son importantes para la hidrólisis de flavonoides, la presencia de ambas actividades en una preparación no resulta conveniente, por ejemplo cuando se desea la manufactura del disacárido rutinosa. Rutinosa forma parte de preparaciones tópicas para el tratamiento de lesiones de la piel, en particular de úlceras dérmicas, heridas y quemaduras (Patrick y Jacques 1995). Se encuentra como glicósido en flavonoides pero no se ha descrito como azúcar libre. Está involucrada en el metabolismo del carbono de plantas como *Datisca glomerata* (Schubert et al. 2010) y su obtención por medios químicos es compleja e implica el uso de solventes (Quintin y Lewin 2005).

Clonado y expresión de biocatalizadores

Los microorganismos detallados en la tabla 1, como otros, producen diferentes enzimas hidrolíticas en respuesta a las condiciones de cultivo. Obteniéndose una mezcla compleja de enzimas que degradan tanto flavonoides como otras moléculas presentes en el medio. Mediante el clonado de los genes correspondientes y su sobre expresión, estas enzimas pueden producirse en concentraciones

equivalentes a mg/l o g/l de proteína (Dalbøge 1997). Los procesos con cepas recombinantes permiten a la vez obtener cultivos en los cuales la proteína de interés es producida con un mínimo o nula presencia de otras proteínas, lo cual facilita enormemente el proceso de recuperación. Al disponer de enzimas puras en cantidades industriales, se pueden formular mezclas óptimas para cada aplicación particular, lo cual es ventajoso en comparación con el uso de mezclas complejas, muchas veces incompletamente caracterizadas, obtenidas mediante el cultivo con cepas nativas en procesos tradicionales. Las primeras diglicosidasas clonadas y expresadas fueron las que pertenecen a plantas como β -primeverosidasa, viacinin hidrolasa, β -apiosil- β -glucosidasa/furcatin hidrolasa (Mizutani et al. 2002, Ahn et al. 2004, Ahn et al. 2007, Chuankhayan et al. 2007) y β -primeverosidasas de los hongos *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium multicolor* (Yamamoto et al. 2006, Tsuruhami et al. 2011). Recientemente fue clonada y expresada una β -rutinosidasa del hongo *Aspergillus niger* (Šimčíková et al. 2015). El clonado y expresión de la diglicosidasa 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de *Acremonium* sp. DSM24697 resulta de interés en vistas a su potencial en la industria farmacéutica y alimenticia.

6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de Acremonium sp. DSM24697

El hongo *Acremonium* sp. DSM24697 fue seleccionado en nuestro laboratorio por su capacidad de producir una diglicosidasa que actúa específicamente sobre 7-O-rutinosil-flavonoides, por lo cual se denominó 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa (Mazzaferro et al. 2010). Considerando su especificidad para hidrolizar flavonoides 7-O-rutinosilados y que las diglicosidasas previamente descritas son específicas para 3-O-rutinosil-flavonoides (Baumgertel et al., 2003; Narikawa et al., 2000) el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB) reconoció a esta reacción como una nueva actividad enzimática otorgándole el número EC 3.2.1.168.

La 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa es una diglicosidasa capaz de escindir el flavonoide hesperidina en el disacárido rutinosa y la flavanona hesperetina en un único paso (Figura 5). A su vez, presenta un mecanismo de hidrólisis de retención (*retaining*) el cual permite la síntesis de compuestos rutinosilados mediante transglicosilación.

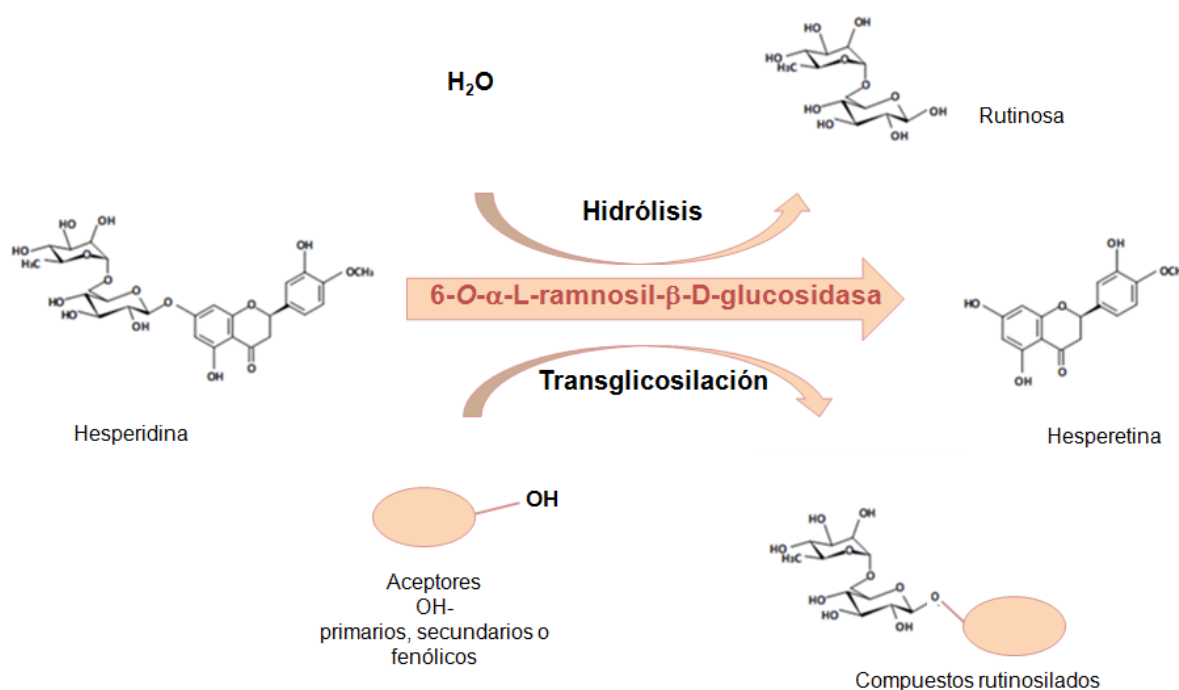


Figura 5: Esquema de reacción de hidrólisis y transglicosilación de 6-O-α-L-ramnosil-β-D-glucosidasa (EC 3.2.1.168).

Aplicaciones e importancia de 6-O-α-L-ramnosil-β-D-glucosidasa del hongo Acremonium sp. DSM24697

Gracias a la especificidad de sustrato hacia hesperidina de la enzima 6-O-α-L-ramnosil-β-D-glucosidasa, ha sido utilizada en el diseño de un método analítico para la cuantificación del flavonoide en productos comerciales ya que hesperidina es un indicador de frescura en jugos frutales (Mazzaferro y Breccia 2012). Paralelamente, su actividad transglicosilante ha sido caracterizada, utilizando hesperidina como donador de rutinosa y etanol como aceptor en la producción de etil-rutinósido (Mazzaferro et al. 2010). Esta característica de la enzima, permitió su utilización como herramienta para la síntesis de moléculas rutinósidas en un solo paso, partiendo de hesperidina como donador y diversos aceptores hidroxilados. Por ejemplo fueron sintetizados por transglicosilación precursores de aromas de alimentos vegetales (Minig et al. 2011). Además, la enzima fúngica fue utilizada para sintetizar un sustrato fluorogénico que permite buscar, mediante técnicas zimográficas, diglicosidasas en otros organismos (Mazzaferro et al. 2012). Una posibilidad importante es la búsqueda de dicha actividad en sistemas procariotas que puedan facilitar la obtención del catalizador recombinante (Puri & Kaur, 2010). Por otro lado, varias glicosidasas de interés industrial descritas en procariotas son intracelulares, de modo que la obtención de las

mismas requiere un paso previo de lisis celular. Razón que nos conduce a plantear otra estrategia de selección buscando estas enzimas en los grupos de microorganismos que las producen en forma extracelular.

Hasta el momento, solo se ha detectado un género de levadura y tres géneros de bacterias con actividad diglicosidasa en Yamamoto et al. 2006. Además de una diglicosidasa procariota proveniente de *Arthrobacter* sp. (Sang-Joon et al., 1990). Sin embargo Yamamoto et al. (2006) no detalla las características de los catalizadores. Por lo tanto podemos estimar que las diglicosidasas procariotas y de levaduras probablemente existen, pero no han sido estudiadas en detalle hasta el momento. El estudio de estas es importante para evaluar la diversidad de dichos catalizadores y la presencia de dicha estrategia de desglicosilación de flavonoides en estos microorganismos.

Objetivo general

Obtención de una librería de glicosil-hidrolasas microbianas partiendo de la búsqueda y selección de microorganismos capaces de desglicosilar flavonoides. Identificación, caracterización de las enzimas involucradas. Se realizará con especial énfasis, la búsqueda de diglicosidasas de microorganismos procariotas.

Objetivos específicos

- a. Selección de microorganismos productores de enzimas, de acuerdo a su capacidad de modificar polisacáridos o glicoconjugados. Será priorizada la obtención de microorganismos procariotas que produzcan diglicosidasas.
- b. Producción de biomasa y actividad enzimática a partir de los microorganismos más promisorios.
- c. Purificación y caracterización de la/s enzima/s seleccionada/s. Se pretende crear una colección de diglicosidasas.
- d. Clonado y expresión de los biocatalizadores, en caso de provenir de microorganismos procariontes.
- e. Por otro lado, la diglicosidasa α -ramnosil- β -glucosidasa producida por *Acremonium* sp. DSM24697, ya caracterizada en trabajos previos (Mazzaferro et al. 2010), será clonada y sobreexpresada en sistemas heterólogos empleando el análisis de su genoma y la información disponible acerca de su caracterización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos químicos:

4-metilumbeliferil- α -L-ramnopiranosido (MU- α -ramnósido), 4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosido (MU- β -glucósido), 4-metilumbeliferil- β -celobiósido (MU- β -celobiósido), p-nitrofenil- α -L-ramnopiranosido (pNRp), p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNGp), hesperidina, hesperidina metilchalcona, rutina, narangina y diosmina se compraron en Sigma Chemical (Buenos Aires, Argentina). Los sustratos 4-metilumbeliferil-rutinósido (MU- β -rutinósido) y p-nitrofenil- β -D-rutinósido (pNRut) se sintetizaron como se describe en Mazzaferro et al. (2012) y Šimčíková et al. (2015).

Recurso microbiano y condiciones de cultivos:

Se utilizaron microorganismos de la colección del laboratorio Biocatálisis-UNLPam provenientes de muestras de suelo y sedimentos de la zona sur de nuestro país: Antártida (Base Marambio S56°14'31" W56°37'48"); Patagonia Argentina (Rio Turbio S51°31'49" W72°21'54"; El Calafate S50°18'36" W72°14'42") y Lago Shala (Ethiopia N7°25'30" E38°23'42") (Minig et al. 2009). Así como también, cepas referenciadas provistas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). El medio enriquecido a pH 10 se ajustó con 100 mM de carbonato de sodio (Na₂CO₃) conteniendo (g/l): extracto de levadura 5, peptona de carne 10, cloruro de sodio (NaCl) 10. En el caso de las levaduras, se agregó 20 g/l de glucosa como fuente de carbono y el pH se ajustó a 7 usando 50 mM de buffer fosfato de sodio. Para las cepas de *Cryptococcus* se utilizó el medio indicado por USDA, YM (Yeast Malt) a pH libre (g/l): extracto de malta 3, peptona de carne 5, extracto de levadura 3, glucosa 10. El medio de selección (g/l): flavonoide 2.5, peptona de carne 2, extracto de levadura 1, para medio sólido se agregó 15 g/l de agar. Las piezas de agar (zonas de clarificación) alrededor de las colonias en el medio de selección se usaron como recurso enzimático. Estas piezas de agar se procesaron según González et al. (1996).

Para la determinación de crecimiento y producción de la enzima se cultivó a la levadura *C. carnescens* en los medios: YM y de selección con hesperidina como fuente de carbono. Un mililitro de un caldo cultivado en YM de 48 h se utilizó como inóculo en los cultivos en lote de 150 ml (Inóculo: 0.67%). Los cultivos se realizaron a 25°C en agitador rotatorio (250 rpm).

La cepa seleccionada (*A. missouriensis* 431^T = NRRL B-3342) se cultivó en un biorreactor tipo bach de 1 l de capacidad máxima con una tasa de agitación de 200 rpm y aereación de 0.4 vvm a 30 °C. El medio de cultivo contuvo (g/l): hesperidina 2.5, peptona de carne 2 y extracto de levadura 1. El pH se mantuvo a 7.0 con 0.5 M H₂SO₄ y 1 M NaOH. El biorreactor se inoculó con 10 ml de un cultivo crecido en medio LB durante 2 días (Inóculo: 1%), se tomaron periódicamente alicuotas de 1 ml para las mediciones de

actividad. Las muestras se centrifugaron (10 min, 12000×g), y los pellets se lavaron dos veces con 0.16 M NaCl y resuspendieron en 1 ml de 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0). Las suspensiones celulares se usaron para detectar las actividades unidas a las células. La proteína *wild type* se purificó desde el sobrenadante mediante cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sephadex, 40–120 µm, GE Healthcare Life Sciences), precipitación de sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄ y cromatografía de exclusión molecular (Bio-Gel P-60, Bio-Rad). La concentración de proteína se estimó usando el ácido bicinonínico (BCA assay, Sigma-Aldrich).

Los medios de cultivos para el crecimiento y producción de la proteína heteróloga en *Pichia pastoris* se realizaron según las instrucciones de Easy Select *Pichia* expression kit, Invitrogen. YPDS (g/l): extracto de levadura 10, peptona de carne 20, glucosa 2, agar 20 y sorbitol 1 M. BMGY (g/l): extracto de levadura 10, peptona de carne 20, YNB 13.4, biotina 4x10⁻⁴, glicerol 10, buffer fosfato de potasio 100 mM pH 6.0. BMMY (g/l): extracto de levadura 10, peptona de carne 20, YNB 13.4, biotina 4x10⁻⁴, metanol 5, buffer fosfato de potasio 100 mM pH 6.0. BMYP (g/l): extracto de levadura 10, peptona de carne 20, biotina 4x10⁻⁴, metanol 5, buffer fosfato de potasio 100 mM pH 6.0. BMLB (g/l): extracto de levadura 5, peptona de carne 10, biotina 4x10⁻⁴, metanol 5, buffer fosfato de potasio 100 mM pH 6.0.

Ensayos de actividad enzimática

1. Medición de Actividades enzimáticas

Para la determinación de la actividad desglucosilante de hesperidina se procedió a la cuantificación de la liberación de azúcares reductores (Miller, 1959). Se incubaron 450 µl de sustrato hesperidina en buffer con 50 µl de muestra. En el caso de los cultivos en medio sólido, la muestra se obtuvo congelando distintas fracciones de agar clarificado cercanas a la colonia, y luego se recuperó el sobrenadante por centrifugación (González et al. 1996). En el caso de los cultivos sumergidos, se usó el cultivo completo como fuente de enzimas ecto- y extracelulares. La reacción se llevó a cabo durante 1 hora en un baño de agua a 50°C, 50 mM buffer Tris-HCl pH 7.0 (en el caso de las reacciones del *screening* se incubaron 2 horas a 40°C, 50mM buffer fosfato pH 6.0) y se finalizó agregando 500 µl de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Los tubos se colocaron en un baño de agua hirviendo por 10 min y se enfriaron antes de medir la absorbancia a 540nm. Se definió una unidad de enzima (U) como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 µmol de rutinosa por minuto.

Para la evaluación del efecto del pH y la temperatura sobre la proteína en el sobrenadante de *C. carnescens* se utilizó buffer universal (30mM) en el rango de pH 2,5-10 a 30°C. Para la determinación de

la temperatura óptima aparente se testearon temperaturas comprendidas entre los 30 y 70°C, con el buffer universal (pH 6). Todas las reacciones se incubaron durante 2 horas.

Para la evaluación del efecto del pH y la temperatura sobre la proteína *wild type* en el sobrenadante de *A. missouriensis* se utilizaron los siguientes buffers 50 mM a 50°C: citrato de sodio (pH 4-6), fosfato de sodio (pH 6-7) y Tris-HCl (pH 7- 8.8). La medición de actividad a diferentes temperaturas se realizó entre 30 y 70°C. Todas las reacciones se incubaron durante 1 hora.

2. Zimogramas

Se realizaron electroforesis nativas PAGE (10% p/v bis/acrilamida), a potencial constante (120 V) y temperatura ambiente. Para la detección de las actividades enzimáticas los geles se sumergieron en 50 mM buffer Tris-HCl pH 8.0 con los sustratos fluorogénicos MU-β-glucósido, MU-α-ramnósido, MU-β-celobiósido o MU-β-rutinósido. Luego de 10 min a 37°C las bandas se visualizaron por iluminación UV (312nm). Además, la actividad enzimática de *A. missouriensis* se detectó mediante placas de agar (1.5 % p/v) con el sustrato natural hesperidina (0.25% p/v) incubadas a 37°C durante 3 días. Los halos transparentes en el fondo amarillo indicaron la presencia de la actividad de desglicosilación del flavonoide. La enzima 6-O-α-L-ramnosil-β-D-glucosidasa (EC 3.2.1.168) de *Acremonium* sp. DSM24697 se usó como control positivo.

3. Cromatografía en capa delgada (TLC)

La identificación de los productos de las reacciones enzimáticas (hidrólisis y transglicosilación) se realizó por cromatografía en capa delgada (Silicagel 60 W) usando acetato de etilo/isopropanol/agua (3:2:2) como fase móvil y se revelaron con el reactivo de antrona (Witham et al. 1971). Para medir actividad de transglicosilación se agregó 1 y 5 %v/v de los distintos alcoholes (etanol y fenol) a la mezcla de reacción y se incubó a la temperatura y pH óptimos para cada cepa (detallado en el apartado 1).

Además, el disacárido rutinosa producido en la reacción de hidrólisis de hesperidina con la proteína *wild type* pura de *A. missouriensis* se purificó y analizó por NMR. La mezcla de reacción se extrajo 2 veces con acetato de etilo (1:1), la fase acuosa se concentró y cargó en una columna de cromatografía de exclusión molecular (Bio-Gel P-2, Bio-Rad). Las fracciones que contenían rutinosa se reunieron y liofilizaron. Los espectros de ¹H- y ¹³C-NMR (500.13 MHz y 125.77 MHz respectivamente) se registraron por el espectrómetro Bruker Avance-500 en CD3OD a 20 °C.

Digestión con tripsina y espectrometría de masa MALDI-TOF

La banda de proteína teñida con Coomassie Brilliant Blue de *A. missouriensis* se cortó desde el gel SDS-Page, escindida en pequeñas piezas y desteñida 50 mM de acetato de 4-etilmorfolina (pH 8.1) en 50 %

acetonitrilo (ACN). El gel se lavó con agua, deshidrató en ACN y resuspendió en agua. Las piezas de gel se incubaron a 37°C por 20 horas con 100 ng de tripsina (Promega, USA) en 25 mM de acetato de 4-etilmorfolina y 5% v/v ACN. Los péptidos obtenidos se transfirieron a 40% v/v ACN/0.1% v/v TFA. Un μ l de la mezcla de péptidos se depositó en la placa de MALDI con 0.4 μ l de la matriz. El espectro de masas de MALDI se registró con Ultraflex III (Bruker Daltonics, Alemania). La información proveniente del MS y MS/MS se buscó con la base de datos de proteínas bacterianas (NCBI nr20130322) usando el motor de búsqueda MASCOT.

Clonado de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de A. missouriensis

El ADN genómico de *A. missouriensis* se aisló según el protocolo de Sambrook y Russell (2001). La secuencia señal de secreción del gen de la 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa se predijo usando SignalP (Petersen et al. 2011). El gen que codifica para la proteína sin péptido señal se amplificó por PCR usando ADN polimerasa *Q5 Hot Start* (New England Biolabs), el ADN genómico aislado (como molde) y los *primers* correspondientes (Tabla 2). Además, se utilizó el buffer *Q5 High GC Enhancer* para mejorar las reacciones de amplificación de secuencias con alto % de GC. El producto de PCR se purificó desde el gel de agarosa (1 % p/v) e insertó dentro del vector de clonado pGEM-T Easy (Invitrogen). Se reemplazó el codón de *stop* localizado *upstream* del vector pET101/D-TOPO por una secuencia His-tag mediante una mutación sitio- dirigida usando el kit *Phusion site-directed mutagenesis* (Thermo Scientific) y se amplificó el gen con los *primers* (Tabla 2) y el vector de clonado con el gen de interés como molde. El producto de PCR obtenido, se purificó, fosforiló usando la proteína polinucleótido kinasa T4 (New England Biolabs) y circularizó. El constructo pET101/D-TOPO::*rgH* se usó para transformar las células *E. coli* TOP10.

Tabla 2. Primers usados para el clonado y expresión de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de la bacteria.

Par de primer	Nombre	Secuencia (5' → 3')	Vector	Proteína recombinante con	
				Péptido señal nativo	His-tag
1	Act_w_sig_F	GTGCGAACACGGCGACGAAACC	Clonado en pGEM-T Easy	si	no
	Act_w/o_sig_F	GCGACCACTCCGACTTCGG		no	no
	Act_R	TCAGCGGGGGTGGGCAG			
2	Act_101F	CACCATGGCGACCACTCCGGA	Clonado en pET101/TOPO	no	no
	Act_101R	TCAGCGGGGGTGGGCA			
3	Act_His_101F	CCACCCCGCTCAAAGGGCGAGCT	Reemplazo del codón de stop	no	C-terminal
	Act_His_101R	GCAGCCAGCCGGGCAGAT	<i>upstream</i> de la secuencia His-tag por Ser (pET101) ^a		

^a Mutación sitio dirigida usando el kit Phusion site-directed mutagenesis (Thermo Scientific).

Expresión heteróloga y purificación de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de A. missouriensis

Los constructos pET101/D-TOPO::*rgH* (que codifican la proteína con y sin His-tag en el extremo C-terminal) se insertaron en células *E. coli* BL21 Star (DE3) (Life Technologies) que además contiene el plásmido pGro7 (TaKaRa Bio Inc.) para la co-expresión de proteínas chaperonas GroES y GroEL que ayudan al plegamiento adecuado de la proteína de interés. Se cultivó la cepa transformada a 28 °C en medio LB conteniendo ampicilina (100 μ g/ml) y cloranfenicol (34 μ g/ml), pasadas las 20 horas se bajó la temperatura a 22 °C y se añadió L-arabinosa (a una concentración final de 1.7 g/l). Luego de 1 hora se añadió IPTG (a una concentración final de 450 μ M), y el cultivo continuó otras 24 horas. La biomasa se cosechó por centrifugación (3,600 \times g at 8 °C, 15 min), y el pellet celular se lavó dos veces con 25 mM buffer Tris-HCl (pH 7.0). Las células se resuspendieron en *binding buffer* (ver abajo), luego las células se incubaron con lizosima y DNasa (0.2 mg/ml y 20 μ /ml, respectivamente) por una hora y seguida por sonicación en hielo por 15min (pausas de 1 min entre pulsos de 1 min; 80% amplitud; UP50H sonicator, Hielscher Ultrasonics GmbH, Alemania). La fracción soluble del lisado, el cual se obtuvo por centrifugación (15,500 \times g at 4 °C, 15 min), se cargó en una columna de afinidad de metales (Ni-sepharose HisTrap HP, 5 ml, GE Healthcare Life Sciences) equilibrada con *binding buffer* (20 mM fosfato de sodio, 500 mM NaCl, 30 mM imidazol, pH 7.4). La columna se lavó con *binding buffer*, y la diglicosidasa unida se eluyó con *elution buffer* (20 mM fosfato de sodio, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 7.4) usando un flujo de 3 ml/min y un gradiente de tiempo de 40 min.

Efecto del pH, temperatura y especificidad de sustrato de la proteína recombinante de A. missouriensis

Las mediciones de actividad a diferentes temperaturas (pH 7.0) y a diferentes valores de pH (50 °C) se realizaron con los buffers (50 mM): citrato de sodio (pH 4.0-6.0), fosfato de sodio (pH 6.0-7.0), Tris-HCl (pH 7.0-8.9) y Na₂CO₃ (9.2–10.8). La cantidad de azúcares reductores producidos durante la desglicosilación enzimática de los distintos flavonoides se determinó usando el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) como se detalla en el apartado 1 de ensayos enzimáticos. También las actividades diglicosidasa (6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa) y monoglicosidasas (α -L-ramnosidasa y β -D-glucosidasa) se determinaron usando los sustratos artificiales pNRut, pNRhap o pNGlcp según Orrillo et al. (2007).

Clonado de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de Acremonium sp. DSM 24697

Se cultivó *Acremonium* sp. DSM 24697 en medio LB a 27 °C con agitación. Su ADN genómico se aisló usando el protocolo de *DNeasy plant mini kit* (Qiagen), el cual incluye un congelamiento rápido en nitrógeno líquido de la biomasa filtrada y una molienda que resulta en un polvo fino. Se preparó una librería de ADN genómico usando el kit *Nextera DNA sample preparation kit* (Illumina Inc.). El secuenciado se realizó por BaseClear B.V. (the Netherlands) con el secuenciador MiSeq Illumina. La amplificación por PCR del gen de la 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa se realizó con la ADN polimerasa *Pfu Ultra II Fusion HS* (Agilent Technologies), el ADN genómico como molde y los correspondientes pares de *primer* para el clonado en pGEM-T Easy (Promega) (Tabla 3).

El producto de PCR provisto de una cola de adeninas en el extremo 3' permitió un mejor ligamiento con el vector usando Taq ADN polimerasa. El ADN se purificó desde el gel de agarosa y precipitó con etanol. Luego de la transformación de las células de *E. coli* TOP10, la presencia de inserto en forma correcta se confirmó por análisis con enzimas de restricción y el secuenciado del plásmido completo (con el gen de interés). Usando el par de *primer* apropiado (Tabla 3), el ADN del plásmido completo como molde y la ADN polimerasa *Pfu Ultra II*, se amplificó por PCR el gen de interés para ser insertado en los vectores de expresión pET101/D-TOPO y pET100/D-TOPO (Invitrogen). El gen de la 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa presenta una secuencia señal de secreción y la misma se predijo usando SignalP (Petersen et al. 2011). Se eliminó el codón de stop localizado *upstream* de la secuencia His-tag del vector (pET101) usando el kit *Phusion site-directed mutagenesis* (Thermo Scientific) y la secuencia del péptido señal nativo en los constructos pET100 y pET101 también se eliminó con el uso de los correspondientes *primers* (Tabla 3). Los productos de PCR resultantes se purificaron desde geles de agarosa, fosforilaron usando la polinucleotido kinasa T4 (New England Biolabs) y circularizaron para la transformación en células de *E. coli* TOP10.

Tabla 3. Primers usados para el clonado y expresión de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa del hongo.

Par de primer	Nombre	Secuencia (5' → 3')	Vector	Proteína recombinante con	
				Péptido señal nativo	His-tag
1	g231-GEM-F	ATGTTTCATCAAATCCATCATCATCCCCTTCTCTG	Clonado en pGEM-T Easy	si	no
	g231-GEM-R	TCACTGGCAGCTTACTCCTTCAGAAGG			
2	g231-pET101-F	CACCATGTTTCATCAAATCCATCATCATCCCCTTC	Clonado en pET101	si	no
	g231-pET101-R	TTACTGGCAGCTTACTCCTTCAGAAGGG			
	Acre_pET100_F	CACCTTCATCAAATCCATCATCATCCCCTTCC	Clonado en pET100	si	N-terminal
	Acre_pET100_R	TTACTGGCAGCTTACTCCTTCAGAAGGGTTGATGTAAC			
	Acrem1_His_F	AAGGGCGAGCTCAATTCGAAG	Remoción del codón de stop	si	C-terminal
	Acrem1_His_R	CTGGCAGCTTACTCCTTCAGAAGG	<i>upstream</i> de la secuencia His-tag (pET101) ^a		
3	g231-PICZ α -F	GAAAAGAGCACCGCAAGCCGCCTACCTG	Clonado en pPICZ α ^b	no	no
	g231-PICZ α -R	AAT <u>TCTAG</u> A7CACTGGCAGCTTACTCCTTCA GAAGGGTTGATG			
4	Acr_N_w/o_sigF	GCACCGCAAGCCGCCTAC	Remoción del péptido señal nativo (pET100) ^a	no	N-terminal
	Acr_N_w/o_sigR	GGGATGATCCTTATCGTCATCGTC	Remoción del péptido señal nativo (pET101) ^a	no	C-terminal
	Acr_C_w/o_sigF	GCACCGCAAGCCGCCTAC	Remoción del péptido señal nativo (pET100) ^a	no	N-terminal
	Acr_C_w/o_sigR	CATGGTGAAGGGCTCCTGAATT	Remoción del péptido señal nativo (pET101) ^a	no	C-terminal

^a Mutación sitio dirigida usando el kit Phusion site-directed mutagenesis (Thermo Scientific).

^b Subrayado sitio de restricción de *Xba* I, codon de stop en itálicas.

El gen de la 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa sin su secuencia señal de secreción también se insertó en el vector pPICZ α A para la sobre-producción de la enzima en *P. pastoris*. Para este propósito el inserto de ADN se re-amplificó desde el plásmido pGEM-T usando la ADN polimerasa *PfuUltra* II y los correspondientes par de *primer* con el *reverse primer* diseñado para incorporar el sitio de restricción de *Xba* I y un codón de stop (Tabla 2). El producto de PCR purificado se clivó con *Xba* I y ligado con el vector pPICZ α A usando el kit *Mighty mix DNA ligation* (Takara Bio Inc.). Esta estrategia de clonado dió lugar a un constructo con el gen de interés, el factor α que se encuentra *downstream* del mismo y el sitio de escisión Kex2. La transformación se realizó en células de *E. coli* TOP10, y los transformantes se inocularon en placas con medio LB y zeocina según las instrucciones de Invitrogen.

Bioinformática: Análisis filogenético y codones raros

El software ExPasy se utilizó para predecir la masa molecular y el pI de la 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de *A. missouriensis* (Gasteiger et al. 2005). Los alineamientos y árbol filogenético se generaron usando *MUltiple Sequence Comparison by Log- Expectation* (MUSCLE) en el caso de *A. missouriensis*. Para la enzima de *Acremonium* sp. DSM24697 los alineamientos de la secuencia se generaron usando Clustal W (Thompson et al. 1994). Los árboles filogenéticos se construyeron con el programa MEGA4 usando el método de *Neighbor-Joining* con 1000 *bootstrap* (Tamura et al. 2007). Las distancias evolutivas se computaron usando el método de Poisson. Todas las posiciones que contienen lagunas de alineación se eliminaron en la comparación de secuencias de pares. La presencia de codones raros en los genes de interés para *E. coli* se analizó utilizando el sitio web *Rare Codon Calculator* (RaCC; <http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC/>).

Expresión heteróloga de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de Acremonium sp. DSM 24697 en E. coli y P. pastoris

Las células de *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL (Life Technologies) se transformaron con los constructos pET100::*rgh* y pET101::*rgh*. Luego de 24 horas de crecimiento de las transformantes a 37°C en medio LB conteniendo ampicilina (100 μ g/ml) y cloranfenicol (34 μ g/ml), la temperatura se disminuyó a 22 °C. Pasada la hora se añadió IPTG a una concentración final de 450 μ M. Luego de otras 24 horas, se colectó la biomasa por centrifugación (3,600 \times g a 8 °C, 15 min). El pellet de células se lavó dos veces con buffer 25 mM Tris-HCl (pH 7.0).

El constructo pPICZ α A::*rgh* (10 μ g) se linealizó con *Sac* I (New England Biolabs), precipitó con etanol y transformó por electroporación en células de *P. pastoris* KM71H (Invitrogen). Para ello se utilizó el electroporador MicroPulser seteado para *P. pastoris* (Bio-Rad). Las transformantes se cultivaron a 28 °C sobre placas con medio YPDS conteniendo zeocina (concentración final 1 mg/ml). Los medios de cultivo usados para la expresión de la proteína recombinante fueron BMGY y BMMY. La inducción de la expresión con metanol (concentración final de 0.5% v/v) se mantuvo durante cuatro días por el agregado del mismo cada 24 horas. El clon con mayor nivel de secreción de la enzima recombinante se usó para la producción a gran escala de la proteína en los medios BMMY, BMYP y BMLB con inducción de metanol.

Purificación de la 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa recombinante de Acremonium sp. DSM24697

Luego de cuatro días de cultivo de *P. pastoris*, la biomasa se removió por centrifugación (3000g a 8°C, 10 min) y el medio extracelular que contenía la proteína se liofilizó. La muestra liofilizada se resuspendió en

buffer (5mM citrato de sodio, pH 5.0) y cargó en una columna cromatográfica de exclusión molecular (Bio-Gel P-60, Bio-Rad) equilibrada con buffer 5 mM citrato de sodio (pH 5.0). La tasa de flujo se mantuvo a 0.15 ml/min. Se colectaron las fracciones activas y liofilizaron nuevamente para su almacenamiento a -20°C.

Desglicosilación de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa wild-type y recombinante de Acremonium sp. DSM24697

Las reacciones de desglicosilación de las enzimas 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasas se realizaron durante 24 horas a 37 °C con Endoglicosidasa H (Endo H) usando el kit *ENDO Hf* (New England BioLabs, USA) y Peptido-N-Glicosidasa F (PNGasa F)(Invitrogen). Se realizó la desglicosilación en condiciones nativas y desnaturalizantes. La reacción con el ácido trifluorometanosulfónico (TFMS) se llevó a cabo en baño frío de etanol, seguido de 4 horas de incubación a -20°C. El exceso de TFMS se neutralizó por el agregado de una solución de piridina (piridina/metanol/agua, 3:1:1). Luego, los productos de reacción (péptidos y carbohidratos) se separaron por cromatografía de exclusión molecular (DEAE sephadex G-25). Mediante geles SDS-Page se analizaron los productos de todas las reacciones de desglicosilación y se testeó su actividad de hidrólisis y transglicosilación de hesperidina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de microorganismos capaces de degradar flavonoides

Microorganismos del dominio Bacteria son hasta ahora un recurso inexplorado de diglicosidasas. Incluso cuando una patente menciona un par de géneros bacterianos como productores de diglicosidasas (Yamamoto et al. 2006), no hay estudios sistemáticos de estas enzimas. Si bien el objetivo principal de la tesis fue la búsqueda de diglicosidasas con especial énfasis en procariotas, en vistas de ampliar las posibilidades también se ensayaron cepas de levaduras ya que tampoco se ha encontrado trabajos en detalle de la producción de diglicosidasas en ellas (Yamamoto et al. 2006). Una característica en común, sin embargo no confirmatoria, entre los productores de diglicosidasas es la clarificación del medio de cultivo que contiene flavonoides (Mazzaferro et al. 2010). Hace más de 10 años que nuestro laboratorio estudia glicosil-hidrolasas, específicamente diglicosidasas, y hasta el momento más de 300 aislamientos fueron capaces de crecer en presencia de flavonoides pero la degradación del medio fue escasa. En esta tesis se estudiaron 37 cepas referenciadas de bacterias y levaduras. La selección de microorganismos por su capacidad de degradar flavonoides consistió en primer término en la evaluación de la clarificación del medio de cultivo, tanto en medio sólido como en medio líquido. Hecho que indica que los organismos son capaces de producir enzimas para degradar esta fuente de carbono. Para ello se utilizaron los flavonoides rutinosilados hesperidina y rutina por ser una importante clase de metabolitos secundarios en los frutos cítricos, donde ellos constituyen aproximadamente el 1.7-2.0% de las cáscaras secas de naranjas y pomelo (Manthey y Grohmann 1996).

De un total de 37 cepas microbianas 33 fueron capaces de crecer con al menos uno de los flavonoides, se observó la clarificación del medio en nueve cepas y solo cinco de ellas fueron capaces de clarificar los medios de cultivos en ambos flavonoides. La degradación de flavonoides ha sido reportada para especies bacterianas de los géneros *Streptomyces*, *Actinoplanes*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Rhizobium* (Merkens et al. 2008, Rao y Cooper 1994, Rose y Fetzner 2006, Westlake et al. 1959). Estos autores focalizan sus estudios en la capacidad de las mencionadas bacterias de oxidar los anillos de la aglicona de los flavonoides. En el caso de flavonoides glicosilados, la desglicosilación es un paso previo a la oxidación de la aglicona. *Streptomyces* sp. FLA es capaz de utilizar quercetina como único recurso de carbono, sin embargo, el crecimiento en el flavonoide fue pobre (Merkens et al. 2008). Westlake et al. (1959) detalla que la mayoría (95% y 84%) de las cepas pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Corynebacterium* no crecieron sobre el flavonoide rutina, pero las que sí lo hicieron menos del 1% fueron capaces de desglicosilar el flavonoide. En esta tesis los procariotas pertenecientes al género *Bacillus*, *Corynebacterium* y *Microbacterium* incrementaron su biomasa microbiana en el medio que

contenía el flavonoide pero en ninguno de los casos se observó un halo de clarificación alrededor de las colonias. En cambio, solo tres de 11 cepas de los géneros *Actinoplanes* y *Streptomyces* mostraron la clarificación del medio de cultivo sólido.

Con respecto a levaduras, hasta el momento solo se han encontrado trabajos en los cuales se cultivan levaduras en medios que contienen flavonoides con el propósito de medir actividad antimicrobiana (Buzzini et al. 2008) o como inductores de la síntesis de flavonoides desde organismos transgénicos como *S. cerevisiae* (Tantras et al. 2009). Solo Westlake et al. (1996) identifican levaduras capaces de crecer y producir enzimas que degradan el flavonoide rutina. En este *screening*, *S. cerevisiae*, *Candida* spp., *T. cutaneum* y *P. minuta* crecieron pobremente en el medio que contenía el flavonoide hesperidina. Las tres cepas de *Cryptococcus* fueron capaces de crecer en ambos flavonoides dos de las cuales presentaron clarificación sobre hesperidina y rutina y *C. albidus* solo sobre rutina. A continuación se presentan en la tabla 4 los resultados obtenidos de acuerdo con la técnica empleada.

Tabla 4. Cepas usadas en el screening de diglicosidasas.

Microorganismos	Crecimiento ¹	Formación de halo ²
Origen procariota		
<i>Actinoplanes auranticolor</i> B-3343	+	NO
<i>Actinoplanes ferrugineus</i> B-16718	+	NO
<i>Actinoplanes liguriae</i> B-16723	++	++
<i>Actinoplanes missouriensis</i> B-3342	++	++
<i>Bacillus halodurans</i> SES01	+	NO
<i>Bacillus halodurans</i> SES05	+	NO
<i>Bacillus halodurans</i> SES22	+	NO
<i>Bacillus halodurans</i> SES4	+	NO
<i>Bacillus</i> sp. SES111	+	NO
<i>Bacillus</i> sp. SES33	+	NO
<i>Bacillus</i> sp. SES403	+	NO
<i>Bacillus</i> sp. SES46	+	NO
<i>Bacillus</i> sp. SES77	+	NO
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i> B-4246	++	NO
<i>Corynebacterium glaucum</i> B-24142	++	NO
<i>Corynebacterium glutamicum</i> B-2784	++	NO
<i>Corynebacterium marinum</i> B-24779	-	NO
<i>Corynebacterium variabile</i> B-4201	-	NO
<i>Marinibacillus</i> sp. SES62	-	NO
<i>Microbacterium aurantiacum</i> B-24217	+	NO
<i>Microbacterium barkeri</i> B-24231	+	NO
<i>Streptomyces coelicolor</i> B-2812	+	NO
<i>Streptomyces mediolani</i> WC-3934	+	NO

<i>Streptomyces naganishii</i> B-1816	+	NO
<i>Streptomyces olivovorticilliatu</i> s B-1994	-	NO
<i>Streptomyces</i> sp.	+	NO
<i>Streptomyces</i> sp. SES401	+	NO
<i>Streptomyces</i> sp. SES404	+	NO
<i>Streptomyces</i> sp. SES405	++	++

Origen eucariota

<i>Candida boidinii</i> Y-17661	+	NO
<i>Candida cylindracea</i> Y-17506	++	NO
<i>Cryptococcus albidus</i> YB-253	++	++
<i>Cryptococcus bestiolae</i> Y-27894	+	+
<i>Cryptococcus carnescens</i> Y-1503	+	++
<i>Pichia minuta</i> Y-411	+	NO
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	NO
<i>Trichosporon cutaneum</i> YB-583	+	NO

¹(-) Ausencia de crecimiento luego de 10 días de incubación a 30°C en medio sólido con hesperidina, (+) colonias con un diámetro ≤ 5 mm luego de 10 días de incubación a 30°C, y (++) colonias con un diámetro > 5 mm bajo las mismas condiciones.

² (NO) Halo no observado luego de 10 días de incubación a 30°C en medio sólido con hesperidina, (+) diámetro del halo ≤ diámetro de la colonia y (++) diámetro del halo > diámetro de la colonia bajo las mismas condiciones.

El comportamiento de las cepas cultivadas en medio líquido y en medio sólido fue diferente, ya que si bien con la cepa *S. naganishii* no se detectó clarificación en los medios sólidos, si se observó clarificación del medio de cultivo líquido con hesperidina. Con las cepas *B. halodurans* SES22 y *Bacillus*.sp SES77 en los cultivos sumergidos si bien no hubo una clarificación total se observó un cambio de color del medio de cultivo (Figura 6).

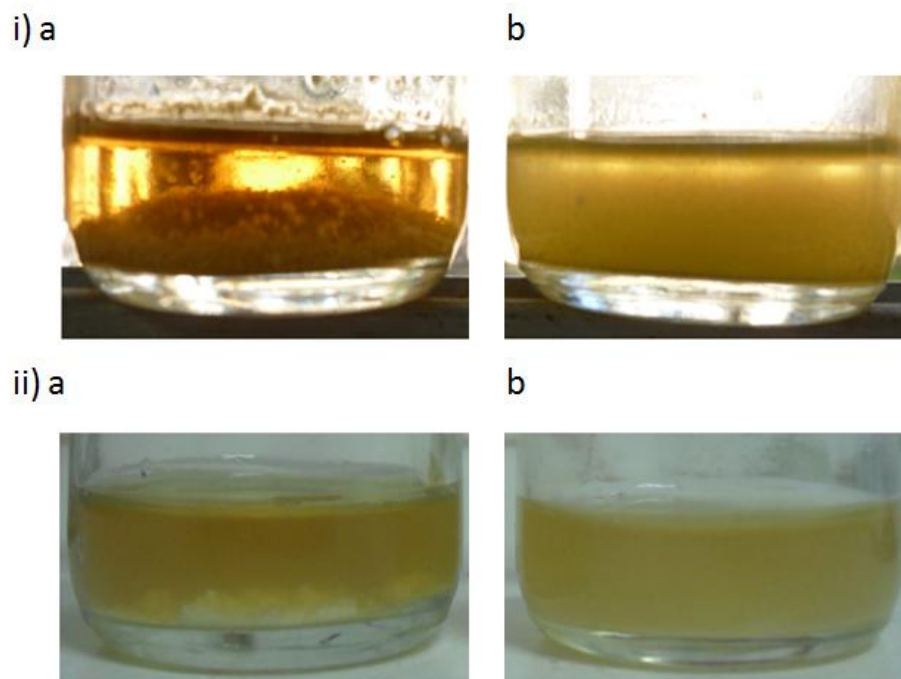


Figura 6: Clarificación del medio líquido conteniendo hesperidina por a i) cultivo de *S. naganishii* y a ii) cultivo de *Bacillus sp. SES77*. b) medios estériles.

Aquellos organismos que crecieron sobre medio sólido y donde el diámetro del halo de clarificación del flavonoide fue mayor al diámetro de la colonia, fueron nuevamente cultivados en ambos flavonoides (hesperidina y rutina). Como se puede observar en la figura 7, *A. liguriae* y *C. carnescens* clarificaron pobremente en el medio hesperidina con respecto al medio con rutina. Mientras que *A. missouriensis* creció y clarificó en menor medida en placas con rutina que con herperidina. *C. albidus* creció y clarificó en medio con rutina mientras que no se observó clarificación del medio que contenía hesperidina. *Streptomyces sp. SES405* fue la cepa en la cual se detectó mayor crecimiento y clarificación en ambos flavonoides.



Figura 7: Crecimiento de microorganismos y clarificación del medio sólido conteniendo flavonoides rutinossilados.

Actividades enzimáticas de los microorganismos estudiados

De las 9 cepas que presentaron clarificación, se utilizaron los extractos extracelulares de ocho cepas como recurso enzimático y se evaluaron las actividades monoglicosidas (α -ramnosidasa y β -glucosidasa) y la desglicosilación del flavonoide hesperidina medida por la cantidad total de azúcares reductores liberados. La diferencia entre estas mediciones brinda la información si se está en presencia de la actividad diglicosidasa. No se pudo evaluar la actividad de hidrólisis de la cepa *C. bestiolae* ya que el recurso enzimático no fue suficiente para la evaluación de los ensayos. Excepto para *C. albidus*, *B.*

halodurans SES22 y *Bacillus* sp. SES77 donde la actividad de desglicosilación de hesperidina no fue detectada, el resto de los microorganismos desglicosilaron hesperidina. Todos ellos fueron activos hacia los sustratos monoglicosilados. Las cepas *Streptomyces* sp. SES405, *A. liguriae*, *A. missouriensis* y *C. carnescens* fueron seleccionadas para los siguientes estudios porque en las mismas se detectó una actividad desglicosilante de hesperidina mayor a las 5 U/l. Excepcionalmente, *Streptomyces* SES405 mostró valores comparables de actividades monoglicosidasas y desglicosilación de hesperidina, mientras que para *A. liguriae*, *A. missouriensis* y *C. carnescens* solo produjeron trazas de actividades monoglicosidasas (Tabla 5). Esta diferencia sugiere que el mecanismo de desglicosilación de las últimas cepas es debido a enzimas diglicosidasas.

Tabla 5: Actividades glicosil-hidrolasas extracelulares provenientes de las cepas crecidas en hesperidina.

Actividades glicosil-hidrolasas extracelulares (U/l)			
Microorganismo	α -ramnosidasa	β -glucosidasa	Desglicosilación de hesperidina
<i>Actinoplanes liguriae</i> B-16723	0.012	0.0018	10.58
<i>Actinoplanes missouriensis</i> B-3342	0.0006	0.002	6.23
<i>Bacillus halodurans</i> SES22	ND	0.016	ND
<i>Bacillus</i> sp. SES77	ND	0.094	ND
<i>Streptomyces naganishii</i> B-1816	0.0008	0.0006	1.7
<i>Streptomyces</i> sp. SES405	5.12	0.57	17.28
<i>Cryptococcus albidus</i> YB-253	0.0001	0.001	ND
<i>Cryptococcus carnescens</i> Y-1503	0.00003	0.0009	5.51

McMahon et al. (1999) determinaron que 32 levaduras de los géneros *Candida*, *Pichia* y *Saccharomyces* crecieron en un medio conteniendo arbutina (hidroquinona β -D-glucopiranosido), y produjeron actividad β -glucosidasa bajo estas condiciones. La mayoría de las β -glucosidasas fueron localizadas en la fracción celular, con pequeñas cantidades liberadas en el medio de cultivo (McMahon et al. 1999). La caracterización de glicosidasas activas sobre flavonoides en levaduras es incluso más limitada. Un trabajo reciente realizado con *S. cerevisiae* demostró que tres de las β -glucosidasas producidas por el organismo son activas hacia los flavonoides 7-O- y 4'-O-glicosilados (Schmidt et al. 2011). Sin embargo, este

microorganismo no se hizo crecer en el medio conteniendo el flavonoide ni tampoco fueron detectadas actividades diglicosidasas. Según Yamamoto et al. (2006) las cepas *C. albidus*, *M. arborescens*, *Co. ammoniagenes*, *Co. glutamicum* y *A. missouriensis* produjeron diglicosidasas, las mismas fueron detectadas con el sustrato p-nitrofenil (pNP) primeverósido. En este trabajo las cepas *Co. ammoniagenes* y *Co. glutamicum* si bien crecieron en los medios que contenian los flavonoides no se observó halo de clarificación ni se detectaron enzimas glicosil-hidrolasas capaces de degradarlos. Los bajos valores de actividad monoglicosidasas detectados en *C. albidus*, pueden explicarse por la falta de una fuente rica en nitrógeno (Westlake et al. 1996). En el caso de *A. missouriensis* si se observó actividad diglicosidasa hacia el sustrato hesperidina.

Selección de microorganismos productores de diglicosidasas

La selección de microorganismos se basó, en segundo término, por análisis zimográfico con el sustrato fluorogénico MU- β -rutinósido. Rodríguez et al. (2010) asociaron con un mismo Rf una banda intensa de actividad α -L-ramnosidasa de *Pichia guilliermondii* con una banda menos intensa de actividad β -D-glucosidasa, esto podría deberse a la conjunción que la promiscuidad de la α -L-ramnosidasa y la característica de buen grupo saliente de la aglicona 4-metilumbeliferona (Kitson y Freeman 2000). Considerando el resultado de *P. guilliermondii* como un hecho aislado, una selección de microorganismos que presenten bandas positivas con el sustrato diglicoconjugado MU- β -rutinósido indicarían la presencia de la actividad diglicosidasa. Los extractos extracelulares de los 33 microorganismos se sometieron a un análisis zimográfico con el sustrato MU- β -rutinósido, solo la levadura *C. carnescens* y las bacterias *A. missouriensis* y *A. liguriae* mostraron una banda de actividad positiva (Figura 8). Si bien, *Streptomyces* sp. SES405, *C. bestiolae*, *C. albidus*, *B. halodurans* SES22 y *Bacillus* sp. SES77 fueron capaces de degradar el flavonoide hesperidina o rutina no se detectó actividad alguna con el sustrato fluorogénico.

Los extractos de las tres cepas que evidenciaron producción de una enzima diglicosidasa, también fueron evaluados con los sustratos fluorogénicos MU- α -ramnósido y MU- β -glucósido para la detección de actividades monoglicosidasas (α -ramnosidasa y β -glucosidasa) mientras que el sustrato MU- β -cellobiósido fue usado para detectar la especificidad de las proteínas hacia los compuestos diglicosilados. *C. carnescens* y *A. liguriae* solo presentaron actividad contra MU- β -rutinósido en cambio *A. missouriensis* con ambos sustratos MU- β -rutinósido y MU- β -glucósido. Ninguna de las cepas mostró actividad con el sustrato MU- β -cellobiósido, indicando la especificidad hacia el disacárido rutinosa.

Los resultados obtenidos en esta tesis con *Streptomyces* sp. SES405 indicaron que la cepa desglucosila hesperidina mediante un mecanismo secuencial ya que se observó altos valores de actividades

monoglicosidasas, y la actividad diglicosidasa no fue detectada en los zimogramas. Un trabajo publicado por Rose y Fetzner (2006) describe la identificación de un plásmido lineal en *A. missouriensis*, el cual codifica la actividad quercetinasasa. Esta cepa fue capaz de degradar no solo quercetina, sino también los flavonoides glicosilados hesperidina y rutina. La enzima de *A. missouriensis* descrita en esta tesis podría ser la responsable del paso de desglicosilación de estos últimos compuestos.

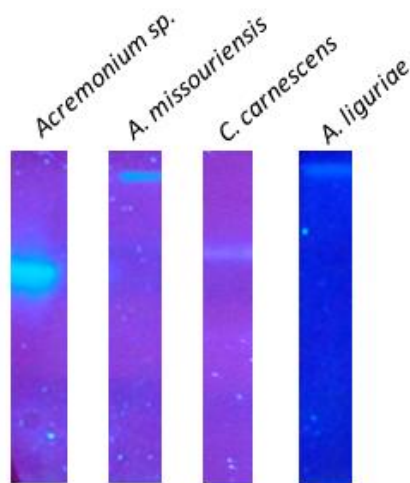


Figura 8: Zimograma de los extractos extracelulares usando MU-β-rutinósido. Control positivo: 6-O-α-L-ramnosil-β-D-glucosidasa (EC 3.2.1.168) de *Acremonium sp.* DSM24697; *A. missouriensis* y *C. carnescens* creciendo en presencia de hesperidina como única fuente de carbono, y *A. liguriae* creciendo en rutina como fuente de carbono.

Cuando el sustrato natural hesperidina fue usado como sustrato de la reacción, los sobrenadantes de *C. carnescens*, *A. missouriensis* y *A. liguriae* produjeron rutinosa como uno de los productos de la hidrólisis de hesperidina, mientras los monosacáridos glucosa y ramnosa no fueron detectados por cromatografía de capa delgada (Figura 9). Esta información, junto con el hecho que la actividad α-L-ramnosidasa fue de 2-5 órdenes de magnitud más baja que la actividad de desglicosilación de hesperidina, confirman la producción de la actividad diglicosidasa por las tres cepas mencionadas. Se caracterizó el extracto extracelular de *C. carnescens* por ser la única levadura en la que se encontró actividad diglicosidasa en este trabajo y la cepa *A. missouriensis* por presentar menores valores de actividades monoglicosidasas con respecto a *A. liguriae*.

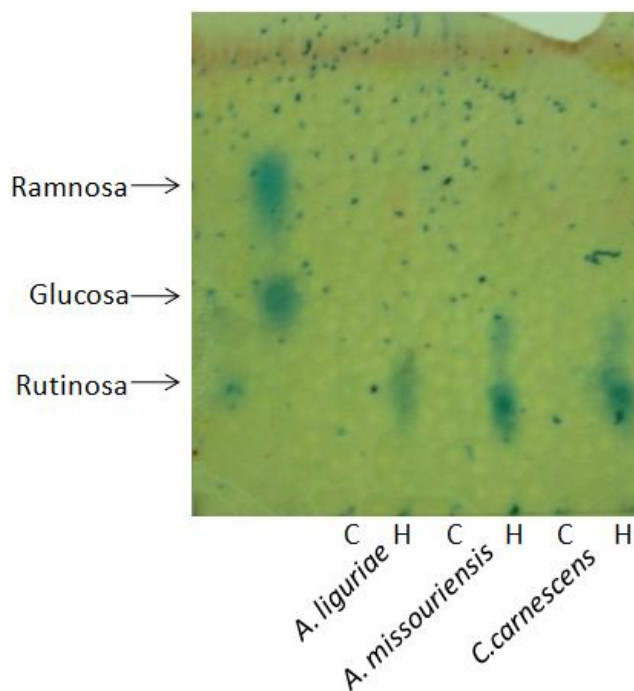


Figura 9: Cromatografía de capa delgada de los productos de reacción de la hidrólisis de hesperidina. Condiciones de reacción: 40°, 2h in 50 mM buffer fosfato pH 6.0. C reacción control (enzima inactivada a 100°C por 10 min), H producto de reacción.

Caracterización de la producción de la diglicosidasa por la levadura C. carnescens

Las colonias de *C. carnescens* en medio YM agar tienen un aspecto mucoso, de color crema, virando a tonos más oscuros y apariencia seca en la madurez. Sin embargo, no se ha encontrado en la bibliografía descripción de la cepa *C. carnescens* creciendo sobre flavonoides, en este trabajo sus colonias en cultivos con diferentes flavonoides rutinossilados (hesperidina, rutina y diosmina) como fuentes de carbono presentaron colores diferentes. Un tono rosado en el medio con hesperidina; blanco con rutina y amarillento con diosmina. Cabe destacar que el microorganismo fue capaz de crecer en todos los medios que contenían flavonoides en su composición y con un desarrollo importante en solo 48 h de cultivo. Nuevamente, solo se observaron halos de clarificación alrededor de las colonias en las placas con hesperidina y rutina.

Con el fin de evaluar el crecimiento y la producción de la diglicosidasa por *C. carnescens* se realizó cultivos sumergidos en medio YM y medio de selección con el flavonoide hesperidina como fuente de carbono. El crecimiento del organismo en YM y en el medio con el flavonoide alcanzó la fase estacionaria alrededor de las 50 horas (Figura 10). Sin embargo se observó que en el medio con el flavonoide, el número de individuos que llegaron a la fase estacionaria fue menor. El medio con flavonoide es más limitado en nutrientes que el medio YM, y esta condición puede explicar las diferencias en los bajos recuentos celulares. La actividad desglicosilante de hesperidina durante cuatro días de crecimiento en medio con dicho flavonoide presentó niveles mínimos durante la fase de adaptación y la fase exponencial del proceso fermentativo (Figura 11). Mientras que el pico de máxima producción se encontró en la fase estacionaria de crecimiento, de forma similar a otras enzimas hidrolíticas de origen microbiano (Breccia et al. 1998, Subramaniyan et al. 1998)

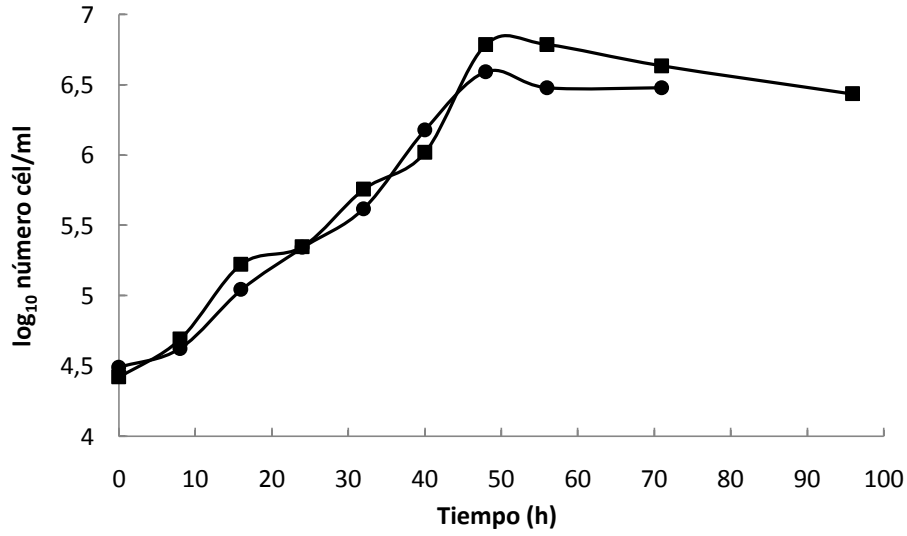


Figura 10: Crecimiento en lote de la cepa *C. carnescens* en medio YM (■) y medio con hesperidina (●).

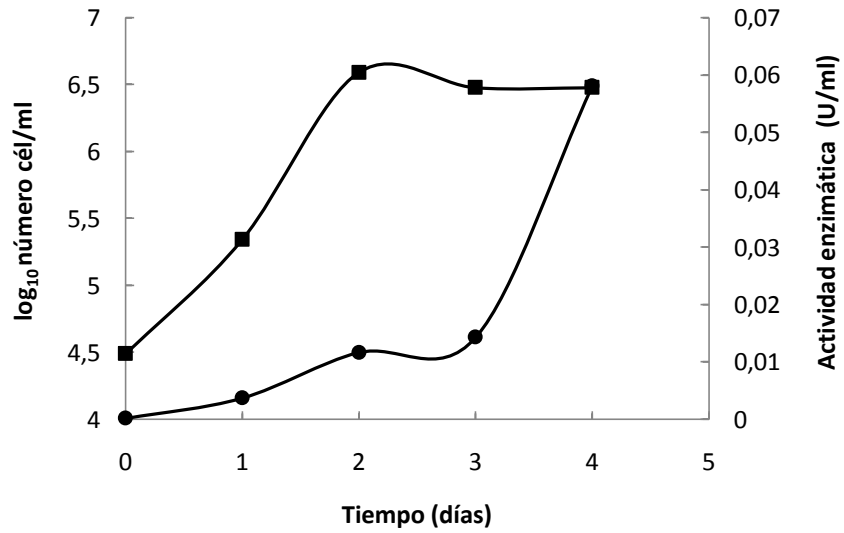


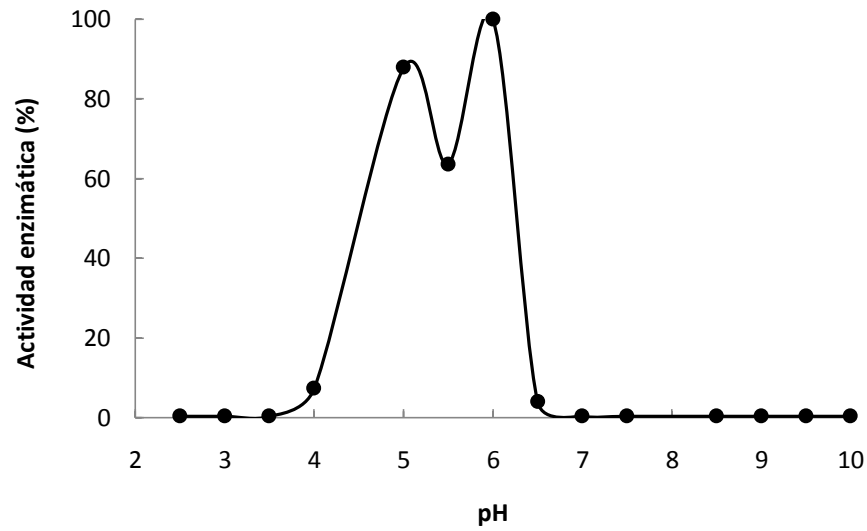
Figura 11: Curva de producción de actividad diglicosidasa por *C. carnescens* en medio con hesperidina. Células/ml (■), Actividad enzimática (●)

La actividad diglicosidasa de *C. carnescens* en cultivos de 48h de crecimiento en medio con hesperidina se encontró mayoritariamente ligada a las células (aproximadamente 60%), y en menor medida en el

extracto extracelular. Existen numerosas estrategias microbianas para la degradación de macromoléculas tales como polisacáridos. La más común consiste en la secreción de endoglicosidasas extracelulares las cuales hidrolizan los polisacáridos y los oligómeros resultantes incorporados, tal es el caso de la degradación de la celulosa por *Nocardiosis* sp. (Walker et al. 2006) o del xilano, por *Bacillus halodurans* (Breccia et al. 1998). Una segunda estrategia es la presencia de hidrolasas en la superficie celular, en contacto con el medio externo; ejemplificada por la pululanasa de *Klebsiella oxytoca*. Por último, una tercera estrategia es la importación del polisacárido, tal como ocurre en *Bacteroides* spp., éste ingresa a través de un receptor de membrana al periplasma donde se hallan las enzimas degradativas (Salysers et al. 1996). Teniendo en cuenta la localización de la actividad diglicosidasa de *C. carnescens*, su estrategia de degradación del flavonoide sería similar a la descrita para la pululanasa de *Klebsiella oxytoca*.

Se detectó actividad desglicosilante de hesperidina en el intervalo entre los pH 4- 6, el pico máximo fue a pH 6. Otro pico con un 90% de actividad fue a pH 5. El extracto enzimático mantiene más del 60% de la actividad en el rango de pH 4.5 a 6.0 y actividades detectables a pH 4.0, que incrementan las posibilidades de aplicación para la biotransformación de alimentos. La influencia de la temperatura sobre la actividad se realizó a pH 6 y se encontró un óptimo aparente alrededor de los 55°C (Figura 12). Este comportamiento es beneficioso para aplicaciones en la industria cítrica, ya que las altas temperaturas favorecen la disolución de hesperidina y otros flavonoides (Van Rensburg y Pretorius 2000). No obstante el biocatalizador exhibió actividad enzimática en un amplio rango de temperaturas.

a)



b)

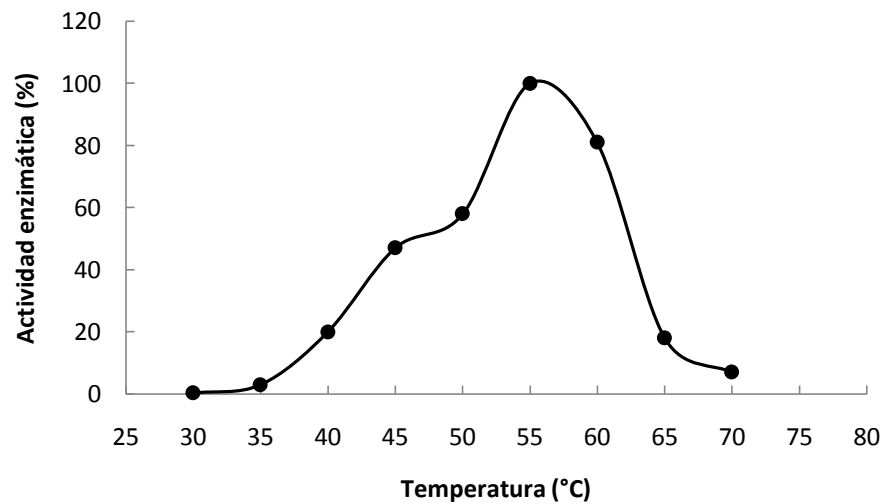


Figura 12: (a) Efecto del pH y (b) la temperatura sobre la actividad diglicosidasa de *C. carnescens*. El 100% de la actividad corresponde a 0,03 U/ml para ambos gráficos.

Teniendo en cuenta que *C. carnescens* es capaz de hidrolizar el flavonoide hesperidina en rutinosa y hesperetina, se evaluó la capacidad de transferir este residuo sacarídico a otros aceptores diferentes del agua, como etanol y fenol. No se pudo detectar mediante cromatografía de capa delgada los productos de transglicosilación (alcoholes rutinósilados). Hasta el momento, no hemos encontrado en la literatura

descripciones de reacciones de transglucosilación a aceptores alcohólicos con enzimas provenientes del género *Cryptococcus*.

A fin de comparar la producción de las actividades enzimáticas desglicosilantes de hesperidina y rutina se cultivó *C. carnescens* en medios sólidos con ambos flavonoides como fuente de carbono. El análisis zimográfico mostró una banda de actividad, con un R_f de 0.30, con el sustrato artificial MU- β -rutinósido. Se observó que esta banda, tiene un R_f menor al de la enzima 6- O - α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de *Acremonium* sp. DSM24697 (R_f 0,54). Cuando *C. carnescens* fue cultivado en rutina como fuente de carbono también produjo una banda de actividad diglicosidasa con el mismo R_f de la anterior (Figura 13). Estos resultados sugieren que el microorganismo produce actividad diglicosidasa específica para rutinosa y que podría ser la misma hidrolasa para ambos sustratos. En el laboratorio se seguirá el estudio de este biocatalizador como posible modulador de aromas en vinos (Takashima et al. 2003).

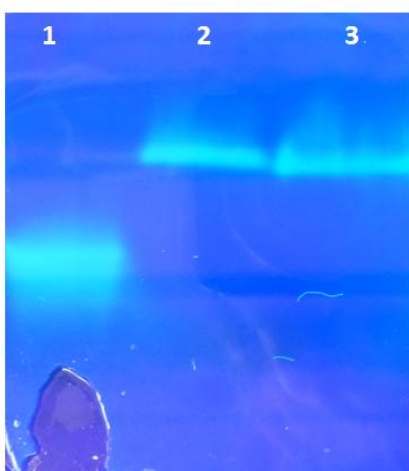


Figura 13: Zimograma de los extractos extracelulares de *C. carnescens* creciendo medios con rutina y hesperidina. Línea 1: 6- O - α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de *Acremonium* sp. DSM24697, línea 2 extractos de *C. carnescens* creciendo medios con hesperidina y línea 3 en rutina.

Producción, localización celular y purificación de la enzima diglicosidasa de A. missouriensis

Los avances de la Biotecnología de las últimas décadas, especialmente en Genética e Ingeniería de proteínas, han otorgado a las enzimas (biocatalizadores) un rol fundamental dentro de los procesos industriales (Alkorta et al. 1998). Un biocatalizador debe ser efectivo bajo las condiciones de trabajo del proceso en cuestión para que pueda ser utilizado y tenga un impacto positivo significativo sobre el mismo. Para ello se determinan sus propiedades más relevantes, se purifica y se investiga la factibilidad

técnica del proceso enzimático. Con el fin de lograr el clonado y sobreexpresión de una de las enzimas diglicosidasas se seleccionó la enzima producida por la cepa *A. missouriensis* ya que su genoma (GenBank: AP012319.1) se encuentra disponible públicamente en la base de datos (Yamamura et al. 2012). Además que se conoce en detalle sobre la degradación de los anillos de flavonoides como rutina, hesperidina, quercetina, entre otros (Rose y Fetzner 2006).

La cepa *A. missouriensis* fue capaz de crecer con hesperidina como única fuente de carbono y la actividad diglicosidasa solo se detectó con el medio conteniendo el flavonoide. Por esta razón la enzima es nombrada 6-*O*- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa (EC 3.2.1.168) al igual que la perteneciente a *Acremonium* sp. DSM24697. Se cultivó *A. missouriensis* en un reactor de 1 l de capacidad con el fin de evaluar el curso de la producción de la actividad diglicosidasa. La producción máxima se detectó luego del cuarto día (27.7 U l⁻¹). La actividad diglicosidasa luego de las 72 horas de cultivo se localizó un 80 % en el extracto extracelular y un 20 % unida a la pared celular. Los resultados de la cromatografía de capa delgada muestran que el disacárido rutinosa fue uno de los principales productos de hidrólisis de hesperidina. Sin embargo, el medio extracelular también contuvo trazas de actividades monoglicosidasas (0.045 U/l α -ramnosidasa y 0.089 U/l β -glucosidasa) (Figura 14).

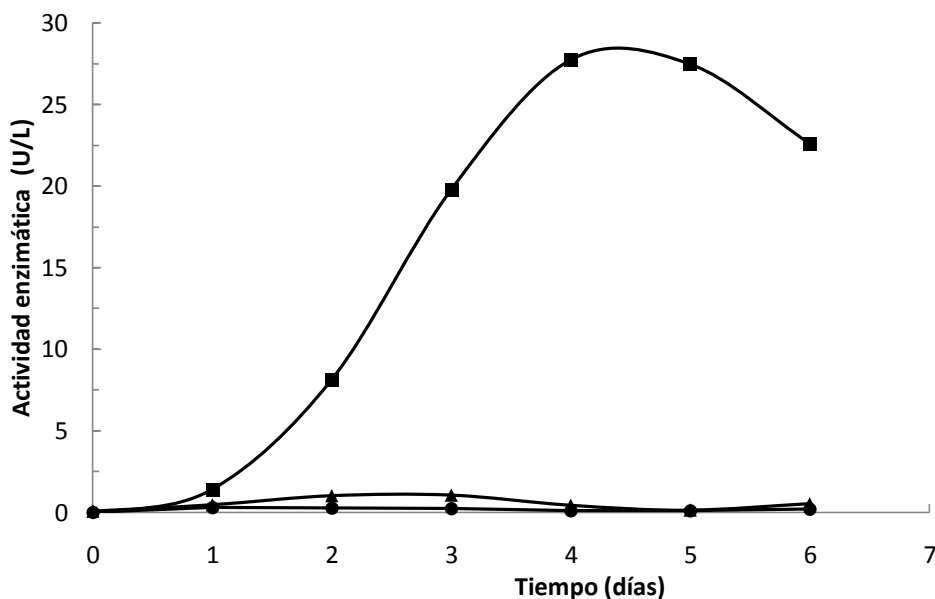
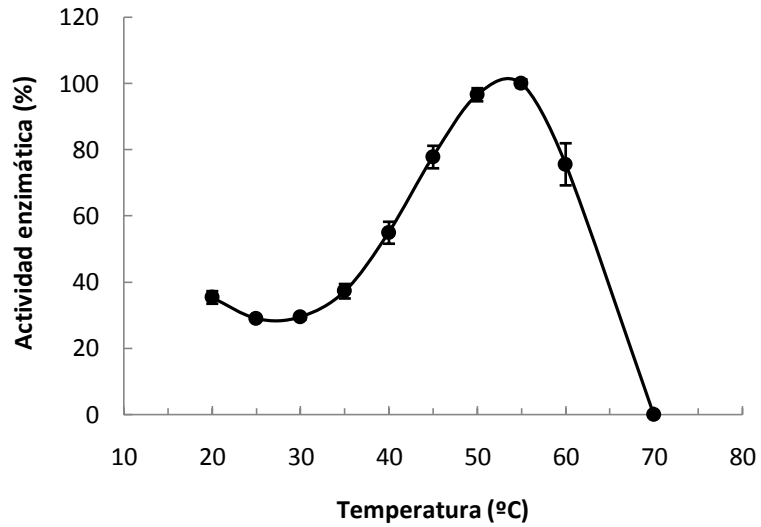


Figura 14: Perfil de actividades enzimáticas de *A. missouriensis* creciendo en un reactor de 1 l con hesperidina como fuente de carbono. Actividades (▲) β-D-glucosidasa, (●) α-L-ramnosidasa y (■) 6-O-α-L-ramnosil-β-D-glucosidasa.

La máxima actividad enzimática se encontró a 55°C, mostrando un valor óptimo aparente de pH cercano a la neutralidad (Figura 15). Conociendo que las diglicosidasas provenientes de microorganismos descriptas hasta el momento presentan actividad de hidrólisis y de transglicosilación, se evaluó la capacidad de transferir el residuo sacarídico rutinosa a otros aceptores diferentes del agua (etanol). No se pudo detectar mediante cromatografía de capa delgada los productos de transglicosilación.

Si bien el comportamiento de las diglicosidasas en el extracto crudo de *C. carnescens* y *A. missouriensis* creciendo en un medio de cultivo conteniendo hesperidina fue similar, se encontraron pequeñas diferencias en cuanto al rango de pH y temperatura en las cuales son activas, esta característica permitirá su aplicación para diferentes propósitos.

a)



b)

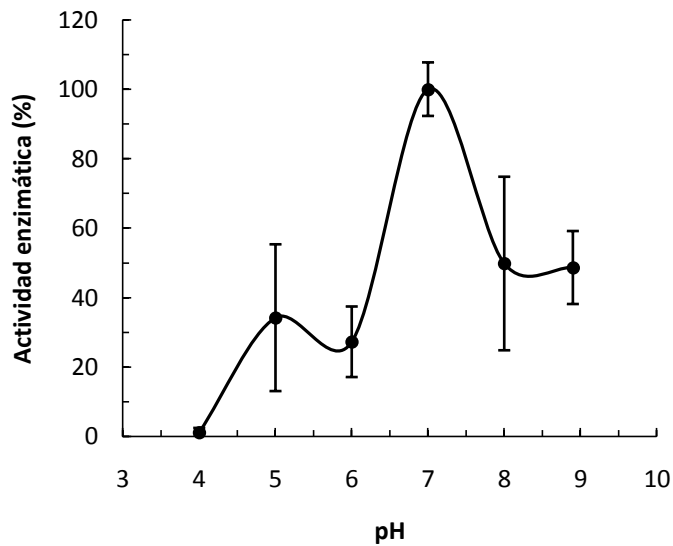


Figura 15: (a) Efecto de la temperatura y (b) el pH sobre la actividad diglicosidasa del extracto crudo de *A. missouriensis*. El 100 % de la actividad corresponde a 5.25 U/l en el perfil de pH y 3.85 U/l en el de temperatura.

Una vez conocidas las condiciones óptimas aparentes de la enzima diglicosidasa en el extracto extracelular se condujo a la purificación de la misma. El sobrenadante del cultivo de *A. missouriensis* en medio que contenía el flavonoide hesperidina se sometió a un paso cromatográfico de intercambio aniónico (DEAE-sephadex), una precipitación con sulfato de amonio y una cromatografía de exclusión

molecular (Biogel P-60). El conjunto de las fracciones activas presentaron un rendimiento del 10.8 % de la carga inicial y un factor de purificación de 70 veces con una actividad específica de 0.47 U/mg (Tabla 5). La diglicosidasa de *Arthrobacter* sp. tuvo un factor de purificación similar a 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de *A. missouriensis*, sin embargo el rendimiento fue menor (0.57 %) (Sang-Joon et al. 1990). Sang-Joon et al. (1990) lograron separar las monoglicosidasa (β -glucosidasa y α -ramnosidasa) de la rutinosidasa luego de siete pasos de purificación. En este trabajo se obtuvo una única banda homogénea en PAGE nativo en tres pasos de purificación y una la actividad específica fue baja en comparación con otras diglicosidasas (Sang-Joon et al. 1990, Mizutani et al. 2002, Mazzaferro et al. 2010).

Tabla 5. Purificación de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de *A. missouriensis*

Pasos de purificación	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Extracto crudo	860	0.030	0.007	100	1
DEAE-sephadex	920	0.013	0.004	44.48	0.64
Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄	1000	0.003	0.001	12.31	0.15
Biogel P-60	37	0.076	0.478	10.80	70.37

Ademas se detectó actividad sobre los sustratos MU-rutinósido y MU-glucósido, sin embargo la enzima tiene mayor afinidad hacia los sustratos diglicosilados ya que se identificó rutinosa como el producto de hidrólisis de hesperidina por Resonancia Magnética Nuclear (NMR). Los espectros de ¹H y ¹³C fueron similares a los reportados por Schubert et al. (2010) (Tabla 6 y Figura 16).

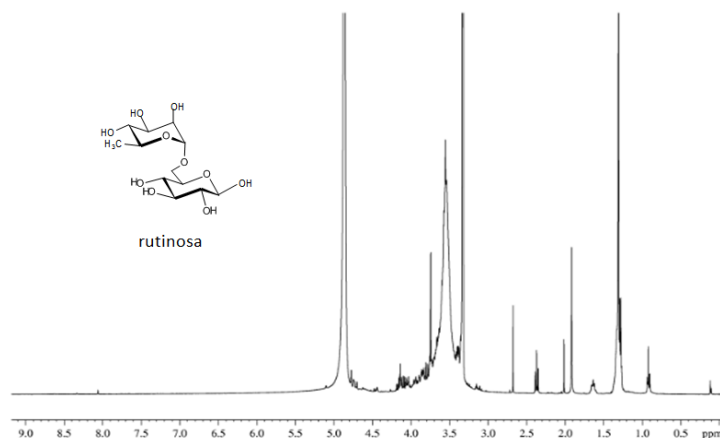
Tabla 6: Análisis estructural de rutinosa por NMR

¹ H-NMR	(CD ₃ OD, 500.13 MHz) δ_H 1.276 (3H, d, $J_{5',6'}$ 6.2 Hz, H-6'*), 1.270 (3H, d, $J_{5',6'}$ 6.2 Hz, H-6'*), 3.66 (1H, m, H-5'), 3.38 (1H, m, H-4'), 3.39 (1H, m, H-3'), 3.854 (1H, dd, $J_{2',3'}$ 3.3, $J_{1',2'}$ 1.8 Hz, $J_{2',3'}$ 3.4 Hz, H-2'*), 3.849 (1H, dd, $J_{2',3'}$ 3.3, $J_{1',2'}$ 1.8 Hz, $J_{2',3'}$ 3.4 Hz, H-2'*), 4.754 (1H, d, $J_{1',2'}$ 1.8 Hz, H-1'*), 4.74 (1H, d, $J_{1',2'}$ 1.8 Hz, H-1'*) 3.998 (1H, m/dd, $J_{6u,6d}$ 11.1 Hz, $J_{6u,5}$ 1.9 Hz, H-6 _d β), 3.939 (1H, m/dd, $J_{6d,6u}$ 11.1 Hz, $J_{6u,5}$ 1.9 Hz, H-6 _u α), 3.62 (1H, m/dd, $J_{6d,6u}$ 11.1 Hz, $J_{6d,5}$ 6.4 Hz, H-6 _d α), 3.588 (1H, m/dd, $J_{6d,6u}$ 11.1 Hz, $J_{6u,5}$ 6.4 Hz, H-6 _u α), 3.93 (1H, m/ddd, $J_{5,6d}$ 1.9 Hz, $J_{6u,5}$ 6.4 Hz, $J_{5\alpha,4}$ 9.7 H-5 α), 3.439 (1H, m/ddd, $J_{5,6d}$ 9.7 Hz, $J_{6u,5}$ 6.4 Hz, $J_{5\beta,4}$ 9.7 H-5 β),
--------------------	--

	3.299 (1H, dd, $J_{4,5}$ 9.7 Hz, $J_{4,3}$ 9.0 Hz H-4 α), 3.285 (1H, dd, $J_{4,5}$ 9.7 Hz, $J_{4,3}$ 9.0 Hz H-4 β), 3.68 (1H, m H-3 α), 3.36 (1H, m H-4 β), 3.37 (1H, m H-2 α), 3.149 (1H, dd, $J_{2,3}$ 9.2 Hz, $J_{2,1\beta}$ 7.8 Hz H-2 β), 5.109 (1H, d, $J_{1,2}$ 3.7 Hz H-1 α), 4.48 (1H, d, $J_{1,2}$ 7.8 Hz H-1 β)
¹³ C-NMR	(CD ₃ OD, 125.77 MHz) δ_c 18.28 (C-6'*), 18.30 (C-6'*), 69.94 (C-5'*), 70.0 (C-5'*), 74.34 (C-4'*), 74.38 (C-4'*), 72.63 (C3'*), 72.65 (C3'*), 72.42 (C2'*), 72.45 (C2'*), 102.46 (C1'*), 102.55 (C1'*), 68.55 (C6 α), 68.60 (C6 β), 72.33 (C5 α), 77.18 (C5 β), 72.27 (C4 α), 72.13 (C4 β), 75.12 (C3 α), 78.38 (C3 α), 74.1 (C2 α), 76.55 (C2 β), 94.22 (C1 α), 98.5 (C1 β).

* α/β intercambiable

a)



b)

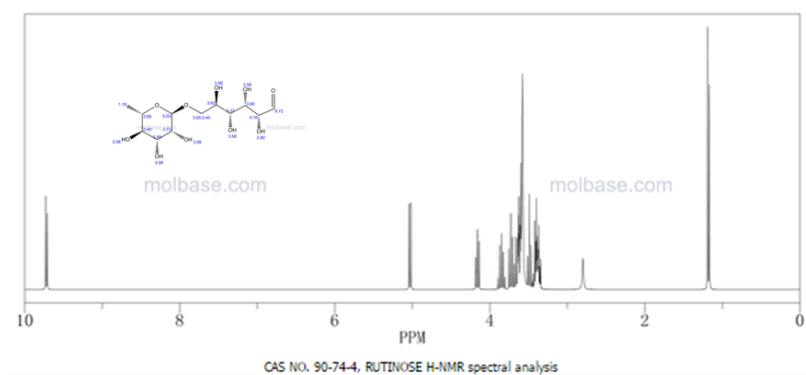


Figura 16: Espectro de ^1H NMR de rutinosa. (a) producto de hidrólisis de hesperidina por *A. missouriensis* (CD3OD, 20 °C) y (b) base de datos http://www.molbase.com/en/hnmr_90-74-4-moldata-186957

Análisis in silico de la secuencia de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de A. missouriensis

El clonado y sobreexpresión de genes que codifican para proteínas con fines en la industria alimenticia y farmacológica permite la producción de biocatalizadores en cantidades adecuadas (mg/l o g/l de proteína) para ensayos en mayor escala, simplifica el proceso de purificación, aumenta la actividad y estabilidad del biocatalizador (ingeniería de proteínas). Por tal motivo, la enzima pura de *A. missouriensis* en un gel de poliacrilamida se sometió a digestión con tripsina para ser analizada mediante espectrometría de masa. Los péptidos obtenidos SLDNLSINPIQRPGADAER, TNASGVNWATDSTAGTSSIPSR, NQVIWNGER, HLILTPGIYR, VILDDNWLWR, ISGTVNSGGDAGPGQAQYYVR, IGTGTANNIGDATNPPTLSDLFVR, NIVGTTGAAVDATQPNQVPGFTASAR junto a la información de la huella

peptídica (PMF *Peptide mass fingerprinting*) permitió la identificación de la secuencia como una proteína con función desconocida con el número de acceso de GenBank BAL86042.1. Dicha proteína pertenece a *A. missouriensis* 431^T, cuyo genoma ha sido secuenciado por Yamamura et al. (2012) (GenBank: AP012319.1). Se identificó un marco abierto de lectura que consta de 1902 pb, comenzando con el codón GTG. Se predijo que la proteína está compuesta por 633 aminoácidos, incluyendo un péptido señal en su extremo N-terminal de 34 residuos. También se predijo una masa molecular de 62 303 Da y un pI de 6.89 de la enzima secretada. El mayor porcentaje de similitud entre la proteína predicha y una glicosil-hidrolasa verificada experimentalmente fue determinado para una endo- β -1,3-glucanasa de *Arthrobacter* sp. NHB-10 (GenBank: BAF52916) con un 52 % de identidad de secuencias (Okazaki et al., 2007). La base de datos de enzimas carbohidrato activas, CAZy, clasificó a la secuencia BAL86042.1 de *A. missouriensis* como miembro de las glicosil-hidrolasas de la familia 55 (GH55) (Lombard et al. 2014). Se realizó un árbol filogenético para evaluar las relaciones entre las secuencias de diglicosidasas conocidas, la diglicosidasa de *A. missouriensis* 431^T, y secuencias estrechamente relacionadas dentro de las GH55 (Figura 17). En el árbol se puede observar que las secuencias se agruparon en tres clados bien diferenciados, que dependen de la clasificación en familias de las glicosil-hidrolasas.

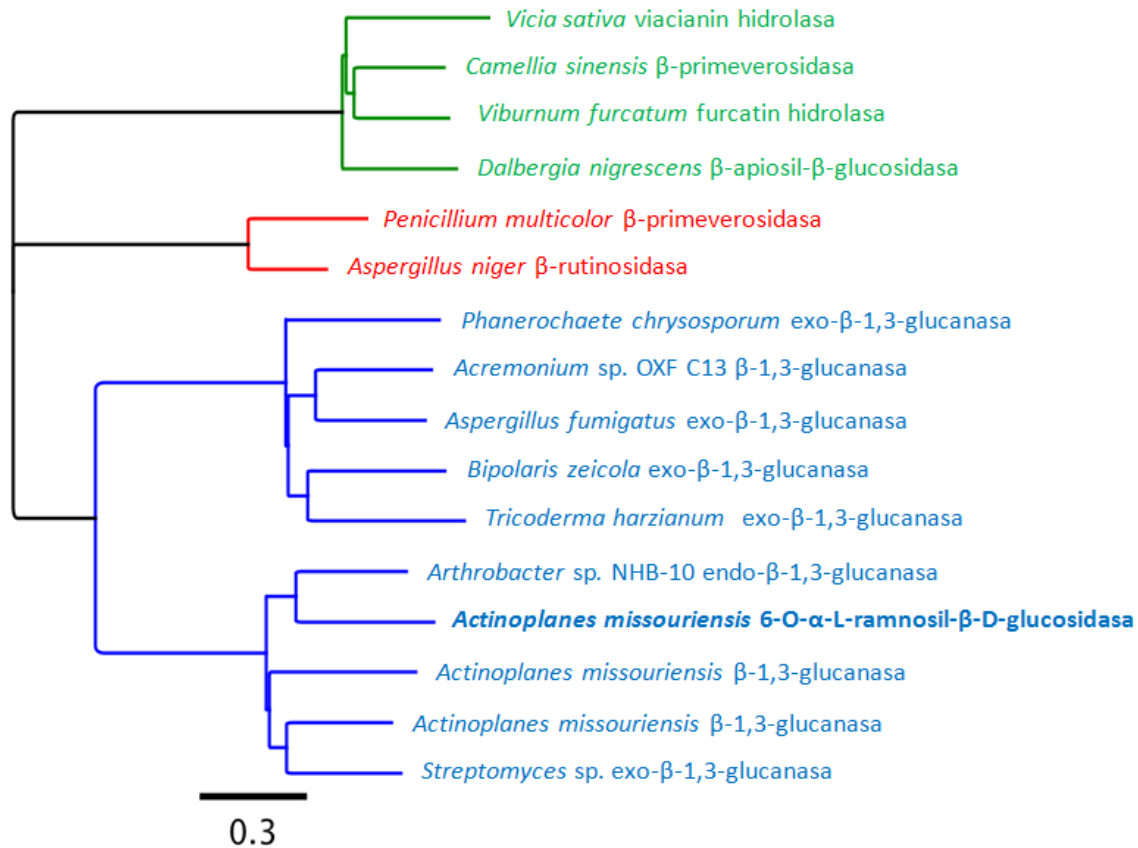


Figura 17: Árbol filogenético (cladograma) de secuencias de β -1,3-glucanasas y diglicosidasas conocidas. Se incluyen 16 secuencias de proteínas de origen vegetal, fúngico y bacteriano. Los clados son coloreados de acuerdo a la clasificación de las glicosil-hidrolasas según CAZy: GH1 (verde), GH5 (rojo) y GH55 (azul). Los números o nombres de acceso para cada secuencia de proteína son los siguientes: A2SY66.1, BAC78656.1, BAD14925.1, A3RF67.1, BAG70961.1, CAK39791.1, PclLam55A, AAW47927.1, CAF32160.1, P49426.1, AJ002397.1, BAF52916.1, BAL86042.1, BAL88862.1, BAL87999.1 y SacteLam55A (desde arriba hacia abajo). La barra representa 0.3 sustituciones de aminoácidos por sitio.

El genoma de *A. missouriensis* (cepa 431^T) consta de 8204 genes predichos, de los cuales 8125 codifican para proteínas y 79 para ARNs. Para estas proteínas predichas solo al 55.9 % se le asignaron una función putativa a cada una (Yamamura et al. 2012). En este trabajo, la proteína putativa BAL86042.1 fue experimentalmente relacionada con una función catalítica, específicamente con la actividad 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa. La enzima se encontró como un miembro de GH55. Esta familia está compuesta, hasta ahora, sólo con las actividades exo- β -1,3-glucanasas (EC 3.2.1.58) y endo- β -1,3-glucanasas (EC 3.2.1.39). El análisis filogenético con secuencias de diglicosidasas conocidas, exo- β -1,3-

localiza en la interfaz de ambos dominios. La asimetría causada por el truncamiento del dominio N-terminal en comparación con el dominio C-terminal y el ángulo de torsión entre los dos dominios hace que el sitio de unión del sustrato adopte una conformación curva que sigue los contornos exteriores del dominio N-terminal. Como se puede observar en la figura 19 la proteína predicha de *A. missouriensis* también presenta estos dos dominios y se puede estimar la ubicación del sitio de unión al sustrato.

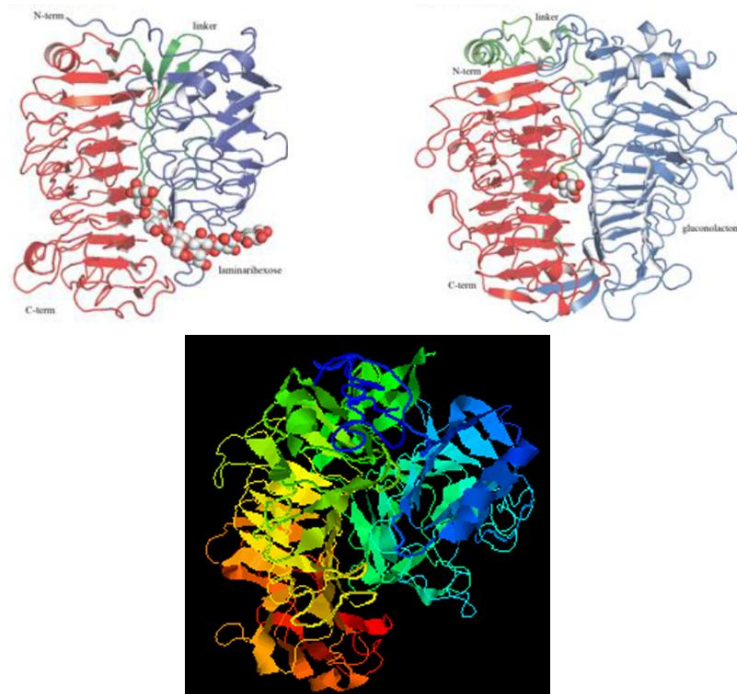


Figura 19: Estructura tridimensional de enzimas GH55: SactLam55A, PclLam55A y 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de *A. missouriensis* Representaciones en cinta de: SactLam55A (arriba derecha), PclLam55A (arriba izquierda) y 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de *A. missouriensis* predicha (abajo). Se muestra SactLam55A y PclLam55A formando un complejo con laminarihexosa y gluconolactona (análogo a glucosa), respectivamente (esferas grises y rojas); el dominio N, C y región de unión entre ellos están coloreados de azul, rojo y verde, respectivamente.

Análisis in silico de la secuencia de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa del hongo Acremonium sp. DSM24697

A partir de la secuenciación de genomas completos y mediante el desarrollo de la genómica comparativa, se observó que a más de la mitad de los marcos abiertos de lectura no se les ha podido asociar pertenencia a una familia de genes con función conocida, y que alrededor de la cuarta parte de

dichas regiones son únicas para esa especie (Fraser et al. 2000). La determinación de las secuencias genómicas es sólo el primer paso; a partir de allí, se ha comenzado a recorrer un camino complejo para llegar a conocer completamente la biología de los microorganismos, y aplicar ese conocimiento para resolver los diferentes desafíos que se plantean en el campo de la Microbiología. Para darle funcionalidad a esa información, y poder aplicarla de manera práctica ha sido necesario entrar en el terreno de la proteómica, es decir en el estudio del conjunto de proteínas que un organismo puede producir. El secuenciado del ADN genómico de *Acremonium* sp. DSM24697 resultó en 1030 *contigs* con un tamaño de secuencias promedio de 26 kbp. Estos *contigs* fueron reunidos en 355 *scaffolds*, que representan 26.9 Mbp de la secuencia del genoma. Para la búsqueda de transcritos se utilizó el servidor Augustus (Stanke y Morgenstern 2005) con la opción de búsqueda de genes en ambas cadenas. La web proporcionó parámetros de *Aspergillus oryzae* y *Chaetomium globosum*. La enzima 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa es codificada por un gen de 1167 pb y se encontró en el *scaffold* 1, el cual tiene una longitud de 1.49 Mbp. Se predijo que la proteína está compuesta por 389 aminoácidos, incluyendo un péptido señal en su extremo N-terminal de 19 residuos. Una comparación entre la secuencia transcripta del gen y la secuencia del *scaffold* 1 sugirió que no hay presencia de intrones. El análisis de la secuencia transcripta de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa mediante BlastP reveló la presencia de dos dominios MFS (major facilitator superfamily), los cuales se conservan en proteínas de membrana con función de transporte. La secuencia de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa del hongo *Acremonium* sp. DSM 24697 fue depositada en GenBank bajo el número de acceso KP972593. Se realizó un árbol filogenético con el objetivo de relacionar la diglicosidasa de *Acremonium* sp. DSM 24697 con otras siete diglicosidasas (confirmadas experimentalmente) provenientes de plantas y hongos, y otras ocho secuencias de glicosidasas fúngicas obtenidas por BlastP cuando se utilizó la secuencia de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa del hongo *Acremonium* sp. DSM 24697 como incógnita (Figura 20). La enzima (KP972593) es miembro de las glicosil-hidrolasas de la familia 5 (GH5) según la clasificación de CAZy. Como se puede observar en el árbol las secuencias se agruparon en dos grupos, un clado con secuencias de hongos, donde tres de estas secuencias codifican para diglicosidasas conocidas, una β -rutinosidasa de *Aspergillus niger* K2 (Šimčíková et al. 2015) y dos β -primeverosidasa de *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium multicolor* TS-5 (Yamamoto et al. 2006, Tsuruhami et al. 2011); y otro clado, con secuencias de diglicosidasas vegetales. El porcentaje de identidad de la secuencia de la 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa con las secuencias de las diglicosidasas provenientes de *Aspergillus niger* K2 y *Penicillium multicolor* TS-5 fue de 54 y 57 %, respectivamente. Estos resultados soportan la clasificación publicada previamente en Aspeborg et al. (2012) donde clasifica estas enzimas dentro de la familia GH5 sub-familia 23. Y refutan la

clasificación según Mazzaferro et al. (2010) donde la 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de *Acremonium* sp. DSM 24697 se interpretó como miembro de las glicosil-hidrolasas de la familia GH1.

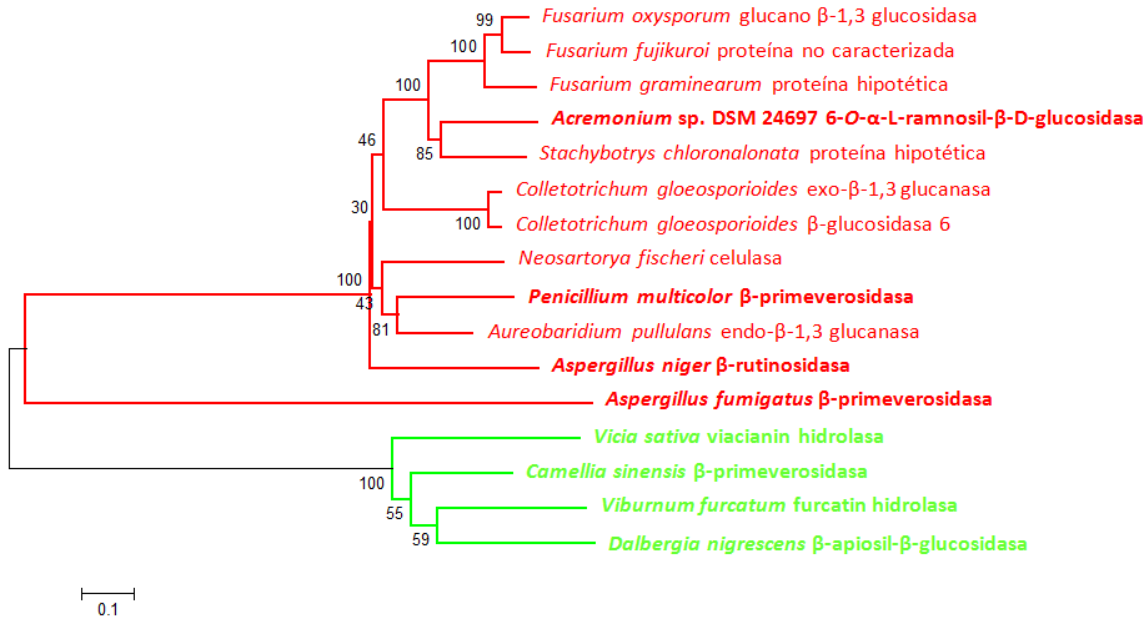


Figura 20: Árbol filogenético (cladograma) de secuencias de diglicosidasas, otras glicosil-hidrolasas y la de diglicosidasa de *Acremonium* sp. DSM24697. Se incluyen 7 secuencias de proteínas de diglicosidasas confirmadas experimentalmente (en negrita) y 8 secuencias con los mayores porcentajes de identidad (58 - 73% BLASTP) hacia la secuencia de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de *Acremonium* sp. DSM 24697(KP972593). Los clados son coloreados de acuerdo al origen: vegetal (verde) y fúngico (rojo). Los números de acceso para cada secuencia de proteína son los siguientes: ENH74352.1, CCT65263.1, EYB22096.1, KP972593, KFA68135.1, XP_007283044.1, EQB51121.1, XP_001262690, BAG70961.1, KEQ80465.1, CAK39791.1, XP_747510.1, A25Y66.1, BAC78656.1, BAD14925.1, A3RF67.1 (desde arriba hacia abajo). La barra representa 0.1 sustituciones de aminoácidos por sitio.

Si bien la secuencia peptídica presenta similitud con otras glicosil-hidrolasas, el análisis estructural mediante I-TASSER *server* revela una estructura tridimensional con un 89% de similitud con una reductasa citocromo P450 (Lamb et al. 2006). Probablemente, este alineamiento se deba a la presencia de los dos dominios MFS (*major facilitator superfamily*) que se conservan en proteínas de membrana con función de transporte. Si bien se desconoce si la enzima tiene este tipo de función si se conoce que presenta estructuras secundarias α -hélices, características de proteínas que se ubican en o sobre la pared celular.

Clonado y expresión heteróloga de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de A. missouriensis

La cantidad de actividad enzimática que se alcanza con cepas silvestres, en particular las diglicosidasas es baja en comparación de otras glicosil-hidrolasas (Mazzaferro et al. 2010, Zhou et al. 2012) por lo que se dificulta la obtención de cantidades significativas que permitan su aplicación industrial. Una alternativa para subsanar este déficit es clonar a la proteína de interés en un sistema de expresión heterólogo y sobre-expresarla. Una opción interesante en el caso de enzimas bacterianas es el uso de microorganismos fácilmente cultivables en medios semisintéticos, con rendimientos celulares elevados y producción de altas concentraciones de la proteína de interés. La amplificación del gen de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de *A. missouriensis* con y sin la secuencia del péptido señal se realizaron con las ADN polimerasas *Pfu Ultra II* y *Q5 Hot Start*. Conociendo el alto contenido de nucleótidos GC en las secuencias de los microorganismos del género *Actinoplanes* (Tamura y Hatano 2001), se observó que la estrategia de amplificación con *Q5 Hot Start* fue exitosa con respecto a *Pfu Ultra II* (Figura 21). La correcta ligación de estas secuencias al vector pGEM-T se testeó con la enzima de restricción EcoRI (Figura 22) además que se sometieron a secuenciación para determinar si presentaban el correcto marco abierto de lectura. El crecimiento de las células transformadas *E. coli* TOP10 permitió la multiplicación de este plásmido, el cual se utilizó como ADN molde en la amplificación de la secuencia del gen *rgh*. Una vez purificado el producto de PCR se ligó al vector de expresión pET101/D-TOPO.

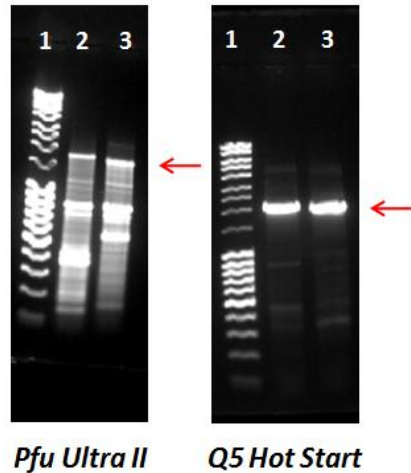


Figura 21: Gel de agarosa de los productos de PCR con *Pfu Ultra II* y *Q5 Hot Start*. Líneas 1 marcador de peso molecular, líneas 2 producto de PCR gen de interés con péptido señal (~1900 pb) y líneas 3 producto de PCR gen de interés sin péptido señal (~1800 pb).

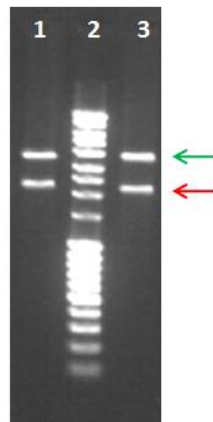


Figura 22: Gel de agarosa de los plásmidos digeridos con *EcoRI*. Línea 1 *pGEM-T::rgh* con péptido señal (~1900 pb), línea 2 marcador de peso molecular y línea 3 *pGEM-T::rgh* sin péptido señal (~1800 pb). (←) vector (~3000pb) (←) gen de interés (*rgh*)

Los constructos *pET101/D-TOPO::rgh* se introdujeron en células para la producción heteróloga de la 6-*O*- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de *A. missouriensis*. Se realizaron diferentes estrategias de expresión que aseguraran el correcto funcionamiento de la proteína recombinante. Se llevó a cabo la co-expresión con proteínas chaperonas para su correcto plegado y para evitar la formación de cuerpos de inclusión o la

degradación de la proteína por proteasas. También se utilizó la cepa BL21-CodonPlus para permitir altos niveles de expresión de ARNt raros para convencionales cepas BL21. En la tabla 7 se detallan las diferentes estrategias utilizadas. Se seleccionó la estrategia de expresión 2 ya que en zimogramas se observó una banda de actividad más intensa y definida con respecto a las proteínas recombinantes con las otras estrategias.

Tabla 7. Estrategias de expresión de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa

Estrategia	Cepa de E. coli	Expresión	Co-expresión
1	BL21 (DE3) star	6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa	-
2	BL21 (DE3) star	6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa	Chaperonas:groES-groEL (pGro7)
3	BL21 (DE3) star	6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa	Chaperonas: dnaK-dnaJ-grpE-groES-groEL (pG-KJE8)
4	BL21(DE3)CodonPlus-RIPL	6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa	ARNt: argU-ileY-proL-leuW

Las enzimas recombinantes (con y sin His-tag en el extremo C-terminal) se expresaron en forma soluble y activa en la fracción citosólica. La enzima marcada con residuos de histidinas se eluyó en un solo pico a los 24 min luego del comienzo del gradiente. El análisis del gel SDS-PAGE confirma la pureza de la proteína, la cual migró como un polipéptido de ~60 kDa (Figura 23, línea 3), similar a la masa molecular predicha de 62 kDa. La proteína mostró una actividad específica de 1.8 U/mg con hesperidina como sustrato. Este valor es cuatro veces mayor que la actividad específica para la proteína *wild type*. Como otra de las ventajas de la sobre-expresión de proteínas en estos sistemas, el tiempo de cultivo de *E. coli* se redujo a un día (*versus* cuatro días de crecimiento de la cepa *A. missouriensis* en el medio con el flavonoide hesperidina) y el tiempo de purificación a dos horas (la proteína *wild type* en tres días).

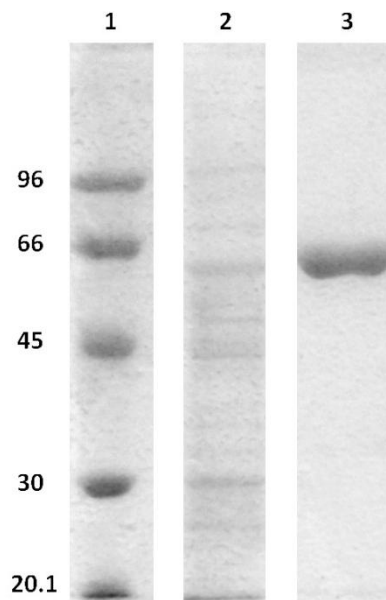
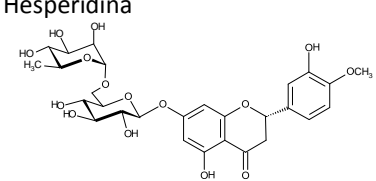
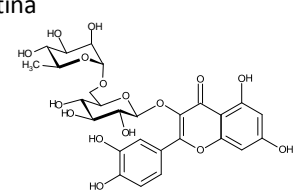
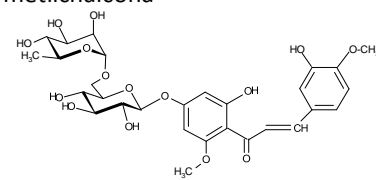
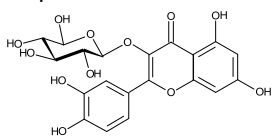
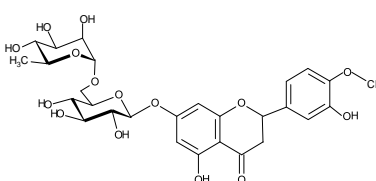
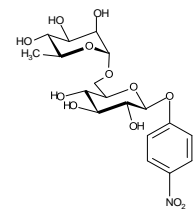
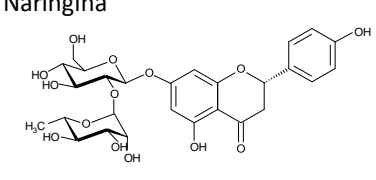
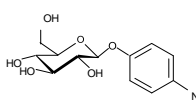
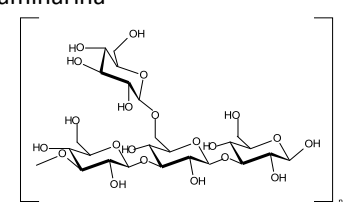
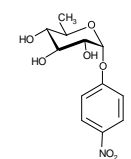


Figura 23: Análisis en SDS-PAGE de la 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa durante su purificación. Línea 1, marcador de masa molecular; línea 2, fracción del extracto crudo; línea 3, 6-O- α -L-ramnosil- β -glucosidasa pura.

La especificidad de sustrato se testeó con diferentes mono- y diglicósidos (Tabla 8). Dos flavonoides 7-O-rutinosilados, hesperidina y hesperidin metilchalcona, mostraron ser sustratos de la enzima. Por el contrario, no se detectó la hidrólisis de rutina (quercetina 3-O-rutinósido), diosmina (diosmetin 7-O-rutinósido) ni de narangina (naringenin-7-O-neohesperidósido). Ya que la secuencia de la enzima clonada exhibió un 53 % de identidad con una conocida endo-1,3- β -glucanasa de *Arthrobacter* sp., también se testeó la actividad contra laminarina, la cual es un polisacárido lineal de $\beta(1\rightarrow3)$ -glucanos y ramificaciones $\beta(1\rightarrow6)$. Sin embargo, no se detectaron azúcares reductores liberados desde laminarina. Con respecto a los sustratos artificiales *p*-nitrofenil-monoglicósidos, la enzima no fue capaz de hidrolizar *pNRp* y mostró solo trazas de actividad hacia *pNGp*. En contraste, se detectó actividad contra el sustrato diglicósido *pNRut*.

Tabla 8. Especificidad de sustrato de la recombinante 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de *A. missouriensis*

Sustrato	%	Sustrato	%
7-O-β-rutinósidos		3-O-β-rutinósido	
Hesperidina 	100	Rutina 	ND
Hesperidina metilchalcona 	91	3-O-β-glucósido Isoquercetina 	ND
Diosmina 	ND	p-Nitrofenil-glicósidos pNRut 	26
7-O-β-neohesperidósido Naringina 	ND	pNGp 	1
Otros sustratos Laminarina 	ND	pNRp 	ND

ND: Actividad No Detectada.

El 100% de la actividad corresponde a 0.2 U/ml.

La enzima recombinante siguió una cinética de Michaelis-Menten para los sustratos hesperidina y hesperidina metilchalcona (Figura 24). A pesar de la baja solubilidad en agua de hesperidina, la enzima mostró un valor de K_M menor ($K_M= 4.48$ mM) que con hesperidina metilchalcona. Si bien, este último es un derivado soluble de hesperidina la enzima mostró menor afinidad por el sustrato ($K_M= 6.28$ mM). La validación estadística se muestra en la Tabla 9.

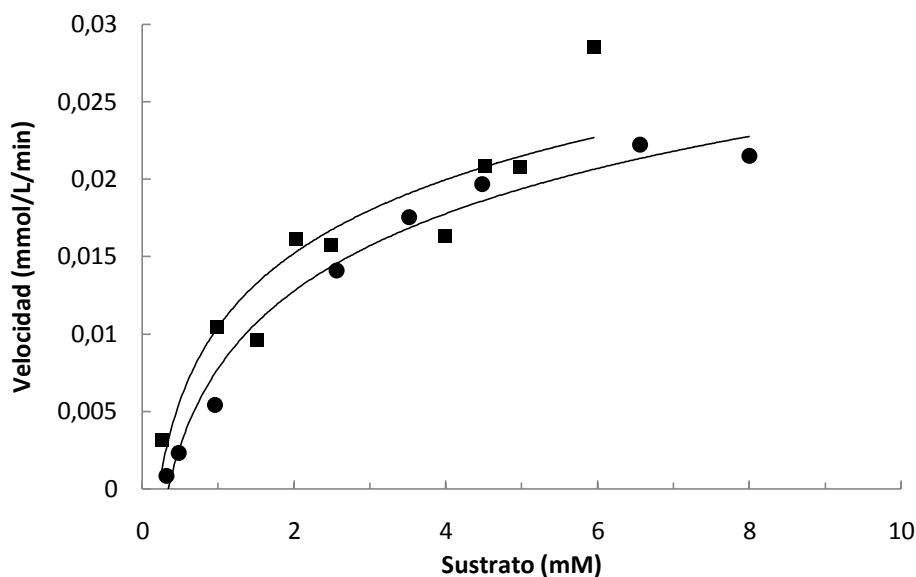


Figura 24: Cinética de saturación de α -ramnosil- β -glucosidasa de *A. missouriensis* usando el modelo de Michaelis-Menten con el sustrato hesperidina (■) y hesperidina metilchalcona (●).

Tabla 9: Parámetros cinéticos de α -ramnosil- β -glucosidasa de *A. missouriensis*

Sustrato	Parámetro	Valor	Error standar	IC 95%	p
Hesperidina	Vmax	4.210E-02	3.24E-03	3.56E-02 - 4.86E-02	0.000*
	Km	4.482E+00	5.75E-01	3.32E+00 - 5.64E+00	0.000*
Hesperidina metilchalcona	Vmax	4.274E-02	4.62E-03	3.34E-02 - 5.21E-02	0.000*
	Km	6.280E+00	1.13E+00	4.00E+00 - 8.56E+00	0.000*

*($p < 0.05$)

La diglicosidasa recombinante de *A. missouriensis* mostró una máxima actividad a 70°C, sin embargo cuando se ensayó la estabilidad del biocatalizador durante una hora, la actividad solo fue estable en un rango de temperatura de 25-50°C (Figura 25); además se determinó que la enzima almacenada a 8 °C por

más de 10 días sin ningún aditivo mantiene >90 % de la actividad inicial. La presencia de iones metales Mn^{2+} , Ca^{2+} y Na^+ (1 mM) no afectaron la actividad enzimática, mientras que los iones Zn^{2+} , Mg^{2+} , y el agente quelante EDTA redujeron la actividad entre un 20-50%. Solo el ion K^+ en concentraciones 10 mM incrementó la actividad a un 25%.

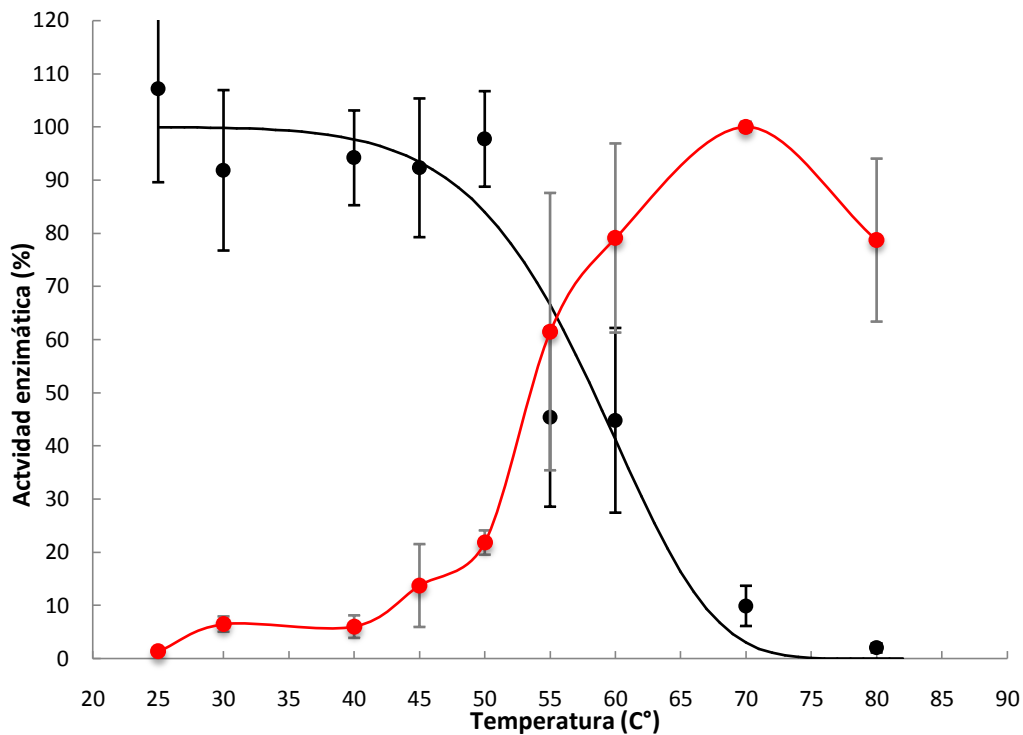


Figura 25: Efecto de la temperatura (●) y estabilidad (●) de la 6-O-α-L-ramnosil-β-D-glucosidasa recombinante sobre la hidrólisis de hesperidina. El 100% de la actividad corresponde a 0.24 U/ml (temperatura) y 0.48 U/ml (estabilidad). La estabilidad de la enzima fue ensayada por determinación de la actividad residual a 50°C luego de 60 min de incubación a diferentes temperaturas.

La 6-O-α-L-ramnosil-β-D-glucosidasa recombinante presentó un pH óptimo más alcalino que aquel con la enzima *wild type* en el extracto crudo (Figura 26 vs Figura 15b). Este comportamiento sugiere algún tipo de interacción con el entorno generado por otras proteínas y péptidos, que hace que la preparación no pura manifieste un pH óptimo desplazado hacia valores más ácidos. Hecho similar ocurrió con las enzimas endopeptidasas provenientes de *Araujia hortorum* (Obregón 2008).

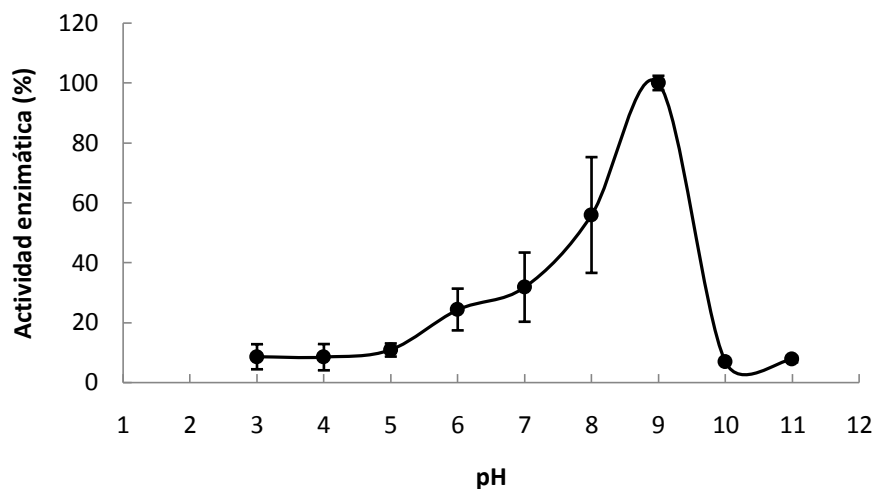


Figura 26. Efecto del pH sobre la actividad 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa recombinante. El 100 % de la actividad corresponde a 0.2 U/ml

Es interesante destacar que los flavonoides son poco solubles en medio ácido (pH 5,0-6,0), condición en la cual actúan la mayoría de las diglicosidasas reportadas (Guo et al. 1996, Schimikova et al 2015). La diglicosidasa de *Acremonium* sp. DSM24697 muestra un 30-40 % de la actividad máxima a pH 8.8 (Mazzaferro et al. 2010) y solo una de origen bacteriano, es estable a pH alcalino y posee un 50% de la actividad máxima a pH 8.0 (Sang Joon et al 1920). La diglicosidasa de *A. missouriensis* presenta un máximo de actividad a pH 8.8, lo que sugiere su potencial catalítico para hidrolizar flavonoides en condiciones alcalinas, siendo este el primer reporte de una diglicosidasa con esta propiedad.

Esta enzima presenta posibles aplicaciones tecnológicas en procesos relacionados con la producción de rutinosa y la hidrólisis de sustratos sintéticos y naturales (Shin et al. 2013).

Finalmente, se debe mencionar la necesidad de continuar los presentes estudios para evaluar la aplicación de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de *A. missouriensis* recombinante en diferentes procesos industriales a los efectos de optimizar las condiciones de empleo de la misma. En este sentido, la búsqueda de nuevas aplicaciones biotecnológicas para la enzima debe resaltarse en virtud de sus peculiares características aquí expuestas.

Clonado y expresión heteróloga de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de Acremonium sp. DSM 24697

Nuestro laboratorio (Biocatálisis-UNLPam) ha realizado varios intentos de clonar dicho catalizador desde librerías de RNA-cDNA de *Acremonium sp.* DSM24697 en diversos vectores sin éxito hasta el momento. Una vez secuenciado el genoma del hongo y encontrado la secuencia del gen que codifica para la enzima 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de *Acremonium sp.* DSM 24697, se procedió a la amplificación del gen por PCR usando el ADN genómico como molde y *primers* específicos (Figura 27). La correcta ligación de estas secuencias al vector pGEM-T se testeó con la enzima de restricción BstXI además que se sometieron a secuenciación para determinar si presentaban el correcto marco abierto de lectura. El crecimiento de las células transformadas *E. coli* TOP10 permitió la multiplicación de este plásmido, el cual se utilizó como ADN molde en la amplificación de la secuencia del gen *rgH*. Una vez purificado el producto de PCR se ligaron a los vectores de expresión correspondientes.

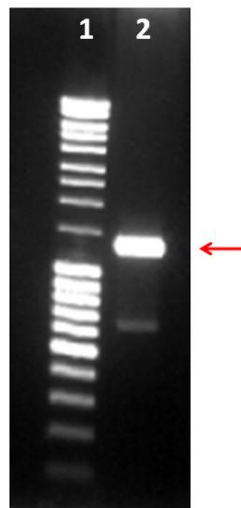


Figura 27: Producto de amplificación de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de *Acremonium sp.* DSM 24697 sintetizado por ADN polimerasa *Pfu Ultra II*. Líneas 1 marcador de peso molecular, líneas 2 producto de PCR gen de interés (1167 pb).

Conociendo que esta secuencia no posee intrones existen al menos dos hipótesis para trabajar con el gen de la diglicosidasa de *Acremonium sp.* DSM 24697, la más sencilla es la expresión de la proteína en un sistema procariota, para ello se utilizó la cepa BL21-CodonPlus para permitir altos niveles de expresión de ARNt raros. Cuando se avaluó mediante zimogramas la actividad de hidrólisis del sustrato fluorogénico MU- β -rutinósido se observó una banda de actividad intensa (Figura 28a). También se

detectó la hidrólisis del sustrato pNRut y el flavonoide hesperidina, sin embargo cuando se evaluó la actividad de transglicosilación los productos de la reacción no se detectaron mediante cromatografía de capa delgada. El péptido señal podría interferir en la expresión de la proteína en *E. coli* ya que esta cepa no tiene las enzimas capaces de clivarlo. Sin embargo, no se detectó actividad de transglicosilación cuando este no estaba presente (Figura 28a). Si bien la adición de residuos histidina en alguno de los extremos de la secuencia de la proteína permite una purificación rápida y sencilla, puede interferir sobre la actividad de las mismas (Kotik 2014 comunicación personal). Por esta razón primero se evaluó la actividad de hidrólisis de la enzima sin la adición de histidinas, donde se detectó actividad frente al MU- β -rutinósido. Al adicionar histidinas en el extremo N-terminal la proteína recombinante fue funcional con respecto a la actividad de hidrólisis pero no a la actividad de transglicosilación (Figura 28b).

La segunda hipótesis para trabajar con el gen de la 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa del hongo *Acremonium* sp. DSM 24697 es la expresión en *P. pastoris*; que como eucariota, tiene muchas de las ventajas de expresión de estos sistemas, como son el procesamiento, el plegado y las modificaciones post-traduccionales. La enzima 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de *Acremonium* sp. DSM 24697 es una proteína glicosilada (Mazzaferro et al. 2010) y esta modificación post-traduccional podría ser esencial para la actividad de transglicosilación. Para la expresión se clonó previamente la 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa sin el péptido señal. La expresión en *P. pastoris* fue exitosa ya que no solo se detectó la actividad de hidrólisis hacia los sustratos MU- β -rutinósido (Figura 28c), pNRut y hesperidina. Sino que también se observaron los productos rutinósidos de las reacciones de transglicosilación (Figura 29b). Resultados similares fueron descritos por Ahn et al. (2007) donde la expresión en *E. coli* de la enzima vicianin hidrolasa de *Vicia angustifolia* no fue exitosa pero si cuando se utilizó un sistema de expresión eucariota, en este caso células de insecto mediante baculovirus.

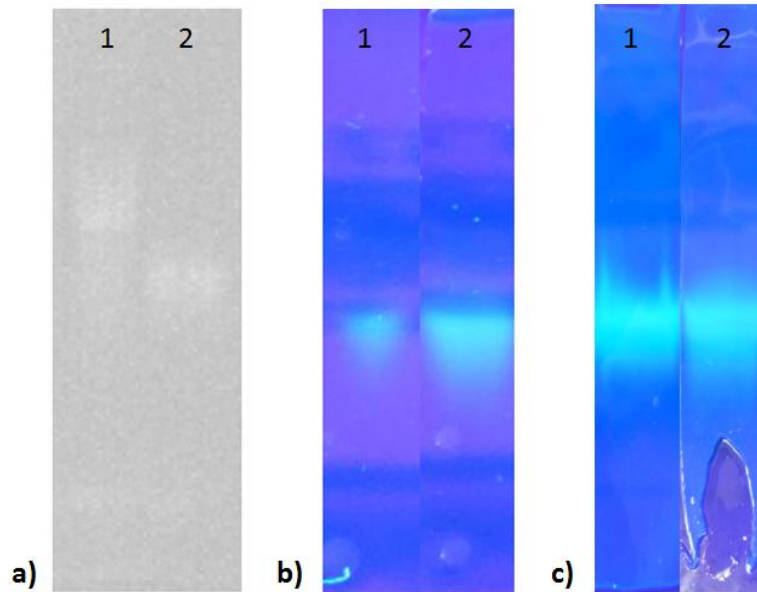


Figura 28: Zimogramas con las diferentes estrategias de expresión de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de *Acremonium* sp. DSM 24697. Control positivo (línea 1):6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa *wild type* (EC 3.2.1.168) de *Acremonium* sp. DSM24697; línea 2a) proteína recombinante en *E. coli* sin adición de histidinas; b) proteína recombinante en *E. coli* con adición de histidinas y c) proteína recombinante en *P. pastoris*.

Como se puede observar en el zimograma de la figura 28, la proteína recombinante con 6 residuos de histidina expresada en *E. coli* presenta el mismo R_f que la proteína *wild type*. Esto podría deberse que el peso de los residuos de histidina equivalen aproximadamente al del glicósido presente en la glicoproteína original. Por otro lado, *P. pastoris* que produce la enzima recombinante sin los residuos de histidina, sin embargo como huésped eucariota es capaz de glicosilar el péptido y presentó también el mismo R_f que la proteína original (Figura 28) (Solá y Griebenow 2008).

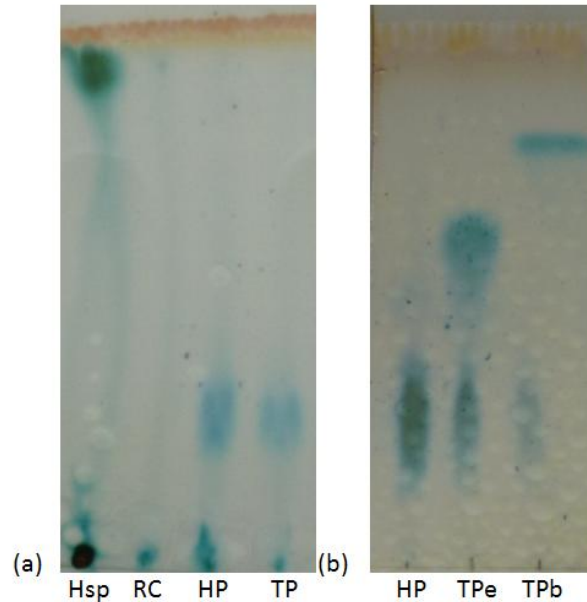


Figura 29: Productos de las reacciones de hidrólisis y transglucosilación con las proteínas recombinantes de *E. coli* (a) y *P. pastoris* (b). *Hsp* hesperidina, *RC* control de la reacción, *HP* productos de hidrólisis, *TP* productos de transglucosilación (*TPe* etanol- *TPb* butanol).

La alteración de las proteínas por las modificaciones post-traduccionales da lugar a una amplia variedad de moléculas teniendo estas el mismo *core* proteico. La glicosilación de las moléculas nos permite comprender las numerosas variantes observadas en la naturaleza y determinar la importancia de los azúcares para las funciones biológicas de enzimas, hormonas, mucinas, etc. (Weintraub et al. 1983, Kalisz et al. 1997, Duarte-Vázquez et al. 2003). Para elucidar la importancia del glicósido sobre la funcionalidad de la 6-*O*- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa se llevó a cabo procedimientos químicos y enzimáticos de desglicosilación de las proteínas *wild type* y recombinante en *P. pastoris*. Se utilizaron N-glicosidasas (Endo H y PNGasa F) y el ácido TFMS para detectar si la desglicosilación de la proteína (ya sea *wild type* o recombinante) interfiere o no en la actividad de transglucosilación.

Las proteínas tratadas con Endo H, si bien fueron desglicosiladas ya que se observó un cambio en el R_f de las bandas en SDS-PAGE comparado con las enzimas nativas, este hecho no afectó la actividad de transglucosilación (Figura 30). Las bandas múltiples en la línea 5 del SDS-PAGE sugieren distintos niveles de desglicosilación de la proteína recombinante, ya que probablemente sean distintos glicósidos comparados con los de la proteína *wild type* (Ishida et al. 2009). No se pudo detectar la desglicosilación

con el tratamiento de PNGasa F. Probablemente esta enzima no fue capaz de desglicosilar la 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa.

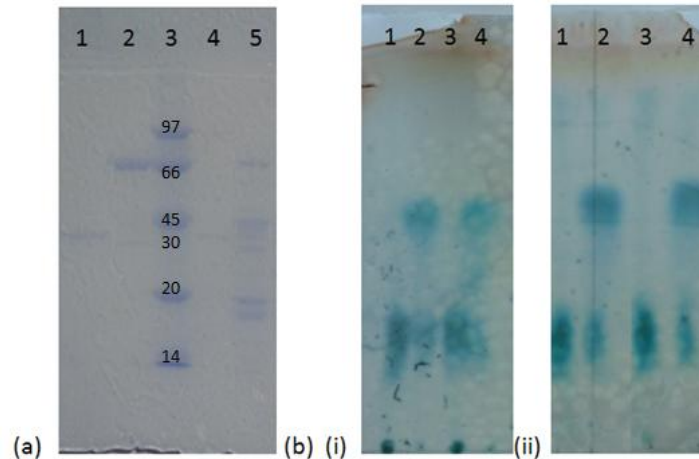


Figura 30: (a) SDS-Page y productos de las reacciones de hidrólisis y transglicosilación de las enzimas *wild type* y recombinante tratadas con EndoH. (a) SDS-Page de las enzimas *wild type* (Líneas 1 y 2) y recombinante (Líneas 4 y 5) tratadas con EndoH, Línea 3 marcador de masa molecular. (b) Productos de las reacciones de hidrólisis y transglicosilación por (i) proteína *wild type* y (ii) proteína recombinante. Líneas 1 y 3 productos de hidrólisis, Líneas 2 y 4 productos de transglicosilación.

La desglicosilación con TFMS se ha utilizado ampliamente para eliminar carbohidratos de glicoproteínas, dejando el esqueleto de la proteína intacto (Sojar y Bahl 1987, Fryksdale et al. 2002). Sin embargo, la desglicosilación de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa mediante esta técnica no tuvo éxito ya que las proteínas *wild type* y recombinante perdieron su actividad tanto de hidrólisis como la de transglicosilación. Probablemente las enzimas de interés fueron hidrolizadas ya que en los geles SDS-PAGE no pudieron ser detectadas.

La glicosilación juega un papel importante en la asistencia del plegamiento de proteínas (Baudys et al. 1995), los resultados alcanzados con los tratamientos que se han aplicado sobre la proteína de interés, sugieren que una vez que la proteína ya está correctamente plegada probablemente la eliminación del azúcar no interfiere en la actividad de transglicosilación. Si bien no se pudo demostrar si el péptido no glicosilado producido por *E. coli* es la causa de esta diferencia. El plegamiento de la proteína

recombinante producida por *E. coli* probablemente es diferente al plegamiento de la proteína original o la recombinante en *P. pastoris*, por lo que se pierde la actividad de transglucosilación.

Producción y purificación de 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa recombinante en P. pastoris

El gen que codifica para la enzima 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa en *P. pastoris* se diseñó sin el péptido señal nativo y se agregó el factor α del vector pPICZ α A que permite la producción y secreción de la enzima al medio extracelular. Como se observa en la figura 31, la mayor fracción del total del medio extracelular (BMMY) contiene la proteína heteróloga. Sin embargo, la solución enzimática que se obtuvo resultó ser intensamente coloreada debido a la presencia de pigmentos propios del medio de cultivo. Por tal razón, el sobrenadante del cultivo se concentró inicialmente por liofilización seguida de una cromatografía de exclusión molecular (Bio-Gel P-60). Se detectó una actividad específica de 3.6 U/mg cuando se realizó la hidrólisis del sustrato hesperidina.

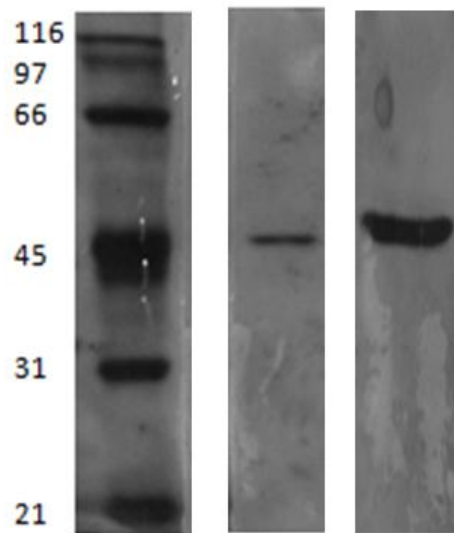


Figura 31: SDS-PAGE Purificación de la recombinante 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa. Gel al 10%. Línea1 Marcador de masa molecular Línea 2 Extracto crudo, Línea 3 proteína recombinante pura.

Como se ha demostrado, fue posible producir la diglicosidasa de *Acremonium* sp. DSM24697 recombinante. Sin embargo, el uso de YNB implica un incremento substancial en el costo del medio de cultivo para el proceso (521.76 dolares por 250 g) condicionando la idea de realizar un cambio de escala. Es por esto que se decidió expresar la proteína en medios más económicos. Resulta interesante que la

producción de la enzima en medio YPD (o BMMY sin YNB) presentó una actividad específica de 9.2 U/mg. Estas actividades son 3 y 7 veces más altas que la actividad de la proteína *wild type* pura (1.25 U/mg). Además se evaluó la actividad del sustrato laminarina, ya que la secuencia de la proteína presentó un 70 % de identidad con una glucano 1,3- β -glucosidasa putativa de *Fusarium oxysporum*. Dicha actividad no se detectó en condiciones óptimas para la enzima ni en reacciones de 24 horas a 30°C y 40°C.

Reconocimiento del sitio activo y mecanismo de hidrólisis: bases moleculares

La conservación de los residuos catalíticos en una familia es estricto: una vez identificado la posición y función para uno de los miembros de la familia, puede ser fácilmente inferido para el resto (Henrissat et al. 2001). Los estudios moleculares y computacionales con la furcatin hidrolasa de *V. furcatum* (Daiyasu et al. 2008) así como el análisis estructural por cristalografía de rayos X de β -primeverosidasa de *C. sinensis* (Saino et al. 2014) permiten el conocimiento en detalle del funcionamiento de las diglicosidasas en plantas (GH1). Saino et al. 2014, identificaron tres subsitios en el sitio activo, el subsitio -2 específico para monoglicósidos, subsitio -1 de unión de la glucosa, el cual es bien conservado en todas las β -glucosidasas y el subsitio +1 específico para la aglicona (Figura 32).

El análisis estructural de proteínas pertenecientes a GH55 revela una hendidura alargada de unión al sustrato con 6 subsitios de unión a azúcares formada en la interface de los dominios β -hélice (Ishida et al. 2009, Bianchetti et al. 2015). Bianchetti et al. 2015 han marcado estos subsitios desde el extremo no reductor al extremo reductor como -1, +1, +2, +3, +4 y +5, donde el clivaje de β -1,3 glicósido ocurre entre los subsitios -1 y +1. Mientras los subsitios +3, +4, +5 están expuestos al disolvente (Figura 33).

El estudio de la estructura tridimensional de otras diglicosidasas traerá nuevas pistas para entender el reconocimiento de sustrato ya sea de las diglicosidasas fúngicas, las cuales pertenecen a las GH5 (Aspeborg et al. 2012); y las diglicosidasas bacterianas. Sin bien se puede estimar las características estructurales de la diglicosidasa de *A. missouriensis* ya que pertenece a GH55, sigue siendo necesario su estudio mediante cristalización de rayos X para detalles finos de la relación función-estructura.

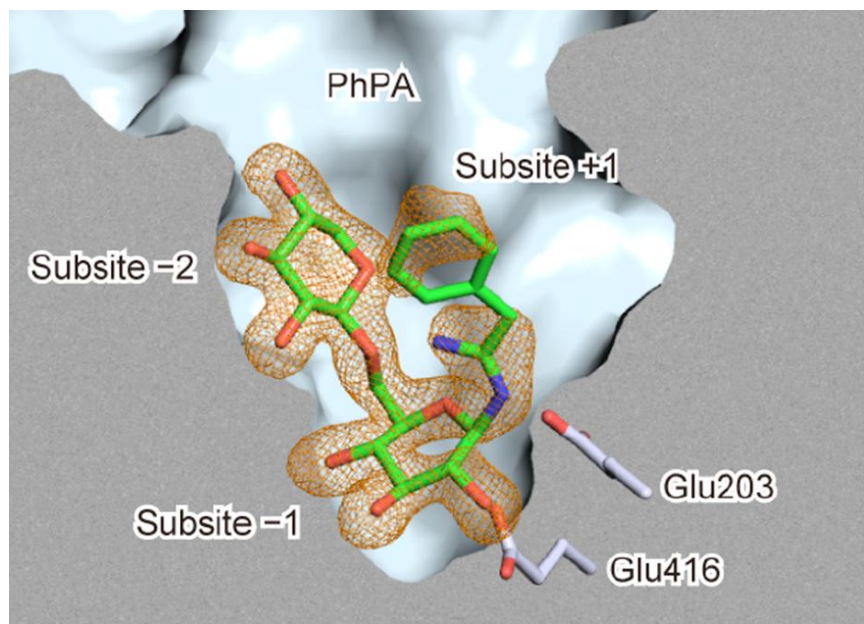


Figura 32: Sitio de unión al sustrato en diglicosidasas GH1. Se muestra β -primeverosidasa de *C. sinensis* formando un complejo con 2-fenil-*N*-(6-*O*- β -D-xilopiranosil- β -D-glucopiranosil) etilamidina (PhPA). Los anillos verdes indican PhPA, los residuos que actúan como ácido/base (Glu203) y nucleófilo (Glu416) en gris. El sitio está formado por tres subsitios (-2, -1 y +1). Los subsitios -2 y -1 de reconocimiento del disacárido.

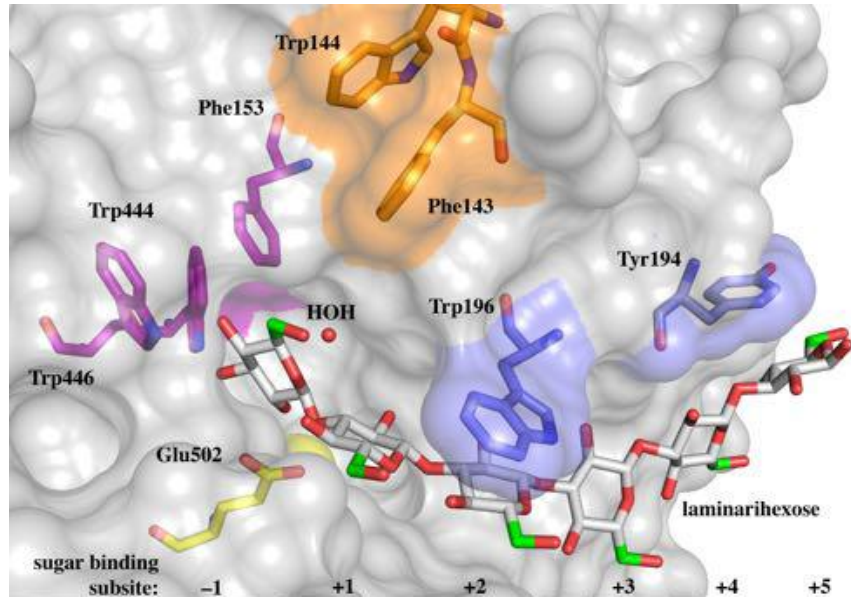


Figura 33: Estructura de unión al sustrato de SactLam55A E502A (GH55). La hendidura está ubicada en la interface entre los dominios N-terminal y C-terminal conteniendo al menos 6 subsitios de unión a azúcares (-1, +1, +2, +3, +4 y +5). Residuos del dominio C-terminal forman interacción con grupos glucosilados en los subsitios -1 y +1. Posición del ácido catalítico (Glu502, amarillo), los anillos grises representan el sustrato laminarihexosa.

Se evaluó la relación entre las secuencias de diglicosidasas conocidas mediante un árbol filogenético y se pudo observar que estas secuencias se agruparon por origen de cada organismo (Figura 34).

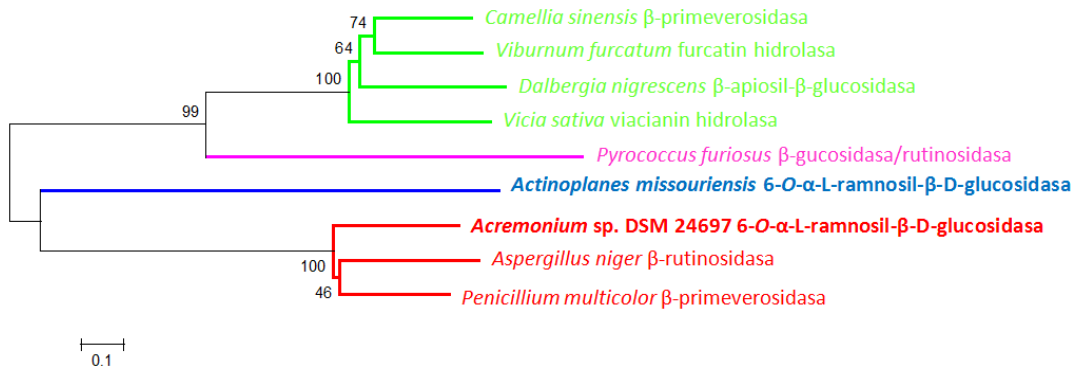


Figura 34: Árbol filogenético (cladograma) de secuencias de diglicosidasas provenientes de bacterias, hongos y plantas.

Breve resumen de los trabajos realizados con diglicosidasas en plantas y microorganismos

Enzima	Organismo	Referencias sobre	
		Purificación y Caracterización	Clonado y Expresión
Plantas			
β -primeverosidasa	<i>Camellia sinensis</i>	Guo et al. 1996	Mizutani et al. 2002
β -primeverosidasa	<i>Camellia sinensis</i>	Ijima et al. 1998	
α -apiosil- β -glucosidasa	<i>Dalbergia nigrescens</i>	Chuankhayan et al. 2005	Chuankhayan et al. 2007
Furcatin hidrolasa	<i>Virburum furcatum</i>	Ahn et al. 2004	Ahn et al. 2004
Viacinin hidrolasa	<i>Vicia angustifolia</i>	Ahn et al. 2007	Ahn et al. 2007
Hongos			
β -primeverosidasa	<i>Penicillium multicolor</i>	Tsuruahmi et al. 2006	Tsuruahmi et al. 2011
β -primeverosidasa	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Yamamoto et al. 2002	Yamamoto et al. 2006
α -ramnosil- β -glucosidasa	<i>Acremonium</i> sp.DSM24697	Mazzaferro et al. 2010	<i>En esta tesis</i>
β -rutinosidasa	<i>Aspergillus niger</i>	Šimčíková et al. 2014	Šimčíková et al. 2014
Bacterias			
β -rutinosidasa	<i>Arthrobacter</i> sp.	Sang Joon et al. 1990	
α -ramnosil- β -glucosidasa	<i>Actinoplanes missouriensis</i>	<i>En esta tesis</i>	<i>En esta tesis</i>
Archeobacterias			
β -rutinosidasa	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Nam et al. 2012	Shin et al. 2013
Levaduras			
diglicosidasa	<i>Cryptococcus carnescens</i>	<i>En esta tesis*</i>	

*solo caracterización del extracto crudo

CONCLUSIONES

Se extendió el conocimiento de otros organismos productores de diglicosidasas, además de hongos y plantas. En este trabajo se encontraron tres microorganismos productores de diglicosidasas, dos de origen bacteriano (*A. missouriensis* y *A. ligurica*) y una de levadura (*C. carnescens*).

Los microorganismos muestran diferente comportamiento en cuanto al crecimiento y la clarificación de los flavonoides rutina y hesperidina. Las enzimas en los extractos crudos de los microorganismos *A. missouriensis* y *C. carnescens* muestran temperaturas óptimas aparentes similares (55°C) de reacción, sin embargo se observó que las enzimas trabajan de manera óptima en distintos rangos de pH (*A. missouriensis* 7-9 y *C. carnescens* 4-6). Estas características permitirán su aplicación a diferentes propósitos.

La enzima 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasade *A. missouriensis* fue expresada funcionalmente en *E. coli*. Es altamente específica para sustratos 7-O-rutinosilados. Presenta amplia estabilidad térmica, y es la primer diglicosidasa con un máximo de actividad a pH 8.8.

La secuencia de esta enzima fue predicha como una glicosil-hidrolasa de la familia 55 (GH55). Donde hasta ahora, las únicas actividades descritas para esta familia fueron exo y endo- β -1,3-glucanasas. La diglicosidasa de *A. missouriensis* es la primer proteína la familia GH55 con una actividad diferente, por lo tanto estimamos que este trabajo facilitará la identificación de los miembros putativos de la GH55.

En contraste con las diglicosidasas de plantas y hongos pertenecientes a las familias GH1 y GH5. Esta enzima perteneciente a las GH55 presenta un mecanismo catalítico *inverting*. Esto hace a la enzima un biocatalizador atractivo para aquellas biotransformaciones donde la transglicosilación no es deseada.

Además, la enzima 6-O- α -L-ramnosil- β -D-glucosidasa de *Acremonium* sp. DSM24697 fue expresada funcionalmente los dos hospedadores seleccionados: *E. coli* y *P. pastoris*. Si bien la actividad de hidrólisis de las proteínas recombinantes se mantuvieron como en la proteína *wild type*, en el sistema procarionta no se pudo detectar la actividad de transglicosilación.

La glicosilación juega un papel importante en la asistencia del plegamiento de proteínas. Esto sugiere que el plegamiento de la proteína recombinante producida por *E. coli* probablemente es diferente al

plegamiento de la proteína original o la recombinante en *P. pastoris*, por lo que se pierde la actividad de transglicosilación.

BIBLIOGRAFÍA

Ahn YO, Mizutani M, Saino H, Sakata K. 2004. Furcatin hydrolase from *Viburnum furcatum* Blume is a novel disaccharide-specific acuminosidase in glycosyl hydrolase family 1. *J Biol Chem* 279:23405-23414

Ahn YO, Saino H, Mizutani M, Shimizu B, Sakata K. 2007. Vicianin Hydrolase is a Novel Cyanogenic β -Glycosidase Specific to β -Vicianoside (6-O- α -L-arabinopyranosyl- β -D-glucopyranoside) in Seeds of *Vicia angustifolia*. *Plant Cell Physiol.* 48(7):938-947

Alkorta I, Garbisu C, Llama MJ, Serra JL. 1998. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochem* 33: 21-28

Aspeborg H, Coutinho PM, Wang Y, Brumer H, Henrissat B. 2012. Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glycoside hydrolase family 5 (GH5). *BMC Evol Biol.* 12:186

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. *Enz Microb Technol* 35:58-66

Baudys M, Uchio T, Mix D, Wilson D, Kim SW. 1995. Physical stabilization of insulin by glycosylation. *J Pharm Sci* 84:28-33

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. *Phytochem* 64:411-418

Bianchetti CM, Takasuka TE, Deutsch S, Udell HS, Yik EJ, Bergeman LF, Fox BG. 2015. Active site and laminarin binding in glycoside hydrolase family 55. *J Biol Chem* doi:10.1074/jbc.M114.623579

Botha A. 2011. The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biol Biochem* 43(1):1-8

Bridel M. 1925. Primeverose, primeverosides and primeverosidase. *C R Acad Sci Paris* 180:1421-1425

Buzzini P, Menichetti S, Pagliuca C, Viglianisi C, Branda E, Turchetti B. 2008. Antimycotic activity of 4-thioisosteres of flavonoids towards yeast and yeast-like microorganisms. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18:3731-3733

Choct M. 2006. Enzymes for the feed industry: past, present and future. *World Poultry Sci J.* 62(1):5-16

Chuankhayan P, Hua Y, Svasti J, Sakdarat S, Sullivan PA, Ketudat Cairns JR. 2005. Purification of an isoflavonoid 7-O- β -apiosyl-glucoside β -glycosidase and its substrates from *Dalbergia nigrescens* Kurz. *Phytochem* 66:1880-1889

Dalbøge H. 1997. Expression cloning of fungal enzyme genes: a novel approach for efficient isolation of enzyme genes of industrial relevance. *FEMS Microbiol Rev* 21:29-42

Edge ASB. 2003. Deglycosylation of glycoproteins with trifluoromethanesulphonic acid: elucidation of molecular structure and function. *Biochem. J.* 376:339-350

- Fraser CM, Eisen J, Fleischmann RD, Ketchum KA, Peterson S. 2000. Comparative genomics and understanding of microbial biology. *Emerg Infect Dis.* 5: 505-12
- Fryksdale BG, Jedrzejewski PT, Wong DL, Gaertner AL, Miller BS. 2002. Impact of deglycosylation methods on two-dimensional gel electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization- time of-flight -mass spectrometry for proteomic analysis. *Electrophoresis* 23:2184-2193
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A . 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server;(In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, pp571-607
- Gómez Y, Axayacatl MR, Abarca SS. 2009. Aplicación de la electroforesis capilar durante el monitoreo de producción de cianocobalamina (vitamina B12). *Rev. cubana de química.* Vol. XXI, Nº 3
- González C, Martínez A, Vázquez F, Baigori M, Figueroa LIC .1996. New method of screening and differentiation of exoenzymes from industrial strains. *Biotechnol Tech* 10:519-522
- Ishida T, Fushinobu S, Kawai R, Kitaoka M, Igarashi K, Samejima M .2009. Crystal structure of glycoside hydrolase family 55 β -1,3-glucanase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biol Chem* 284:10100-10109
- Jung HM, Kim SY, Prabhu P, Moon HJ, Kim IW, Lee JK. 2008. Optimization of culture conditions and scale-up to plant scales for teicoplanin production by *Actinoplanes teichomyceticus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:21-27
- Kallio P, Pasztor A, Thiel K , Akhtar MK, Jones PR. 2014. An engineered pathway for the biosynthesis of renewable propane *Nature Communications*. doi: 10.1038/ncomms5731
- Kitson TM, Freeman GH. 2000. 3,4-Dihydro-3,4,6-trimethyl-2H,8H-pyrano-[3,2g]-1,3-benzoxazin-2,8-dione, a potential fluorogenic reporter group reagent for esterases - Synthesis and interaction with chymotrypsin. *Bioorganic Chemistry* 28:273-282
- Klose S, Tabatabai MA. 2002. Response of glycosidases in soils to chloroform fumigation. *Biol Fertil Soils* 35:262-269
- Kren V. 2001. *Chemical Biology and Biomedicine of Glycosylated Natural Compounds*. *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology I-III*. pp 2471-2529
- Kuddus SM, Ahmad RIZ. 2013. Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology JGEB.* 11:39-46
- Lamb DC, Kim Y, Yermalitskaya LV, Yermalitsky VN, Lepesheva GI, Kelly SL, Waterman MR, Podust LM. 2006. A Second FMN Binding Site in Yeast NADPHCytochromeP450 Reductase Suggests a Mechanism of Electron Transfer by Diflavin Reductases. *Structure* 14:51-61

- Liese A, Seelbach K, Wandrey C. 2006. History of Industrial Biotransformations. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Alemania.
- Limtong S, Koowadjanakul N. 2012. Yeasts from phylloplane and their capability to produce indole-3-acetic acid. *World J Microb Biot.* 28(12):3323-3335
- Lombard V, Golaconda RH, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* 42:D490-D495
- Madigan MT, Clark DP, Stahl D, Martinko JM. 2010. Brock Biology of Microorganisms 13th Edition 1040 pp
- Manthey JA, Grohmann K. 1996. Concentrations of hesperidin and other orange peel flavonoids in citrus processing by products. *J Agric Food Chem* 44:811-814
- Manzanares P, van den Broeck HC, de Graaff LH, Visser J. 2001. Purification and characterization of two different α -L-rhamnosidases, RhaA and RhaB, from *Aspergillus aculeatus*. *Appl Environ Microbiol* 67:2230-2234
- Mazzaferro L, Piñuel L, Minig M, Breccia JD. 2010. Extracellular monoenzyme deglycosylation system of 7-O-linked flavonoid β -rutinosides and its disaccharide transglycosylation activity from *Stilbella fimetaria*. *Arch Microbiol* 192:383-393 [Erratum, *Archive Microbiology.* 2011, 193:461].
- Mazzaferro LS, Breccia JD. 2011. Functional and biotechnological insights into diglycosidases. *Biotransf* 29(4): 103-112
- Mazzaferro LS, Breccia JD. 2012. Quantification of hesperidin in citrus-based foods using a fungal diglycosidase. *Food chem.* 134:2338-2344
- Mazzaferro L, Piñuel L, Erra-Balsells R, Giudicessi SL, Breccia JD. 2012. Transglycosylation specificity of *Acremonium* sp. α -rhamnosyl- β -glucosidase and its application to the synthesis of the new fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl-rutinoside. *Carbohydrate Research* 347: 69-75
- McMahon H, Zoecklein BW, Fugelsang K, Jasinski Y. 1999. Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol* 23:198-203
- Merkens H, Kappl R, Jakob RP, Schmid FX, Fetzner S. 2008. Quercetinase QueD of *Streptomyces* sp. FLA, a monocupin dioxygenase with a preference for nickel and cobalt. *Biochemistry* 47:12185-12196
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid (DNS) for determination of reducing sugars. *Anal Chem* 31:426-8

- Minig M, Walker D, Ledesma P, Martínez MA, Breccia JD. 2009. Bacterial isolates from Ethiopian soda lake producers of alkaline-active β -glucanases resistant to chelating and surfactant compounds. *Res J Microbiol* 4:194-201
- 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. *J. Agric. Food Chem.* 59 (20): 11238-11243
- Mizutani M, Nakanishi H, Ema J, Ma SJ, Noguchi E, Inohara-Ochiai M, Fukuchi-Mizutani M, Nakao M, Sakata K. 2002. Cloning of β -primeverosidase from tea leaves, a key enzyme in tea aroma formation. *Plant Physiol* 130:2164–2176
- Obregón WD. 2008. Hidrolasas de látex de especies del género *Araujia*. Purificación y caracterización de las enzimas proteolíticas. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata. pp. 203
- Nakanishi F, Nagasawa Y, Kabaya Y, Sekimoto H, Shimomura K. 2005. Characterization of lucidin formation in *Rubia tinctorum* L. *Plant Physiol Biochem* 43:921-928
- Okazaki K, Nishimura N, Matsuoka F, Hayakawa S. 2007. Cloning and characterization of the gene encoding endo- β -1,3-glucanase from *Arthrobacter* sp. NHB-10. *Biosci Biotechnol Biochem* 71(6):1568-1571
- 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. *Enz Microb Technol* 40 (2):236-241
- Osborn AE. 1996. Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *The Plant Cell* 8: 1821-1831
- Petersen TN, Brunak S, Heijne G, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8:785-786
- Peterson JJ, Beecher GR, Bhagwat SA, Dwyer JT, Gebhardt SE, Haytowitz DB, Holden JM. 2006. Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *J Food Comp Anal* 19: 74-80
- Puri M, Kaur A. 2010. Molecular identification of *Staphylococcus xylosus* MAK2, a new α -L-rhamnosidase producer. *World J Microbiol Biotechnol* 26:963-968
- Quintin J, Lewin G. 2005. Mild alkaline hydrolysis of some 7- O -fl avone glycosides. Application to a novel access to rutinosa heptaacetate. *Tetrahedron Lett* 46:4341-4343
- Rao JR, Cooper JE. 1994. Rhizobia catabolize nod gene-inducing flavonoids via C-ring fission mechanisms. *J Bacteriol* 176:5409-5413
- Rodríguez ME, Lopes CA, Valles S, Caballero AC. 2010. Characterization of α -rhamnosidase activity from a Patagonian *Pichia guilliermondii* wine strain. *J Appl Microbiol* 109(6):2206-2213

- Rose K, Fetzner S. 2006. Identification of linear plasmid pAM1 in the flavonoid degrading strain *Actinoplanes missouriensis* (DSM 43046). *Plasmid* 55:249-254
- Sambrook J, Russell D. 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sang-Joon L, Omori T, Kodama T. 1990. Purification and some properties of rutinoidase from *Arthrobacter* sp. *Kor J Appl Microbiol Biotech* 18:360-367
- Sarry JE, Gunata Z. 2004. Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chem* 87:509-521
- Schmidt S, Rainieri S, Witte S, Matern U, Martens S. 2011. Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* glucosidase that hydrolyzes flavonoid glucosides. *App environ microbial* 77:1751-57
- Shaw LJ, Morris P, Hooker JE. 2006. Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environ Microbiol* 8:1867-1880
- Šimčíková D, Kotik M, Weignerová L, Halada P, Pelantová H, Adamcová K, Křen V. 2015. α -L-Rhamnosyl- β -D-glucosidase (rutinosidase) from *Aspergillus niger*: Characterization and synthetic potential of a novel diglycosidase. *Adv Synth Catal* 357(1):107-117
- Sláviková E, Vadkertiová R. 2003. The diversity of yeasts in the agricultural soil. *J Basic Microbiol* 43(5):430-436
- Takashima M, Sugita T, Shinoda T, Nakase T. 2003. Three new combinations from the *Cryptococcus laurentii* complex: *Cryptococcus aureus*, *Cryptococcus carnescens* and *Cryptococcus peneaus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 1187-1194
- Tamura T, Hatano K. 2001. Phylogenetic analysis of the genus *Actinoplanes* and transfer of *Actinoplanes minutisporangius* Ruan et al. 1986 and *Actinoplanes aurantiacus* to *Cryptosporangium minutisporangium* comb. nov. and *Cryptosporangium aurantiacum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 2119-2125
- Trantas E, Panopoulos N, Ververidis F. 2009. Metabolic engineering of the complete pathway leading to heterologous biosynthesis of various flavonoids and stilbenoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng* 11(6):355-366
- 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*. *Biosci Biotechnol Biochem* 70:691-698
- Westlake DWS, Talbot G, Blakley ER, Simpson FJ. 1959. Microbial decomposition of rutin. *Can J Microbiol* 5: 621-629
- Witham FH, Blaydes DF, Devlin RM. 1971. *Experiments in plant physiology*. New York, USA: Van Nostrand Reinhold Company p. 167-200.

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. *Biosci Biotechnol Biochem* 66:801-807

Yamamoto S, Okada M, Usui T, Sakata K, Toumoto A, Tsuruhami K. 2006. Diglycosidase isolated from microorganisms. United States patent 7109014.2006 Sep 19.

Yamamura H, Ohnishi Y, Ishikawa J, Ichikawa N, Ikeda H, Sekine M, Harada T, Horinouchi S, Otaguro M, Tamura T, Suzuki K, Hoshino Y, Arisawa A, Nakagawa Y, Fujita N, Hayakawa M. 2012. Complete genome sequence of the motile actinomycete *Actinoplanes missouriensis* 431T (=NBRC102363T). *SIGS* 7:294-303

Zhou K, Luana H, Hua Y, Gea G, Liua X, Mac X, Houc Y, Wanga X, Yanga L. 2012. Isolation and characterization of a novel β -glucosidase with transglycosylation activity from *Arthrobacter* sp. DL001. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 80: 48– 57

Artículo de respaldo publicado en Applied Microbiology and Biotechnology:

Bacteria as source of diglycosidase activity: *Actinoplanes missouriensis* produces 6-O- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase active on flavonoides

Bárbara D. Neher^a, Laura S. Mazzaferro^a, Michael Kotik^b, Jorge Oyhenart^a, Petr Halada^b, Vladimír Křen^b and Javier D. Breccia^{a,}*

^a INCITAP - CONICET (National Scientific and Technical Research Council. Department of Chemistry, Faculty of Natural Sciences, National University of La Pampa (UNLPam), Av. Uruguay 151, (6300) Santa Rosa, La Pampa, Argentina

^b Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídenská 1083, CZ-142 20 Prague, Czech Republic

*Corresponding author: Javier D. Breccia.

E-mail: javierbreccia@gmail.com

Phone number: +54-2954-245220 int 7426

Postal address: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UNLPam. Av. Uruguay 151. 6300 Santa Rosa, La Pampa, Argentina

ABSTRACT

Bacteria represent an underexplored source of diglycosidases. Twenty-five bacterial strains from the genera *Actinoplanes*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Microbacterium* and *Streptomyces* were selected for their ability to grow in diglycosylated flavonoid-based media. The strains *Actinoplanes missouriensis* and *Actinoplanes liguriae* exhibited hesperidin deglycosylation activity (6-*O*- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase activity, EC 3.2.1.168), which was 3 to 4 orders of magnitude higher than the corresponding monoglycosidase activities. The diglycosidase production was confirmed in *A. missouriensis* by zymographic assays and NMR analysis of the released disaccharide, rutinose. The gene encoding the 6-*O*- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase was identified in the genome sequence of *A. missouriensis* 431^T (GenBank accession number BAL86042.1) and functionally expressed in *Escherichia coli*. The recombinant protein hydrolyzed hesperidin and hesperidin methylchalcone, but not rutin, which indicates its specificity for 7-*O*-rutinosylated flavonoids. The protein was classified into the glycoside hydrolase family 55 (GH55) in contrast to the known eukaryotic diglycosidases, which belong to GH1 and GH5. These findings demonstrate that organisms other than plants and filamentous fungi can contribute to an expansion of the diglycosidase toolbox.

Keywords

α -L-rhamnosidase, β -D-glucosidase, inverting glycosidase, methylumbelliferyl- β -D-rutinoside

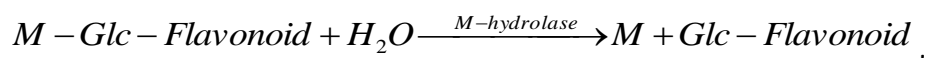
INTRODUCTION

Flavone glycosides are abundant secondary metabolites of plants that are involved in numerous aspects of the manufacturing of products derived from citrus and grapes. Some characteristics like bitter taste or juice clouding are attributed in some extent to these compounds (Manthey and Grohmann 1996). The deglycosylation of different flavone glycosides represents a challenge in food technology for debittering and clarifying of fruit juices (Hemingway et al. 1999; Wang et al. 2001). The deglycosylation processes also find application in plant-based beverages, like wine or tea, to increase the aroma of the final product by releasing volatile terpenes (Ma et al. 2001).

The screening of microorganisms that grow on diglycosylated flavonoids usually provides strains that produce monoglycosidases as the main tools for deglycosylation. These strains hydrolyze the disaccharidic flavonoid in a sequential manner, releasing first the exo-glycosidic moiety followed by the action of a β -glucosidase (EC 3.2.1.21), which cleaves the glycosidic bond between the remaining glucose

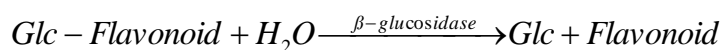
residue and the aglycone (Sarry and Gunata 2004). The two consecutive reactions can be summarized as follows:

Reaction 1:

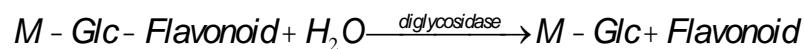


where M is a monosaccharidic moiety and M-hydrolase is a specific monoglycosidase that cleaves the glycosidic bond between M and glucose (Glc) (e.g. EC 3.2.1.40: α -L-rhamnosidase, or EC 3.2.1.37: β -D-xylosidase), and

Reaction 2:



Nevertheless, a few fungal strains were reported to produce diglycosidases that perform the deglycosylation of flavonoids and other diglycosylated plant metabolites in a single step (Mazzaferro and Breccia 2011):



Diglycosidases have been predominantly reported in eukaryotes, specifically in filamentous fungi and plants (see Mazzaferro and Breccia 2011 for a review; Šimčíková et al. 2015). Although a few bacterial strains have been identified as diglycosidase producers (Sang Joon et al. 1990; Yamamoto et al. 2006), to the best of our knowledge no thorough studies about these bacterial enzymes are available. Therefore, bacteria constitute an underexplored source of diglycosidases for biotechnological applications. This work deals with the search for diglycosidase-producing bacterial strains from the genera *Actinoplanes*, *Streptomyces*, *Microbacterium*, *Corynebacterium* and *Bacillus*. The diglycosidase producers were found by zymograms with the fluorescent substrate methylumbelliferyl-rutinoside, which was synthesized by transglycosylation of hesperidin using a fungal diglycosidase (Mazzaferro et al. 2012). The selected diglycosidase (6-O- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase) from *A. missouriensis* was recombinantly expressed and purified. In addition, the substrate specificity was characterized in view of its potential application for the hydrolysis of 7-O-rutinosylated flavonoids and other rutinose-containing compounds.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

p-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*NGIcp), *p*-nitrophenyl- α -L-rhamnopyranoside (*p*NRhap), 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside (MU- β -glucoside), 4-methylumbelliferyl- α -L-rhamnoside (MU- α -rhamnoside), 4-methylumbelliferyl- β -D-cellobioside (MU- β -cellobioside), hesperidin, hesperidin methylchalcone, diosmin, rutin and naringin were purchased from Sigma Chemical (Buenos Aires, Argentina). 4-Methylumbelliferyl- β -D-rutinoside (MU- β -rutinoside) and *p*-nitrophenyl- β -D-rutinoside (*p*NRut) were synthesized as described before (Mazzaferro et al. 2012; Šimčíková et al. 2015).

Microbial sources, culture conditions and purification of wild-type enzyme

The microorganisms were isolated from sediment and soil samples collected from Antarctica (Base Marambio S56°14'31" W56°37'48"); Patagonia Argentina (Rio Turbio S51°31'49" W72°21'54"); El Calafate S50°18'36" W72°14'42") and Shala Lake (Ethiopia N7°25'30" E38°23'42") (Minig et al. 2009). Reference strains were kindly provided by the United States Department of Agriculture (USDA). The enrichment medium was adjusted to pH 10 with 100 mM Na₂CO₃ and contained (g/l): yeast extract 5, meat peptone 10, NaCl 10. The composition of the selection medium was as follows (g/l): hesperidin or rutin 2.5, meat peptone 2, and yeast extract 1. For solid media 15 g/l of agar were added. Pieces of agar from the clarification zone around the colonies or culture broth from strains cultivated in the selection medium were used as the source of enzymatic activities. The agar samples were processed according to González et al. (1996).

The selected strain (*A. missouriensis* 431^T = NRRL B-3342) was cultured in a benchtop bioreactor (1.0 liter working volume) with an agitation rate of 200 rpm and aeration of 0.4 vvm at 30 °C. The culture medium contained (g/l): hesperidin 2.5, meat peptone 2, and yeast extract 1. The pH was maintained at 7.0 with 0.5 M H₂SO₄ and 1 M NaOH. The bioreactor was inoculated with 10 ml of an overnight culture grown in LB medium, and aliquots of 1 ml were periodically withdrawn for activity measurements. The samples were centrifuged (10 min, 12000×g), and the pellets were washed twice with 0.16 M NaCl and resuspended in 1 ml of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0). Cell suspensions were used to detect cell-bound enzymatic activities. The wild-type protein was purified from the supernatant by anion exchange chromatography (DEAE-Sephadex, 40–120 μ m, GE Healthcare Life Sciences), (NH₄)₂SO₄ precipitation and size exclusion chromatography (Bio-Gel P-60, Bio-Rad).

Trypsin digestion and MALDI-TOF mass spectrometry

The Coomassie Brilliant Blue-stained protein bands were excised from the gel, cut into small pieces and destained using 50 mM 4-ethylmorpholine acetate (pH 8.1) in 50% v/v acetonitrile (ACN). The gel was washed with water, dehydrated in ACN, reswelled in water and partly dried in a SpeedVac concentrator. The gel pieces were incubated overnight at 37 °C with 100 ng sequencing grade trypsin (Promega, USA) in cleavage solution (25 mM 4-ethylmorpholine acetate, 5% v/v ACN). The resulting peptides were transferred to 40% v/v ACN/0.1% v/v TFA. An aqueous 50% v/v ACN/0.1% v/v TFA solution of 5 mg/ml α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Sigma) was used as the MALDI matrix. One μ l of the peptide mixture was deposited on the MALDI plate and overlaid with 0.4 μ l of the matrix. MALDI mass spectra were recorded on an Ultraflex III instrument (Bruker Daltonics, Germany) in the mass range of 700–4000 Da calibrated with PepMix II (Bruker Daltonics). Both MS and MS/MS data sets were searched against the NCBI nr20130322 database subset of bacterial proteins using the in-house MASCOT search engine.

Cloning

Genomic DNA from *A. missouriensis* was isolated according to Sambrook and Russell (2001). The secretory signal sequence in the 6-O- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase-encoding gene was predicted using SignalP (Petersen et al. 2011). The gene encoding the putative protein without its native signal peptide sequence was PCR-amplified using the Q5 DNA polymerase (New England Biolabs), the isolated genomic DNA as a template and the primers Act-101F (5'-CACCATGGCGACCACTCCGGA) and Act-101R (5'-TCAGCGGGGTGGGCA). The PCR product was used for cloning into the expression vector pET101/D-TOPO (Invitrogen). Replacement of the stop codon located upstream of the pET101/D-based His-tag sequence by a Ser-encoding codon was accomplished using the Phusion site-directed mutagenesis kit (Thermo Scientific) and the primers Act-His-101F (5'-CCACCCCGCTCAAAGGGCGAGCT) and Act-His-101R (5'-GCAGCCAGCCGGGCGAGAT). The PCR product, which comprised the entire insert-containing plasmid, was gel-purified, phosphorylated using T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) and circularized. The resulting construct pET101/D-TOPO::*rgH* was used to transform *E. coli* TOP10 cells.

Bioinformatics

ExPasy software tools were used to predict the molecular mass and pI of the protein (Gasteiger et al. 2005). Protein sequence alignments and unrooted phylogenetic tree were generated using Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE).

Heterologous expression and purification of 6-O- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase

The pET101-based constructs (encoding the protein with and without a C-terminal His-tag) were transformed into *E. coli* BL21 Star (DE3) cells (Life Technologies) harboring the plasmid pGro7 (TaKaRa Bio Inc.) for co-expression of the cloned protein with the chaperones GroES and GroEL. Following overnight growth of a selected transformant at 28 °C in LB medium containing ampicillin (100 μ g/ml) and chloramphenicol (34 μ g/ml), the cultivation temperature was decreased to 22 °C and L-arabinose was added (to a final concentration of 1.7 g/l). After 1 h IPTG was added (final concentration of 450 μ M), and the cultivation continued overnight. The biomass was harvested by centrifugation (3600 \times g at 8 °C, 15 min), and the cell pellet was washed twice in 25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0). The cells were resuspended in binding buffer (see below), and cell lysis was accomplished by lysozyme and DNase treatment (0.2 mg/ml and 20 μ /ml, respectively) for 1 h, followed by sonication on ice for 15 min (pause of 1 min between pulses of 1 min; 80% amplitude; UP50H sonicator, Hielscher Ultrasonics GmbH, Germany). The soluble fraction of the lysate, which was obtained by centrifugation (15500 \times g at 4 °C, 15 min), was loaded on a Ni Sepharose column (HisTrap HP, 5 ml, GE Healthcare Life Sciences) and equilibrated with binding buffer (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, 30 mM imidazole, pH 7.4). The column was washed with binding buffer, and the bound protein was eluted with elution buffer (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.4) after 24 min using a flow rate of 3 ml/min and a gradient time of 40 min.

Zymograms and agar-based activity determination

Native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was carried out according to Laemmli (1970). Enzymatic activities were detected by submerging the gel in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0) containing MU- β -glucoside, MU- α -rhamnoside, MU- β -cellobioside or MU- β -rutinoside. After 10 min at 37 °C the bands were visualized by UV illumination (312 nm). The enzymatic activity was also detected by overlaying agar plates with agar (1.5 % w/v) containing hesperidin or rutin (0.25% w/v) and incubating them at 37°C. Transparent halos in a clouded light yellow background indicated deglycosylation activity (Mazzaferro et al. 2012). The enzyme 6-O- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase (EC 3.2.1.168) from *Acremonium* sp. DSM24697 was used as a positive control.

Enzyme assays

The total amount of reducing sugars produced during enzymatic deglycosylation of hesperidin was determined using 2,4-dinitrosalicylic acid and the substrate specificity of the 6-O- α -L-rhamnosyl- β -D-

glucosidase was assessed as described by Mazzaferro et al. (2010). Diglycosidase (6-O- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase) and monoglycosidase (α -L-rhamnosidase and β -D-glucosidase) activities were determined according to Orrillo et al. (2007) using the corresponding substrates (*pNRut*, *pNRhap* or *pNGlcp*). Activity measurements at different temperatures (50 mM Tris-HCl buffer pH 7.0) and at different pH values (50 °C) were performed with the following buffers (50 mM): sodium citrate (pH 4.0–6.0), sodium phosphate (pH 6.0–7.0), Tris-HCl (pH 7.0–8.9) and Na₂CO₃ (9.2–10.8). The products of the enzymatic reactions were analyzed by thin layer chromatography (silica gel 60 W) using ethyl acetate/2-propanol/water (3:2:2) as a mobile phase and the anthrone reagent for staining. Rutinose, which was generated by enzymatic hesperidin hydrolysis, was purified for NMR structure determination as follows: the reaction mixture was extracted twice with ethyl acetate (1:1), and the aqueous phase was concentrated and loaded on a size-exclusion chromatography column (Bio-Gel P-2, Bio-Rad). The fractions containing rutinose were pooled and lyophilized.

RESULTS

Search for flavonoid glycoside-deglycosylating bacteria

Twenty-five bacterial strains were selected based on their ability to grow on rutin or hesperidin as the sole carbon source. Four strains were able to form a clarification zone in the solid culture medium, which was considered as indication of flavonoid glycoside degradation (Table S1, Supplementary material). The strains of the genera *Bacillus*, *Corynebacterium* and *Microbacterium* increased their microbial biomass in the hesperidin- or rutin-based media, but a halo around the colonies was not observed. On the other hand, four out of 11 strains of the genera *Actinoplanes* and *Streptomyces* generated a clarification zone in the solid culture media. The extracellular extracts of these four strains were tested for hesperidin deglycosylation, α -L-rhamnosidase and β -D-glucosidase activities. All of them were active against hesperidin and the monoglycosylated artificial substrates. The strains with the highest extracellular hesperidin deglycosidase activities (>5 U/l), namely *Streptomyces* sp. SES405, *A. liguriae* and *A. missouriensis*, were selected for further studies (Table 1). Remarkably, the strain *Streptomyces* sp. SES405 showed comparable values of hesperidin deglycosylation and monoglycosidase activities, while the strains *A. liguriae* and *A. missouriensis* produced only traces of monoglycosidase activities. These data suggest that the deglycosylation activities of the latter strains are likely based on the action of a diglycosidase enzyme.

Screening for diglycosidase activities

Enzyme activities were detected in native-PAGE by zymography using the corresponding 4-methylumbelliferyl glycosides as substrates. The fluorogenic compounds MU- α -rhamnoside and MU- β -glucoside were used for the detection of monoglycoside-specific glycosidase activities, while MU- β -cellobioside and MU- β -rutinoside were used for diglycosidase activities. *A. missouriensis* and *A. liguriae* displayed a positive band of activity with MU- β -rutinoside; on the other hand, extracellular protein extracts from *Streptomyces* sp. SES405 did not exhibit activity (Fig. 1). None of the screened strains showed activity towards MU- β -cellobioside. When hesperidin was used as a substrate, the diglycosidase activities present in the supernatants of *A. missouriensis* and *A. liguriae* resulted in rutinose formation as revealed by thin-layer chromatography, whereas glucose and rhamnose were not detected (Fig. 2 and Figure S1, Supplementary material). These data, together with the fact that the α -L-rhamnosidase activities were 3–4 orders of magnitude lower than the total hesperidin deglycosylation activity (Table 1), strongly suggest the presence of an extracellular diglycosidase in these two strains. The enzyme *A. missouriensis* was selected for further studies because the degradation of the flavone ring by this strain is well documented and its genome publically available (GenBank: AP012319.1) (Rose and Fetzner 2006, Yamamura et al. 2012).

Diglycosidase production, cellular location and hydrolysis of other substrates by A. missouriensis

The strain *A. missouriensis* was able to grow on hesperidin as the sole carbon source, and the diglycosidase activity was detected only in media containing the flavonoid. The maximum enzyme activity was determined at 55 °C with an apparent optimum pH-value at 7.0. The strain, when cultivated in a 1-l bioreactor, produced a maximum diglycosidase activity after four days (27.7 U/l). Minor monoglycosidase activities were also detected in the growth medium (0.11 U/l of α -L-rhamnosidase and 0.42 U/l of β -D-glucosidase activities). After 72 h of cultivation, 80 % of the enzyme activity was found in the extracellular space and 20% associated with the cells. The enzyme, which was responsible for hesperidin deglycosylation, was purified from *A. missouriensis* using a three-step purification protocol. The zymographic assay revealed a positive band (R_f of 0.45) for both substrates, MU- β -glucoside and MU- β -rutinoside. The main product of hesperidin hydrolysis was confirmed by ^1H and ^{13}C NMR to be rutinose (Table S2, Supplementary material; Schubert et al. 2010).

Cloning and expression of 6-O- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase from A. missouriensis

The purified 6-O- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase was subjected to in-gel trypsin digestion followed by MALDI-TOF mass spectrometry. Besides peptide fingerprint data, the sequences of eight peptides

(SLDNLSINPIQRPVGADAER, TNASGVNWATDSTAGTSIPISR, NQVIWNGER, HLILTPGIYR, VILDDNWLWR, ISGTVNSGGDAGPGQAQYYVR, IGTGTANNIGDATNPTTSLDLFVR, NIVGTTGAAVDATQPNQVVPGFASAR) were obtained. The MS data unambiguously identified a hypothetical protein sequence (GenBank accession number BAL86042.1) from *A. missouriensis* 431. An open reading frame consisting of 1902 bp was identified, starting with the codon GTG. The encoded protein was predicted to be composed of 633 amino acids, including a 34 residues long secretory signal peptide at its N-terminus. A molecular mass of 62 303 Da and a pI of 6.89 was predicted for the secreted enzyme. The highest sequence identity (52%) with experimentally verified glycoside hydrolases was determined for an endo- β -1,3-glucanase from *Arthrobacter* sp. NHB-10 (GenBank: BAF52916) (Okazaki et al., 2007). A CAZy database search revealed that the putative protein BAL86042.1 has been previously classified as a member of the glycoside hydrolase family 55 (GH55) (Lombard et al. 2014). A phylogenetic tree was generated to assess the sequence relationships between known diglycosidases, the 6-*O*- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase from *A. missouriensis* and closely related sequences within GH55 (Fig. 3).

E. coli BL21 Star (DE3) cells harboring the construct pET101/D-TOPO::*rgh* were cultivated for heterologous production of the C-terminal His-tagged 6-*O*- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase (Rgh) from *A. missouriensis*. The enzyme Rgh was expressed in the cytosolic fraction in a soluble and active form and purified to homogeneity by metal affinity chromatography. The molecular mass estimated by SDS-PAGE (~60 kDa) was in agreement with the predicted molecular mass of 62 kDa (Fig. 4, lane 3). Rgh showed a specific hydrolytic activity of 1.8 U/mg with hesperidin as the substrate.

Substrate specificity of Rgh

The substrate specificity was tested with different mono- and diglycosides (Table 2). Two flavonoid 7-*O*-rutinosides, hesperidin and hesperidin methylchalcone, were shown to be substrates of the enzyme. By contrast, the hydrolysis of diosmin (diosmetin 7-*O*-rutinoside), rutin (quercetin 3-*O*-rutinoside), and naringin (naringenin-7-*O*-neohesperidoside) was not detected. Since Rgh exhibited the highest protein sequence identity with a known endo-1,3- β -glucanase from *Arthrobacter* sp., activity against laminarin, which is a predominantly linear β (1 \rightarrow 3)-glucan with some β (1 \rightarrow 6)-branches, was also tested. However, detectable amounts of reducing sugars were not released from laminarin when incubated with the cloned enzyme. Regarding the artificial *p*-nitrophenyl monoglycosides, the enzyme was not able to hydrolyze *p*NRhap and showed only traces of activity towards *p*NGlcp. By contrast, 26 % relative activity was detected for the diglycoside *p*NRut. The Rgh was stable in the temperature range of 25–50 °C for at least one hour (Fig. 5). Moreover, >90 % of the initial activity was determined after incubation of the

enzyme at 8 °C for 10 days (data not shown). The presence of the metal ions Mn^{2+} , Ca^{2+} and Na^+ (1 mM) did not affect the enzyme activity, while Zn^{2+} , Mg^{2+} , and the chelating agent EDTA reduced the activity by 20–50 %. The activity was only increased (25 %) by 10 mM K^+ .

DISCUSSION

Diglycosidases have been reported to be chiefly produced by eukaryotic organisms, specifically by filamentous fungi and plants (Mazzaferro and Breccia 2011). Only a few bacterial diglycosidase producers and one archaeobacterium have been identified (Sang Joon et al. 1990; Yamamoto et al. 2006; Nam et al. 2012). In this work, we screened a panel of bacterial strains for diglycosidase activities. Two strains, *A. missouriensis* and *A. liguriae*, out of 25 tested, were able to grow on hesperidin and rutin, respectively, as the sole carbon source and at the same time exhibited extracellular diglycosidase activities. In contrast to monoglycosidase activities such as α -L-rhamnosidase and β -D-glucosidase, which seem to be widespread, diglycosidase activities are rather scarce. The bacterial degradation of flavonoids has been reported for some strains within the order Rhizobiales and the genera *Streptomyces*, *Actinoplanes*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas* (Merkens et al. 2008; Rao and Cooper 1994; Rose and Fetzner 2006; Westlake et al. 1959). These studies focused on the capability of bacteria to oxidize the flavonoid aromatic rings. In the case of glycosylated flavonoids, a deglycosylation step preceding oxidation is usually required. *Streptomyces* sp. FLA is able to utilize quercetin as the sole carbon source; however, the growth is poor (Merkens et al. 2008). Our results with *Streptomyces* sp. SES405 indicate that this strain deglycosylates hesperidin *via* a sequential mechanism since it displayed monoglycosidase activities while diglycosidase activity was not detected. A work published by Rose and Fetzner (2006) describes the identification of a linear plasmid in *A. missouriensis*, which is involved in the degradation of the flavone ring. This strain was able to degrade not only the non-glycosylated flavonoid quercetin, but also the glycosylated flavonoids rutin and hesperidin. The 6-*O*- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase is likely responsible for the deglycosylation of the latter flavonoid in *A. missouriensis*.

The genome of *A. missouriensis* (strain 431^T) consists of 8204 predicted genes, out of these, 8125 encode proteins and 79 encode RNAs. A putative function was assigned to 55.9% of the protein-encoding genes (Yamamura et al. 2012). In this work, the putative protein BAL86042.1 was experimentally linked to a catalytic function, specifically 6-*O*- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase activity. The enzyme was found to be a member of GH55. This family comprised until now only exo- β -1,3-glucanases (EC 3.2.1.58) and endo- β -1,3-glucanases (EC 3.2.1.39). A phylogenetic analysis with the known diglycosidases, GH55 exo- β -1,3-

glucanases and GH55 endo- β -1,3-glucanases revealed that the diglycosidases from plants clustered in a separate clade as GH1 family members, whereas the fungal diglycosidases gathered in GH5; enzymes in both glycoside hydrolase families exhibit a retaining catalytic mechanism.

Recently, the glutamate at the position 502 of the β -1,3-exo-glucanase SacteLam55A from *Streptomyces* sp. SirexAA-E was identified by site-directed mutagenesis and structural studies as the catalytic acid (Bianchetti et al. 2015). This catalytic glutamate is conserved throughout the GH55 family in both prokaryotic and eukaryotic microorganisms (Ishida et al. 2009, Bianchetti et al. 2015). The sequence alignment of the 6-*O*- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase from *A. missouriensis* with SacteLam55A, the β -1,3-exo-glucanase Pclam55A from *Phanaerochaete chrysosporium* (Ishida et al. 2009) and other GH55 β -1,3-glucanases (Okazaki et al. 2007) allowed the identification of Glu517 as the presumable catalytic acid (Table S3).

Several glycosidases were reported to recognize both mono- and diglycosides with different degrees of specificity. The *Acremonium* sp. DSM24697 6-*O*- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase and the *Aspergillus niger* K2 rutinoidase are highly specific for diglycosylated substrates and exhibit rather low or null activities against monoglycosylated compounds (Mazzaferro et al. 2010; Šimčíková et al. 2015). The ratio of β -D-glucosidase activity to 6-*O*- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase activity (<0.04) for the *A. missouriensis* enzyme clearly shows its preference for the diglycosylated substrate, exhibiting only traces of β -D-glucosidase activity. By contrast, the *Pyrococcus furiosus* β -D-glucosidase is promiscuous enough to hydrolyze diglycosylated compounds, albeit with a low ratio of β -D-glucosidase activity to β -D-rutinoidase activity (>7000) (Nam et al. 2012). The 6-*O*- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidases from *A. missouriensis* and *Acremonium* sp. DSM24697 exhibited both a preference for 7-*O*-rutinosylated flavonoids (hesperidin and hesperidin methylchalcone) (Mazzaferro et al. 2011). The hydrolysis of rutin, a 3-*O*-rutinosylated flavonoid, was not detected. Among diglycosidases, the reports on enzymes that preferentially hydrolyze hesperidin are circumscribed to these two proteins, while there are at least six enzymes that hydrolyze rutin (Sang Joon et al. 1990, Narikawa et al. 2000, Nam et al. 2012, Šimčíková et al. 2015).

Until now, two activities have been described in the GH55 family: β -1,3-exo-glucanases and β -1,3-endo-glucanases. Recently, 51 members of the GH55 were tested with a panel of substrates, from which 34 proteins were found to be active (Bianchetti et al. 2015). Laminarin was the only substrate that gave a positive assay response (Bianchetti et al. 2015). The authors suggested that the enzymes whose activities could not be experimentally verified might be specific for other substrates. The enzyme described in this work represents the first member of the family with an enzymatic activity other than β -1,3-glucanase.

Eukaryotic diglycosidases are effective catalysts when applications such as the release of volatile compounds during aroma modulation of plant-based foods are envisioned (Mizutani et al. 2002; Minig et al. 2011). These enzymes group under GH1 and GH5, respectively. Because of their retaining mechanism, transglycosylation side-activity is to be expected. Indeed, the synthetic potential of diglycosidases from fungal origin has been demonstrated: they *in vitro* glycosylate alkylic and phenolic alcohols (Mazzaferro et al. 2012; Šimčíková et al. 2015). However, transglycosylation reactions might be disadvantageous for industrial biotransformations where solely hydrolysis is expected. The bacterial diglycosidase herein described belongs to GH55 and, consistently with the inverting mechanism of the family, did not show transglycosylation activity. Therefore, our results opened up the possibility to carry out predictable biotransformations of complex mixtures. We demonstrated as well that bacteria contribute to an expansion of the diglycosidase toolbox

AKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the National University of La Pampa (UNLPam), the National Council of Scientific and Technical Research (CONICET), and The National Agency for Science and Technology Promotion (ANPCyT) of Argentina. Funding of the bilateral cooperation project 7AMB13AR005 by the Ministry of Education, Youth and Sports (MEYS) of the Czech Republic and the Ministry of Science, Technology and Innovation (MINCYT) of Argentina is acknowledged. This work was also supported by the MEYS project LD13042. Further, we thank the support for the networking by the European COST Chemistry project MultiGlycoNano CM1102.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

Bianchetti CM, Takasuka TE, Deutsch S, Udell HS, Yik EJ, Bergeman LF, Fox BG (2015) Active site and laminarin binding in glycoside hydrolase family 55. *J Biol Chem* doi:10.1074/jbc.M114.623579

Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server;(In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press, pp571-607

González C, Martínez A, Vázquez F, Baigori M, Figueroa LIC (1996) New method of screening and differentiation of exoenzymes from industrial strains. *Biotechnol Tech* 10:519-522. doi: 10.1007/BF00159517

Hemingway KM, Alston MJ, Chappell CG, Taylor AJ (1999) Carbohydrate-flavour conjugates in wine. *Carbohydr Polymer* 38:283-286. doi: S0144861798001039

Ishida T, Fushinobu S, Kawai R, Kitaoka M, Igarashi K, Samejima M (2009) Crystal structure of glycoside hydrolase family 55 β -1,3-glucanase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biol Chem* 284:10100–10109. doi:10.1074/jbc.M808122200

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685. doi: 10.1038/227680a0

Lombard V, Golaconda RH, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* 42:D490–D495.

Ma SJ, Mizutani M, Hiratake J, Hayashi K, Yagi K, Watanabe N, Sakata K (2001) Substrates specificity of β -primeverosidase, a key enzyme in aroma formation during oolong tea and black tea manufacturing. *Biosci Biotechnol Biochem* 65:2719-2729.

Manthey JA, Grohmann K (1996) Concentrations of hesperidin and other orange peel flavonoids in citrus processing by products. *J Agric Food Chem* 44:811-814. doi: 10.1021/jf950572g

Mazzaferro L, Piñuel L, Minig M, Breccia JD (2010) Extracellular monoenzyme deglycosylation system of 7-O-linked flavonoid β -rutinosides and its disaccharide transglycosylation activity from *Stilbella fimetaria*. *Arch Microbiol* 2010;192:383-393. Erratum in: *Arch Microbiol* (2011) 193:461. doi: 10.1007/s00203-010-0567-7

Mazzaferro L, Breccia JD (2011) Functional and biotechnological insights into diglycosidases. *Biocat Biotrans* 29:103-112. doi: 10.3109/10242422.2011.594882

Mazzaferro L, Piñuel L, Erra-Balsells R, Giudicessi SL, Breccia JD (2012) Transglycosylation specificity of *Acremonium* sp. α -rhamnosyl- β -glucosidase and its application to the synthesis of the new fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl-rutinoside. *Carbohydr Res* 347:69-75. doi:10.1016/j.carres.2011.11.008

Merkens H, Kappl R, Jakob RP, Schmid FX, Fetzner S (2008) Quercetinase QueD of *Streptomyces* sp. FLA, a monocupin dioxygenase with a preference for nickel and cobalt. *Biochemistry* 47:12185-12196. doi:10.1021/bi801398x

Minig M, Walker D, Ledesma P, Martínez MA, Breccia JD (2009) Bacterial isolates from Ethiopian soda lake producers of alkaline-active β -glucanases resistant to chelating and surfactant compounds. *Res J Microbiol* 4:194-201. doi: 10.3923/jm.2009.194.201

Minig M, Mazzaferro LS, Erra-Balsells R, Petroselli G, Breccia JD. 2011. α -Rhamnosyl- β -glucosidase-catalyzed reactions for analysis and biotransformations of plant-based foods. *J Agr Food Chem*. 59:11238-11243

Mizutani M, Nakanishi H, Ema J, Ma SJ, Noguchi E, Inohara-Ochiai M, Fukuchi-Mizutani M, Nakao M, Sakata K. 2002. Cloning of β -primeverosidase from tea leaves, a key enzyme in tea aroma formation. *Plant Physiol* 130:2164–2176

Nam HK, Hong SY, Shin KC, Oh DK (2012) Quercetin production from rutin by a thermostable β -rutinosidase from *Pyrococcus furiosus*. *Biotechnol Lett* 34:483-489. doi: 10.1007/s10529-011-0786-2

Narikawa T, Shinoyama H, Fujii T (2000) A β -rutinosidase from *Penicillium rugulosum* IFO 7242 that is a peculiar flavonoid glycosidase. *Biosci Biotechnol Biochem* 64:1317-1319. doi:10.1271/bbb.64.1317

Okazaki K, Nishimura N, Matsuoka F, Hayakawa S (2007) Cloning and characterization of the gene encoding endo- β -1,3-glucanase from *Arthrobacter* sp. NHB-10. *Biosci Biotechnol Biochem* 71(6):1568-1571. doi: 10.1271/bbb.70030

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. *Enz Microb Technol* 40:236-241. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.04.002

Petersen TN, Brunak S, Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8:785-786. doi: 10.1038/nmeth.1701

Rao JR, Cooper JE (1994) Rhizobia catabolize nod gene-inducing flavonoids *via* C-ring fission mechanisms. *J Bacteriol* 176:5409-5413. doi:0021-9193/94/\$04.00+0

Rose K, Fetzner S (2006) Identification of linear plasmid pAM1 in the flavonoid degrading strain *Actinoplanes missouriensis* (DSM 43046). *Plasmid* 55:249-254. doi: 10.1016/j.plasmid.2005.10.003

Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sang-Joon L, Omori T, Kodama T (1990) Purification and some properties of rutinoidase from *Arthrobacter* sp. *Kor J Appl Microbiol Biotech* 18:360-367.

Sarry JE, Gunata Z (2004) Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chem* 87:509-521. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.01.003

Schubert M, Melnikova AN, Mesecke N, Zubkova EK, Fortte R, Batashev DR, Barth I, Sauer N, Gamalei YV, Mamushina NS, Tietze LF, Voitsekhovskaja OV, Pawlowski K (2010) Two novel disaccharides, rutinose and methylrutinose, are involved in carbon metabolism in *Datisca glomerata*. *Planta* 231:507-521. doi: 10.1007/s00425-009-1085-1

Šimčíková D, Kotik M, Weignerová L, Halada P, Pelantová H, Adamcová K, Křen V (2015) α -L-Rhamnosyl- β -D-glucosidase (rutinosidase) from *Aspergillus niger*: Characterization and synthetic potential of a novel diglycosidase. *Adv Synth Catal* 357(1): 107-117. doi: 10.1002/adsc.201400566

Wang D, Kurasawa E, Yamaguchi Y, Kubota K, Kobayashi A (2001) Analysis of glycosidically bound aroma precursors in tea leaves. 2. Changes in glycoside contents and glycosidase activities in tea leaves during the black tea manufacturing process. *J Agric Food Chem* 49:1900-1903. doi:10.1021/jf001077+

Westlake DWS, Talbot G, Blakley ER, Simpson FJ (1959) Microbial decomposition of rutin. *Can J Microbiol* 5: 621-629. doi:10.1139/m59-076

Yamamoto S, Okada M, Usui T, Sakata K, Toumoto A, Tsuruhami K (2006) Diglycosidase isolated from microorganisms. United States patent 7109014.2006 Sep 19.

Yamamura H, Ohnishi Y, Ishikawa J, Ichikawa N, Ikeda H, Sekine M, Harada T, Horinouchi S, Otaguro M, Tamura T, Suzuki K, Hoshino Y, Arisawa A, Nakagawa Y, Fujita N, Hayakawa M (2012) Complete genome sequence of the motile actinomycete *Actinoplanes missouriensis* 431^T (= NBRC 102363T). *SIGS* 7:294-303. doi:10.4056/sigs.3196539

Legends to the tables

Table 1 Solid cultures of selected strains with hesperidin and rutin as the sole carbon source and extracellular glycosidase activities detected when the strains grown on hesperidin as carbon source.

Table 2 Substrate specificity of recombinant 6-O- α -rhamnosyl- β -glucosidase from *A. missouriensis*. 100 % activity corresponded to 0.2 U/ml.

Legends to the figures

Fig. 1 Zymographic analysis of extracellular extracts using MU- β -rutinoside as the substrate. Positive control: 6-O- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase (EC 3.2.1.168) from *Acremonium* sp. DSM24697; *A. missouriensis* and *Streptomyces* sp. SES405 were grown in the presence of hesperidin as the sole carbon source, whereas *A. liguriae* was grown with rutin as the carbon source.

Fig. 2 Reaction scheme of the hesperidin hydrolysis catalyzed by 6-O- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase (EC 3.2.1.168) from *A. missouriensis*.

Fig. 3 Phylogenetic relationships among known β -1,3-glucanases and diglycosidases. The data set included 16 protein sequences from plantae, fungi and bacteria. The clades are colored according to the CAZy classification of glycoside hydrolases: GH1 (green), GH5 (red) and GH55 (blue). The accession numbers or names for each protein sequence are as follows: A2SY66.1, BAC78656.1, BAD14925.1, A3RF67.1, BAG70961.1, CAK39791.1, Pclam55A, AAW47927.1, CAF32160.1, P49426.1, AJ002397.1,

BAF52916.1, BAL86042.1, BAL88862.1, BAL87999.1 and SacteLam55A (from the top to the bottom). The bar represents 0.3 amino acid substitutions per site.

Fig. 4 SDS–PAGE analysis of the His-tagged 6-*O*- α -rhamnosyl- β -glucosidase during its purification. Line 1, molecular mass marker; line 2, unbound fraction of the crude extract loaded onto the Ni Sepharose column; line 3, purified 6-*O*- α -rhamnosyl- β -glucosidase.

Fig. 5 Effect of temperature on hesperidin hydrolysis (●) and stability (●) of the recombinant 6-*O*- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase. Enzyme stability was assessed by determining the residual activity at 50°C after incubation at different temperatures for 60 min. The 100% activity corresponded to 0.24 U/ml for hydrolysis and 0.48 U/ml for stability assays.

Table 1

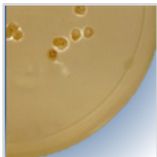
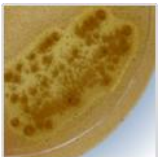




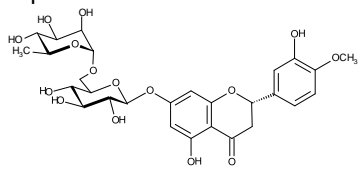
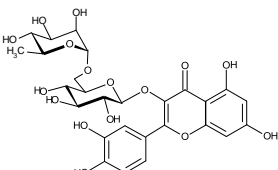
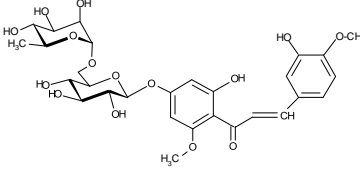
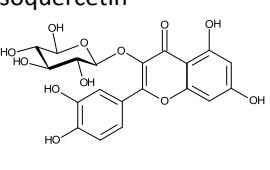
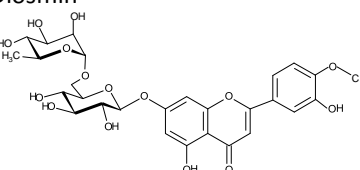
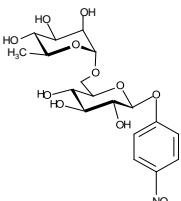
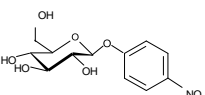
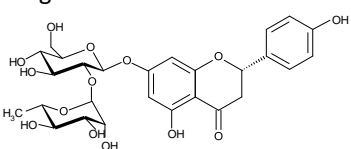
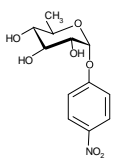
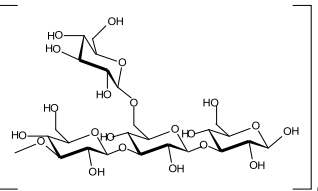
Strain	Carbon source		Extracellular glycosidase activities (U/l)		
	Hesperidin	Rutin	α -L-Rhamnosidase	β -D-Glucosidase	Hesperidin deglycosidase
<i>Actinoplanes liguriae</i>			0.012	0.0018	10.58
<i>Actinoplanes missouriensis</i>			0.0006	0.002	6.23
<i>Streptomyces</i> sp. SES405			5.12	0.57	17.28

Table 2

Substrate	%	Substrate	%
7-O-β-rutinosides		3-O-β-rutinoside	
Hesperidin 	100	Rutin 	ND
Hesperidin methylchalcone 	91	Isoquercetin 	ND
Diosmin 	ND	p-Nitrophenyl glycosides	
		<i>p</i> -NRut 	26
7-O-β-neohesperidoside		<i>p</i> -NGlcp 	1
Naringin 	ND	<i>p</i> -NRhap 	ND
Other substrates			
Laminarin 	ND		

ND: no activity detected.

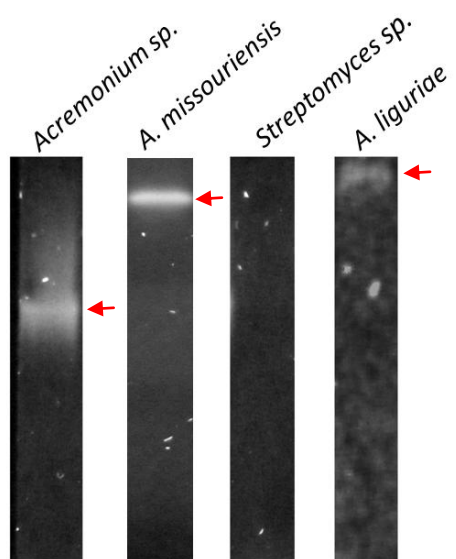


Fig.1

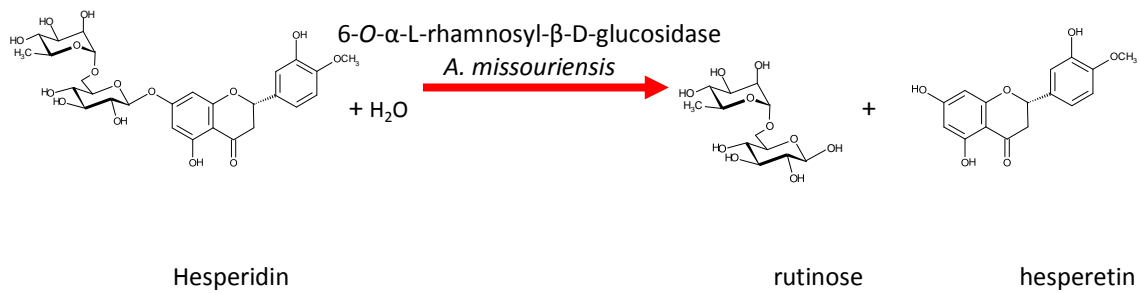


Fig. 2

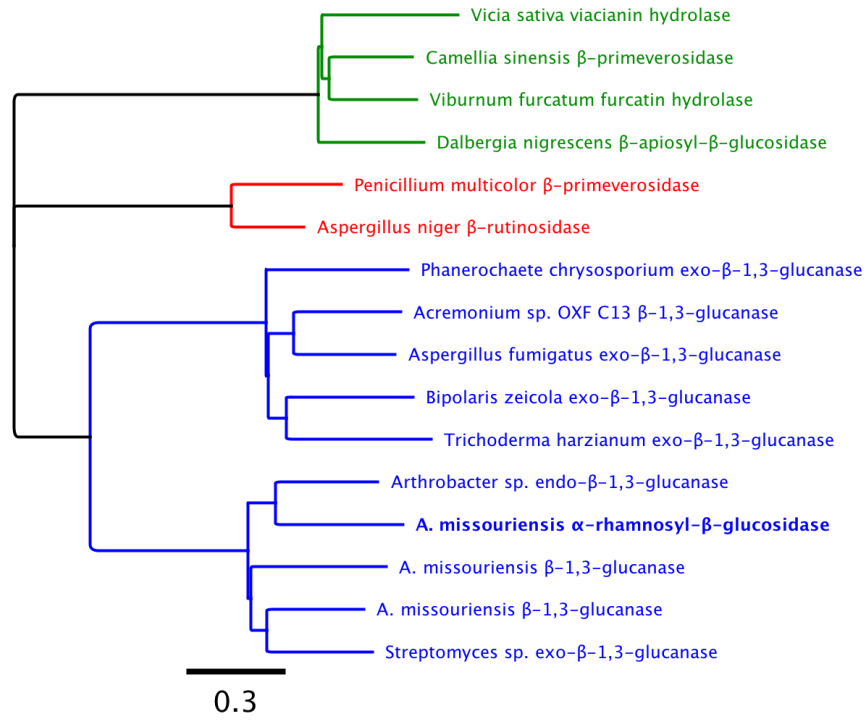


Fig. 3

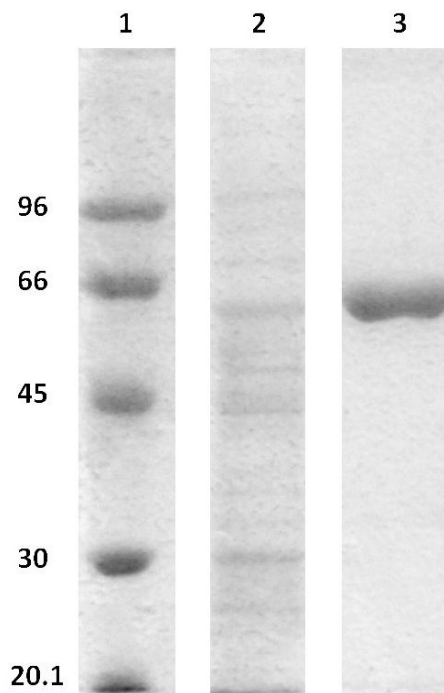


Fig. 4

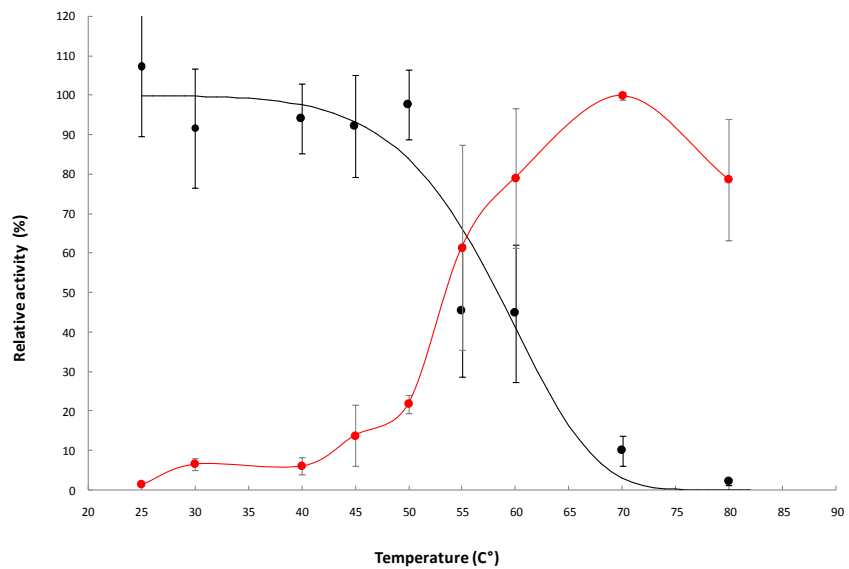


Fig. 5