



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

**“Identificación y análisis de enzimas comúnmente expresadas en  
levaduras antárticas”**

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

**Vicente Andrés Peragallo Papic**

Director del Seminario de Título: Dr. Marcelo Baeza

Mayo 2020

Santiago - Chile

## BIOGRAFÍA



Vicente Peragallo Papic nació el 27 de Julio de 1996 en Santiago de Chile. Durante su infancia vivió en Calera de Tango junto a su madre, padre y hermana menor. Asistió al colegio San Felipe Diácono hasta sus 10 años de edad, cuando se muda con su familia a la comuna de Las Condes, donde nace su segunda hermana menor. Asiste al colegio Redland School, donde se gradúa de cuarto medio el año 2014. El año 2015 entra a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile. Durante los años 2018 y 2019 realiza dos Unidades de Investigación en el laboratorio de Genética de la misma universidad bajo la tutela del Dr. Marcelo Baeza, donde además llevó a cabo su Seminario de Título el segundo semestre del año 2019.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
1) Identificación de enzimas expresadas en las levaduras:.....	13
2) Predicción de presencia o ausencia de péptido señal de exportación en el extremo N-terminal en las secuencias seleccionadas:.....	13
3) Predicción de localización subcelular de las enzimas seleccionadas:.....	13
4) Predicción de residuos flexibles en las enzimas seleccionadas:.....	14
5) Crear modelos 3D de cada enzima:.....	15
6) Predicción del volumen del sitio activo de cada modelo 3D:.....	16
7) Optimización de las secuencias para síntesis:.....	16
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>17</b>
<b>Encontrar enzimas de estudio por medio del análisis del transcriptoma de 8 levaduras antárticas:.....</b>	<b>17</b>
<b>Optimizar las secuencias codificantes de las enzimas seleccionadas:.....</b>	<b>19</b>
Péptidos señal de exportación encontrados en las secuencias codificantes, sitios de restricción y optimización de codones:.....	19
<b>Analizar la secuencia y estructura de las enzimas seleccionadas con herramientas bioinformáticas:.....</b>	<b>20</b>
Predicción de la localización subcelular de las enzimas en estudio:.....	20
Grupos de residuos flexibles en las enzimas de estudio:.....	21
Volumen del sitio activo de las enzimas en estudio:.....	26
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>31</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>37</b>
<b>MATERIAL COMPLEMENTARIO.....</b>	<b>40</b>
<b>Sección 1: Secuencias optimizadas para síntesis:.....</b>	<b>40</b>
Alcohol deshidrogenasa:.....	40
Beta-Glucosidasa:.....	43
Glucoamilasa:.....	47
<b>Sección 2: Gráficos de flexibilidad estructural:.....</b>	<b>48</b>
Alcohol deshidrogenasa:.....	48
Beta-Glucosidasa:.....	52
Glucoamilasa:.....	57
<b>Sección 3: Gráficos de Verify3D.....</b>	<b>58</b>
Alcohol Deshidrogenasa:.....	58
Beta-Glucosidasa:.....	61
Glucoamilasa:.....	63

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> .....	<b>19</b>
<b>Tabla 2</b> .....	<b>20</b>
<b>Tabla 3</b> .....	<b>21</b>
<b>Tabla 5</b> .....	<b>25</b>
<b>Tabla 6</b> .....	<b>25</b>
<b>Tabla 7</b> .....	<b>27</b>
<b>Tabla 8</b> .....	<b>27</b>
<b>Tabla 9</b> .....	<b>28</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	23
Figura 2.....	24
Figura 3.....	26
Figura 4 .....	29
Figura 5 .....	30

## LISTA DE ABREVIATURAS

-°C: Grados Celcius

-Å: Angstrom

-BLAST: Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local

-ORF: Marco de Lectura Abierto

-NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica

-IC: Índice de Confianza

-G.L: Grados de libertad

-V.C: Valor crítico

- $\chi^2$ : Chi cuadrado

## RESUMEN

Durante las últimas décadas se ha puesto atención en los microorganismos que habitan ecosistemas con temperaturas permanentes bajo los 5°C, ya que surgen preguntas sobre cómo han evolucionado para adaptarse a estos hábitats, además de presentar un gran potencial para la industria biotecnológica. La evidencia indica que estos microorganismos presentan enzimas adaptadas al frío, las cuales han adquirido ciertas cualidades estructurales que les permiten realizar reacciones químicas a bajas temperaturas, sacrificando su termoestabilidad estructural. Sin embargo, existen casos donde estas modificaciones no están presentes, por lo que existe la duda de si son adaptaciones transversales a todos los microorganismos adaptados al frío o son especie dependientes.

El objetivo principal de este trabajo es comparar y analizar enzimas expresadas en levaduras antárticas, las cuales fueron aisladas de la misma zona subantártica (Isla Rey Jorge) y presentan distintas temperaturas óptimas de crecimiento, por lo que son un buen modelo de estudio para determinar si las adaptaciones al frío son una característica transversal a estas levaduras o si varían dependiendo de la especie.

Se comenzó analizando los transcriptomas ensamblados de las levaduras *Cryptococcus sp.*, *Mrakia gelida*, *Vishniacozyma victoriae*, *Phenoliferia glacialis*, *Tetracladium sp.*, *Candida sake*, *Leucosporidium creatinivorum* y *Wickerhamomyces anomalus*, obteniendo marcos de lectura abiertos, los cuales se identificaron por BLAST. Se encontraron nueve enzimas: alcohol deshidrogenasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, amilasa, isocitrato deshidrogenasa, celulasa, invertasa, proteinasa K y fosfatasa ácida. Se decidió seguir con la beta-glucosidasa y la alcohol deshidrogenasa debido a que se encontraban expresadas en las ocho levaduras, además de una

glucoamilasa de la levadura *Tetracladium sp.* descrita en estudios anteriores. Utilizando el programa online Philius se buscaron péptidos señal, encontrando uno en el caso de la alcohol deshidrogenasa, uno en la beta-glucosidasa y uno en la glucoamilasa, los cuales fueron removidos. También se determinó la localización subcelular con el programa Euk-mPLoc 2.0 para cada enzima, siendo el citoplasma y la mitocondria para la alcohol deshidrogenasa, el citoplasma y espacio extracelular para la beta-glucosidasa y el espacio extracelular para la glucoamilasa. Por medio del programa PredyFlexy se obtuvo los residuos flexibles en la estructura de cada enzima y se tabularon. Utilizando el programa Swiss-model e I-TASSER se construyeron modelos tridimensionales de cada enzima para analizar el sitio activo en términos de su volumen por medio del programa UCSF Chimera. Para la alcohol deshidrogenasa se obtuvo un volumen del sitio activo de en promedio  $346,15 \text{ \AA}^3$  con Swiss-Model y  $614,43 \text{ \AA}^3$  con I-TASSER, respectivamente. En el caso de la beta-glucosidasa el volumen del sitio activo en promedio fue de  $315,82 \text{ \AA}^3$  con Swiss-Model y  $406,25 \text{ \AA}^3$  con I-TASSER, respectivamente. Para la glucoamilasa el volumen fue  $323,87 \text{ \AA}^3$  con Swiss-Model y  $380,39 \text{ \AA}^3$  con I-TASSER, respectivamente. Por último se envió a sintetizar las secuencias codificantes de cada enzima, donde se optimizó los codones para la posterior expresión en *Pichia pastoris* y se agregaron sitios de restricción a los extremos.

## ABSTRACT

During the past few decades, there has been a high interest in microorganisms inhabiting ecosystems with constant temperatures below 5°C, to know about their adaptation to these environments, and by their great biotechnological potential. The enzymes of these microorganisms have a set of structural adaptations that allows them to perform chemical reactions in low temperature environments, sacrificing their thermostability. However, there are not enough examples to assert these adaptations are found across all cold-adapted microorganisms or if it is a species-dependent feature, besides, the majority of studies have been performed on bacterial enzymes.

The main objective of this work is to compare and analyze commonly expressed enzymes from antarctic yeasts that were isolated from the same sub-antarctic region (King George Island), and show different optimal growth temperature, being a suitable model to determine if cold-adaptation features occur along every cold-adapted yeast or if it happens in a species-dependent manner.

The transcriptomes of the yeasts species *Cryptococcus sp.*, *Mrakia gelida*, *Vishniacozyma victoriae*, *Phenoliferia glacialis*, *Tetracladium sp.*, *Candida sake*, *Leucosporidium creatinivorum* and *Wickerhamomyces anomalus* were analyzed, and the obtained open reading frames were identified using BLAST tool. Nine enzymes were found: alcohol dehydrogenase, alpha-glucosidase, beta-glucosidase, amylase, isocitrate dehydrogenase, cellulase, invertase, proteinase K and acid phosphatase. The alcohol dehydrogenase and beta-glucosidase were chosen for this work as they are expressed in all eight yeasts, along with a glucoamylase from *Tetracladium sp.* described in previous studies. Signal peptides were identified using the online software

Philius, finding one in the case of alcohol dehydrogenase, one in beta-glucosidase and one in glucoamylase, which were removed. The subcellular location of every sequence

was determined using the online software Euk-mPLoc 2.0, being the cytoplasm and mitochondria the most common locations for the alcohol dehydrogenase, cytoplasm and extracellular space for the beta-glucosidase and the extracellular space for the glucoamylase. The flexible amino acids of each enzyme were determined by the online software PredyFlexy. 3D models of each enzyme were created using Swiss-Model and I-TASSER and the active site was analyzed in terms of its volume using the software UCSF Chimera. For the alcohol dehydrogenase, the mean volume of the active site using Swiss-Model was 346,15 Å<sup>3</sup>, while using I-TASSER was 614,43 Å<sup>3</sup>, respectively. For the beta-glucosidase, the mean volume of the active site using Swiss-Model was 315,82 Å<sup>3</sup>, while using I-TASSER was 406,25 Å<sup>3</sup>, respectively. For the glucoamylase, the volume of the active site using Swiss-Model was 323,87 Å<sup>3</sup>, while using I-TASSER was 380,39 Å<sup>3</sup>, respectively. Ultimately, the coding sequences were sent to GeneUniversal for synthesis, where codon optimization was performed for heterologous expression in the yeast *Pichia pastoris* and restriction sites were added on each end of every sequence.

## INTRODUCCIÓN

La mayor parte de los ecosistemas del planeta están expuestos a temperaturas bajo los 5°C, si contamos los polos, montañas altas, glaciares y el fondo de los océanos tenemos que aproximadamente el 80% de la Tierra se encuentra bajo estas condiciones (Feller y Gerday, 2003; Baeza y col., 2019). Los microorganismos son los primeros colonizadores en cualquier hábitat terrestre (Vincent, 2000) por lo que no es sorpresa que hayan logrado establecerse en ambientes extremos como los anteriormente mencionados. Durante la última década ha habido un aumento de estudios sobre microorganismos adaptados al frío obtenidos de muestras de todo el mundo, debido principalmente al creciente interés que han generado tanto por sus adaptaciones evolutivas a estos hábitats como por su potencial biotecnológico (Baeza y col., 2019). Dentro de estos microorganismos se pueden encontrar bacterias, arqueas, hongos (incluido levaduras), microalgas y protozoos (Vincent, 2000; Feller y Gerday, 2003). Estos microorganismos adaptados al frío se pueden agrupar en dos categorías dependiendo de su capacidad de crecer a estas temperaturas. Los organismos psicrófilos son aquellos que tienen una temperatura óptima de crecimiento igual o menor a 15°C, pudiendo vivir incluso a temperaturas bajo 0°C. Sin embargo no son capaces de desarrollarse a temperaturas mayores a los 20°C. Este tipo de estrategia permite la prevalencia en ambientes permanentemente fríos, como grandes altitudes, fondo del océano y algunas zonas de los polos, pero restringe el rango de temperaturas a las cuales pueden crecer estos organismos. Por otro lado están los psicrotolerantes, que presentan mejor crecimiento a temperaturas sobre los 20°C, pero pueden desarrollarse a temperaturas bajo los 15°C. Este tipo de adaptación les permite

crecer en un espectro más amplio de temperaturas, y son predominantes en ecosistemas con periodos de frío que varían a lo largo del año, como es el caso de algunos lugares de los polos (Shivaji y Pasad, 2009). Ambos tipos de microorganismos conviven en ambientes extremos para la mayoría de la vida como la conocemos en el planeta, cumpliendo roles importantes dentro de sus ecosistemas. Los microorganismos son las primeras formas de vida en colonizar nuevos hábitats, reciclan macro y micro nutrientes esenciales, contribuyen a la biomasa y energía al inicio de las cadenas alimenticias, entre otras (Vincent, 2000).

A pesar de representar el componente predominante de biomasa en ecosistemas fríos, como la Antártica, y los roles esenciales que cumplen en ellos, poco se sabe sobre cómo llegaron ahí. El caso de la Antártica es particular porque es un lugar relativamente aislado del resto del planeta desde su separación de Gondwana y la formación del Frente Polar hace aproximadamente diez millones de años atrás (Vincent, 2000). A pesar del aislamiento de este continente, se han propuesto diversas maneras en que se podría estar generando un intercambio de microorganismos entre diversas partes del mundo y la Antártica, como la circulación atmosférica o circulación eólica, corrientes marinas, animales migratorios y humanos (Vincent, 2000). Además, existe evidencia que indica que este intercambio de microorganismos ha estado ocurriendo desde hace cientos de miles de años, ya que se han encontrado microorganismos viables a profundidades de más de tres kilómetros en el hielo sobre el Lago Vostok (Vincent, 2000; Poglavova, 2001).

Sin duda los microorganismos han estado presentes en la Antártica hace miles de años, y el hecho de que se hayan encontrado una gran variedad de cepas tanto cultivables como por métodos cultivo-independientes de procariontes y eucariontes implica que han sido capaces de evolucionar y adaptarse a las distintas condiciones adversas que

presenta este continente. Temperaturas constantes bajo los 5°C implica que muchos procesos fisiológicos que llevaría a cabo un microorganismos mesófilo se verían afectados enormemente. Algunas estructuras altamente afectadas por bajas temperaturas son la membrana plasmática y las proteínas, por lo que procesos como el transporte de nutrientes y sustancias de desecho, plegamiento de proteínas y catálisis enzimática se dificultan al punto de hacer la vida inviable. En este contexto, los microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes han desarrollado estrategias como aumentar la fluidez de la membrana celular, producción de proteínas anticongelantes y sustancias crioprotectoras, respuestas “cold-shock”, optimización de los procesos de transcripción y traducción y producción de enzimas adaptadas al frío (D’Amico y col., 2006).

La fluidez de la membrana celular se puede regular de varias maneras, las cuales implican modificar la estructura de una fracción de los fosfolípidos que la componen. Por lo general estas modificaciones conciernen cadenas de ácidos grasos insaturados, poliinsaturados, ramificaciones con grupos metilo y/o cadenas más cortas (D’Amico y col., 2006). Algunas adaptaciones menos comunes pueden ser la presencia de proteínas o carotenoides hidrofóbicos en la membrana plasmática. Todas estas modificaciones promueven la fluidez de la membrana celular, permitiendo que el transporte a través de esta mediado por proteínas de membrana sea posible.

La formación de cristales de hielo dentro de células y/o órganos es uno de los problemas que han tenido que enfrentar organismos uni y pluricelulares psicrófilos/psicrotolerantes para poder adaptarse a sus ecosistemas. La evolución de proteínas anticongelantes han permitido que estos organismos puedan vivir en ambientes donde la temperatura está bajo el punto de congelación del agua. Estas proteínas se unen a los cristales de hielo por medio de una gran superficie complementaria, evitando que el agua en contacto con

el hielo se una a este y el cristal crezca (Jia y Davies, 2002; D'Amico y col., 2006). Además, ciertos microorganismos producen polisacáridos y exopolisacáridos, los cuales se cree que tienen un importante rol crioprotector en psicrófilos/psicrotolerantes. Los exopolisacáridos permiten a los microorganismos modificar su ambiente externo evitando el congelamiento del agua y al mismo tiempo reteniéndola, protegen y retienen a las enzimas secretadas por estas células de las condiciones ambientales, ayuda a la concentración y retención de nutrientes, etc (D'Amico y col., 2006).

La respuesta "cold-shock" ha sido ampliamente estudiada en microorganismos mesófilos como *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* y se han identificado proteínas y genes clave para la supervivencia a bajas temperaturas, los cuales están principalmente relacionados con la maquinaria transcripcional, traduccional y mantención de la membrana plasmática (Phadtare y col., 1999; Inouye y Phadtare, 2014) . En el caso de las levaduras, presentan una respuesta moderada (respecto al aumento del nivel de transcritos) a disminuciones de temperatura hasta los 10°C aprox., la cual se divide en tres etapas: temprana, media y tardía. En las etapas temprana y media aumenta la expresión de proteínas relacionadas a la transcripción y traducción, mientras que en la tardía entran en juego genes ligados a respuesta a estrés, vías metabólicas y transducción de señales (Inouye y Phadtare, 2014). Cuando las levaduras son sometidas a temperaturas cerca del punto de congelación del agua (<10°C) aumenta la síntesis de compuestos y proteínas crioprotectoras, como trehalosa, glicerol y proteínas de shock térmico (Inouye y Phadtare, 2014). La principal diferencia que se ha visto en esta respuesta entre microorganismos mesófilos y adaptados al frío es la persistencia en la expresión de proteínas de shock térmico y genes "housekeeping" en el caso de microorganismos psicrófilos/psicrotolerantes por periodos extensos de tiempo expuestos a estas condiciones (Phadtare y col., 1999; D'Amico y col., 2006).

Algunas de las proteínas de shock térmico mencionadas anteriormente tienen función de chaperonas, cumpliendo roles fundamentales en la transcripción y traducción a bajas temperaturas al evitar que se formen estructuras secundarias en los mRNA que dificulten la traducción de este en el ribosoma, o ayudando a plegar proteínas de manera correcta. Como a bajas temperaturas las reacciones químicas ocurren de manera más lenta, las enzimas involucradas en los procesos de transcripción y traducción también se ven afectadas. Sin embargo, se han detectado algunas estrategias para sobrellevar estos inconvenientes, como la sobreexpresión de ciertas enzimas involucradas en estos procesos y la incorporación de adaptaciones que les permitirían tener mayor actividad a bajas temperaturas respecto a sus contrapartes mesófilas (D'Amico y col., 2006; Inouye y Phadtare, 2014).

Como se mencionó en el párrafo anterior, la temperatura a la que están expuestos los microorganismos adaptados al frío genera problemas al momento de llevar a cabo reacciones químicas vitales para sus procesos fisiológicos, debido a que la velocidad de las reacciones disminuye (Feller y Gerday, 2003). Las reacciones químicas son realizadas principalmente por enzimas, las cuales son altamente sensibles a la temperatura. Es por esto que las enzimas adaptadas al frío presentan una serie de adaptaciones estructurales y bioquímicas que les permiten ser útiles en el ambiente al que están expuestas. Quizás las características que más resaltan en las enzimas adaptadas al frío son su mayor flexibilidad estructural y su elevada actividad a bajas temperaturas (Feller y Gerday, 2003). En el caso de la flexibilidad estructural, esta ayuda a promover el movimiento de la estructura proteica en condiciones donde las bajas temperaturas tienden a rigidizarla (D'Amico y col., 2006). Se ha visto que la sustitución de ciertos residuos puede generar un cambio en la flexibilidad, principalmente por el tamaño de la cadena lateral de estos o las interacciones que pueden generar con

residuos cercanos. Por ejemplo, en una diene lactona hidrolasa proveniente de la levadura adaptada al frío *Glaciozyma antarctica* (Hashim y col., 2018) se identificaron múltiples características pertenecientes a una enzima psicrófila comparándola con la enzima homóloga de la bacteria mesófila *Klebsiella pneumoniae*. Una de estas características son una disminuida cantidad de interacciones electrostáticas, como puentes de hidrógeno, interacciones aromáticas y puentes salinos. Todas estas interacciones estabilizan a la enzima, por lo que una disminución en el número de ellas (de 188 a 124 en el caso de *K. pneumoniae* y *G. antarctica*, respectivamente) la vuelve menos rígida. Esta misma cualidad se observa en una fosfoglicerato quinasa de una *Pseudomonas sp.* antártica (Bentahir y col., 2000), la cual fue comparada en términos de puentes iónicos e interacciones aromáticas con la enzima homóloga de levadura, *Trypanosoma brucei*, *Bacillus stearothermophilus* y *Thermotoga maritima*, donde la enzima psicrófila posee en total 11, mientras que la enzima de levadura 22, *T. brucei* 23, *B. stearothermophilus* 35 y *T. maritima* 29.

Otra característica es la disminución de interacciones apolares, como se ve en la enzima psicrófila de *G. antarctica*, la cual posee 158 interacciones apolares comparado con las 240 de la enzima homóloga de *K. pneumoniae*. Las interacciones apolares tienden a generar rigidez y estabilidad en las zonas menos accesibles para el solvente en la proteína, por lo que una disminución de ellas tiene como consecuencia una estructura menos rígida (Hashim y col., 2018).

Existen residuos específicos que afectan la rigidez de una enzima, como la glicina, la prolina y la arginina (Bentahir y col., 2000; Lonhienne y col., 2001; Hashim y col., 2018). La glicina al ser un aminoácido cuya cadena lateral es un hidrógeno, tiene una gran libertad conformacional en una estructura proteica, otorgando más grados de libertad para el movimiento de la cadena principal. En el caso de la diene lactona hidrolasa de *G.*

*antarctica*, se observó que un total de 18 residuos fueron reemplazados por glicina al comparar esta enzima con su homóloga mesófila. Algunos de los residuos sustituidos en la enzima mesófila fueron asparagina, prolina, triptófano y tirosina, los cuales poseen cadenas laterales más voluminosas. Este ejemplo lo complementa el caso de una quitobiasa proveniente de una cepa antártica de *Arthrobacter* sp. (Lonhienne y col., 2001) en la cual se identificaron tres dobletes de glicina que están ausentes en la enzima homóloga proveniente de *Serratia marcescens*, la contraparte mesófila que utilizaron como comparación. Además, esta enzima carece de dos puentes disulfuro presentes en la quitobiasa de *S. marcescens*. Si consideramos el caso de la cadena lateral del aminoácido arginina, es capaz de formar hasta 5 interacciones electrostáticas con moléculas circundantes, por lo que se cree que su presencia ayuda a estabilizar la estructura proteica en caso de cumplir un rol estructural (Bentahir y col., 2000; Lonhienne y col., 2001). La fosfoglicerato quinasa de *Pseudomonas* sp. presenta al menos tres argininas menos en su estructura que las fosfoglicerato quinasa homóloga de los otros microorganismos que se utilizaron como comparación, mientras que la quitobiasa de *Arthrobacter* sp. tiene 14 argininas menos que la quitobiasa de su contraparte mesófila. En el caso de la prolina, tiene una cadena lateral que restringe la rotación de la cadena principal en los loops de la estructura, volviéndola más rígida (Shiddiqui y Cavicchioli, 2006). En la diene lactona hidrolasa de *G. antarctica* se observó cuatro sustituciones de prolinas ubicadas en loops de esta enzima.

Otra característica importante que presentan las enzimas adaptadas al frío es su alta actividad a bajas temperaturas (Feller y Gerday, 2003; D'Amico y col., 2006), aunque no se puede hablar de este tema sin mencionar la flexibilidad estructural característica de estas enzimas. Se cree que la flexibilidad exhibida por estas enzimas puede ser general o acotada a ciertas partes de la proteína, como a ciertos segmentos involucrados en la

catálisis (D'Amico y col., 2006), lo que explicaría la baja afinidad que por lo general muestran estas enzimas por el sustrato respecto de sus contrapartes mesófilas, ya que al ser menos estable el sitio de unión a sustrato, este se une con menos afinidad. De hecho, es aceptada la hipótesis de que se sacrifica la afinidad hacia el sustrato por una mayor actividad catalítica (Feller y Gerday, 2003). La alta actividad catalítica a bajas temperaturas de estas enzimas puede tener varias explicaciones, pero por lo general implica la modificación del sitio activo o sus alrededores. Una característica interesante es la baja energía de activación que requieren sobrepasar estas enzimas para llevar a cabo su reacción comparado con enzimas mesófilas o termófilas (D'Amico y col., 2006). Esto gracias a la disminuida cantidad de interacciones intermoleculares presentes en la estructura proteica que deben modificarse o romperse para que la reacción se realice. Una de las maneras de lograr mayor flexibilidad en el sitio activo o en el dominio catalítico es por medio de modificaciones estructurales (Feller y Gerday, 2003), como la sustitución de residuos voluminosos por otros de cadena más corta, como la glicina mencionada anteriormente. Este es el caso de la quitobiasa y diene lactona hidrolasa ejemplificadas previamente, en las cuales se encontraron agrupaciones de glicina en segmentos cercanos al sitio activo, aumentando la flexibilidad de este. En la quitobiasa de *Arthrobacter* sp. también se identificó la ausencia de dos puentes disulfuro en su dominio catalítico, los cuales sí están presentes en la quitobiasa de *S. marcescens*. La presencia de residuos menos voluminosos en segmentos catalíticos no solo otorga mayor flexibilidad a la estructura en sí, sino que además puede facilitar el acceso al sitio activo por parte del sustrato (Feller y Gerday, 2003; Hashim y col., 2018) y la salida de los productos de la reacción que se lleve a cabo. Esta misma ventaja se logra por un aumento de tamaño de la cavidad del sitio activo al tener cadenas laterales más pequeñas dentro de este.

La mayor flexibilidad predicha en el dominio catalítico o directamente en el sitio activo de las enzimas adaptadas al frío se ha podido observar experimentalmente hasta cierto punto, arrojando nuevas características que las distinguen de sus contrapartes mesófilas y termófilas. Este es el caso de la relación que existe entre la temperatura de desplegamiento y la temperatura de inactivación de estas enzimas, donde se ha observado que la actividad se pierde en gran medida antes de que la proteína se comience a desplegar (Feller & Gerday, 2003), indicando que al haber un aumento de temperatura en el medio en el cual se está llevando a cabo la reacción, el sitio activo pierde parcial o completamente su conformación antes que el resto de la estructura proteica. En (Bentahir y col., 2000) se puede observar la cinética de desplegamiento de la fosfoglicerato quinasa de *Pseudomonas* sp., donde se distinguen dos dominios, uno termolábil y uno termoestable comparado con la misma enzima mesófila de levadura que muestra un desplegamiento en una sola etapa. Los autores atribuyen esta adaptación a la mayor capacidad catalítica a bajas temperaturas que presenta esta enzima comparada con la de levadura, mientras que el dominio termoestable no se ve afectado por estas adaptaciones. Este mismo caso se observa en (Lonhienne y col., 2001) con la quitobiasa de *Arthrobacter* sp., la cual también presenta dos dominios con termoestabilidad distinta, siendo el dominio catalítico el más termolábil. Además, la enzima psicrófila se inactiva luego de 15 minutos al estar a 40°C, mientras que su desplegamiento comienza a los 45°C, indicando que el sitio activo es más inestable que el resto de su estructura. Otro ejemplo se puede ver en (Berg y col., 2019) en donde caracterizan tres DNA ligasas pertenecientes a *Psychromonas* sp., *Aliivibrio salmonicida* y *Pseudoalteromonas artica*. En estas tres enzimas es posible notar una disminución de la actividad a temperaturas donde todavía hay ausencia de desplegamiento. Sin embargo, es importante mencionar que las DNA ligasas de *Psychromonas* sp. y *Pseudoalteromonas artica* mostraron una

temperatura de máxima actividad en el rango de 35-40°C y una temperatura de desplegamiento superior a 45°C, por lo que no presentan un comportamiento que indique una adaptación a climas fríos. En (Carrasco y col., 2017) también hay un caso similar, donde se aísla una glucoamilasa extracelular de la levadura antártica *Tetracladium* sp., la cual presenta una temperatura de máxima actividad en el intervalo de 30 a 45°C, reteniendo un 55 y 25% de actividad a los 22 y 4°C respectivamente. En otro estudio con una pectinasa extracelular de la misma levadura (Carrasco y col., 2019), se determinó que la máxima actividad se lograba a los 15°C, por lo que se puede ver la inconsecuencia entre las adaptaciones presentadas por dos enzimas del mismo microorganismo adaptado al frío. Una posible razón para que ciertas enzimas presenten una temperatura de máxima actividad por sobre la temperatura de supervivencia de su microorganismo es que si bien no se encuentra en las condiciones ideales para realizar la catálisis, una actividad reducida sigue siendo suficiente para la supervivencia del microorganismo (Berg y col., 2019), por lo que no existe una presión selectiva para que ocurran más adaptaciones. Otra posible explicación es que algunas enzimas adaptadas al frío ya han logrado el estado más inestable posible, por lo que no pueden seguir ocurriendo cambios en su estructura sin perder las características propias de su plegamiento y funcionamiento (Feller & Gerday, 2003).

Si bien la mayor parte de la evidencia existente hasta hoy en día sugiere que la evolución ha encaminado las adaptaciones de las enzimas a climas fríos a modificar la flexibilidad y actividad de estas, al mismo tiempo surgen estudios que sugieren una heterogeneidad en la presencia de estas mismas adaptaciones. Además, como menciona (D'Amico y col., 2006), intentos por encontrar adaptaciones específicas al frío por medio de la comparación de proteínas de organismos psicrófilos, mesófilos y termófilos han arrojado resultados ambiguos. Una posible explicación para esto es que los microorganismos que

viven en estos hábitats están expuestos a muchos otros factores ambientales, como alta radiación UV, baja cantidad de agua, baja concentración de nutrientes, entre otros (Shivaji & Prasad, 2009; Baeza y col., 2019). Algunos de estos factores podrían presentar un desafío mayor para la supervivencia que las bajas temperaturas, por lo que las adaptaciones presentes en ciertos microorganismos pueden estar dirigidas a sortear estas complicaciones más que los efectos que pueda tener la temperatura sobre las enzimas. Además, como se mencionó anteriormente, estas adaptaciones pueden no ser necesarias en el caso de que el microorganismo pueda crecer de todas maneras a bajas temperaturas.

Es debido a estas observaciones que en el presente trabajo se ha decidido investigar la posibilidad de que estas adaptaciones no sean transversales a todos los microorganismos adaptados al frío, sino que sean características especie específicas.

**Objetivo General:** Identificar y analizar enzimas comúnmente expresadas en levaduras antárticas. Estas levaduras fueron aisladas de la isla subantártica Rey Jorge y presentan temperaturas de crecimiento óptimo desde los 10 a los 22°C, lo que las vuelve buenas candidatas para probar la idea planteada en el párrafo anterior, ya que preliminarmente estas levaduras presentan diferencias en sus adaptaciones al frío siendo que todas habitan la misma isla, lo que se espera que se vea en sus enzimas.

**Objetivos específicos:**

- Encontrar enzimas de estudio por medio del análisis del transcriptoma de 8 levaduras antárticas.
- Optimizar las secuencias codificantes de las enzimas seleccionadas.
- Analizar la secuencia y estructura de las enzimas seleccionadas con herramientas bioinformáticas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1) Identificación de enzimas expresadas en las levaduras:**

Para la identificación de enzimas de interés que estuvieran expresadas en las levaduras en estudio se utilizaron los ORFs traducidos obtenidos del transcriptoma ensamblado de estos microorganismos. Se utilizó la herramienta BLAST para determinar a qué proteína correspondía cada ORF. Primero se utilizó una base de datos local de proteínas de hongos para anotar cada ORF. Se hizo una selección preliminar de enzimas candidatas, cuyas secuencias aminoacídicas se sometieron a un segundo BLAST utilizando la base de datos no redundante de NCBI. En ambos BLAST se eligió el resultado con mayor porcentaje de cobertura y con un porcentaje de identidad mayor a 30%.

### **2) Predicción de presencia o ausencia de péptido señal de exportación en el extremo N-terminal en las secuencias seleccionadas:**

Las secuencias aminoacídicas seleccionadas en formato FASTA se analizaron utilizando el software online Philius (<http://www.yeastrc.org/philius/pages/philius/runPhilius.jsp>). En el caso de existir un péptido señal en la secuencia, los resultados indicaron el inicio y término de este.

### **3) Predicción de localización subcelular de las enzimas seleccionadas:**

Las secuencias aminoacídicas seleccionadas en formato FASTA se analizaron utilizando el software online Euk-mPLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2/>). Se le asignó la localización subcelular que se obtuvo como resultado del

análisis a cada enzima y según esto se clasificaron como intracelulares o extracelulares.

#### **4) Predicción de residuos flexibles en las enzimas seleccionadas:**

Las secuencias aminoacídicas seleccionadas en formato FASTA se analizaron utilizando el software online PredyFlexy ([https://www.dsimb.inserm.fr/dsimb\\_tools/predyflexy/](https://www.dsimb.inserm.fr/dsimb_tools/predyflexy/)), obteniendo una lista completa de la flexibilidad de cada residuo en la secuencia.

El programa PredyFlexy se basa en información estructural obtenida de un PSI-BLAST realizado a la secuencia ingresada, y una biblioteca estructural compuesta de 120 conjuntos de secuencias agrupadas por su estructura local, cada uno representado por un prototipo estructural de 11 residuos de largo, para realizar una predicción de la estructura secundaria y terciaria de la enzima que se desea evaluar.

La secuencia en cuestión es dividida en segmentos de 11 residuos, los cuales son evaluados por 120 máquinas de vectores de soporte (un conjunto de algoritmos de aprendizaje) asignadas a cada uno de los conjuntos estructurales.

Cada algoritmo entrega un puntaje basado en la probabilidad de que el fragmento de la secuencia ingresada pertenezca al conjunto estructural asignado por ese algoritmo. Los 120 puntajes son ordenados de mayor a menor y los cinco prototipos estructurales pertenecientes a los conjuntos con los cinco mejores puntajes son propuestos como candidatos para representar estructuralmente al fragmento de la secuencia estudiada.

Cada prototipo estructural de 11 residuos de largo está caracterizado según su B-factor normalizado asociado a sus carbonos alfa, obtenido de experimentos de rayos X y la fluctuación de la media cuadrática normalizada de sus carbonos alfa obtenida de simulaciones de dinámica molecular para asignarles una clase de flexibilidad (rígido, intermedio, flexible) obtenida mediante la calibración de umbrales compuestos por el B-factor normalizado y la fluctuación de la media cuadrática normalizada. La flexibilidad del

segmento de 11 residuos de la enzima estudiada es obtenida del promedio de la flexibilidad de los cinco candidatos estructurales predichos por el programa (de Brevern y cols., 2012).

El índice de confianza es dado por una maquina de vectores de soporte entrenada para discriminar entre predicciones erróneas y correctas hechas por los 120 algoritmos previamente mencionados. Este algoritmo evalúa el grado de correspondencia entre el segmento evaluado y su conjunto estructural asignado, asignando un puntaje. Este puntaje es el índice de confianza, el cual indica qué tan correcta es la predicción estructural de dicho segmento, y el conjunto de estos índices asociados a todos los fragmentos dan un estimado de la calidad de predicción para una enzima completa (Bornot y cols., 2009; Información Suplementaria III).

Para complementar la confianza de la predicción de la estructura por parte de PredyFlexy, se analizó el plegamiento de los modelos de cada enzima con el programa Verify3D (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/Verify3D/>). Este programa mide la compatibilidad de la secuencia de la enzima con su estructura 3D, donde cada residuo es caracterizado por su entorno, el cual está definido por tres parámetros: el área expuesta al solvente del residuo, la fracción del área de la cadena lateral cubierta por átomos polares (O, N) y la estructura secundaria local. Este último parámetro se obtiene a partir de las coordenadas del modelo 3D de la enzima. Cada residuo obtiene un puntaje dependiendo de qué tan compatible es con su entorno, y la sumatoria de los puntajes otorga un puntaje para toda la enzima (Eisenberg y cols., 1997).

##### **5) Crear modelos 3D de cada enzima:**

Se utilizó los software online Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) e I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) para construir los

modelos 3D de cada enzima, por homología, a partir de su secuencia aminoacídica. Los modelos se eligieron dependiendo de su porcentaje de identidad respecto de su molde, el cual debía ser mayor a 30% en el caso de Swiss-Model, y mayor a 28% en el caso de I-TASSER, siempre que tuviera una predicción del sitio activo y que la proteína utilizada como molde tuviera una actividad similar o igual a la enzima que se estaba modelando. Los modelos se visualizaron con el software UCSF Chimera.

#### **6) Predicción del volumen del sitio activo de cada modelo 3D:**

El sitio activo de cada enzima se determinó utilizando la bibliografía asociada a la cristalización de la proteína molde de cada modelo en el caso de los modelos realizados por Swiss-Model, o se obtuvieron como parte de los resultados de la predicción de la estructura en el caso del software I-TASSER. En UCSF Chimera se visualizó la superficie del bolsillo del sitio activo de cada enzima, y a partir de la función “medir y colorear parches” se calculó el volumen encerrado en esta superficie para cada modelo.

#### **7) Optimización de las secuencias para síntesis:**

Se removió el péptido señal de todas las secuencias donde se detectó uno, así como el codón de término de cada secuencia. La optimización de codones para *Pichia pastoris* y la inserción de sitios de restricción para cada secuencia fue realizada por la empresa GeneUniversal, a la cual se enviaron a sintetizar las secuencias codificantes.

## RESULTADOS

### **Encontrar enzimas de estudio por medio del análisis del transcriptoma de 8 levaduras antárticas:**

Para realizar un análisis comparativo de enzimas expresadas en las levaduras en estudio el primer paso fue crear una lista de enzimas candidatas para este trabajo. Para esto se seleccionaron enzimas que tuvieran actividad medible en laboratorio por métodos colorimétricos, y estuvieran presentes en al menos cuatro levaduras. Se seleccionó de una lista de ORFs obtenidos del transcriptoma de estas levaduras. Se comprobó por BLAST que las secuencias correspondieran a las enzimas que se indicaba en la lista y se filtraron dependiendo del porcentaje de identidad ( $\geq 30\%$ ) y cobertura ( $\geq 70\%$ ). Se pudo identificar un total de 9 enzimas que cumplían todos los requisitos (Tabla 1). De todas las enzimas candidatas para este trabajo se decidió continuar con la alcohol deshidrogenasa y la beta-glucosidasa, porque ambas se encuentran expresadas en las ocho levaduras estudiadas y tienen una posible aplicación industrial. Además de las enzimas mostradas en la Tabla 1, se incluyó una glucoamilasa procedente de la levadura *Tetracladium* sp. caracterizada en el laboratorio en estudios previos (Carrasco y cols., 2017), la cual también posee aplicación en distintas industrias.

**Tabla 1:** Enzimas identificadas y levaduras en las que se encuentran.

	Alcohol Deshidrogenasa	Amilasa	Alfa Glucosidasa	Beta Glucosidasa	Isocitrato Deshidrogenasa	Celulasa	Invertasa	Proteinasa K	Fosfatasa Ácida
<i>Cryptococcus sp.</i>									
<i>C. sake</i>									
<i>L. creatinivorum</i>									
<i>M. gelida</i>									
<i>P. glacialis</i>									
<i>Tetracladium sp.</i>									
<i>V. victoriae</i>									
<i>W. anomalus</i>									

**Optimizar las secuencias codificantes de las enzimas seleccionadas:****Péptidos señal de exportación encontrados en las secuencias****codificantes, sitios de restricción y optimización de codones:**

Habiendo seleccionado dos enzimas que cumplen todos los requisitos, se procedió a analizar su secuencia nucleotídica y aminoacídica. Debido a que estas enzimas serán expresadas heterológamente en estudios posteriores, se analizaron las 16 secuencias nucleotídicas más la de la glucoamilasa de *Tetracladium sp.* en busca de péptidos señal utilizando el software Philius, encontrando tres (Tabla 2). Los péptidos señal fueron encontrados en el extremo N-terminal y fueron removidos de las secuencias codificantes, ya que el vector de expresión que se utilizará en *Pichia pastoris* tiene un péptido señal de exportación al medio extracelular, por lo que la señal de exportación nativa no es necesaria.

**Tabla 2:** Péptidos señal encontrados mediante el software Philius en las secuencias codificantes de las enzimas de estudio.

Secuencia	Largo péptido señal (aminoácidos)	Secuencia del péptido señal (nucleótidos)
Glucamilasa <i>Tetracladium</i> sp.	1-35	ATGTTCTCCTTCTTCTCTCAGCTTCAGTTCCTCACT CTCAAGCCTCTCATCTCTTTAGCCATCATGGTFACT TTCTCCTCTCTTCTCCTCACTGTAGGCCTCGCA
Alcohol Deshidrogenasa <i>Vishniacozyma</i> <i>victoriae</i>	1-23	ATGGCACCAGCATCACGATCATCAGTA GTCCGACTCTTGCTCACTCACAGCCAACGGA GGTTGTCGAGGA
Beta-Glucosidasa <i>Mrakia Gelida</i>	1-20	ATGATCCTCCTCCATCCTTCCCTCTTACTCCTCCTC CACCTCGCTGTGTCCTCGCTAGCA

Además, a la secuencia codificante de estas enzimas se le agregó sitios de restricción en el extremo 5' (EcoRI o NotI, dependiendo del caso) y 3' (NotI) y al mandarlas a sintetizar se optó por la opción de la optimización de codones para la expresión heteróloga en *Pichia pastoris*.

### **Analizar la secuencia y estructura de las enzimas seleccionadas con herramientas bioinformáticas:**

#### **Predicción de la localización subcelular de las enzimas en estudio:**

Continuando con el análisis y caracterización de las enzimas seleccionadas, se procedió a predecir su localización subcelular a través de su secuencia aminoacídica utilizando el software Euk-mPLoc 2.0 (Tabla 3).

**Tabla 3:** Localización subcelular de cada enzima obtenida mediante el software Euk-mPLoc 2.0.

<b>Levaduras</b>	<b>Alcohol Deshidrogenasa</b>	<b>Beta-Glucosidasa</b>
<i>Cryptococcus sp.</i>	Citoplasma	Extracelular
<i>Candida sake</i>	Mitocondria	Extracelular
<i>Leucosporidium creatinivorum</i>	Citoplasma	Citoplasma
<i>Mrakia gelida</i>	Citoplasma	Citoplasma
<i>Phenoliferia glacialis</i>	Citoplasma	Extracelular
<i>Tetracladium sp.</i>	Extracelular	Extracelular
<i>Vishniacozyma victoriae</i>	Mitocondria	Extracelular
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Citoplasma	Citoplasma

Según los resultados de la Tabla 3 se puede observar que la mayoría de las alcohol deshidrogenasas pertenecen a espacios intracelulares como el citoplasma o la mitocondria, mientras que en el caso de la beta-glucosidasa esta puede ser tanto extracelular como intracelular. La glucoamilasa de *Tetracladium sp.* no se incluye en la Tabla 3 porque se sabe que es una enzima extracelular por estudios anteriores (Carrasco y cols., 2017). Predecir el compartimento celular al cual es exportada cada una de estas enzimas es importante porque creemos que dependiendo de si son intra o extracelulares podrían presentar distintas adaptaciones estructurales debido a la diferencia en el ambiente al que estarán expuestas para cumplir su función.

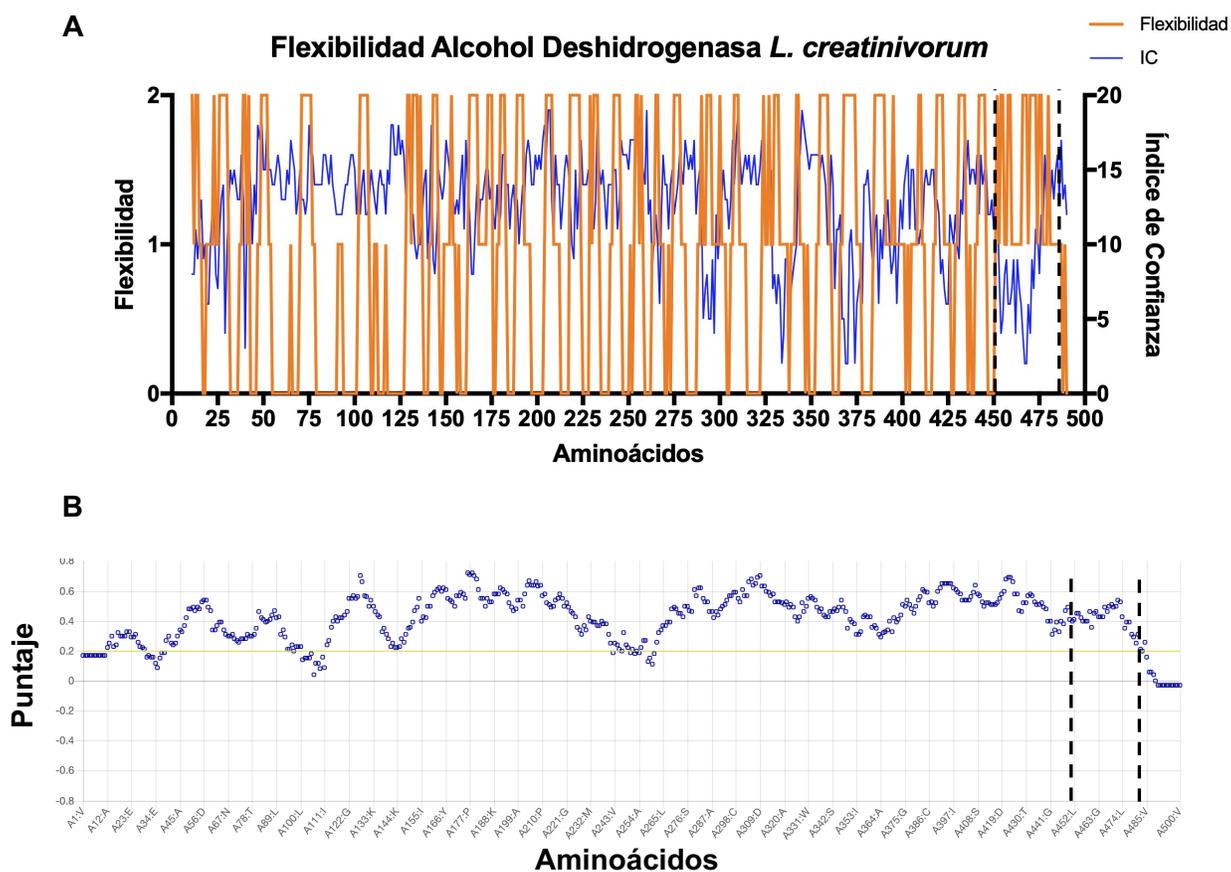
#### **Grupos de residuos flexibles en las enzimas de estudio:**

El siguiente análisis hecho a las secuencias aminoacídicas consistió en determinar los residuos flexibles presentes en la estructura terciaria de las enzimas utilizando el software Predyflexy. Este programa le asigna un valor discreto a cada residuo dependiendo de su flexibilidad desde el 0 al 2, siendo 0 rígido, 1 intermedio y 2 flexible. Además entrega un índice de confianza a cada residuo al que se le predijo su flexibilidad,

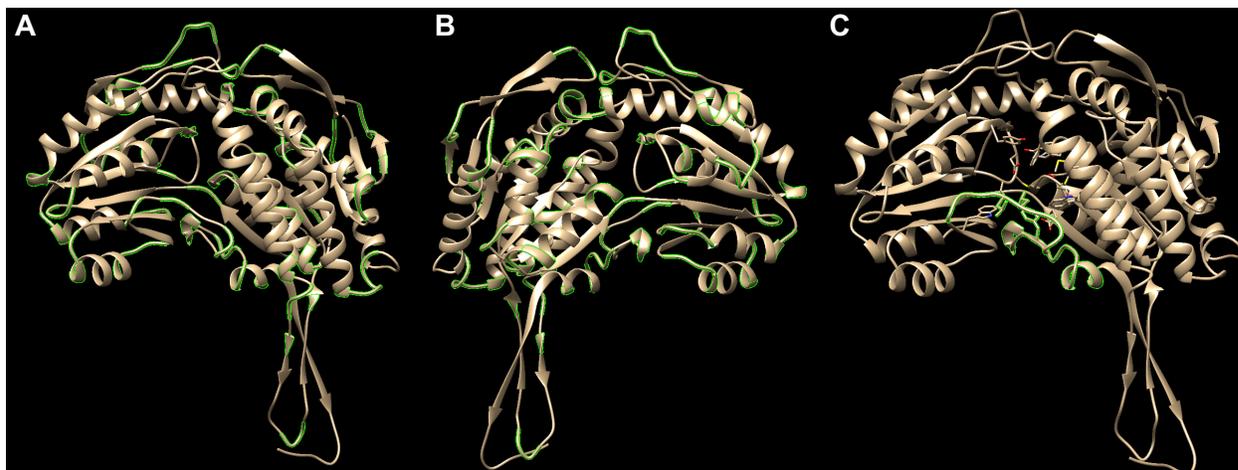
cuyo valor discreto va desde el 1 al 19, siendo más confiable la predicción mientras más alto es este valor. Los datos obtenidos fueron graficados (Figura 1A, Sección 2 de Material Complementario) para visualizar la distribución de los residuos flexibles a lo largo de la secuencia. Además se complementó la predicción de la estructura por parte de PredyFlexy con el software Verify3D, el cual predice la compatibilidad de la secuencia de aminoácidos de la enzima con su estructura tridimensional en base al entorno de cada residuo y su posición en la estructura. Los residuos que tengan un puntaje  $\geq 0,2$  se consideran correctos (Figura 1B). Además se crearon los modelos tridimensionales de estas enzimas para poder visualizar los resultados obtenidos.

La Figura 1A se muestra como ejemplo de los gráficos que se obtuvo con los datos de PredyFlexy. Se puede observar que en general la distribución de los peaks (residuos con valor igual a 2) es uniforme a lo largo de la secuencia. De los residuos flexibles en el modelo de la subunidad A de la alcohol deshidrogenasa de *L. creatinivorum*, la mayoría se encuentra en loops superficiales y el resto posicionados en estructuras como hélices- $\alpha$  y sábanas- $\beta$  (Figura 2A y 2B). Características similares fueron observadas en el resto de las enzimas estudiadas, donde los residuos catalogados como flexibles no parecen estar relacionados en su gran mayoría con la formación del sitio activo, y parecen estar distribuidos uniformemente a lo largo de la enzima.

Por otro lado, existe una sección de la cadena principal de la enzima (residuos 451-480)(Figura 1A, 1B y 2C) donde se observa la ausencia de residuos rígidos, lo que indicaría una sección de alta flexibilidad estructural, siendo posiblemente una característica importante para realizar reacciones químicas a bajas temperaturas, ya que podría otorgar mayor flexibilidad estructural en zonas claves para la catálisis.



**Figura 1:** Predicción de flexibilidad y estructura de la alcohol deshidrogenasa de *L. creatinivorum*. A Gráfico de flexibilidad de cada residuo en la secuencia principal de la alcohol deshidrogenasa. Las líneas punteadas delimitan la sección de alta flexibilidad. B Gráfico de puntaje de compatibilidad de cada residuo de la alcohol deshidrogenasa con su estructura tridimensional. Las secciones de la secuencia consideradas como correctamente plegadas se encuentran sobre la línea verde. Las líneas punteadas delimitan la zona de alta flexibilidad mostrada en A.



**Figura 2:** Imágenes del modelo de la subunidad A de la alcohol deshidrogenasa de *L. creatinivorum*. A y B son rotaciones en 180° respecto a un eje vertical del modelo. Los residuos flexibles están resaltados en verde. C muestra el segmento con ausencia de residuos rígidos en verde.

Esta característica se encontró en cinco enzimas más (Tabla 4, casillas amarillas)(Sección 2 de Material Complementario). Se quiso predecir si esta característica estaba asociada al compartimento celular al cual estas enzimas son exportadas, y de ser así proponer qué ventaja podría ofrecer esta cualidad en dicho compartimento. Para esto se crearon tablas de frecuencia (Tabla 5 y 6) de la presencia de este segmento flexible en ambas enzimas a partir de la Tabla 4 y se calculó el chi cuadrado ( $\chi^2$ ) a partir de ellas para determinar si ambas observaciones eran dependientes. Como se puede ver en las Tablas 5 y 6, ambos  $\chi^2$  son menores al valor crítico (V.C) dado para los grados de libertad (G.L) y significancia escogidos ( $\alpha=0,05$ ), por lo que en ambos casos no se puede afirmar que la característica previamente mencionada es dependiente del compartimento celular al cual son exportadas estas enzimas. Esto es corroborado aún más con el p-valor calculado en cada caso, donde ambos son valores son mayores a 0,05 (p-valor>0,05).

**Tabla 4:** Presencia de segmento altamente flexible y localización subcelular de cada enzima en estudio.

	Alcohol Deshidrogenasa		Beta-Glucosidasa	
	Presencia de característica	Localización subcelular	Presencia de característica	Localización subcelular
<i>Cryptococcus sp.</i>		Citoplasma		Extracelular
<i>Candida sake</i>		Mitocondria		Extracelular
<i>Leucosporidium creatinivorum</i>		Citoplasma		Citoplasma
<i>Mrakia gelida</i>		Citoplasma		Citoplasma
<i>Phenoliferia glacialis</i>		Citoplasma		Extracelular
<i>Tetracladium sp.</i>		Extracelular		Extracelular
<i>Vishniacozyma victoriae</i>		Mitocondria		Extracelular
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>		Citoplasma		Citoplasma

**Tabla 5:** Datos utilizados para calcular el chi-cuadrado de los datos de la Alcohol Deshidrogenasa.

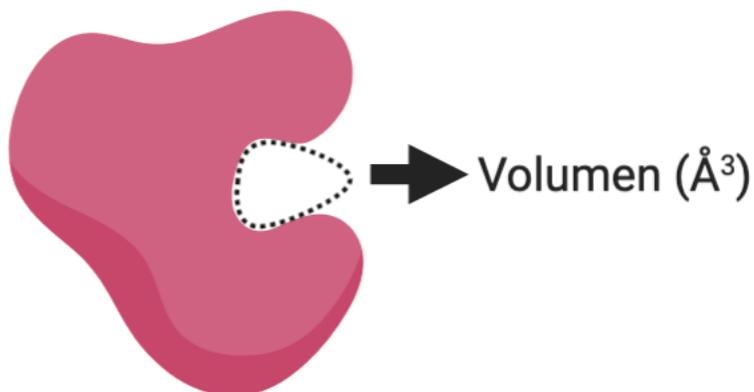
	Presencia de segmento flexible		Total	$x^2$	G.L	V.C	p-valor
	si	no					
<b>Citoplasma</b>	1	4	5	2,45	2	5,99	0,29
<b>Extracelular</b>	1	0	1				
<b>Mitocondria</b>	1	1	2				
<b>Total</b>	3	5	8				

**Tabla 6:** Datos utilizados para calcular el chi-cuadrado de los datos de la Beta-Glucosidasa.

	Presencia de segmento flexible		Total	$x^2$	G.L	V.C	p-valor
	si	no					
<b>Citoplasma</b>	0	3	3	2,88	1	3,84	0,089
<b>Extracelular</b>	3	2	5				
<b>Total</b>	3	5	8				

**Volumen del sitio activo de las enzimas en estudio:**

Habiendo realizado los análisis correspondientes a las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de las enzimas seleccionadas, el siguiente paso fue crear modelos 3D de cada una para posteriormente medir el volumen del sitio activo (Figura 3). Para la creación de los modelos se utilizó los software Swiss-Model e I-TASSER, y la visualización y medición del volumen de los sitios activos se hizo utilizando el software UCSF Chimera (Tabla 7 y 8). Se puede observar la diferencia en los resultados dependiendo del programa que se usó para generar los modelos, así como la variación en el volumen del sitio activo de las enzimas homólogas en distintas levaduras. Además se incluyen las temperaturas de crecimiento óptimo de cada levadura (Tabla 9) para los análisis posteriores de correlación.



**Figura 3:** Diagrama de la medición del volumen del sitio activo de las enzimas en estudio.

**Tabla 7:** Volúmenes de los sitios activos de los modelos generados por Swiss-Model e I-TASSER de las enzimas estudiadas.

	Swiss-Model		I-TASSER	
	Alcohol Deshidrogenasa	Beta Glucosidasa	Alcohol Deshidrogenasa	Beta Glucosidasa
Levadura	Volumen (A <sup>3</sup> )			
<i>Cryptococcus sp.</i>	520,62	-	489,62	323,16
<i>Candida sake</i>	517,17	-	403,39	-
<i>Leucosporidium creatinivorum</i>	372,61	494,68	327,11	-
<i>Mrakia gelida</i>	371,49	317,91	371,66	225,97
<i>Phenoliferia glacialis</i>	156,38	-	-	-
<i>Tetracladium sp.</i>	138,64	134,87	-	226,73
<i>Vishniacozyma victoriae</i>	-	-	1480,4	849,15
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	-	-	-	-

**Tabla 8:** Volúmenes del sitio activo del modelo de la glucoamilasa de la levadura *Tetracladium sp.*

Swiss-Model	I-TASSER
Volumen (A <sup>3</sup> )	Volumen (A <sup>3</sup> )
323,87	380,39

Lo siguiente fue realizar un análisis comparativo entre los volúmenes calculados y la temperatura de crecimiento de cada levadura (Tabla 9) para dilucidar si existe una relación entre ambos parámetros. Se graficó el volumen del sitio activo calculado para cada modelo según el programa utilizado para crearlos versus la temperatura óptima de crecimiento de cada levadura (Figuras 4 y 5). Para determinar si existía una relación

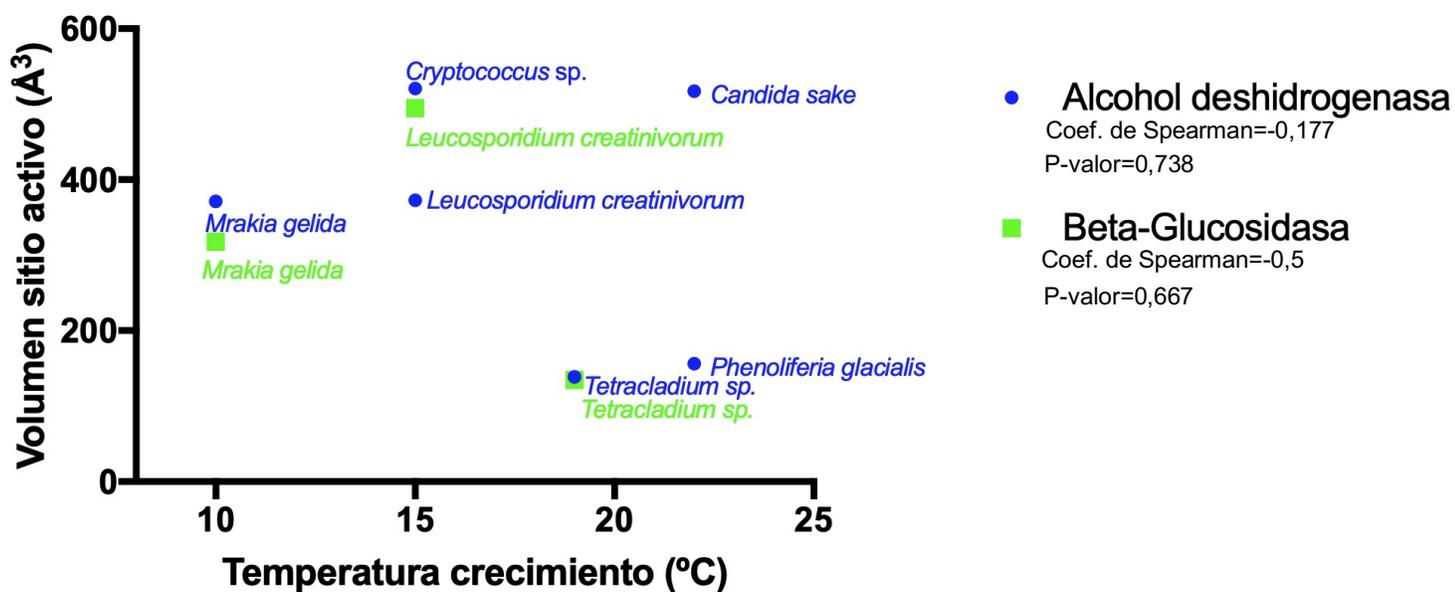
entre ambas variables, se realizó el test estadístico de Spearman, el cual entrega un coeficiente entre -1 (indicando una relación inversa) y 1 (indicando una relación directa), siendo 0 indicativo de que no existe relación entre ambas variables. Además, para saber si la correlación es estadísticamente significativa, se calculó el p-valor de cada test de correlación realizado. Según el coeficiente de Spearman para ambas enzimas en la Figura 4, existe una relación inversa entre el volumen del sitio activo y la temperatura óptima de crecimiento, mientras que el mismo coeficiente para ambas enzimas en la Figura 5 indica que la relación entre ambas variables es directa. Sin embargo, para todos los casos el p-valor es mayor a 0,05, por lo que la evidencia presentada aquí no es suficiente para establecer que alguna de estas relaciones es significativa.

**Tabla 9:** Temperaturas de crecimiento óptimo de las levaduras en estudio.

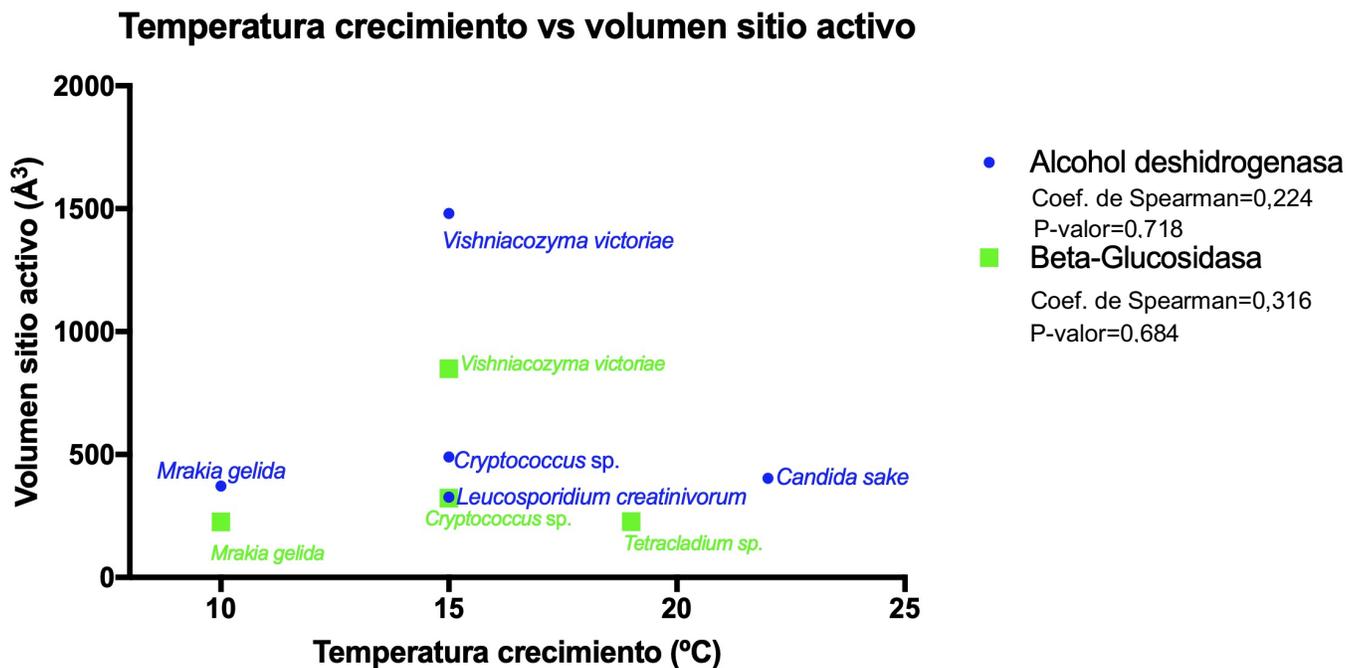
<b>Levadura</b>	<b>Temperatura crecimiento (°C)</b>
<i>Cryptococcus sp.</i>	15
<i>Candida sake</i>	22
<i>Leucosporidium creatinivorum</i>	15
<i>Mrakia gelida</i>	10
<i>Phenoliferia glacialis</i>	22
<i>Tetracladium sp.</i>	19
<i>Vishniacozyma victoriae</i>	15
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	22

Los datos expuestos en esta tabla se obtuvieron en experimentos de cultivo a diferentes temperaturas realizados en el laboratorio.

## Temperatura crecimiento vs volumen sitio activo



**Figura 4:** Gráfico de temperatura de crecimiento de cada levadura versus el volumen del sitio activo de cada enzima en estudio de los modelos generados por Swiss-Model. Se muestra el coeficiente de Spearman para cada grupo de datos analizado y su respectivo p-valor ( $\alpha=0,05$ ).



**Figura 5:** Gráfico de temperatura de crecimiento de cada levadura versus el volumen del sitio activo de cada enzima de estudio de los modelos generados por I-TASSER. Se muestra el coeficiente de Spearman para cada grupo de datos analizado y su respectivo p-valor ( $\alpha=0,05$ ).

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se muestran los resultados de la identificación y análisis de enzimas provenientes de levaduras adaptadas al frío. Un total de nueve enzimas candidatas fueron identificadas (Tabla 1), las cuales cumplen los requisitos necesarios para este trabajo, como tener una actividad medible por métodos colorimétricos, tener una posible aplicación industrial y estar expresadas en la mayor cantidad de levaduras posible. De estos candidatos se decidió analizar a la alcohol deshidrogenasa y la beta-glucosidasa, ya que estas enzimas se expresan en las ocho levaduras. Además, se decidió incluir una glucoamilasa de la levadura *Tetracladium* sp., la cual fue caracterizada en estudios previos en el laboratorio y posee aplicaciones en distintas industrias (Carrasco y cols., 2017).

De acuerdo a los resultados del análisis de la secuencia aminoacídica de estas enzimas (Tabla 2), tres de ellas tienen un péptido señal en el extremo N-terminal. Un péptido señal promedio tiene un largo de entre 25 a 30 residuos, aunque pueden ser tan cortos como 16 residuos y tan largos como 140 residuos, además de servir como método de señalización para que la enzima llegue al compartimento celular indicado (Owji y cols., 2018). El largo de los péptidos señal predichos se encuentra dentro del rango mencionado, y es esperable que la glucoamilasa tenga uno, ya que es una enzima extracelular, pero por otro lado resulta sorprendente que se haya encontrado sólo un péptido señal entre las beta-glucosidasas analizadas, ya que la mayoría fueron clasificadas como extracelulares (Tabla 3). Así mismo, se esperaría haber encontrado un péptido señal en las alcohol deshidrogenasas clasificadas como mitocondriales. El programa para la identificación de péptidos señal fue elegido

después de probar tres distintos (incluido Philius), siendo este el que otorgó la mayor cantidad de resultados y con la mayor cantidad de detalle, por lo que los datos aquí mostrados fueron obtenidos con las herramientas disponibles en el momento de realizar los análisis.

Analizando la secuencia aminoacídica completa de estas enzimas se predijo su localización subcelular (Tabla 3). Predecir el compartimento celular al cual pertenecen estas enzimas es importante, ya que creemos que al existir diferencias en los ambientes intra y extracelular, principalmente debido al control de la concentración de iones, pH (Ariño y cols., 2010) y metabolitos (Ljungdahl & Diagnan-Fornier, 2012), podrían existir diferencias en las adaptaciones estructurales o catalíticas de estas enzimas. Las alcohol deshidrogenasas son una familia de enzimas que puede ser encontradas tanto en el citoplasma como en la mitocondria (De Smidt y cols., 2008), mientras que las beta-glucosidasas varían su localización subcelular entre el citoplasma, la membrana plasmática y el espacio extracelular (Cairns y Esen, 2010). En general los resultados obtenidos concuerdan con la literatura excepto por la alcohol deshidrogenasa de *Tetracladium* sp., la cual se predijo como extracelular. Hasta la fecha no hay reportes de alcohol deshidrogenasas extracelulares, sin embargo, exportar esta enzima al medio extracelular podría significar alguna ventaja para este microorganismo desconocida hasta el momento, como convertir aldehidos potencialmente dañinos en alcoholes o cetonas antes de asimilarlos, o utilizar estos productos en distintas vías metabólicas, por lo que no es un resultado que se tenga que descartar. Futuros estudios podrían enfocarse en intentar aislar esta enzima del medio extracelular de esta levadura, para comprobar las predicciones mostradas previamente.

A partir del programa PredyFlexy se obtuvo los residuos flexibles de las enzimas estudiadas (Figura 1A, Sección 2 de Material Complementario) y la predicción de la

estructura de las enzimas por este programa se complementó con los resultados de Verify3D (Figura 1B, Sección 3 de Material Complementario). Los residuos catalogados como flexibles se encuentran distribuidos a lo largo de toda la estructura enzimática, principalmente en loops, con algunos presentes en hélices- $\alpha$  y sábanas- $\beta$  (Figura 2A y 2B). Sin embargo, hay seis enzimas que presentan tramos de su secuencia con ausencia de residuos rígidos, como el caso de la alcohol deshidrogenasa de *C. sake* (487-519), *L. creatinivorum* (451-480) y *Tetracladium* sp. (160-189) y la beta-glucosidasa de *Cryptococcus* sp. (70-105), *Tetracladium* sp. (500-541), y *V. victoriae* (259-293), lo que podría dar cuenta de una mayor flexibilidad localizada en lugares específicos de la estructura de la enzima (Feller & Gerday, 2003) (D'Amico y cols., 2006). En el ejemplo mostrado (Figura 2C), el segmento flexible se encuentra formando parte de la cavidad catalítica, lo que podría otorgarle mayor facilidad para acomodar el sustrato y la flexibilidad suficiente para llevar a cabo los cambios conformacionales necesarios para realizar reacciones químicas a bajas temperaturas (Feller & Gerday, 2003)(D'Amico y cols., 2006)(Santiago y cols., 2016). Además, se quiso saber si esta característica estaba asociada a la localización subcelular de estas enzimas (Tablas 4, 5 y 6) y de ser así, inferir qué ventaja les daría tener una característica como esta. Los resultados indican que esta característica no estaría asociada a dónde son exportadas estas enzimas, principalmente porque el  $\chi^2$  calculado para ambos grupos de datos es menor que su valor crítico correspondiente, además que el p-valor calculado es mayor a 0,05. Sin embargo, podría corresponder a una adaptación propia de enzimas adaptadas al frío, específicamente una alta flexibilidad local como se mencionó anteriormente (D'Amico y cols., 2006)(Feller & Gerday, 2003)(Santiago y cols., 2016). Si bien preliminarmente todas estas enzimas son adaptadas al frío, se ha visto que el tipo y cantidad de

adaptaciones que presentan estas enzimas varía dependiendo de cada caso (Santiago y cols., 2016), por lo que no es de extrañar que no todas ellas presenten este segmento más flexible. Sin embargo, se deben realizar más experimentos para comprobar estas predicciones. Por último, se puede observar que el índice de confianza del segmento flexible (Figura 1A) es más bajo que el del resto de la secuencia. Esto puede ser debido a que este programa tiende a tener un índice de confianza más bajo en zonas de mayor flexibilidad (de Brevern, 2012) o porque es una zona pobremente predicha, pero complementando la predicción con los datos de Verify3D se tiene mayor seguridad de que la estructura tridimensional de la enzima es la correcta, por lo que la primera opción es la más probable. Estos datos podrían complementarse con análisis que comparen la cantidad y posición de ciertos residuos como glicina, prolina y arginina para determinar si efectivamente existen sustituciones, respecto a enzimas homólogas mesófilas, que pudieran generar un cambio en la estabilidad y actividad catalítica, ya que el programa utilizado no utiliza esta estrategia (Materiales y métodos). Además, ensayos comparativos sobre el efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad estructural de estas enzimas podrían ayudar a dilucidar si efectivamente estas seis enzimas previamente mencionadas tienen un comportamiento distinto al resto de las enzimas estudiadas, respecto a las variables previamente mencionadas.

Se ha postulado que los sitios activos de enzimas adaptadas al frío son más grandes que los de sus contrapartes mesófilas, lo que les ayudaría a tener una mayor actividad catalítica a bajas temperaturas (Feller y Gerday, 2003)(Santiago y cols., 2016). Hace sentido pensar que el volumen del sitio activo dependerá del tamaño del sustrato de cada enzima. En el caso de la beta-glucosidasa y glucoamilasa sus sustratos son bastante homogéneos en lo que a tamaño respecta, siendo celooligosacáridos y almidón, respectivamente (Sharma y cols., 2016)(Carrasco y cols., 2017), por lo que no

se espera que sea una variable que afecte el análisis de los resultados del volumen del sitio activo. En el caso de las alcohol deshidrogenasas, estas son una familia de enzimas bastante variadas en términos de su estructura y especificidad de sustratos y ha sido bastante estudiada en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se ha visto que algunas alcohol deshidrogenasas pueden catalizar la oxidación de todos los alcoholes primarios con cadenas de entre 2 y 10 átomos de carbono, mientras que otras son más específicas, oxidando sólo etanol y n-propanol (De Smidt y cols., 2008). Siendo enzimas en donde una sola puede tener una gran gama de sustratos, no se espera que el tamaño de este defina preponderantemente el volumen del sitio activo. En las Figuras 4 y 5 se graficó el volumen del sitio activo de las enzimas estudiadas y la temperatura óptima de crecimiento de cada levadura (Tabla 9), ya que si bien fueron aisladas de la misma zona geográfica, el que presenten diferencias respecto a la temperatura a la que crecen mejor indica que poseen distintos grados de adaptación a las condiciones ambientales de su entorno, por lo que se espera que existan diferencias en el volumen del sitio activo de sus enzimas. Tanto en la Figura 4 como la Figura 5 se muestra que existe una correlación entre ambas variables, aunque corresponde a una correlación inversa y una directa, respectivamente. Además, el p-valor para todas las correlaciones indica que la evidencia presentada no es suficiente para afirmar que son estadísticamente significativas. La diferencia en las correlaciones se puede deber a que no se pudo evaluar a las mismas enzimas según el programa que se utilizó para crear los modelos (Tabla 7), por lo que no se pudieron utilizar exactamente los mismos datos para calcular todas las correlaciones. Además no se pudo contar con la cantidad de datos que se esperaba en un principio. Por lo tanto, la heterogeneidad en los resultados recabados y la poca cantidad de estos pudo haber tenido un efecto en las correlaciones mostradas en este trabajo. Para realizar predicciones más certeras y que cuenten con validez estadística,

en un futuro se deben recaudar una mayor cantidad de datos del volumen del sitio activo de una mayor cantidad de enzimas adaptadas al frío.

Hasta el momento, los datos presentados son insuficientes para determinar si estas relaciones observadas apuntan a que estas adaptaciones existen en algunas enzimas dentro de distintas especies de levaduras, corresponde a una característica dependiente de la especie, o son una adaptación presente en todas las levaduras adaptadas al frío, debido a que no se pudo obtener el volumen de cada sitio activo en cada levadura, haciendo imposible una comparación representativa. Estos resultados deberán ser comprobados por medio de análisis bioinformáticos sobre un mayor número de enzimas y experimentos *in vitro* en investigaciones futuras.

Por último, los datos faltantes en las Tabla 7 se deben a que no se pudo obtener un modelo completo de la enzima a partir de su secuencia aminoacídica, posiblemente porque dichas secuencias corresponden a una proteína incompleta o hay zonas de la secuencia de baja similitud respecto a la enzima molde cuya estructura no se pudo predecir por homología, por lo que no fueron modeladas, por ende no fue posible hacer los cálculos respectivos en el sitio activo. Al igual que en el punto anterior, esto se podrá dilucidar con experimentos *in vitro* en investigaciones futuras.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ariño, J., Ramos, J., & Sychrová, H. 2010. Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(1): 95-120.
2. Baeza M., Flores O., Alcaíno J., Cifuentes V. 2019. Yeast Thriving in Cold Terrestrial Habitats: Biodiversity and Industrial/Biotechnological Applications. *En Tiquia-Arashiro S., Grube M. (eds). Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance*. pp.253-268. Springer, Cham.
3. Bentahir, M., Feller, G., Aittaleb, M., Lamotte-Brasseur, J., Himri, T., Chessa, J. P., & Gerday, C. 2000. Structural, Kinetic, and Calorimetric Characterization of the Cold-active Phosphoglycerate Kinase from the Antarctic *Pseudomonas* sp. TACII18. *Journal of Biological Chemistry*. 275(15): 11147-11153.
4. Berg, K., Leiros, I., & Williamson, A. 2019. Temperature adaptation of DNA ligases from psychrophilic organisms. *Extremophiles*. 23(3): 305-317.
5. Bornot, A., Etchebest, C., & De Brevern, A. G. 2009. A new prediction strategy for long local protein structures using an original description. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 76(3): 570-587.
6. Cairns, J. R. K., & Esen, A. 2010.  $\beta$ -Glucosidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67(20): 3389-3405.
7. Carrasco, M., Alcaíno, J., Cifuentes, V., & Baeza, M. 2017. Purification and characterization of a novel cold adapted fungal glucoamylase. *Microbial cell factories*. 16(1): 75.
8. Carrasco, M., Rozas, J. M., Alcaíno, J., Cifuentes, V., & Baeza, M. 2019. Pectinase secreted by psychrotolerant fungi: identification, molecular characterization and heterologous expression of a cold-active polygalacturonase from *Tetracladium* sp. *Microbial cell factories*. 18(1): 45.
9. D'Amico, S., Collins, T., Marx, J. C., Feller, G., & Gerday, C. 2006. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO reports*. 7(4): 385-389.
10. de Brevern, A. G., Bornot, A., Craveur, P., Etchebest, C., & Gelly, J. C. 2012. PredyFlexy: flexibility and local structure prediction from sequence. *Nucleic acids research*, 40(W1): W317-W322.
11. De Smidt, O., Du Preez, J. C., & Albertyn, J. 2008. The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. *FEMS yeast research*. 8(7): 967-978.

12. Eisenberg, D., Lüthy, R., & Bowie, J. U. 1997. [20] VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. In *Methods in enzymology* (Vol. 277, pp. 396-404). Academic Press.
13. Feller, G., & Gerday, C. 2003. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nature reviews microbiology*. 1(3): 200-208.
14. Hashim, N. H. F., Mahadi, N. M., Illias, R. M., Feroz, S. R., Bakar, F. D. A., & Murad, A. M. A. 2018. Biochemical and structural characterization of a novel cold-active esterase-like protein from the psychrophilic yeast *Glaciozyma antarctica*. *Extremophiles*. 22(4): 607-616.
15. Inouye M., Phadtare S. 2014. Cold-Shock Response and Adaptation to Near-Freezing Temperature in Cold-Adapted Yeasts. *En Buzzini P., Margesin R. (eds). Cold-adapted Yeasts*. pp. 243-257. Springer, Berlin, Heidelberg
16. Jia, Z., & Davies, P. L. 2002. Antifreeze proteins: an unusual receptor–ligand interaction. *Trends in biochemical sciences*. 27(2): 101-106.
17. Ljungdahl, P. O., & Daignan-Fornier, B. 2012. Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(3), 885-929.
18. Lonhienne, T., Zoidakis, J., Vorgias, C. E., Feller, G., Gerday, C., & Bouriotis, V. 2001. Modular structure, local flexibility and cold-activity of a novel chitobiase from a psychrophilic Antarctic bacterium. *Journal of molecular biology*. 310(2): 291-297
19. Owji, H., Nezafat, N., Negahdaripour, M., Hajiebrahimi, A., & Ghasemi, Y. 2018. A comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications. *European journal of cell biology*. 97(6): 422-441.
20. Phadtare, S., Alsina, J., & Inouye, M. 1999. Cold-shock response and cold-shock proteins. *Current opinion in microbiology*. 2(2): 175-180.
21. Poglazova, M. N., Mitskevich, I. N., Abyzov, S. S., & Ivanov, M. V. 2001. Microbiological characterization of the accreted ice of subglacial Lake Vostok, Antarctica. *Microbiology*. 70(6): 723-730.
22. Santiago, M., Ramírez-Sarmiento, C. A., Zamora, R. A., & Parra, L. P. 2016. Discovery, molecular mechanisms, and industrial applications of cold-active enzymes. *Frontiers in microbiology*, 7, 1408.
23. Sharma, A., Tewari, R., Rana, S. S., Soni, R., & Soni, S. K. 2016. Cellulases: classification, methods of determination and industrial applications. *Applied biochemistry and biotechnology*, 179(8), 1346-1380.
24. Shivaji, S., & Prasad, G. S. 2009. Antarctic yeasts: biodiversity and potential applications. *En Yeast biotechnology: Diversity and applications* (pp. 3-18). Springer, Dordrecht.

25. Siddiqui, K. S., & Cavicchioli, R. 2006. Cold-adapted enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 75: 403-433.
26. Vincent, W. F. 2000. Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. *Antarctic Science.* 12(3): 374-385.

## MATERIAL COMPLEMENTARIO

### Sección 1: Secuencias optimizadas para síntesis:

Se presenta la secuencia nucleotídica de la alcohol deshidrogenasa, beta-glucosidasa y glucoamilasa optimizada de cada levadura. Los sitios de restricción a los extremos de cada secuencia se indican en color rojo (EcoRI), Verde (KpnI) y azul (NotI).

#### Alcohol deshidrogenasa:

*Cryptococcus sp.:*

**GAATTC**CCTGCTTTTTCTTACGATTTCACTTCTCATGGTGTTCCTCAAGGGTAAATCTGAATTTGATACTG  
GTTTGTATATCAACGGTAAATTTGTTGAAGGTTCTACTAATAAGACCATTGATGTTATTAACCCATCTAC  
TGGTGAAGTTGTTGGTAAAGTTGCTGAAGCTACTGATGCTGATTTGGATAAGGCTGTTGATGCTGCTC  
AAGCTTGTTCGATACTACTTGGGGTAAAAATTTGCTGGTACTGCTAGAGGTAAAATTTTGATTAGAGT  
TGCTGAATTGATCGAAGAAAACGTTGATGAATTGGCTGCTTTGGAATCTTTGGATAATGGTAAAGCTTT  
TTCTATCGCTAAAGGTTTTGATATTGTCGAAGGTGCTGCTACTTTTAGATATTACGCTGGTTGGGCTGA  
TAAGGATCATGGTAAAGTTATTGATGTTAACCCTCATAAGTTGGCTTATACTGTTTCATGATCCAATTGGT  
GTTGTTGGTCAAATTATCCATGGAATTTCCCTTTTCTTATGTTGCTTGGAAAGTTGGCTCCAGCTTTGG  
CTATGGGTAACACTGTTGTTTTGAAACCATCTGAGTTTACTCCATTGACTGCTTTGAGATTGTGTTCTTT  
GTTGAAGGAAGCTGGTTTGCCAGATGGTGTGTTAATATTTTGAATGGTTACGGTTCTACTATCGGTGC  
TGCTATTTCTTCTCATATGAAGATTAGAAAGGTGCTTTTACTGTTTCTACTGCTGTTGGTAGAATGGTT  
ATGAAAGCTGCTGCTGCTTCTAATTTGAAAAATTTACTCTGGAGCTGGGTGGTAAATCTCCAAATATT  
GTTTTCGCTGATGCTGATATTGATCAAGCTGTTAAGTGGGCTTGTTCGGTATTTTTCTTAATCATGGTC  
AATGTTGTTGCGCTGGTTCTAGAGTTTTTGTGAAGAATCTATCTATGAGGAATTTTCGTGAAAAGTTCTT  
GGCTCAATCTGCTAAGCATAAGGTTGGTGACCCATTTGCTGCTGAAACTTTTCAAGGTCCACAAATTTT  
TCAAATTCATATGATAGAATCATGTCCTACATCGAACAAGGTAAAGCTGAAGGTGCTACTTGTGAAAT  
GGGTGTAATAGACATGGTGACAAGGGTACTTTCATTGAACCAACTGTTTTAGTAACGTTAAGCCATC  
TATGAAGATTGTTCAAGAAGAAATTTTCCGGTCCAGTTGTTGTTTTGGTTAAATTCAAAAACGAGGAAGAT  
GTTATCGCTCAAGCTAACGATACTGAATACGGTTTGGCTTCTGCTGTTTTCACTAAGGATATTGCTAAA  
GCTACTAGAGTTTTCTCAAAAATTGCATGCTGGTACTGTTTGGATTAATTGTTATAATCAGCTGCATCCAA  
ACGTTCCTTTTGGTGGTTTCAAGACTTCTGGTATTGGTAGAGAATTGGGTGAATATGCTTTGGCTAACT  
ATACTGAAGTTAAATCTATCCATGTCAACATTGATGCTTTGTGTCATTG**GCGGCCGC**

*Candida sake:*

**GAATTC**AACATGTTGGCTTCTATTACTAGAACTACTTTGAGAAAACCTGCTTGGGGTCAAAATGCTGCT  
GGTAAATTCATAATTTGCTGCTACTTACTCTACTCAAGGTTTGTCTGTTCCAATTAAGTTGCCAAACG  
GTATTGAATATACTCAACCAACTGGTTTGTATTAACAATAAGTTTCGTCCCATCTAAGGAAGGTAGAAC  
TTTTGAAGTTTTAGTCCACTAACGAAGAATTGATTACTTCTGTTTACGAATCTAAGGATGATGATGTT  
GATATTGCTGTTGAAGCTGCTACTAACGTTTTGAAAACCTCTGAATGGAATAAGGCTGATCCTGCTCAA  
AGAGGTGCTGCTTTGAACAGATTGGCTGATTTGATTGAACAACATAAAGATACTATCGCTGCTATTGAA  
ACTTATGATAACGGTAAAGTTATCTCTAACTCTCAAGGTGACGTTGCTTTGTCTATTGCTGTTTTGAGAT  
CTACTGCTGGTTACGCTGATAAATTGCAAGGTTCTGTTGTTGAAACTGGTACTCTCATTTTTCTTTCC



TTGGAACATTTGTTGGAAACTGAAATTATCTCTGATGGTGTGTTTGGCTCAAGATTCTAACCAATTGGCT  
 GCTTTGTGGCCTTGAGAGAATCTATTCCTGAATCTGCTGCTAAGTGTGGTCCAGTTTATAAGTATGAT  
 TTGTCTGTTCCAGTTCCAAAGATGTACGGTTTGGTTGAAGTTTTGAGAAAAAGAATGACTGAAAAGGGT  
 TTGTACGTTGAAGGTAACGAAGATGGTGGTAAAATTAGAAAAGATTGCTGGTTACGGTCATATTGGTGAC  
 GGTAATTTGCATGTTAATATGTCTGCTAAAGCTTGGGATAAGGAAGTTGAAGAAGCTATTGAACCAATTG  
 ATCTATGAATTGACTGCTGCTGAAAAGGGTCTATTTCTGGCTGAACATGGTTTGGGTGTTATGAAGGCT  
 CCTCATTTGCATTACTCTAAGACTGATGATGCTATTCAAATGATGAGAGATGTTAAGAACTGTTTGATC  
 CAAAAGGTATTATGAACCCATACAAATATCTGCCAGCTGAAGAACTAAGCCA**GCGGCCGC**

*Phenoliferia glacialis:*

**GAATTC**CCAGCTTTCTCTTACGATTTTACTTCTCATGGTGTGTTTCAAGGGTAAATCTGAATTTGATACTG  
 GTTTGTACATCAATGGTAAATTCGTTGAAGGTTCTACTAATAAGACTATTGATGTTATCAACCCTTCTAC  
 TGGTGAAGTTGTTGGTAAAGTTGCTGAAGCTACTGATGCTGATTTGGATAAAGCTGTTGATGCTGCTCA  
 AGCTTGTTCGATACTACTTGGGGTAAAACTTGTCTGGTACTGCTAGAGGTAAAAATTTGATTAGAGT  
 TGCTGAATTGATCGAAGAAAACGTTGATGAATTGGCTGCTTTGGAATCTTTGGATAATGGTAAAGCTTT  
 TTCTATCGTAAAGGTTTCGATATTGTTGAAGTGCTGCTACTTTTAGATATTATGGTGGTTGGGCTGA  
 TAAGGATCATGGTAAAGTTATTGATGTTAACCCATATAAACTGGCTTATACTGTTTATGATCCAATTGGT  
 GTTGTGGTCAAATATTCCTTGAACCTTTCCATTTTTGATGTTGTCTTGAAGTTGGCTCCAGCTTTGG  
 CTATGGGTAATACTGTTGTTTTGAAACCTTCTGAGTTTACTCCTTTGACTGCTTTGAGATTGTGTTCTTT  
 GTTGAAAAGAAGCTGGTTTGCCTGATGGTGTGTTAATATTTGAATGGTTACGGTTCTACTATCGGTGC  
 TGCTATTTCTTCTCATATGAAGATTAGAAAAGGTCGCTTTTACTGGTTCTACTGCTGTTGGTAGAATGGT  
 ATGAAAAGCTGCTGCTGCTTCTAACTGAAAAATATTACTTTGGAGCTGGGTGTAATCTCCAAACATT  
 GTTTTGGTGTGATATTGATCAAGCTGTTAAGTGGCTTGTTCGGTATTTTTCTAATCATGGTGC  
 AATGTTGTTGCGCTGTTCTAGAGTTTTCGTTGAAGAATCTATCTATGAAGAATTCGTGAAAAGTTCTT  
 GGCTCAATCTGCTAAACATAAGGTTGGTGACCCATTTGCTGCTGAAACTTTCCAAGGTCCACAAATTT  
 TCAAATTCATATGATAGAATCATGTCCTACATCGAACAAGGTAAGCTGAAGGTGCTACTTGTGAAAT  
 GGGTGGTAATAGACATGGTGACAAAGTTACTTTATTGAACCAACTGTTTTCTAACGTTAAACCATC  
 TATGAAGATTGTTCAAGAAGAAAATTTTGGTCCAGTTGTTGTTTTGGTTAAGTTCAAGAACGAAGAAGA  
 TGTTATTGCTCAAGCTAACGATACTGAATACGGTTTGGCTTCTGCTGTTTTACTAAAGATATTGCTAAG  
 GCTACTAGATTTCTCAAAGTTGCATGCTGGTATTGTTGGATTAATTGTTAATCAGCTGCATCCCTA  
 ACGTTCCATTTGGTGGTTTTAAAACCTTCTGGTATTGGTAGAGAATTGGGTGAATACGCTTTGGCTAACT  
 ATACTGAAGTTAAGTCTATTTCATGTCAACATTGATGCTTTGTGTCCTTT**GCGGCCGC**

*Tetracladium sp.:*

**GGTACC**GGTACTAACCCAGATGTTAACTCTGGTAACCCATTGGTTTTGGTTGGGTCCTTCTACTATG  
 TATAAAGTTCTAGAATTACCGCTTCTTCTTATTTGGATCATGCTGGTCCTAATTTGACTATTTTACTA  
 ATGCTCAAGTCGCTAAAGTTACTTTCCATGGTAAAAAGGCTGTTGGTATTGAAACTATTGATGGTAAAA  
 GATTCTCCGCTAGAAGAGATGTTATTTTGTCTGGTGGTGTCTTTGAATTCTCCTCAAATTTGATGTTGTC  
 TGTTATTGGTCTGTTAAAGAATTGAAAAACAGATATCGCTACTGTTTATGATGATGATGATGATGATG  
 TCAAATTTGCAAGATCATGTTTTAGTGGTATCACTTTGATTCAAAGACTGGTACTAATGATAGAATG  
 TCTTACGAAACTGATGCTGAATTGCAATTGGCTTGAAGGAACAATATTCTAAAGATAAGACCGGTTTG  
 AGAACTTCTATGACTGTTCTAACCCAATGGGTTGGTTCAAAAATGATGCTATTTTGGCTTCTGAAGAAT  
 TCAAAGATTTGGATCCATACTTGAAGAACATTATAAGAAGCCAAGTTCCTTTGTTGGAATTGGCTA  
 CTCATATTTCTCCATTGATTTTGGGTGACCATGTTTTGCAACCTACTGATTCTTATTTGACTGGTGTGCTG  
 TTTTGTATGAACCCACAATCTTCTGGTGAAGTTACTTTGAATTCTGCTAACCCATCTGATCCTCCAAGA  
 ATTTCAACCTAATTTGGTTTTCTCATCTTGTATAAGAGAGTTTTGATTGAAGCTACTAAGACTTTGATGG  
 ATTTGTTTGAAGCTCCTGTTTTAGTTCTACTACTGTTAAAGTTGTCGGTTGTCCAAAATCTAGATCTGA  
 TGAAGATGTTTGAACCATGTTTCTGGTAACTTGTCTCTTCTTGGCATATGTGTAAACTGTTAAATG  
 GGTACTGATAACGATATGGAAGCTTGTACTGATACTAATTTTAGAGTTAGAGGTGTTCAAACCTTGAGA  
 GTTGTGATATGTCTATTGCTCCATTGTTGCCTAATAATCATACTCAATCTACTGCTTATCTGATTGGT  
 AAAGTCTGCTGAAAAGATTATTGCTGAATACAATTT**GCGGCCGC**

*Vishniacozyma victoriae:*

**GAATTC**TGTGGTAGAACTCATGGTGTGCTCATCATCATCCACCATCTCCTGCTTTGCCACATCATATT  
 CATGGTATGGGTGCTGGTTTGGGTATGAGAGGTTTGGCTACTCCAATTGATGCTGGTGGTTATAATCC

ACCACCTGGTAACACTGATTACGCTTTCGAAATGGCTGCTTCTAATTTGAGATTCGGTATGGGTGCCAC  
 TAGAGAAGTTGGTATGGATTTCACTAACATGATTGCTCAATTGTCTGGTGACGAAAAGCATCAAGCTAA  
 AATTGGTGTCTTCACTGATCCAAATGTTGCTAGATTGCCTGTTATGAAAGTTGTTGAAGAATCTTTGATG  
 AAGGAAGTTTGAACCTCGTTATTTTCGATAAGATTTCCGTTGAACCAACTGATAACTCTTGGCAACAA  
 GCTATTGATTTTTCTAGAAACAACAAGATCACCCATTTCTTGGCTGTTGGTGGTGGTCTTCTATGGATA  
 CTGCTAAAGCTGCTAATTTGTTTCGTTAACTACCCAGATGCTGATATGTTTGATTTTTATTAACGCTCCAAT  
 CGGTAAAGTTTGCCTATTGATAGAAAATTGCTCCATTGGTTTGTATTCCAACACTACTGCTGGTACTGG  
 TTCTGAAACTACTGGTACTGCTATTTTGGATATTCCATCTAGATCTTTCAAGACTGGTATTGCTTCTAGA  
 GCTTTGAAGCCAACTTTGGGTATTGTTGATATGATGAACACTGCTACTTGCCTAAGGAAGTTCAAATT  
 GCTGCTGGTTTGGATGTTTGTTCATTCTTTGGAATCTTGGACTGCTGTTCCCTATAATGAAAGAACTC  
 CAAGACCTGCTAATCCAATTAATAGACCTGCTTATCAAGGTTCTAATCCAATTTCTGATATCTTCTCTAG  
 ATGGGCTTTGGAACTACTATTAAGTACTTGCCTAGATAATTGCTAGAGATCCTTTCCGGTACTCTGAAGC  
 TAGAGGTTCAAATGTTGGTGGTCTTCTACTGCTGGTATTGGTTTTGGTAAACGCTGGTGTTCATTGTG  
 TCATGCTGCTTCTTACCCAATTTCTTCTTTGAACAAGGGTAGAACTAAAGAAAATCAATACCATCATCCA  
 TCTTACTCTAAAGATATTCCATTGATTCCACATGGTGTGGCCTTGTCTTGGTACTGCTCCAGCTGTTTTTA  
 ACTTCACTGCTCCATCTGATCCTCAAAGACATAGAGATGCTATTTCTGTTTTATGGGTAAAGAAAGATC  
 CTCTGAATTGGATAGAGTTAGAGATGAAGATTTGGGTATGGTTTTGAGAGAAGAAATTTGTAAGTTCTT  
 GGATTTGGTTGGTGTTCCTAGAGGTTTGGCCATGGTTGGTTATAAGTCTGAAGATGTTTCTAGATTGGT  
 TGAAGGTATGTTGCCTCAAAGAAGAGTTTTGGATTTGGCTCCAATTTGGTTAAGGATAATTTGGATCA  
 AGAGAGAGAACAATTGACTGGTATTATTGAAGCTTCTTGAACCTGG**GCGGCCGC**

*Wickerhamomyces anomalus*:

**GAATTC**CAATGTGGTGGTTTACTGTTTACTCTCCTATTAAGAGAGGTATTCAAGATGTTCAAAACACT  
 GTTCCAAAGTTGCTATTATTGGTTGGGTGGTTGGGTGCATATGGCTATTATGATTGCTAAGGCTTTG  
 GGTGCTGAAGTTACTGCTTCTCTAGATCTTATTCTAAGCAAGAAGATGCTAAAAAGATGGGTGCTGAT  
 CATTTCGTTGCTACTGGTGAAGAAAAGGATTTCGAATCTAAGTTGTATGATACTTTCCATTTGATCTTGA  
 ACTGTGCTTCTTCTACTTCTGCTTTGGATTTGAATAAGTTGTTGAAGACTTTGAAGGTTAACAGATCTTT  
 TATCTCTGTTGGTTTGGCACATGTTGATGAAAAATTCGAAGTTCAACCATTCACTTTCTTTTCTAACGGT  
 TCTGCTGTTGGTCTTCTTGTGGTTCTAGAGCTGAAGCTATTGAATTGTTTCAAGTTGGCTGTTAAG  
 CATGATATTAAGCCTTGGGTTGAACTATTAAGGTTTCTGAAGCTGGTGTCTGAAGGTTTACTAGA  
 TTGGATAAGGTGACGTTAGATATAGATTCACTTTGGTTGGTTTCAACGAATTTTCCGGTACTGGTAAA  
**GCGGCCGC**

**Beta-Glucosidasa:**

*Cryptococcus sp.:*

**GAATTC**GTTATCGTTCATGATTGTTTCCAACCATTGTCTAACTGGGATTACTTCTTCTGCTTACGCTG  
 GTAACCTGGACTAACTATGGTATTGATACTCATTGTACCAAGCTTTTAAAGATTATCCTAATATGCTCTGA  
 TACCGAACAATTGCAATCTACTTGTGGTCAACAATCTTCTTTGACTACTTCTCAAGCTAAATGGCCAACT  
 ATTGTTGGTGAATTTCTATTGGTACTCAAACCTTCTGTGTTGATTACAAGTCTTGTGTTGGTTTACTA  
 TGGAAAGATATGGTTTCTAATATGACTAGATCTGATGCTTTCCAAAGAGAATTTTGGGAAGTTCAAAGG  
 ATGTTTACGAATTGGCTGCTGGTTGGATTTTCTGGAATTGGAAGACTGATTTGGCTCCAACCTGGTCTT  
 ATGAAAACGCTGTTGCTCAAAGTGGATTCCAGTTGATCCTACTGAAGTTTTGTATCCTTTCACTGCTG  
 GTGCTACTGATTGTTGGATGTTTCTTCTCCTATTGATGGTGACCAAACATTCTGCTTATGCTACTAC  
 TGCTGTTCTATTGCTAACGGTACTTCTACTCCAAGACAAATTTGGCTGTTACTTCTGGTCTACTTCT  
 ACTTCTTCTGTTAATGCTACTGCTTCTTGTACTTCTATTGCTGGTGGTTCTAAGGCTACTGCTGGTTCTA  
 CTTCCAACCTCTTCTGAAAGATTGAATATTGGTTGGATGACTTATCATTGATGGGTGCTGTTGGTATTGT  
 TATTTCTATGGCTTTGTTGGCT**GCGGCCGC**

*Candida sake*:

**GAATTC**TCTTTCATCGTTCATACTTCTTTCGATTCTTCTTGGATAAGCATAGATTTGTTTACTTGCATTC  
 TTTGATGAAGACTTCTTTCATTACTTTGTTGACTGTTGCTACTTTGGTTGCTTCTGTTCCATTGCAAGGT  
 CATAAACATCATCAACATAATTTGGATAAGAGATTGGCTGTTACTAAGGTTGTTTACGTTGATGGTTCTG  
 GTAATACTGTTACTCCAACCTGGTTTGGCTGCTCCAGAACTGAAGCTACTACTTCTGCTGCTGCTCCTA

CTTCTGCTAAGGCTACTACTTCCGCTGTTACTACTTCTGCCGGTGCTACTTCTGCTGCCGGTACTACTT  
 CTTCTAGATCTGTTTCTTCTGCTGCTGCCTCTTCTGCTGCCGCTTCTTCTTCTGCTTCTCCATCTGGTTC  
 TACTTCTTCTGGTGCTGGTGGTATTGATGGTGACTTGGCTGCTTTTTCTAACCCTTCTGGTCTTTTTGAA  
 GATGGTAAATATTCTTGTGGTCTGTTCCAACCTGGTCAAGGTGTTATTGGTGTGATTGGGTTTTCTGGT  
 TTGAATGGTGGTTGGACTTCTATTATGAATACTAATGGTGACACTTCTTCTACTTGTAAAGATGGTTTTCT  
 ATTGTTCTTACGCTTGTCAAGCTGGTATGTCTAAGACTCAATGGCCTTCTGAACAACCATCTAACGGTA  
 TGTCTGTTGGTGGTTTTGTTGTGTAAGAATGGTTTTGTTGTATAGATCTAACCCCTGATCAAAGAATTTGTG  
 TGAATGGGGTGTGATTCTGCTTCTTTCAAGTCTCAAATTTCTCAAGAAGTTGCTATTTGTAGAAGTATGAT  
 TACCCTGGTCTGAAAATATGAACATTCCAACCTTTGTTGTCTGCTGGTGGTCTAAGCCTTGTCTGTT  
 GTTGATTCTTCTTCTTACTTTACTTGGCAAGGTGGTAAAACCTTCTACTCAATATTATGTTAACAACGCTG  
 GTGTTTCTGTTGAAGATGGTGTATTTGGGGTACTGCTGGTCTGGTGTGTTGTTAACTGGGCTCCAGTT  
 GTTTTGGGTGCTGGTAAATCTAATGGTAACACTTATTTGTCTCTGATTCCCTAATCCTAACAAATAAGGATA  
 CTCCAAACCTACAATATCAAGATTGTTGGTACTGCTGGATCTTCTGTTGTTGGTACTGTAAATATGAAG  
 GTGGTTCTTATAATGGTCAAGTTCTGATGGTGTACTGTTACTGTTACTTCTGGTCTGCTGAATTTGT  
 TTTCTATGCGGCCGC

*Leucosporidium creatinivorum:*

GAATTCACTATCACTTACAAGAGATTGGATGTTGAAGAATTGTTGACTACTTTGCCTTTGTCTGTTAAGG  
 TTAATTGTTGGCTGGTCATGATTTTTGGGCTTTTCCGAATCTTCTCCTGAACATGGTATTCCACCAATTAG  
 AGTTTCTGATGGTCCTAACGGTGTAGAGGTTCTAGATTCTTCAATGGTACTCCTGCTAATTGTTTTCT  
 TCTTCTACTGGTACTGGTGCTTCTTTTGTGTTGAATTGTTGAAAGAATCGGTAAGCTTTGGGTAAC  
 GAATGTAGAGCTAAAGGTGCTCATGTTTTGTGGTCCAACCTGTAATATGCAAAGATCTCCTTTGGGT  
 GGTAGAGTTTTGAATCTTTTCGGTGAAGACTCTACTTTGTCTGGTTTGATTACTGCTGCTTATTAATG  
 GTTGCATCTCAAGGTGTTGCTGCTTGTGTTAAGCATTACGTTGCTAACGATCAAGAATTTGAAAGAT  
 TTTCTGTCGATTCTGTTGTTTCTCAAAGAGCTTTGAGAGAAATCTATTTGGAACCTTTCAGAATTGCTCA  
 AAGAGATTCTTCTCCTTGGTCTTTTATGACTTCTTATAATAGAGTCAACGGTACTCATGCTTCTGAAAAC  
 ACTCAATTGTTGGATGATATTTTGAAGAAAGGAAATGGGGTTTCGATGGTTTTGGTATGTCTGATTGGACT  
 GGTGTTTACTCTACTTCTCAATCTATTAAGGCTGGTTTTGGATGTTGAGATGCCTGGTCTACTACTATG  
 AGAGTACTGCTGTTATGAGACAAGTTGCTGCTGGTAAAATTTTTGTTGAAGATATTGACGAGAGAGTT  
 AGAAACATTTTGAATTTGGCTAACAGAGCTATTGAATCTGGTATTCCCTTTTCGATGTTGAAGAAAGTCT  
 GTTGATACTCCAGAACTAGAGCTTTGTTGAGAGAAGCTGCTGCTTCTGCTATTGTTTTGTTGAAGAAC  
 GAAAAGGAATTGTTGCCAATTTCTTCTAAGCCAAAAAAGATTGCTGTTATTGGTTCTAATGCTAAGATTG  
 CTGTCCCATCTGGTGGTGGTCTGCTTCTTTGGCTGGTACTTACACTATTTCTCCATTGGATGGTATTA  
 CTGAAGCTGCTAAAGAAATTTGGTGTGAAGTTTTCTTTGCTACTGGTGCTTCCGCTTTCAGATACTTGC  
 CATTGATTGATCCATTATGAAGAACGCTAAAGTTGAATTTTTCATCGATTCTCCAACCTGCTGATTACTT  
 TAACGATACTTCTTTTGAAGAAGACCGATTGGGAAGAAGCTACTAAGTCTTCTTTGGCTTTTATGATT  
 GATGGTGTTCATATGAAAAGTTGGGTGACGCTCCAAGATGTAGATTCTCTGCTGAATTGACTTCTGAT  
 TTTACTGGTACTTGGGATGTTTCTATTGGTCTTTGGGTTCTGCTACTTTGTTGGTTGATGGTAAAGTTG  
 TTGTTGAAAACGTTGAATCTAGAAAAGGTGGTGAATTTTTTTCGGTATGGGTTCTGAAGAAAGAAGAG  
 CTCAAATTCATTGGAAGCTGGTAAAACCTTACTTGTGGAAGTTAGACATTGGAAAGATCCTACTACTG  
 TTATCCAGGTCCATTTGCTACTTTGGATAAGGCTGCTGGTTTTAGAGTTGGTGTCTATCCATCTCAAA  
 CTGTTGAAGCTGCTAGAGATGAAGCTGTTGCTTTGGCTAAGACTGCTGATTAATGTTATTGTTGTTG  
 GACTAACGTTGATTGGGAATCTGAAGTTTTGATAGAAAGAATATCGATTTGCCAGGTGCTACTGATG  
 ATTTGGTTAAGGCTGTTTTGGCTGTTAACCCCTAACACTATTGTTGTTACTCAATCTGGTACTCCAGTTGC  
 TATGCCTTGGATTAAGGATGCTCCAACCTGTTGTTCAAGCTTTCTTTGGTGGTAATGAATTGGTAATGG  
 TTTGGCTGATATTTTGTTCGGTAAAGTTAATCCTTCTGGTAAATTGCCATTGACTTTCCCTGCTAGATTG  
 GAAGATAATCCATCTTATCATTCTTTTCGGTATTACTTCTGATACTCCTGGTAAAGTTGTCTACGGTGAAG  
 GTGTTTATATGGGTTATAGACATTACGATAGATCTTCTATTGCTCCTTTGTTTCCATTTGGTTACGGTTT  
 GTCTTATACTTCTTTTGTCTTCTGATTTGAAGTTTTCTTCTGCTTCTGCTGAAGGTGACTTCACTGTT  
 TCTTTTACTATTACTAACACCGGTAAAACCTGCTGGTAAACAAGTTGGTCAAGTTTTATGTTTCTCCACCTA  
 CTGAAGGTAGAATTACTTCTCCTATTAAGGAATTGGTTGTTTCAAGAAGGTTTTGAAAGACTGGTG  
 AAAAGAAGGAAGTTTCTGTTAAAGTTGGTAAAGAAGCTTTCTCTTATTGGGATGAACATTTGATTTCTG  
 GGTTGCTACTGCTGGTGTCTTTAAGGTTTTGGTGGTGGTCTTCTGATGCTTTGGAATTGGAAGGTGA  
 AGTTAAGTTGAAAAGACTTTTAAGTGAAGGGTTTTGCGGCCGC

*Mrakia gelida:*

GAATTCGCTGAAGCTCCAGATGGTCCAGCTAAGGATCCAAGATTGGCTCATCCTAAAGCTGGTGTTTA  
 CTTGGGTCCCTTTGGCTGATGGTGGTAATTGGAAACATGCTTTTGATAAAGCTTCTTCTTTGTTGGCTCA  
 AATGACTTTTCCAGAAAAGATTTTGTTCGCTACTGGTCATAAGGGTCCATGTGAAGGTAATATCCAGG  
 TATTGAAAGATTGGGTATTCCAAGATTTTGTATTCAAGATGGTCCAAGTGGTTTGGATTTGAAGCTTTC  
 GTTTCTCAATTTCTACTGCTCATACTGTTGCTGCTACTTGGGATAGAGATTTGATGGAAGAAAGAGGT  
 AAAGGTATTGGTAGAGAATTCGTGCTAGAGGTGTTCACTACTCATTGGGTCCAGTTACTGGTGGTCCCT  
 TTGGGTAGATCTCCATTGGGTGGTAGAAATTGGGAAGTTTCTCTCCAGATCCTTCTTGTCTTCTGTT  
 GCTTCTTACTTACTGTTAGAGCTATTCAAGAACAAGGTGTTATTACTTCTTTGAAACATTTTCATCGGT  
 ACGAACAAGAACTTTTGAAGTCTAGATGGAGAATTAATGGTACTGTTCAAACCTTTCAGACAAAATTTT  
 TTCTGATATCGATGATAAGACTTTGCATGAAACTTACTTGCATCTTTTGTGAAAGCTGTTAGAGCTGG  
 TTCTGGTTCTATTATGTGTTCTTATAACTCTATCAACGGTACTCATGCTTGTGAAAACGATCATTGTTG  
 AATAATATCCTGAAGAAGGAATTGAACCTCCAAGTTTTGTTATGTCTGATTGGGATGCTACTTGGTCT  
 AACTTTCTGCTTTGAATGGTTTGGATCAAACCTGCAAGGTCAAGTTTTTCTGTTGGTGGTGGTGGT  
 TTCGGTGGTCTTTGGTTGATTTGGTTGATGAAGGTGCTGTTCCAATTGAAAGAATTGATGATATGGTT  
 TTGAGAGTTTTGACTCCATTCTTTCATTTGGGTCAAGATAAGAAGTCTTCTGATTCTCCAAGTAAACGAC  
 CAAGAGATTTGAAGGGTGGTTTGGTGGTCAAGGTGACGAATCTGATTGCTTTCGATGATGAATTGA  
 CTGATGATATTCCTGATGTTCAAGGTGACCATTGGAAGATTATTAGAAAATTGGTGAGGAATCCATCA  
 CTTTGTGAAAACCTCTCATCATTCTTGGCCAATTAAGAAGTCTACTACTAGAAGATTGGCTGTTTTGG  
 TTCTGATGCTGGTCCATCTAGATACGGTTTGAAGCTTGTGGTACTGATAACTACTGTCATGATTTGAC  
 TAGACCTTATTTTTGGCCAGGACTGTTACTACTGGTCTGGTTCTGGAAGTCTTGGGCTCCTTATGT  
 TATTAATCCATTGGAAGCTATTACCAGAAGACTAGAAGATCTCATACTCAAGTTGATTGGGTTTTGGA  
 AGATACTGCTTACGATTACATTAATATCACTGCTTCTAGAGCTGAACAATTTTTGTTTTGTTTCTTCTT  
 TCGTTTTGAAAGTTATGATAGAGATAACTTGGCTTGTGGAACGATGGTGACAGATTGATTGAACTG  
 TTGCTTCTCATTGTGCTGAAACTGTTGTTGTTATTCTCCTGGTCCAGTTTTGATGGAAGATGGAT  
 TGATCATGAAAACGTTACTGCTGTTTTGATGGCTTATTATCCAGGTCAAGAATCTGGTAATGCTGTTACT  
 AATGTTTTGTTCCGGTGACATTTCTCCATCTGGTAAATTGCCATTCACTTTGGGTAATCTTTGGAAGATT  
 GGCCACCTTACGGTATTATTGATGAATTGGTTGATCAACCTAACGCTACTTTCCAGAAGGTAACCTGG  
 TTGATTACAGATACTTTGATGCTAATAAGATCGAACCTAGATTTGAATTTGGTTTTGTTTCTTACAC  
 TTCTTTTGAATACGGTAAAACCTACTGTTAAGGCTAAGCATTTTGAAGATTCTAAGGCTTGAACCAACT  
 AATGAAAAGTACGAAGGTAAGGTGGTTTGTACGATCAATTGATTTGGTTTCTGTTGATGTTACTAACA  
 CTGGTAGAAGAGCTGGTTCCGAAGTTGCTCAATTGACTTACTTTTCTTCTACTCCTTCTCAAC  
 CTCCATTGTTGTTGAGAGTTTTGATAAATTGATTTGAAGCCTGGTCAAACCTAAGACTGCTCATTTC  
 CATTGAGAGCTAAAGATTTGTCTGTTTGGTCTGTTGAAAAGCAATCTTGGTCTATTCTGAAGGTGAAT  
 TGGTTGCTAGAGTTGGTGCCTTCTAGAGATTTGGGTGAAGCTGTTGGTTTCCAGAATTGCGGGC  
 GC

*Phenoliferia glacialis:*

GAATTCGAAGTTTACGGTATTAACGGTCAATGTGGTACTAGAAGAGATGGTTTGGATGGTGTACTTCT  
 GTTGATTCTGCTACTAAACCAACTTCTGCTGAATGTGGTTTGGTTACTACTTCTTCTACTAATCCATTGA  
 CTAATGCTTCTTTGTTTACTGGTAAAAATATGACTTTGCCTTATGGTATTGGTCTTCTGTTGGTCA  
 TTCTTTGCATAAAAAACGTTGGGCTGTTTCTGTTGATGTTGCTAATTCTGGTACTGTTGATGGTTGTGAA  
 ATTCCTCAATTGTATTTGGTTTCCCTCCACATGCTGGTGAACCTCAAAGGTTTTGAGAGGTTACGCT  
 AGAATTAATTTGCAACCTAACTGACTCAAACCTGTTACTTTTCAATTTGTCTAGATACGATTTGTCTATCTG  
 GGATGTTTTGAGACAAAGATGGAGAATTGAGAGGTACTACACTATGTTGGTTGGTAAAGGTG  
 CTTTCCATGAAAAGGCTGTTAAAGGTGTTTTGGAATGGGATGTTATCTATCCTGATCATCATGAAACGGC  
 CCGC

*Tetracladium sp.:*

GGTACCGGTAGAAATTGGGAAGTTTTCTTCTGATCCATACTTACTGGTGGTGGTATGACTGAAACT  
 ATCAAGGTATTCAAGATGCTGGTGTCAAGCTGCTTCAAGCATTATTTGGTAATGAACAAGAGATC  
 CAAAGAAATAACAACATTTTCCAAACTTCACTGTTCAATATGAAGCTATTTCTTCTAACATCGATGATA  
 GAACCTTCCATGAAATCTATTTGTGGCCATTCGTAATGCTGCTAGAGCTAAATCTGCTTCTTTCATGTG  
 TTCTTATAACAGAAATTAACGGTTCTTACGCTTGTCAAACCTGAAACTTTGAATGATTTTGAAGGTT  
 GAATTTGGTTTTCCAAGGTTACGTTATGTCTGATTGGTTGCTGTTTCACTTCTGGTGGTGGTGGTGGT  
 GCTGGTTTTGGATATGGATATGCCTGGTTTTACTTTGCCTTATTTGTTGGGTCAAATTACTTCTTCT  
 TTGGTGACAACGTTGTTAACGCTGTTAATAACGGTTCTTGTCTGTTGATAGATTGGATGATATGATTGT  
 TAGAATCATGACTCCATATTACGCTTTGGGTCAAGATCAAGATTTCCCATCTAGAGATCCAGCTTCTGA

AAGAGTTAATGGTTTTACTCCACCTAGATTGTACACTAACGATTGGTCTCCTTACTTGACTGGACCTTCT  
 GATAGAGATGTTAGACAAGATCATGGTGAATTGATTAGAAAACAAGCTGCTGAATCTACTGTTATGTTG  
 AAAACAACGGTTCTTCCATTGCAAAACATTAGACATATTGCTGTTTTCGGTAATGATGCTGGTGAC  
 CCATTGTTGGGTCCATTGAATCAAGAAAATTACGAATATGGTACTCTGGCTATTGGTGGTGGTTCTGGT  
 GCTGGTCAATTCACTTATTTGATTTCTCCTTTGGATGCTTTGAAGAATAAGGCTGTTGAAACTGGTGTCT  
 ACTATTGAGTACTGGTTGAACAATACTTACTTTGGCTTCCACCTACTGTTACTGGTTGGGTGGTGGT  
 GGTTTTCTTAGATCTATTACTCCAGATGTTTGGTTTTCTTAAGGGTTGGGCTGCTGAAGGTGTT  
 GATAGAGATACTTTGGATTTGGATTGGCAAGCTAATTCTGTTGTTGAAAACGTTGCTTCTAGATGTAATA  
 ATACTGTTGTTGTTACCCATTCTTCTGGTGTAAATAATTTGCCTTGGGCTAATCATCCTAACGTTACTGG  
 TATTTTGATTGCTCATTACCCTGGTCAAGAATCTGGTAACTCTATTGTTGATGTTTTGTTGGTGACGTT  
 AATCCATCTGGTCATTTGCCATATACTATTGCTTTGAACGGTACTGATTACAACGCTCCTGTTATTACTG  
 GTATTAACACTACTGGTACTGATGATTGGCAATCTTACTTTACTGAAGAATTGGAAGTTGATTACAGATA  
 TTTCCGATCTAATAACATCGATGTTAGATACGAATTTGGTTTTGGTTTGTCTTATACTACTTTCAACTG  
 CATGATTTGTCTGTTGACGCTGTTGATTTCTTCTGATATTACTGCTTTGCCAGAAAATAGACCTATTGAAC  
 CTGGTGGTAACCCAGCTTTGTGGGATGTTATCTATAGAGCTCAAGTTTACGCTACTAACACTGGTGAC  
 GTTAGAGGTCATGTTGTTCCCTCAATTGTACGTTACTTTCCCTTCTTACTCCATCTGGTACTCCACCAA  
 GACAATTGAGAGGTTTTGATAAGGTTGATGTTGCTCCTGGTGAAGAAGAAGCTGTTACTTTGATTGTA  
 TGAGAAGAGATTTGTCTTATTGGGATGTTACTGCTCAACAATGGAGAATTCCTGCTGGTGAATTCATA  
 TTCATGTTGGTTTTGCTTCTAGAAACTTTGTTGACTAACACTACTTTGACTGTTATTGAAGGTGGTCTTC  
 TGGTAACTCCACTATGAGAAGAAGATGG**GCGGCCGC**

*Vishniacozyma victoriae*:

**GAATTC**AAGCCTTCTGATGTTGATGAATGTGTTGGTAGAATTTTGAATTCGTTAGACATGCTCAAGAAT  
 CTGGTATTCCATTGAAAGCTAAAAGAAGGTAATGATACTCCTGAAGTTCATAACTTGTGCAAAAAG  
 CTGCTGATGCTTCTATTGTTTTGTTGAAGAATGAATCTAACGCTTGCCTGTTACTCCAGCTCCTGGTTT  
 GAAGATTGCTGTTATTGGTTCTAACGCTAAAACCTCCTTACGCTGGTGGTGGTTCTGCTAACTTGT  
 GCCAACTTATACTGTTACTCCTTTGCAAGCTATTGAAAGAGTTGCTGCTGAAATGAATGGTACTGTTCA  
 ATGGGAAATGGGTGTTGATACTGCTAGATGGACTCCTTTGTTGACTGATTTTTCTTTCTTTGTCTGATAA  
 GGTGAAGAAGCTTCTATTGTCAGAGCTGAATTTTTCGATGTTGATCCTTGGTCTAACCCCTTCTTCTAA  
 GCCATTGTTGCTAAGGAAAACAATTCTGCTTTTACTTTACTTTTCATCGATGTTTTCAAAAGAAGTTCCCT  
 GTTAGAGGTTATATTTCTTTGAAGACTTCTTTCACTCCAAGTCTTCTGGTCCATGGGAATTGGGTTTG  
 GGTGTTGCTGGTCAAGCTGATTTGTATGTTAATGGTGAAGAAGTTATCGACAACACTACTGATCAAAA  
 GCTGGTTTGTGTTCTTTACTACTGGTCTGAAGAAGAAGTCTTTGTATTCTTTGCAAGCTGGTAGA  
 GTTTACGCTTTGGAAGTTAGATTCTCTAACTTTAAACCATTGTCTGCTCAATCTCCATATACTGGTAGAA  
 GAGGTGGTATTAGAATTGGTGGTAGACCAGTTAGATCTGCTCAAGATGAAATTGCTAAAGCTGTTAGAT  
 TGGTAGAGCTCTGATGTTACTATTGTTGTTATTGGTACTACTACTGAATGGGAATCTGAAGCTTATG  
 ATAGAGATGATGAAGTTGCCAGGTGCTACTGATGATTTGGTTAGATCTATTTTGCAAAAGAAGTTCTTA  
 ATGCTATTATTGTTAATCAATCCGGTATGCCAGTTGAATTGTCTTGGTTGGATCAAGCTCCAAGTTTGT  
 GCAAGCTTTCTCGGTGGTAACGAATGTGGTACTGCTATTGCTAATGCTATTTTTGGTAAAGGTAACCC  
 TGGTGGTAAATTGCCAGTTACTTGGCCAGTTTCTTTGGATGATTATAAACATGTTGAGTTCCGTAACGC  
 TGTTACTACTGTTTATACTGAAGGTTTGAATGTTGGTTATAGATGGTTTGTGCTCCTGGTAGACCAAA  
 GTCTGCTTTTCTTTTGGTTTTGGTGGTCTTATACTACTTTCCAATTCTCTAATCCAAAGTTGATTTCTT  
 CTGGTACTGTCAAGTTGTTATTGCTTTTCGATATTAAGAACAAGTGGTAAATGGCTGGTCTACTGTTG  
 GTCAAGTTTATGTTTCATCAAGCTAGACCATCTGTTGAAAACAGATGTTGAATTGGCTGGTTTCGCTA  
 AGTTGACTTGGAACTGGTGAATCTAAGACTACTTCTGTTACTTTGGATCATAAGGCTTTTTCTTATTA  
 CAACGTTAGAAGATTTCTGGGTTGCTGAAGCTGGTACTATGAAATTAGAATTGGAAGTTCTTCTAG  
 AGATATCGTTTTGACTAGACCATTTCAATTTGGAAGAATCTGGACTTGGACTGGTTTGGAGCTCCTAG  
 AGTTTT**GCGGCCGC**

*Wickerhamomyces anomalus*:

**GAATTC**GATCCAAATGAATACGTTTTCCAGAAGGTTTCGATAAATTGGCTAAGGTTACTTACCCATATA  
 TTGATGATGCTTCTTCTATTAAGCCAAACTCTTCTTATGATTACCCAGAAGGTTACTCTACTAAGCAATT  
 TGATGGTCCAGTTCTTTGGCTGGTGGTGGTTTTGGTGGTAAACCCTCATTGTGGGATATTGGTTACG  
 TTGTTACTGCTAAAGTTACTAATGAAGGTCCATATTTCCGGTGGTTTTGCTCCTCAATTGTACGTTAAGTA  
 TCCAGATAATGAAGAATTTCTACTCCACCAGTTCAATTGAGAGGTTTTGAAAAGTTTTCTTGATAAG  
 GGTTACTCTGAAACTGTTTCTTTGCAATTGACTAGAAAAGATTTGTCTGTTGGGATACTAAAACCTCAAT

CTTGGATTGTTTTGAGAGGTGAATACAAAATCTATGTTGGTCATTCTTCTAGACAATTGGATTTGGTTTC  
TACTTTGACTTTGGAAGCGGCCGC

**Glucoamilasa:**

*Tetracladium sp.:*

GAATTCCTCAAGTTGTTTTGCTTTGCCAAACCAAAAAAGAGATGTTGATTCTTTCATCGCTAGAGAAT  
CTCCAATTGCTTACAACGGTATTTTGTGTAATATCGGTCCTTCTGGTGCTTGTGTTTCTGGTGCTGGTT  
CTGGTTTGGTTATTGCTTCTCCATCTAGAAATGATCCTCCTTACTTTTTCACTTGGACTAGAGATGCTGC  
TTTGGTTTTCAAGTATTTGGTTGATAGATTGTTGAAACTTACGATTCTTCTTTGCAAATTCAAATCCAAA  
GATACATCACTTCTCAAGCTAAATTGCAAACCTGTTATTAACCCATCTGGTGGTTTGGCTAACGGTGGTT  
TGGGTGAAGCTAAATACAACGCTGATGGTACTCAATTCCTGACTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT  
GGTCTGCTTTGAGAGCTACTGCTTTGATTACTTACGCTAAGTGGTTGGTTGCTAATGGTTACACTTCT  
ACTGCTCAATCTTTGGTTTGGCTGTTATTAGAAACGATTTGTCTTACGTTACTCAACTGGAACCAAA  
CTGGTTTCGATTTGTGGGAAGAAGTTAGAGGTTCTTCTTTCTTACTATTGCTGTTTCTCATAGAGCTTT  
GGTTGAAGGTTCTGCTTTGGCTGCTCAATTGGTACTTCTTGTACTTACTGTGATTCTCAAGCTCCTCA  
AGTTTTGTGTTTTCTCAAAGATTTTGGCAACCAATAACGGTGGTTATTTTTGTCTAATATCAACGTTA  
ACGACGGTAGATCTAAAAGGATGCTAATTCTATTCTGACTTCTATTCATAACTTCGATCCAAATGTTGG  
TTGTGATGCTACTACTTATCAACCATGTTCTGATAGAGCTTTGTCTAACCATAAGGCTGTTACTGATTCT  
TTCAGATCTATCTATGGTATTAACCTCTGGTAAAGGTGCTGGTCAAGCTGTTGCTGTTGGTAGATATGCT  
GAAGATGTTTACTACGGTGGTAATCCTTGGTTCTTGGCTAATTTGGCTGCTGCTGAACAATTGTACGAT  
GCTTTGTACACTTGAACAAGCAAGGTTCTATTACTGTTACTTCTGTTTCTTTGGGTTTCTCAGAGATT  
TGGTTTCTTCTGTTAACGTTGGTACTTATCAATCTTCTTCTTCTTGTACTACTATCTATAACGCTGTT  
AGAGTTTACGCTGATGGTTATGTTGCTATTGTTGAACAATACGCTGAAGCTGATGGTGGTTTGGCCGA  
ACAATTCAACAGAAACAATGGTTCTCCATTGTCTGCTGCTGATTTGACTTGGTCTTACGCTGCTTTTCTT  
ACTGCTGCTGATAGAAGAAGAGCTGCTGTTCCCTTATCCTTGGATTGTTCCATCTGCTACTAATGTTCCCT  
GGTCAATGTGTTGCTACTTCTGCTTTCGGTACTTACTCTGCTGCTCCAACCTTCTACTTTTCCACCTAACC  
AAACTCCTACTGGTGGTGTTCCTACTACTACTGCTAGACCTACTTCTACTGGTACTAGAACTACTACTT  
CTGGTGCTCCTTGTGCTACTGCTACTACTGTTGCTGTTACTTTCAACGTTTTGGCTACTACTCAATTTG  
GTCAAATTAAGGTTGTTGGTAACAACGCTGCTATTGGTAATTGGAACACTGGTCTGCTGTTTCTT  
TGTCTGCTTCTCAATACACTTCTTCTAATCCATTGTGGACTGGTACTGTTAATTTCCAGCTGGTACTGC  
TTTGCAATTCAAATTCATTAATGTCGCTGCTAATGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT  
TTTACTGTTCCAAGATCTTGTCAAACCTTCTACTTCTATTAACACTTCTTGGCAAGGTGCGGCCGC

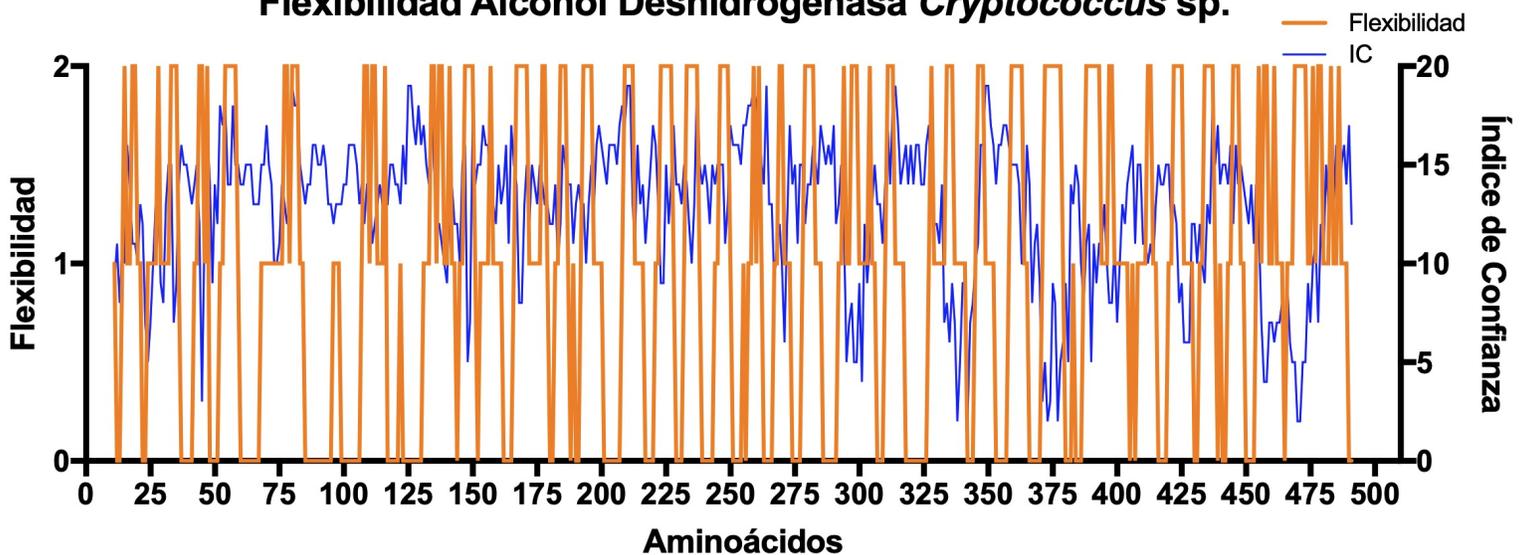
## Sección 2: Gráficos de flexibilidad estructural:

Se muestran los gráficos construidos a partir de los datos obtenidos del análisis de las secuencias aminoacídicas de las enzimas en estudio por el programa PredyFlexy. A cada residuo se le asigna un valor discreto desde el 0 al 2, siendo 0 (rígido), 1 (intermedio) y 2 (flexible); estos valores se muestran graficados en naranja. El índice de confianza (IC) consiste en valores discretos desde el 1 al 19, siendo más confiable la predicción mientras mayor sea el valor del IC. Este se muestra en azul en los gráficos.

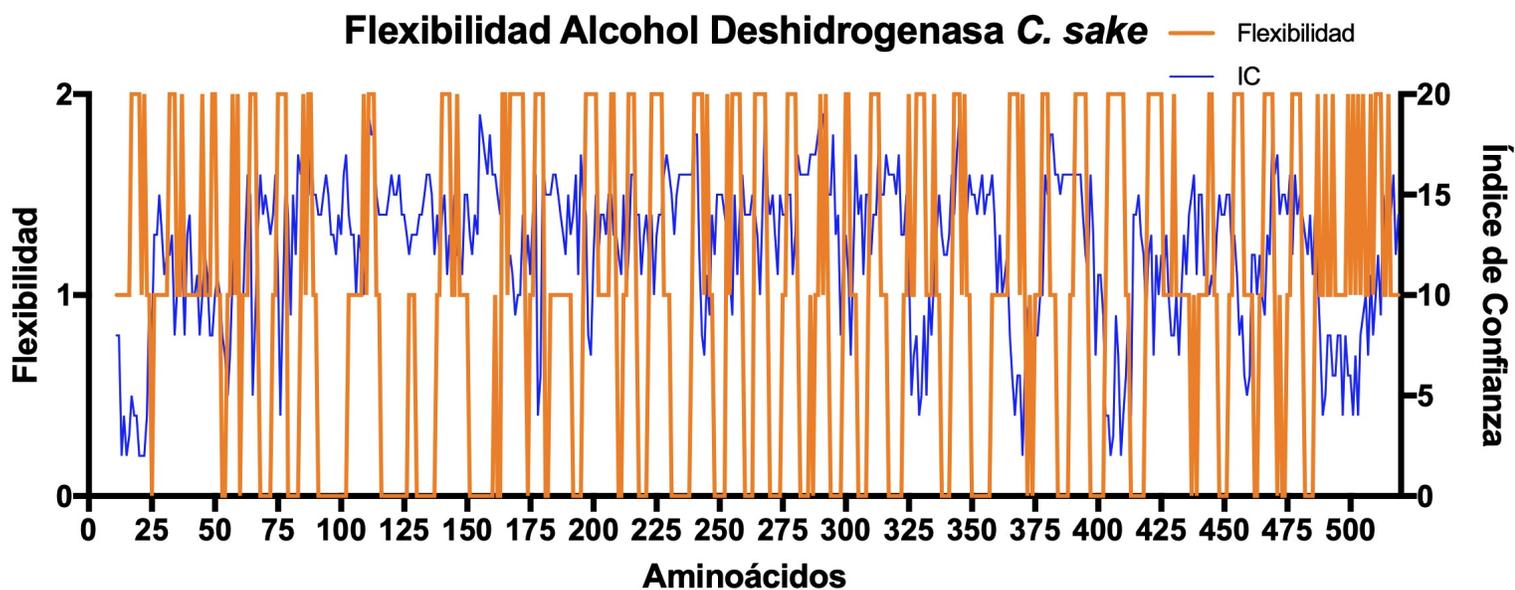
### Alcohol deshidrogenasa:

*Cryptococcus* sp.:

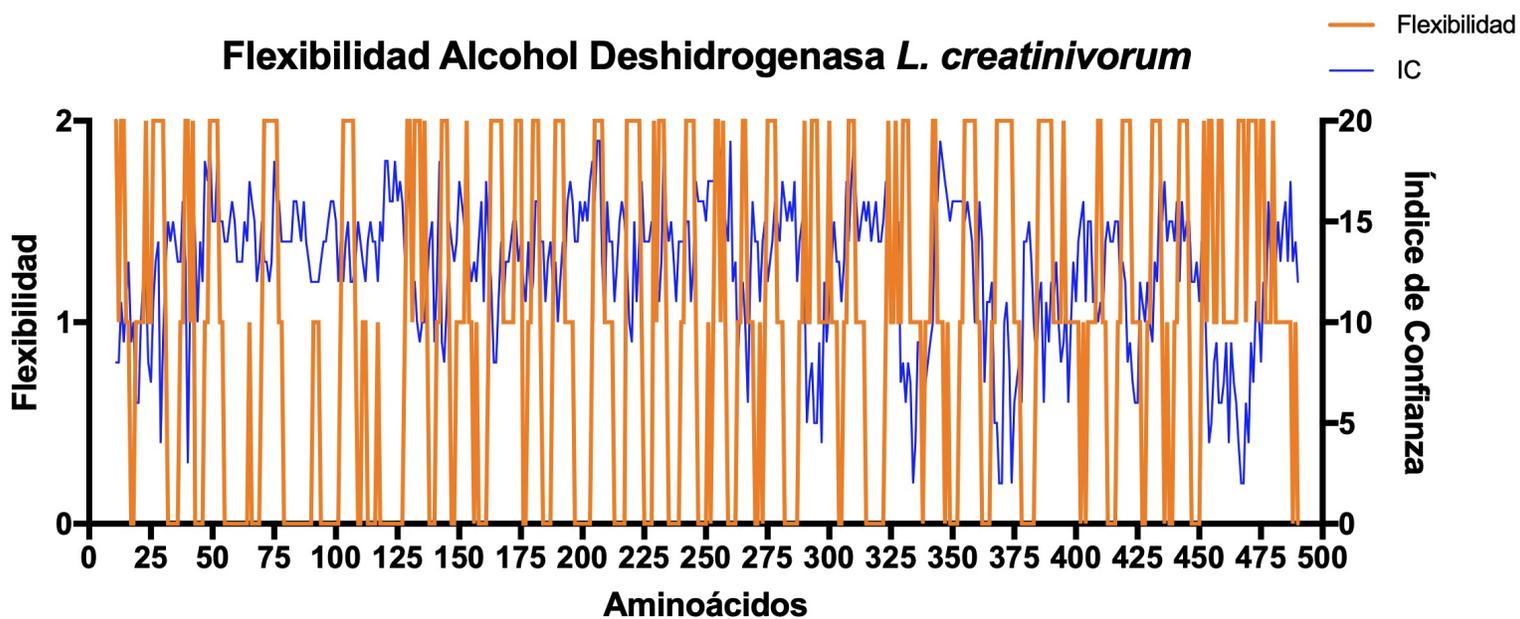
#### Flexibilidad Alcohol Deshidrogenasa *Cryptococcus* sp.



*Candida sake*:

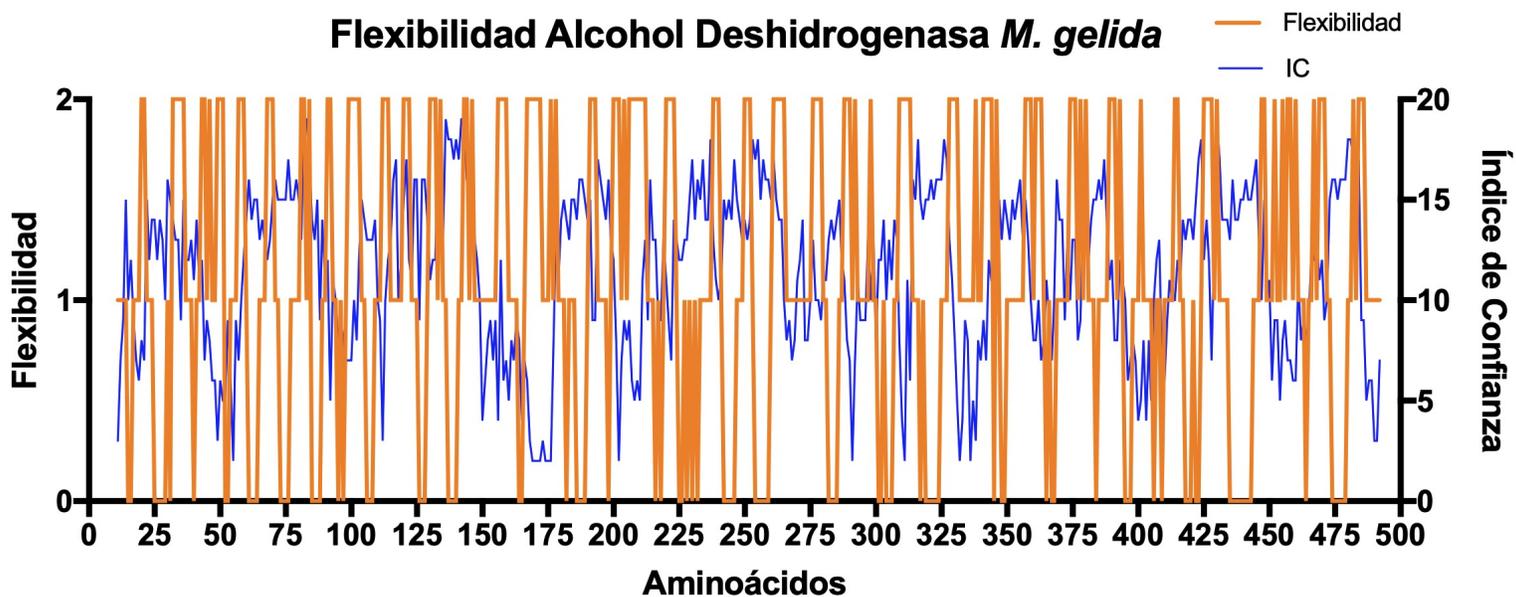


*Leucosporidium creatinivorum*:



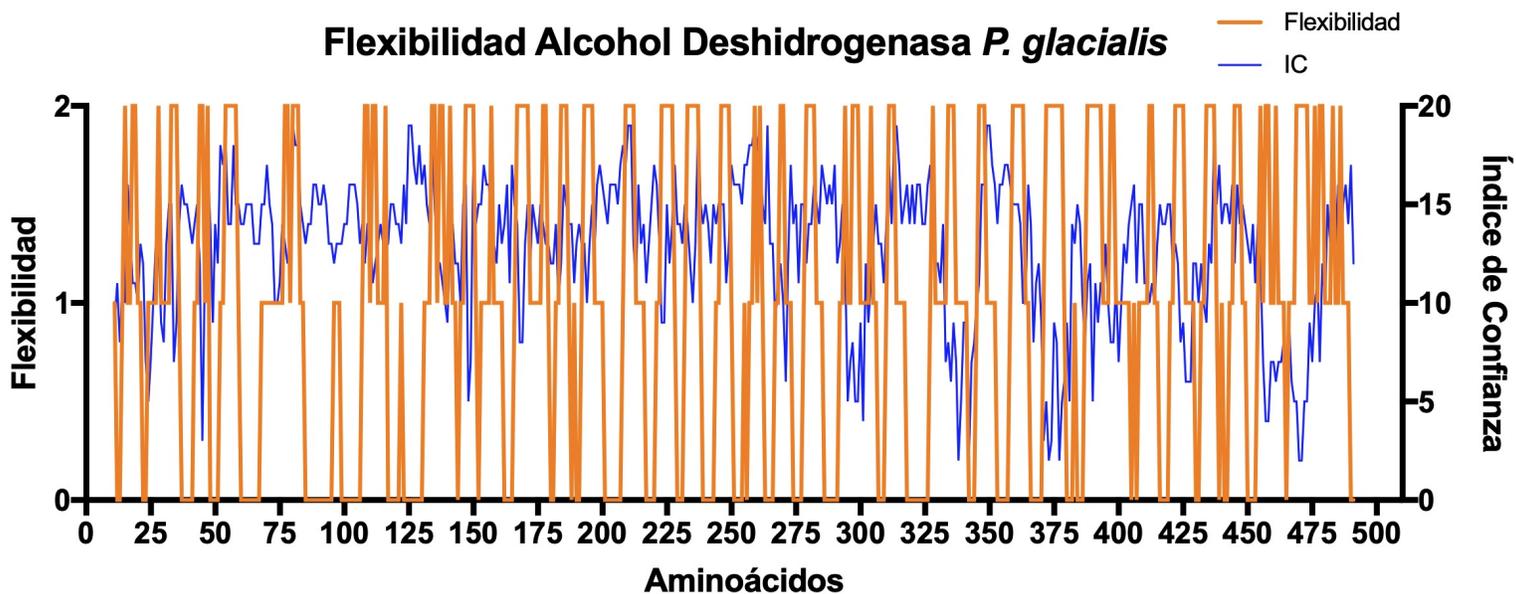
*Mrakia gelida*:

### Flexibilidad Alcohol Deshidrogenasa *M. gelida*

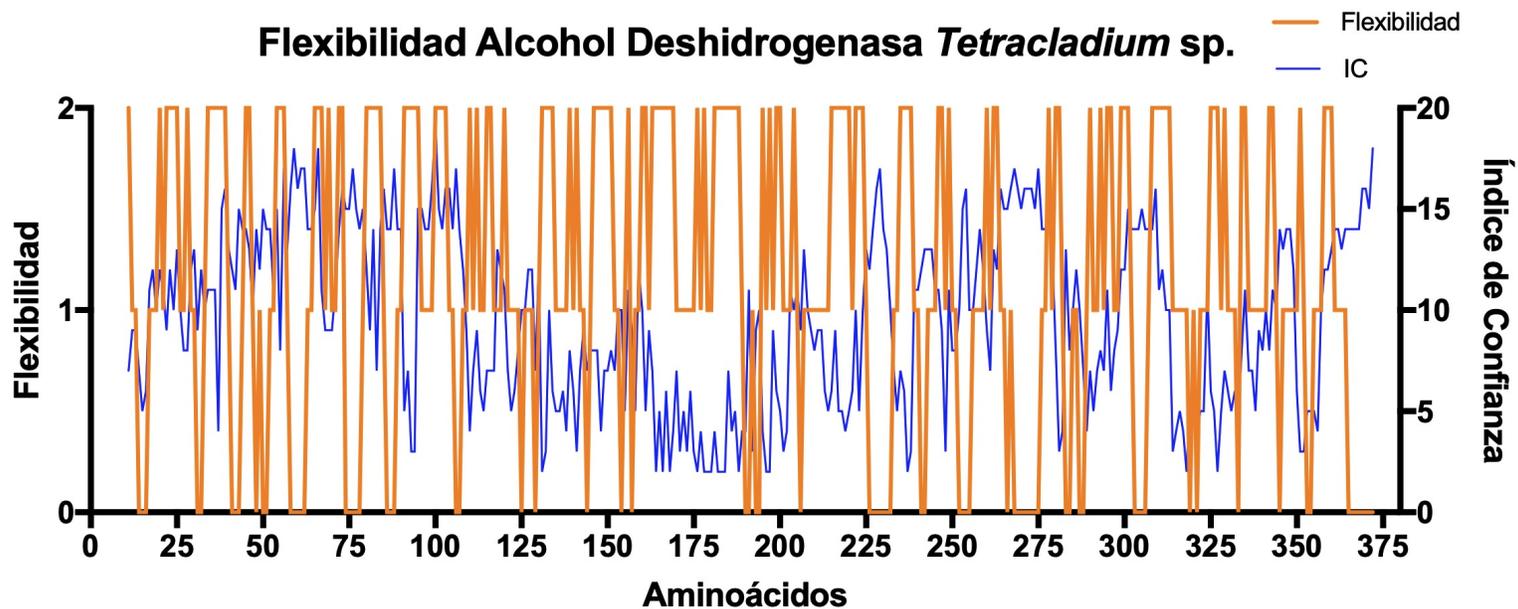


*Phenoliferia glacialis*:

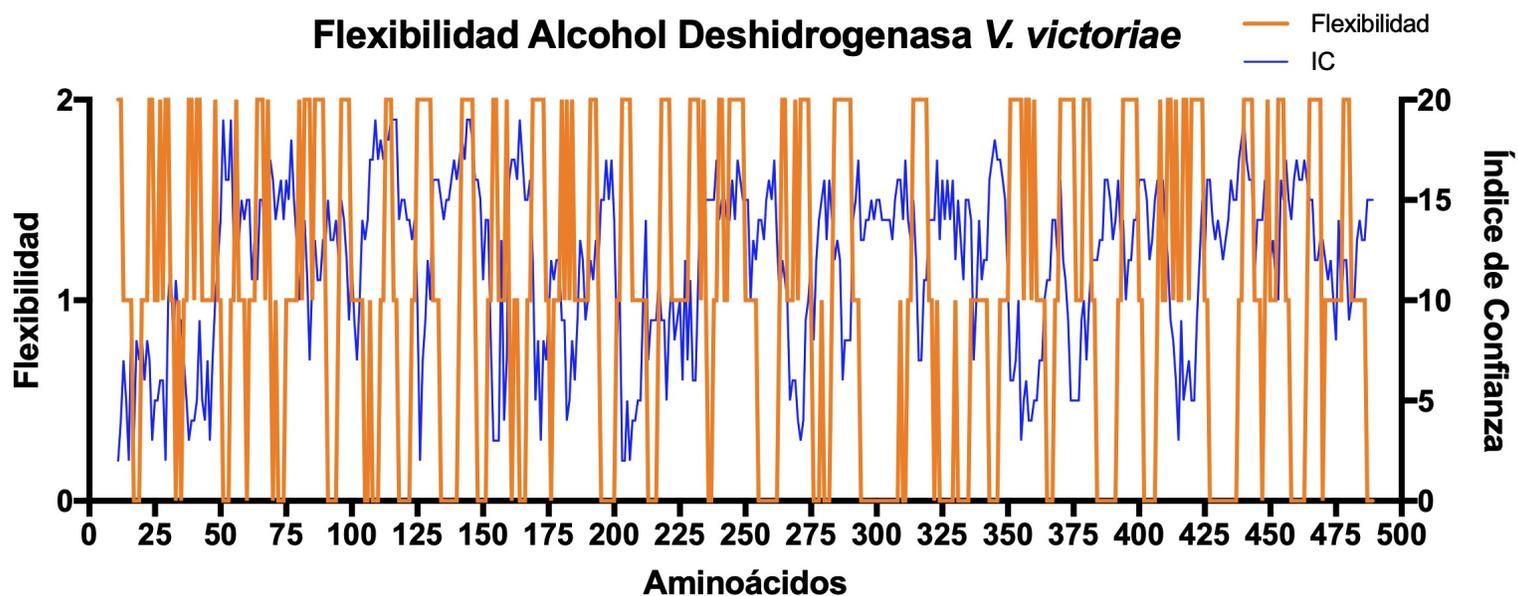
### Flexibilidad Alcohol Deshidrogenasa *P. glacialis*



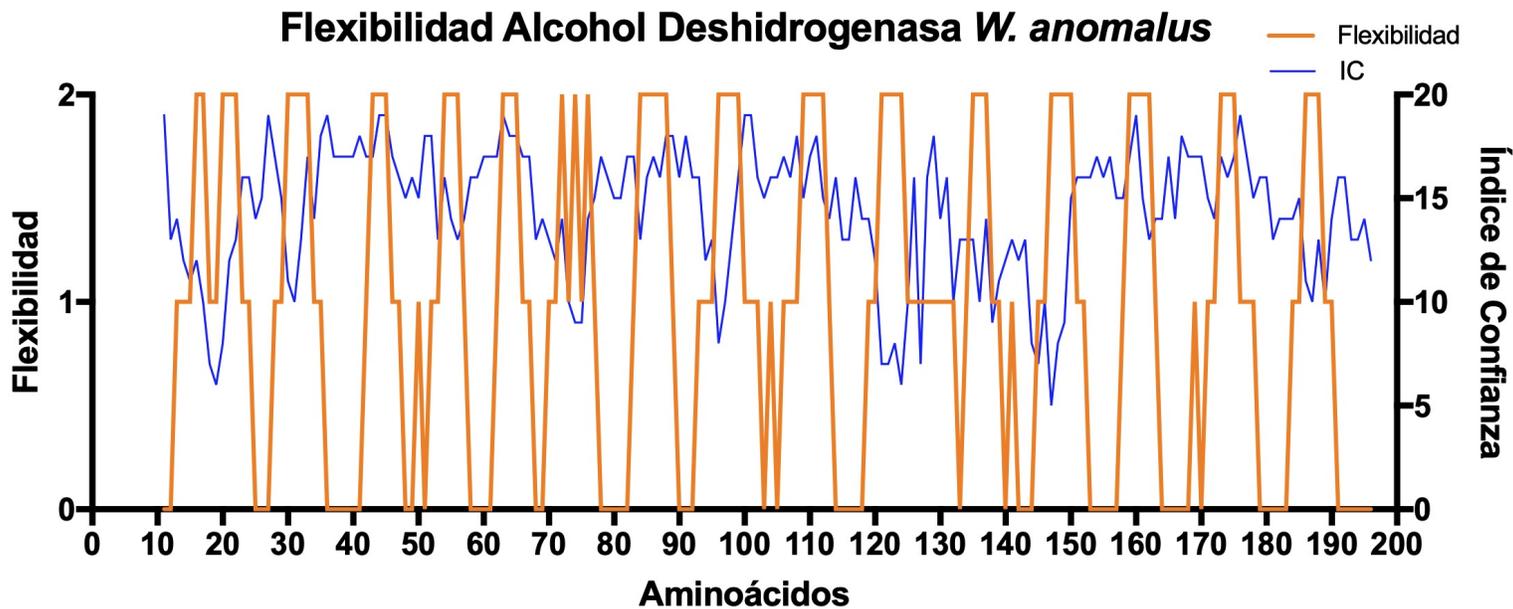
*Tetracladium* sp.:



*Vishniacozyma victoriae*:

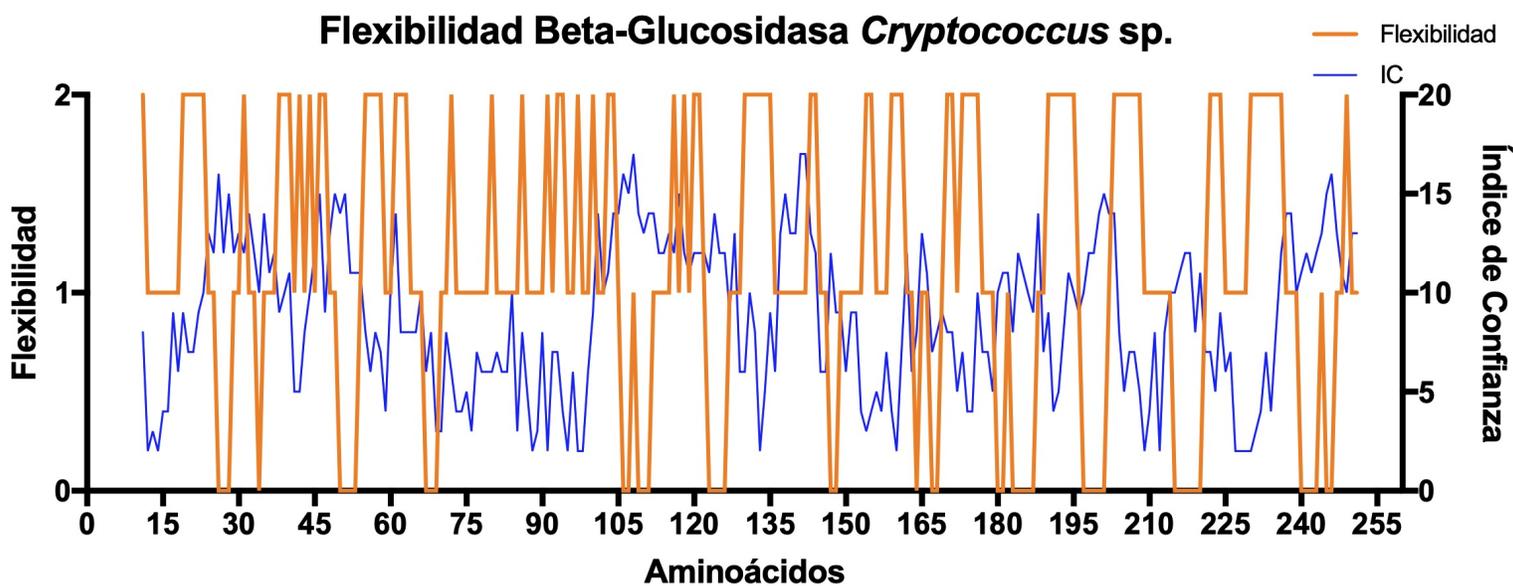


*Wickerhamomyces anomalus*:



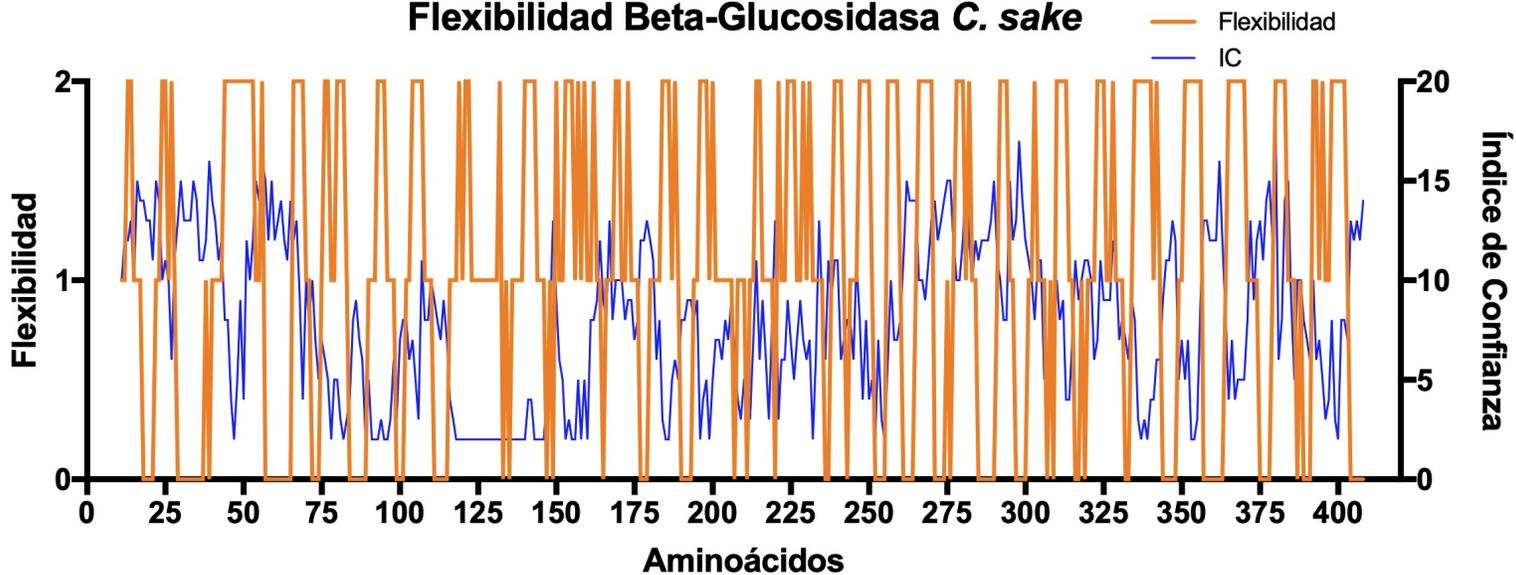
Beta-Glucosidasa:

*Cryptococcus* sp.:



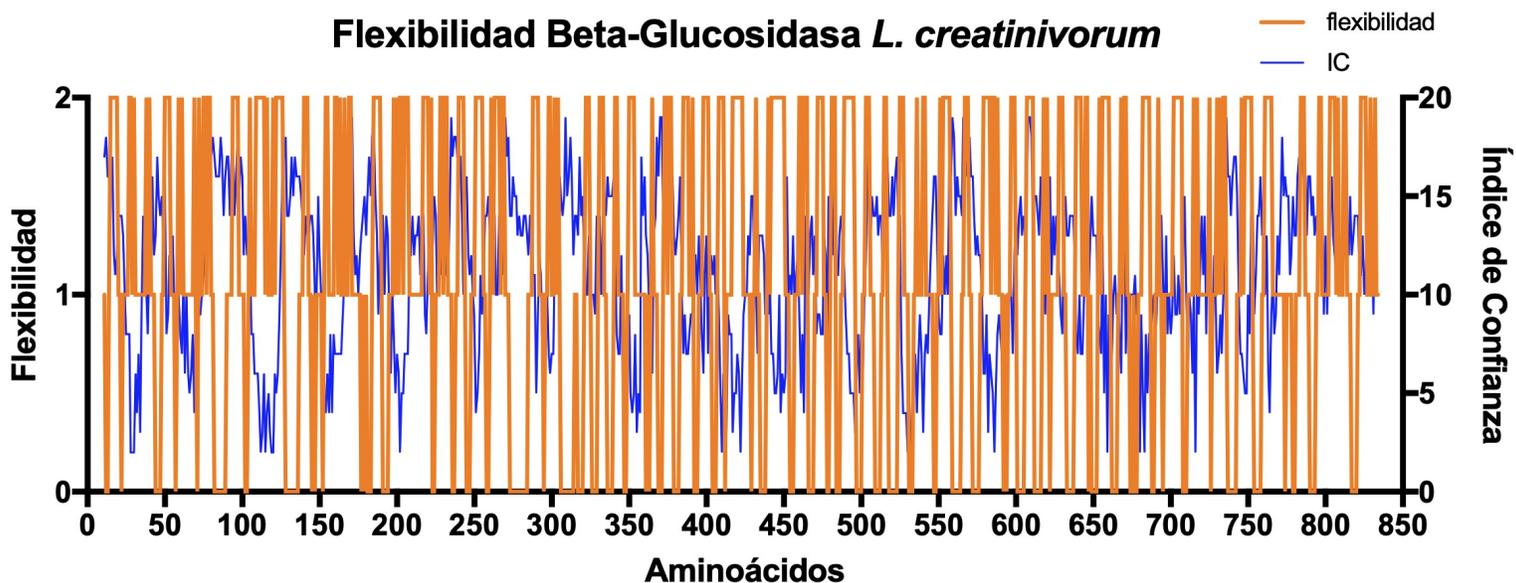
*Candida sake*:

### Flexibilidad Beta-Glucosidasa *C. sake*



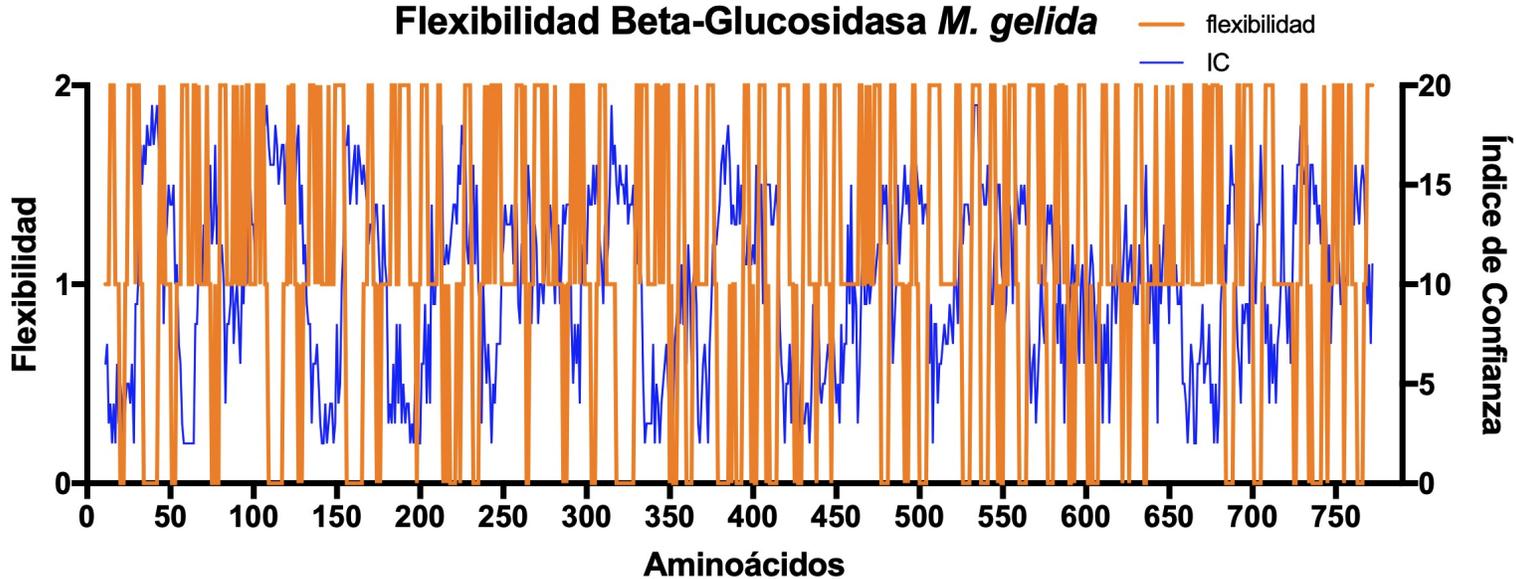
*Leucosporidium creatinivorum*:

### Flexibilidad Beta-Glucosidasa *L. creatinivorum*



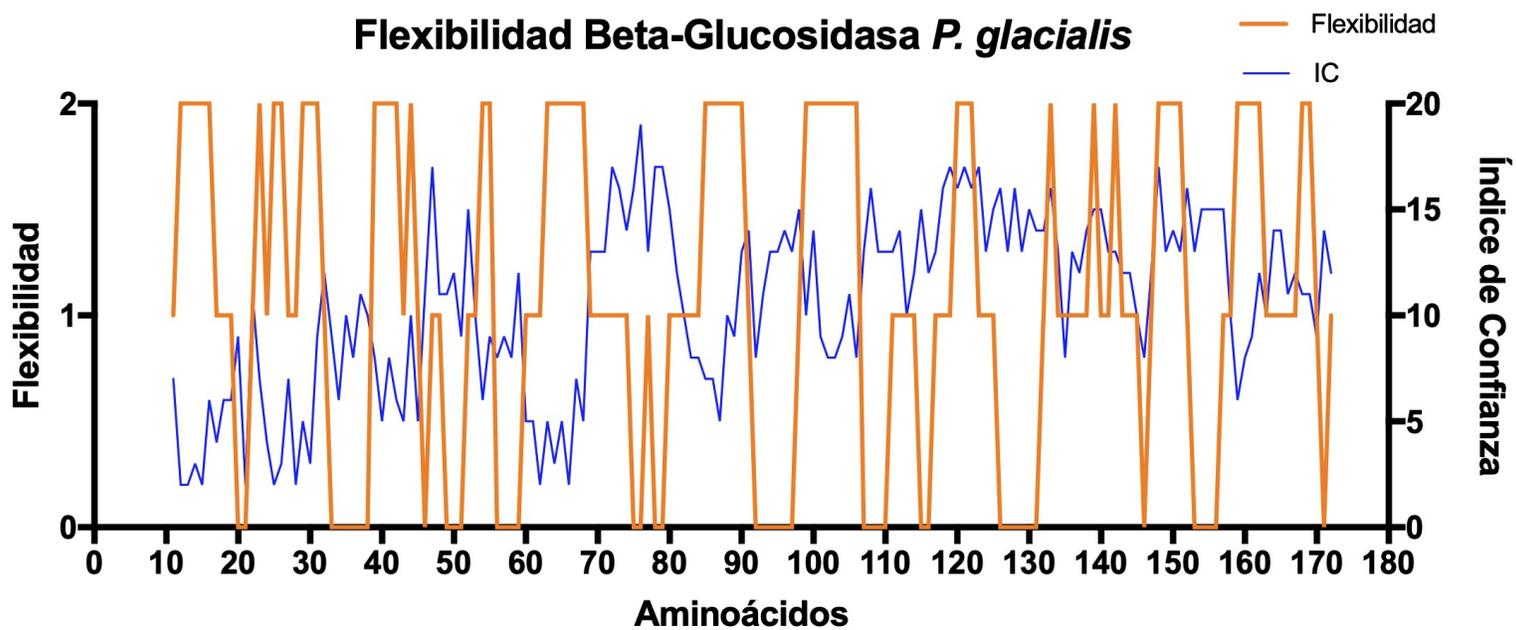
*Mrakia gelida*:

### Flexibilidad Beta-Glucosidasa *M. gelida*



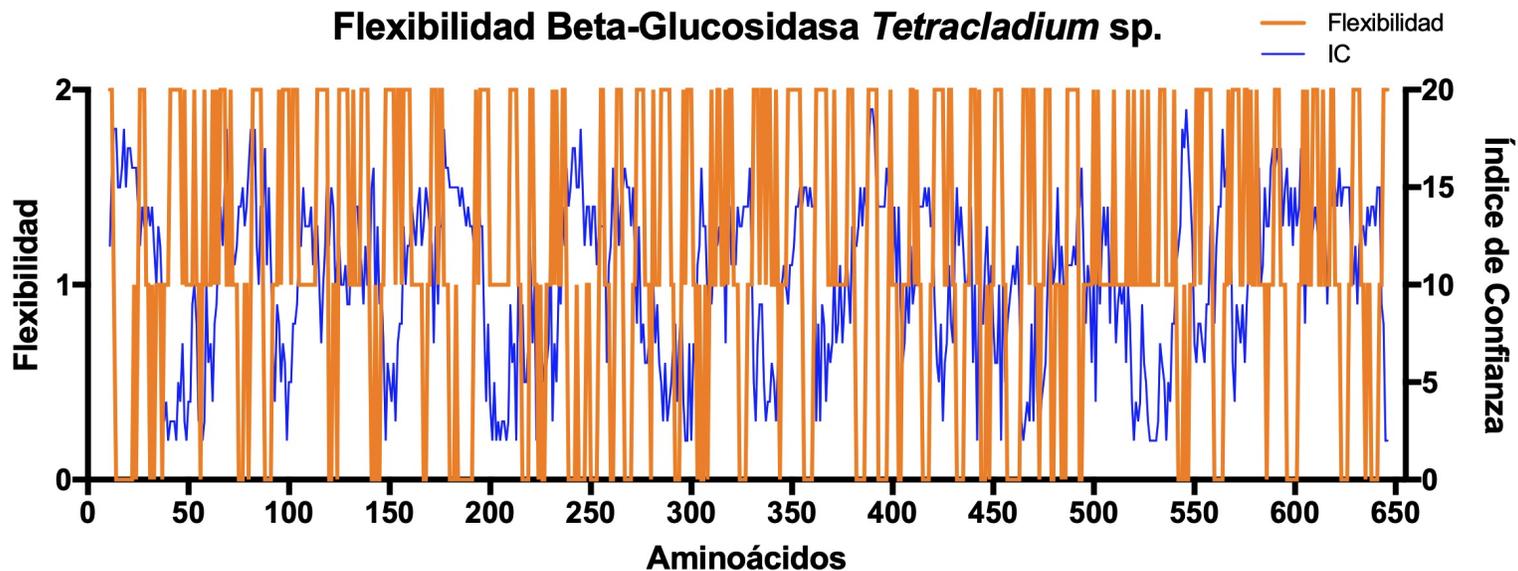
*Phenoliferia glacialis*:

### Flexibilidad Beta-Glucosidasa *P. glacialis*



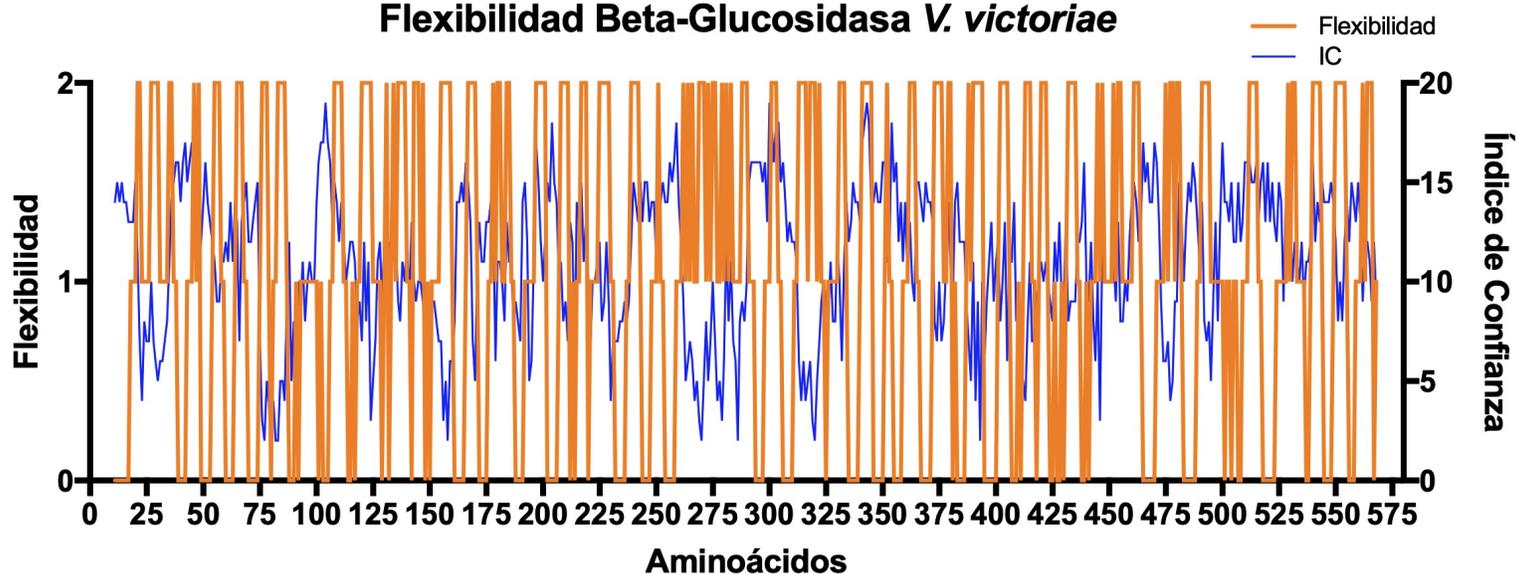
*Tetracladium* sp.:

### Flexibilidad Beta-Glucosidasa *Tetracladium* sp.



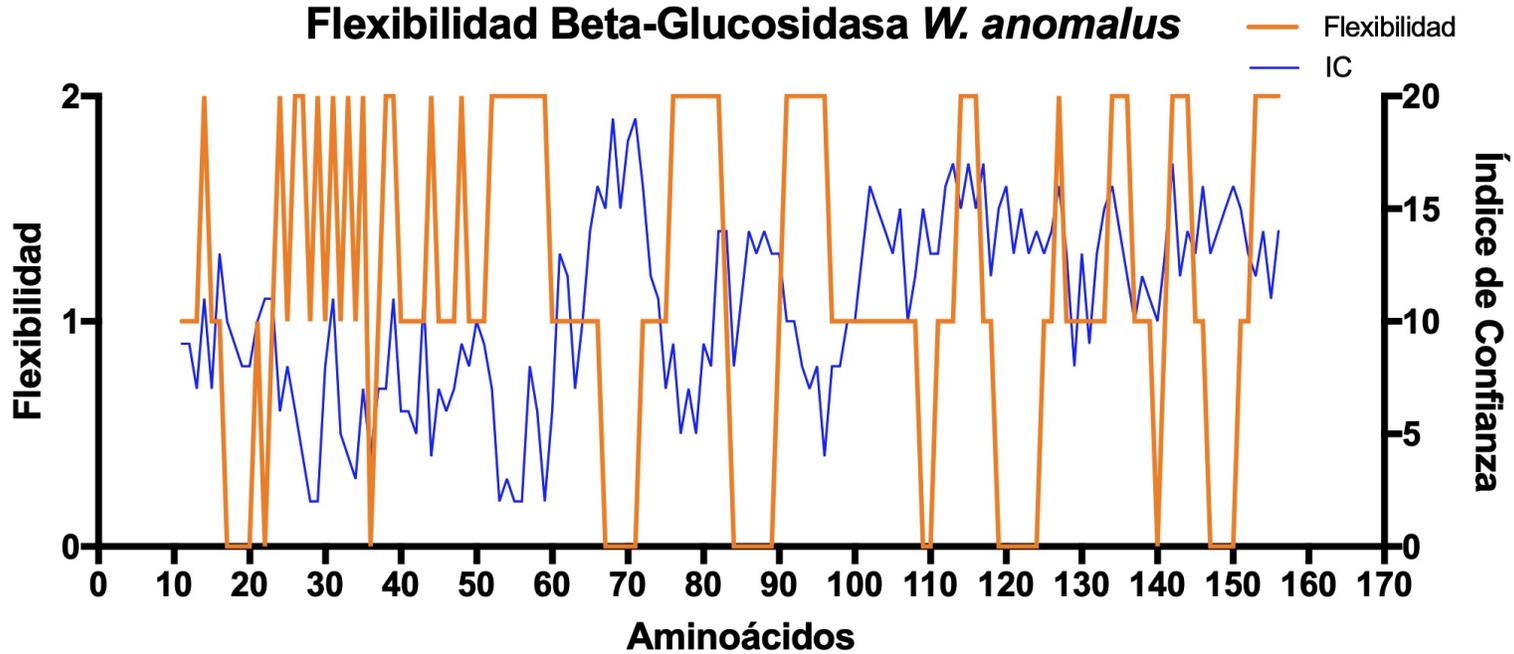
*Vishniacozyma victoriae*:

### Flexibilidad Beta-Glucosidasa *V. victoriae*



*Wickerhamomyces anomalus*:

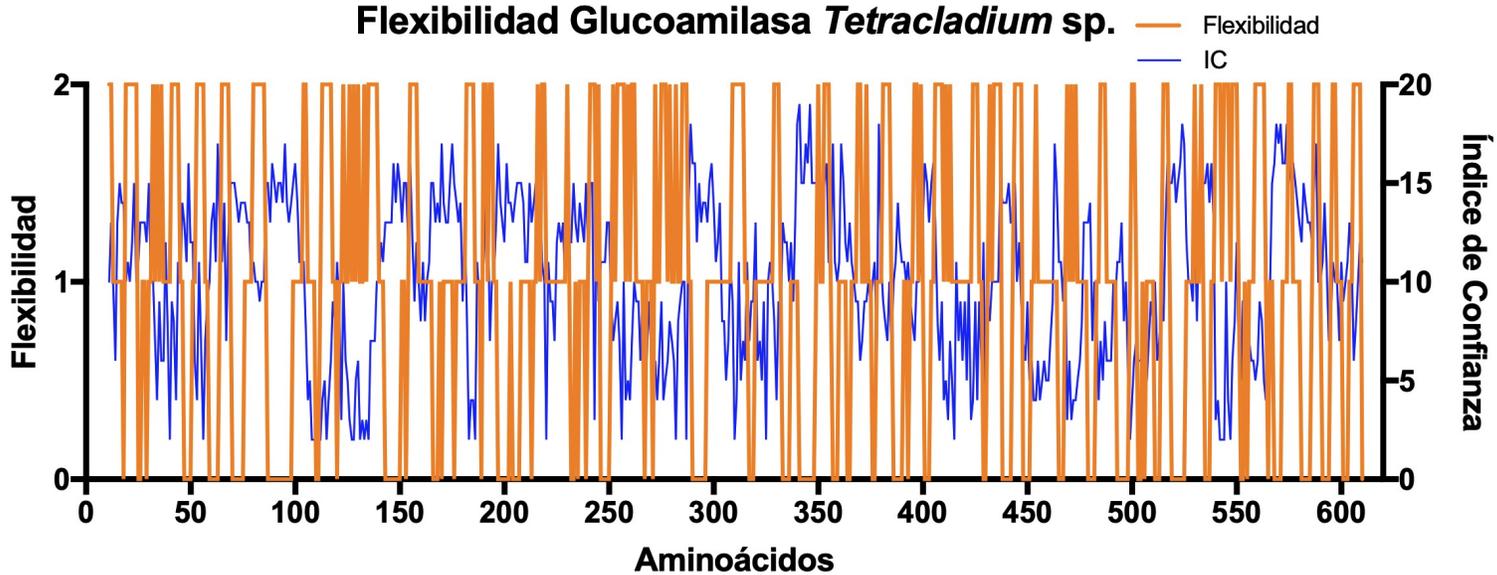
### Flexibilidad Beta-Glucosidasa *W. anomalus*



**Glucoamilasa:**

*Tetracladium sp.:*

**Flexibilidad Glucoamilasa *Tetracladium sp.***

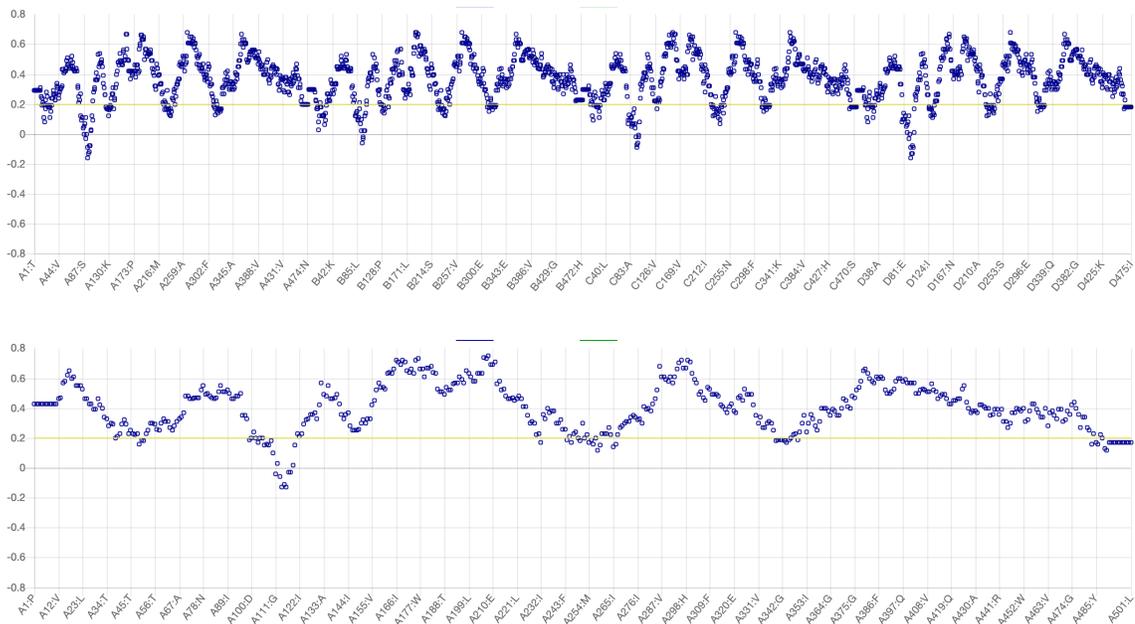


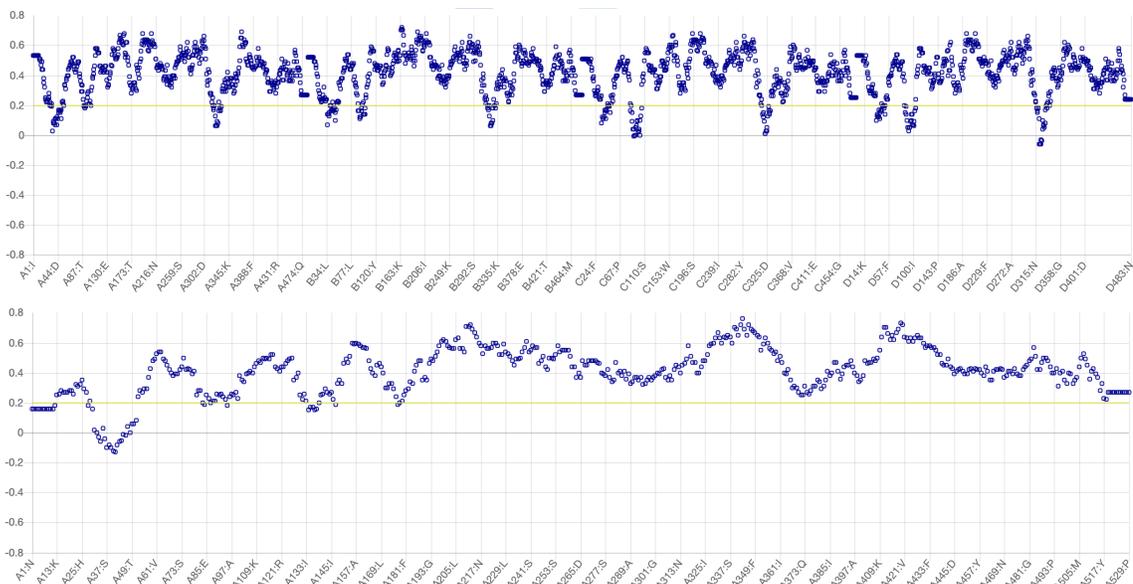
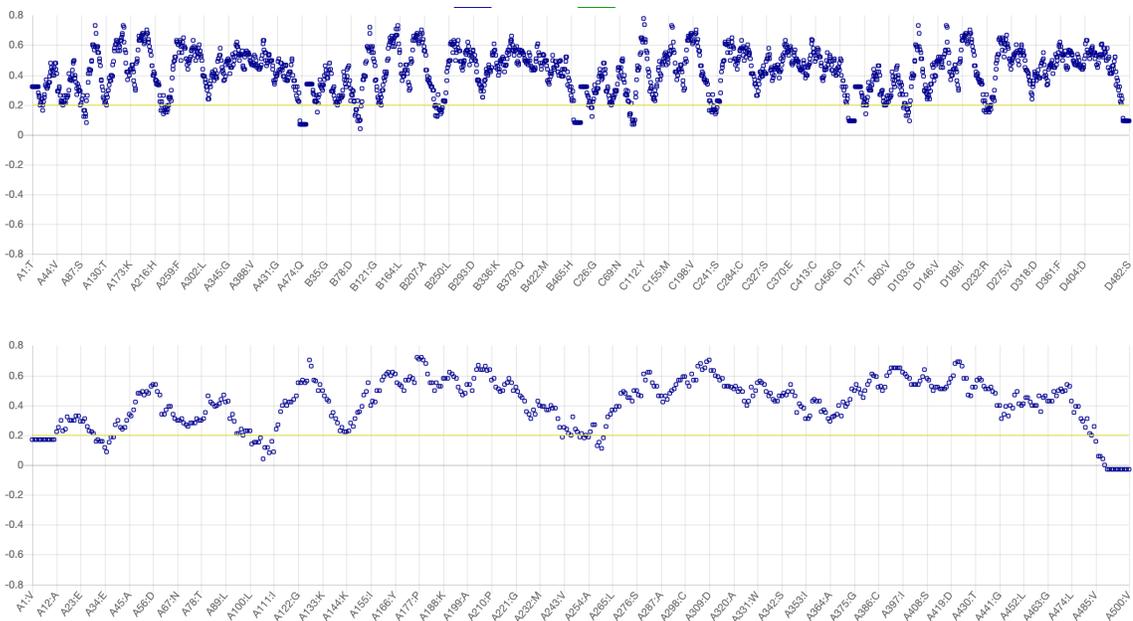
### Sección 3: Gráficos de Verify3D

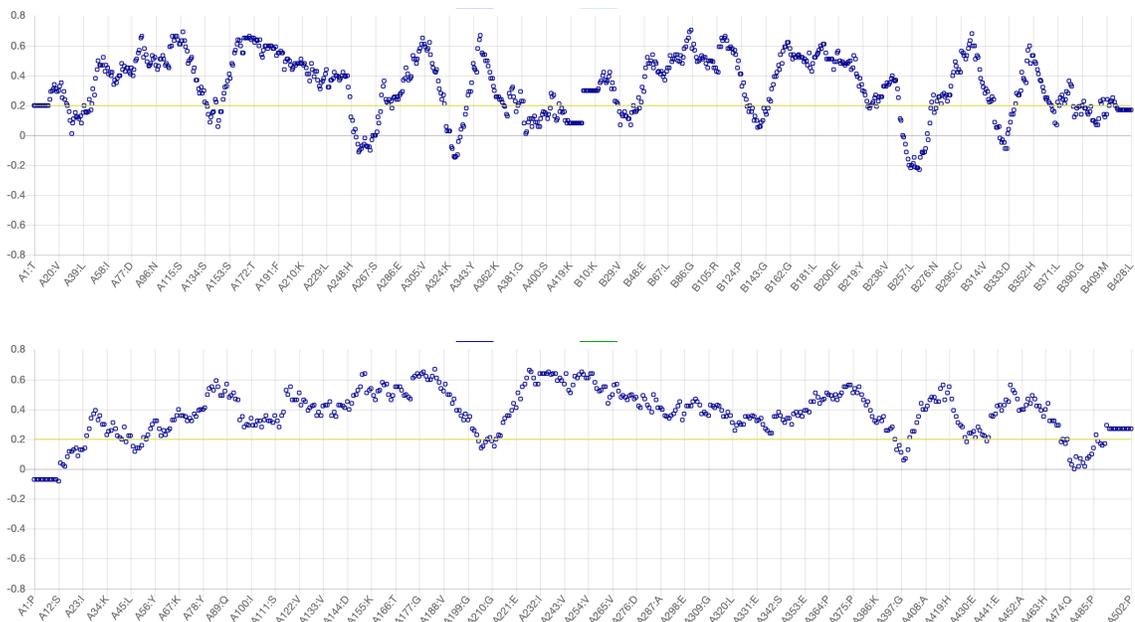
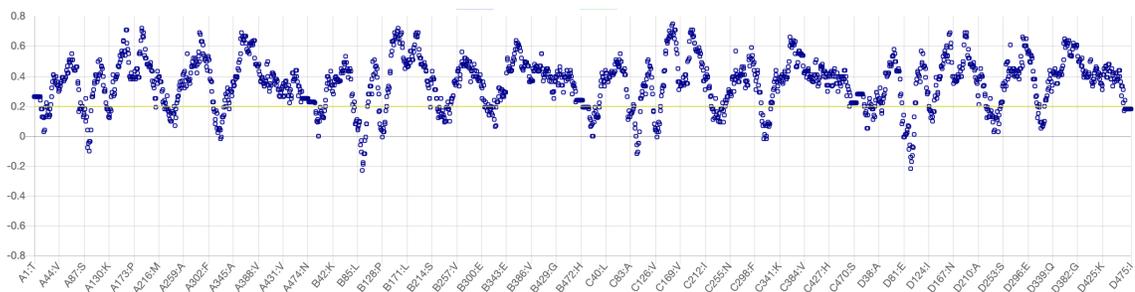
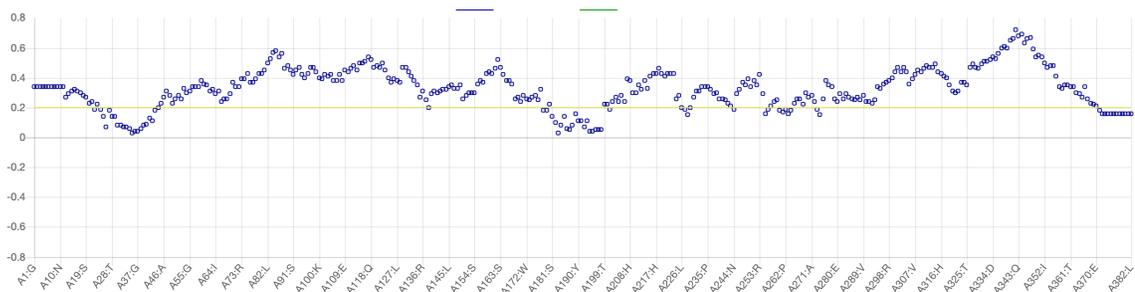
Los gráficos representan la compatibilidad de la secuencia aminoacídica con su estructura tridimensional. En el eje y se grafica el puntaje de cada residuo en la secuencia. En el eje x se grafica cada residuo según su posición en la secuencia. La línea verde indica el humbral que debe pasar el puntaje de cada residuo para considerarse que está en una posición tridimensional correcta. En el caso de que la enzima tenga modelos generados con Swiss-Model e I-TASSER, primero se mostrará el gráfico para el modelo de Swiss-Model y luego I-TASSER.

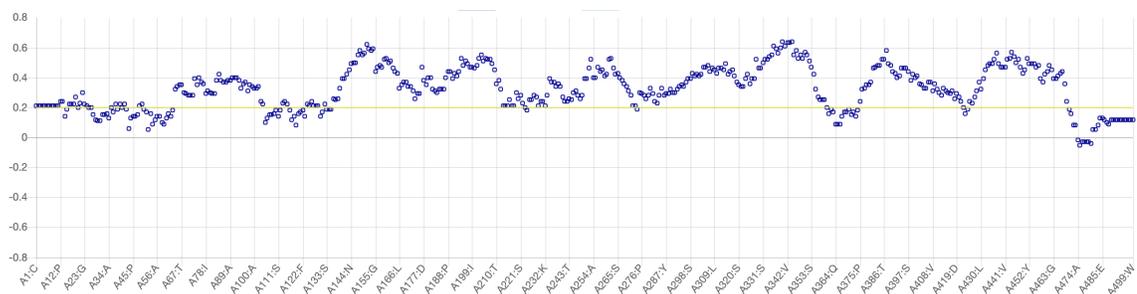
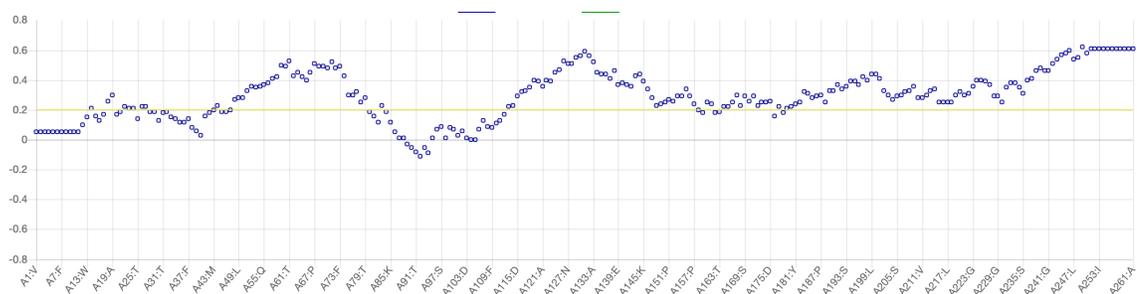
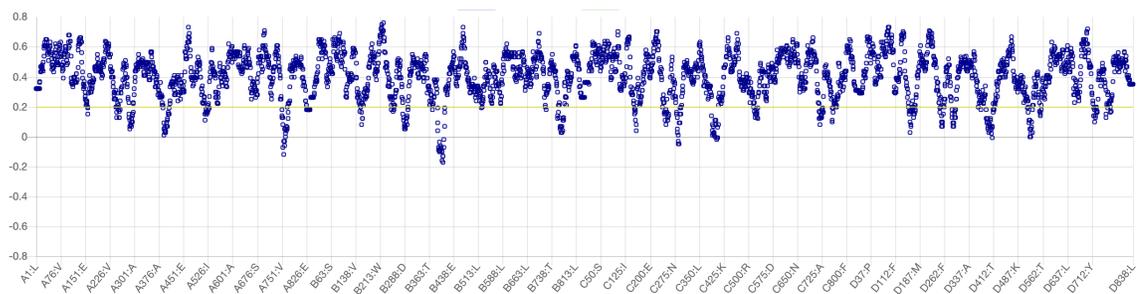
#### Alcohol Deshidrogenasa:

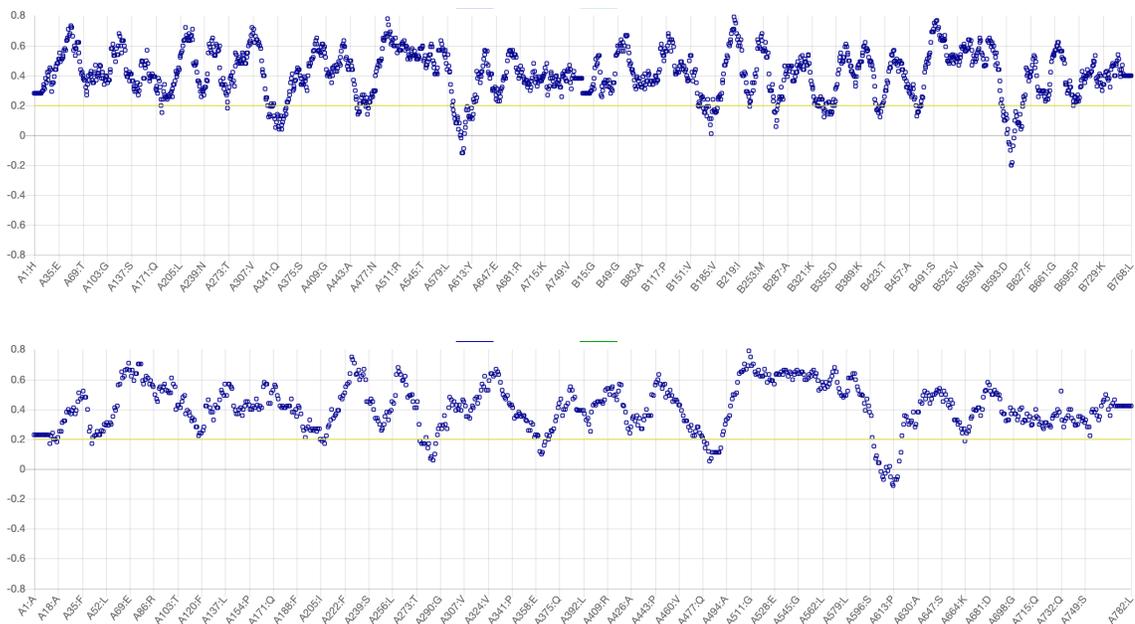
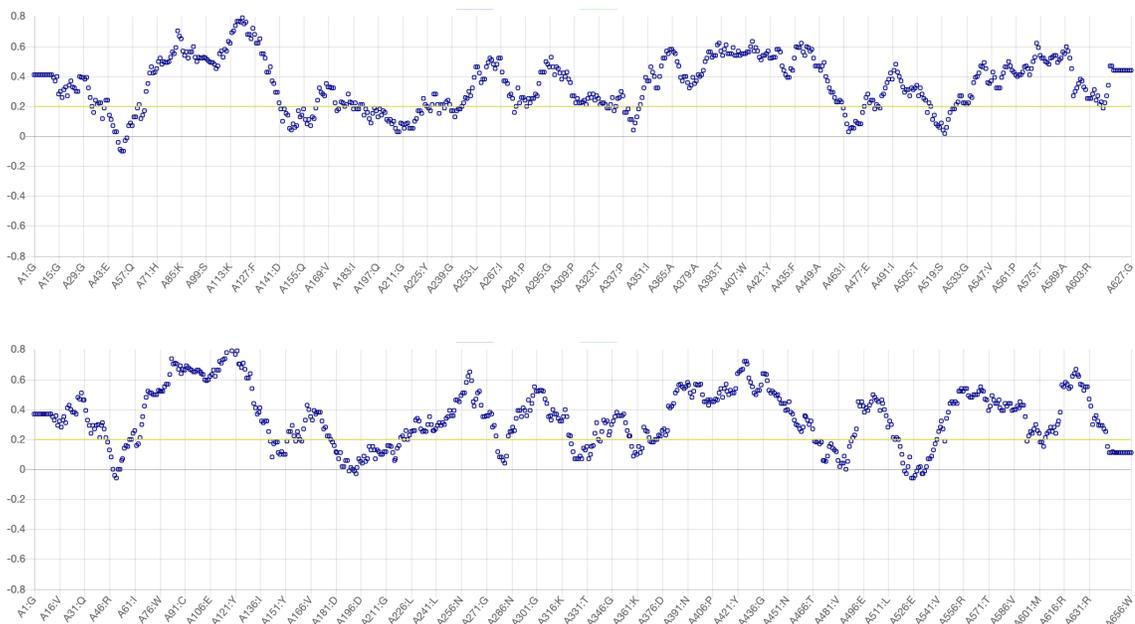
*Cryptococcus* sp.:

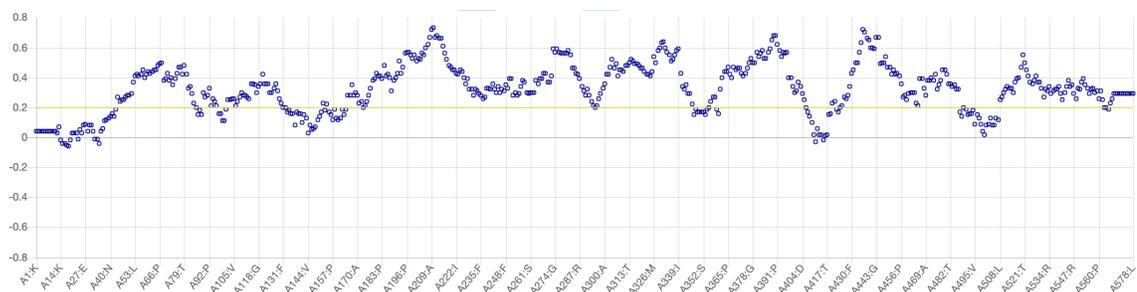


*Candida sake*:*Leucosporidium creatinivorum*:

*Mrakia gelida:**Phenoliferia glacialis**Tetracladium* sp.:

*Vishniacozyma victoriae*:**Beta-Glucosidasa:***Cryptococcus* sp.:*Leucosporidium creatinivorum*:

*Mrakia gelida*:*Tetracladium* sp.:

*Vishniacozyma victoriae*:**Glucoamilasa:***Tetracladium* sp.