

UCH-FC
Biotecnología
S121
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE-FACULTAD DE CIENCIAS-ESCUELA DE PREGRADO

**“ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD MICOCIDA DE EXTRACTOS PROTEICOS
EXTRACELULARES DE LEVADURAS PSICROTOLERANTES”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

GABRIEL ALEJANDRO SOCÍAS ESQUIVEL

Director del Seminario de Título:
Dr. Marcelo Baeza Cancino

Octubre 2015
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr. Gabriel Socías Esquivel**

“ANÁLISIS DE ACTIVIDAD MICOCIDA DE EXTRACTOS PROTEICOS EXTRACELULARES DE LEVADURAS PSICROTOLERANTES”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Director Seminario de Título:

A handwritten signature in blue ink on a horizontal line.

Comisión Revisora y Evaluadora:

Presidente Comisión:

A handwritten signature in blue ink on a horizontal line.

Evaluador:

A handwritten signature in blue ink on a horizontal line.

Santiago de Chile, Octubre de 2015

BIOGRAFÍA



Nací el 26 de Junio de 1990 en la ciudad de Santiago. Hijo de Verónica Esquivel y Francisco Socías, y hermano de Alvaro Socías. Estudié en el colegio Stella Maris en la comuna de El Bosque desde kínder hasta cuarto medio, finalizando mi enseñanza media con promedio 6.9. A pesar de que siempre me ha gustado la biología, esta siempre me ha parecido difícil, ya que desde pequeño mi fuerte han sido la física y las matemáticas. Hasta cuarto medio pensé que estudiaría una carrera relacionada con números, sin embargo, me decidí por entrar al programa académico de Bachillerato en el año 2009. Fue allí donde logré aclarar mis dudas y opté finalmente por la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, la cual resultó ser un desafío para mí. Sin embargo, hoy puedo decir que la biología es realmente mi área y aunque tuve mis dudas, estoy feliz de haber seguido por este camino. Actualmente soy estudiante del programa de Magíster en Ciencias Biológicas de la Universidad de Chile y miembro del Laboratorio de Genética, del cual formo parte desde el año 2013.

A mi familia...

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mi familia y en especial a mi madre por el apoyo y el cuidado que me ha dado desde el momento en que nací hasta ahora, sin descanso alguno, dedicando el 100% de su tiempo al cuidado de mi hermano y mío. Esta tesis no es el resultado de mis años de estudio, sino que es una pequeña parte de tus logros como madre.

En segundo lugar, agradezco al Dr. Victor Cifuentes y a la Dra. Jennifer Alcaino por permitirme formar parte del Laboratorio de Genética y en especial al Dr. Marcelo Baeza, quien no sólo me abrió las puertas del laboratorio, sino que también ha dedicado su tiempo para guiar en mi formación profesional y personal, gracias por la confianza. También agradezco a Dony y Salva quienes siempre están dispuestos a ayudarme y me han salvado de apuros incontables veces, a Mario y Pablo, agradezco la buena onda y el tiempo que han dedicado para enseñarme todo lo necesario para llevar a cabo mis experimentos, a Rafa, Sole, Nicol y Pame por la enorme ayuda que me han dado en todo este tiempo, a Evelin y Yassef por su amistad y apoyo siempre y al resto del equipo de GenLab por su paciencia y por los momentos compartidos,

A mis amigos Yassef, Pame, Claudio, Ernesto y JP, quienes han hecho de estos casi siete años de estudio algo inolvidable, a los amigos de toda la vida, Matías, Mauricio, Kathy, Claudia y Pablo, quienes a pesar de estar lejos o de haber seguido por caminos diferentes, la amistad jamás se ha perdido y a los amigos que he conocido en el último tiempo, Emilio, Lucas y Diego. Gracias por el apoyo.

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE MATERIAS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS.....	12
3. OBJETIVO.....	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS	14
4.1. Materiales.....	14
4.1.1. Cepas.....	14
4.1.2. Reactivos químicos	14
4.2. Métodos.....	14
4.2.1. Medio de cultivo	14
4.2.2. Extracción de proteínas extracelulares totales	14
4.2.3. Fraccionamiento de proteínas	16
4.2.4. Ensayo de actividad micocida a partir de extractos proteicos.....	16
4.2.5. Ensayo de actividad micocida a partir de colonias	17
4.2.6. Electroforesis de proteínas	17
5. RESULTADOS.....	20
5.1. Actividad micocida: Análisis de extractos proteicos extracelulares totales.....	20
5.2. Fraccionamiento de proteínas	25
5.3. Electroforesis de proteínas	28
6. DISCUSIÓN	32
7. CONCLUSIONES	36
8. BIBLIOGRAFÍA	37

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Ensayos cruzados de actividad micocida a partir de colonias	10
Tabla 2: Levaduras antárticas.....	15
Tabla 3: Ensayos cruzados de actividad micocida a partir de extractos proteicos.....	21
Tabla 4: Actividad micocida de las fracciones obtenidas por precipitación con sulfato de amonio.....	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Efecto antimicótico producido por diferentes levaduras sobre un césped sensible de <i>Rhodotorula laryngis</i>	3
Figura 2: Ciclo de replicación de un virus killer y de su virus helper	6
Figura 3: Vía secretora de una toxina killer en <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	8
Figura 4: Halo de muerte producido por la actividad micocida de un extracto proteico .	18
Figura 5: Actividad micocida de extractos proteicos extracelulares.....	22
Figura 6: Actividad micocida de <i>Candida sake</i>	24
Figura 7: Actividad micocida de extractos proteicos extracelulares (<i>C. parapilopsis</i> y <i>W. anomalus</i>) extraídos con sulfato de amonio al 20, 40, 60 y 80% de saturación	27
Figura 8: Actividad micocida de extractos proteicos extracelulares (<i>M. gélida</i> y <i>Leuconeuospora sp1</i>) extraídos con sulfato de amonio al 20, 40, 60 y 80% de saturación	29
Figura 9: Perfil proteico del extracto extracelular de <i>W. anomalus</i> , <i>C. parapilopsis</i> , <i>M gélida</i> y <i>Leuconeuospora sp2</i>	30

RESUMEN

El continente antártico es uno de los ambientes más extremos del planeta, sin embargo, es el hábitat de una gran variedad de microorganismos, entre los que se incluyen las levaduras, de las cuales tenemos un escaso conocimiento. El estudio de levaduras de origen antártico, y ambientes fríos en general, ha aumentado principalmente debido a su potencial biotecnológico en el cual las enzimas activas a baja temperatura, tales como lipasas, xilanasas y proteasas, entre otras, son de gran interés en diferentes áreas industriales. Por otro lado, la actividad llamada "killer", propuesta como mecanismo de competencia, sólo ha sido estudiada a partir de levaduras mesófilas y poco se sabe acerca de ella en levaduras desde ambientes fríos y en especial desde la región antártica.

El fenómeno killer fue descubierto en 1963 en una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* la cual era capaz de secretar proteínas (toxinas killer o micocinas) con la capacidad de matar células sensibles de género igual o relacionado sin un contacto directo célula-célula. Este fenómeno es muy frecuente en levaduras y representa un mecanismo de competición por interferencia, donde la producción de micocinas impide al competidor tomar acceso a los recursos. Las bases genéticas de este fenómeno son variables y la toxina puede ser codificada tanto por genes nucleares como por elementos genéticos extracromosómicos, sin embargo, todas las micocinas descritas son producidas óptimamente durante la fase de crecimiento exponencial y en general tiene un perfil de actividad de pH bajo. Las levaduras micocinogénicas, así como sus toxinas, han sido utilizadas en las últimas décadas principalmente en la industria fermentativa para combatir los contaminantes que pueden aparecer durante la producción de vino, cerveza

y pan, aunque también presentan gran utilidad en medicina, para el tratamiento de infecciones por hongos en humanos y animales, y biología molecular, para estudiar los mecanismos de procesamiento y secreción de proteínas, entre otros.

En estudios anteriores de nuestro grupo, 21 cepas de levadura aisladas de muestras de suelo de la Isla Rey Jorge del territorio antártico chileno fueron analizadas para determinar si este mecanismo de competencia está presente en ecosistemas antárticos. Se determinó, a partir de ensayos realizados en colonia, que 20 de las 21 cepas presentaban actividad micocida contra al menos una especie de levadura. Este tipo de ensayos, si bien permite determinar la existencia del fenotipo, no entrega información de la naturaleza del factor responsable de la actividad y tampoco si es secretado al medio o no. En el presente trabajo se analizó la actividad killer de las 20 cepas de levaduras que inicialmente mostraron actividad antimicótica en ensayos a partir de colonia, agregando al ensayo cuatro nuevas levaduras, de las cuales no se tenía ningún antecedente con respecto al fenotipo killer. El ensayo fue llevado a cabo utilizando extractos proteicos extracelular obtenidos desde cultivos celulares, con lo cual se determinó que al menos nueve de las 24 levaduras analizadas secretan algún tipo de micocina, entre las cuales destacan *Candida parapilopsis* y *Wickerhamomyces anomalus* por su amplio rango de actividad y diámetro e intensidad de halo de muerte generado. En la mayoría de las cepas analizadas, la actividad killer se mantuvo en la fracción obtenida al precipitar las proteínas con una saturación de sulfato de amonio del 80% y mediante SDS-PAGE se identificó una banda correspondiente a 7-9 kDa, la cual podría corresponder a algún tipo de micocina.

ABSTRACT

The continent of Antarctica is considered one of the most extreme environments in the planet; however, it is the habitat of microorganism such as the yeasts, which are still poorly known. The study of yeasts from Antarctic and others cold environments has increased mainly due to its potential application in biotechnology, in which the cold-active enzymes produced by these yeasts, such as lipase, xylanase and protease are of great interest in different industrial areas. On the other hand, the phenomenon called "killer" activity, proposed as a competition mechanism, has been studied only in mesophilic yeasts and little is known in yeasts from cold environment and especially from Antarctic.

The killer phenomenon was discovered in 1963 in a *Saccharomyces cerevisiae* strain that was able to secrete a protein (killer toxin or mycocin), which kills sensitive cells of the same or related yeast genera without direct cell to cell contact. This phenomenon is very frequent among yeast and represents a mechanism of interference competition, where the production of mycocins prevents a competitor from gaining access to resources.

The genetic basis for this phenomenon is variable and the toxin can be encoded by the nuclear genes or by extrachromosomal genetic elements. All described mycocins are optimally produced during exponential phase of growth when resources are abundant and in general are more active at low pH values.

Killer toxins and toxin-producing killer yeast have been used during last decades principally in fermentation industries to control contaminating yeasts during the production of wine, beer and bread. Furthermore, killer yeasts are very useful in medicine, in the treatment of human and animal fungal infections and in molecular biology, as model system to study the mechanism of protein processing and secretion.

In previous studies of our group, 21 yeast strains isolated from soil samples of the Isla Rey Jorge in the Antarctic region were analyzed to determine if this mechanism of competition is present in Antarctic ecosystems. A total of 20 of 21 yeast strain studied showed killer activity against at least one yeast species, in colony assays. With this kind of assay it can be determined the existence of the phenotype, but no the nature of the factor responsible of the activity nor if it is excreted to the medium.

In the current work, it was analyzed the killer activity using the extracellular protein extracts obtained from culture of 25 yeast strains, of which was determined that at least nine of these yeast can excrete some kind of mycocin, among which *C. parapilopsis* and *W. anomalus* showed the best activity range and produce the bigger death halo. In every yeast strain analyzed, the killer activity was remained in the fraction 80 and by SDS-PAGE, it was founded a 7-9 kDa protein band in the fraction 80 of the analyzed extracts, which probably correspond to some kind of mycocin.

1. INTRODUCCIÓN

El continente antártico ocupa un área de 14 millones de kilómetros cuadrados y está cubierto en un 99% por hielo y nieve. Además de ser muy helado, el continente antártico es también uno de los lugares más secos y ventosos de todos los hábitats conocidos, el cual está sometido a altas tasas de radiación solar, por lo que se considera un hábitat muy extremo. Sin embargo, a pesar de estas condiciones, el continente antártico posee una enorme riqueza biológica, siendo el hospedero de un gran número de bacterias, levaduras, hongos, líquenes, invertebrados, aves y mamíferos (Satyanara y col, 2009). A los microorganismos de origen antártico y regiones frías en general, se les conoce como psicrófilos o psicrotolerantes. El término psicrófilo (originalmente descrito para bacterias) hace referencia a aquellos microorganismos capaces de crecer a temperaturas cercanas a 0°C, siendo su temperatura óptima de crecimiento de 15 °C o menor y su temperatura máxima de crecimiento debe estar por debajo de 20°C, mientras que los microorganismos psicrotolerantes, a pesar de crecer a temperaturas cercanas a 0°C, su temperatura óptima de crecimiento es de 20 a 40°C (Castillo y cols, 2005).

Las levaduras son un grupo de microorganismos eucariontes capaces de sobrevivir en un extenso rango de hábitats diferentes. Debido a su habilidad única para sobrevivir y crecer a bajas temperaturas, las levaduras de origen antártico han ido adquiriendo cada vez más relevancia, ya que la obtención de enzimas activas a bajas temperaturas, tales como lipasas, xilanasas, fitasas y proteasas, entre otras, son de gran interés en el área de la biotecnología industrial (Satyanarayana y col, 2009, Liu y col, 2012). Además de estas enzimas, las toxinas killer han ido ganando interés en las últimas décadas debido a

su potencial biotecnológico en diferentes áreas. Sin embargo, esta actividad se ha estudiado principalmente en levaduras mesófilas, y muy poco se sabe de ellas y de sus toxinas a partir de levaduras obtenidas de ambientes fríos como la Antártica (Hua y col, 2010), siendo la levadura *Mrakia frigida* el único reporte de una levadura psicrófila que presenta el fenotipo killer (Hua y col. 2010).

Toxinas Killer (Micocinas)

En contraste a los antibióticos antibacteriales, bacteriófagos y bacteriocinas, que fueron descritos a comienzos del último siglo, un fenómeno similar fue demostrado en levaduras mucho más tarde, en 1963, cuando Bevan y Makover descubrieron una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* capaz de matar células de género igual o relacionado. (Schmitt & Breinig, 2002). El descubrimiento de esta cepa de *Saccharomyces cerevisiae* capaz de secretar proteínas o glicoproteínas, llamadas toxinas killer, y su asociación fenotípica con la presencia de virus de RNA de doble hebra (dsRNA) heredados citoplasmáticamente, marcó el comienzo de las investigaciones dentro del campo de la virología en levaduras en los inicios de la década del 70 (Schmitt & Breinig, 2006). Estas toxinas pueden matar a células sensibles de género igual o relacionado sin un contacto directo célula-célula, pero resultan inactivas contra bacterias y protozoos (Salgado y col, 2002). Aunque las cepas killer son por si mismas inmunes a su propia toxina, permanecen susceptibles a las toxinas secretadas por otras cepas (Schmitt & Breinig, 2002) (Figura 1).

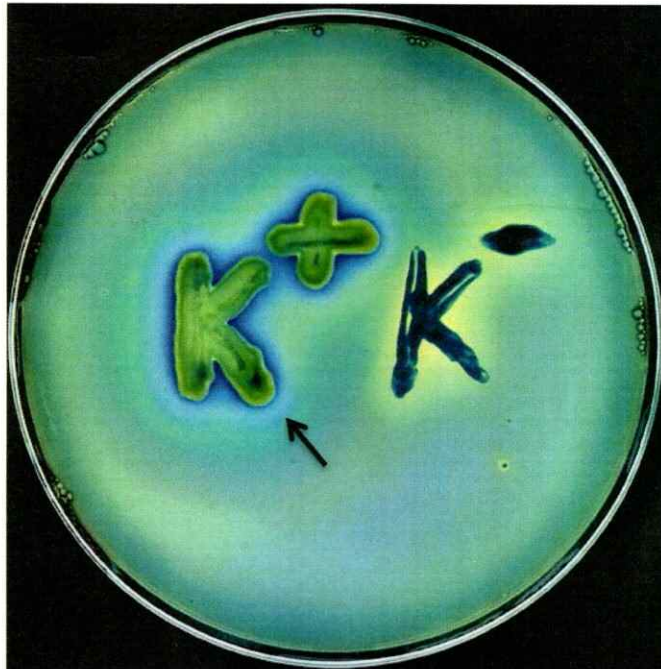


Figura 1: Efecto antimicótico producido por diferentes levaduras sobre un césped sensible de *Rhodotorula laryngis*. *Wickerhamomyces anomalus* (izquierda) presenta el fenotipo killer y secreta una toxina que difunde en el agar e impide el crecimiento de *Rhodotorula laryngis*, mientras que *Leucosporidiella fragaria* (derecha) no presenta el fenotipo killer y no produce ningún efecto sobre *Rhodotorula laryngis*. El halo de coloración azul (flecha) indica que las células han muerto por efecto de la toxina.

Dentro de poco llegó a ser evidente que las cepas killer productoras de toxinas tienen una importante actividad antimicótica y no están restringidas sólo a *Saccharomyces cerevisiae*, sino que son encontradas frecuentemente en otras especies y géneros de levaduras (Schmitt & Breinig, 2006, Hodgson y col, 1995). Las toxinas fueron llamadas micocinas y las cepas killer, micocinogénicas, en orden de enfatizar la naturaleza general de esta interacción antagónica (El Baz & Shetaia, 2005). El fenotipo killer es muy frecuente en levaduras y puede ser encontrado tanto en cepas ambientales como en colecciones de laboratorio (Schmitt & Breinig, 2002) y la naturaleza de este fenómeno en levaduras, bacterias y protistas sugiere que este es un mecanismo natural de competición por interferencia, donde la producción de un compuesto tóxico impide al competidor tomar acceso a los recursos del medio, resultando en una disminución en el tamaño de la población de la especie menos competitiva (Starmer y col, 1987). Además, ha sido demostrado que las toxinas pueden afectar directamente la distribución de cepas sensibles a ellas, e indirectamente, la distribución de otras levaduras que interactúan con estas últimas (Ganter & Starmer, 1991). El rol ecológico del fenómeno killer en levaduras ha sido estudiado extensamente en comunidades de levaduras, principalmente en frutas y tallos en descomposición, y en moho en crecimiento. Un cuarto de las cepas de levaduras aisladas de frutas son micocinogénicas, por lo que las frutas parecen ser uno de los hábitats más importantes para el fenómeno killer, tanto por su bajo pH como por su alta concentración de azúcar. En la naturaleza, algunas levaduras requieren de vectores eficientes tales como insectos para transferirse de un medio a otro, y las frutas son visitadas por una gran variedad de vectores de levaduras, como *Drosophila species*. El rol del fenómeno killer es de vital importancia en este tipo de sistemas en el cual los

insectos pueden llevar diferentes levaduras las cuales son capaces de colonizar los medios en que el insecto se deposita (Magliani y col, 1997).

Estudios han revelado que en la mayoría de las cepas Killer de *Saccharomyces cerevisiae*, la toxina es codificada por un dsRNA lineal (Kurtzman & Fell, 1998, Wickner, 1996), sin embargo, las bases genéticas de este fenotipo son variables y la toxina puede estar codificada por genes nucleares o por elementos genéticos extracromosómicos, tales como plásmidos lineales de dsDNA o moléculas de dsRNA encapsuladas dentro de partículas tipo-virus (VLPs; Virus Like Particles) (Figura 2) (Magliani y col, 1997).

Todas las micocinas estudiadas son de naturaleza proteicas y tienen un peso molecular que varía entre 10 y 20 kDa, aunque se han encontrado micocinas cuyo peso molecular alcanza los 100 kDa (Kurtzman & Fell, 1998). Las toxinas son producidas óptimamente durante la fase de crecimiento exponencial, cuando los recursos son abundantes, y en general tienen mayor actividad a pH bajo, 3 a 6, con un rango óptimo de pH entre 4 y 5 (Kurtzman & Fell, 1998; Starmer y col, 1987), por lo que una de las condiciones más importantes para la detección de la actividad killer es el pH del medio de cultivo usado en los ensayos. Además, las micocinas son más estables en medio sólido, ya que la agitación puede causar su inactivación debido a la formación de puentes disulfuro entre residuos de cisteína de la toxina (Wilson & Whittaker, 1989). La relación entre el tamaño del inóculo de la cepa sensible y la cepa micocinogénica influencia en la sensibilidad del ensayo y en algunos casos, la adición de glicerol 10-15% incrementa el tamaño del halo de inhibición y facilita su interpretación (Lehmann y col, 1987).

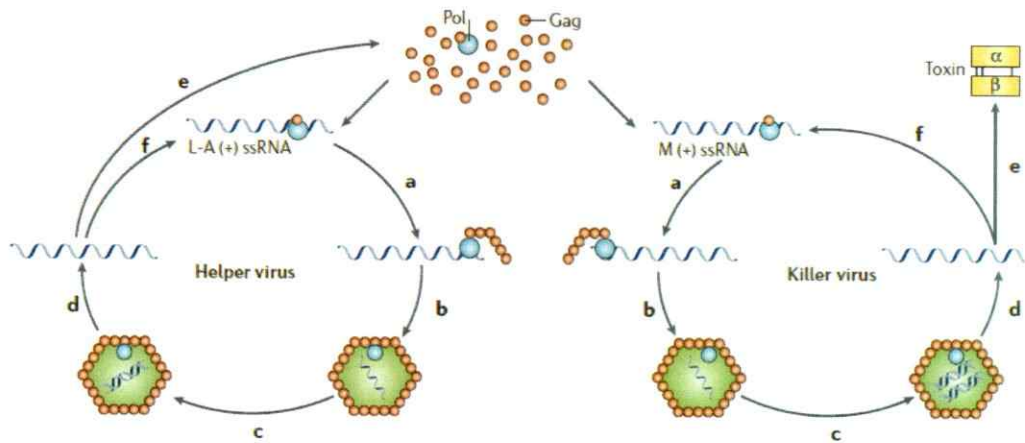


Figura 2: Ciclo de replicación de un virus killer y de su virus helper. Tanto el virus killer (M) como el virus helper (L-A) son virus de RNA de doble hebra. Ambos compiten por las proteínas virales Gag y Gag-Pol codificadas por el virus helper, las cuales son esenciales para (a) encapsidación del RNA de hebra simple, (b) ensamblaje del virión, (c) síntesis de la hebra negativa de RNA (replicación), (d) síntesis de la hebra positiva de RNA (transcripción) y liberación de la partícula dentro del citosol, (e) traducción del RNA de hebra simple y (f) unión al RNA de hebra simple.

Sistema Killer en *Saccharomyces cerevisiae*

El sistema killer más estudiado hasta ahora es el de *Saccharomyces cerevisiae*, el cual ha sido descrito en detalle en una extensa lista de revisiones. Las toxinas killer de *Saccharomyces cerevisiae*, llamadas K1, K2 y K28, son codificadas por diferentes dsRNA satélites, llamados M1, M2 y M28, respectivamente, los cuales son heredados citoplasmáticamente y encapsidados en VLPs. Para su replicación y encapsidación dependen de otro grupo de virus, llamados helper (L-A) (Figura 2) (Manfred & Schmitt, 2006, Marquina y col, 2002, Wickner, 1996). Inicialmente, la toxina es sintetizada como una pre-protóxina la cual es modificada post traduccionalmente en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi, lo que termina con la secreción de una toxina madura a través de vesículas secretoras (Figura 3) (Marquina y col, 2002). La cantidad de toxina en el medio extracelular puede disminuir debido a la presencia de proteasas y a la unión a receptores para la toxina en la propia cepa productora (Hutchins & Busset, 1983). A pesar de que las cepas micocinogénicas poseen receptores para la toxina, ellas permanecen inmunes a esta (Marquina y col, 2002).

Las principales toxinas de *Saccharomyces cerevisiae* son llamadas K1 y K2 y son muy similares en su modo de acción. Estas actúan a nivel de membrana, interactuando con el receptor de la pared celular, (1→6)-β-D-glucano, de la célula sensible, y luego, a través de una reacción dependiente de energía, la toxina produce daño en la membrana plasmática, generando un poro por el que pueden transitar inicialmente protones y iones de potasio, y luego, en un estado más avanzado, moléculas de mayor masa molecular

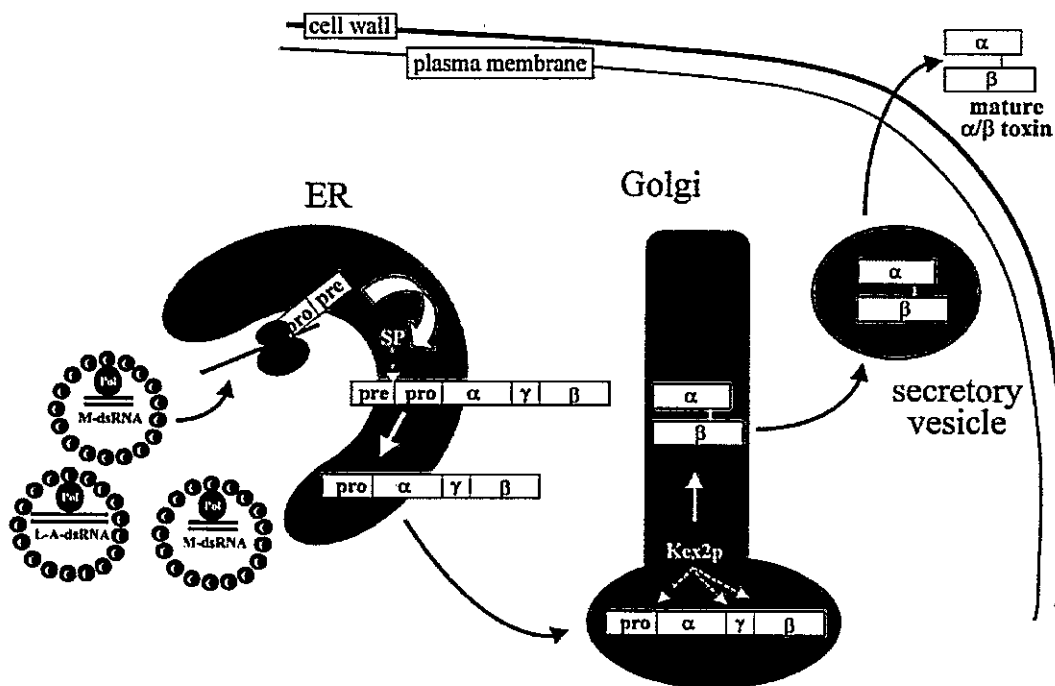


Figura 3: Vía secretora de una toxina killer en *Sacharomyces cerevisiae*. Luego de la traducción de la pre-prototoxina, esta es importada al retículo endoplásmico donde la señal de secreción N-terminal es removida por clivaje. En un compartimiento del aparato de Golgi, la endopeptidasa Kex2p corta la región pro y remueve la secuencia intramolecular γ y finalmente dirige la secreción de la toxina madura a través de vesículas secretoras.

tales como glucosa y ATP, alterando la permeabilidad y el gradiente electroquímico de la membrana, lo que conlleva a la muerte celular (Bussey y col, 1982).

Aplicaciones

Durante las últimas tres décadas, las levaduras killer y sus toxinas han sido de utilidad en diferentes áreas (Schmitt & Breinig, 2002). Estas han sido usadas como modelo de estudio para entender los mecanismos de regulación en el procesamiento, secreción e interacción de toxinas con células sensibles en eucariontes. También, el sistema killer de levaduras provee un modelo útil para el estudio del control y expresión de virus eucariontes. Además, este fenómeno tiene utilidad biotecnológica en la industria de bebidas fermentadas y en medicina, en el desarrollo de nuevos antimicóticos para el tratamiento de infecciones por hongos en humanos y animales, en la preservación de alimentos (levaduras como agentes de bio-control), en el biotipificado de levaduras patógenas de importancia médica y en el área de tecnología de DNA recombinante, en la cual el plásmido killer de *S. cerevisiae* y de *K. lactis* tienen el potencial de servir como vector de clonación para la secreción efectiva de polipéptidos (Schmitt & Breinig, 2002; Marquina y col, 2002).

En trabajos previos, nuestro grupo evaluó la actividad micocida cruzada de 21 cepas de levadura aisladas de muestras de suelo obtenidas de la Isla Rey Jorge del territorio antártico chileno (Tabla 1). El ensayo se efectuó sembrando las levaduras sobre un césped confeccionado con otras levaduras, con lo que se determinó que 20 de las especies de levadura ensayadas presentan el fenotipo killer. Sin embargo, debido a la

Tabla 1. Ensayos cruzados de actividad micocida a partir de colonias

Levaduras sembradas	Césped																								
	22°C						15°C						10°C												
	S.sal	Cr.gass	Cr.vic	Cr.gil	Cr.sp	H.wat	C.sak	D.fris	L.fra	R.lar	L.cre	C.sak	Cr.vic	Cr.gil	G.ant	M.sp1	M.blo	R.gla1	Le.sp1	Le.sp2	Cr.sp	M.bic	M.psy	R.gla2	
S.sal	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Cr.gass	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cr.vic	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cr.gil	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Cr.sp	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H.wat	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C.sak	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.fris	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R.lar	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L.cre	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L.fra	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G.ant	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W.ano	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M.sp1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M.blo	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M.psy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R.gla1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R.gla2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Le.sp1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Le.sp2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M.bic	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: No se observó halo de muerte; +: Halo entre 0,5 y 1,9mm; ++: Halo entre 2 y 4,9mm; +++: Halo >5mm.

S.sal: *Sporidiobolus salmonicolor*; Cr.gass: *Cryptococcus gastricus*; D.fris: *Dioszegia fristingensis*; L.fra: *Leucosporidiella fragariae*; R.lar: *Rhodotorula laryngis*; L.cre: *Leucosporidiella creatinivora*; C.sak: *Candida sake*; Cr.vic: *Cryptococcus victoreae*; Cr.gil: *Cryptococcus gilvescens*; G.ant: *Glaciozyma antarctica*; H.wat: *Hotermaniella watticus*; Mr.sp: *Mrakia sp.*; Mr.blo: *Mrakia lollopiis*; Mr.psy: *Mrakia psychrophila*; R.gla1: *Rhodotorula glacialis 1*; R.gla2: *Rhodotorula glacialis 2*; Le.sp1: *Leuconeurospora. sp1*; Le.sp2: *Leuconeurospora. sp2*; W.ano: *Wickerhamomyces anomalus*; M.bic: *Metschnikowia bicuspidata*.

naturaleza del ensayo realizado, no es posible afirmar que dicha actividad se deba a un factor de naturaleza proteica excretado al medio, ya que otros tipos de antagonismo, tales como desplazamiento por competencia, acidificación del medio y/o secreción de enzimas hidrolíticas también podrían dar como resultado un fenotipo positivo.

El objetivo del presente trabajo fue confirmar si el fenotipo killer observado previamente es debido a un factor de naturaleza proteica que es excretado al medio. Por ello, los análisis se realizaron usando extractos proteicos extracelulares obtenidos a partir de las 20 cepas de levaduras que inicialmente mostraron actividad antimicótica en ensayos a partir de colonia, agregando cuatro nuevas especies de levadura al ensayo (*Mrakia gélida*, *Rhodotorula musilaginosa*, *Mrakia roberti* y *Candida parasilopsis*), de las cuales no se tenía ningún antecedente con respecto al fenotipo killer.

2. HIPÓTESIS

El fenotipo killer observado en las levaduras antárticas se debe a factores de naturaleza proteica excretados al medio.

3. OBJETIVO

Objetivo General

Determinar si la actividad antimicótica de levaduras corresponde a un factor de naturaleza proteica que es excretado al medio.

Objetivos Específicos

1. Extracción de las proteínas extracelulares totales desde cultivos celulares y análisis de su actividad antimicótica.
2. Fraccionamiento de las muestras que poseen actividad antimicótica y determinación de la fracción con actividad.
3. Caracterización del perfil proteico de muestras que presentan actividad antimicótica.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Cepas

Las cepas fueron aisladas de muestras de suelo recolectadas de la Isla Rey Jorge ubicada en el territorio Antártico Chileno y se encuentran listadas en la Tabla 2.

4.1.2. Reactivos químicos

Los componentes del medio de cultivo y los reactivos químicos se adquirieron de Sigma Chemical, Merk y Difco Laboratorios.

4.2. Métodos

4.2.1. Medio de cultivo

Las células fueron crecidas en medio YM líquido conteniendo 1% de glucosa, 0,3% de extracto de levadura, 0,3% de extracto de malta y 0,5% de peptona, sometidas a una agitación de 160 rpm e incubadas a la temperatura óptima de crecimiento de cada cepa (Tabla 2). Placas con medio YM-MB (YM conteniendo 0,003% de azul de metileno y 1,5% agar) fueron utilizadas para el ensayo de actividad killer.

4.2.2. Extracción de proteínas extracelulares totales

50 ml de cultivos celulares fueron centrifugados a 6.000xg durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de fluoruro de polivinilideno de

Tabla 2. Levaduras antárticas

Levaduras antárticas	
Cepa	Temperatura óptima de crecimiento
<i>W. anomalus</i>	30°C
<i>R. musilaginosa</i>	
<i>C. parapilopsis</i>	
<i>Le. creatinivora</i>	22°C
<i>C. sake</i>	
<i>D. fristingensis</i>	
<i>Sp. Salmonicolor</i>	
<i>R. laryngis</i>	
<i>Cr. victoriae</i>	
<i>Cr. Gastricus</i>	
<i>Cr. Gilvescens</i>	
<i>H. waticus</i>	
<i>M. gélida</i>	
<i>M. roberti</i>	
<i>G. antartica</i>	
<i>Mrakia sp1</i>	
<i>M. blollopis</i>	
<i>R. glacialis 1</i>	
<i>Leuconeurospora. sp1</i>	
<i>Leuconeurospora. sp2</i>	
<i>Cr. sp</i>	
<i>M. bicuspidata</i>	10°C
<i>M. psychrophila</i>	
<i>R. glacialis 2</i>	

Se muestran las 24 levaduras utilizadas para los ensayos de actividad micocida en placa. Las levaduras están agrupadas de acuerdo a su temperatura óptima de crecimiento.

0,45 mm (Millipore). Al sobrenadante se le adicionó gradualmente sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta alcanzar una saturación del 80% y las muestras fueron centrifugadas a 9.000xg durante 15 minutos para precipitar las proteínas. Finalmente, el pellet de proteínas fue suspendido en 1,5 ml de buffer Tris-HCl 100 mM pH 7, dializadas con Tris-HCl por 24 horas a 4°C para quitar la sal y guardadas con glicerol a -20°C hasta su análisis.

4.2.3. Fraccionamiento de proteínas

200 ml de cultivo fueron centrifugados a 6.000xg durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de fluoruro de polivinilideno de 0,45 mm (Millipore). Al sobrenadante se le adicionó secuencialmente sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta alcanzar una saturación del 20%, 40%, 60% y 80%. Cada fracción fue centrifugada a 9.000xg durante 15 minutos. El pellet fue suspendido en 5 ml de buffer Tris-HCl 100 mM pH 7, dializadas con Tris-HCl por 24 horas a 4°C y guardadas con glicerol a -20°C hasta su análisis. Sólo fueron sometidas a fraccionamiento las levaduras *C. parapilopsis*, *W. anomalus*, *M. gelida*, *Leuconeuropa sp1*, *Leuconeuropa sp2* y *R. musilaginosa*.

4.2.4. Ensayo de actividad micocida a partir de extractos proteicos

El fenotipo killer fue determinado mediante la técnica MBA (methylene blue agar) de Somer y Bevan (1969). El césped sensible fue preparado mezclando 5 ml de cultivo fresco con 50 ml de YM-MB conteniendo azul de metileno al 0,003%, a 45°C. Una vez gelificado el agar, se perforaron pocillos de 10 mm de diámetro en el césped y se

inocularon con 50 μ L de cada extracto proteico. El diámetro del halo de muerte fue medido luego de la incubación por 2 a 5 días a 10°C, 15°C o 22°C, según corresponda (Tabla 2). La actividad killer fue reconocida por una región de células coloreadas de azul o por una zona clara de inhibición delimitada por células coloreadas de azul alrededor de los pocillos (Figura 4). Si la cepa inoculada fue rodeada por un halo azul, la cepa fue designada como micocinogénica y el césped como sensible.

Para determinar la naturaleza proteica del extracto, las muestras fueron incubadas entre 90°C a 100°C durante 10 min y ensayadas sobre el césped sensible.

4.2.5. Ensayo de actividad micocida a partir de colonias

El césped sensible fue preparado mezclando 5 ml de cultivo fresco con 50 ml de YM-MB conteniendo azul de metileno al 0,003%, a 45°C. Una vez gelificado el agar, se sembraron las levaduras a ensayar. El halo de muerte fue visualizado luego de la incubación por 2 a 5 días a 10°C, 15°C o 22°C, según corresponda (Tabla 2). La actividad killer fue reconocida por una región de células coloreadas de azul o por una zona clara de inhibición delimitada por células coloreadas de azul alrededor de la colonia (Figura 1).

4.2.6. Electroforesis de proteínas

Para obtener el perfil proteico de las muestras de proteína, los extractos libres de células fueron separados en un gel SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). El gel separador fue preparado a una concentración final del 10% a partir de una solución stock de acrilamida al 30%, Tris 1,5M pH 8,8 y SDS, el cual fue polimerizado

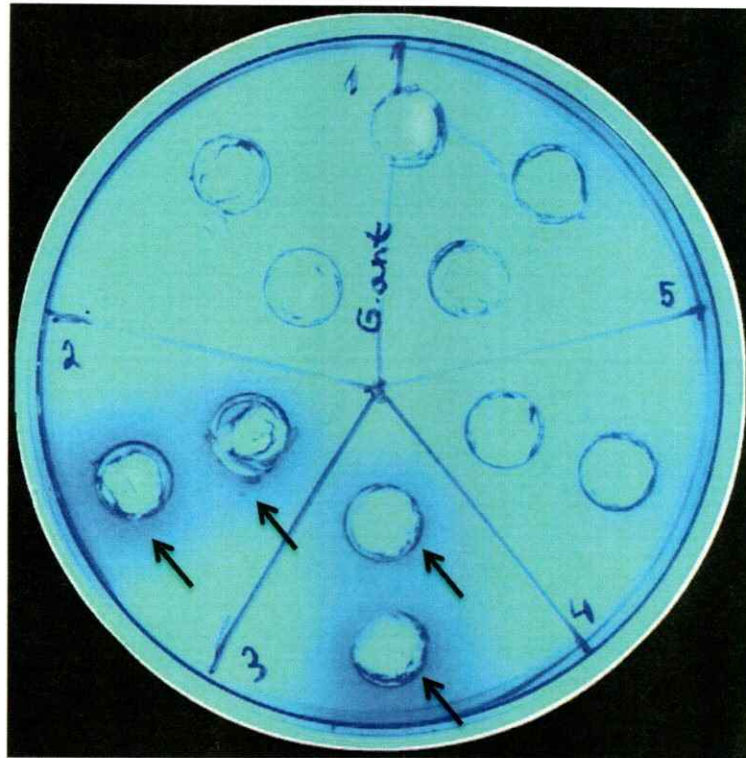


Figura 4: Halo de muerte producido por la actividad micocida de un extracto proteico. Efecto producido por el extracto proteico de una levadura micocinogénica sobre un césped sensible de *G. antártica*. Las flechas indican el precipitado de azul de metileno o halo de muerte.

químicamente por la adición de TEMED y persulfato de amonio, mientras que el gel concentrador fue preparado a una concentración final del 5% utilizando Tris 1 M pH 6,8. La composición del buffer de electroforesis fue de 1,51 g de Tris, 7,25 g de glicina, 5 mL de SDS al 10% y 500 mL de agua. Las muestras fueron preparadas homogenizando 30 μ L de cada extracto proteico con 10 μ L de buffer de carga denaturante, y luego fueron sometidas a un tratamiento térmico de 100°C durante 10 minutos. Las muestras fueron cargadas en el gel y separadas a un voltaje de 120 V, y finalmente teñidas con nitrato de plata (Rabilloud y cols, 1994) para observar las bandas en el gel. Para determinar el tamaño de las bandas se utilizó el marcador "PageRuler Prestained Protained Ladder" de la marca Thermo Scientific.

5. RESULTADOS

5.1. Actividad micocida: Análisis de extractos proteicos extracelulares totales

El azul de metileno es capaz de ingresar a las células muertas, por lo que un halo azul alrededor de los pocillos indica actividad micocida (Figura 4). El diámetro del halo de muerte fue medido luego de la incubación por 2 a 5 días a 10°C, 15°C o 22°C, de acuerdo a la temperatura óptima de crecimiento de cada cepa (Tabla 2).

La levadura *C. parapilopsis* fue la que presentó el mayor rango de actividad, tanto contra levaduras cuya temperatura óptima de crecimiento es de 10°C, 15°C y 22°C (Tabla 3), donde se incluyen levaduras del género *Cryptococcus*, *Dioszegia*, *Leucosporidiella*, *Rhodotorula*, *Mrakia* y *Leuconeurospora*, entre otras, lo que da cuenta de su amplio rango de actividad antimicótica. El halo de muerte generado por esta cepa presenta los mayores diámetros dentro en todos los ensayos, alcanzando un radio de hasta 5,6 mm contra *L. creatinivora* (Figura 5, A) y un mínimo de 3,8 mm contra *R. glacialis* 1. Además, es importante destacar que *C. parapilopsis* presenta actividad contra la levadura *Metschnikowia bicuspidata*, un patógeno de cangrejo.

W. anomalus presentó un gran espectro de acción, mostrando actividad contra levaduras cuya temperatura óptima de crecimiento es de 22°C y 15°C, y produciendo un halo de muerte de hasta 5,2 mm de radio contra un césped sensible de *Cr. gastricus* (figura 5, B). Sin embargo, a diferencia de *C. parapilopsis*, *W. anomalus* no presentó actividad contra las cepas *D. fristingensis*, *L. fragaria*, *L. creatinivora*, *R. glacialis* 1, *Leuconeurospora. sp1* y *Cryptococcus. sp.,* y tampoco contra levaduras cuya

Tabla 3. Ensayos cruzados de actividad micocida a partir de extractos proteicos

Extracto	Cásped																			
	22°C						15°C													
	S.sal	Cr. gas	D. fris	L. fra	R. lar	Lere	C. ssk	Cr. vic	C. gill	G. ani	M. sp1	M. blo	R. gl1	Le. sp1	Le. sp2	Cr. sp	M. psy	M. bic	R. gl2	
S.sal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cr. gas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cr. vic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cr. gill	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cr. sp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H. var	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. ssk	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D. fris	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R. lar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lere	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G. ani	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W. ano	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M. sp1	-	-	-	-	+++	-	++	+	+	++	++	++	-	-	++	-	-	-	-	-
M. blo	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M. psy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R. gl1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R. gl2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Le. sp1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
Le. sp2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M. bic	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-	-
M. ge	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R. mu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M. rob	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. pa	-	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	++	+++	++	++	++	++	+++	++	++	+++

.: No se evaluó actividad; -: No se observó halo de muerte; +: Halo entre 0,7 y 2,1mm; ++: Halo entre 2,2 y 4,4mm; +++: Halo >4,4mm.

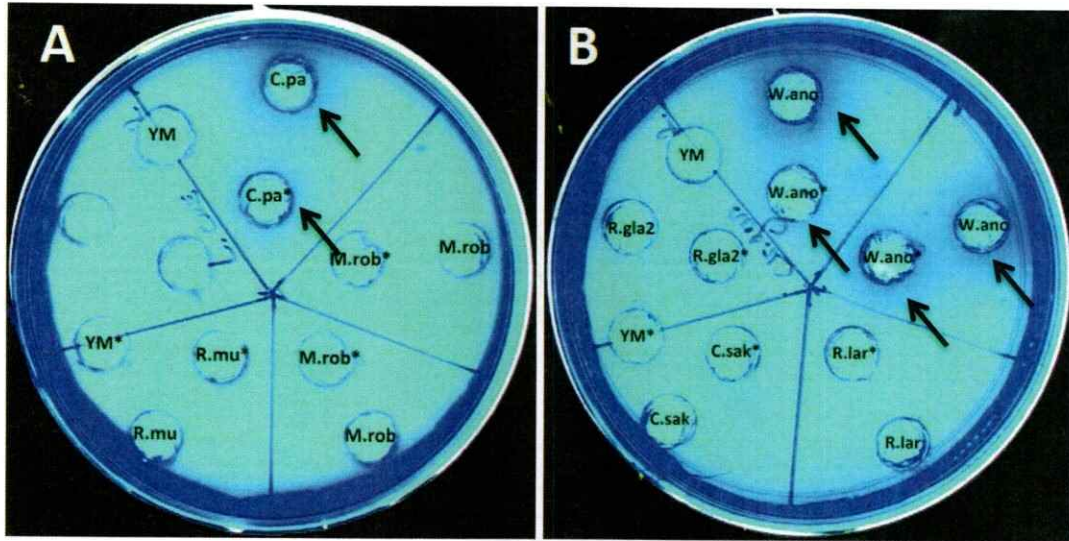


Figura 5: Actividad micocida de extractos proteicos extracelulares. A, efecto de los extractos proteicos obtenidos a partir de *R. musilaginosa* (*R. mu*), *M. roberti* (*M.rob*), *C. parapilopsis* (*C. pa*) y medio YM sin inocular (YM) sobre un césped de *L. creatinivora*. B, efecto de los extractos proteicos obtenidos a partir de *Rhodotorula glacialis 2* (*R. gla2*), *C. sake* (*C. sak*), *R. laryngis* (*R. lar*), *W. anomalus* (*W. ano*) y medio YM sin inocular (YM) sobre un césped de *Cr. gastricus*. Los nombres con asterisco corresponden a los extractos incubados a 90°C durante 10 minutos. Las flechas indican el precipitado de azul de metileno o halo de muerte.

temperatura óptima de crecimiento es de 10°C, tales como *M. psychrophila*, *M. victoriae* y *Rh. glacialis 2*.

M. gelida mostró actividad contra una gran variedad de especies de levaduras cuyo crecimiento óptimo es a 22°C y 15°C, sin embargo, los diámetros del halo de muerte fueron pequeños comparados con los halos producidos por *C. parapilopsis* y *W. anomalus*, y la intensidad de estos también fue menor. Levaduras como *C. sake*, *M. victoriae*, *Rh. mucilaginoso*, *Leuconeuropsora sp2*, *Lecosporidiella sp1* y *M. blollopis* revelaron un bajo espectro de acción, mostrando actividad contra 3, 3, 2, 4, 3 y 2 cepas, respectivamente, con un diámetro e intensidad de halo de muerte muy pequeño, entre las cuales destaca *C. sake* por la generación de halos blanco de inhibición en los céspedes sensibles (Figura 6 A y B). En cambio, levaduras como *S. salmonicolor*, *D. fristingensis*, *Cr. gastricus*, *Cr. victoriae*, *Cr. gilvescens*, *Cryptococcus. sp*, *H. waticus*, *R. laryngis*, *L. creatinivora*, *G. antarctica*, *M. psychrophila*, *R. glacialis 1*, *R. glacialis 2* y *M. roberti* no mostraron actividad contra ninguna de las levaduras ensayadas.

Los extractos proteicos fueron además incubados por 10 minutos a 100°C y ensayados sobre los céspedes sensibles. Los resultados muestran que la actividad micocida se perdió parcial o completamente luego del tratamiento térmico, lo que sugiere una naturaleza proteica de los factores secretados al medio (Figura 5 y 6). Además, se utilizó como control medio YM suplementado con glucosa al 1%, el cual no mostró actividad sobre ninguna de las levaduras sensibles, lo que permite descartar la influencia de alguno de los componentes del medio sobre los resultados obtenidos.

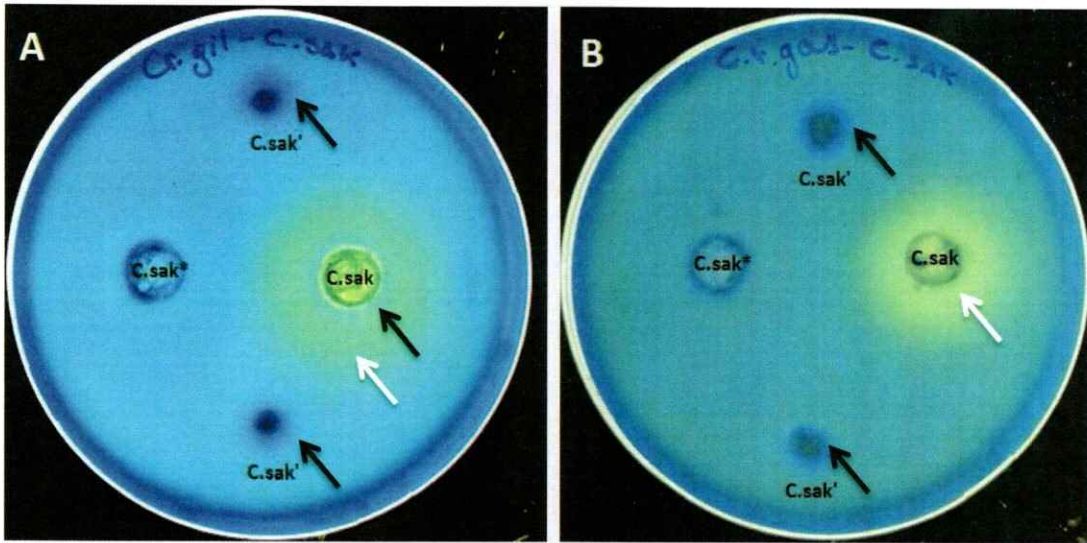


Figura 6: Actividad micocida de *C. sake*. A, efecto del extracto proteico de *C. sake* (*C. sake*) sobre un césped de *Cr. gilvoscens*. B, efecto del extracto proteico de *C. sake* sobre un césped de *Cr. gastricus*. Los nombres con asterisco corresponden a los extractos incubados a 90°C durante 10 minutos (*C. sake**) y los nombres con un apóstrofe al final corresponde a una colonia (*C. sake*'). Las flechas negras indican el precipitado de azul de metileno o halo de muerte y las flechas blancas, el halo de inhibición.

5.2. Fraccionamiento de proteínas

El fraccionamiento de proteínas se basa en la técnica salting out, la cual puede ser usada para separar proteínas basado en su solubilidad bajo la presencia de una elevada concentración de sal, de esta forma, mediante esta técnica se logra remover a las proteínas que son poco solubles de aquellas que son más solubles, haciendo de este un buen paso inicial de purificación de proteínas (Duong-Ly, K. y cols, 2014).

Una vez obtenido el perfil de actividad de los extractos proteicos de cada levadura, se seleccionaron las levaduras *C. parapilopsis*, *W. anomalus*, *M. gelida*, *Leuconeuospora sp1*, *Leuconeuospora sp2* y *R. musilaginosa* y se realizó el fraccionamiento de las proteínas extracelulares (Tabla 4). Las fracciones obtenidas para cada levadura corresponden a una precipitación de proteínas con sulfato de amonio a una saturación de 20%, 40%, 60% y 80%, llamadas fracción 20, fracción 40, fracción 60 y fracción 80, respectivamente.

Al ensayar *C. parapilopsis* sobre un césped sensible de *R. laryngis*, se observó un halo de 10 mm de radio en la fracción 80 (Figura 7, A), mostrando la actividad micocida más potente entre las cepas analizadas. De la misma forma, *W. anomalus* mostró una fuerte actividad micocida en la fracción 80, con un halo de muerte de radio 7 mm (Figura 7, B). Cabe destacar que ambas cepas mostraron actividad en la fracción 80 tanto en el extracto sin tratar así como también en la fracción incubada a 100°C por 10 minutos. Las cepas restantes, *M. gelida*, *Leuconeuospora sp1*, *Leuconeuospora sp2* y *R. musilaginosa*, todas mostraron una leve actividad en la fracción 80 y esta se perdió

Tabla 4. Actividad micocida de las fracciones obtenidas por precipitación con sulfato de amonio

		Césped Sensible (halo en mm)				
		R.lar	Cr.vic	M.sp1	Le.sp1	G.ant
Extracto	W.ano 20	-	nd	nd	nd	nd
	W.ano 40	-	nd	nd	nd	nd
	W.ano 60	-	nd	-	nd	-
	W.ano 80	7	nd	5,5	nd	5
	C.pa 20	-	nd	nd	nd	nd
	C.pa 40	-	nd	nd	nd	nd
	C.pa 60	-	nd	-	nd	-
	C.pa 80	9	nd	12	nd	7
	Le.sp1 20	-	-	nd	nd	nd
	Le.sp2 40	-	-	nd	nd	nd
	Le.sp1 60	nd	4	3	nd	nd
	Le.sp1 80	nd	2,5	1	nd	nd
	Le.sp2 20	nd	-	nd	nd	nd
	Le.sp2 40	nd	-	nd	nd	nd
	Le.sp2 60	nd	-	nd	nd	nd
	Le.sp2 80	nd	2,5	nd	nd	nd
	R.mu 20	nd	-	nd	nd	nd
	R.mu 40	nd	-	nd	nd	nd
	R.mu 60	nd	-	nd	nd	nd
	R.mu 80	nd	1	nd	nd	nd
M.ge 20	nd	-	nd	-	nd	
M.ge 40	nd	-	nd	-	nd	
M.ge 60	nd	-	nd	-	nd	
M.ge 80	nd	1,2	nd	1	nd	

nd: No determinado; -: No se observó halo de muerte; +: Halo entre 0,5 y 2,1mm; ++: Halo entre 2,2 y 4,4mm; +++: Halo >4,4mm

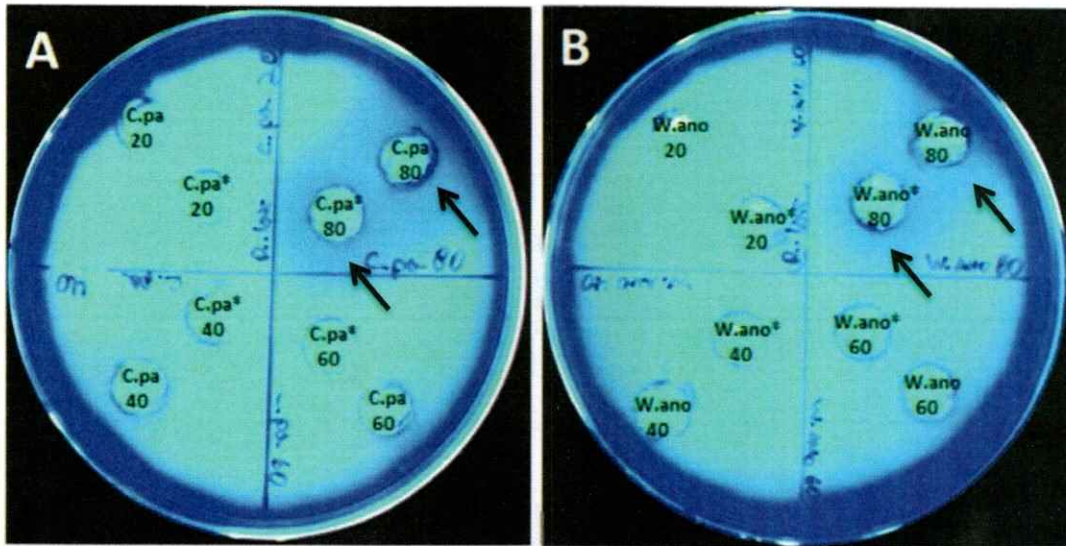


Figura 7: Actividad micocida de extractos proteicos extracelulares (*C. parapilopsis* y *W. anomalus*) obtenidos por precipitación con sulfato de amonio al 20, 40, 60 y 80% de saturación. A, efecto de *C. parapilopsis* (*C. pa*) sobre un césped de *R. laryngis*. B, efecto de *W. anomalus* sobre un césped de *R. laryngis*. Los nombres con asterisco (pocillos internos) corresponden a los extractos incubados a 100°C durante 10 minutos. Las flechas indican el precipitado de azul de metileno o halo de muerte observado en la fracción 80.

totalmente cuando la muestra fue sometida a tratamiento térmico, lo que sugiere un origen proteico de su actividad (figura 8, A y B). Sólo la levadura *Leuconeuropa sp1* mostró actividad en la fracción 60 (Figura 8, B).

5.3. Electroforesis de proteínas

Las muestras sometidas a fraccionamiento fueron separadas en un gel SDS-PAGE y teñidas con nitrato de plata para obtener el perfil proteico de los extractos extracelulares.

Se encontraron bandas correspondientes a proteínas de peso molecular 35 kDa, 40 kDa, 50 kDa, 55 kDa, 65 kDa, 70 kDa, 80 kDa, 100 kDa, 130 kDa, 150 kDa y 170 kDa, entre otras, principalmente en la fracción 80 de los extractos analizados.

El extracto de *W. anomalus* muestra bandas correspondientes a proteínas con masa molecular estimada de 7 kDa, 9 kDa, 36 kDa, 55 kDa, 60 kDa, 80 kDa y 120 kDa en la fracción 80, de las cuales sólo tres (55 kDa, 60 kDa y 80 kDa) aparecen también en la fracción 60 (Figura 9, carril 7 y 8). *C. parapilopsis* muestra un perfil similar, con bandas correspondientes a proteínas de masa molecular cercana a 36 kDa, 38 kDa, 42 kDa, 47 kDa, 60 kDa y 130 kDa en la fracción 80, de las cuales sólo una (42 kDa) aparece en la fracción 60 (Figura 9, carril 5 y 6). El perfil proteico de *M. gélida* muestra dos bandas de tamaño 8 kDa y 9 kDa y cinco bandas con un peso de 35 kDa a 130 kDa en la fracción 80, mientras que no se observan bandas en la fracción 60 (Figura 9, carril 3 y 4). Por último, el perfil de *Leuconeuropa sp2* muestra dos bandas pequeñas cercanas a 8 kDa y 9 kDa, y otras bandas de mayor tamaño, 35 kDa a 130 kDa, en la fracción 80, sin

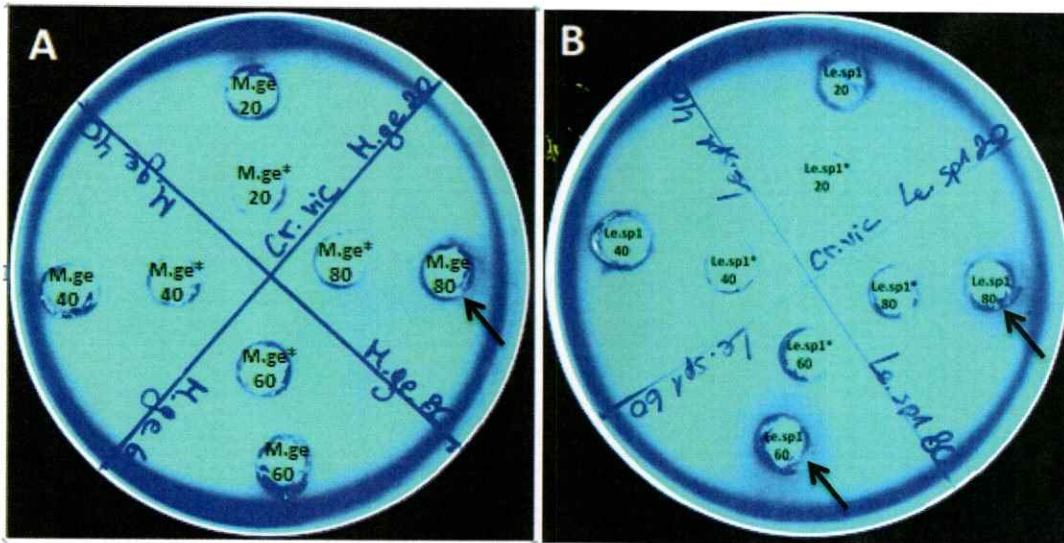


Figura 8: Actividad micocida de extractos proteicos extracelulares (*M. gélida* y *Leuconeuospora sp1*) obtenidos por precipitación con sulfato de amonio al 20, 40, 60 y 80% de saturación. A, efecto *M. gelida* sobre un césped de *Cr. victoriae*. B, efecto de *Leuconeuospora. Sp1* sobre un césped de *Cr. victoriae*. Los nombres con asterisco (pocillos internos) corresponden a los extractos incubados a 100°C durante 10 minutos. Las flechas indican el precipitado de azul de metileno o halo de muerte observado en la fracción 80.

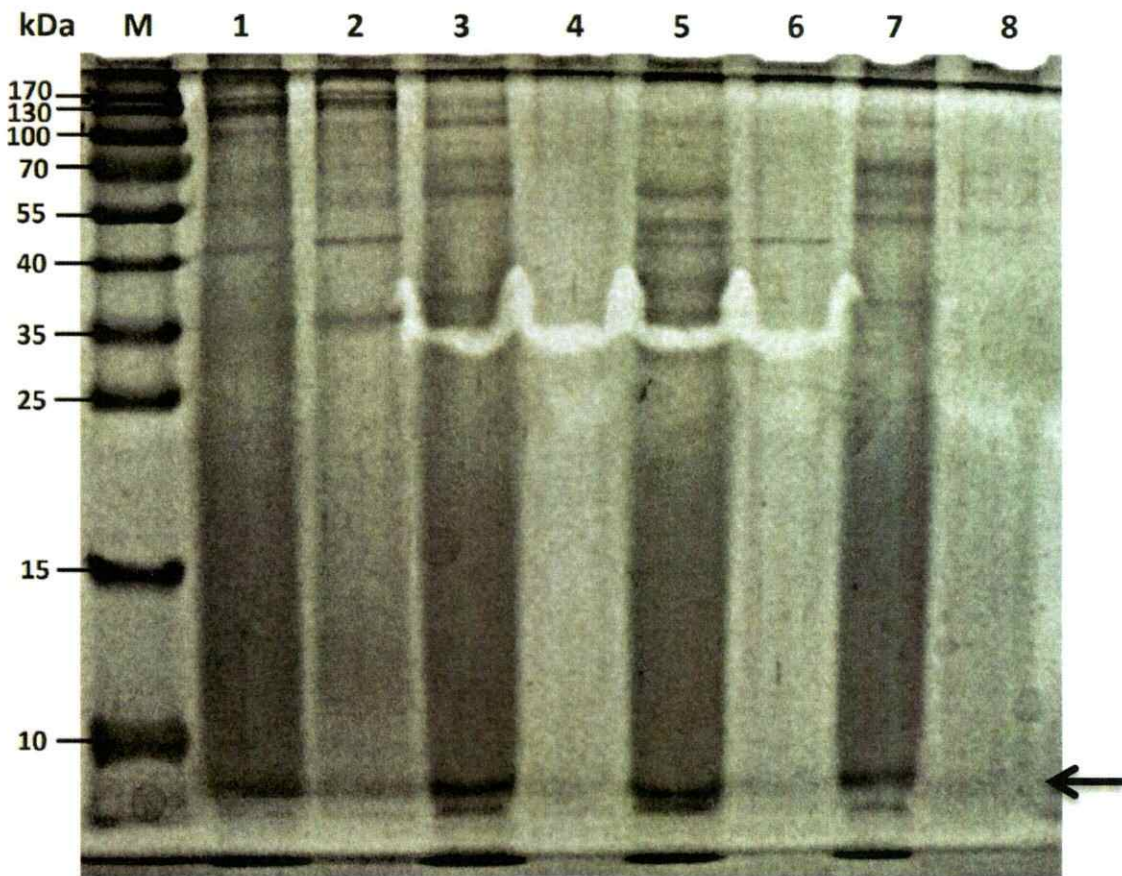


Figura 9: Perfil proteico del extracto extracelular de *W. anomalus*, *C. parapilopsis*, *M. gelida* y *Leuconeuospora sp2*. Las fracciones obtenidas fueron separadas en un gel SDS-PAGE para visualizar su perfil. M, Marcador. 1, *Leuconeuospora sp2* fracción 80. 2, *Leuconeuospora sp2* fracción 60. 3, *M. gelida* fracción 80. 4, *M. gelida* fracción 60. 5, *C. parapilopsis* fracción 80. 6, *C. parapilopsis* fracción 60. 7, *W. anomalos* fracción 80. 8, *W. anomalos* fracción 60. La flecha indica la banda la cual se presume corresponde a las micocinas.

embargo, estas bandas aparecen también en la fracción 60 con la misma intensidad (Figura 9, carril 1 y 2).

Una proteína con una masa estimada de 7 a 9 kDa fue la más abundante y común para todas las muestras, la cual aparece sólo en la fracción 80 (Figura 9).

6. DISCUSIÓN

En trabajos previos, todas las cepas analizadas (con excepción de *Mrakia gélida*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Mrakia roberti* y *Candida parapilopsis*, de las cuales no se contaba con antecedentes previos) mostraron actividad positiva en los ensayos a partir de colonias, sin embargo, en este estudio, no todas presentaron actividad a partir de su extracto proteico (Tabla 3).

De las 24 muestras analizadas, sólo nueve dieron actividad contra alguna levadura. *C. parapilopsis* y *W. anomalus* fueron las cepas cuyos extractos proteicos mostraron la mayor actividad, alcanzando un radio de hasta 5,6 y 5,2 mm de halo de muerte, respectivamente y un gran rango de actividad, matando a 18 y 9 de las cepas analizadas, respectivamente. *M. gelida* presentó un amplio rango de actividad pero con halo de muertes pequeños, por lo que a pesar de su gran espectro, su potencial podría ser menor que *C. parapilopsis* y *W. anomalus*. Las demás cepas mostraron un rango de actividad bajo (*C. sake*, *M. victoriae*, *R. mucilaginosa*, *Leuconeurospora sp2*, *Lecosporidiella sp1* y *M. blollopis*) con diámetros de halo de muertes muy pequeños, o no mostraron ninguna actividad (*S. salmonicolor*, *D. fristingensis*, *Cr. gastricus*, *Cr. victoriae*, *Cr. gilvescens*, *Cr. sp*, *H. watticus*, *R. laryngis*, *L. creatinivora*, *G. antartica*, *M. psychrophila*, *R. glacialis 1*, *R. glacialis 2* y *M. roberti*). Es importante destacar que un espectro bajo de actividad se relaciona con una mayor especificidad, por lo que esto podría ser conveniente cuando se desea matar a una especie de levadura sin afectar al resto. A pesar de que este estudio reporta actividad micocida por primera vez en estas especies de levaduras, los resultados se corresponden con los antecedentes, en los cuales cepas del

género *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Mrakia* y *Candida*, han sido reportadas con actividad killer anteriormente (Magliani y col, 1997, Liu y col, 2012, Kurtzman & Fell, 1998)

Diferentes motivos podrían resultar en un fenotipo positivo a partir del ensayo en colonia y un fenotipo negativo a partir del extracto proteico; (a) El fenotipo observado en los ensayos a partir de colonias no era debido a la acción de micocinas, (b) factores como la agitación, el pH del medio y la temperatura podrían haber inactivado a las micocinas secretadas al medio (c) las cepas secretan una cantidad de micocinas demasiado pequeña con lo cual el fenotipo no fue observable, (d) la propia cepa produjo un secuestro de las micocinas secretadas, mediante unión a la pared celular, por lo cual las micocinas no fueron encontradas en el extracto, (e) la sensibilidad del método usado no fue lo suficientemente alta como para observar fenotipos débiles y por último, (f) la pérdida del plásmido como resultado de una elevada temperatura de incubación, lo que conlleva a la pérdida de las propiedades micocinogénicas de la cepa (Magliani y col, 1997).

Es importante destacar que en los ensayos cruzados de actividad micocida a partir de colonias, *C. sake* fue una de las cepas que presentó el mayor espectro de actividad, mostrando actividad contra 10 especies de levaduras diferentes, sin embargo, en los ensayos a partir del extracto proteico, *C. sake* presentó actividad sólo contra tres diferentes cepas; *R. laryngis*, *Cr. gilvescens* y *M. blollopis*, las cuales presentaron el halo característico de muerte (Figura 6, A), mientras que otras cepas mostraron sólo un halo blanco de inhibición, pero no un halo de muerte (Figura 6, B).

Al someter las muestras a tratamiento térmico por 10 minutos a 90°C, los extractos provenientes de *C. sake*, *M. victoriae*, *R. mucilaginoso*, *Leuconeurospora sp2*, *Lecosporidiella sp1* y *M. blollopis* perdieron la actividad casi por completo, lo cual da cuenta del origen proteico del factor secretado, sin embargo, los extractos proteicos de *C. parapilopsis* y *W. anomalus*, al ser sometidos a tratamiento térmico, ambos mantuvieron su actividad pero dieron como resultado un halo de muerte menos intenso y de la mitad del diámetro producido por el extracto sin tratar, al ser ensayadas sobre un césped sensible. Factores como el pH y la concentración de proteínas pueden afectar la tasa de denaturación de las proteínas, por lo que es posible que una mayor concentración de micocinas (u otras proteínas en la muestra), secretadas por *C. parapilopsis* y *W. anomalus*, se relacione directamente con una mayor tolerancia térmica (Law & Leaver, 1997).

Todas las cepas analizadas mostraron actividad sólo en la fracción 80, con excepción de *Leuconeurospora sp1* la cual mostró actividad tanto en la fracción 60 y 80. En el caso de *M. gelida*, *Leuconeurospora sp1*, *Leuconeurospora sp2* y *R. musilaginoso*, esta actividad se perdió completamente cuando la muestra fue sometida a tratamiento térmico, mientras que los extractos proteicos de *C. parapilopsis* y *W. anomalus* mantuvieron la actividad luego del tratamiento térmico sin una disminución apreciable en el tamaño e intensidad del halo de muerte generado. Sin embargo, la concentración de proteínas en la fracción 80 fue mayor que la concentración de proteínas en la fracción total, lo cual refuerza la idea de que la concentración de proteínas jugaría un rol importante en la tasa de denaturación por temperatura, aunque no se descarta una mayor

tolerancia debido a la naturaleza propia de las micocinas o de algún otro factor secretado al medio, propio de *C. parasilopsis* y *W. anomalus*, tal como ha sido registrado en la levadura *Cryptococcus humicola*, la cual secreta una micocina termoestable de bajo peso molecular (Magliani y col, 1997).

Finalmente, se encontró que las muestras analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE muestran una banda correspondiente a una masa molecular estimada de 7 kDa a 9 kDa en la fracción 80 (Figura 9). Esta banda no está presente en las fracciones 20, 40 y 60 de los extractos analizados, sin embargo, en la fracción 80 se hacen presentes con gran abundancia, correspondiéndose con los resultados obtenidos a partir de los ensayos en placa, donde sólo la fracción 80 presenta actividad. En la fracción 80 de las muestras aparecen además varias proteínas con una masa molecular entre 35 kDa y 170 kDa, las cuales están también presentes en la fracción 60, sin embargo, se descarta que alguna de ellas corresponda a una micocina ya que esta fracción no posee actividad antimicótica y la masa molecular de las micocinas generalmente varía entre 10 kDa y 20 kDa (Kurtzman & Fell, 1998), correspondiéndose mejor con las bandas de bajo peso encontradas en la fracción 80.

7. CONCLUSIONES

1. La diversidad de acción mostrada por las levaduras analizadas en este estudio sugiere que las toxinas producidas por cada cepa podría ser bioquímicamente diferente una de cada otra.
2. Al menos nueve de las 24 levaduras analizadas secretan algún tipo de micocina, tal como se determinó a partir de los ensayos cruzados a partir del extracto proteico extracelular de cada cepa.
3. Basado en espectro de acción y en el diámetro e intensidad del halo de muerte generado, *C. parapilopsis* y *W. anomalus* son aquellas cepas que presentan la mayor actividad micocida contra las cepas ensayadas.
4. El fenómeno killer como mecanismo de competencia podría estar presente en ecosistemas antárticos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Baeza, M., Flores, O., Carrasco, M., Rozas, J., Oviedo, V., Barahona, S., & Cifuentes, V. (2010). The inter-generic fungicidal activity of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 48(6), 822–828.
- Baeza, M., Sanhueza, M., & Cifuentes, V. (2008). Occurrence of killer yeast strains in industrial and clinical yeast isolates. *Biological Research*, 41(2), 173–182.
- Boekhout, T., & Scorzetti, G. (1997). Differential killer toxin sensitivity patterns of varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 35, 147–149.
- Boone, C., Sdicu, A., Degri, R., Sanchez, C., & Bussey, H. (1990). Integration of the Yeast K1 Killer Toxin Gene into the Genome of Marked Wine Yeasts and Its Effect on Vinification. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41(1), 37–42.
- Bortol, A., Nudel, C., Fraile, E., Torres, R., Giulietti, A., Spencer, J., & Spencer, D. (1986). Biotechnology Short contribution Isolation of yeast with killer activity, and its breeding with an industrial baking strain by protoplast fusion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24, 414–416.
- Bussey, H., Sacks, W., Galley, D., & Saville, D. (1982). Yeast Killer Plasmid Mutations Affecting Toxin Secretion and Activity and Toxin Immunity Function. *Molecular and Cellular Biology*, 2(4), 346–354.
- Bussey, H., Steinmetz, O., & Saville, D. (1983). Protein secretion in yeast: Two chromosomal mutants that oversecrete killer toxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 7(6), 449–56.
- Castillo, F., Dolores, M., Blasco, R., Huertas, M., Caballero, F., Moreno, C. & Luque, M. (2005). *Biología Ambiental*. Editorial Tébar, S.L., Madrid.
- Duong-Ly, K. & Gabelli, S. (2014). Salting out of protein using ammonium sulfate precipitation. *Methods in Enzymology*, 51, 85-94.
- El Baz, A., & Shetaia, Y. (2005). Evaluation of different assays for the activity of yeast killer toxin. *International Journal of Agriculture and Biology*, 7(6), 1003–1006.
- Ganter, P., & Starmer, W. (1992). Killer factor as a mechanism of interference competition in yeasts associated with cacti. *Ecology*, 73, 54–67.

- Hodgson, V. J., Button, D., & Walker, G. M. (2003). Anti-Candida activity of a novel killer toxin from the yeast. *Microbiology*, *141*(1995), 2003–2012.
- Hua, M.-X., Chi, Z., Liu, G.-L., Buzdar, M. A., & Chi, Z.-M. (2010). Production of a novel and cold-active killer toxin by *Mrakia frigida* 2E00797 isolated from sea sediment in Antarctica. *Extremophiles : Life under Extreme Conditions*, *14*(6), 515–21.
- Hutchins, K., & Bussey, H. (1983). Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1→6)- β -d-glucan. *Journal of Bacteriology*, *154*(1), 161–169.
- Jacobs, C., Fourie, I., & van Vuuren, H. (1991). Characterization of killer yeast isolates from Chenin blanc grapes and grape skins. *South African Journal of Enology and Viticulture*, *12*(2), 57–63.
- Kurtzman, C., & Fell, J. (1998). *XX The Yeasts, A Taxonomic Study. The yeasts-a taxonomic study*, 55–62.
- Law, A. J. R., & Leaver, J. (1997). Effect of Protein Concentration on Rates of Thermal Denaturation of Whey Proteins in Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(42), 4255–4261.
- Lehmann, P., Lemon, M., & Ferencak, W. (1987). Antifungal compounds (“killer factors”) produced by *Kluyveromyces* species and their detection on an improved medium containing glycerol. *Mycologia*, *79*(5), 790–794.
- Liu, G.-L., Wang, K., Hua, M.-X., Buzdar, M. A., & Chi, Z.-M. (2012). Purification and characterization of the cold-active killer toxin from the psychrotolerant yeast *Mrakia frigida* isolated from sea sediments in Antarctica. *Process Biochemistry*, *47*(5), 822–827.
- Magliani, W., Conti, S., Gernoli, M., Bertolotti, D., & Polonelli, L. (1997). Yeast Killer Systems. *Clinical Microbiology Reviews*, *10*(3), 369–400.
- Marquina, D., Santos, A., & Peinado, J. (2002). Biology of killer yeasts. *International Microbiology : The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, *5*(2), 65–71.
- Rabilloud, T., Vuillard, L., Gilly, C. & Jacques, J. (1994). Silver Staining of protein in polyacrylamide gels: a general overview. *Cellular and Molecular Biology*, *40*(1), 57-75.

- Salgado, J., Abranches, J., Hagler, A. N., & Mendonça-hagler, L. C. (2002). Mycocinogenic yeasts isolated from Amazon soils of the Maracá Ecological Estation, Roraima-Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 5(33), 230–235.
- Satyanarayana, T., & Kunze, G. (Eds.). (2009). *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (pp. 3–18). Dordrecht: Springer Netherlands. doi:10.1007/978-1-4020-8292-4.
- Schmitt, M., & Breinig, F. (2002). The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 257–276.
- Schmitt, M., & Breinig, F. (2006). Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nature Reviews. Microbiology*, 4, 212–221.
- Selitrennikoff, C. (2001). Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2883–94.
- Starmer, W., Ganter, P., & Aberdeen, V. (1987). The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. *Canadian Journal of Microbiology*, 33, 783–796.
- Van Vuuren, H., & Wingfield, B. (1986). Killer Yeast - Cause of stuck fermentation in a wine cellar. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 7(2), 113–118.
- Wickner, R. (1989). Yeast virology. *The FASEB Journal*, 3, 2257–2265.
- Wickner, R. (1996). Double-Stranded RNA Viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 60(1), 250–265.
- Wilson, C., & Whittaker, P. (1989). Factors Affecting Activity and Stability of the *Kluyveromyces lactis* Killer Toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(3), 695–699.
- Young, T. (1981). The genetic manipulation of killer character into brewing yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 87, 292–295.