

UCH-FC  
DOC-Microb  
C 313  
C I

***Estudio comparativo de las enzimas amilasas y  
celulasas producidas por levaduras psicrófilas y  
psicrotolerantes***

**Tesis**

**Entregada A La  
Universidad De Chile  
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos  
Para Optar Al Grado De**



**Doctor en Ciencias con mención en Microbiología**

**Facultad De Ciencias**

**Por**

**Mario Esteban Carrasco Troncoso**

**Agosto, 2017**

**Director de Tesis: Dr. Marcelo Baeza Cancino**

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

**MARIO ESTEBAN CARRASCO TRONCOSO**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 10 de Agosto de 2017.

Director de Tesis:

Dr. Marcelo Baeza Cancino



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Rosalba Lagos



Dr. Ricardo Cabrera

.....

Dr. Oscar León



Dr. Gino Corsini





**A mi familia.**



## BIOGRAFÍA



Nací el 25 de Octubre de 1987 en la ciudad de Santiago. En el año 1994, comencé mi educación básica en el colegio Naciones Unidas, colegio en donde cursé de primero a octavo básico. En el año 2002 ingresé al Liceo Andrés Bello A-94, donde terminé la educación media en Diciembre de 2005. En 2006 comencé la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular de la Universidad de Chile. El año 2010 obtuve la Licenciatura en Ingeniería en Biotecnología Molecular y en el año 2011 recibí mi título profesional luego de desarrollar mi seminario de título en el laboratorio de Genética bajo la tutela del Dr. Marcelo Baeza Cancino. En 2011 ingresé al Magister en Ciencias Biológicas de la misma casa de estudio, en donde me gradué en el año 2013 haciendo mi tesis en el mismo laboratorio. Finalmente en el año 2013 ingresé al programa de Doctorado en Ciencias con mención en Microbiología que imparte la Universidad de Chile. Durante cuatro años desarrollé mi Tesis en el mismo laboratorio y actualmente estoy presentando mi trabajo para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer a todas las personas que me acompañaron y apoyaron durante la realización de mi Tesis de Doctorado:

Agradezco al Dr. Marcelo Baeza Cancino, Director de esta Tesis, por recibirme en su laboratorio y brindarme su apoyo y confianza en mis capacidades, además de compartir su conocimiento y experiencia.

A la Dra. Jennifer Alcaíno por su constante ayuda y apoyo.

Al Dr. Víctor Cifuentes por sus críticas constructivas.

A la comisión evaluadora de esta Tesis conformada por la Dra. Rosalba Lagos, Dr. Gino Corsini, Dr. Oscar León y Dr. Ricardo Cabrera por su buena disposición y colaboración durante todo el proceso de desarrollo de esta investigación.

A todos mis compañeros de laboratorio con los que compartí durante la realización de mi Tesis, que supieron entregar sus conocimientos de manera oportuna y apropiada.

A mi familia

A mis amigos.

A mi nueva familia, Pamela, los 4 perritos y la Olivia.

GRACIAS.

Financiado por FONDECYT 1130333. y al programa de becas MECESUP de la Universidad de Chile.

## INDICE DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Microorganismos adaptados a las bajas temperaturas.....	1
1.2 Levaduras aisladas desde ambientes fríos.....	2
1.3 Enzimas extracelulares producidas por levaduras adaptadas a bajas temperaturas.....	2
1.4 Amilasas: Características generales.....	4
1.5 Celulasas: Características generales.....	6
1.6 Adaptaciones de las enzimas adaptadas a bajas temperaturas.....	7
1.7 Antecedentes previos de la propuesta.....	9
1.8 Hipótesis y objetivos.....	11
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
2.1 Métodos estándares.....	12
2.2 Cepas, mantención y condiciones de cultivo.....	12
2.3 Extracción de proteínas extracelulares.....	14
2.4 Ensayos en placa de actividad amilasa y celulasa.....	14
2.5 Método del ácido 3, 5-dinitrosalicílico.....	15
2.6 Asimilación de fuentes de carbono y ensayos de fermentación.....	15
2.7 Condiciones de producción y componentes del medio cultivo para la producción de las enzimas amilasas y celulasas.....	16
2.8 Purificación de las enzimas.....	16
2.9 Determinación del peso molecular de las enzimas.....	17
2.10 Ensayo de glicosilación.....	18
2.11 Especificidad de sustrato de las enzimas amilasas.....	18
2.12 Cuantificación de la liberación de glucosa.....	19
2.13 Experimentos de Plackett-Burnman.....	19
2.14 Experimentos de superficie de respuesta.....	22
2.15 Actividad y estabilidad de las enzimas con respecto a la temperatura.....	22
2.16 Determinar parámetros cinéticos de las enzimas amilasas.....	22
2.17 Espectroscopia de masas.....	23
2.18 Análisis de secuencias aminoacídicas, modelamiento y análisis bioinformáticos.....	23
3. RESULTADOS.....	24
4. DISCUSIÓN.....	71
5. CONCLUSIONES.....	76
6. REFERENCIAS.....	77
7. ANEXOS.....	82

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Adaptaciones que les confieren flexibilidad a proteínas adaptadas a bajas temperaturas. ....	10
Tabla 2. Cepas de levadura utilizadas en este trabajo y sus respectivas temperaturas óptimas de crecimiento. ....	13
Tabla 3. Condiciones de ensayo Plackett-Burmann de la glucoamilasa de <i>Tetracladium</i> sp. ....	20
Tabla 4. Condiciones de ensayo Plackett-Burmann de la $\alpha$ -glucosidasa de <i>D. fristingensis</i> T9Df1. ....	20
Tabla 5. Condiciones de ensayo Plackett-Burmann de la celulasa de <i>Tetracladium</i> sp. ....	21
Tabla 6. Condiciones de ensayo Plackett-Burmann de la celulasa de <i>M. gelida</i> . ....	21
Tabla 7. Péptidos identificados mediante el análisis de huella peptídica de la amilasa de <i>Tetracladium</i> sp. ....	48
Tabla 8. Expresión de los genes de las amilasas putativas de <i>Tetracladium</i> sp. en medios suplementados con glucosa o AS, como única fuente de carbono. ....	49
Tabla 9. Influencia de diferentes parámetros sobre la actividad de la glucoamilasa de <i>Tetracladium</i> sp. ....	56
Tabla 10. Influencia de diferentes parámetros sobre la actividad de la amilasa de <i>D. fristingensis</i> T9Df1. ....	56
Tabla 11. Influencia de diferentes parámetros sobre la actividad de la celulasa de <i>Tetracladium</i> sp. ....	56

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Temperatura y pH óptimas de amilasas de hongos y levaduras.....	5
Figura 2. Temperatura y pH óptimas de $\beta$ -glucosidasas de hongos y levaduras.....	8
Figura 3. Actividad amilasa de los extractos proteicos extracelulares .....	26
Figura 4. Actividad celulasa de los extractos proteicos extracelulares.....	27
Figura 5. Comparación de las actividades amilasas extracelulares desde muestras inducidas y no inducidas.....	29
Figura 6. Comparación de las actividades celulasas extracelulares desde muestras inducidas y no inducidas.....	31
Figura 7. La biomasa alcanzada por las especies cultivadas con AS o CMC como fuentes de carbono únicas.....	33
Figura 8. Curvas de crecimiento, perfiles de proteínas extracelulares y actividad amilasa a lo largo de la curva de crecimiento.....	34
Figura 9. Curvas de crecimiento, actividad celulasa y perfiles de proteínas fraccionadas.....	36
Figura 10. Perfil de proteínas y actividad celulasa de extractos proteicos extracelulares de <i>M.gelida</i> obtenidos en medios de cultivo YM suplementado con glucosa o con diferentes concentraciones de CMC.....	38
Figura 11. Perfiles de proteínas extracelulares y actividad amilasa de las distintas fracciones de proteínas.....	40
Figura 12. Purificación de la amilasa de <i>Tetracladium sp.</i> a través de filtración en gel.....	41
Figura 13. Purificación de la enzima amilasa de <i>D.fristingensis</i> T9Df1 a través de intercambio catiónico.....	43
Figura 14. Análisis de SDS-PAGE y de presencia de glicosilación de la glucoamilasa purificada.....	44
Figura 15. Análisis de SDS-PAGE y de presencia de glicosilación de la amilasa purificada de <i>D. fristingensis</i> T9Df1.....	45
Figura 16. Purificación de la celulasa de <i>Tetracladium sp.</i> a través de intercambio catiónico.....	46
Figura 17. Purificación de la celulasa de <i>Tetracladium sp.</i> a través de filtración en gel.....	47
Figura 18. Regiones conservadas de glucoamilasas de hongos.....	50
Figura 19. Especificidad de sustrato de la amilasa de <i>Tetracladium sp.</i> .....	53
Figura 20. Especificidad de sustrato de la amilasa de <i>D. fristingensis</i> T9Df1.....	54
Figura 21. Determinación de la actividad $\beta$ -glucosidasa de fracciones representativas de la purificación de enzimas celulasas de <i>Tetracladium sp.</i> .....	55
Figura 22. Influencia del $\text{CaCl}_2$ sobre la actividad enzimática de la amilasa de <i>D. fristingensis</i> T9Df.....	58
Figura 23. Diseños de superficie de respuesta de la glucoamilasa de <i>Tetracladium sp.</i> .....	59
Figura 24. Diseños de superficie de respuesta de la amilasa de <i>D.fristingensis</i> T9Df.....	60
Figura 25. Diseños de superficie de respuesta de las celulasas de <i>Tetracladium sp.</i> .....	61
Figura 26. Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la glucoamilasa de <i>Tetracladium sp.</i> .....	62
Figura 27. Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la amilasa de <i>D.fristingensis</i> T9Df1.....	63
Figura 28. Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la celulasa de <i>Tetracladium sp.</i> .....	64
Figura 29. Velocidades de reacción y curva de progreso de la glucoamilasa de <i>Tetracladium sp.</i> .....	67
Figura 30. Velocidades de reacción y curva de progreso de la $\alpha$ -glucosidasa de <i>D. fristingensis</i> T9Df1.....	68
Figura 31. Comparación estructural entre la glucoamilasa de <i>H.jecorina</i> (HjGa) y de <i>Tetracladium sp.</i> .....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS

Aw	Disponibilidad de agua
AS	Almidón soluble
CMC	Carboximetilcelulosa
DNS	Método ácido 3,5-dinitrosalicílico
DO	Densidad óptica
HGja	Glucoamilasa de <i>H.jecorina</i>
$k_m$	Constante de Michaelis-Menten
$k_{cat}$	Constante catalítica
ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
rMW	Peso molecular relativo
YM-C	Medio YM suplementado con Carboximetilcelulosa
YM-G	Medio YM suplementado con glucosa
YM-S	Medio YM suplementado con almidón soluble
SD	Medio mínimo

## RESUMEN

Los microorganismos que habitan en ambientes fríos han desarrollado una serie de adaptaciones que les permiten crecer a bajas temperaturas, incluyendo la producción de enzimas extracelulares para utilizar los nutrientes disponibles. Es aceptado que estas enzimas son más activas a bajas temperaturas que sus contrapartes mesófilas. Sin embargo, las temperaturas óptimas de actividad enzimática son variables entre los grupos de microorganismos aislados desde estos ambientes, algunos presentando actividad enzimática óptima entre 22-40 °C y otros entre 0-15 °C. Se ha sugerido que las enzimas pertenecientes al primer grupo son obtenidas desde microorganismos psicrotolerantes, que han sido aislados desde ambientes fríos con variaciones estacionales de temperatura, mientras que el segundo grupo se han obtenido desde microorganismos psicrófilos que han sido aislados desde ambientes fríos constantes.

Dentro de este contexto, es posible hipotetizar que las enzimas producidas por levaduras psicrófilas estarían más adaptadas a las bajas temperaturas en comparación a las enzimas producidas por levaduras psicrotolerantes, basándonos en las temperaturas óptimas de crecimiento de ambos grupos de levaduras. En este trabajo se puso a prueba esta hipótesis utilizando para los estudios levaduras psicrófilas y psicrotolerantes aisladas desde la Antártica.

El trabajo se enfocó en las enzimas amilasas y celulasas las cuales degradan los dos polisacáridos más abundantes del planeta y además, corresponden a las enzimas más utilizadas en la industria. En el último tiempo se ha considerado la utilización de enzimas amilasas y celulasas activas a bajas temperaturas en los procesos de producción de biocombustibles a partir de materias primas ricas en almidón y celulosa. Sin embargo, las enzimas comerciales disponibles actualmente son ineficientes para funcionar a temperatura ambiente o bajas temperaturas, lo que hace necesario subir las temperaturas del proceso encareciendo la producción de biocombustibles.

En este trabajo se evaluó en primera instancia, las actividades amilasas y celulasas presentes en extractos proteicos extracelulares obtenidos de levaduras psicrófilas y psicrotolerantes, lo que permitió la selección de dos enzimas amilasas y dos enzimas celulasas,

producidas por levaduras psicrófilas y psicotolerantes, en cada caso. Se optimizaron las condiciones de crecimiento de las levaduras para la obtención de la mayor cantidad de enzimas para su posterior purificación. Las enzimas se caracterizaron en relación al pH y temperatura óptima, el efecto de iones, termoestabilidad de la actividad enzimática, y también se determinaron parámetros cinéticos. Se observó que las mayores actividades amilasas y celulasas de las levaduras psicrófilas y psicotolerantes se obtuvieron entre 30 y 37 °C. Sin embargo, algunas levaduras psicrófilas presentaron las mayores actividades amilasa y celulasa entre 10 y 22 °C. El calcio aumentó la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa de *D. fristingensis* T9Df1, mientras que la actividad de las restantes enzimas no fueron afectadas por ninguno de los iones evaluados. La glucoamilasa producida por *Tetracladium* sp. (psicotolerante) fue la que presentó la temperatura óptima de actividad más baja dentro de las evaluadas, siendo ésta 30 °C. Además se determinó que esta enzima posee una  $K_m$  de 4,5 g/l sobre almidón soluble, valor significativamente mayor que las  $K_m$  reportadas para las glucoamilasas de microorganismos mesófilos. De acuerdo a estos resultados, se determinó que la glucoamilasa producida por *Tetracladium* sp. fue la enzima que resultó estar más adaptada a las bajas temperaturas. Por último, se modeló esta enzima con respecto a la glucoamilasa que presentó la mayor similitud de secuencia, y se determinó que la glucoamilasa descrita en este trabajo posee una serie de sustituciones aminoacídicas, que en su conjunto le confieren una mayor actividad a bajas temperaturas en relación a su contraparte mesófila. Considerando los resultados obtenidos en este trabajo se rechaza la hipótesis planteada en este trabajo ya que la amilasa obtenida desde una levadura psicotolerante fue la que presentó la menor temperatura óptima de actividad enzimática.

## ABSTRACT

Microorganisms that inhabit in cold environments have developed adaptations that allow them to grow/tolerate low and freeze temperatures, and furthermore, the secretion of hydrolytic enzymes to use the available nutrients. Although, these enzymes are more active at low temperatures than their mesophilic counterparts, their temperatures for optimum activity are variable among the groups of microorganisms isolated from these environments. Psychrotolerant microorganisms are normally isolated from cold environments with seasonal temperature variations, while psychrophilic microorganisms are commonly isolated from constant cold environments. The temperature described for enzymes from psychrotolerant and psychrophilic microorganisms range from 22-40 °C and 0-15 °C, respectively. In this context, it is possible to hypothesize that the enzymes produced by psychrophilic yeasts would be more adapted at low temperatures regarding to the enzymes produced by psychrotolerant yeasts. In this work we tested this hypothesis in psychrophilic and psychrotolerant yeasts isolated from Antarctica.

The work was focused on the amylases and cellulases which degrade the two most abundant polysaccharides on the planet and also correspond to the enzymes most used in the industry. Currently, the use of low-temperature active amylases and cellulases has been considered for the production of biofuel from raw matters rich in starch and cellulose. However, the commercial enzymes currently available are inefficient to operate at room temperature or low temperatures, which makes necessary to heat the process, increasing the production costs of biofuels. The amylases and cellulase activities were evaluated in extracellular extracts obtained from yeasts, which allowed the selection of two amylases and two cellulase enzymes, produced by psychrophilic and psychrotolerant yeasts, in each case. The yeast growth conditions were optimized to obtain the highest amount of enzymes for further purification.

The enzymes were characterized in relation to their optimal pH and temperature for activity, thermostability of enzymatic activity, effect of metals on activity, and the kinetic

parameters were determined. It was observed that the highest amylase and cellulase activities of the psychrophilic and psychotolerant yeasts were obtained between 30 and 37 °C. However, some psychrophilic yeasts had the highest amylase and cellulase activity between 10 and 22 °C. Calcium increased the activity of the  $\alpha$ -glucosidase of *D. fristingensis* T9Df1, while the activity of the remaining enzymes were not affected by any of the evaluated cations. The glucoamylase produced by *Tetracladium* sp. was the one that presented the lowest optimum temperature of their activity, being this 30 °C. In addition, it was determined that this enzyme has a  $K_m$  of 4,5 g/l on soluble starch, a value significantly higher than the  $K_m$  reported for the glucoamylases of mesophilic microorganisms. According to these results, it was determined that the glucoamylase produced by *Tetracladium* sp. was the enzyme that proved to be more adapted to low temperatures. This enzyme was modeled with respect to the glucoamylase that presented the greatest sequence similarity, and it was determined that the glucoamylase described in this work has a series of amino acid substitutions that confer it greater enzymatic activity than their mesophilic counterpart. Considering the results obtained we reject the hypothesis proposed in this work since the amylase obtained from a psychotolerant yeast was the one with the lowest optimum temperature of enzymatic activity.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Microorganismos adaptados a bajas temperaturas

Los ambientes fríos, definidos como aquellos que poseen constantemente temperaturas bajo 10 °C, están ampliamente distribuidos en el planeta (Margesin y col., 2007). Son considerados uno de los hábitats más extremos debido a que presentan condiciones que dificultan la vida, desde un punto de vista antropocéntrico, tales como baja disponibilidad de nutrientes, alta salinidad, alta radiación ultravioleta (UV) y bajas temperaturas (D'Amico y col., 2002). Los microorganismos que viven en ambientes fríos se han clasificado como psicrófilos o psicrotolerantes de acuerdo con sus temperaturas de crecimiento. Los microorganismos psicrófilos crecen a temperaturas cercanas a 0 °C, presentan una temperatura óptima de crecimiento  $\leq 15$  °C y una temperatura máxima de crecimiento  $\leq 20$  °C. Los microorganismos psicrotolerantes tienen una temperatura óptima de crecimiento cercana a 20 °C y una temperatura máxima de crecimiento  $\leq 25$  °C (Ramli y col., 2011). Se sugiere que los microorganismos psicrotolerantes han evolucionado a tolerar el frío, pero aparentemente no están especializados fisiológicamente como los psicrófilos (Buzzini y Margesin, 2014), los cuales además están adaptados a otros estrés presentes en ambientes fríos tales como baja disponibilidad de agua y baja disponibilidad de nutrientes (Buzzini y Margesin, 2014). Los microorganismos aislados desde ambientes fríos corresponden principalmente a bacterias, hongos y levaduras. Los hongos y levaduras están ampliamente distribuidos en los microbiomas de la tierra actuando principalmente como descomponedores heterótrofos (Starmer y Lachance, 2011). Diversos trabajos han demostrado que los hongos presentan una habilidad sorprendente para sobrevivir en una gran cantidad de hábitats y bajo diferentes tipos de estrés (Rosa Margesin y Miteva, 2011).

## 1.2 Levaduras aisladas desde ambientes fríos

Se han aislado alrededor de 70 especies de levaduras psicrófilas o psicrotolerantes desde regiones frías del planeta tales como: Japón, los Alpes Italianos, las Montañas del Himalaya, fondo marino, glaciares de la Patagonia Argentina y desde la Antártica (Butinar y col., 2007; Carrasco y col., 2012; Connell y col., 2008; De García y col., 2007; Singh y col., 2013; Turchetti y col., 2008), pertenecientes sólo a unos pocos géneros: *Cryptococcus*, *Leuconeuropsora*, *Glaciozyma*, *Wickerhamomyces Mrakia*, *Cystofilobasidium*, *Aureobasidium*, *Naganishia*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Leucosporidiella*, *Dioszegia*, *Sporobolomyces*, *Pseudozyma*, *Udeniomyces* y *Candida* (De García y col., 2007; Singh y col., 2013; Turchetti y col., 2008). La gran mayoría de estas levaduras pertenecen al phylum Basidiomycota (Butinar y col., 2011; Vishniac y Onofri, 2003), muchas de las cuales se han encontrado en climas fríos como también en hábitats cálidos: *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus macerans* (anámorfo de *Cystofilobasidium macerans*) y *Rhodotorula mucilaginosa* (De García y col., 2007). Las especies del género *Mrakia* y su género anámorfo *Mrakiella* han sido aisladas exclusivamente en ambientes fríos (Turchetti y col., 2008). Los géneros de levaduras predominantes en ambientes fríos son *Cryptococcus* y *Rhodotorula* (Bellemain y col., 2013; Branda y col., 2010), que poseen perfiles nutricionales heterogéneos y también una habilidad para sobrevivir en una gran cantidad de hábitats y bajo diferentes tipos de estrés (Margesin y Miteva, 2011).

Dentro de las adaptaciones de las levaduras para sobrevivir en ambientes fríos se puede nombrar los péptidos anticongelantes, variación en la composición lipídica de sus membranas, micosporinas y enzimas activas a bajas temperaturas (Buzzini y Margesin, 2014). Este trabajo se enfocó en el estudio de las enzimas extracelulares activas a bajas temperaturas.

## 1.3 Enzimas extracelulares producidas por levaduras adaptadas a bajas temperaturas

Las enzimas extracelulares han sido estudiadas debido a su rol en el reciclaje de nutrientes y en la mineralización de la materia orgánica en regiones frías del planeta (Starmer y Lachance, 2011; Stern, 2009). La producción de este tipo de enzimas contribuiría a la liberación de sustratos que podrían ser utilizados como fuente de carbono por distintos microorganismos, por lo tanto el estudio de los microorganismos productores de éste tipo de enzimas y de las enzimas

propriadamente tal, es fundamental. A la fecha se han caracterizado distintas enzimas desde microorganismos adaptados a bajas temperaturas y también se ha evaluado sus posibles aplicaciones biotecnológicas (Burhan y col., 2014; Margesin y Miteva, 2011; Rothschild, 2001; Satyanarayana y Kunze, 2009). Si bien estos reportes corresponden a avances importantes dentro de este campo de estudio, las investigaciones se remiten principalmente al estudio de actividades enzimáticas identificadas desde bacterias (Connell y col., 2008; Buzzini y Margesin, 2014), siendo pocos los estudios que se han enfocado sobre enzimas hidrolíticas extracelulares producidas por levaduras psicrófilas y/o psicrotolerantes (Ramli y col., 2011; Ray y col., 1992). El primer estudio se remonta al año 1987 relacionado con la producción de dos amilasas secretadas por la levadura *Glaciozyma antarctica* (De Mot y Verachtert, 1987). Estas dos amilasas presentaron un óptimo de actividad enzimática a 62 °C y 57 °C, sobre diferentes sustratos. Estos valores se encuentran dentro del rango de temperaturas óptimas para diferentes amilasas mesófilas (50-60 °C), aunque la levadura productora de estas enzimas haya sido aislada desde la Antártica. Esta tendencia ha sido reportada con otras enzimas extracelulares (xilanasas, pectinasas, proteasas y fitasas) con temperaturas óptimas de actividad entre 37 y 50 °C (Petrescu y coll., 2000; Nakagawa y col., 2005; Nakagawa y col., 2002; Ray y col., 1992; Pavlova y col., 2008). Sin embargo, se ha reportado que otras enzimas tienen actividad enzimática óptima a temperaturas entre 15 y 20 °C, (Ramli y col., 2011; Kasana y Gulati, 2011).

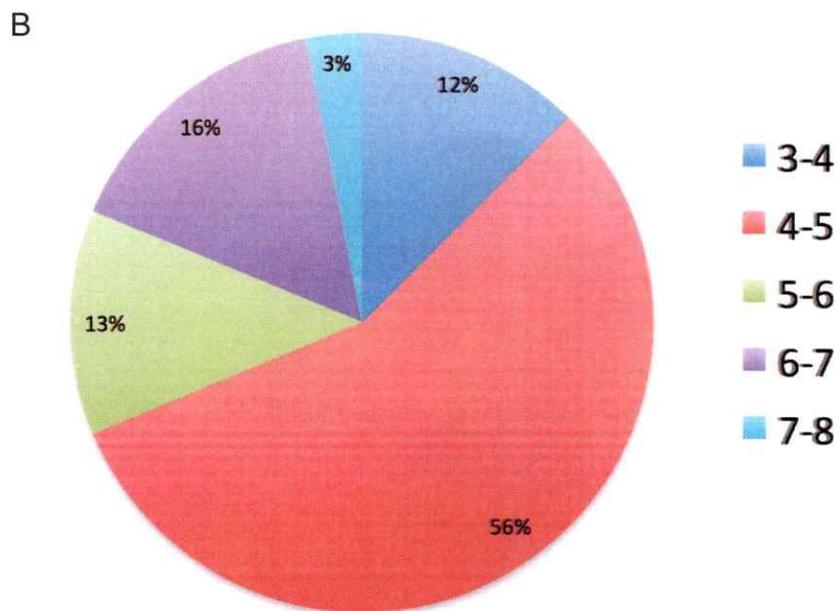
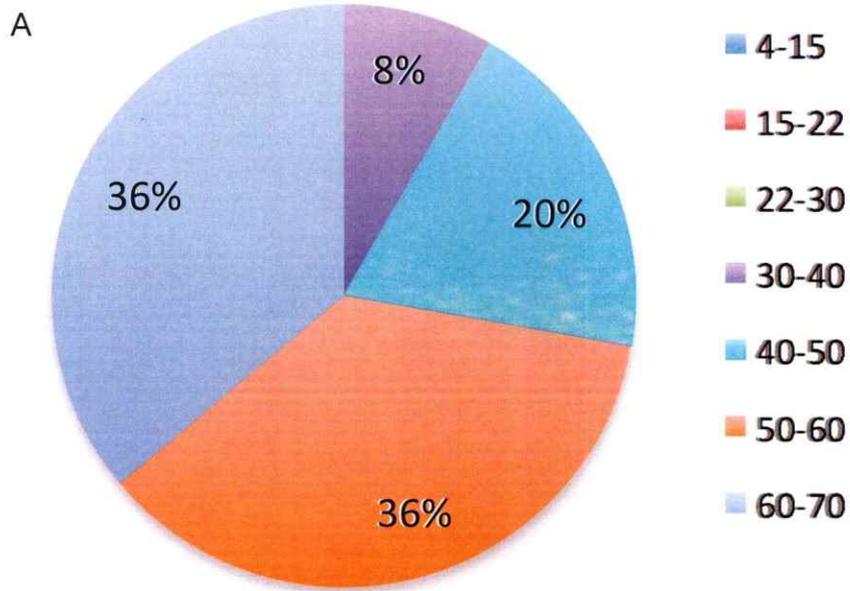
Estos antecedentes sugieren que existirían dos grupos de enzimas hidrolíticas extracelulares, algunas que estarían adaptadas a las bajas temperaturas (óptimos de actividad enzimática bajo 20°C) y otras que no estarían adaptadas ya que poseen temperaturas óptimas de actividad enzimática fuera del rango de temperatura que se da en distintas regiones frías. A la fecha no existen estudios en donde se comparen las enzimas hidrolíticas extracelulares desde distintas levaduras debido a: (1) número limitado de levaduras aisladas desde regiones frías del planeta y (2) las investigaciones publicadas a la fecha no son comparables ya que se han aislado desde distintos hábitats y desde diferentes tipos de muestras.

#### 1.4 Amilasas: Características generales.

Las amilasas son un grupo de enzimas que hidrolizan almidón dando como producto oligosacáridos de un largo variable o glucosa y se pueden dividir en tres grupos,  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -amilasa y glucoamilasa de acuerdo sus características estructurales y catalíticas (Vihinen y Mantsiila, 1989; Janeček y col., 2014). Las  $\alpha$ -amilasas (EC 3.2.1.1) son metaloenzimas dependientes de calcio, y catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 en el almidón o  $\alpha$ -glicanos relacionados (Vihinen & Mantsiila, 1989), liberando oligosacáridos de distintos tamaños (Saranraj y Stella, 2013). Las enzimas  $\beta$ -amilasas (EC 3.2.1.2) hidrolizan los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 en sustratos de almidón desde su extremo no reductor liberando maltosa como producto final. Otras de las enzimas amilolíticas más estudiadas son las  $\alpha$ -glucosidasas (3.2.1.20) y las glucoamilasas (3.2.1.3) las cuales hidrolizan el extremo terminal no reductor del almidón actuando sobre los enlaces  $\alpha$ -1,4, liberando  $\alpha$ -glucosa y  $\beta$ -glucosa, respectivamente (Saranraj y Stella, 2013).

Las enzimas amilasas se utilizan en industrias tales como la alimenticia, detergentes y biocombustibles (Gurung y col., 2013; Uthumporn y col., 2012), siendo las amilasas microbianas las más utilizadas debido a su productividad y estabilidad (Burhan y col., 2014). Una de las aplicaciones más interesantes de este tipo de enzimas es en la producción de biocombustibles desde materias primas ricas en almidón. Actualmente, la degradación completa de almidón crudo que es fundamental para la producción industrial de biocombustibles, es llevado a cabo mediante la suplementación de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa (Xu y col., 2016). Las amilasas utilizadas actualmente tienen óptimos de temperatura entre 45 y 60 °C, lo que eleva el costo del proceso (Xu y col., 2016). Por esta razón existe una continua búsqueda de amilasas eficientes a bajas temperaturas.

Como se observa en la Figura 1 la mayoría de las amilasas poseen una temperatura óptima de actividad enzimática entre 45 y 60 °C. Sin embargo, algunas de ellas tienen una actividad enzimática óptima a 37 °C (*Aspergillus niger* y *C. albicans*) e incluso se reporta que la enzima de *Schizosaccharomyces pombe* tiene un óptimo de actividad a 35 °C, siendo esta la  $\alpha$ -glucosidasa con la menor temperatura óptima dentro de las analizadas (Anexo 1).



**Figura 1.** Temperatura y pH óptimas de amilanas de hongos y levaduras. En (A) y (B) se muestran las temperaturas óptimas y pH óptimos de la amilanas depositadas en la base de datos de BRENDA, respectivamente. Datos obtenidos desde la base de datos de enzimas Brenda (al 01 de Abril de 2017).

El pH óptimo de actividad de la mayoría de las amilasas se encuentra entre 4,5 y 5,5. Las amilasas producidas por *A. niveus*, *Penicillium brevicompactum*, *Trichoderma viride*, *C. albicans* y *Wickerhamomyces anomalus* presentan pH óptimos de actividad entre 6,0 y 7,2 (Anexo 1). En los anexos 1 y 2 se muestran diferentes características bioquímicas de las amilasas de hongos y levaduras tales como: presencia de glicosilación, activadores, inhibidores, masa y estado oligomérico.

### **1.5 Celulasas: Características generales.**

Las celulasas son un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de celulosa en distintos azúcares. Las fuentes naturales de celulasas generalmente contienen al menos tres grupos de actividades celulolíticas, entre las que se incluyen: (1) endoglucanasa, (2)  $\beta$ -1,4-celobiohidrolasa, y (3)  $\beta$ -glucosidasa (Kuhad y col., 2011). Las endoglucanasas o  $\beta$ -1,4-glucanasas (EC 3.2.1.4) hidrolizan enlaces glucosídicos internos en la región amorfa de la celulosa, liberando oligosacáridos de distintos tamaños. Las  $\beta$ -1,4-celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 en el extremo reductor y no reductor de la molécula de celulosa, liberando celobiosa. Las  $\beta$ -glucosidasas (EC 3.2.1.21) actúan sobre el extremo no-reductor de celu-oligosacáridos liberando glucosa (Sharma y col., 2010). Para alcanzar una hidrólisis completa de la celulosa es necesaria la acción de estas tres enzimas. Las enzimas celulolíticas se utilizan en industrias tales como la textil, papelera, detergente y biocombustible (Sharma y col., 2016). El proceso en donde se utilizan celulasas con mayor proyección corresponde a la conversión de residuos ricos en lignocelulosa para obtener productos con valor agregado (Sharma y col., 2016). A pesar de numerosas investigaciones el principal obstáculo para desarrollar productos desde este tipo de materiales es el alto costo de las celulasas y la ineficiencia de estas (Ji y coll., 2014). La ineficiencia de las enzimas se explica porque actualmente existen dos tipos de tratamientos a los cuales es sometido el material lignocelulósico previo al proceso de fermentación: (1) Hidrólisis separada y fermentación (SHF), y (2) Bioprocesamiento consolidado (CBP). La principal diferencia entre ambos procesos es que en el CBP se realiza un proceso simultáneo de hidrólisis y fermentación, mientras que en el SHF se hacen separadamente. El CBP es el proceso más

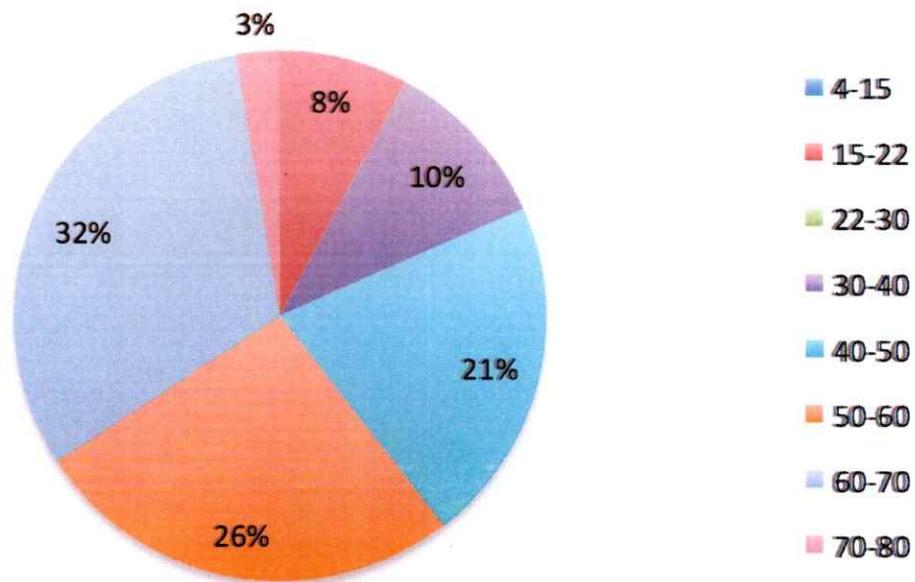
rentable, sin embargo se tiene que realizar entre 30 °C y 35 °C, restricción debida los microorganismos industriales utilizados. El problema actual de este proceso es que no hay celulasas industriales que funcionen eficientemente en a las temperaturas indicadas (Van Dyk y Pletschke, 2012), por lo que actualmente se utiliza principalmente un proceso SHF el cual se tiene que realizar a temperaturas cercanas a 50 °C, encareciendo el proceso global. En el último tiempo se ha comenzado a considerar la utilización de enzimas adaptadas a bajas temperaturas dentro del proceso de producción de biocombustibles desde materiales lignocelulósicos debido a que estas poseerían tres grandes ventajas: ahorro de energía (Kasana y Gulati, 2011), prevención de la modificación de sustratos sensibles a la temperatura disminuyendo los productos secundarios y operación industrial de forma más conveniente y segura (Burhan y col., 2014).

Las temperaturas óptimas de actividad de las  $\beta$ -glucosidasas están en el rango de 40-80 °C. Las levaduras que producen celulasas con menores temperaturas óptimas de actividad son *Hanseniaspora uvarum* y *W. anomalus* (óptimo a 20 °C) y *Saccharomycopsis fibuligera* (22 °C) (Figura 2 y Anexo 3), todas levaduras mesófilas (Albertin y col., 2016; González y col., 2008; Romero-Gil y col., 2013). El pH óptimo de las celulasas producidas por hongos filamentosos se encuentra en el rango 4,0 a 7,0, mientras que para levaduras varía desde 3,5 a 7,0 (Anexo 3). Este valor se correlaciona con los valores óptimos de pH divulgados previamente en la literatura (Bhatia y col., 2002). En el anexo 3 se detallan otras características relevantes de estas enzimas.

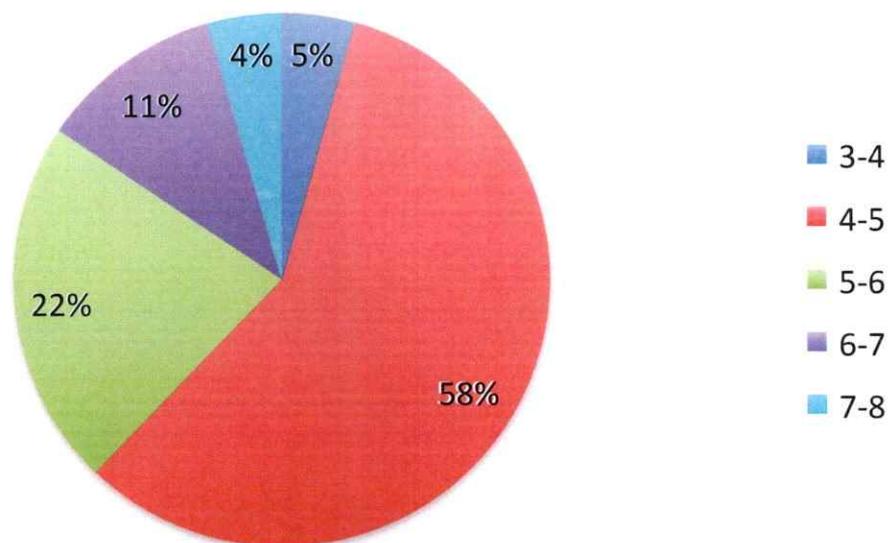
### **1.6 Adaptaciones de las enzimas activas a bajas temperaturas**

Las principales adaptaciones estructurales de las enzimas activas a bajas temperaturas es su flexibilidad principalmente alrededor del sitio activo, observándose baja entalpía de activación, baja afinidad por el sustrato, y alta actividad específica a bajas temperaturas (Siddiqui y Cavicchioli, 2006). De los estudios estructurales comparativos entre las enzimas activas en frío con respecto a sus homólogos mesófilos y/o termófilos, se ha logrado concluir que la mayor flexibilidad de las enzimas adaptadas a bajas temperaturas corresponde a cambios aminoacídicos puntuales y discretos (Thomas y Cavicchioli, 1998).

A



B



**Figura 2.** Temperatura y pH óptimas de  $\beta$ -glucosidasas de hongos y levaduras. En (A) y (B) se muestran las temperaturas óptimas y pH óptimos de las enzimas depositadas en la base de datos de BRENDA, respectivamente. Obtenido desde base de datos BRENDA (al 21 de Abril de 2017).

En la Tabla 1 se muestra una recopilación de las adaptaciones de enzimas adaptadas a bajas temperaturas (Adaptado desde Sidiqi y Cavicchioli, 2006). Al comparar las adaptaciones estructurales que presentan cada una de estas enzimas se observa que ninguna de ellas está presente en todas las enzimas analizadas. La importancia de estas adaptaciones estructurales que les confieren mayor flexibilidad a las proteínas, se discutirán a lo largo del documento.

### **1.7 Antecedentes previos de la propuesta.**

Previamente se evaluó la producción de 8 diferentes enzimas hidrolíticas extracelulares en ensayos de colonias. Las actividades amilasa y celulasa se detectaron en 14 y 10 levaduras, respectivamente, pero no fueron caracterizadas en mayor profundidad.

En el presente trabajo se estudiaron las enzimas amilasas y celulasas extracelulares producidas por levaduras psicrófilas y psicrotolerantes. Para esto ambos tipos de enzimas extracelulares se caracterizaron desde los extractos proteicos obtenidos desde las respectivas levaduras productoras, con el objetivo de identificar aquellas enzimas que presentaron las mayores actividades enzimáticas. Esta caracterización permitió seleccionar una amilasa y una celulasa producida por las levaduras psicrófilas *Dioszegia fristingensis* T9Df1 y *M. gelida*, y una amilasa y celulasa producidas por el microorganismo psicrotolerante *Tetracladium* sp. Estas cuatro enzimas fueron nuestro modelo de estudio. Para responder la hipótesis que se planteó en este trabajo, las enzimas seleccionadas se purificaron, identificaron y caracterizaron considerando diferentes parámetros, pero el análisis se enfocó principalmente sobre las temperaturas óptimas de actividad enzimática y la estabilidad térmica que éstas poseen. Además se determinaron los diferentes parámetros cinéticos que poseen las enzimas purificadas sobre sus respectivos sustratos. Este conjunto de ensayos establecieron que la glucoamilasa producida por *Tetracladium* sp (psicrotolerante) estaría más adaptada a las bajas temperaturas que la amilasa producida por *D. fristingensis* T9Df1. Finalmente, se realizó un análisis estructural de la glucoamilasa de *Tetracladium* sp. a través del cual se intentó dilucidar las adaptaciones que presenta esta enzima en relación a su homólogo mesófilo más cercano.

**Tabla 1.** Adaptaciones que les confieren flexibilidad a proteínas adaptadas a bajas temperaturas.

Adaptaciones	Ah	Ci	Me	Xil	Mal	Tri	Ura	Ade	Pe	Ela	Tri	Sub	Fos	DCC
Disminución hidrofobicidad del core	+	+	+	X	0	0	+	+	X	X	+	+	X	X
Menos Ile	+	+	X	X	-	+	0	X	+	-	+	+	-	X
Incremento hidrofobicidad superficial	+	+	0	+	0	0	X	+	+	X	X	-	+	+
Menos residuos cargados totales	-	-	0	+	+	0	0	0	+	-	-	0	-	+
Incremento hidrofiliidad superficie	+	+	X	X	X	X	X	0	+	-	+	X	+	+
Más His	+	+	+	X	0	-	0	-	+	-	+	0	0	X
Mayor razón (Glu+Asp)/ (Lys+Arg)	+	+	0	+	+	+	0	+	+	-	+	+	+	+
Menos puentes de hidrógeno	0	+	0	0	-	X	-	+	X	X	+	-	X	+
Menor razón Arg/Lys	+	-	-	+	+	0	-	+	+	+	-	-	+	+
Menos interacciones aromáticas	+	X	X	X	X	-	X	X	X	X	-	X	X	+
Menos puentes salinos	+	-	0	+	-	0	+	+	X	+	+	0	X	+
Contactos interdominios más débiles	+	+	X	X	+	X	X	N	X	X	+	X	X	X
Loops más largos	-	+	-	X	-	0	X	X	-	-	-	X	X	+
Más Gly	-	-	+	-	0	+	0	-	+	+	-	+	+	+
Menos Pro en loops	+	+	0	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
Más Pro en as hélices	-	+	N	-	0	-	-	+	X	X	X	X	X	X
Más Met	+	+	+	X	0	-	0	-	-	+	+	-	-	X
Menos sitios de unión a metales o con menor afinidad	+	N	+	N	N	N	N	0	X	X	N	-	X	N
Menos puentes disulfuros	+	N	N	N	N	N	N	N	-	-	-	-	0	N

+ : Presencia de la adaptación; - : Ausencia de la adaptación; 0 : No existe diferencia apreciable entre la enzima mesófila y psicrófila; X : La adaptación no fue evaluada; N : No está presente en la estructura. En Celeste se destacan las enzimas extracelulares analizadas. AH:  $\alpha$ -amilasa (*Alteromonas haloplanctis*); Ci, citrato sintasa (*Arthrobacter* sp.); Me, metaloproteasa (*Pseudomonas* sp.); Xil, xilanasa (*Pseudoalteromonas* sp.); Mal, malato deshidrogenasa (*Aquaspirillum arcticum*); Tri, triosa fosfato isomerasa (*Vibrio Matrinus*); Ura, uracil-DNA glicosilasa (*Gadus morhua*); Ade: Adenilato quinasa (*Bacillus globisporus*); Pe: Pepsina (*Gadus morhua*); Ela: Elastasa (*Salmo salar*); Tri: Tripsina (*Salmo salar*); Sub: Subtilisina (*Vibrio* sp.); Fos: Fosfatasa Alcalina (*Pandalus borealis*); DCC: Dominio Catalítico Celulasa (*Pseudoalteromonas baloplanktis*).

## **1.8 Hipótesis y objetivos**

### **Hipótesis de trabajo**

Las enzimas amilasas y celulasas secretadas por levaduras psicrófilas tienen temperaturas óptimas de actividad enzimática más bajas y poseen una menor estabilidad térmica en comparación a las enzimas secretadas por levaduras psicrotolerantes, y esta mayor adaptación a las bajas temperaturas está dada por cambios aminoacídicos discretos en su estructura.

### **Objetivos.**

#### **Objetivo general**

Caracterizar las enzimas amilasas y celulasas secretadas por diferentes especies de levaduras psicrófilas y psicrotolerantes.

#### **Objetivos específicos**

- I. Evaluar las actividades amilasas y celulasas desde extractos proteicos extracelulares de levaduras psicrófilas y/o psicrotolerantes, a diferentes temperaturas.
- II. Purificar e identificar las enzimas amilasas y celulasas desde levaduras psicrófilas y psicrotolerantes.
- III. Determinar las condiciones experimentales óptimas de actividad enzimática y la estabilidad térmica de las enzimas amilasas y celulasas purificadas.
- IV. Determinar parámetros cinéticos de las enzimas amilasas y celulasas, y modelar su estructura tridimensional para identificar diferentes sustituciones de aminoácidos que explican la adaptación a bajas temperaturas.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Métodos estándares.

El crecimiento celular de los microorganismos utilizados en este trabajo se determinó midiendo la densidad óptica del cultivo a 600 nm ( $DO_{600}$ ). Cuando fue necesario se realizaron curvas de crecimiento para las distintas levaduras, en donde se tomaron 1 ml de los cultivos a distintos tiempos, y a cada muestra se cuantificó su  $DO_{600}$ . Las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE y se tiñeron con azul de coomassie o nitrato de plata (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) (Sambrook y cols., 2001). El contenido de proteínas se determinó mediante el kit de cuantificación de proteínas BCA (Pierce BCA Protein Assay kit, Thermo Scientific, IL, USA). Para los experimentos de cromatografía la presencia de proteínas se siguió mediante lecturas de absorbancia a 280 nm.

### 2.2 Levaduras, mantención y condiciones de cultivo.

Las levaduras utilizadas en este trabajo fueron aisladas desde muestras de suelo desde el Territorio Antártico Chileno y fueron caracterizadas en cuanto a sus temperaturas óptimas de crecimiento. De acuerdo a este criterio se clasificaron como levaduras psicrófilas o psicotolerantes, tal como se indica en la Tabla 2. Las levaduras fueron mantenidas rutinariamente en medio YM (extracto de levadura 3 g/l, extracto de malta 3 g/l y peptona 5 g/l) suplementados con glucosa 10 g/l (YM-G). También, las levaduras fueron crecidas en medio YM suplementado con glucosa 10 g/l, o con almidón soluble 10 g/l (YM-S), o con carboximetilcelulosa 10 g/l (YM-C), a sus respectivas temperaturas óptimas de crecimiento. Para los ensayos de asimilación de fuentes de carbono y para las pruebas de fermentación las levaduras fueron crecidas en medio SD (Yeast Nitrogen Base (Difco) 6,7 g/l y glucosa 20 g/l). Para la forma semisólida cada medio de cultivo (YM o SD) se suplementó con 15 g/l de agar. Las levaduras se preservaron a través del método de la gelatina de acuerdo a lo descrito previamente (Baeza y col., 2009).

**Tabla 2.** Levaduras utilizadas en este trabajo y sus respectivas temperaturas óptimas de crecimiento

Cepa	Temperatura (°C)
<b>Levaduras Psicrotolerantes</b>	
<i>Cr. gilvencens</i> ( <i>Goffeauzyma gilvencens</i> )	4-22 (22)
<i>Cr. gastricus</i> ( <i>Goffeauzyma gastrica</i> )	4-22 (22)
<i>Cr. victoriae</i> ( <i>Vishniacozyma victoriae</i> )	4-22 (22)
<i>D. fristingensis</i> T11Df1	4-22 (22)
<i>Le. fragaria</i> ( <i>Leucosporidium fragarium</i> )	4-22 (22)
<i>H. waticus</i>	4-37 (30)
<i>W. anomalus</i>	4-37 (30)
<b>Levaduras Psicrófilas</b>	
<i>Dioszegia</i> sp.	4-22 (15)
<i>Cryptococcus</i> sp.	4-22 (15)
<i>D. fristingensis</i> T9Df1	4-15 (15)
<i>Leuconeurospora</i> sp (T11Cd2)	4-22 (15)
<i>Leuconeurospora</i> sp (T17Cd2)	4-22 (15)
<i>Leuconeurospora</i> sp (T27Cd2)	4-22 (15)
<i>M. blollopis</i>	4-22 (15)
<i>M. gelida</i>	4-15 (10)
<i>M. psychrophila</i>	4-15 (10)
<i>M. robertii</i>	4-15 (10)
<i>Mrakia</i> sp.	4-15 (10)
<i>R. glacialis</i>	4-15 (15)
<i>R. glacialis</i>	4-22 (10)

\* Se muestra el intervalo de temperaturas de crecimiento y entre paréntesis las temperaturas óptimas para cada levadura.



### **2.3 Extracción de proteínas extracelulares.**

Se realizaron cultivos de 300 ml de las levaduras a analizar en medio líquido YM suplementado con glucosa, almidón soluble o carboximetilcelulosa a una concentración de 10 g/l, y se siguió el crecimiento celular. Las células se cosecharon en fase exponencial tardía de crecimiento mediante centrifugación en una centrifuga Sorvall Legend XTR (Thermo Scientific) a 6.000 x g por 10 minutos. Luego, los sobrenadantes obtenidos se filtraron utilizando membranas de fluoruro de polivinilideno de 0,45 µm de tamaño de poro (Millipore, Billerica, MA, USA), para eliminar los restos celulares. Para la obtención de las proteínas extracelulares totales se adicionó sulfato de amonio al 80% de saturación, se incubó esta solución por una hora a 4 °C, con agitación, y luego se centrifugó a 10.000 x g a 4 °C por 15 minutos. El precipitado se suspendió en 5 ml de solución amortiguadora fosfato de sodio 20 mM y 150 mM NaCl (pH 7,0) y se eliminó el sulfato de amonio a través de bolsas de diálisis de 10 kDa de tamaño de corte, utilizando la misma solución amortiguadora.

### **2.4 Ensayos en placa de actividad amilasa y celulasa**

Para los ensayos de actividad enzimática amilasa y celulasa se depositaron 100 µl de las muestras de proteínas extracelulares totales en pocillos hechos en placas semisólidas YM (1,5 % agar) suplementadas con 10 g/l de AS o CMC. El pH del medio se ajustó con solución amortiguadora citrato ( $pK_{a1} = 3,13$ ,  $pK_{a2} = 4,76$ ,  $pK_{a3} = 6,40$ , a 25 °C)/fosfato ( $pK_{a1} = 2,15$ ,  $pK_{a2} = 7,20$ ,  $pK_{a3} = 12,33$ , a 25 °C), cuyo rango de amortiguación es entre un pH 2,6 y 7,6. Se eligió esta solución amortiguadora debido a que tiene esta capacidad en un amplio rango de pH, y este rango es útil los pHs considerados para dichos ensayos. Se ha determinado que los valores de  $pK_{a2}$  del citrato a 4 °C, 20 °C, 25 °C y 37 °C son 4,79, 4,77, 4,76 y 4,74, respectivamente. Por lo tanto este amortiguador presenta una variación pequeña en función de la temperatura. Con respecto a los valores de  $pK_{a2}$  del amortiguador fosfato a 4 °C, 20 °C, 25 °C y 37 °C son 7,26, 7,21, 7,20 y 7,16, respectivamente. Por lo tanto, este amortiguador dentro de los rangos de temperatura utilizados también presenta una pequeña variación. Es por esto que las placas que contenían los diferentes sustratos y tamponadas a pHs entre 4 y 6,2, se

incubaron a 4, 10, 15, 22, 30 o 37° C por diferentes tiempos. Para los ensayos de actividad amilasa, las placas fueron incubadas con 1 ml de una solución de  $I_2$ , y las actividades enzimáticas positivas fueron definidas como un halo claro alrededor de los pocillos, en un fondo color púrpura (Hankin y Anagnostakis, 1975). Para los ensayos de actividad celulasa, las placas fueron incubadas con una solución de rojo congo 1 mg/ml, la cual fue removida después de 15 min, y entonces las placas fueron incubadas con NaCl 1 M por 15 min. La actividad celulasa positiva fue definida como un halo claro alrededor de la colonia en un fondo color rojo (Teather y Wood, 1982). Las actividades enzimáticas fueron cuantificadas como la distancia en milímetros desde el borde del pocillo hasta el término del halo. Cada muestra de proteína evaluada fue utilizada a una concentración de 40 µg/ml.

### **2.5 Método del ácido 3, 5-dinitrosalicílico**

Para la cuantificación de las actividades amilasas y celulasas de los extractos de proteínas se utilizó el método ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Este es un método colorimétrico que se basa en la capacidad de los azúcares reductores de reducir el DNS lo que, bajo ciertas condiciones, produce una coloración que se hace más intensa a mayor concentración de azúcar. Para esto, se mezcló la muestra problema con el reactivo DNS (DNS 1 %, NaOH 1,6 % y  $Na_2C_4H_4O_6$  y KCl 15 %) en una relación 1:1 y se incubó a 100 °C por 10 min. Posteriormente, la muestra se incubó en hielo por 5 min y se midió la absorbancia a 540 nm.

### **2.6 Asimilación de fuentes de carbono y ensayos de fermentación**

Las levaduras fueron inoculadas en matraces con 10 ml de medio SD suplementado con 1,25, 2,5, 5, 10 o 20 g/l de almidón soluble o carboximetilcelulosa, a una  $DO_{600}$  inicial de 0,2. Para cada fuente de carbono la máxima concentración que se pudo utilizar fue 20 g/l debido al incremento en la viscosidad del medio. Los matraces fueron incubados a 15 o 22 °C, y el crecimiento fue seguido midiendo la  $DO_{600}$  del cultivo. Cuando se alcanzó la fase estacionaria de crecimiento se centrifugaron 4 ml del cultivo a 6.000 x g por 10 min, se eliminó el sobrenadante y se determinó el peso seco de las muestras incubándolas a 100 °C por 24 h,

hasta peso constante. La fermentación de ambas fuentes de carbono fue evaluada utilizando el método de Durham (Durham, 1984), y se cuantificó la producción de etanol (Ethanol Assay Kit, Megazyme, Wicklow, Ireland). Todos los experimentos fueron realizados en triplicado.

## **2.7 Condiciones de producción y componentes del medio cultivo para la producción de las enzimas amilasas y celulasas**

Para determinar las condiciones óptimas y el medio de cultivo idóneo para la producción de las enzimas amilasas de *Tetracladium* sp. y *D. fristingensis* T9Df1, y de las celulasas de *Tetracladium* sp. y *M.gelida*, estas se crecieron en medio líquido YM suplementado con 10 g/l de glucosa o 10 g/l AS o 10 g/l CMC, según corresponda. El crecimiento de las levaduras se siguió a través de una curva de crecimiento. Las células desde cada muestra se cosecharon por centrifugación a 4.000 x g por 5 min y se conservó el sobrenadante. Luego, se determinó el perfil de proteínas de los sobrenadantes libres de células a través de SDS-PAGE y también se ensayaron para actividad amilasa utilizando almidón soluble como sustrato mediante el método del DNS. Las muestras provenientes de los cultivos crecidos en medio YM suplementado con glucosa se diluyeron 10 veces para poder ensayarlos mediante dicho método mientras que las muestras desde los cultivos suplementados con AS o CMC se ensayaron directamente. Para cada punto de la curva, en ambas condiciones, se incubaron 100 µl de los sobrenadantes libres de células con 100 µl del reactivo de DNS y se continuó con el ensayo como se describe en la sección 2.5.

## **2.8 Purificación de las enzimas**

Como primera aproximación se realizaron cultivos de 200 ml de cada una de las cuatro levaduras, y las proteínas extracelulares totales fueron fraccionadas a través de precipitación con sulfato de amonio, utilizando concentraciones de 20 %, 40 %, 60 % o 80 % de esta sal. La actividad amilasa y celulasa se evaluó en cada fracción, y se determinó cual de las fracciones presentó la mayor actividad enzimática. Luego a las muestras de proteínas se les intercambiaron soluciones amortiguadoras a través de una columna HiTrap Desalting (General Electric, Nueva York, USA). Posteriormente las muestras fueron concentradas a través de filtros Amicon Ultra

(Millipore, Billerica, MA, USA).

En cuanto a la purificación de la amilasa de *D. fristingensis* T9Df1 y la celulasa de *Tetracladium* sp. las muestras fueron suspendidas en una solución amortiguadora fosfato de sodio 20 mM y pH 7,0. Ambas enzimas se purificaron mediante cromatografía de intercambio catiónico utilizando la columna HiPrep SP FF 16/10. En una primera aproximación, 1 ml de las muestras se cargaron en dicha columna a un flujo de 0,2 ml/min, y luego se realizó un lavado con 25 ml de la misma solución amortiguadora. Las proteínas unidas a la columna fueron eluidas mediante un gradiente de 50 mL desde 0 mM NaCl a 1 M NaCl. La purificación de la enzima amilolítica de *Tetracladium* sp. se realizó a través de filtración en gel en donde 500 µl de las muestras de *Tetracladium* sp. se cargaron en una columna de filtración en gel Superdex 75 increase 10/300 GI. Las condiciones de purificación consistieron en un flujo de 0.2 ml/min y se colectaron fracciones de 200 µl. La purificación de la enzima amilolítica de *Tetracladium* sp. se realizó a través de filtración en gel en donde dichas muestras concentradas provenientes de *Tetracladium* sp. fueron cargadas en una columna de filtración en gel Superdex 75 increase 10/300 GI. Las condiciones de purificación consistieron en un flujo de 0.2 ml/min y se colectaron fracciones de 200 µl.

Cada fracción fue analizada para detectar la presencia de proteínas y también se ensayaron para detectar la actividad amilasa o celulasa, mediante el método del DNS. Una vez estandarizada la metodología de purificación de ambas proteínas, esta se repitió numerosas veces con el objetivo de obtener la cantidad de enzimas necesarias para su respectiva caracterización.

## **2.9 Determinación del peso molecular de las enzimas**

Para determinar el peso molecular se utilizaron dos aproximaciones. En primer lugar, se calculó la migración relativa (RF) de las enzimas, con respecto a la migración de las bandas de proteínas del estándar utilizado (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, IL, USA). Con los valores de RF obtenidos para el estándar de proteínas se realizó una curva de calibración, a través de la cual se interpoló el peso molecular de cada una de las enzimas

caracterizadas. En paralelo se determinó el peso molecular de las enzimas, a través del cálculo del tiempo de retención de las proteínas en una columna de exclusión molecular Superdex 75 increase 10/300 G1. Previamente se creó una curva de calibración usando el tiempo de retención de las proteínas presentes en un estándar de calibración para columnas de filtración en gel (Biorad, CA, USA). Conociendo el tiempo de retención de dichas proteínas, con peso molecular conocido, se creó una curva de calibración a través de la cual se interpoló el peso molecular de las enzimas, conociendo su tiempo de retención en la columna.

### **2.10 Ensayo de glicosilación**

La presencia de glicosilaciones en las enzimas se evaluaron mediante el kit Pierce Glycoprotein Staining (Thermo Scientific, IL, USA). Brevemente, las enzimas, un control positivo (Peróxidasa de rábano picante) y un control negativo (Inhibidor de tripsina de frijol) fueron separadas utilizando un gel SDS-PAGE. Luego, el gel fue embebido en 100 ml de una solución 50 % metanol en agua destilada por 30 min. Transcurrido este tiempo se eliminó la solución de etanol y este incubó por 10 min con 100 ml de una solución 3 % v/v de ácido acético, repitiéndose esta etapa una vez más. Posteriormente el gel se incubó con agitación con 25 ml del reactivo oxidante por 15 min, luego se eliminó esta solución, y el gel fue incubado con 100 ml de una solución 3 % v/v de ácido acético por 5 min. Este proceso se repitió dos veces más. Entonces, el gel fue incubado con 25 ml del reactivo "Glycoprotein Staining" y fue agitado por 15 min. Luego, el gel fue incubado con 25 mL del reactivo reductor durante 5 min, hasta la aparición de bandas color violeta. Por último, el gel fue lavado con una abundante cantidad de una solución 3 % v/v ácido acético, y luego con agua.

### **2.11 Especificidad de sustrato de las enzimas amilasas.**

Las enzimas amilolíticas purificadas fueron ensayadas utilizando los sustratos etilideno-pNP-G7 o 4-Nitrofenol  $\alpha$ -D-glucopiranosido, los cuales son hidrolizados específicamente por  $\alpha$ -amilasas o  $\alpha$ -glucosidasas/glucoamilasas, respectivamente. Brevemente, se mezclaron 100  $\mu$ l de cada una de las enzimas con 100  $\mu$ l de cada sustrato (por separado), y se cuantificó la hidrólisis de los sustratos por distintos períodos de tiempo (entre 0 y 210 min). La hidrólisis de

cada sustrato se siguió mediante lecturas de Absorbancia a 405 nm utilizando un lector de placa Epoch (Biotek Instruments Inc, Winooski, VT, USA), ya que los sustratos están marcados con p-nitrofenol que al ser hidrolizado produce una coloración amarilla que absorbe a 405 nm. En paralelo se realizó una curva de calibración utilizando concentraciones conocidas de p-nitrofenol, datos que sirvieron para cuantificar la cantidad de p-nitrofenol en los ensayos con las enzimas purificadas. La especificidad de las celulasas se ensayaron incubando 100 µl de las enzimas con 100 µl de celobiosa 10 g/l, y se cuantificó la liberación de glucosa por 1 h, a través del método del DNS.

### **2.12 Cuantificación de la liberación de glucosa.**

La liberación de glucosa producida por las enzimas evaluadas se determinó a través del kit comercial D-Fructose/D-Glucose (Megazyme, IL, USA). El ensayo se basa en que la glucosa liberada por la reacción enzimática es convertida a glucosa 6-fosfato a través de la enzima hexoquinasa, y luego esta glucosa 6-fosfato es convertida a gluconato 6-fosfato en presencia de NADP<sup>+</sup>, mediante la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. Producto de esta reacción se libera NADPH (equimolarmente con respecto a la glucosa), y por lo tanto la cuantificación de este es una medida indirecta para obtener la concentración de glucosa. La liberación de NADPH se cuantificó mediante lecturas de absorbancia a 340 nm, y se siguió el protocolo indicado por el fabricante.

### **2.13 Experimentos de Plackett-Burman**

Para determinar qué factores tienen un mayor impacto sobre las actividades enzimáticas de las enzimas amilasas y celulasas, se realizó un diseño de Plackett-Burman de dos niveles. A través de este diseño se evaluó el efecto del pH, la temperatura, la concentración de sustrato y la presencia de CaCl<sub>2</sub> o MgCl<sub>2</sub>, sobre la actividad de las amilasas y celulasas. Para esto se diseñaron 8 ensayos para cada enzima, en donde se variaron los factores a analizar, y en cada uno de estos se siguió la actividad enzimática a lo largo del ensayo. Cada factor fue evaluado en dos niveles: -1 para el nivel más bajo y +1 para el nivel más alto. Las tablas 3, 4, 5 y 6

ilustran las variables y los correspondientes valores usados en cada diseño experimental. El tratamiento de los datos para analizar el efecto de cada factor se realizó como se ha descrito anteriormente (Stanbury y col., 1995).

**Tabla 3.** Condiciones de ensayo Plackett-Burmann de la glucoamilasa de *Tetracladium* sp.

Ensayo	Factores						
	T (°C)	pH	AS (g/l)	CaCl <sub>2</sub> (mM)	Error	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Error
1	50	8	10	10	1	0	0
2	30	8	10	0	-1	10	0
3	30	6	10	0	1	0	1
4	50	6	1	0	1	10	0
5	30	8	1	10	1	10	1
6	50	6	10	10	-1	10	1
7	50	8	1	0	-1	0	1
8	30	6	1	10	-1	0	0

**Tabla 4.** Condiciones de ensayo Plackett-Burmann de la  $\alpha$ -glucosidasa de *D. fristingensis* T9Df1.

Ensayo	Factores						
	T (°C)	pH	AS (g/l)	CaCl <sub>2</sub> (mM)	Error	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Error
1	37	7	10	10	1	0	0
2	25	7	10	0	-1	10	0
3	25	5	10	0	1	0	1
4	37	5	1	0	1	10	0
5	25	7	1	10	1	10	1
6	37	5	10	10	-1	10	1
7	37	7	1	0	-1	0	1
8	25	5	1	10	-1	0	0

**Tabla 5.** Condiciones de ensayo Plackett-Burmann de la celulasa de *Tetracladium* sp.

Ensayo	Factores						
	T (°C)	pH	CMC (g/l)	CaCl <sub>2</sub> (mM)	Error	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Error
1	50	8	10	10	1	0	0
2	30	8	10	0	-1	10	0
3	30	6	10	0	1	0	1
4	50	6	1	0	1	10	0
5	30	8	1	10	1	10	1
6	50	6	10	10	-1	10	1
7	50	8	1	0	-1	0	1
8	30	6	1	10	-1	0	0

**Tabla 6.** Condiciones de ensayo Plackett-Burmann de la celulasa de *M. gelida*.

Ensayo	Factores						
	T (°C)	pH	CMC (g/l)	CaCl <sub>2</sub> (mM)	Error	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Error
1	40	7	10	10	1	0	0
2	25	7	10	0	-1	10	0
3	25	5	10	0	1	0	1
4	40	5	1	0	1	10	0
5	25	7	1	10	1	10	1
6	40	5	10	10	-1	10	1
7	40	7	1	0	-1	0	1
8	25	5	1	10	-1	0	0

#### **2.14 Experimentos de superficie de respuesta**

Para determinar los óptimos de pH y temperatura de las reacciones catalizadas por las enzimas, se realizaron reacciones enzimáticas a diferentes temperaturas (25, 30, 32,5, 35, 37,5, 40, 42,5, 45, 47,5, 50 °C) y pH (4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5 y 9), alrededor de los valores óptimos de pH determinado previamente. Los sustratos utilizados fueron AS o CMC 10 g/l y las reacciones se incubaron por diferentes tiempos. Las reacciones se siguieron mediante el método del DNS, y se detuvieron cuando no se observó un incremento lineal en la concentración de azúcares reductores (cuando se llegó al equilibrio). La concentración de los azúcares reductores liberados en cada condición fue graficada como una superficie de respuesta.

#### **2.15 Actividad y estabilidad de las enzimas con respecto a la temperatura**

Las enzimas se incubaron con AS 10 g/l o CMC 10 g/l, según corresponda, a 4, 10, 15, 22, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55 o 60 °C por una hora, y luego se ensayaron mediante el método del DNS. Para los experimentos de estabilidad, las enzimas se incubaron previamente a 4, 10, 15, 22, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55 o 60 °C por una hora, y luego dichas muestras fueron ensayadas para actividad amilasa o celulasa a la respectiva temperatura óptima determinada para cada enzima. Adicionalmente se evaluó la cinética de estabilidad de cada enzima, incubándolas entre 22-60 °C por 0-8 h, usando el mismo procedimiento.

#### **2.16 Parámetros cinéticos de las enzimas amilasas**

Se incubaron diferentes soluciones de AS (4 a 10 g/l) y con diferentes soluciones de enzima (0,8-25,4 µg/ml), para determinar la concentración de enzima que permitiera visualizar distintas velocidades de reacción. En los ensayos cinéticos, las reacciones se llevaron a cabo a las temperaturas y pH óptimos para cada enzima, utilizando una concentración de enzima de 1,5 µg/ml y diferentes concentraciones de AS. 50 µl de las enzimas fueron tomadas a diferentes tiempos (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 220 min), y se ensayaron a través del método del DNS. Las pendientes de las fases lineales de las reacciones se calcularon, y se consideraron como la

velocidad inicial de las reacción. Los experimentos se realizaron en triplicado. Los parámetros cinéticos  $k_m$  y  $V_{max}$  se obtuvieron a partir de los valores obtenidos de velocidad de reacción y concentración de sustratos y a través de una regresión no lineal de tipo Hill disponible en el programa Origin para determinar si la enzima presentaba un comportamiento de tipo Michaelis-Mente (OriginLab, Northampton, MA). Los valores de  $k_{cat}$  se determinaron utilizando los valores de  $k_m$  y  $V_{max}$ .

## **2.17 Espectroscopia de masas**

Las enzimas se liofilizaron utilizando el liofilizador Free Zone 2.5 liter Benchtop Freeze Dry System (Labconco, Kansas, USA) y se enviaron al servicio central de investigación experimental (Valencia, España). Para el análisis las muestras estas fueron reconstituidas en agua y fueron digeridas con tripsina (grado de secuenciación). Las reacciones fueron detenidas con ácido trifluoroacético 1 %, y concentradas hasta 20  $\mu$ l utilizando una bomba de vacío. Se utilizaron 5  $\mu$ l de esta solución para ser analizada por cromatografía líquida y espectroscopia de masa en tándem (LC-MS/MS). Los datos obtenidos para cada muestra fueron analizados con Mascot, y solo los resultados con una puntuación más alta que 54 fueron considerados estadísticamente significativos.

## **2.18 Análisis de secuencias aminoacídicas, modelamiento y análisis bioinformáticos.**

Las secuencias del genoma y los transcriptomas de *Tetracladium* sp. disponibles en nuestro laboratorio, se analizaron con el programa Geneious v. 8.1.9 (Kearse y col., 2012). Los transcriptomas analizados se obtuvieron a partir de RNA total extraído de células cosechadas luego de 40 h de crecimiento a 22 °C en dos medios de cultivo con distintas fuentes de carbono: SD-glucosa 1 % y SD-almidón soluble 1 %. La clasificación de los genes identificados según su función o proceso biológico en que participan se realizó utilizando la base de datos UniProt (*Universal Protein Resource*) disponible en internet ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). La expresión a nivel de transcrito de los distintos genes analizados se estimó a partir de su representación en cuanto a número de lecturas o "Reads" en cada transcriptoma y se expresó con el valor de FPKM

(*Fragments Per Kilobase of exon model per Million Mapped fragments*) que refleja la concentración molar del transcrito en la muestra inicial, normalizando por la longitud del RNA y el número total de “lecturas o *reads*” (Mortazavi, Williams, McCue, Schaeffer, & Wold, 2008). Este valor se calculó con la siguiente fórmula:

$$FPKM = \frac{C * 10^9}{NL}$$

Donde: **FPKMg**: *Fragments Per Kilobase of exon model per Million Mapped fragments*, **C**: número de *reads* mapeados en el exón del gen, **N**: *reads* totales, **L**: suma del exón en pares bases.

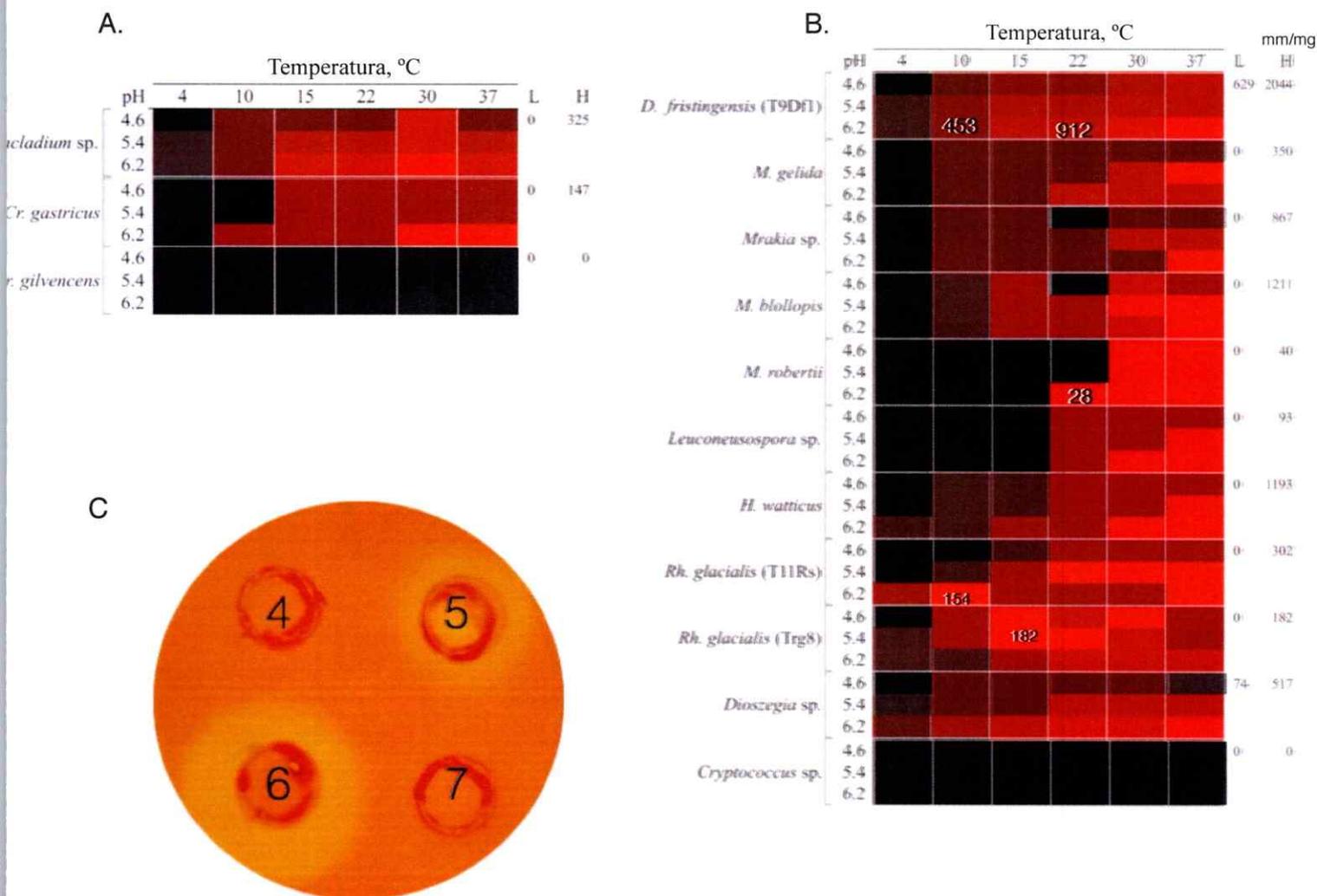
Los alineamientos múltiples de secuencias se realizaron con el programa utilizando la aplicación ClustalW2 (disponible en el programa Geneious). La estructura cristalográfica (número de PDB = 2VN7.A) que se utilizó para modelar por homología la glucoamilasa de *Tetracladium* sp. se obtuvo en la base datos de la herramienta “Swiss-Model” (<https://swissmodel.expasy.org>), y se utilizó dicha estructura debido a que fue la que presentó mayor cobertura e identidad con la secuencia aminoacídica de la glucoamilasa a modelar. El modelo de dicha glucoamilasa se obtuvo a través de esta herramienta, y la manipulación posterior del modelo se realizó mediante el programa “Swiss-PDB viewer” (Guex & Peitsch, 1997). El modelo generado presentó un QMEAN de 1,26, lo que valida que fue realizado correctamente. Además, la calidad del modelo se verificó mediante el programa Verify3D ([http://services.mbi.ucla.edu/Verify\\_3D/](http://services.mbi.ucla.edu/Verify_3D/)).

### 3. RESULTADOS.

**Objetivo 1. Evaluar las actividades amilasas y celulasas de extractos proteicos extracelulares de levaduras psicrófilas y/o psicotolerantes.**

#### **Selección de las levaduras**

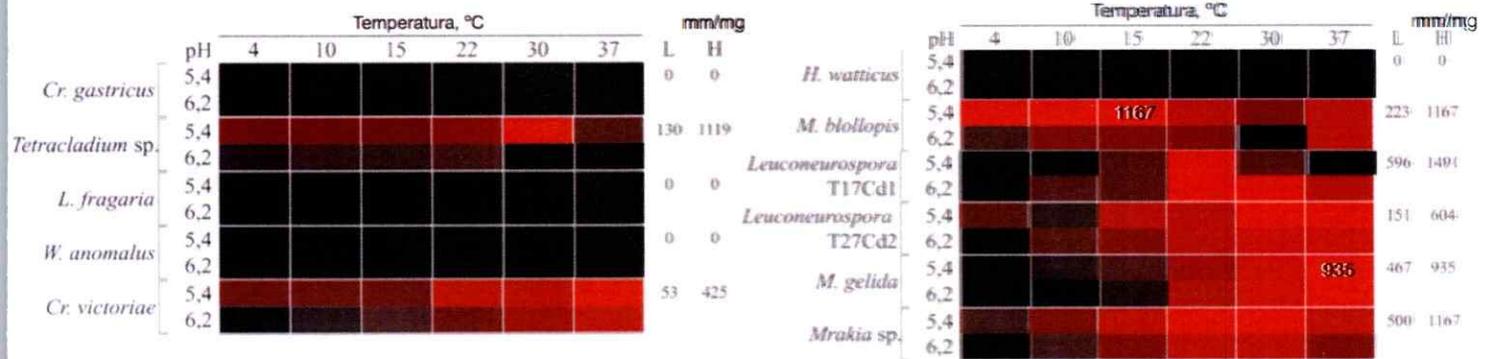
Las levaduras que poseen actividad amilasa o celulasa, detectadas previamente en ensayos de colonia (Carrasco y col., 2012) fueron crecidas en medio de cultivo líquido, y desde los sobrenadantes de estos cultivos se obtuvo las proteínas totales. Las actividades enzimáticas de las muestras se evaluaron a diferentes pH y temperaturas en ensayos en placa. Con estos experimentos se determinó que trece levaduras producen alguna amilasa extracelular, de las cuales tres son producidas por levaduras psicotolerantes y las restantes por levaduras psicrófilas. Por su parte, diez levaduras producen alguna celulasa extracelular, siendo cuatro producidas por levaduras psicotolerantes y seis por levaduras psicrófilas. Debido a que ambas actividades enzimáticas se detectaron en más de una levadura psicrófila y/o psicotolerante, es que se seleccionaron aquellas que presentaron los mayores halos para cada actividad enzimática. La mayoría de las muestras presentaron alta actividad amilasa a pH 5,4, y 6,2, y en el rango de temperatura de 30 °C a 37 °C (Figura 3). Para las levaduras psicotolerantes la mayor actividad amilasa se observó en las muestras de *Tetracladium* sp., mientras que desde las levaduras psicrófilas se observó la mayor actividad en las muestras obtenidas desde *D. fristingensis* T9Df1. En relación a los ensayos de actividad celulasa, esta actividad no pudo ser ensayada a un pH de 4,6 debido a que el medio suplementado con AS y agar no solidifica a este pH. La mayoría de las muestras presentaron alta actividad celulasa a pH 5,4, y en el rango de temperatura de 30 °C a 37 °C (Figura 4). Como se muestra en la Figura 4A la mayor actividad celulasa en las levaduras psicotolerantes se observó en las muestras de *Tetracladium* sp. (pH 5,4; 30 °C), mientras que la mayor actividad celulasa en levaduras psicrófilas corresponde a las muestras de la levadura *Leuconeuropsora* sp. T17Cd1 (pH 6,2, y 22-30 °C).



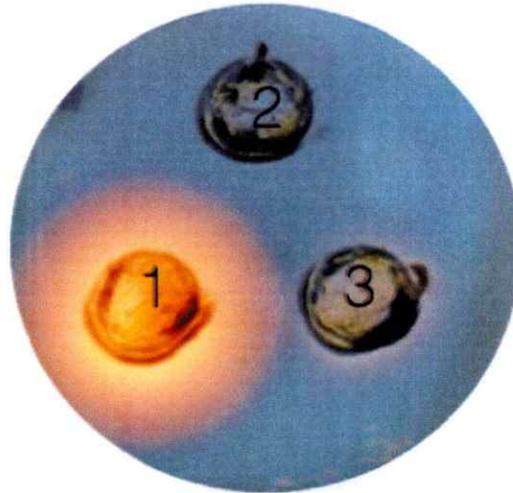
**Figura 3.** Actividad amilasa de los extractos proteicos extracelulares. Las proteínas totales fueron obtenidas desde sobrenadantes libres de células de levaduras psicotolerantes (A) o psicrófilas (B), las cuales fueron cultivadas en medio YM suplementado con glucosa. La actividad amilasa se evaluó mediante el método de ensayo en placa, a diferentes pH y temperaturas, y normalizados por la cantidad total de proteína. La escala de color indicada en la figura representa los valores de actividad enzimática más bajos (L, Negro), hasta los mayores (H, Rojo). Adaptado desde Carrasco y cols., 2016. Las unidades de actividad enzimática se indican como el cociente entre el radio del halo en mm y la masa de proteína agregada en mg. En (C) se muestra un ensayo en placa, en donde los número 4, 5, 6 y 7 representan diferentes muestras de proteínas evaluadas.

A.

B.



C.



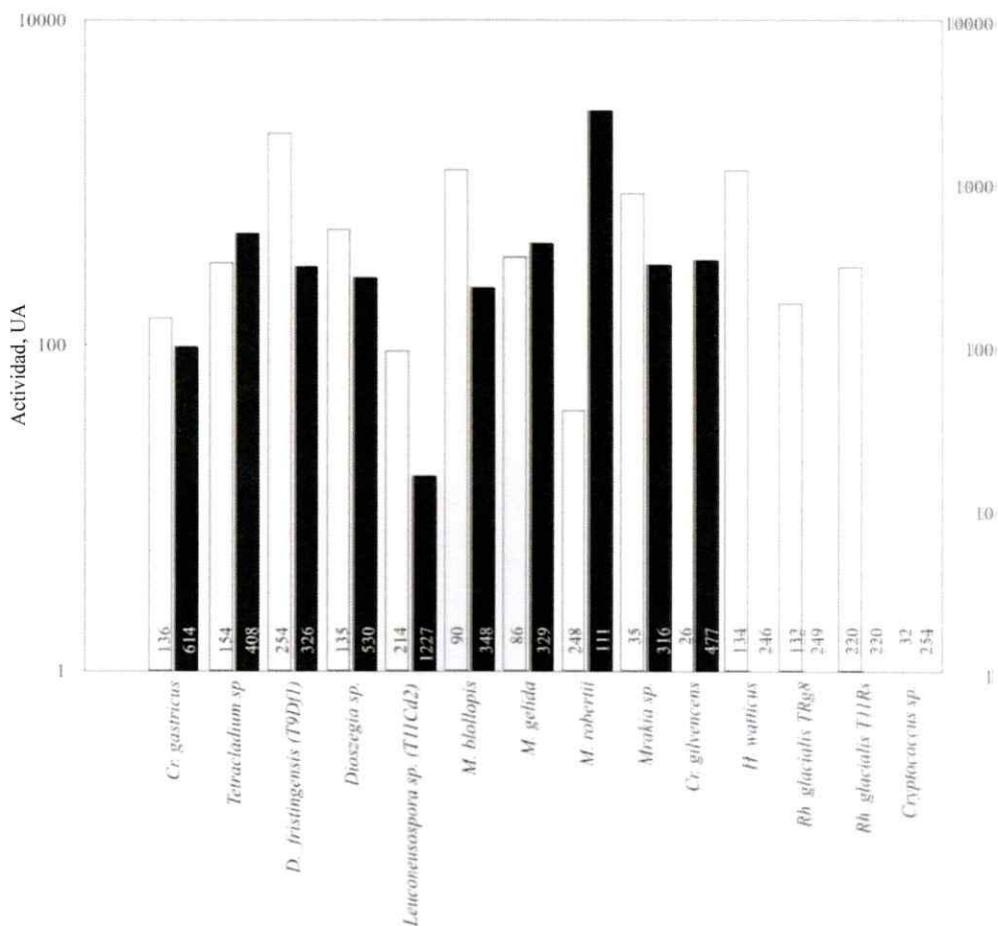
**Figura 4.** Actividad celulasa de los extractos proteicos extracelulares. Las proteínas totales fueron obtenidas desde sobrenadantes libres de células de levaduras psicotolerantes (A) o psicrófilas (B), las cuales fueron cultivadas en medio YM suplementado con glucosa. La actividad celulasa se evaluó mediante el método de ensayo en placa, a diferentes pH y temperaturas, y normalizados por la cantidad total de proteína. La escala de color indicada en la figura representa los valores de actividad enzimática más bajos (L, Negro), hasta los mayores (H, Rojo) evaluados desde los sobrenadantes de cultivos de las especies de levaduras. Las unidades de actividad enzimática se indican como el cociente entre el radio del halo en mm y la masa de proteína agregada en mg. En (C) se muestra un ensayo en placa, en donde los número 1, 2 y 3 representan diferentes muestras de proteínas evaluadas. Adaptado desde Carrasco y cols., 2016

Sin embargo, aunque el halo observado para *Leuconeuropsora* sp. T17Cd1 fue el mayor, también fue uno de los más tenues. Es por esto que se seleccionó a la celulasa producida por levadura psicrófila *M. gelida* para futuras caracterizaciones ya que presentó el halo más nítido dentro de todas las muestras evaluadas.

De acuerdo con esto se seleccionaron las amilasas producidas por *Tetracladium* sp. (psicrotolerante) y por *D. fristingensis* T9Df1 (psicrófila), y las celulasas producidas por *Tetracladium* sp. (psicrotolerante) y por *M. gelida* (psicrófila).

#### **Efecto del sustrato en la producción de amilasas y celulasas por levaduras psicrófilas y psicrotolerantes.**

Un resultado interesante fue que no se observó actividad amilasa en las muestras provenientes desde las levaduras *Cryptococcus* sp. y *Cr. gilvencens* (ahora *Goffeauzyma gilvencens*), ni actividad celulasa en las muestras obtenidas desde la levadura *Cr. gastricus*, *Holtermanniella watticus*, *Leucosporidiella fragaria* (ahora *Leucosporidium fragarium*) y *W. anomalus*, levaduras que habían presentado la respectiva actividad en ensayos en colonia. En dichos ensayos se observa directamente la hidrólisis de AS o CMC, razón por la cual es poco probable la obtención de falsos positivos. A diferencia de los ensayos en placa, los medios líquidos no fueron suplementados con dichos sustratos. Para evaluar si la producción de amilasas y celulasas por las levaduras requieren la presencia del respectivo sustrato, estas se crecieron en medio YM suplementado con AS o CMC. En la Figura 5 se muestra las actividades enzimáticas amilasas de las muestras de proteínas desde las levaduras cultivadas en medio suplementado con glucosa, o AS, evaluadas al pH y temperatura a los cuales presentaron la mayor actividad en cada caso. Se observó un efecto inductor de AS en la producción de la actividad amilasa en 4 especies de levaduras, más notoriamente en las levaduras *G. gilvencens* y *M. robertii*. En otras especies, la actividad amilasa fue mayor en las levaduras cultivadas en medio suplementado con glucosa en relación al medio suplementado con AS.



**Figura 5.** Comparación de las actividades amilasas extracelulares desde muestras suplementadas con diferentes fuentes de carbono. Muestras de proteínas fueron obtenidas desde cultivos de levaduras en medio YM suplementado con glucosa, YM-G (columnas blancas) o AS, YM-AS (columnas negras). La actividad amilasa fue evaluada y normalizada por la concentración total de proteína utilizada ( $\mu\text{g}$ ) utilizada en este ensayo, la cual es indicada en cada columna.

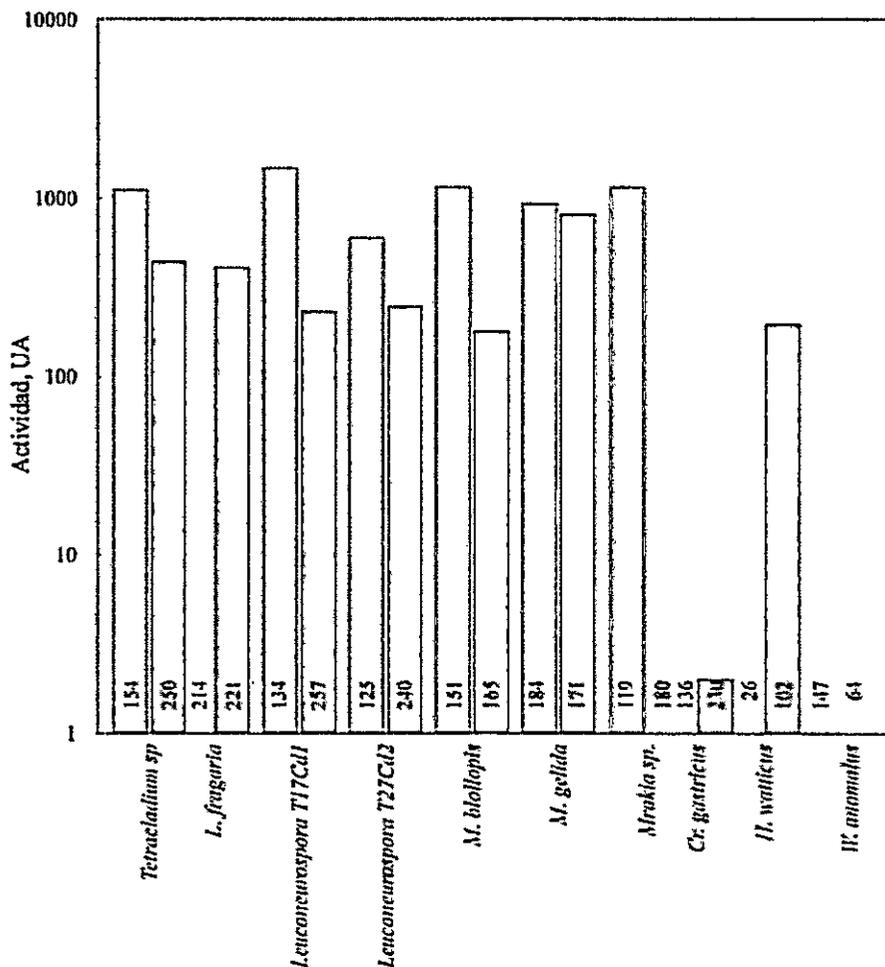


Para la levadura *Cryptococcus* sp. no se observó actividad amilasa en los extractos proteicos obtenidos desde los cultivos crecidos en ambas condiciones. En los análisis realizados para las actividades celulasas (Figura 6), un efecto inductor de la CMC fue observado para *Cr. gastricus* (ahora *Goffeauzyma gastrica*), *H. waticus* y *Le. fragaria*, mientras que en las muestras desde otras especies se observó las mayores actividades celulasas cuando las levaduras fueron cultivadas en medios suplementados con glucosa. Como se indica en cada columna de las Figuras 5 y 6 para la mayoría de las especies de levaduras, la cantidad de proteínas totales fueron mayores en las muestras desde cultivos suplementados con AS o CMC en comparación a los cultivos con glucosa. Sin embargo, el incremento en el contenido proteico no se correlacionó con un incremento de las actividades amilasas o celulasas en las muestras. Aunque *Cryptococcus* sp. y *W. anomalus* presentaron actividad enzimática, amilasa y celulasa respectivamente, en ensayos de colonia, las actividades no fueron detectadas en las muestras de proteínas extracelulares desde cultivos de las levaduras en ninguna de las condiciones usadas.

#### ***Cryptococcus* sp. y *W. anomalus* asimilan AS y CMC, respectivamente.**

La pregunta que surge desde los resultados anteriores es si realmente las levaduras son capaces de utilizar los sustratos como fuente de carbono. Es por esto que se evaluó el crecimiento de las levaduras en medio mínimo (YNB) suplementado con AS o CMC como única fuente de carbono. Como se observa en la Figura 5, ambas levaduras fueron capaces de crecer en un medio mínimo suplementado solo con AS o CMC. Tenido en cuenta los resultados, una posibilidad es que las correspondientes enzimas están ancladas a membrana, como ha sido descrito para otras enzimas en dos especies de *Aspergillus* (Van Dyk y Pletschke, 2012). En cuanto a los resultados obtenidos para las restantes levaduras se observó la mayor producción de biomasa en medio suplementado con 2 % de AS, excepto *Cr. gilvescens* y *Rh. glacialis* B19 las que alcanzaron la mayor biomasa a 0.5-1 % y 1 % de AS, respectivamente (Anexo 4). Con respecto a la utilización de CMC, la mayoría alcanzó la mayor biomasa cuando estas fueron

crecidas con 2 % de CMC, con la excepción de *Leuconeuospora* sp., T27Cd2 la cual alcanzó su mayor biomasa cuando fue crecida con 0,5 % CMC (Anexo 4).



**Figura 6.** Comparación de las actividades celulasas extracelulares desde muestras suplementadas con diferentes fuentes de carbono. Muestras de proteínas fueron obtenidas desde cultivos de levaduras en medio YM suplementado con glucosa, YM-G (columnas blancas) o CMC, YM-CMC (columnas grises). La actividad celulasa fue evaluada y normalizada por la concentración total de proteína utilizada (µg) utilizada en este ensayo, la cual es indicada en cada columna.

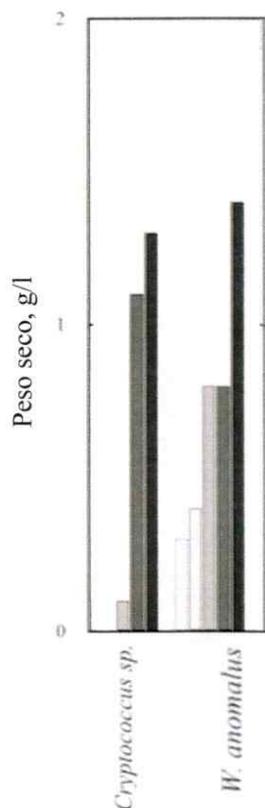
Es importante mencionar que la concentración de 2 % de cada compuesto es la mayor a la que fue posible realizar los estudios, ya que a concentraciones mayores la viscosidad del medio es muy alta. La capacidad de las levaduras para fermentar ambos compuestos fue evaluada mediante el método de Durham y cuantificación de etanol en el medio. Ninguna de las levaduras analizadas fue capaz de fermentar AS o CMC (datos no mostrados). Con fines comparativos se realizaron fermentaciones utilizando glucosa como fuente de carbono, en donde se observó la fermentación de esta azúcar en las levaduras *C. sake*, *M. blollopis*, *M. gelida*, y *W. anomalus*. Tomando en consideración estos resultados, es posible sugerir que las especies de levaduras analizadas fueron capaces de asimilar AS y/o CMS, pero no son capaces de fermentar estos compuestos, a las concentraciones ensayadas.

**Objetivo 2. Purificar e identificar las enzimas amilasas y celulasas desde levaduras psicrófilas y psicrotolerantes.**

#### **Parte I: Selección del medio de cultivo y condiciones de crecimiento**

Las levaduras productoras de amilasas extracelulares seleccionadas (*Tetracladium* sp. y *D. fristingensis* T9Df1) se crecieron en medio líquido YM suplementado con glucosa o AS, mientras que las levaduras productoras de celulasas (*Tetracladium* sp. y *M.gelida*) se crecieron en medio líquido YM suplementado con glucosa o CMC. Se realizaron curvas de crecimiento en donde se determinó las actividades enzimáticas, el perfil proteico de las alícuotas colectadas, y con los datos obtenidos se estimaron las tasas de crecimiento ( $\mu$ ) y los respectivos tiempos generacionales ( $t_g$ ) utilizando el modelo de Gompertz (Zwietering y col., 1990). Como se muestra en la figura 7A, *Tetracladium* sp. poseería una fase de latencia más larga en el medio YM-S en comparación al medio YM-G, pero en fase estacionaria de crecimiento se alcanza la misma densidad óptica en ambas condiciones. Los valores de  $\mu$  y  $t_g$  obtenidos para *Tetracladium* sp. en glucosa fueron  $0,186 \text{ h}^{-1}$  y 5.4 h, mientras que los valores obtenidos en AS

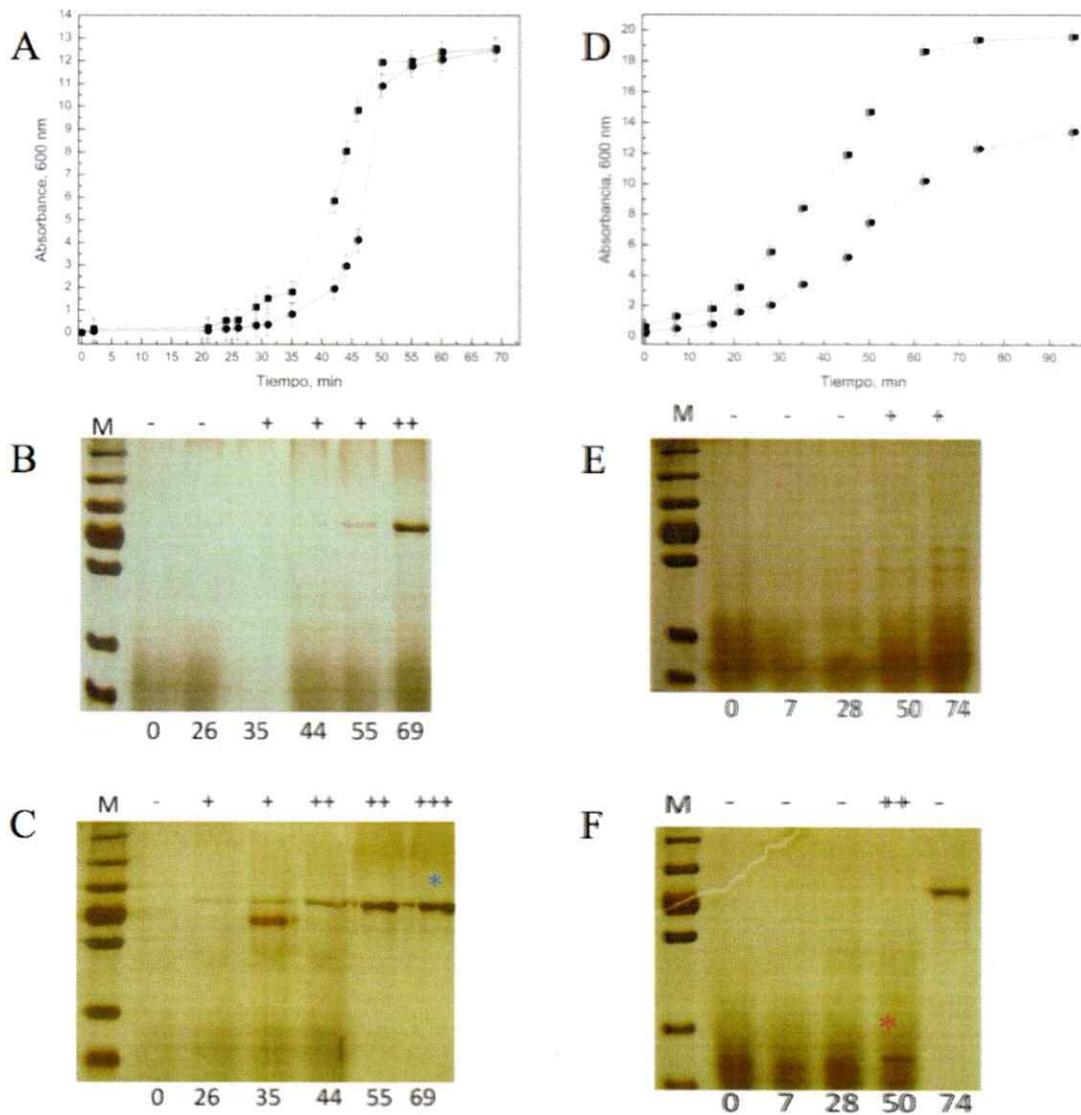
0.125 0.25 0.5 1 2 % p/v



fueron  $0,23 \text{ h}^{-1}$  y 4.4 h. Estos resultados sugieren que *Tetracladium sp.* crecería levemente mejor en AS.

**Figura 7.** La biomasa alcanzada por las levaduras cultivadas con AS o CMC como fuentes de carbono únicas. *Cryptococcus sp.* y *W.anomalus* levaduras fueron cultivadas en medio mínimo YNB suplementado con AS o CMC, respectivamente, hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. La concentración (%p/v) de cada fuente de carbono es indicada en la parte superior de las gráficas. El crecimiento basal de las levaduras en el medio YNB sin la suplementación de ninguna fuente de carbono fue sustraída para cada condición. Adaptado desde Carrasco y cols., 2016.

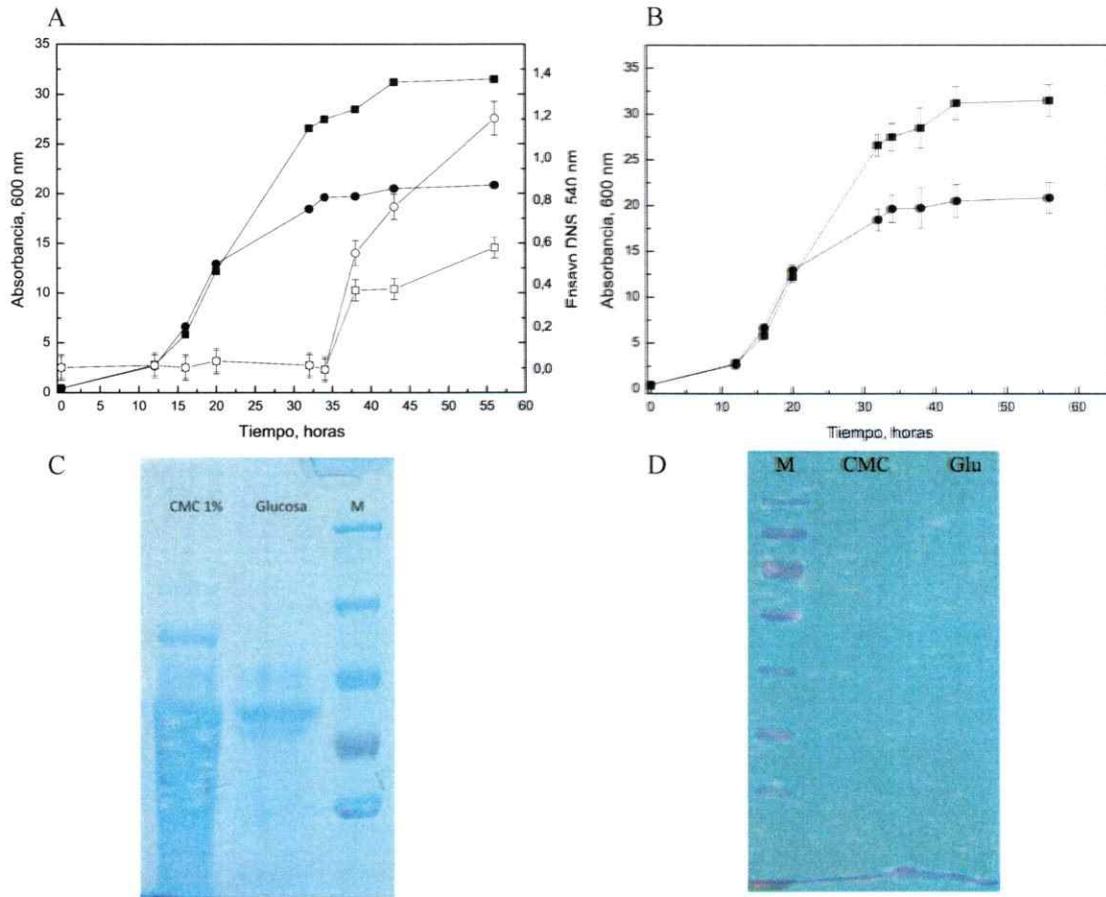




**Figura 8.** Curvas de crecimiento, perfiles de proteínas extracelulares y actividad amilasa a lo largo de la curva de crecimiento. *Tetracladium sp.* (A) y *D. fristingensis* T9Df1 (D) se cultivaron en medio YM suplementado con glucosa (cuadrados) o almidón soluble (círculos) y se siguió el crecimiento mediante lecturas de DO<sub>600</sub> nm. Muestras fueron tomadas a diferentes tiempos a lo largo de la curva de crecimiento para ambas levaduras y se determinaron los perfiles de proteínas a través de SDS-PAGE, y se tiñeron mediante tinción con plata. En (B) y (C) se muestra el perfil de proteínas extracelulares y la actividad amilasa de las muestras de *Tetracladium sp.* en glucosa y almidón soluble, respectivamente. En (E) y (F) se muestra el perfil de proteínas extracelulares y la actividad amilasa de las muestras de *D. fristingensis* T9Df1 en glucosa y almidón soluble, respectivamente. La actividad enzimática se determinó mediante el método del DNS, determinándose las máximas actividad amilasas para ambas levaduras en medio YM suplementado con AS. El asterisco celeste y rojo indican las bandas proteicas que se correlaciona con los mayores niveles de actividad encontrados para *Tetracladium sp.* (proteína de 80 kDa) y para *D. fristingensis* T9Df1 (proteína de 30 kDa).

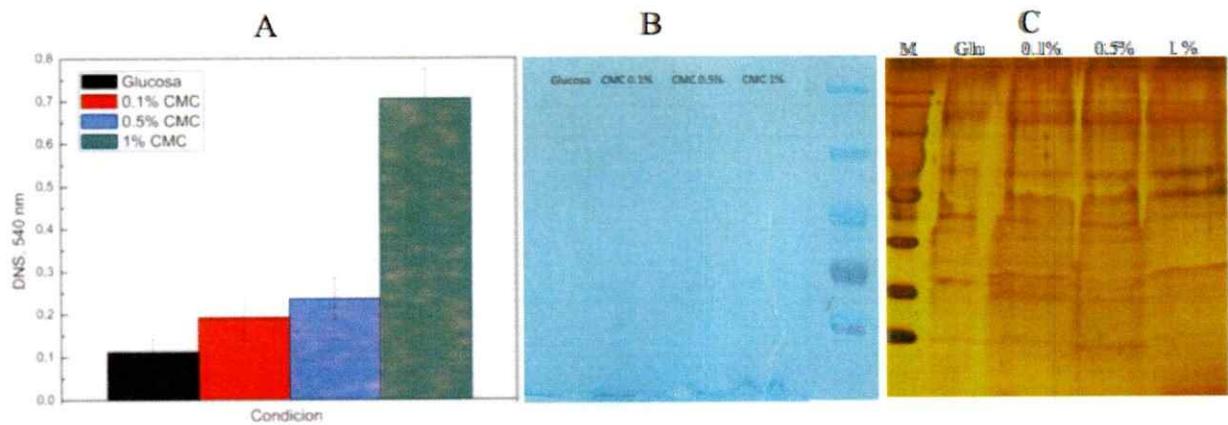
En los perfiles de proteínas extracelulares obtenidos para *Tetracladium* sp. en glucosa (Figura 8B) y AS (Figura 8C) se observa que durante la fase exponencial de crecimiento (aproximadamente 35 horas) comienza a aparecer una banda proteica de Mr 80.000, la cual alcanza su máximo de intensidad durante la fase estacionaria de crecimiento (60 horas). La intensidad de esta banda se correlaciona con los niveles de actividad amilasa determinados en cada punto (ver asteriscos en la Figura), siendo el máximo alcanzado a las 69 horas en medio suplementado con AS. En las curvas de crecimiento de *D. fristingensis* T9df1 (Figura 9D) en medio YM-G o AC a 15°C no se observó un crecimiento de tipo exponencial. Esto se confirmó mediante un ajuste lineal utilizando logaritmo natural, no observándose este tipo de relación entre la densidad óptica y el tiempo de la curva de crecimiento (datos no mostrados). Es por esta razón que no se obtuvo los parámetros cinéticos  $\mu$  y  $t_0$ . Sin embargo, en la Figura 9D se observa que la levadura alcanza una mayor densidad óptica en medio YM-G en comparación con YM-AS. Sin embargo, la actividad amilasa máxima determinada en YM-AS fue dos veces mayor en relación al medio YM-G (ver asterisco en figura 9F). Los perfiles extracelulares obtenidos para *D. fristingensis* T9DF1 en glucosa (figura 9E) y AS (Figura 6F) se correlacionan con la presencia de una proteína de aproximadamente 30 kDa. Es importante señalar que en los experimentos posteriores se cosecharon los sobrenadantes libres de células a las 50 horas de cultivo en medio suplementado con AS, ya que en tiempos posteriores se observa una disminución en la presencia de proteínas extracelulares concomitante con la pérdida de actividad enzimática.

No se logró obtener el perfil de proteínas de las muestras obtenidas de las curvas de crecimiento de las levaduras productoras de celulasas suplementadas con CMC, debido a que la viscosidad del medio de cultivo impidió la visualización de las proteínas presentes en las muestras. Como se observa en las Figuras 9A y 9B tanto *Tetracladium* sp como *M. gelida* no presentaron un crecimiento de tipo exponencial en glucosa y CMC. Sin embargo en dichas figuras se observa claramente que ambas levaduras alcanzan una mayor biomasa en medio YM suplementado con glucosa. Al analizar la actividad celulasa de *Tetracladium* sp. durante la curva de crecimiento en ambas fuentes de carbono, se observó que la mayor actividad se obtuvo en el medio YM suplementado con CMC durante la fase exponencial de crecimiento.



**Figura 9.** Curvas de crecimiento, actividad celulasa y perfiles de proteínas fraccionadas. *Tetracladium sp.* (A) y *M. gelida* (B) se cultivaron en medio YM suplementado con glucosa (cuadrados negros) o CMC (círculos negros) y se siguió el crecimiento mediante lecturas de  $DO_{600\text{ nm}}$ . Muestras fueron tomadas a diferentes tiempos a lo largo de la curva de crecimiento y se determinó la actividad celulasa de cada muestra para los extractos obtenidos en glucosa (cuadrados blancos) y con CMC (círculos blancos). En (C) y en (D) se muestran los perfiles de proteínas extracelulares de las proteínas presentes en la fracción 80 % de sulfato de amonio obtenido en cada condición para *Tetracladium sp.* y *M. gelida*, respectivamente.

Se determinó el perfil de actividad celulasa a lo largo de la curva de crecimiento en glucosa y CMC para *M. gelida* pero no se observó actividad en dichas muestras, lo cual probablemente se deba a la baja concentración de la enzima. En las Figuras 9C y 9D se muestran los perfiles de proteínas extracelulares de las fracciones de proteínas precipitadas con 80 % de sulfato de amonio, tanto para los cultivos obtenidos en YM-G y como en YM-C, para ambas levaduras. Para *Tetracladium* sp., se observó un incremento en la cantidad de proteínas extracelulares producidas en medio YM-C en relación al medio YM-G. Sin embargo, no se observan bandas definidas en los extractos de proteínas extracelulares de la levadura *M. gelida*, en ambos medios de cultivo (Figura 9D). Para evaluar si *M. gelida* producía una mayor cantidad de proteínas extracelulares en otras condiciones, se evaluó el crecimiento de esta levadura en un medio de cultivo suplementado con diferentes concentraciones de CMC (0.1 % p/v y 0.5 % p/v). Luego, en fase estacionaria de crecimiento se obtuvo las proteínas extracelulares totales. En la Figura 10A se muestran los resultados obtenidos de la actividad celulasa para las fracciones 80 % de sulfato de amonio obtenidas en cada condición, y como se puede observar la mayor actividad celulolítica se obtuvo cuando el cultivo se suplementó con 1 % CMC. Sin embargo, al igual que lo observado previamente no se observan bandas de proteínas definidas en los perfiles extracelulares (Figura 10B) en ninguna de las condiciones ensayadas. La detección de actividad celulasa en las fracciones es indicativo de la presencia de este tipo de enzimas, pero estas probablemente estarían poco concentradas y por lo tanto no se observan en la tinción con azul de Coomassie, razón por la cual fueron teñidas con nitrato de plata (Figura 10C). Sin embargo, se pudo correlacionar una banda proteica con la actividad celulasa observada en esta fracción. Por lo tanto, *M. gelida* secretaría una baja cantidad de proteínas, razón por la cual no se continuó con la caracterización de la celulasa desde esta levadura debido a las dificultades técnicas para obtener la enzima en cantidades y pureza necesarias para su correcta caracterización.

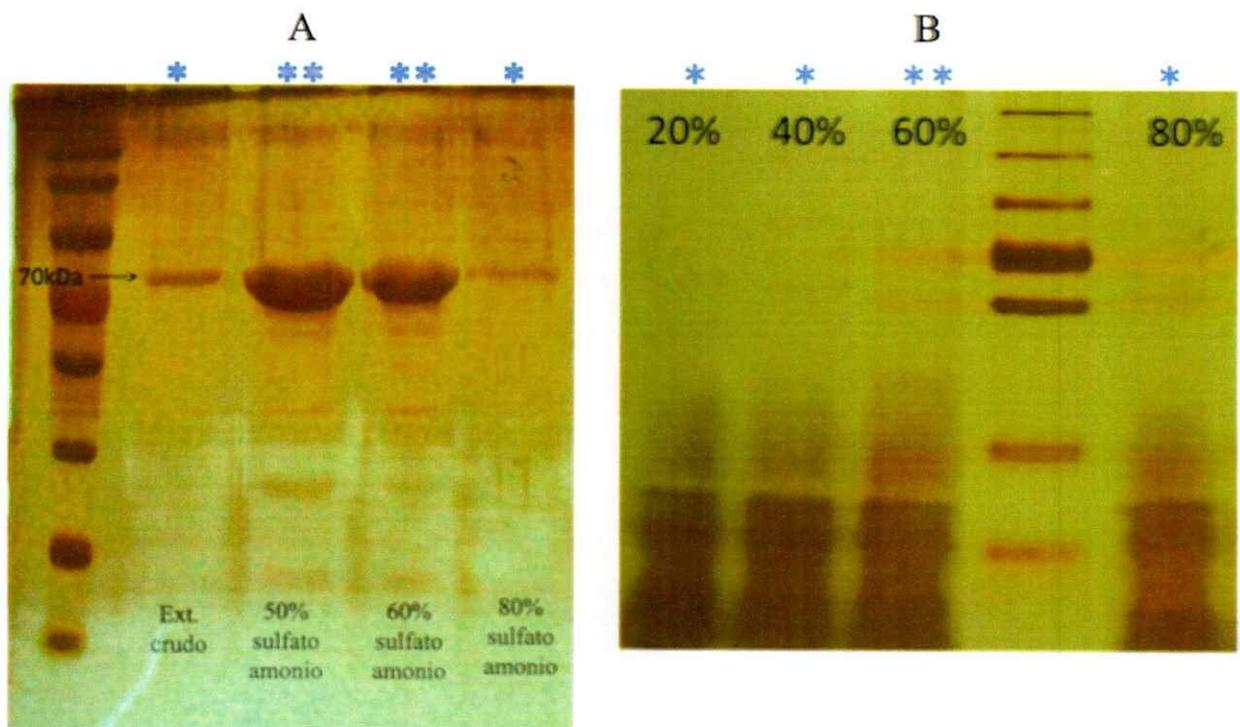


**Figura 10.** Perfil de proteínas y actividad celulasa de extractos proteicos extracelulares de *M.gelida* obtenidos en medios de cultivo YM suplementado con glucosa o con diferentes concentraciones de CMC. En (A) se muestra la actividad celulasa determinada mediante el método del DNS de las fracciones 80% sulfato de amonio obtenidas desde extractos proteicos extracelulares de *M.gelida* crecidos en glucosa, 0.1% CMC, 0.5% o 1% CMC y *M.gelida*. En (B) y (C) se muestran los perfiles de proteínas extracelulares de dichas fracciones, las que se tiñeron con azul de coomassie o tinción con plata, respectivamente.

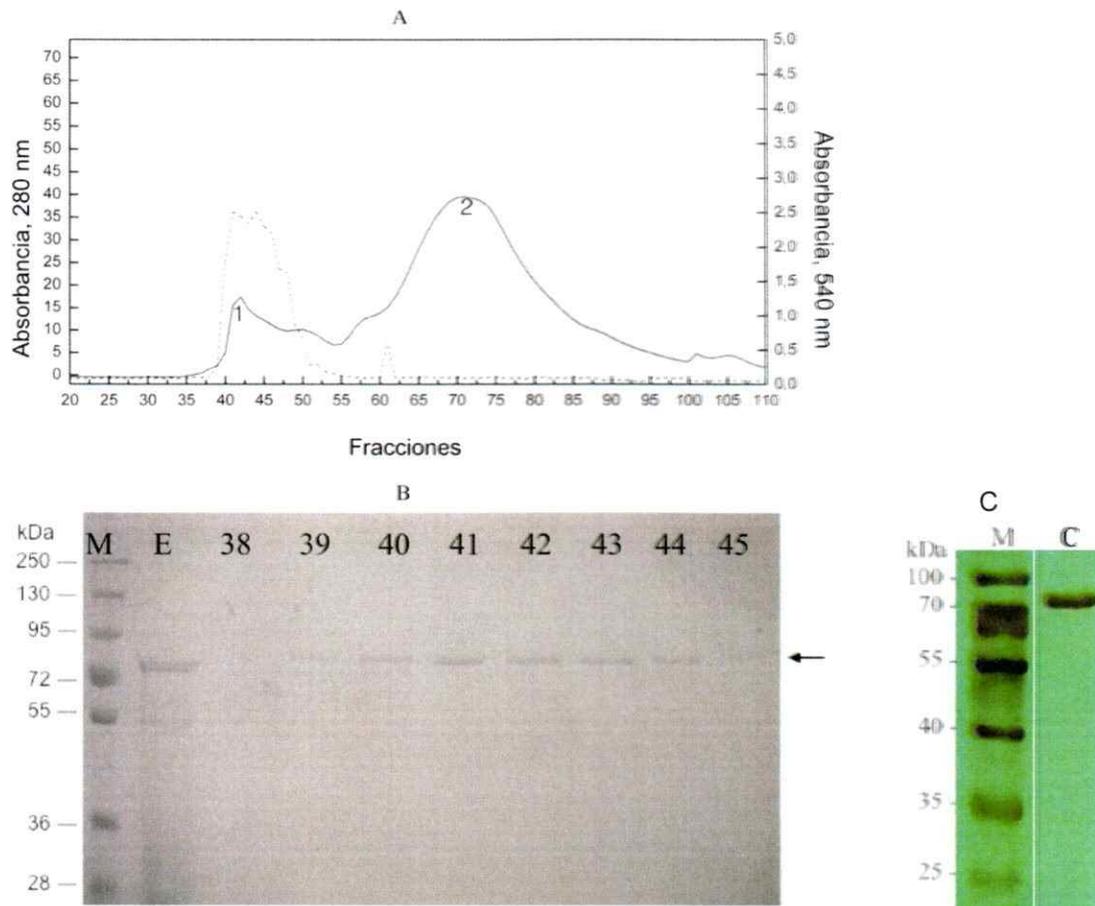
## Parte II: Purificación de las enzimas

Desde sobrenadantes de cultivos de *Tetracladium* sp. y *D. fristingensis* T9Df1 obtenidos en medio YM-S en fase estacionaria y exponencial de crecimiento, respectivamente, se realizó la precipitación fraccionada de las proteínas utilizando sulfato de amonio (20 a 80 % de saturación). Se realizó el mismo procedimiento con los sobrenadantes de cultivo de *Tetracladium* sp. obtenidos en fase exponencial en medio YM-C. Las actividades amilasas y celulasas se determinaron en cada fracción, revelando que la fracción obtenida con 60 % de sulfato de amonio fue la que presentó la mayor actividad amilasa en ambas levaduras analizadas (Figura 11), y la fracción 60 % también fue la que presentó la mayor actividad celulasa en las muestras obtenidas desde *Tetracladium* sp. (datos no mostrados). Es por esto que la precipitación de proteínas con dichas concentraciones de sal se utilizaron para los restantes experimentos.

Los extractos de proteínas obtenidos desde *Tetracladium* sp. (para actividad amilasa) se suspendieron en una solución amortiguadora fosfato de sodio 20 mM, pH 7.0 y 150 mM NaCl, mientras que los extractos obtenidos desde *D. fristingensis* T9Df1 y desde *Tetracladium* sp. (para actividad celulasa) se suspendieron en una solución amortiguadora fosfato de sodio 20 mM y pH 7.0. Dichas muestras se dializaron contra las mismas soluciones amortiguadoras a través de una columna HiTrap Desalting (General Electric). Para la purificación de la amilasa de *Tetracladium* sp. en una primera instancia se utilizó cromatografía de intercambio aniónico y catiónico, usando distintos buffers, resinas y pHs, sin embargo, no se logró obtener la enzima pura, por lo cual se optó por filtración en gel. Los resultados obtenidos para la purificación de la amilasa de *Tetracladium* sp, se muestran en la Figura 12, observándose dos picos proteicos en el cromatograma de los cuales la actividad amilasa fue detectada en el pico 1 (fracciones 40 a la 50). Al analizar el perfil proteico de estas fracciones se desprende que la actividad amilasa detectada se correlaciona con la presencia de una sola banda proteica de Mr 80.000.



**Figura 11.** Perfiles de proteínas extracelulares y actividad amilasa de las distintas fracciones de proteínas. Los extractos de proteínas extracelulares obtenidos desde cultiv utilizando desde un 20 % a 80 % de esta sal. En esta figura se muestran las fracciones 50 %, 60 % y 80 % para los *Tetracladium sp.* (A) y para *D. fristingensis T9Df1* (B) las cuales presentaron actividad enzimática. Los niveles de actividad enzimática encontrados se representan mediante \*.

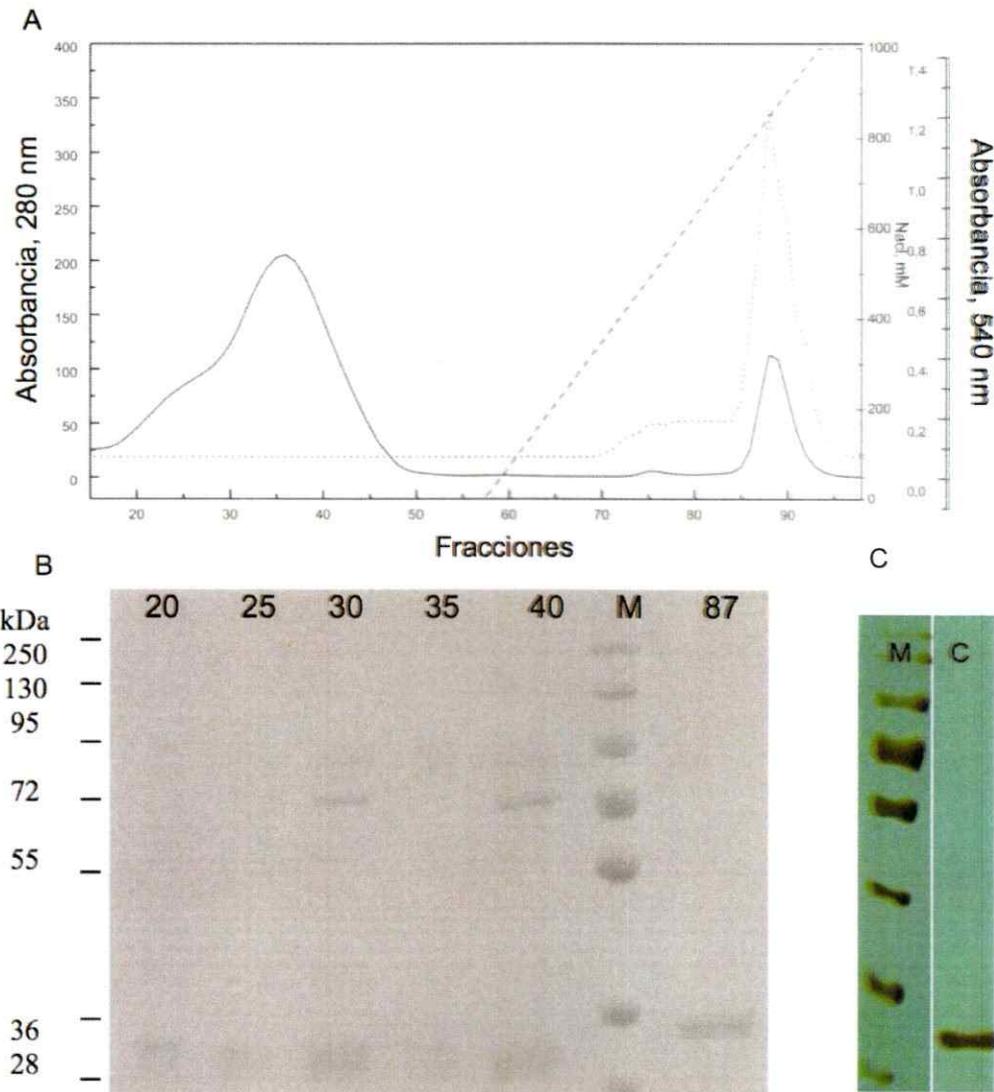


**Figura 12.** Purificación de la enzima amilasa de *Tetracladium* sp. a través de filtración en gel. (A) Se cargaron 1,5 mg de proteína en una columna Superdex 75 10/300 GL equilibrada previamente con una solución amortiguadora fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0 y 150 mM NaCl, con un flujo de 0,2 ml/min. Los valores de absorbancia a 280 nm (línea continua) y la actividad amilasa (línea punteada), fueron cuantificados. (B) El análisis de SDS-PAGE muestra las fracciones activas (líneas 38 a 45). En (C) se cargó la proteína glucoamilasa concentrada, y se tiñó mediante nitrato de plata. M: Marcador de proteínas; E: muestra de precipitación con 80 % sulfato de amonio; C: proteína purificada concentrada. La amilasa identificada es indicada con la flecha.

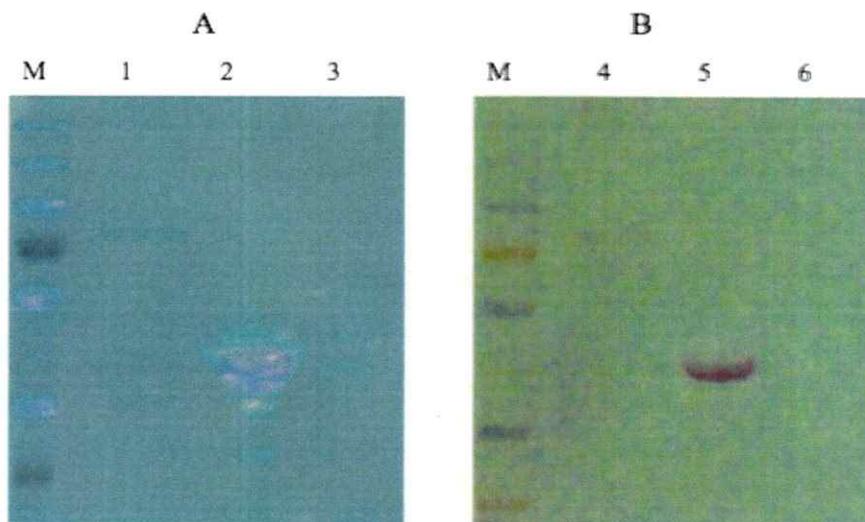
La amilasa de la levadura *D. fristingensis* T9Df1 fue purificada mediante cromatografía de intercambio catiónico, observándose dos picos proteicos en el cromatograma (Figura 13), detectándose la actividad amilasa sólo en el 2 (fracciones 85 a 93, elución a aproximadamente a 500 mM NaCl), que se correlaciona con la presencia de una banda proteica de Mr 30.000. La purificación para ambas enzimas se realizó de forma rutinaria en varias ocasiones, obteniéndose los mismos resultados. La amilasa secretada por *Tetracladium* sp. corresponde a una enzima glicosilada (Figura 14), contrario a la amilasa secretada por *D. fristingensis* T9Df1 (Figura 15).

En la Figura 14 se muestra el cromatograma para la purificación de la celulasa de *Tetracladium* sp. mediante cromatografía de intercambio catiónico, observándose un único pico de proteínas en el cual se detectó la actividad celulasa (fracción 82, elución a aproximadamente 300 mM NaCl). En el análisis del perfil proteico de la fracción 82 se observaron al menos 5 bandas proteicas (Figura 14B). Se modificó el protocolo de purificación utilizando diferentes gradientes de NaCl y distintos amortiguadores, pero la purificación que se muestra en esta figura corresponde al mejor resultado obtenido. Mediante de filtración en gel (Figura 15A), la actividad celulasa detectada desde la fracción 80 hasta la fracción 100 y se correlacionó con dos probables proteínas. No se logró separar ambas proteínas, no obstante del análisis de los resultados de ambas purificaciones (Figuras 14 y 15), se puede sugerir que la actividad celulolítica estaría relacionada, con la proteína de Mr. 79.000

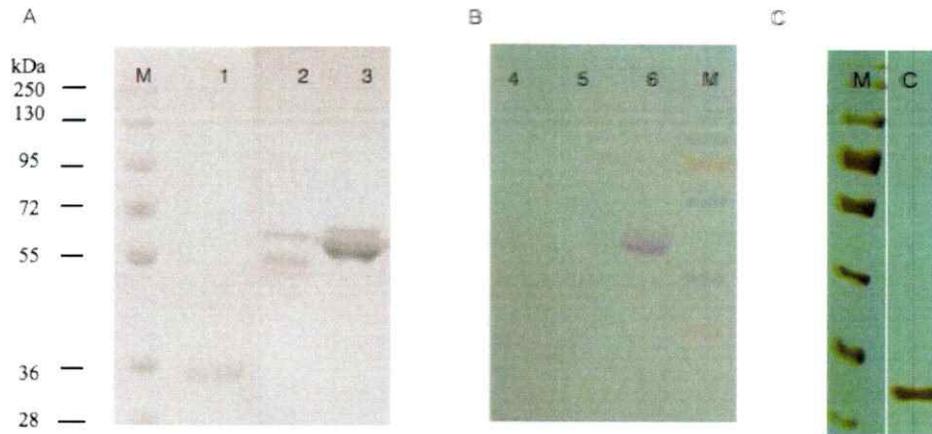
. Llama la atención que dos proteínas con diferencia de tamaño de 50 kDa no se lograran separar por filtración en gel, tras varios intentos. En consecuencia, todas las caracterizaciones que se realizaron para la actividad celulolítica de *Tetracladium* sp. que se muestran más adelante se realizaron considerando que la enzima celulasa no correspondería a un enzima monómerica.



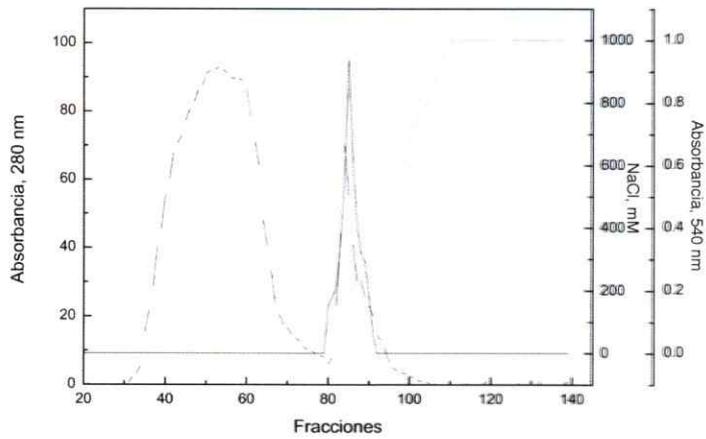
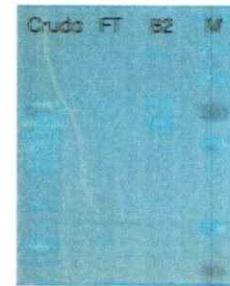
**Figura 13.** Purificación de la enzima amilasa de *D. fristingensis* T9Df1 a través de intercambio catiónico. (A) Se cargaron 1,5 mg de proteína en una columna SP FF 16/10 GL equilibrada previamente con una solución amortiguadora fosfato de sodio 20 mM y pH 7,0, con un flujo de 1,0 ml/min. Las proteínas unidas a la columna fueron eluidas con un gradiente de NaCl de 50 ml desde 0 hasta 1 M. Los valores de absorbancia a 280 nm (línea continua), la actividad amilasa (línea punteada) y gradiente iónico (línea discontinua), fueron cuantificados. (B) El análisis de SDS-PAGE muestra fracciones representativas del pico 1 (20, 25, 30, 35 y 40) y del pico 2 (87). En (C) se cargó amilasa de *D. fristingensis* T9Df1 concentrada, y se tiñó mediante nitrato de plata. M: Marcador de proteínas; E: muestra de precipitación con 80 % sulfato de amonio; C: proteínas purificada concentrada. La amilasa identificada es indicada con la flecha.



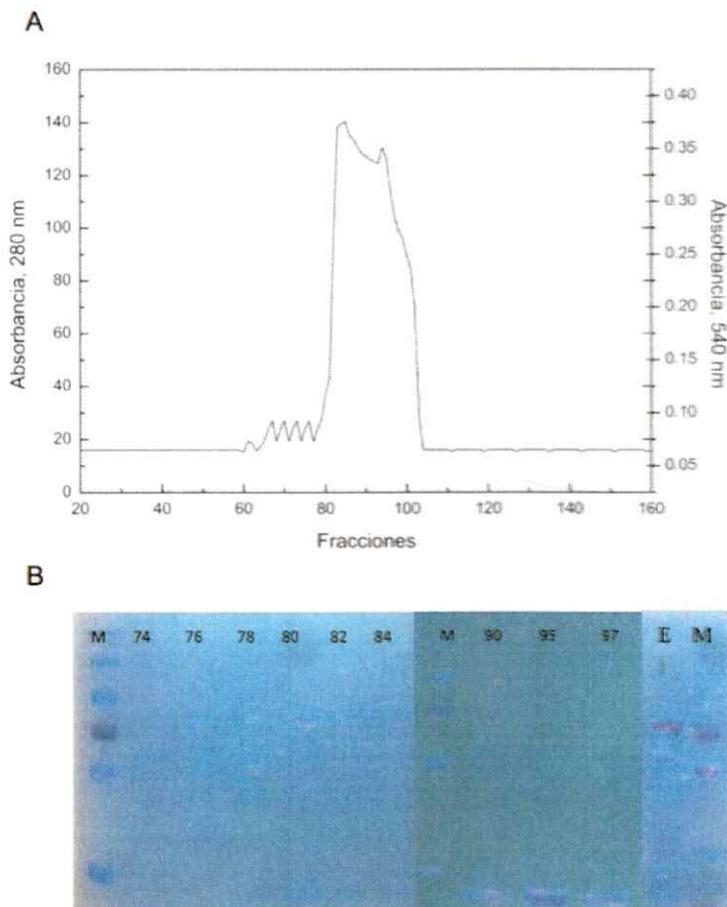
**Figura 14.** Análisis de SDS-PAGE y de presencia de glicosilación de la glucoamilasa purificada. (A) y (B) muestran geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie o con un kit de tinción de proteínas, respectivamente. En Los carriles 1 y 4 se cargó la glucoamilasa de *Tetracladium* sp.; carriles 2 y 5, una glicoproteína de rabano picante (control positivo); y en los carriles 3 y 6 la proteína inhibidora de tripsina de frijol (control negativo).



**Figura 15.** Análisis de SDS-PAGE y de presencia de glicosilación de la amilasa purificada de *D. fristingensis* T9Df1. (A) y (B) muestran geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie o con un kit de tinción de proteínas, respectivamente. En Los carriles 1 y 4 se cargó la amilasa de *D. fristingensis* T9Df1.; carriles 3 y 6, una glicoproteína de rábano picante (control positivo); y en los carriles 2 y 5 la proteína inhibidora de tripsina de frijol (control negativo).

**A****B**

**Figura 16.** Purificación de la celulasa de *Tetracladium sp.* a través de intercambio catiónico. (A) Muestras de proteínas fueron cargadas en una columna SP FF 16/10 GL equilibrada previamente con una solución amortiguadora fosfato de sodio 20 mM y pH 7,0, con un flujo de 1,0 ml/min. Las proteínas unidas a la columna fueron eluidas con un gradiente de NaCl de 50 ml desde 0 hasta 1000 mM. Los valores de absorbancia a 280 nm (línea discontinua), la actividad amilasa (línea continua) y gradiente iónico (línea punteada), fueron cuantificados. (B) El análisis de SDS-PAGE indica las muestras representativas de la purificación M: Marcador de proteínas. Crudo: Extracto de proteínas cargado en la columna; FT: Proteínas no unidas a la resina; 82: Fracción 82.



**Figura 17.** Purificación de la celulasa de *Tetracladium sp.* a través de filtración en gel. (A) Muestras de proteínas fueron cargadas en una columna Superdex 200 10/300 GL equilibrada previamente con una solución amortiguadora fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0 y 150 mM NaCl, con un flujo de 0,2 ml/min. Los valores de absorbancia a 280 nm (línea discontinua) y la actividad amilasa (línea continua), fueron cuantificados. (B) El análisis de SDS-PAGE muestra las fracciones representativas de la purificación (líneas 74, 78, 80, 82, 84, 90, 95 y 97). M: Marcador de proteínas; E: muestra de precipitación con 80% sulfato de amonio.



### Parte III: Identificación de las enzimas

Las amilasas purificadas y la celulasa parcialmente purificada fueron liofilizadas y enviadas al servicio de espectrometría de masas del Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA, Valencia, España). A través del servicio de huella peptídica se logró obtener péptidos correspondientes a la enzima amilasa de *Tetracladium sp.*, (Tabla 7). Como se observa en dicha tabla, dichos péptidos presentaron similitud con secuencias aminoacídicas pertenecientes a un precursor de la glucoamilasa del hongo *A. terreus*.

Tabla N° 7. Péptidos identificados mediante el análisis de huella peptídica de la amilasa de *Tetracladium sp.*

Péptido	Identificación	Similitud
ALVEGSTFASKV GASC SWCDSQAPQV LCFLQR	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624 glucoamilase precursor (XM_001213553.1)	32/32(100%)
CDSQAPQVLCFLQR	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624 glucoamilase precursor (XM_001213553.1)	14/14(100%)

\* Hubo más péptidos identificados en el análisis pero estos eran fragmentos de los dos péptidos que se muestran aquí.

En estudios paralelos, que no son objetivo de esta tesis, se logró secuenciar el genoma de *Tetracladium sp.*, y además se obtuvo el transcriptoma de este hongo crecido en almidón y en glucosa como fuentes de carbono única. Utilizando esta aproximación se obtuvo un modelo de genes para los transcritos expresados en esta condición y también se identificó el proteoma *in silico* de este hongo en dicha fuente de carbono. Se identificaron 3 amilasas dentro del genoma de este hongo, dos  $\alpha$ -amilasas y una glucoamilasa (Tabla 8).

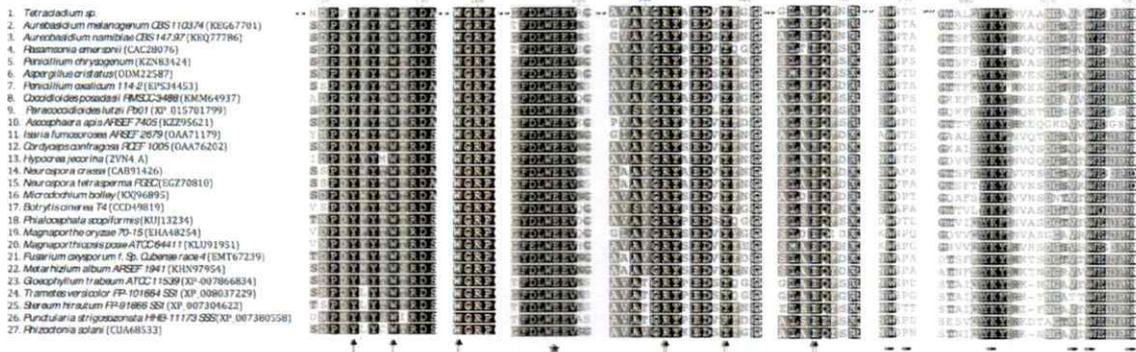
Tabla 8. Expresión de los genes de las amilasas putativas de *Tetracladium* sp. en medios suplementados con glucosa o AS, como única fuente de carbono.

Gen putativo	Tipo de amilasa	Glucosa*	AS*
1.g909.t1	Glucoamilasa	1545	1722
0.g2254.t1	$\alpha$ -amilasa	122	184
2.g884.t1	$\alpha$ -amilasa	76	7

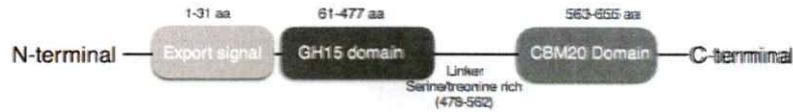
\*, valores de FPKM en cada condición.

Los péptidos identificados en el análisis de huella peptídica se buscaron en las secuencias aminoacídicas de las tres proteínas predichas que eran codificadas por estos genes putativos, y se encontró que estos pertenecían a la única glucoamilasa presente en el genoma. Además, se comprobó que el que codifica para esta glucoamilasa tiene una expresión ligeramente mayor cuando es adicionado AS como fuente de carbono única, en relación al medio con glucosa. Por lo tanto, corroboramos los estudios funcionales que se han descrito previamente. Con esta estrategia además, se logró determinar la secuencia aminoacídica completa de esta proteína, la cual se sometió a búsqueda de regiones conservadas descritas en otras glucoamilasas de hongos. En la Figura 18A se muestra la organización de esta proteína, la cual posee un dominio catalítico GH15 que es conservado en todas las glucoamilasas y un dominio CBM20 el cual participa en la unión a la molécula de almidón (Figura 18B). Un aspecto que diferencia de ésta glucoamilasa con respecto a las depositadas en las base de datos, es el largo del “enlazador” que une a ambos dominios (GH15 y CBM20) el cual posee 84 aminoácidos.

A



B



**Figura 18.** Regiones conservadas de glucoamilasas de hongos. (A) Se realizó una comparación entre las secuencias aminoácidas de las glucoamilasas de diferentes hongos depositadas en la base de datos del NCBI. Los aminoácidos del sitio activo involucrados en la unión al sustrato están indicados con flechas negras, y el \* muestra los aminoácidos que están involucrados en la catálisis basado en reportes previos para otras glucoamilasas. El signo - representa los residuos conservados que están involucrados en la unión del dominio CBM20 a las moléculas de almidón. (B) Representación esquemática de la predicción de la estructura de la glucoamilasa de este trabajo. En este dibujo está representado el péptido de señal, el dominio GH15 y el dominio CBM20 unidos a través de un espaciador.

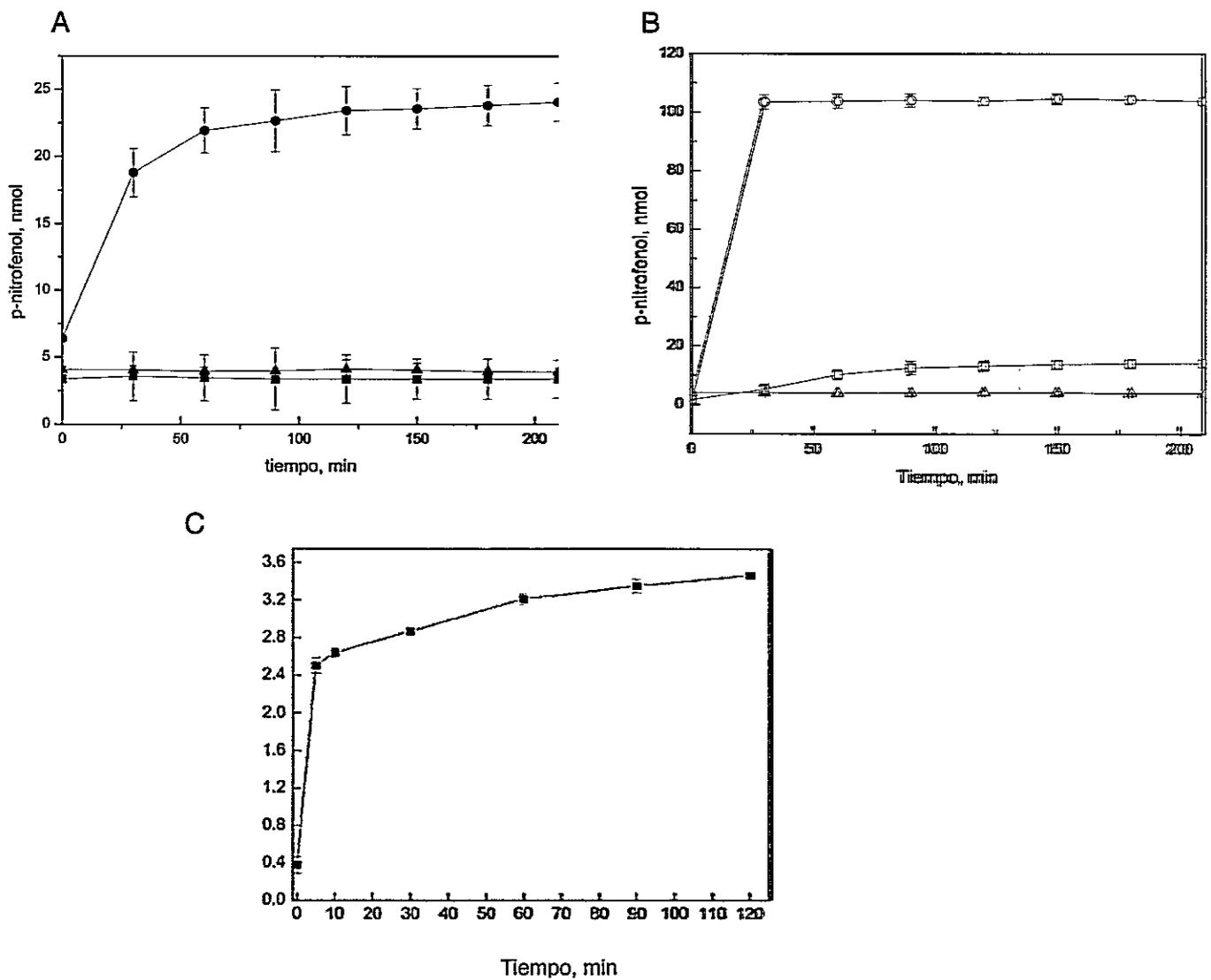
En la mayoría de las glucoamilasas reportadas la extensión promedio de este enlazador es de 30 aminoácidos, y la máxima extensión reportada corresponde al enlazador de la glucoamilasa de *Aspergillus terreus* de 70 aminoácidos. Se ha reportado que esta región le confiere flexibilidad a la estructura de la proteína y contribuye a la catálisis ya que esta región es la encargada de poner en proximidad el dominio catalítico GH15 con el dominio CBM20. Los análisis de huella peptídica para la amilasa de *D. fristingensis* T9Df1 y para la celulasa de *Tetracladium* sp. (datos no mostrados), fueron realizados, sin embargo no se obtuvo ningún péptido que hiciera "match" con alguna enzima amilasa depositada en la base de datos o en los genomas disponibles en el laboratorio.

### **Objetivo 3. Determinar las condiciones óptimas de actividad enzimática y la estabilidad de las enzimas amilasas y celulasas purificadas**

El peso molecular predicho desde la secuencia traducida del CDS de la glucoamilasa de *Tetracladium* sp. es de 66.000, mientras la masa determinada a través de migración relativa en condiciones denaturantes (SDS-PAGE) y en condiciones nativas (filtración en gel) se estimó en 84.000 y 80.000, respectivamente. Aunque no se disponía de las masas teóricas de la amilasa de *D. fristingensis* T9Df1 y de la celulasa de *Tetracladium* sp. se realizó la caracterización de sus masas en condiciones denaturantes y nativas. Para la amilasa se determinó una masa de 33.000 y 32.000 en condiciones desnaturalantes y nativas, respectivamente. El análisis realizado para las dos proteínas presentes en la fracción 82 de la celulasa indica que la proteína grande y pequeña poseen masas teóricas en condiciones desnaturalantes de 79.000 y 35.000 kDa, respectivamente. Las proteínas no se lograron separar en condiciones nativas, confirmando su naturaleza heterodimérica. Estos resultados sugieren que las dos enzimas amilasas purificadas a homogeneidad serían proteínas monoméricas, mientras que la celulasa sería una proteína heterodimérica.

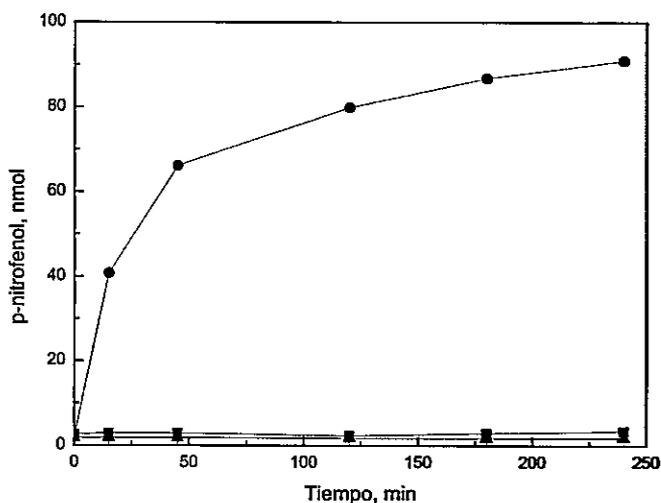
La especificidad de las amilasas se determinó en ensayos enzimáticos usando los sustratos etilideno-pNP-G7 (específico para  $\alpha$ -glucosidasas y glucoamilasas) o 4-Nitrofenol  $\alpha$ -D-glucopiranosido (específico para  $\alpha$ -amilasa). Los resultados para las amilasas de *Tetracladium* sp., y *D. fristingensis* T9Df1 se muestran en las Figuras 19 y 20, respectivamente, e indican que ambas enzimas actúan sobre el sustrato 4-Nitrofenol  $\alpha$ -D-glucopiranosido (Figura 19B y 20B) pero no actúan sobre etilideno-pNP-G7 (Figura 19A y 20A). Estos resultados sugieren que ambas enzimas serían del tipo  $\alpha$ -glucosidasas o glucoamilasas. Para confirmar que ambas enzimas corresponderían a este tipo de enzimas, se determinó la liberación de glucosa desde almidón soluble ya que ambas enzimas catalizan la hidrólisis de AS liberando este azúcar. Tal como se observa en las Figuras 19C y 20C, ambas enzimas liberan glucosa desde almidón soluble. Sin embargo, la glucoamilasa producida por *Tetracladium* sp. no alcanzó el equilibrio ya que la reacción alcanzó un "plateau" en donde no siguió aumentando la actividad enzimática. Esto se debe a que probablemente la enzima se inactivó durante el ensayo, a diferencia de la  $\alpha$ -glucosidasa de *D. fristingensis* en donde no se observa ese comportamiento, sino que se visualiza un comportamiento lineal de la reacción.

Como se mencionó anteriormente las enzimas  $\beta$ -glucosidasas son un tipo de enzimas celulolíticas que degradan celobiosa liberando dos unidades de glucosa. Para determinar si la celulasa de *Tetracladium* sp. corresponde a este tipo de enzima, esta fue incubada con celobiosa como sustrato y se cuantificó la glucosa liberada mediante un kit comercial. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 21 e indican que dicha enzima no posee actividad  $\beta$ -glucosidasa. Sin embargo, el extracto crudo inicial utilizado para la purificación de estas enzimas sí posee dicha actividad. Para determinar el efecto de distintas condiciones experimentales sobre las actividades de las amilasas y de la celulasa, se aplicó un diseño de Plackett-Burman de dos niveles, cuyos resultados se resumen en las Tablas 9, 10 y 11. Las condiciones que más influyen en la actividad enzimática para la glucoamilasa y la celulasa, ambas producidas por *Tetracladium* sp., fueron el pH y la temperatura. Para la amilasa de *D. fristingensis* T9Df1 se observó que el  $\text{CaCl}_2$  fue el factor que más influyó en la actividad de esta enzima.

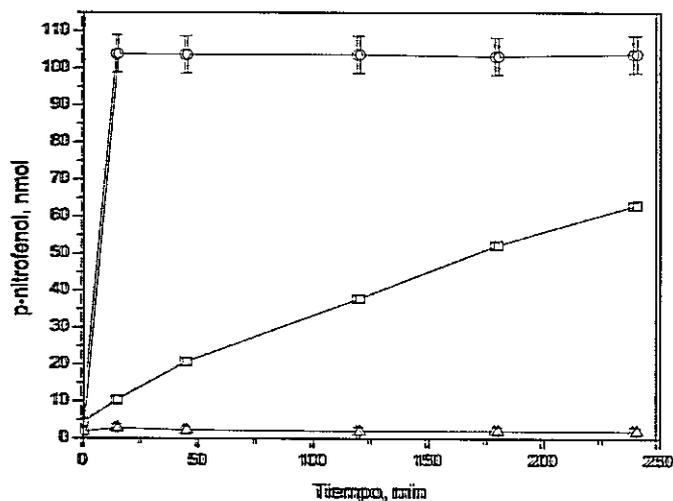


**Figura 19.** Especificidad de sustrato amilasa de *Tetracladium sp.* Los ensayos de actividad amilasa se realizaron a 30 °C usando etilideno-pNP-G7 (A) o 4-nitrofenol α-D-glucopiránosido (B) como sustratos. La liberación de p-nitrofenol fue cuantificada a través de la absorbancia a 405 nm, y la concentración del producto liberado fue cuantificado mediante una curva de calibración usando soluciones puras de p-nitrofenol. Los resultados obtenidos para la amilasa de *Tetracladium sp.* se muestran con cuadrados, para una α-amilasa y glucoamilasa comercial se muestran como círculos (controles positivo), y el control negativo (sin enzima) por triángulos. (C) Los ensayos con la amilasa fueron realizados con almidón soluble 10 g/l pH 6,0 como sustrato, y la liberación de glucosa fue cuantificada (Carrasco y cols., 2017a).

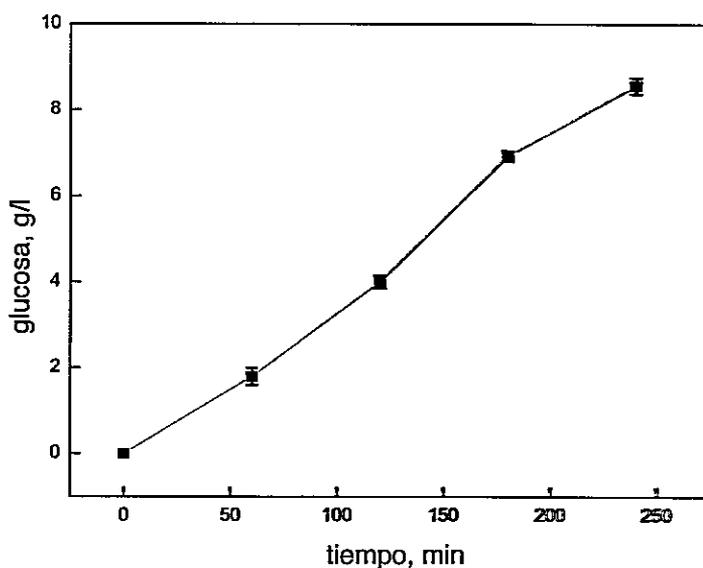
A



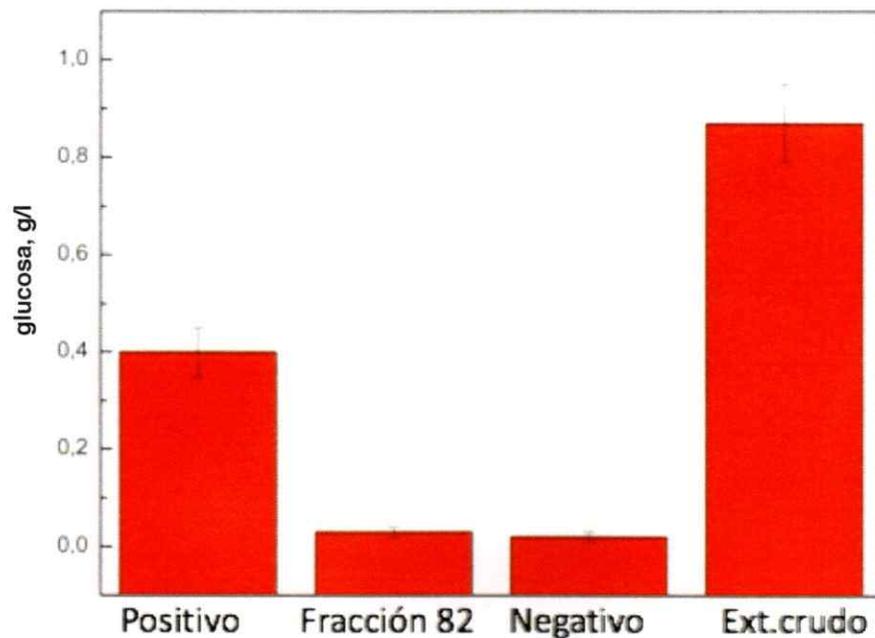
B



C



**Figura 20.** Especificidad de sustrato de la amilasa de *D. fristingensis* T9Df1. Los ensayos de actividad amilasa se realizaron a 37 °C usando etilideno-pNP-G7 (A) o 4-nitrofenol α-D-glucopiránosido (B) como sustratos. La liberación de p-nitrofenol fue cuantificada a través de la absorbancia a 405 nm, y la concentración del producto liberado fue cuantificado mediante una curva de calibración usando soluciones puras de p-nitrofenol. Los resultados obtenidos para la amilasa de *Tetracladium* sp. se muestran con cuadrados, para una α-amilasa y glucoamilasa comercial se muestran como círculos (controles positivo), y el control negativo (sin enzima) por triángulos. (C) Los ensayos con la amilasa fueron realizados con almidón soluble 10 g/l pH 6,0 como sustrato, y la liberación de glucosa fue cuantificada (Carrasco y cols., 2017b).



**Figura 21.** Determinación de la actividad  $\beta$ -glucosidasa de fracciones representativas de la purificación de enzimas celulasas de *Tetracladium* sp. Los ensayos se realizaron con celobiosa 1% p/v como sustrato a pH 6,0, y la actividad enzimática se siguió mediante la cuantificación de la liberación de glucosa durante una hora de incubación. En este ensayo la columna positiva se refiere a una solución de glucosa estándar utilizada para determinar la validez del ensayo. La columna negativa se refiere a que en dicho ensayo no se adicionó enzima. Las muestras indicadas como fracción 82 y extracto crudo se refieren a las muestras de proteínas ensayadas.



**Tabla 9.** Influencia de diferentes condiciones experimentales sobre la actividad de la glucoamilasa de *Tetracladium sp.*

Factor	Alto	Bajo	Efecto
Temperatura (°C)	50	30	2.8
pH	8	6	1.9
Almidón soluble (g/l)	5	0.5	1.0
CaCl <sub>2</sub> (mM)	10	0*	0.9
MgCl <sub>2</sub> (mM)	10	0*	0.2

\*: No adición de compuestos.

**Tabla 10.** Influencia de diferentes condiciones experimentales sobre la actividad de la amilasa de *D. fristingensis* T9Df1.

Factor	Alto	Bajo	Efecto
Temperatura (°C)	37	25	0.6
pH	7	5	1.9
Almidón soluble (g/l)	5	0.5	1.8
CaCl <sub>2</sub> (mM)	10	0*	8.2
MgCl <sub>2</sub> (mM)	10	0*	0.6

\*: No adición de compuestos.

**Tabla 11.** Influencia de condiciones experimentales sobre la actividad de la(s) celulasa(s) de *Tetracladium sp.*

Factor	Alto	Bajo	Efecto
Temperatura (°C)	50	30	2.0
pH	8	6	1.7
Almidón soluble (g/l)	5	0.5	1.0
CaCl <sub>2</sub> (mM)	10	0*	0.3
MgCl <sub>2</sub> (mM)	10	0*	0.4

\*: No adición de compuestos.

Para determinar la concentración de  $\text{CaCl}_2$  óptima para la actividad amilasa, se realizaron experimentos de cinética en donde se evaluó la degradación de AS utilizando diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$ . Como se observa en la Figura 22, las concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  en el rango entre 10 mM y 40 mM aumentan notoriamente la velocidad de la reacción catalizada por esta enzima. Por otro lado, una concentración de 100 mM de  $\text{CaCl}_2$  afecta negativamente la actividad de dicha enzima. Es por esta razón que todos los ensayos posteriores con esta enzima se realizaron utilizando soluciones amortiguadoras suplementadas con 10 mM  $\text{CaCl}_2$ .

Tomando en consideración los resultados de los experimentos de Plackett-Burman para las tres enzimas estudiadas, se continuó con la caracterización de las 3 enzimas en cuanto a determinar los valores de pH y temperatura óptimas para cada actividad enzimática. Para esto se utilizó el diseño de superficie de respuesta, denominada diseño central compuesto de dos niveles (Box y Hunter, 1957). Como punto de partida se tomaron los valores de temperatura y pH a los cuales se obtuvo la mayor actividad enzimática para cada enzima en los ensayos previos. Los resultados obtenidos para la glucoamilasa de *Tetracladium* sp.,  $\alpha$ -glucosidasa de *D. fristingensis* T9Df1 y para la celulasa de *Tetracladium* sp. se muestran en las Figuras 23, 24 y 25, respectivamente. Tal como se visualiza en dichas figuras los valores óptimos de temperatura y pH fueron 30 °C y 6,0 (glucoamilasa), 37 °C y 6,0 ( $\alpha$ -glucosidasa), y 5,0 y 40 °C (celulasa). A continuación se determinó la influencia de la temperatura sobre la actividad y la estabilidad de las distintas enzimas a una hora de incubación, resultados que se muestran en la Figura 26A, 27A y 28A. Para la glucoamilasa de *Tetracladium* sp. se observó que la actividad de la enzima decrece a temperaturas menores a 30 °C, mientras que a mayores temperaturas se ve menos afectada manteniendo 80 % hasta los 45 °C. La enzima presenta alta estabilidad a incubación por una hora entre 4°C-37 °C, en cambio temperaturas sobre 37 °C se observa una brusca caída. Se analizó la estabilidad de la enzima por largos periodos, y se determinó que a 22 °C y 30 °C la enzima no se vio afectada incluso tras 8 horas. A 40 °C se visualizó un decaimiento lineal en el tiempo a 50 °C, mostrando una rápida caída en las primeras dos horas de incubación (10 % actividad residual).

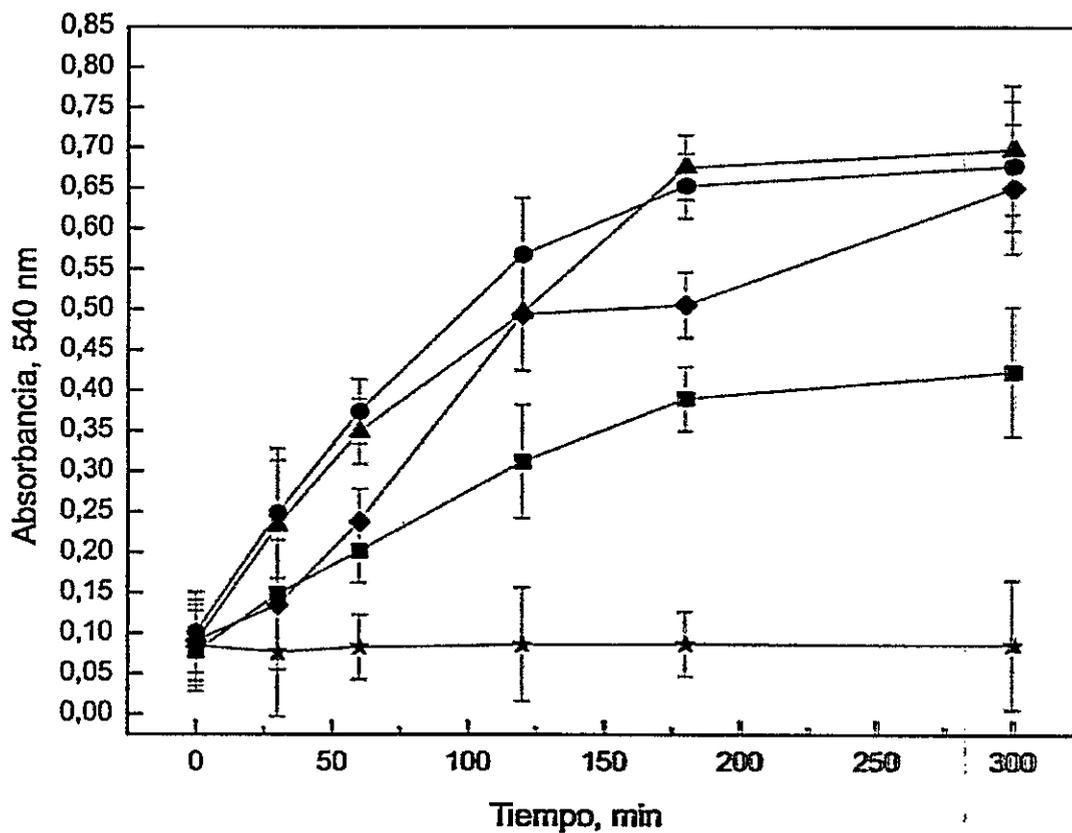
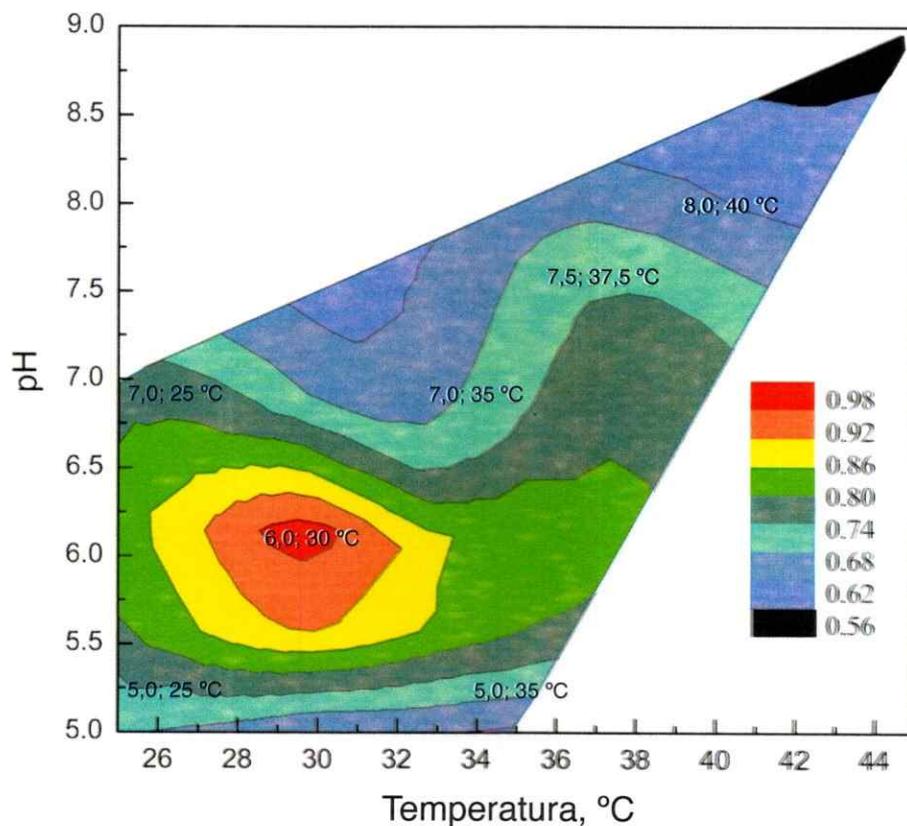
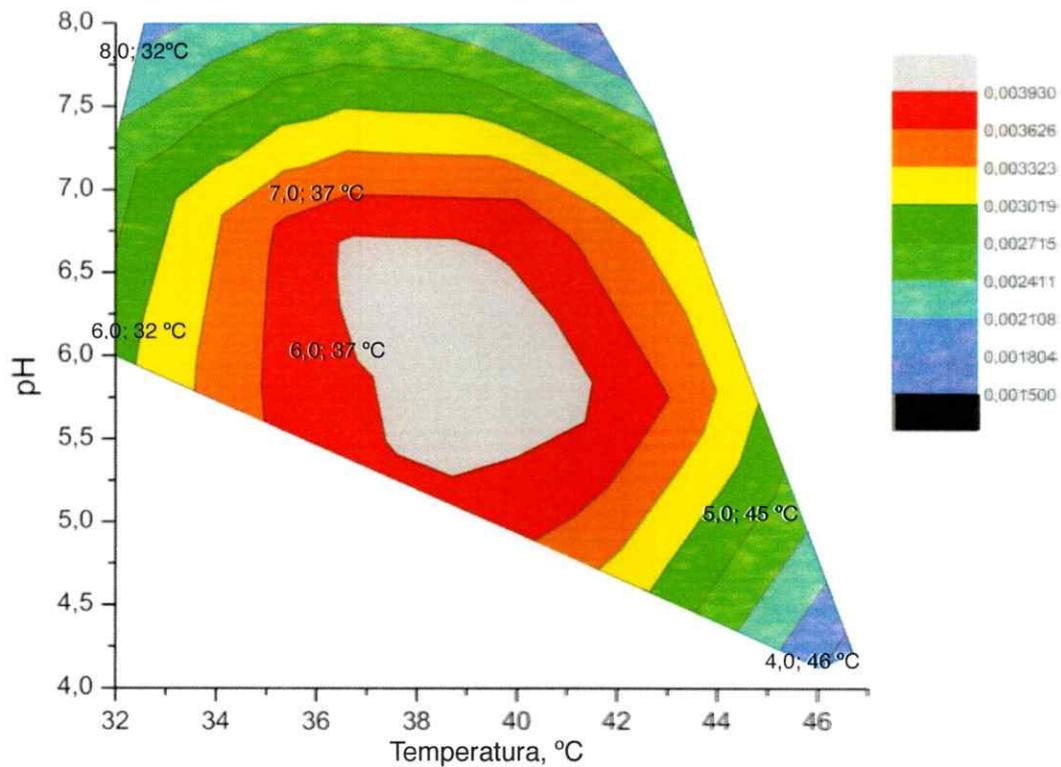


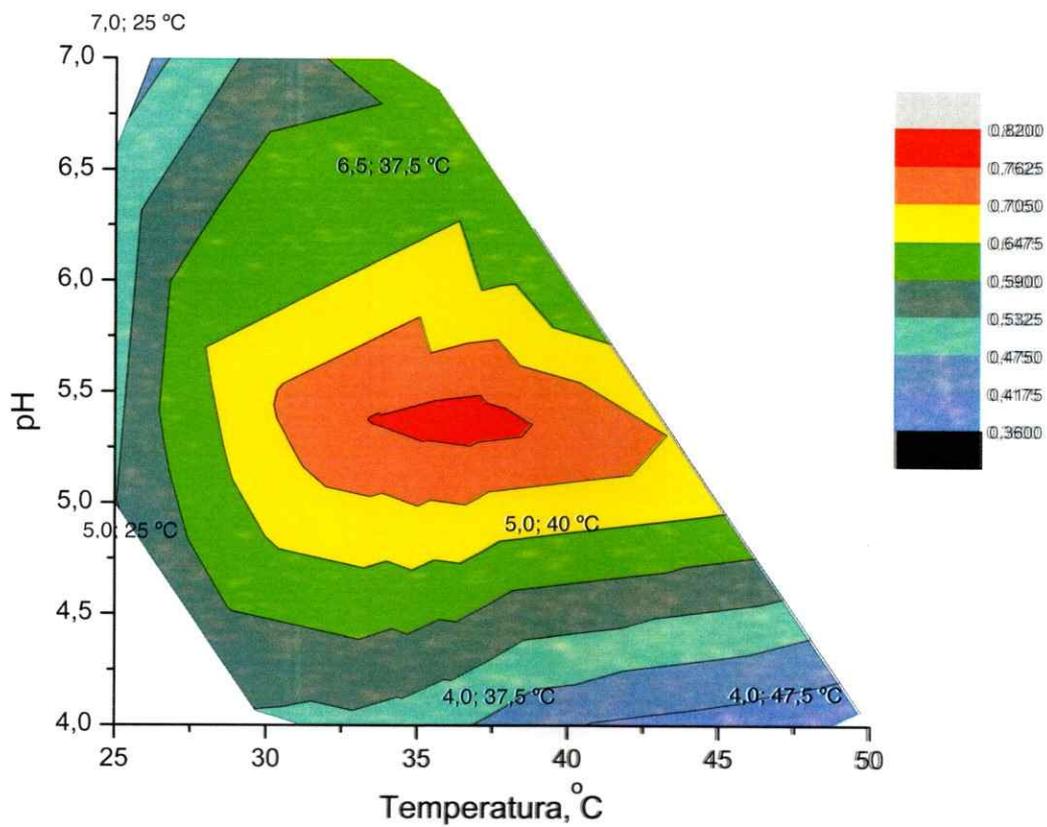
Figura 22. Influencia del  $\text{CaCl}_2$  sobre la actividad enzimática de la amilasa de *D. fristingensis* T9Df1. Cada reacción fue realizada con 5 g/l de almidón soluble pH 6,0 a 37 °C y se variaron las concentraciones de  $\text{CaCl}_2$ : 0 mM (cuadrados), 10 mM (círculos), 20 mM (triángulos), 40 mM (rombos), y 100 mM (estrellas). La liberación de azúcares reductores fue cuantificada a través del método del DNS.



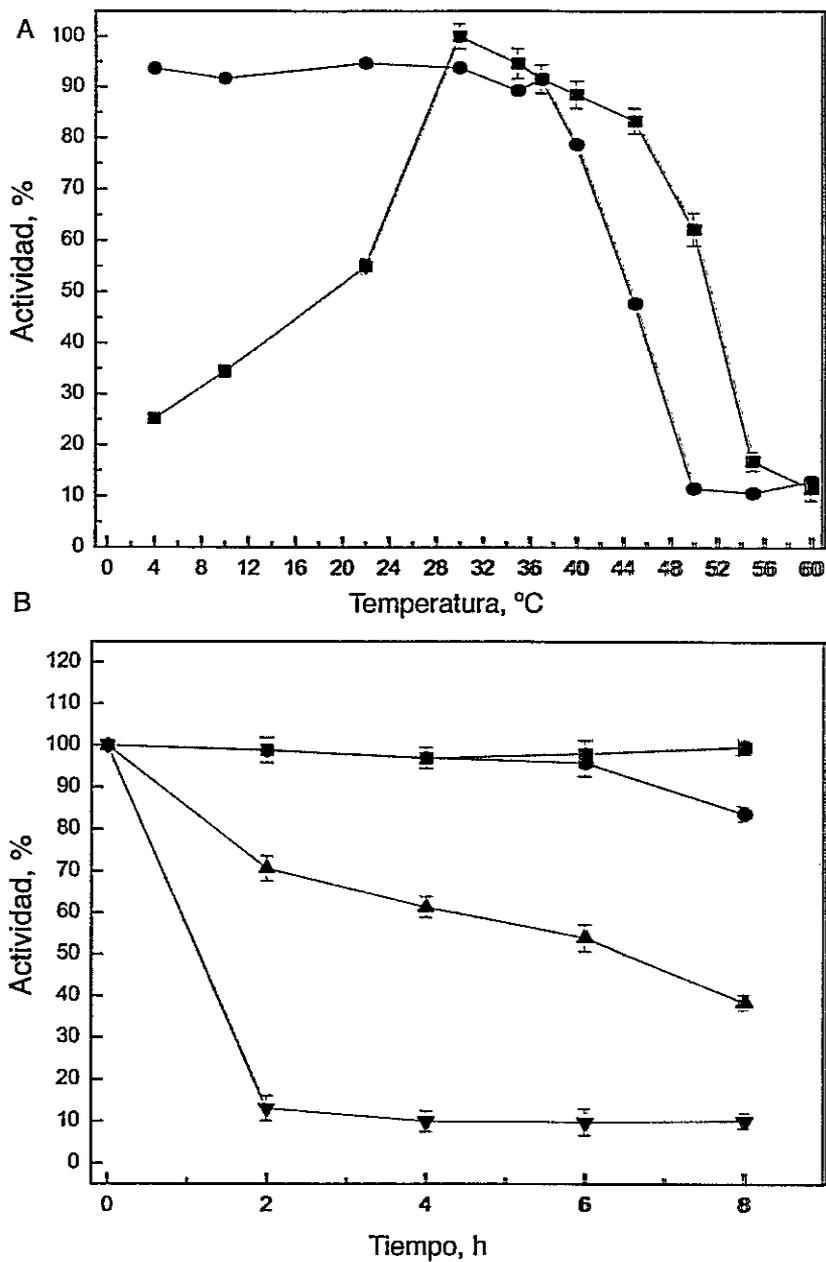
**Figura 23.** Diseño de superficie de respuesta de la glucoamilasa de *Tetracladium* sp. (A) El gráfico indica la concentración de glucosa liberada la cual fue cuantificada mediante el método del DNS, para cada pH y temperatura. Los mayores valores de actividad enzimática están representados por el color rojo, mientras que los menores por verde. Carrasco y cols., 2017a.



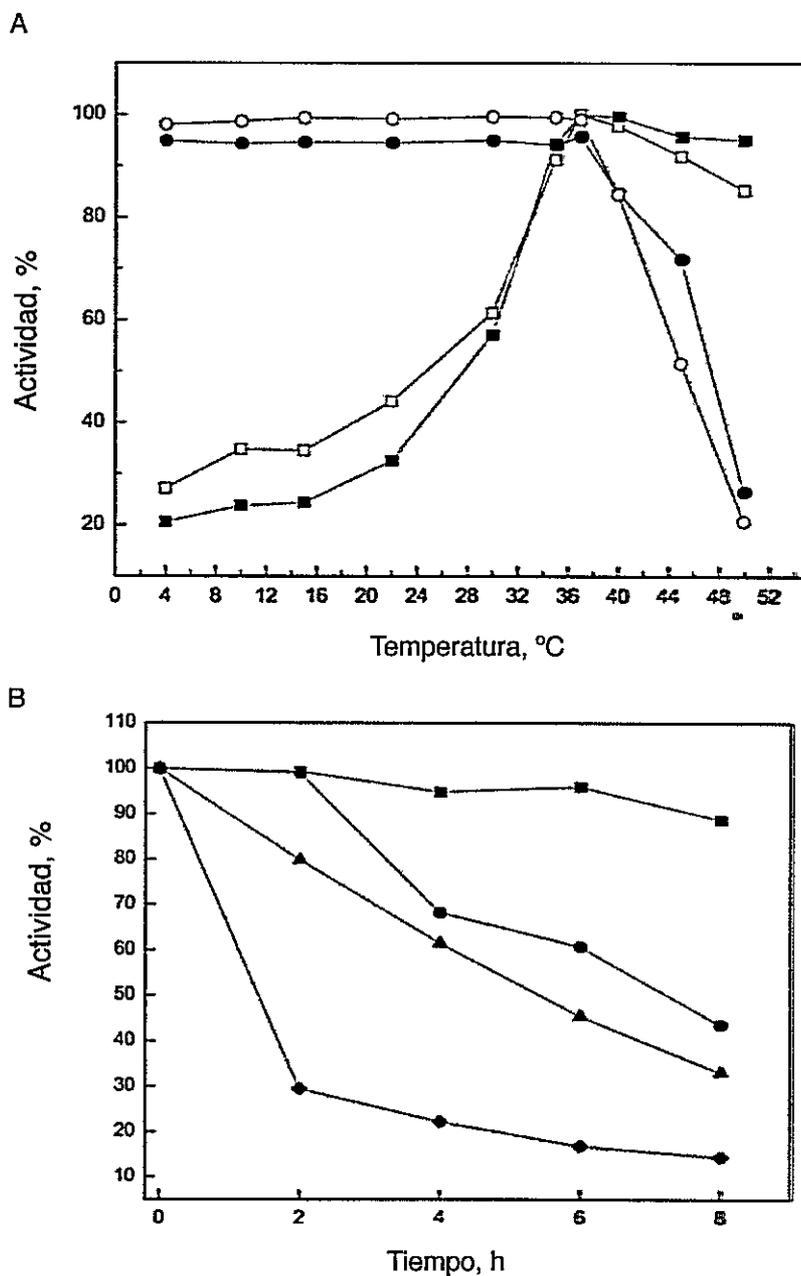
**Figura 24.** Diseño de superficie de respuesta de la amilasa de *D. fristingensis* T9Df1. (A) El gráfico indica la concentración de glucosa liberada la cual fue cuantificada mediante el método del DNS, para cada pH y temperatura. Los mayores valores de actividad enzimática están representados por el color gris, mientras que los menores por negro. Carrasco y cols., 2017b.



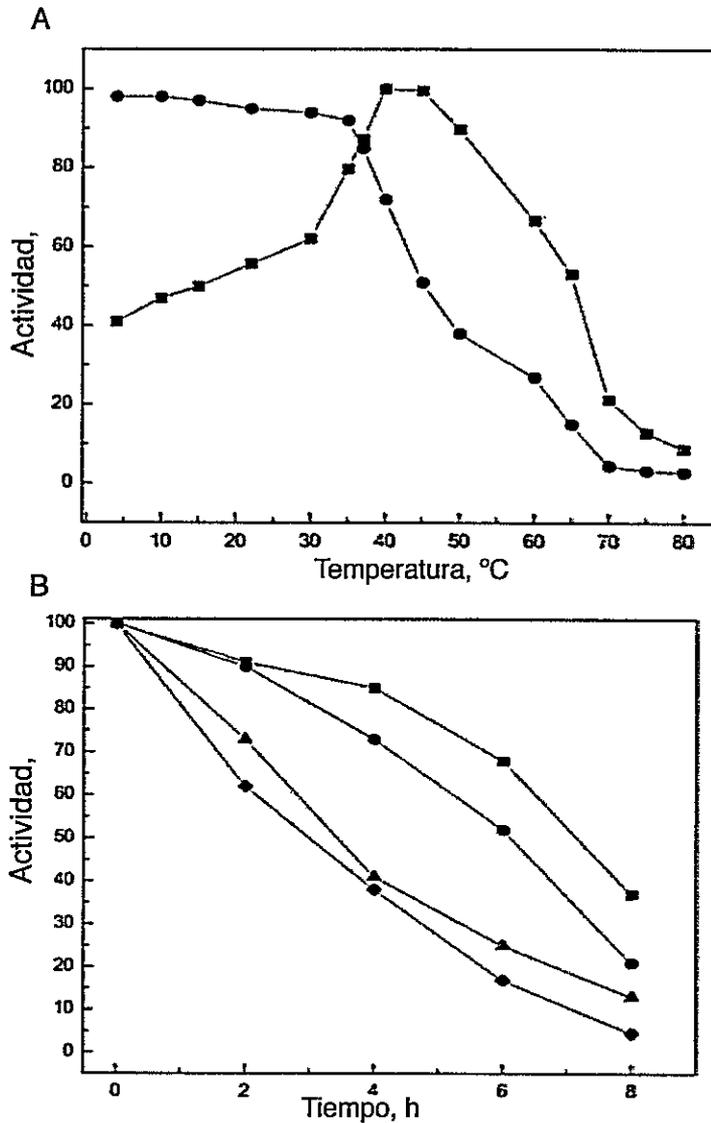
**Figura 25.** Diseño de superficie de respuesta de las celulasas de *Tetracladium sp.* (A) El gráfico indica la liberación de azúcares reductores cuantificado mediante el del DNS, para cada pH y temperatura. Los mayores valores de actividad enzimática están representados por el color rojo, mientras que los menores por negro.



**Figura 26.** Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la glucoamilasas de *Tetracladium* sp. (A) La actividad de la enzima fue ensayada por una hora a cada temperatura (cuadrados). Para los experimentos de estabilidad térmica (círculos), las muestras se incubaron a las temperaturas indicadas por una hora y luego la actividad remanente se determinó a 30°C y pH 6,0. (B) Muestras se incubaron a 22 °C (cuadrados), 30 °C (círculos), 40 °C (Triángulo hacia arriba), y 50°C (Triángulo invertidos). La actividad remanente fue determinada como en (A). Carrasco y cols., 2017a.



**Figura 27.** Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la amilasa de *D. fristingensis* T9Df1. Los ensayos se realizaron con almidón soluble como sustrato a pH 6,0, y la actividad enzimática se siguió mediante el método del DNS. (A) La actividad a diferentes temperaturas fue ensayada por 1 hora con (cuadrados negros) y sin la adición (cuadrados blancos) de 10 mM CaCl<sub>2</sub>. Para los ensayos de estabilidad de la enzima, las muestras fueron incubadas por 1 hora a diferentes temperaturas antes de la determinación de la actividad enzimática a 37 °C, con (círculos negros) o sin (círculos blancos) la adición de 10 mM CaCl<sub>2</sub>. (B) muestras de las enzimas fueron incubadas a 22 °C (cuadrados), 30 °C (círculos), 40 °C (triángulos), y 50 °C (rombos) por diferentes tiempos antes de la realización de los ensayos a 37 °C. Carrasco y cols., 2017b.



**Figura 28.** Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la celulasa de *Tetracladium sp.* Los ensayos se realizaron con CMC 1% p/v como sustrato a pH 6,0, y la actividad enzimática se siguió mediante el método del DNS. (A) La actividad a diferentes temperaturas fue ensayada por 1 hora (cuadrados negros). Para los ensayos de estabilidad de la enzima, las muestras fueron incubadas por 1 hora a diferentes temperaturas antes de la determinación de la actividad enzimática a 40 °C. (B) Muestras de las enzimas fueron incubadas a 37 °C (cuadrados), 40 °C (círculos), 50 °C (triángulos), y 60 °C (rombos) por diferentes tiempos antes de la realización de los ensayos a 40 °C.

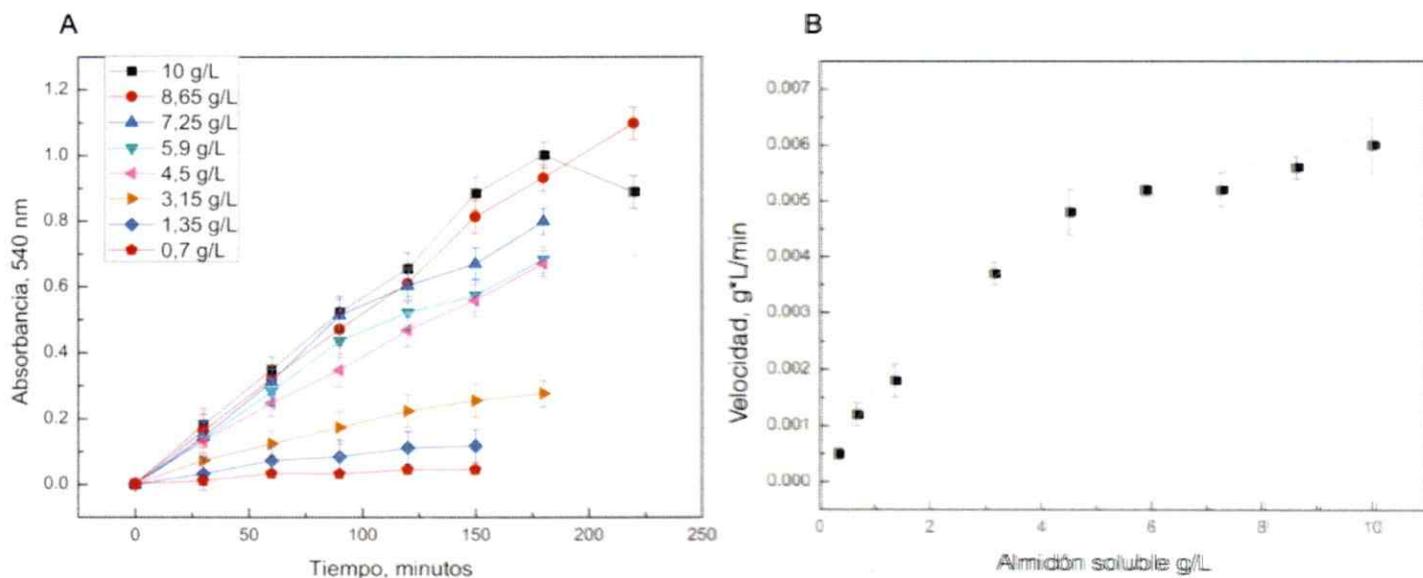
La influencia de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la amilasa de *D. fristingensis* T9Df1 se determinó con y sin la adición de 10 mM CaCl<sub>2</sub>. Como se observa en la Figura 27A en presencia de CaCl<sub>2</sub>, la actividad enzimática disminuyó a temperaturas bajo 37 °C, reteniendo el 55 % y 32 % de su máxima actividad cuando esta fue ensayada a 30 °C y 22 °C, respectivamente. Cuando no se adicionó CaCl<sub>2</sub>, la actividad enzimática decreció a temperaturas más bajas pero este decrecimiento fue menos pronunciado. En presencia de CaCl<sub>2</sub>, se observó sólo una leve disminución en la actividad enzimática a 45 °C y 50 °C, reteniendo sobre el 90 % de su máxima actividad, mientras que la actividad enzimática se redujo más pronunciadamente, a las mismas temperaturas, sin la adición de CaCl<sub>2</sub>. La enzima permaneció altamente estable después de una incubación de una hora a temperaturas entre 4 °C y 37 °C, antes de realizar el ensayo de actividad amilasa en sus condiciones óptimas. Resultados similares se obtuvieron cuando los ensayos se realizaron con y sin la adición CaCl<sub>2</sub>. Una reducción abrupta en la actividad enzimática fue observada cuando las muestras se incubaron por 1 hora a temperaturas ≥40 °C, reteniendo solo el 25% de su actividad enzimática máxima después de una incubación a 50 °C, pero esta reducción fue más pronunciada cuando no fue adicionado CaCl<sub>2</sub>. La estabilidad de la enzima a mayores tiempos de incubación se muestra en la figura 27B. Como se observa la enzima es muy estable después de una incubación a 22 °C, manteniendo aproximadamente el 90% de su máxima actividad incluso después de una incubación de 8 horas. Sin embargo, tras una incubación a 30 °C y 40 °C, la enzima presentó una disminución casi lineal a lo largo del tiempo.

Los resultados obtenidos para la preparación con actividad celulasa obtenida desde *Tetracladium* sp. se observan en la figura 26. Se observó que una incubación de la muestra por una hora a 45 °C causa la pérdida de aproximadamente el 50% de la actividad enzimática. En contraste, la incubación de la enzima por una hora entre 4 °C y 35 °C no afectó significativamente la actividad de ésta. Como se observa en la Figura 28B, la actividad de la enzima a 37 °C y 40 °C no se vio afectada significativamente tras 2 horas de incubación. Sin embargo, la actividad de la enzima a 50 °C y 60 °C cayó hasta aproximadamente un 70 % y 60 % de la actividad original después de dos horas de incubación, respectivamente. El efecto es

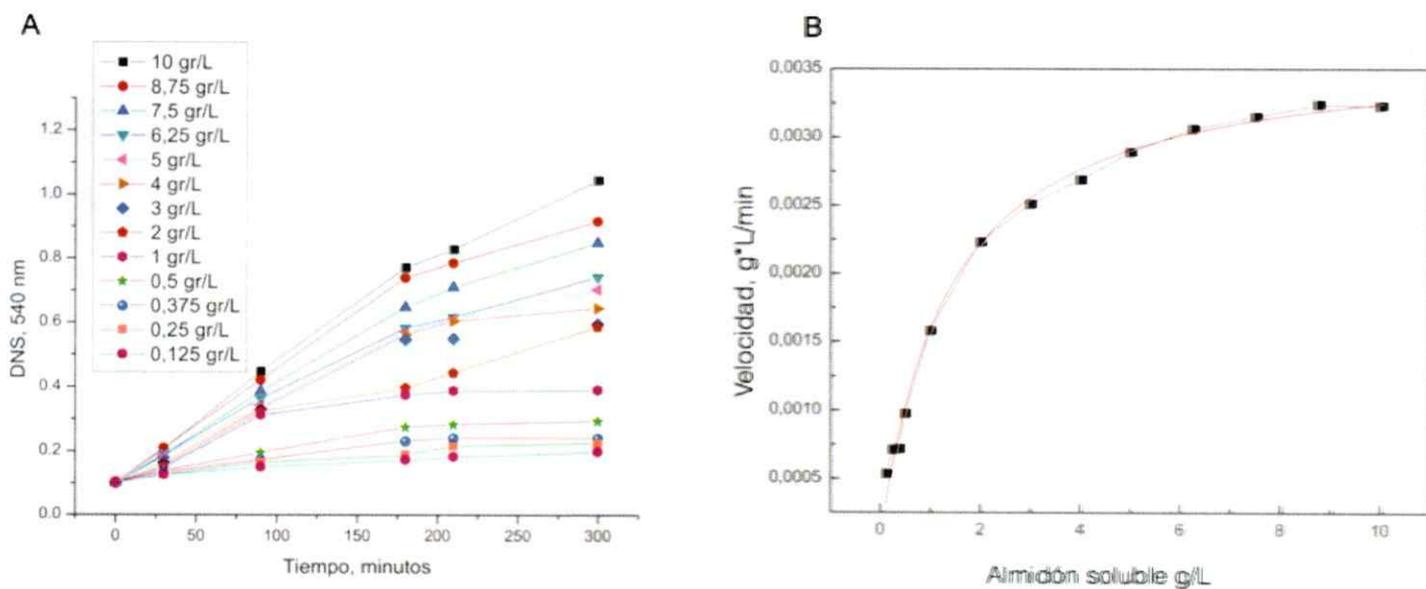
más notorio tras 4 horas de incubación a 50 °C y 60 °C en donde se puede observar que la preparación enzimática tiene solo el 40% de la actividad enzimática original. Incluso a esas temperaturas la enzima sólo mantiene la actividad alrededor del 20% tras una incubación de 6 horas.

**Objetivo 4. Determinar parámetros cinéticos de las enzimas amilasas y celulasas, y modelar su estructura tridimensional para identificar diferentes sustituciones de aminoácidos que explican la adaptación a bajas temperaturas.**

Como última parte de la caracterización de las enzimas purificadas a homogeneidad, se realizaron experimentos de cinética en estado estacionario para determinar distintos parámetros cinéticos en las condiciones óptimas de reacción para ambas enzimas. Se determinaron las velocidades iniciales de las reacciones a distintas concentraciones de sustrato y la curva de progreso para la glucoamilasa de *Tetracladium* sp. (Figura 29) y para la  $\alpha$ -glucosidasa de *D. fristingensis* T9Df1 (Figura 30). Como se observa en las Figuras 29A y 30A las concentraciones de almidón soluble utilizadas permiten establecer diferencias en cuanto a las velocidades de reacción de ambas enzimas. Para lograr esto, se evaluó previamente distintas concentraciones de sustrato y de enzima (datos no mostrados). Las curvas de saturación de ambas enzimas (Figura 29B y 30B) presentan un comportamiento de tipo Michaelis-Menten, en donde se aprecia que la velocidad de la reacción aumenta a mayores concentraciones de sustrato. Luego a cada curva de progreso se le realizó una regresión no lineal (ajuste de Hill) utilizando el software Microcal Origin, con el objetivo de determinar una relación lineal entre las velocidades iniciales y la concentración de sustrato. A través de estos experimentos se logró determinar para la glucoamilasa de *Tetracladium* sp., los valores de  $k_m$ ,  $k_{cat}$  y  $k_{cat}/k_m$  los cuales son 4,5 g/L, 45  $\text{min}^{-1}$  y 10  $\text{g/L} \cdot \text{min}$ , respectivamente. Estos parámetros cinéticos también fueron determinados para la  $\alpha$ -glucosidasa de *D. fristingensis* T9Df1, los cuales son 1,42 g/L ( $k_m$ ), 15  $\text{min}^{-1}$  y 0.82 ( $k_{cat}/k_m$ ).



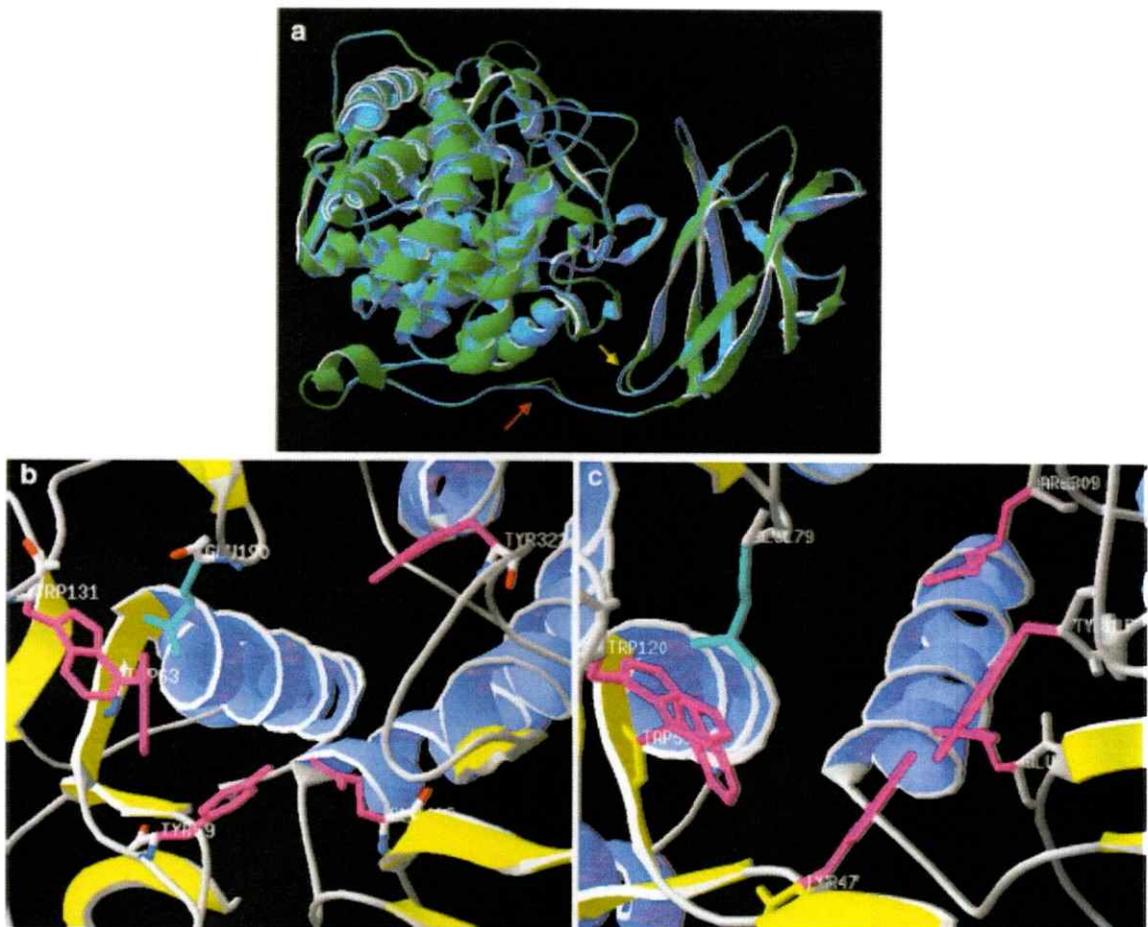
**Figura 29.** Velocidades de reacción y curva de saturación de la glucoamilasa de *Tetracladium sp.* (A) La actividad amilasa fue evaluada utilizando una concentración de enzima de 1,5  $\mu\text{g/ml}$  a diferentes concentraciones de almidón soluble por diferentes tiempos. (B) A partir de la parte (A) se calculó las velocidades iniciales de reacción de la enzima para cada concentración de sustrato, las cuales se graficaron en función de la concentración de almidón soluble utilizada.



**Figura 30.** Velocidades de reacción y curva de saturación de la  $\alpha$ -glucosidasa de *D.fristingensis* T9Df1. (A) La actividad amilasa fue evaluada utilizando una concentración de enzima de 1,5 ug/ml a diferentes concentraciones de almidón soluble por diferentes tiempos. (B) A partir de la parte (A) se calculó las velocidades iniciales de reacción de la enzima para cada concentración de sustrato, las cuales se graficaron en función de la concentración de almidón soluble utilizada.

El valor de  $k_m$  determinado para la glucoamilasa es mayor que las  $k_m$  de la mayoría de las glucoamilasas reportadas, y corresponde a una adaptación que se observó para otras enzimas adaptadas a bajas temperaturas (Anexo 9). En cambio el valor de  $k_m$  determinado para la  $\alpha$ -glucosidasa se encuentra dentro del rango descrito para otras enzimas amilolíticas.

Finalmente se modeló por homología la estructura de la glucoamilasa descrita en este trabajo con respecto a la enzima producida por *H. jecorina*, HjGa, ya que esta fue la primera estructura de una glucoamilasa cristalizada que poseía tanto el dominio catalítico como el dominio de unión a sustrato. Estas proteínas comparten el 69% de identidad con la glucoamilasa de *Tetracladium* sp. teniendo un 90% de cobertura. Para comparar las estructuras tridimensionales entre la glucoamilasa de *Tetracladium* sp. y la de *H. jecorina*, la enzima descrita en el presente trabajo fue modelada usando la estructura cristalográfica de esta (2VN7.1.A). La superimposición de las dos estructuras (Figura 31A) muestra la alta similitud tanto en los dominios catalíticos como en los de unión a sustrato de ambas enzimas. Generalmente las enzimas adaptadas a bajas temperaturas poseen sitios activos más grandes en comparación a sus homólogos mesófilos (Tsigos y cols., 2001). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en las distancias entre las cadenas laterales de los aminoácidos involucrados en la catálisis entre el modelo de la glucoamilasa de *Tetracladium* sp. (Figura 31b) y HjGa (Figura 31c). Se ha reportado que la enzima HjGa es estable entre 45 °C y 65 °C. Numerosas interacciones entre el dominio de unión a almidón y el dominio catalítico son importantes para la actividad y estabilidad de HjGa (Marín-Navarro y Polaina, 2011), incluyendo interacciones electroestáticas y puentes de hidrógeno (T589/R27, H650, E562, A80, E157, H600 y D93) e interacciones hidrofóbicas (F76, V594, I604 y V650). Los mismos tipos de aminoácidos no están presentes en la glucoamilasa de *Tetracladium* sp. lo que podría explicar la baja estabilidad térmica de ésta enzima en comparación con la enzima HjGa.



**Figura 31.** Comparación estructural entre la glucoamilasa de *H. jecorina* (HjGa) y de *Tetracladium* sp. (A) Superimposición del modelo predicho para la glucoamilasa de *Tetracladium* sp. (verde), y la estructura de la glucoamilasa de HjGa (azul). La región enlazadora (flecha roja), y el loop variable (flecha amarilla) están indicados. Los residuos implicados en el reconocimiento del sustrato y el sitio catalítico están mostrados en rosado y celeste, respectivamente, para la glucoamilasa de *Tetracladium* sp (B) y HjGa (C). Las distancias calculadas para la glucoamilasa descrita aquí entre los residuos Y47 y R309, W51 y Y315, W120 e Y315, y E190 e Y315 fueron 8.5, 9.6, 8.7 y 10.2Å. Para HjGa las distancias calculadas entre los residuos equivalentes Y47 y R309, W51 y Y315, W120 e Y315, y E190 e Y315 fueron 8.5, 8.6, 8.3 y 10.1Å, respectivamente.

#### 4. DISCUSIÓN

Las enzimas amilasas y celulasas producidas por las levaduras Antárticas estudiadas en este trabajo son activas en un amplio rango de temperatura (4-30 °C), la mayoría presentando mayor actividad a 22-30 °C. Si bien estas temperaturas parecen altas, hay que tener en cuenta que las levaduras estudiadas en este trabajo fueron aisladas desde la isla Rey Jorge (Carrasco y cols., 2012), en la que las temperaturas son mayores que el resto de la Antártica, teniendo cambios estacionales y que pueden alcanzar los 20°C en verano (Horowitz y cols., 1972). Aun así, las temperaturas de ambas actividades enzimáticas son menores que aquellas descritas para enzimas desde microorganismos mesófilos, generalmente sobre 40 °C (Cavicchioli y cols., 2011). En varias especies de levaduras hubo inconsistencias entre las actividades medidas en colonias y en los extractos proteicos extracelulares, como la actividad amilasa en *Cryptococcus sp.* y *Cr. gilvescens* (ahora *Goffeauzyma gilvescens*), y la actividad celulasa en *Cr. gastricus* (ahora *Goffeauzyma gastrica*), *H. waticus*, *L. fragarium* y *W. anomalus*. Se debe considerar que los cultivos utilizados para la extracción de proteínas se realizaron en medio suplementado con glucosa, mientras que en los ensayos en colonias además se adicionó el sustrato respectivo. Por lo tanto, existe la posibilidad que las actividades sean inducidas por la presencia del sustrato respectivo como se ha descrito en otros microorganismos (Pascon y cols., 2011; Salmon y cols., 2014). Esto fue comprobado para la producción de amilasas por *Cr. gilvescens* y para las celulasas producidas por *Cr. gastricus*, *H. waticus* y *L. fragaria*. Sin embargo, en las muestras de *Cryptococcus sp.* y *W. anomalus* no se observó actividad amilasa o celulasa, respectivamente, a pesar de ser crecidas con los sustratos correspondientes. Todas las levaduras fueron capaces de crecer en medios con AS o CMC como única fuente de carbono, indicando que son capaces de asimilar esas fuentes de carbono complejas. En el género *Aspergillus* se ha descrito que existen enzimas amilasas ancladas a membranas, las cuales asimilan el almidón extracelular y

transportan sus productos para utilizarlos como energía (Van Der Kaaij y cols., 2007), lo cual podría estar sucediendo en *Cr. gilvescens* y *W. anomalus*, lo que explicaría la imposibilidad de detectar actividades enzimáticas en el medio extracelular.

En este trabajo se detectó por primera vez las actividades amilasa en los géneros *Dioszegia*, *Leuconeurospora* y *Holtermaniella*, y celulasa en los géneros *Dioszegia*, *Leuconeurospora*, *Leucosporidiella* y *Wickerhamomyces*. La preparación enzimática con actividad celulasa más pura que se logró obtener para *Tetracladium* sp. correspondería a una enzima heterodimérica que tiene un pH y temperatura óptimo de 5,0 y 40 °C, respectivamente. El valor de pH determinado se encuentra dentro del rango descrito para las diferentes celulasas. Sin embargo, el valor de temperatura óptimo determinado es inferior en relación a las temperaturas óptimas descritas para diferentes celulasas de otros hongos (Anexo 3). Los resultados de la estabilidad térmica determinada para esta enzima indican que es altamente estable en el rango entre 4-35 °C. Al analizar la estabilidad de la enzima por diferentes períodos de tiempo se logró concluir que está es inestable a temperaturas superiores a 45 °C. Estos resultados sugieren que la celulasa de *Tetracladium* sp. sería inestable a temperaturas sobre 40 °C, comportamiento observado en otras enzimas adaptadas a bajas temperaturas (Siddiqui y Cavicchioli, 2006).

La enzima  $\alpha$ -glucosidasa de *D. fristingensis* corresponde una enzima monomérica de 30 kDa, que posee un pH y temperaturas óptimos de 5,5-6,0, y 37-40 °C, respectivamente, reteniendo un 60 % de la actividad óptima a 30°C. De acuerdo a nuestros resultados, esta  $\alpha$ -glucosidasa no estaría glicosilada a diferencia del resto de las enzimas, que si lo están. Sin embargo, el ensayo empleado se basa en el método del ácido periódico-Schiff el cual detecta las proteínas glicosiladas que tienen ácido siálico y otros grupos carbohidratos oxidables, por lo que es posible que algunas glicosilaciones no sean detectadas. En adición, existe la posibilidad de que la enzima tenga pocos sitios de glicosilación y por lo tanto una intensidad de tinción bajo el nivel de detección del método usado (Roth y cols., 2012). La actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa de *D. fristingensis* T9Df1 fue 2 veces mayor en presencia de calcio 10 mM, en comparación a la ausencia de este

cación en la reacción. Sin embargo, este efecto fue observado sólo a temperaturas mayores a 40 °C, mientras que a temperaturas menores que 30 °C la actividad de la enzima fue mayor en ausencia de calcio. Nuestros resultados sugieren que la presencia de calcio aumenta la estabilidad de la enzima sólo a altas temperaturas. En general, ha sido reportado que la presencia de calcio aumenta la termoestabilidad de las enzimas amilasas, lo cual no ocurre en algunas amilasas termófilas como la producida por *Thermococcus* sp. HJ21 (Cheng y cols., 2017). Una característica de las enzimas activas a bajas temperaturas es que ellas tienen valores de  $k_m$  más altos que sus contrapartes mesófilas (Feller y Gerday, 2003). *D. fristingensis* es una levadura que posee una temperatura óptima de crecimiento a 15 °C, y su enzima  $\alpha$ -glucosidasa exhibe su mayor actividad enzimática entre 37 y 40 °C, teniendo un valor de  $k_m$  sobre almidón soluble de 1,3 g/l. Este valor de  $k_m$  está dentro del rango de los valores de  $k_m$  descritos para otras  $\alpha$ -glucosidasas microbianas y glucoamilasas que poseen una actividad óptima de 40-50 °C, sin embargo, es menor en comparación a aquellas enzimas que poseen actividad óptima sobre 60 °C (Kumar y Satyanarayana, 2009). Además ésta enzima posee una baja estabilidad térmica a 30 °C en comparación a otras enzimas mesófilas (Prajapati y cols., 2014).

La glucoamilasa de *Tetracladium* sp. se identificó como una enzima monómerica de Mr 70.000, que posee un pH y temperatura óptimos de 6,0 y 30 °C. De acuerdo a nuestros resultados *in vitro* esta glucoamilasa estaría glicosilada, lo cual fue confirmado con una predicción *in silico* utilizando el programa GIYCOEP (Chauhan y cols., 2013). El pH óptimo para la actividad de ésta glucoamilasa fue 6,0, el cual es similar al pH óptimo de otras glucoamilasas. Sin embargo, su temperatura óptima fue 30 °C, la cual es menor a la observada para la mayoría de las restantes glucoamilasas, cuyo valor se encuentra entre 40-70 °C. Además, la  $k_m$  de dicha glucoamilasa hacia almidón soluble fue 4,5 g/L, mientras las  $k_m$  reportadas para glucoamilasas microbianas son <1,0 g/L (Kumar y Satyanarayana, 2009). Generalmente las enzimas adaptadas a bajas temperaturas tienen valores de  $k_m$  más altos en relación a las contrapartes mesófilas o termófilas, lo que está



en concordancia con nuestros resultados. Al comparar las temperaturas óptimas de la actividad amilasa y la estabilidad de la enzima producida por *D. fristingensis* (psicrófila) con respecto a la amilasa producida por *Tetracladium* sp. (psicrotolerante), se rechaza la hipótesis planteada en este trabajo ya que el resultado obtenido fue el contrario a lo esperado. Se observó que la amilasa producida por la levadura psicrotolerante presentó una menor temperatura óptima para su actividad enzimática sobre almidón soluble y presentó una menor termoestabilidad en comparación a la amilasa de *D. fristingensis*. Sin embargo, durante este trabajo se utilizaron una serie de criterios selectivos para poder cumplir los objetivos planteados. En primer lugar, se tuvo que seleccionar dos enzimas por actividad enzimática estudiada debido a que era muy ambicioso trabajar con un mayor número de enzimas. En segundo lugar, la amilasa producida por *D. fristingensis* no fue la enzima más "psicrófila" que se pudo haber seleccionado. Esto se debe a que si se observa la Figura 1B, la levadura *Rh. glacialis* presentó alta actividad amilasa dentro del rango 4-15 °C, pero esta actividad fue mucho menor a la observada para las amilasas de otras levaduras en otros rangos de temperatura. Esta baja actividad dificultaba todas las caracterizaciones posteriores con esta enzima. Sumado a esto, dicha levadura secreta una baja cantidad de proteínas al medio extracelular, por lo tanto esto también planteaba una dificultad metodológica.

También hay que tener en consideración que todos los ensayos enzimáticos se realizaron con almidón soluble, sustrato que difícilmente se encuentra disponible en el ambiente desde donde fueron aisladas estas levaduras. Se ha descrito que la temperatura óptima para la actividad de algunas enzimas es diferente al ensayarla contra distintos sustratos. Por lo tanto, puede ser que al ensayar dichas enzimas contra otros sustratos se observe un comportamiento distinto. Los resultados obtenidos en este trabajo son útiles para comenzar con la caracterización de las enzimas producidas por levaduras aisladas desde ambientes fríos, pero las conclusiones que se pueden desprender son limitadas en su alcance ya que se utilizó una sub-población de enzimas para poder dar explicación a un fenómeno más amplio.

A nivel estructural, las enzimas activas a bajas temperaturas presentan diferentes cambios aminoacídicos, los cuales en su conjunto le confieren una mayor flexibilidad a la proteína (Siddiqui y Cavicchioli, 2006). A nivel estructural los resultados presentados en este trabajo demuestran que la glucoamilasa producida por *Tetracladium* sp. tiene una serie de sustituciones aminoacídicas, que han sido descritas como adaptaciones que presentan dichas enzimas para funcionar de mejor forma a temperatura más bajas.

Finalmente es posible sugerir la utilidad de las glucoamilasa descrita en este trabajo para ser utilizada en procesos biotecnológicos que requieran la utilización de este tipo de enzimas, como el proceso de producción de biocombustibles. El utilizar esta enzima podría reducir la temperatura del proceso, debido a que esta es más activa a temperatura ambiente en comparación a las enzimas comerciales actuales. En otra posible aplicación se podría expresar el gen que codifica para dicha glucoamilasa en microorganismos industriales que se emplean en la producción de biocombustibles con el objetivo de realizar un proceso consolidado de producción.

## 5. CONCLUSIONES

No se observó una correlación directa entre las temperaturas óptimas de crecimiento de las levaduras de las cuales se obtienen las enzimas, y las temperaturas óptimas de actividad enzimática que tienen dichas enzimas.

Al comparar las características de las dos enzimas amilasas descritas en este trabajo, es posible concluir que la glucoamilasa de *Tetracladium* sp. está más adaptada a las bajas temperaturas que la  $\alpha$ -glucosidasa de *D. fristingensis* T9Df1.

El análisis estructural realizado para la glucoamilasa de *Tetracladium* sp. y la comparación con respecto a la glucoamilasas mesófila HgJa, indica que la glucoamilasa descrita en este trabajo poseería una serie de sustituciones aminoacídicas que en su conjunto le confieren una mayor flexibilidad a dicha proteína, lo cual explicaría su mayor actividad a bajas temperaturas. .

## REFERENCIAS

1. Baeza M, Retamales P, Sepúlveda D, Lodato P, Jiménez A, Cifuentes V. Isolation, characterization and long term preservation of mutant strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J Basic Microbiol*. 2009;49(2):135–41.
2. Bellemain E, Davey ML, Kausrud H, Epp LS, Boessenkool S, Coissac E. Fungal palaeodiversity revealed using high-throughput metabarcoding of ancient DNA from arctic permafrost. *Environ Microbiol*. 2013;15(4):1176–89.
3. Bhatia Y, Mishra S, Bisaria VS. Microbial  $\beta$ -glucosidases: cloning, properties, and applications. *Crit Rev Biotechnol* [Internet]. 2002;22(4):375–407. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07388550290789568>
5. Box GEP, Hunter JS. Multi-Factor Experimental Designs for Exploring Response Surfaces. *Ann Math Stat* [Internet]. 1957;28(1):195–241. Available from: <http://www.jstor.org/stable/2238700>  
<http://projecteuclid.org/euclid.aoms/1177707047>
7. Branda E, Turchetti B, Diolaiuti G, Pecci M, Smiraglia C, Buzzini P. Yeast and yeast-like diversity in the southernmost glacier of Europe (Calderone Glacier, Apennines, Italy). *FEMS Microbiol Ecol*. 2010;72(3):354–69.
8. Burhan H, Ravinder SR, Deepak C, Poonam S, Fayaz AM, Sanjay S. Psychrophilic yeasts and their biotechnological applications - A review. *African J Biotechnol* [Internet]. 2014;13(22):2188–97. Available from: <http://academicjournals.org/journal/AJB/article-abstract/0C9623644894>
9. Butinar L, Spencer-Martins I, Gunde-Cimerman N. Yeasts in high Arctic glaciers: The discovery of a new habitat for eukaryotic microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol*. 2007;91(3):277–89.
11. Butinar L, Strmole T, Gunde-Cimerman N. Relative Incidence of Ascomycetous Yeasts in Arctic Coastal Environments. *Microb Ecol*. 2011;61(4):832–43.
12. Carrasco M, Rozas JM, Barahona S, Alcalá J, Cifuentes V, Baeza M. Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. *BMC Microbiol* [Internet]. 2012;12:251. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3499239&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
13. Connell L, Redman R, Craig S, Scorzett G, Iszard M, Rodriguez R. Diversity of soil yeasts isolated from South Victoria Land, Antarctica. *Microb Ecol*. 2008;56(3):448–59.
14. D'Amico S, Claverie P, Collins T, Georgette D, Gratia E, Hoyoux A. Molecular basis of cold adaptation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* [Internet]. 2002;357(1423): 917–25. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1692995&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
15. De García V, Brizzio S, Libkind D, Buzzini P, Van Broock M. Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiol Ecol*. 2007;59(2):331–41.
16. De Mot R, Verachtert H. Purification and characterization of extracellular alpha-amylase and glucoamylase from the yeast *Candida antarctica* CBS 6678. *Eur J Biochem*. 1987;164(3):643–54.

17. Durham DR. Initial reactions involved in the dissimilation of mandelate by *Rhodotorula graminis*. *J Bacteriol.* 1984;160(2):778–80.
18. Geber A, Williamson PR, Rex JH, Sweeney EC, Bennett JE. Cloning and characterization of a maltase gene involved in sucrose utilization. *J Bacteriol.* 1992;174(21):6992–6.
19. Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 1997;18(15):2714–23.
20. Gurung N, Ray S, Bose S, Rai V, K WF. A Broader View : Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries , Medicine , and Beyond enzyme and its use were well known to the mankind but. 2013;2013.
21. Hankin L, Anagnostakis SL. <<The >>use of solid media for detection of enzyme production byfungi. *Mycologia.* 1975;67:597–607.
22. Hem JD. Complexes of Ferrous Iron With Tannic Acid. *Chem Iron Nat Water.* 1960;75–94.
23. Janeček Š, Svensson B, MacGregor EA. ??-Amylase: An enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(7):1149–70.
24. Ji L, Yang J, Fan H, Yang Y, Li B, Yu X. Synergy of crude enzyme cocktail from cold-adapted *Cladosporium cladosporioides* Ch2-2 with commercial xylanase achieving high sugars yield at low cost. *Biotechnol Biofuels* [Internet]. 2014;7(1): 130. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4172917&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
25. K. PAVLOVA, S. GARGOVA, T. HRISTOZOVA ZT. Phytase from Antarctic Yeast Strain. *Folia Microbiol.* 2008;53(1):29–34.
26. Kasana RC, Gulati A. Cellulases from psychrophilic microorganisms: A review. *J Basic Microbiol.* 2011;51(6):572–9.
27. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics.* 2012;28(12):1647–9.
28. Kinsella BT, Larkin A, Bolton M, Cantwell BA. Molecular cloning and characterization of a *Candida tsukubaensis* alpha-glucosidase gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* [Internet]. 1991;20(1–2):45–52. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1934116](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1934116)
29. KUHAD RC, GUPTA R, SINGH A. Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Res* [Internet]. 2011;2011:280696. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3168787&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
30. Larriba G, Andaluz E, Cueva R, Basco RD. Molecular biology of yeast exoglucanases. *FEMS Microbiol Lett.* 1995;125(2–3):121–6.
31. Letters F, Academy S, Biology M, Academy S, Received D. The evolution of starch-binding domain. 1999;456.
32. Liiv L, Pärn P, Alamäe T. Cloning of maltase gene from a methylotrophic yeast, *Hansenula polymorpha*. *Gene.* 2001;265(1–2):77–85.
33. Margesin R, Neuner G, Storey KB. Cold-loving microbes, plants, and animals - Fundamental and applied aspects. *Naturwissenschaften.* 2007;94(2):77–99.
34. Margesin R, Miteva V. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Res Microbiol* [Internet]. 2011;162(3):346–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2010.12.004>

35. Marín D, Linde D, Fernández Lobato M. Purification and biochemical characterization of an  $\alpha$ -glucosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Yeast*. 2006;23(2):117–25.
36. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem*. 1959;31(3):426–8.
37. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* [Internet]. 2008;5(7):621–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1226>[http://www.nature.com/nmeth/journal/v5/n7/supinfo/nmeth.1226\\_S1.html](http://www.nature.com/nmeth/journal/v5/n7/supinfo/nmeth.1226_S1.html)<http://www.nature.com/doi/doi/10.1038/nmeth.1226><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18516045>
38. Murphy L, Bohlin C, Baumann MJ, Olsen SN, Sørensen TH, Anderson L. Product inhibition of five *Hypocrea jecorina* cellulases. *Enzyme Microb Technol* [Internet]. 2013;52(3):163–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.01.002>
39. NAKAGAWA T, NAGAOKA T, MIYAJI T, TOMIZUKA N. Cold-Active Polygalacturonase from Psychrophilic-Basidiomycetous Yeast *Cystofilobasidium capitatum* Strain PPY-1. *Biosci Biotechnol Biochem* [Internet]. 2005;69(2):419–21. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1271/bbb.69.419>
40. Nakagawa T, Yamada K, Miyaji T, Tomizuka N. Cold-active pectinolytic activity of psychrophilic-basidiomycetous yeast *Cystofilobasidium capitatum* strain PPY-1. *J Biosci Bioeng*. 2002;94(2):175–7.
41. Needleman R, Federoff H, Eccleshall R, Buchferer B, Marmur J. Purification and characterization of an extracellular. *Biochemistry*. 1978;17(2):4657–61.
42. Oda Y, Iwamoto H, Hiromi K, Tonomura K. Purification and Characterization of  $\alpha$ -Glucosidase from *Torulaspota pretoriensis* YK-1. *Biosci Biotechnol Biochem* [Internet]. 1993;57(11):1902–5. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1271/bbb.57.1902>
43. Okuyama M, Okuno A, Shimizu N, Mori H, Kimura A, Chiba S. Carboxyl group of residue Asp647 as possible proton donor in catalytic reaction of ??-glucosidase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Biochem*. 2001;268(8):2270–80.
44. Payne CM, Knott BC, Mayes HB, Hansson H, Himmel ME, Sandgren M. Fungal cellulases. *Chem Rev*. 2015;115(3):1308–448.
45. Petrescu I, Lamotte-Brasseur J, Chessa JP, Ntarima P, Claeysens M, Devreese B. Xylanase from the psychrophilic yeast *Cryptococcus adeliae*. *Extremophiles*. 2000;4(3):137–44.
46. Ramli A, Mahadi N, Rabu A, Murad A, Bakar F, Illias R. Molecular cloning, expression and biochemical characterisation of a cold-adapted novel recombinant chitinase from *Glaciozyma antarctica* PI12. *Microb Cell Fact* [Internet]. 2011;10(1): 94. Available from: <http://www.microbialcellfactories.com/content/10/1/94>
47. Ray MK, Devi KU, Kumar GS, Shivaji S, Devi KUM a, Kumar GS. Extracellular protease from the antarctic yeast Extracellular Protease from the Antarctic Yeast *Candida humicola*. 1992;58(6):1918–23.
48. Rothschild LJ. Life in Extreme Environments. *Ad Astra* [Internet]. 2001;14(September 2000):1092–101. Available from: <http://www.nss.org/adastra/volume14/rothschild.html>
49. Saranraj P, Stella D. Fungal Amylase -A Review. *Int J Microbiol Res*. 2013;4(2): 203–11.
50. Satyanarayana T, Kunze G. Yeast biotechnology: Diversity and applications. *Yeast Biotechnol Divers Appl*. 2009;1–744.

51. Satyanarayana T, Kunze G. Yeast biotechnology: Diversity and applications. *Yeast Biotechnol Divers Appl*. 2009;1–744.
52. Sharma A, Tewari R, Rana SS, Soni R, Soni SK. Cellulases: Classification, Methods of Determination and Industrial Applications. *Appl Biochem Biotechnol* [Internet]. 2016;179(8):1346–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-016-2070-3>
53. Shewale JG. ??-Glucosidase: Its role in cellulase synthesis and hydrolysis of cellulose. *Int J Biochem*. 1982;14(6):435–43.
54. Siddiqui KS. Some like it hot, some like it cold: Temperature dependent biotechnological applications and improvements in extremophilic enzymes. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2015;33(8):1912–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.11.001>
55. Siddiqui KS, Cavicchioli R. Cold-Adapted Enzymes. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2006;75(1):403–33. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142723>
56. Siddiqui KS, Cavicchioli R, Thomas T. Thermodynamic activation properties of elongation factor 2 (EF-2) proteins from psychrotolerant and thermophilic Archaea. *Extremophiles*. 2002;6(2):143–50.
57. Siddiqui KS, Poljak A, De Francisci D, Guerriero G, Pilak O, Burg D. A chemically modified  $\alpha$ -amylase with a molten-globule state has entropically driven enhanced thermal stability. *Protein Eng Des Sel*. 2010;23(10):769–80.
58. Singh P, Tsuji M, Singh SM, Roy U, Hoshino T. Taxonomic characterization, adaptation strategies and biotechnological potential of cryophilic yeasts from ice cores of Midre Lovénbreen glacier, Svalbard, Arctic. *Cryobiology* [Internet]. 2013;66(2):167–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.01.002>
59. Sohail Siddiqui K. Defying the activity–stability trade-off in enzymes: taking advantage of entropy to enhance activity and thermostability. *Crit Rev Biotechnol* [Internet]. 2016;8551(March):1–14. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388551.2016.1144045>
60. Sørensen A, Lübeck M, Lübeck PS, Ahring BK. Fungal Beta-glucosidases: a bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. *Biomolecules* [Internet]. 2013;3(3):612–31. Available from: <http://www.mdpi.com/2218-273X/3/3/612/htm>
61. Sørensen A, Lübeck M, Lübeck PS, Ahring BK. Fungal Beta-glucosidases: a bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. *Biomolecules* [Internet]. 2013;3(3):612–31. Available from: <http://www.mdpi.com/2218-273X/3/3/612/htm>
62. Starmer WT, Lachance MA. Yeast ecology. *The Yeasts*. 2011;1(1987):65–83.
63. Stern H. Climate change in the sub-Antarctic: An illustration from Heard Island. 21st Conf Clim Var Chang (CVC 2009) [Internet]. 2009;1968:345–57. Available from: [http://search.proquest.com/docview/41678479?accountid=12528%5Cnhttp://search.lib.monash.edu/openurl/MUA/MUL\\_SERVICES\\_PAGE?url\\_ver=Z39.88-2004&rft\\_val\\_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&genre=conference&sid=ProQ:ProQ:cpi&atitle=Climate+Change+in+the+Sub+Anta](http://search.proquest.com/docview/41678479?accountid=12528%5Cnhttp://search.lib.monash.edu/openurl/MUA/MUL_SERVICES_PAGE?url_ver=Z39.88-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&genre=conference&sid=ProQ:ProQ:cpi&atitle=Climate+Change+in+the+Sub+Anta)
64. Sternberg D, Mandels GR. Regulation of the cellulolytic system in *Trichoderma reesei* by sophorose: induction of cellulase and repression of ??-glucosidase. *J Bacteriol*. 1980;144(3):1197–9.
65. Strategies A, Significance B. Cold-Adapted Yeasts.



66. Teather RM, Wood PJ. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol.* 1982;43(4):777–80.
67. Teather RM, Wood PJ. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol.* 1982;43(4):777–80.
68. Thomas T, Cavicchioli R. Archaeal cold-adapted proteins: Structural and evolutionary analysis of the elongation factor 2 proteins from psychrophilic, mesophilic and thermophilic methanogens. *FEBS Lett.* 1998;439(3):281–6.
69. Tributario C. Certificado declaración jurada internet. 2013;2012:12749153.
70. Turchetti B, Buzzini P, Goretti M, Branda E, Diolaiuti G, D'Agata C. Psychrophilic yeasts in glacial environments of Alpine glaciers. *FEMS Microbiol Ecol.* 2008;63(1): 73–83.
71. Ueda M, Goto T, Nakazawa M, Miyatake K, Sakaguchi M, Inouye K. A novel cold-adapted cellulase complex from *Eisenia foetida*: Characterization of a multienzyme complex with carboxymethylcellulase, ??-glucosidase, ??-1,3 glucanase, and ??-xylosidase. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol [Internet].* 2010;157(1): 26–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.04.014>
72. Un T, Sou N. Low-temperature extremophiles and their applications Ricardo Cavicchioli\*, Khawar Siddiqui\*, David Andrews ‡ and Kevin R Sowers §. :253–61.
73. Un T, Sou N. Low-temperature extremophiles and their applications Ricardo Cavicchioli\*, Khawar Siddiqui\*, David Andrews ‡ and Kevin R Sowers §. :253–61.
74. Uthumporn U, Shariffa YN, Karim AA. Hydrolysis of native and heat-treated starches at sub-gelatinization temperature using granular starch hydrolyzing enzyme. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012;166(5):1167–82.
75. Vihinen M, Mantsilla P. I. Introduction 11. the Substrate and the Enzymes. 1989;24(4).
76. Vishniac HS, Onofri S. *Cryptococcus antarcticus* var. *circumpolaris* var. nov., a basidiomycetous yeast from Antarctica. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol.* 2003;83(3):231–3.
77. Woodward J, Wiseman A. Fungal and other ??-d-glucosidases - Their properties and applications. *Enzyme Microb Technol.* 1982;4(2):73–9.
78. Xiao Z, Zhang X, Gregg DJ, Saddler JN. Effects of sugar inhibition on cellulases and beta-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Appl Biochem Biotechnol.* 2004;113–116:1115–26.
79. Xu Q-S, Yan Y-S, Feng J-X. Efficient hydrolysis of raw starch and ethanol fermentation: a novel raw starch-digesting glucoamylase from *Penicillium oxalicum*. *Biotechnol Biofuels [Internet].* 2016;9(1):216. Available from: <http://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-016-0636-5>

## 7. ANEXOS

Anexo 1. Características de  $\alpha$ -glucosidasas de hongos y levaduras.

Microorganismo	Gli	T	pH	Inh	MS	Est	Act
<b>Hongo</b>							
<i>Amylomyces rouxii</i>	Si	50-60	3.5-6.0	D-glucosa	ND	ND	ND
<i>Aspergillus awamori</i>	ND	55	5.0	ND	ND	ND	ND
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Si	ND	4.5	ND	63	ND	ND
<i>Aspergillus nidulans</i>	Si	45	4.5	ND	130	D	ND
<i>Aspergillus niger</i>	Si	37	4.5	ND	125	D	ND
<i>Aspergillus niveus</i>	ND	65	6.0	Ag, Fe <sub>2</sub>	56	ND	ND
<i>Aureobasidium pullulans</i>	ND	60	4.0	ND	ND	ND	ND
<i>Paecilomyces variotii</i>	ND	60	3.5-4.0	ND	ND	ND	ND
<i>Penicillium brevicompactum</i>	ND	40-60	7.0	ND	ND	ND	ND
<i>Penicillium oxalicum</i>	ND	50	3.5	Cu, Hg, Pb	ND	ND	ND
<i>Penicillium purpurogenum</i>	ND	50	3.0-5.0	Cu, Mg, Mn, K y Zn	ND	ND	ND
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	ND	65	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Trichoderma viride</i>	ND	55	7.2	ND	111	M	ND
<b>Levadura</b>							
<i>Candida albicans</i>	ND	37	7	D-glucosa	50	ND	ND
<i>Cyberlindnera fabianii</i>	ND	50	5	Ag, Cu y Hg	ND	ND	Ca
<i>Lipomyces starkeyi</i>	ND	60	4.5	ND	35	ND	ND
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	ND	ND	6.7-6.8	ND	63	ND	ND
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ND	36-42	6.3-7.1	ND	ND	ND	ND
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	Si	43-53	5.5	ND	135	M	ND
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Si	35	4.5	ND	112	ND	ND
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	ND	40-60	7.0	ND	ND	ND	ND
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Si	45	5.5	ND	115	D	ND
<i>Zea mays</i>	ND	ND	3.6	ND	ND	ND	ND

ND: No determinado. Gli: Glicosilaciones; T: Temperatura óptima en °C; pH: pH óptimo; inh: inhibidores; MS: Masa del monómero en kDa; Est: Estado oligomérico; Act: Activadores. D: Dímero; M: Monómero.

Anexo 2. Características de glucoamilasas de hongos y levaduras.

Microorganismo	Gli	T	pH	Inh	MS	Est	Act
<b>Hongos</b>							
<i>Acremonium sp.</i>	ND	55	ND	EDTA, Ba, Fe, Hg	ND	ND	Ca y Mg
<i>Aspergillus awamori</i>	ND	50	4.5	ND	ND	ND	ND
<i>Aspergillus candidus</i>	ND	ND	ND	ND	72	M	ND
<i>Aspergillus coreanus</i>	ND	60-65	4	EDTA	62	M	Cu y Mg
<i>Aspergillus flavus</i>	ND	60	6	Cu, Fe, Al, Mg, Hg, Zn	ND	ND	Ca, Ba, Mn, Co
<i>Aspergillus foetidus</i>	Si	ND	ND	ND	125	ND	ND
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Si	65	4-5.5	Hg	42	M	ND
<i>Aspergillus niger</i>	Si	ND	5-5.5	ND	78	ND	ND
<i>Aspergillus niveus</i>	ND	65	ND	Ag, Fe	77	ND	Ca, Ba
<i>Aspergillus oryzae</i>	Si	56	4-4.5	Acar	80	ND	ND
<i>Aspergillus phoenicis</i>	Si	ND	4.5	Hg, Mg, Pb	90	ND	ND
<i>Aspergillus terreus</i>	Si	ND	4.0	Ag, Hg	ND	ND	Ca y Mg
<i>Athelia rolfsii</i>	Si	65	ND	ND	74	M	ND
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Si	60	4.5	ND	66	M	ND
<i>Fusarium solani</i>	ND	40-50	4.5	Fe, Hg, Ni, Pb, Zn	41	M	EDTA
<i>Lentinula edodes</i>	Si	50	4.6	GAL, Gluco, Glu y Xil	ND	ND	Mn, Ca
<i>Neurospora crassa</i>	Si	60	5.0-5.4	Cu	82	M	Mn <sup>2+</sup>
<i>Paecilomyces variotii</i>	Si	55	4.5	Al, Cu, Fe, Pb, Zn	69	M	Mn
<i>Thielavia terrestris</i>	Si	60	4.0	ND	62	ND	ND
<i>Trichoderma reesei</i>	Si	70	ND	ND	125	ND	ND
<b>Levaduras</b>							
<i>Blastobotrys adenivorans</i>	Si	60-70	4-5.5	Celo, Fruc, y Sor	225	ND	ND
<i>Candida antarctica</i>	Si	57	4.2	Acar	47	ND	ND
<i>Lipomyces kononenkoae</i>	Si	60	4.5	ND	140	D	ND
<i>Pseudozyma tsukubaensis</i>	Si	55	2.4-4.8	Acar, Ca, Dex,	ND	ND	ND
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Si	55	3.6-5.2	ND	90	T	ND
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	ND	50	5.6-6.4	Acar	56	ND	ND

ND: No determinado; Gli: Glicosilaciones; Temp: Temperatura óptima; pH: pH óptimo; inh: inhibidores; MS: Masa del monómero en kDa; Est: Estado oligomérico; Act: Activadores. GAL: galactosa; GLUCO: glucosamina; Acar: Acarbosa; Glu: Glucosa; Xil: Xilosa; Celo: Celobiosa; Fruc: Fructosa; Xil: Xilosa; Sor: Sorbitol; Dex: Dextrina; M: monómero; D: dímero; T: Tetramero.

Anexo 3. Características de  $\beta$ -glucosidasas de hongos.

Hongo	Gli	T	pH	Inh	PM	Est	Act
<i>Acremonium persicinum</i>	ND	ND	5.5	Glu, Cu, Hg, Zn	128	M	Mg, Sn
<i>Aspergillus aculeatus</i>	Si	55	4.5	Glu	132	ND	ND
<i>Aspergillus fischeri</i>	ND	40	6	Glu	ND	ND	ND
<i>Aspergillus foetidus</i>	Si	65	4.8	Glu	122	ND	ND
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ND	65	4.5	Cu, Fe, Hg, SDS	95	T	ND
<i>Aspergillus japonicus</i>	Si	65	5.0	Hg, SDS	120	D	Co, Mn
<i>Aspergillus niger</i>	Si	65	4.5	Cu, Hg, Cd, Ba, Zn	88	ND	Ca, Co, Mn
<i>Aspergillus oryzae</i>	ND	50	5.0	Glu, Ag, Cu, Fe, Hg	105	D	EtOH, Mn
<i>Aspergillus pulverulentus</i>	ND	60	4.0	Hg, SDS	118	D	ND
<i>Aspergillus saccharolyticus</i>	ND	58	4.2	Glu	ND	ND	ND
<i>Aspergillus terreus</i>	Si	50	5.8	Glu	275	ND	ND
<i>Aspergillus tubingensis</i>	Si	65	4.6	Glu	111	ND	ND
<i>Aspergillus wentii</i>	ND	65	4.5-5.5	Glu	ND	ND	ND
<i>Athelia rolfsii</i>	Si	65-68	4.2	Glu	90	M	ND
<i>Aureobasidium pullulans</i>	ND	80	4.5	ND	ND	ND	ND
<i>Fomitopsis palustris</i>	ND	70	4.5	Glu	ND	ND	ND
<i>Fusarium oxysporum</i>	ND	60	5.0-6.0	Glu	110	ND	1-butanol, Met
<i>Fusarium proliferatum</i>	ND	50	5.0	Ca, EDTA, Mn, Zn, Ni	39	D	Co
<i>Fusarium solani</i>	ND	65	4.5	Glu	ND	ND	ND
<i>Humicola grisea</i>	Si	50	5.0	Cu	250	ND	ND
<i>Magnaporthe oryzae</i>	Si	55	5.5	Cu, Hg, Mn	240	ND	ND
<i>Melanocarpus sp.</i>	ND	60	6.0	Cu	92	M	Mg, Zn, Na
<i>Myceliophthora heterothallica</i>	ND	60	4.8	Glu	ND	ND	ND
<i>Neocallimastix patriciarum</i>	ND	40	5.0	Glu	ND	ND	ND
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	ND	55	6.0	Ag, Cu, Fe, Mn	71	D	EDTA, Ca y Zn
<i>Penicillium brasilianum</i>	ND	70	4.8	Glu	115	ND	ND
<i>Penicillium decumbens</i>	ND	65-75	7.0	Glu	28	D	ND
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Si	65	5.0	Glu	110	M	ND
<i>Physarum polycephalum</i>	ND	70	4.5	castanospermina	130	O	ND
<i>Trichoderma koningii</i>	ND	50	4.5-5.0	D-glucono-1,5-lactona	40	ND	ND
<i>Trichoderma reesei</i>	Si	60	4.6	Glu, Fe, Hg, Sn	71	ND	ND

ND: No determinado; Gli: Glicosilaciones; T: Temperatura óptima en °C; pH: pH óptimo; inh: inhibidores; PM: Peso molecular del monómero en kDa; Est: Estado oligomérico; Act: Activadores; Glu: Glucosa; EtOH: Etanol; Met: Metanol; M: monómero; D: dímero; T: Tetrámero; O: Oligómero.

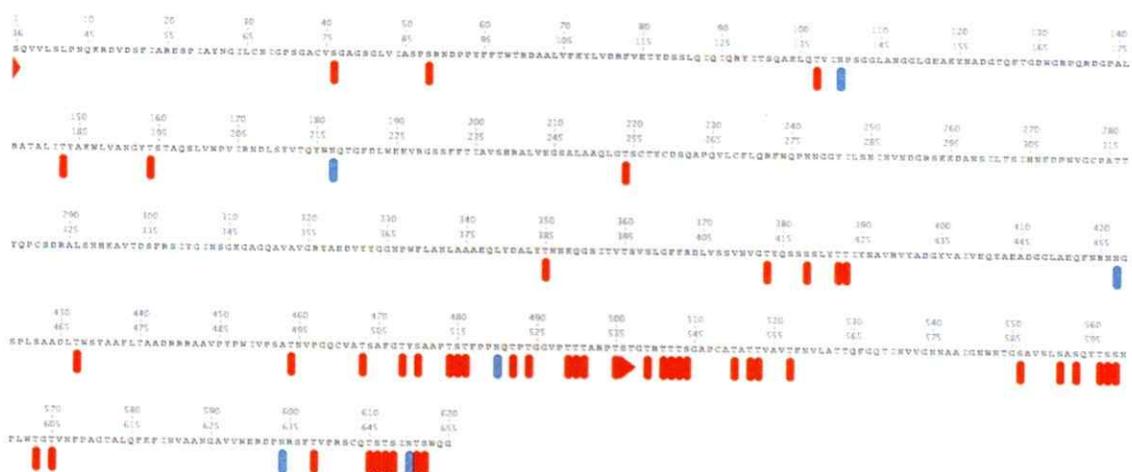
Anexo 3 (continuación).

<i>Levadura</i>	Gli	T	pH	Inh	PM	Est	Act
<i>Candida peltata</i>	ND	50	5.0	Glu	43	M	Etolol
<i>Candida sake</i>	ND	52	4.25	Glu, Hg	60	T	ND
<i>Candida wickerhamii</i>	ND	35	6-6.5	EtOH, Glu	94	D	But, Pent
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	ND	20	5.0	Fruc, Glu, EtOH	ND	ND	EtOH
<i>Hanseniaspora vineae</i>	ND	55	6.0-6.5	Glu, Ca, Co, Cu, Fe, Ni, Hg	ND	ND	EtOH, Mn
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	ND	55	5.8	Glu, Hg, Ni, Pb	90	T	EtOH
<i>Komagataella pastoris</i>	ND	40	7.3	Glu	70	T	ND
<i>Kuraishia molischiana</i>	Si	30	3.5	ND	330	ND	ND
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	ND	50	4.5	Glu, Mg, Zn	49	O	EtOH, Fe
<i>Millerozyma farinosa</i>	ND	60	5.5	Glu, Ag, Cu, Fe, Mg, Mn, Hg	110	D	Fe, Na, Ni
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Si	45	6.4-6.8	Glu	300	D	ND
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	ND	22	4.5	ND	220	ND	ND
<i>Schwanniomyces etchellsii</i>	Si	50	6.5-7.0	Glu	50	T	ND
<i>Schwanniomyces vanrijae</i>	Si	40	5.0	Glu, EtOH, Cu, SDS	100	ND	ND
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	ND	20	5.5	Glu, Fruc, EtOH	ND	ND	EtOH

ND: No determinado. Gli: Glicosilaciones; T: Temperatura óptima en °C; pH: pH óptimo; inh: inhibidores; PM: Peso molecular del monómero en kDa; Est: Estado oligomérico; Act: Activadores; Glu: Glucosa; EtOH: Etanol; Met: Metanol; Fruc: Fructosa; But: Butanol; Pent: Pentanol; M: monómero; D: dímero; T: Tetrámero; O: Oligómero.



**Anexo 5. Predicción bioinformática de N-glicosilaciones y O-glicosilaciones de la glucoamilasa de *Tetracladium sp.***



**Anexo 6.** Carrasco, M., Alcaíno, J., Cifuentes, V. & Baeza, M. Purification and characterization of a novel cold adapted fungal glucoamylase. *Microb. Cell Fact.* **16**, 75 (2017a)

Carrasco et al. *Microb Cell Fact* (2017) 16:75  
DOI 10.1186/s12934-017-0693-x

Microbial Cell Factories

RESEARCH

Open Access



# Purification and characterization of a novel cold adapted fungal glucoamylase

Mario Carrasco, Jennifer Alcaíno, Victor Cifuentes and Marcelo Baeza\*

## Abstract

**Background:** Amylases are used in various industrial processes and a key requirement for the efficiency of these processes is the use of enzymes with high catalytic activity at ambient temperature. Unfortunately, most amylases isolated from bacteria and filamentous fungi have optimal activity above 45 °C and low pH. For example, the most commonly used industrial glucoamylases, a type of amylase that degrades starch to glucose, are produced by *Aspergillus* strains displaying optimal activities at 45–60 °C. Thus, isolating new amylases with optimal activity at ambient temperature is essential for improving industrial processes. In this report, a glucoamylase secreted by the cold-adapted yeast *Tetracladium* sp. was isolated and biochemically characterized.

**Results:** The effects of physicochemical parameters on enzyme activity were analyzed, and pH and temperature were found to be key factors modulating the glucoamylase activity. The optimal conditions for enzyme activity were 30 °C and pH 6.0, and the  $K_m$  and  $k_{cat}$  using soluble starch as substrate were 4.5 g/L and 45 min<sup>-1</sup>, respectively. Possible amylase or glucoamylase encoding genes were identified, and their transcript levels using glucose or soluble starch as the sole carbon source were analyzed. Transcription levels were highest in medium supplemented with soluble starch for the potential glucoamylase encoding gene. Comparison of the structural model of the identified *Tetracladium* sp. glucoamylase with the solved structure of the *Hypocrea jecorina* glucoamylase revealed unique structural features that may explain the thermal lability of the glucoamylase from *Tetracladium* sp.

**Conclusion:** The glucoamylase secreted by *Tetracladium* sp. is a novel cold-adapted enzyme and its properties should render this enzyme suitable for use in industrial processes that require cold-active amylases, such as biofuel production.

**Keywords:** Fungal amylase, Cold-adapted amylase, *Tetracladium* sp., Antarctic fungi

**Anexo 7.** Carrasco, M., Alcalino, J., Cifuentes, V., & Baeza, M. Purification and characterization of a novel  $\alpha$ -glucosidase from an Antarctic yeast *Dioszegia fristingensis* isolate. *Amylase*. 1: 50–58 (2017b).

Research Article

Open Access

Mario Carrasco, Jennifer Alcaíno, Víctor Cifuentes, Marcelo Baeza\*

## Purification and characterization of a novel $\alpha$ -glucosidase from an Antarctic yeast *Dioszegia fristingensis* isolate

DOI 10.1515/amylase-2017-0005

Received March 23, 2017; accepted May 18, 2017

**Abstract:** Starch hydrolyzing enzymes, amylases, are important commercial enzymes used in several productive areas. A current tendency is to find amylases with high catalytic activity at 20–40°C, to generate products that work well at low temperatures, such as detergents, and for energy saving resources in industrial processes. In this work, an  $\alpha$ -glucosidase secreted by the cold-adapted yeast *Dioszegia fristingensis* was purified and biochemically characterized. The effect of physicochemical parameters on the enzyme activity was evaluated. According to our results, the amylolytic enzyme secreted by *D. fristingensis* is a monomeric  $\alpha$ -glucosidase of about 30 kDa that displayed the highest activity at 37–40°C and at pH 5.5–6.5, in the presence of 10 mM CaCl<sub>2</sub>. The enzyme exhibited a Michaelis-Menten kinetics with  $K_m$  and  $k_{cat}$  of 1.3 g/L and 15 min<sup>-1</sup>, respectively.

**Keywords:** starch hydrolysis; cold-adapted  $\alpha$ -glucosidase; *Dioszegia fristingensis*; Antarctic yeast.

### 1 Introduction

Humans have been using enzymes in the production of food and beverages from ancient times but without knowing its existence. Only since the 19<sup>th</sup> century the role and importance of enzymes for application in diverse industrial markets, such as food and beverages, detergents, animal feed, biofuels, leather, and textile has been acknowledged [1,2]. Currently, industrial enzymes comprise a well-established global market, estimated to reach a value of \$6.3 billion in 2021 [3]. In the last decades, a growing interest in enzymes produced by microorganisms living in cold environments can be recognized, which is due to their high catalytic activity at middle or low temperatures that allow, among other properties, energy saving in productive processes [4–6]. Examples of these attractive enzymes are the cold-active amylases, lipases, proteases, cellulases, pectinases, and esterases, as they are applied in food, wine, textile, and detergent industries [7,8]. Amylases are used as additives in detergent formulations, in wool treatment, and in the production of biofuels from starch-rich wastes, besides

Anexo 8. Carrasco y cols., a. Screening and characterization of amylase and cellulase activities in psychrotolerant yeasts. *BMC Microbiol.* **16**, 21 (2016).

Carrasco et al. *BMC Microbiology* (2016) 16:21  
DOI 10.1186/s12866-016-0640-8

BMC Microbiology

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Screening and characterization of amylase and cellulase activities in psychrotolerant yeasts



Mario Carrasco, Pablo Villarreal, Salvador Barahona, Jennifer Alcaíno, Víctor Cifuentes and Marcelo Baeza\*

## Abstract

**Background:** Amylases and cellulases have great potential for application in industries such as food, detergent, laundry, textile, baking and biofuels. A common requirement in these fields is to reduce the temperatures of the processes, leading to a continuous search for microorganisms that secrete cold-active amylases and cellulases. Psychrotolerant yeasts are good candidates because they inhabit cold-environments. In this work, we analyzed the ability of yeasts isolated from the Antarctic region to grow on starch or carboxymethylcellulose, and their potential extracellular amylases and cellulases.

**Result:** All tested yeasts were able to grow with soluble starch or carboxymethylcellulose as the sole carbon source; however, not all of them produced ethanol by fermentation of these carbon sources. For the majority of the yeast species, the extracellular amylase or cellulase activity was higher when cultured in medium supplemented with glucose rather than with soluble starch or carboxymethylcellulose. Additionally, higher amylase activities were observed when tested at pH 5.4 and 6.2, and at 30–37 °C, except for *Rhodotorula glacialis* that showed elevated activity at 10–22 °C. In general, cellulase activity was high until pH 6.2 and between 22–37 °C, while the sample from *Mrakia blollopis* showed high activity at 4–22 °C. Peptide mass fingerprinting analysis of a potential amylase from *Tetracladium* sp. of about 70 kDa, showed several peptides with positive matches with glucoamylases from other fungi.

**Conclusions:** Almost all yeast species showed extracellular amylase or cellulase activity, and an inducing effect by the respective substrate was observed in a minor number of yeasts. These enzymatic activities were higher at 30 °C in most yeast, with highest amylase and cellulase activity in *Tetracladium* sp. and *M. gelida*, respectively. However, *Rht. glacialis* and *M. blollopis* displayed high amylase or cellulase activity, respectively, under 22 °C. In this sense, these yeasts are interesting candidates for industrial processes that require lower temperatures.

**Keywords:** Amylase, Cellulase, Cold-active enzymes, Psychrotolerant yeasts

**Anexo 9. Características glucoamilasas microbianas**





Table 2. Purification details and important features of microbial glucoamylases.

Source	Molecular weight (kDa)	Posttranslational modification	Purification strategy	pH	Temperature	pI	$K_m$ starch
<i>Thermomyces lanuginosus</i> F1	70	(--)	Ion exchange and gel filtration	6.0	70°C	4.0	0.80 mg/mL
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	66	(--)		5.0	70°C	3.8-4.0	3.5 mM*
<i>A. oryzae</i>	68.4	Glycoprotein (7.8%)	Ethanol precipitation and affinity chromatography using acarbose	4.0-4.5	56°C		
<i>Curvularia lunata</i>	66	(-)	Ammonium sulfate precipitation, gel filtration, and ion exchange	4.0	50°C		
<i>Trichoderma reesei</i>	66	(-)	Ammonium sulfate precipitation, ion exchange, and gel filtration	5.5	70°C	4	0.11 mg/mL
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	75	Glycoprotein (3.27%)		4.4-5.6	70°C	4.1-4.3	0.80 mg/mL
<i>Cephalosporium eichhorniae</i>	28.85	Glycoprotein (28%)	Membrane filtration and gel filtration	4.6	46°C	3.25	
<i>Scytalidium thermophilum</i>	86	Glycoprotein (25.5%)	Ion exchange	6.5	60°C	8.4	0.28 mg/mL
<i>Scytalidium thermophilum</i>	75	Glycoprotein (9.8%)		5.5	70°C	8.3	0.210 mg/mL
<i>Chaetomium thermophilum</i>	64	Glycoprotein (11.7%)	Ammonium sulfate precipitation, anion exchange, hydrophobic interaction chromatography	4.0	65°C		
<i>Humicola grisea</i>	74	Glycoprotein (5%)	Ultrafiltration and gel filtration	6.0	60°C		0.14 mg/mL
<i>H. grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	63	Glycoprotein (1.8%)		5.0	55°C		
<i>A. fumigatus</i>	42	Glycoprotein (23%)	Ammonium sulfate precipitation and ion exchange	4.5-5.5	65°C		0.1 mg/mL
<i>Fusarium solani</i>	40/41	(-)	Ammonium sulfate precipitation, gel filtration, anion exchange, and hydrophobic interaction chromatography	4.5	40°C		1.9 mg/mL
<i>Humicola</i> sp.	72.8	(-)	Anion exchange hydrophobic interaction chromatography	4.7	55°C		0.26 mg/mL
<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i>	42	Glycoprotein	Anion exchange and gel filtration	7.0	60°C	8.2	0.4 mg/mL