

UCH-FC  
Biotecnología  
7949  
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE-FACULTAD DE CIENCIAS-ESCUELA DE PREGRADO

**“ANÁLISIS DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EXTRACELULARES EN  
DIFERENTES ESPECIES DE LEVADURAS PSICROTOLERANTES”**

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

**Yassef Ariel Yuivar Villarreal**

**Agosto 2015**

**Santiago-Chile**

Director del Seminario de Título: Dr. Marcelo Baeza Cancino



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr Yassef Ariel Yuivar Villarreal**

### “ANÁLISIS DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EXTRACELULARES EN DIFERENTES ESPECIES DE LEVADURAS PSICROTOLERANTES”

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

**Director Seminario de Título:**  
*Dr. Marcelo Baeza C.*

**Comisión Revisora y Evaluadora:**

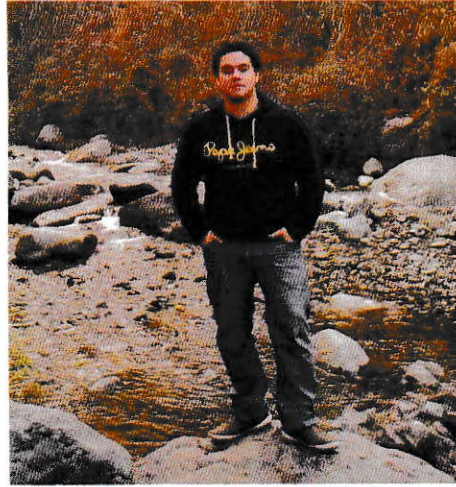
**Presidente Comisión:**  
*Dr. Nicolás Guilliani.*

**Evaluador:**  
*Dr. Francisco Chávez.*

Se muestran tres líneas horizontales con firmas manuscritas. A la derecha de las firmas se encuentra un sello circular que dice "FACULTAD DE CIENCIAS \* BIBLIOTECA CENTRAL \* U. DE CHILE".

Santiago de Chile, Agosto de 2015

## BIOGRAFÍA



Nací el jueves 21 de Febrero de 1991 en la ciudad de Quilpué, Quinta Región, hijo de Selim Yuivar y Karin Villarreal. Producto del trabajo de mi padre estuve en varios colegios durante mi infancia, pero fue en el Colegio San Miguel de los Andes, de Puente Alto, donde estuve la mayor parte de mi enseñanza básica. Luego, ingresé al Liceo José Victorino Lastarria para cursar mi enseñanza media, pero por diferentes motivos, me gradué de Cuarto Medio en el Colegio San Miguel de los Andes.

Siempre me gustó la ciencia, desde pequeño, pero tenía muchas dudas acerca de qué carrera elegir, por eso ingresé al Programa de Bachillerato de la Universidad de Chile, donde me di cuenta que era la investigación y la biotecnología lo que me apasionaba, así fue como elegí la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular. En el año 2013 ingresé al Laboratorio de Genética de la Universidad de Chile para realizar una Unidad de Investigación estudiando actividades enzimáticas extracelulares de varias cepas de levaduras traídas desde la Antártica. El 2014 comencé a trabajar en mi Memoria de Título sobre este mismo tema y actualmente soy estudiante del Programa de Magister en Ciencias Biológicas de la Universidad de Chile, para continuar con mi investigación sobre el tema con el que realicé este trabajo.

**A mi familia...**

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero que todo, agradezco a mis padres, Karin y Selim, por entregarme una familia hermosa, amor y la educación necesaria para cumplir este sueño de ser profesional. A mis hermanos por entregarme alegrías cada día de mi vida. A mis abuelos, tíos y primos por apoyarme siempre y ser como son conmigo. A mi perrito "Harry" por acompañarme siempre en esas largas horas de estudio y entregar cariño cuando uno lo necesita.

Quiero agradecer a todos los que trabajan en el Laboratorio de Genética de la Universidad de Chile. Al Dr. Marcelo Baeza por confiar en mí y darme la oportunidad de trabajar con él. Al Dr. Víctor Cifuentes de permitirme entrar a su laboratorio y desarrollarme como persona y profesional. A la Dr. Jennifer, a la Dony, al Salva y al Rafa por su ayuda y buena voluntad siempre. A la Pame, la Naty y la Nicole, por su buena onda y, especialmente, al Pablo y Mario, por sus consejos, apoyo y excelente disposición a responder mis dudas siempre, de verdad gracias. Sé que me faltan varios, son muchos por eso no los nombro a todos, pero gracias.

A mis amigos de Universidad, a los que han estado ahí desde que comencé este largo camino, gracias a Gabriel, Pame, Ernesto, Claudio y JP por esas horas de estudios, almuerzos en filo, descansos en los pastos y buena onda siempre todos estos años.

Agradecer de todo corazón a mis amigos de la vida, a los que me han acompañado por muchos años que siempre fueron y han sido un apoyo en mi vida, gracias Juano, Michelle, Cris, Erika, Stephanie, Erick, Andrés, Dani y Allison, por su compañía, alegría, apoyo y entregarme hermosos recuerdos que jamás olvidaré. Gracias Scarlett por ser mi compañera en este largo camino universitario por muchos años y ahora ser una gran amiga. Los quiero y recordaré siempre. Por último, agradecer a Fondecyt por financiar este proyecto. Gracias a todos, GRACIAS TOTALES.

## ÍNDICE

Índice General.....	ii
Índice de Figuras.....	iv
Índice de Tablas.....	v
Resumen.....	vi
Abstract.....	viii
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1. Ureasa.....	4
1.2. Invertasa.....	6
1.3. Gelatinasa.....	8
1.4. Fosfatasa alcalina.....	10
1.5. Glucosa oxidasa.....	12
<b>Objetivos.....</b>	<b>16</b>
<b>2. Materiales y Métodos.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1. Materiales.....</b>	<b>17</b>
2.1.1. Cepas de levaduras.....	17
2.1.2. Reactivos químicos.....	17
<b>2.2. Métodos.....</b>	<b>17</b>
2.2.1. Medio de cultivo.....	17
2.2.2. Obtención de proteínas extracelulares totales.....	17
2.2.3. Actividad ureasa.....	19
2.2.4. Actividad invertasa.....	19
2.2.5. Actividad gelatinasa.....	19
2.2.6. Actividad fosfatasa alcalina.....	19
2.2.7. Actividad glucosa oxidasa.....	19

<b>3. Resultados</b> .....	21
3.1. Extracción y análisis de proteínas extracelulares totales.....	21
3.2. Actividad ureasa extracelular.....	21
3.3. Actividad invertasa extracelular.....	23
3.4. Actividad gelatinasa extracelular.....	24
3.5. Actividad fosfatasa alcalina extracelular.....	26
3.6. Actividad glucosa oxidasa extracelular.....	28
<b>4. Discusión</b> .....	30
<b>5. Conclusiones</b> .....	35
<b>6. Proyecciones</b> .....	36
<b>7. Bibliografía</b> .....	37
<b>8. Anexo</b> .....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diferentes condiciones ambientales y grupos de organismos adaptados a ellas.....	2
<b>Figura 2.</b> Variación de la actividad enzimática con la temperatura.....	3
<b>Figura 3.</b> Reacción producida por la enzima ureasa y sus productos.....	5
<b>Figura 4.</b> Reacción generada por enzima invertasa usando sacarosa como sustrato y los productos generados.....	7
<b>Figura 5.</b> Estructura cuaternaria de la gelatinasa B humana (MMP-9).....	9
<b>Figura 6.</b> Estructura cuaternaria de la enzima ALP de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	12
<b>Figura 7.</b> Reacción generada por la enzima glucosa oxidasa y sus productos.....	13
<b>Figura 8.</b> Ensayos de actividad ureasa extracelular a temperaturas óptimas crecimiento.....	22
<b>Figura 9.</b> Ensayos de actividad gelatinasa a temperaturas óptimas de crecimiento.....	25



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Cepas de levaduras antárticas positivas en los ensayos de actividad en colonias.....	18
<b>Tabla 2.</b> Diferencia entre los diámetros de los “pocillos” y los diámetros de los halos indicadores de actividad ureasa medidos a las temperaturas óptimas de crecimiento de cada cepa.....	23
<b>Tabla 3.</b> Absorbancia medida en los ensayos de actividad invertasa a las temperaturas óptimas de crecimiento. ....	24
<b>Tabla 4.</b> Diferencia de los diámetros de los “pocillos” y los halos de degradación indicadores de actividad gelatinasa.....	26
<b>Tabla 5.</b> Absorbancia medida en los ensayos de actividad fosfatasa alcalina a las temperaturas óptimas de crecimiento de cada cepa. ....	27
<b>Tabla 6.</b> Absorbancia medida en los ensayos de actividad glucosa oxidasa usando los extractos proteicos de las 27 cepas de levaduras antárticas estudiadas.....	29
<b>Tabla 7.</b> Ensayo de crecimiento en medio de cultivo YM suplementado con 1% de sacarosa. ....	43

## RESUMEN

Los microorganismos han logrado colonizar hasta los ambientes más extremos del planeta gracias a sus características y adaptaciones muy distintas a sus contrapartes mesófilos. Estas adaptaciones biológicas han sido un motivo continuo de estudios y se realizan esfuerzos para aislar microorganismos desde regiones frías del planeta, ya que poseen una gran importancia ecológica y posibles aplicaciones industriales. El continente Antártico es un gran reservorio microbiológico, poco explorado, por lo cual en los últimos años han aumentado las investigaciones destinadas a aislar nuevos microorganismos y analizar sus características fisiológicas, metabólicas, entre otras.

El objetivo de la presente memoria de título fue el análisis de actividad enzimática de 27 cepas de levaduras aisladas desde la sub-antártica y que, previamente, se determinó la presencia de actividades ureasa, gelatinasa, fosfatasa alcalina, invertasa y/o glucosa oxidasa en colonias de estas. Los ensayos se realizaron usando extractos proteicos extracelulares obtenidos desde cultivo de cada cepa de levadura. En los ensayos de actividad ureasa, las cepas *Sporidiobolus salmonicolor*, *Glaciozyma antarctica*, *Rhodotorula laryngis*, *Cryptococcus victoriae*, *Mrakia sp* y *Rhodotorula glacialis* mostraron actividad a nivel extracelular. En los ensayos de actividad invertasa solo las cepas *Wickerhamomyces anomalus*, *Candida sake* y *Cryptococcus gilvescens* tuvieron actividad extracelular. Las cepas *Leucosporidiella fragaria*, *Mrakia sp* y *Metschnikowia bicuspidata* mostraron actividad gelatinasa a nivel extracelular. En los ensayados de actividad fosfatasa alcalina, las cepas *Wickerhamomyces anomalus*, *Candida sake*, *Cryptococcus gilvescens*, *Dioszegia sp* y *Mrakia psychrophila* mostraron actividad extracelular. En el caso de la actividad glucosa oxidasa solo las cepas *Cryptococcus*

*gastricus*, *Rhodotorula laryngis*, *Leucosporidiella creatinivora*, *Cryptococcus gilvescens* y *Sporidiobolus salmonicolor* dieron positivo en estos análisis.

Por último, se concluyó que los extractos proteicos utilizados de las cepas estudiadas fueron obtenidos con éxito y que todos los ensayos realizados mostraron al menos una levadura con actividad enzimática extracelular, siendo las cepas del género *Cryptococcus* las que tienen mayor variedad de actividades enzimáticas.

## ABSTRACT

Microorganisms have successfully colonized most extreme environments on the planet, developing characteristics and adaptations very different to their mesophilic counterparts. These biological adaptations have attracted an increasing interest and efforts to isolate microorganisms from cold regions, to analyze their ecological importance and potential industrial applications. The Antarctic continent is an unexplored microbiological reservoir and excursions to this region have increased in recent years, to collect samples and to isolate new microorganisms, and analyze their physiological characteristics.

The aim objective of the present work was to analyze the extracellular enzyme activities of 27 yeast strains isolated from sub-antarctic region. Previously, the presence of urease, gelatinase, alkaline phosphatase, invertase and/or glucose oxidase activities was observed in colonies of these yeasts. In this study, the extracellular protein extracts were obtained from cultures of each yeast strain, and the mentioned enzyme activities were measured for each sample. For urease activity, the positive results were obtained in protein samples from *Sporidiobolus salmonicolor*, *Glaciozyma antarctica*, *Rhodotorula laryngis*, *Cryptococcus victoriae*, *Mrakia sp* and *Rhodotorula glacialis*. In the case of invertase activity, the yeast *Wickerhamomyces anomalus*, *Candida sake* and *Cryptococcus gilvescens* showed positive results. The yeasts *Leucosporidiella fragaria*, *Mrakia sp* and *Metschnikowia bicuspidata* strains showed extracellular gelatinase activity. A alkaline phosphatase activity was observed in protein extracts from *Wickerhamomyces anomalus*, *Candida sake*, *Cryptococcus gilvescens*, *Dioszegia sp* and *Mrakia psychrophila*. Finally, for glucose oxidase activity a "screening" was performed to know which of the 27 had extracellular activity level, *Cryptococcus*

*gastricus*, *Rhodotorula laryngis*, *Leucosporidiella creatinivora*, *Cryptococcus gilvescens* and *Sporidiobolus salmonicolor* strains tested positive in these analyzes.

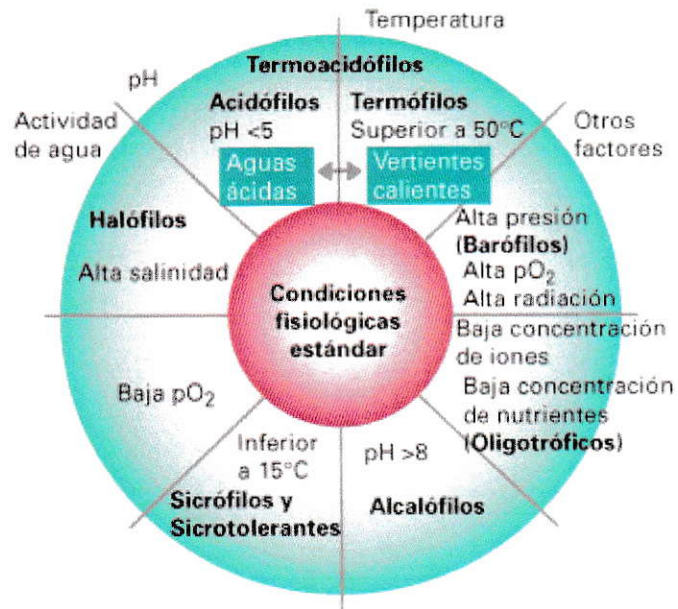
It was concluded that the protein extracts were successfully strains obtained from cultured of yeasts and all samples showed at least one enzyme activity, and the samples from genus *Cryptococcus* were that showed higher variety of enzyme activities.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos han colonizado, prácticamente, todos los rincones de la Tierra, desde geiseres hasta los lugares más fríos del planeta. A estos organismos, capaces de crecer a temperaturas cercas a 0°C, se les denomina psicrófilos, término que con los años ha variado producto de nuevos estudio de microorganismos desde regiones frías. Hoy en día, se utilizan los términos psicrófilos y psicotrópicos (originalmente usado en bacterias) para describir a microorganismos presentes en estas zonas extremas. Se establece que un organismo psicrófilo es aquel que puede crecer a 0°C, con una temperatura óptima de crecimiento igual o menor a 15°C, mientras que un organismo psicotrópico puede crecer a 0°C y su temperatura óptima de crecimiento es entre los 20°C y los 30°C. Este último término ha sido reemplazado, en la actualidad, por el término psicrotolerante y se utiliza, principalmente, en microorganismos aislados desde el Ártico y la Antártica (Comerio y cols., 2007).

La Figura 1 muestra diferentes ambientes con condiciones extremas de temperatura, salinidad, pH, radiación, etc. Los microorganismos que han sido capaces de soportar estas condiciones extremas reciben diferentes nombres y han sobrevivido en estas zonas gracias a varias adaptaciones fisiológicas que han logrado desarrollar.

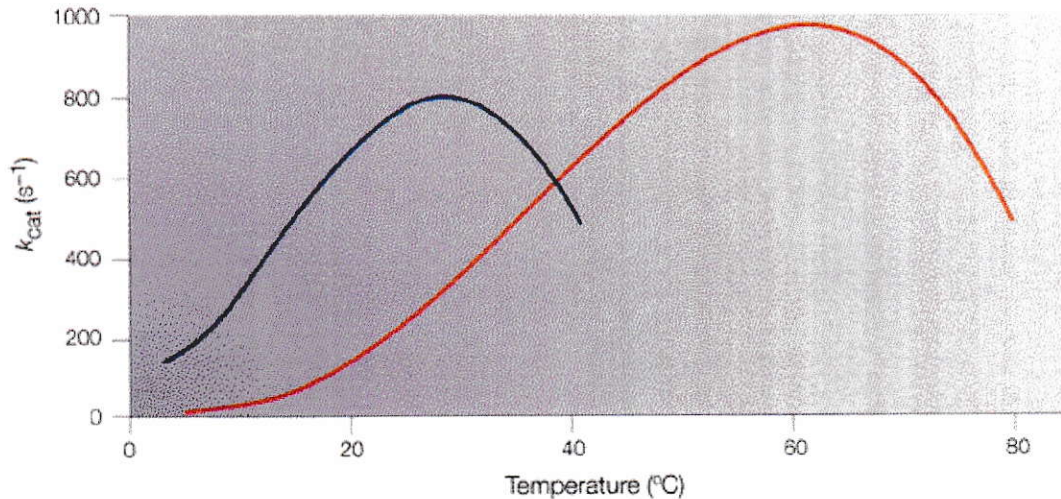
La colonización de ambientes fríos como la Antártica, presenta varias dificultades para los microorganismos, tales como la formación de cristales de hielo, la disminución de la permeabilidad de la membrana plasmática, el aumento de la viscosidad del medio y la reducción de la tasa de reacciones bioquímicas (Cavicchiolo y cols., 2002). Para superar estos factores los microorganismos han desarrollo una serie de adaptaciones, como por ejemplo, la presencia de ácidos grasos insaturados en vez de ácidos grasos saturados en la membrana plasmática incrementando su fluidez (Rothschild & Mancinelli, 2001).



**Figura 1. Diferentes condiciones ambientales y grupos de organismos adaptados a ellas.** Adaptado desde (Comerio y cols., 2007).

Una de las adaptaciones más importantes para la supervivencia de los microorganismos en ambientes fríos como la Antártica, es la producción de enzimas activas a bajas temperaturas, ya que, varios estudios han demostrado que distintas reacciones químicas decaen de forma exponencial acorde a la disminución de la temperatura (D'Amico, 2003). A pesar de esto, los microorganismos psicrotolerantes han podido sobrevivir gracias a la producción de enzimas estables y altamente específicas, incluso mostrando niveles de actividad mayores a lo observado en sus contrapartes mesófilos (Russell, 2000). La posible explicación a esta capacidad se sustenta en la hipótesis que relaciona la actividad-estabilidad-flexibilidad, la cual sugiere que las enzimas psicrotolerante aumentan la flexibilidad de sus estructuras para compensar el efecto de congelamiento que producen las bajas temperaturas de los ambientes fríos (Johns &

Somero, 2004). La Figura 2 muestra el comportamiento de la actividad enzimática al variar la temperatura en microorganismos mesófilos y psicotolerantes.



**Figura 2. Variación de la actividad enzimática con la temperatura.** Enzimas de microorganismos psicotolerantes (curva azul) son hasta diez veces más activas a temperaturas bajas y moderadas (hasta  $20^{\circ}C$  y  $30^{\circ}C$ ) en comparación con sus homólogos mesófilos (curva roja). Adaptado desde (Feller & Gerday, 2003).

La necesidad de los microorganismos psicotolerantes de adaptar todos sus componentes celulares al frío, implica que se pueden encontrar en ellos productos con alto potencial en varias aplicaciones y procesos biotecnológicos. Es más, estudios actuales con enzimas activas a bajas temperaturas han provocado un rápido aumento en esta área de investigación, ya que estos microorganismos producen enzimas que pueden funcionar en ambientes fríos, las cuales tienen una estructura más flexible que les permitiría realizar cambios conformacionales necesarios para la catálisis de compuestos con una baja demanda de energía (Arpigny & Lamotte, 1997), ofreciendo potenciales beneficios económicos, como el ahorro de energía en procesos a gran escala al no requerir incrementar la temperatura de los reactores.



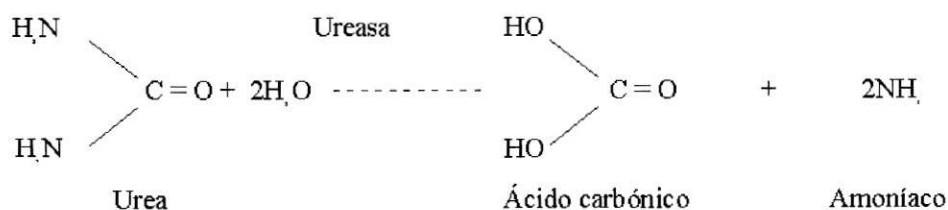
En trabajos previos se han descrito enzimas extracelulares de interés industrial que son producidas por levaduras obtenidas desde el territorio antártico, como lipasas (Fenice y cols., 1997), proteasas (Carrasco y cols., 2012), amilasas y celulasas (Loperena y cols., 2012). Sin embargo, no existen o hay muy pocos estudios que describan otras actividades enzimáticas como ureasa, gelatinasa, glucosa oxidasa, invertasa o fosfatasa alcalina, las cuales poseen un alto interés comercial e industrial, por lo que este trabajo se centrara en analizar estas cinco actividades en levaduras aisladas desde la Isla Rey Jorge del territorio antártico chileno. Estas actividades son descritas a continuación.

### **1.1. Ureasa.**

La enzima ureasa (urea amidohidrolasa, EC 3.5.1.5) pertenece a un gran grupo de enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza, cuya función catalítica consiste en hidrolizar la urea en ácido carbónico y amoníaco. Una de las características principales de esta reacción es el aumento en el pH del medio (Valdés y col., 1997). La reacción generada por la ureasa tiene varios productos finales. En un principio, la ureasa hidroliza la urea en amoníaco y en ácido carbónico, el cual reacciona con el agua generando bicarbonato, amonio e iones hidróxidos, el cual genera el aumento del pH del medio. La reacción producida por esta enzima se muestra en la Figura 2, en donde se muestran los productos mayoritarios generados por la ureasa.

La enzima ureasa tiene múltiples aplicaciones en diferentes industrias. En el área médica, se utiliza como un indicador de urea en sangre, como un seguimiento del tratamiento de hemodiálisis, y como indicador en la orina. En la industria alimenticia, se utiliza en el análisis de alimentos, por ejemplo, en la leche de vaca y en bebidas alcohólicas. En el primer caso, se utiliza el análisis de los niveles de urea como un indicador de la calidad de la leche y para detectar alteración en la producción de esta.

En el segundo caso, el control de los niveles de urea en bebidas alcohólicas es necesario para minimizar la reacción de urea con etanol, lo cual genera carbonato de etilo, el cual es cancerígeno. Además, en las áreas ambiental e industrial, existe una gran necesidad de cuantificar la concentración de urea en aguas residuales y naturales producto del uso de fertilizantes y productos químicos en las industrias, ya que la urea es utilizada en la fabricación de resinas, pegamentos, disolventes, medicamentos y productos de limpieza, como jabones y detergentes (Krajewska, 2009).



**Figura 3. Reacción producida por la enzima ureasa y sus productos.** Adaptado desde (Valdéz y col., 1997).

Los métodos de cuantificación de urea pueden ser directos o indirectos. Si se compararan los procedimientos de cuantificación de urea directa, tales como el método diacetil monoxima, los métodos indirectos, como el uso de la enzima ureasa, son mucho más beneficiosos, ya que no se producen reactivos químicos tóxicos. En este caso, la urea se detecta por los productos liberados en su hidrólisis (carbonato y amoníaco) o por los efectos provocados en la reacción, como el aumento del pH del medio o la conductividad de la solución. La ureasa se ha utilizado como un biosensor por muchos años. El primer uso de ureasa como biosensor fue preparado por Guilbault en 1969 y se han empleado distintas técnicas de medición, como espectrometría de masa, potenciometría usando electrodos sensibles al pH, electrodos selectivos de iones de

amonio, métodos térmicos, entre otros (Krajewska, 2009). Los sistemas de biosensores basados en ureasa tienen grandes expectativas, ya que ofrecen un enorme potencial para hacer mediciones a niveles de trazas de contaminantes en el medio ambiente, detecciones y seguimiento, hacer controles en alimentos y análisis biomédicos.

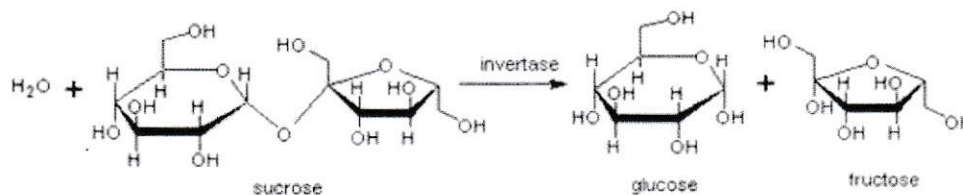
Con todos estos antecedentes, el estudio y la búsqueda de nuevas cepas microbianas que posean esta actividad enzimática son de suma importancia para el área biotecnológico e industrial.

## **1.2. Invertasa.**

La invertasa ( $\beta$ -D-fructofuranosidasa,  $\beta$ -D-fructofuranósido fructohidrolasa, EC 3.2.1.26), pertenece a un grupo de enzimas denominadas  $\beta$ -fructofuranosidasas, las cuales son capaces de hidrolizar sustratos con fructosil en la zona terminal. Este grupo de enzimas se dividen dependiendo de su capacidad de degradar sacarosa (invertasa) o inulina (inulinasa y  $\beta$ -fructosidasa) y algunas  $\beta$ -fructofuranosidasas poseen una actividad fructosiltransferasa para la síntesis de fructo-oligosacáridos de cadena corta (Marini, 2005). Esta reacción generada por la enzima invertasa está ilustrada en la Figura 3, en donde se muestran los productos generados por la enzima a partir de una molécula de sacarosa.

Esta enzima está ampliamente distribuida en los seres vivos, estando presente en microorganismos, animales y plantas, siendo muy necesaria para aquellos organismos que utilizan fructanos como fuente de carbono y energía. La invertasa fúngica ha sido ampliamente estudiada en levaduras y hongos filamentosos y se ha clasificado dentro de las 32 familias de glicosil hidrolasas (GH32) en base a la homología de sus secuencias aminoacídicas (Aguiar y cols., 2014). En levadura, esta enzima se presenta de dos formas en las células: una invertasa “pesada” que contiene 50% de manano y

3% de glucosamina; y una forma “liviana” que no contiene hidratos de carbono. La concentración de la invertasa es dependiente de las condiciones de crecimiento, especialmente, de la concentración de glucosa en el medio, la cual reprime la síntesis de invertasa. Cuando la concentración de glucosa es baja, la mayor parte de la invertasa sintetizada se encuentra fuera de la membrana citoplasmática y en su forma pesada. Por otro lado, en los protoplastos hay pequeñas cantidades de ambas isoenzimas pesadas y ligeras y se localizan en pequeñas vesículas o vacuolas (Moreno, 1974).



**Figura 4. Reacción generada por enzima invertasa usando sacarosa como sustrato y los productos generados.** Adaptado desde (Marini, 2005).

Esta actividad enzimática es muy importante en una gran variedad de procesos industriales. En la industria alimentaria, se utiliza esta enzima para asegurar que los productos de confitería permanecen frescos y suaves después de un largo período de almacenamiento. Además, la fructosa es más dulce que la sacarosa y posee una cristalinidad menor a concentraciones altas, lo que se asemeja al jarabe de fructosa que se obtiene del almidón, siendo una opción para sustituirla. Por otra parte, la invertasa se utiliza mucho en los procesos de fermentación de la caña de melaza en la industria del alcohol, además como agente plastificante en la industria cosmética, en la fabricación de drogas, en la industria del papel y como electrodo enzimático en aplicaciones bioelectrónicas. Este último uso es muy reciente, ya que hace poco tiempo se han empezado a utilizar sensores de electrodos enzimáticos, en donde la hidrólisis de la sacarosa por parte de la invertasa se utiliza como señal (Du y cols., 2013).

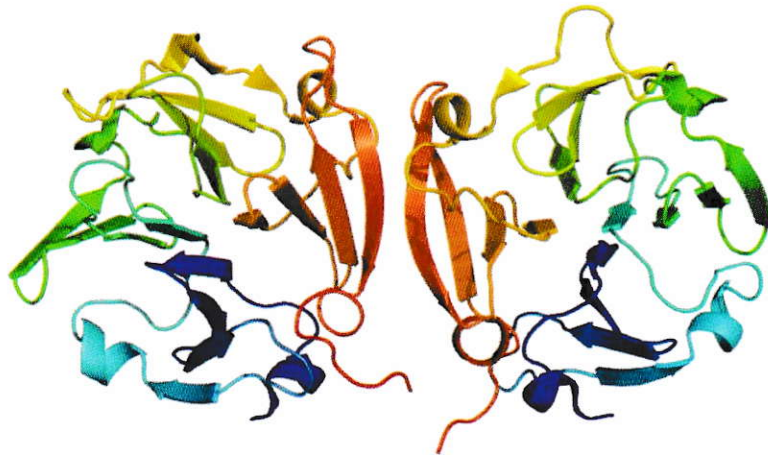
Hasta la fecha, la invertasa mejor estudiada y fácilmente disponible es la derivada de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual posee un óptimo de actividad a pH 6.5 y 50°C. Estudios en otros seres vivos, como las plantas, muestran que la enzima invertasa tiene una alta actividad a pH neutro y usa la sacarosa como único sustrato (Du y cols., 2013). El estudio de esta actividad en cepas de levaduras antárticas podría entregar nuevos datos de esta enzima para futuras aplicaciones industriales y biotecnológicas.

### **1.3. Gelatinasa.**

La enzima gelatinasa pertenece a una gran familia de proteinasas denominadas Metaloproteinasas de la Matriz Extracelular (MMP), las cuales son capaces de degradar la mayoría de los componentes de la matriz extracelular, tales como colágenos, proteoglicanos, elastina, laminina, fibronectina y otras glicoproteínas, por lo que son enzimas importantes, en los seres humanos, en la remodelación de tejidos fisiológicos y patológicos, como enfermedades autoinmune, tumores y metástasis (Opdenakker & Van Damme, 1992). Estas enzimas son parte de una familia que comprenden 25 genes identificados sobre la base de su homología de secuencia y especificidad de sustrato, y se clasifican en 5 grupos: colagenasas, estromelisin, gelatinasas, metaloproteinasas de membrana y otras MMPs. Además, estas enzimas en conjunto pueden degradar varias proteínas de origen no extracelular, como moléculas de adhesión, citoquinas, inhibidores de la proteasa y entre otras (Berg, 2011).

Dentro de este grupo de metaloproteinasas, las más estudiadas y con mayor importancia comercial y biotecnológicas son las colagenasas y las gelatinasas. Las enzimas colagenasas (denominadas MMP-1 y MMP-8), presentan un peso molecular de alrededor de 54 kDa en su forma latente y su sustrato es el colágeno. Su acción consiste en la catálisis de una ruptura única en las cadenas  $\alpha$  del colágeno intersticial

tipos I, II y III. También presentan cierta actividad gelatinasa. Son incapaces de actuar sobre el colágeno tipo IV. La colagenasa de vertebrado es producida por fibroblastos, células epiteliales y macrófagos. Las enzimas gelatinasas (denominadas MMP-2 y MMP-9) tienen un peso molecular de 72 kDa (gelatinasa A o tisular, [MMP-2]) y 92 kDa (gelatinasa B o de neutrófilo, [MMP-9]) (Van den Steen, 2002). La estructura de esta enzima se muestra en la Figura 4, en donde se muestran varias cadenas sabanas  $\beta$  y  $\alpha$ -hélices. Su acción consiste en hidrolizar los productos de la ruptura del colágeno por las colagenasas, siempre que estén desnaturalizados. También presentan actividad colagenasa tipo IV. Además actúan sobre otras moléculas de la matriz del tejido conectivo asociadas con el colágeno (García y cols., 1998).



**Figura 5. Estructura cuaternaria de la gelatinasa B humana (MMP-9).** Adaptado desde (Van den Steen, 2002).

Estas enzimas tienen una gran importancia en medicina, ya que varios estudios han demostrado que las metaloproteinasas participan en varias enfermedades neurodegenerativas y autoinmunes. Por ejemplo, la gelatinasa B humana (MMP-9), está involucrada en la invasión de células tumorales, artritis, periodontitis y osteoporosis (Nita Roy & Padmanabhan, 1999). Es más, estudios recientes muestran que estas enzimas

pueden ser utilizadas como biomarcadores de varias enfermedades y síndromes metabólicos (hiperglicemia, hipertensión, dislipidemia, etc.) donde se ve aumentada la síntesis de MMPs (Berg, 2011). Otras aplicaciones se relacionan con la industria farmacéutica, donde se utilizan estas enzimas junto con antibiótico para tratar heridas y quemaduras. Por último, las gelatinasas se utilizan para reciclar plata y poliésteres que se encuentran presente en derivados de películas fotográficas o placas de rayos X, ayudando con el medio ambiente (Rao, 1998).

El estudio de este tipo de enzimas va en aumento y el presente trabajo podría entregar nuevas herramientas para posibles aplicaciones con nuevos enfoques industriales.

#### **1.4. Fosfatasa alcalina.**

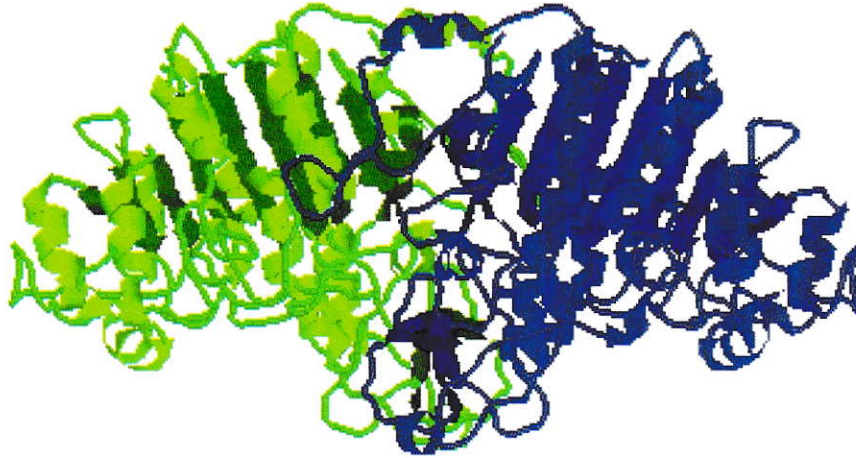
La enzima fosfatasa alcalina (ALP; ortofosfórico monoéster fosfohidrolasa, EC 3.1.3.1, óptimo alcalino) es una glicoproteína unida a membrana con ácido siálico como azúcar, que cataliza la hidrólisis de monoésteres de ácido fosfórico a fosfato y alcohol (Rankin y cols., 2010). La enzima ALP está presente de forma activa en una amplia variedad de organismos, desde las bacterias hasta los mamíferos, por lo que se le denomina como una enzima “adaptable”, una característica que le pudo haber ayudado a su propagación a lo largo de la evolución (Fernandes, 2008). Pero a pesar de que la ALP es unas de las enzimas más estudiadas, no se tiene un conocimiento claro de su actividad fisiológica específica. Se han hecho estudios que muestran que la ALP participa, junto con otras enzimas, en la homeostasis del fósforo, en el transporte a través de las membranas, en la mineralización de los huesos, en la sinapsis neuronal y en diversos procesos celulares fundamentales (diferenciación, proliferación y celular la señalización, la meiosis, mitosis, apoptosis, migración celular, defensa inmunológica, y la síntesis de ADN regulación) en varias especies de seres vivos. Esta gran variedad de actividades fisiológicas se debe

a que la enzima ALP tiene varias isoenzimas e isoformas. Los seres humanos codifican 4 isoenzimas ALP diferentes: una isoenzima específica de tejido, que se expresa en prácticamente todos los tejidos incluyendo el hígado, hueso y riñón; una isoenzima intestinal, que se expresa en el borde del cepillo de la mucosa intestinal; una isoenzima de la placenta, que se expresa en trofoblastos durante la gestación y en pequeñas cantidades en el pulmón y el cuello uterino; y una isoenzima en células germinales, que se expresa en pequeñas cantidades en los testículos y el timo. Por otro lado, las isoformas se forman producto de cambios post-traduccionales de las isoenzimas sintetizadas (Fernández, 2007). La enzima ALP ha sido descrita en pocas especies de microorganismos, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* posee dos isoenzimas de ALP: PHO8 y PHO13, ambas ubicados en el cromosoma IV. La ALP PHO8, es una isoenzima dependiente de  $Mg^{2+} / Zn^{2+}$ , que tiene una estructura dimérica muy similar a la ALP encontradas en *Escherichia coli* y en células de mamífero. La estructura cuaternaria de esta enzima se muestra en la Figura 5, en donde se distinguen las dos estructuras que forman la isoenzima. Por otro lado, la ALP PHO13 es una proteína monomérica, altamente específica para *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP) y histidinolfosfato y también es una isoenzima dependiente de  $Mg^{2+}$  (Rankin y cols., 2010).

Gracias a las múltiples funciones biológicas donde participan la enzima ALP, sus aplicaciones industriales son enormes. Por ejemplo, ha habido una creciente evidencia de que las ALPs actúan como un agente terapéutico durante una infección o una inflamación del intestino delgado, disminuyendo la posibilidad de complicaciones durante una enfermedad. Además, la suplementación de ALP junto con antibióticos, ha demostrado ser eficaz contra enfermedades relacionadas con *Clostridium difficile* y *Salmonella typhimurium*, lo cual es muy útil, ya que la administración de antibióticos



puede producir un desequilibrio microbiano en el intestino, conocido como disbiosis, que crea un ambiente favorable para patógenos.



**Figura 6. Estructura cuaternaria de la isoenzima PHO8 de *Saccharomyces cerevisiae*.** Adaptado desde (Rankin y cols., 2010).

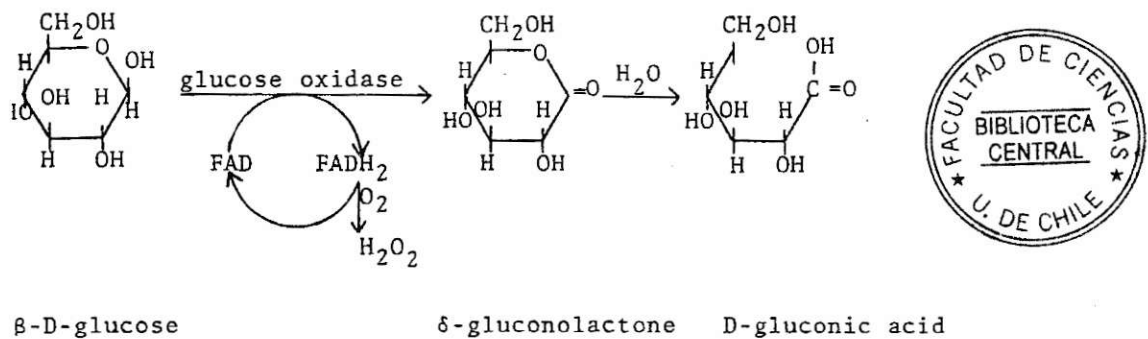
Otra posible aplicación terapéutica de la ALP es en neonatos que sufren de enterocolitis necrotizante (NEC), ya que en estudios en ratas se redujeron los niveles séricos de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-5 e IL-1 $\beta$ ) durante NEC. Además, la ALP ha demostrado ser beneficioso en ratones con fibrosis quística (Estaki y cols., 2014). Con todos estos datos se puede ver claramente que la enzima ALP tiene un amplio potencial terapéutico, por lo que el estudio de esta enzima podría entregar nuevas y mejores herramientas en el ámbito médico y farmacológico.

### **1.5. Glucosa Oxidasa.**

La enzima glucosa oxidasa (GOx) ( $\beta$ -D-glucosa: oxígeno-1-oxidoreductasa, EC 1.1.3.4) es una importante flavoproteína formada por dos subunidades idénticas de 80 kDa unidas, con dos sitios activos y unida, de forma no covalente, a dos coenzimas flavin adenin dinucleótido (FAD). Esta enzima cataliza la oxidación de  $\beta$ -D-glucosa a D-

glucono-1,5-lactona y la reducción de oxígeno a peróxido de hidrógeno. Esta reacción puede dividirse en dos etapas. Primero, la β-D-glucosa es oxidada a D-glucono-1,5-lactona, después es hidrolizada a ácido glucónico junto con la reducción de FAD a FADH<sub>2</sub>. En la segunda etapa, el oxígeno es reducido a peróxido de hidrógeno por la acción de FADH<sub>2</sub> y la enzima glucosa oxidasa (Kovacevic y cols., 2014). La Figura 6 muestra la reacción catalizada por la enzima glucosa oxidasa, junto con los reactivos y productos generados.

La glucosa oxidasa es una enzima representante de la familia de las oxidoreductasas. Este grupo es grande y diverso e incluye muchas enzimas muy importantes, para diferentes industrias, especialmente en el área de diagnóstico médico, tales como la colesterol oxidasa, alcohol oxidasa, animo oxidasa y la piranosa oxidasa. Todas estas enzimas comparten una homología estructural, en sus extremos aminos y en varios segmentos de su cadena de aminoácidos (Ferri, 2011).



**Figura 7. Reacción generada por la enzima glucosa oxidasa y sus productos.**  
Adaptado desde (Kovacevic y cols., 2014).

Como se mencionó anteriormente, esta enzima es muy utilizada en varias industrias, principalmente en el área de diagnóstico. Se utiliza mucho en pacientes con diabetes

para detectar la concentración de glucosa en la sangre y orina de los pacientes con esta enfermedad. Para hacer estas mediciones se acopla la actividad glucosa oxidasa con la reacción generada por la peroxidasa, la cual genera un compuesto que es detectado de forma colorimétrica y medida por espectrofotómetros o técnicas automatizadas, como los electrodos enzimáticos, los cuales permiten detectar los niveles de glucosa al llevar un registro de los electrones que pasan a través de la enzima. La enzima se encuentra depositada sobre un electrodo y lo que se mide es el potencial eléctrico generado por la reacción. Esto ha hecho posible la fabricación de microsensors que resultan verdaderas proezas nanotecnológicas y que son utilizados, por ejemplo, en los sensores caseros que miden el nivel de glucosa sanguínea utilizada por muchos diabéticos. Ensayos similares permiten monitorear los niveles de glucosa en procesos de fermentación, biorreactores y el control de niveles de glucosa en materia prima vegetal y productos alimentarios (Raba & Mottola, 1995).

La glucosa oxidasa tiene otras aplicaciones en varias industrias muy importantes. Por ejemplo, en la industria alimenticia, esta enzima se utiliza como un aditivo formulado en forma líquida que, frecuentemente, se clasifica como antioxidante, conservador y estabilizador de alimentos. También es utilizada en la fabricación de pan, en donde se utiliza como un oxidante para producir pan con una mejor textura y para aumentar su volumen, obteniéndose así, una masa con más elasticidad y viscosidad. En la industria vitivinícola, la glucosa oxidasa se utiliza para disminuir los niveles de glucosa en el proceso de fermentación del vino, impidiendo así que microorganismos, como la cepa *Saccharomyces cerevisiae* produzca una mayor cantidad de alcohol, obteniéndose así bebidas con bajo contenidos de alcohol (Pickering, 1999).

La enzima glucosa oxidasa que más se utiliza en las industrias es la aislada del hongo *Aspergillus niger*, debido a su alta especificidad de sustrato (glucosa), su eficiencia, su

estabilidad en un amplio rango de pH (3.5-11.5) y termoestabilidad (94,8% de actividad enzimática a 52°C y un 84,2% de actividad a 56°C) (Wang & Lang, 2013). Aunque han habido varios estudios en otras cepas como en *Saccharomyces cerevisiae* y *Hansenula polymorpha*, existe una constante búsqueda de nuevas cepas de microorganismos con esta enzima y con un rango de actividad más amplio, por lo que el estudio de cepas antárticas podría entregar nuevos datos para futuras aplicaciones biotecnológicas.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Analizar las actividades enzimáticas extracelulares producidas por diferentes especies de levaduras psicotolerantes.

### **Objetivos específicos**

- Extracción de proteínas totales desde el sobrenadante de cultivos de cepas de levaduras antárticas.
- Análisis de las actividades ureasa, gelatinasa, fosfatasa alcalina, invertasa y glucosa oxidasa extracelulares a partir de los extractos obtenidos.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Materiales.

**2.1.1. Cepas de levaduras.** Las levaduras utilizadas en cada actividad se especifican en la Tabla 1. Estas levaduras fueron aisladas y caracterizadas de muestras obtenidas de la Isla Rey Jorge del territorio Antártico chileno por nuestro grupo de trabajo (Baeza y cols., 2010) en el Laboratorio de Genética de la Universidad de Chile.

**2.1.2. Reactivos químicos.** Los diferentes reactivos utilizados en los medios de cultivo o ensayos de actividad, fueron obtenidos en Sigma Chemical, Abnova, Merck y Difco Laboratorios.

### 2.2. Métodos

**2.2.1. Medio de cultivo.** Para crecer levaduras se utilizó el medio de cultivo YM (0,3% extracto de levadura, 0,3% extracto de malta, 0,5% de Bacto pectona), suplementado con un 1% de glucosa. Para la actividad invertasa, se usó medio YM suplementado con 1% sacarosa. Para la forma semisólida se adicionó agar microbiológico (Oxoid) al 1,5%.

**2.2.2. Obtención de proteínas extracelulares totales.** 100 ml de cultivo en fase estacionaria fueron centrifugados a 6000 x g por 10 min y a 4°C. El sobrenadante fue filtrado con una membrana de fluoruro de polivinilideno de 0,45 mm de diámetro (Millipore). Posteriormente, se agregó sulfato de amonio (80% final) en agitación a 4°C por 40 min para precipitar las proteínas presentes en el sobrenadante. Se centrifugó durante 15 min a 10000 x g y el pellet obtenido fue suspendido en 4 ml de "Buffer" Tris-HCl (1 M, pH 7). Las muestras se dializaron (10 kDa tamaño corte) en 1000 ml de

“Buffer” Tris-HCl (0,1 M, pH 7) durante 12 h a 4°C. Finalmente, se almacenaron las proteínas a 4°C hasta su análisis.

**Tabla 1.** Cepas de levaduras antárticas positivas en los ensayos de actividad en colonias.

ACTIVIDAD	TEMPERATURA	CEPAS POSITIVAS EN ENSAYOS DE COLONIAS
UREASA	22°C	<i>Leucosporidiella creatinivora</i>
		<i>Leucosporidiella fragaria</i>
		<i>Glaciozyma antarctica</i>
		<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>
		<i>Rhodotorula laryngis</i>
		<i>Cryptococcus victoriae</i>
	15°C	<i>Rhodotorula glacialis (T11Rs)</i>
		<i>Dioszegia fristingensis (T9Df1)</i>
		<i>Mrakia sp</i>
GELATINASA	22°C	<i>Leucosporidiella creatinivora</i>
		<i>Dioszegia fristingensis (T11Df)</i>
		<i>Leucosporidiella fragaria</i>
		<i>Glaciozyma antarctica</i>
		<i>Candida davisiana</i>
		<i>Cryptococcus waticus</i>
	15°C	<i>Leuconeurospora sp. (T17Cd1)</i>
		<i>Dioszegia fristingensis (T9Df1)</i>
		<i>Mrakia sp</i>
		<i>Metschnikowia bicuspidata</i>
FOSFATASA ALCALINA	30°C	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
	22°C	<i>Candida sake</i>
		<i>Cryptococcus gastricus</i>
		<i>Dioszegia fristingensis (T11Df)</i>
		<i>Candida davisiana</i>
		<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>
		<i>Cryptococcus victoriae</i>
	15°C	<i>Cryptococcus gilvescens</i>
		<i>Rhodotorula glacialis (T11Rs)</i>
	INVERTASA	30°C
22°C		<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
		<i>Leucosporidiella fragaria</i>
		<i>Cryptococcus gilvescens</i>
		<i>Candida sake</i>
15°C		<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>
	<i>Leuconeurospora sp. (T17Cd1)</i>	

Las cepas *Metschnikowia bicuspidata* y *Mrakia psychrophila* no fueron ensayadas en colonia para medir la actividad fosfatasa alcalina, por lo que serán incluidas en este trabajo para su análisis.

**2.2.3. Actividad Ureasa.** Para los ensayos de detección de ureasa extracelular, se hizo una modificación al protocolo de Hankin y Anagnostakis (1975). Se formaron placas semisólidas con "Buffer" fosfato (0,01 M, pH 6), 1,5% de agar y 1% de urea. La urea se agregó de forma estéril (por filtro) antes de que el Buffer-agar se solidificara. Se formaron "pocillos" y se utilizó 100 µl de cada extracto proteico extracelular obtenido de levaduras positivas para la actividad ureasa en ensayos de colonia (Tabla 1). Se usó 1 ml de azul de bromotimol al 1% para el revelado. Se dejó la reacción por 24 h y el ensayo se realizó a las temperaturas óptimas de crecimiento de cada cepa de levaduras.

**2.2.4. Actividad Invertasa.** Se diluyó 100 µl de extracto proteico obtenido de las cepas de levaduras que crecieron en medio YM con 1% sacarosa (Anexo 1), en 1 ml de agua destilada (pH 5,6) con sacarosa 0,2 M. Se realizó el ensayo a las temperaturas óptimas de crecimiento de cada cepa de levaduras por 24 h. Para revelar la actividad, se mezcló 150 µl de cada muestra, con 150 µl de DNS. Se calentó durante 10 min a 100°C. Se colocó en hielo por 5 min y se midió absorbancia a 540 nm.

**2.2.5. Actividad Gelatinasa.** Se formaron placas de medio semisólido compuesto por agar 1,5%, gelatina al 12% y búfer fosfato-citrato (pH 6). Se generaron "pocillos" y se utilizó 100 µl de cada extracto proteico obtenido de levaduras positivas para la actividad en colonia (Tabla 1). Luego de 24 h se midieron los halos de degradación formados. El ensayo se realizó a las temperaturas óptimas de crecimiento de cada cepa de levaduras.

**2.2.6. Actividad Fosfatasa Alcalina.** Se utilizó "Alkaline Phosphatase Assay Kit", adquirido de Abnova, para medir la actividad usando extractos proteicos obtenidos de las cepas positivas para el ensayo en colonia (Tabla 1). Se ensayó por 24 h y a las temperaturas óptimas de crecimiento de cada cepa.

**2.2.7. Actividad Glucosa Oxidasa.** Se diluyó 100 µl de extracto proteico obtenido de las 27 cepas de levaduras en 1 ml de agua destilada (pH 5,6) con glucosa al 10%. Se



colocaron las muestras a las temperaturas óptimas de crecimiento por 24 h. Para el revelado, se tomaron 150  $\mu$ l de cada muestra y se mezcló con 150  $\mu$ l de "Buffer" fosfato 0,2 M con *o*-dianisidina 0,17 mM y peroxidasa (6 U/ml). Para cuantificar la actividad, se midió la absorbancia a 500 nm.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Extracción y análisis de proteínas extracelulares totales.**

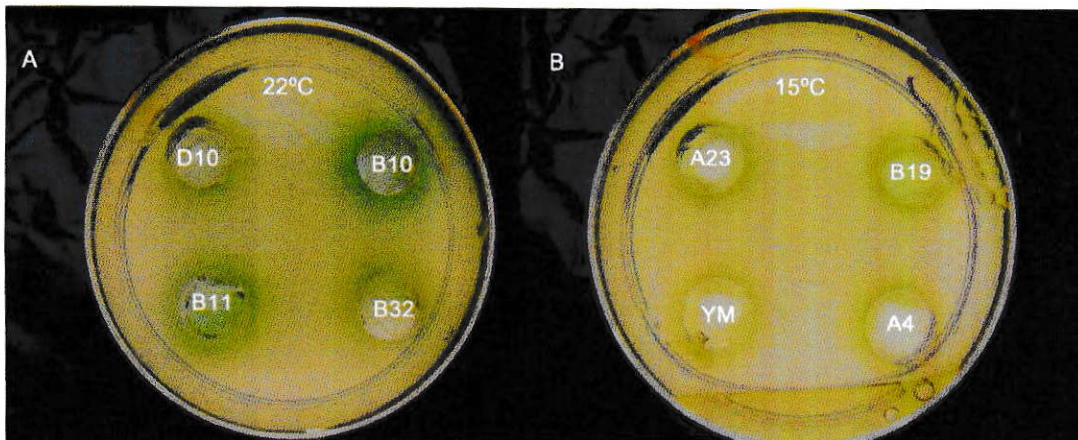
Previamente, la presencia de actividades ureasa, gelatinasa, invertasa y fosfatasa alcalina fue determinada en colonias de 27 cepas de levaduras antárticas. En la Tabla 1 se detallan las levaduras que arrojaron resultados para una o más actividades, las que fueron utilizadas en la presente memoria. Ya que no se disponía de datos referentes a la actividad glucosa oxidasa, esta fue analizada en las 27 cepas de levaduras.

Las levaduras se cultivaron en medio YM suplementado con 1% glucosa hasta fase estacionaria de crecimiento. Para el estudio de actividad invertasa, las levaduras se cultivaron en medio YM suplementado con 1% sacarosa. Desde el sobrenadante de los cultivos se obtuvieron las proteínas totales mediante precipitación con sulfato de amonio.

#### **3.2. Actividad ureasa extracelular.**

Los ensayos fueron realizados a las temperaturas óptimas de crecimiento de cada cepa y pH 6. Una actividad positiva se observa por la formación de un halo de color verde-azul.

La Figura 7 muestra los resultados obtenidos de los ensayos para medir la actividad ureasa a nivel extracelular. Las proteínas totales extraídas fueron colocadas en las placas 1,5% agar con 1% de urea durante 24 h. Se puede observar un halo de color alrededor de los "pocillos" donde se colocaron los extractos proteicos, lo cual determina la presencia de la actividad ureasa, ya que el azul de bromotimol cambia de amarillo a verde-azul frente a un cambio de pH del medio generado por la reacción de la enzima. El tamaño de los halos es distinto en cada cepa ensayada.



**Figura 8. Ensayos de actividad ureasa extracelular a temperaturas óptimas crecimiento.** **D10:** *Glaciozyma antarctica*; **B10:** *Sporidiobolus salmonicolor*; **B11:** *Rhodotorula laryngis*; **B32:** *Cryptococcus victoriae*; **A23:** *Mrakia*; **B19:** *Rhodotorula glacialis*; **A4:** *Dioszegia fristingensis*; **YM:** Control. Se muestran las placas de ensayo con halos alrededor de los “pocillos”, generado por el cambio de pH y detectado con azul de bromotimol.

La Tabla 2 muestra todas las cepas ensayadas para esta actividad y la diferencia entre el diámetro del “pocillo” realizado para el ensayo y el diámetro generado por la actividad ureasa. A 22°C, las cepas *Sporidiobolus salmonicolor*, *Glaciozyma antarctica*, *Rhodotorula laryngis* y *Cryptococcus victoriae* mostraron halos alrededor de los “pocillos” indicadores de actividad ureasa, mientras que en las cepas crecidas a 15°C, solo las levaduras *Mrakia sp.* y *Rhodotorula glacialis* mostraron estos halos indicadores de actividad. La cepa *Dioszegia fristingensis* (T11Df) fue utilizada como control negativo, ya que esta levadura no mostró la actividad ureasa en los ensayos de colonia. Además, se utilizó como control, extracto proteico desnaturalado de cada cepa ensayada, el cual fue colocado a 100 °C por 15 minutos. Otro control realizado fue utilizar proteínas totales extraídas desde un medio de cultivo YM. El valor del halo generado por el control YM fue restado al resto de los datos obtenidos.

**Tabla 2.** Diferencia entre los diámetros de los “pocillos” y los diámetros de los halos indicadores de actividad ureasa medidos a las temperaturas óptimas de crecimiento de cada cepa.

TEMPERATURA 22 °C	Δ DIÁMETRO (mm)	
	Extracto	Desnaturado
<i>Le. creatinivora</i>	0,1	0,0
<i>Le. fragaria</i>	0,0	0,0
<i>Sp. salmonicolor</i>	1,2	0,1
<i>Rh. laryngis</i>	0,8	0,0
<i>Cr. victoriae</i>	0,8	0,0
<i>G. antarctica</i>	0,9	0,0
<b>TEMPERATURA 15°C</b>		
<i>Rh. glacialis</i>	1,0	0,1
<i>D. fristingensis (T9Df1)</i>	0,0	0,0
<i>Mrakia sp.</i>	0,7	0,0
<i>D. fristingensis (T11Df)</i>	0,0	0,0
Control (YM)	0,0	0,0

### 3.3. Actividad invertasa extracelular.

Debido a que la actividad invertasa es reprimida por la presencia de glucosa en el medio, se realizó un ensayo para determinar que cepas podían utilizar la sacarosa como fuente principal de carbono. Las cepas que dieron positivo para la actividad invertasa en colonias (Tabla 1) fueron crecidas en medio YM suplementado con 1% sacarosa y las cepas que crecieron en este medio fueron utilizadas para medir la actividad invertasa a nivel extracelular. Para medir esto, se utilizó medio YM sin fuente de carbono como control. Solo las cepas *Candida sake*, *Wickerhamomyces anomalus* y *Cryptococcus gilvescens* crecieron más en medio YM suplementado con 1% sacarosa que en medio

YM sin fuente de carbono, lo que indica que estas cepas usan la sacarosa como fuente de carbono (Anexo 1).

La Tabla 3 muestra los resultados de los ensayos de actividad invertasa realizados para las 3 cepas de levaduras que crecieron en medio de cultivo YM suplementado con 1% de sacarosa. Las tres cepas estudiadas tienen valores de absorbancia significativos. La cepa *Glaciozyma antarctica* y las proteínas totales extraídas de YM fueron utilizadas como controles. Además, se utilizó como control, extracto proteico desnaturalado de cada cepa ensayada, el cual fue colocado a 100 °C por 15 minutos.

**Tabla 3.** Absorbancia medida en los ensayos de actividad invertasa a las temperaturas óptimas de crecimiento.

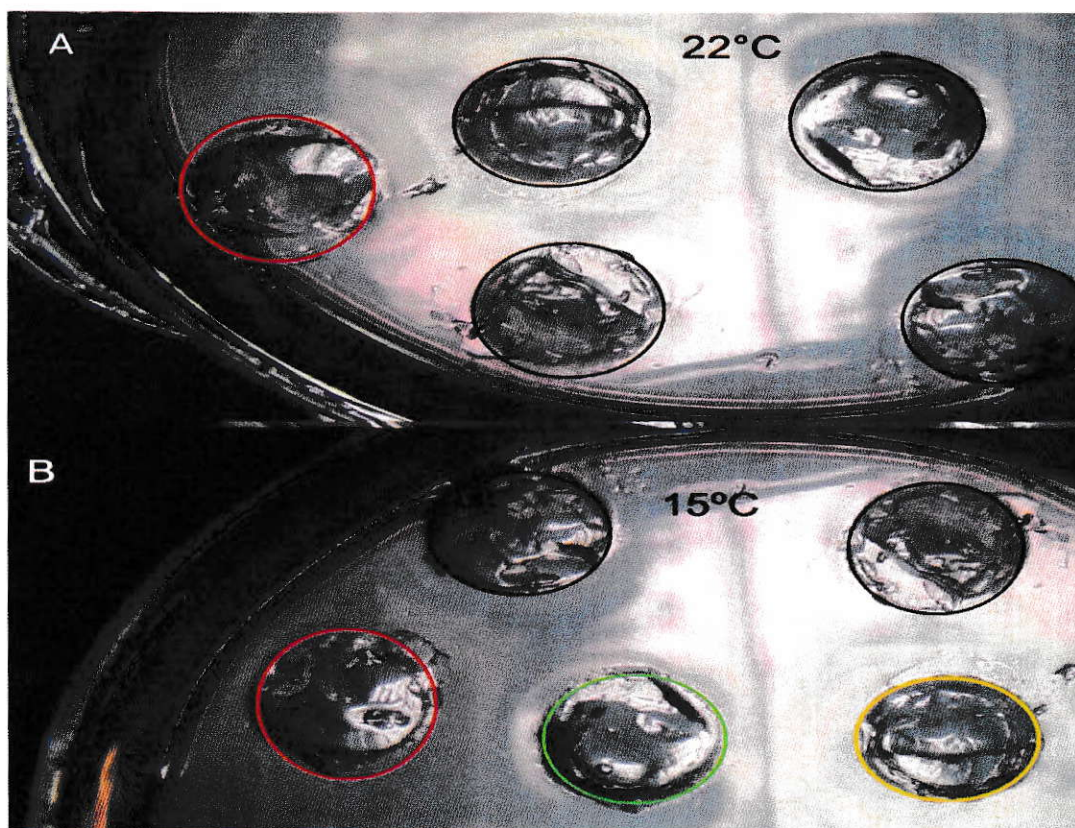
TEMPERATURA 30 °C	ABSORBANCIA 540 nm	
	Extracto	Desnaturalado
<i>W. anomalus</i>	1,103	0,004
TEMPERATURA 22 °C		
<i>C. sake</i>	0,382	0,005
<i>Cr. gilvescens</i>	0,286	0,009
<i>G. antarctica</i>	0,002	0,000
Control (YM)	0,000	0,000

#### 3.4. Actividad gelatinasa extracelular.

Los ensayos de actividad gelatinasa fueron realizados en “Buffer” fosfato-citrato pH 6 y las temperaturas óptimas de las cepas que dieron positivo para esta actividad en los ensayos de colonia (Tabla 1).



La Figura 8 muestra algunas de las placas de ensayo realizadas para medir la actividad gelatinasa extracelular. Para determinar de mejor manera las cepas que poseen actividad gelatinasa, se midió el tamaño de los halos de degradación generados.



**Figura 9. Ensayos de actividad gelatinasa a temperaturas óptimas de crecimiento.** En A se muestran las cepas que crecen a 22°C y el halo rojo indica la degradación del “pocillo” de la cepa *Leucosporidiella fragaria*. En B se observa que la cepa *Mrakia sp* (halo rojo) presenta degradación a 15°C. Los halos verde y amarillo representan los controles realizados (YM y control negativo, respectivamente).

La Tabla 4 muestra los valores de la diferencia del diámetro de los “pocillos” y el diámetro generado por la degradación de la placa de ensayo. Las cepas *Leucosporidiella fragaria*, *Mrakia sp.* y *Metschnikowia bicuspidata* son las cepas con el halo de degradación de mayor tamaño. La cepa *Candida sake* fue utilizada como control negativo junto con las

proteínas totales extraídas del medio de cultivo YM. Además, se utilizó como control, extracto proteico desnaturalado de cada cepa ensayada, el cual fue colocado a 100 °C por 15 minutos.

**Tabla 4.** Diferencia de los diámetros de los “pocillos” y los halos de degradación indicadores de actividad gelatinasa.

TEMPERATURA 22 °C	Δ DIÁMETRO (mm)	
	Extracto	Desnaturalado
<i>Le. creatinivora</i>	0,2	0,0
<i>Le. fragaria</i>	1,5	0,1
<i>G. antarctica</i>	0,2	0,0
<i>D. fristingensis</i>	0,1	0,0
<i>C. davisiana</i>	0,2	0,1
<i>H. waticus</i>	0,0	0,1
<b>TEMPERATURA 15 °C</b>		
<i>Mrakia sp.</i>	2,1	0,0
<i>D. fristingensis (T9Df1)</i>	0,3	0,0
<i>Leuconeurospora sp. (T17Cd1)</i>	0,1	0,0
<b>TEMPERATURA 10 °C</b>		
<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	1,1	0,1
<i>C. sake</i>	0,1	0,0
Control (YM)	0,0	0,0

### 3.5. Actividad fosfatasa alcalina extracelular.

Para estudiar esta actividad se utilizaron las cepas que habían dado positivo para la actividad fosfatasa en colonias y se utilizó “Alkaline Phosphatase Assay Kit”, adquirido de Abnova.

La Tabla 5 muestra los resultados de la actividad fosfatasa alcalina. Se muestra que cinco cepas de levaduras presentan valores de absorbancia significativos, *Wickerhamomyces anomalus* a 30°C, *Candida sake* y *Cryptococcus gilvescens* a 22°C, *Dioszegia sp* a 15°C y *Mrakia psychrophila* a 10°C. El control se realizó con extracto proteico obtenido desde medio YM y se utilizó la cepa *Mrakia blollopis* como control negativo. Además, se utilizó como control, extracto proteico desnaturalado de cada cepa ensayada, el cual fue colocado a 100 °C por 15 minutos.

**Tabla 5.** Absorbancia medida en los ensayos de actividad fosfatasa alcalina a las temperaturas óptimas de crecimiento de cada cepa.

TEMPERATURA 30°C	ABSORBANCIA 405 nm	
	Extracto	Desnaturalado
<i>W. anomalus</i>	1,210	0,001
TEMPERATURA 22°C		
<i>C. sake</i>	3,067	0,010
<i>Cr. gastricus</i>	0,019	0,000
<i>D. fristingensis</i>	0,011	0,002
<i>C. davisiana</i>	0,040	0,004
<i>Sp. salmonicolor</i>	0,051	0,003
<i>Cr. gilvescens</i>	0,286	0,005
<i>Cr. victoriae</i>	0,002	0,000
TEMPERATURA 15°C		
<i>Dioszegia. sp</i>	2,996	0,008
<i>Rh. glacialis</i>	0,021	0,002
TEMPERATURA 10°C		
<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	0,014	0,003
<i>M. psychrophila</i>	0,392	0,008
<i>M. blollopis</i>	0,010	0,000
Control (YM)	0,001	0,001



### **3.6. Actividad glucosa oxidasa extracelular.**

La actividad glucosa oxidasa no fue, previamente, estudiada en colonias, por lo que se decidió hacer el “screening” de todas las cepas estudiadas, pero utilizando, directamente, las proteínas totales extraídas de cada una de las cepas.

La Tabla 6 muestra el “screening” realizado a las proteínas totales extraídas de las 27 cepas de levaduras antárticas estudiadas. Del total de cepas, solo *Cryptococcus gastricus*, *Rhodotorula laryngis*, *Leucosporidiella creatinivora*, *Cryptococcus gilvescens* y *Sporidiobolus salmonicolor* muestran niveles de absorbancia significativas. Se usaron proteínas totales extraídas de medio YM como control del ensayo y además, se utilizó como control, extracto proteico desnaturalado de cada cepa ensayada, el cual fue colocado a 100 °C por 15 minutos.

**Tabla 6.** Absorbancia medida en los ensayos de actividad glucosa oxidasa usando los extractos proteicos de las 27 cepas de levaduras antárticas estudiadas.

TEMPERATURA 30°C	ABSORBANCIA 500 nm	
	Extracto	Desnaturado
<i>W. anomalus</i>	0,022	0,001
<b>TEMPERATURA 22°C</b>		
<i>D. fristingensis (T11Df)</i>	0,004	0,000
<i>C. davisiana</i>	0,010	0,004
<i>H. waticus</i>	0,025	0,009
<i>Cr. gastricus</i>	<b>0,432</b>	0,010
<i>Rh. laryngis</i>	<b>0,196</b>	0,000
<i>Le. fragaria</i>	0,026	0,001
<i>Cr. victoriae</i>	0,002	0,000
<i>Le. creatinivora</i>	<b>0,309</b>	0,007
<i>Cr. gilvescens</i>	<b>0,331</b>	0,004
<i>C. sake</i>	0,024	0,000
<i>Sp. salmonicolor</i>	<b>0,123</b>	0,001
<i>G. antártica</i>	0,004	0,000
<b>TEMPERATURA 15°C</b>		
<i>Cryptococcus. sp</i>	0,026	0,002
<i>Dioszegia sp</i>	0,046	0,012
<i>Rh. glacialis (T8Rg)</i>	0,051	0,000
<i>Leuconeuospora sp.(T11Cd2)</i>	0,003	0,006
<i>Leuconeuospora sp. (T17Cd1)</i>	0,046	0,003
<i>Leuconeuospora sp. (T27Cd2)</i>	0,054	0,000
<i>M. robertii</i>	0,013	0,002
<i>Rh. glacialis (T11Rs)</i>	0,009	0,007
<i>D. fristingensis (T9Df1)</i>	0,055	0,011
<i>Mrakia sp.</i>	0,029	0,000
<i>M. gelida</i>	0,010	0,005
<i>M. blollopis</i>	0,008	0,000
<b>TEMPERATURA 10°C</b>		
<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	0,002	0,001
<i>M. psychrophila</i>	0,007	0,001
Control (YM)	0,000	0,000

#### 4. DISCUSIÓN

Los estudios de microorganismos psicotolerantes han aumentado en los últimos años debido a que presentan una gran oportunidad para encontrar nuevos productos biológicos con un alto potencial industrial y biotecnológico. Por ejemplo, en el trabajo de Loperena y cols. (2012), se realizaron estudios de actividad enzimática extracelular a levaduras extraídas del fondo marino antártico, donde se encontraron microorganismos con actividad celulasa, xilasa, y gelatinasa, principalmente, en levaduras del género *Pseudozyma*. Por otro lado, Fenice y cols. (1997), analizaron levaduras y hongos filamentosos y mostraron que cepas como *Pseudozyma antarctica*, *Leucosporidium antarcticum* y levaduras del género *Cryptococcus* y *Rhodotorula*, aisladas desde la Antártica, presentaban actividad lipasa a nivel extracelular. Sumado a esto, nuestro grupo de trabajo, anteriormente, también realizó varios estudios de actividad a nivel extracelular en cepas de levaduras extraídas de la Isla Rey Jorge, mostradas en el trabajo de Carrasco y cols (2012), en donde se determinó que estas levaduras antárticas poseen varias actividades enzimáticas de alta importancia industrial, como actividad lipasa en cepas como *Rhodotorula laryngis* y *Wickerhamomyces anomalus*; xilanasas en las levaduras *Dioszegia fristingensis* y actividades proteasa, amilasa y esterasa en varias de las cepas analizadas.

Estos antecedentes muestran que el estudio de microorganismos psicotolerantes y el análisis de sus diferentes actividades enzimáticas a nivel extracelular es un tema de mucho interés en el mundo científico y posee un alto potencial para futuras aplicaciones en varias áreas industriales. A pesar de que las actividades analizadas en este trabajo

poseen un alto potencial para futuras aplicaciones industriales, han sido poco estudiadas en levaduras psicotolerantes.

#### **4.1. Ureasa**

Los resultados obtenidos en los ensayos realizados a las cepas que dieron positivo para la actividad ureasa en colonia, muestran que no todas estas cepas poseen actividad ureasa a nivel extracelular. Del total de las cepas ensayadas solo las cepas *Glaciozyma antarctica*, *Sporidiobolus salmonicolor*, *Rhodotorula laryngis*, *Cryptococcus victoriae* *Mrakia sp.* y *Rhodotorula glacialis* presentaron actividad ureasa extracelular. La cepa *Sporidiobolus salmonicolor* fue la que presentó un halo indicador de actividad de mayor tamaño, algo no registrado en trabajos previos. Del mismo modo, no se encontraron antecedentes bibliográficos que demuestren que las cepas *Glaciozyma antarctica* y *Mrakia sp* posean actividad ureasa extracelular. Por otra parte, los resultados obtenidos en las cepas del género *Rhodotorula* y *Cryptococcus* concuerdan con los obtenidos en el trabajo de Singh y cols (2013), en donde se realizaron ensayos para medir la actividad ureasa en cepas de levaduras psicotolerantes obtenidas desde el glaciar Midre Lovenbreen (Ártico). En este trabajo, las cepas del género *Rhodotorula* y *Cryptococcus* presentaron actividad ureasa extracelular a 10°C y 20°C, respectivamente, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en esta memoria, pudiendo tratarse del mismo tipo de enzima o muy similares.

#### **4.2. Invertasa**

El estudio realizado para medir la actividad invertasa extracelular tuvo un paso previo. Se realizó un ensayo para determinar que cepas, de las que dieron positivo para la actividad en colonia, pueden crecer en medio YM suplementado con 1% de sacarosa.

Esto se realizó debido a que la síntesis de la enzima invertasa es inhibida por glucosa. De este ensayo se obtuvo que 3 cepas de levaduras crecen en este medio, *Wickerhamomyces anomalus*, *Candida sake* y *Cryptococcus gilvescens*. A estas tres cepas se les realizó el ensayo para determinar la presencia de actividad invertasa extracelular. Los resultados obtenidos muestran que las tres cepas ensayadas poseen esta actividad, siendo la cepa *Wickerhamomyces anomalus* la que mayor actividad muestra a 30°C, lo cual es un dato novedoso, porque no se encontraron estudios previos de esta cepa de levadura que muestren la presencia de actividad invertasa. Sin embargo, existen varios estudios previos que muestran que cepas del género *Candida* y *Cryptococcus* presentan esta actividad, pero ninguno de estos ensayos fueron realizados en cepas psicrotolerantes. Por ejemplo, en el trabajo de Dworschack & Wickerham (1960), cepas de levaduras del género *Candida*, *Rhodotorula* y *Cryptococcus* mostraron actividad invertasa extracelular a 20°C. Por otro lado, Aydogan y cols (2013) mostraron que cepas del género *Cryptococcus* presentan actividad invertasa extracelular, pero a 35°C.

Los resultados de los ensayos realizados en esta memoria de título concuerdan con los obtenidos en el trabajo de Dworschack & Wickerham (1960), ya que se encontraron cepas de levaduras del género *Candida* y *Cryptococcus* con actividad invertasa, pero como los ensayos fueron realizados a una sola temperatura, es difícil establecer si esta es la temperatura de mayor actividad de la enzima. Por otro lado, en esta memoria no se encontraron cepas de levaduras del género *Rhodotorula* con actividad invertasa.

#### **4.3. Gelatinasa**

La Tabla 1 muestra que solo tres cepas de levaduras mostraron actividad gelatinasa en los ensayos de colonia. Las levaduras con crecimiento óptimo de 30°C no mostraron

halos de degradación en las placas de ensayo. A 22°C, solo la cepa *Leucosporidiella fragaria* generó un halo indicador de actividad gelatinasa. Este resultado se asemeja mucho con el obtenido en los análisis de Vasileva y cols (2013), en donde se realizaron ensayos para determinar la presencia de varias actividades enzimáticas en cepas de levaduras extraídas desde el mar de la Isla Galindez, en la Antártica. En su trabajo, solo la levadura del género *Leucosporidiella* presentó actividad gelatinasa extracelular a 18°C. Por otro lado, en esta memoria, las cepas *Mrakia sp* y *Metschnikowia bicuspidata* presentaron actividad gelatinasa extracelular a 10°C, siendo la primera la que mostró mayor actividad. Resultados similares no aparecen en estudios previos.

#### **4.4. Fosfatasa alcalina**

Los resultados obtenidos en los ensayos de actividad fosfatasa alcalina extracelular mostraron que solo cinco cepas de levaduras presentan esta actividad: *Wickerhamomyces anomalus*, *Candida sake*, *Cryptococcus gilvescens*, *Diosegia sp* y *Mrakia psychrophila*. La cepa *Candida sake* fue la que mayor actividad mostró a 22°C y la presencia de actividad en esta cepa concuerda con lo obtenido en el trabajo de Lacher & Lehmann (1991), en donde se determinó la presencia de actividad fosfatasa alcalina en varias cepas de levaduras del género *Candida*, en ensayos realizados a 25°C. Por otro lado, la presencia de actividad fosfatasa alcalina en la cepa *Cryptococcus gilvescens* a 22°C es consecuente con lo obtenido en el trabajo de García-Martos y cols (2000), en donde se midió la presencia de actividad fosfatasa alcalina extracelular en varias levaduras del género *Cryptococcus* en ensayos realizados a 28°C. Por último, no se encontraron estudios previos que muestren la presencia de actividad fosfatasa alcalina en las cepas *Wickerhamomyces anomalus*, *Diosegia sp* y *Mrakia psychrophila* como los obtenidos en esta memoria.

#### 4.5. Glucosa oxidasa

Del "screening" realizado a las 27 cepas de levaduras antárticas, solo 5 cepas, *Cryptococcus gastricus*, *Rhodotorula laryngis*, *Leucosporidiella creatinivora*, *Cryptococcus gilvescens* y *Sporidiobolus salmonicolor* mostraron actividad glucosa oxidasa extracelular. La cepa *Cryptococcus gastricus* fue la que mayor actividad mostró a 22°C.

Hasta ahora, esta enzima ha sido estudiada y utilizada, principalmente, en *Saccharomyces cerevisiae* y en *Aspergillus niger* (Hellmuth y cols, 1995). No se encontraron estudios previos de esta enzima en alguna de las cepas psicrotolerantes aquí estudiadas, por lo que este trabajo entrega datos que muestran la presencia de actividad glucosa oxidasa extracelular en cepas no descritas anteriormente.

Con todos los datos obtenidos en este trabajo se puede establecer que las levaduras del género *Cryptococcus* presentan la que mayor variedad de actividades enzimáticas, lo que concuerda con varios trabajos previos. Por otro lado, el control de extracto proteico desnaturalado realizado en todos los ensayos, mostró que los valores medidos disminuyeron considerablemente al desnaturalar el extracto obtenidos en cada cepa, lo que muestra que el cambio de pH, degradación de placa o aumento de absorbancia se debió a un compuesto de origen proteico.

Por último, las condiciones de temperatura y pH, utilizadas en este trabajo, puede que no sean las óptimas para las enzimas estudiadas, por lo que, los valores obtenidos solo establecen la presencia o ausencia de una enzima, y no su valor máximo o mínimo, aun así, se puede establecer que las cepas de levaduras antárticas estudiadas poseen actividades enzimáticas extracelular con un alto interés industrial y biotecnológico, pudiendo ser fuente de futuras investigaciones y nuevos estudios.

## 5. CONCLUSIONES

1. En todos los ensayos realizados se pudo determinar, al menos, una cepa de levadura con actividad enzimática extracelular.
2. Las levaduras del género *Cryptococcus* fueron las que poseen mayor variedad de actividades (ureasa, invertasa, fosfatasa alcalina y glucosa oxidasa), resultado que concuerda con varios trabajos previos.
3. Las cepas *Sporidiobolus salmonicolor*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Mrakia sp.*, *Candida sake* y *Cryptococcus gastricus* presentaron los mayores niveles de actividad ureasa, invertasa, gelatinasa, fosfatasa alcalina y glucosa oxidasa, respectivamente.
4. Muchas de las actividades aquí ensayadas no presentan antecedentes previos, por lo que, este trabajo entrega nueva información acerca de actividades enzimáticas de interés comercial en microorganismos psicrotolerantes.



## 6. PROYECCIONES

En este trabajo se mostró que muchas de las cepas de levaduras aisladas desde la Isla Rey Jorge del territorio antártico chileno, producen una gran variedad de enzimas extracelulares, muchas de las cuales, tienen un alto interés comercial e industrial, ya que, al ser liberadas al medio, el costo y el tiempo de obtención de estas enzimas es menor y, se espera que, cambiando las condiciones de temperatura y pH en futuros ensayos se determinen los parámetros de actividad de estas enzimas extracelulares, para encontrar así, enzimas activas a bajas temperaturas de un alto interés comercial y biotecnológico en varias áreas industriales.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

**Aguiar T, Dinis C, Magalhaes F, Oliveira C, Wiebe M, Penttila M y Domingues L.** 2014. Molecular and functional characterization of an invertase secreted by *ashbya gossypii*. *Mol Biotechnol*, **56**: 524–534.

**Arpigny, J y Lamotte, J.** 1997. Molecular adaptation to cold of an Antarctic bacterial lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 3: 29–35.

**Baeza M, Flores O, Carrasco M, Rozas JM, Oviedo V, Barahona S y Cifuentes V.** 2010. The inter-generic fungicidal activity of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J Microbiol*. **48**: 822-8.

**Berg G, Miksztowicz V y Schreier L.** 2011. Metalloproteinases in metabolic syndrome. *Clinica Chimica Acta*, **412**: 1731–1739.

**Carrasco M, Rozas J.M, Barahona S, Alcaíno J, Cifuentes V y Baeza M.** 2012. Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. *BMC Microbiology*, **12**:251.

**Cavicchioli R, Siddiqui K, Andrews D y Sowers K.** 2002. Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr Opin Biotechnol*, **13**: 253-61.

**Comerio R, Tarapow M, Vazquez S y Mc Cormak W.** 2007. Bacterias adaptadas al frío. *Revista Ciencia Hoy en Línea*, **17**: 99.

**D'Amico S, Marx J, Gerday C y Feller G.** 2003. Activity-Stability relationships in extremophilic enzymes. *Journal of Biological Chemistry*. **278**: 7891–7896.

**Dworschack R y Wickerham L.** 1960. Production of extracellular and total invertase by *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, and other yeasts. *UCSF Library & CKM*, **9**: 291-295.

**Du L, Pang H, Wang Z, Lu J, Wei Y.** 2013. Characterization of an invertase with pH tolerance and truncation of its *N*-terminal to shift optimum activity toward neutral pH. *Plos one*, **8**(4): e62306.

**Estaki M, DeCoffe D y Gibson D.** 2014. Interplay between intestinal alkaline phosphatase, diet, gut microbes and immunity. *World J Gastroenterol*, **20**(42): 15650-15656.

**Feller G y Gerday C.** 2003. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptación. *Nature Reviews Microbiology*. **1**: 200–208.

**Fenice M, Selbmann L, Zucconi L, Onofri S.** 1997. Production of extracellular enzymes by Antarctic fungal strains. *Polar Biol*. **17**: 275–280.

**Fernandes J, Amorim R, Azevedo I y Martins M.J.** 2008. In vitro modulation of alkaline phosphatase activity of *Saccharomyces cerevisiae* grown in low or high phosphate medium. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **41**: 41-46.

**Fernández N y Kidney B.** 2007. Alkaline phosphatase: beyond the liver. *Vet Clin Pathol*, **36**: 223–233.

**Ferri S, Kojima K y Sode K.** 2011. Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: A bird's eye view of glucose sensing enzymes. *J Diabetes Sci Technol*, **5**(5):1068-1076.

**García B, Vicedo A, García J y Saldaña A.** 1998. Enzimas proteolíticas relacionadas con la enfermedad Periodontal Inflamatoria. *Rev Cubana Estomatol*, **35**(2):62-67.

**García-Martos P, Martín P, Hernández-Molina J.M, García-Agudo L, Aoufi S y J. Mira J.** 2000. Extracellular enzymatic activity in 11 *Cryptococcus* species. *Mycopathologia*, **150**: 1–4.

**Godfrey T. y West S.** 1996. Industrial enzymology. Londres: *Macmillan Press*, **17**: 109-130.

**Hellmuth K, Pluschkell S, Jung JK, Ruttkowski E y Rinas U.** 1995. Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger* using genetic- and process-engineering techniques. *Appl Microbiol Biotechnol*. **43**(6):978-84.

**Johns G y Somerio G.** 2004. Evolutionary convergence in adaptation of protein to hydrolase enzyme production by soil fungi from King George Island, Antarctic. *Polar Biololy*.

**Kovacevic G, Blaziic M, Draganic B, Ostafe R, Gavrovic-Jankulovic J, Fischer R y Prodanovic R.** 2014. Cloning, heterologous expression, purification and characterization of M12 mutant of *Aspergillus niger* glucose oxidase in yeast *Pichia pastoris* KM71H. *Mol Biotechnol*, **56**:305–311.

**Krajewska B.** 2009. Ureases II. Properties and their customizing by enzyme immobilizations: A review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **59**: 22–40

**Loperena L, Soria V, Varela H, Lupo S, Bergalli A, Guigou M, Pellegrino A, Bernardo A, Calviño A, Rivas F, Batista S.** 2012. Extracellular enzymes produced by microorganisms isolated from maritime Antarctica. *World J Microbiol Biotechnol*, **28**:2249–2256.

**Marini I.** 2005. Discovering an accessible enzyme: salivary  $\alpha$ -amylase. Prima digestion fit in ore: a didactic approach for high school students. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, **33**: 112-116.

**Moreno F, Ochoa F, Gascon S y Villanueva J.** 1975. Molecular forms of yeast invertase. *Eur. J. Biochem*, **50**: 571-579.

**Nuri M, Taskin A, Canli O, Pinar N y Ortucu S.** 2013. Tris–sucrose buffer system: a new specially designed medium for extracellular invertasa production by immobilized cells of isolated yeast *Cryptococcus laurentii* MT-61. *Folia Microbiol*, **13**: 223-258.

**Opdenakker G, Van Damme J.** 1992. Chemotactic factors, passive invasion and metastasis of cancer cells. *Immunol Today*, **13**(11):463-4.

**Pickering G, Heatherbell D, Barnes M.** 1999. The production of reduced-alcohol wine using glucose oxidase treated juice. Part I Composition. *Am J Enol Vitic*, **50**: 291-298.

**Raba J y Mottola H.** 1995. Glucose oxidase as an analytical reagent. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **25**: 1–42.

**Rao B, Tanksale A, Ghatge M y Deshpande V.** 1998. Molecular and biotechnological aspect of microbial proteases. *Microbiology Mol Biology Rev*, **62**: 597-635.

**Rankin S, Christiansen A, Lee W, Banavara D y Lopéz-Hernández A.** 2010. Invited review: The application of alkaline phosphatase assays for the validation of milk product pasteurization. *J. Dairy Sci*, **93**: 5538–5551.

**Roy N, Padmanabhan S, Smith M, Shi L, Navre M y Das G.** 1999. Expression of human gelatinase B in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, **16**: 324–330.

**Rothschils L y Mancinelli R.** 2001. Life in extreme environments. *Nature*, **409**: 1092-1101.

**Russell N.** 2000. Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. *Extremophiles*. **4**: 83–90.

**Singh P, Tsuji M, Mohan S, Singh S, Roy U y Hoshino T.** 2013. Taxonomic characterization, adaptation strategies and biotechnological potential of cryophilic yeasts from ice cores of Midre Lovénbreen glacier, Svalbard, Arctic. *Cryobiology*, **66**: 167–175.

**Valdéz L, González G, Rodríguez M, Rodríguez O y Sijó M.** 1997. Variantes del método de Berthelol. *Rev Cubana Farm*, **31** (2): 96-101.

**Van den Steen P, Dubois B, Nelissen I, Rudd P, Dwek P y Opdenakker G.** 2002. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **37** (6): 375–536.

**Vasileva-Tonkova E, Romanovskaya V, Gladka G, Gouliamova D, Tomova I, Stoilova-Disheva M y Tashyrev O.** 2013. Ecophysiological properties of cultivable heterotrophic bacteria and yeasts dominating in phytocenoses of Galindez Island, maritime Antarctica. *World J Microbiol Biotechnol*, **13**: 274-296.

**Wang H, Lang Q, Li L, Liang B, Tang X, Kong L, Mascini M y Liu A.** 2013. Yeast surface displaying glucose oxidase as whole-cell biocatalyst: Construction, characterization, and its electrochemical glucose sensing application. *Anal. Chem*, **85**: 6107–6112.

## ANEXO

**Anexo 1. Tabla 7.** Ensayo de crecimiento en medio de cultivo YM suplementado con 1% de sacarosa.

HORAS	0 h		24 h		48 h		72 h		96 h		120 h		144 h	
MEDIO	YM	YM + SAC	YM	YM + SAC	YM	YM + SAC	YM	YM + SAC	YM	YM + SAC	YM	YM + SAC	YM	YM + SAC
<b>30°C</b>														
<i>W. anomalus</i>	0,008	0,008	1,872	6,507	2,725	10,900	2,910	11,760	3,386	14,760	3,540	17,180	3,814	17,201
<b>22°C</b>														
<i>Le. fragaria</i>	0,000	0,001	0,010	0,011	0,012	0,013	0,020	0,011	0,014	0,018	0,020	0,019	0,017	0,018
<i>Cr. gilvescens</i>	0,002	0,002	0,029	0,300	1,218	3,147	1,290	3,190	1,559	3,290	1,329	4,012	1,301	4,015
<i>C. sake</i>	0,002	0,001	0,089	1,720	1,464	3,378	1,556	3,890	1,790	4,162	1,802	4,350	1,820	4,361
<i>G. antarctica</i>	0,001	0,001	0,010	0,012	0,010	0,011	0,011	0,012	0,011	0,012	0,014	0,015	0,012	0,011
<b>15°C</b>														
<i>C. davisiana</i>	0,001	0,001	0,187	0,241	1,350	1,116	1,460	1,400	1,640	1,810	2,314	2,237	2,319	2,329

Los ensayos fueron realizados en medio de cultivo YM suplementado con 1% de glucosa y 1% de sacarosa (YM + SAC) y con 1% de glucosa (YM) como control.