

RECYT

Año 17 / N° 24 / 2015 / 48–54

## Selección y Caracterización de Cepas Psicrotolerantes Productoras de Actividad $\alpha$ -L-Ramnosidasa

### Selection and Characterization of $\alpha$ -L-Rhamnosidase Activity Producers of Psychrotolerant Strains

Adriana E. Alvarenga<sup>1,\*</sup>, María I. Arévalo<sup>2</sup>, Guillermo R. Castro<sup>3</sup>, Carlos M. Abate<sup>1,†</sup>

1 - PROIMI-CONICET, Av. Belgrano y Pje. Caseros, T4001MVB, Tucumán, Argentina.

2 - Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones.

3 - Laboratorio de Nanobiomateriales, Instituto de Biotecnología Aplicada (CINDEFI, UNLP-CONICET CCT La Plata).

Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

\* E-mail: adrianaealvarenga@gmail.com

#### Resumen

Las  $\alpha$ -L-ramnosidasas desempeñan un rol clave en jugos de uvas y bebidas derivadas aumentando su aroma; y en jugos cítricos eliminando su amargor. El objetivo del trabajo fue el estudio y caracterización parcial de microorganismos marinos procedentes de diferentes zonas costeras del Canal de Beagle y de contenidos intestinales de organismos bentónicos con actividad  $\alpha$ -L-ramnosidasa. A partir de 58 aislamientos cultivados en medio mineral de Brunner (MMB) con ramnosa, fueron seleccionados 10 microorganismos por presentar buen crecimiento a 8 y 20 °C. A través de la determinación cuantitativa de la actividad  $\alpha$ -L-ramnosidasa, se demostró que los aislamientos F6 y G33 presentaron los mayores valores de actividad a 30 °C (250,2 U.L-1) y a 37 °C (411,7 U.L-1). Los aislamientos seleccionados fueron identificados molecularmente como pertenecientes a los géneros *Serratia* y *Pseudomonas*. Los resultados de este trabajo indican que las enzimas  $\alpha$ -L-ramnosidasas presentes en las cepas *Serratia* sp. F6 y *Pseudomonas* sp. G33 tienen un uso potencial en procesos biotecnológicos.

Palabras clave:  $\alpha$ -L-ramnosidasa; *Pseudomonas* sp. G33; *Serratia* sp. F6; Canal de Beagle.

#### Abstract

$\alpha$ -L-rhamnosidase plays a key role in grape juice and derived beverages processing by enhancing the aroma and in citric juices by removing bitterness. The aim of this work was to study and partially characterize marine microorganisms from different coastal areas of the Beagle Channel and intestinal contents of benthic organisms with  $\alpha$ -L-rhamnosidase activity. A total of 10 microorganisms were selected because of their proper growth in MMB supplemented with rhamnose as the sole carbon source, at 8 and 20 °C. According to the quantitative determination of the  $\alpha$ -L-rhamnosidase activity, G33 isolate showed the highest activity values at 37 °C (411.7 U.L-1), followed by F6 isolate at 30 °C (250.2 U.L-1). Molecular identification methods classified the isolates F6 and G33 as *Serratia* and *Pseudomonas* genera respectively. The results showed that  $\alpha$ -L-rhamnosidase enzymes from *Serratia* sp. F6 and *Pseudomonas* sp. G33 strains are promising to be used in biotechnological strategies.

Keywords:  $\alpha$ -L-rhamnosidase; *Pseudomonas* sp. G33; *Serratia* sp. F6; Beagle Channel.

#### Introducción

Los microorganismos secretores de glicosil-hidrolasas se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y juegan un papel importante en la hidrólisis y el catabolismo de polisacáridos (1). La L-ramnosa o 6-desoxi-L-manosa es un carbohidrato comúnmente encontrado en muchos tejidos vegetales formando parte estructural de flavonoides glicosilados, terpenilglicósidos, pigmentos de plantas y complejos heteropolisacáridos. Los flavonoides glicosi-

lados, tales como naringina, hesperidina y rutina, y los terpenilglicósidos se encuentran presentes en varios frutos (2). Los alcoholes monoterpénicos como geraniol, linalool y  $\alpha$ -terpineol son las sustancias más importantes que otorgan aroma a las bebidas alcohólicas como el vino (3,4). Un gran número de monoterpénos se encuentran presentes en su forma inodora, conjugados a diglicósidos, como por ejemplo, 6-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil- $\beta$ -D-glucopiranosidos, 6-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosil- $\beta$ -D-glucopiranosidos y 6-O- $\beta$ -D-apiofuranosil- $\beta$ -D-glucopiranosidos. Se ha informado

que la hidrólisis enzimática de estos diglicósidos ocurre en dos pasos secuenciales: primero  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa,  $\alpha$ -L-ramnosidasa (o  $\beta$ -D-apiofuranosidasa) catalizan la ruptura del enlace (1-6), seguido de la liberación de los componentes aromáticos del monoglucósido por la acción de la  $\beta$ -D-glucosidasa (5, 6).

Debido a su alta especificidad, la hidrólisis enzimática libera los terpenoles unidos a los residuos glicosídicos con mayor rapidez y de manera selectiva sin provocar alteraciones estructurales de los monoterpenos, desarrollando así un aroma más natural (7, 8, 9). Cuando se emplean enzimas en la modificación de alimentos y compuestos orgánicos volátiles, es conveniente realizar estos procesos a bajas temperaturas (10). Las enzimas frío-activas ofrecen beneficios económicos a través de ahorros energéticos: no requieren pasos de calentamiento costosos debido a que funcionan en ambientes fríos; proveen cinéticas de reacción incrementadas; presentan un alto nivel de estereoespecificidad; minimizan reacciones químicas indeseables que pueden ocurrir a altas temperaturas y exhiben elevada labilidad térmica, lo que permite un control preciso del proceso de biocatálisis (10, 11). La posibilidad de ser inactivadas con calor tiene una particular relevancia en la industria alimentaria, donde es importante prevenir cualquier modificación del producto y de sustratos originales sensibles a la temperatura. Esto también representa un beneficio en procesos secuenciales donde la acción de una enzima necesita ser finalizada antes de que la próxima etapa del proceso se realice. Con las enzimas frío-activas esto puede ser logrado por inactivación térmica, en vez de procesos de inactivación como la extracción química. Las enzimas frío-activas también pueden ser aplicadas en mezclas de solventes acuosos-orgánicos o no acuosos en la síntesis orgánica (11, 12). La expresión de enzimas capaces de catalizar reacciones a bajas temperaturas forma parte de los mecanismos de adaptación de los organismos psicrófilos y/o psicrotolerantes (13).

Las aguas del Canal de Beagle presentan atractivos considerables si tenemos en cuenta que, por estar en zonas costeras (Ushuaia), son de fácil acceso y presentan temperaturas que oscilan entre los 4,5 y los 10 °C, de acuerdo a las estaciones (<http://www.hidro.gov.ar/ceado/ceado.asp>). Estas temperaturas se encuentran en el rango de crecimiento de los microorganismos psicrófilos y/o psicrotolerantes, por lo que estas aguas serían una potencial fuente de microorganismos capaces de crecer y producir enzimas con elevadas actividades específicas a bajas temperaturas (14). Además, los sedimentos presentes principalmente compuestos de materiales lignocelulósicos con una gran proporción de flavonoides, constituyen el alimento principal de los organismos bentónicos habitantes de la zona (15).

Debido a las ventajas que presentan, en los últimos años se ha prestado mayor atención a las enzimas frío-activas, y entre ellas, a las  $\alpha$ -L-ramnosidas. Dado el gran potencial

biotecnológico de estas enzimas el objetivo del presente trabajo fue la selección y caracterización de microorganismos con actividad  $\alpha$ -L-ramnosidasa aislados a partir de muestras de agua de mar provenientes de diferentes zonas del Canal de Beagle.

## Materiales y métodos

**Microorganismos.** Se utilizaron 58 aislamientos bacterianos previamente obtenidos a partir de muestras procedentes de diferentes zonas del Canal de Beagle (S 55°, W 67°), Tierra del Fuego, Argentina (16). Los aislamientos bacterianos se realizaron a partir de muestras de agua de mar correspondientes a las zonas de Bahía Ushuaia (S 54° 49.665'; W 68° 16.473'), Punta Segunda y Bahía Ensenada (S 54° 51.156'; W 68° 29.503'), Bahía Lapataia (S 54° 51.618'; W 68° 33.607'); como así también de contenidos intestinales de organismos bentónicos: langostillas (*Munida subrugosa*), centollones (*Paralomis granulosa*), erizos (*Pseudechinus magellanicus*) y lapas (*Nacella (P.) deaurata*) colectados en las regiones mencionadas.

**Selección de cepas.** Los 58 aislamientos fueron cultivados en medio mineral de Brunner (MMB) sólido y líquido utilizando como fuente de carbono ramnosa comercial (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) o naringina. Los aislamientos fueron incubados a 8 y 20°C durante 14 días, con valores de pH de 5 y 7.

**Medios de cultivo.** Medio para la selección de microorganismos. Se empleó como medio de cultivo sólido, medio mineral de Brunner (MMB) conteniendo (g L<sup>-1</sup>): NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2,44), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,52), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,50), CaCl<sub>2</sub> (0,05), NaCl (20), Agar (15) y ramnosa o naringina (5). Agregar 10 mL de elemento traza SL4 y 990 mL de agua destilada. Elemento traza SL4 contiene (g L<sup>-1</sup>): EDTA (0,5), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,4). Se agrega 100 mL de elemento traza SL6 y 900 mL de agua destilada. Elemento traza SL6 contiene (g L<sup>-1</sup>): ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,1), MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (0,03), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0,3), CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (0,2), CoCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,01), NiSO<sub>4</sub> (0,02), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,03). La fuente de carbono fue adicionada en una concentración de 5 g L<sup>-1</sup>.

Medio sólido Luria Bertani modificado (LBm) conteniendo (g L<sup>-1</sup>): extracto de levadura (3), peptona de carne (5), NaCl (20), agar (15) y ramnosa o glucosa (5).

Los valores de pH de los medios utilizados se ajustaron empleando NaOH 0,1 N o HCl 0,1 N. Posteriormente, los medios se esterilizaron por autoclave a 121 °C por 15 minutos.

## Caracterización de las cepas seleccionadas

**Morfología.** La morfología de las colonias fue determinada por la observación macroscópica directa de las mismas en medio sólido. Además, se realizó tinción de Gram y observación microscópica.

**Propiedades Bioquímicas.** Se utilizó un sistema del tipo

API 20NE (Biomérieux S.A., Francia) para la determinación de los perfiles de asimilación de fuentes de carbono y presencia de actividades enzimáticas. Los microorganismos estudiados fueron desarrollados en medio LBm líquido.

**Prueba de catalasa.** Para determinar la presencia de la enzima se añadió unas gotas de una solución de peróxido de hidrógeno al 3% sobre un cultivo en fase exponencial del microorganismo en estudio. La aparición de burbujeo inmediato, por la descomposición del peróxido de hidrógeno, se consideró como positivo.

**Rango de Crecimiento.** Teniendo en cuenta la definición de psicrófilos y psicrotolerantes de Morita (17), se evaluó el crecimiento en medio de enriquecimiento agarizado a diferentes temperaturas (4, 10, 20, 30 y 37 °C). Las cepas se desarrollaron en medio LBm sólido con glucosa (5 g L<sup>-1</sup>) y fueron incubados desde 4 a 37 °C a pH 7.

**Determinación de actividad  $\alpha$ -L-ramnosidasa.** La actividad  $\alpha$ -L-ramnosidasa fue ensayada de la siguiente manera: se mezclaron 0,9 mL de *buffer* fosfato de sodio 100 mM (pH 7) con 0,015 mL de 4-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnopiranosido (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) 100 mM disuelto en dimetilformamida y luego se adicionó 0,1 mL del extracto (extracto libre de células o sobrenadante). La mezcla de reacción fue incubada en un rango de 10 a 37°C durante 1 h; la reacción fue detenida agregando 0,1 mL de NaOH 1 M, y luego se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU800 (EE.UU.). El incremento de la absorbancia a 420 nm fue proporcional a la cantidad de 4-nitrofenol liberado. Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un  $\mu$ mol de 4-nitrofenol del sustrato por minuto por litro, bajo las condiciones del ensayo.

**Preparación de las proteínas totales.** Se inocularon las cepas seleccionadas en medio líquido MMB con ramnosa y se incubaron a 25 °C durante 72 h con agitación (200 rpm). Posteriormente, se centrifugó a 30.000 g durante 10 min para separar las células del sobrenadante. Las células fueron lavadas dos veces con solución fisiológica estéril centrifugadas a 30.000 g durante 10 min, luego se procedió a romperlas utilizando prensa French a 12.000 psi. De esta manera se obtuvieron dos fracciones que se utilizaron en las pruebas posteriores: contenido intracelular y sobrenadante libre de células. A ambas se les adicionó fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) en una concentración de 0,1 mM. Para concentrar las proteínas presentes, se utilizaron membranas filtrantes con límite de filtración de 50 kDa (Centricon, Millipore, EE.UU.). La concentración de proteínas se midió por el método de Bradford (18).

**Identificación molecular.** La extracción de ADN se realizó según la técnica descrita por Hoffman y Winston (19). Para la amplificación se utilizaron cebadores universales con especificidad para genes del ADNr 16S eubacteriano (cebador sentido 27F y cebador antisentido 1492R). Las secuencias fueron depositadas en la GenBank (*Serratia*

sp. F6: FR754553; *Pseudomonas* sp. G33: FR731132). Las secuencias pertenecientes al mismo género o especies cercanamente relacionadas publicadas en las bases de datos (GenBank y RDP II) fueron alineadas y el análisis filogenético fue inferido por el método de Máxima Verosimilitud (20) usando la distancia evolutiva de Kimura 2-parámetros (21). Los árboles filogenéticos fueron construidos utilizando el programa MEGA 6, con 1.000 réplicas (22) para representar la historia evolutiva de los taxones analizados.

**Análisis estadístico.** Los ensayos se realizaron por triplicado mediante dos experimentos independientes. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Infostat versión 2008 (23). Los resultados se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar. Los resultados experimentales se analizaron mediante ANOVA (Tukey-post test).

## Resultados y Discusión

### Selección de microorganismos productores de actividad $\alpha$ -L-ramnosidasa

Los ambientes marinos existentes en Argentina, poseen numerosos nichos con gran biodiversidad para llevar a cabo la búsqueda y selección de microorganismos con potencial biotecnológico. En particular, las regiones marinas sub-antárticas y antárticas, remotas y en su mayoría prístinas, contienen comunidades microbianas adaptadas a condiciones climáticas extremas (24). Es por ello, que las muestras utilizadas en este trabajo para el aislamiento de microorganismos psicrófilos y/o psicrotolerantes representan una importante fuente potencial para la bioprospección de nuevas enzimas de interés industrial.

De un total de 58 aislamientos realizados en nuestro laboratorio (15), fueron seleccionados 10 microorganismos (Tabla 1) por su capacidad de crecer en medio MMB sólido a 8 y 20 °C y valores de pH 5 y 7 (Figura 1), con ramnosa o naringina como única fuente de carbono.

Otros autores han demostrado que los microorganismos aislados del Canal de Beagle, fueron capaces de producir actividad  $\alpha$ -L-ramnosidasa (15, 25) y otras enzimas de interés biotecnológico, como ser celulasas,  $\beta$ -D-glucosidasas, amilasas y proteasas (16,26).



**Figura 1:** Desarrollo de los aislamientos microbianos en placas con medio MMB sólido con ramnosa incubadas a 8 °C, pH 5 (placa izquierda) y pH 7 (placa derecha).

**Tabla 1:** Microorganismos seleccionados aislados a partir de organismos bentónicos y agua de mar provenientes del Canal del Beagle.

Muestras	Hospedador específico/Lugar	Aislamientos
Contenidos Intestinales de Organismos bentónicos	Paralomis granulosa	D1, D2, D3, D5
	Nacella (P.) deaurata	Las Q7, F3, F6
	Munida subrugosa	E3
Agua de mar	Bahía Lapataia	G33
	Bahía Ensenada	A7

Los sobrenadantes y los extractos libres de células de los 10 microorganismos en estudio fueron sometidos a una determinación cuantitativa de la actividad  $\alpha$ -L-ramnosidasa a 10 °C y pH 7. No se detectaron valores de actividad en los sobrenadantes de cultivo bajo las condiciones ensayadas. A partir de los valores detectados en los extractos libres de células de las diez cepas analizadas, se seleccionaron dos cepas (F6 y G33) por presentar los mayores valores actividad ramnosidasa (Tabla 2) con diferencias significativas ( $p=0,005$ ). El aislamiento F6 fue realizado a partir del contenido intestinal de *Nacella (P.) deaurata* y el aislamiento G33 a partir de muestras de agua recolectadas de Bahía Lapataia.

**Tabla 2:** Actividad  $\alpha$ -L-ramnosidasa en extractos libres de células.

Aislamientos	Actividad enzimática (U. L <sup>-1</sup> )
G33	16,12 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>
F6	11,01 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>
E3	8,15 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>
D5	6,01 $\pm$ 0,14 <sup>c</sup>
LasQ7	2,01 $\pm$ 0,28 <sup>d</sup>
D3	1,01 $\pm$ 0,35 <sup>d</sup>
A7	ND
D1	ND
D2	ND
F3	ND

Valores con las mismas letras (a-d) indican que no existen diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) según el test de Tukey. ND: no se detectó actividad bajo las condiciones de ensayo.

### Identificación y caracterización de las cepas seleccionadas

Mediante la secuenciación del ADNr 16S amplificado y posterior comparación con base de datos del NCBI, los aislamientos F6 y G33 fueron clasificados dentro de los géneros *Serratia* y *Pseudomonas*, respectivamente, con una identidad del 99% de las secuencias de ADNr 16S. Ambos géneros pertenecen a la subclase  $\gamma$ -Proteobacteria. El hallazgo de estos géneros concuerda con otras publicaciones, en las cuales se describe el aislamiento e identificación de bacterias marinas cultivables pertenecientes a géneros de la clase gamma-Proteobacteria presentes en diversos ambientes acuáticos (27, 28, 29).

En base a las secuencias del gen ADNr 16S de los aislamientos F6 y G33 se construyó un árbol filogenético (Figura 2). En el árbol recuperado se puede apreciar que la cepa G33 se ubica dentro del género *Pseudomonas*, más precisamente en un clado constituido por *Pseudomonas azotoformans*, *P. fluorescens*, *P. marginalis*, *P. mucidolens*, *P. synxantha* y *Pseudomonas tolaasii*. Por su parte, la cepa F6 se recupera como grupo hermano del clado constituido por *Serratia plymuthica* NBRC 102599 + *Serratia grimesii* NBRC 13537; y este a su vez incluido en una gran politomía que reúne terminales de los géneros *Hafnia*, *Serratia* y *Yersinia*.

Las principales características morfológicas y fisiológicas de las cepas estudiadas se presentan en la Tabla 3. Ambas cepas desarrollaron colonias circulares, convexas, color crema en medios de cultivo sólidos. Microscópicamente consistían en bacilos no formadores de esporas. En general, las cepas estudiadas exhibieron características comunes a los demás miembros de los géneros *Serratia* y *Pseudomonas* (30, 31).

Teniendo en cuenta la temperatura de crecimiento, los aislamientos estudiados presentaron un rango de desarrollo compatible con el concepto de microorganismos psicrotolerantes, un hallazgo común en ambientes fríos (32).

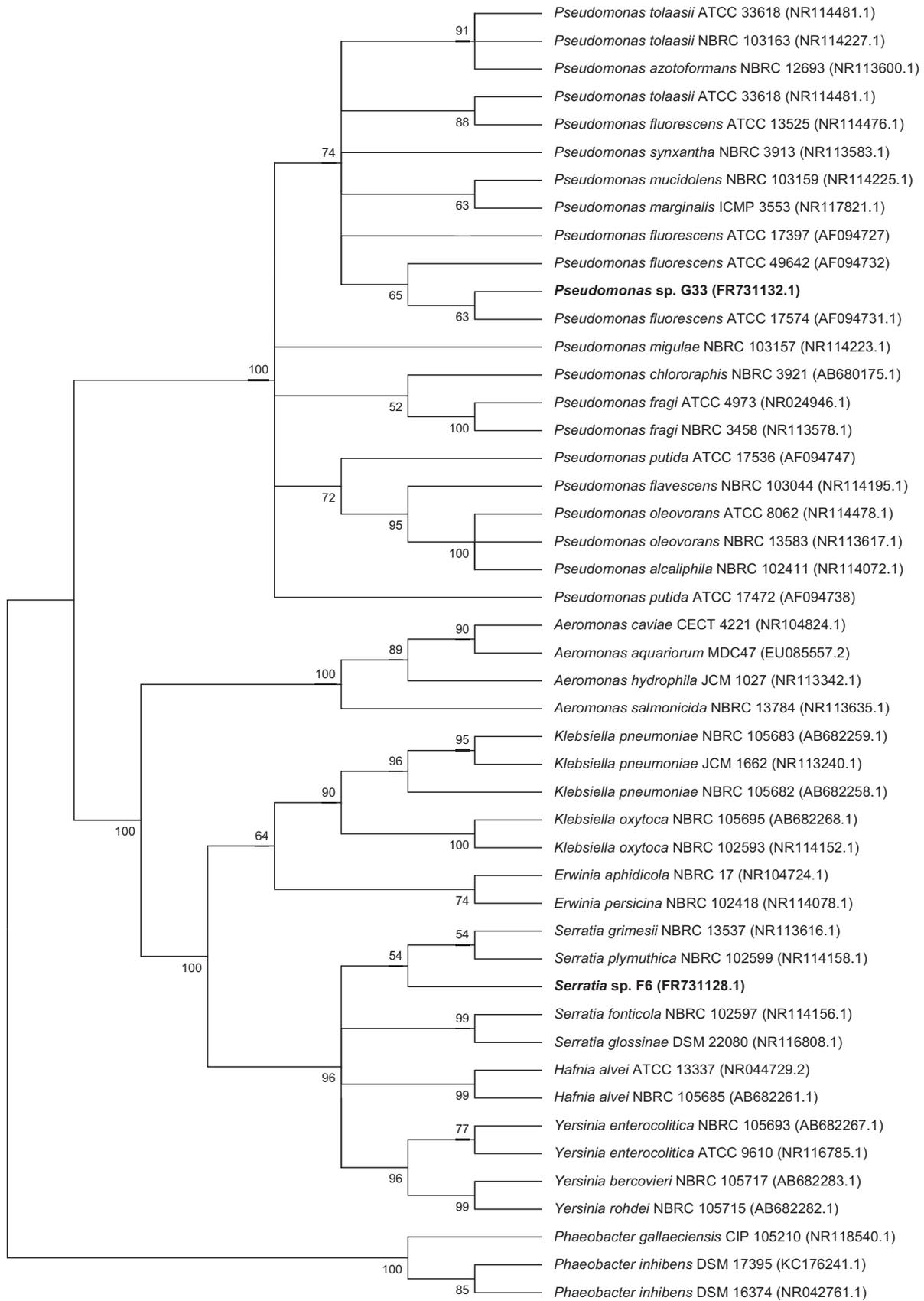
**Tabla 3:** Propiedades bioquímicas de las cepas *Serratia* sp. F6 y *Pseudomonas* sp. G33.

	F6	G33
Tinción de Gram	-	-
Rango de crecimiento	4 a 30°C	4 a 30°C
Reducción de nitratos a nitritos	+	-
Reducción de nitritos a nitrógeno	-	+
Fermentación de glucosa	+	-
Presencia de arginina hidrolasa	-	+
Presencia de ureasa	-	-
Presencia de $\beta$ -glucosidasa	+	-
Presencia de proteasa y catalasa	+	+
Asimilación de glucosa, manosa, manitol, N-acetilglucosamina, gluconato, caprato, malato, citrato	+	+
Asimilación de L-arabinosa, maltosa	+	-
Asimilación de ácido adipico	-	+
Asimilación de ácido fenilacético	-	-

(-) Negativo, (+) Positivo.

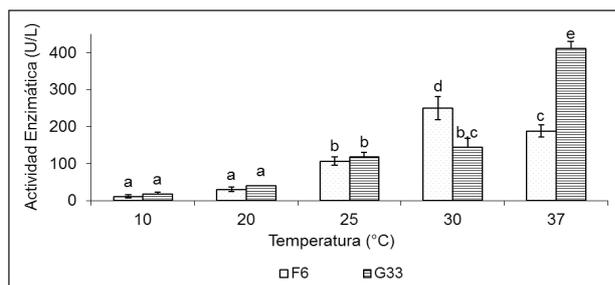
### Actividad alfa-L-ramnosidasa de *Serratia* sp. F6 y *Pseudomonas* sp. G33

Por lo general, se ha descrito que las ramnosidasas exhiben un amplio rango de temperatura óptima (33,34). Se evaluó el comportamiento de la actividad  $\alpha$ -L-ramnosidasa de *Serratia* sp. F6 y *Pseudomonas* sp. G33 a diferentes temperaturas (Figura 3). La actividad  $\alpha$ -L-ramnosidasa del extracto libre de células de la cepa F6 mostró la mayor actividad a 30 °C (250, 2 U.L<sup>-1</sup>), observándose valores similares entre ambas cepas a esa temperatura ( $p=0,0532$ ). Sin embargo, el mayor valor de actividad ramnosidasa del extracto libre de células de la cepa G33 se observó a 37 °C (411, 7 U.L<sup>-1</sup>).



**Figura 2:** El árbol filogenético fue construido utilizando el método de Máxima Verosimilitud (20). El árbol consenso se obtuvo a partir de 1000 réplicas (22). Las distancias evolutivas fueron computadas utilizando el método Kimura 2-parámetros (21).

Las temperaturas óptimas exhibidas por las cepas estudiadas fueron diferentes a las descritas por otros autores. La enzima  $\alpha$ -L-ramnosidasas de la cepa psicrotolerante *Pseudoalteromonas* sp. 005NJ exhibió una temperatura de 40 °C, en cambio, *Aspergillus nidulans* demostró una temperatura de 60 °C (15,35). Sin embargo, valores similares de temperatura se demostraron en la enzima ramnosidasas de *Brevundimonas* sp. Ci19, que presentó un intervalo óptimo de 30 a 37 °C. En coincidencia con los microorganismos estudiados, esta última cepa fue aislada de muestras de agua de mar provenientes del Canal de Beagle (36).



**Figura 3:** Efecto de la temperatura sobre la actividad  $\alpha$ -L-ramnosidasas de *Serratia* sp. F6 y *Pseudomonas* sp. G33. Las barras con las mismas letras indican que no existen diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) según el test de Tukey.

## Conclusión

Las ramnosidasas producidas por las cepas psicrotolerantes *Serratia* sp. F6 y *Pseudomonas* sp. G33 demostraron interesantes valores de actividad enzimática en este trabajo, por lo que presentan características promisorias para ser aplicadas potencialmente en procesos de la industria alimentaria y farmacéutica. Además, este estudio contribuye al conocimiento de las bacterias psicrotolerantes aisladas de muestras del Canal de Beagle, mostrando una variedad de biocatalizadores que posibilitan encaminar nuevas investigaciones.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento de ANPCyT, y CONICET. Además, se agradece la asistencia técnica del Sr. Guillermo Borchia y del Dr. Héctor A. Cristóbal, y a la Dra. Mirta Daz (INIQUI-CONICET, Salta) por la naringina donada.

## Referencias

- Manzanares, P.; van den Broeck, H.C.; de Graaff, L.H. y Visser, J. Purification and characterization of two different  $\alpha$ -L-rhamnosidasas, RhaA and RhaB, from *Aspergillus aculeatus*. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2230–2234. 2001.

- Maicas, S. y Mateo, J.J. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 67: 322–335. 2005.
- Marais, J. Terpenes in the aroma of grapes and wines: a review. S. Afr. J. Enol. Vitic. 4: 49–58. 1983.
- Mateo, J.J. y Jiménez, M. Monoterpenes in grape juice and wines. J. Chromatogr. A. 881: 557–567. 2000.
- Günata, Z.; Bitteur, S.; Brillouet, J.M.; Bayonove, C. y Cordonnier, R.E. Sequential enzymatic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. Carbohydr. Res. 184: 139–149. 1988.
- Zverlov, V.V.; Hertel, C.; Bronnenmeier, K.; Hroch, A.; Kellermann, J. y Schwarz, W.H. The thermostable  $\alpha$ -L-rhamnosidase RamA of *Clostridium stercorarium*: biochemical characterization and primary structure of a bacterial  $\alpha$ -L-rhamnoside hydrolase, a new type of inverting glycoside hydrolase. Mol. Microbiol. 35: 173–179. 2000.
- Williams, P.J.; Strauss, C.R. y Wilson, B. Classification of the monoterpenoid composition of Muscat grapes. Am. J. Enol. Vitic. 32: 230–235. 1981.
- Yanai, T. y Sato, M. Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Pichia angusta* X349. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64: 2179–2185. 2000.
- Manzanares, P.; Orejas, M.; Gil, J.V.; de Graaff, L.H.; Visser, J. y Ramón, D. Construction of a genetically modified wine yeast strain expressing the *Aspergillus aculeatus* rhaA gene, encoding an  $\alpha$ -L-rhamnosidase of enological interest. Appl. Environ. Microbiol. 69: 7558–7562. 2003.
- Russell, N.J. Molecular adaptations in psychrophilic bacteria: potential for biotechnological applications. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 61: 1–21. 1998.
- Gerday, C.; Aittaleb, M.; Bentahir, M.; Chessa, J.P.; Claverie, P.; Collins, T.; D'Amico, S.; Dumont, J.; Garsoux, G. y Georges, F. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. Tibetech. 18: 103–107. 2000.
- Sellek, G.A. y Chaudhuri, J.B. Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. Enzyme Microb. Technol. 25: 471–482. 1999.
- Gerday, C.; Aittaleb, A.; Arpigny, J.L.; Baise, E.; Chessa, J.P.; Garsoux, G.; Petrescu, I. y Feller, G. Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. Biochem. Biophys. Acta. 1342: 119–131. 1997.
- Tapella, F. y Lovrich, G.A. Asentamientos de estadios tempranos de las centollas *Lithodes santilla* y *Paralomis granulosa* (decápoda: Lithodidae) en colectores artificiales pasivos en el Canal Beagle, Argentina. Invest. Marinas. 34: 47–55. 2006.
- Orrillo, G.; Ledesma, P.; Delgado, O.; Spagna, G. y Breccia, J. Cold-active  $\alpha$ -L-rhamnosidase from psychrotolerant bacteria isolated from a sub-Antarctic ecosystem. Enzyme Microb. Tech. 40: 236–241. 2007.
- Cristóbal, H.A.; Benito, J.; Lovrich, G. y Abate C. Phylogenetic and enzymatic characterization of psychrophilic and psychrotolerant marine bacteria belong to  $\gamma$ -Proteobacteria group isolated from the sub-Antarctic

- Beagle Channel, Argentina*. Folia Microbiologica. DOI 10.1007/s12223-014-0351-1. 2014.
17. **Morita, R.Y.** Psychrophilic bacteria. Bacteriol. Rev. 39: 144–167. 1975.
  18. **Bradford, M.** A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. Anal. Chem. 72: 248–254. 1976.
  19. **Hoffman, C.S. y Winston, F.** A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. Gene 57: 267–272. 1987.
  20. **Felsenstein, J.** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. J Mol Evol. 17: 368–376. 1981.
  21. **Kimura, M.** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16: 111–120. 1980.
  22. **Felsenstein, J.** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution. 39: 783–791. 1985.
  23. **InfoStat (2008).** InfoStat versión 2008 (Software Estadístico). Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 24. **Dionisi, H.M.; Lozada, M. y Olivera, N.L.** Bioprospection of marine microorganisms: potential and challenges for Argentina. Rev. Arg. Microbiol. 44 (2): 122–132. 2012. 2
  24. **Mazzafarro, L.S.; Orrillo, G.A.; Ledesma, P. y Breccia, J.D.** Dose dependent significance of monosaccharides on intracellular alpha-L-rhamnosidase activity from *Pseudoalteromonas* sp. Biotechnol. Lett. 30: 2147–2150. 2008.
  25. **Olivera, N.; Sequeiros, C. y Nievas, M.** Diversity and enzyme properties of protease-producing bacteria isolated from sub- Antarctic sediments of Isla de Los Estados, Argentina. Extremophiles. 11: 517–26. 2007.
  26. **Junge, K.; Imhoff, F.; Staley, T. y Deming, W.** Phylogenetic diversity of numerically important arctic sea-ice bacteria cultured at subzero temperature. Microb. Ecol. 43: 315–328. 2002.
  27. **Casamayor, E.; Pedrós-Alió, C.; Muyzer, G. y Amann, R.** Microheterogeneity in 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations from a stratified planktonic environment is related to temporal changes and to ecological adaptations. Appl. Environ. Microbiol. 68: 1706–1714. 2002.
  28. **Stevens, H.; Stubner, M.; Simon, M. y Brinkhoff, T.** Phylogeny of Proteobacteria and Bacteroidetes from toxic habitats of a tidal flat ecosystem. FEMS Microbiol. Ecol. 54: 351–365. 2005.
  29. **Sabri, A.; Leroy, P.; Haubruge, E.; Hance, T.; Frère, I.; Destain, J. y Thonart, P.** Isolation, pure culture and characterization of *Serratia symbiotica* sp. nov., the R-type of secondary endosymbiont of the black bean aphid *Aphis fabae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61(9): 2081–2088. 2011.
  30. **Peladan, F. y Monteil, H.** Identification of *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, and *Alcaligenes* with the API 20 NE system. Pathol. Biol. 36(2):187–92. 1988.
  31. **O'Brien, A.; Sharp, R.; Russell, N.J. y Roller, S.** Antarctic bacteria inhibit growth of food-borne microorganisms at low temperatures. FEMS Microbiol. Ecol. 1(48): 157–167. 2004.
  32. **Yu, H.; Gong, J.; Zhang, C. y Jin, F.** Purification and characterization of ginsenoside-alpha-L-rhamnosidase. Chem. Pharm. Bull. 50: 175–178. 2002.
  33. **Qian, S.; Yu, H.; Zhang, C.; Lu, M.; Wang, H. y Jin, F.** Purification and characterization of dioscin-alpha-L-rhamnosidase from pig liver. Chem. Pharm. Bull. 53: 911–914. 2005.
  34. **Manzanares, P.; Orejas, M.; Ibañez, E.; Vallés, S. y Ramón, D.** Purification and characterization of an alpha-L-rhamnosidase from *Aspergillus nidulans*. Lett. Appl. Microbiol. 31: 198–202. 2000.
  35. **Alvarenga, A.E.; Romero, C.M. y Castro, G.R.** A novel alpha-L-rhamnosidase with potential applications in citrus juice industry and in winemaking. Eur. Food Res. Tech. 237: 977–985. 2013.

Recibido: 14/08/2014.

Aprobado: 12/05/2015.