

JCH-FC  
DOC-Biotecnología  
V 722  
C.1

***Análisis de la producción en levaduras antárticas de metabolitos crioprotectores y fotoprotectores con potencial aplicado.***

**Tesis**

entregada a la

**Universidad de Chile**

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

**Doctor en Biotecnología Molecular**

**Facultad de Ciencias**

**Por**

**Pablo Alfonso Villarreal Díaz**

**Octubre, 2017**

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

**Co-Director: Dr. Víctor Cifuentes Guzmán.**



**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.

**PABLO ALFONSO VILLARREAL DIAZ**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Biotecnología Molecular, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 4 de Agosto de 2017.

Director de Tesis:

Dr. Marcelo Baeza Cancino

Co-Director de Tesis

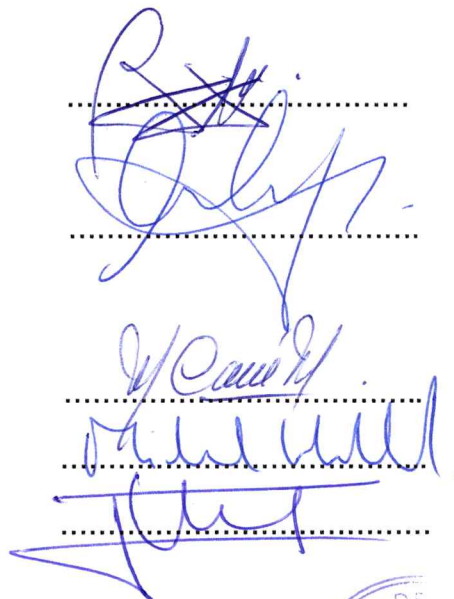
Dr. Víctor Cifuentes Guzmán

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Margarita Carú

Dr. Michael Handford

Dr. Claudio Martínez



Handwritten signatures in blue ink over dotted lines, corresponding to the names listed on the left. The signatures are: Marcelo Baeza Cancino, Víctor Cifuentes Guzmán, Margarita Carú, Michael Handford, and Claudio Martínez.



## BIOGRAFÍA



Nací el 7 de Junio de 1988 en la ciudad de Santiago. En el año 1993, ingrese al Colegio San Ignacio El Bosque donde curse toda la enseñanza básica y media. En el año 2007 comencé la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular de la Universidad de Chile. El año 2011 obtuve la Licenciatura en Ingeniería en Biotecnología Molecular y en el año 2013 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 2013 ingresé al Doctorado en Biotecnología Molecular 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 Biotecnología Molecular.

## **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.

Al Dr. Víctor Cifuentes, Co-Director de esta Tesis por sus críticas constructivas.

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

A la comisión evaluadora de esta Tesis conformada por la Dra. Margarita Carú, Dr. Michael Handford, Dr. Claudio Martínez 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, en especial a Mario y Salva.

A mi familia.

A mis amigos.

GRACIAS.

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

|  |             |
|--|-------------|
| <b>INDICE DE TABLAS .....</b>  | <b>viii</b> |
| <b>INDICE DE FIGURAS .....</b>   | <b>ix</b>   |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>   | <b>xi</b>   |
| <b>Resumen. ....</b>   | <b>xii</b>  |
| <b>Abstract. ....</b>  | <b>xiv</b>  |
| <b>1. Introducción .....</b>   | <b>1</b>    |
| 1.1 Introducción general.....  | 1           |
| 1.2. Metabolitos producidos en respuesta al estrés por frío y congelación.....   | 2           |
| 1.3 Metabolitos producidos en respuesta al estrés por exposición a alta radiación ultravioleta. ....   | 4           |
| 1.4 Aplicación de los metabolitos producidos por levaduras. ....   | 5           |
| <b>2. Hipótesis .....</b>  | <b>8</b>    |
| <b>3. Objetivos.....</b>   | <b>9</b>    |
| 3.1 Objetivo General.....  | 9           |
| 3.2 Objetivos Específicos. ....  | 9           |
| <b>4. Materiales y Métodos.....</b>  | <b>10</b>   |
| 4.1 Levaduras y condiciones de cultivo. ....   | 10          |
| 4.2 Tolerancia a ciclos de congelación/descongelación (CC/D) y radiación ultravioleta.....   | 10          |
| 4.3 Extracción y análisis de pigmentos carotenoides. ....  | 12          |
| 4.4 Extracción y análisis de micosporinas.....   | 13          |
| 4.5 Extracción y análisis de ergosterol.....   | 13          |
| 4.6 Extracción y análisis de ácidos grasos.....  | 14          |
| 4.7 Extracción y análisis de proteínas extracelulares. ....  | 14          |
| 4.7.1 Extracción de proteínas extracelulares totales y fraccionamiento. ....   | 14          |
| 4.7.2 Análisis de proteínas. ....  | 15          |
| 4.7.3 Ensayo con proteinasa K. ....  | 15          |
| 4.7.4 Liofilización.....   | 16          |
| 4.8 Determinación de propiedad anticongelante.....   | 16          |
| 4.9 Extracción y análisis de DNA.....  | 16          |
| 4.10 Amplificación y clonamiento de producto de PCR.....   | 17          |
| 4.11 Análisis de Componentes Principales (ACP). ....   | 19          |
| <b>5. Resultados.....</b>  | <b>20</b>   |
| 5.1 Selección de levaduras antárticas con diferentes grados de tolerancia a la congelación y la radiación UV.....  | 20          |
| 5.2 Determinación de metabolitos fotoprotectores producidos por levaduras.....   | 24          |
| 5.2.1 Análisis de la influencia de pigmentos carotenoides y micosporinas a la tolerancia a UV por levaduras antárticas.....  | 28          |
| 5.3 Análisis de metabolitos asociados a la tolerancia al frío/congelación.....   | 30          |
| 5.3.1 Esteroles totales y ácidos grasos (FAs).....   | 30          |
| 5.3.2 Secreción de proteínas anticongelantes. ....   | 36          |
| 5.3.3 Análisis de la influencia de la propiedad anticongelante, los PUFAs y el ergosterol a la tolerancia a ciclos de congelación/descongelación por levaduras antárticas..... | 56          |
| 5.3.4 Clonamiento y análisis bioinformático de las secuencias hipotéticas de AFP.....  | 56          |
| <b>6. Discusión .....</b>  | <b>58</b>   |
| 6.1 Discusión Científica.....  | 58          |
| 6.2 Discusión tecnológica. ....  | 62          |
| <b>7. Conclusión.....</b>  | <b>64</b>   |

|                     |    |
|---------------------|----|
| 8. Referencias..... | 65 |
| 9. Anexos .....     | 71 |
| 10. Paper.....      | 80 |

## INDICE DE TABLAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabla 1: Levaduras utilizadas en este trabajo.....</b>  | <b>11</b> |
| <b>Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados en el PCR y secuenciación.....</b>   | <b>18</b> |
| <b>Tabla 3: Porcentaje de sobrevivida en el tiempo de levaduras antárticas expuestas a CC/D .....</b>                      | <b>21</b> |
| <b>Tabla 4: Tasa de decaimiento celular.....</b>   | <b>22</b> |
| <b>Tabla 5: Porcentaje de sobrevivida en el tiempo de las levaduras antárticas expuestas a radiación UV de 254 nm.....</b> | <b>23</b> |
| <b>Tabla 6: Contenido de pigmentos carotenoides y micosporinas en levaduras antárticas.....</b>                            | <b>25</b> |
| <b>Tabla 7: Contenido de ácidos grasos (FAs) totales en levaduras psicrotolerantes.....</b>                                | <b>35</b> |
| <b>Tabla 8: Biomasa y concentración de proteínas en diferentes medios de cultivo.....</b>                                  | <b>47</b> |

## INDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Análisis de carotenoides mediante RP-HPLC.....  | 26 |
| Figura 2: Análisis de micosporinas mediante RP-HPLC.....  | 27 |
| Figura 3: Análisis de componentes principales involucrados en la tolerancia a alta radiación UV.....  | 29 |
| Figura 4: Contenido de esteroides totales de levaduras psicotolerantes.....   | 31 |
| Figura 5: Análisis RP-HPLC de las muestras de esteroides totales.....   | 32 |
| Figura 6 Contenido de esteroides totales extraídos a diferentes temperaturas de crecimiento (10, 15, 22, 30°C).....   | 33 |
| Figura 7: Curvas de crecimiento a diferentes temperaturas de la levadura <i>M. blollopis</i> .....  | 34 |
| Figura 8: Electroforesis en gel SDS-PAGE 15% de extractos proteicos extracelulares totales de las levaduras seleccionadas.....  | 37 |
| Figura 9: Control medición propiedad anticongelante.....  | 38 |
| Figura 10: Cambio en el espectro de absorbancia al congelar/descongelar una muestra con y sin propiedad anticongelante.....   | 39 |
| Figura 11: Propiedad anticongelante en extractos totales de levaduras antárticas.....   | 40 |
| Figura 12: Propiedad anticongelante del extracto proteico extracelular total de la levadura <i>Le. creatinivora</i> expuesto a 100°C y tratamiento con proteinasa K .....                     | 41 |
| Figura 13: Determinación de la concentración máxima y mínima del extracto proteico extracelular y propiedad anticongelante medida al extracto liofilizado.....                                | 43 |
| Figura 14: Electroforesis en gel SDS-PAGE 15% del fraccionamiento con sulfato de amonio levaduras crecidas en medio YM 1% de glucosa.....   | 44 |
| Figura 15: Propiedad anticongelante medida a las fracciones obtenidas con sulfato de amonio de las levaduras seleccionadas crecidas en medio YM 1% glucosa.....                               | 45 |
| Figura 16: Electroforesis en gel SDS-PAGE al 15% del fraccionamiento con sulfato de amonio levaduras crecidas en medio mínimo YNB 2% de glucosa y 0,5 de Peptona.....                         | 48 |
| Figura 17: Propiedad anticongelante medida a las fracciones obtenidas con sulfato de amonio de las levaduras seleccionadas crecidas en medio mínimo YNB 2% de glucosa y 0,5 % de Peptona..... | 49 |
| Figura 18: Cromatografía de Exclusión Molecular en columna Sephadex 75 increase 10/300 GI column.....   | 51 |
| Figura 19: Actividad anticongelante de las muestras separadas de <i>Cr. gastricus</i> fracción 60%.....   | 52 |
| Figura 20: Termoestabilidad de las proteínas de <i>Cr. gastricus</i> 60%.....   | 53 |



**Figura 21: Perfil proteico extracelular *Cr. gastricus* 60%.....54**

**Figura 22: Tolerancia proteínas purificadas de *Cr. gastricus* 60% a ciclos de congelación/  
descongelación.....55**

**Figura 23: Análisis de componentes principales involucradas en la tolerancia a ciclos de  
congelación/descongelación.....57**

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                 |   |
|-----------------|---|
| <b>A/C</b>      | Antes de congelar                                       |
| <b>ACP</b>      | Análisis de Componentes Principales                     |
| <b>AFGP</b>     | Antifreeze Glicoproteína                                |
| <b>AFP</b>      | Antifreeze Protein                                      |
| <b>CC/D</b>     | Ciclos congelación/descongelación                       |
| <b>D/C</b>      | Después de congelar                                     |
| <b>FAs</b>      | Fatty acids   |
| <b>FDA</b>      | Food and Drug Administration                            |
| <b>GRAS</b>     | Generally Recognized as Safe                            |
| <b>IRI</b>      | Ice Recrystallization Inhibition                        |
| <b>ISPs</b>     | Ice structure protein                                   |
| <b>MSA-AuNP</b> | Nanopartículas de oro                                   |
| <b>MUFAs</b>    | Monounsaturated fatty acids                             |
| <b>PCR</b>      | Reacción en cadena de la polimerasa                     |
| <b>PEG</b>      | Poli etilenglicol                                       |
| <b>PUFAs</b>    | Polyunsaturated fatty acids                             |
| <b>PVA</b>      | Poli vinylalcohol                                       |
| <b>RAF</b>      | Relación antifreeze (Relación propiedad anticongelante) |
| <b>TH</b>       | Thermal Hysteresis                                      |
| <b>THPs</b>     | Thermal Hysteresis Proteins                             |
| <b>T°A</b>      | Temperatura ambiente                                    |
| <b>UV</b>       | Ultra Violeta   |
| <b>YM</b>       | Yeast Medium  |
| <b>YNB</b>      | Yeast Nitrogen Base                                     |

## Resumen.

Las levaduras han logrado colonizar ambientes fríos y de alta exposición a la radiación ultravioleta, como el continente Antártico, desarrollando diferentes adaptaciones para poder tolerar estas condiciones extremas. Como respuesta al frío y bajas temperaturas producen proteínas anticongelantes (AFPs) y modifican la proporción de lípidos reguladores de membrana, como el ergosterol y los ácidos grasos (FAs). Como respuesta a la alta radiación UV estos microorganismos producen compuestos UV-absorbentes como pigmentos carotenoides y micosporinas. Reportes de AFPs en levaduras son escasos, y solo tres proteínas han sido identificadas a la fecha. La presencia de FAs y ergosterol se encuentra mucho más documentada y se ha propuesto que su acción en conjunto otorga a los microorganismos la capacidad de tolerar y sobrevivir a condiciones de bajas temperaturas. Industrialmente estos tres metabolitos son de gran importancia y presentan un atractivo para la elaboración de nuevos productos comerciales. Por un lado, las AFPs han sido propuestas principalmente para la preservación de alimentos y linajes celulares, mientras que los FAs y el ergosterol como precursores de hormonas eicosanoides (Prostaglandina) y el ergocalciferol (Vitamina D), respectivamente. Por otro lado, estudios de micosporinas y pigmentos carotenoides en el último tiempo han tenido un gran aumento debido a su importancia industrial en las áreas farmacéutica, médica, cosmética y salmonicultura. Es por lo anteriormente mencionado, que en el presente trabajo se evaluaron y seleccionaron levaduras antárticas con tolerancia variable respecto a la congelación y radiación UV. Además, se determinó la producción de los diferentes metabolitos involucrados en la tolerancia observada, como son las AFPs, el ergosterol, los FAs, pigmentos carotenoides y micosporinas, metabolitos que pueden tener un gran potencial biotecnológico.

Las levaduras evaluadas con mayor tolerancia a ciclos de congelación/descongelación (CC/D) fueron *Leucoesporidiella creatinivora*, *Dioszegia fristingensis*, *Candida parapsilosis* y *Cryptococcus victoriae*. Mientras que las levaduras más tolerantes a la radiación UV fueron *Dioszegia* sp., *Cryptococcus gastricus*, *Leuconeurospora* sp. (T27Cd2), *Rhodotorula laryngis* y *Rhodotorula mucilaginosa*. Se logró determinar propiedad anticongelante en los extractos proteicos extracelulares de varias levaduras, siendo *Le. creatinivora*, *C. parapsilosis* y *Cr. gastricus* las con mayor propiedad. En el caso de *Cr. gastricus* propiedad anticongelante se atribuyó a más de una proteína sugiriendo

una acción en conjunto de las proteínas extracelulares parcialmente purificadas, una de 100 kDa y dos de menor tamaño, cercanas a los 30 kDa.

El ergosterol fue el principal esteroide encontrado en todas las levaduras analizadas, *Mrakia blollopis* presentó la mayor concentración (6,9 mg/g de peso seco) respecto a cualquier otra levadura ambiental reportada a la fecha, convirtiéndola en candidato para estudios posteriores. Respecto al análisis de los FAs, se logró identificar FAs poliinsaturados (PUFAs). Levaduras como *Le. creatinivora*, *C. parapsilosis*, *Cr. victoriae*, *Rh. mucilaginoso*, *Rh. laryngis*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Cr. gastricus* y *M. blollopis* son buenos candidatos para posteriores análisis ya que tienen la capacidad de sintetizar PUFAs  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 y PUFAs de cadena larga ( $>C_{20}$ ), muy importantes en la industria farmacéutica. Finalmente se logró comprobar la presencia de diferentes pigmentos carotenoides, como OHK-toruleno, licopeno y gama-caroteno en *Dioszegia* sp., *Rh. laryngis* y *Rh. mucilaginoso* los cuales no habían sido identificados en otros aislados de estas especies de levaduras, convirtiéndolos en candidatos para posteriores estudios de nuevas fuentes de pigmentos. Según la metodología utilizada las levaduras *Le. creatinivora* y *Leuconeurospora* sp. (T27Cd2) fueron las que presentaron mayor contenido de micosporinas, lo que las convierte en candidatos para futuros análisis de identificación y aumento de producción para aplicaciones a gran escala.

## Abstract.

Yeasts that colonize cold environments and with high exposure to ultraviolet radiation, such as the Antarctic continent, have developed different adaptations to tolerate these extreme conditions. To counteract the effects of low temperatures, yeasts produce antifreeze proteins (AFPs) and modify the proportion of membrane-regulating lipids, ergosterol and fatty acids (FAs). It has been reported that in response to high UV radiation, yeasts produce UV-absorbing compounds such as carotenoid pigments and mycosporines. Reports of AFPs in yeast are scarce, only three proteins have been identified to date. The presence of FAs and ergosterol is more documented and it has been proposed that their action as a whole give microorganisms the ability to tolerate and survive low-temperature conditions. These metabolites are of great industrial importance and are attractive for the elaboration of new commercial products. AFPs have been proposed mainly for the preservation of foods and cell lineages, whereas FAs and ergosterol as precursors of eicosanoid hormones (Prostaglandin) and Ergocalciferol (Vitamin D), respectively. Studies of mycosporines and carotenoid pigments have increased recently due to their industrial importance in the pharmaceutical, medicine, cosmetic and salmon culture fields. In the present work, Antarctic yeasts with variable tolerance to freezing and UV radiation was evaluated and selected. Furthermore, the production of the various metabolites involved in the observed tolerance, such as AFPs, ergosterol, FAs, carotenoid pigments and mycosporines was evaluated, which may also have biotechnological potential.

The yeasts with higher resistance to freeze/thaw cycles were *Leucoesporidiella creatinivora*, *Dioszegia fristingensis*, *Candida parapsilosis* and *Cryptococcus victoriae*. The yeasts most tolerant to UV radiation were *Dioszegia* sp., *Cryptococcus gastricus*, *Leuconeurospora* sp. (T27Cd2), *Rhodotorula laryngis* and *Rhodotorula mucilaginosa*. Antifreeze activity was detected in the extracellular protein extracts of several yeasts, being *Le. creatinivora*, *C. parapsilosis* and *Cr. gastricus* those with greater activity. In the case of *Cr. gastricus*, the antifreeze activity was attributed to several proteins of about 100, and two close to 30 kDa.

Ergosterol was the principal sterol found in all yeasts analyzed and *Mrakia blollopis* produced the highest amount (6.9 mg / g dry weight), with a sterol content higher than other environmental yeast reported to date, making it a good candidate for later studies and industrial scaling for its

production. In the analysis of FAs, it was possible to identify polyunsaturated FAs (PUFAs), being *Le. creatinivora*, *C. parapsilosis*, *Cr. victoriae*, *Rh. mucilaginosa*, *Rh. laryngis*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Cr. gastricus* and *M. blollopis* good candidates for further analysis as they synthesize PUFAs  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 and long-chain PUFAs (>C20), very important in the pharmaceutical industry. Finally, different carotenoid pigments were identified such as OHK-toruleno, lycopene and gama-carotene in *Dioszegia* sp., *Rh. laryngis* and *Rh. mucilaginosa* species which had not been identified in other isolates of these strains, making these yeasts good candidates for further studies of new pigment sources. According to the methodology used *Le. creatinivora* and *Leuconeuropa* sp. (T27Cd2) showed the highest content of mycosporines, making them good candidates for future identification and improvement of the production for large scale applications.

## 1. Introducción

### 1.1 Introducción general.

Los sectores productivos a nivel mundial como el agrícola, la industria de los alimentos, la industria del salmón, la medicina y farmacéutica, entre otros, han aumentado el número de estudios relacionados en la búsqueda de nuevos compuestos biológicos con la capacidad de impedir o reducir los daños generados por el frío, la congelación y la alta radiación ultravioleta (UV). La búsqueda se ha enfocado específicamente en metabolitos crioprotectores, anticongelantes y fotoprotectores, teniendo como principal fuente de investigación microorganismos adaptados a estas condiciones, con el fin de generar un recambio a nivel mundial de los compuestos químicos usados comúnmente. Lugares de búsqueda de microorganismos capaces de generar este tipo de compuestos en el planeta son muy variados, actualmente se sabe que más del 80% de la superficie terrestre presenta temperaturas que no superan los 5°C durante el año y diferentes zonas se encuentran constantemente cubiertas de nieve y hielo, (Cavicchioli y col., 2000; Margesin y col. 2007). Sumado a esto, producto de la contaminación antropogénica, el daño en la capa de ozono ha generado un aumento en la radiación UV que llega a la superficie terrestre en diversos sectores del planeta (Mc Kenzie y col., 2011).

Uno de los ecosistemas más atractivos para este tipo de búsqueda es el continente antártico, el cual además de ser uno de los lugares más fríos en el planeta presenta una alta radiación UV. Este continente es considerado uno de los ambientes terrestres más extremos por ser el más seco, con más viento y más helado, presentando además una alta radiación solar en épocas de verano, con periodos de luz que varían de 16 a 18 horas (Mckenzie y col., 2007; Martínez y col. 2016). No obstante, es posible encontrar una amplia biodiversidad de organismos representada principalmente por bacterias, hongos y microalgas, los cuales han desarrollado una serie de adaptaciones como la producción de compuestos crioprotectores y fotoprotectores para poder sobrevivir en este ambiente (Vishniac y Klinger, 1986; Martínez y col. 2016).

A nivel industrial el trabajo con levaduras y los metabolitos producidos por ellas presentan diferentes ventajas frente a otros microorganismos como bacterias, hongos filamentosos y microalgas. Dentro de ellas, destaca el hecho de que muchos metabolitos son producidos de forma

heteróloga en levaduras (Porro y col. 2005; Ahmad y col. 2014), por lo cual, los procesos para su obtención están muy controlados y optimizados (crecimiento en variadas fuentes de carbono incluyendo fuentes complejas provenientes de desecho de procesos industriales, como la melaza (Ariza y Gonzáles, 1997)). Por otro lado, muchas especies de levaduras han sido denominadas como Generalmente Reconocidas como Seguras (GRAS, **Generally Recognized As Safe**) por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, **Food and Drug Administration**), fomentando su utilización en la producción a gran escala de metabolitos utilizados como aditivos en alimentos o fármacos.

Diferentes estudios han propuesto a las levaduras como un versátil grupo de microorganismos eucariontes que presentan variados perfiles nutricionales y una gran habilidad de sobrevivir en un amplio rango de hábitats (Hagler y Ahearn, 1987; Walker, 1998; Starmer y Lachance, 2011). Las levaduras antárticas han generado un notable interés desde los años 60s debido a las extremas condiciones a las cuales se ven enfrentadas, logrando superar las dificultades generadas por las bajas temperaturas y elevada radiación solar (D'Amico y cols. 2006). Para ello, estos microorganismos han desarrollado variadas estrategias, dentro de las cuales está la producción de metabolitos para evitar o disminuir los efectos nocivos de los mencionados factores físicos. Además, estos metabolitos presentan grandes proyecciones a nivel industrial, como se mencionará a lo largo del presente escrito.

## **1.2. Metabolitos producidos en respuesta al estrés por frío y congelación.**

Para contrarrestar los efectos de las bajas temperaturas y la congelación los microorganismos producen péptidos con la capacidad de detener el crecimiento del hielo (AFPs) y modifican la composición de los lípidos reguladores de la fluidez de las membranas (ergosterol y ácidos grasos) (Park y col., 2011; Rossi y col. 2009). Las AFPs tienen la capacidad de unirse al hielo y modificar su morfología (Raymond y col., 1989) debido a dos propiedades, la histéresis termal (TH) y la inhibición de la recristalización del hielo (IRI) (Barrett, 2001). Se han descrito como el principal mecanismo de respuesta frente a la congelación y las bajas temperaturas (Jia y Davies, 2002; Bar Dolev y col., 2016) permitiendo a los organismos vivir o sobrevivir a temperaturas cercanas al punto



de congelación (Gupta y Deswal, 2014; Kim y col., 2015). El mecanismo de acción no es bien conocido, sin embargo, el más aceptado postula que las AFPs se anclan mediante puentes de hidrogeno a la superficie del hielo mediante una región hidrofílica dejando expuesta al agua una zona hidrofóbica la cual genera repulsión de las moléculas de agua cercanas impidiendo el crecimiento del hielo. El primer reporte de este tipo de proteínas se remonta al año 1969 desde la sangre de un pez antártico (De Vries y Wohlschlang, 1969). Actualmente han sido reportadas en vertebrados, invertebrados, plantas, líquenes, bacterias y levaduras conformando una amplia familia no homologa, con diversidad de estructuras (Bar Dolev y col., 2016).

La composición lipídica de las membranas determina en parte la habilidad de algunos microorganismos de crecer a diferentes temperaturas (Cooke y Whipps, 1993). En levaduras se ha observado que a medida que la temperatura disminuye, el grado de instauración de los ácidos grasos (FAs) aumenta, siendo un factor importante en la regulación de la fluidez de la membrana y mantención de la integridad celular (D'Amico y col. 2006; Robinson, 2001; Zlatanov y cols., 2001). Dentro de los FAs se encuentran los ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs, *monounsaturated fatty acids*) y polinsaturados (PUFAs, *polyunsaturated fatty acids*). PUFAs del tipo  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6, como el ácido oleico (18:2, 18 átomos de carbono y dos insaturaciones desde el carbono 3) y ácido linolénico (18:3, 18 átomos de carbono y tres insaturaciones desde el carbono 6), son considerados esenciales y deben ser incorporados en la dieta de los mamíferos (De Caterina, 2011). Este tipo de FAs son precursores de otro tipo de PUFAs de más de 20 átomos de carbono ( $C_{20}$ ), como el ácido araquidónico (20:4) y el eicosapentanoico (20:5), que a su vez son precursores de hormonas eicosanoides, como la prostaglandina. Ácidos grasos como el linoleico y linolénico se encuentran comúnmente en semillas de plantas, mientras que PUFAs del tipo  $C_{20}$ , son extremadamente raros en semillas, pero comunes en algunos microorganismos y aceites de pescados (Radwan, 1991).

Al igual que los FAs los esteroides son un componente estructural esencial en las membranas de los eucariontes. En levaduras el principal esteroide es el ergosterol, molécula responsable de la integridad, fluidez y permeabilidad, además de ser muy importante en la actividad de diferentes enzimas las cuales se anclan a la membrana. Se ha sugerido que el ergosterol promueve la resistencia a la alta presión, bajas temperaturas y estrés por frío en levaduras, siendo muy importante

al impedir la cristalización de las cadenas de ácidos grasos en las membranas (Abe y Minegishi, 2008; Calcott y Rose, 1982; Landolfo y col., 2010).

### **1.3 Metabolitos producidos en respuesta al estrés por exposición a alta radiación ultravioleta.**

Los daños provocados por la radiación UV se pueden diferenciar dos: i) los directos, provocados por la incidencia directa de la radiación UV sobre macromoléculas como proteínas, DNA, y RNA que absorben eficientemente la energía del espectro UV resultando en su degradación y/o transformación generando la pérdida de su función (Cockell y Knowland, 1999; Vincent y Nale, 2000); ii) los daños indirectos, se generan cuando la radiación UV es absorbida por compuestos celulares intermediarios que producen especies reactivas de oxígeno (ROS) como  $H_2O_2$ ,  $O_2$  y OH capaces de oxidar diferentes componentes celulares (Vincent y Nale, 2000; Rastogi y col., 2014). Existen diferentes mecanismos desarrollados por los organismos para contrarrestar estos efectos nocivos (Cockell y Knowland, 1999; Vincent y Nale, 2000), de los cuales son de interés para este trabajo la producción de compuestos con la capacidad de absorber la radiación UV y con actividad antioxidante. Compuestos de este tipo son los pigmentos carotenoides y las micosporinas (Contreras y col., 2015; Libkind y col., 2003).

Los carotenoides son los pigmentos más ampliamente distribuidos en la naturaleza y solo pueden ser sintetizados de *novo* por algunos vegetales y ciertos microorganismos. Son compuestos isoprenoides, terpenoides o terpenos y existen más de 600 tipos en la naturaleza (Britton, 1995). Su función primaria en los organismos fotosintéticos es servir como pigmentos accesorios y como protectores contra la foto-oxidación (Strzalka y col., 2003). En los organismos no fotosintéticos su función principal es la de secuestrar las especies reactivas de oxígeno (Kirti y col., 2014), lo cual sugeriría que son útiles para evitar los daños indirectos producidos por la radiación ultravioleta. Este tipo de pigmentos se encuentran raramente en hongos, siendo más frecuentes en los basidiomicetes. En levaduras se encuentran principalmente en los géneros *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*, *Cryptococcus*, *Rhodospodium* y *Phaffia* (*Xanthophyllomyces*), siendo los más característicos el beta-caroteno, el toruleno y la torularrodina (Avalos y Carmen, 2015).

Las micosporinas son compuestos hidrosolubles de bajo peso molecular (<400 Da) con la capacidad de absorber la radiación UV. Estos compuestos presentan una unidad cíclica tipo aminociclohexenona unido a un aminoácido o amino-alcohol, teniendo la capacidad de absorber a longitudes entre los 296 a los 310 nm (Carreto y Carignan, 2011). Distinto de los aminoácidos tipo micosporinas (MAAs), lo que poseen como unidad cíclica un aminociclohexemina y tiene la capacidad de absorber longitudes de onda entre los 310 y 360 nm. Las micosporinas fueron descubiertas inicialmente en hongos (Leach, 1965) y son exclusivas de este grupo, mientras que los MAAs pueden ser sintetizados por una gran variedad de organismos. Las micosporinas, además de su propiedad de absorber luz ultravioleta, se ha reportado su capacidad antioxidante (Oren y Gunde-Cimerman, 2007; De la Coba y col. 2009; Carreto y Carignan, 2011). En levaduras se han descrito dos tipos de micosporinas, micosporina glutamicol glucósido y micosporina glutaminol glucósido, ambas con la capacidad de absorber radiación entre 296-310 nm (Volkman y col., 2003; Libkind y col., 2004).

#### **1.4 Aplicación de los metabolitos producidos por levaduras.**

Los metabolitos mencionados anteriormente poseen un gran atractivo para su aplicación en variadas industrias. Las AFPs han sido foco de estudio para una amplia variedad de aplicaciones, como almacenamiento en la industria de los alimentos, mejorando textura y la propiedad de los diferentes productos congelados. Aumento de la tolerancia al frío de plantas mediante la obtención de transgénicos, criopreservación de células, tejidos, líneas celulares y órganos para trasplantes. Productos para mejorar criocirugías, donde mediante frío se eliminan células cancerosas y productos para inducir tolerancia al frío en organismos sensibles, como peces (Koushafar y Pham, 1997; Bar Dolev y col., 2016). Sin embargo, muchos estudios con diferentes proteínas han demostrado que el efecto de protección depende del tipo de AFP y la concentración de ésta. Por lo cual la investigación y búsqueda de nuevas fuentes de AFPs de levaduras son de gran importancia debido al potencial uso industrial que presentan estos microorganismos.

Se ha reportado que una dieta alta en PUFAs de tipo  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 favorece la prevención de enfermedades autoinmunes, inflamatorias, cardiovasculares y mentales, entre otras (Simopoulos,

2002), lo que ha llevado que este tipo de ácidos grasos a ser usado como aditivos en la industria de alimentos, cosmética y farmacéutica. Actualmente, su extracción a gran escala se realiza desde aceites de pescado ya que su producción es mucho más económica, sin embargo, el “olor a pescado” permanece en el producto final, lo que genera un gran problema para su consumo y uso como aditivo en alimentos y cosméticos (Okuyama y col. 1998). Debido a esto, la búsqueda de nuevas fuentes de PUFAs de C<sub>20</sub>, ha generado mucho interés y los microorganismos adaptados al frío son la principal alternativa y candidatos de estudio (Veen y Lang, 2004). Al igual que los FAs y las AFPs el ergosterol es un metabolito con gran importancia biotecnológica, ya que es precursor de vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol) que regula la absorción y acumulación de calcio y fósforo en los huesos (Wiseman, 1993; Veen y Lang, 2004). El bajo consumo en niños causa raquitismo, enfermedad que provoca retardo en el crecimiento y deformaciones óseas, mientras que en adultos provoca osteoporosis (Holick, 2007). Su producción a gran escala en la actualidad se realiza mediante el cultivo de levaduras, específicamente una cepa modificada genéticamente de *Saccharomyces cerevisiae* sobreproductora de ergosterol (Tronchoni y col., 2012), y también con otras levaduras productoras de ergosterol, que mediante la optimización de condiciones de cultivo en biorreactores se ha logrado aumentar su rendimiento. Hoy en día el estudio de nuevas fuentes biológicas y mejoras en las condiciones de cultivo para aumentar la producción de ergosterol generan mucho interés tanto en la industria de alimentos y farmacéutica. Por lo cual la investigación de levaduras adaptadas al frío, productoras de ergosterol como mecanismo adaptativo, es muy atractiva en esta área.

Por último, los pigmentos carotenoides son muy utilizados en diferentes industrias como farmacéutica y acuícola, entre otras, donde son empleados como compuestos antioxidantes, precursores de la vitamina B y como suplemento en la dieta de salmones respectivamente. El mercado global de este tipo de pigmento ha estado en constante crecimiento, alcanzando los US\$ 1.5 billones en el año 2014 y se estima que al año 2019 alcance los US\$ 1.8 billones (Schmidt y col., 2011; BCC Research, 2015). Actualmente el mercado de pigmentos corresponde principalmente al producido de manera química (Lorenz y Cysewski, 2000; Mata-Gomez y col., 2014), sin embargo, cada día hay una mayor demanda por productos de origen natural, lo que ha generado la motivación de buscar nuevas fuentes naturales de pigmentos carotenoides. Las micosporinas, metabolito

secundario con importancia económica, presenta una creciente utilidad producto de su aplicación en la formulación de bloqueadores y pantallas solares para la piel (Balskus y Walsh, 2010; Contreras y col., 2015). Así al igual que en el caso anterior la búsqueda de nuevas fuentes de micosporinas generan gran interés, principalmente en la industria farmacéutica y cosmética.

Sobre la base del conjunto de antecedentes expuestos y considerando las extremas condiciones mencionadas en las que viven las levaduras antárticas, resulta apropiado pensar que estos microorganismos han desarrollado mecanismos adaptativos, como la producción de metabolitos con la capacidad de contrarrestar los efectos de las bajas temperaturas, la congelación y la elevada radiación UV. Es por esto que resulta interesante estudiar la producción de estos tipos de metabolitos en levaduras, debido a que su escalamiento industrial es más sencillo y procesos de producción a gran escala se encuentran mucho más estandarizados. Así, en este trabajo se propuso evaluar la presencia de metabolitos crioprotectores y fotoprotectores, desarrollados por levaduras antárticas, con la capacidad de ser aplicados en diferentes sectores productivos.

## **2. Hipótesis**

De acuerdo con las condiciones ambientales en las que viven las levaduras en la Antártica, éstas han desarrollado respuestas para sobrevivir en condiciones extremas de frío, congelación y radiación UV.

De acuerdo con lo anterior, nuestra hipótesis de trabajo es que dentro de las especies de levaduras aisladas desde la Antártica, algunas serán buenas candidatas para la producción de metabolitos con potencial aplicado como proteínas anticongelantes, ácidos grasos poliinsaturados, ergosterol, pigmentos carotenoides y micosporinas.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo General.**

Determinar la presencia de metabolitos crioprotectores y fotoprotectores, que poseen potencial aplicado, en levaduras antárticas.

#### **3.2 Objetivos Específicos.**

1. Selección de especies de levaduras de acuerdo a su resistencia a la congelación y la radiación UV.
2. Determinación de metabolitos fotoprotectores, con proyección industrial, producidos por las levaduras seleccionadas en 1.
3. Determinación de metabolitos relacionados con la resistencia al frío/congelación, con proyección industrial, producidos por las levaduras seleccionadas en 1.

## **4. Materiales y Métodos**

### **4.1 Levaduras y condiciones de cultivo.**

Las diferentes especies de levaduras utilizadas en este trabajo (Tabla 1) fueron aisladas desde muestras de suelo de la Isla Rey Jorge, región sub-Antártica (Carrasco y col. 2012). Los medios de cultivo utilizados fueron: YM: 3 g/L extracto de levadura, 3 g/L de extracto de malta y 5 g/L de peptona), suplementado con 10 g/L de glucosa; Medio Mínimo Vogel (Retamales y col. 2002), suplementado con 20 g/L de glucosa; YNB: 6,7 g/L de "Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids" (Difco), suplementado con 20 g/L de glucosa y/ 0,5% de peptona. La temperatura de incubación correspondió a la óptima de crecimiento de cada especie de levaduras.

### **4.2 Tolerancia a ciclos de congelación/descongelación (CC/D) y radiación ultravioleta.**

Se trabajó con cultivos de levaduras en medio YM en fase exponencial tardía de crecimiento. Los cultivos fueron congelados a -20°C por 12 horas y descongelados a 30°C por 30 min o depositados en placas de Petri e irradiados con luz UV (254 nm) utilizando una lámpara germicida GE T8 (General Electric, Fairfield, CT, USA) a una distancia de 15 cm. Se determinó viabilidad celular después de diferentes ciclos de congelación y tiempos de exposición al UV (5,10,20 y 40 minutos), el porcentaje de sobrevivencia fue calculado respecto de la viabilidad celular antes de someter a los respectivos tratamientos. La tasa de decaimiento, se calculó desde cada curva de sobrevivencia vs CC/D según el modelo de Gompertz (Zwietering y col., 1990).



Tabla 1. Levaduras utilizadas en este trabajo.

| Especie de levadura                  | Temperatura óptima de crecimiento |
|--------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Wickerhamomyces anomalus</i>      |                                   |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>      | 30°C                              |
| <i>Candida parapsilosis</i>          |                                   |
| <i>Leucosporidiella creatinivora</i> |                                   |
| <i>Candida sake</i>                  |                                   |
| <i>Dioszegia fristingensis</i>       |                                   |
| <i>Leucosporidiella fragaria</i>     |                                   |
| <i>Cryptococcus gastricus</i>        |                                   |
| <i>Leuconeurospora sp. (T27Cd2)</i>  | 22°C                              |
| <i>Sporidiobolus salmonicolor</i>    |                                   |
| <i>Rhodotorula laryngis</i>          |                                   |
| <i>Cryptococcus victoriae</i>        |                                   |
| <i>Cryptococcus gilvescens</i>       |                                   |
| <i>Holtermanniella watticus</i>      |                                   |
| <i>Cryptococcus sp.</i>              |                                   |
| <i>Dioszegia sp.</i>                 |                                   |
| <i>Rhodotorula glacialis (T8Rg)</i>  |                                   |
| <i>Leuconeurospora sp. (T11Cd2)</i>  |                                   |
| <i>Mrakia robertii</i>               | 15°C                              |
| <i>Rhodotorula glacialis (T11Rs)</i> |                                   |
| <i>Mrakia sp.</i>                    |                                   |
| <i>Mrakia gelida</i>                 |                                   |
| <i>Mrakia blollopis</i>              |                                   |
| <i>Metschnikowia bicuspidata</i>     |                                   |
| <i>Mrakia psychrophila</i>           |                                   |
| <i>Rhodotorula sp.</i>               | 10°C                              |
| <i>Rhodotorula sp 2.</i>             |                                   |
| <i>Levadura sp.</i>                  |                                   |
| <i>Saccharomyces cerevisiae Q23</i>  | 28°C                              |
| <i>Xantophyllomyces dendrorhous</i>  | 22°C                              |

La temperatura óptima de cada una de las levaduras antárticas fue determinada mediante crecimiento en medio semi-sólido por nuestro grupo de trabajo. Las levaduras *S. cerevisiae* y *X. dendrorhous* fueron utilizadas como modelos comparativos de levaduras aisladas de regiones templadas.

#### 4.3 Extracción y análisis de pigmentos carotenoides.

La extracción de carotenoides de las levaduras seleccionadas se realizó según la metodología descrita por An y col. (1989). Se colectó el pellet celular desde 100 ml de cultivos en fase exponencial tardía de crecimiento, fue suspendido en 1 ml de agua nanopura y se agregaron 250  $\mu$ l de perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. Se realizó la ruptura celular en un molidor Minibeadbeater (BioSpec Bartlesville, USA) por 3 minutos, se agregó 1 ml de acetona y nuevamente se llevó al molidor por 3 minutos. Se repitió la extracción con 2 ml de acetona llevando al molidor por 3 minutos, seguido de 5 minutos de centrifugación a 4000 g, recolectando el sobrenadante luego de cada una de las centrifugaciones, hasta que el pellet celular fuese incoloro. Posteriormente al sobrenadante final se le agregó 1/5 del volumen de éter de petróleo, se mezcló y se centrifugó por 5 minutos a 4000 g. La fase superior (éter de petróleo) se traspasó a un tubo limpio de vidrio y se determinó su absorbancia a 474 nm. La cantidad total de pigmentos carotenoides se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Total de carotenoides: } \frac{\text{ug}}{\text{g peso seco}} = \frac{(\text{Vol eter})(A)(\text{Vol peso seco})}{(E)(\text{peso seco})(\text{Vol muestra})}$$

Donde, A: Absorbancia a 474 nm, v éter: volumen de éter de petróleo recuperado (ml), E: coeficiente de extinción molar carotenoides = 2100 ( $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) (An y col. 1989), vol muestra: volumen del cultivo celular para la extracción y vol peso seco: volumen del cultivo utilizado para calcular el peso seco. Para determinar el peso seco de cada una de las levaduras, se colectó por triplicado el pellet celular de 10 ml de cultivo secado por toda la noche a 80°C.

A continuación, se evaporó a temperatura ambiente todo el éter de petróleo recuperado y se agregó 100  $\mu$ l de acetona. La composición de los pigmentos se determinó mediante cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC), con una columna LiChroCART RP18 125-4 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), acetonitrilo:metanol:isopropanol (75:20:5 v v<sup>-1</sup>) como fase móvil a un flujo de 1 ml min<sup>-1</sup>. Cada pigmento se identificó de acuerdo a su tiempo de retención y a su espectro de absorción comparándolo con estándares, usando un detector de arreglo de diodos Shimadzu SP-M10A.

#### 4.4 Extracción y análisis de micosporinas.

La extracción de micosporinas se realizó mediante una adaptación de las metodologías descritas por Libkind y cols. (2011) y Balskus y Walsh (2010). Se colectó el pellet celular desde 100 ml de cultivos en fase exponencial tardía de crecimiento, fueron suspendidos en 1 ml de agua destilada y se agregó 250  $\mu$ l de perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. Se agitó en un molidor Minibeadbeater, realizando 3 pulsos de 3 minutos de agitación y 1 minuto en hielo. Se centrifugó por 15 minutos a 4.000 g se recuperó el sobrenadante y se midió su absorbancia a 310 nm. La cuantificación de las micosporinas se realizó mediante el coeficiente de extinción molar de la micosporina glutaminol glucósido 2500 ( $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) (Libkind y col. 2011), la absorbancia a 310 nm y se normalizó por el peso seco de cada una de las levaduras. La separación de micosporinas se realizó mediante un equipo de RP-HPLC, utilizando una columna Hypercarb C18 (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) y agua:metanol:ácido acético (99.3:0.5:0.2 v v<sup>-1</sup>) como fase móvil, a un flujo de 0.7 ml min<sup>-1</sup>. Las micosporinas fueron identificadas de acuerdo a su tiempo de retención y a su espectro de absorción comparándolo con lo reportado por Libkind D. y cols. (2011) y Balskus y Walsh (2010).

#### 4.5 Extracción y análisis de ergosterol.

La extracción de esteroides totales fue realizada según la metodología descrita por Shang (Shang y col. 2006). Se colectaron pellets celulares provenientes desde 10 ml de cultivo de cada una de las levaduras, se agregó 4 g de KOH y 16 ml de etanol al 60% (v v<sup>-1</sup>) y se incubó por 2 horas a 80°C. Los esteroides totales se extrajeron con 10 ml de éter de petróleo y se midió la absorbancia a 282 nm. Para los cálculos de cuantificación de esteroides se utilizó un coeficiente de extinción molar de 11900 ( $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) (Shang y col. 2006), y se normalizó por peso seco de cada levadura. Posteriormente se evaporó a temperatura ambiente el éter de petróleo y se agregó 100  $\mu$ l de acetona. La composición de esteroides fue evaluada mediante RP-HPLC, usando una columna LiChroCART RP18 125-4 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), metanol:agua (97:3 v v<sup>-1</sup>) como fase móvil y un flujo de 1.8 ml min<sup>-1</sup>. El ergosterol fue identificado de acuerdo a su tiempo de retención y a su espectro de absorción comparándolo con lo reportado por Shang y col., 2006.



#### **4.6 Extracción y análisis de ácidos grasos.**

La biomasa (250 g) para la extracción de los ácidos grasos (FAs) totales fue obtenida desde 8 L de cultivo en fase estacionaria obtenida en un fermentador BIOFLO 415 (New Brunswick Scientific). Las células se colectaron por centrifugación a 8.000 g durante 10 minutos y se lavaron con agua destilada. La extracción de los FA realizada según la metodología descrita por Bligh y Dyer (1959) y el análisis de composición evaluado mediante cromatografía de gas (CG). La extracción de FAs y análisis de composición se realizó por un servicio externo en Analab Chile S.A.

#### **4.7 Extracción y análisis de proteínas extracelulares.**

##### **4.7.1 Extracción de proteínas extracelulares totales y fraccionamiento.**

La extracción fue realizada según la metodología descrita por Carrasco y cols. (2012). Cultivos en fase exponencial tardía de crecimiento se centrifugaron a 8.000 g por 10 min y el sobrenadante pasado por filtros de 0,45 mm de diámetro de poro (Millipore). A este sobrenadante libre de células se agregó sulfato de amonio hasta alcanzar una saturación de 80 %, se incubó por 2 horas a 4°C y se centrifugó a 10.000 g por 10 minutos. El pellet se suspendió en 4 ml de agua nanopura o buffer. Para el fraccionamiento, se procedió del mismo modo solo que adicionando concentraciones crecientes de sulfato de amonio (20-80%), obtenido pellet proteico en cada paso.

Para una mayor purificación se realizó por cromatografía de exclusión molecular, la separación de las proteínas según su peso molecular utilizando el equipo AKTAPrime plus (General Electrics). Se utilizaron las columnas de exclusión molecular Superdex 75 increase 10/300 GI column y Superdex 200 increase 10/300 GI column (General Electrics). Los diferentes buffers utilizados para eluir las proteínas cargadas en las diferentes columnas fueron: Fosfato Citrato 150 mM NaCl pH 8,0, Fosfato de Sodio 150 mM NaCl pH 7,0, Tris HCl 150 mM NaCl pH 8,0 y Fosfato 200 mM 150 mM NaCl pH 8,0, al igual que el detergente no iónico Tween 20 al 20% y el detergente iónico Colato de Sodio. Cada una de las cromatografías fue realizada a un flujo de 0,2 ml/min a 25°C y una presión de 1 MPa. Se colectaron fracciones de 200 µl y fueron concentradas con filtros de corte Vivaspin 6 3 kDa (General Electrics). Las muestras obtenidas luego de ser concentradas fueron dializadas con

una columna His-Trap Desalting (General Electrics) a un flujo de 0,5 ml/min a 25°C y presión de 1 MPa.

#### **4.7.2 Análisis de proteínas.**

30  $\mu$ l de las muestras de proteínas se mezclaron con 10  $\mu$ l buffer de carga (Tris-HCl, pH 6,8; Glicerol; Azul de Bromofenol; SDS 10%;  $\beta$ -mercaptoetanol) y fueron incubadas por 3 minutos a 85°C. Se realizaron electroforesis en gel SDS-PAGE al 15 % a temperatura ambiente. Los geles se tiñeron con una solución de Azul de Coomassie ( 2,5 g/L Coomassie Blue G250 (Merck), 454 ml H<sub>2</sub>O, 454 ml Metanol absoluto (Merck) y 92 ml ácido acético (Merck)) y destañidos con una solución de agua:metanol:ácido acético (70:29:1 v/v) con agitación constante. Como estándar se utilizó PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). La cuantificación de proteínas se realizó usando el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific) de acuerdo con las indicaciones del proveedor. Para la identificación de proteínas se usó huella peptídica, para lo cual muestras liofilizadas se enviaron a "Center for Functional Genomics" (University at Albany, NY, USA). Las muestras fueron digeridas con tripsina como se describe previamente por Shevchenko y col. (1996). La reacción de digestión se detuvo con TFA a una concentración final de 1% y concentradas hasta obtener 20  $\mu$ l. El análisis de la muestra (5  $\mu$ l) fue realizado mediante Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem (LC.MS/MS). Los datos obtenidos fueron analizados mediante Mascot (Perkins y col. 1999).

#### **4.7.3 Ensayo con proteinasa K.**

Un ml de muestras de proteína se mezcló con 20  $\mu$ l de 20 mg/ml de Proteinasa K (Thermo Fisher Scientific), y se incubó a 55°C por 30-120 minutos. Como control se utilizó un "coctel" de inhibidores de proteasa (50X Promega, BioLabs) mezclado con el extracto proteico y proteinasa K al cual se le aplicó el mismo tratamiento.

#### **4.7.4 Liofilización.**

Para la liofilización de las muestras se utilizó el equipo FreeZone 2.5 (LABCONCO). Las muestras obtenidas de las levaduras fueron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  y posteriormente cargadas en el equipo de liofilizado para retirar el agua mediante vacío (sublimación). Cada una de las muestras fue liofilizada por 16 horas. Para reconstituir la muestra tratada se suspendió el liofilizado en agua nanopura y su estabilidad comprobada mediante medición de la propiedad anticongelante.

#### **4.8 Determinación de propiedad anticongelante**

Se utilizó una adaptación de la metodología descrita por Park y cols. (2013), que se basa en la inhibición, por parte de las proteínas, de la agregación de nanopartículas de oro (MSA-AuNP) por efecto del congelamiento. Para la síntesis de MSA-AuNP, 50 ml de 300 mM  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  se colocó en un agitador magnético con temperatura hasta alcanzar la ebullición. Rápidamente se agregó 2 ml de una solución de citrato de sodio 30 mM, se mantuvo en ebullición por 20 minutos más y luego se enfrió a temperatura ambiente. Se adicionó 2 ml de 30 mM ácido mercaptosuccinico y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente con agitación (Park y col. 2013). Para los ensayos se mezcló 50  $\mu\text{l}$  de la muestra proteica con 100  $\mu\text{l}$  de MSA-AuNP y 50  $\mu\text{l}$  de agua nanopura. La mezcla fue congelada 1 hora a  $-20^{\circ}\text{C}$  y descongelada 30 minutos a  $22^{\circ}\text{C}$ . Antes y después de congelar/descongelar se realizó un barrido entre 400 y 800 nm con el equipo EPOCH 2 (Biotek). Se determinó la razón  $A_{520}/A_{650}$  antes y después de congelar la mezcla, que denominaremos relación antifreeze (RAF). Como control se utilizó BSA (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), las proteínas obtenidas desde el medio YM sin inocular, las proteínas obtenidas de la levadura *S. cerevisiae* Q23, poli-vinil alcohol (PVA) y polietilenglicol (PEG).

#### **4.9 Extracción y análisis de DNA**

Pellet de cada una de las levaduras crecidas en medio YM fueron suspendidos en 400  $\mu\text{l}$  de buffer TE (Tris-EDTA 10:25; pH 8,0) y se mezclaron con 250  $\mu\text{l}$  de perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. Luego, se agitó en vórtex a máxima velocidad durante 10 minutos. Se agregó 400  $\mu\text{l}$  de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1; pH 8,0), se agitó 1 minuto a vórtex y se centrifugó a

10.000 g por 5 minutos. A la fase acuosa obtenida se le realizó una segunda extracción fenólica y para eliminar los restos de fenol de la muestra se lavó con 400  $\mu$ l de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El DNA obtenido se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto y la mezcla se incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 18 horas. El DNA se obtuvo por centrifugación a 10.000 g por 10 minutos y se suspendió en buffer TE (Tris-EDTA 10:1; pH 8,0) con 34  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de RNasa A. Luego la muestra se incubó 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . El DNA obtenido se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Los ácidos nucleicos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa en buffer TAE 1X (40 nM Tris-acetato; 1 nM EDTA; pH 8,0) con el colorante Safe View (NBS Biologicals Ltd). Las muestras de DNA se mezclaron con buffer de carga 1X GLD (0,3 % Ficol; 0,04 %; azul de bromofenol; 5,8 % glicerol) y las bandas se visualizaron por la fluorescencia emitida al irradiar con luz UV. Como marcador de peso molecular se utilizó 100 bp (Fermentas) y 1 kb (New England Biolabs).

La extracción y purificación de DNA plasmidial de *E. coli* pBluescript, se realizó utilizando un kit comercial AxyPrep<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep, siguiendo el protocolo entregado por el fabricante. La purificación de los diferentes fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se llevó a cabo utilizando el kit comercial Ultra Clean<sup>TM</sup> 15 DNA Purification Kit (MO BIO), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

#### **4.10 Amplificación y clonamiento de producto de PCR.**

Los oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR y secuenciación se indican en la Tabla 2, los que fueron sintetizados por *Integrated DNA Technologies* (IDT). Cada una de las reacciones de PCR contenía la mezcla de: 1X buffer (200 mM Tris-HCl; 500 nM KCl; pH 8,4); 2 mM de MgCl; 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP y dTTP); 1  $\mu\text{M}$  de cada partidor; 20 ng de DNA y 1 unidad enzimática de *Pfu* DNA polimerasa (New England Biolabs), en un volumen final de 25  $\mu\text{l}$ . Las reacciones de PCR estándar se realizaron en un termociclador Applied Biosystem 2720 según el siguiente protocolo: 3 minutos de denaturación a  $94^{\circ}\text{C}$ , seguido de 35 ciclos de: 30 segundos a  $94^{\circ}\text{C}$  de denaturación, 30 segundos a  $55^{\circ}\text{C}$  para el alineamiento de los partidores y 3 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$

**Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en el PCR y secuenciación.**

| Nombre       | Secuencia                     |
|--------------|-------------------------------|
| LeIBP Fw     | 5'-CATATGCAGCGCGACCTCTCCGT-3' |
| LeIBP Rw     | 5'-TCTAGATTAAGCCACTGGCG-3'    |
| IBP Yeast Fw | 5'-TTTCCAGGAGGGTAGCAATG-3'    |
| IBP Yeast Rw | 5'-TGCACAAACCAGCAGAAGGA-3'    |
| AFP Y Fw     | 5'-ATGTTCTCCTCAACCTACCTCC-3'  |
| AFP Y Rv     | 5'-CTACTTTTGCACGACGGTAGCC-3'  |
| M13 Fw       | 5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3' |
| M13 Rv       | 5'-AGCGGATAACAATTCACACAGGA-3' |

Los oligonucleótidos LeIBP, IBP Yeast y AFP Y fueron diseñados tomando como molde la secuencia de una proteína anticongelante descrita en la levadura *Leuconeuospora* sp. (Numero de Acceso GQ336995 en GenBank, NCBI).



de extensión. Finalmente, la reacción se mantuvo 10 minutos a 72°C para una elongación final. Las muestras fueron guardadas a 4°C previo a su análisis. Los diferentes productos de PCR (amplicones) obtenidos se clonaron en el vector pBluescript (Invitrogen). La reacción de ligado se realizó según el protocolo descrito por Sambrook y Russell, 2001. Cada una de las reacciones de ligado contenían: 1 µl enzima T4 DNA ligasa (Fermentas), 2 µl de vector pBluescript (100 ng), 2 µl buffer 10X (T4 DNA ligasa), 10 µl de fragmentos DNA y 5 µl de H<sub>2</sub>O nanopura. La mezcla se incubó 2 horas a 22°C. Posteriormente 10 µl se dializaron con H<sub>2</sub>O nanopura para retirar el contenido salino. La transformación se realizó en células electrocompetentes de *E. coli DH5α*, se utilizó el protocolo descrito por Sambrook y Russell, 2001. Para transformar, se mezcló 40 µl de células electrocompetentes y 5-10 µl de mezcla de ligado en una cubeta de electroporación de 0,2 cm enfriada. La electroporación se llevó a cabo con el equipo BioRad Gene Pulser X Cell, bajo las condiciones de 25µF, 200 Ω y 2,5 KV. Posteriormente se adicionó 1 ml de medio LB, se incubó 1 hora a 37°C y se sembraron alícuotas de 100 µl en medio LB semi-sólido suplementado con el antibiótico ampicilina (100 µg/ml) y X-gal (5-bromo-4cloro-3-indol-β-D-galactopiranosido, 80 ug/ml), las células se incubaron durante toda la noche a 37°C.

La secuenciación del DNA obtenido de las cepas de *E. coli* fue realizado por el servicio externo realizado por Macrogen Inc. (Korea). Para el análisis de las secuencias se utilizaron las herramientas Contig Express y AlignX del paquete de programas Vector NT Advance v.11 (Invitrogen) y las herramientas disponibles en línea como BLAST (Nucleotide BLAST y blastx) u ORF Finder del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

#### **4.11 Análisis de Componentes Principales (ACP).**

El análisis de los datos obtenidos de cada uno de los parámetros medidos (Tolerancia CC/D, Tolerancia a UV, Contenido de AFP, ergosterol, PUFAs, pigmentos carotenoides y micospirinas) fue realizado mediante el análisis estadístico ACP en el programa R y Restudio utilizando el código descrito en Anexos.

## 5. Resultados.

### 5.1 Selección de levaduras antárticas con diferentes grados de tolerancia a la congelación y la radiación UV.

Teniendo en mente a priori una relación directa entre la tolerancia a estrés físicos y la producción de los respectivos metabolitos protectores, se determinó la sobrevivencia de las levaduras después de la exposición a ciclos de congelación/descongelación (CC/D) y elevada radiación UV. Respecto de la tolerancia a la congelación (Tabla 3), comparativamente las levaduras que presentaron mayor tolerancia a los CC/D fueron *D. fristingensis*, *C. parapsilosis*, *L. creatinivora* y *C. victoriae*. Las levaduras que presentaron menor tolerancia fueron *W. anomalus*, *Cr. gastricus*, *M. gelida*, *M. blollopis*, llegando luego de dos ciclos a un porcentaje de sobrevivencia menor al 0,1 %. Otras especies de levaduras presentaron una tolerancia que fue considerada como intermedia en relación a las mencionados anteriormente y fueron seleccionadas con fines comparativos para los siguientes objetivos (Tabla 3). En estos experimentos las levaduras fueron crecidas a su óptimo de temperatura antes de ser congeladas, quedando abierta la posibilidad de que las levaduras puedan inducir una respuesta si son expuestas a bajas temperaturas antes de ser congeladas. Por ello se realizó una nueva evaluación, pero en este caso, las levaduras fueron incubadas a 4°C por 24, 48 y 72 horas antes de congelar, para una levadura una con alta (*Le. creatinivora*) y baja (*Cr. gastricus*) tolerancia a los CC/D (Tabla 4). De acuerdo con los resultados de decaimiento celular la incubación previa a 4°C por 24, 48 y 72 no tuvo un efecto sobre la tolerancia a los CC/D.

La resistencia a la luz ultravioleta se determinó en un primer apronte a un tiempo de exposición de 5 minutos, sin embargo, en todas las levaduras analizadas no se observó disminución de la viabilidad en ese tiempo. Por ello los tiempos de exposición se aumentaron hasta 40 minutos (Tabla 5).

Tabla 3. Porcentaje de sobrevivencia en el tiempo de levaduras antárticas expuestas a CC/D.

| Especie de levadura                    | T°C         | Tiempo expuestas a congelación (horas) |       |       |       |       |       |
|--|-------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|
|  |             | 0                                      | 12    | 24    | 36    | 48    | 60    |
| <b>Porcentaje sobrevivencia</b>        |             |  |       |       |       |       |       |
| <i>Wickerhamomyces anomalus</i> ***    |             | 100                                    | 0,03  | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> **     | <b>30°C</b> | 100                                    | 100   | 12,67 | 3,53  | 0,13  | 0,00  |
| <i>Candida parapsilosis</i> *          |             | 100                                    | 50,00 | 14,55 | 13,18 | 7,27  | 2,64  |
| <i>Leucosporidiella creatinivora</i> * |             | 100                                    | 98,04 | 33,33 | 2,75  | 7,65  | 6,86  |
| <i>Candida sake</i>                    |             | 100                                    | 1,93  | 0,21  | 0,04  | 0,02  | 0,00  |
| <i>Dioszegia fristingensis</i> *       |             | 100                                    | 100   | 12,35 | 22,94 | 11,76 | 11,18 |
| <i>Leucosporidiella fragaria</i>       |             | 100                                    | 3,54  | 0,73  | 0,52  | 0,33  | 0,52  |
| <i>Cryptococcus gastricus</i> ***      |             | 100                                    | 0,11  | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> **   | <b>22°C</b> | 100                                    | 4,13  | 0,07  | 0,03  | 0,05  | 0,01  |
| <i>Leuconeurospora</i> sp. (T27Cd2)    |             | 100                                    | 7,21  | 0,56  | 0,01  | 0,01  | 0,00  |
| <i>Rhodotorula laryngis</i> **         |             | 100                                    | 23,68 | 5,79  | 1,87  | 0,26  | 1,05  |
| <i>Cryptococcus victoriae</i> *        |             | 100                                    | 60,39 | 3,33  | 3,61  | 1,31  | 1,25  |
| <i>Cryptococcus gilvescens</i>         |             | 100                                    | 0,57  | 0,05  | 0,01  | 0,00  | 0,00  |
| <i>Holtermanniella watticus</i>        |             | 100                                    | 1,45  | 0,21  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| <i>Cryptococcus</i> sp.                |             | 100                                    | 0,11  | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| <i>Dioszegia</i> sp.                   |             | 100                                    | 66,22 | 5,54  | 0,05  | 0,01  | 0,00  |
| <i>Leuconeurospora</i> sp. (T27Cd2)    |             | 100                                    | 1,93  | 0,28  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| <i>Leuconeurospora</i> sp. (T11Cd2)    |             | 100                                    | 34,48 | 6,21  | 0,72  | 0,09  | 0,10  |
| <i>Mrakia robertii</i>                 | <b>15°C</b> | 100                                    | 1,01  | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| <i>Rhodotorula glacialis</i> (T11Rs)   |             | 100                                    | 5,82  | 0,18  | 0,01  | 0,00  | 0,00  |
| <i>Mrakia</i> sp.                      |             | 100                                    | 15,79 | 1,23  | 0,11  | 0,12  | 0,00  |
| <i>Mrakia gelida</i> ***               |             | 100                                    | 0,09  | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| <i>Mrakia blollopis</i> ***            |             | 100                                    | 0,67  | 0,01  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| <i>Metschnikowia bicuspidata</i>       |             | 100                                    | 23,57 | 20,00 | 16,43 | 2,93  | 1,07  |
| <i>Mrakia psychrophila</i>             |             | 100                                    | 2,31  | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| <i>Rhodotorula</i> sp.                 | <b>10°C</b> | 100                                    | 0,01  | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| <i>Rhodotorula</i> sp 2.               |             | 100                                    | 0,53  | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| <i>Levadura</i> sp.                    |             | 100                                    | 14,78 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| <i>S. cerevisiae</i> Q23               | <b>28°C</b> | 100                                    | 0,26  | 0,01  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |

El resultado mostrado es el promedio de tres mediciones. En todos los casos el error del recuento viable no superó el 20%, el cual está dentro del error normal de la metodología utilizada. T°C: Temperatura óptima de crecimiento de cada una de las levaduras. Levaduras seleccionadas, \* tolerancia alta; \*\* tolerancia media; \*\*\* tolerancia baja.

**Tabla 4. Tasa de decaimiento celular.**

| <b>Tiempo de Incubación</b> | <b><i>Le. creatinivora</i></b> | <b><i>Cr. gastricus</i></b> |
|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| <b>T0 (Control)</b>         | 0,09 ± 0,006                   | 0,235 ± 0,086               |
| <b>T24 (4°C)</b>            | 0,109 ± 0,02                   | 0,29 ± 0,076                |
| <b>T24 (T°A)</b>            | 0,223 ± 0,032                  | 0,381 ± 0,071               |
| <b>T48 (4°C)</b>            | 0,28 ± 0,051                   | 0,38 ± 0,063                |
| <b>T48 (T°A)</b>            | 0,532 ± 0,072                  | 0,541 ± 0,097               |
| <b>T72 (4°C)</b>            | 0,209 ± 0,015                  | 0,434 ± 0,083               |
| <b>T72 (T°A)</b>            | 1,407 ± 0,266                  | 0,765 ± 0,075               |

La diferencia de las tasas medidas entre cada uno de los cultivos se analizó con el test de ANOVA ( $P < 0,05$ ). T0 (Control, tiempo 0, levaduras sin incubación): cultivo de ambas levaduras antes de ser incubados a 4°C y T°A (Temperatura Ambiente) por diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas).

**Tabla 5. Porcentaje de sobrevida en el tiempo de las levaduras antárticas expuestas a radiación UV de 254 nm.**

| Especie de levadura                      | T°C         | Tiempo expuestas a radiación UV de 254 nm<br>(minutos) |        |       |       |       |
|--|-------------|--|--------|-------|-------|-------|
|  |             | 0  | 5      | 10    | 20    | 40    |
| <b>Porcentaje sobrevida</b>              |             |  |        |       |       |       |
| <i>Wickerhamomyces anomalus</i> **       |             | 100  | 62,13  | 14,93 | 9,79  | 0,75  |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> *        | <b>30°C</b> | 100  | 100,00 | 44,26 | 21,02 | 9,63  |
| <i>Candida parapsilosis</i>              |             | 100  | 11,44  | 17,78 | 10,27 | 2,05  |
| <i>Leucosporidiella creatinivora</i> *** |             | 100  | 10,00  | 1,00  | 1,00  | 0,00  |
| <i>Candida sake</i> **                   |             | 100  | 7,56   | 3,39  | 4,80  | 0,70  |
| <i>Dioszegia fristingensis</i>           |             | 100  | 12,50  | 10,00 | 6,25  | 0,05  |
| <i>Leucosporidiella fragaria</i>         |             | 100  | 100,00 | 10,00 | 0,10  | 0,05  |
| <i>Cryptococcus gastricus</i> *          |             | 100  | 12,50  | 17,80 | 10,22 | 2,05  |
| <i>Leuconeurospora sp. (T27Cd2)</i> *    | <b>22°C</b> | 100  | 78,34  | 61,78 | 66,87 | 5,98  |
| <i>Sporidiobolus salmonicolor</i>        |             | 100  | 34,12  | 13,56 | 8,34  | 6,33  |
| <i>Rhodotorula laryngis</i> *            |             | 100  | 98,03  | 94,11 | 21,20 | 0,29  |
| <i>Cryptococcus victoriae</i>            |             | 100  | 20,34  | 10,25 | 1,31  | 0,05  |
| <i>Cryptococcus gilvescens</i>           |             | 100  | 21,61  | 14,85 | 2,41  | 0,14  |
| <i>Holtermanniella watticus</i>          |             | 100  | 18,77  | 10,65 | 2,87  | 0,12  |
| <i>Cryptococcus sp.</i>                  |             | 100  | 91,79  | 14,31 | 15,54 | 0,62  |
| <i>Dioszegia sp.*</i>                    |             | 100  | 75,99  | 78,49 | 65,55 | 39,26 |
| <i>Rhodotorula glacialis (T8Rg)</i>      |             | 100  | 7,34   | 6,78  | 6,87  | 0,98  |
| <i>Leuconeurospora sp. (T11Cd2)</i>      |             | 100  | 7,04   | 2,18  | 2,34  | 2,55  |
| <i>Mrakia robertii</i>                   | <b>15°C</b> | 100  | 12,00  | 4,80  | 1,28  | 0,01  |
| <i>Rhodotorula glacialis (T11Rs)</i> *** |             | 100  | 8,01   | 0,19  | 0,01  | 0,00  |
| <i>Mrakia sp.**</i>                      |             | 100  | 38,05  | 8,05  | 1,00  | 0,26  |
| <i>Mrakia gelida</i>                     |             | 100  | 9,12   | 10,87 | 0,78  | 0,09  |
| <i>Mrakia blollopis</i>                  |             | 100  | 9,62   | 2,57  | 0,02  | 0,00  |
| <i>Metschnikowia bicuspidata</i>         |             | 100  | 13,68  | 14,85 | 2,41  | 0,14  |
| <i>Mrakia psychrophila</i>               |             | 100  | 10,00  | 1,00  | 0,10  | 0,03  |
| <i>Rhodotorula sp.</i>                   | <b>10°C</b> | 100  | 48,29  | 20,72 | 5,67  | 0,23  |
| <i>Rhodotorula sp 2.</i>                 |             | 100  | 9,12   | 6,09  | 1,06  | 0,02  |
| <i>Levadura sp.</i>                      |             | 100  | 15,45  | 7,34  | 3,21  | 0,12  |

El resultado mostrado es el promedio de tres mediciones. En todos los casos el error del recuento viable no superó el 20%, el cual está dentro del error normal de la metodología utilizada. T°C: Temperatura óptima de crecimiento de cada una de las levaduras. Levaduras seleccionadas, \* tolerancia alta; \*\* tolerancia media; \*\*\* tolerancia baja.

Comparativamente las levaduras que presentaron menor tolerancias a la radiación con luz UV-C fueron, *Rh. glacialis*, *M. psychrophila*, *Le. creatinivora*, *Leuconeurospora* sp. (T11Cd2), *Metschnikowia* sp., *C. sake* y *M. robertii*, las cuales mostraron un porcentaje de sobrevivida entre 0,2 y 4,8% luego de 10 minutos de irradiación. Por el contrario, levaduras como *Leuconeurospora* sp. (T27Cd2), *Rh. laryngis*, *Rh. mucilaginoso* y *Dioszegia* sp. mostraron una alta tolerancia, 10- 40% de sobrevivida luego de 20 minutos de irradiación. Otras levaduras que presentaron una tolerancia intermedia entre las mencionadas anteriormente fueron seleccionadas con fines comparativos (Tabla 5).

## 5.2 Determinación de metabolitos fotoprotectores producidos por levaduras.

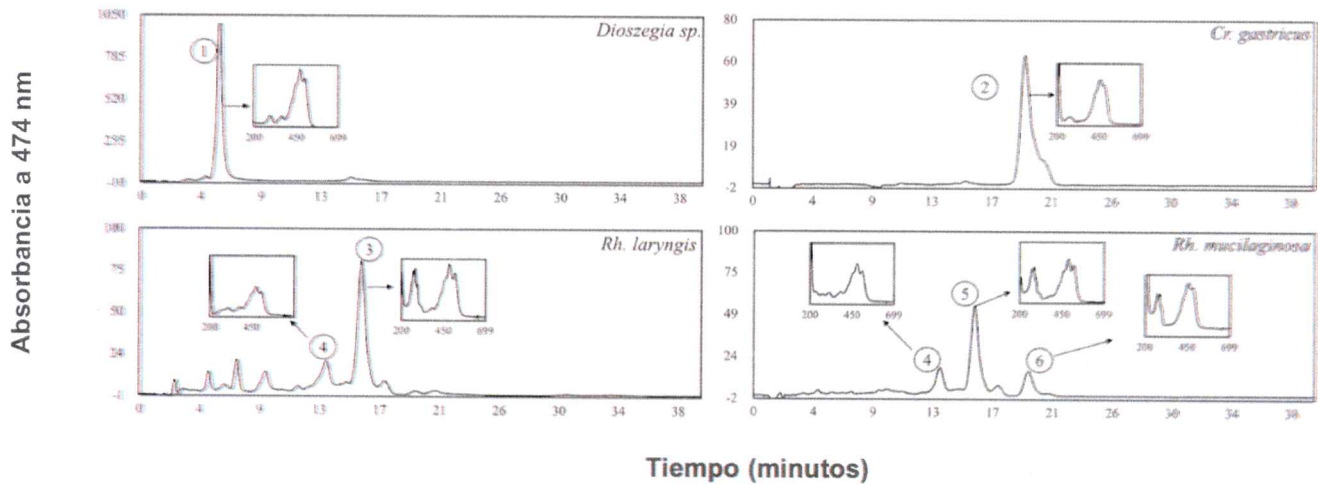
El contenido de los pigmentos obtenidos de cada una de las levaduras seleccionadas fue cuantificado midiendo la absorbancia a 474 y expresado en  $\mu\text{g/g}$  de peso seco de levadura (Tabla 6). Las levaduras con mayor cantidad de carotenoides fueron en orden decreciente *Dioszegia* sp., *Rh. laryngis*, *Rh. mucilaginoso* y *Cr. gastricus*, todas levaduras que desarrollan colonias coloreadas en medios semisólidos. Además, a excepción de *Leuconeurospora* sp. (T27Cd2), la cual no es pigmentada, son las más resistentes al UV. La composición de pigmentos fue analizada mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) (Figura 1). *Dioszegia* sp. y *Cr. gastricus* presentaron cromatogramas con picos que de acuerdo al tiempo de retención y espectro de absorbancia corresponderían a OHK toruleno y 2- $\gamma$ -caroteno. Del mismo modo *Rh. laryngis* produciría toruleno y licopeno mientras que *Rh. mucilaginoso* produciría toruleno, 2- $\gamma$ -caroteno y licopeno.

El análisis de la producción de micosporinas en las diferentes especies analizadas se muestra en la Tabla 6. Las muestras fueron cuantificadas por absorbancia a 310 nm. Las levaduras que presentaron el mayor contenido de micosporinas fueron *Le. creatinivora* y *Leuconeurospora* sp. T27Cd2, mientras las con menor contenido fueron *Rh. laryngis*, *W. anomalus* y *Dioszegia* sp. En el análisis por RP-HPLC (Figura 2), en las muestras de *Rh. laryngis* y *Dioszegia* sp. se observaron picos con tiempos de retención de 18 y 20 minutos que poseen espectros de absorbancia con un máximo a 309 nm, similar a lo descrito para micosporinas (Bandaranayake, 1998; Balskus y Walsh,

**Tabla 6. Contenido de pigmentos carotenoides y micosporinas en levaduras antárticas.**

| <b>Especie de Levadura</b>         | <b>Tolerancia a la radiación UV</b> | <b>Carotenoides</b> | <b>Micosporinas</b> |
|------------------------------------|-------------------------------------|---------------------|---------------------|
| <i>Dioszegia sp.</i>               | Alta                                | 193.8 ± 2.8         | 51 ± 2              |
| <i>Leuconeuospora sp. (T27Cd2)</i> |                                     | 5.4 ± 0.3           | 209 ± 13            |
| <i>Cr. gastricus</i>               |                                     | 24.8 ± 0.8          | 126 ± 6             |
| <i>Rh. laryngis</i>                |                                     | 87 ± 5.3            | 86 ± 2              |
| <i>Rh. mucilaginoso</i>            |                                     | 56.9 ± 3.2          | 125 ± 2             |
| <i>W. anomalus</i>                 | Media                               | 0.87 ± 0.02         | 66 ± 2              |
| <i>C. sake</i>                     |                                     | 2.8 ± 0.1           | 156 ± 3             |
| <i>Mrakia sp.</i>                  |                                     | 1.2 ± 0.1           | 121 ± 2             |
| <i>Rh. glacialis</i>               | Baja                                | 4.3 ± 0.2           | 132 ± 2             |
| <i>Le. creatinivora</i>            |                                     | 0.13 ± 0.02         | 242 ± 11            |
| <i>M. robertii</i>                 |                                     | 1.5 ± 0.1           | 108 ± 5             |

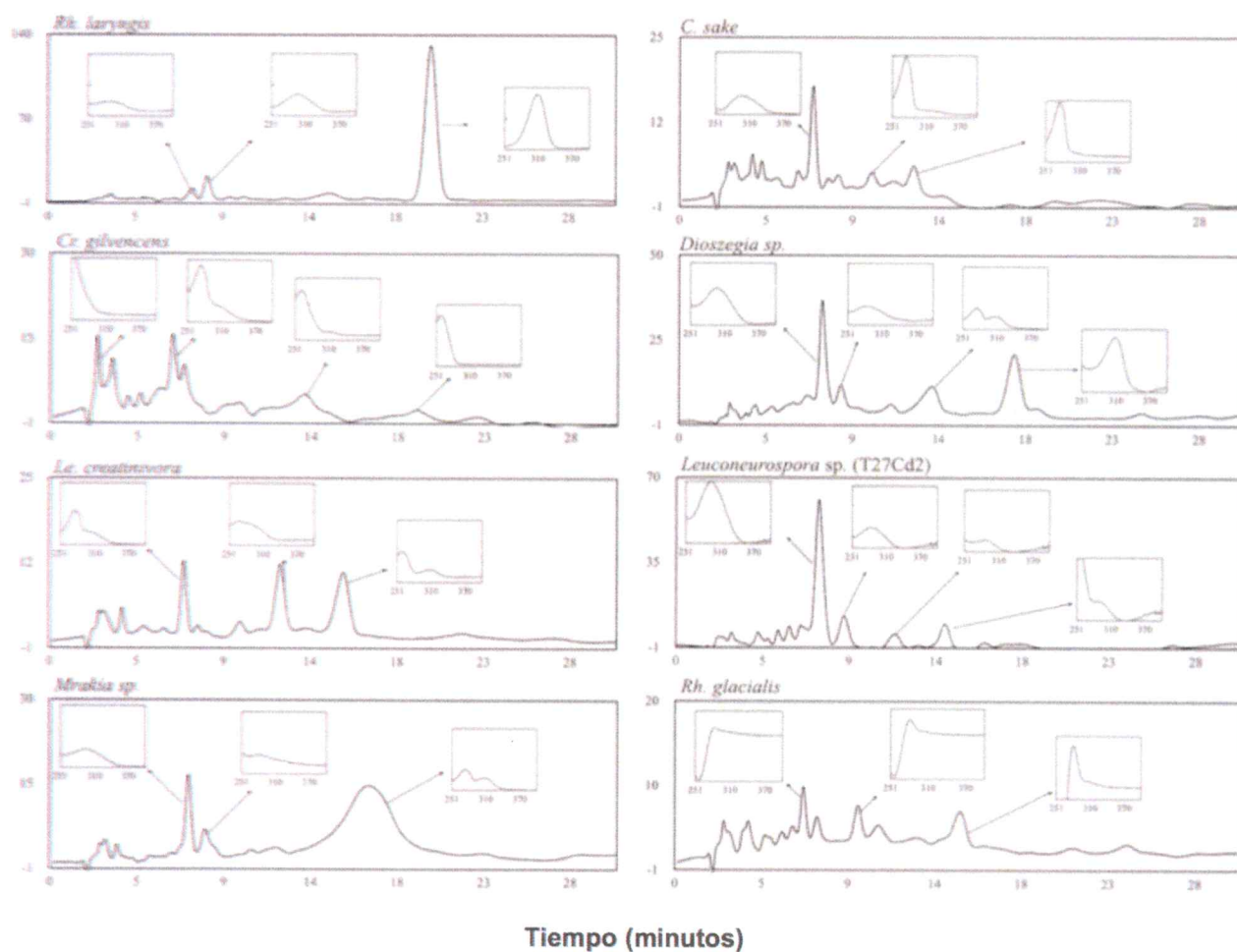
El contenido de carotenoides y micosporinas es mostrado en  $\mu\text{g/g}$  de peso seco en cada uno de los casos. Los pigmentos carotenoides y micosporina fueron cuantificados midiendo la absorbancia a 474 y 310 nm respectivamente.



**Figura 1. Análisis de carotenoides mediante RP-HPLC.** Cromatogramas representativos de muestras de pigmentos carotenoides obtenidos de las levaduras *Dioszegia sp.*, *Cr. gastricus*, *Rh. laryngis* y *Rh. mucilaginosa*. Los picos según su tiempo de retención en la columna y espectros de absorbancia medidos con un detector de arreglo de diodos Shimadzu SP-M10A corresponden a 1 OHK toruleno; 2 gama caroteno; 3 toruleno; 4 licopeno; 5 toruleno; 6 gama caroteno. El espectro de absorbancia es mostrado en cada uno de los casos (Britton y col., 2004).





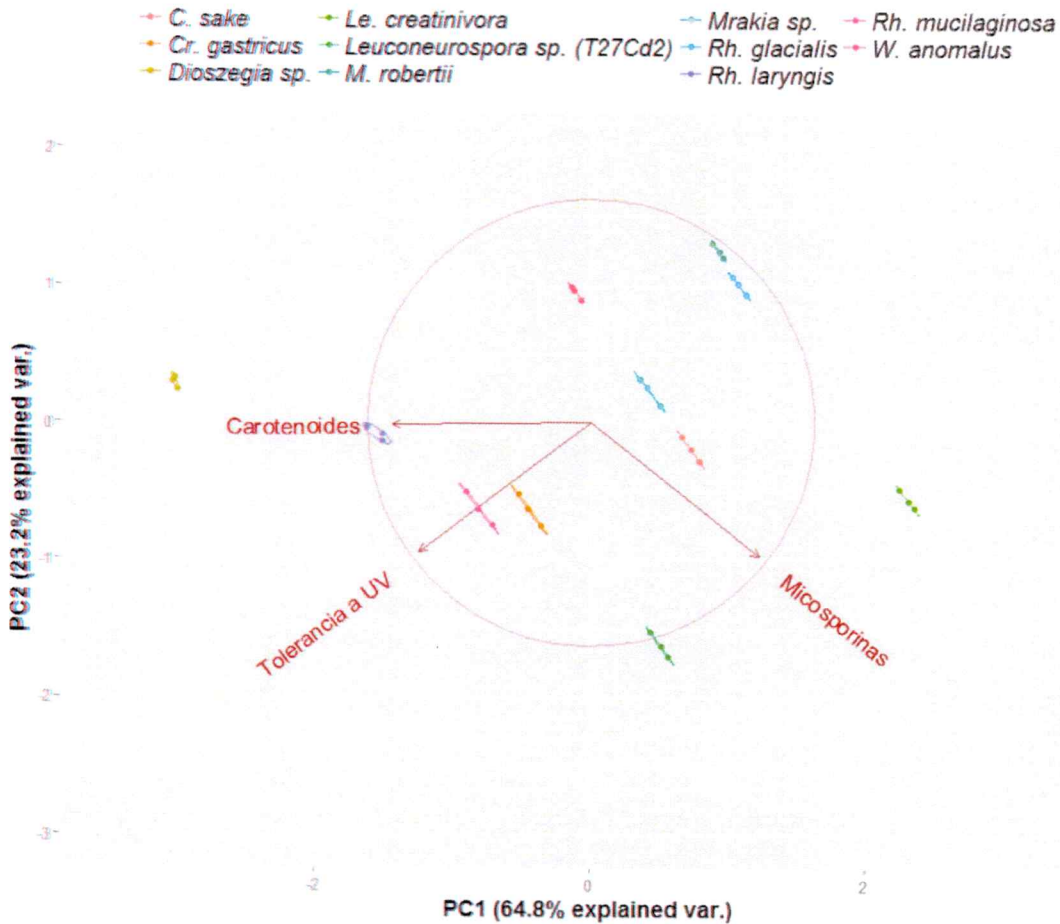


**Figura 2: Análisis de microsporinas mediante RP-HPLC.** Cromatogramas representativos de las muestras de microsporinas extraídas de las levaduras *Rh. laryngis*, *C. sake*, *Cr. gilvencens*, *Dioszegia sp.*, *Le. creatinivora*, *Leuconeurospora sp. (T27Cd2)*, *Mrakia sp.* y *Rh. glacialis*. Los diferentes espectros de absorbancia son mostrados en cada uno de los casos (Bandaranayake, 1998; Balskus y Walsh, 2010). Su identificación fue realizada mediante un detector de arreglo de diodos Shimadzu SP-M10A.

2010). Los demás picos con tiempos de retención menor corresponderían a intermediarios en la ruta de síntesis de las micosporinas. En *Mrakia* sp. y *Le. creatinivora* se observó picos centrados en los 16 minutos, presentaron espectros de absorción con máximos a 275 y 309 nm, y 261 y 309 nm, respectivamente. Las muestras obtenidas de las levaduras *Leuconeurospora* sp. (T27Cd2), *C. sake* y *Mrakia* sp. presentaron picos con tiempos de retención entre 7 y 8 minutos, con espectros de absorbancia similar al descrito para 4-deoxygadusol (máximo a 296 nm en solución acuosa, pH 7,0) intermediario en la ruta de síntesis de las micosporinas (Bandaranayake, 1988; Balskus y Wash, 2010). En el caso de *W. anomalus*, *M. robertii* y *Rh. mucilaginoso*, estas no producen micosporinas en las condiciones de cultivo usadas.

#### **5.2.1 Análisis de la influencia de pigmentos carotenoides y micosporinas a la tolerancia a UV por levaduras antárticas.**

De manera adicional y poder complementar los datos obtenidos, se realizó un Análisis de Componentes Principales, el cual evalúa la relación de diferentes variables respecto a una condición, en este caso la tolerancia a la radiación UV. Se utilizaron los datos de tolerancia a la radiación UV (sobrevivencia en el tiempo) y las concentraciones de pigmentos carotenoides y micosporinas. Al evaluar mediante el APC (Figura 3) cuál de los dos metabolitos tenía más influencia sobre la tolerancia, se determinó que los pigmentos carotenoides tenían más influencia frente a esta condición que las micosporinas confirmando lo reportado por Kirti y col., 2014.



**Figura 3: Análisis de componentes principales involucrados en la tolerancia a alta radiación UV.** Se muestra el resultado de tres mediciones en cada una de las variables determinadas. El error es mostrado en forma de elipse. Eje X PC1, explica en un 64,8 % la variabilidad de los datos. Eje Y PC2, explica en un 23,2 % la variabilidad de los datos. Se utilizó el programa R y Restudio para el análisis de los datos.

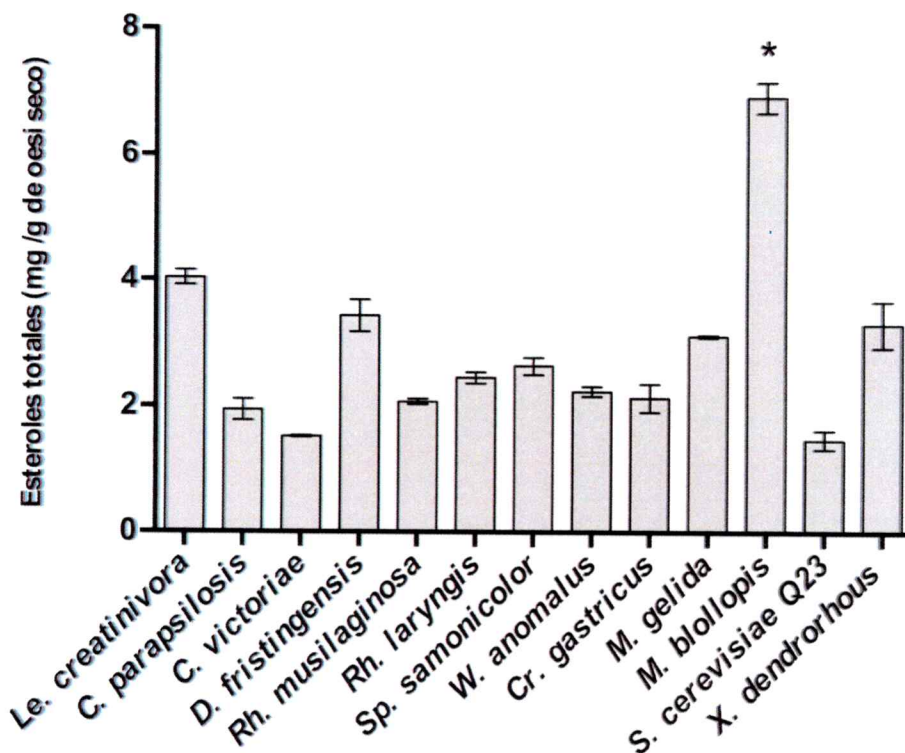
### 5.3 Análisis de metabolitos asociados a la tolerancia al frío/congelación.

#### 5.3.1 Esteroles totales y ácidos grasos (FAs).

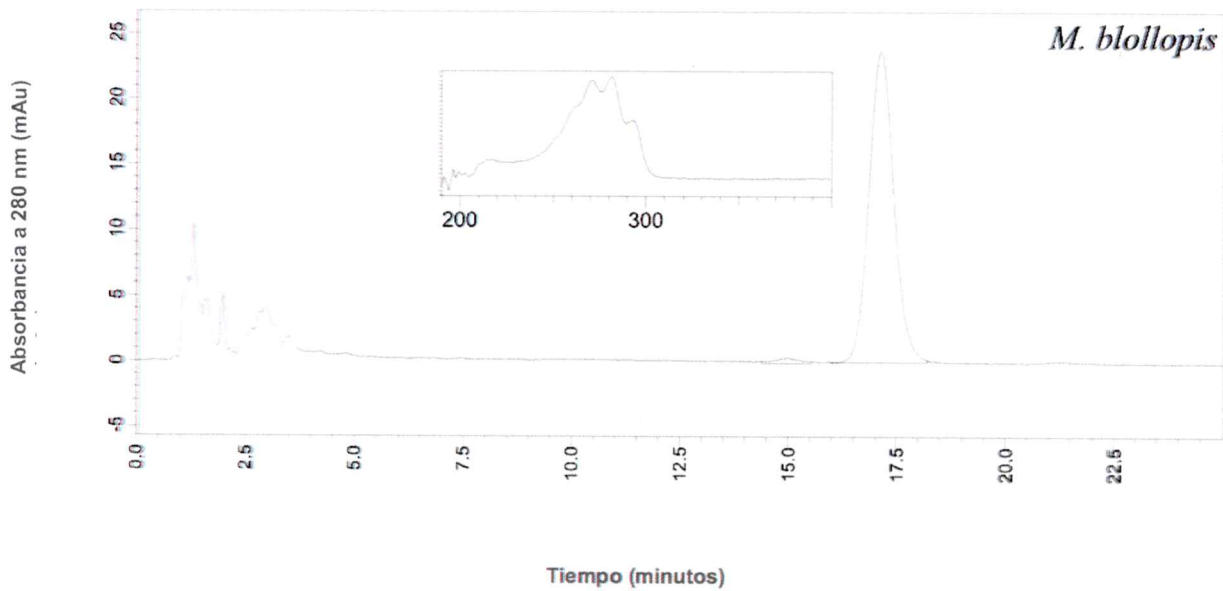
Las levaduras *D. fristingensis*, *Le. creatinivora* y *M. blollopis* son las levaduras que presentan un mayor contenido de esteroles totales (Figura 4), 3,4, 4,0 y 6,9 mg/g de peso seco, respectivamente. En el análisis mediante RP-HPLC se observó que el principal esteroles (97-100%) fue ergosterol (Figura 5; Anexo, Figura IV, Tabla I). Además, se evaluó si la temperatura tiene un efecto sobre la producción de esteroles, para lo cual las levaduras *Le. creatinivora*, *Rh. mucilaginoso*, y *M. blollopis*, alta, intermedia y baja tolerancia CC/D, respectivamente, fueron crecidas a 10, 15, 22 y 30°C y se realizó la extracción de esteroles totales. Como se muestra en la Figura 6, la concentración de esteroles totales (mg/g de peso seco) no varió al modificar la temperatura de crecimiento de las levaduras, así como tampoco la composición de esteroles, en donde el principal esteroles fue el ergosterol (97-100%)(Anexo, Tabla II). Se midió el crecimiento de *M. blollopis*, levadura que produce la mayor cantidad de ergosterol, a diferentes temperaturas para evaluar su posible escalamiento industrial. Como se logra ver en la Figura 7 las velocidades de crecimiento determinadas a 10, 15, 22 y 30°C fueron de: 0,070, 0,098, 0,056, 0,061 horas, respectivamente, comprobando que la velocidad de crecimiento de la curva realizada a 15°C presenta variación significativa respecto a las otras tres.

El análisis de FAs totales y PUFAs se realizó con 250 g de biomasa húmeda de cada una de las levaduras seleccionadas (Tabla 7). Se encontró que el largo de la cadena de los FAs encontrados era de 18 átomos de carbono mayoritariamente y los FAs predominantes en la mayoría de las levaduras fueron el ácido palmítico (C<sub>16:1</sub>), ácido oleico (C<sub>18:1</sub>) y ácido linolénico (C<sub>18:2</sub>). También se observó la presencia de FAs poliinsaturados en las levaduras *Le. creatinivora*, *C. victoriae*, *D. fristingensis*, *W. anomalus* y *Cr. gastricus*. PUFAs de más de 20 átomos de carbonos también fueron identificados, aunque en baja proporción en las levaduras *Le. creatinivora*, *C. parapsilosis*, *C. victoriae*, *Rh. mucilaginoso*, *Rh. laryngis*, *W. anomalus*, *Cr. gastricus* y *M. blollopis*.

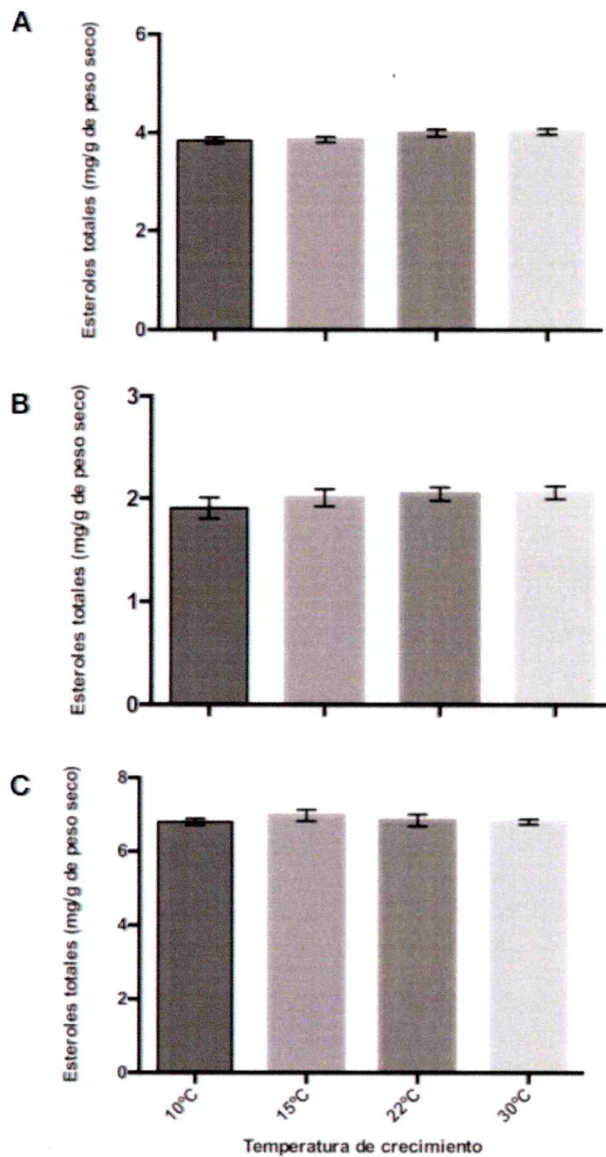
## Contenido de esteroides totales en levaduras antárticas



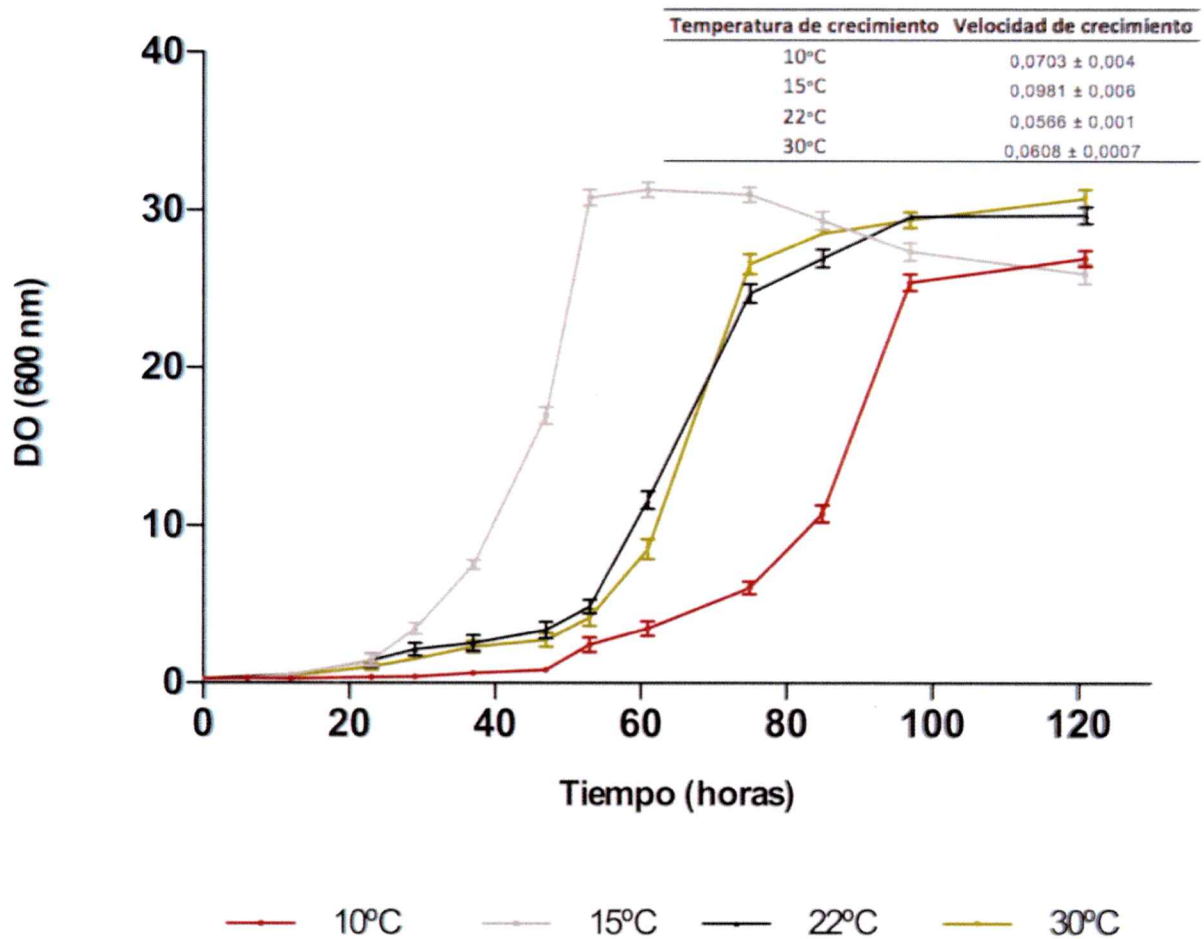
**Figura 4. Contenido de esteroides totales de levaduras psicrotolerantes.** Los esteroides totales fueron cuantificados midiendo la absorbancia a 280 nm. El contenido total de esteroides es mostrado en mg/g de peso seco (promedio de tres extracciones de cultivos independientes, crecidos a la temperatura óptima de cada una de las levaduras). Como control se realizó la extracción de esteroides totales a dos levaduras aisladas desde el continente, *S. cerevisiae* Q23, levadura obtenida del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA, Valencia España) utilizada en fermentaciones vínicas y la levadura *X. dendrorhous* (UCD 67-385, Banco ATCC), levadura aislada desde exudados de árbol, Japón. La diferencia en cantidad de entre la levadura *M. blollopis* y el resto de cepas se analizó con el test de ANOVA ( $P < 0,05$ ).



**Figura 5. Análisis RP-HPLC de las muestras de esteroides totales.** Cromatograma representativo de las muestras extraídas de las levaduras seleccionadas. El espectro de absorbancia es mostrado. Se logra observar en el cromatograma que el único esteroide presente según su tiempo de retención y espectro de absorción es el ergosterol (Shang y col., 2006).



**Figura 6. Contenido de esteroles totales extraídos a diferentes temperaturas de crecimiento (10, 15, 22, 30°C).** A: *Le. creatinivora*, B: *Rh. mucilaginosa*, C: *M. blollopis*. La diferencia en el contenido de los esteroles totales fue analizada mediante el test de ANOVA ( $P < 0,05$ ), no se observan diferencias significativas.



**Figura 7: Curvas de crecimiento a diferentes temperaturas de la levadura *M. blollopis*.** Se realizaron cuatro curvas de crecimiento de la levadura *M. blollopis* a diferentes temperaturas (10, 15, 22 y 30°C). Se muestra la velocidad de crecimiento, determinada según el modelo de Gompertz (Zwietering M. H. Y cols. 1990) en cada una de las temperaturas analizadas. Para determinar la diferencia en cada una de las velocidades medidas, se realizó el test de ANOVA ( $P > 0,05$ ), con variación significativa entre la curva a 15°C y el resto analizadas.



Tabla 7. Contenido de ácidos grasos (FAs) totales en levaduras psicotolerantes.

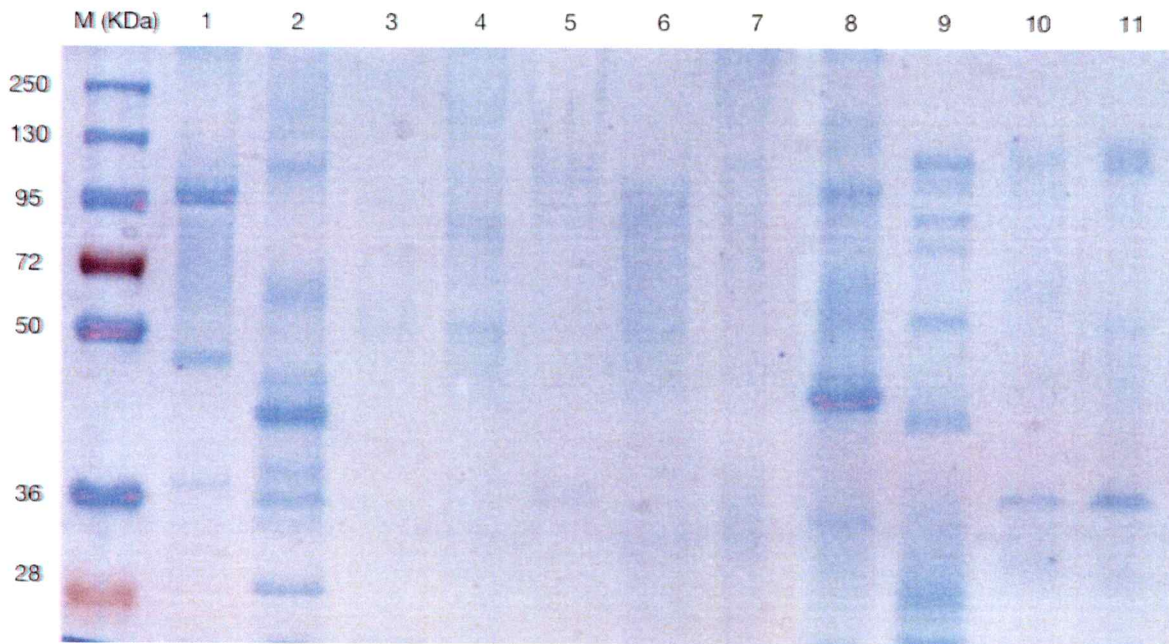
| Especie de levadura       | Porcentaje del total de ácidos grasos |                                   |                   |                                     |                   |                                     |       |                    |                                |                   |                                      |                     |       |                                   |                                    |                     |       |
|---------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------------------------|-------|--------------------|--------------------------------|-------------------|--------------------------------------|---------------------|-------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------|-------|
|                           | Saturados                             |                                   |                   |                                     |                   |                                     |       | Monoinsaturados    |                                |                   |                                      |                     |       |                                   | Polinsaturados                     |                     |       |
|                           | <C <sub>14:0</sub>                    | Ácido mirístico C <sub>14:0</sub> | C <sub>15:0</sub> | Ácido palmítico o C <sub>16:0</sub> | C <sub>17:0</sub> | Ácido esteárico o C <sub>18:0</sub> | Total | <C <sub>18:1</sub> | Ácido oleico C <sub>18:1</sub> | C <sub>18:1</sub> | Ácido eicosaenoico C <sub>20:1</sub> | C <sub>20:1</sub> < | Total | Ácido linoleico C <sub>18:2</sub> | Ácido linolénico C <sub>18:3</sub> | C <sub>20:2</sub> < | Total |
| <i>Le. creatinivora</i>   | 2,4                                   | 1,22                              | 0,21              | 12,2                                | 0,49              | 4,31                                | 13,91 | 23,07              | 61,25                          | 41,53             | 0,13                                 | 0,45                | ND    | 18,56                             | 10,76                              | 0,78                | 30,17 |
| <i>C. parapsilosis</i>    | 22,41                                 | 2,86                              | 0,54              | 15,16                               | ND                | 4,95                                | ND    | 44,92              | 0,9                            | 19,08             | ND                                   | ND                  | 19,98 | 13,45                             | 1,94                               | 1,44                | 16,83 |
| <i>C. victoriae</i>       | 1,47                                  | 2,87                              | 1,01              | 23,33                               | ND                | 7,01                                | 1,62  | 37,31              | 1,55                           | 28,08             | ND                                   | ND                  | 29,63 | 30,12                             | 2,18                               | 0,76                | 33,06 |
| <i>D. fristingensis</i>   | ND                                    | ND                                | ND                | 10,96                               | ND                | ND                                  | ND    | 10,96              | ND                             | 57,05             | 3,85                                 | ND                  | 60,9  | 21,81                             | 6,34                               | ND                  | 28,14 |
| <i>Rh. mucilaginososa</i> | 0,23                                  | 0,45                              | ND                | 13,44                               | ND                | 1,35                                | ND    | 15,47              | 0,88                           | 57,35             | ND                                   | 1,72                | 59,96 | 17,8                              | 2,18                               | 0,63                | 20,62 |
| <i>Rh. laryngis</i>       | 0,27                                  | 1,16                              | 0,28              | 15,24                               | 0,32              | 2,13                                | 0,77  | 20,17              | 78,59                          | 63,29             | ND                                   | 2,11                | 67,11 | 11,48                             | ND                                 | 0,61                | 12,09 |
| <i>Sp. salmonicolor</i>   | 5,57                                  | 6,3                               | ND                | 24,68                               | ND                | 7,12                                | ND    | 43,66              | ND                             | 41,9              | ND                                   | ND                  | 41,9  | 14,44                             | ND                                 | ND                  | 14,44 |
| <i>W. anomalus</i>        | 0,4                                   | 0,29                              | 0,31              | 15,55                               | 0,47              | 4,61                                | 0,78  | 21,87              | 78,78                          | 23,53             | 0,12                                 | 8,41                | 37,25 | 33,12                             | 3,01                               | 0,53                | 36,66 |
| <i>Cr. gastricus</i>      | ND                                    | 0,55                              | ND                | 10,95                               | 0,27              | ND                                  | 1,49  | 13,27              | 78,21                          | 42,29             | ND                                   | ND                  | 43,34 | 34,87                             | ND                                 | 1,49                | 36,36 |
| <i>M. gelida</i>          | 2,39                                  | 3,24                              | ND                | 34,57                               | ND                | 49,3                                | ND    | 49,3               | 1,95                           | 38,07             | ND                                   | ND                  | 38,07 | 12,63                             | ND                                 | ND                  | 12,63 |
| <i>M. blollopis</i>       | 2,07                                  | 6,89                              | 0,67              | 25,77                               | ND                | 8,58                                | ND    | 43,99              | 2,03                           | 27,68             | ND                                   | ND                  | 29,7  | 24,46                             | 0,67                               | 1,17                | 26,31 |
| <i>S. cerevisiae</i> Q23  | 11,08                                 | 4,31                              | ND                | 15,79                               | ND                | 7,37                                | ND    | 38,55              | 21,75                          | 21,71             | ND                                   | ND                  | 43,46 | 7,12                              | ND                                 | 1,27                | 8,38  |
| <i>X. dendrorhous</i>     | 0,05                                  | 0,45                              | 6,89              | 10,2                                | 0,18              | 6,75                                | 1,49  | 19,26              | 0,52                           | 65,16             | ND                                   | 0,15                | 65,83 | 12,56                             | 2,35                               | ND                  | 14,91 |

ND: FAs no detectado; C<sub>x-z</sub>: "x" indica el número de átomos de carbono presentes en el FA y "z" indica el número de dobles enlaces de cada FA a partir del carbono 3. *S. cerevisiae* Q23, *X. dendrorhous* UCD 67-385.

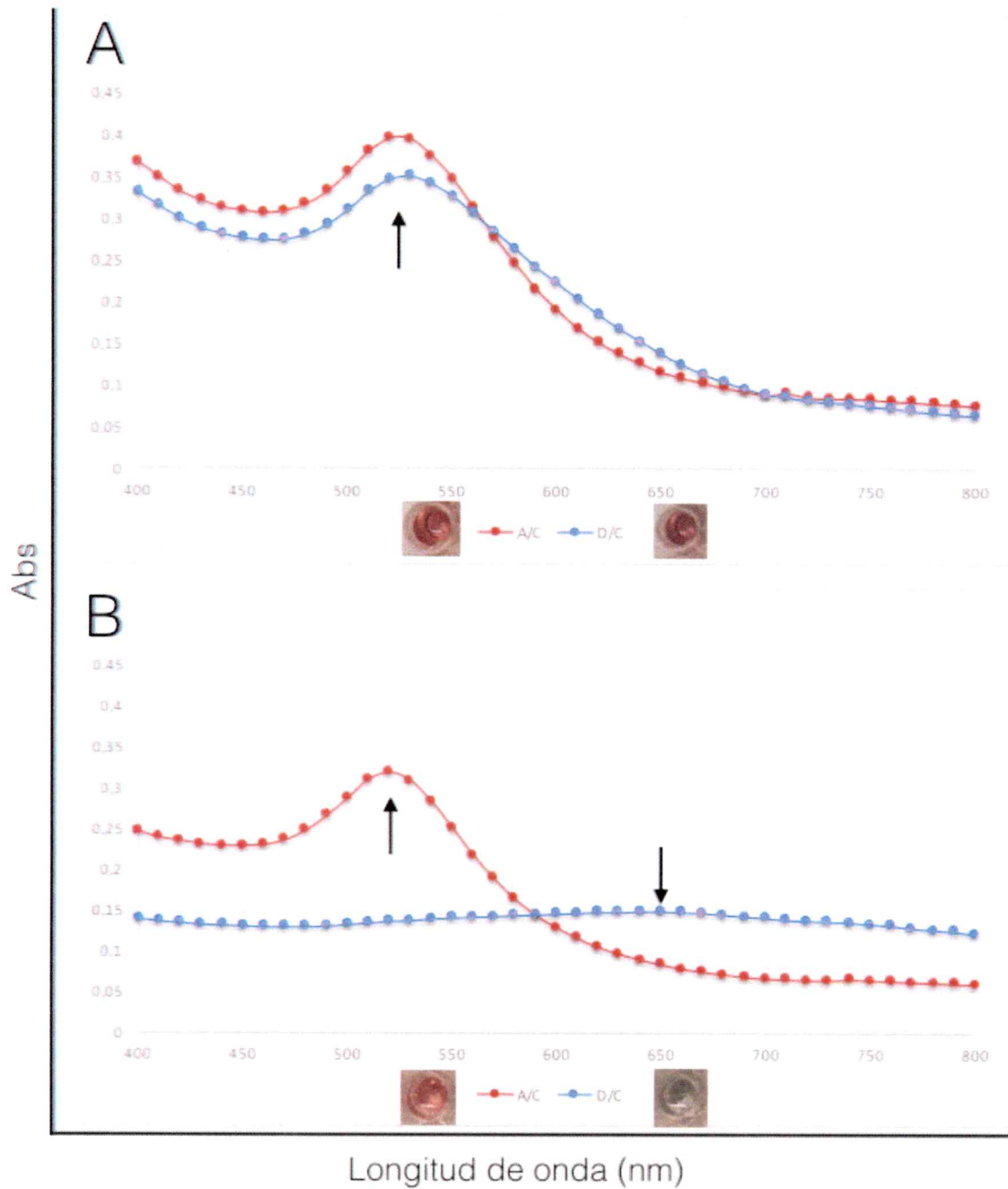
### 5.3.2 Secreción de proteínas anticongelantes.

Se obtuvieron las proteínas extracelulares totales desde cultivos de las levaduras seleccionadas. Las muestras fueron analizadas por Electroforesis en gel de SDS-PAGE como se muestra en la Figura 8. Se puede observar levaduras que presentan muchas bandas en el gel, correspondientes a proteínas extracelulares, como *Le. creatinivora*, *C. parapsilosis*, *W. anomalus* y *Cr. gastricus*, mientras que otras presentaron muy pocas y en otros casos no hay contenido de proteínas extracelulares como es el caso de la levadura *S. salmonicolor*.

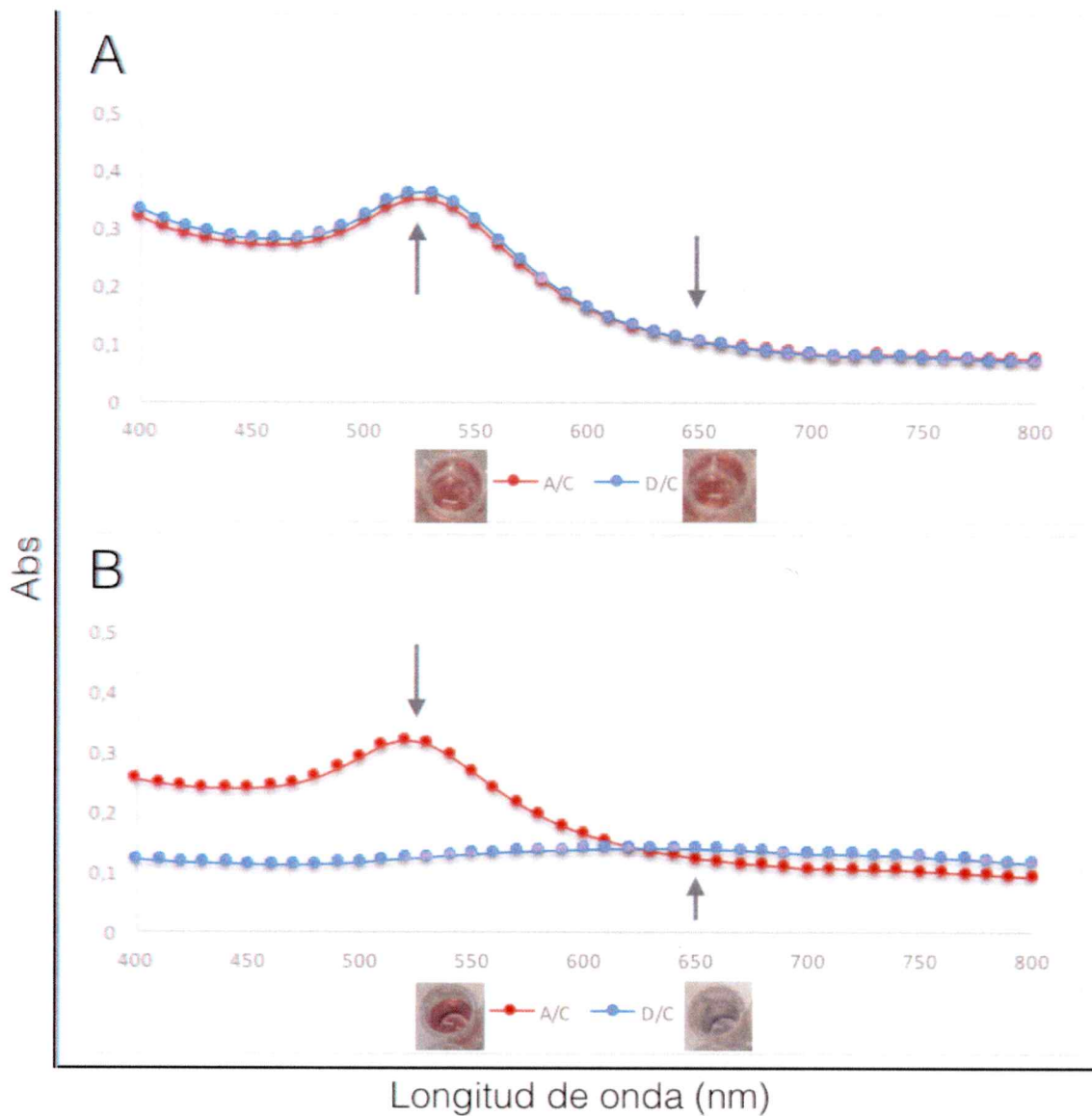
La propiedad anticongelante se determinó por una metodología basada en nanopartículas de oro. En la Figura 9 se muestran los resultados para un compuesto con propiedad anticongelante (polivinilalcohol, PVA) y uno que no la posee (polietilenglicol, PEG, control negativo). Se puede ver como las curvas de absorbancia entre 400 y 800 nm no cambian al realizar un ciclo de congelación/descongelación en el caso del PVA demostrando propiedad anticongelante, mientras que en el PEG el máximo calculado antes de congelar disminuye luego de la congelación, mostrando la falta de la propiedad. De mismo modo se determinó la propiedad anticongelante de las muestras proteicas, cuantificado mediante una razón antifreeze (RAF) que es la razón entre las  $A_{520}/A_{650}$  antes y después de descongelar. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 10 y 11. En las determinaciones se incluyó la proteína BSA (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y las proteínas obtenidas desde el medio YM sin inocular, y cultivos de *S. cerevisiae*. Las muestras obtenidas desde cultivos de *L. creatinivora*, *C. parapsilosis* y *Cr. gastricus* presentaron valores de RAF mayores al medio YM sin inocular (Figura 11; Anexo, Tabla III), no así para el resto de las muestras. Por lo tanto, para las demás determinaciones se continuó trabajando con estas tres levaduras que presentan propiedad anticongelante. Para determinar si el factor responsable de la propiedad medida es proteico se utilizaron dos estrategias. Se seleccionó la muestra proveniente de la levadura *Le. creatinivora* (mayor propiedad anticongelante) y se incubó a 100°C por diferentes tiempos, tras lo cual se determinó la propiedad anticongelante, encontrando que se mantiene inclusive hasta 30 minutos después de la incubación (Figura 12.A).



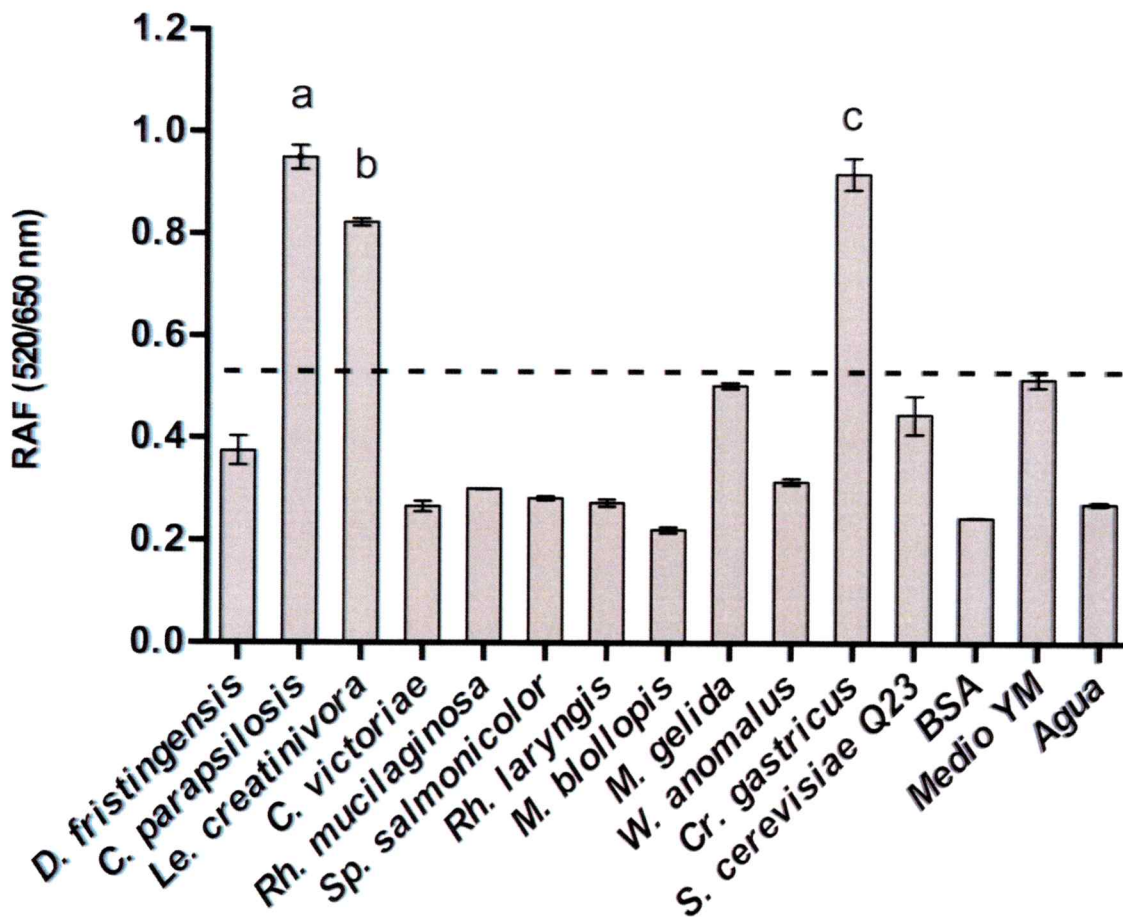
**Figura 8: Electroforesis en gel SDS-PAGE 15% de extractos proteicos extracelulares totales de las levaduras seleccionadas.** Se cargó un volumen total de 40  $\mu$ l (30  $\mu$ l de proteínas y 10  $\mu$ l de buffer de carga). Cada una de las levaduras fue crecida a su temperatura óptima y se realizó la extracción de proteínas mediante precipitación con Sulfato de Amonio, posteriormente esta fueron suspendidas en agua nanopura. 1: *Le. creatinivora*; 2: *C. parapsilosis*; 3: *C. victoriae*; 4: *D. fristingensis*; 5: *Rh. mucilaginoso*; 6: *Rh. laryngis*; 7: *Sp. salmonicolor*; 8: *W. anomalus*; 9: *Cr. gastricus*; 10: *M. gelida*; 11: *M. blollopis*.



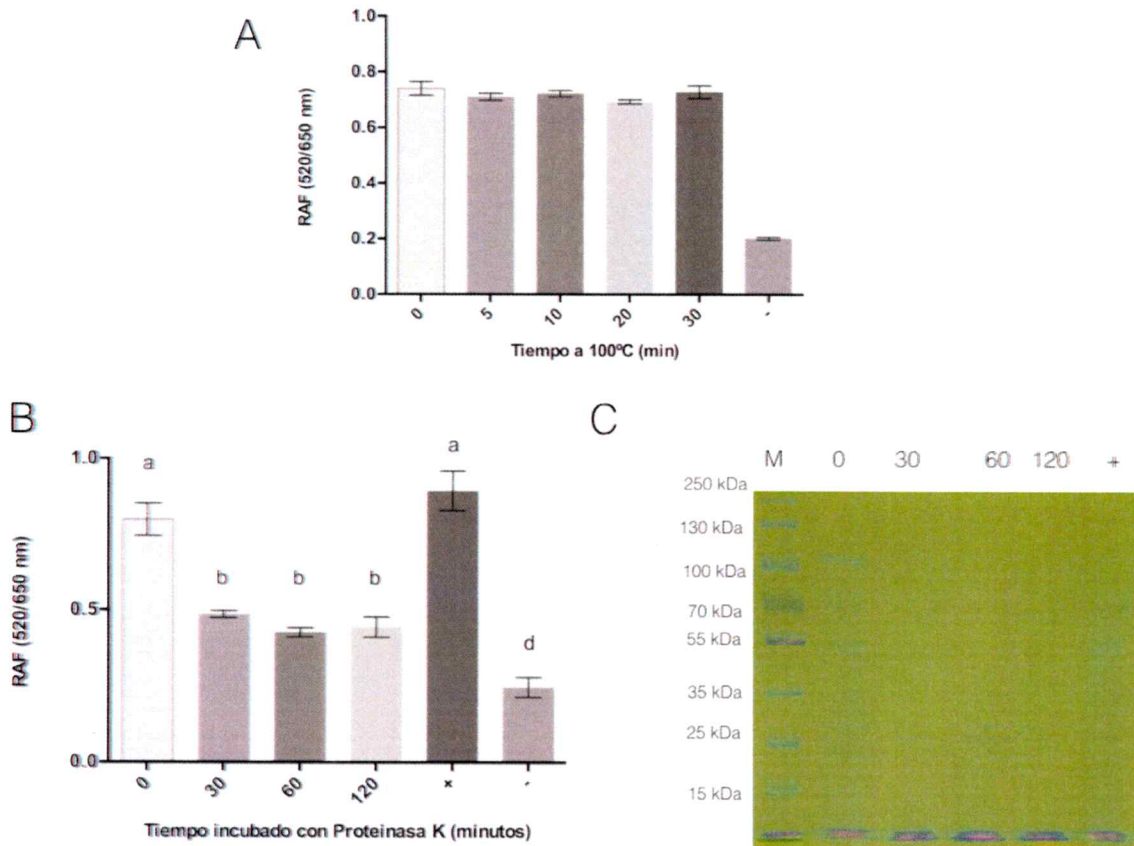
**Figura 9: Control medición propiedad anticongelante.** Se muestran los espectros característicos de dos muestras utilizadas como control de reacción con MSA-AuNP. **A:** Control positivo PVA, flecha negra indica máximo de absorción a 520 nm en las curvas antes y después de congelar. **B:** Control negativo PEG, flechas negras muestran máximos de absorción, a 520 nm antes de congelar y a 650 nm después e congelar. A/C: antes de congelar. D/C: después de congelar.



**Figura 10: Cambio en el espectro de absorbancia al congelar/descongelar una muestra con y sin propiedad anticongelante. A: *Le. creatinivora*, se muestra el espectro medido al extracto proteico extracelular total de la levadura, característico de una muestra con propiedad anticongelante. Flechas de color negro indican máximo a 520 nm antes y después de congelar. B: *Sp. salmonicolor*, se muestra el espectro característico de una muestra sin propiedad anticongelante. Flechas negras indican máximo de absorbancia a 520 antes de congelar y a 650 después de congelar. A/C: antes de congelar. D/C: después de congelar.**



**Figura 11: Propiedad anticongelante en extractos totales de levaduras antárticas.** La razón entre las absorbancias (520/650 antes y después de congelar, RAF) fue comparada con el extracto extracelular total de la levadura *S. cerevisiae*. Se utilizó como control proteínas obtenidas de medio YM sin inocular y una muestra medida solo con agua. La diferencia entre los extractos con mayor propiedad anticongelante y el control Medio YM se analizó mediante el test de ANOVA, las letras indican diferencias significativas respecto a la línea base punteada ( $P: <0,05$ ).



**Figura 12: Propiedad anticongelante del extracto proteico extracelular total de la levadura *Le. creatinivora* expuesto a 100°C y tratamiento con proteinasa K. A:** Se muestra la actividad medida de las diferentes alícuotas tomadas de la muestra expuesta a alta temperatura (100°C). Al realizar el test estadístico de ANOVA no se observan diferencias significativas entre las muestras (letras iguales indican que no hay diferencias significativas), como control de reacción se utilizó agua (-). **B:** Propiedad anticongelante medida a las diferentes muestras tratadas con proteinasa k. Se analizaron los resultados según el test estadístico de ANOVA ( $P < 0,05$ ), se puede ver diferencias significativas entre las muestras tratadas y el tiempo 0, al igual que la muestra control con inhibidor de proteasa. Letras diferentes indican diferencias significativas. Como control negativo de utilizó agua (-). **C:** Se muestra la Electroforesis en gel SDS-PAGE 15% de las muestras tratadas con proteinasa K. M: marcador de peso molecular; 0: muestra sin tratar. 30-60-120: muestras tratadas por diferentes tiempos. +: control positivo de proteinasa k con inhibidor de proteasa (Protease Inhibitor cocktail, Promega).

Posteriormente, la muestra de *Le. creatinivora* también fue tratada con Proteinasa K durante diferentes tiempos, después de lo cual se determinó la propiedad anticongelante y analizaron las proteínas por Electroforesis en gel SDS-PAGE al 15%. Como se muestra en la Figura 12.B, la propiedad anticongelante disminuye a los 30 min de digestión, coincide con degradación de proteínas observadas en gel (Figura 12.C), y se mantiene con mismo tratamiento con coctel de inhibidores.

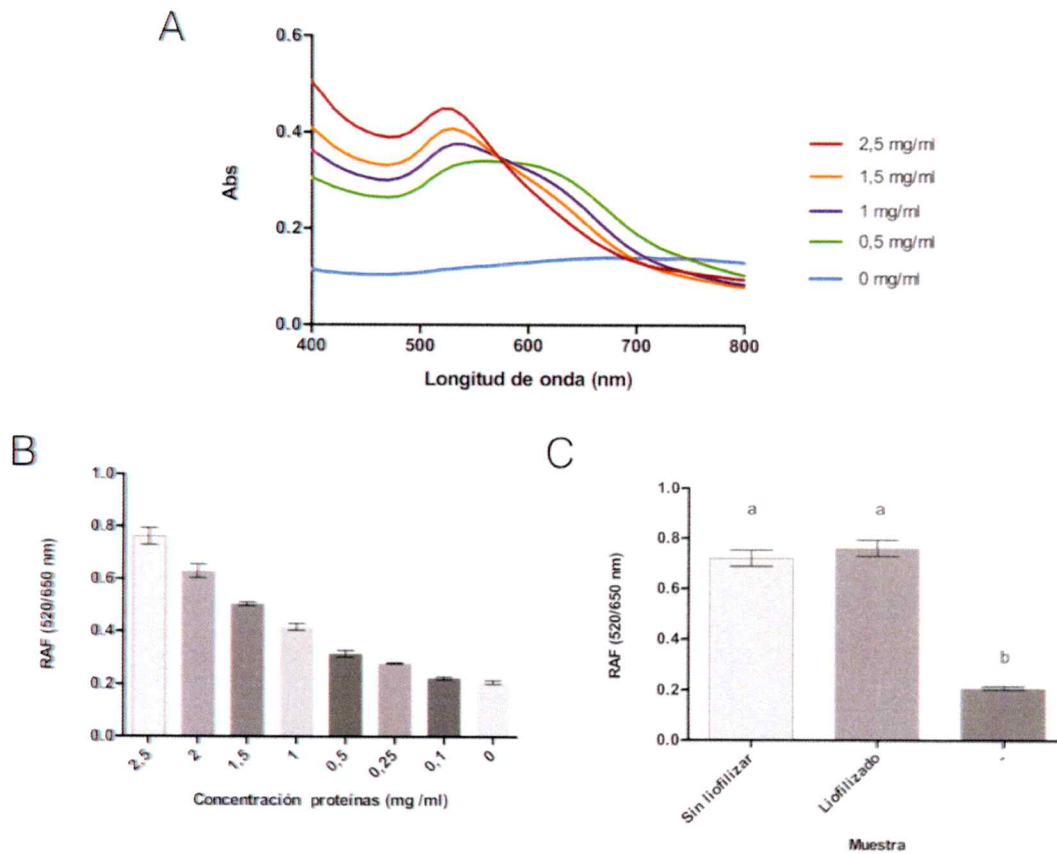
De manera de optimizar la medición de la propiedad anticongelante se determinó la concentración mínima y máxima de proteínas que detecta la técnica utilizado nanopartículas de oro. Se utilizó el extracto de la levadura con mayor propiedad anticongelante, *Le. creatinivora*. El rango en que se detectó propiedad anticongelante y logró medir correctamente RAF fue de 1 a 2,5 mg/ml, (Figura 13 A y B).

Además, se determinó la estabilidad de la muestra al proceso de liofilización, una de las formas más comunes de almacenamiento y transporte de diferentes productos comerciales. Se midió la propiedad anticongelante después de liofilizada y reconstituida la muestra obtenida de la levadura *Le. creatinivora*, determinando que esta se mantiene luego del proceso (Figura 13.C).

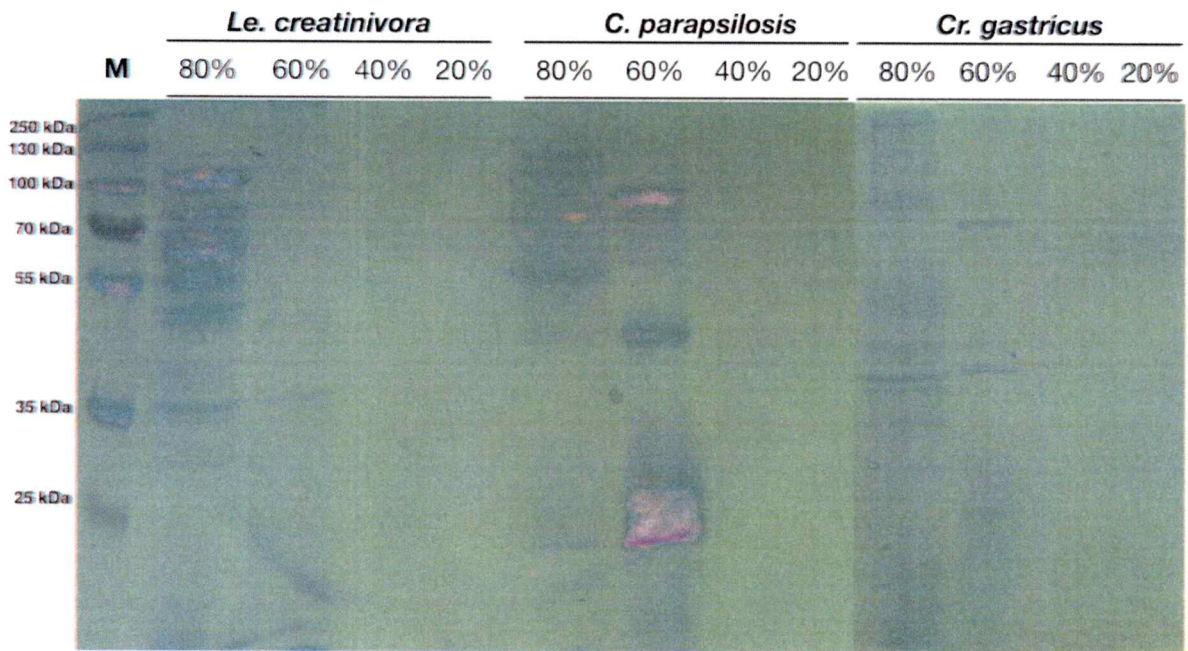
Para lograr una mayor purificación de las proteínas de las tres levaduras seleccionadas previamente, *L. creatinivora*, *C. parapsilosis* y *Cr. gastricus*, se realizó el fraccionamiento con sulfato de amonio con concentraciones crecientes de 20-80%. Las muestras obtenidas en cada una de las fracciones fueron analizadas mediante Electroforesis en gel SDS-PAGE al 15% y evaluando la propiedad anticongelante. Se determinó que las proteínas extracelulares de las tres levaduras analizadas se encontraban principalmente en las fracciones 80 y 60% (Figura 14), al igual que la propiedad medida. En la levadura *Le. creatinivora* la propiedad se encontró principalmente en las fracciones 60% y 80%, mientras que *C. parapsilosis* y *Cr. gastricus* en la fracción 60% (Figura 15).

De manera alternativa a la estrategia utilizada en la identificación de las proteínas anticongelantes y previo a la purificación parcial de las proteínas de la levadura *Cr. gastricus* se seleccionaron dos fracciones de extractos proteicos obtenidos de las levaduras *Le. creatinivora* fracción 80% y *Cr. gastricus* fracción 60%. Las dos muestras seleccionadas presentaron alta actividad anticongelante y eran representativas de las levaduras con alta tolerancia a los CC/D (*Le. creatinivora*) y baja tolerancia a los CC/D (*Cr. gastricus*). Las muestras fueron liofilizadas y enviadas

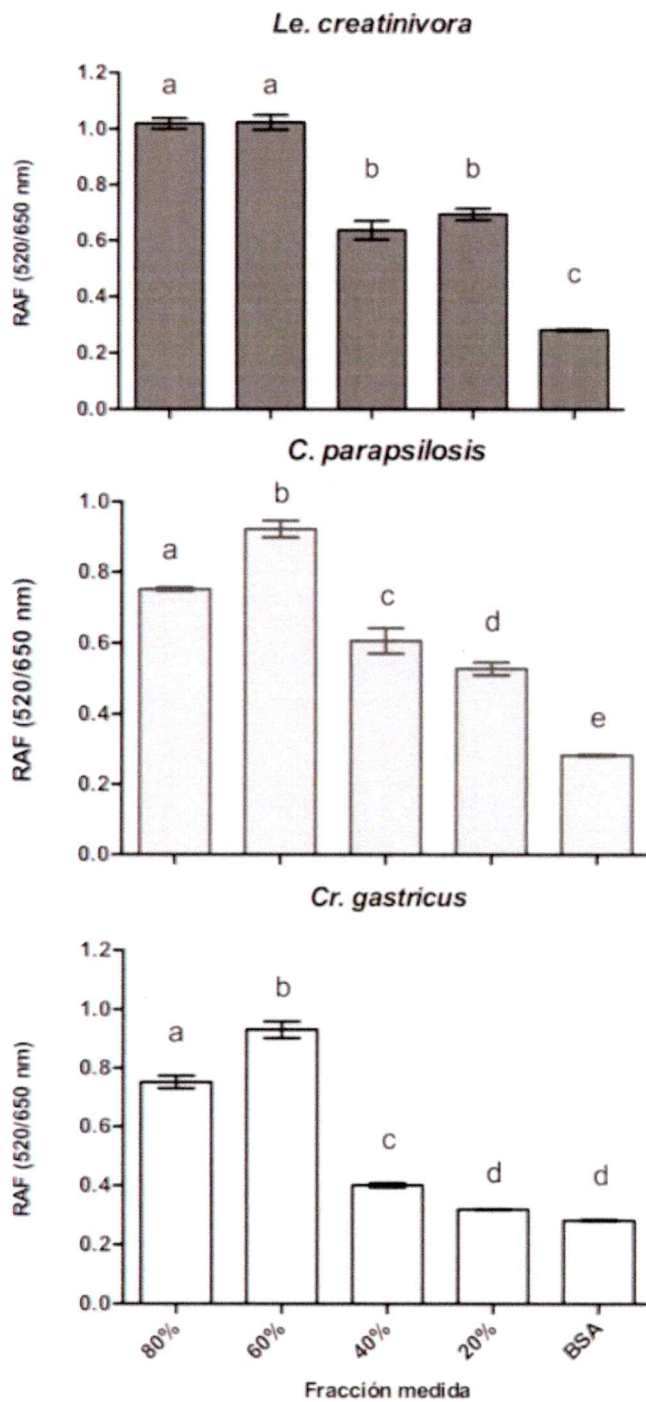




**Figura 13: Determinación de la concentración máxima y mínima del extracto proteico extracelular y propiedad anticongelante medida al extracto liofilizado. A:** Cambio en el espectros luego de realizar el ciclo de congelación de diferentes concentraciones del extracto proteico. **B:** Propiedad anticongelante medida a diferentes concentraciones del extracto proteico de la levadura *Le. creatinivora*. **C:** Se muestra la propiedad anticongelante del extracto proteico de la levadura *Le. creatinivora* previo a la liofilización (sin liofilizar) y luego de ser reconstituido con agua destilada (liofilizado). Como control de reacción se utilizo agua (-). Se analizaron los datos mediante el test estadístico de ANOVA ( $P < 0,05$ ), letras diferentes indican diferencias significativa.



**Figura 14: Electroforesis en gel SDS-PAGE 15% del fraccionamiento con sulfato de amonio levaduras crecidas en medio YM 1% de glucosa.** Se muestran las diferentes fracciones, obtenidas mediante precipitación con sulfato de amonio a diferentes concentraciones de las tres levaduras seleccionadas. Se cargó un volumen total de 40  $\mu$ l (30  $\mu$ l de proteínas y 10  $\mu$ l de buffer de carga).



**Figura 15: Propiedad anticongelante medida a las fracciones obtenidas con sulfato de amonio de las levaduras seleccionadas crecidas en medio YM 1% glucosa.** Como control negativo se midió la actividad anticongelante a la proteína BSA. La diferencia entre las fracciones se analizó mediante el test de ANOVA, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

al servicio de espectrometría de masa en "Center for Functional Genomics" en la Universidad de Albany (NY) para su análisis. Los resultados para las dos levaduras analizadas no fueron los esperados y no se logró la identificación de ninguna proteína anticongelante u otra con función conocida en la base de datos utilizada.

Debido a que el medio YM presenta muchas proteínas que pueden interferir en los siguientes pasos de purificación y medición de actividad, se evaluó la utilización de medios menos complejos para la producción de proteínas por *Le. creatinivora*, *C. parapsilosis* y *Cr. gastricus*.

Las levaduras fueron crecidas en 600 ml de Medio Mínimo Vogel 50X 2 % de glucosa, Medio Mínimo YNB 2 % de glucosa y Medio Mínimo YNB 2% de glucosa 0,5% de Peptona. Se evaluó el crecimiento y producción de proteínas extracelulares de las tres levaduras en los medios descritos, se determinó que el medio óptimo para la extracción de proteínas y medición de actividad fue el Medio Mínimo YNB 2% de glucosa 0,5% de Peptona ya que por un lado la biomasa producida se asemejaba al medio YM y por otro la cantidad de proteínas extracelulares producidas se encontraba dentro del rango determinado previamente para poder medir la actividad (Tabla 8).

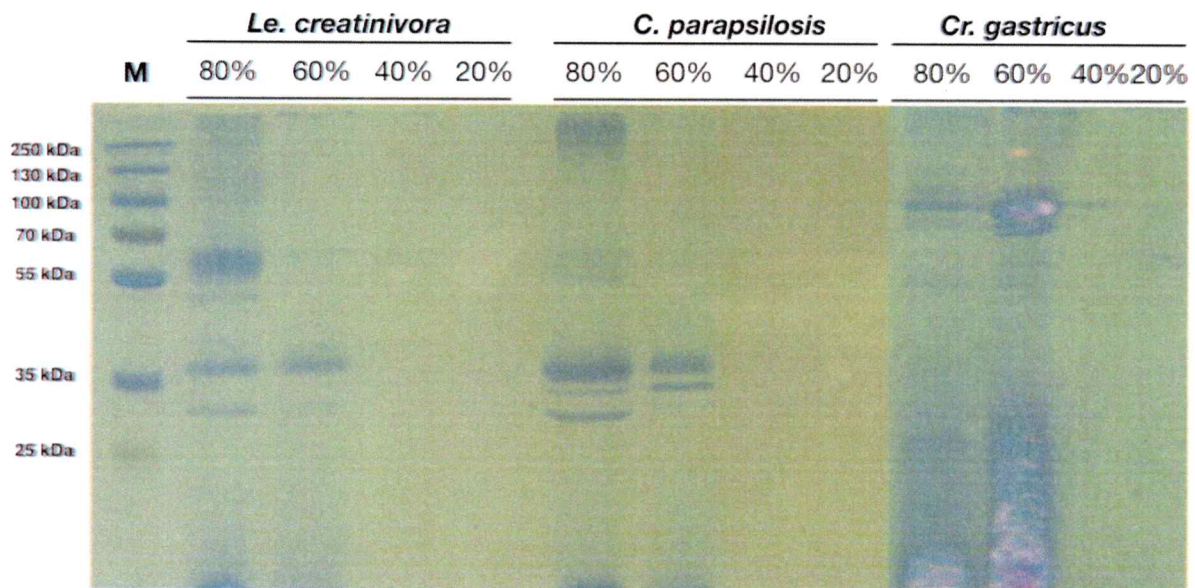
El medio seleccionado fue YNB 2% de glucosa y 0,5 % de Peptona, entonces se realizó la extracción de proteínas extracelulares mediante fraccionamiento con sulfato de amonio como se describió anteriormente en la sección 4.7.2. Las muestras obtenidas fueron analizadas mediante Electroforesis en gel SDS-PAGE al 15% y se evaluó su propiedad anticongelante. En las tres levaduras la cantidad de proteínas extracelulares disminuyó comparando al medio YM (Figura 16). Al evaluar la propiedad anticongelante se determinó que la mayor propiedad en la levadura *Le. creatinivora* se encontraba en la fracción 80%, mientras que en *C. parapsilosis* y *Cr. gastricus* en la fracción 60% (Figura 17).

Como siguiente paso de purificación se realizaron diferentes cromatografías de exclusión molecular como se describe en la sección 4.7.1. Cabe mencionar que se realizó este protocolo utilizando agua nanopura para eluir las proteínas desde las columnas ya que soluciones tampón interfieren con la medición de la actividad anticongelante utilizando MSA-AuNP, generando un cambio de color antes de realizar la congelación de la muestra. Al analizar los datos obtenidos de la separación de las tres fracciones seleccionadas no se logró observar separación (Anexo; Figura V),

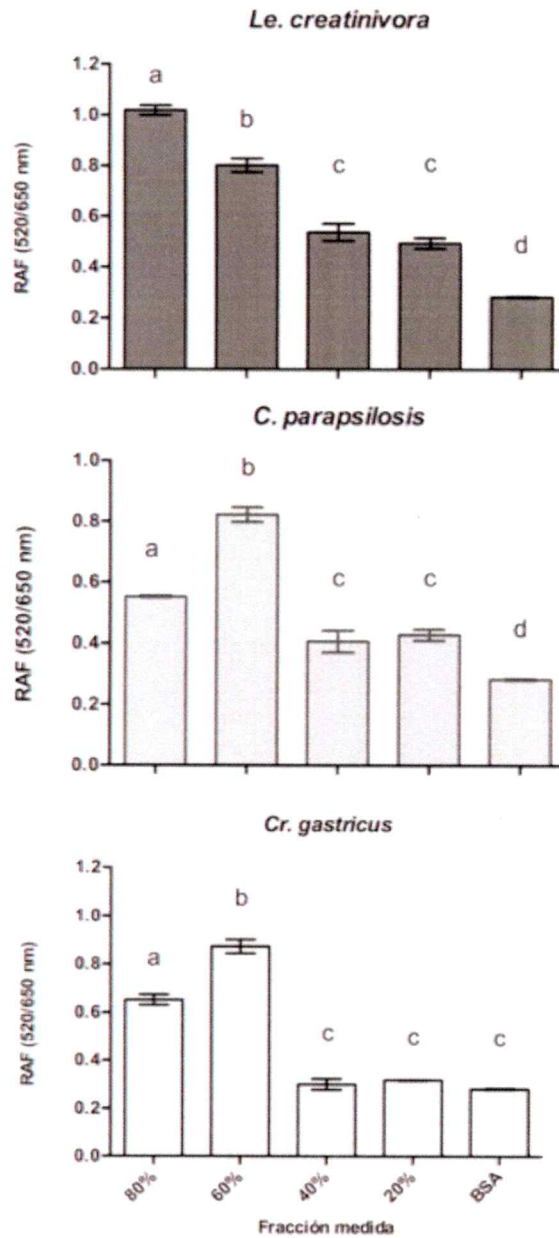
**Tabla 8. Biomasa y concentración de proteínas en diferentes medios de cultivo.**

| <b>Especie de Levadura</b> | <b>Medio de Cultivo</b> | <b>Biomasa (g)</b> | <b>Concentración Proteínas (mg/ml)</b> |
|----------------------------|-------------------------|--------------------|--|
| <i>Le. creatinivora</i>    | a                       | 0,466 ± 0,0101     | 3,01 ± 0,11                            |
|                            | b                       | 0,182 ± 0,0057     | 0,21 ± 0,01                            |
|                            | c                       | 0,308 ± 0,0065     | 1,01 ± 0,002                           |
|                            | d                       | 0,362 ± 0,0021     | 2,81 ± 0,003                           |
| <i>C. parapsilosis</i>     | a                       | 0,389 ± 0,0032     | 3,22 ± 0,019                           |
|                            | b                       | 0,101 ± 0,0040     | 1,30 ± 0,014                           |
|                            | c                       | 0,112 ± 0,0017     | 1,58 ± 0,023                           |
|                            | d                       | 0,274 ± 0,0110     | 2,39 ± 0,016                           |
| <i>Cr. gastricus</i>       | a                       | 0,421 ± 0,0084     | 4,83 ± 0,091                           |
|                            | b                       | 0,125 ± 0,0045     | 0,67 ± 0,014                           |
|                            | c                       | 0,287 ± 0,0092     | 0,91 ± 0,008                           |
|                            | d                       | 0,294 ± 0,0068     | 2,66 ± 0,077                           |

Se muestra la biomasa medida desde 100 ml de cultivo líquido en cada una de las levaduras seleccionadas. A cada uno de los cultivos se les realizó la extracción de proteínas extracelulares y se midió su concentración mediante la metodología escrita en 4.7.2. **a:** Medio YM 1% de glucosa. **b:** Medio Mínimo Vogel 50X 2% de glucosa. **c:** Medio Mínimo YNB 2% de glucosa. **d:** Medio Mínimo YNB 2% de glucosa 0,5% de peptona.



**Figura 16: Electroforesis en gel SDS-PAGE al 15% del fraccionamiento con sulfato de amonio levaduras crecidas en medio mínimo YNB 2% de glucosa y 0,5 de Peptona.** Se muestran las diferentes fracciones, obtenidas mediante precipitación con sulfato de amonio a diferentes concentraciones de las tres levaduras seleccionadas.



**Figura 17: Propiedad anticongelante medida a las fracciones obtenidas con sulfato de amonio de las levaduras seleccionadas crecidas en medio mínimo YNB 2% de glucosa y 0,5 % de Peptona.** Como control negativo se midió la actividad anticongelante a la proteína BSA. La diferencia entre las fracciones se analizó mediante el test de ANOVA, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas en cada uno de los casos ( $P < 0,05$ ).

por lo cual se decidió utilizar soluciones tampón para separar las proteínas en primera instancia y luego con las proteínas separadas buscar una metodología para medir la propiedad anticongelante.

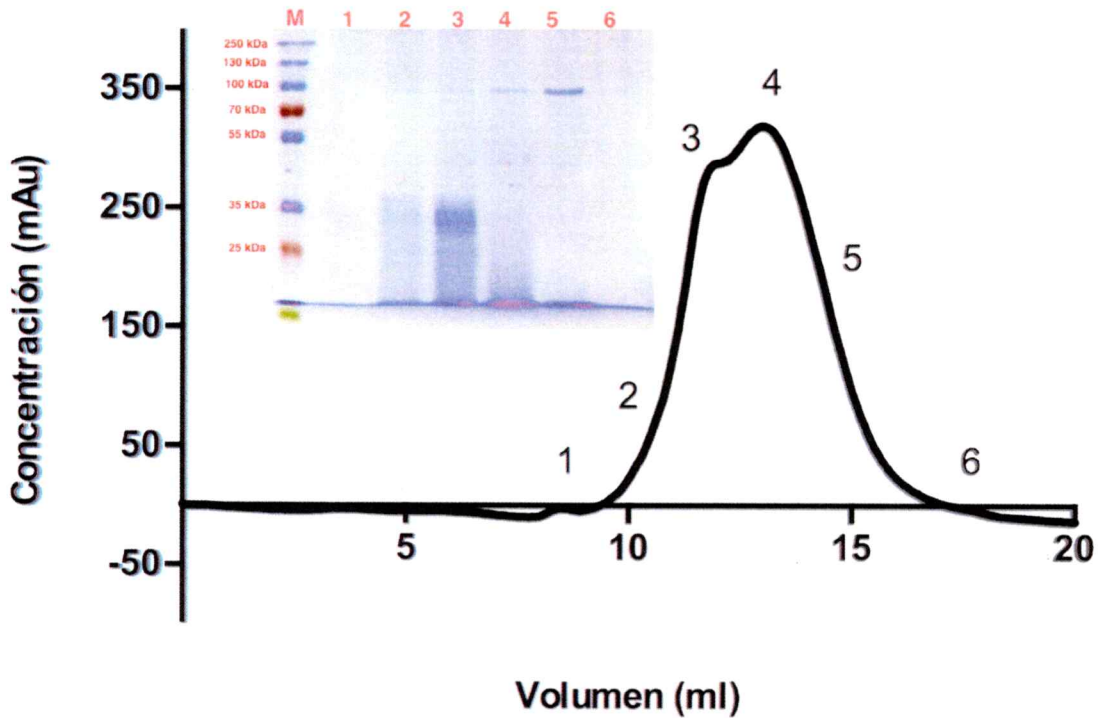
Se utilizó diferentes buffers para realizar la elución de las proteínas desde las columnas: Fosfato Citrato 150 mM NaCl pH 8.0; Fosfato de Sodio 150 mM NaCl pH 7.0, Tris HCl 150 mM NaCl pH 8.0; y Fosfato 200 mM 150 mM NaCl pH 8.0. Además, se adicionó detergentes Tween 20 al 20% y Colato de Sodio. Las fracciones colectadas fueron dializadas contra la misma solución. De todas las muestras analizadas solo se logró obtener una separación parcial de las proteínas obtenidas de *Cr. gastricus* utilizando la columna Superdex 75 increase 10/300 GI column y la solución Fosfato 200 mM 150 mM NaCl pH 8.0 (Figura 18), bandas con Mr 100.000 aproximadamente y dos cercanas a los 30.000. Las proteínas semi-purificadas se utilizaron para la determinación de propiedad anticongelante, ninguna positiva (Figura 19). Sin embargo, al mezclar las fracciones la propiedad anticongelante se recupera, lo que sugiere que las proteínas obtenidas de la levadura *Cr. gastricus* podrían estar actuando como un complejo para poder impedir la agregación de las nanopartículas de oro. Las muestras semi-purificadas fueron incubadas a 100 °C como se muestra en la (Figura 20). Después de los 10 minutos se determinó la propiedad anticongelante, llegando a valores muy bajos luego de los 20 minutos expuestas a 100°C.

Se realizó una caracterización bioquímica de la muestra parcialmente purificada de la levadura *Cr. gastricus* y se evaluó la presencia de glicosilaciones. Se realizó una Electroforeiss en gel SDS- PAGE al 15 % por duplicado. Un gel fue teñido con Azul de Coomassie según la metodología descrita anteriormente en 4.7.2 y el otro con tinción Pierce Glycoprotein Stainin kit (Thermo Scientific), según las especificaciones del fabricante. Al comparar los dos geles se logró determinar que la mayoría de las proteínas presentes en la levadura *Cr. gastricus* presentan glicosilaciones (Figura 21).

Una característica de las proteínas con la capacidad de unir hielo es la estabilidad frente a ciclos de congelación/descongelación por lo cual las muestra de las proteínas parcialmente purificadas de *Cr. gastricus* fueron sometidas a 10 ciclos de 1 hora a -20°C y 20 minutos a 22°C midiendo propiedad anticongelante después de cada ciclo (Figura 22). Se logró observar que la muestra mantiene propiedad anticongelante hasta el ciclo 6. Luego en el ciclo 8 la propiedad

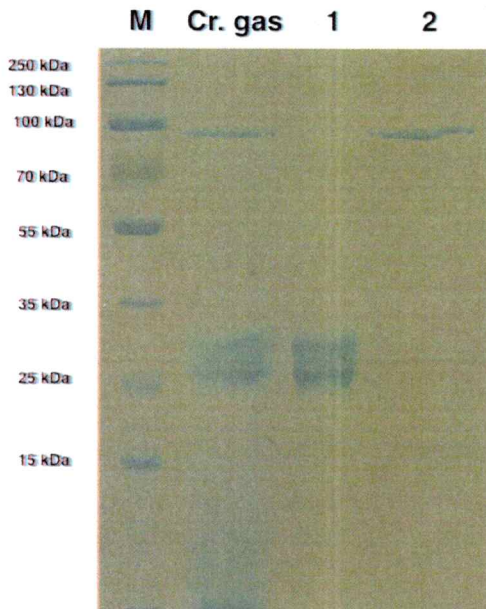


## *Cr. gastricus*

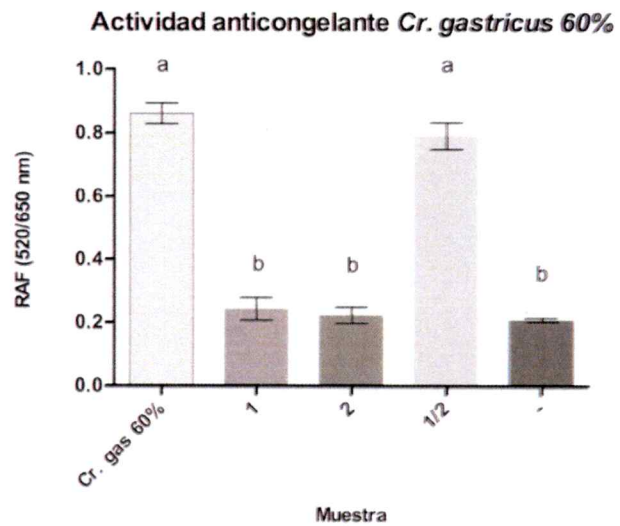


**Figura 18: Cromatografía de Exclusión Molecular en columna Sephadex 75 increase 10/300 GI column.** La muestra obtenida de la levadura *Cr. gastricus* (fracción 60%) fue cargada en la columna y eluida con la solución tampón Fosfato 200 mM 150 mM NaCl pH. 8.0 a un flujo de 0.2 ml/min a 25°C. Se muestra en la Electroforesis en gel SDS-PAGE al 15%, las diferentes fracciones recolectadas desde el equipo AKTAprime Plus. Los números sobre el cromatograma corresponden a las fracciones cargadas en cada uno de los carriles del gel.

A

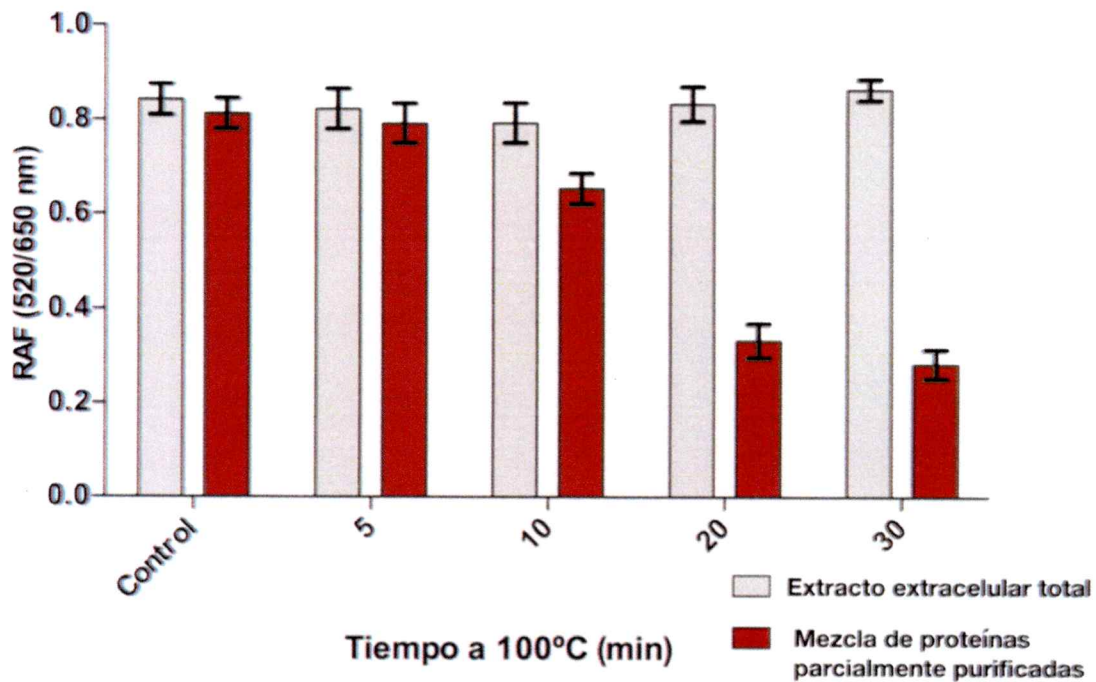


B

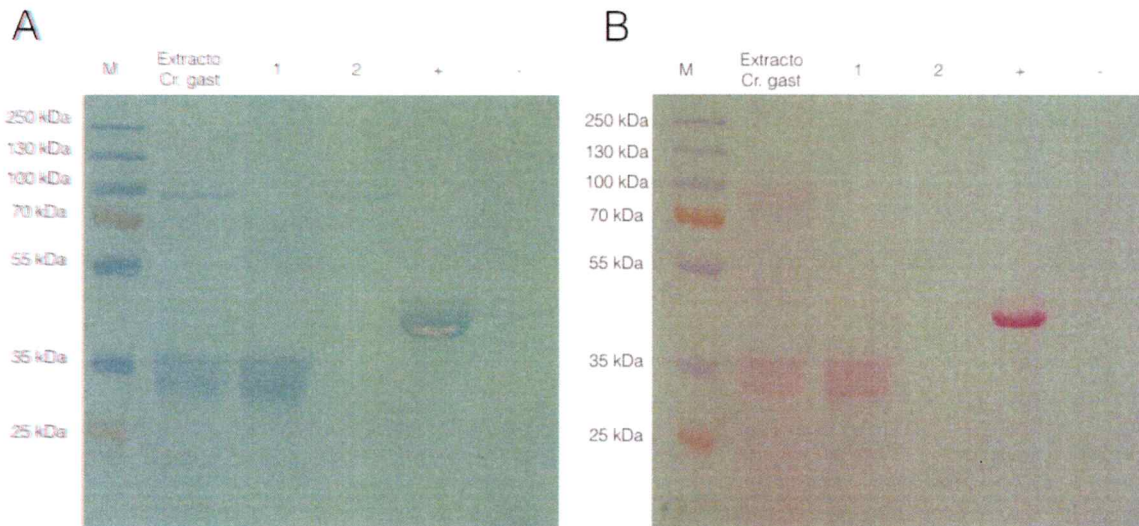


**Figura 19. Actividad anticongelante de las muestras separadas de *Cr. gastricus* fracción 60%.** **A:** Electroforesis en gel SDS-PAGE 15%, se muestra la fracción antes de ser pasada por la columna de exclusión molecular (Cr. gas) y las diferentes muestras obtenidas luego de ser eluidas de la columna (1 y 2). **B:** Actividad medida a las muestras luego de ser pasadas por la columna His-Trap Desalting. 1 y 2 sin actividad observada. 1/2: mezcla de las dos muestras previamente separadas presentan nuevamente actividad. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el test estadístico ANOVA ( $P < 0,05$ ), letras diferentes indican diferencias significativas.

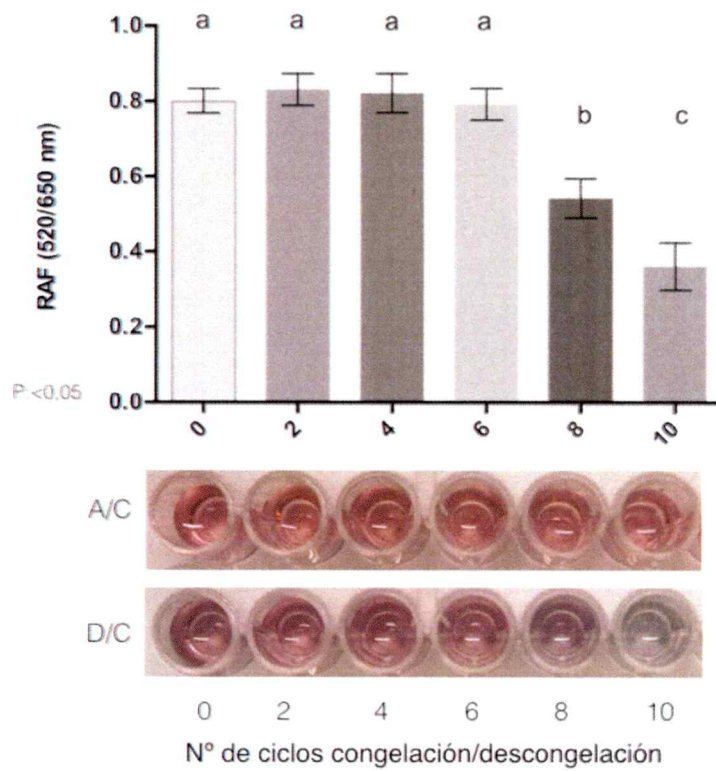
## Termoestabilidad *Cr. gastricus* 60%



**Figura 20. Termoestabilidad de las proteínas de *Cr. gastricus* 60%.** Se muestra la actividad anticongelante medida del extracto total de *Cr. gastricus* 60% antes de ser cargado en la columna de exclusión molecular (barras grises). Mezcla de proteínas parcialmente purificadas mediante exclusión molecular (barras rojas). Los datos fueron analizados mediante el test estadístico de ANOVA, letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



**Figura 21: Perfil proteico extracelular *Cr. gastricus* 60%.** A: tinción con Azul de Coomassie. B: tinción Pierce Glycoprotein Stainin kit (Thermo Scientific). M: marcador de peso molecular. Extracto Cr. gast: extracto total de la fracción 60% de la levadura *Cr. gastricus* antes de ser cargado en la columna de exclusión molecular. 1 y 2: proteínas de *Cr. gastricus* parcialmente purificadas mediante cromatografía de exclusión molecular. Como control positivo (+) se utilizó una Peroxidasa de Rábano Picante y como control negativo (-) un inhibidor de tripsina de Frijol.



**Figura 22. Tolerancia proteínas purificadas de *Cr. gastricus* 60% a ciclos de congelación/descongelación.** Actividad anticongelante medida luego de tratar la mezcla de las proteínas parcialmente purificadas de la levadura *Cr. gastricus* 60%. Los datos fueron analizados mediante el test estadístico de ANOVA, letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). A/C: muestra antes de ser congelada. D/C: muestra después de ser congelada. Ciclos de congelación/descongelación: 1 hora a  $-20^{\circ}\text{C}$  y 20 minutos a  $22^{\circ}\text{C}$ .

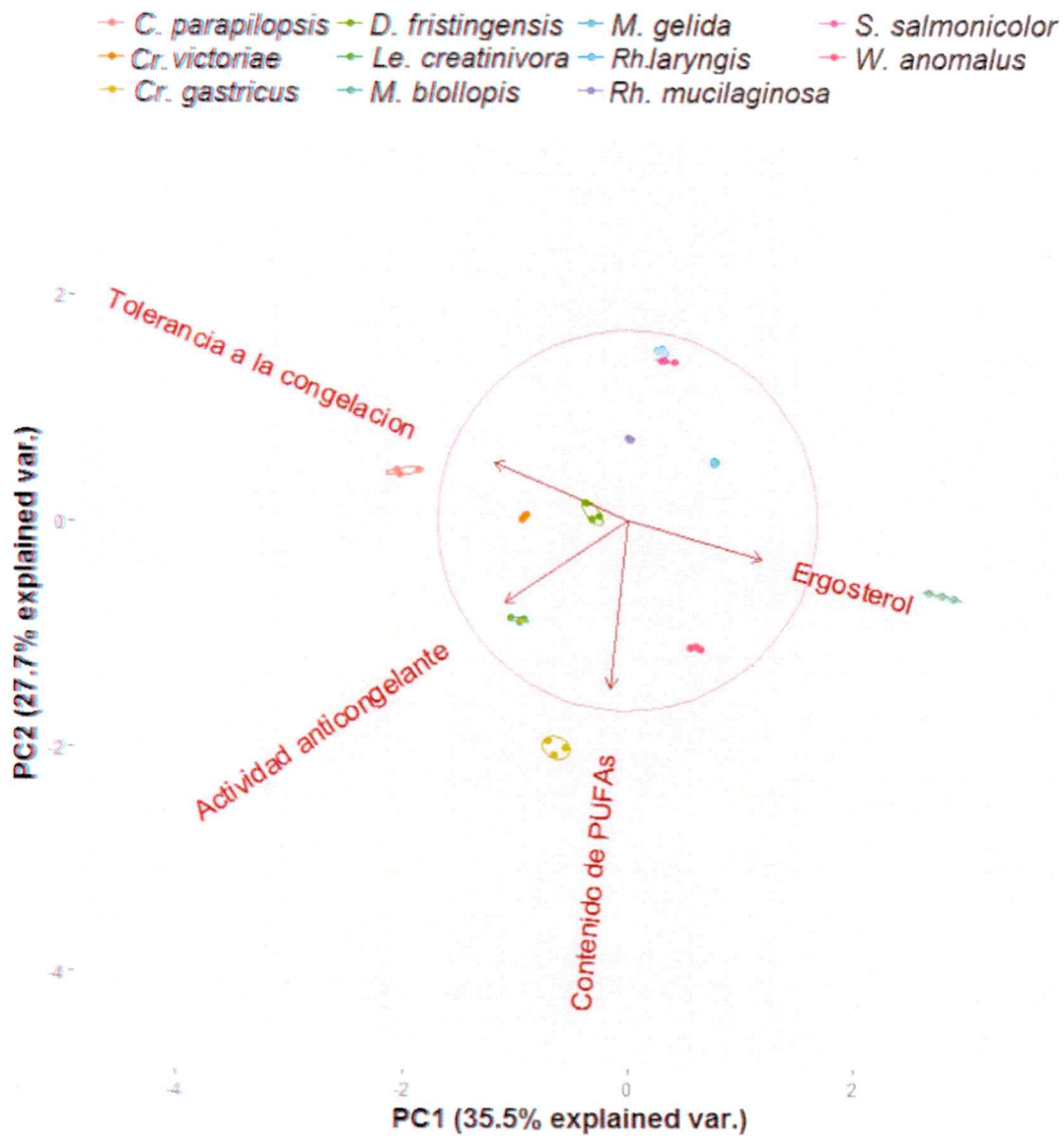
disminuye a la mitad y al igual que en el ciclo 10 se logra ver un cambio de color en el ensayo con nanopartículas de oro, pasando de color rojo a morado (ciclo 8) y luego a color azul claro (ciclo 10), demostrando una alta estabilidad frente a los CC/D.

### **5.3.3 Análisis de la influencia de la propiedad anticongelante, los PUFAs y el ergosterol a la tolerancia a ciclos de congelación/descongelación por levaduras antárticas.**

De la misma manera como se realizó con los resultados obtenidos de tolerancia a la radiación UV y poder complementar los datos obtenidos, se realizó un Análisis de Componentes Principales, en este caso con la tolerancia a la congelación. Se utilizaron los datos de tolerancia a los CC/D (sobrevida en el tiempo), la medición de la propiedad anticongelante, la concentración de esteroides totales (mg/g de peso seco) y la proporción de PUFAs. Al evaluar mediante el APC (Figura 23) cuál de los tres parámetros medidos tenía más influencia sobre la tolerancia, se determinó que la propiedad anticongelante es la que presenta mayor relevancia sobre la resistencia de las levaduras a los CC/D.

### **5.3.4 Clonamiento y análisis bioinformático de las secuencias hipotéticas de AFP.**

Se diseñaron tres pares de partidores (Tabla 2) basados en la secuencia de la AFP descrita en la levadura *Leucosporidium* sp. AY30 (Numero de Acceso GQ336995 en GenBank, NCBI), a la cual se agregaron sitios de restricción para su posterior ligación en el vector pBluescript. Se extrajo DNA genómico desde cultivos de las levaduras y se usó como molde para PCR con los partidores mencionados. Los amplicones obtenidos fueron clonados en el vector pBluescript y posteriormente utilizados para transformar células electrocompetentes *E. coli DH5 $\alpha$*  como se describe en la sección 4.10. Los vectores recombinantes fueron secuenciados en MacroGen Inc. Las secuencias obtenidas se analizaron bioinformáticamente comparándolas con la base de datos de NCBI mediante las herramientas BLASTn y BLASTx, pero no se obtuvo BLAST-Hits con alguna proteína depositada en la base de datos (Anexo; Figura VI).



**Figura 23: Análisis de componentes principales involucradas en la tolerancia a ciclos de congelación/descongelación.** Se muestra el resultado de tres mediciones en cada una de las variables determinadas. El error es mostrado en forma de elipse. Eje X PC1, explica en un 35,5 % la variabilidad de los datos. Eje Y PC2, explica en un 27,7 la variabilidad de los datos.

## 6. Discusión

### 6.1 Discusión Científica.

La tolerancia de las especies de levaduras estudiadas tanto a ciclos de congelación/descongelación y radiación UV fue variable. Dentro de las levaduras con mayor tolerancia a los CC/D se encontró *Cr. victoriae*, cuyo género presenta la mayor distribución en los ecosistemas fríos (Vishniac 1986, 2006; Shivaji y Prasad 2009; Buzzini P. y col., 2012). Esta propiedad se ha atribuido a la habilidad de estas levaduras de producir un exopolisacárido que forma una cápsula (Vishniac 2006), la cual les permitiría resistir a diferentes condiciones ambientales adversas. Sin embargo, una de las levaduras con menor tolerancia a los CC/D pertenece a este género (*Cr. gastricus*), sugiriendo que la tolerancia es especie específica. Otras de las levaduras con alta tolerancias fueron *Le. creatinivora*, *C. parapsilosis* y *D. fristingensis*, las cuales no presentan cápsula. *D. fristingensis* forma agregados celulares en medio líquido, cuando se realizaban los ciclos de congelación se acumulaba en el fondo del tubo y no permanecía homogénea, lo que sugiere que la formación de agregados disminuye los efectos dañinos de la formación de cristales de hielo.

En dos de las cuatro levaduras con tolerancia alta a la congelación se logró identificar propiedad anticongelante demostrando que es uno de los mecanismos principales frente a estas condiciones. Para poder detectar esta propiedad se utilizó una metodología colorimétrica relativamente nueva, descrita por Park y cols., 2013 y reportada por Mitchell y col., el 2015, en la medición de proteínas anticongelantes de plantas, la cual se basa en la utilización de nanopartículas de oro para determinar la inhibición de la recristalización del hielo. Las proteínas totales de *Le. creatinivora* y la fracción 60% de *Cr. gastricus* presentaron una alta estabilidad a la temperatura y al medir la propiedad anticongelante esta se mantenía por tiempos superiores a los 20 minutos al ser tratadas a 100°C. Esta característica se puede atribuir a una propiedad estructural de unión específica de las proteínas al hielo (Bar Dolev y col., 2016), sugiriendo que a altas temperaturas las proteínas anticongelantes se despliegan sin modificar o alterar los sitios de unión a hielo, factor que permite mantener su propiedad anticongelante. Esto reforzado por la pérdida de la propiedad cuando las proteínas se digieren con proteinasa K. Reportes de APFs en levaduras son muy escasos, Lee y col., 2010 logró identificar una proteína anticongelante en la levadura psicrófila



*Leucosporidium sp.* con un tamaño aproximado de 25 kDa, por otro lado, Hashim y col., 2013 también identificaron una AFP en la levadura *Glaciozyma antarctica* PI12 con un tamaño aproximado de 18 kDa. Estos reportes no coinciden con lo encontrado en este trabajo, ya que luego de intentar purificar las proteínas de tres levaduras con alta actividad anticongelante (*Le. creatinivora*, *C. parapsilosis* y *Cr. gastricus*) solo se logró una purificación parcial la muestra provenientes de la fracción 60% obtenida con sulfato de amonio de la levaduras *Cr. gastricus*, y su propiedad anticongelante no se pudo atribuir a una sola proteína (una sola banda en una electroforesis en gel SDS-PAGE), ya que al medir la actividad a las muestras parcialmente purificadas (banda de Mr 100.000, dos bandas cercanas a 30.000) la propiedad se perdía. Interesantemente la propiedad se recupera mezclar nuevamente las muestras parcialmente purificadas, sugiriendo una función en conjunto de más de una estas proteínas.

Existen escasos reportes del contenido de esteroides en las especies de levaduras estudiadas en este trabajo. En *Sp. salmonicolor* aislada desde muestras de suelo del río Little Donau (Bratislava), el contenido de ergosterol fue de 0,38 mg/g de peso seco mientras que en varias especies de *Rhodotorula* el contenido de ergosterol varió entre 0,17 y 0,5 mg/g de peso seco (Marova y col., 2004). Las levaduras *Sp. salmonicolor*, *Rh. laryngis* y *Rh. mucilaginosa*, este trabajo presentaron un mayor contenido, rango 2,4-2,6 mg/g de peso seco. Además, se determinó que *M. blollopis* presenta un contenido de ergosterol de 6,9 mg/g de peso seco, más que otro reporte de contenido de ergosterol en levaduras ambientales aisladas desde la antártica (Contreras y col., 2015). Se logró identificar ácidos grasos polinsaturados en las todas levaduras analizadas, esto concuerda con lo reportado por (Rossi y col., 2009), donde se plantea que una de las respuestas o adaptaciones más comunes en microorganismos es generar cambios en la composición lipídica y la proporción de FAs encontrada en este trabajo es similar a la encontrada en otras levaduras antárticas (Zlatanov y col., 2001). En el caso de PUFAs de más de 20 átomos de carbono, se logró encontrar este tipo en las levaduras *Le. creatinivora*, *C. parapsilosis*, *C. victoriae*, *Rh. mucilaginosa*, *Rh. laryngis*, *W. anomalus*, *Cr. gastricus* y *M. blollopis*, los cuales no habían sido descritos previamente en levaduras aisladas de la antártica.

Al integrar todos los resultados obtenidos en el análisis de componentes principales (ACP) (Figura 23), se observa, debido a la distancia de los vectores en el eje X (explica un 35,5 % de la variabilidad), que la presencia de propiedad anticongelante es la variable que más influencia tiene en la tolerancia de las levaduras frente a la congelación, siendo el ergosterol el compuesto que menos influencia tiene (vector más alejado del vector tolerancia a la congelación/descongelación). Esto concuerda con lo reportado a la fecha, donde se ha descrito que la presencia de proteínas con actividad anticongelante es uno de los principales mecanismos frente a condiciones extremas de frío y congelación. (Jia y Davies, 2002). Al ergosterol no se le ha atribuido una función específica, su presencia y proporción junto los FAs es lo que otorgaría la tolerancia frente a las bajas temperaturas y congelación (Abe y Minegishi, 2008; Calcott y Rose, 1982), además de la resistencia mecánica que otorga a la membrana plasmática en respuesta a estrés osmótico (Dupont y col., 2011).

No existe mucha información respecto de la de tolerancia radiación UV en levaduras ambientales. Se ha reportado por Libkind y cols. (2009) que levaduras del género *Rhodotorula* presentan una resistencia variable frente a la radiación UV-B mientras que levaduras del género *Dioszegia* son muy resistentes a alta radiación lo que coincide con los resultados obtenidos en este trabajo. *Dioszegia sp.* fue la levadura con mayor tolerancia, presentando una alta sobrevivencia luego de 40 minutos de exposición a radiación UV de 254 nm, seguido de la levadura *Leuconeurospora sp.* (T27Cd2), *Rh. laryngis* y *Rh. mucilaginoso*. A excepción de *Leuconeurospora sp.* (T27Cd2), todas las levaduras con mayor tolerancia frente a la radiación UV son pigmentadas, lo que concuerda con reportes previos donde se ha demostrado que levaduras pigmentadas presentan una mayor tolerancia a la radiación UV en comparación a levaduras sin pigmentos (Libkind y col. 2004). Los compuestos involucrados en la resistencia a alta exposición a radiación UV analizados fueron los pigmentos carotenoides y micosporinas. Se ha descrito que la levadura *Dioszegia sp.* aislada desde hojas de *Crataegus sp.* produce un único pigmento, identificado como plectaxantina (Madhour y col., 2005), mientras que otro aislado desde un glaciar alpino produce únicamente una xantofila, la cual no ha sido identificada (Amaretti y col., 2014). A diferencia de estos reportes en este trabajo se determinó como el principal pigmento de la levadura *Dioszegia sp.* el OHK toruleno. Otra de las levaduras con alto contenido de pigmentos carotenoides fue *Rh. mucilaginoso*, se han descrito

cantidades variables de pigmentos (de 96 a 243  $\mu\text{g/g}$  de peso seco) de aislados de esta levadura desde los lagos del Parque Nacional Nahuel Huapi y los principales carotenoides identificados fueron torularrodina, toruleno y  $\beta$ -caroteno (Moline y col., 2010). Al igual que en el caso anterior, esto difiere con los resultados presentados en este trabajo donde el contenido de pigmentos determinado para esta especie de levadura fue de 57 $\mu\text{g/g}$  de peso seco y los pigmentos identificados fueron toruleno, gama-caroteno y licopeno. En relación a la producción de micosporinas, los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado a la fecha, donde se han descrito micosporinas en aislados desde las islas del archipiélago de Shetland South en las levaduras *Rh. laryngis* y *Diosegia sp.* y no han sido encontradas en otras especies como *Rh. glacialis*, *Rh. mucilaginosa* y *C. sake* (Vaz y col., 2011).

Al integrar todos los resultados obtenidos en un análisis de componentes principales los pigmentos carotenoides fueron determinados como el metabolito con mayor influencia en la tolerancia frente a la alta exposición de radiación UV, por sobre las micosporinas. Si observamos la tolerancia a la radiación UV entre las diferentes especies de levaduras analizadas encontramos una tolerancia variable, los pigmentos carotenoides que han sido descritos como metabolitos protectores contra la radiación UV en organismos fotosintéticos, pero no así en microorganismos no fotosintéticos, postulándolos como agentes protectores contra éstos general (Avalos y Carmen Limon, 2015). Por otra parte, el papel de las micosporinas como agentes protectores contra el daño generado por la radiación está bien establecido, pero también hay evidencia de su efecto protector con estrés salino y térmico (Oren y Gunde.Cimerman, 2007).

Por lo tanto, tomando en cuenta todos los resultados obtenidos en el presente trabajo y antecedentes hasta la fecha, se puede decir que la tolerancia frente a condiciones ambientales como las bajas temperaturas, congelación y alta radiación UV es variable y especie específica. De igual manera los metabolitos no son exclusivos de las levaduras con mayor tolerancia a cada una de las condiciones estudiadas ya que fue posible identificarlos en los grupos con tolerancia intermedia y baja en algunos casos. Finalmente, la tolerancia frente a condiciones de estrés son respuestas muy complejas y no se pueden atribuir a un solo metabolito o a una respuesta específica ya que es un conjunto de factores tanto internos como externos los que determinan la habilidad de cada una de las especies de levaduras de tolerar y poder sobrevivir frente a condiciones ambientales estresantes.

## 6.2 Discusión tecnológica.

Tomando en cuenta cada uno de los metabolitos estudiados en cuanto a la cantidad producida por cada especie de levadura, se logró encontrar levaduras con mayor proyección para la elaboración de diferentes productos comerciales. En el caso de las proteínas con actividad anticongelante identificadas desde la levadura *Cr. gastricus* podemos decir que son buenos candidatos para posteriores estudios y presentan grandes proyecciones ya que su actividad medida con la técnica de las nanopartículas de oro es mayor que la reportada en otras proteínas anticongelantes de levaduras y plantas (Park y cols. 2013; Mitchell y col., 2014). Además, presenta una gran estabilidad en el tiempo frente a ciclos de CC/D lo que la hacen un muy buen candidato como aditivo en productos criopreservantes tanto para la industria de los alimentos y medicina, en donde pueden ser utilizadas de manera integral en la preservación de sangre, disminuyendo la cantidad de otros aditivos químicos como el DMSO utilizado actualmente (Venketesh y Dayananda, 2008; Hashim y col., 2013). La capacidad de tolerar cambios drásticos de temperatura en el tiempo es un gran atractivo y el estudio de las proteínas identificadas y de las otras dos levaduras con alta propiedad anticongelante (*Le. creatinivora* y *C. parapsilosis*) son muy prometedores.

En el caso del ergosterol, la levadura *M. blollopis* presentó la mayor producción incluso que la cepa modificada de *S. cerevisiae* (Tronchoni y cols. 2012),  $6,90 \pm 0,24$  y  $4,9$  mg/g de peso seco respectivamente. Además, no presentó modificaciones en la cantidad de esteroides totales producidos al modificar la temperatura de crecimiento de la levadura. Sin embargo, la temperatura óptima de crecimiento de esta levadura es de  $15^{\circ}\text{C}$ , muy alejado de lo recomendable para fermentaciones a gran escala. La producción de PUFAs en las levaduras aisladas desde el continente antártico es muy prometedor, mencionamos anteriormente que una de las principales ventajas de la producción de FAs en levaduras es la metodología de extracción, actualmente FAs como el  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 son obtenidos desde aceites de pescado, lo que deja un muy mal olor en el producto final, haciendo muy difícil su utilización en la industria de los alimentos como aditivo en algunos productos (Okuyama y col. 1998). Además, PUFAs de cadena larga ( $\text{C}_{20}$ ) no habían sido reportados hasta la fecha en levaduras (Rossi y col. 2009) por lo cual las cepas *Le. creatinivora*, *C. parapsilosis*, *C. victoriae*, *Rh. mucilaginosus*, *Rh. laryngis*, *W. anomalus*, *Cr. gastricus* y *M. blollopis* son buenos candidatos para estudios posteriores

como nuevas fuentes de PUFAs de cadena larga. A pesar de no contar con los datos de concentración de FAs producido de cada una de las levaduras producto de lo costoso de la metodología de identificación, si podemos afirmar que los resultados obtenidos de levaduras estudiadas son un aporte y confirman que las levaduras adaptadas al frío son una buena fuente de FAs de cadena larga y PUFAs para su uso a nivel industrial, ya que como se mencionó anteriormente la producción y extracción de estos metabolitos en levaduras es más sencillo de lo utilizado actualmente (Okuyama y col. 1998) obteniendo el compuesto limpio y utilizable en cualquier tipo de producto comercial.

De los resultados obtenidos en el análisis de pigmentos carotenoides y micosporinas podemos afirmar que levaduras como *Dioszegia sp.*, *Rh. mucilaginoso*, *Le. creatinivora* y *Leuconeurospora sp.* (T27Cd2) son candidatos como nuevas fuentes de estos metabolitos al presentar pigmentos que no habían sido descritos en estas especies de levaduras aisladas desde otros puntos del planeta además de micosporinas y un intermediario en su ruta de síntesis como lo es el 4-deoxygadusol.

## 7. Conclusión

Tomando en cuenta los resultados del presente estudio, se puede concluir que la capacidad de tolerar y sobrevivir a los dos estrés ambientales estudiados no se debe solo a una estrategia desarrollada o a un solo metabolito si no a un combinación de factores que los diferentes organismos han desarrollado. En este caso la resistencia y la producción de los diferentes metabolitos evaluados es variable y especie específica en cada uno de los casos analizados.

Las levaduras *Le. creatinivora*, *C. parapsilosis* y *Cr. gastricus* son buenos candidatos para posteriores estudios relacionados con la producción a gran escala de proteínas anticongelantes. Las proteínas anticongelantes producidas por estas levaduras son muy estables frente a altas temperaturas y ciclos de congelación/descongelación, características que son requeridas para poder ser utilizadas en la preservación de alimentos y diferentes líneas celulares.

En relación a la producción de FAs, a pesar de no contar con los datos cuantitativos para cada una de las levaduras, *Le. creatinivora*, *C. parapsilosis*, *C. victoriae*, *Rh. mucilaginoso*, *Rh. laryngis*, *W. anomalus*, *Cr. gastricus* y *M. blollopis* son buenos candidatos para posteriores análisis ya que tiene la capacidad de sintetizar PUFAs  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 y PUFAS de cadena larga (C<sub>20</sub>). En el caso de la producción de ergosterol la levadura *M. blollopis* es la mejor candidata para posteriores estudios de condiciones de cultivo ya que es la levadura que en condiciones de laboratorio produce más ergosterol que cualquiera otra levadura ambiental y es comparable con la cepa industrial de *S. cerevisiae*.

Finalmente, en el caso de la producción de pigmentos carotenoides las levaduras *Dioszegia* sp., *Rh. laryngis* y *Rh. mucilaginoso* son candidatos para posteriores estudios como nuevas fuentes de pigmentos y la levadura *Leuconeuospora* sp. (T27Cd2) como fuente de micosporina.

## 8. Referencias

- Abe, F. y Minegishi, H. (2008). Global screening of genes essential for growth in high-pressure and cold environments: searching for basic adaptive strategies using a yeast deletion library. *Genetics*. 178: 851-872.
- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., y Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98: 5301–5317.
- Amaretti, A. Simone, M. Quartieri, A. Masino, F. Raimondi, S. Leonardi, A. y Rossi, M. (2014) Isolation of carotenoid-producing yeasts from an alpine glacier. *Chem Eng Trans* 38:217–222
- An, GH. Schuman, DB. Johnson, EA. (1989) Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl Environ Microbiol* 55:116.
- Avalos, J. y Carmen Limon, M. (2015). Biological roles of fungal carotenoids. *Curr Genet* 61:309–324.
- Balskus, EP y Walsh, CT. (2010). The genetic and molecular basis for sunscreen biosynthesis in cyanobacteria. *Science* 329:1653–1656
- Bandaranayake WM (1998) Mycosporines: are they nature's sunscreens? *Nat Prod Rep* 15:159–172.
- Bar Dolev, M. Braslavsky, I. y Davies, P.L. (2016). Ice-Binding Proteins and Their Function. *Annual Review of Biochemistry*, 85: 515–542.
- Barrett, J. 2001. Thermal hysteresis proteins. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 33: 105–117.
- Bligh, E. G. y Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37: 911–917.
- Britton, G. (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J* 9:1551–1558.
- Business Communications Company. (2015). FOD025E - The Global Market for Carotenoids. BBC Research Food & Beverage Report.
- Buzzini, P. Branda, E. Goretti, M. y Turchetti, B. (2012). Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: Diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. *FEMS Microbiology Ecology*, 82: 217–241.
- Calcott, P. H. y Rose, A. H. (1982). Freeze-thaw and cold-shock resistance of *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma membrane lipid composition. *J Gen Microbiol*. 128: 549-555.
- Carrasco M, Rozas JM, Barahona S, Alcaino J, Cifuentes V, Baeza M (2012) Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. *BMC Microbiol* 12:251.

Carreto, J. I. y Carignan, M. O. (2011). Mycosporine-Like AminoAcids: Relevant Secondary Metabolites. *Chemical and Ecological Aspects. Mar Drugs*, 9: 387-446.

Cavicchioli, R. Thomas, T. y Curmi, P. M. G. (2000). Cold stress response in Archaea. *Extremophiles*, 4:321-331.

Cockell, CS. y Knowland, K. (1999). Ultraviolet radiation screening compounds. *Biol Rev*, 74:311-345.

Contreras, G. Barahona, S. Sepúlveda, D., Baeza, M. Cifuentes, V. y Alcaíno, J. (2015). Identification and analysis of metabolite production with biotechnological potential in *Xanthophyllomyces dendrorhous* isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31: 517-526.

Cooke, R. C. y Whipps. J. M. (1993). *Ecophysiology of fungi*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.  
D'Amico, S. Collins, T. Marx, JC. Feller, G. Gerday, C. (2006) Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Rep* 7:385-389.

De Caterina, R. (2011). n-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease. *New Engl J Med*. 365: 2439-2450.

De la Coba, F. Aguilera, J. Figueroa, F. De Gálvez, M. y Herrera, E. (2009). Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen. *J Appl Phycol*. 21: 161-169.

De Vries, A.L. y Wohlschlag, D.E. (1969). Freezing resistance in some Antarctic fishes. *Science* 163, 1074-1075

Dupont, S. Beney, L. Ferreira, T. Gervais, P. (2011). Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration. *Biochim Biophys Acta* 1808:1520-1528

Gupta, R. y Deswal, R. (2014). Antifreeze proteins enable plants to survive in freezing conditions. *Journal of Biosciences*, 39: 931-944.

Hagler, A. y Ahearn, D. (1987). Ecology of aquatic yeasts. In: Rose A, Harrison J (eds) *The yeasts*, vol 2., *Yeasts and the environment* Academic Press, London, pp 181-205.

Hashim, N. H. F. Bharudin, I. Nguong, D. L. S. Higa, S. Bakar, F. D. A. Nathan, S. y Murad, A. M. A. (2013). Characterization of Afp1, an antifreeze protein from the psychrophilic yeast *Glaciozyma antarctica* PI12. *Extremophiles*, 17:63-73.

Holick, M. F. (2007). Vitamin D deficiency. *New Engl J Med*. 357:266-281.

Jia Z. y Davies P. (2002). Antifreeze proteins: an unusual receptor-ligand interaction. *Niochemical Sciences*. 27: 101-106.

Kim, H. J. Shim, H. E. Lee, J. H. Kang, Y. C. y Hur, Y. B. (2015). Ice-binding protein derived from *Glaciozyma* can improve the viability of cryopreserved mammalian cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25:1989-1996.

Kirti K, Amita S, Priti S, Jyoti S (2014) Colorful world of microbes: carotenoids and their applications. *Adv Biol* 1-13.



Koushafar, H. Pham, L. Lee, C. y Rubinsky, B. (1997). Chemical adjuvant cryosurgery with antifreeze proteins. *J Surg Oncol* 66:114-121.

Landolfo, S. Zara, G. Zara, S. Budroni, M. Ciani, M. Mannazzu, I. (2010) Oleic acid and ergosterol supplementation mitigates oxidative stress in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol* 141:229-235

Leach, C. (1965). Ultraviolet-absorbing substances associated with light-induced sporulation in fungi. *Can J Bot.* 43: 185-200.

Lee, J. K. Park, K. S. Park, S. Park, H. Song, Y. H. Kang, S. H. y Kim, H. J. (2010). An extracellular ice-binding glycoprotein from an Arctic psychrophilic yeast. *Cryobiology*, 60:222-228.

Libkind, D. Brizzio, S. Ruffini, A. Gadanho, M. van Broock, M. y Sampaio JP. (2003). Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia Argentina. *Anton Leeuw Int J G*, 84:313- 322.

Libkind, D. Brizzio, S. y Van Broock, M. (2004). *R. mucilaginosa*, a carotenoid producing yeast strain from a Patagonian high-altitude lake. *Folia Microbiol* 49:19-25.

Libkind, D. Moline, M. Sampaio, JP. y van Broock M (2009) Yeasts from high-altitude lakes: influence of UV radiation. *FEMS Microbiol Ecol* 69:353-362.

Libkind, D. Moline, M. y van Broock, M. (2011) Production of the UVB- absorbing compound mycosporine-glutaminol-glucoside by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *FEMS Yeast Res* 11:52-59

Libkind, D. Pérez, P. Sommaruga, R. del Carmen Diéguez, M. Ferraro, M. Brizzio, S. Zagarese, H. y van Broock, M. (2004). Constitutive and UV-inducible synthesis of photoprotective compounds (carotenoids and mycosporines) by freshwater Yeast. *Photochem Photobiol Sci.* 3: 281-286.

Lorenz, R. T. y Cysewski, G R. (2000). Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.* 18: 160-167.

Madhour, A. Anke, H. Mucci, A. Davoli P. y Weber, RW. (2005). Biosynthesis of the xanthophyll plectanixanthin as a stress response in the red yeast *Dioszegia* (Tremellales, Heterobasidiomycetes, Fungi). *Phytochemistry* 66:2617-2626

Margesin, R. Neuner, G. y Storey, K. B. (2007). Cold-loving microbes, plants, and animals - Fundamental and applied aspects. *Naturwissenschaften*, 94: 77-99.

Marova I, Breierova E, Koci R, Friedl Z, Slovak B, Pokorna J (2004) Influence of exogenous stress factors on production of carotenoids by some strains of carotenogenic yeasts. *Ann Microbiol* 54:73-86.

Martin, A. Lu, C. Patel, T. 1992. Growth parameters for the yeast *Rhodotorula rubra* grown in peat extracts. *J Ferment Bioeng.* 76:321-325.

Martinez, A. Cavello, I. Garmendia, G. Rufo, C. Cavalitto, S. y Vero, S. (2016). Yeasts from sub-Antarctic region: biodiversity, enzymatic activities and their potential as oleaginous microorganisms. *Extremophiles*, 20: 759-769.

Mata-Gómez, L., Montañez, J., Méndez-Zavala, A., & Aguilar, C. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Fac*, 13: 12.

McKenzie, RL. Aucamp, PJ. Bais, AF. Bjorn, LO. Ilyas, M. y Madronich, S. (2011). Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation. *Photochem Photobiol Sci* 10:182–198

McKenzie, RL. Aucamp, PJ. Bais, AF. Bjorn, LO. y Ilyas, M. (2007). Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochem Photobiol Sci* 6:218–231.

Mitchell, D. E. Congdon, T. Rodger, A. y Gibson, M. I. (2015). Gold Nanoparticle Aggregation as a Probe of Antifreeze (Glyco) Protein-Inspired Ice Recrystallization Inhibition and Identification of New IRI Active Macromolecules. *Scientific Reports*. 5: 15716.

Moline, M. Flores, MR. Libkind, D. Dieguez Mdel, C. Farias, ME. y van Broock M (2010) Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin. *Photochem Photobiol Sci* 9:1145–1151

Okuyama, H. Morita, N. y Yumoto, I. (1999). Cold-adapted microorganisms for use in food biotechnology In: Margesin R, Schinner F (eds) *Biotechnological applications of cold- adapted organisms*. Springer, Berlin, pp 101–115

Oren, A. y Gunde-Cimerman, N. (2007) Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? *FEMS Microbiol Lett* 269:1–10

Park, J. I. Lee, J. H. Gwak, Y. Kim, H. J. Jin, E. y Kim, Y. P. (2013). Frozen assembly of gold nanoparticles for rapid analysis of antifreeze protein activity. *Biosensors & Bioelectronics*, 41: 752–757.

Perkins, DN. Pappin, DJ. Creasy, DM. Cottrell, JS. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 1999; 20:3551–67.

Porro, D. Sauer, M. Branduardi, P. y Mattanovich, D. (2005). Recombinant Protein Production in Yeasts. *Molecular Biotechnology*, 31: 245–260.

Radwan, S. S. (1991). Sources of C20-polyunsaturated fatty acids for biotechnological use. *Appl Microbiol Biot*. 35: 421-430.

Rastogi, RP. Singh, SP. Incharoensakdi, A. Hader, DP. Sinha, RP.(2014) Ultraviolet radiation-induced generation of reactive oxygen species, DNA damage and induction of UV-absorbing compounds in the cyanobacterium *Rivularia* sp. HKAR-4. *S Afr J Bot* 90:163–169

Raymond, J.A. Wilson, P.W. y DeVries, A.L. (1989). Inhibition of growth on nonbasal planes in ice by fish antifreeze. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:881-885.

Retamales, P. Hermosilla, G. León, R. Martínez, C. Jiménez, A. y Cifuentes, V. (2002). Development of the sexual reproductive cycle of *Xanthophyllumycetes dendrorhous*. *Journal of Microbiol*48: 87-93.

Robinson, C.H. (2001). Cold daption in Artin and Antartic fungi. *New Phytol*. 151: 341-353.

Rossi, M. (2009) Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts. *FEMS Microbiol Ecol* 69:363–372

Sambrook, J. y Russell D.W. (2001). *Molecular Cloning. A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schmidt, I. Schewe, H. Gassel, S. Jin C. Buckingham, J. Humbelin. Sandmann, G. y Schrader, J. (2011). Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma*/*Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Microbiol Biot.* 89: 555-571.

Shang, F. Wen, S. Wang, X. y Tan, T. (2006). Effect of nitrogen limitation on the ergosterol production by fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 122: 285–292.

Shevchenko, A. Jensen, ON. Podtelejnikov, AV. Sagliocco, F. Wilm, M. y Vorm O. (1996). Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93:14440–5.

Simopoulos, A. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother.* 56: 365-379.

Starmer, WT. y Lachance, MA. (2011). Yeast ecology. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (eds) *The yeasts. A taxonomy study*, vol 1. Elsevier, New York, pp 65–83.

Shivaji S. y Prasad GS (2009). Antarctic yeasts: biodiversity and potential applications. In: Satyanarayana T, Kunze G (eds) *Yeast biotechnology: diversity and applications*. Springer, Dordrecht, pp 3–18

Strzałka, K. Kostecka-Gugała, A. Latowski, D. (2003) Carotenoids and environmental stress in plants: significance of carotenoid- mediated modulation of membrane physical properties. *Russ J Plant Physiol* 50:168–173.

Tronchini, J. Rozes, N. Querol, A. y Guillamón, J. M. (2012). Lipid composition of wine strains of *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae* grow at low temperatura. *Int J Food Microbiol.* 155: 191-198.

Vaz, ABM. Rosa, LH. Vieira, MLA. Garcia, VD. Brandao, LR. Teixeira, LCR. Moline, M. Libkind, D. van Broock, M. y Rosa, CA. (2011) The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Braz J Microbiol* 42:937–947

Veen M, Lang C (2004) Production of lipid compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biot* 63:635–646.

Venketesh, S. y Dayananda, C. (2008). Properties, Potentials, and Prospects of Antifreeze Proteins. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28: 57–82.

Vincent, WF. y Neale, PJ. (2000). Mechanisms of UV damage to aquatic organisms. In: S. de Mora, S. Demers and M. Vernet (Eds). *The effects of UV Radiation in the Marine Environment*. Cambridge Environmental Chemistry Series no. 10, Cambridge University Press, 149-176.

Vishniac, HS. (2006) A multivariate analysis of soil yeasts isolated from a latitudinal gradient. *Microb Ecol* 52:90103.

Vishniac, HS. Klinger, JM. (1986). Yeasts in the Antarctic deserts. In: Megusar F, Ganter M (eds) Perspectives in microbial ecology. Slovene Society for Microbiology, Ljubljana, pp 46–51.

Vishniac, HS. Klinger, JM. 1986. Yeasts in the Antarctic deserts. In: Megusar F, Ganter M (eds) Perspectives in microbial ecology. Slovene Society for Microbiology, Ljubljana, pp 46–51.

Volkman, M. y Gorbushina, A. (2006). A broadly applicable method for extraction and characterization of mycosporines and mycosporine-like amino acids of terrestrial, marine and freshwater origin. FEMS Lett. 255: 286-295.

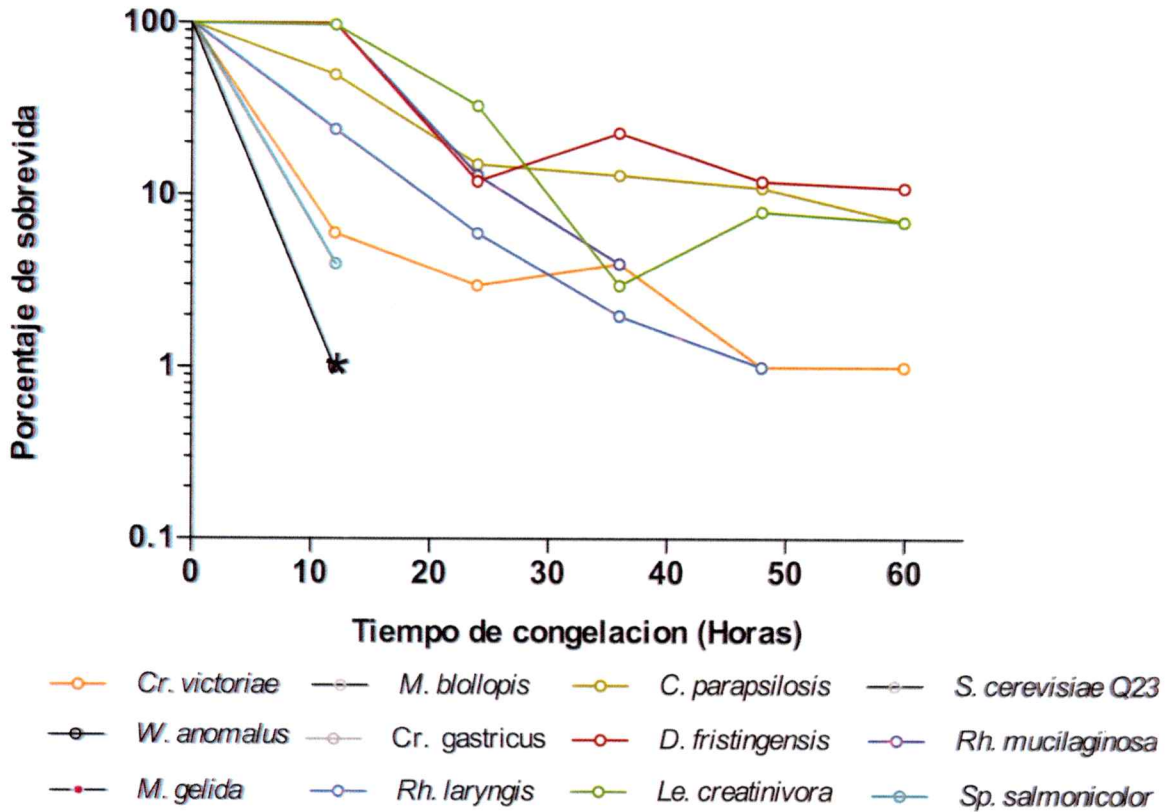
Walker, GM. (1998). Yeast physiology and biotechnology. Wiley, New York.

Wiseman, H. (1993). Vitamin D is a membrane antioxidant Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. FEBS lett. 326(1): 285-288.

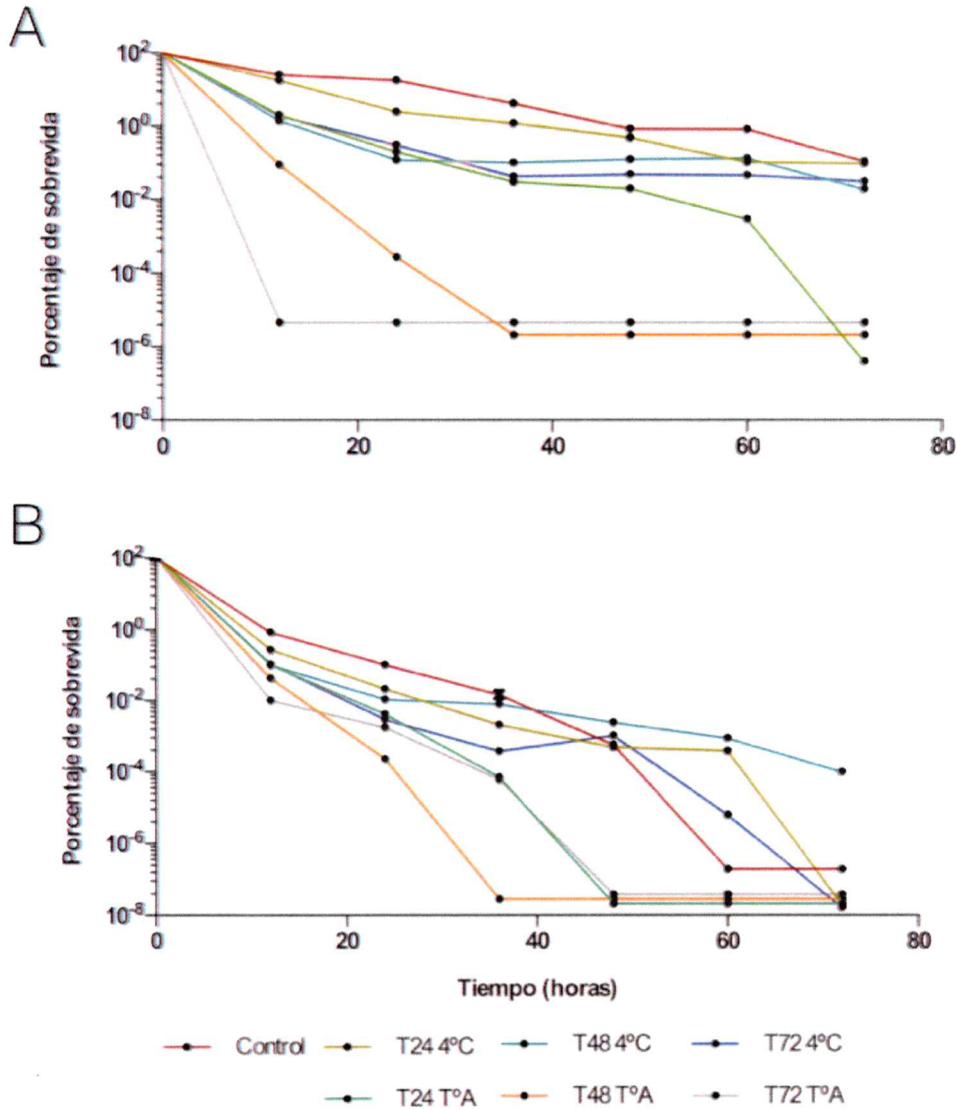
Zlatanov, M. Pavlova, K. y Grigorova, D. (2001). Lipid composition of some yeast strains from Livingston Islans, Antarctica. Folia microbiol. 46: 402-40.

Zwietering, M. H. Jongenburger, I. Rombouts, F. M. y Van't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. Applied and Envir. Microbiol, 56: 1875–1881.

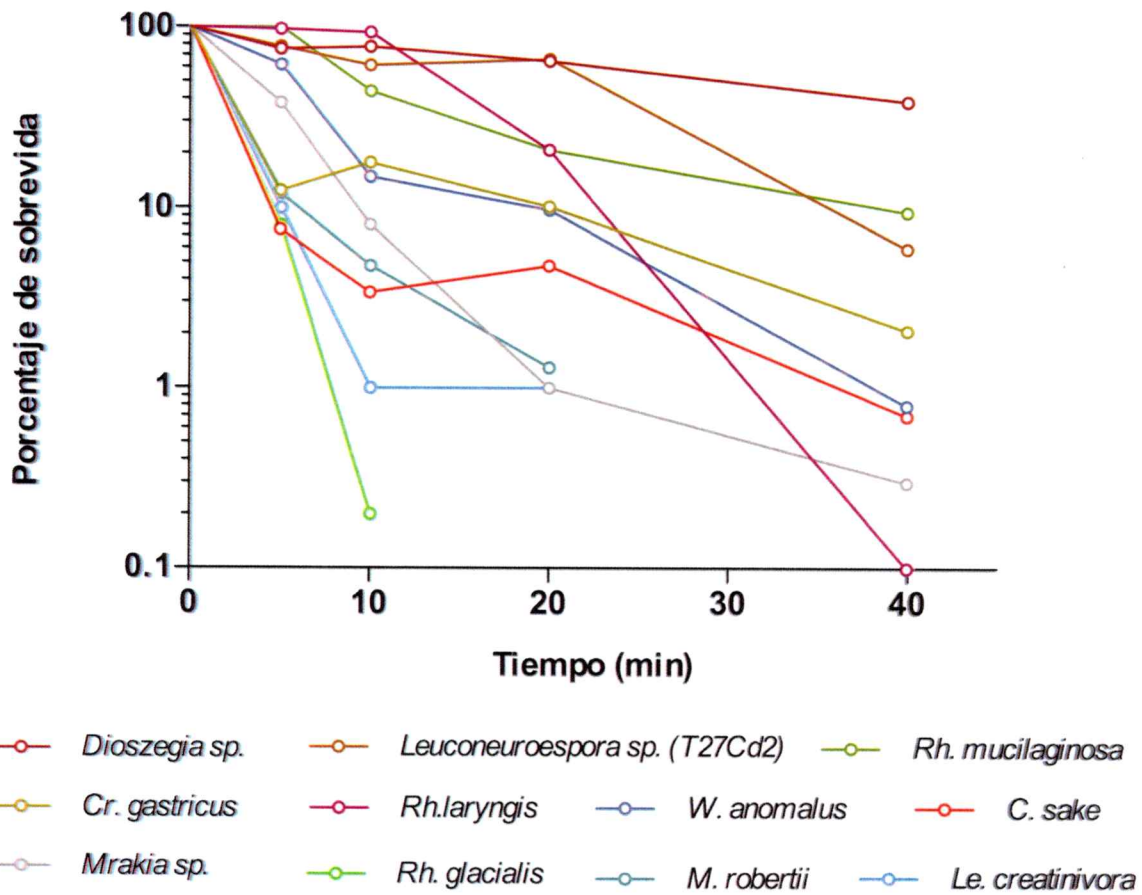
9. Anexos



**Figura I. Tolerancia a los ciclos de congelación/descongelación de la colección de levaduras antárticas seleccionadas.** Gráfico representativo del porcentaje de sobrevivencia en el tiempo de las levaduras antárticas expuestas a CC/D. Los resultados mostrados son el promedio de tres mediciones, las barras de error no se incluyeron para mantener la claridad de los gráficos. En todos los casos el error del recuento viable no superó el 20%, el cual está dentro del error normal de la metodología utilizada. (\*) Corresponde a la superposición de las levaduras con el menor porcentaje de sobrevivencia *W. anomalus*, *Cr. gastricus*, *M. gelida*, *M. blollopis* y *S. cerevisiae Q23*.

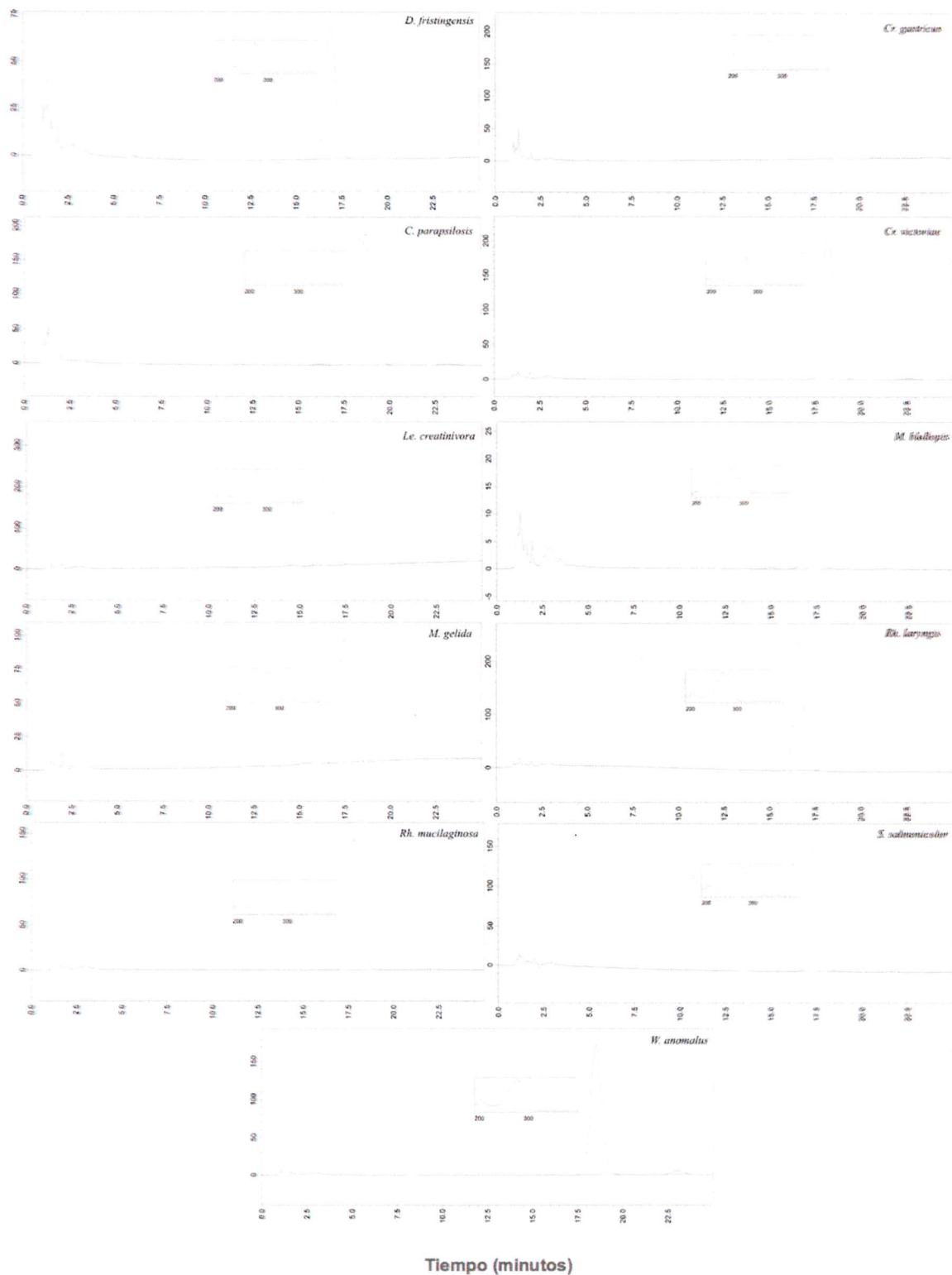


**Figura II: Sobrevida de levaduras antárticas con previa incubación a 4°C. A:** *Le. creatinivora* (alta tolerancia a CC/D). **B:** *Cr. gastricus* (baja tolerancia a los CC/D). Los porcentajes de sobrevivida mostrados son el promedio de tres mediciones. Con cada una de las curvas se calculó la tasa de decaimiento (muerte) y se comparó entre cada uno de los tiempos (24,48 y 72 horas). T°A: Temperatura ambiente.



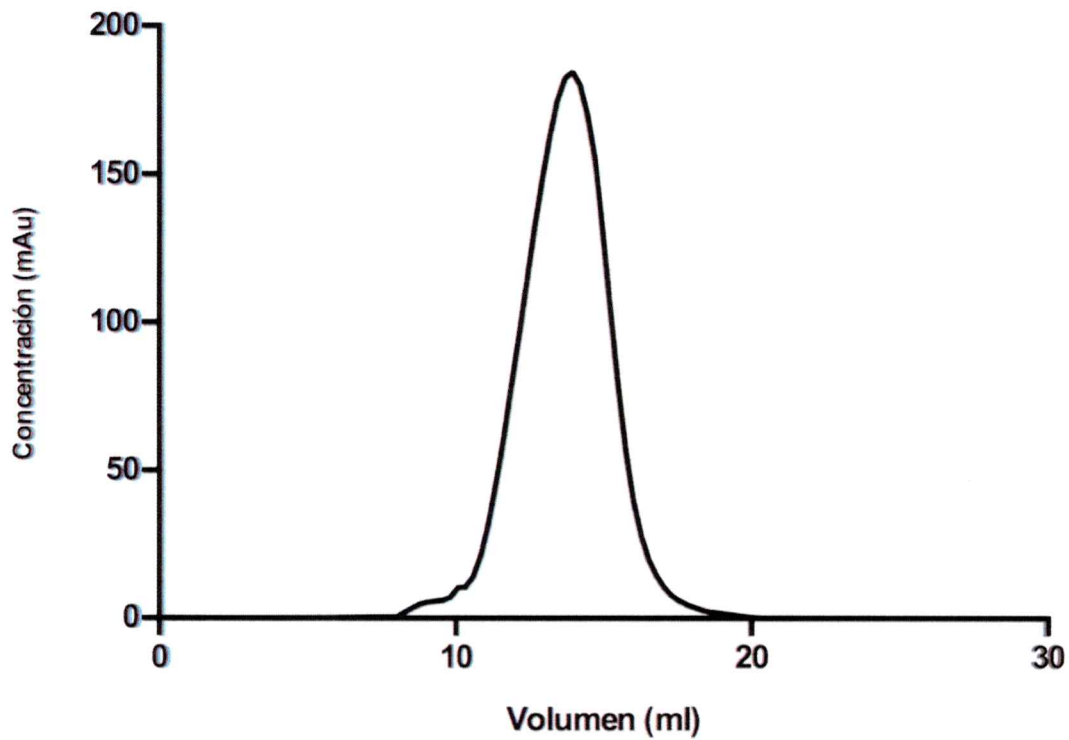
**Figura III. Tolerancia a la radiación UV (254 nm).** Los resultados mostrados son el promedio de tres mediciones, las barras de error no se incluyeron para mantener la claridad de los gráficos. En todos los casos el error del recuento viable no supero el 20%, el cual está dentro del error normal de la metodología utilizada.

Absorbancia a 280 nm (mAu)



**Figura IV. Análisis RP-HPLC de las muestras de esteroides totales.** Cromatogramas de las muestras extraídas de las levaduras seleccionadas. El espectro de absorbancia es mostrado. Se logra observar en el que el único esteroide presente según su tiempo de retención y espectro de absorción es el ergosterol (Shang y col., 2006).





**Figura V: Cromatografía de Exclusión Molecular en columna Sephadex 75 increase 10/300 GI column.** Cromatograma característico de una muestra en la que no fue posible separar sus proteínas. Se puede ver un solo pico en el cromatograma lo que indica que todas las proteínas cargada en la columna eluyen juntas.

SECUENCIA I:

GACCACAGCGAAGACGAATGTCTCTGCTCCTTCGAGATCTTCTTGC GCGAGATACGTGCGACGACAGCGGCGACGAGGFACTCGTTGAGCC  
 CGAGACCGGCGATCTGGGACTCGACGAAGCGCAGAGGCGAGGTCGGTTCGACGGAGGCGGAGGAAGATACCGGTGAGGATAACGATGGTAGC  
 GATATCGGGAGGTGGCCGAAAGTAGGGATGGGGCGAGGGGGAGGAACTCGGAGGAGAGGACTGCGAGGAGGAGGGCGGAGGTGAACCGAC  
 GGAGTGC GAAACCGAGCCGGGGCATCTTGTGAGGTTGAAAGTGGTTCGAGTACAGCGAAGGCGTCTTCTTGATCCCCGCGAGACGCTCTGACG  
 CTCATGATGCGGTTGAGTACCTTGACGTCTTGGCACGTCGCCTTCATCCGCTTGAGGCGCTGCTCGTTCTGCTCCTCCAACACCTCTGCTC  
 CATCACTCGGTTACCTCCAACATCCACATGCCGTCGAGAAGGGCGAGGCACGTCTTGACGGTGGTGGGGAAGCCTCGCTCTGCCTTGTGCG  
 CAAGAGCTGCTGCGCCGCTCCGAGGTTGGCGTTGAGCAGCTGGGCGCCGACGAGGTCGTCTGAGGCGTCTCCGGTCGGCTGCAATCGATGC  
 TGCTTGAATAGCGAGAATGCCTCGACCGTCTCGGGGTACCTCCTCAACTCGTACAGGCTTGGAGTCGCCACTCGATGAGTCGCGAGCGAGTT  
 GACCTGCTTCCAGACGGCTATGTTGGTGAAGCAACGACCTCCTCCAGAGACATCGTTGGACGAGGTGCTTGACGGGCTGTTGAGGACTC  
 GAGCGAGGTTGTTGCGGGGGAAGGGAGGGGGCGCACATGTGGTTGAGCGCTTGCTTGAGGAGTCGTCGGCGAAAGGAAACCTGAAGGAGG  
 GGAGGCTTTGATGGCAATGGATGCCAACC GGTTGAAAGGTGCCAAGTCCGTC AAGGTAACCCGTCCTTTGCGAAATGAAGGCCTTGC  
 CAAACCGAGGGAGGGTAGGTTGAGGGGAGAAACATTTCCACCCGAATTCCTTGAGCAGCCCGGGGGGATTCCCTAAGTTTTTTAAAGG  
 GGGCCCGCCACCGCGGTTGGGACTCCTCCACCTTTTGGT

SECUENCIA II:

GAAATTCAAAAGATGCAATATAATCTCTTGATCAGATAAAGATAGAGATTTTTTTGGGGGGGGGGGGGATTGTTTTCTCTTTCTTTT  
 TTTCTTTCTCTCTTTTCTTTGTTGTTCTCGTACTTATCTGGCGCACTTCTGGCCTTGTGCTTGACCAGGTGGGTCGAATGCACTCCCGA  
 CCTCGTGATGAAGGTGATTTTGGCCTGATAATACGCTAACATCTTAAAAGTGGGATATCAATTTAAGGAAGCTATTCAATGGGCGAGG  
 GCAATGGCGAAAGGCTCTGAAGATAACCTTAGGCCGTATGACTTTGCCACGGAGAACGAGCACATCCAGCACAAATAATACTTTCTCCA  
 CCTTCCCTTCGTGCGTATATGATTTGATATCTATTAAGTTCGGTTCGACGATCCGGAGCAAGCTGGGGCGACGATTTACACTGTGCGAGATT  
 CCTTGTACAACGACGTCGGGCATTACTCCCGCGCTTCAGCAGCCGATCTGATTACTCCCGATAATCCCGTTCCGGAGCGGACGATTGCGTC  
 GGAGCGACCTACGCACCCCGCTGCATCATCGAATGGCCGTGCAGCAACCTCTCATACAGTGGACCTCACCAACCTCCAACGAGACCGC  
 CGGAACCACTGCATCTGCCAGCTTCACGATTTCTCTGCTCAAACCTCTGGGAGCTGCTGATGCTCGATCGCCCTGCGATCATCTTTCCC  
 AAAAAATGTTTGAACCTCATATTGCGCAATCCCCCTACCTCCCCCTTCCAGTCAATGACTTATATTTATCCTTCAATTTATCCGTCAG  
 GATATTCTTGAACCGAAATCCGCTACCCAGGGTGCCCGAAGTGCAGGTCAGCTCTCCGCCAACCATCAATATCATATAAGTTCTCG  
 CGCTACGAGGGGACCCACGGGGACCGGGATGCTCATTGCCCTTGAGTCTCCGTGGGAATAAGCCACCCACCCGTACGCAAAATCCGG  
 CGCCACTGAAAGGAAGAGACACCGGGATCCTCCTGCCCGGACCCAGAAAGGAGCACACAACCCCTCGCTCTCGATCAGGGTCCATGCGA  
 AACTTAACCCCAACACCGGTTAGG

| Secuencia | Análisis | Descripción  | Cobertura | E value | Identidad |
|-----------|----------|--|-----------|---------|-----------|
| I         | BLASTn   | NI   | -         | -       | -         |
|           | BLASTx   | MTLa1 [ <i>Candida orthopsilosis</i> ]               | 14%       | 9.0     | 32%       |
| II        | BLASTn   | NI   | -         | -       | -         |
|           | BLASTx   | Cadena A, Co-chaperona Cpr7 [ <i>S. cerevisiae</i> ] | 27%       | 2.7     | 50%       |

Figura VI. Secuencias nucleotídicas obtenidas de la levadura *Le. creatinivora* utilizando partidores LeIBP (Secuencia I) y AFP (Secuencia II) junto a análisis bioinformático. NI: No identificado.

Tabla I. Contenido de esteroides en levaduras antárticas.

| Especie de Levadura     | Tolerancia a la congelación | Esteroides (mg g <sup>-1</sup> peso seco) | Porcentaje de Ergosterol (%) |
|-------------------------|-----------------------------|---|------------------------------|
| <i>Le. creatinivora</i> |                             | 4,0317 ± 0,12                             | 99,4                         |
| <i>C. parapsilosis</i>  | Alta                        | 1,9429 ± 0,17                             | 98,4                         |
| <i>C. victoriae</i>     |                             | 1,5248 ± 0,02                             | 100                          |
| <i>D. fristingensis</i> |                             | 3,4301 ± 0,25                             | 97,1                         |
| <i>Rh. mucilaginosa</i> |                             | 2,0729 ± 0,04                             | 100                          |
| <i>Rh. laryngis</i>     | Media                       | 2,4485 ± 0,09                             | 100                          |
| <i>Sp. salmonicolor</i> |                             | 2,6341 ± 0,13                             | 100                          |
| <i>W. anomalus</i>      |                             | 2,2329 ± 0,08                             | 98,1                         |
| <i>Cr. gastricus</i>    | Baja                        | 2,13 ± 0,22                               | 100                          |
| <i>M. gelida</i>        |                             | 3,1089 ± 0,02                             | 100                          |
| <i>M. blollopis</i>     |                             | 6,9086 ± 0,24                             | 99,2                         |

Tabla II. Contenido de esteroides en levaduras antárticas a diferentes temperaturas.

| Especie de Levadura     | Tolerancia a la congelación | Temperatura de crecimiento (°C) | Esteroides (mg g <sup>-1</sup> peso seco) | Porcentaje de Ergosterol (%) |
|-------------------------|-----------------------------|---------------------------------|---|------------------------------|
| <i>Le. creatinivora</i> | Alta                        | 10                              | 3,8398 ± 0,06                             | 99,5                         |
|                         |                             | 15                              | 3,8597 ± 0,05                             | 99,1                         |
|                         |                             | 22                              | 4,0317 ± 0,12                             | 99,4                         |
|                         |                             | 30                              | 4,0288 ± 0,06                             | 99,1                         |
| <i>Rh. mucilaginoso</i> | Media                       | 10                              | 1,9055 ± 0,1                              | 100                          |
|                         |                             | 15                              | 2,0063 ± 0,08                             | 99,2                         |
|                         |                             | 22                              | 2,0457 ± 0,06                             | 100                          |
|                         |                             | 30                              | 2,0729 ± 0,04                             | 100                          |
| <i>M. blollopis</i>     | Baja                        | 10                              | 6,7911 ± 0,09                             | 99,3                         |
|                         |                             | 15                              | 6,9086 ± 0,24                             | 99,2                         |
|                         |                             | 22                              | 6,8393 ± 0,16                             | 99                           |
|                         |                             | 30                              | 6,8001 ± 0,07                             | 99,1                         |

Tabla III. RAF levaduras psicrotolerantes.

| Tolerancia a la Congelación | Especie de Levadura     | RAF (520/650) |
|-----------------------------|-------------------------|---------------|
| Alta                        | <i>D. fristingensis</i> | 0,37 ± 0,028  |
|                             | <i>C. parapsilosis</i>  | 0,94 ± 0,022  |
|                             | <i>Le. creatinivora</i> | 0,82 ± 0,006  |
|                             | <i>Cr. victoriae</i>    | 0,26 ± 0,01   |
| Media                       | <i>Rh. mucilaginoso</i> | 0,3 ± 0,0005  |
|                             | <i>Sp. salmonicolor</i> | 0,28 ± 0,004  |
|                             | <i>Rh. laryngis</i>     | 0,27 ± 0,007  |
| Baja                        | <i>M. blollopis</i>     | 0,22 ± 0,006  |
|                             | <i>M. gelida</i>        | 0,5 ± 0,006   |
|                             | <i>W. anomalus</i>      | 0,31 ± 0,006  |
|                             | <i>Cr. gastricus</i>    | 0,91 ± 0,03   |
| Control                     | <i>S. cerevisiae</i>    | 0,44 ± 0,037  |
|                             | BSA                     | 0,24 ± 0,0005 |
|                             | YM                      | 0,51 ± 0,016  |
|                             | Agua                    | 0,27 ± 0,003  |

Se muestra el valor determinado de propiedad anticongelante (RAF) para cada una de las levaduras analizadas agrupadas según su tolerancia a la congelación. Como control se muestra la actividad el extracto proteico extracelular total de la levadura *S. cerevisiae*, la proteína BSA y las proteínas obtenidas desde el medio de cultivo YM 1% de glucosa sin inocular.

## Código utilizado en R para Análisis de Componentes Principales.

```
library(ggbiplot)
#Datos separados en valores y nombres de cepas
#datos1
valores<-datos1[,2:5]
cepas<-datos1[,1]
#correr PCA en R
pablo.pca <- prcomp(valores,center = TRUE,scale. = TRUE)

Gráfico
g <- ggbiplot(pablo.pca, obs.scale = 1, var.scale = 1, groups = cepas, circle = TRUE, varname.size =
5, labels.size=5, ellipse = TRUE)
g <- g + scale_color_discrete(name = "") +ylim(-4.5, 3)+xlim(-
4.5,3.5)+theme(axis.text=element_text(size=10),axis.title=element_text(size=16,face="bold"))
g <- g + theme(legend.direction = 'horizontal', legend.position = 'top', legend.text
=element_text(size=11,face="bold"))
print(g)
```

## 10. Paper

## Tolerance to Ultraviolet Radiation of Psychrotolerant Yeasts and Analysis of Their Carotenoid, Mycosporine, and Ergosterol Content

Pablo Villarreal<sup>1</sup> · Mario Carrasco<sup>1</sup> · Salvador Barahona<sup>1</sup> · Jennifer Alcaíno<sup>1</sup> · Víctor Cifuentes<sup>1</sup> · Marcelo Baeza<sup>1</sup>

Received: 13 July 2015 / Accepted: 9 September 2015 / Published online: 20 October 2015  
© Springer Science+Business Media New York 2015

**Abstract** Yeasts colonizing the Antarctic region are exposed to a high ultraviolet radiation evolving mechanisms to minimize the UV radiation damages, such as the production of UV-absorbing or antioxidant compounds like carotenoid pigments and mycosporines. Ergosterol has also been suggested to play a role in this response. These compounds are also economically attractive for several industries such as pharmaceutical and food, leading to a continuous search for biological sources of them. In this work, the UV-C radiation tolerance of yeast species isolated from the sub-Antarctic region and their production of carotenoids, mycosporines, and ergosterol were evaluated. *Dioszegia* sp., *Leuconeuospora* sp. (T27Cd2), *Rhodotorula laryngis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, and *Cryptococcus gastricus* showed the highest UV-C radiation tolerance. The yeasts with the highest content of carotenoids were *Dioszegia* sp. (OHK torulene), *Rh. laryngis* (torulene and

lycopene), *Rh. mucilaginosa*, (torulene, gamma carotene, and lycopene), and *Cr. gastricus* (2-gamma carotene). Probable mycosporine molecules and biosynthesis intermediates were found in *Rh. laryngis*, *Dioszegia* sp., *Mrakia* sp., *Le. creatinivora*, and *Leuconeuospora* sp. (T27Cd2). Ergosterol was the only sterol detected in all yeasts, and *M. robertii* and *Le. creatinivora* showed amounts higher than 4 mg g<sup>-1</sup>. Although there was not a well-defined relation between UV-C tolerance and the production of these three kinds of compounds, the majority of the yeasts with lower amounts of carotenoids showed lower UV-C tolerance. *Dioszegia* sp., *M. robertii*, and *Le. creatinivora* were the greatest producers of carotenoids, ergosterol, and mycosporines, respectively, representing good candidates for future studies intended to increase their production for large-scale applications.

### Introduction

The yeasts inhabiting the Antarctic, one of the most extreme environments on the Earth, have developed several physiological adaptations to survive under the harsh environmental conditions of this region, including freezing temperatures, low nutrient availability, and high solar radiation [20]. The microorganisms colonizing cold environments are classified as psychrophilic if their optimum and maximum temperatures for growth are ≤15 and ≤20 °C, respectively, or as psychrotolerant if their maximum temperature for growth is above 20 °C [14, 31]. The solar radiation periods in the Antarctic can be 16–18 h in summer [23], and with the additional reduction in the ozone layer in this region, this exposure results in a high incidence of ultraviolet (UV) radiation [24]. This level of UV radiation has negative effects on cells by directly

✉ Marcelo Baeza  
mbaeza@u.uchile.cl  
Pablo Villarreal  
pablovillarreal07@gmail.com  
Mario Carrasco  
mario.carrasco.t@gmail.com  
Salvador Barahona  
barahona.salvador@gmail.com  
Jennifer Alcaíno  
jalcaino@u.uchile.cl  
Víctor Cifuentes  
vcifuentes@uchile.cl

<sup>1</sup> Laboratorio de Genética, Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile

affecting the DNA molecules, or by indirect effects through the generation of reactive oxygen species (ROS) [29, 30], among other harmful effects. The synthesis of protective molecules such as carotenoid pigments and mycosporine or mycosporine-like amino acids (MAAs) is among the mechanisms that microorganisms have evolved to minimize or avoid cellular damage derived from UV radiation [21]. Carotenoids are yellow, orange, or red pigments synthesized by photosynthetic organisms and some fungi and bacteria, playing important physiological roles in all living organisms [6]. In photosynthetic organisms, carotenoids are not only involved in photosynthesis, acting as accessory pigments, but they also provide a photoprotective role against photo-oxidation [33]. In non-photosynthetic organisms, their main function is to sequester ROS that may be produced by their own aerobic metabolism or by environmental factors [16]. In yeasts, these kinds of pigments are more frequently found in basidiomycetes, mainly in the genera *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*, *Cryptococcus*, *Rhodospiridium*, and *Xanthophyllomyces* (ex *Phaffia*), and include  $\beta$ -carotene, torulene, and torularodine as the most common carotenoids [3]. In addition to carotenoids, mycosporines and MAAs are hydrosoluble molecules that absorb UV radiation mainly in the range 310–365 nm. These molecules are composed of a unit of amino-cyclohexenimine ring linked to an amino acid, amino alcohol, or amino group [9]. Beyond their protective role against UV radiation, mycosporines are also involved in fungal reproduction and in tolerance to osmotic or thermal stress, and possibly act as an intracellular nitrogen reservoir [13, 26]. Ergosterol is another metabolite that could participate in yeast tolerance to stress generated by UV radiation. This sterol is one of the most important components of cellular membranes in *Saccharomyces cerevisiae*, where it modulates the fluidity and permeability, which is important for several cellular functions [10]. Furthermore, a role in the oxidative stress response has been attributed to ergosterol [15] as its supplementation improves yeast viability in wine fermentation and resistance to exogenous and endogenous ROS [17].

Beyond their ecophysiological importance, the metabolites mentioned above have attracted the attention of researchers for their economic importance and there is a continuous search for their biological sources. Carotenoid pigments are used in pharmaceutical and aquaculture industries as antioxidant compounds, vitamin B precursors, and supplements in the diet of salmon [1, 16]. Mycosporines and MAAs have been proposed by the cosmetic and pharmacology industries as alternative compounds to currently used sunscreens [4, 5, 7]. Ergosterol is the precursor of vitamin D<sub>2</sub>, which is used for anti-rachitic treatment and in food fortification [34], and for the production of cortisone and the hormone flavone [39].

Previously, we isolated and identified several yeast species in soil samples from King George Island in the sub-Antarctic region [8]. In this work, the tolerance of these yeasts against UV radiation was evaluated, as well as their relationship with the production of carotenoid pigments, mycosporines, and ergosterol.

## Materials and Methods

### Yeasts and Culture Conditions

The yeast species used in this work were isolated from soil and water samples of King George Island at the sub-Antarctic region [8]. Yeasts were routinely cultured in YM medium (0.3 % yeast extract, 0.3 % malt extract, 0.5 % de peptone) supplemented with 1 % glucose and incubated at the optimal temperature of growth of each yeast species.

### Tolerance to UV Radiation

The different yeast species were grown until the late log phase of growth in YM medium supplemented with glucose. Aliquots were deposited in Petri plates and irradiated with 254 nm UV radiation using a germicidal lamp GE T8 (General Electric, Fairfield, CT, USA) placed 15 cm above the plates. Aliquots were collected at different times and the viable count was determined. The survival percentage in each case was calculated in relation to the viability of the culture before exposure to UV.

### Metabolite Extraction and Identification

Metabolites were extracted from yeast pellets obtained from cultures at the late log phase of growth, quantified spectrophotometrically, and analyzed for their composition by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) using a LiChroCART RP18 125-4 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) column. In the case of mycosporine analyses, a Hypercarb C18 (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) column was used. Metabolites were identified according to their retention time, absorption spectra, and comparison with standards.

Carotenoids were extracted according to the method by An y cols. (1989), quantified by their absorbance at 474 nm using an absorption coefficient of 2100 ( $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ ), and normalized by the yeast dry weight. For RP-HPLC analyses, carotenoids were suspended in acetone and acetonitrile:methanol:isopropanol (75:20:5 v v<sup>-1</sup>) was used as the mobile phase at a flow rate of 1 ml min<sup>-1</sup>.

Mycosporines were extracted from cell pellets according to previously described method: cells were suspended in 1 ml of water, lysed with a Minibeadbeater (BioSpec



Bartlesville, USA; 3 × 3 min pulses with 1-min recovery on ice between each pulse), and clarified by centrifugation for 15 min at 9000 rpm in a microcentrifuge [4]. Mycosporines were quantified at 310 nm using the extinction coefficient of 2500 (cm<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>) and normalized by the yeast dry weight in each case. For RP-HPLC analyses, mycosporines were suspended in water, and water:methanol:acetic acid (99.3:0.5:0.2 v v<sup>-1</sup>) was used as the mobile phase at 0.7 ml min<sup>-1</sup> flow rate.

Sterols were extracted as previously described [32]. Briefly, the yeast pellets from 5 to 10 ml of culture were mixed with 4 g of KOH and 16 ml of ethanol 60 % (v v<sup>-1</sup>). The mix was incubated at 80 °C for 2 h, and then the sterols were extracted with 10 ml of petroleum ether. Sterols were quantified at 282 nm using the molar extinction coefficient of 11,900 cm<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup> [36]. For RP-HPLC analysis, sterols were suspended in acetone, and methanol:water (97:3 v v<sup>-1</sup>) was used as the mobile phase at a flow rate of 1.8 ml min<sup>-1</sup>.

## Results

### Tolerance to UV Radiation

Cultures of different yeast species at the late log phase of growth were irradiated with UV-C (254 nm) to determine the viable count after irradiation. The percentage of survival at each point was calculated by comparison with the original cell count in each case. In initial trials, yeast cultures were submitted for a maximum of 5 min of UV radiation, but no significant viability decrease was observed for the majority of yeast species (not shown). Then, the irradiation time was increased to 40 min. Figure 1 shows the survival decay over time, which varied among the different yeast species. Comparatively, the yeasts that showed the lower UV radiation tolerance were *Rh. glacialis* (T8Rg), *M. psychrophila*, *Le. creatinivora*, *Leuconeuospora* sp. (T11Cd2), *Metschnikowia* sp., *C. sake*, and *M. robertii*, showing between 0.2 and 4.8 % of survival after ten minutes of irradiation. On the contrary, the yeasts *Leuconeuospora* sp. (T27Cd2), *Rhodotorula laryngis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, and *Dioszegia* sp. showed the higher UV tolerances, having over 40 % of survival after 10 min of irradiation. Among them, *Rh. mucilaginosa* and *Dioszegia* sp. were the ones with the highest UV radiation tolerance with 10 and 40 % of survival, respectively, after 40 min of exposure. Other yeast species showed intermediate tolerances in relation to those mentioned above.

Taking into account the UV-C tolerance results and for comparative purposes, representative yeasts with the higher, middle, and lower UV tolerances were selected to

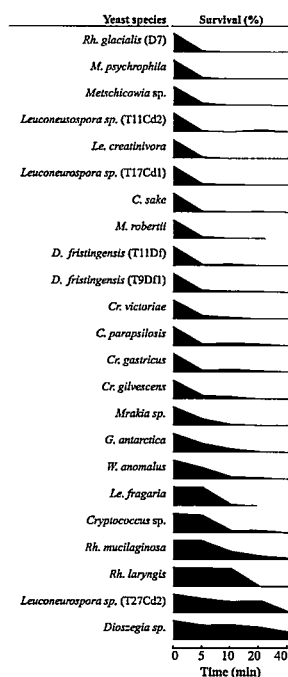


Fig. 1 Tolerance to UV-C radiation. Yeast cultures were exposed to UV radiation for varying lengths of time. Aliquots were collected at each point, the viable count was determined, and the % of survival was calculated based on the viability of the original culture before exposure to UV-C. The average values of three determinations are shown, and the errors bars were not included to keep the clarity of the graphs, but in all cases the viable count error varied up to 20 %, which is within the normal error of the methodology

analyze their production of carotenoids, mycosporines, and ergosterol. These analyses were carried out with cell pellets obtained from yeast cultures on YM medium supplemented with glucose at the late log phase of growth.

### Quantification and Identification of Carotenoid Pigments

The total amount of carotenoids in samples obtained from each yeast species was quantified spectrophotometrically and expressed as  $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight of the yeasts (Table 1). As expected, the yeasts that develop colored colonies in semisolid media showed the highest production of carotenoids. *Dioszegia* sp. (orange) had the highest amount of carotenoids, 195  $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight, followed by *Rh. laryngis* (red) with 87  $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight. *Rh. mucilaginosa* (pale red) and *Cryptococcus gastricus* (pink)

**Table 1** Metabolite production by psychrotolerant yeast species

| Yeast species                      | Carot<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight) | Erg            | Myc            |
|------------------------------------|---|----------------|----------------|
| <i>C. sake</i>                     | 2.8 $\pm$ 0.1                               | 1150 $\pm$ 19  | 156 $\pm$ 3**  |
| <i>Cr. gastricus</i>               | 24.8 $\pm$ 0.8                              | 1337 $\pm$ 8   | 126 $\pm$ 6    |
| <i>Dioszegia</i> sp.               | 193.8 $\pm$ 2.8                             | 1174 $\pm$ 45  | 51 $\pm$ 2*    |
| <i>Le. creatinivora</i>            | 0.13 $\pm$ 0.02                             | 4075 $\pm$ 191 | 242 $\pm$ 11*  |
| <i>Leuconeuospora</i> sp. (T27Cd2) | 5.4 $\pm$ 0.3                               | 1474 $\pm$ 148 | 209 $\pm$ 13** |
| <i>M. robertii</i>                 | 1.5 $\pm$ 0.1                               | 4568 $\pm$ 165 | 108 $\pm$ 5    |
| <i>Mrakia</i> sp.                  | 1.2 $\pm$ 0.1                               | 2127 $\pm$ 109 | 121 $\pm$ 2*   |
| <i>Rh. glacialis</i>               | 4.3 $\pm$ 0.2                               | 827 $\pm$ 29   | 132 $\pm$ 2    |
| <i>Rh. laryngis</i>                | 87.0 $\pm$ 5.3                              | 2448 $\pm$ 90  | 86 $\pm$ 2*    |
| <i>Rh. mucilaginoso</i>            | 56.9 $\pm$ 3.2                              | 2632 $\pm$ 67  | 125 $\pm$ 2    |
| <i>W. anomalus</i>                 | 0.87 $\pm$ 0.02                             | 2232 $\pm$ 76  | 66 $\pm$ 2     |

The average values and standard deviations obtained from three independent cultures are given

Carot total carotenoid pigments, Erg ergosterol, Myc mycosporines quantified in each sample by absorption at 310 nm. All samples absorb at 310 nm

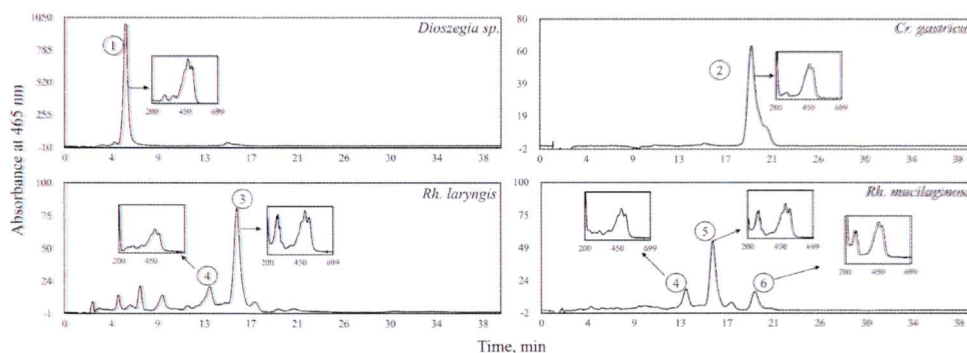
\*, \*\* indicate those that probably contain mycosporines and deoxygadusol, respectively, according to the RP-HPLC and absorbance spectra analyses

produced minor amounts of carotenoids, 57 and 25  $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight, respectively. Carotenoid samples were analyzed by reverse-phase high-pressure liquid chromatography (RP-HPLC); chromatograms and the absorbance spectra of each peak are shown in Fig. 2. No significant peaks were observed in chromatograms of samples from *Le. creatinivora*, *M. robertii*, *W. anomalus*, *C. sake*, *Mrakia* sp., and *Rh. glacialis* (data not shown), suggesting that these species do not produce carotenoids. In samples from *Dioszegia* sp. and *Cr. gastricus*, predominant peaks were observed that, according to their retention time and absorbance spectra, could correspond to OHK torulene and 2- $\gamma$ -carotene, respectively. The main carotenoids detected

in samples from *Rh. laryngis* were torulene and lycopene with 68 and 14 %, respectively. In samples from *Rh. mucilaginoso*, three main peaks could be detected, which were identified as torulene, gamma carotene, and lycopene with 64, 19, and 14 %, respectively.

#### Extraction and Analysis of Mycosporines

The extraction of mycosporines from cell pellets was based on previously described method by Balskus and Walsh [4] and were quantified by their absorbance at 310 nm (Table 1). The yeasts with the higher amounts of mycosporines were *Le. creatinivora* and *Leuconeuospora*



**Fig. 2** RP-HPLC analyses of carotenoid pigments. Representative chromatograms of carotenoid samples extracted from *Dioszegia* sp., *Cr. gastricus*, *Rh. laryngis*, and *Rh. mucilaginoso*. Peaks correspond

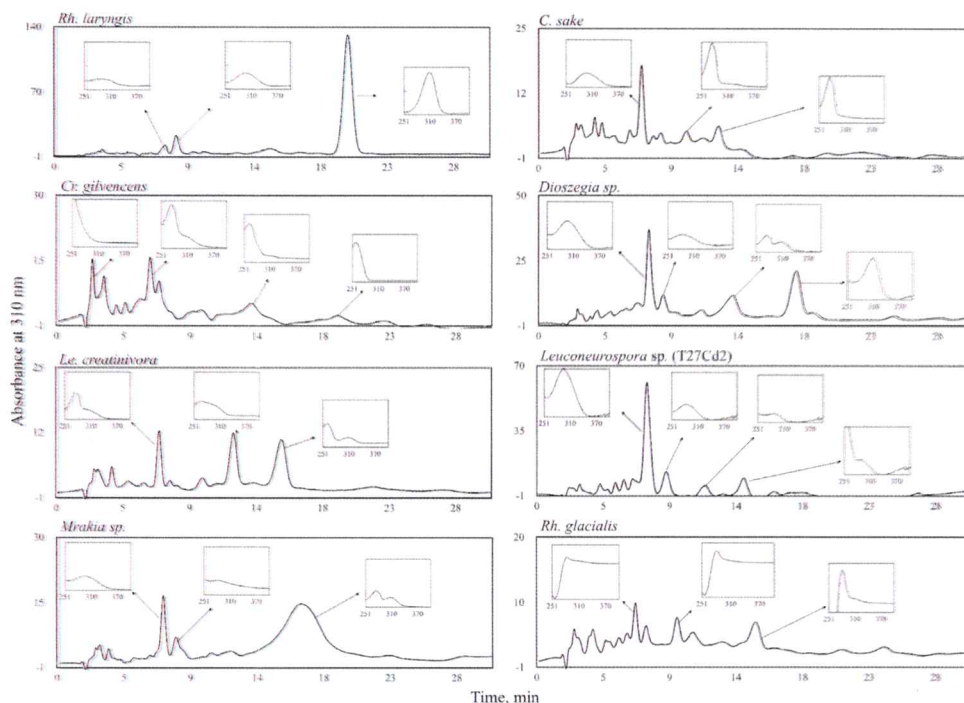
to 1 OHK torulene; 2 gamma carotene; 3 torulene; 4 lycopene; 5 torulene; 6 gamma carotene. The absorbance spectrum of each peak is included in the figure

sp. T27Cd2 and those with the lower amounts were *Rh. laryngis*, *W. anomalus*, and *Dioszegia* sp. The mycosporine samples were also analyzed by RP-HPLC, and chromatograms were recorded at 310 nm to register the absorbance spectrum for each peak (Fig. 3). In samples from *Rh. laryngis* and *Dioszegia* sp., the retention times of the main peaks were centered at 20 and 18 min, respectively. Both showed an absorbance spectrum with a maximum at 309 nm, which is similar to that described for mycosporines; other peaks with minor retention times could correspond to intermediates of the mycosporine biosynthesis. Wide peaks centered at 16 min showed absorbance spectra with maxima at 275 and 309 and 261 and 309 nm in chromatograms of samples from *Mrakia* sp. and *Le. creatinivora*, respectively. In samples from *Leuconurospora* sp. (T27Cd2), *C. sake*, and *Mrakia* sp., peaks with retention times between 7 and 8 min that showed an absorbance spectrum similar to 4-deoxygadusol (maximum at 296 nm in aqueous solution, pH 7) [4] were detected. The peak spectra of the chromatograms of samples from *W.*

*anomalus*, *M. robertii*, and *Rh. mucilaginosa* indicate that these yeast species do not produce mycosporines (not shown), at least under the culture conditions used in this work.

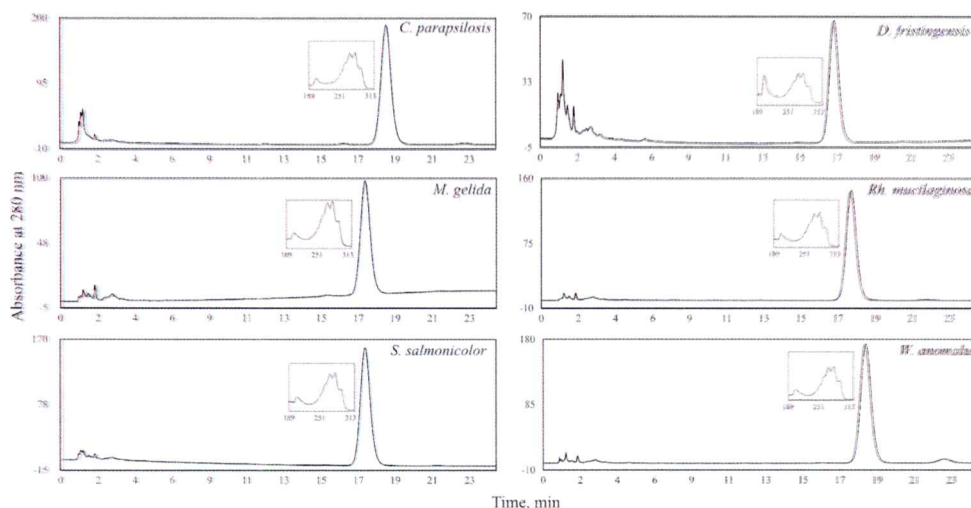
### Sterol Analysis and Identification

Sterols were extracted from yeast pellets, quantified spectrophotometrically at 280 nm, and normalized by the dry weight biomass of each yeast species. As shown in Table 1, the yeasts with the highest content of sterols were *M. robertii* and *Le. creatinivora* (over 4 mg g<sup>-1</sup> dry weight). The sterol content in the yeasts *Cr. gastricus*, *Rh. mucilaginosa*, *Rh. laryngis*, *W. anomalus*, and *Mrakia* sp. varied from 2.1 to 2.8 mg g<sup>-1</sup> dry weight, and the yeasts with the lowest sterol content were *Dioszegia* sp., *Rh. glacialis*, and *C. sake*. In the sterol RP-HPLC analyses, a single peak was observed in all samples that according to the retention time and absorbance spectra corresponded to ergosterol (representative results are shown in Fig. 4).



**Fig. 3** RP-HPLC analyses of mycosporine samples. Representative chromatograms of mycosporine samples extracted from *Rh. laryngis*, *C. sake*, *Cr. gilvencens*, *Dioszegia* sp., *Le. creatinivora*,

*Leuconurospora* sp. (T27Cd2), *Mrakia* sp., and *Rh. glacialis*. The absorbance spectrum of each peak is included in the figure



**Fig. 4** RP-HPLC analyses of sterol samples. Representative chromatograms of sterol samples extracted from *C. parapsilosis*, *D. fristingensis*, *M. gelida*, *Rh. mucilaginosa*, *S. salmonicolor*, and *W. anomalous*. The absorbance spectra of the main peaks are shown

When the yeasts' UV-C tolerance was analyzed in relation to their content of carotenoid pigments, mycosporines, or ergosterol, a clear correlation was not observed. Only carotenoid pigments had a trend where the majority of the species with lower carotenoid content also showed lower tolerances to UV-C radiation. The yeast *Leucosporium* sp. (T27Cd2) is an interesting case, because, despite its higher tolerance to UV-C, it has the lowest amount of carotenoid pigments among the carotenogenic yeasts; however, it had the highest amount of mycosporines, possibly contributing to its tolerance phenotype. In this respect, an inverse relation between the carotenoid and mycosporine content could be observed in the analyzed yeasts; in general, yeasts having the lowest amount of carotenoids had the highest amount of mycosporines and vice versa. This observation is very interesting, as these two types of metabolites have complementary roles in UV tolerance and survival.

## Discussion

The information in the literature about the tolerance of environmental yeasts to UV radiation is rather scarce. A variable resistance against UVB of *Rh. mucilaginosa* strains and a very high resistance of yeasts belonging to the genus *Dioszegia* were described in isolates from lakes of Nahuel Huapi National Park [18], and several species belonging to the *Rhodotorula* genus that were isolated from

different drinking water sources in Portugal showed high resistance to UV [27], which coincides with results obtained by us. There are few data in the current literature about the carotenoid content in the yeast species analyzed in this work. The production of a single pigment, identified as plectanixanthin, was described in epiphytic *Dioszegia* sp. isolated from leaves of *Crataegus* sp. [19] and an unidentified xanthophyll in *Dioszegia* sp. that was isolated from an alpine glacier [2]. Unlike this, the main carotenoid pigment identified in the *Dioszegia* sp. isolate analyzed in this work was OHK torulene. Variable amounts of total carotenoids (from 96 to 243  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) were described in *Rh. mucilaginosa* strains isolated from lakes at the Nahuel Huapi National Park, and the main carotenoids identified were torularhodin, torulene, and  $\beta$ -carotene [25]. The total carotenoids in *Rh. mucilaginosa* strains isolated from shrimp culture ponds and from coastal marine water (Zhanjiang, China) and *Rhodotorula* strain CBS 17 were 171 and 100  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectively, and 75 % from the CBS 17 strain corresponded to  $\beta$ -carotene [28, 38]. This differs from the strain of *Rh. mucilaginosa* analyzed in this work, which produce torulene, gamma carotene, and lycopene. In relation to production of mycosporines, our results are in accordance with previously described reports of yeasts isolated from islands of the Shetland South archipelago, in which the presence of mycosporines was reported in *Rh. laryngis* and *Dioszegia* sp. isolates, and no mycosporines were found in *Rhodotorula glacialis*, *Rh. mucilaginosa*, and *C. sake* species [35]. To the best of our knowledge,

there are no data available in the literature regarding the sterol content of the yeast species analyzed in this work. In a *Sporidiobolus salmonicolor* strain isolated from a soil sample from the river Little Donau (Bratislava), the reported ergosterol content was  $0.38 \text{ mg g}^{-1}$ , and for several *Rhodotorula* species, the content of ergosterol varied from  $0.17$  to  $0.5 \text{ mg g}^{-1}$  [22]. In the culture conditions used in this work, the yeasts *Dioszegia* sp., *M. robertii*, and *Mrakia* sp. were the highest producers of carotenoids, mycosporines, and ergosterol, respectively. Because of their high metabolite production, these yeasts could be good candidates for studies of culture condition optimization in inexpensive media or genetic improvement strategies to enhance the production of these metabolites on a large scale.

Variable tolerances to UV-C radiation were observed among the different yeast species; however, this response is not clearly attributable to any of the metabolites (carotenoids, mycosporines, and ergosterol) studied in this work. The functions of carotenoids in photosynthetic organisms are well known, but are less clear in non-photosynthetic microorganisms, being postulated to act as stress-protecting agents [3]. On the other hand, the role of mycosporines as protective agents against damage induced by UV radiation is well established, but there are also evidences of their protective effect in salt and thermal stresses; moreover, mycosporines are proposed to be an intracellular nitrogen reservoir [26]. In relation to ergosterol, there is evidence of its importance in oxidative stress responses [15, 17] and resistance of membrane lipids to peroxidation [37]. In addition, ergosterol also increases the mechanical resistance of cell plasma membrane to osmotic treatments [11]. For this last property, ergosterol has been postulated to be an important factor for fungal development in solid-air interfacial habitats [12]. While this kind of compounds may contribute to the stress response generated by UV radiation, their level of contribution may be variable between different yeast species studied in this work and may be part of a global adaptive mechanism including other molecular mechanisms that were not analyzed here.

**Acknowledgments** This study was financially supported through FONDECYT Grant 1130333.

**Compliance with Ethical Standards**

**Conflict of interest** No conflict of interest to declare.

## References

- Alcaino J, Baeza M, Cifuentes V (2014) Astaxanthin and related xanthophylls. In: Martín J-F, García-Estrada C, Zeilinger S (eds) Biosynthesis and molecular genetics of fungal secondary metabolites. Springer, New York, pp 187–208
- Amaretti A, Simone M, Quartieri A, Masino F, Raimondi S, Leonardi A, Rossi M (2014) Isolation of carotenoid-producing yeasts from an alpine glacier. *Chem Eng Trans* 38:217–222
- Avalos J, Carmen Limon M (2015) Biological roles of fungal carotenoids. *Curr Genet* 61:309–324
- Balskus EP, Walsh CT (2010) The genetic and molecular basis for sunscreen biosynthesis in cyanobacteria. *Science* 329:1653–1656
- Bandaranayake WM (1998) Mycosporines: are they nature's sunscreens? *Nat Prod Rep* 15:159–172
- Britton G (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J* 9:1551–1558
- Cardozo KH, Guaratini T, Barros MP, Falcao VR, Tonon AP, Lopes NP, Campos S, Torres MA, Souza AO, Colepicolo P, Pinto E (2007) Metabolites from algae with economical impact. *Comp Biochem Phys C* 146:60–78
- Carrasco M, Rozas JM, Barahona S, Alcaino J, Cifuentes V, Baeza M (2012) Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. *BMC Microbiol* 12:251
- Carreto JJ, Carignan MO (2011) Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. Chemical and ecological aspects. *Mar Drugs* 9:387–446
- Daum G, Lees ND, Bard M, Dickson R (1998) Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14:1471–1510
- Dupont S, Beney L, Ferreira T, Gervais P (2011) Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration. *Biochim Biophys Acta* 1808:1520–1528
- Dupont S, Lemetals G, Ferreira T, Cayot P, Gervais P, Beney L (2012) Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land. *Evolution* 66:2961–2968
- Gao Q, Garcia-Pichel F (2011) Microbial ultraviolet sunscreens. *Nat Rev Microbiol* 9:791–802
- Gounot AM (1986) Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. *Experientia* 42:1192–1197
- Higgins VJ, Beckhouse AG, Oliver AD, Rogers PJ, Dawes IW (2003) Yeast genome-wide expression analysis identifies a strong ergosterol and oxidative stress response during the initial stages of an industrial lager fermentation. *Appl Environ Microbiol* 69:4777–4787
- Kirti K, Amita S, Priti S, Jyoti S (2014) Colorful world of microbes: carotenoids and their applications. *Adv Biol* 1–13
- Landolfo S, Zara G, Zara S, Budroni M, Ciani M, Mannazzu I (2010) Oleic acid and ergosterol supplementation mitigates oxidative stress in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol* 141:229–235
- Libkind D, Moline M, Sampaio JP, van Broeck M (2009) Yeasts from high-altitude lakes: influence of UV radiation. *FEMS Microbiol Ecol* 69:353–362
- Madhour A, Anke H, Mucci A, Davoli P, Weber RW (2005) Biosynthesis of the xanthophyll plectanixanthin as a stress response in the red yeast *Dioszegia* (*Tremellales*, *Heterobasidiomycetes*, Fungi). *Phytochemistry* 66:2617–2626
- Margesin R, Miteva V (2011) Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Res Microbiol* 162:346–361
- Margesin R, Neuner G, Storey KB (2007) Cold-loving microbes, plants, and animals-fundamental and applied aspects. *Naturwissenschaften* 94:77–99
- Marova I, Breierova E, Koci R, Friedl Z, Slovak B, Pokorna J (2004) Influence of exogenous stress factors on production of carotenoids by some strains of carotenogenic yeasts. *Ann Microbiol* 54:73–86
- McKenzie RL, Aucamp PJ, Bais AF, Björn LO, Ilyas M (2007) Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochem Photobiol Sci* 6:218–231

24. McKenzie RL, Aucamp PJ, Bais AF, Bjorn LO, Ilyas M, Madronich S (2011) Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation. *Photochem Photobiol Sci* 10:182–198
25. Moline M, Flores MR, Libkind D, Dieguez Mdel C, Farias ME, van Broock M (2010) Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin. *Photochem Photobiol Sci* 9:1145–1151
26. Oren A, Gunde-Cimerman N (2007) Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? *FEMS Microbiol Lett* 269:1–10
27. Pereira VJ, Ricardo J, Galinha R, Benoliel MJ, Barreto Crespo MT (2013) Occurrence and low pressure ultraviolet inactivation of yeasts in real water sources. *Photochem Photobiol Sci* 12:626–630
28. Perrier V, Dubreucq E, Galzy P (1995) Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. *Arch Microbiol* 164:173–179
29. Rastogi RP, Singh SP, Incharonsakdi A, Häder D-P, Sinha RP (2014) Ultraviolet radiation-induced generation of reactive oxygen species, DNA damage and induction of UV-absorbing compounds in the cyanobacterium *Rivularia* sp. HKAR-4. *S Afr J Bot* 90:163–169
30. Ravanat J-L, Douki T, Cadet J (2001) Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B* 63:88–102
31. Robinson CH (2001) Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytol* 151:341–353
32. Shang F, Wen S, Wang X, Tan T (2006) Effect of nitrogen limitation on the ergosterol production by fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* 122:285–292
33. Strzałka K, Kostecka-Gugala A, Latowski D (2003) Carotenoids and environmental stress in plants: significance of carotenoid-mediated modulation of membrane physical properties. *Russ J Plant Physiol* 50:168–173
34. Vandamme EJ (1992) Production of vitamins, coenzymes and related biochemicals by biotechnological processes. *J Chem Technol Biotechnol* 53:313–327
35. Vaz ABM, Rosa LH, Vieira MLA, Garcia VD, Brandao LR, Teixeira LCR, Molinê M, Libkind D, van Broock M, Rosa CA (2011) The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Braz J Microbiol* 42:937–947
36. Venkateswarlu K, Kelly DE, Manning NJ, Kelly SL (1998) NADPH cytochrome P-450 oxidoreductase and susceptibility to ketoconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 42:1756–1761
37. Wiseman H (1993) Vitamin D is a membrane antioxidant. Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. *FEBS Lett* 326:285–288
38. Yang SP, Wu ZH, Jian JC (2011) Distribution of marine red yeasts in shrimps and the environments of shrimp culture. *Curr Microbiol* 62:1638–1642
39. Zou X (2006) Fed-batch fermentation for hyperproduction of polysaccharide and ergosterol by medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis*. *Process Biochem* 41:970–974