



Generación de herramientas biotecnológicas para análisis de glicanos biológicos

Lorena Herrera Fuentes

Programa de Maestría en Biotecnología
Facultad de ciencias
Universidad de la República

Montevideo, Uruguay

Octubre de 2024



Generación de herramientas biotecnológicas para análisis de glicanos biológicos

Lorena Herrera Fuentes

Tesis presentada con el objetivo de obtener el título de Magíster en Biotecnología del Programa de Posgrado de Facultad de Ciencias de la Universidad de la República

Directora de tesis: Dra. Cecilia Giacomini

Laboratorio de Bioquímica

Codirectora de tesis: Dra. Paula Rodríguez

Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones

Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Udelar

Tribunal

Dra. Paula González

Dra. Silvana Alborés

Dr. Álvaro Pittini

Montevideo, Uruguay

Octubre de 2024

AGRADECIMIENTOS

“Doy infinitas gracias a Dios por ser mi guía y sostén en este camino, iluminando cada paso hacia la culminación de esta tesis”

Al mismo tiempo quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a mi directora de tesis, Dra. Cecilia Giacomini, por su esfuerzo y dedicación. Sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación en esta maestría.

Asimismo, quiero también agradecer a mi codirectora de tesis, Dra. Paula Rodríguez, por su ayuda y dedicación en todo este proceso.

Las dos, son grandes mujeres y excelentes profesionales. ¡¡¡Muchas gracias por todo!!!

A todo el Laboratorio de Bioquímica y al Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones, del Departamento de Biociencias de la Facultad de Química de la UdelaR, gracias por abrirme sus puertas y a todos los compañeros por ayudarme cuando lo necesité.

A María Eugenia Cedrés, por su colaboración y participación en este proyecto.

A Beatriz Munguía del Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Química, por su tiempo y colaboración cuando tuve que utilizar el ultrasonido para lisar las células, para poder realizar los ensayos enzimáticos.

A los miembros del tribunal, Dra. Paula González, Dra. Silvana Alborés y Dr. Álvaro Pittini, por aceptar evaluar este trabajo.

Al Posgrado en Biotecnología, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República de Uruguay.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), por la Beca de Maestría y el apoyo económico para realizar este posgrado.

A la empresa BioTech Uruguay, por gentilmente donar el Bio-Mos (utilizado como inductor para la búsqueda de α -manosidasas).

Finalmente, pero no menos importante, deseo agradecer a mi esposo Eduardo y a mi hija Isabella por su amor incondicional y apoyo constante. Ustedes han sido mi mayor motivación para seguir siempre adelante. ¡Esta tesis es para ustedes!

RESUMEN

Los glicanos biológicos se encuentran unidos a proteínas o lípidos y desempeñan diversas funciones tanto fisiológicas como patológicas en los seres vivos. Las enzimas activas en carbohidratos, como las glicosiltransferasas y las glicosil hidrolasas, son fundamentales para la síntesis, modificación y degradación de los glicanos complejos. En particular, las α -manosidasas y α -fucosidasas son ejemplos de glicosidasas con la habilidad para hidrolizar enlaces específicos en los glicanos. El estudio de estas enzimas y su aplicación en glicobiología son importantes para comprender la estructura y función de los glicanos, lo que puede tener implicancias en el desarrollo de diagnósticos y tratamientos terapéuticos de patologías mediadas por interacciones glicano-proteínas.

En esta tesis se llevó a cabo un screening para identificar actividad α -manosidasa y α -fucosidasa en microorganismos autóctonos. Se encontró actividad α -manosidasa en bacterias, levaduras y hongos filamentosos y actividad α -fucosidasa en levaduras y hongos filamentosos. Se seleccionó la bacteria *Bacillus* sp. 12.22 y el hongo filamentosos *Dichostereum sordulentum* DS-1488 para evaluar las mejores condiciones para la producción, purificación y caracterización de una α -manosidasa y α -fucosidasa respectivamente.

Se purificó y caracterizó la α -fucosidasa del hongo *Dichostereum sordulentum* DS-1488 con un grado significativo de pureza, aunque a expensas de bajos rendimientos. Se trata de una proteína homodimérica con un peso molecular de 214 kDa, un pH óptimo de 4.0 y una temperatura óptima de 70 °C. Su K_M es 0.27 mM y su V_{Max} de 3,3 μ moles de PNP/min x mg para el sustrato *p*-nitrofenil α -L-fucopiranosido, determinada a pH 4.0 y 37°C. La misma presenta inhibición por sustrato.

Por otra parte, se estudió la purificación de la enzima α -manosidasa de *Bacillus* sp. 12.22. Sin embargo, la pérdida de actividad enzimática durante el proceso de purificación no permitió continuar trabajando con la misma. Como alternativa se seleccionó una α -manosidasa extracelular del hongo *Aspergillus terreus* BFQU 121. Se evaluaron las mejores condiciones de crecimiento de cultivo para maximizar la producción de la enzima a los efectos de continuar trabajando en su purificación en futuras etapas.

Este trabajo contribuyó a la identificación de nuevas enzimas con potencial aplicación en el análisis del rol biológico de los glicanos en las glicoproteínas.

TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Glicanos Biológicos Estructura y función	11
1.1.1. Funciones Fisiológicas.....	12
1.1.2. Funciones patológicas	14
1.2. Enzimas activas en carbohidratos	16
1.2.1. Glicosiltransferasas	16
1.2.2. Glicosil hidrolasas	19
1.2.2.1. Fuentes y funciones de las glicosidasas.....	22
1.3. Glicosidasas como herramientas en glicobiología	23
1.4. Manosidasas	24
1.5. Fucosidasas	25
OBJETIVOS	27
Objetivo general.....	27
Objetivos específicos	27
CAPITULO 2. MATERIALES Y METODOS	28
2.1. Materiales	28
2.2. Cepas estudiadas	28
2.2.1. Bacterias.....	28
2.2.2. Levaduras.....	28
2.2.3. Hongos filamentosos.....	28
2.3. Cultivo de células	29
2.3.1. Bacterias.....	29
2.3.2. Levaduras.....	29
2.3.3. Hongos filamentosos.....	30
2.4. Ensayo de identificación de actividad enzimática	30
2.4.1. Utilizando sustratos cromogénicos	30
2.4.2. Utilizando sustratos no cromogénicos	31
2.4.2.1. Cuantificación de fucosa	31
2.5. Cuantificación de la actividad enzimática	31
2.6. Cuantificación de proteínas	32

2.7. Evaluación de las mejores condiciones de crecimiento de cultivo para maximizar la producción de enzimas	32
2.7.1. Producción de α-manosidasa en bacterias.....	32
2.7.2. Producción de α-manosidasa en hongos	32
2.7.3. Producción de α-fucosidasa en hongos.....	33
2.8. Estudio de la influencia de iones en la actividad α-manosidasa.....	34
2.9. Purificación de las enzimas identificadas	34
2.9.1. Precipitación fraccionada con sulfato de amonio.....	34
2.9.2. Precipitación con solventes.....	34
2.9.3. Intercambio iónico.....	35
2.9.4. Cromatografía de exclusión molecular	35
2.9.5. Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE).....	35
2.10. Caracterización de la α-fucosidasa de <i>Dichostereum sordulentum</i> DS-1488	36
2.10.1. Determinación de Peso Molecular	36
2.10.2. Determinación de pH óptimo	36
2.10.3. Determinación de temperatura óptima	36
2.10.4. Determinación de parámetros cinéticos	36
CAPÍTULO 3. SCREENING DE α-MANOSIDASA Y α-FUCOSIDASA EN MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS	37
3.1. Introducción	37
3.2. Resultados.....	38
3.2.1. Screening de actividad α-manosidasa y α-fucosidasa.....	38
3.2.2. Evaluación de las mejores condiciones de crecimiento de cultivos de <i>Bacillus</i> sp. 12.22 y <i>Bacillus</i> sp. X para maximizar la producción de α-manosidasa.....	41
3.2.3. Evaluación de las mejores condiciones de crecimiento de cultivos de <i>Fusarium</i> sp. Y3 y <i>Dichostereum sordulentum</i> DS-1488 para maximizar la producción de α-fucosidasa	44
CAPÍTULO 4. PURIFICACIÓN DE α-FUCOSIDASA	47
4.1. Introducción	47

4.2. Resultados.....	47
4.2.1. Purificación de α -fucosidasa de <i>Dichostereum sordulentum</i> DS-1488....	47
4.2.2. Caracterización de la α -fucosidasa de <i>Dichostereum sordulentum</i> DS-1488.....	54
4.2.2.1. Determinación de Peso Molecular	54
4.2.2.2. Determinación de condiciones óptimas	55
4.2.2.3. Determinación de parámetros cinéticos	56
CAPÍTULO 5. PURIFICACIÓN DE α-MANOSIDASA.....	58
5.1. Introducción	58
5.2. Resultados.....	58
5.2.1. Purificación de α -manosidasa de <i>Bacillus</i> sp. 12.22.....	58
5.2.2. Evaluación de actividad α -manosidasa en sobrenadante de cultivo de levaduras y hongos	66
5.2.3. Evaluación de las mejores condiciones de crecimiento de cultivos de <i>Aspergillus terreus</i> BFQU 121 para maximizar la producción de α -manosidasa	67
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	69
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXOS	80
ANEXO I – 1. Tabla de diseño de experimento de <i>Bacillus</i> sp. 12.22	81
ANEXO I – 2. Tabla de diseño de experimento de <i>Bacillus</i> sp. X	82
ANEXO I – 3. Tabla de diseño de experimento de <i>Aspergillus terreus</i> BFQU 121	83
ANEXO I – 4. Tabla de diseño de experimento de <i>Dichostereum sordulentum</i> DS-1488	84
ANEXO I – 5. ANOVA para el modelo factorial seleccionado para <i>Bacillus</i> sp. 12.22	85
ANEXO I – 6. ANOVA para el modelo factorial seleccionado para <i>Bacillus</i> sp. X	85
ANEXO I – 7. ANOVA para el modelo factorial seleccionado para <i>Dichostereum sordulentum</i> DS-1488	86

ANEXO I – 8. ANOVA para el modelo factorial seleccionado para <i>Aspergillus terreus</i> BFQU 121	86
PUBLICACIÓN DERIVADA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ESTA TESIS	87
FINANCIACIÓN	88

ABREVIATURAS

AE: Actividad Específica

BCA: Acido Bicinconínico

BSA: Albúmina de Suero Bovino (De sus siglas en inglés)

CAZymes: Carbohydrate Active enZymes

Da: Dalton

GalNAc: *N*-acetil galactosamina

GH: Glicosil Hidrolasas

GlcNAc: *N*-acetil glucosamina

GT: Glicosil Transferasas

KDa: Kilo Dalton

K_M: constante de Michaelis- Menten

LB: Luria Bertani

M: concentración molar

mM: concentración milimolar

nm: nanómetro

PBS: Buffer Fosfato Salino

PDA: Potato Dextrose Agar

PDB: Potato Dextrose Broth

PGM: Mucina Gástrica Porcina

PM: Peso Molecular

PNP: *p*-nitrofenol

PNPF: *p*-nitrofenil α -L-fucopiranosido

PNPM: *p*-nitrofenil- α -D-manopiranosido

RE: Retículo Endoplásmico

rpm: revoluciones por minuto

SC: Sobrenadante de Cultivo

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
(Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)

TSA: Trypto-Casein Soy Agar

UI o (U): unidades internacionales de actividad enzimática

V_{máx}: Velocidad Máxima

Vol: Volumen

μg: microgramos

μL: microlitros

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Glicanos Biológicos Estructura y función

Los glicanos que componen las glicoproteínas o glicolípidos secretados por la célula o anclados a membrana cumplen diversos roles biológicos. Estos se pueden subdividir en estructurales y funcionales o moduladores (Figura 1.1).

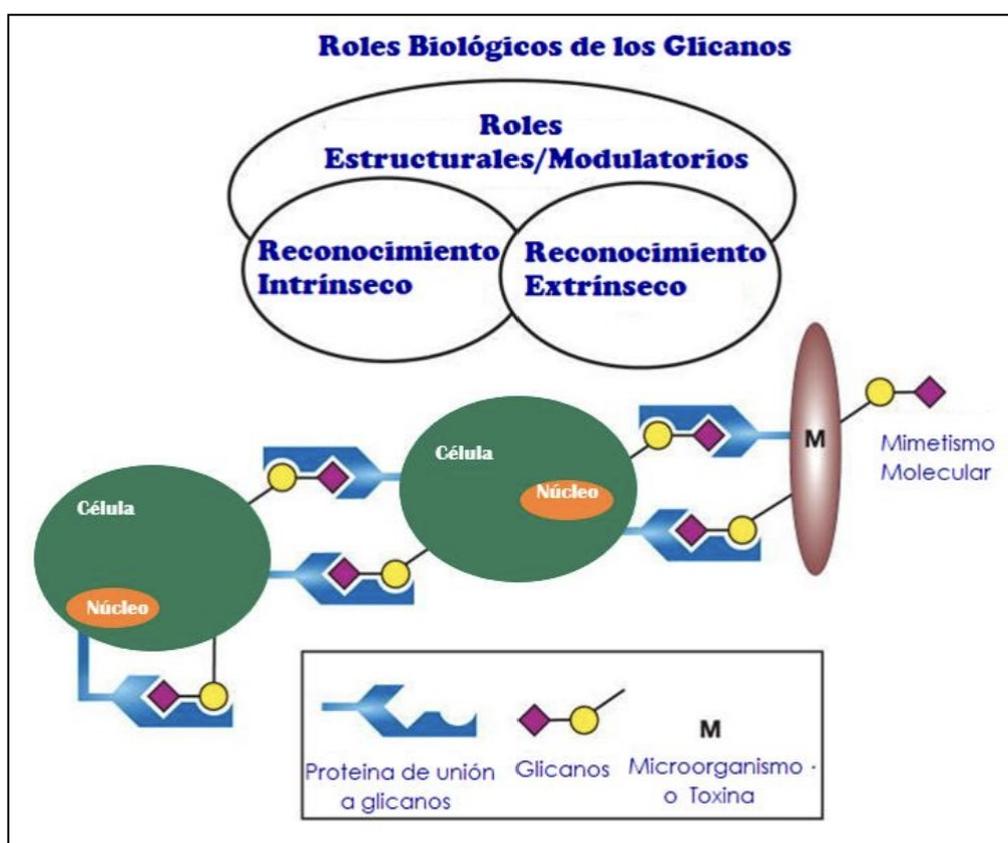


Figura 1.1. Clasificación general de las funciones biológicas de los glicanos. Modificado de [1]

En casi todas las células eucarióticas, las cadenas de oligosacáridos específicos unidas a los componentes de las membranas plasmática forman una capa glucídica conocida como glicocálix. Esta presenta varios nanómetros de espesor y constituye una superficie rica en información que la célula expone a su entorno. La N- y O-glicosilación de proteínas son el tipo de glicosilación más frecuentes en este tipo de células [2-3]. Los N-glicanos generalmente se encuentran unidos mediante un enlace amida a un residuo de asparagina ubicado en una secuencia Asn-X-Ser/Thr (donde X es un aminoácido distinto de prolina). Estos glicoconjugados poseen un núcleo conservado (α -Man(1→3)[α -Man(1→6)] β -Man(1→4) β GlcNAc(1→4) β GlcNAc) al que se unen un número variable de monosacáridos. De acuerdo a su estructura los mismos se pueden clasificar en: glicanos

con alto contenido de manosa, complejos o híbridos (Figura 1.2) [2-5]. Por otra parte, en la O-glicosilación los glicanos se encuentran unidos al oxígeno de un grupo hidroxilo de Serina (Ser) o Treonina (Thr) y pueden clasificarse en función del azúcar directamente unido a la proteína y los azúcares utilizados para su elongación. Los O-glicanos de tipo mucina poseen un residuo de GalNAc unido a un residuo de Ser/Thr pudiendo ser elongados formando diferentes Cores. Por otro lado, la unión de β -GlcNAc a un residuo de Ser/Thr se encuentra en proteínas nucleares o del citoesqueleto (Figura 1.2) [2-5]. Ambos tipos de glicanos también pueden encontrarse unidos a lípidos tales como ceramidas [4]. La C manosilación es un evento menos frecuente que se ha observado en mamíferos, generalmente humanos y otros animales, pero no en plantas, hongos, levaduras o procariontes [2,5].

Estos glicanos juegan un papel central en diversas funciones tanto fisiológicas como patológicas [1-2].

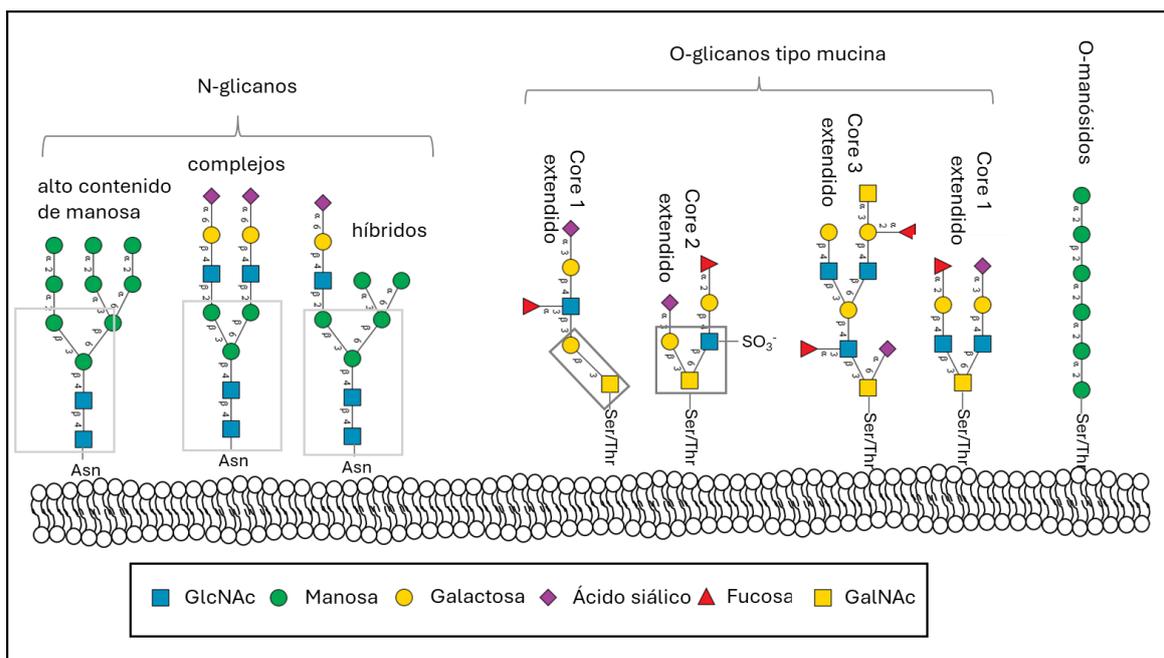


Figura 1.2 Representación de los glicanos más característicos.

1.1.1. Funciones Fisiológicas

Los glicanos biológicos presentan funciones protectoras, estabilizadoras, organizativas y de barrera. El glicocálx que cubre las células eucariotas como la celulosa en las plantas y la quitina en los hongos, al igual que los polisacáridos que recubren varias células procariontes representan una barrera física sustancial. En los organismos multicelulares, los glicanos que componen la matriz extracelular como los proteoglicanos, son importantes para el mantenimiento de la estructura, porosidad e integridad de los tejidos.

Dichas moléculas también pueden contener sitios de unión para otros glicanos específicos, lo que ayuda a la organización general de la matriz. Por otro lado, en las glicoproteínas los glicanos que se encuentran sobre su superficie pueden protegerla de la acción de las proteasas como es el caso de las mucinas o del reconocimiento de los anticuerpos del huésped como en las glicoproteínas virales. Otra función estructural de los glicanos es su participación en el plegamiento de polipéptidos recién sintetizados en el retículo endoplásmico (RE) y/o en el mantenimiento posterior de la solubilidad y conformación de las proteínas [1-2]. Por otro lado, a nivel de metabolismo energético los carbohidratos forman parte de las moléculas de almacenamiento como el almidón en las plantas o glucógeno en los animales [6].

Finalmente, a nivel funcional, los glicanos participan en procesos enzimáticos o de reconocimiento biológico como la interacción célula-célula, célula-matriz extracelular, fundamentales en la modulación de la respuesta inmune, desarrollo embrionario, diferenciación e interacción huésped patógeno. A modo de ejemplo, muchos de los receptores de membrana son proteínas de unión a glicanos (GBP de sus siglas en inglés) también conocidas como lectinas. Los primeros en ser identificados en animales fueron las proteínas de unión a glicano que median la eliminación, recambio y tráfico intracelular de glicoproteínas plasmáticas, mediante el reconocimiento específico de glicanos terminales o subterminales de las mismas. Por otra parte, los glicanos de las glicoproteínas participan en su marcado para dirigirlos a su destino final como en el caso de las proteínas lisosomales donde la presencia de un residuo terminal de manosa-6-fosfato constituye la señal que las dirige al lisosoma.

Muchos de los receptores expresados en células del sistema inmunológico innato o adaptativo reconocen glicanos de la superficie de microorganismos conocidos como PAMPs (Pathogen Associate Molecular Patterns) tales como lipopolisacáridos o peptidoglucanos bacteriano, polisacárido capsular o los mananos fúngicos, desencadenando de esta forma una respuesta inmunológica. Por otra parte, las interacciones entre las células endoteliales y los leucocitos son cruciales para el tráfico y reclutamiento de los leucocitos en los lugares de daño celular y se encuentran mediados por las selectinas. Las selectinas son lectinas de tipo C que reconocen en forma específica glicanos sialilados y fucosilados. A su vez las selectinas participan en la implantación de los embriones en el endometrio [1,3].

1.1.2. Funciones patológicas

Teniendo en cuenta el rol fisiológico de glicanos previamente descrito, la existencia de patrones de glicosilación alterados se encuentra relacionada con diversas enfermedades tales como desórdenes congénitos de la glicosilación, enfermedades autoinmunes, infecciosas o inflamatorias crónicas al igual que el cáncer [2-3,7-11].

Los desórdenes congénitos de la glicosilación (CDGs de sus siglas en inglés) se clasifican en tipo I y II. Los de tipo I son causados por anomalías en la síntesis del oligosacárido precursor unido a dolicol fosfato en el paso previo a su unión al residuo Asn de la proteína afectada que tiene lugar en el retículo endoplasmático. Esto es causado por defectos en las glicosiltransferasas que participan de este proceso. Por otro lado, los CDG de tipo II involucran defectos en el control de la ramificación de los N-glicanos durante las modificaciones postraduccionales de las proteínas. Las CDG generalmente presentan manifestaciones severas ya que afectan el desarrollo muscular al igual que funciones neurológicas [3,8].

Las enfermedades inflamatorias crónicas vienen dadas por fallas en los mecanismos involucrados en la regulación de la glicosilación celular tanto de ligandos como receptores que participan de la respuesta inflamatoria. Por ejemplo, las inmunoglobulinas son componentes claves de la inmunidad humoral y se han identificado patrones alterados de la glicosilación en algunas isoformas de inmunoglobulina en enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoidea o el lupus sistémico eritematoso [3].

En los procesos infecciosos de tipo parasitario o viral, los glicanos se encuentran involucrados tanto en la propagación de la infección como en la evasión de la respuesta inmune del hospedero [10-12]. Existen evidencias con relación a la participación de glicoproteínas virales en la evasión de la respuesta inmune (HIV e influenza) al igual que en procesos infectivos (Hendra, SARS-CoV, SARS-CoV2, influenza, hepatitis), en particular vinculados a los N-glicanos con alto contenido de manosa [10,13]. Por otro lado, existen evidencias de que los glicanos de los helmintos afectan las vías de señalización de las células del sistema inmune. De hecho, se ha reportado el uso de componentes parasitarios para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas al igual que enfermedades autoinmunes [14,15]. A su vez, resultados de nuestro grupo de investigación sugieren que los residuos de manosa terminal de los glicanos producidos por el helminto *Fasciola hepática* serían importantes tanto en la inhibición de la

maduración de células dendríticas (CD) como en la inducción de una respuesta inmune de tipo regulatoria en este parásito [16-18].

Los glicanos también se encuentran involucrados en la generación de procesos tumorales donde el crecimiento de las células tumorales depende de su habilidad para eludir los puntos de control de la división celular, evadir las señales de muerte celular y la vigilancia del sistema inmunológico al igual que su capacidad de generación de metástasis. La glicosilación está involucrada en todos estos procesos. A modo de ejemplo, la señalización anormal de los factores de crecimiento es un factor clave en el desarrollo del cáncer que puede ser controlado por la glicosilación de ligandos y receptores. Los patrones de glicosilación han sido los primeros biomarcadores para la detección del cáncer. Los patrones de glicosilación alterados incluyen un aumento en las estructuras sialyl Lewis, fucosilación anormal en el núcleo de los N-glicanos, un aumento en la ramificación de los N-glicanos o exposición del antígeno Tn. Muchos de estos patrones de glicosilación alterada han sido denominados oncofetales ya que se asemejan a los patrones observados en etapas tempranas del desarrollo. Teniendo en cuenta que el cáncer evoluciona a lo largo de las distintas etapas de la enfermedad su patrón glicosídico puede variar en paralelo con los cambios en el metabolismo celular. Este fenómeno incluye la glicosilación truncada de los *O*-glicanos dando lugar al antígeno Tn y la neosíntesis que produce patrones de glicosilación anormal como las estructuras sialyl Lewis X. Estos gliconeoantígenos generalmente reservados para la extravasación de los linfocitos desde la sangre se encuentran comúnmente en las células cancerígenas y son los que facilitan su propagación en procesos metastásicos [3,9].

Dentro de los cambios en los patrones de glicosilación más frecuentemente asociados al cáncer se encuentran alteraciones en la sialilación y/o fucosilación en *N*- y *O*-glicanos, generación de *O*-glicanos trancos y ramificación de *O*-glicanos [3,19]. En particular se ha reportado la presencia del antígeno S_{Lex}, Lex y ley que contienen α 1-3 fucosa (Figura 1.3), como marcador tumoral al igual que un aumento en la fucosilación α 1-6 en el core de *N*-glicanos en líneas celulares de cáncer de mama y colon [20-22]. A su vez, se han reportado alteraciones en los niveles de *N*-glicanos con alto contenido de manosa en líneas tumorales de cáncer de ovario e hígado [21, 23].

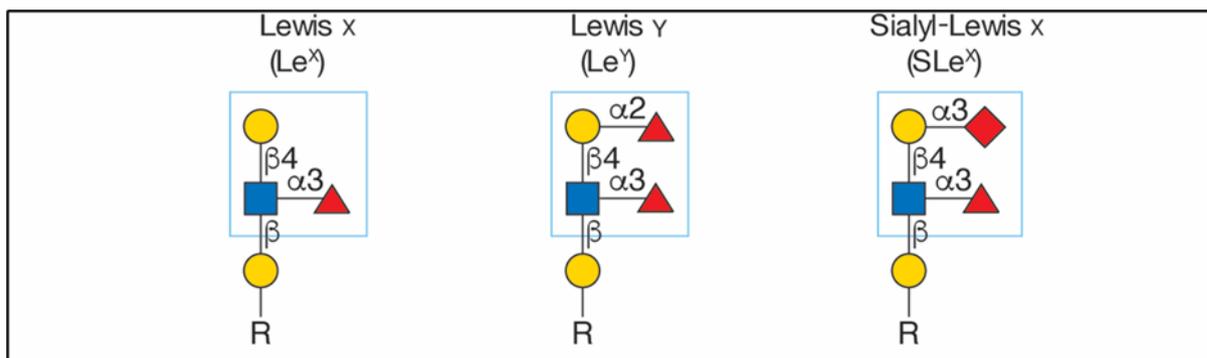


Figura 1.3. Estructura de antígenos de grupo sanguíneo Lewis.

1.2. Enzimas activas en carbohidratos

Las enzimas activas en carbohidratos (CAZymes, del inglés Carbohydrate-Active enZymes) son aquellas que participan tanto en la síntesis como en la ruptura o modificación de carbohidratos complejos. La enorme diversidad de estas enzimas se debe a que los oligosacáridos, a diferencia de los oligopéptidos y oligonucleótidos que son polímeros lineales, en general son moléculas complejas ramificadas. Esta complejidad viene dada por el hecho de que los monosacáridos son moléculas polihidroxiladas que pueden ciclarse en estructura piranosa o furanosa y en conformación α o β . Pueden unirse mediante enlaces glicosídicos en distinto orden y a través de distintas posiciones y con diversas posibilidades de ramificaciones. Por otra parte, pueden estar unidas a otras moléculas como por ejemplo proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y antibióticos.

Las enzimas activas en carbohidratos incluyen a las glicosil hidrolasas (GH), glicosil transferasas (GT), polisacárido liasas (PL), carbohidrato esterasas (CE) y la familia que se une a módulos de carbohidratos (CBM). De ellas las más utilizadas en glicobiología son las glicosil hidrolasas y glicosil transferasas [24].

1.2.1. Glicosiltransferasas

Las glicosiltransferasas son enzimas que catalizan la formación de un enlace glicosídico entre un azúcar y un aceptor que puede ser una biomolécula incluyendo otros azúcares, proteínas, lípidos o pequeñas moléculas. El dador de azúcar es un azúcar activado que generalmente se encuentra unido a un nucleótido, pero, puede también encontrarse unido a un fosfolípido o a un fosfato no sustituido (Figura 1.4) [25-27].

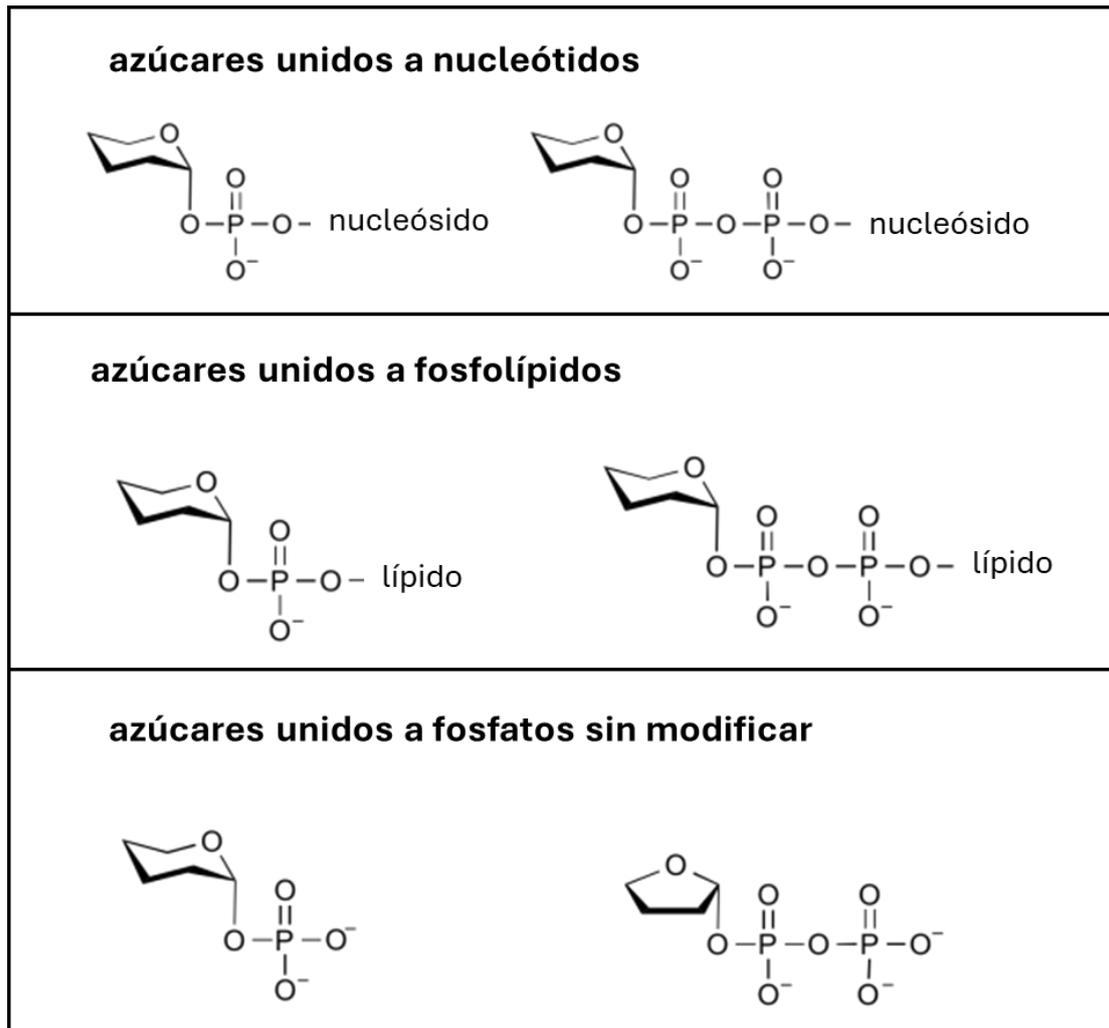


Figura 1.4 Sustratos dadores de glicosiltransferasas.

En el caso de los dadores unidos a nucleótidos en general se trata de nucleósidos difosfato como por ejemplo UDP-galactosa o GDP-manosa. Sin embargo, también son utilizados los azúcares unidos a nucleósidos monofosfato como el CMP-ácido neuramínico. Las glicosiltransferasas dependientes de azúcares activados por nucleótidos generalmente se conocen como enzimas Leloir en honor a Luis F. Leloir que descubrió el primer azúcar nucleótido ganando el premio nobel en 1970 por su contribución a la comprensión de la biosíntesis de los glicósidos y el metabolismo de los azúcares. Las glicosiltransferasas no Leloir utilizan como sustratos dadores de azúcares unidos a un lípido como el dolicol fosfato unido a manosa o glucosa. En algunos casos el dolicol fosfato puede encontrarse unido a un oligosacárido, en cuyo caso se transfiere el oligosacárido completo al sustrato aceptor como ocurre en las modificaciones co-traduccionales de las glicoproteínas que tienen lugar en el retículo endoplasmático. Algunas glicosiltransferasas de plantas

también utilizan como sustratos dadores azúcares unidos a lípidos para la síntesis de los peptidoglicanos y lipopolisacáridos [25,27].

Por otro lado, los sustratos aceptores utilizados por las glicosiltransferasas son generalmente otros azúcares, pero también pueden ser lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, antibióticos u otras moléculas pequeñas. Si bien la transferencia de la molécula de azúcar generalmente se da a un grupo alcohol de la molécula aceptora, también podría transferirse a un nitrógeno dando lugar a la formación de N-glicanos en glicoproteínas o a un azufre para la formación de tioglicósidos en las plantas o a un carbono para la formación de C-glicósidos en antibióticos [27].

Aproximadamente el 1% de los genes del genoma de los mamíferos se encuentra involucrado en la producción o modificación de glicanos. Se conocen más de 750.000 secuencias de glicosiltransferasas considerando todos los reinos y este número está creciendo rápidamente. En base al análisis de secuencia se han agrupado en más de 110 familias de glicosiltransferasas que se describen en la base de datos de las enzimas activas en carbohidratos CAZy (<http://www.cazy.org/>). La estructura terciaria al igual que el mecanismo de acción se mantienen dentro de la misma familia, sin embargo, la especificidad de sustrato es difícil de predecir y requiere de la caracterización individual de cada enzima. La determinación tanto del azúcar donador como de la molécula aceptora es complejo, siendo una de las razones por las que las glicosiltransferasas se encuentran menos caracterizadas que las glicosil hidrolasas [25-26].

En cuanto a su mecanismo de acción las glicosiltransferasas se pueden clasificar en aquellas que mantienen o invierten la configuración anomérica (Figura 1.5) [27].

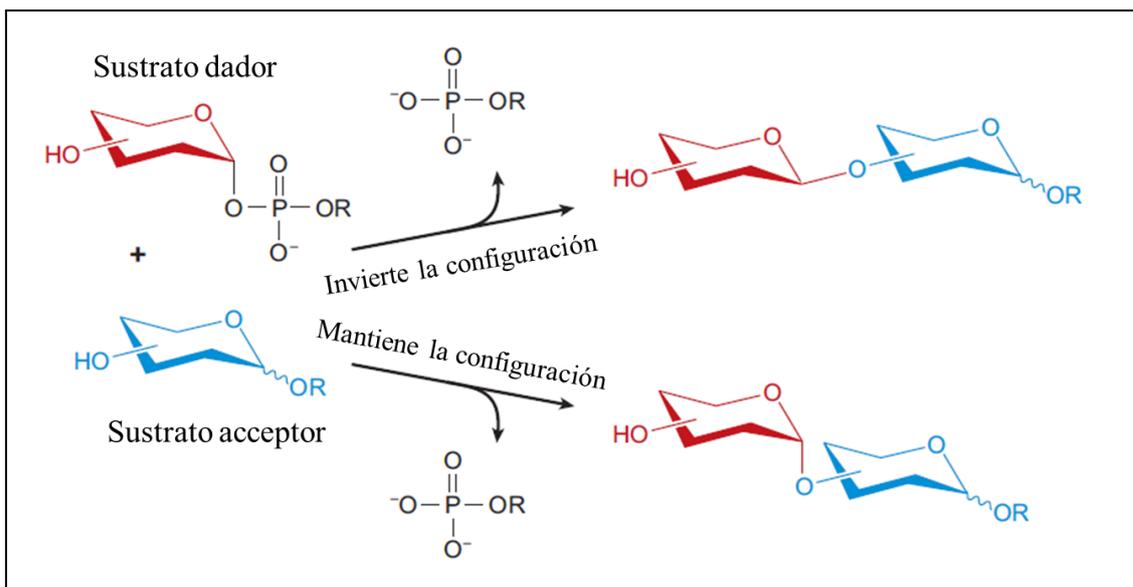


Figura 1.5 Clasificación de acuerdo con el mecanismo catalítico de las glicosil transferasas. Modificado de [27]

1.2.2. Glicosil hidrolasas

Las glicosil hidrolasas también conocidas como glicosidasas son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace glicosídico de los glicósidos, conduciendo a la formación de un azúcar hemiacetal y la correspondiente aglicona libre (Figura 1.6). Pueden catalizar la hidrólisis de O, N y S glicósidos [28-29].

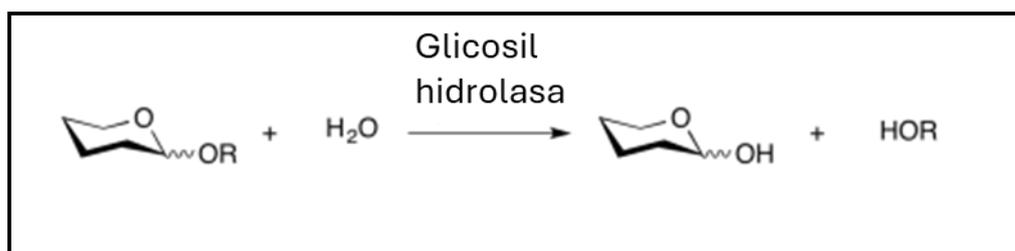


Figura 1.6 Reacción catalizada por una glicosil hidrolasa.

Las glicosidasas se pueden subdividir en dos grupos de acuerdo con su mecanismo de acción: i) aquellas que hidrolizan el enlace glicosídico con una inversión neta de la configuración del carbono anomérico y ii) las que hidrolizan el enlace glicosídico reteniendo la configuración del carbono anomérico. Las que invierten la configuración del carbono anomérico siguen un mecanismo de desplazamiento simple en un solo paso involucrando un estado de transición del tipo oxocarbonio (Figura 1.7 B). Por otro lado, las que retienen la configuración del carbono anomérico, utilizan un mecanismo de doble

desplazamiento involucrando un intermediario glicosil-enzima. En cada paso tiene lugar un estado de transición del tipo oxocarbonio (Figura 1.7 A).

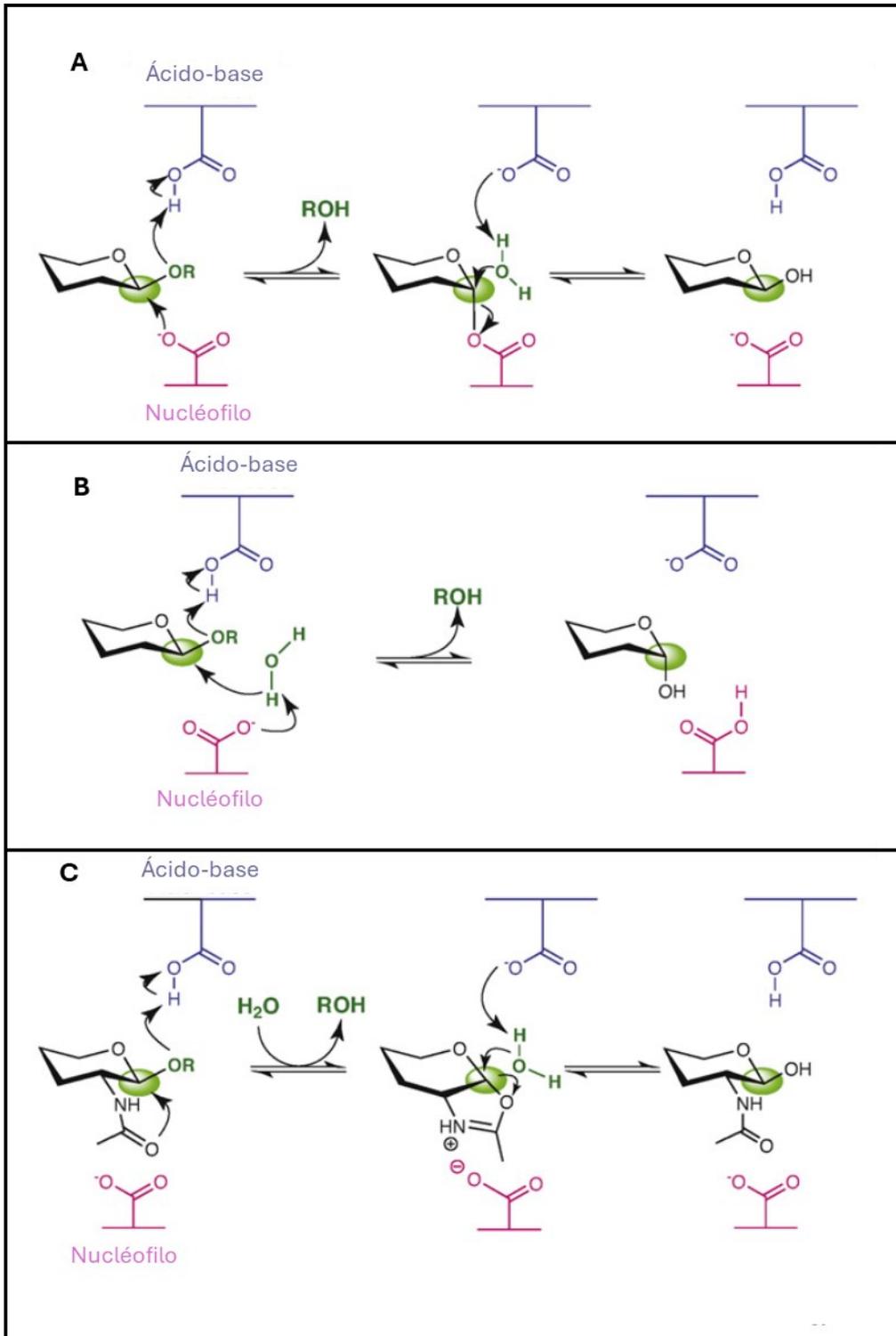


Figura 1.7 Mecanismos catalíticos de las glicosidasas. A) retienen la configuración del carbono anomérico; B) invierten la configuración del carbono anomérico; C) Requieren la participación del grupo vecino 2-acetamida. Modificado de [30]

En ambos casos participan un par de residuos de ácido carboxílicos en el sitio activo. En las enzimas que invierten la configuración del carbono anomérico uno de los residuos actúa como ácido y el otro como base, mientras que en aquellas que retienen la configuración del carbono anomérico uno de los ácidos carboxílicos actúa como ácido y base mientras que el otro funciona como nucleófilo. Las glicosidasas que hidrolizan sustratos conteniendo un grupo N-acetamida en la posición 2, utilizan un mecanismo en el que el grupo 2-acetamida lidera la formación de un intermediario del tipo ion ozazolinio (Figura 1.7 C) [28,30-31].

Las glicosil hidrolasas se pueden clasificar de formas diferentes dependiendo del criterio seleccionado.

Clasificación basada en el sitio de corte (Endo/Exo)

La clasificación *exo-* y *endo-* se refiere a la capacidad de una glicosil hidrolasa para hidrolizar un enlace glicosídico de un sustrato desde un extremo (con mayor frecuencia, pero no siempre desde el extremo no reductor) o al interior de una cadena polisacáridica. Por ejemplo, la mayoría de las celulasas son *endoglicosidasas*, mientras que la β -galactosidasa es una *exoglicosidasa* (Figura 1.8) [29,30,32].

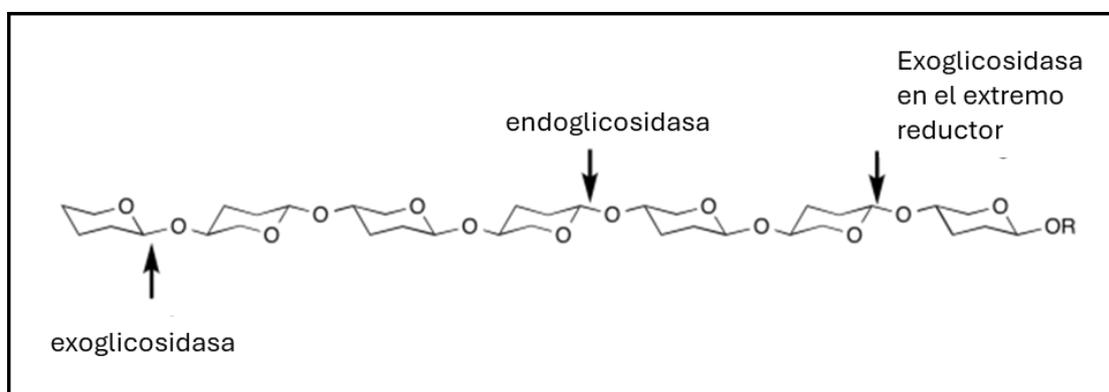


Figura 1.8 Endo y Exoglicosidasas

Clasificación basada en la especificidad de sustrato

La nomenclatura de enzimas de la IUBMB (Comité de Unión internacional de Bioquímica y Biología molecular) establecida en 1984 se basa en el tipo de reacción catalizada por una enzima y en la especificidad de sustrato. Para las *O*-glicosidasas o glicosil hidrolasas (EC 3.2.1.X), los primeros tres dígitos indican que estas enzimas hidrolizan enlaces *O*-glicosídicos mientras que el último dígito indica el sustrato y en algunos casos refleja el mecanismo molecular (<https://www.enzyme->

database.org/class.php). Esta clasificación es muy útil, especialmente para evitar ambigüedades y la proliferación de nombres fantasía proveyendo una única clasificación. Sin embargo, al menos en el caso de las glicosil hidrolasas dicha clasificación no necesariamente refleja los aspectos estructurales de estas enzimas en función de su evolución. Para solucionar este problema se introdujo una nueva clasificación basada en la similitud de secuencia y el plegamiento de la proteína como se describe a continuación [33-34].

Clasificación basada en similitud de secuencia

Las glicosil hidrolasas se han clasificado (familia GH) de acuerdo con su secuencia y por ende a su estructura. A la fecha en la base de datos CAZy (<http://www.cazy.org/>) se han reportado 189 familias GH. Generalmente el mecanismo catalítico se mantiene dentro de una misma familia GH a excepción de la familia GH97 que agrupa glicosidasas que retienen la configuración del carbono anomérico y otras que lo invierten. En esta clasificación, enzimas con diferente especificidad de sustrato pueden encontrarse en una misma familia indicando una divergencia en su evolución para adquirir nuevas especificidades. Por otra parte, enzimas que hidrolizan el mismo sustrato pueden pertenecer a diferentes familias. Por ejemplo, se han encontrado celulasas en 11 familias diferentes. A su vez las familias se agrupan en clanes donde un clan es un grupo de familias que poseen una similitud significativa en su estructura terciaria, residuos catalíticos y mecanismo. Se cree que las familias dentro de los clanes tienen un ancestro evolutivo común. La estructura tridimensional más frecuente en las glicosidasas es la del barril $(\alpha/\beta)_8$, barril α/α , barril β y estructura β sándwich [<http://www.cazy.org/>] 29,31,35-36].

1.2.2.1. Fuentes y funciones de las glicosidasas

Las glicosidasas son enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza tanto en forma intra- como extracelular. Tienen diversas funciones donde la mayoría actúan en procesos de digestión de carbohidratos extracelulares a sus monosacáridos más simples. También a nivel intracelular cumplen funciones degradativas como la degradación endógena de glucógeno para obtención de energía o el recambio de los carbohidratos complejos a nivel del lisosoma. Por otra parte, hay un grupo de glicosidasas intracelulares que participan en las modificaciones co- y postraduccionales de las glicoproteínas, proceso que tiene lugar en el retículo endoplasmático y en el aparato de

Golgi. Se han aislado glicosidasas de plantas, microorganismos y organismos superiores [28, 37-39].

1.3. Glicosidasas como herramientas en glicobiología

Teniendo en cuenta el rol de los glicanos biológicos tanto en procesos fisiológicos como patológico, como fue descrito previamente, la elucidación de su estructura y función es fundamental para el diseño de métodos de diagnósticos y tratamientos terapéuticos [3,21]. En los últimos años ha habido grandes avances en las técnicas de glicoproteómica, lo que ha hecho posible un avance en la caracterización estructural de los glicanos [4,40-44]. En este sentido las endo y exoglicosidasas son excelentes herramientas en el análisis glicómico ya que acopladas al análisis por espectrometría de masas contribuyen a la elucidación estructural de los glicanos y en particular la identificación del enlace glicosídico [44]. A su vez, su funcionalidad se ve potenciada al utilizarse en forma inmovilizada, dado que sumado a su capacidad de remover en forma selectiva residuos terminales de monosacáridos sin alterar la estructura proteica de la glicoproteína, pueden separarse fácilmente del medio de reacción. Esto evita su interferencia con ensayos biológicos posteriores, lo que es esencial para estudiar cambios en la función biológica de la glicoproteína asociada a los glicanos [45-48].

Un aspecto para considerar es que el uso de exoglicosidasas para análisis glicómico requiere enzimas con un alto grado de pureza específicas para la remoción de los monosacáridos más relevantes en los glicanos biológicos y cuya especificidad de sustrato esté bien definida. A su vez, si se va a utilizar para la elucidación del rol de los glicanos en procesos biológicos específicos, las condiciones óptimas de actividad de la glicosidasa deben ser compatibles con las de la muestra biológica a estudiar. En general las glicosidasas comerciales utilizadas en el análisis glicómico tienen una actividad máxima a pHs ácidos cuando la mayoría de las glicoproteínas son estables a pHs neutros. Si bien esto no resulta un problema cuando se utilizan asociadas a estudios de espectrometría de masa de los glicanos donde la integridad del esqueleto proteico no es relevante, si lo es en estudios de funcionalidad [20,40,49-52]. Las exoglicosidasas disponibles a nivel comercial no cubren toda la gama de exoglicosidasas que serían necesarias para una secuenciación completa de la estructura de un glicano [53]. En este contexto resulta interesante contribuir al aislamiento de nuevas glicosidasas. Considerando la composición de azúcares de las cadenas glicosídicas de la mayoría de las glicoproteínas, las exoglicosidasas más utilizadas son α -manosidasa, α -fucosidasa, β -galactosidasa y

sialidasa o neuraminidasa, que liberan residuos de manosa, fucosa, galactosa y ácido siálico, respectivamente [54]. Las alfa-manosidasas y las alfa-fucosidasas adquieren relevancia en función del rol que cumplen los glicanos fucosilados y/o manosilados en procesos tumorales y de infección parasitaria o viral [3, 10,16-23].

1.4. Manosidasas

Las α -manosidasas (α -D-manósido mano hidrolasa EC 3.2.1.24) son glicosidasas con especificidad para la hidrólisis de unidades de α -manosa terminales y juegan un rol importante en el procesamiento de glicanos con alto contenido de manosa. Si bien se les ha asignado el número EC 3.2.1.24 de la nomenclatura del Comité de Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, a aquellas con una especificidad definida para un tipo de enlace glicosídico se les han asignado los siguientes números: EC 3.2.1.77 a las específicas para la hidrólisis de enlaces α 1-2 y α 1-3; EC 3.2.1.113 a las que hidrolizan solo enlaces α 1-2; EC 3.2.1.114 a las que hidrolizan enlaces α 1-3 y α 1-6 y EC 3.2.1.137 a las que hidrolizan enlaces α 1-2 y α 1-6. Hasta el momento no se han incluido en la clasificación α -manosidasas con especificidad exclusiva para la hidrólisis de enlaces α 1-6 o para la hidrólisis de enlaces α 1-3 [55-56, <https://www.enzyme-database.org/class.php>].

Las α -manosidasas se pueden clasificar en dos clases, I y II. Las de clase I se encuentran distribuidas en los grupos GH38, GH47 y GH92 de las glicosil hidrolasas de la base de datos CAZy (Carbohydrate Active Enzymes) [35, <http://www.cazy.org/>]. Presentan un mecanismo catalítico que invierten la configuración en el carbono anomérico, son específicas para la ruptura de enlaces α -1-2 y son inhibidas por kifunesina y 1-deoxymanojirimicina. Por otro lado, las α -manosidasas de Clase II en su mayoría pertenecen al grupo GH38 de las glicosil hidrolasas y presentan un mecanismo catalítico que mantiene la configuración del centro anomérico. Poseen un amplio rango de capacidad catalítica hidrolizando enlaces α 1-2, 1-3 y 1-6 y son inhibidas por swainsonina [5,57-62]. Las α -manosidasas son ubicuas y se pueden purificar de plantas, animales y microorganismos [59,63]. Dentro de los microorganismos se ha reportado la producción de α -manosidasas en bacterias, hongos y levaduras. En bacterias en los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium* y *Cellulomonas*. En los hongos mayoritariamente está descrito en el género *Aspergillus* (*Aspergillus niger*, *Aspergillus saitoi* y *Aspergillus oryzae*) pero también se ha reportado en el género

Penicillium y en el moho mucilaginoso *Dictyostelium* por otro lado, en levaduras se han estudiado α -manosidasas en *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans* [61,63-65].

Las α -manosidasas son inducibles utilizando mananos o extractos de levadura como fuente de carbono. Los mananos de levadura son polisacáridos altamente ramificados, constituidos por una cadena principal de manosas unidas por enlace α 1-6 con ramificaciones de manosas unidas por enlace α 1-2 y α 1-3 [5,63].

La mayoría de las α -manosidasas microbianas presentan un pH óptimo en el rango de 5-7, una temperatura óptima de 40-50 °C, son estables en un pH neutro o alcalino y su punto isoeléctrico es levemente ácido. Generalmente son proteínas oligoméricas compuestas por cuatro o seis subunidades con un alto peso molecular [63].

1.5. Fucosidasas

Las α -fucosidasas (EC 3.2.1.51) son glicosidasas con especificidad para la hidrólisis de unidades de α -L-fucosa terminales de glicoproteínas y glicolípidos. La α -L-fucosa se encuentra frecuentemente en el extremo no reductor de los glicanos biológicos de las glicoproteínas séricas, inmunoglobulinas, mucinas gástricas y submaxilares, hormonas gonadotrópicas y en la superficie de los antígenos de carácter sacarídico que se encuentran en la superficie de los eritrocitos. También se encuentran presentes en los oligosacáridos de la leche humana y bovina y en gomas de plantas [66-69]. Por lo tanto, las α -fucosidasas juegan un rol importante en el procesamiento de glicanos fucosilados, en particular en la degradación de glicanos intestinales en aquellas que provienen de microorganismos que se alojan en el intestino [70-72]. Estas enzimas se han reportado en bacterias, hongos, plantas al igual que en mamíferos. Su especificidad para la hidrólisis de residuos de α -L-fucosa unida por diferente configuración depende de su origen. Mientras que las provenientes de tejidos de mamíferos presentan una amplia especificidad de sustrato e incluso pueden hidrolizar *p*-nitrofenil α -L-fucopiranosido o metil α -L-fucopiranosido, las enzimas provenientes de algunos microorganismos solo liberan α -L-fucosa unida por enlace α (1 \rightarrow 2) [70-71,73]. En la base de datos CAZy (www.cazy.org) [35], que nuclea las enzimas activas en carbohidratos se clasifican en las familias GH29, GH95 y GH151. La familia GH95 comprende a las α -fucosidasas (EC 3.2.1.51) y las α (1 \rightarrow 2)-L-fucosidasas (EC 3.2.1.63) que presentan un mecanismo catalítico que invierte la configuración del carbono anomérico. La familia GH29 comprende a las α -fucosidasas (EC. 3.2.1.51), a las α (1 \rightarrow 3/4)-L-fucosidasas (EC 3.2.1.111) y una única α (1 \rightarrow 2)-L-

fucosidasa (EC 3.2.1.63) y en todos los casos presentan un mecanismo que mantiene la configuración del carbono anomérico. Esta se puede dividir en dos subfamilias GH29A y GH29B en base a la similitud de secuencia y la especificidad por sustrato. Los miembros de la subfamilia G29B incluyen a las $\alpha(1\rightarrow3/4)$ fucosidasas que actúan sobre las fucosas unidas por enlace $\alpha(1\rightarrow3/4)$ y se encuentran ramificadas con un residuo de galactosa, mientras que los miembros de la familia G29A presentan una especificidad por sustrato más flexible actuando incluso sobre PNPF [72, 74-77].

En la bibliografía se han descrito α -fucosidasas con distintas estructuras cuaternarias desde monoméricas hasta tetraméricas con pesos moleculares que van desde 80 kDa hasta 240 kDa [68-69,71,78-80]. El pH óptimo de las mismas se encuentra en el rango ácido (4.5-7) y la temperatura óptima entre 50-60 °C [67-71,78-81].

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general de esta tesis de maestría fue la búsqueda de α -manosidasas y α -fucosidasas en microorganismos autóctonos, evaluación de las mejores condiciones para la producción de las enzimas seleccionadas, posterior purificación y caracterización.

Objetivos específicos

1. Búsqueda de α -manosidasas y α -fucosidasas en microorganismos autóctonos (bacterias, levaduras y hongos filamentosos).
2. Evaluación de las mejores condiciones para la producción enzimática en los microorganismos seleccionados.
3. Purificación y caracterización de las α -manosidasas y α -fucosidasas identificadas.

CAPITULO 2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Materiales

Los medios de cultivo utilizados: Trypto-Casein Soy Agar (TSA), Potato Dextrose Agar (PDA), Potato Dextrose Broth (PDB), el extracto de levadura y la peptona fueron de Oxoid. El Bio-Mos fue gentilmente donado por la empresa BioTech Uruguay. La Fucosa, Mucina Gástrica Porcina (PGM), *p*-nitrofenil- α -D-manopiranosido (PNPM), *p*-nitrofenol (PNP) fueron de SIGMA. El *p*-nitrofenil α -L-fucopiranosido (PNPF), α -manosidasa de *Bacteroides thetaiotaomicron*, α -fucosidasa de *Homo sapiens* y el kit para cuantificación de fucosa (L-fucose assay kit) fueron de Megazyme. El kit para determinación de proteínas por el método de BCA fue de Pierce.

2.2. Cepas estudiadas

Todos los microorganismos estudiados son de la colección de cultivos microbianos del Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones (LBB) de la Facultad de Química, Udelar.

2.2.1. Bacterias

Acinetobacter sp. M3T, *Bacillus* sp. 12.22, *Bacillus cereus* M3R, *Proteus vulgaris* M1E, *Streptomyces* sp. M9A, *Citrobacter freundii* M3W, *Tsukamurella* sp. M9B2, *Acinetobacter johnsonii* M3X1, *Klebsiella pneumoniae* M3F, *Micrococcus luteus* C20, *Bacillus* sp. X, *Bacillus subtilis* C28, *Pantoea agglomerans* C13, *Pseudomonas* sp. E, *Pseudomonas aeruginosa* AT E2, *Pseudomonas moraviensis* Eiii X1a, *Leuconostoc* sp. Z2, *Stenotrophomonas* sp. Ei X1a y *Enterobacter agglomerans* C8.

2.2.2. Levaduras

Rhodotorula mucilaginosa H2, *Rhodotorula glutinis* H93, *Aureobasidium pullulans* CQA, *Rhodotorula* sp. Ro, *Wickerhamomyces anomalus* Z1 y *Pichia* sp. PDA

2.2.3. Hongos filamentosos

Aspergillus terreus BFQU 121, *Penicillium* sp. EBV 95-17, *Fusarium* sp. Y3, *Mucor circinelloides* H4, *Trichoderma* sp. Y5, *Talaromyces* sp. H5, *Aspergillus* sp. Y6, *Dichostereum sordulentum* DS-1488, *Penicillium* sp. VA8.

2.3. Cultivo de células

2.3.1. Bacterias

Se tomó un inóculo de cada una de las cepas bacterianas conservadas en freezer a -70°C , se sembraron en placas de Petri con medio de cultivo TSA y se incubaron a 28°C durante 24 h. A partir de los crecimientos desarrollados se prepararon pre-cultivos inoculando una colonia en un tubo de ensayo con 5 ml de medio LB (Luria Bertani) (NaCl 10 g/L; triptona 10g/L; extracto de levadura 5g/L) que se incubó durante 24 h a 30°C y 150 rpm. A continuación, se inocularon 200 μL del pre-cultivo en un matraz Erlenmeyer de 100 ml con 20 ml de medio de inducción para búsqueda de α -manosidasa (1% NaCl, 0,5% triptona y 1% de extracto de levadura o Bio-Mos como fuente de carbono) o α -fucosidasa, (1% NaCl, 0,5% triptona, 0,5% extracto de levadura y 0,25% de fucosa o 1% de PGM como fuente de carbono). Se incubaron durante 24 h a 30°C y 150 rpm. Se separó el sobrenadante de las células por centrifugación a 4°C y 10.000 rpm durante 10 min en centrífuga (Thermo Scientific, Sorvall ST 16R). Las células se lavaron con suero fisiológico y se lisaron utilizando buffer de lisis para α -manosidasa (buffer MES 0.1M pH 6.5; 1.75% NaCl) o α -fucosidasa (buffer fosfato de sodio 0.1 M pH 2.5; 1.75% NaCl) mediante ultrasonido (SONICS Vibra Cell, Modelo CV18) con pulsos de 30 segundos, con 10 segundos de descanso, durante 2 minutos, utilizando una amplitud de 40%. Se evaluó presencia de actividad enzimática en el sobrenadante de cultivo y en el lisado celular como se describe en la sección 2.4.

2.3.2. Levaduras

A partir de las cepas de levadura conservadas en freezer a -70°C se tomó un inóculo y se sembraron en Placas de Petri con medio de cultivo PDA, las cuales se incubaron en estufa a 28°C durante 48 horas. A partir del crecimiento desarrollado se preparó un pre-cultivo inoculando una colonia en un tubo de ensayo con 5 ml de caldo PDB que se incubó durante 48 h a 30°C y 150 rpm. A continuación se inocularon 200 μL del pre-cultivo en un matraz Erlenmeyer de 100 ml con 20 ml de medio de inducción Czapek manosidasa (0.77% NaNO_3 , 0.3% KH_2PO_4 , 0.15% KCl, 0.15% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.15% bactopectona y 2% de extracto de levadura o Bio-Mos como fuente de carbono) para la búsqueda de actividad α -manosidasa o medio de inducción Czapek fucosidasa (0.77% NaNO_3 , 0.3% KH_2PO_4 , 0.15%, 0.15% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.15% bactopectona y 0.25% de fucosa o 1% de PGM como fuente de carbono) para búsqueda de actividad α -fucosidasa. Se incubaron 48 h a 30°C y 150 rpm. Se separó el sobrenadante de las células por centrifugación a 4°C y

10.000 rpm durante 10 min y se evaluó presencia de actividad enzimática en el sobrenadante como se describe en la sección 2.4.

2.3.3. Hongos filamentosos

Se tomó un inóculo de los hongos que estaban conservados a 4°C, se sembraron en placas de Petri con el medio de cultivo PDA y se incubaron a 28 °C durante 5-7 días. Se cortaron discos de 1 cm de diámetro de micelio y se inocularon en matraces Erlenmeyer de 100 ml con 20 ml de medio de inducción Czapex manosidasa (0.77% NaNO₃, 0.3% KH₂PO₄, 0.15% KCl, 0.15% MgSO₄.7H₂O, 0.15% bactopectona y 2% de extracto de levadura o Bio-Mos como fuente de carbono) para búsqueda de actividad α -manosidasa o medio de inducción Czapex fucosidasa (0.77% NaNO₃, 0.3% KH₂PO₄, 0.15% KCl, 0.15% MgSO₄.7H₂O, 0.15% bactopectona y 0.25% de fucosa o 1% de PGM como fuente de carbono) para búsqueda de actividad α -fucosidasa. Se incubaron durante 7 días a 30 °C y 150 rpm. Se separó el sobrenadante de las células por centrifugación a 4°C y 10.000 rpm durante 10 min y se evaluó presencia de actividad enzimática en el sobrenadante como se describe en la sección 2.4.

2.4. Ensayo de identificación de actividad enzimática

2.4.1. Utilizando sustratos cromogénicos

Se incubaron 20 μ L de sobrenadante de cultivo o lisado celular con 180 μ L de sustrato (5 mM *p*-nitrofenil- α -D-manopiranosido (PNPM) en buffer MES 0.1 M pH 6,5; 2,5 mM CaCl₂ para α -manosidasa o 2 mM *p*-nitrofenil- α -L-fucopiranosido (PNPF) en buffer acetado de sodio 0.1M pH 4.0 o PBS pH 6.5 para α -fucosidasa a 37 °C *overnight*. A 70 μ L de la mezcla de reacción se le agregaron 130 μ L de buffer borato de sodio 0,2M pH 9,8 y se observó aparición de color amarillo correspondiente a la liberación de *p*-nitrofenol (PNP). Se utilizó como blanco sobrenadante de cultivo o lisado previamente calentado a 100°C durante 5 minutos para inactivar la actividad enzimática y una α -manosidasa (*Bacteroides thetaiotaomicron*, Megazymes, UK) o α -fucosidasa (*Homo sapiens*, Megazymes, UK) comercial como control positivo.

2.4.2. Utilizando sustratos no cromogénicos

Para el caso de la α -fucosidasa también se realizó un ensayo utilizando mucina gástrica porcina (PGM) como sustrato, ya que se ha reportado que no todas las α -fucosidasas aceptan como sustrato el PNPF. Se incubaron 50 μ L de sobrenadante de cultivo o lisado y su blanco correspondiente con 450 μ L de PGM 10 mg/mL durante 48 horas a 37°C en baño con agitación. Se centrifugó para separar el exceso de PGM en suspensión y se cuantificó la fucosa liberada con un kit enzimático (L-Fucose Assay Kit, Megazyme, UK) como se describe a continuación. Se utilizó como blanco sobrenadante de cultivo o lisado previamente calentado a 100°C durante 5 minutos para inactivar la actividad enzimática y una α -fucosidasa (*Homo sapiens*, Megazymes, UK) comercial como control positivo.

2.4.2.1. Cuantificación de fucosa

Este método se basa en la cuantificación de la concentración de NADPH por medida de absorbancia a 340 nm en la reacción de la oxidación de la fucosa catalizada por la fucosa deshidrogenasa. Se procede según las indicaciones del fabricante. Se incubaron en placa de ELISA 10 μ L de muestra, blanco o estándar (fucosa 0.5 mg/mL) con 40 μ L del buffer provisto en el kit, 10 μ L de NADP⁺ y 200 μ L de agua destilada durante 4 minutos a temperatura ambiente y se midió absorbancia a 340 nm (A1). A continuación, se agregaron 5 μ L de fucosa deshidrogenasa, se incubó durante 10 minutos a 37°C y se midió absorbancia a 340 nm (A2). Si luego de 30 minutos no se detuvo la reacción enzimática se continuó midiendo la absorbancia cada 2 minutos hasta llegar a una meseta o hasta observar disminución de la misma.

$$[\text{Fucosa mg/mL}] = (\Delta A_M / \Delta A_{st}) \times 0.5 \text{ mg/Ml} \times \text{Factor de dil}$$

$$\Delta A_M = A_{2M} - A_{1M}$$

$$\Delta A_{st} = A_{2st} - A_{1st}$$

2.5. Cuantificación de la actividad enzimática

Se incubaron 70 μ L de solución conteniendo enzima con 630 μ L de 5 mM PNPM en buffer MES 0.1 M, pH 6.5; 2.5 mM CaCl₂ o de 2 mM PNPF en PBS pH 6,5 a 37°C para actividad α -manosidasa o α -fucosidasa respectivamente. Se sacaron alícuotas de 70 μ L a distintos tiempos y se agregaron 130 μ L de buffer borato de sodio 0.2 M, pH 9.8 para detener la reacción enzimática. Se midió absorbancia a 405 nm y se determinó la

concentración de *p*-nitrofenol liberado utilizando una curva de calibración. Se definió la unidad de enzima como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μmol de PNPM o PNPF por minuto a pH 6.5 y 37°C para α -manosidasa o α -fucosidasa respectivamente.

2.6. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó alternativamente por espectrofotometría por absorbancia a 280 nm o por el método del ácido bicinconínico (BCA) [82]. Se procedió de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Se incubaron 15 μL de muestra con 300 μL de reactivo durante 15 minutos a 60 °C. Luego de enfriar a temperatura ambiente se midieron las absorbancias a 562 nm. La curva de calibración se realizó con 5 diluciones de albúmina de suero bovino (BSA) en el rango de 0.1 – 0.5 mg/mL.

2.7. Evaluación de las mejores condiciones de crecimiento de cultivo para maximizar la producción de enzimas

2.7.1. Producción de α -manosidasa en bacterias

Se realizó para las cepas seleccionadas *Bacillus* sp. 12.22 y *Bacillus* sp. X, utilizando el programa estadístico Desing Expert. Se realizó un diseño factorial de cuatro factores en dos niveles. Los factores estudiados fueron: extracto de levadura y Bio-Mos como fuente de carbono; concentración de la fuente de carbono (0.5% y 2%); temperatura (30°C y 37°C) y tiempo de incubación (24 h y 72 h).

Se realizaron 32 cultivos para cada cepa estudiada, inoculando 200 μL del pre-cultivo correspondiente en 20 mL de medio de inducción previamente descrito para la producción de α -manosidasas en bacterias. 16 de ellos se suplementaron con extracto de levadura (8 con 0.5% y los otros 8 con 2%) y los otros 16 con Bio-Mos (8 de ellos con 0.5% y los otros 8 con 2%). 16 matraces conteniendo distinto inductor y concentración se incubaron a 30°C (8 durante 24 h y los otros 8 durante 72 h). Los otros 16 matraces se incubaron a 37 °C (8 durante 24 h y otros 8 durante 72 h) (ver Anexo I – 1 y Anexo I – 2). Se cuantificó la actividad enzimática en cada sobrenadante de cultivo como se describe en la sección 2.5.

2.7.2. Producción de α -manosidasa en hongos

En una primera instancia se estudió el mejor inductor. Para esto se creció la cepa de *Aspergillus terreus* BFQU 121 en medio Czapek manosidasa inoculando un disco de 1

cm de diámetro del micelio del hongo crecido en placa PDA en 20 mL de medio Czapek manosidasa suplementado con extracto de levadura (2%) o Bio-Mos (2%) durante 5 y 7 días. Luego, se cuantificó la actividad α -manosidasa en el sobrenadante de cultivo como se describe en la sección 2.5. Posteriormente, se utilizó el programa estadístico Desing Expert realizando un diseño factorial de tres factores en dos niveles con puntos intermedios, siendo los factores evaluados concentración de extracto de levadura (1% - 3%), temperatura (28°C - 32°C) y tiempo de incubación (5 - 9 días) correspondiendo los puntos intermedios a 2% de extracto de levadura, 30 °C y 7 días. Se realizaron 20 cultivos en medio Czapek-manosidasa suplementados con extracto de levadura (8 con 1%, 4 con 2% y 8 con 3%). 8 de ellos (4 con 1% de extracto de levadura y los otros cuatro con 3%) se incubaron a 28 °C (4 durante 5 días y los otros 4 durante 9 días). Se procedió de la misma forma con la incubación a 32 °C. Los 4 matraces suplementados con 2% de extracto de levadura correspondientes a los puntos intermedios se incubaron a 30 °C durante 7 días (ver Anexo I – 3). Se cuantificó la actividad enzimática en cada sobrenadante de cultivo como se describe en la sección 2.5.

2.7.3. Producción de α -fucosidasa en hongos

En una primera instancia se estudió el mejor inductor. Para esto se crecieron las cepas *Fusarium* sp. Y3 y *Dichostereum sordulentum* DS-1488 inoculando un disco de 1 cm de diámetro del micelio del hongo crecido en placa PDA en 20 mL de medio Czapek fucosidasa suplementado con fucosa (0.25 %) o PGM (1%) durante 5 y 7 días. Después, se cuantificó la actividad α -fucosidasa en el sobrenadante de cultivo como se describe en el punto 2.5.

Posteriormente se utilizó el programa estadístico Desing Expert realizando un diseño factorial de tres factores en dos niveles con puntos intermedios, siendo los factores evaluados concentración de PGM (1% - 3%), temperatura (28°C - 32°C) y tiempo de incubación (5 - 9 días) correspondiendo los puntos intermedios a 2% PGM, 30 °C y 7 días. Se realizaron 20 cultivos del hongo *Dichostereum sordulentum* DS-1488 en medio Czapek-fucosidasa suplementado con PGM (8 con 1%, 4 con 2% y 8 con 3%). 8 de ellos (4 con 1% de PGM y los otros 4 con 3%) se incubaron a 28 °C (4 durante 5 días y los otros 4 durante 9 días). Se procedió de la misma forma con la incubación a 32 °C. Los 4 matraces suplementados con 2% de PGM correspondientes a los puntos intermedios se incubaron a 30 °C durante 7 días (ver Anexo I – 4). Se cuantificó la actividad enzimática en cada sobrenadante de cultivo como se describe en la sección 2.5.

2.8. Estudio de la influencia de iones en la actividad α -manosidasa

Se gel filtró el sobrenadante de cultivo utilizando Sephadex G25 (Cytiva), eluyendo con buffer MES 0,1 M, pH 6,5 sin ningún suplemento de sales. Se incubaron 20 μ L de sobrenadante gel filtrado con 180 μ L de PNPM 5 mM en buffer MES 0.1 M, pH 6,5; 2,5 mM CaCl₂ suplementado con distintas concentraciones (1 mM, 2.5 mM, 5 mM y 10 mM) de las siguientes sales: AcZn, MgCl₂, CoCl₂, MnCl₂, CaCl₂, KCl y NaCl a 37°C durante 15 horas. A 70 μ L de la mezcla de reacción se le agregaron 130 μ L de buffer borato de sodio 0,2M pH 9,8 y se midió absorbancia a 405 nm. Se utilizó como blanco sobrenadante de cultivo previamente calentado a 100 °C durante 5 minutos para inactivar la actividad enzimática.

2.9. Purificación de las enzimas identificadas

A los efectos de purificar α -manosidasa o α -fucosidasa se crecieron las cepas seleccionadas en 200 mL del medio de cultivo correspondiente y en las condiciones de incubación previamente evaluadas. En el caso de bacterias se inoculó cada matraz con 2 mL del pre-cultivo correspondiente y en el caso de hongos con 4 discos de un 1cm de diámetro del micelio del hongo crecido en placas de PDA.

2.9.1. Precipitación fraccionada con sulfato de amonio

Al sobrenadante de cultivo previamente separado por centrifugación a 10.000 rpm durante 20 minutos a 4°C, se le agregó lentamente en baño de hielo y con agitación la cantidad necesaria de (NH₄)₂SO₄ para alcanzar la concentración deseada (30%, 50% y 80%) de (NH₄)₂SO₄. Se dejó en heladera durante 1 h. Se centrifugó a 10.000 rpm, 4°C durante 20 min. Se separó el sobrenadante del precipitado. El precipitado se disolvió en el mínimo volumen del buffer deseado. Al sobrenadante de la precipitación se le agregó la cantidad de (NH₄)₂SO₄ necesaria para llegar a la concentración siguiente y se procedió de la misma forma.

2.9.2. Precipitación con solventes

Al sobrenadante de cultivo se le agregó lentamente en baño de hielo y con agitación el volumen necesario de solvente (acetona, etanol o isopropanol) para alcanzar la concentración deseada (30%-65%). Se almacenó durante 1 h en heladera y se centrifugó a 10.000 rpm, 4°C durante 20 min. Se separó el sobrenadante del precipitado. El precipitado se disolvió en el mínimo volumen del buffer deseado. En caso de querer

precipitar a una concentración superior de solvente se calculó el volumen necesario de solvente a agregar y se procedió de la misma forma.

2.9.3. Intercambio iónico

Se realizó en equipo Akta Purifier equipado con detector UV utilizando columna High Trap Q HP (5mL). Se adsorbió el precipitado disuelto de la precipitación con NH_4SO_4 o solvente según corresponda, previamente dializado contra buffer MES 10 mM pH 6.5; 2.5 mM CaCl_2 ; 10 mM MgCl_2 o fosfato de sodio 20 mM pH 7.5 para α -manosidasa o α -fucosidasa respectivamente (5-10 mL) a un flujo de 1mL/min. Se eluyó por gradiente de fuerza iónica (0-1.2M) al mismo flujo, recogiendo fracciones de 1 mL. Alternativamente se realizó elución por saltos de fuerza iónica (0.6-1.0 M). En el caso de la purificación de α -fucosidasa de *D. sordulentum*, el escalado de la purificación de intercambio iónico se realizó en batch utilizando como intercambiador aniónico capto Q. Se incubaron 10 mL del precipitado del sobrenadante de cultivo proveniente de la precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (fracción precipitada a 80%) redissuelto y dializado en buffer fosfato de sodio 20 mM pH 7.5 con 10 mL de resina capto Q durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó con el mismo buffer hasta que la absorbancia a 280 nm fue inferior a 0.1, se empaquetó el intercambiador en una columna PD10 y se eluyó por gravedad con el mismo buffer suplementado con 0,8 M NaCl recogiendo fracciones de 1.5 ml.

2.9.4. Cromatografía de exclusión molecular

Al pool de fracciones del eluido del intercambio iónico se le realizó una cromatografía de exclusión molecular utilizando equipo automatizado Akta Purifier equipado con columna Superdex 200 (10/300) y detector UV. Se sembraron 500 μL y se eluyó con buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7.5; NaCl 0.15 M a un flujo de 0.4 mL/min recogiendo fracciones de 0.5 mL.

2.9.5. Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)

Se realizaron electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (15%) y se corrieron a 120V durante una hora y media. Se utilizaron estándares de bajo peso molecular (97, 66, 45, 30, 20.1, 14.4 kDa) y se revelaron con Coomassie coloidal.

2.10. Caracterización de la α -fucosidasa de *Dichostereum sordulentum* DS-1488

2.10.1. Determinación de Peso Molecular

La determinación del peso molecular se realizó combinando experimentos de exclusión molecular y electroforesis en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE. Se sembró la enzima purificada (500 μ L) en la columna Superdex 200 10/300 previamente calibrada con estándares de peso molecular utilizando como eluyente buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7.5; 0.15M NaCl a un flujo de 0.4 mL/min. Se utilizaron como estándares de PM ferritina (440 kDa), aldolasa (158 kDa), conalbúmina (75kDa), ovoalbúmina (44kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y citocromo C (12.4 kDa) con los que se construyó la curva de selectividad K_{av} vs log PM. El volumen muerto de la columna determinado con Blue dextrano fue de 8.2 mL y el volumen total de 23.5 mL.

2.10.2. Determinación de pH óptimo

El pH óptimo se determinó realizando el ensayo de actividad descrito previamente en la sección 2.5 a distintos pH (4.0, 5.0, 6.5, 7.4, 8.5, 9.5) a 37 °C, utilizando PNPF 2 mM como sustrato. Para los pH 4-5 se utilizó buffer acetato de sodio 0.1 M, para los pH 6.5-7.4 buffer fosfato de sodio 0.1M y para los pH 8.5 y 9.5 buffer carbonato de sodio 0.1M.

2.10.3. Determinación de temperatura óptima

Para la determinación de la temperatura óptima se realizaron medidas de actividad enzimática a distintas temperaturas (37°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 70°C, 80°C) utilizando el PNPF 2 mM como sustrato y la metodología descrita en la sección 2.5 pero al pH óptimo previamente determinado (pH 4.0).

2.10.4. Determinación de parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos se determinaron realizando ensayos de actividad enzimática a distintas concentraciones del sustrato PNPF (0.1-10 mM) en buffer acetato de sodio 1M pH 4.0 y 60°C.

CAPÍTULO 3. SCREENING DE α -MANOSIDASA Y α -FUCOSIDASA EN MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS

3.1. Introducción

Como se mencionó en la introducción los glicanos biológicos que conforman el glicoma celular participan en varios procesos fisiológicos y alteraciones en estos patrones de glicosilación se encuentran asociadas a numerosas enfermedades entre las que se destacan desórdenes congénitos de la glicosilación, enfermedades autoinmunes, infecciosas o inflamatorias crónicas al igual que el cáncer [2-3,7-11]. En este contexto la elucidación de la composición estructural, así como la función biológica de los glicanos es fundamental para comprender el rol que desempeñan en procesos fisiológicos, al igual que en el desarrollo de algunas enfermedades. Esto es esencial para el diseño tanto de métodos de diagnóstico como de tratamientos terapéuticos. Los avances realizados en glicobiología han permitido desarrollar numerosas técnicas que han hecho posible la caracterización estructural de diversos glicanos biológicos [41-44]. Sin embargo, el estudio de su rol en procesos biológicos resulta más complejo. En este aspecto las glicosidasas resultan una excelente herramienta ya que permiten la remoción selectiva de glicanos de glicoproteína sin alterar su estructura tridimensional. Esto hace que las moléculas deglicosiladas puedan ser evaluadas en procesos biológicos de forma de determinar la relevancia del glicano o monosacárido removido [45-47]. En particular, el uso de la glicosidasa inmovilizada permite su fácil separación del medio de reacción evitando el uso de condiciones drásticas para detener la reacción enzimática y la interferencia de la glicosidasa en los estudios biológicos posteriores [83-84]. Sin embargo, un requisito fundamental es contar con glicosidasas puras, específicas para la remoción de los monosacáridos más relevantes en los glicanos biológicos, y cuya selectividad en relación con el tipo de enlace glicosídico que hidrolizan sea conocida. Por otra parte, las condiciones óptimas para su funcionamiento deben ser compatibles con las condiciones de estabilidad de la muestra biológica en la que van a ser utilizadas. Dada la oferta comercial limitada de glicosidasas para cubrir todos estos requerimientos, es interesante contribuir a la identificación de nuevas enzimas que puedan ser posteriormente purificadas, caracterizadas e inmovilizadas.

Dado la relevancia de la α -fucosidasa y la α -manosidasa en función del rol que cumplen los glicanos fucosilados y/o manosilados en procesos tumorales y de infección parasitaria o viral, como se describió en la introducción, en esta tesis se propuso la búsqueda de

nuevas enzimas con actividad α -manosidasa y α -fucosidasa. En este capítulo se describe la identificación de α -manosidasas y α -fucosidasas en diferentes microorganismos aislados de hábitats naturales.

3.2. Resultados

3.2.1. Screening de actividad α -manosidasa y α -fucosidasa

La búsqueda de actividad α -manosidasa y α -fucosidasa se realizó en bacterias, levaduras y hongos filamentosos aislados de diferentes hábitats naturales de la colección de microorganismos del Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones (LBB) de la Facultad de Química. Se utilizaron como inductores extracto de levadura 1% para la expresión de α -manosidasa y mucina gástrica porcina 1% (PGM) o fucosa 0.25% para α -fucosidasa [63,78-79,85]. Para los ensayos de screening de actividad α -manosidasa se utilizó *p*-nitrofenil α -D-manopiranosido (PNPM) como sustrato. Por otra parte para el screening de α -fucosidasas se utilizaron dos sustratos, *p*-nitrofenil α -L-fucopiranosido (PNPF) y mucina gástrica porcina (PGM) debido a que está descrito en bibliografía que no todas las α -fucosidasas aceptan el PNPF como sustrato [75,77]. Dado que el objetivo era la identificación de glicosidasas con la finalidad de ser utilizadas para el análisis del rol biológico de glicanos de glicoproteínas que mayoritariamente son estables a pHs neutros, para el screening de las mismas se prepararon los sustratos a pH 6.5 (PNPF y PNPM) o 7.5 (PGM).

La búsqueda de actividad enzimática en bacterias se realizó en 19 cepas tanto a nivel intra como extracelular, identificándose actividad α -manosidasa intracelular en 8 cepas: *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp. 12.22, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Tsukamurella* sp., *Bacillus* sp. X, *Stenotrophomonas* sp. y *Enterobacter agglomerans* y extracelular en 5 cepas: *Bacillus* sp. 12.22, *Bacillus* sp. X, *Pseudomonas* sp. E, *Pseudomonas moraviensis*, *Leuconostoc* sp. Z2. Sin embargo, no fue posible identificar actividad α -fucosidasa intracelular ni extracelular en ninguna de las cepas bacterianas estudiadas (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Screening de actividad α -manosidasa y α -fucosidasa en bacterias

Microorganismo	Actividad α -manosidasa		Actividad α -fucosidasa			
	PNPM		PNPF		PGM	
	S	L	S	L	S	L
<i>Acinetobacter</i> sp.	-	+	-	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. 12.22	+	+	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp.	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Tsukamurella</i> sp.	-	+	-	-	-	-
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. X	+	+	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. E	+	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas moraviensis</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Leuconostoc</i> sp. Z2	+	-	-	-	-	-
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	-	+	-	-	-	-
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	+	-	-	-	-

Se utilizó extracto de levadura 1% y PGM 1% como inductor para α -manosidasa y α -fucosidasa respectivamente. Se utilizó PNPM como sustrato para α -manosidasa y PNPF y PGM como sustrato de α -fucosidasa. (S) Sobrenadante; (L) Lisado celular; (+) Presencia de actividad enzimática; (-) Ausencia de actividad enzimática.

En el caso de levaduras, el screening de actividad enzimática se llevó a cabo a nivel extracelular en 6 cepas, identificándose actividad α -manosidasa en 5 de ellas: *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula glutinis*, *Aureobasidium pullulans*, *Wickerhamomyces anomalus* y *Pichia* sp. PDA. Por otro lado, si bien no se identificó

actividad α -fucosidasa cuando se utilizó PNPF como sustrato, si fue posible la identificación de dicha actividad en 4 cepas: *Rhodotorula glutinis*, *Aureobasidium pullulans*, *Wickerhamomyces anomalus* y *Pichia* sp. PDA cuando el sustrato utilizado fue PGM (Tabla 3.2).

Tabla 3.2- Screening de actividad α -manosidasa y α -fucosidasa extracelular en levaduras

Microorganismo	Actividad		
	α -manosidasa	α -fucosidasa	
	PNPM	PNPF	PGM
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+	-	+/-
<i>Rhodotorula glutinis</i>	+	-	+
<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	-	+
<i>Rhodotorula</i> sp. Ro	-	-	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	+	-	+
<i>Pichia</i> sp. PDA	+	-	+

Se utilizaron extracto de levadura 1% y fucosa 0.25% como inductor para α -manosidasa y α -fucosidasa respectivamente. Se utilizó PNPM como sustrato para α -manosidasa y PNPF y PGM para evaluar actividad α -fucosidasa. **Sustrato PNPM o PNPF:** (+) Presencia de actividad enzimática, (-) Ausencia de actividad enzimática. **Sustrato PGM:** (+) Libera más de 60 $\mu\text{g/mL}$ de fucosa en 48 h, (+/-) libera entre 10-60 $\mu\text{g/mL}$ de fucosa en 48 h y (-) libera menos de 10 $\mu\text{g/mL}$ de fucosa en 48 h.

Finalmente, se realizó el screening de actividad enzimática extracelular en 9 cepas de hongos filamentosos identificándose actividad α -manosidasa en las cepas de *Fusarium* sp. Y3, *Trichoderma* sp. Y5, *Penicillium* sp. EBV 95-17 y *Aspergillus terreus* BFQU 121. Por otra parte, se identificó actividad α -fucosidasa utilizando PNPF como sustrato en el hongo *Fusarium* sp. Y3 tanto cuando el inductor fue fucosa (0.25%) como PGM (1%) y en el hongo *Dichostereum sordulentum* DS-1488. solo cuando el inductor fue PGM (1%) (Tabla 3.3).

Tabla 3.3- Screening de actividad α -manosidasa y α -fucosidasa extracelular en hongos filamentosos

Microorganismo	Actividad		
	α -manosidasa	α -fucosidasa	
	PNPM	PNPF ^(a)	PNPF ^(b)
<i>Fusarium</i> sp. Y3	+	+	+
<i>Dichostereum sordulentum</i> DS-1488	-	-	+
<i>Aspergillus</i> sp. Y6	-	-	-
<i>Mucor circinelloides</i> H4	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp. Y5	+	-	-
<i>Talaromyces</i> sp. H5	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp. EBV 95-17	+	-	-
<i>Penicillium</i> sp. VA8	-	-	-
<i>Aspergillus terreus</i> BFQU 121	+	-	-

Se utilizó como inductor para α -manosidasa extracto de levadura 1% y en el caso de fucosidasa; (a) fucosa 0.25% y (b) PGM 1% como inductor. (+) Presencia de actividad manosidasa, (-) Ausencia de actividad manosidasa.

Debido a que en la literatura la mayoría de los reportes de actividad α -manosidasa es en bacterias, en particular para el género *Bacillus* [5, 63-64] y que la purificación de una enzima extracelular es más sencilla que una intracelular se seleccionaron las dos bacterias del género *Bacillus* en las que se identificó actividad α -manosidasa extracelular (*Bacillus* sp. 12.22 y *Bacillus* sp. X) para evaluar las mejores condiciones de cultivo que permitan maximizar la producción de α -manosidasa (Tabla 3.1). Por otro lado, en relación a las enzimas con actividad α -fucosidasa, dado que el seguimiento de dicha actividad es más fácil cuando se utiliza el sustrato PNPF y que solo se identificaron hongos que expresan actividad α -fucosidasa identificada con este sustrato se seleccionaron los hongos *Dichostereum sordulentum* DS-1488 y *Fusarium* sp. Y3 para evaluar las mejores condiciones de cultivo que permitan maximizar la producción de α -fucosidasa (Tabla 3.3).

3.2.2. Evaluación de las mejores condiciones de crecimiento de cultivos de *Bacillus* sp. 12.22 y *Bacillus* sp. X para maximizar la producción de α -manosidasa

A los efectos de identificar las variables que tenían incidencia en la producción de α -manosidasa y determinar las mejores condiciones para su producción, se realizó un diseño factorial de cuatro factores en dos niveles utilizando el software Design Expert. Las α -manosidasas son inducibles utilizando mananos o extractos de levadura como fuente de

carbono. Los mananos de levadura son polisacáridos altamente ramificados, constituidos por una cadena principal de manosas unidas por enlace α -1,6 con ramificaciones de manosas unidas por enlace α -1,2 y α -1,3 [5,63].

Es por eso que se resuelve a estudiar el efecto de dos fuentes de carbono/inductor, extracto de levadura e hidrolizado comercial de mananos de levadura (Bio-Mos) [55]. Los otros factores estudiados fueron: concentración de la fuente de carbono (0.5% - 2%); temperatura (30°C - 37°C) y tiempo de incubación (24 h - 72 h).

Como respuesta se evaluó la velocidad de la α -manosidasa extracelular, expresada en mUA/h. En la Figura 3.1 se puede apreciar que la velocidad de la α -manosidasa de *Bacillus* sp. 12.22 fue superior cuando el inductor estudiado fue el extracto de levadura en relación con Bio-Mos, obteniéndose los mejores resultados para una concentración de 2%, 24 horas y 30°C (ver Anexo I – 5).

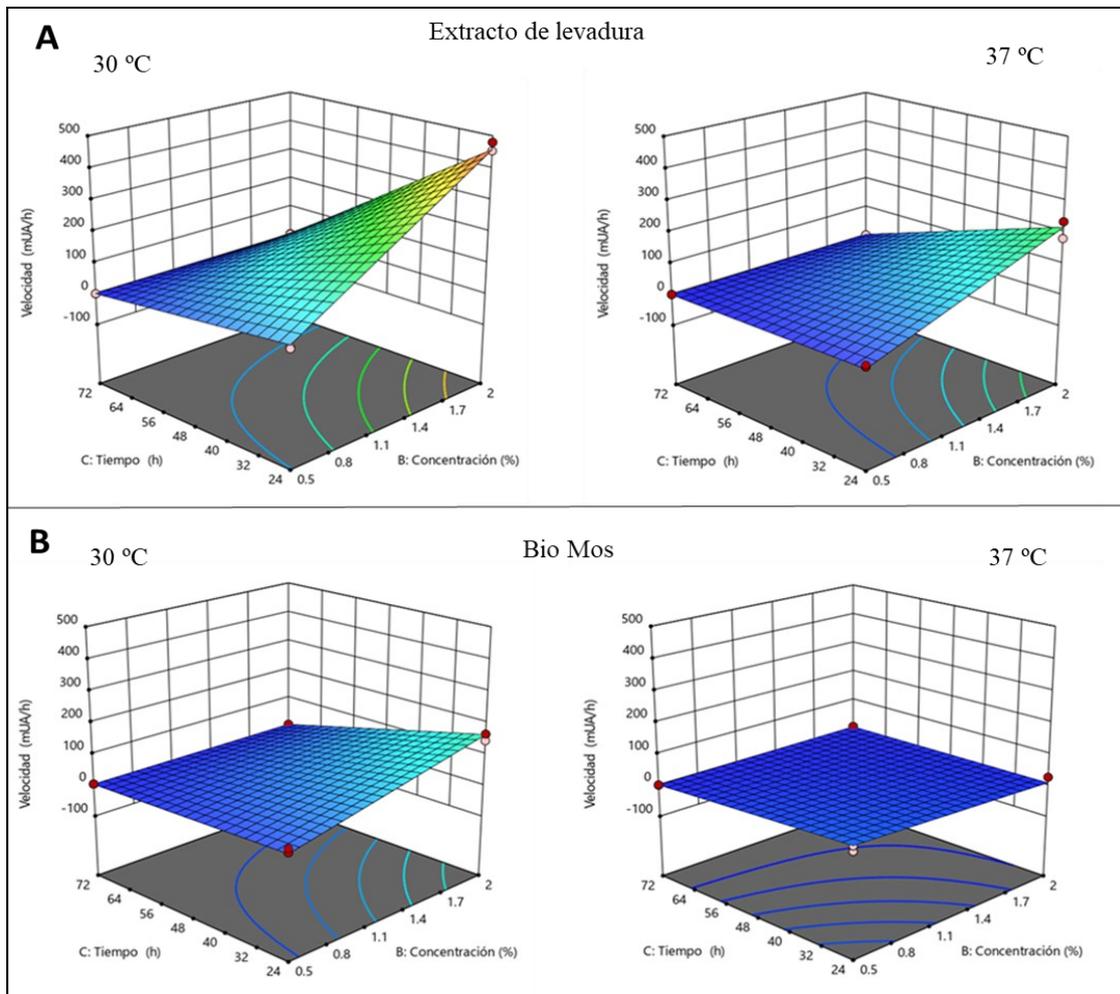


Figura 3.1 – Gráficos de superficie de respuesta correspondiente a la optimización de las condiciones de cultivo de *Bacillus* sp. 12.22 para maximizar la producción de α -manosidasa. A) Inductor extracto de levadura. B) Inductor Bio-Mos.

Para el caso del *Bacillus* sp. X, nuevamente se obtuvo una mayor velocidad enzimática utilizando como fuente de carbono/inductor extracto de levadura (ver Anexo I – 6). Sin embargo, en este caso las mejores condiciones fueron 2% de extracto de levadura durante 72 horas a 30°C (Figura 3.2).

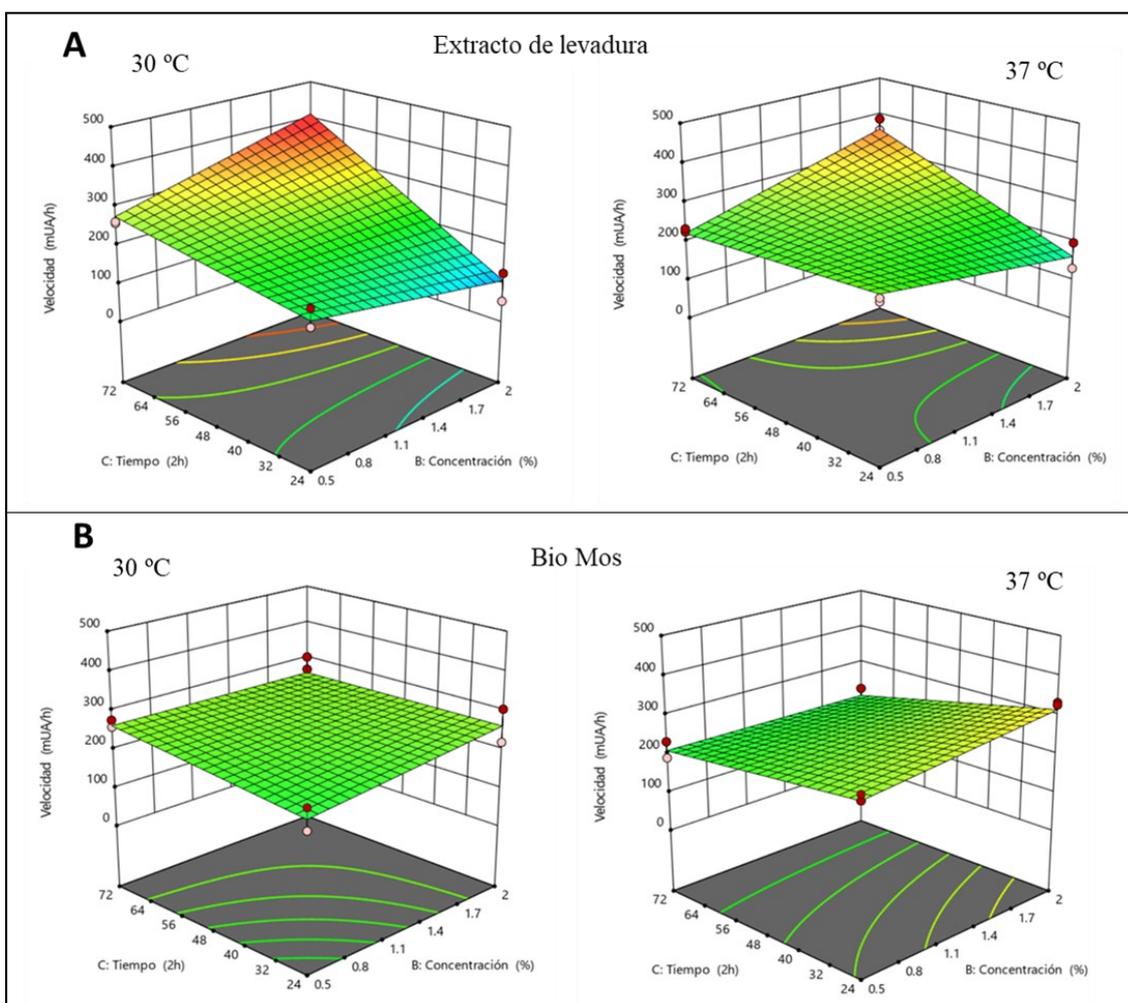


Figura 3.2 – Gráficos de superficie de respuesta correspondiente a la optimización de las condiciones de cultivo de *Bacillus* sp. X para maximizar la producción de α -manosidasa. A) Inductor Extracto de levadura; B) Inductor Bio-Mos.

Sin embargo, si se quisieran reducir los tiempos de incubación se podría realizar el crecimiento de cultivo utilizando Bio-Mos como fuente de carbono/inductor e incubando el cultivo a 37°C durante 24 horas donde si bien se obtienen una actividad un poco menor de α -manosidasa se reducen notoriamente los tiempos de incubación (Figura 3.2).

Si se comparan las velocidades de α -manosidasa en las mejores condiciones para ambas bacterias la misma es levemente superior para la cepa de *Bacillus* sp. 12.22 por lo que se resolvió avanzar con la purificación de α -manosidasa de dicho microorganismo como se describe en el capítulo 5.

3.2.3. Evaluación de las mejores condiciones de crecimiento de cultivos de *Fusarium sp. Y3* y *Dichostereum sordulentum* DS-1488 para maximizar la producción de α -fucosidasa

En una primera instancia se estudió la incidencia del inductor (fucosa o PGM) y el tiempo de cultivo (5-7 días) en la producción de α -fucosidasa extracelular por los hongos *Fusarium sp. Y3* y *Dichostereum sordulentum* DS-1488, evaluando la actividad enzimática en el sobrenadante de cultivo. Si bien, en los ensayos de screening inicial se había identificado la presencia de actividad α -fucosidasa extracelular cuando se creció el hongo *Fusarium sp. Y3*, tanto utilizando fucosa como PGM como inductor, al medir la actividad α -fucosidasa en los sobrenadantes de cultivo, la misma fue muy baja cuando el hongo se creció utilizando PGM 1% en relación con el uso de fucosa 0.25% (Figura 3.3). Por otra parte, la actividad α -fucosidasa producida cuando el cultivo se incubó durante 5 días a 30°C utilizando fucosa 0.25% fue levemente superior a cuando se incubó en las mismas condiciones durante 7 días.

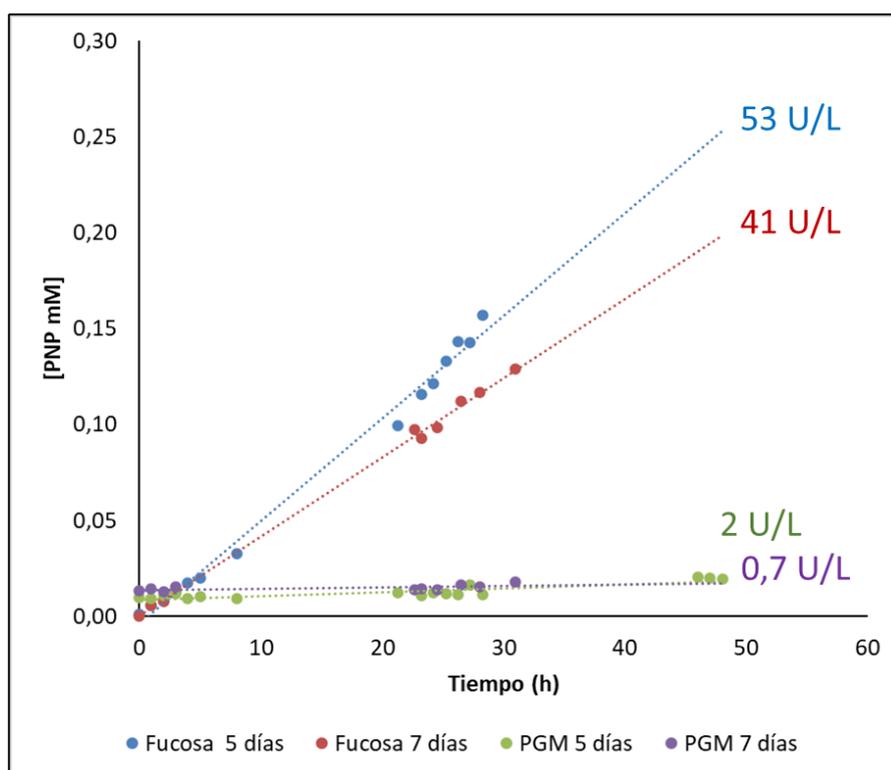


Figura 3.3- Actividad α -fucosidasa extracelular en cultivos de *Fusarium sp. Y3*. Se mide la velocidad con que se hidroliza el sustrato en función del tiempo y de la pendiente se puede calcular la actividad como se detalla en la sección de materiales y métodos.

De la evaluación de la actividad de α -fucosidasa en los sobrenadantes de cultivo del hongo *Dichostereum sordulentum* DS-1488 se puede concluir que, a diferencia de *Fusarium sp.*

Y3, la actividad de esta es muy superior cuando se utiliza PGM como inductor en relación con fucosa (Figura 3.4). Nuevamente la actividad enzimática es levemente superior cuando el cultivo se crece durante 5 días respecto a 7 días.

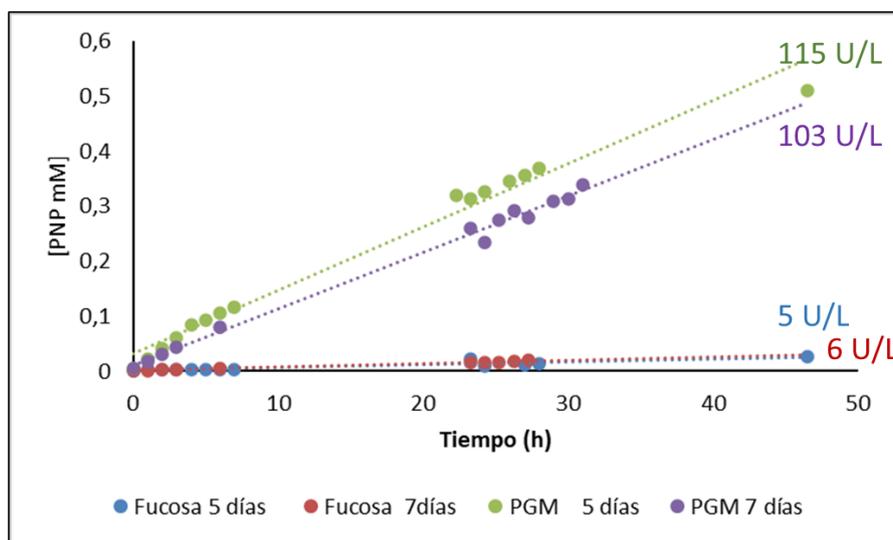


Figura 3.4- Actividad α -fucosidasa extracelular en cultivos de *Dichostereum sordulentum* DS-1488. Se mide la velocidad con que se hidroliza el sustrato en función del tiempo y de la pendiente se puede calcular la actividad como se detalla en la sección de materiales y métodos.

Cuando se compara la actividad de la α -fucosidasa producida en las mejores condiciones para cada uno de los hongos se observa que la de *Dichostereum sordulentum* DS-1488 es el doble de la *Fusarium* sp. por lo que se procedió a la evaluación de las mejores condiciones de crecimiento de cultivo para el hongo *Dichostereum sordulentum* DS-1488 para maximizar la producción de α -fucosidasa.

En esta oportunidad se realizó un diseño factorial de tres factores en dos niveles con puntos intermedios de acuerdo con lo que se describe en materiales y métodos. Los factores evaluados fueron: concentración de PGM (1% - 3%), temperatura (28 °C - 32 °C) y tiempo de incubación (5 - 9 días) correspondiendo los puntos intermedios a 2% PGM, 30 °C y 7 días.

Los resultados obtenidos indicaron que la temperatura no es un factor relevante ya que se obtienen resultados similares en el rango estudiado (Figura 3.5). En lo que tiene que ver con los otros parámetros estudiados, la mayor actividad α -fucosidasa se obtuvo para una concentración de PGM de 3% y una incubación de 9 días (ver Anexo I – 7).

Las predicciones del modelo matemático generado por el programa Design Expert indican que en condiciones de cultivo de 30 °C, al cabo de 7 días se obtiene un 72 % de la actividad que se obtendría en un cultivo de 9 días. Por otro lado, a los efectos prácticos se facilita realizar incubaciones de 7 días en lugar de 9 días. Por lo cual, para continuar

con la purificación de la α -fucosidasa de *Dichostereum sordulentum* DS-1488 que se describe en el capítulo 4 se resuelve crecer el hongo en el medio de inducción Czapek-fucosidasa conteniendo 3% de PGM, a 30°C y 150 rpm durante 7 días.

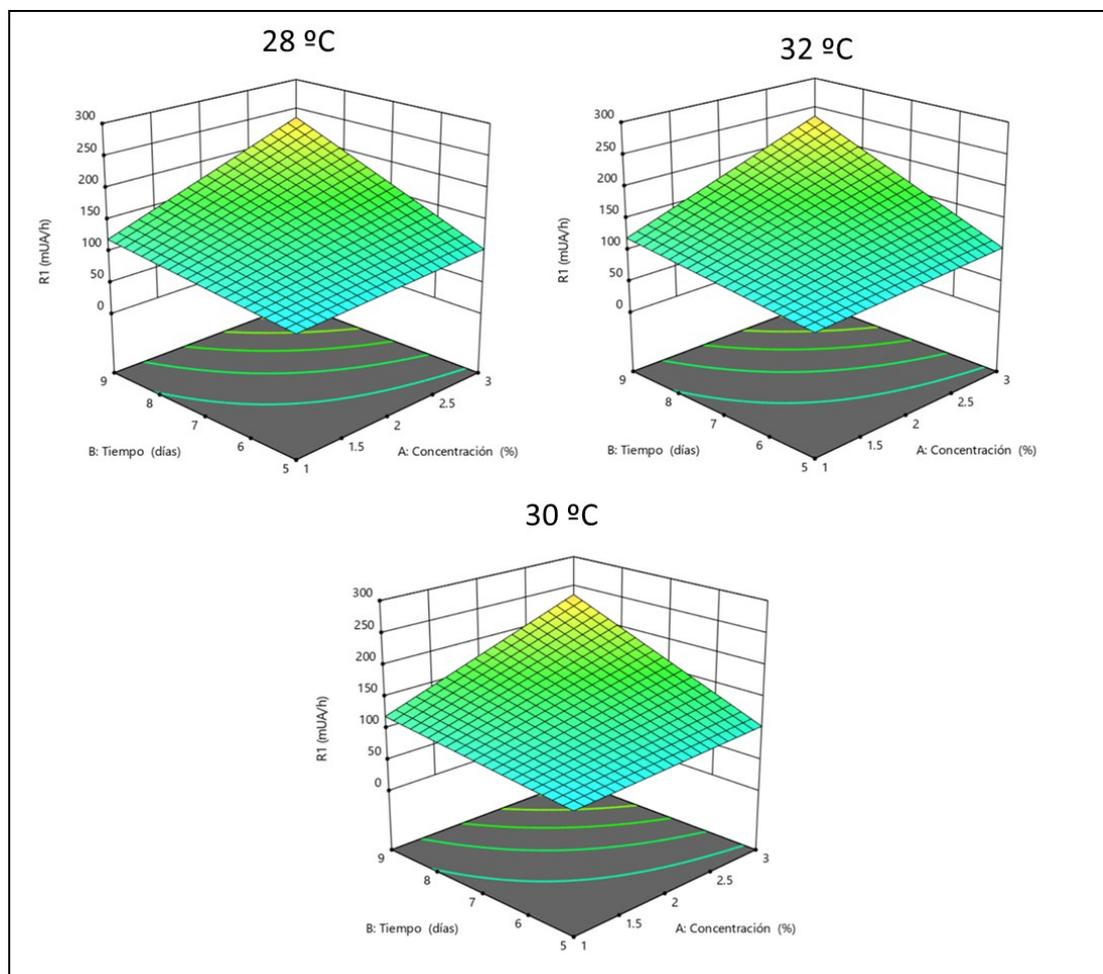


Figura 3.5 – Gráficos de superficie de respuesta correspondiente a la optimización de las condiciones de cultivo de *Dichostereum sordulentum* DS-1488 para maximizar la producción de α -fucosidasa.

A lo largo de este capítulo se describió el screening de α -manosidasa y α -fucosidasa en diferentes cepas de bacterias, levaduras y hongos filamentosos, seleccionándose aquellos microorganismos donde se evidenció una buena producción de enzima. Se evaluaron las mejores condiciones de crecimiento de cultivo que permitiera maximizar la producción de la enzima correspondiente y finalmente se seleccionaron las cepas *Bacillus sp* 12.22 y el hongo *Dichostereum sordulentum* DS-1488 para purificar la α -manosidasa y α -fucosidasa respectivamente. Su purificación se describe en los siguientes capítulos de esta tesis.

CAPÍTULO 4. PURIFICACIÓN DE α -FUCOSIDASA

4.1. Introducción

Las α - fucosidasas (EC 3.2.1.51) son glicosidasas con especificidad para la hidrólisis de unidades de α -L-fucosa terminales de glicoproteínas y glicolípidos [35,86-87]. Por lo tanto, juegan un rol importante en el procesamiento de glicanos fucosilados, en particular en la degradación de glicanos intestinales en aquellas que provienen de microorganismos que se alojan en el intestino [70-72]. Estas enzimas se han reportado en bacterias, hongos, plantas al igual que en mamíferos y su especificidad de sustrato depende de su origen [70-71,73]. Se encuentran clasificadas en la base de datos CAZy (www.cazy.org), en las familias GH29, GH95 y GH151.

En la bibliografía se han descrito α -fucosidasas con distintas estructuras cuaternarias desde monoméricas hasta tetraméricas con pesos moleculares que van desde 80 kDa hasta 240 kDa. El pH óptimo de las mismas se encuentra en el rango ácido (4.5-7) y la temperatura óptima entre 50-60 °C [67-71,78-81]. En este capítulo se describe la purificación y caracterización de una α -fucosidasa de *Dichostereum sordulentum* DS-1488.

4.2. Resultados

4.2.1. Purificación de α -fucosidasa de *Dichostereum sordulentum* DS-1488

Para la purificación de la α -fucosidasa se partió del hongo *Dichostereum sordulentum* DS-1488. Esta cepa es de un basidiomycete aislada de plantaciones de eucaliptus en Uruguay y se encuentra depositado en el herbario de la Facultad de Ciencias con el número del grupo de investigación de micología de dicha Facultad (MVHC5370) (referencia: Martínez S, Nakasone K (2014) New records of interesting corticioid Basidiomycota from Uruguay. Check List 10(5): 1237-1242. <https://doi.org/10.15560/10.5.1237>) [88]. Este hongo se mantiene en la colección del laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones de la Facultad de Química como DS-1488. De este mismo hongo ya se ha reportado la purificación de otras enzimas como lacasa [89].

El hongo *Dichostereum sordulentum* DS-1488 se creció en el medio de inducción Czapek-fucosidasa conteniendo 3% de PGM durante 7 días a 30°C y 150 rpm, condiciones previamente evaluadas en el capítulo 3. Se separó el sobrenadante de cultivo por centrifugación y en una primera etapa se realizó una precipitación fraccionada con

(NH₄)₂SO₄ (30%, 50% y 80%). Se evaluó presencia de actividad α -fucosidasa en las distintas fracciones utilizando el ensayo de identificación de actividad enzimática descrito en la sección 2.4 de materiales y métodos. Como se puede ver en la Figura 4.1 la precipitación fraccionada no solo permitió concentrar las proteínas del sobrenadante sino también una purificación parcial, ya que la actividad α -fucosidasa se recupera en el precipitado con 80% de (NH₄)₂SO₄, mientras que se observa precipitación de otras proteínas en el precipitado con 50% de (NH₄)₂SO₄.

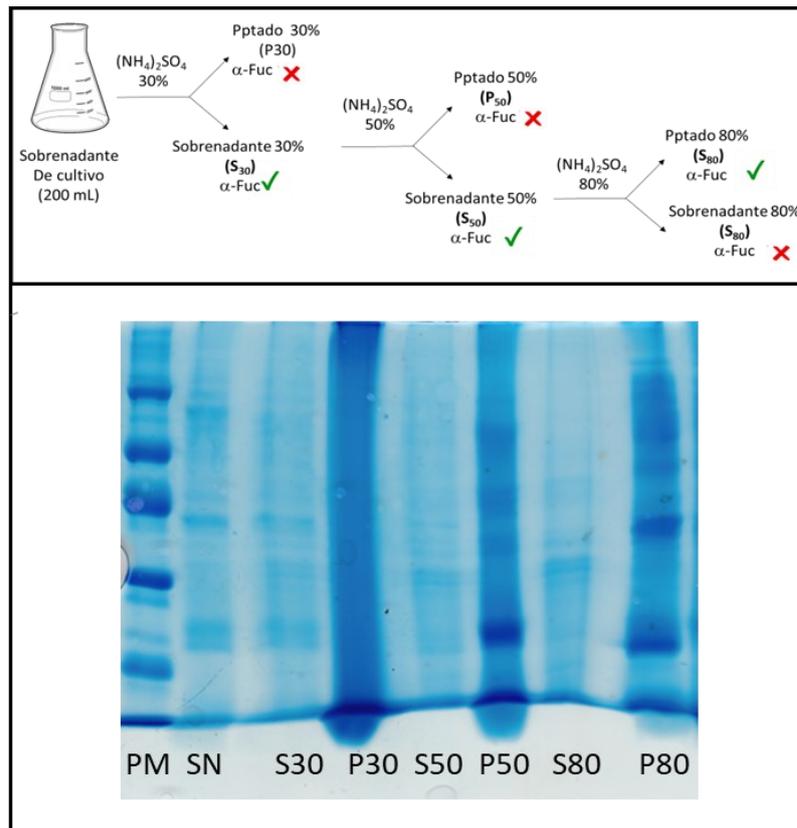


Figura 4.1 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) de la precipitación fraccionada con (NH₄)₂SO₄ del sobrenadante de cultivo de *D. sordulentum* DS-1488. PM: estándares de peso molecular; SN: Sobrenadante de cultivo; S30 sobrenadante de la precipitación 30% (NH₄)₂SO₄; P30: precipitado 30% (NH₄)₂SO₄; S50: sobrenadante de la precipitación 50% (NH₄)₂SO₄; P50: precipitado 50% (NH₄)₂SO₄; S80: sobrenadante de la precipitación 80% (NH₄)₂SO₄; P80: precipitado 80% (NH₄)₂SO₄.

A continuación, se dializó el precipitado de 80% redissuelto contra buffer fosfato de sodio 20 mM pH 7.5 y se realizó un intercambio aniónico utilizando el equipo Akta Purifier. Se adsorbió el precipitado redissuelto y dializado en una columna High trap Q HP 5 mL eluyendo con gradiente de cloruro de sodio (0-1M). Las fracciones en las que se identificó actividad α -fucosidasa eluyeron con una fuerza iónica de entre 0.7-0.8M (Figura 4.2A) y corresponden a las fracciones 59-63 cuyo perfil electroforético se muestra en la Figura 4.2B. A los efectos de optimizar la purificación se repitió el intercambio aniónico, pero

realizando una elución por saltos de fuerza iónica (0.7 M, 0.8 M, 0.9 M, 1.0 M de NaCl). Como se puede ver en la (Figura 4.3 A) las proteínas con actividad α -fucosidasa eluyeron del intercambiador aniónico con una fuerza iónica de 0,8 M (fracciones 29-34) y presentaron un perfil electroforético similar al observado cuando la elución se realizó por gradiente (Figura 4.2).

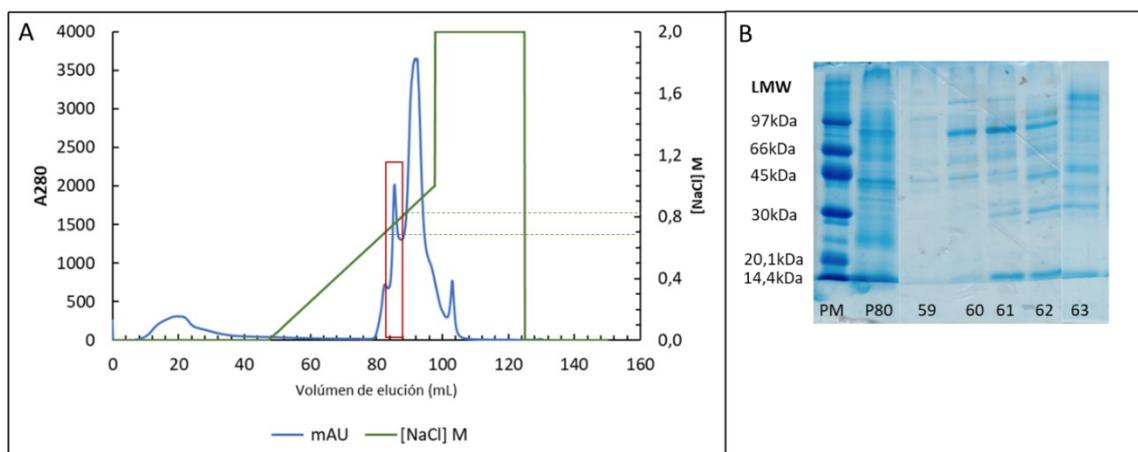


Figura 4.2- Intercambio aniónico del precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80% del sobrenadante de cultivo de *D. sordulentum* DS-1488. **A)** Elución por gradiente de NaCl. En azul se grafica la A280, en verde la concentración de NaCl y en rojo se indican las fracciones con actividad α -fucosidasa **B)** Electroforesis en condiciones desnaturalizantes de las fracciones del intercambio iónico. **PM:** Estándares de PM; **P80:** precipitado con 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; **59-63:** Fracciones con actividad α -fucosidasa.

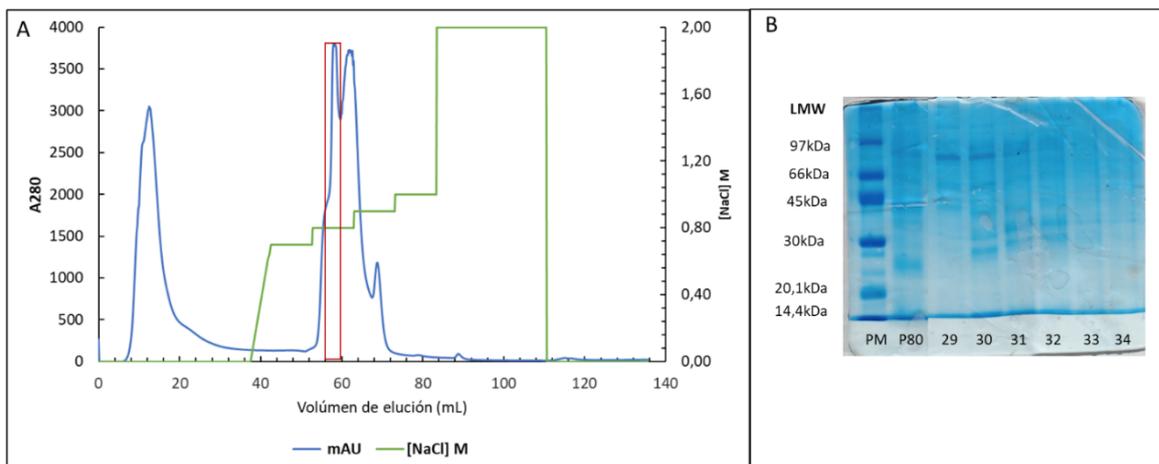


Figura 4.3- Intercambio aniónico del precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80% del sobrenadante de cultivo de *D. sordulentum* DS-1488. **A)** Elución por saltos de NaCl. En azul se grafica la A280, en verde la concentración de NaCl y en rojo se indican las fracciones con actividad α -fucosidasa **B)** Electroforesis en condiciones desnaturalizantes de las fracciones del intercambio iónico. **PM:** Estándares de PM; **P80:** precipitado con 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; **29-34:** Fracciones con actividad α -fucosidasa.

Una vez que se determinó que la α -fucosidasa se adsorbía a un intercambiador aniónico y eluía con una fuerza iónica de 0.8M se resolvió escalar el proceso realizando la adsorción al intercambiador en batch utilizando la resina Capto Q (10 mL). De esta forma fue posible adsorber 16 mL de precipitado con 80% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ redissuelto y dializado.

Como se muestra en la figura 4.4, si bien el paso de intercambio aniónico permitió continuar concentrando las proteínas, la pureza de las fracciones con actividad α -fucosidasa están aún lejos de tener una pureza adecuada. En este contexto se resolvió realizar un pool con todas las fracciones del intercambio iónico con actividad α -fucosidasa y continuar su purificación incorporando un paso de cromatografía de exclusión molecular.

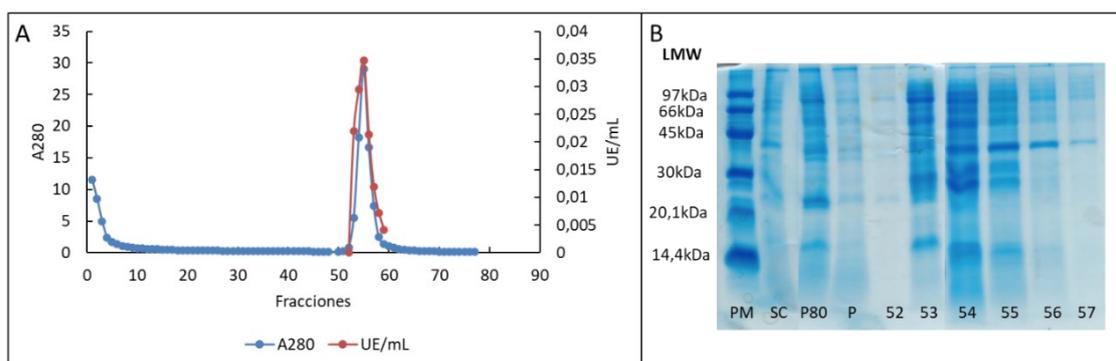


Figura 4.4- Intercambio iónico del precipitado con 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sobrenadante de cultivo del *D. sordulentum* realizado en batch y eluido con 0.8 M NaCl. A) Diagrama de elución. B) Evaluación por SDS-PAGE de las fracciones del Intercambio iónico: PM Estándares de PM; SC Sobrenadante de cultivo; P80 Precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80% redissuelto y dializado; P percolado del intercambio iónico; 52-57 Fracciones 52-57 del eluido con NaCl 0.8M.

A tales efectos dicho pool se dializó contra buffer fosfato de sodio 20 mM pH 7.5 y se liofilizó para concentrarlo. Se retomó en un mínimo volumen de agua, y se sembró en una columna Superdex 200 10/300, eluyendo con buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7.5; NaCl 0.15 M. Del cromatograma de elución correspondiente (Figura 4.5) se pudo concluir que las fracciones con actividad α -fucosidasas eluyeron con un volumen de elución que va de 13-17 mL coincidiendo con el descenso del segundo pico de elución. Esto haría suponer que se logró una purificación apreciable en dichas fracciones.

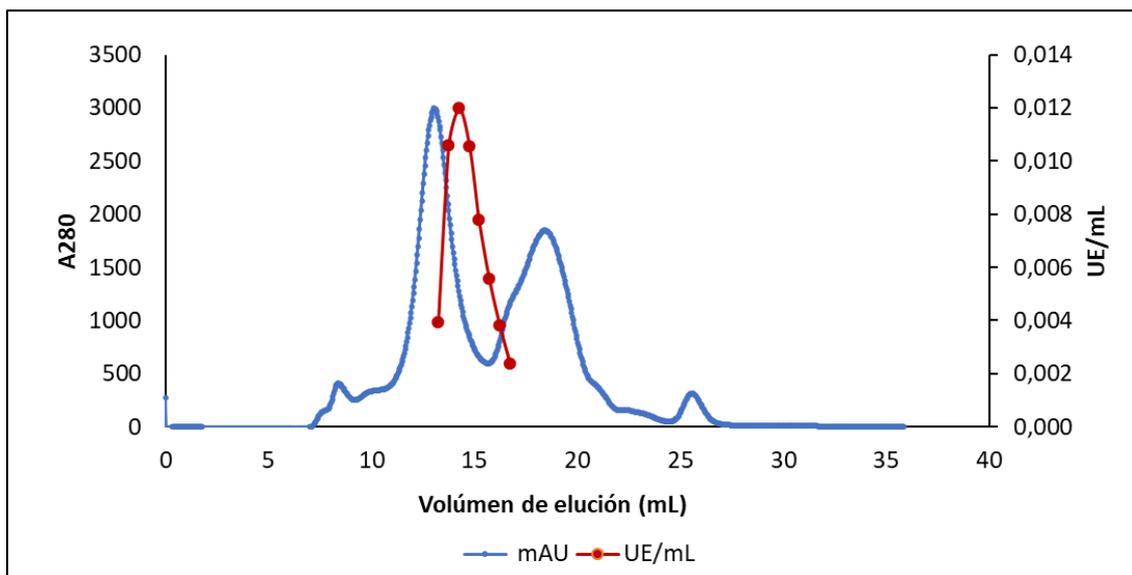


Figura 4.5- Cromatograma de elución de la Gel filtración de la fracción concentrada del eluido del intercambio iónico.

A continuación, se analizó la pureza de dichas fracciones mediante electroforesis desnaturalizante (Figura 4.6). En la misma se puede observar en las fracciones 25-28, correspondiente a los volúmenes de elución de 12,5 a 14 mL, una banda relativamente pura con un peso molecular del entorno de los 97 kDa. Dicha banda se observa también en las fracciones 29-32 (volúmenes de elución de 14-16 mL) pero ya comienza a estar impurificada con proteínas de menor peso molecular que eluirían en el siguiente pico de la gel filtración. Por lo cual, se realizó un pool con las fracciones 25-28 (pool 1) y otro con las fracciones 29-32 (pool 2), se concentraron por liofilización y se retomaron en un mínimo volumen de agua. Ambas fracciones presentaron actividad α -fucosidasa similar, pero de acuerdo con los resultados del control electroforético el grado de pureza es mayor para el pool 1 (Figura 4.6).

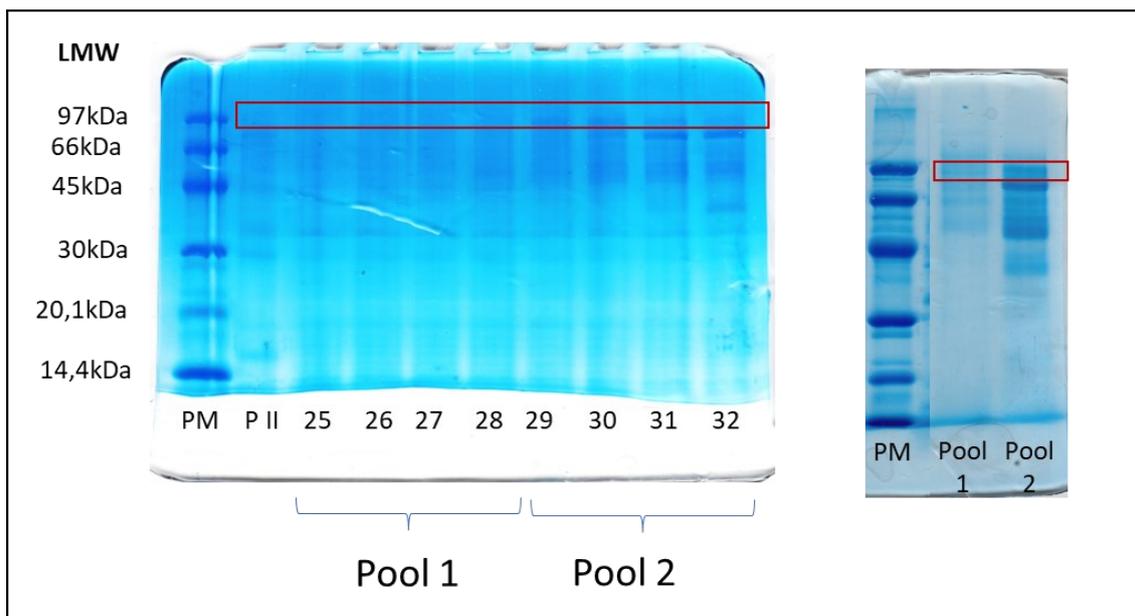


Figura 4.6- Control electroforético de las fracciones de la Gel filtración. PM Estándares de PM; PII Pool del intercambio iónico; 25-32 Eluidos de la cromatografía de exclusión molecular correspondientes a los volúmenes entre 13 y 17 mL.

Una vez optimizado el proceso de purificación, y a los efectos de obtener cantidad de α -fucosidasa suficiente para su caracterización, se repitió todo el procedimiento partiendo de cuatro cultivos de 200 ml cada uno. Se realizó una precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50 y 80 %, a continuación, el precipitado de 80% se redisolvió en buffer fosfato de sodio 20 mM pH 7.5, se dializó contra el mismo buffer y se le realizó un intercambio aniónico utilizando la resina Cpto Q. Se eluyó con el mismo buffer suplementado con 0.8 M de NaCl y el pool de las fracciones del eluido con actividad α -fucosidasa se dializó contra buffer fosfato de sodio 20 mM pH 7.5, se liofilizó y se retomó en un mínimo volumen de agua. Finalmente se realizó una gel filtración utilizando columna Superdex 200 10/300. Con las fracciones con actividad α -fucosidasa de la gel filtración se hicieron tres pooles teniendo en cuenta el grado de pureza de los mismos (figura 4.7).

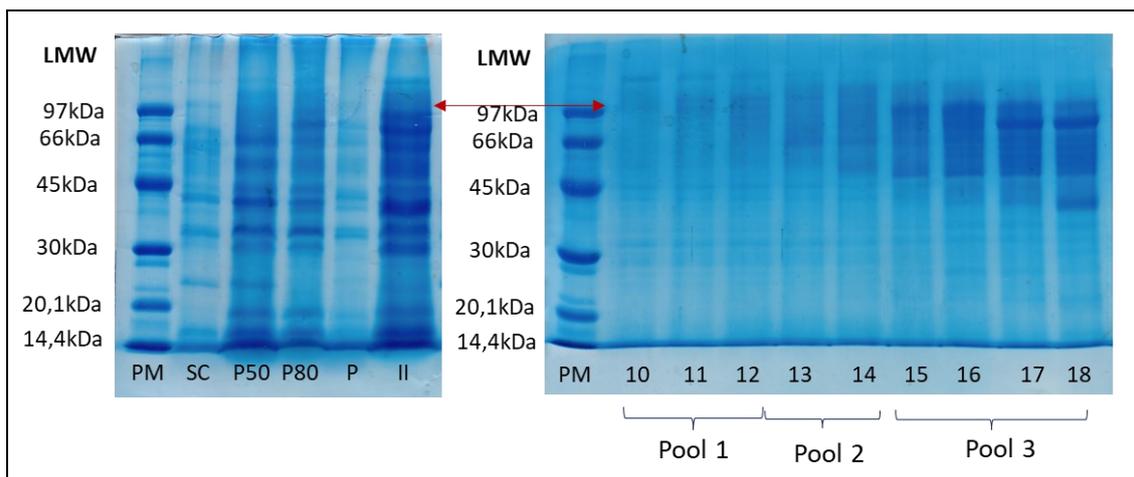


Figura 4.7 Control electroforético del proceso completo de purificación. PM: Estándares de PM; SC: Sobrenadante de cultivo; P50: precipitado con 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; P80: precipitado con 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; P: Percolado del intercambio iónico; II: Pool del intercambio iónico; 10-18 Eluidos de la cromatografía de exclusión molecular correspondientes a los volúmenes entre 12 y 16 mL.

En la tabla 4.1 se puede observar el cuadro de purificación obtenido considerando las cuatro purificaciones. De la misma se puede concluir que los distintos pasos de purificación incrementan la pureza de la enzima, pero con bajos rendimientos de purificación fundamentalmente en el último paso de la gel filtración. Esto es algo que ya ha sido observado para la purificación de α -fucosidasa [69,78].

Tabla 4.1 Cuadro de purificación de α -fucosidasa de *D. sordulentum* DS-1488

Etapa	Vol (mL)	UE (mUE)	[Prot] (mg)	AE (mUE/mg)	FP	% Recuperación
Sobrenadante	164 \pm 4	2676 \pm 1208	566 \pm 60	5 \pm 2	1	100
Precipitado SA	16 \pm 0.6	1000 \pm 367	73 \pm 9	14 \pm 4	3	37
Pool Eluido II	1 \pm 0.4	496 \pm 136	17 \pm 4	30 \pm 1	6	19
Pool 1 GF	0.5 \pm 0.3	22 \pm 19	0.2 \pm 0.1	92 \pm 33	19	1
Pool 2 GF	0.3 \pm 0.2	75 \pm 34	0.5 \pm 0.3	151 \pm 27	32	3
Pool 3GF	0.9 \pm 0.6	130 \pm 63	3 \pm 1	44 \pm 11	9	5

En este último paso se generaron tres pools con distinto grado de actividad específica y pureza. Si bien el pool 2 es el que presentó una mayor actividad específica debido a una mayor actividad α -fucosidasa, de acuerdo con la electroforesis el grado de pureza es menor. Dependiendo de la aplicación que se le vaya a dar a la enzima es el grado de pureza requerido. Cuando la α -fucosidasa va a ser utilizada como herramienta en análisis glicómico para la remoción selectiva de fucosa, de forma de poder caracterizar el rol biológico de la fucosa, la misma debe ser extremadamente pura aun cuando esto

signifique que se tenga que sacrificar el rendimiento de purificación. Para otras aplicaciones podrían utilizarse fracciones con menor grado de pureza como es el caso de los pools 2 y 3. A los efectos de la caracterización de α -fucosidasa se continuó trabajando con el pool 1.

4.2.2. Caracterización de la α -fucosidasa de *Dichostereum sordulentum* DS-1488

4.2.2.1. Determinación de Peso Molecular

La determinación del peso molecular de la α -fucosidasa de *D. sordulentum* DS-1488 se realizó combinando experimentos de exclusión molecular y electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Se sembró la α -fucosidasa purificada en la columna Superdex 200 10/300 previamente calibrada con estándares de PM. Con el volumen de elución correspondiente a la α -fucosidasa (12.7 mL) se calculó su Kav (0.258) e interpolando en la curva de selectividad correspondiente se determinó que el PM de la misma era de 213.840 Da (Figura 4.8).

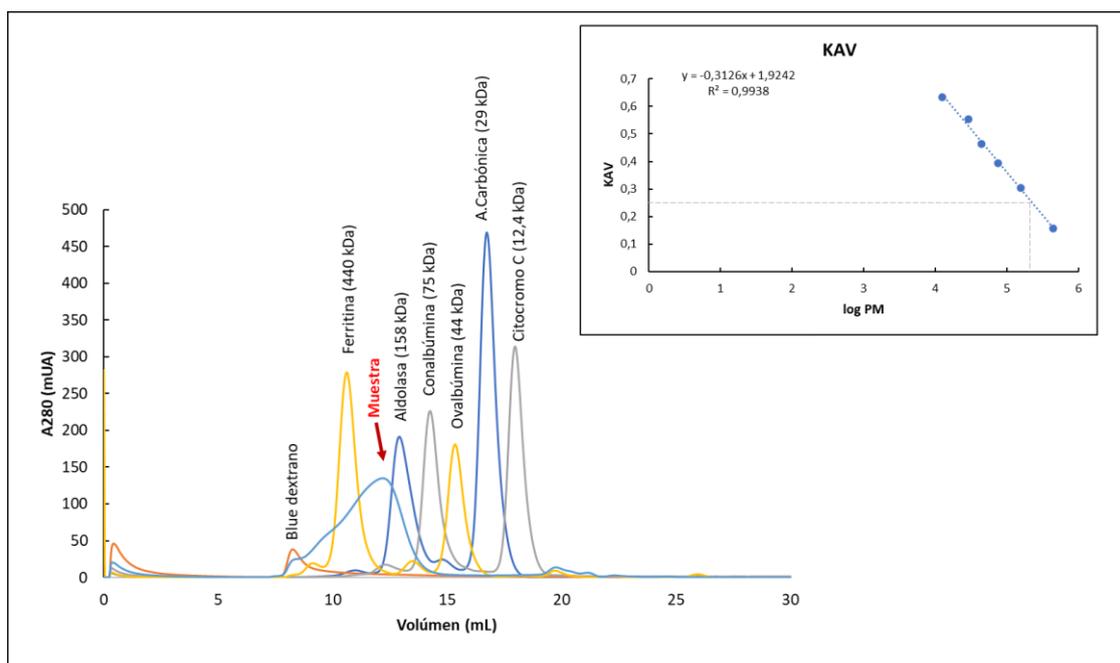


Figura 4.8- Diagrama de elución de la cromatografía de exclusión molecular de la α -fucosidasa purificada y los correspondientes estándares de PM.

Paralelamente se determinó el peso molecular utilizando electroforesis desnaturalizante, interpolando el Rf (0.2) de la banda correspondiente a la α -fucosidasa purificada en la curva de calibración realizada con los estándares de PM (log PM vs Rf). De esta forma se determinó que el peso molecular de la banda era de 92.688 Da (Figura 4.9).

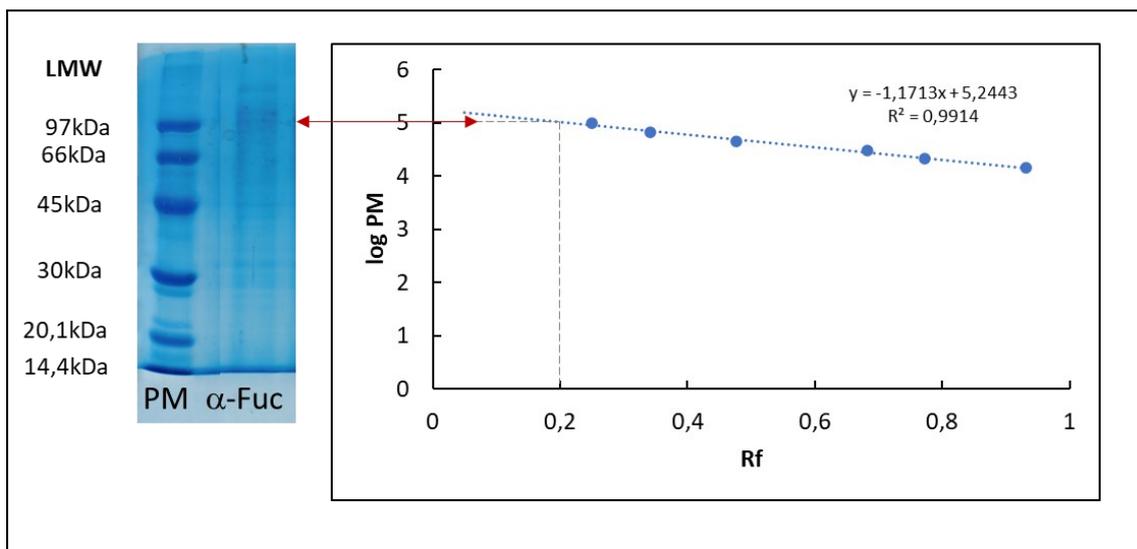


Figura 4.9- Determinación de PM por electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)

Teniendo en cuenta que la determinación de PM por cromatografía de exclusión molecular permite estimar el peso molecular de la proteína nativa, mientras que en una electroforesis desnaturizante lo que se puede estimar son los pesos moleculares de las subunidades y que, el cociente entre el PM determinado por cromatografía de exclusión molecular (213.840 Da) y el determinado por SDS-PAGE (92.688 Da) es de 2.3 se pudo concluir que la α -fucosidasa de *D. sordulentum* DS-1488 es una proteína homodimérica con un peso molecular del entorno de 214 kDa. Se han descrito en bibliografía α -fucosidasas homodiméricas con pesos moleculares de 285 kDa (*B. circulans*), 196 kDa (*B. cereus*) 200 kDa (*Bacillus* sp.); heterotetraméricas con peso molecular 240 kDa (*Thermus* sp.) y monoméricas con peso molecular de 80kDa (*Fusarium oxysporum*) y 59 y 76 kDa (*Streptomyces* sp.) [67, 69,71,78-80].

4.2.2.2. Determinación de condiciones óptimas

La determinación de pH óptimo se realizó midiendo los μ moles de PNP / mL liberados por minuto a distintos pHs (4.0, 5.0, 6.5, 7.4, 8.5, 9.5) y 37 °C, utilizando PNPf como sustrato. En la (Figura 4.10 A) se puede observar que el pH óptimo se encuentra en el entorno de 4.0 disminuyendo la actividad de la enzima hacia pHs más alcalinos. Mientras que a pH 6.5 aún se mantiene un 82% de la actividad de la enzima, a pH 7.4 ya decae a un 17%. Esto es coincidente con lo reportado en bibliografía, donde los pH óptimos descritos para las α -fucosidasas se encuentran en el entorno de 4.5-7.0 [67-70, 78-81].

La determinación de la temperatura óptima se realizó midiendo los μ moles de PNP/ mL liberados por minuto a pH 4.0 y distintas temperaturas (37°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C,

70°C, 80°C) utilizando el PNPF como sustrato. En la (figura 4.10 B) se puede observar que la temperatura óptima se encuentra en un rango de 60°C a 70°C, coincidiendo con lo reportado en bibliografía [67-68, 71,78-79].

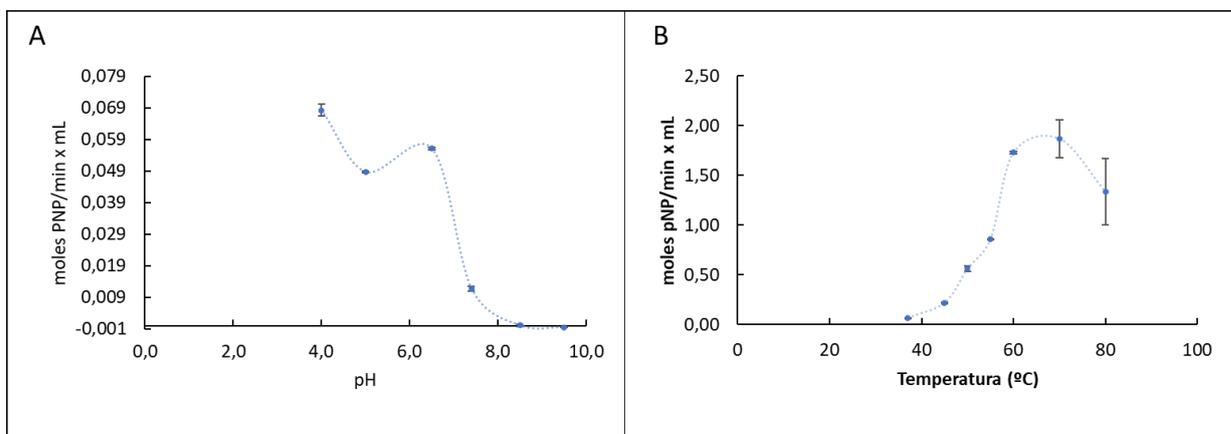


Figura 4.10 – Determinación de condiciones óptimas de la α -fucosidasa de *D. sordulentum*. DS-1488
A) pH óptimo; B) Temperatura óptima

4.2.2.3. Determinación de parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos se evaluaron utilizando PNPF (0.1-10 mM) como sustrato. El perfil obtenido de la linealización de Lineaweaver-Burk presenta un perfil que se ajusta a una inhibición por sustrato (Figura 4.11 A) [90]. Este perfil ya ha sido descrito para α -fucosidasas [81]. Con los valores de la porción lineal del gráfico se determinaron la constante de Michaelis Menten (0.27 ± 0.06 mM) y la velocidad máxima (3.3 ± 0.3 μ moles PNP/min x mg). Si se observa el gráfico de velocidad inicial en función de la concentración de sustrato el comportamiento es compatible con una inhibición por sustrato. Se observa que al aumentar la concentración de sustrato la velocidad aumenta hasta alcanzar un 90% de la V_{max} cuando la concentración de sustrato es 2 mM (7.4 veces la K_M) para luego disminuir poniendo de manifiesto que altas concentraciones de sustrato inhiben la enzima. Los parámetros cinéticos determinados son coincidentes con los reportados en bibliografía [66,68,71, 81,91].

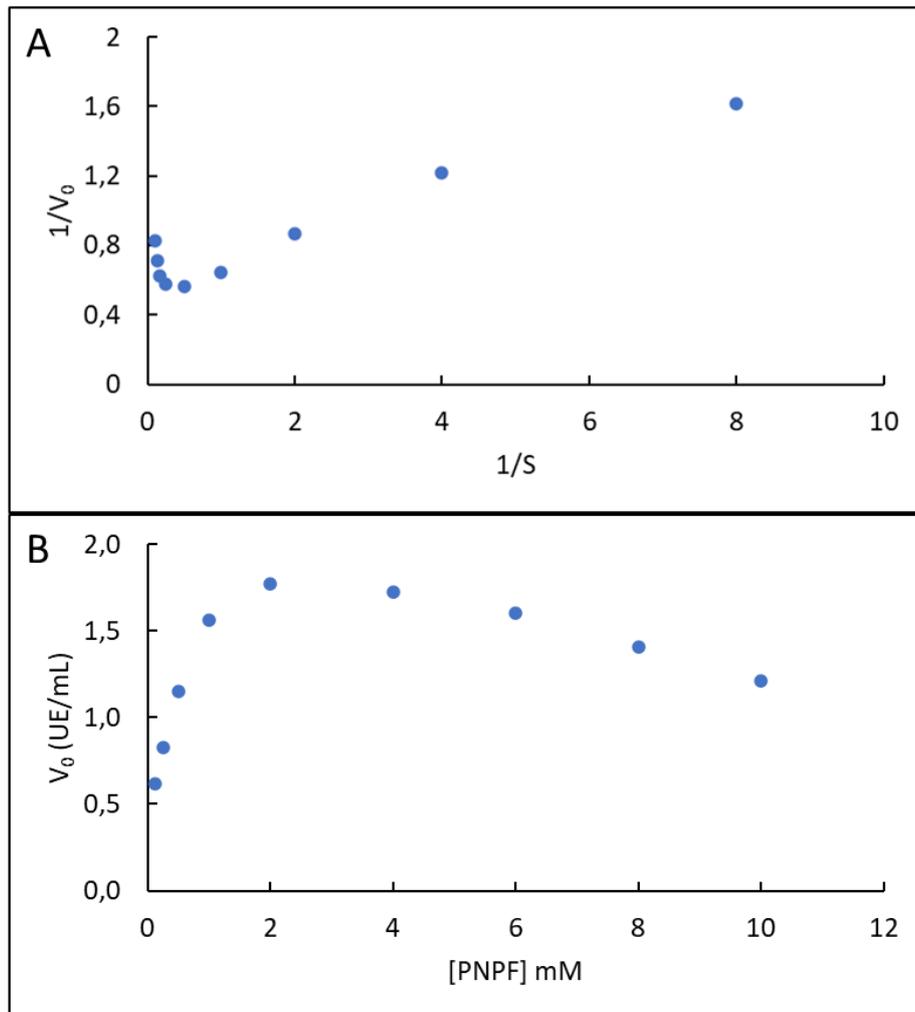


Figura 4.11 Determinación de los parámetros cinéticos de α -fucosidasa de *D. sordulentum* DS-1488. A) Gráfico de Lineaweaver-burk; B) Gráfico de Michaelis Menten

En suma, se logró purificar y caracterizar la α -fucosidasa de *Dichostereum sordulentum* DS-1488, resultando ser una proteína homodimérica con un PM de 214 kDa que presenta un pH óptimo de 4.0 y una temperatura óptima de 70 °C. Tiene una Km de 0.27 mM y presenta inhibición por sustrato. Si bien se logró un alto grado de purificación el mismo trae como contrapartida muy bajos rendimientos.

En ese sentido sería interesante identificar mediante técnicas moleculares el gen que codifica la enzima, para poder diseñar una estrategia de producción de un microorganismo recombinante que porte y exprese dicho gen dado que aumentaría los rendimientos de purificación. Por otra parte, a futuro y con el objetivo de incrementar la caracterización de la enzima se deberían realizar ensayos de especificidad de sustrato.

CAPÍTULO 5. PURIFICACIÓN DE α -MANOSIDASA

5.1. Introducción

Las α -manosidasas (α -D-manósido mano hidrolasa EC 3.2.1.24) son glicosidasas con especificidad para la hidrólisis de unidades de α -manosa terminales y juegan un rol importante en el procesamiento de glicanos con alto contenido de manosa. Esto las convierte en herramientas útiles para el análisis del rol biológico que cumplen los glicanos manosilados [55]. Se encuentran clasificadas en base a su similitud de secuencia en la base de datos CAZy (Carbohydrate Active Enzymes) en los grupos GH38, GH47 y GH92. A su vez se pueden clasificar en clases I y II en función de sus mecanismos catalíticos, especificidad de sustratos e inhibidores como se describe en detalle en la introducción [5,57-62]. Son enzimas ubicuas pudiendo purificarse de plantas, animales y microorganismos. En el caso de las de origen microbiano se puede inducir su expresión utilizando mananos o extractos de levadura como fuente de carbono. En su mayoría presentan un pH óptimo entre 5 y 7, temperatura óptima entre 40-50°C y son estables en pHs neutros o alcalinos. Generalmente son proteínas oligoméricas compuestas por cuatro o seis subunidades con un alto peso molecular [5,59,61,63-65]. En este capítulo nos enfocamos en la purificación de la α -manosidasa de *Bacillus* sp. 12.22.

5.2. Resultados

5.2.1. Purificación de α -manosidasa de *Bacillus* sp. 12.22

Como se describió en el capítulo 3 dentro de las cepas bacterianas en las que se identificó actividad α -manosidasa extracelular se seleccionó el *Bacillus* sp. 12.22 para proceder a la purificación de la misma. Se creció el microorganismo en las condiciones previamente evaluadas en el capítulo 3, medio de inducción conteniendo un 2% de extracto de levadura, durante 24 horas a 30°C y 150 rpm.

Como primer paso para concentrar la α -manosidasa se llevó a cabo una precipitación fraccionada con sulfato de amonio (30%, 50% y 80%) de acuerdo con el esquema de la Figura 5.1, evaluándose las distintas fracciones mediante SDS-PAGE e identificación de actividad enzimática.

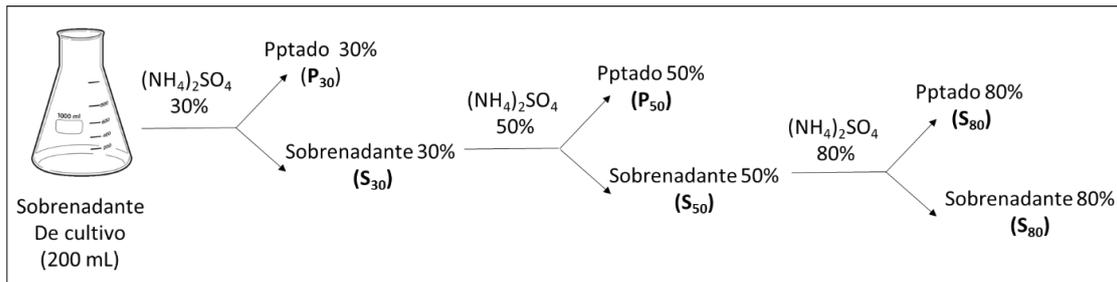


Figura 5.1 Esquema de purificación por precipitación fraccionada con sulfato de amonio

Se observó presencia de proteínas en todos los precipitados con distintas concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, aunque con mucha menor intensidad en el de 50% (Figura 5.2). Cuando se evaluó presencia de actividad α -manosidasa utilizando el ensayo de identificación de actividad enzimática descrito en materiales y métodos, se detectó actividad α -manosidasa en los sobrenadantes de precipitación de 30% y 50%, pero en ninguno de los precipitados. Esto estaría indicando que la α -manosidasa precipitaría con una concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 80% pero con pérdida de su actividad, o bien permanece en solución en una concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 80% pero en forma inactiva. Si bien estos resultados reflejan que la precipitación fraccionada con sulfato de amonio permitiría una purificación parcial de la enzima no es de utilidad ya que la actividad enzimática se pierde durante el proceso.

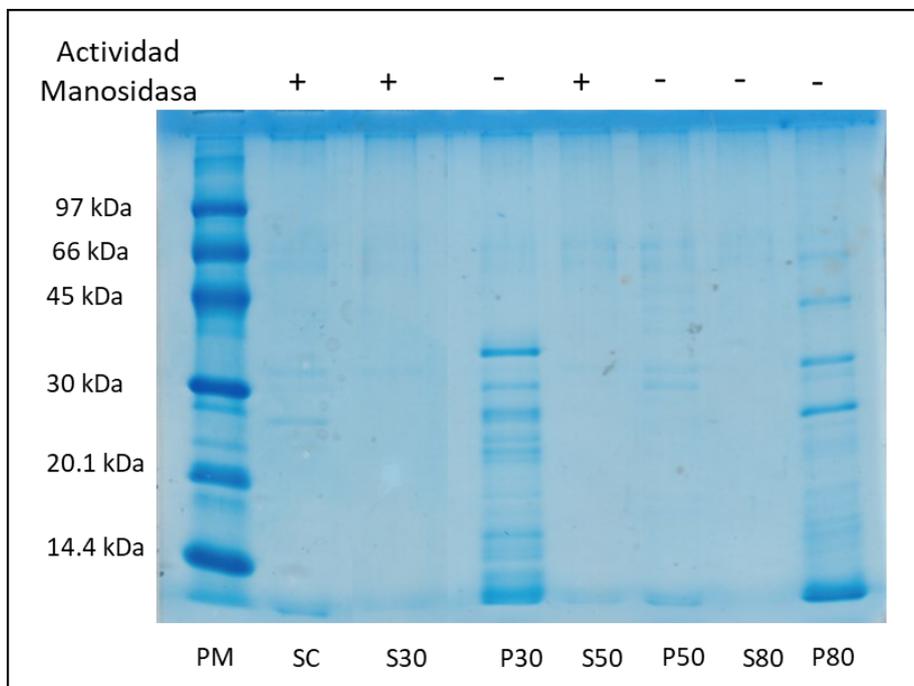


Figura 5.2 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) del fraccionamiento salino de *Bacillus sp. 12.22*. PM: Estándares de PM; SC: Sobrenadante de cultivo; S30: Sobrenadante de la precipitación con 30% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; P30: Precipitado con 30% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; S50: Sobrenadante de la precipitación con 50% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; P50: Precipitado con 50% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; S80: Sobrenadante de la precipitación con 80% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; P80: Precipitado con 80% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

En este contexto, se procedió a evaluar la precipitación con solventes orgánicos como estrategia alternativa para la concentración de la α -manosidasa de *Bacillus* sp. 12.22, utilizando etanol 65%, isopropanol 65% y acetona 60%. Los precipitados obtenidos se redisolieron en un mínimo volumen de buffer MES 10 mM pH 6.5, se evaluaron por SDS-PAGE y en las fracciones donde se identificó actividad enzimática se procedió a su cuantificación. En la figura 5.3A se puede observar para los tres solventes estudiados un aumento de la concentración de las proteínas en relación con el sobrenadante de cultivo con un perfil de bandas muy similar. El precipitado redisoluto correspondiente a las precipitaciones con etanol 65% y acetona 60 % presentó una actividad de 0.7 UE/mL mientras que el correspondiente a la precipitación con isopropanol fue de 0.9 UE/mL por lo cual se resolvió continuar trabajando con este último (Figura 5.3B).

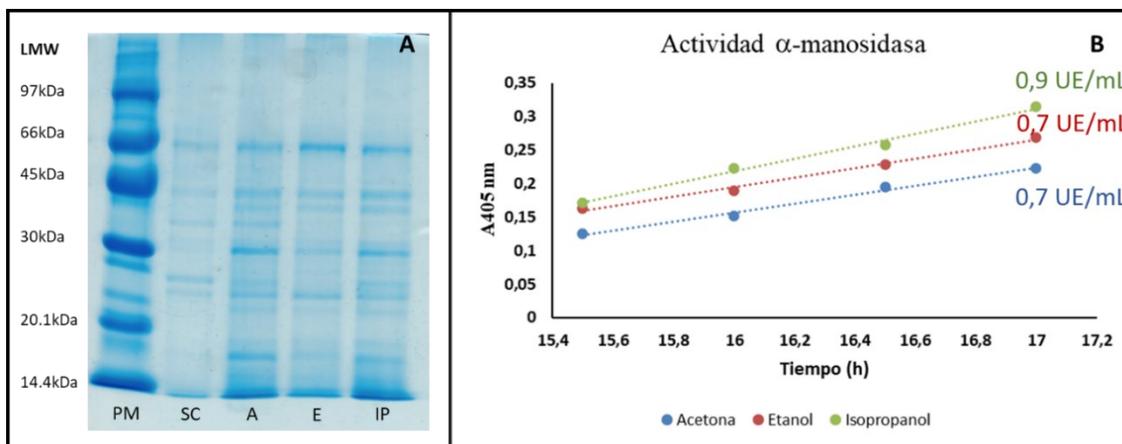


Figura 5.3 A) Electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) de la precipitación con solvente del sobrenadante de cultivo de *Bacillus* sp. 12.22. PM: Estándares de PM; SC: Sobrenadante de cultivo; A: Precipitado con acetona 60% redisoluto; E: Precipitado con Etanol 65 % redisoluto; IP: Precipitado con isopropanol 65% redisoluto. B) Actividad manosidasa

El precipitado con isopropanol 65% redisoluto se dializó contra buffer MES 10 mM pH 6.5; 2.5 mM CaCl_2 a los efectos de remover contaminantes de bajo peso molecular que pudieran interferir con el proceso de intercambio iónico con el que se continuó la purificación. Como forma de definir si la estrategia más conveniente era el uso de un intercambiador aniónico o catiónico, se realizaron experimentos independientes de intercambio iónico en batch utilizando DEAE-Sepharosa (intercambiador aniónico) y SP-Sepharose (intercambiador catiónico). La adsorción se realizó con buffer MES 10 mM PH 6.5; CaCl_2 2.5 mM y se eluyó por aumento de fuerza iónica suplementando ese mismo buffer con NaCl 1M. Se evaluó presencia de actividad α -manosidasa en los percolados y eluidos de ambos intercambios, observándose actividad en el percolado del intercambiador catiónico (SP-Sepharose) y en el eluido del intercambiador aniónico

(DEAE-Sepharose). Estos resultados permitieron seleccionar un intercambio aniónico como segundo paso en el proceso de purificación de la α -manosidasa del *Bacillus* sp. 12.22. El intercambio aniónico permitió concentrar las proteínas en relación con el paso anterior de la precipitación con isopropanol como se deduce del perfil electroforético del eluido de dicho intercambio (Figura 5.4, carriles 6 y 7). Sin embargo, el perfil electroforético sigue siendo muy similar lo que indica que no se logra un mayor grado de pureza lo que hizo necesario continuar con la optimización de ese paso.

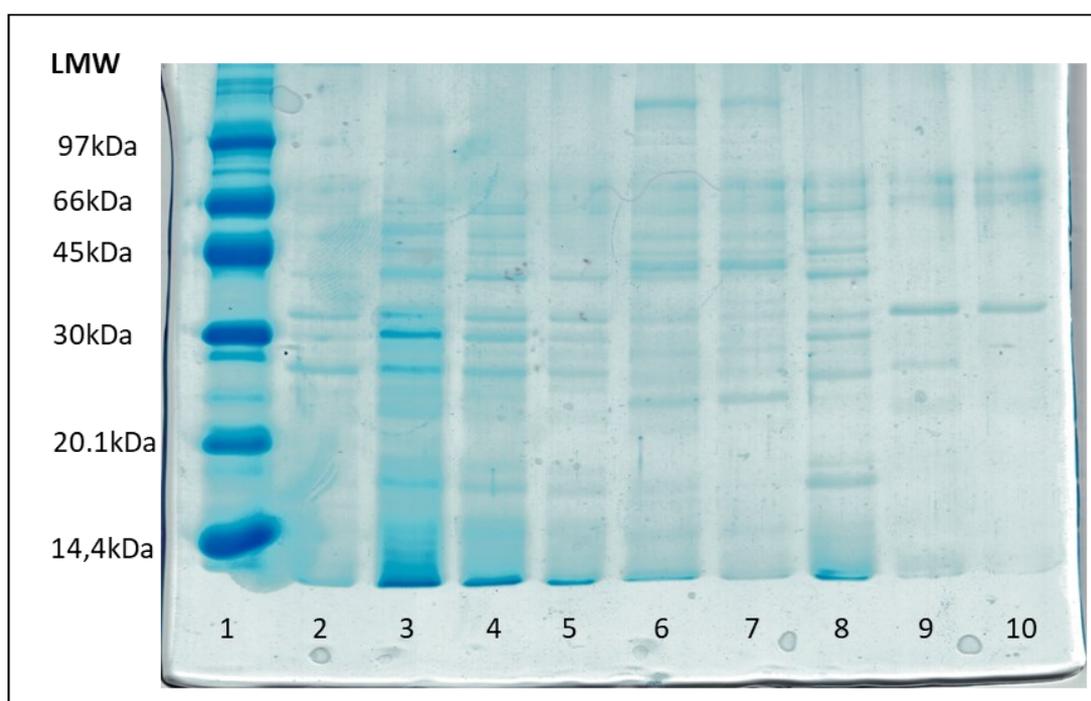


Figura 5.4. Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) de las fracciones de la cromatografía de intercambio iónico de la α -manosidasa de *Bacillus* sp. 12.22. **1:** Estándares de PM; **2:** Sobrenadante de cultivo de *Bacillus* sp. 12.22; **3:** Precipitado con isopropanol; **4:** Precipitado de isopropanol dializado; **5:** Percolado DEAE Sepharose; **6 y 7:** Eluido DEAE Sepharose; **8:** Percolado SP sepharose; **9 y 10:** Eluido SP sepharose

A tales efectos se realizó un intercambio aniónico en el equipo Akta Purifier utilizando una columna de intercambio aniónico High trap Q HP de 5 mL eluyendo por gradiente de NaCl (0 – 1.2M). Las fracciones donde se identificó presencia de actividad α -manosidasa eluyeron en un rango de volumen de 74-82 mL correspondiente a una fuerza iónica de entre 0.64-0.81 M (Figura 5.5). A su vez en la figura 5.6 se puede apreciar el perfil electroforético de las distintas fracciones del intercambio iónico. En los carriles 8 y 9 correspondientes a las fracciones con actividad α -manosidasa se observan dos bandas mayoritarias con PM de 50 kDa y 25 kDa. Dichos pesos moleculares fueron calculados mediante regresión lineal utilizando los estándares de PM.

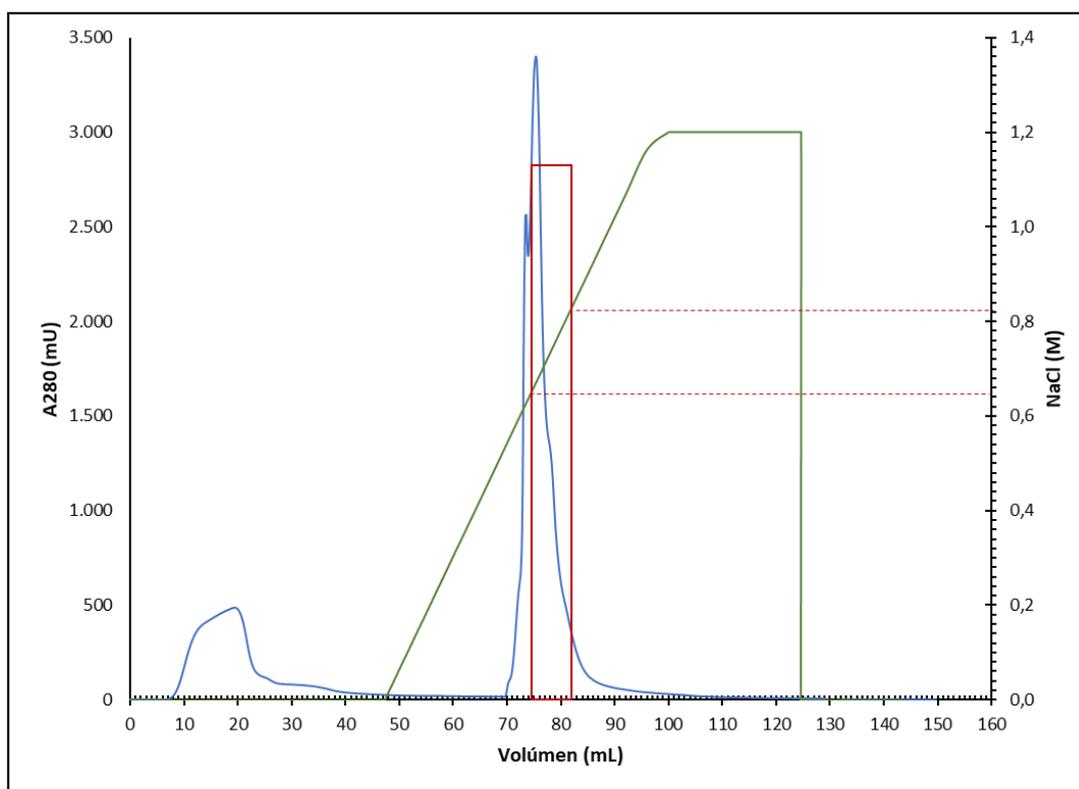


Figura 5.5 Diagrama de elución del intercambio iónico en columna High Trap QHP. En azul se grafica la A280 (mU); En verde se grafica el gradiente de elución con Cloruro de sodio y en rojo se enmarcan las fracciones con actividad α -manosidasa.

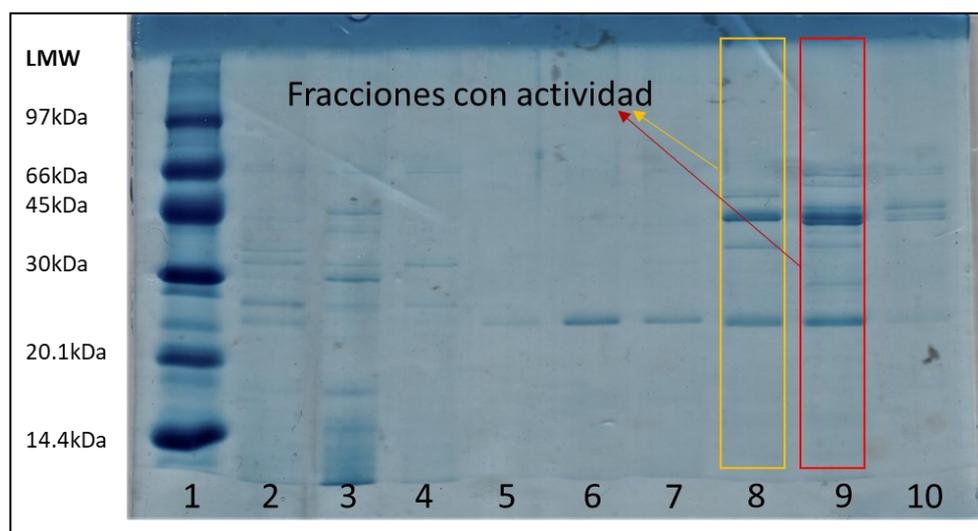


Figura 5.6 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) de las fracciones del intercambio iónico en columna High Trap QHP. 1- Estándares de PM; 2- Sobrenadante de cultivo; 3- Precipitado con isopropanol 65% dializado; 4- Percolado del intercambio iónico; 5- Eluido del intercambio iónico (70-71 mL); 6- Eluido del intercambio iónico (71-73 mL); 7- Eluido del intercambio iónico (73-74 mL); 8- Eluido del intercambio iónico (74-77 mL); 9- Eluido del intercambio iónico (77-79 mL); 10- Eluido del intercambio iónico (79-86 mL).

Si bien en el eluido del intercambio iónico se obtuvieron fracciones donde se identificó presencia de actividad α -manosidasa la misma fue notoriamente menor a la actividad del sobrenadante de cultivo. Mientras que el ensayo de identificación de actividad enzimática

daba positivo a las 24 horas para el sobrenadante, recién al cabo de 48 horas se podía detectar actividad en los eluidos. Esto nos hizo pensar que la enzima podría inactivarse parcialmente debido a la precipitación con isopropanol y posteriormente en el intercambio al remover algún componente esencial para la actividad enzimática. En función de lo anterior se resolvió evaluar la factibilidad de precipitar la enzima con menores concentraciones de isopropanol por lo que se procedió a la realización de una precipitación fraccionada con concentraciones de isopropanol de 20%, 35%, 50% y 65%. No se observó precipitado con 20% de isopropanol pero si en las otras concentraciones estudiadas. El perfil electroforético correspondiente a los precipitados a distintas concentraciones de isopropanol confirma la presencia de proteína en los mismos (Figura 5.7).

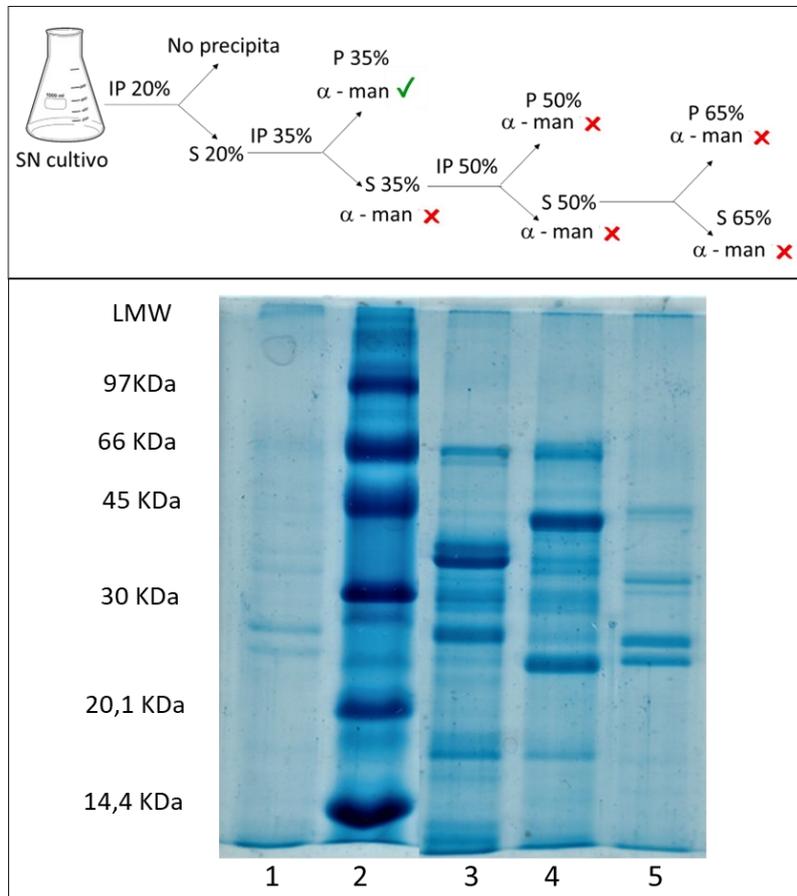


Figura 5.7 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) de la precipitación fraccionada con isopropanol del sobrenadante del cultivo de *Bacillus* sp. 12.22. 1-Sobrenadante de cultivo; 2- Marcador de PM; 3- Precipitado 35% isopropanol; 4-precipitado 50% isopropanol; 5- precipitado 65% isopropanol

En lo que respecta a la actividad α -manosidasa solo se detectó en el precipitado con isopropanol 35%. Esto indicaría que la α -manosidasa ya precipita a concentraciones de

isopropanol de 35% permitiendo en forma simultánea una concentración y purificación parcial de la misma. Por lo tanto, se continuó trabajando con la precipitación con isopropanol 35%.

Se realizaron varios intercambios iónicos, adsorbiendo el precipitado con isopropanol 35% del sobrenadante de cultivo a la columna High Trap Q HP (5 mL) eluyendo tanto con gradiente de NaCl, como por saltos de NaCl a concentraciones de 0.5; 0.6; 0.7 y 0.8M. En todos los casos se observó pérdida de actividad en los eluidos, lo que hizo pensar que o bien en la diálisis realizada luego de la precipitación con isopropanol o en el intercambio iónico se estaba removiendo algún componente crítico para la actividad enzimática.

Dado que se ha reportado que algunas α -manosidasas requieren iones para su actividad, [60,62,65,92-94] se evaluó si la pérdida de actividad observada se debía a la remoción de iones relevantes para la misma. Para eso, se gel filtró el sobrenadante de cultivo utilizando Sephadex G25 como se describe en materiales y métodos, utilizando como eluyente buffer MES 0,1 M pH 6,5 sin ningún suplemento de sales. Luego se incubó con PNPM 5 mM en buffer MES 0,1 M suplementado con distintas concentraciones de las siguientes sales: AcZn, MgCl₂, CoCl₂, MnCl₂, CaCl₂, KCl y NaCl a 37°C durante 15 horas y se midió A405 nm. Cuando se midió la A405 nm utilizando el sustrato suplementado con AcZn, CoCl₂ y MnCl₂ se observó una pérdida de la liberación de PNP indicando pérdida de actividad α -manosidasa. Sin embargo, la misma se recuperó cuando se evaluó en presencia de MgCl₂, CaCl₂, KCl o NaCl. Como se observa en la Figura 5.8 la mejor condición para evaluar la actividad α -manosidasa fue la presencia MgCl₂ 10 mM, por lo cuál en adelante se suplementaron todos los buffers con esta concentración de cloruro de magnesio.

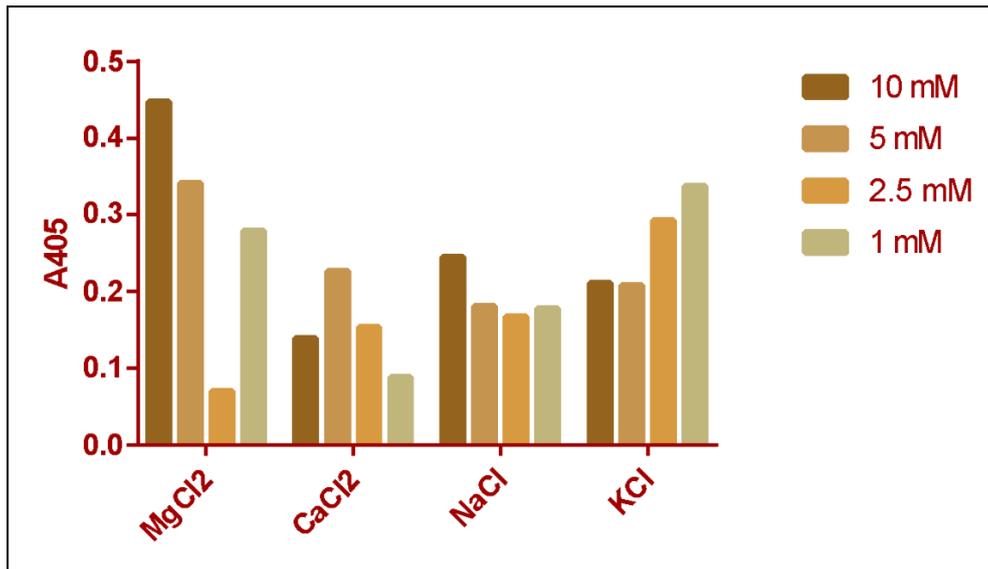


Figura 5.8. Efecto de los iones en la actividad enzimática.

Se realizó un nuevo intercambio iónico adsorbiendo a la columna High trap Q HP (5 mL) el precipitado con isopropanol 35% de 400 mL de sobrenadante de cultivo, rediseuelto en buffer MES 10 mM pH 6,5; CaCl₂ 2.5 mM; MgCl₂ 10 mM. La elución se realizó por saltos de fuerza iónica de 0.7M, 0.8 M y 0.96 M. Como se observa en la (figura 5.9) la α -manosidasa eluyó con una concentración de NaCl de 0.8M.

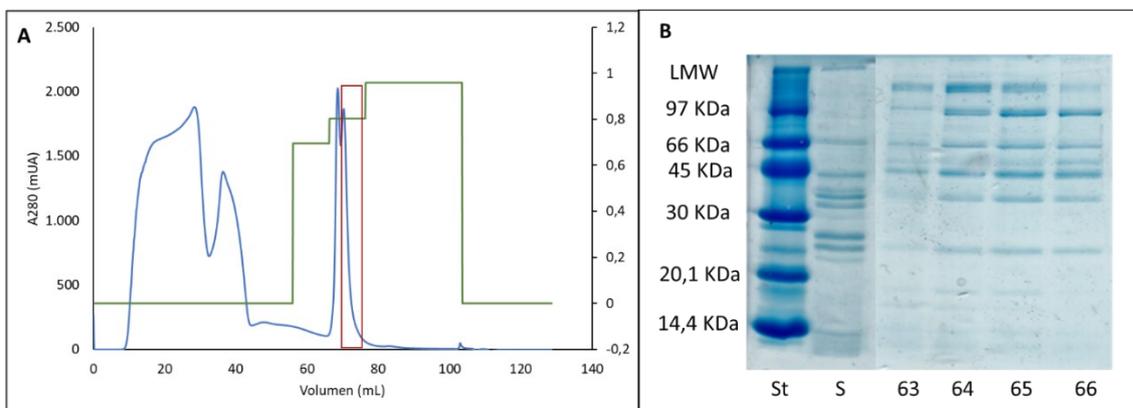


Figura 5.9. A) Diagrama de elución del intercambio iónico en columna High Trap QHP (5 mL). En azul se grafica la A280 (mU); En verde se grafica el gradiente de elución con cloruro de sodio y en rojo se enmarcan las fracciones con actividad α -manosidasa. **B) Electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) de las fracciones del intercambio iónico en columna High Trap QHP.** St- Estándares de PM; S- Sobrenadante de cultivo; fracciones 63-66 – Eluidos del intercambio iónico (69-73 mL).

Sin embargo, el grado de pureza obtenido en las fracciones con actividad α -manosidasa es mucho menor al obtenido con la elución por gradiente (Figura 5.5). Por otra parte, se continuó observando una pérdida notoria de la actividad enzimática en los eluidos del intercambio iónico en relación al sobrenadante de cultivo.

Debido a la baja estabilidad de la α -manosidasa se decidió no continuar intentando mejorar su purificación, y si evaluar la purificación de una α -manosidasa de otra fuente.

5.2.2. Evaluación de actividad α -manosidasa en sobrenadante de cultivo de levaduras y hongos

Se evaluó la producción de α -manosidasa en los sobrenadantes de cultivo de las levaduras que habían presentado actividad α -manosidasa (Capítulo 3) utilizando tanto extracto de levadura como Bio-Mos como inductor, sin embargo, la actividad enzimática resultó ser muy baja en ambos casos (Figura 5.10).

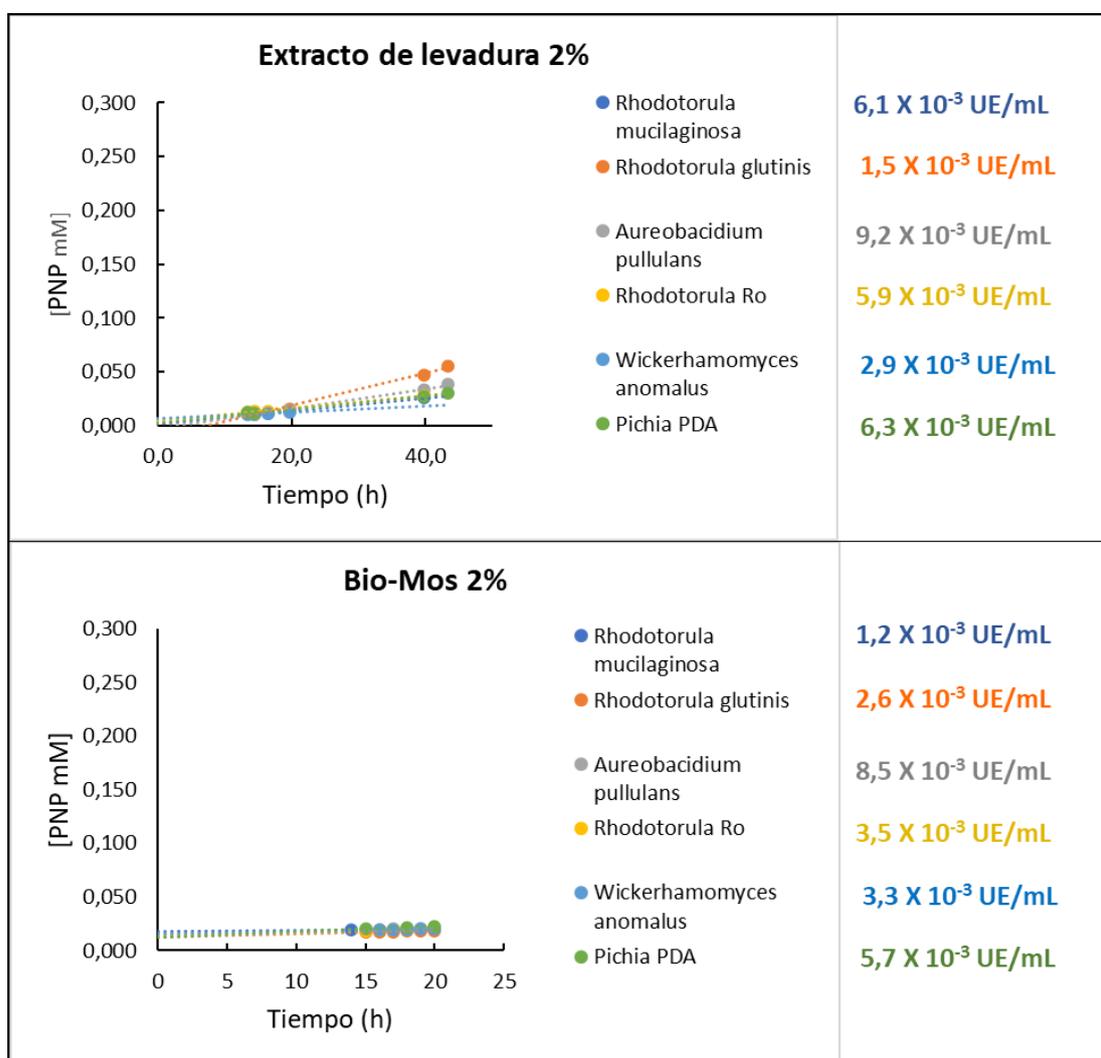


Figura 5.10- Actividad α -manosidasa en sobrenadante de cultivo de levaduras.

Por lo cual, se evaluó la actividad en los sobrenadantes de cultivo de los hongos filamentosos en los que se había identificado actividad α -manosidasa (Capítulo 3). Se estudió la influencia del inductor creciendo los hongos filamentosos en medio Czapek manosidasa utilizando 2% de extracto de levadura y 2% de Bio-Mos y dos tiempos de

incubación (5 y 7 días). En la figura 5.11 se puede observar que para todas las condiciones estudiadas la máxima actividad α -manosidasa se obtuvo en el sobrenadante del cultivo de *Aspergillus terreus* BFQU 121, siendo levemente mejor cuando el inductor era el extracto de levadura.

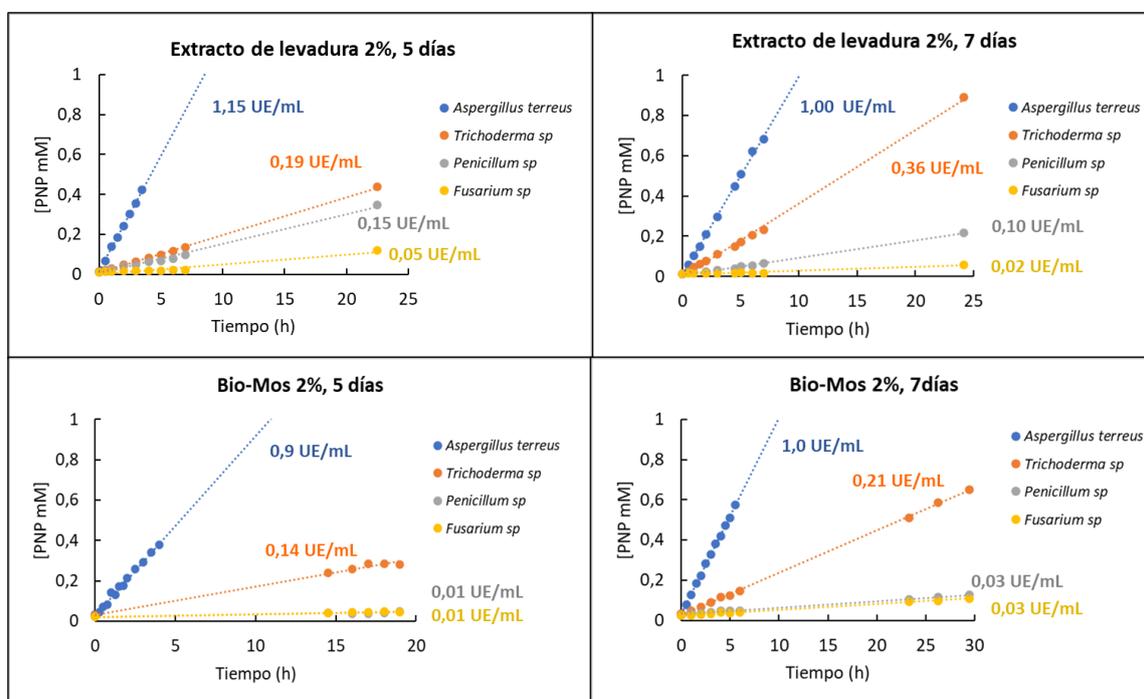


Figura 5.11- Actividad α -manosidasa en sobrenadante de cultivo de hongos filamentosos.

5.2.3. Evaluación de las mejores condiciones de crecimiento de cultivos de *Aspergillus terreus* BFQU 121 para maximizar la producción de α -manosidasa

En función de los resultados obtenidos se resolvió evaluar las mejores condiciones de crecimiento de cultivo del hongo *A. terreus* BFQU 121 de forma de maximizar la producción de α -manosidasa utilizando un diseño factorial de tres factores en dos niveles y con puntos intermedios. Los factores evaluados fueron: concentración de extracto de levadura (1-3%), temperatura (28-32°C) y tiempo de incubación (5-9 días) correspondiendo los puntos intermedios a 2% de extracto de levadura, 30 °C y 7 días. Se evaluó la velocidad de hidrólisis de PNPM obteniéndose las mejores producciones de enzima con 3% de extracto de levadura a 28 °C y 9 días de incubación (Figura 5.12) (ver Anexo I – 8).

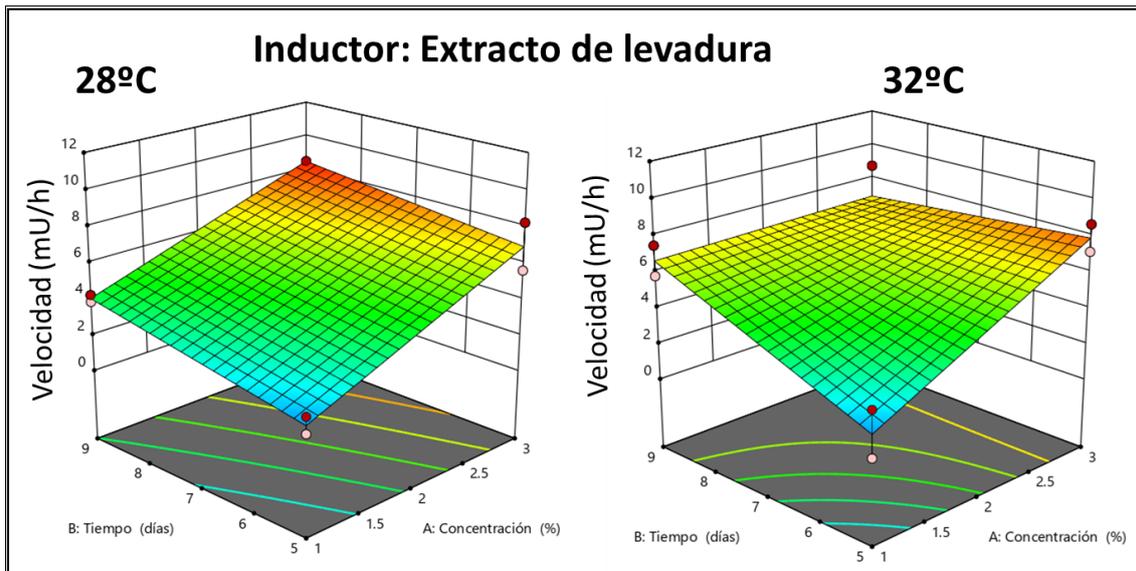


Figura 5.12. Diseño factorial de tres factores en dos niveles con punto medio para optimizar concentración de inductor, temperatura y tiempo para la producción de α -manosidasa de *Aspergillus terreus* BFQU 121.

En suma, en este capítulo se estudió la purificación de la enzima α -manosidasa de *Bacillus* sp. 12.22. Sin embargo, la pérdida de actividad enzimática durante el proceso de purificación no permitió continuar trabajando con la misma. Como alternativa se seleccionó una α -manosidasa extracelular del hongo *Aspergillus terreus* BFQU 121. Se evaluaron las mejores condiciones de crecimiento de cultivo para maximizar la producción de la enzima a los efectos de continuar trabajando en su purificación en futuras etapas.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

El objetivo de esta tesis de maestría fue la búsqueda de α -manosidasas y α -fucosidasas en microorganismos autóctonos, la evaluación en la producción de las enzimas seleccionadas, para su posterior purificación y caracterización. Esto permitiría su utilización como herramienta para la deglicosilación selectiva de manosa y fucosa de glicanos biológicos de forma de contribuir a la elucidación de su estructura y función en diversos procesos biológicos.

Se llevó a cabo un exhaustivo screening en bacterias, levaduras y hongos filamentosos para identificar actividad α -manosidasas y α -fucosidasas. Se encontró que las α -manosidasas fueron más prevalentes, especialmente en bacterias del género *Bacillus*, donde se identificó actividad enzimática tanto intracelular como extracelular. En contraste, la actividad α -fucosidasa fue más limitada y solo detectada en algunas levaduras cuando se utilizó fucosa como inductor y PGM como sustrato y en los hongos como *Fusarium* sp. Y3 y *Dichostereum sordulentum* DS-1488, siendo superior cuando se utilizó PGM como inductor en comparación con fucosa. Estos resultados resaltan la diversidad y distribución de estas enzimas en microorganismos autóctonos, ofreciendo un amplio espectro de potenciales fuentes enzimáticas.

La evaluación de las mejores condiciones de cultivo fue crucial para maximizar la producción de α -manosidasa y α -fucosidasa. Para α -manosidasa en *Bacillus* sp. 12.22 y *Bacillus* sp. X, se puede apreciar que la velocidad de la enzima fue superior cuando el inductor estudiado fue el extracto de levadura con relación a Bio-Mos, obteniéndose los mejores resultados para una concentración de 2%, 24 horas y 30°C para el *Bacillus* sp. 12.22. En cuanto a α -fucosidasa, se determinó que en el hongo *Dichostereum sordulentum* DS-1488 las mejores condiciones fueron 3% de PGM, 30°C y 7 días de incubación, mostrando una producción notablemente superior en comparación con *Fusarium* sp. Y3. Basados en los resultados de producción y actividad enzimática, se seleccionaron el *Bacillus* sp. 12.22 para la purificación de α -manosidasa y *Dichostereum sordulentum* DS-1488 para α -fucosidasa. Estos microorganismos demostraron condiciones óptimas de crecimiento que podrían permitir obtener enzimas puras y específicas, esenciales para estudios posteriores de caracterización y aplicaciones biotecnológicas.

Para la purificación de α -fucosidasa de *Dichostereum sordulentum* DS-1488 se desarrolló una estrategia de purificación que incluyó precipitación fraccionada con sulfato

de amonio seguida de cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión molecular. Si bien, se logró un grado de pureza significativo en fracciones específicas (Pool 1), los rendimientos de purificación fueron relativamente bajos, especialmente en el último paso de gel filtración.

La α -fucosidasa purificada de *Dichostereum sordulentum* DS-1488, un basidiomiceto autóctono de Uruguay se caracterizó como una proteína homodimérica con un peso molecular de aproximadamente 214 kDa, determinado, combinando técnicas de cromatografía de exclusión molecular y electroforesis desnaturalizante. Se determinó que su pH óptimo es 4.0 y su temperatura óptima es entre 60-70 °C. Por otra parte, se evaluaron los parámetros cinéticos utilizando PNPf como sustrato, revelando una constante de Michaelis-Menten de 0.27 mM y una velocidad máxima de 3.3 μ moles de PNP/minuto por mg. Se observó que la enzima presenta una inhibición por sustrato a concentraciones elevadas de PNPf.

Para la purificación de α -manosidasa de *Bacillus* sp. 12.22 se aplicaron varias estrategias de purificación incluyendo precipitación con sulfato de amonio y solventes orgánicos como isopropanol, seguido de intercambio iónico. Aunque, se logró la concentración parcial de la enzima, la pérdida de actividad durante la purificación sugiere desafíos en la estabilidad de la α -manosidasa de *Bacillus* sp. 12.22, que no permitieron continuar trabajando con la misma. Por lo que se decidió evaluar la purificación de una α -manosidasa de otra fuente.

Dados los buenos resultados obtenidos con la α -fucosidasa de origen fúngico y en función del screening previo de α -manosidasa en hongos filamentosos, se seleccionó la cepa de *Aspergillus terreus* BFQU 121 que fue la que presentó mayor actividad enzimática. Se determinaron las mejores condiciones de crecimiento de cultivo utilizando el software Desing Expert realizando un diseño factorial de tres factores en dos niveles con puntos intermedios. Las condiciones que permitieron maximizar la producción de α -manosidasa fueron 3% de extracto de levadura, 28°C y 9 días de incubación.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta maestría revelaron la diversidad y distribución de α -manosidasas y α -fucosidasas en microorganismos autóctonos, lo que sugiere un amplio potencial para la obtención de estas enzimas. Se purificó y caracterizó en forma exitosa una α -fucosidasa del hongo *Dichostereum sordulentum* DS-1488. A

pesar de las dificultades que se enfrentaron para la purificación de α -manosidasa de *Bacillus* sp. 12.22, se identificó el hongo *Aspergillus terreus* BFQU 121 como una prometedora fuente de α -manosidasa que ofrece oportunidades futuras interesantes. Este trabajo no solo destaca la importancia de explorar microorganismos autóctonos para la búsqueda de glicosidasas, sino que también abre la posibilidad de seguir investigando en el futuro sobre estrategias de producción de proteínas recombinantes para mejorar los rendimientos de purificación. Esto permitiría la producción de glicosidasas para su utilización como herramientas biotecnológicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] P.Gagneux, T. Hennet, Biological Functions of Glycans, in: Varki A, Cummings RD, Esko JD et. al. (Ed.), *Essentials of Glycobiology*, 4th ed., Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579984/> doi: 10.1101/glycobiology.4e.7
- [2] R.G. Spiro, Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds, *Glycobiology*. 12 (2002) 43R-56R. <https://doi.org/10.1093/glycob/12.4.43R>.
- [3] C. Reily, T.J. Stewart, M.B. Renfrow, J. Novak, Glycosylation in health and disease, *Nat. Rev. Nephrol.* 15 (2019) 346–366. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0129-4>.
- [4] K. Yamada, K. Kakehi, Recent advances in the analysis of carbohydrates for biomedical use, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (2011) 702–727. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.02.003>.
- [5] S. Ladevèze, E. Laville, J. Despres, P. Mosoni, G. Potocki-Véronèse, Mannoside recognition and degradation by bacteria, *Biol. Rev.* 92 (2017) 1969–1990. <https://doi.org/10.1111/brv.12316>.
- [6] D.L. Nelson, M.M. Cox, Glúcidos y glucobiología, in: *Lehninger Principios de Bioquímica*, Sexta, Ediciones Omega SRL., Barcelona, 2013: pp. 243–280.
- [7] B.C. Holdener, R.S. Haltiwanger, Protein O-fucosylation: structure and function, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 56 (2019) 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.12.005>.
- [8] W. van Tol, H. Wessels, D.J. Lefeber, O-glycosylation disorders pave the road for understanding the complex human O-glycosylation machinery, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 56 (2019) 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.12.006>.
- [9] M.M. Fuster, J.D. Esko, The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets, *Nat. Rev. Cancer.* 5 (2005) 526–542. <https://doi.org/10.1038/nrc1649>.
- [10] D.J. Vigerust, V.L. Shepherd, Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions, *Trends Microbiol.* 15 (2007) 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.03.003>.
- [11] I. van Die, R.D. Cummings, Glycan gimmickry by parasitic helminths: A strategy for modulating the host immune response?, *Glycobiology*. 20 (2010) 2–12. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp140>.
- [12] I. Bagdonaitė, S.Y. Vakhrushev, H.J. Joshi, H.H. Wandall, Viral glycoproteomes: technologies for characterization and outlook for vaccine design, *FEBS Lett.* 592 (2018) 3898–3920. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13177>.
- [13] C.A. Reis, R. Tauber, V. Blanchard, Glycosylation is a key in SARS-CoV-2 infection, *J. Mol. Med.* (2021). <https://doi.org/10.1007/s00109-021-02092-0>.
- [14] D.A. Harn, J. McDonald, O. Atochina, A.A. Da’Dara, Modulation of host immune responses by helminth glycans, *Immunol. Rev.* 230 (2009) 247–257.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00799.x>.

- [15] I.B.H. Wilson, K. Paschinger, Sweet secrets of a therapeutic worm: Mass-spectrometric N-glycomic analysis of *Trichuris suis*, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 461–471. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9154-8>.
- [16] V. Noya, E. Rodriguez, L. Cervi, C. Giacomini, N. Brossard, C. Chiale, C. Carmona, T. Freire, Modulation of dendritic cell maturation by *Fasciola hepatica*: Implications of glycans and mucins for vaccine development, *J. Vaccines Vaccin.* 5 (2014). <https://doi.org/10.4172/2157-7560.1000233>.
- [17] E. Rodríguez, V. Noya, L. Cervi, M.L. Chiribao, N. Brossard, C. Chiale, C. Carmona, C. Giacomini, T. Freire, Glycans from *Fasciola hepatica* Modulate the Host Immune Response and TLR-Induced Maturation of Dendritic Cells, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9 (2015). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004234>.
- [18] E. Rodríguez, H. Kalay, V. Noya, N. Brossard, C. Giacomini, Y. Van Kooyk, J.J. García-Vallejo, T. Freire, *Fasciola hepatica* glycoconjugates immunoregulate dendritic cells through the dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin inducing T cell anergy, *Sci. Rep.* 7 (2017). <https://doi.org/10.1038/srep46748>.
- [19] S.S. Pinho, C.A. Reis, Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications, *Nat. Rev. Cancer.* 15 (2015) 540–555. <https://doi.org/10.1038/nrc3982>.
- [20] U.M. Abd Hamid, L. Royle, R. Saldova, C.M. Radcliffe, D.J. Harvey, S.J. Storr, M. Pardo, R. Antrobus, C.J. Chapman, N. Zitzmann, J.F. Robertson, R.A. Dwek, P.M. Rudd, A strategy to reveal potential glycan markers from serum glycoproteins associated with breast cancer progression, *Glycobiology.* 18 (2008) 1105–1118. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn095>.
- [21] M.N. Christiansen, J. Chik, L. Lee, M. Anugraham, J.L. Abrahams, N.H. Packer, Cell surface protein glycosylation in cancer, *Proteomics.* 14 (2014) 525–546. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300387>.
- [22] T.S. Keeley, S. Yang, E. Lau, The diverse contributions of fucose linkages in cancer, *Cancers (Basel).* 11 (2019) 1–25. <https://doi.org/10.3390/cancers11091241>.
- [23] M.L.A. de Leoz, L.J.T. Young, H.J. An, S.R. Kronewitter, J. Kim, S. Miyamoto, A.D. Borowsky, H.K. Chew, C.B. Lebrilla, High-Mannose Glycans are Elevated during Breast Cancer Progression, *Mol. Cell. Proteomics.* 10 (2011) M110.002717. <https://doi.org/10.1074/mcp.m110.002717>.
- [24] B.I. Cantarel, P.M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard, B. Henrissat, The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) 233–238. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn663>.
- [25] J.D. Rini, J.M., Moremen, K.W., Davis, B.G., Esko, Glycosyltransferases and Glycan-Processing Enzymes, in: et al. Varki A, Cummings RD, Esko JD (Ed.), *Essentials Glycobiol.* [Internet], 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579908/> doi: 10.1101/glycobiology.4e.6.

- [26] T.M. Gloster, Advances in understanding glycosyltransferases from a structural perspective, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 28 (2014) 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.08.012>.
- [27] L.L. Lairson, B. Henrissat, G.J. Davies, S.G. Withers, Glycosyl transferases: Structures, functions, and mechanisms, *Annu. Rev. Biochem.* 77 (2008) 521–555. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.061005.092322>.
- [28] A. Trincone, A., Giordano, Glycosyl Hydrolases and Glycosyltransferases in the Synthesis of Oligosaccharides, *Curr. Org. Chem.* 10 (2006) 1163–1193. <https://doi.org/10.2174/138527206777698075>.
- [29] Z. Mészáros, P. Nekvasilová, P. Bojarová, V. Křen, K. Slámová, Advanced glycosidases as ingenious biosynthetic instruments, *Biotechnol. Adv.* 49 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107733>.
- [30] P. Bojarová, V. Křen, Glycosidases: a key to tailored carbohydrates, *Trends Biotechnol.* 27 (2009) 199–209. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.12.003>.
- [31] J.D. Mccarter, S.G. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr Opin Struct Biol.* 4(6) (1994) 885-892. doi: 10.1016/0959-440x(94)90271-2.
- [32] M.A.B. Morais, A. Nin-Hill, C. Rovira, Glycosidase mechanisms: Sugar conformations and reactivity in endo- and exo-acting enzymes, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 74 (2023) 102282. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2023.102282>.
- [33] B. Henrissat, A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochem. J.* 280 (1991) 309–316. <https://doi.org/10.1042/bj2800309>.
- [34] N.Terrapon, Henrissat, B., Aoki-Kinoshita, K.F., Surolia, A., Stanley, A Genomic View of Glycobiology, in: Varki A, Cummings RD, Esko JD (Ed.), *Essentials of Glycobiology*. [Internet], 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579993/> doi: 10.1101/glycobiology.4e.8.
- [35] E. Drula, M.L. Garron, S. Dogan, V. Lombard, B. Henrissat, N. Terrapon, The carbohydrate-active enzyme database: Functions and literature, *Nucleic Acids Res.* 50 (2022) D571–D577. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1045>.
- [36] G. Davies, B. Henrissat, Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases, *Structure.* 3 (1995) 853–859. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00220-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00220-9).
- [37] M. Scigelova, S. Singh, D.H.G. Crout, Glycosidases—a great synthetic tool, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 6 (1999) 483–494. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(99\)00012-0](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(99)00012-0).
- [38] P. Cabezas, J.A., Reglereo, A., Calvo, Review Glycosidases Hexosaminidases and Glucuronidase From Some Molluscs and Vertebrates . and Neuraminidase From Virus), *Int. J. Biochem.* 15 (1983) 243–259.
- [39] A. Herscovics, Glycosidases of the Asparagine-linked Oligosaccharide Processing Pathway, *Compr. Nat. Prod. Chem.* (1999) 13–35. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-091283-7.00075-8>.
- [40] J.L. Abrahams, M.P. Campbell, N.H. Packer, Building a PGC-LC-MS N-glycan

- retention library and elution mapping resource, *Glycoconj. J.* 35 (2018) 15–29. <https://doi.org/10.1007/s10719-017-9793-4>.
- [41] S.Y. Narimatsu Hisashi, Kaji Hiroyuki, Vakhrushev Sergey Y., Clausen Henrik, Zhang Hui, Noro Erika, Togayachi Akira, Nagai-Okatani Chiaki, Kuno Atsushi, Zou Xia, Cheng Li, Tao Sheng-Ce, Current Technologies for Complex Glycoproteomics and Their Applications to Biology/Disease-Driven Glycoproteomics, *J. Proteome Res.* 17 (2018) 4097–4112. <https://doi.org/doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00515>.
- [42] H. Xiao, F. Sun, S. Suttapitugsakul, R. Wu, Global and site-specific analysis of protein glycosylation in complex biological systems with Mass Spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 38 (2019) 356–379. <https://doi.org/10.1002/mas.21586>.
- [43] Z. Chen, J. Huang, L. Li, Recent advances in mass spectrometry (MS)-based glycoproteomics in complex biological samples, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 118 (2019) 880–892. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.009>.
- [44] A. Shajahan, C. Heiss, M. Ishihara, P. Azadi, Glycomic and glycoproteomic analysis of glycoproteins—a tutorial, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 4483–4505. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0406-7>.
- [45] E. Rodríguez, K. Francia, N. Brossard, J.J. García Vallejo, H. Kalay, Y. van Kooyk, T. Freire, C. Giacomini, Immobilization of β -galactosidase and α -mannosidase onto magnetic nanoparticles: A strategy for increasing the potentiality of valuable glycomic tools for glycosylation analysis and biological role determination of glycoconjugates, *Enzyme Microb. Technol.* 117 (2018) 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.05.012>.
- [46] L. Bidondo, F. Festari, T. Freire, C. Giacomini, Immobilized peptide-N-glycosidase F onto magnetic nanoparticles: A biotechnological tool for protein deglycosylation under native conditions, *Biotechnol. Appl. Biochem. Early on li* (2021). <https://doi.org/10.1002/bab.2099>.
- [47] L. Bidondo, M. Landeira, F. Festari, T. Freire, C. Giacomini, A biotechnological tool for glycoprotein desialylation based on immobilized neuraminidase from *Clostridium perfringens*, *Biochem. Biophys. Reports.* 26 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100940>.
- [48] T. Freire, M. Landeira, C. Giacomini, M.F. Festari, Á. Pittini, V. Cardozo, A. Brosque, L. Monin, V. da Costa, P. Faral-Tello, C. Robello, E. Osinaga, Trypanosoma cruzi-Derived Molecules Induce Anti-Tumour Protection by Favouring Both Innate and Adaptive Immune Responses, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 15032. <https://doi.org/10.3390/ijms232315032>.
- [49] W. Morelle, J. Michalski, Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 1585–1602. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.227>.
- [50] P.K. Yan, S., Wilson, I.B:H., Comparison of RP-HPLC modes to analyse the N-glycome of the free-living nepatode *Pristionchus pacificus*, *Electrophoresis.* (2014) 1–40. <https://doi.org/10.1002/elps.201400528>.
- [51] B. Schiller, G. Makrypidi, E. Razzazi-Fazeli, K. Paschinger, J. Walochnik, I.B.H. Wilson, Exploring the unique N-glycome of the opportunistic human pathogen

- Acanthamoeba, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 43191–43204.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.418095>.
- [52] B. Eckmair, C. Jin, D. Abed-Navandi, K. Paschinger, Multistep fractionation and mass spectrometry reveal zwitterionic and anionic modifications of the N- and O-glycans of a marine snail, *Mol. Cell. Proteomics.* 15 (2016) 573–597.
<https://doi.org/10.1074/mcp.M115.051573>.
- [53] E. Higgins, Carbohydrate analysis throughout the development of a protein therapeutic, *Glycoconj. J.* 27 (2010) 211–225. <https://doi.org/10.1007/s10719-009-9261-x>.
- [54] J.H. Haslam S.M., Freedberg D.I., Mulloy B., Dell, A., Stanley, P., Prestegard, Structural Analysis of Glycans, in: et al. Varki A, Cummings RD, Esko JD (Ed.), *Essentials Glycobiol.* [Internet], 4th ed.,): Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579945/> doi: 10.1101/glycobiology.4e.50.
- [55] V.I. Athanasopoulos, K. Niranjana, R.A. Rastall, The production, purification and characterisation of two novel α -D-mannosidases from *Aspergillus phoenicis*, *Carbohydr. Res.* 340 (2005) 609–617.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.01.005>.
- [56] A.G. McDonald, S. Boyce, K.F. Tipton, ExplorEnz: The primary source of the IUBMB enzyme list, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) 593–597.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkn582>.
- [57] K. Sakharayapatna Ranganatha, A. Venugopal, S.K. Nadimpalli, Class II α -mannosidase from *Trichosanthes anguina* (Snake Gourd) seeds: Purification and biochemical characterization, *Int. J. Biol. Macromol.* 131 (2019) 734–743.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.100>.
- [58] K. Sakharayapatna Ranganatha, L. Sahoo, A. Venugopal, S.K. Nadimpalli, Purification, biochemical and biophysical characterization of a zinc dependent α -mannosidase isoform III from Custard Apple (*Annona squamosa*) seeds, *Int. J. Biol. Macromol.* 138 (2019) 1044–1055.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.135>.
- [59] R. Mishra, R. Chandra, Purification and Characterization of α -Mannosidase from Moss *Hyophilla nymaniana* (Fleish.) Menzel, *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B - Biol. Sci.* 89 (2019) 885–891. <https://doi.org/10.1007/s40011-018-1001-1>.
- [60] B. Cobucci-Ponzano, F. Conte, A. Strazzulli, C. Capasso, I. Fiume, G. Pocsfalvi, M. Rossi, M. Moracci, The molecular characterization of a novel GH38 α -mannosidase from the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* revealed its ability in de-mannosylating glycoproteins, *Biochimie.* 92 (2010) 1895–1907.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.07.016>.
- [61] J.K. Park, Purification and characterisation of a novel alkalophilic α -D-mannosidase from *Pseudomonas fluorescens*, *Biocontrol Sci. Technol.* 23 (2013) 1324–1335. <https://doi.org/10.1080/09583157.2013.838209>.
- [62] Y. Li, R. Li, H. Yu, X. Sheng, J. Wang, A.J. Fisher, X. Chen, *Enterococcus faecalis* α 1–2-mannosidase (EfMan-I): an efficient catalyst for glycoprotein N-glycan modification, *FEBS Lett.* 594 (2020) 439–451.

<https://doi.org/10.1002/1873-3468.13618>.

- [63] S.S. Keskar, S.M. Gaikwad, M.I. Khan, Microbial α -mannosidases, *Enzyme Microb. Technol.* 18 (1996) 602–604. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00145-X](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00145-X).
- [64] Y. Maruyama, T. Nakajima, E. Ichishima, A 1,2- α -d-mannosidase from a bacillus sp.: purification, characterization, and mode of action, *Carbohydr. Res.* 251 (1994) 89–98. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(94\)84278-7](https://doi.org/10.1016/0008-6215(94)84278-7).
- [65] H. Nankai, W. Hashimoto, K. Murata, Molecular identification of family 38 α -mannosidase of *Bacillus* sp. strain GL1, responsible for complete depolymerization of xanthan, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 2731–2736. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2731-2736.2002>.
- [66] O.P. Bahl, Glycosidases of *Aspergillus niger*. II. Purification and general properties of 1,2- α -L-fucosidase., *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 299–304. <http://www.jbc.org/>.
- [67] K. Yamamoto, Y. Tsuji, H. Kumagai, T. Tochikura, Induction and Purification of α -L-Fucosidase from *Fusarium oxysporum*, *Agric. Biol. Chem.* 50 (1986) 1689–1695.
- [68] T. Yano, K. Yamamoto, H. Kumagai, T. Tochucura, T. Yokoyama, T. Seno, H. Yamaguchi, Purification and characterization of a novel α -L-fucosidase from *Fusarium oxysporum* grown on sludge, *Agric. Biol. Chem.* 49 (1985) 3179–3187. <https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10867252>.
- [69] Y. Tsuji, K. Yamamoto, T. Tochikura, T. Seno, Y. Ohkubo, H. Yamaguchi, Purification and characterization of α -L-fucosidase from *Bacillus circulans* grown on porcine gastric mucin, *J. Biochem.* 107 (1990) 324–330. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123046>.
- [70] M. Sano, K. Hayakawa, I. Kato, Purification and characterization of α -L-fucosidase from *Streptomyces* species, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 1522–1527.
- [71] E. V Eneyskaya, A.A. Kulminskaya, N. Kalkkinen, N.E. Nifantiev, N.P. Arbatskii, A.I. Saenko, O. V Chepurnaya, A. V Arutyunyan, K.A. Shabalin, K.N. Neustroev, An α -L-fucosidase from *Thermus* sp. with unusually broad specificity, *Glycoconj. J.* 18 (2001) 827–834. <https://doi.org/10.1023/A:1021163720282>.
- [72] S. Fan, H. Zhang, X. Chen, L. Lu, L. Xu, M. Xiao, Cloning, characterization, and production of three α -L-fucosidases from *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *J. Basic Microbiol.* 56 (2016) 347–357. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500582>.
- [73] E. Farkas, J. Thiem, K. Ajisaka, Enzymatic synthesis of fucose-containing disaccharides employing the partially purified α -L-fucosidase from *Penicillium multicolor*, *Carbohydr. Res.* 328 (2000) 293–299. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00113-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00113-0).
- [74] G. Sulzenbacher, C. Bignon, T. Nishimura, C.A. Tarling, S.G. Withers, B. Henrissat, Y. Bourne, Crystal structure of *Thermotoga maritima* α -L-fucosidase: Insights into the catalytic mechanism and the molecular basis for fucosidosis, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 13119–13128. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313783200>.

- [75] H. Sakurama, E. Tsutsumi, H. Ashida, T. Katayama, K. Yamamoto, H. Kumagai, Differences in the substrate specificities and active-site structures of two α -L-fucosidases (glycoside hydrolase family 29) from *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76 (2012) 1022–1024. <https://doi.org/10.1271/bbb.111004>.
- [76] B. Zeuner, M. Vuillemin, J. Holck, J. Muschiol, A.S. Meyer, Improved transglycosylation by a xyloglucan-active α -L-fucosidase from *Fusarium graminearum*, *J. Fungi.* 6 (2020) 1–19. <https://doi.org/10.3390/jof6040295>.
- [77] H. Wu, O. Rebello, E.H. Crost, C.D. Owen, S. Walpole, C. Bennati-Granier, D. Ndeh, S. Monaco, T. Hicks, A. Colville, P.A. Urbanowicz, M.A. Walsh, J. Angulo, D.I.R. Spencer, N. Juge, Fucosidases from the human gut symbiont *Ruminococcus gnavus*, *Cell. Mol. Life Sci.* 78 (2021) 675–693. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03514-x>.
- [78] T. Miura, K. Okamoto, H. Yanase, Purification and characterization of extracellular 1,2- α -L-fucosidase from *Bacillus cereus*, *J. Biosci. Bioeng.* 99 (2005) 629–635. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.629>.
- [79] Y. Kurimura, Y. Tsuji, K. Yamamoto, H. Kumagai, T. Tochikura, Efficient Production and Purification of Extracellular 1,2- α -L-Fucosidase of *Bacillus* sp. K40T, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59 (1995) 589–594. <https://doi.org/10.1271/bbb.59.589>.
- [80] Y. Goso, K. Ishihara, S. Sugawara, K. Hotta, Purification and characterization of alpha - L -fucosidases from *Streptomyces* sp. OH11242, *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* 130 (2001) 375–383. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00442-0](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00442-0).
- [81] D. Aminoff, K. Furukawa, Enzymes that destroy blood group specificity. I. Purification and properties of alpha-L-fucosidase from *Clostridium perfringens*., *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 1659–1669. <http://www.jbc.org/>.
- [82] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid., *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76–85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3843705>.
- [83] A.A. Homaei, R. Sariri, F. Vianello, R. Stevanato, Enzyme immobilization: An update, *J. Chem. Biol.* 6 (2013) 185–205. <https://doi.org/10.1007/s12154-013-0102-9>.
- [84] R.A. Sheldon, S. van Pelt, Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how., *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6223–35. <https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>.
- [85] K. Takegawa, S. Miki, T. Jikibara, S. Iwahara, Purification and characterization of exo- α -D-mannosidase from a *Cellulomonas* sp., *BBA - Gen. Subj.* 991 (1989) 431–437. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(89\)90069-X](https://doi.org/10.1016/0304-4165(89)90069-X).
- [86] T. Koval'ova, T. Koval, E. Benešová, P. Vodíčková, SpiwokVojtečh, P. Lipovová, D. J, Active site complementation and hexameric arrangement in the GH family 29; A structure-function study of α -L-fucosidase isoenzyme 1 from *Paenibacillus thiaminolyticus*, *Glycobiology.* 29 (2019) 59–73. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwy078>.

- [87] H. Grootaert, L. van Landuyt, P. Hulpiau, N. Callewaert, Functional exploration of the GH29 fucosidase family, *Glycobiology*. 30 (2020) 735–745. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwaa023>.
- [88] S. Martínez, K.K. Nakasone, New records of interesting corticioid Basidiomycota from Uruguay, *Check List*. 10 (2014) 1237–1242. <https://doi.org/10.15560/10.5.1237>.
- [89] V. Vázquez, V. Giorgi, F. Bonfiglio, P. Menéndez, L. Gioia, K. Ovsejevi, Lignocellulosic residues from bioethanol production: a novel source of biopolymers for laccase immobilization, *RSC Adv*. 13 (2023) 13463–13471. <https://doi.org/10.1039/d3ra01520c>.
- [90] A. Cornish-Bowden, *Fundamentals of enzyme kinetics.*, John Wiley & Sons, 2013.
- [91] N. Kochibe, Purification and Properties of α -L-Fucosidase from *Bacillus fulminans*, *J. Biochem*. 74 (1973) 1141–1149.
- [92] A. Kumar, S.M. Gaikwad, Jack bean α -mannosidase ($Jb\alpha$ -man): Tolerance to alkali, chelating and reducing agents and energetics of catalysis and inhibition, *Int. J. Biol. Macromol*. 49 (2011) 1066–1071. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.08.033>.
- [93] D.R. Rose, Structure, mechanism and inhibition of Golgi α -mannosidase II, *Curr. Opin. Struct. Biol*. 22 (2012) 558–562. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2012.06.005>.
- [94] F.F. Liu, A. Kulinich, Y.M. Du, L. Liu, J. Voglmeir, Sequential processing of mannose-containing glycans by two α -mannosidases from *Solitalea canadensis*, *Glycoconj. J*. 33 (2016) 159–168. <https://doi.org/10.1007/s10719-016-9651-9>.

Anexos

ANEXO I – 1. Tabla correspondiente al diseño factorial de cuatro factores en dos niveles realizado con el software Design Expert para evaluar las mejores condiciones de crecimiento de cultivo para maximizar la producción de α -manosidasa de *Bacillus sp.* 12.22

Std	Run	Factor 1 A:Fuente de Car...	Factor 2 B:Concentración %	Factor 3 C:Tiempo h	Factor 4 D:Temperatura °C	Response 1 Velocidad mUA/h
22	1	E Levadura	2	24	37	182.5
23	2	BioMos	2	24	37	
24	3	BioMos	2	24	37	27.65
3	4	BioMos	0.5	24	30	27.42
16	5	BioMos	2	72	30	3.83
11	6	BioMos	0.5	72	30	4.98
30	7	E Levadura	2	72	37	2.07
14	8	E Levadura	2	72	30	3.95
12	9	BioMos	0.5	72	30	5.43
26	10	E Levadura	0.5	72	37	1.22
15	11	BioMos	2	72	30	5.86
31	12	BioMos	2	72	37	6.18
6	13	E Levadura	2	24	30	480.2
4	14	BioMos	0.5	24	30	39.21
7	15	BioMos	2	24	30	145.38
28	16	BioMos	0.5	72	37	2.79
9	17	E Levadura	0.5	72	30	1.17
19	18	BioMos	0.5	24	37	23.4
17	19	E Levadura	0.5	24	37	13.05
2	20	E Levadura	0.5	24	30	63.65
13	21	E Levadura	2	72	30	2.31
27	22	BioMos	0.5	72	37	1.29
5	23	E Levadura	2	24	30	453.8
20	24	BioMos	0.5	24	37	39.45
32	25	BioMos	2	72	37	6.16
18	26	E Levadura	0.5	24	37	18.75
21	27	E Levadura	2	24	37	235.8
25	28	E Levadura	0.5	72	37	1.95
1	29	E Levadura	0.5	24	30	68.03
10	30	E Levadura	0.5	72	30	1.72
29	31	E Levadura	2	72	37	
8	32	BioMos	2	24	30	166.52

ANEXO I – 2. Tabla correspondiente al diseño factorial de cuatro factores en dos niveles realizado con el software Design Expert para evaluar las mejores condiciones de crecimiento de cultivo para maximizar la producción de α -manosidasa de *Bacillus* sp. X

Std	Run	Factor 1 A:Fuente de car...	Factor 2 B:Concentración %	Factor 3 C:Tiempo 2h	Factor 4 D:Temperatura °C	Response 1 Velocidad mUA/h
30	1	racto de Levadura	2	72	37	387
16	2	BioMos	2	72	30	303
29	3	racto de Levadura	2	72	37	356
18	4	racto de Levadura	0.5	24	37	240
5	5	racto de Levadura	2	24	30	54
17	6	racto de Levadura	0.5	24	37	231
2	7	racto de Levadura	0.5	24	30	181
31	8	BioMos	2	72	37	226
13	9	racto de Levadura	2	72	30	378
26	10	racto de Levadura	0.5	72	37	234
19	11	BioMos	0.5	24	37	262
20	12	BioMos	0.5	24	37	277
1	13	racto de Levadura	0.5	24	30	225
6	14	racto de Levadura	2	24	30	128
22	15	racto de Levadura	2	24	37	131
3	16	BioMos	0.5	24	30	182
15	17	BioMos	2	72	30	268
14	18	racto de Levadura	2	72	30	389
23	19	BioMos	2	24	37	333
27	20	BioMos	0.5	72	37	233
10	21	racto de Levadura	0.5	72	30	262
11	22	BioMos	0.5	72	30	277
25	23	racto de Levadura	0.5	72	37	226
32	24	BioMos	2	72	37	163
21	25	racto de Levadura	2	24	37	198
8	26	BioMos	2	24	30	220
7	27	BioMos	2	24	30	305
28	28	BioMos	0.5	72	37	191
12	29	BioMos	0.5	72	30	259
24	30	BioMos	2	24	37	327
9	31	racto de Levadura	0.5	72	30	258
4	32	BioMos	0.5	24	30	236

ANEXO I – 3. Tabla correspondiente al diseño factorial de tres factores en dos niveles con puntos intermedios para evaluar las mejores condiciones de crecimiento de cultivo para maximizar la producción de α -manosidasa de *Aspergillus terreus* BFQU 121

Std	Run	Factor 1 A:Concentración %	Factor 2 B:Tiempo días	Factor 3 C:Temperatura °C	Response 1 R1 mUA/h
17	1	2	7	30	6.899
19	2	2	7	30	5.264
20	3	2	7	30	7.065
18	4	2	7	30	3.038
10	5	1	5	32	0.643
14	6	1	9	32	5.806
3	7	3	5	28	5.639
9	8	1	5	32	3.129
6	9	1	9	28	3.895
7	10	3	9	28	8.493
11	11	3	5	32	8.643
16	12	3	9	32	5.0749
12	13	3	5	32	7.147
4	14	3	5	28	8.262
13	15	1	9	32	7.4829
1	16	1	5	28	2.34
5	17	1	9	28	4.274
15	18	3	9	32	8.75
2	19	1	5	28	1.45
8	20	3	9	28	8.483

ANEXO I – 4. Tabla correspondiente al diseño factorial de tres factores en dos niveles con puntos intermedios para evaluar las mejores condiciones de crecimiento de cultivo para maximizar la producción de α -fucosidasa de *Dichostereum sordulentum* DS-1488

Std	Run	Factor 1 A:Concentración %	Factor 2 B:Tiempo días	Factor 3 C:Temperatura °C	Response 1 R1 mUA/h
19	1	2	7	30	222
14	2	1	9	32	176
11	3	3	5	32	73
18	4	2	7	30	239
9	5	1	5	32	98
13	6	1	9	32	42
10	7	1	5	32	102
16	8	3	9	32	221
12	9	3	5	32	91
6	10	1	9	28	72
20	11	2	7	30	207
4	12	3	5	28	215
8	13	3	9	28	202
15	14	3	9	32	231
17	15	2	7	30	198
2	16	1	5	28	126
3	17	3	5	28	40
1	18	1	5	28	25
5	19	1	9	28	191
7	20	3	9	28	289

ANEXO I – 5. ANOVA para el modelo factorial seleccionado para *Bacillus* sp. 12.22

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	4.470E+05	13	34387.53	148.51	< 0.0001	significant
A-Fuente de Carbono	29170.41	1	29170.41	125.98	< 0.0001	
B-Concentración	56836.99	1	56836.99	245.46	< 0.0001	
C-Tiempo	1.059E+05	1	1.059E+05	457.19	< 0.0001	
D-Temperatura	22696.62	1	22696.62	98.02	< 0.0001	
AB	26314.37	1	26314.37	113.64	< 0.0001	
AC	31363.60	1	31363.60	135.45	< 0.0001	
AD	3137.22	1	3137.22	13.55	0.0020	
BC	54754.28	1	54754.28	236.47	< 0.0001	
BD	12963.21	1	12963.21	55.98	< 0.0001	
CD	22268.58	1	22268.58	96.17	< 0.0001	
ABC	26525.41	1	26525.41	114.56	< 0.0001	
ACD	3254.95	1	3254.95	14.06	0.0018	
BCD	13569.27	1	13569.27	58.60	< 0.0001	
Residual	3704.81	16	231.55			
Lack of Fit	1483.25	2	741.63	4.67	0.0279	significant
Pure Error	2221.56	14	158.68			
Cor Total	4.507E+05	29				

ANEXO I – 6. ANOVA para el modelo factorial seleccionado para *Bacillus* sp. X

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	1.596E+05	6	26595.60	31.11	< 0.0001	significant
B-Concentración	4802.00	1	4802.00	5.62	0.0258	
C-Tiempo	24200.00	1	24200.00	28.31	< 0.0001	
AC	54780.50	1	54780.50	64.09	< 0.0001	
BC	13944.50	1	13944.50	16.31	0.0004	
CD	22366.13	1	22366.13	26.17	< 0.0001	
ABC	39480.50	1	39480.50	46.19	< 0.0001	
Residual	21369.88	25	854.79			
Lack of Fit	5955.88	9	661.76	0.6869	0.7111	not significant
Pure Error	15414.00	16	963.38			
Cor Total	1.809E+05	31				

ANEXO I – 7. ANOVA para el modelo factorial seleccionado para *Dichostereum sordulentum* DS-1488

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	53990.75	3	17996.92	6.00	0.0068	significant
A-Concentración	17556.25	1	17556.25	5.85	0.0287	
B-Tiempo	26732.25	1	26732.25	8.91	0.0093	
AB	9702.25	1	9702.25	3.23	0.0923	
Curvature	20161.25	1	20161.25	6.72	0.0204	
Residual	45002.00	15	3000.13			
Lack of Fit	3557.00	4	889.25	0.2360	0.9122	not significant
Pure Error	41445.00	11	3767.73			
Cor Total	1.192E+05	19				

ANEXO I – 8. ANOVA para el modelo factorial seleccionado para *Aspergillus terreus* BFQU 121

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	96.12	7	13.73	5.64	0.0058	significant
A-Concentración	61.91	1	61.91	25.43	0.0004	
B-Tiempo	14.07	1	14.07	5.78	0.0350	
C-Temperatura	0.9215	1	0.9215	0.3785	0.5509	
AB	10.22	1	10.22	4.20	0.0651	
AC	2.53	1	2.53	1.04	0.3298	
BC	0.0006	1	0.0006	0.0002	0.9878	
ABC	6.47	1	6.47	2.66	0.1312	
Curvature	0.0025	1	0.0025	0.0010	0.9750	
Pure Error	26.78	11	2.43			
Cor Total	122.91	19				

Publicación derivada de los resultados obtenidos en esta tesis

Lorena Herrera, María Eugenia Cedrés, Paula Rodríguez Bonnacarrere, Cecilia Giacomini. Purification and characterization of α -fucosidase from *Dichostereum sordulentum* 1488. *Carbohydrate Research*, v: 545 (2024) 109278. doi.org/10.1016/j.carres.2024.109278

Financiación

Este trabajo contó con el financiamiento de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII-Uruguay); [Número de subvención FMV_1_2019_1_155764].

Beca de Maestría de la ANII asociada al proyecto FMV FMV_1_2019_1_155764 “Generación de herramientas biotecnológicas para análisis de glicanos biológicos, basadas en la inmovilización de glicosidasas”