

ANÁLISIS DE LA ADAPTACIÓN AL FRÍO DE ENZIMAS COMÚNMENTE EXPRESADAS EN LEVADURAS ANTÁRTICAS

Tesis

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

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

Vicente Andrés Peragallo Papic

Enero, 2023

Director de Tesis Dr: Marcelo Baeza Cancino

RESUMEN BIOGRAFICO

Vicente nació en Santiago de Chile el 27 de julio de 1996, y desde pequeño mostró interés por los animales, explorar y hacer preguntas. Sabiendo que quería estudiar biotecnología desde los 16 años, al salir del colegio entró a la Universidad de Chile, titulándose como Ingeniero en Biotecnología Molecular el año 2021. Hoy en día cumple sus últimos pasos para obtener su Magíster en Ciencias Biológicas en la misma universidad, y se proyecta a continuar con su formación como científico.

AGRADECIMIENTOS

Mis primeros agradecimientos van a mi familia. Son un pilar fundamental en mi vida y siento su apoyo y cariño siempre. Gracias por apoyarme en mi camino en la ciencia, por mostrar interés en lo que hago y estar ahí en los momentos que los necesito. Asimismo, me gustaría agradecer a mis amigos. Son una parte esencial de mi vida y aprecio todo su apoyo en los buenos y malos momentos, las risas y el cariño.

Por último, quiero agradecer a la gente del Laboratorio de Genética, gracias por su simpatía y buena disposición, trabajar con ustedes fue un gusto y un honor. Gracias Dr. Marcelo Baeza por su disposición, guía y enseñanzas en los años que pasé en su laboratorio. Gracias Salva por tu paciencia, simpatía y ganas de enseñar las cosas básicas y no tan básicas en el día a día del trabajo en laboratorio. Gracias Dony por tu ayuda y gentileza. Gracias a mis compañeros de laboratorio Max, Sergio, Feña y Seba por las risas y buenos momentos, además de la buena disposición para hablar y discutir resultados. Gracias en general a todos ustedes por contribuir al buen ambiente y recuerdos con los que termino mi etapa en este lugar.

INDICES

INDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	11
1) Análisis bioinformáticos de secuencias codificantes	11
2) Producción y purificación de enzimas recombinantes	13
RESULTADOS	19
Identificación y análisis bioinformático de características estructurales de enzimas adaptadas al frío	19
Obtención de enzimas recombinantes en la levadura modelo Pichia pastoris	22
Análisis de características bioquímicas y estructurales de la/s enzimas recombinantes	29
DISCUSIÓN	36
Identificación y análisis bioinformático de características estructurales de enzimas adaptadas al frío	36
Obtención de enzimas recombinantes en la levadura modelo P. pastoris	37
Análisis de características bioquímicas y estructurales de la/s enzimas recombinantes	41
CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	48
ANEXO	58

INDICE TABLAS

Tabla 1	20
Tabla 2	22
Tabla 3	30
Tabla 4	32
Tabla 1 Anexo	59
Tabla 2 Anexo	61
Tabla 4 Anexo	62

INDICE FIGURAS

Figura 1	22
Figura 2	24
Figura 3	24
Figura 4	25
Figura 5	26
Figura 6	27
Figura 7	28
Figura 8	29
Figura 9	32
Figura 10	33
Figura 1 Anexo	58
Figura 2 Anexo	58
Figura 3 Anexo	60
Figura 4 Anexo	60

LISTA DE ABREVIATURAS

- UV: Radiación ultravioleta
- TOC: Temperatura óptima de crecimiento
- VC: Velocidad de crecimiento
- CDS: Secuencia codificante
- Int_hif: Interacciones hidrofóbicas
- P_de_H: Puentes de hidrógeno
- Apolar SAS: Superficie apolar accesible al solvente
- Apolar SES: Superficie apolar excluida del solvente
- AAs_flex: Aminoácidos flexibles
- Int_ionic: Interacciones iónicas
- PDB: Protein Data Bank
- GMQE: Global Model Quality Estimate
- GT: Glucoamilasa de *Tetracladium* sp.
- AHja: Amilasa de *Hypocrea jecorina*
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- SDS-PAGE: Electroforesis en gel de acrilamida con dodecil sulfato de sodio
- DNS: Ácido dinitrosalicílico
- PVDF: Fluoruro de polivinilideno
- Tetsp_amy: Amilasa de *Tetracladium* sp.
- Vvic_amy: Amilasa de *Vishniacozyma victoriae*
- Tmax: Temperatura de máxima actividad
- Vmax: Velocidad máxima

- KM: Constante de Michaelis-Menten
- Mut⁺: Fenotipo de utilización de metanol positivo
- Mut^s: Fenotipo de utilización de metanol lento
- AOX1: Alcohol oxidasa 1
- SCM: Sitio de clonamiento múltiple
- pb: Pares de bases
- DNA: Ácido desoxiribonucleico

RESUMEN

Gran parte de la superficie terrestre está expuesta a temperaturas permanentes bajo los 5°C, incluyendo el fondo de los océanos, glaciares y altas cumbres. Estos lugares son el hábitat de diversos microorganismos que han desarrollado estrategias para sobrevivir a estas condiciones, entre ellas, las enzimas adaptadas al frío. Estas enzimas han llamado la atención de los científicos por las interrogantes que rodean su adaptación a bajas temperaturas respecto de sus contrapartes mesófilas y su potencial biotecnológico como biocatalizadores en diversas industrias, donde se busca reducir los costos energéticos y el impacto ambiental de los procesos productivos. En este trabajo se estudió las diferencias estructurales entre enzimas de levaduras antárticas y sus homólogos mesófilos, y su asociación con una mayor actividad a bajas temperaturas.

Se midió distintas características estructurales de nueve tipos de enzimas y se realizaron pruebas de correlación y diferencia de medias entre los grupos adaptados al frío y mesófilo, encontrando diferencias significativas en interacciones como puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, y la superficie apolar expuesta y excluida del solvente. Además, se expresó una glucoamilasa recombinante del hongo antártico *Tetracladium* sp., la cual se purificó parcialmente y se determinó su temperatura de máxima actividad, constante de Michaelis-Menten y Velocidad máxima (45°C, 41,75 g/L y 0,006 min⁻¹, respectivamente) con almidón soluble como sustrato a pH 7. Por último, se realizó un análisis más acabado de las características estructurales de esta enzima con su molde mesófilo, encontrando diferencias importantes en la composición de ciertos residuos, motivos estructurales e interacciones asociadas a la adaptación a bajas temperaturas.

ABSTRACT

A large portion of Earth's surface is exposed to permanent temperatures below 5°C, including the bottom of the ocean, glaciers, and high mountains. These places are the habitat of a diversity of microorganisms that developed strategies to survive these conditions; cold-adapted enzymes are among those strategies. Scientists have focused on cold-adapted enzymes because of their intriguing adaptations to cold, and their biotechnological potential as biocatalysts in industries looking to reduce energy costs and their impact on the environment. This study focuses on the structural differences of enzymes from Antarctic yeasts, their mesophilic homologs, and their association with a greater catalytic activity at lower temperatures.

Structural characteristics were measured in nine types of enzymes, which were analyzed between cold-adapted and mesophilic groups, finding significant differences in the number of hydrogen bonds, hydrophobic interactions, solvent-accessible surface, and solvent-excluded surface. A recombinant glucoamylase from the Antarctic fungi *Tetracladium* sp. was expressed, partially purified and its temperature of maximal activity, Michaelis-Menten constant and maximal velocity (45°C, 41,75 g/L y 0,006 min⁻¹, respectively) were determined with soluble starch as substrate at pH 7. Finally, a thorough structural study between this enzyme and its mesophilic template was performed, finding important differences in residue, composition, structural motifs, and interactions associated with cold adaptation.

INTRODUCCIÓN

En nuestro planeta, gran parte de la superficie está expuesta a temperaturas permanentes bajo los 5°C, compuesta principalmente por glaciares, cordones montañosos y el fondo de los océanos (Feller y Gerday, 2003; D'Amico y col., 2006; Feller, 2013; Baeza y col., 2019). Las condiciones climáticas de estos lugares no han evitado que diversas formas de vida las hayan colonizado, evolucionando y generando distintas estrategias para adaptarse y prosperar en estos ambientes. En especial, los microorganismos que habitan estos lugares han captado la atención de los científicos las últimas décadas debido a las dudas que surgen alrededor de sus mecanismos adaptativos y el potencial biotecnológico que presentan (Shivaji y Prasad, 2009; Santiago y col., 2016). A estos microorganismos se les conoce como psicrófilos o psicrotolerantes dependiendo del rango de temperatura al cual crecen (Feller y Gerday, 1997). Para efectos de este trabajo, se les llamará microorganismos adaptados al frío o microorganismos adaptados a bajas temperaturas. Los microorganismos adaptados a una temperatura mayor a los 30°C aproximadamente se les conoce como mesófilos, mientras que los adaptados a temperaturas mayores a 50°C son clasificados como termófilos (Feller y Gerday, 1997; Atalah y col., 2019).

A temperaturas tan bajas, la velocidad de las reacciones químicas se ve disminuida de manera importante, teniendo un efecto directo en el metabolismo de cualquier organismo vivo (Feller y Gerday, 2003; Santiago y col., 2016). Hoy en día existe evidencia de un gran número de adaptaciones presentes en microorganismos adaptados al frío, que les ayudaría a sobrellevar el efecto rigidizante que las bajas temperaturas tienen sobre los distintos componentes celulares. Dentro de las más estudiadas están la mantención de la fluidez

de la membrana plasmática, la presencia de solutos crioprotectores en el citoplasma, producción de proteínas anticongelantes, producción de enzimas adaptadas al frío, entre otras (D'Amico y col., 2006; Shivaji y Prasad, 2009; Goyal, D y col., 2022). Dado que las reacciones químicas que conforman el metabolismo de un organismo se llevan a cabo principalmente por enzimas, no es sorpresa que se haya puesto gran atención a las posibles adaptaciones que estas puedan presentar en un microorganismo adaptado al frío.

Durante los últimos 20 años se han realizado una gran cantidad de trabajos que apuntan a dilucidar los mecanismos bioquímicos y estructurales que les permite a las enzimas adaptadas al frío llevar a cabo reacciones químicas a bajas temperaturas (Parvizpour y col., 2021). La mayoría consisten en la purificación de estas enzimas y su caracterización, pero a medida que se han ido resolviendo las estructuras tridimensionales se ha podido complementar la evidencia empírica con predicciones computacionales, modelamiento y dinámica molecular (Bhatia y col., 2021), pudiendo encontrar una creciente cantidad de estructuras resueltas de enzimas adaptadas al frío en bases de datos como Protein Data Bank. Por otro lado, técnicas como la metagenómica han permitido encontrar secuencias novedosas de enzimas provenientes de ambientes extremos sin la necesidad de cultivar los microorganismos de los cuales provienen, ampliando el espectro de posibles enzimas candidatas para aplicar en procesos industriales que se beneficien de una reducción en la temperatura a la que se llevan a cabo (Vester y col., 2015).

Hoy en día y desde las últimas décadas es común encontrar trabajos que complementen sus resultados empíricos con predicciones bioinformáticas, principalmente mediante modelamiento por homología. Es de esta forma principalmente que se han ido proponiendo teorías sobre distintas adaptaciones que podrían presentar las enzimas provenientes de microorganismos adaptados al frío que les permitirían funcionar a bajas temperaturas de la misma manera como lo harían sus contrapartes adaptadas a temperaturas más elevadas. Hoy en día es aceptado que por lo general estas enzimas presentan una mayor flexibilidad

estructural, a cambio de una mayor inestabilidad estructural y sensibilidad a temperaturas elevadas, permitiéndoles llevar a cabo los cambios conformacionales necesarios para su actividad catalítica y contrarrestar el efecto rigidizante que el frío tiene en estas macromoléculas (D'Amico y col., 2006). Más aún, existe evidencia que sugiere una mayor flexibilidad estructural localizada en el sitio activo de estas enzimas, generando que la actividad de estas enzimas se pierda previo al desplegamiento del resto de la estructura enzimática (Feller y Gerday, 2003; Feller, 2013).

Estas teorías derivan de ensayos de actividad enzimática y desplegamiento realizado en diversas enzimas. D'Amico y col., (2003) realizaron experimentos en α -amilasas de *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Sus scrofa* y *Bacillus amyloliquefaciens* (psicrófila, mesófila y termófila, respectivamente), y observaron que mientras la temperatura de mayor actividad para cada enzima ($\sim 30^{\circ}\text{C}$, $\sim 50^{\circ}\text{C}$ y $\sim 90^{\circ}\text{C}$) aumentaba dependiendo de donde provenían, en el caso de la enzima adaptada al frío su desplegamiento comenzaba desde los 40°C , mientras que para las enzimas restantes el desplegamiento comenzaba aproximadamente a la misma temperatura de máxima actividad. Resultados similares fueron reportados por Collins y col., (2003) utilizando xilanasas de *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Streptomyces* sp. y *Clostridium thermocellum*; Lonhienne y col., (2001) con quitobiasas de *Arthobacter* sp. y *Serratia marcescens*; Berg y col., (2019) con DNA ligasas de *Psychromonas* sp., *Aliivibrio salmonicida* y *Pseudoalteromonas artica*; y Bentahir y col., (2000) con fosfoglicerato quinasas de *Pseudomonas* sp. y *Saccharomyces cerevisiae*.

En los trabajos de Bentahir y col., (2000), Lonhienne y col., (2001) y Berg y col., (2019), complementan sus resultados con modelamiento por homología, herramienta que les permite proponer características estructurales posiblemente responsables de la adaptación a bajas temperaturas. En general se reporta una disminución en distintos tipos de interacciones conocidas por otorgar estabilidad y rigidez a la estructura terciaria de las proteínas, como interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones iónicas, entre otras (Siddiqui

y Cavicchioli, 2006). Al mismo tiempo, se pone énfasis en residuos específicos, como la glicina, arginina y prolina. La glicina es el aminoácido con la cadena lateral más pequeña, consistiendo en un hidrógeno, lo que le proporciona mayor libertad de rotación a la cadena principal de la proteína, así como mayor libertad de movimiento a las cadenas laterales de residuos adyacentes (Ramli y col., 2012). Por otro lado, la prolina posee una cadena lateral unida covalentemente al átomo de nitrógeno de la cadena principal de la proteína, restringiendo la rotación del enlace N-C α , rigidizando la estructura secundaria y terciaria (Siddiqui y Cavicchioli, 2006). Por último, la arginina es un aminoácido capaz de formar varias interacciones con residuos adyacentes, contribuyendo a la estabilidad de la estructura proteica (Feller y Gerday, 2003). En los trabajos previamente mencionados se propone la variación en el contenido de estos residuos como parte de las adaptaciones a bajas temperaturas de estas enzimas. Resultados similares se han reportado por trabajos bioinformáticos, donde se analiza el contenido de residuos en β -galactosidasas (Kumar y col., 2014), quitinasas (Ang y col., 2021) y lipasas (Yang y col., 2021) adaptadas al frío respecto de sus contrapartes mesófilas y termófilas. Además, Ang y col., (2021) reporta la posible importancia de los loops en la pérdida de estabilidad estructural al aumentar la temperatura. Este resultado se ha replicado en una amilasa adaptada al frío comparado a una amilasa de páncreas de cerdo (Socan y col., 2020). Más aún, en ambos trabajos se resalta la importancia de los loops cercanos al sitio activo, que parecen presentar una inestabilidad particularmente alta en las enzimas estudiadas, sumando evidencia que apunta a un aumento de la inestabilidad y flexibilidad centrada en el sitio activo de enzimas adaptadas al frío.

La importancia de caracterizar estas enzimas no solo radica en esclarecer las preguntas que surgen respecto de su adaptación a bajas temperaturas, sino también a cómo pueden beneficiar a distintas industrias con sus novedosas cualidades. Hoy en día la aplicación de enzimas en procesos productivos es un mercado bien establecido, avaluado en US \$5,5 billones en 2018, con proyecciones de llegar a US \$7 billones en 2023 (Bhatia y col., 2021). Industrias como la farmacéutica, alimenticia, detergentes, textil y biocombustibles han

incorporado ya a sus procesos la biocatálisis (Sanchez y Demain, 2011; Santiago y col., 2016; Yuivar y col., 2017). Una de las características más importantes de estas enzimas es la alta actividad catalítica a bajas temperaturas comparado con enzimas provenientes de organismos mesófilos. Esta cualidad es bastante atractiva para diversas industrias debido a que, por un lado, la cantidad de enzima necesaria para llegar a la misma productividad que con enzimas convencionales es menor, y por otro no es necesario aumentar la temperatura de los procesos productivos para que la enzima sea eficiente, ahorrando tanto en insumos como en energía. Junto con lo anterior, las enzimas poseen un gran potencial en la industria farmacéutica en el desarrollo de intermediarios y moléculas bioactivas. Esto debido a que las condiciones que requieren para llevar a cabo las reacciones son menos adversas que con métodos convencionales, por lo que se puede prescindir de aditivos tóxicos y contaminantes, además de pasos de calentamiento. En el caso de la producción de compuestos quirales, las enzimas son el perfecto catalizador, debido a su alta estereoselectividad, siendo capaces de producir el compuesto deseado en un alto grado de pureza. Por último, llevar a cabo procesos productivos a bajas temperaturas significa una ventaja en cuanto a la disminución de subproductos derivados de reacciones indeseadas producidas por altas temperaturas, además de disminuir la probabilidad de contaminación bacteriana.

Como se mencionó anteriormente, hay diversas industrias que se benefician del uso de enzimas, aún más cuando son adaptadas al frío. Existe una gran cantidad de tipos de enzimas que se pueden aplicar en una diversidad de procesos de distintas industrias. Una de ellas que se ve altamente beneficiada por el uso de enzimas adaptadas al frío es la alimenticia (Kuddus, 2018). Enzimas como la proteasa, son utilizadas en el ablandamiento de la carne, donde bajas temperaturas son deseables para mantener la calidad de esta. Las pectinasas son ampliamente utilizadas en la elaboración de jugos de fruta, disminuyendo la viscosidad de este. La mantención de bajas temperaturas evita la pérdida de elementos inestables y volátiles que le dan sabor al jugo, además de evitar contaminaciones de microorganismos indeseados (Ramya y Pulicherla, 2015). La β -galactosidasa se utiliza en la hidrólisis de la

lactosa, para producir leche sin lactosa. Otra industria que se ve altamente beneficiada por la incorporación de enzimas adaptadas al frío es la de detergentes (Al-Ghanayem y Joseph, 2020). Las manchas de la ropa consisten principalmente de componentes lipídicos, proteicos y almidón. Es por esto que las principales enzimas estudiadas y utilizadas para este fin son las proteasas, lipasas, amilasas y celulasas. El beneficio de la adición de enzimas adaptadas a bajas temperaturas a los detergentes radica en eliminar la necesidad de utilizar agua caliente para los lavados y disminuir la toxicidad del producto, volviéndolo eco amigable y biodegradable. Por último, los procesos de bioconversión en la industria química y farmacéutica han incorporado enzimas como parte de sus reactantes por las razones explicadas anteriormente. Enzimas como esterases, lacasas, glicosiltransferasas y alcohol deshidrogenasas (Shoda y col., 2016; An y col., 2019) son utilizadas para producir compuestos de alto valor agregado. En determinadas ocasiones, la evolución dirigida es utilizada como método para mejorar la selectividad y eficiencia de estas enzimas (Fryszkowska y Devine, 2020).

La alta demanda de enzimas por parte de la industria se contrasta con los bajos niveles de producción que presentan por lo general los organismos de origen, por lo que la tecnología de DNA recombinante ha sido ampliamente utilizada para satisfacer esta necesidad (Kopetzki y col., 1994). Los microorganismos más utilizados para este fin son *E. coli* en el caso de los procariontes y *S. cerevisiae* y *Pichia pastoris* en el caso de los eucariontes (Trono, 2019). *E. coli* presenta la ventaja de un rápido crecimiento en condiciones de laboratorio y una gran variedad de vectores, promotores, cepas, ect. para lograr el mayor nivel de expresión de la enzima recombinante posible. Los sistemas procariontes no pueden llevar a cabo modificaciones postraduccionales, lo que representa un problema al expresar enzimas que las necesiten para ser activas. Los modelos de expresión eucariontes poseen la cualidad de poder llevar a cabo estas modificaciones, además de poder secretar la enzima al medio extracelular. *S. cerevisiae* presenta el fenómeno de hiperglicosilación, lo que puede afectar el funcionamiento de la enzima producida. Este fenómeno es menos frecuente en *P. pastoris*

(Cereghino y Cregg, 2000). Una gran variedad de enzimas adaptadas al frío ha sido producida mediante esta tecnología (Santiago y col., 2016), principalmente en *E. coli* y *P. pastoris*, resaltando la importancia de este método y su aplicabilidad a la producción de enzimas de diversos orígenes.

Durante la última década, en nuestro laboratorio se ha investigado la diversidad, las características adaptativas y la producción de metabolitos de interés industrial de levaduras antárticas. En un principio, se puso atención a la producción de metabolitos como esteroides, pigmentos, micospirinas, y enzimas extracelulares (Carrasco y col., 2012; Barahona y col., 2016; Villarreal y col., 2016; Villarreal y col., 2018). En el caso de los esteroides, el único que se encontró fue ergosterol, mientras que en el caso de los pigmentos se encontraron principalmente carotenoides como el licopeno, β -caroteno, γ -caroteno, toruleno, entre otros. Junto con las micospirinas, los carotenoides y el ergosterol juegan un rol importante en la adaptación y prevención de los efectos de las especies reactivas de oxígeno (Margesin y col., 2007), generadas principalmente por la radiación ultravioleta (UV). Teniendo en cuenta que en la Antártica hay entre 16 y 18 horas de radiación solar en el verano (McKenzie y col., 2007) y con la reducción de la capa de ozono, los niveles de radiación en esta zona son muy altos (McKenzie y col., 2011) por lo que es esperable que los microorganismos aislados de este lugar presenten adaptaciones a estas condiciones. Adicionalmente, la evidencia apunta a que el ergosterol tiene efectos en la fluidez y permeabilidad de la membrana plasmática de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Daum y col., 1998), por lo que su presencia en levaduras antárticas puede darles una ventaja al mantener la integridad y funcionamiento de la membrana plasmática a bajas temperaturas.

Junto con los metabolitos mencionados anteriormente, se ha logrado comprobar la presencia de enzimas hidrolíticas extracelulares en distintas levaduras adaptadas a bajas temperaturas. Carrasco y col., (2012) y Barahona y col., (2016) reportan actividades amilasa, celulasa, esterasa, lipasa, proteasa, pectinasa, quitinasa, xilanasas, gelatinasa, fosfatasa alcalina e

invertasa. Esto da cuenta del enorme potencial que presentan las levaduras aisladas de la región antártica para la obtención de enzimas con importantes aplicaciones biotecnológicas. Es por esto que en los últimos años los esfuerzos han estado puestos en la búsqueda, caracterización y purificación de estas enzimas, con ejemplos de éxito como una glucosa oxidasa de *Goffeauzyma gastrica*, invertasa de *Wickerhamomyces anomalus*, fosfatasa alcalina de *Dioszegia* sp., α -glucosidasa de *Dioszegia fristingensis*, pectinasa y glucoamilasa de *Tetracladium* sp. y una gelatinasa de *Mrakia* sp. (Carrasco y col., 2017 a, b; Yuivar y col., 2017; Carrasco y col., 2019; Yuivar y col., 2019). La mayoría de estas enzimas muestra un comportamiento esperable de una enzima adaptada al frío, con una temperatura de máxima actividad bajo los 40°C a las condiciones ensayadas, e inactivándose rápidamente sobre los 50°C. Sin embargo, en el caso de la invertasa y glucosa oxidasa, presentan la mayor actividad a 60°C, aunque manteniendo un nivel de actividad significativo hasta los 37°C, siendo activas en un amplio rango de temperaturas.

Además de realizar análisis en enzimas específicas, nuestro esfuerzo también ha estado orientado a determinar si las adaptaciones estructurales presentes en enzimas adaptadas al frío descritas en la literatura se encuentran de manera general en el genoma y transcriptoma de levaduras antárticas, las cuales difieren tanto en su temperatura de mayor crecimiento como su velocidad de crecimiento en las condiciones ensayadas (Baeza y col., 2021; Baeza y col., 2022). Un resultado interesante es que, a nivel de genoma, no se encontró correlación en la variación del contenido de aminoácidos específicos y la temperatura óptima de crecimiento de las distintas levaduras, la cual varía desde 10 a 30°C. Más aún, si bien se encontró una correlación entre una menor temperatura óptima de crecimiento (TOC) y un aumento en la cantidad de aminoácidos catalogados como flexibles al agrupar las secuencias codificantes (CDS) por rutas metabólicas, la mayor tendencia se vió cuando se comparó este parámetro con la velocidad de crecimiento (VC), existiendo una correlación directa entre la cantidad de aminoácidos flexibles en ciertos grupos de CDS de levaduras con una baja TOC y una VC alta. En el caso de levaduras con TOC altas, se encontró una relación inversa entre

la VC y la cantidad de aminoácidos flexibles. Estos resultados concuerdan con los resultados de los análisis realizados con el transcriptoma de estas levaduras. Además, en este estudio las levaduras se cultivaron a su TOC para luego dividir el cultivo y la mitad exponerlo a 4°C. En base a esto, se estudió si las enzimas sobreexpresadas a 4°C contenían un mayor número de adaptaciones a bajas temperaturas. No se encontró relación entre los niveles de expresión y la presencia de estas adaptaciones al realizar comparaciones dentro de cada levadura y entre levaduras. Sin embargo, al comparar los modelos tridimensionales de un grupo selecto de estas enzimas con los de sus enzimas molde, se encontraron diferencias significativas en ciertos aspectos estructurales, como algunos tipos de interacciones electrostáticas y presencia de tipos de aminoácidos en determinadas estructuras secundarias.

En general, es aceptado que dentro de la gran variedad de adaptaciones que pueden presentar las enzimas adaptadas al frío, cada familia de enzimas puede adoptar su propio repertorio, presentando variaciones entre especies y la procedencia del microorganismo (D'Amico y col., 2006 ;Santiago y col., 2016), lo que dificulta la formulación de una regla unificada sobre qué es lo que le confiere a estas enzimas sus cualidades tan interesantes. Además, la gran mayoría de las enzimas estudiadas procede de bacterias y organismos procariontes (Baeza y col., 2021), por lo que todavía queda mucho que estudiar y comprender sobre otras formas de vida tan importantes como los hongos.

En un trabajo previo (Peragallo, 2020) se identificó marcos de lectura abierto procedentes del transcriptoma de ocho levaduras antárticas, las cuales poseen TOC que varían entre los 10 y 30°C, correspondientes a nueve tipos de enzimas, los cuales fueron sintetizados en vectores comerciales para su posterior expresión heteróloga y caracterización (Tabla 3 del Anexo).

En esta tesis se apuntó a expresar estas enzimas de manera recombinante, y así determinar la temperatura de máxima actividad y de desplegamiento bajo ciertas condiciones

experimentales, con el fin de comprobar experimentalmente si las enzimas expresadas por levaduras adaptadas al frío tienen un comportamiento concordante con el descrito en la literatura y los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, así como aportar al creciente conocimiento sobre enzimas provenientes de levaduras adaptadas al frío y su potencial como biocatalizadores para una industria más sustentable.

HIPÓTESIS

Las enzimas provenientes de levaduras antárticas poseen propiedades estructurales significativamente diferentes de sus contrapartes mesófilas y asociadas a una mejor/mayor actividad a bajas temperaturas

OBJETIVO GENERAL

Determinar características estructurales de enzimas provenientes de levaduras antárticas y analizar su implicancia en la adaptación a bajas temperaturas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar y analizar bioinformáticamente características estructurales de enzimas adaptadas al frío.
- Obtener enzimas recombinantes en la levadura modelo *Pichia pastoris*.
- Analizar características bioquímicas y estructurales de la/s enzimas recombinantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

1) Análisis bioinformáticos de secuencias codificantes:

a) Obtención de secuencias preliminares:

Las secuencias utilizadas previo a los análisis se obtuvieron como se menciona en (Peragallo, 2020).

b) Selección de secuencias y creación de modelos tridimensionales:

Se crearon modelos tridimensionales por homología de cada secuencia codificante de aminoácidos utilizando la herramienta online Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) (Guex y col., 2009; Bertoni y col., 2017; Bienert y col., 2017; Waterhouse y col., 2018; Studer y col., 2020). Por cada secuencia, se seleccionó el modelo que tuviera el mayor Global Model Quality Estimate (GMQE). La secuencia de la enzima molde de cada modelo se obtuvo del Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>) para realizar alineamientos globales entre cada secuencia y su molde utilizando la herramienta web EMBOSS Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) (Madeira, F. y col., 2022). Se seleccionaron las secuencias que tuvieran un 30% o más de identidad con su respectivo molde. Se verificó la calidad del modelo creado mediante la herramienta web Verify3D (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) (Bowie, J.U y col., 1991; Lüthy, R y col., 1992), donde se seleccionaron los modelos que tuvieran una puntuación de 0.8 o superior.

c) Análisis de composición de residuos, interacciones y superficies:

Se utilizaron las siguientes categorías de aminoácidos: Menor volumen (A,C,G,S,T), Pequeños (A,C,D,G,N,P,S,T,V), Alifáticos (A,I,L,V), Aromáticos (F,H,W,Y), No Polares (A,C,F,G,I,L,M,P,V,W,Y), Polares (D,E,H,K,N,Q,R,S,T), Cargados (D,E,H,K,R), Básicos (H,K,R), Ácidos (D,E).

La cuantificación de cada categoría de residuo por secuencia se calculó con Microsoft Excel (V 16.6).

La visualización de los modelos tridimensionales, la cuantificación de puentes de hidrógeno (P_de_H) y superficies apolares accesibles (Apolar_SAS) y excluidas (Apolar_SES) del solvente se calcularon mediante el software UCSF Chimera (V 1.14). La cuantificación de enlaces iónicos (int_ionic) e interacciones hidrofóbicas (int_hif) se realizó con la herramienta web PIC (<http://pic.mbu.iisc.ernet.in/>) (Tina y col., 2007). La medición de las distintas interacciones se normalizó por el número total de residuos de la secuencia respectiva. En el caso de las superficies apolares, se normalizaron por la superficie apolar total.

El porcentaje de residuos flexibles (AAs_flex) se cuantificó con la herramienta web MEDUSA (<https://www.dsimb.inserm.fr/MEDUSA/>), utilizando dos niveles de flexibilidad (Vander Meersche y col., 2021).

d) Análisis estadísticos, de regresión y gráficos:

Todos los análisis estadísticos y de regresión se realizaron en RStudio (V 4.1.2). La confección de los gráficos se realizó con Graphpad Prism 9.

e) Caracterización estructural de GT y AHja:

Se utilizó la secuencia de los modelos de ambas enzimas para realizar la caracterización. En el caso de AHja, su modelo 3D corresponde a 2vn4. La composición de tipo de residuos y residuos específicos, así como las superficies y tipos de interacciones se evaluó como se explica previamente. La composición de residuos flexibles se realizó con el software MEDUSA con tres

niveles de flexibilidad. La identificación de los residuos involucrados en la catálisis y unión del sustrato según se describe en Bott y cols., 2008.

2) Producción y purificación de enzimas recombinantes:

a) Replicación de secuencias en *E. coli*:

Las secuencias codificantes de las enzimas seleccionadas clonadas en los vectores comerciales pUC57, pCCI o pJET1.2, fueron transformadas en *E. coli* DH5 α por electroporación en cubetas de 2 mm y sembradas en medio LB sólido suplementado con ampicilina (100 ug/mL). Se seleccionaron colonias transformantes mediante PCR con partidores M13 (forward= 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'; reverse=5'-GGAAACAGCTATGACCAT-3'). Los vectores se purificaron por miniprep utilizando el Kit de minipreparación de plásmidos GeneJET (Thermo Scientific™) y digeridos con las enzimas de restricción EcoRI y NotI o KpnI y NotI dependiendo de la secuencia.

b) Subclonamiento de secuencias en vector pPICZ α A:

El vector pPICZ α A se transformó en *E. coli* DH5 α mediante electroporación en cubetas de 2 mm y las colonias transformantes se seleccionaron en medio LB sólido con zeocina (85 μ g/mL) y se corroboraron por PCR con los partidores forward=5'-GAGTGGTCGGAGGTCGTGTC-3' y reverse=5'-AGCTTGCAAATTAAGCCTTCG-3'. El vector fue purificado por miniprep utilizando el Kit de minipreparación de plásmidos GeneJET (Thermo Scientific™) y digerido con las enzimas de restricción EcoRI y NotI o KpnI y NotI para la posterior ligación. Para ligar el vector pPICZ α A con la secuencia respectiva se utilizó la T4 DNA ligasa (Thermo Scientific™). El vector ligado se transformó en *E. coli* DH5 α , las células se sembraron en medio LB sólido suplementado con zeocina (85 μ g/mL) y las colonias transformantes se corroboraron por PCR con los partidores incluidos en EasySelect™ *Pichia*

Expression Kit (Invitrogen™). Los vectores se purificaron por kit de miniprep y se linealizaron con la enzima de restricción PmeI. El DNA se precipitó siguiendo el protocolo descrito en el manual de EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Invitrogen™).

c) Transformación de los vectores subclonados en *Pichia pastoris*:

Los vectores pPICZ α A con sus respectivas secuencias codificantes fueron transformados en *P. pastoris* KM71H y X-33 por electroporación siguiendo el protocolo del kit. Las células transformantes se seleccionaron en medio YEP sólido suplementado con zeocina (100 μ g/mL). La presencia del vector en el genoma se comprobó por PCR con los partidores incluidos en EasySelect™ o los partidores forward=5'-GAGTGGTCGGAGGTCGTGTC-3' y reverse=5'-AGCTTGCAAATTAAGCCTTCG-3 en el caso de transformar el vector vacío.

d) Inducción y selección de clones productores de enzimas recombinantes:

Los clones transformantes de *P. pastoris* KM71H y X-33 se crecieron en medio MGY (Minimal Glycerol Medium) (1.34% YNB, 1% Glicerol, $4 \cdot 10^{-5}$ % biotina) a 28°C, 220 RPM por 24 horas y se indujeron con metanol al 0.5% del volumen final del cultivo en medio MM (Minimal Methanol Medium) (1.34% YNB, 0.5% metanol, $4 \cdot 10^{-5}$ % biotina) con buffer fosfato 100 mM a 28°C, 220 RPM por 4 días. La adición de metanol se repitió cada 24h hasta recolectar los cultivos. Para seleccionar clones transformantes que expresaran niveles cuantificables de enzima, se cultivaron 5 colonias que previamente habían crecido en medio sólido YEP suplementado con zeocina (100 μ g/mL) en 100 mL de medio MGY por 24 horas, para luego inducirlos en 10 mL de medio MM por 4 días. Se centrifugó los cultivos a 4000 RPM por 10 minutos y se recolectó las células y el sobrenadante para los ensayos posteriores, guardándose a -20°C en caso de no utilizarse de inmediato. El contenido intracelular se obtuvo realizando lisis mecánica mediante perlas de vidrio de 0.5 mm (BioSpec Products) en un

moedor de células Mini-BeadBeater (BioSpec Products), realizando nueve ciclos de lisis por 30 segundos intercalados con 30 segundos en hielo. Se centrifugó la muestra a 15000 RPM a 4°C por 10 minutos y el contenido intracelular se guardó a -20°C hasta su uso. El contenido de proteína se visualizó mediante SDS-PAGE 10%.

e) Inducción de clon seleccionado:

El clon seleccionado de *P. pastoris* se creció en un total de 1,5 L de medio MGY (Minimal Glycerol Medium) (1.34% YNB, 1% Glicerol, $4 \cdot 10^{-5}$ % biotina) dividido en 6 cultivos de 250 mL en matraces de 1L a 28°C, 220 RPM por 24 horas. Se indujo con metanol al 0.5% del volumen final de los cultivos en medio MM (Minimal Methanol Medium) (1.34% YNB, 0.5% metanol, $4 \cdot 10^{-5}$ % biotina) con buffer fosfato 100 mM a 28°C, 220 RPM por 4 días. La adición de metanol se repitió cada 24h hasta recolectar los cultivos.

f) Medición de actividad amilolítica:

La actividad amilolítica se midió por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS)(Miller G. L., 1959), para detectar la presencia de azúcares reductores, utilizando almidón soluble 10 g/mL como sustrato. Para los ensayos se utilizaron controles negativos de la enzima denaturada y sin enzima. Los controles positivos se realizaron con glucosa. La absorbancia de 100µL de muestra se midió a 540 nm en un EPOCH2 (BioTek™) en placas de 96 pocillos transparentes (Thermo Scientific™). Para evitar valores de absorbancia con un nivel de error elevado, se consideraron valores significativos mayores a 0,2 para concluir que hay presencia de azúcares reductores. En caso de ser ensayos comparativos, se cuantificó la cantidad de proteína utilizada mediante el Kit de ensayo de proteínas BCA Pierce™ (Thermo Scientific™) según las instrucciones del kit, y se realizó los ensayos con la misma cantidad de proteína por triplicado. En caso de querer determinar presencia de actividad,

se utilizó 30 μL de solución de almidón y 30 μL de muestra problema. La incubación se llevó a cabo en un termociclador convencional.

En el caso de la determinación de presencia de actividad amilolítica mediante medio sólido, se utilizó placas de agar 1,5% con almidón soluble 0.2%. Se le hizo orificios al agar con puntas estériles para depositar la solución de enzima en él. La actividad se determinó por la presencia de un halo transparente al teñir el agar con solución yoduro 0.625%. Se utilizó como control la enzima denaturada, el buffer de la solución enzimática y extracto intracelular de *P. pastoris* transformada con el vector sin secuencia de amilasa.

g) Purificación de enzimas recombinantes:

Se utilizaron columnas de afinidad de níquel-sefarosa HisTrap™ FF crude de 1 mL (GE Healthcare) e intercambio iónico HiPrep™ SP FF 16/10 (GE Healthcare), HiPrep™ Q FF 16/10 (GE Healthcare), y columnas de exclusión molecular Superdex™ 75 10/300 GL (GE Healthcare) y Superdex™ 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare). En el caso de la columna de afinidad HisTrap™ FF crude, previo a cargar la muestra, se realizó un lavado con 10 volúmenes de agua destilada y 10 volúmenes de buffer de unión (Tris-HCl 20 mM pH = 7.4, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM), se cargó la muestra previamente filtrada en filtros Durapore PVDF 0.22 μm (Millipore) (1 mL de extracto intracelular diluído 10 veces), se realizó un nuevo lavado de 10 volúmenes de buffer de unión, y se realizó una elución por gradiente de concentración de imidazol con buffer de elución (Tris-HCl 20 mM pH=7.4, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM). Las fracciones se recolectaron en un equipo AKTAprime plus (GE Healthcare), y se dializaron a 4°C por 2 horas en volúmenes de 400 μL en un volumen total de 1 L de buffer Tris-HCl 20 mM, pH = 7. Para las columnas HiPrep™ SP FF 16/10, HiPrep™ Q FF 16/10, se equilibraron con buffer Tris-HCL 20 mM, pH = 7. Se cargó 0.5 mL de lisado celular previamente filtrado y se recolectaron las fracciones mediante gradiente de NaCl utilizando buffer de

elución (buffer Tris-HCl, pH = 7, NaCl 1M) y se dializaron como se mencionó previamente. Para la columna de exclusión molecular Superdex™ 75 10/300 GL, se le realizó un lavado de un volumen de agua destilada y se equilibró con un volumen de buffer Tris-HCl 20 mM, pH = 7. Se cargó 2 mL de contenido intracelular previamente filtrado y se recolectó las fracciones con presencia de proteína. Para la columna de exclusión molecular Superdex™ 200 Increase 10/300 GL, se le realizó un lavado de un volumen de agua destilada y se equilibró con un volumen de buffer Tris-HCL 20 mM, pH = 7. Se cargó 2 y 5 mL de contenido intracelular previamente filtrado y se recolectó las fracciones con presencia de proteínas. Las fracciones recolectadas se visualizaron por SDS-PAGE 10% y 8% y se guardaron a -20°C en caso de que no se utilizaran inmediatamente.

h) Cálculo de peso molecular de enzimas recombinantes:

El peso molecular de las enzimas recombinantes se determinó a partir de SDS-PAGE, midiendo el avance relativo de las bandas del patrón de peso molecular y la banda de la enzima recombinante como se menciona en Hames, 1998.

El tamaño esperado de la enzima purificada se determinó mediante el servidor online Compute pI/Mw (https://web.expasy.org/compute_pi/).

La presencia de sitios para glicosilación se predijo mediante los servidores NetOGlyc (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetOGlyc-4.0>) y NetNGlyc (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0>).

i) Cálculo experimental de temperatura de mayor actividad, constante de Michaelis-Menten y Velocidad máxima:

Para determinar la temperatura de máxima actividad, se incubó la reacción enzimática por un máximo de 4 horas a 30, 40, 45, 50 y 55°C, tomando puntos por triplicado cada 30 minutos. Se graficó la absorbancia obtenida por el método de DNS versus el tiempo y se calculó la pendiente de la curva, la cual corresponde a la velocidad de reacción en cada condición. La velocidad

medida a cada temperatura se graficó para determinar a qué temperatura se obtuvo la mayor velocidad.

Para determinar la constante de Michaelis-Menten y la Velocidad máxima, se incubó la reacción enzimática a la temperatura de máxima actividad determinada previamente a concentraciones ascendentes de sustrato. Se tomaron puntos por triplicado cada 30 minutos hasta llegar a un máximo de 3 horas y 30 minutos para cada concentración. La absorbancia de cada punto se graficó versus el tiempo de reacción y la pendiente de cada curva se graficó versus la concentración de sustrato para obtener la curva de Michaelis-Menten. Por último, se calculó la constante de Michaelis-Menten y la Velocidad máxima a partir del modelo ajustado a la curva de Michaelis-Menten.

Se utilizó 18,5 μg de proteína por ensayo.

RESULTADOS

Identificación y análisis bioinformático de características estructurales de enzimas adaptadas al frío:

En un trabajo previo en el laboratorio, se identificaron 57 marcos de lectura abierto (ORF) en el transcriptoma de 8 levaduras antárticas, pertenecientes a 9 tipos de enzimas con potencial aplicación industrial (Tabla 3 y 4 del Anexo). Estos tipos de enzimas estaban presentes en al menos 4 de las 8 levaduras analizadas. Además de crear esta base de datos, se enviaron a sintetizar 34 de estas secuencias (Alcohol deshidrogenasas, β -Glucosidasas, Amilasas, Isocitrato Deshidrogenasas y Fosfatasas Ácidas) en vectores comerciales con el fin de estudiar su posible adaptación a bajas temperaturas y potencial aplicación industrial.

Con el objetivo de encontrar características estructurales en las enzimas presentes en la base de datos mencionada previamente, descritas en otras enzimas adaptadas al frío y asociadas a la adaptación a bajas temperaturas, se construyeron modelos tridimensionales (3D) a partir de las secuencias codificantes de estas enzimas, los cuales se seleccionaron como se describe en Materiales y Métodos. Los modelos y secuencias seleccionadas se analizaron tanto en composición de tipo de residuos como número de interacciones no covalentes y residuos flexibles. Además, se creó una variable adicional llamada Clase, la cual tomó el valor de 0 si la secuencia proviene de una levadura antártica o 1 si la secuencia corresponde a la enzima molde (Tabla 1 del Anexo). Creando estos dos grupos de secuencias se buscó determinar, primero, si existe una correlación entre alguna de las variables y la pertenencia a alguno de los dos grupos, para luego buscar diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos respecto de estas variables.

Como se muestra en la Tabla 1, se encontró correlaciones significativas entre cuatro variables y Clase. Específicamente, los puentes de hidrógeno (P_de_H) e interacciones hidrofóbicas (int_hif) muestran una correlación directa con la variable Clase cuando toma el valor 1 (Clase = 1). Por otro lado, tanto la superficie apolar accesible al solvente (Apolar_SAS) y excluida del solvente (Apolar_SES) muestran una correlación inversa respecto de la variable Clase = 1. int_hif muestra el mayor índice de correlación entre las variables con una correlación estadísticamente significativa, además de tener la mayor significancia entre las cuatro variables mencionadas anteriormente. Por otro lado, el índice de correlación de P_de_H es el más cercano a cero, y su p-valor es bastante cercano a 0,05, indicando que es la variable menos significativa en términos de correlación.

Tabla 1: Correlación entre las variables del set de datos y la variable Clase

Variable 1	Variable objetivo	Correlación	p-valor
int_hif	Clase 1	0,635	1,35E-08
Apolar_SES	Clase 1	-0,354	0,00385
Apolar_SAS	Clase 1	-0,323	0,00868
P_de_H	Clase 1	0,252	0,043
int_ionic	Clase 1	0,214	0,0876
Menor volumen	Clase 1	-0,176	0,16
No_Polares	Clase 1	-0,149	0,237
Polares	Clase 1	0,149	0,237
Aromáticos	Clase 1	0,124	0,325
Alifáticos	Clase 1	-0,122	0,335
Pequeños	Clase 1	-0,0602	0,634
Cargados	Clase 1	0,0376	0,766
Ácidos	Clase 1	0,0357	0,778
Básicos	Clase 1	0,031	0,806
AAs_flex	Clase 1	-0,0275	0,828

Sabiendo que existe una correlación significativa entre el grupo al que pertenece cada secuencia y las cuatro variables mencionadas anteriormente, lo siguiente fue determinar si existe una diferencia significativa entre ambos grupos de secuencias si se agrupan por cada variable y graficar los datos para poder comparar visualmente las distribuciones de cada grupo. Para esto, primero se evaluó si estas variables siguen una distribución normal

mediante la prueba estadística de Shapiro-Wilk, y si se cumple la presencia de homocedasticidad mediante la prueba de Fligner-Killeen en caso de no existir normalidad o Bartlett en caso de existir normalidad. En caso de cumplirse la normalidad y homocedasticidad, se evaluó la diferencia de las medias de los grupos mediante la prueba t de student. En caso de no cumplirse la normalidad o la homocedasticidad se utilizó la prueba Suma Rango de Wilcoxon.

Como se puede observar tanto en la Figura 1 como en la Tabla 2, existe una diferencia significativa de la media entre ambos grupos cuando se evalúan las variables seleccionadas. Los resultados son consistentes con el análisis anterior, siendo la variable *int_hif* la que muestra la diferencia más significativa de las cuatro variables. Asimismo, *P_de_H* es la variable que muestra la diferencia menos significativa. La cruz en los gráficos de la Figura 1 muestran la media de cada grupo, donde se puede comprobar los resultados de las pruebas estadísticas. Además, al observar la distribución de los grupos para cada variable, es posible verificar que la separación de los datos de ambos grupos es más acentuada para *int_hif* (Figura 1a) donde el solapamiento ocurre entre un extremo y el rango intercuartil. En contraste, para el resto de las variables (Figura 1b, c, d) se puede observar un solapamiento entre los rangos intercuartil de ambos grupos, e incluso entre el resto de los datos en cada distribución.

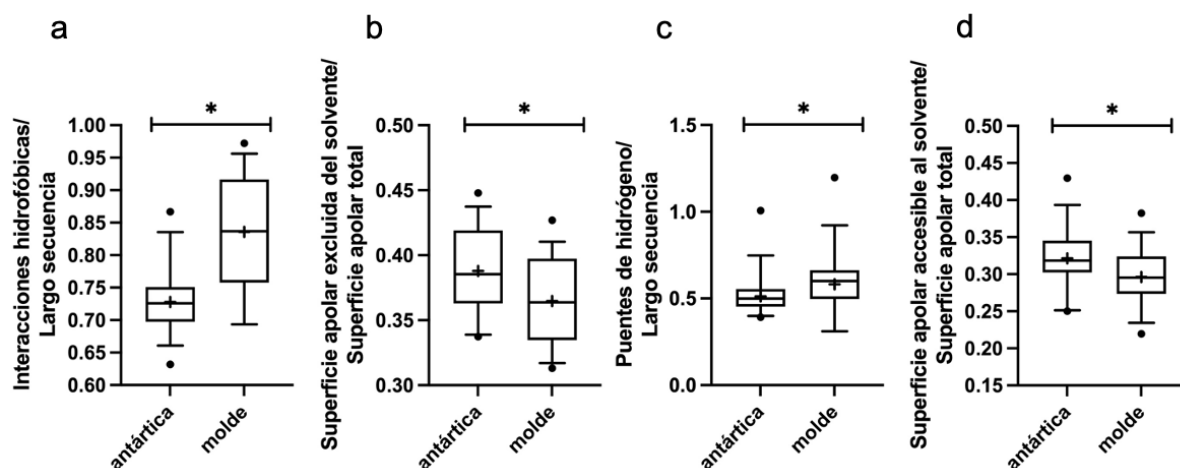


Figura 1: Distribución de los grupos de secuencias antárticas y molde para las variables int_hif (a), Apolar_SES (b), P_de_H (c) y Apolar_SAS (d). La cruz en cada distribución indica la media de cada grupo. En cada gráfico muestra del percentil 5 al 95.

Tabla 2: Análisis de significancia entre clases

Variable	Prueba estadística	p-valor
int_hif	Wilcoxon test	$4,74 \cdot 10^{-7}$
SAS apolar	t-test	$4,3 \cdot 10^{-3}$
SES apolar	Wilcoxon test	$4,25 \cdot 10^{-3}$
P_de_H	Wilcoxon test	$2,25 \cdot 10^{-3}$

En base a estos resultados se puede inferir que, para este grupo de datos, existe una correlación directa entre una menor cantidad de interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno y que la secuencia pertenezca a una enzima proveniente de levaduras antárticas. Consistentemente, existe una diferencia significativa en el número de estas interacciones entre secuencias de levaduras antárticas y sus moldes, habiendo en promedio menor cantidad de estas interacciones en el primer grupo mencionado. Por otro lado, se determinó una correlación inversa entre una menor superficie hidrofóbica accesible y excluida del solvente y que la secuencia pertenezca a una enzima proveniente de levaduras antárticas. De manera concordante, se determinó una diferencia significativa entre los dos grupos de secuencias respecto de las dos variables anteriormente mencionadas, habiendo en promedio una mayor superficie hidrofóbica expuesta y excluida del solvente en enzimas de levaduras antárticas.

Obtención de enzimas recombinantes en la levadura modelo *Pichia pastoris*:

El siguiente paso de este trabajo fue obtener enzimas recombinantes en la levadura modelo *Pichia pastoris*. Se trabajó con las secuencias sintetizadas mencionadas previamente. Para

este objetivo se utilizaron las cepas X-33 y KM71H y el vector de expresión pPICZ α A, el cual tiene la característica de incluir en el extremo 5' del sitio de clonamiento múltiple (SCM) el factor- α de *S. cerevisiae*, el cual sirve para exportar la enzima recombinante al medio de cultivo. En el extremo 3' del SCM se encuentra la cola de histidina, para la eventual purificación de la enzima recombinante por columna de níquel-sefarosa. En un comienzo, se intentó la producción de enzimas recombinantes en la cepa X-33, sin obtener actividad enzimática intra y extracelular luego de intentar diferentes condiciones de cultivo, por lo que se intentó con la cepa KM71H. La presencia de enzima recombinante se identificó realizando un *screening* a cinco clones de una glucoamilasa y dos amilasas provenientes de las levaduras *Tetracladium* sp. (GT y Tetsp_amy) y *Vishniacozyma victoriae* (Vvic_amy). Se midió la producción de azúcares reductores tanto del medio intra como extracelular de estos clones, y el mismo procedimiento se realizó para la cepa KM71H transformada con el vector vacío (KM71H pPICZ α A) como control negativo.

En la Figura 2 se muestran gráficos de la actividad de cada clon analizado para cada enzima. A partir de los controles negativos de transformación de la Figura 2 se puede inferir que *P. pastoris* no tiene actividad amilolítica intra ni extracelular. Se identificó actividad amilolítica intracelular en tres clones de GT (Figura 2a) y cuatro de Vvic_amy (Figura 2b). Ninguno de los cinco clones analizados de Tetsp_amy mostró actividad amilolítica intra o extracelular (Figura 2c). De la misma manera, ningún clon analizado mostró actividad amilolítica extracelular. A partir de estos resultados, se optó por continuar los experimentos con el contenido intracelular de estos clones.

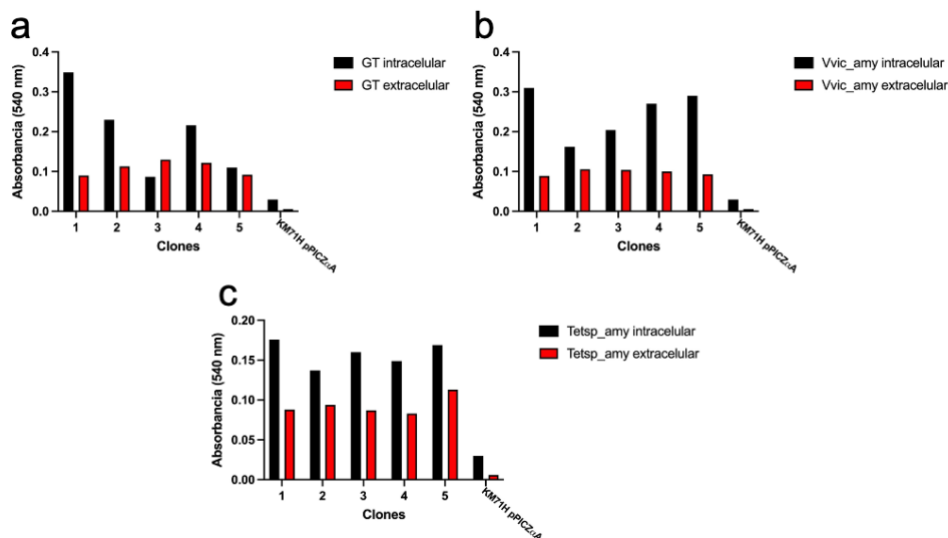


Figura 2: Detección de azúcares reductores en medio intra y extracelular por método de DNS en clones de *P. pastoris* recombinantes transformados con GT (a), Vvic_amy (b) y Tetsp_amy (c). En cada gráfico se incluye el control negativo de *P. pastoris* transformada con el vector vacío pPICZ α A. Las mediciones se realizaron una vez.

Adicionalmente, se quiso saber si el vector se insertó exitosamente en el genoma de los clones analizados. En la Figura 3 se muestran las PCR realizadas en los cinco clones de GT, los clones 1 y 5 de Tetsp_amy y Vvic_amy, y el clon transformado con el vector vacío. Se verificó la presencia del vector en todos los clones analizados, por lo que la diferencia, e incluso ausencia de actividad es atribuible a otros factores.

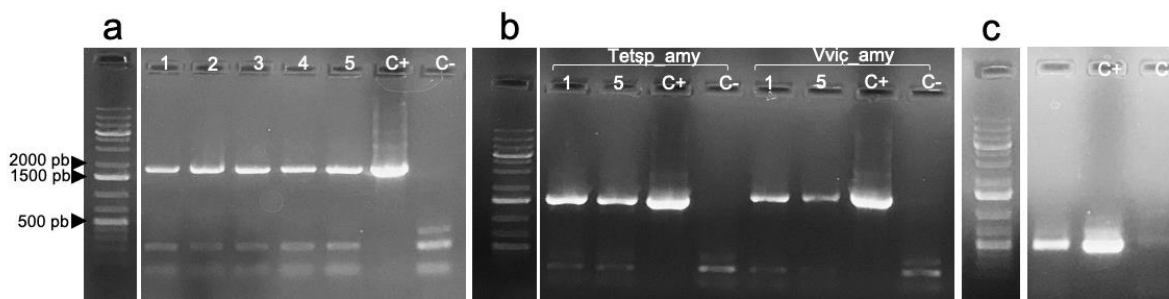


Figura 3: PCR de clones recombinantes de *P. pastoris* transformados con GT (~1859 pb) (a), Tetsp_amy (~1548 pb) y Vvic_amy (~1599 pb) (b) y pPICZ α A vacío (~500 pb) (c). C+: control positivo. C-: control negativo.

Por último, se quiso determinar estadísticamente si existen diferencias en la actividad de las enzimas estudiadas comparadas entre ellas y con el control. Para esto se seleccionó un clon de GT y de Vvic_amy en base a la actividad obtenida previamente, y se efectuaron ensayos

de actividad por triplicado. No se analizó a Tetsp_amy debido a la ausencia de actividad amilolítica. Se determinó si los datos de cada grupo se distribuyen de manera normal con la prueba de Shapiro-Wilk y si hay presencia de homocedasticidad con la prueba de Fligner-Killeen en caso de no existir normalidad o Bartlett en caso de existir normalidad.

En el caso de que se cumplieran las condiciones anteriores, se determinó si existe una diferencia significativa entre los datos mediante la prueba estadística t de student. En caso de que no se cumpliera una de las condiciones anteriores, se utilizó la prueba Suma Rango de Wilcoxon.

Como se muestra en la Figura 4, existe una diferencia significativa entre la actividad de todos los clones analizados, siendo mayor la de GT en comparación a Vvic_amy. Tanto GT como Vvic_amy tienen una actividad significativamente mayor que KM71H pPICZ α A. En base a estos resultados, se decidió continuar trabajando con GT para los análisis posteriores.

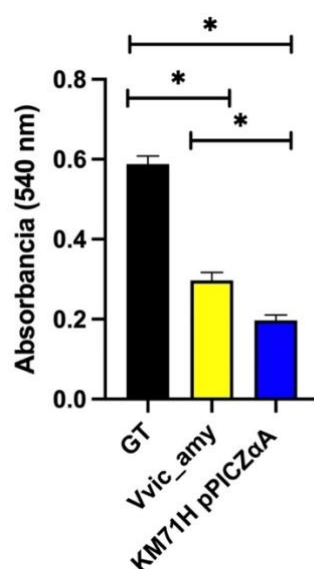


Figura 4: Análisis de diferencia en la producción de azúcares reductores en el medio intracelular del clon seleccionado de GT y Vvic_amy, con almidón soluble como sustrato. Se incluye a KM71H pPICZ α A como control negativo. Las mediciones se realizaron por triplicado. * p-valor<0,05.

Para comprobar la presencia de actividad amilolítica de manera directa en el medio intracelular del clon elegido de GT y descartarla completamente en KM71H pPICZ α A, se decidió realizar un ensayo de actividad en placa de agar almidón 0,2% (Figura 5a). La presencia de actividad amilolítica se comprueba tiñendo la placa con solución yoduro y observando la presencia de un halo claro donde se agregó el lisado celular. Se puede observar que existe actividad amilolítica en el lisado celular del clon GT, mientras que no se evidencia un cambio donde se agregó el lisado de KM71H pPICZ α A. Además, se visualizó el contenido de proteínas totales de estos dos clones por SDS-PAGE, normalizado por concentración (Figura 5b). Se observa una banda más intensa en el carril correspondiente al lisado del clon GT, indicado con la flecha roja. El tamaño esperado para GT es de aprox. 80 kDa, por lo que la banda se encuentra dentro del rango de peso molecular esperado.

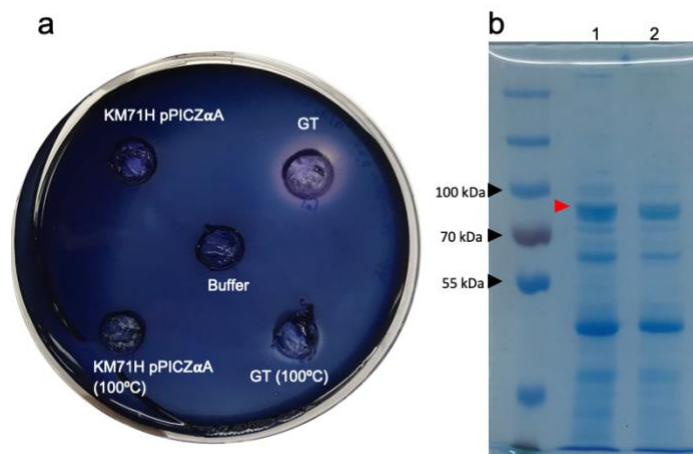


Figura 5: (a) Determinación de la actividad amilolítica del contenido intracelular del clon seleccionado de GT por medio de ensayo en placa agar almidón (0,2%). Se incubó el lisado celular de este clon (GT), su lisado celular denaturado (GT (100°C)), lisado celular de KM71H pPICZ α A (KM71H pPICZ α A), lisado celular de KM71H pPICZ α A denaturado (KM71H pPICZ α A (100°C)) y el buffer de resuspensión del contenido intracelular (Buffer). (b) SDS-PAGE del contenido intracelular de GT y KM71H pPICZ α A diluïdos 1:10. La flecha roja indica la banda correspondiente a GT.

Habiendo comprobado la actividad amilolítica del clon recombinante seleccionado de *P. pastoris* para GT y habiendo visualizado su expresión por medio de SDS-PAGE, se quiso saber preliminarmente la temperatura de máxima actividad a las condiciones ensayadas para los análisis posteriores. Se probó tres temperaturas distintas (22, 30 y 37°C) detectando la

mayor cantidad de azúcares reductores a 37°C (Figura 6a). Se realizó el mismo ensayo en KM71H pPICZ α A para contrastar. Consistente con los resultados mostrados previamente, la

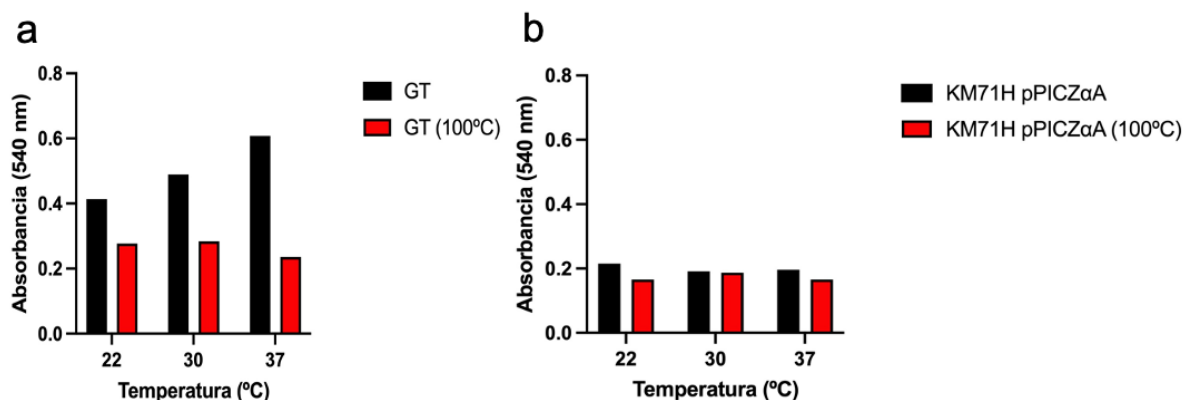


Figura 6: Análisis preliminar de la temperatura de máxima actividad del clon seleccionado de GT (a) y KM71H pPICZ α A (b). Se incluye la medición del lisado celular denaturado (rojo). Las mediciones se realizaron una vez.

señal observada por absorbancia no parece ser de una enzima amilolítica, ya que no hay un cambio de absorbancia detectable a medida que se aumenta la temperatura de la reacción. Además, en estos gráficos se muestra la señal medida para la enzima denaturada. Se observa que los valores de estas mediciones son consistentes en los dos clones analizados, y en el caso de KM71H pPICZ α A, no hay una diferencia aparente entre los niveles de absorbancia medidos para la muestra problema y la denaturada.

Teniendo seleccionado el clon a analizar y habiendo comprobado la presencia de la enzima recombinante, se procedió a purificarla. Se intentaron los métodos de cromatografía por columna de níquel-sefarosa, intercambio aniónico y catiónico, y exclusión molecular. Se pudo purificar parcialmente GT a partir de cromatografía de exclusión molecular (Figura 7a), donde la banda obtenida se condice con el tamaño esperado de GT. Además, se detectó actividad amilolítica en algunas de las fracciones (Figura 7a), lo que no se logró por los otros métodos. De la purificación se obtuvo aproximadamente 30 fracciones, en las que se observó un aumento de la actividad amilolítica hasta la fracción 20 y 21, las cuales además mostraron la mayor pureza. Estas fracciones se recolectaron y se utilizaron para los análisis posteriores.

En la Figura 7b se muestra una imagen representativa de la mezcla de las fracciones recolectadas, donde se puede observar la presencia de GT, señalada por la flecha roja.

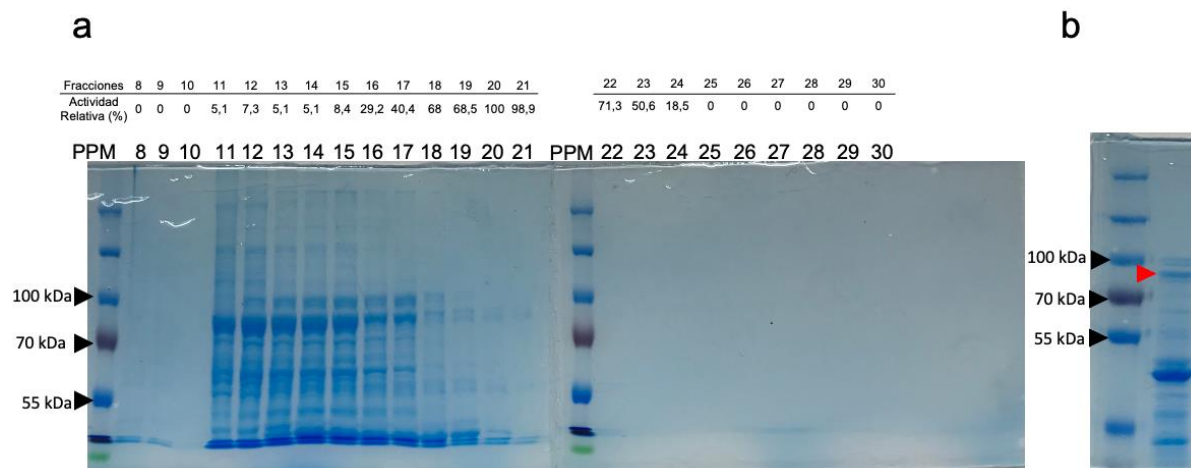


Figura 7: Purificación y determinación de actividad amilolítica en fracciones de GT. Se visualizaron las fracciones obtenidas de la purificación de GT desde el lisado celular del clon seleccionado por SDS-PAGE, y se midió la presencia de azúcares reductores en cada una por el método de DNS, mostrándose la actividad relativa (a). Se visualizó la mezcla de las fracciones seleccionadas por SDS-PAGE. La flecha roja muestra la banda correspondiente a GT (b).

A partir de la Figura 7b se calculó el peso molecular de GT, utilizando el avance relativo del patrón de peso molecular y la banda correspondiente. Se obtuvo un peso molecular de 95,9 kDa. Como es un peso molecular mayor al predicho previamente a partir de la secuencia de GT, se predijo la presencia de glicosilaciones, encontrando un total de 28 sitios predichos como glicosilados (Tabla 1 del Anexo).

Con estos resultados se puede decir que se logró obtener enzimas recombinantes en la levadura modelo *P. pastoris*. Se analizó la presencia de actividad amilolítica directa e indirectamente, seleccionando el clon de la enzima recombinante con mayor actividad, la cual se logró purificar parcialmente por medio de cromatografía de exclusión molecular. Adicionalmente, se calculó el peso molecular de dicha enzima y posibles sitios de glicosilaciones.

Análisis de características bioquímicas y estructurales de la/s enzimas recombinantes:

Teniendo la GT parcialmente purificada, se procedió a caracterizar esta enzima. Se quiso saber principalmente la temperatura de máxima actividad (T_{max}), la constante de Michaelis-Menten (K_m) para almidón soluble, y la Velocidad máxima de reacción (V_{max}). En la Figura 8a se muestran graficadas las velocidades de reacción obtenidas para las temperaturas estudiadas (30, 40, 45, 50 y 55°C). El rango de mayor actividad (dado por las velocidades de reacción) se encuentra entre los 40 y 50°C. Asimismo, existe una disminución abrupta de la actividad a los 55°C. La K_m y V_{max} se calculó mediante el gráfico de Michaelis-Menten (Figura 8b). Sus valores calculados fueron 41,75 g/L y 0,006 Absorbancia DNS/min, respectivamente. Además, a partir de la Figura 8b se puede afirmar que GT tiene cinética de Michaelis-Menten.

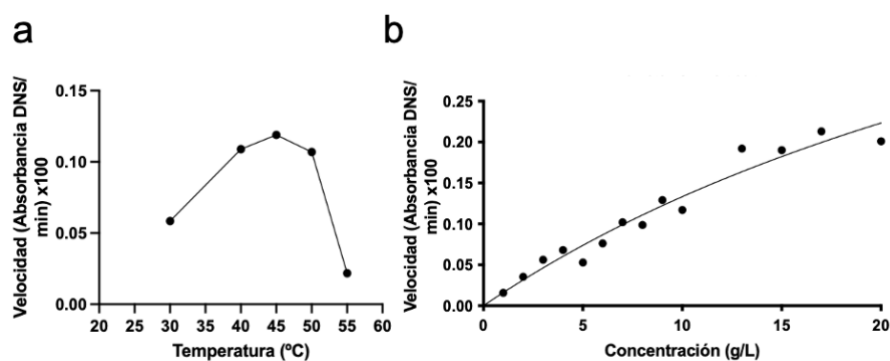


Figura 8: Influencia de la temperatura y concentración de sustrato en la actividad de GT. Cada velocidad de reacción se determinó una vez, a partir de los gráficos de la Figura 3 y 4 del Anexo. (a) Efecto de la temperatura en la velocidad de reacción de GT. (b) Gráfico de Michaelis-Menten de GT. Este gráfico se utilizó para calcular V_{max} y K_m de GT.

Por último, teniendo datos empíricos sobre la temperatura de máxima actividad y algunos datos cinéticos de GT, se realizó una caracterización bioinformática más detallada de esta enzima. Para esto, se utilizó su modelo 3D y se compararon características estructurales con su enzima molde, una glucoamilasa del hongo filamentoso *Hypocrea jecorina* (AHja), con el fin de determinar si existen variaciones atribuibles a una diferencia en la adaptación a bajas

temperaturas. Como este hongo está clasificado como mesófilo, AHja es un candidato perfecto para realizar esta comparación.

Tabla 3: Comparación de composición de residuos, interacciones y superficies entre GT y AHja

Parámetro	Organismo	
	<i>Hypocrea jecorina</i>	<i>Tetracladium sp.</i>
%Arg	3,0	4,5
%Pro	5,7	5,0
%Gly	8,0	8,4
%Pro alfa	2,0	2,1
%Gly alfa	3,7	3,7
%Pro loop	9,7	7,3
%Gly loop	12,0	12,6
%Menor volumen	39,2	41,1
%Pequeños	64,1	64,4
%Alifáticos	30,4	29,5
%Aromáticos	12,2	12,0
%No Polares	56,8	56,1
%Polares	43,2	43,9
%Cargados	14,5	12,9
%Ácidos	6,5	6,8
%Básicos	8,0	6,1
%AAs_flex	34,0	34,0
P_de_H	0,6	0,6
int_ionic	0,1	0,05
int_hif	0,9	0,8
Apolar_SAS	0,3	0,3
Apolar_SES	0,4	0,4

En la Tabla 3 se muestran los datos obtenidos para los distintos parámetros estudiados. Se observa que int_hif y las interacciones iónicas (int_ionic) son menores en GT, lo que generaría una mayor flexibilidad e inestabilidad de la estructura enzimática respecto de AHja. Consecuentemente, los residuos cargados (%Cargados) y básicos (%Básicos) son mayores en AHja, lo que explicaría el aumento de las interacciones iónicas, y la disminución de residuos alifáticos (%Alifáticos) en GT respecto de AHja explicaría la disminución en interacciones hidrofóbicas. Por otro lado, se observa que hay una disminución en la cantidad de prolina total y en los loops (%Pro loop) de GT (30 y 22, respectivamente) respecto de

AHja (34 y 29, respectivamente), y un aumento general de los residuos de menor volumen (%Menor volumen) (GT: 249; AHja: 235), lo cual es usual en enzimas provenientes de microorganismos adaptados a bajas temperaturas, debido a que promueven la flexibilidad de la estructura enzimática. El único caso excepcional es que el número de argininas (%Arg) es mayor en GT (27) respecto de AHja (18), lo cual es inusual en una enzima proveniente de un organismo adaptado al frío, ya que este es un aminoácido comúnmente asociado a una mayor estabilidad estructural debido a que puede generar una gran cantidad de puentes de hidrógeno e interacciones iónicas.

Una de las características más relevantes de las enzimas adaptadas al frío es su mayor flexibilidad estructural respecto de sus contrapartes mesófilas. Es por esto que se analizó a GT y AHja para predecir la cantidad y la posición de residuos flexibles de cada una. Resulta interesante que, en términos de cantidad, ambas enzimas poseen el mismo porcentaje de residuos flexibles (%AAs_flex). Además, a partir de la Figura 9, se observa que la posición de los residuos flexibles no presenta gran variación en su ubicación, estando principalmente en el exterior de la enzima y en loops, por lo que no es evidente que exista este tipo de adaptación en el contexto global de la estructura enzimática. Para el resto de los parámetros tampoco se encontró una diferencia importante.

Una característica importante tanto de GT como AHja es una estructura que conecta los dos dominios de la enzima, la cual se llamará bisagra de aquí en adelante y se indica en la Figura 9a, b con flechas rojas. Al corresponder a un loop y ser el único punto de unión física entre ambos dominios, es posible que este motivo juegue un rol clave en la actividad catalítica, por lo que se caracterizó estructuralmente para determinar si existen diferencias que den cuenta de adaptaciones que incrementen la flexibilidad de esta zona.

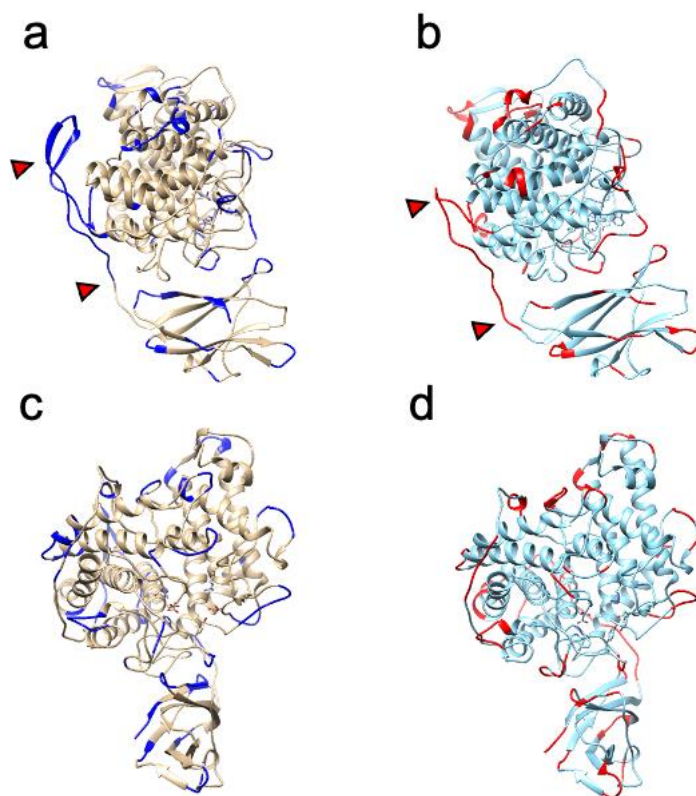


Figura 9: Visualización de residuos flexibles y bisagra de GT (a, c) y 2vn4 (b, d). Los modelos se visualizaron mediante el software UCSF Chimera. Las flechas rojas indican la bisagra de ambos modelos. Los residuos flexibles de GT se resaltan en azul y de 2vn4 en rojo.

Organismo	Largo bisagra (AAs)	%Pro	%Gly	%Arg	%AAs_flex
<i>Tetracladium</i> sp.	47	14,9	10,6	4,3	63,8
<i>Hypocrea jecorina</i>	37	24,3	10,8	2,7	67,6

En la Tabla 4 se resumen los parámetros investigados para la bisagra de GT y AHja. La mayor variación se encuentra en el largo de esta bisagra, el número de prolina y el porcentaje de residuos flexibles, mientras que no se observa una diferencia importante en el porcentaje de glicinas. La bisagra de GT es 10 residuos más larga que la de AHja, y en términos porcentuales posee un 9,4% menos de prolina (GT: 7; AHja: 9). Estas características son comúnmente encontradas en enzimas adaptadas al frío al ser comparadas con enzimas mesófilas. Por otro lado, al cuantificar los residuos catalogados como flexibles, el porcentaje de estos es mayor en AHja respecto de GT. Estos porcentajes se traducen en 25 residuos

flexibles para AHja y 30 para GT, por lo que, aunque AHja tiene un mayor porcentaje de residuos flexibles en su bisagra, GT tiene una bisagra más larga y con un mayor número total de residuos flexibles, lo que indicaría cambios estructurales orientados a una mejor adaptación a las bajas temperaturas por parte de GT. En el caso del porcentaje de argininas, existe un aumento de estas en la bisagra de GT respecto de AHja, aumentando de 1 a 2 argininas, lo cual se condice con el aumento visto en las argininas de la estructura enzimática general.

Por último, se identificaron los residuos de la cavidad catalítica de ambas enzimas, involucrados en la catálisis o unión a sustrato. Estos residuos corresponden a una asparagina, dos ácidos glutámicos, dos treoninas, una arginina y un triptófano. En la Figura 10 se muestra la disposición espacial de estos residuos, y se observa que no existen sustituciones entre GT y AHja. La única diferencia observable es que, en el caso de GT, el triptófano está catalogado como flexible (resaltado en azul). A partir de esta información se puede inferir que cualquier diferencia en las características catalíticas y cinéticas entre GT y AHja, no se debe a una mutación en los residuos involucrados en la catálisis, presentes en el sitio activo.

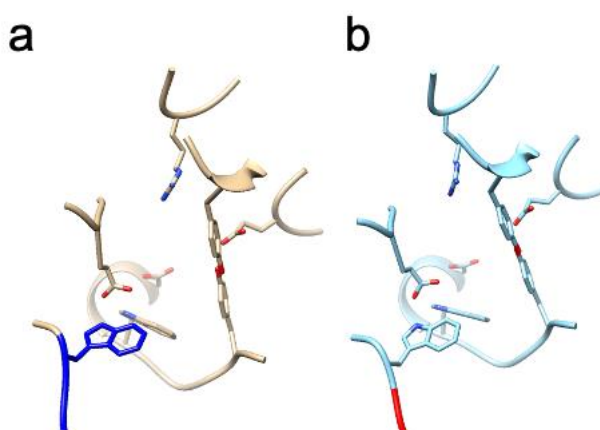


Figura 10: Visualización de residuos involucrados en catálisis y unión del sustrato en la cavidad catalítica de GT (a) y 2vn4 (b). Los residuos catalogados como flexibles se resaltan en azul para GT y rojo para 2vn4. Los modelos se visualizaron mediante el software UCSF Chimera.

A partir de estos resultados se demuestra que se pudo determinar características estructurales y bioquímicas de la enzima recombinante obtenida. Se determinó la temperatura de máxima actividad bajo las condiciones analizadas, la V_{max} y la K_m . Además, la enzima se caracterizó estructuralmente por métodos bioinformáticos, encontrando características clave que pueden estar potencialmente ligadas a la adaptación a bajas temperaturas.

DISCUSIÓN

Identificación y análisis bioinformático de características estructurales de enzimas adaptadas al frío:

Se construyeron modelos 3D predictivos de enzimas de levaduras antárticas, los cuales se analizaron en términos de composición de tipos de aminoácidos, aminoácidos flexibles y cantidad de tipo de interacciones, y se compararon a sus enzimas moldes. Se encontró una correlación significativa inversa entre el número de interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y que la secuencia provenga de levaduras adaptadas al frío. Del mismo modo, se observó una correlación significativa inversa entre el área apolar excluida y accesible al solvente con que la secuencia provenga de organismos no adaptados al frío. El subsecuente análisis estadístico de comparación de medias comprueba que existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de secuencias respecto de estas variables. Las interacciones hidrofóbicas son claves para la termoestabilidad de las enzimas, puesto que permiten mantener compacto el interior de estas. Los puentes de hidrógeno por su lado, si bien son una interacción intermolecular débil, son importantes para la estabilidad conformacional de las proteínas debido a su gran número (Feller y Gerday, 2003; D'Amico y col., 2006; Mandelman y col. 2018). En el estudio de Gianese y col., (2002) realizaron un análisis estructural comparativo de 7 tipos de enzimas adaptadas al frío con sus homólogos mesófilos y/o termofílicos, encontrando una tendencia al aumento del número de interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno a medida que aumenta la temperatura de máxima actividad, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. En el estudio realizado por Ang y col., (2021) se reportó una mayor cantidad de

interacciones hidrofóbicas en una quitinasa termofílica, comparado a sus homólogos mesófilos y adaptados al frío, mientras que se encontró una mayor cantidad de puentes de hidrógeno en la quitinasa adaptada al frío.

Una mayor superficie hidrofóbica se asocia comúnmente a enzimas adaptadas al frío (Santiago y col., 2016). Esto principalmente porque la exposición de residuos hidrofóbicos al solvente genera un efecto desestabilizante en la enzima al ser una condición termodinámicamente desfavorable, aumentando la flexibilidad de esta y favoreciendo la adaptación a temperaturas más bajas (Feller, 2013). Al mismo tiempo, una menor área apolar excluida del solvente implica un centro hidrofóbico menos compacto, otorgando menor rigidez a la estructura enzimática. Si bien los resultados obtenidos en este trabajo se condicen con la literatura en el caso de la superficie apolar accesible al solvente, se obtuvo el resultado opuesto para la superficie apolar excluida del solvente. Es posible que las enzimas adaptadas al frío compensen la pérdida de interacciones estabilizantes como los puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas con un centro hidrofóbico más grande y así mantener su integridad estructural y función catalítica. Un caso similar se propone en el estudio de Vogt y col., (1997), donde las tres familias de enzimas que no presentaron un aumento de puentes de hidrógeno conforme aumentaba la estabilidad térmica, compensaron con un aumento de las interacciones iónicas.

Resulta interesante no haber encontrado correlaciones significativas que incluyeran algún tipo de residuo, considerando la relevancia que se les atribuye como características asociadas a una mayor adaptación al frío. Kumar y col., (2014) reportan un aumento significativo de residuos pequeños y de menor volumen en β -galactosidasas adaptadas al frío, respecto de sus homólogos mesófilos y termófilos, así como una disminución significativa de residuos aromáticos, cargados y básicos. Resultados similares fueron reportados por Yang y col., (2021), obteniendo un aumento significativo de residuos pequeños y de menor volumen en lipasas adaptadas al frío respecto de lipasas mesófilas. Hay que tener en cuenta que en estos estudios se analizó una sola familia de enzimas, mientras que en este trabajo se agrupó las

enzimas dependiendo de su proveniencia, sin hacer distinción entre familias, por lo que no es posible descartar que este tipo de diferencias se puedan ver si los datos se organizan y analizan de una manera diferente. De hecho, debido a las características del grupo de secuencias final con el cual se trabajó, es posible que ciertas estrategias adaptativas estén sobrerrepresentadas, ya que hay tipos de enzimas más abundantes que otros. Otra manera de organizar las enzimas en futuros estudios es por la arquitectura de plegamiento, ya que dependiendo de a qué categoría correspondan (all- α , all- β , $\alpha+\beta$, α/β) podría variar el tipo y número de interacciones intramoleculares (Gromiha y Selvaraj, 2004). Por último, más adelante deberá ser tomado en cuenta el número de secuencias analizadas y la representatividad de la levadura de proveniencia, ya que una mayor cantidad de secuencias otorgaría mayor robustez estadística al estudio, mientras que una representatividad más equitativa entre levaduras ayudaría a dilucidar si existen diferentes estrategias adaptativas entre ellas.

Dicho esto, a partir de este grupo de datos se puede inferir que los tipos de residuos no son una característica general de gran importancia para la adaptación al frío, como sí lo son las interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y superficies hidrofóbicas accesibles y excluidas del solvente.

Obtención de enzimas recombinantes en la levadura modelo *P. pastoris*:

Para expresar las secuencias de enzimas seleccionadas para este estudio, se eligió la levadura modelo *P. pastoris* y el vector de expresión pPICZ α A. En este trabajo se utilizaron las cepas X-33 y KM71H. En un comienzo, se intentó la expresión de las enzimas recombinantes Tetsp_amy, Vvic_amy y GT en la cepa X-33, sin obtener actividad amilasa en el lisado celular o el medio de cultivo, por lo que se intentó la expresión en la cepa KM71H, encontrando actividad amilasa intracelular. La diferencia entre ambas cepas es que X-33 es

fenotipo Mut⁺, es decir, posee el gen AOX1 que le permite metabolizar metanol de manera normal. La cepa KM71H solo puede metabolizar lentamente metanol mediante la enzima alcohol oxidasa 2 del gen AOX2 (Pla y col. 2006). Existen distintos estudios donde se compara la expresión de enzimas en distintas cepas de *P. pastoris*, con distintos resultados. Lindenmuth y McDonald, (2011) expresaron una endoglucanasa de *Acidothermus cellulolyticus* en las cepas GS115, X-33 y KM71H. La cepa GS115 tiene auxotrofía para la histidina además de ser Mut⁺. La mayor producción de la endoglucanasa se determinó en la cepa KM71H, encontrada en el medio de cultivo. Seo y Rhee, (2004) reportan la expresión de una fosfolipasa C recombinante proveniente de *Bacillus cereus* en las cepas GS115, KM71H y X-33. La mayor expresión extracelular se observó en la cepa X-33. Por último, Zheng y col., (2016) expresaron una α -galactosidasa en las cepas X-33 y KM71H, encontrando la actividad de esta enzima tanto en el medio de cultivo como en el lisado celular. Curiosamente, la actividad intracelular determinada en ambas cepas fue mayor que la extracelular, indicando que una proporción importante de la enzima recombinante no estaba siendo exportada al medio de cultivo. Esto se puede explicar principalmente por un mal procesamiento del factor- α , el cual se puede ver ocultado por el plegamiento de la enzima recombinante, dificultando el acceso de la endopeptidasa Kex2 y la proteína Ste13 (Cereghino y Cregg, 2000). Por un lado, esta evidencia sugiere que al momento de expresar proteínas recombinantes en *P. pastoris*, es necesario realizar pruebas en más de una cepa para obtener el mejor resultado posible, y estos pueden variar caso a caso. Por otro, la exportación de enzimas recombinantes al medio extracelular debe ser evaluado para cada una, así como la presencia de la enzima en el lisado celular. En este trabajo, no se detectó actividad amilolítica en el medio extracelular al utilizar la cepa KM71H, pero sí en el lisado celular en el caso de GT y Vvic_amy al comparar con el control, por lo que es posible que la exportación de las enzimas recombinantes se haya visto afectada por el plegamiento de estas.

Se evaluó la actividad amilolítica del lisado celular de los clones elegidos de Vvic_amy y GT, encontrando diferencias significativas entre la actividad de GT y Vvic_amy, así como entre ambos clones recombinantes y el control sin inserto. En base a este resultado, y teniendo en cuenta el tiempo y dedicación para la obtención de una enzima recombinante, se optó por continuar con GT. Además, en vista de una posible aplicación industrial, este primer resultado apuntaría a que GT es el mejor candidato.

El método del DNS para la determinación de presencia de azúcares reductores es un método indirecto, ya que es necesario que el azúcar reduzca al DNS para producir ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (ANS) (Teixeira y col., 2012) el cual tiene una coloración café rojiza, medible en un espectrofotómetro (Saqib y Whitney, 2011). Si bien la literatura es escasa, se ha reportado la reacción cruzada del DNS con otros compuestos diferentes a azúcares reductores (Teixeira y col., 2012; Deshavath y col., 2020). Una leve coloración naranja se encontró en los controles negativos de los ensayos de actividad realizados, por lo que para descartar que exista una actividad amilolítica basal intracelular en *P. pastoris* y demostrar de manera directa la actividad amilolítica del lisado celular del clon seleccionado de GT, se realizó un ensayo de actividad en placas agar almidón. Este método ha sido utilizado con éxito en nuestro laboratorio para encontrar actividad amilolítica y otras más en levaduras antárticas (Carrasco y col., 2017). Otro método convencional que se pudo haber utilizado para determinar la presencia de GT en el medio intra y extracelular es el Western-Blot. De esta manera se pudo haber comprobado la presencia de la cola de histidinas o el epítipo c-myc. Por motivos de la contingencia mundial al momento de realizar la tesis, no se contaba con los reactivos y tiempo necesarios para realizar este experimento, por lo que el método de la placa agar-almidón resultó muy útil.

Se intentó purificar GT por los métodos de cromatografía por columna de níquel-sefarosa, intercambio aniónico y catiónico, y exclusión molecular. El único método por el cual se obtuvo fracciones con actividad fue la cromatografía de exclusión molecular. Si bien el sistema de

expresión utilizado fusiona una cola de histidina en el extremo carboxilo terminal a la enzima recombinante, este método no fue efectivo. Se ha reportado el efecto deletéreo que puede tener la cola de histidina en el plegamiento nativo de la enzima recombinante (Yadav y col., 2016), por lo que se puede inferir que el mismo plegamiento puede ocultarla, así como ocurre con el factor- α discutido anteriormente. Es difícil inferir la posición de la cola de histidina a partir de los modelos tridimensionales creados, ya que los primeros y últimos residuos no se lograron incluir dentro de estos. La pureza que se obtuvo de GT fue subóptima, sin embargo, se pudo obtener actividad amilolítica luego del paso de purificación. Hay que tener en cuenta que se está purificando un lisado celular, por lo que hay una gran cantidad de proteínas que además de tener el mismo tamaño, pueden interactuar entre ellas por afinidad de carga o hidrofobicidad. Por otro lado, la heterogeneidad de formas de las proteínas puede producir que eluyan al mismo tiempo siendo que tienen pesos moleculares distintos (Burgess, 2018). Resultados similares se reportan en Bhardwaj y col., 2019 donde expresan una xilanasa de *Aspergillus oryzae*, la cual purifican mediante una serie de métodos, entre ellos cromatografía de exclusión molecular, y se muestra la presencia de proteínas inespecíficas en las fracciones purificadas, evidenciando la posibilidad de que no se logre una separación específica de las proteínas por este método.

GT nativa fue aislada y purificada previamente por Carrasco y col., (2017 a). En ese trabajo se determinó que la secuencia de residuos tiene un peso molecular predicho de 66 kDa, mientras que por SDS-PAGE se observó una banda a los 80 kDa. Esta discrepancia en peso molecular se le atribuyó a glicosilaciones. Las glicosilaciones son algo común en enzimas extracelulares, y se cree que juegan un rol importante en su estabilidad y función (Vite-Vallejo y col., 2009). El peso molecular predicho para la secuencia de GT utilizada en este estudio fue de 80 kDa, mientras que se determinó que tiene un peso molecular relativo de 95,9 kDa. Se predijo sitios de glicosilación en la secuencia de GT, por lo que estas modificaciones postraduccionales podrían explicar esta diferencia en peso molecular, y sería concordante con lo previamente reportado.

Análisis de características bioquímicas y estructurales de la/s enzimas recombinantes:

Se caracterizó bioquímica y estructuralmente la enzima recombinante GT, calculando la K_m , V_{max} y temperatura de máxima actividad por un lado, e identificando, cuantificando y comparando características asociadas a la adaptación al frío en los modelos 3D de GT y AHja por otro. Las glicosidasas adaptadas al frío, específicamente las α -amilasas y glucoamilasas han sido sujeto de bastante estudio debido a su potencial biotecnológico en industrias como la alimenticia, papel, textil, detergentes, entre otras (Duarte y col., 2018). La caracterización de una α -amilasa adaptada al frío de *Bacillus* sp. indicó que su K_m es de 2,8 mg/mL, su V_{max} 21,8 mg/mL min y su temperatura de máxima actividad fue de 20°C bajo las condiciones reportadas, teniendo un rango de actividad de 4-60°C (Dou y col., 2018). Una α -glucosidasa purificada en nuestro laboratorio desde la levadura antártica *D. fristingensis* mostró una K_m de 1,3 g/L, una V_{max} cercana a 3,25 mg/ L min y una temperatura de máxima actividad de 37°C en las condiciones reportadas, teniendo un rango de actividad entre 4-40°C (Carrasco y col., 2017 b). Adicionalmente, una glucoamilasa purificada en nuestro laboratorio del hongo antártico *Tetracladium* sp., fue caracterizada y se determinó su K_m , V_{max} y temperatura de máxima actividad (4,5 g/L, 0,006 g/L min y 30°C, respectivamente). Además, el rango de mayor actividad se determinó entre los 30 y 45°C, disminuyendo considerablemente al disminuir y aumentar la temperatura (Carrasco y col., 2017 a). La secuencia de esta enzima fue incluida en este trabajo, y fue finalmente la enzima que se logró expresar y purificar parcialmente. Debido al vector y método de expresión, es necesario volver a caracterizar la enzima, ya que existe evidencia de que la presencia de una cola de histidinas puede tener cambios en la termoestabilidad y constantes cinéticas de una enzima recombinante respecto a la enzima nativa (Bentahir y col., 2000; Flores y col., 2022). Adicionalmente, al haber purificado a GT desde el espacio intracelular, es posible que el factor- α no se haya procesado, y su presencia podría cambiar ciertas propiedades de la enzima. Por último, al no haber podido purificar a GT de manera óptima, no se puede descartar que el resto de las proteínas

presentes afecten la reacción. Se determinó que GT tiene una K_m de 41,75 g/L, una V_{max} de 0,006 min^{-1} y una temperatura de máxima actividad de 45°C. El rango de temperatura de mayor actividad se determinó entre 40-50°C. Si bien esta caracterización no se llevó a cabo en las mismas condiciones de pH, temperatura y pureza que en Carrasco y col., (2017a), por lo que no se puede hacer una comparación directa, se puede decir que para GT nativa como recombinante existe un rango de temperatura similar en el cual actúan, de entre 10 y 15°C. La K_m de GT recombinante es bastante más alta que la de GT nativa (41,75 g/L y 4,5 g/L, respectivamente). Esto implica que GT disminuyó bastante su afinidad por el almidón soluble, y más esfuerzos de caracterización son necesarios para saber si aun retiene su actividad de glucoamilasa. Esta es la principal razón de por qué no se expresa la V_{max} en $\text{g/L} \cdot \text{min}$, ya que no se sabe el producto específico que se está generando, más allá de que es un azúcar reductor, por lo que no se puede utilizar un coeficiente de extinción molar o una curva estándar de un compuesto en específico para convertir la absorbancia en concentración.

En base a la temperatura de máxima actividad, esta enzima tiene un comportamiento mesófilo. Es posible que las modificaciones introducidas por el vector de expresión, como la cola de histidina y el α -factor tengan un efecto estabilizante en la enzima, aumentando su temperatura de máxima actividad, aunque más experimentos deben ser realizados para comprobar esta propuesta. Por otro lado, existe evidencia en trabajos previos en el laboratorio que no todas las enzimas aisladas de levaduras antárticas tienen una temperatura de máxima actividad correspondiente a la de una enzima adaptada a bajas temperaturas. Este es el caso de una glucosa oxidasa (GOD), invertasa (Inv) y fosfatasa alcalina (ALP) de *Goffeauzyma gastrica*, *Wickerhamomyces anomalus* y *Dioszegia* sp., respectivamente (Yuivar y col., 2017). Las temperaturas de máxima actividad de GOD, Inv y ALP fueron 64°C, 60°C y 47°C, respectivamente. Esto sugiere que no es necesario que todas las enzimas de una levadura antártica sean eficientes catalíticamente a bajas temperaturas, sino que deben ser lo suficientemente activas para cumplir su función fisiológica. Si bien este no parece ser el caso de GT, debido a la evidencia que se tiene sobre GT nativa, es necesario realizar experimentos

comparativos entre GT nativa y GT en las mismas condiciones de pH y pureza para poder descartar estas variables como las responsables de la diferencia en la temperatura de máxima actividad de ambas enzimas, antes de realizar otras comparaciones.

Las características de esta enzima no la convierten en una buena candidata para las aplicaciones industriales que se pensaban en un inicio, principalmente porque es activa a temperaturas más altas que lo que se tenía previsto. Las amilasas más utilizadas en la industria hoy en día son producidas por cepas de *Aspergillus*, con temperaturas de máxima actividad entre los 45-60°C (Carrasco y col., 2017a), muy similar a la obtenida con GT. Además, GT tiene una Km bastante alta comparada con otras amilasas, lo que podría ser indicio de que su afinidad por el almidón soluble sufrió una disminución importante por las modificaciones introducidas a la enzima o las condiciones utilizadas para los experimentos. Sin embargo, se necesita más evidencia sobre la estabilidad y actividad de GT en el tiempo a distintas temperaturas, para así determinar si tiene potencial en procesos en donde se requiera incubar la reacción por largos periodos.

Se creó un modelo 3D de GT utilizando la amilasa de *H. jecorina* como molde. Ambos modelos se caracterizaron y compararon en términos de características asociadas a la adaptación a bajas temperaturas. Como se dispone de datos empíricos sobre la termoestabilidad y cinética de actividad de ambas enzimas, se decidió hacer un análisis más profundo. No fue posible incorporar el factor- α ni la cola de histidina en el modelo, probablemente porque el método utilizado se basa en la homología de la secuencia ingresada con el molde seleccionado para recrear la estructura terciaria. Por lo tanto, se compararon las características que comparte GT y la enzima nativa respecto de su molde. Analizando las características de las enzimas completas, en general los cambios que más resaltaron dan indicios de una adaptación a bajas temperaturas por parte de GT. La disminución de interacciones hidrofóbicas e iónicas son un factor desestabilizante (Vogt y col., 1997; Mandelman y col. 2018). Este resultado se puede explicar en parte debido a una disminución

de los residuos cargados en GT respecto de AHja. Además, GT presenta un mayor porcentaje de residuos de menor volumen, lo cual está asociado a una mayor flexibilidad de la estructura terciaria de la enzima, al igual que la disminución de prolinas en los loops (Russel y col., 1998; Hashim y col., 2018). El aumento de argininas en GT llama la atención, debido a que es por lo general una característica asociada a la adaptación a temperaturas más altas debido a la capacidad de este aminoácido de crear una mayor cantidad de interacciones iónicas y puentes de hidrógeno (Vogt y col., 1997; Lonhienne y col., 2001). Sin embargo, al no encontrar una mayor cantidad de interacciones iónicas, es posible que estas sustituciones no se encuentren en proximidad de residuos cargados negativamente. Además, este puede ser un caso más de compensación, donde la disminución general de residuos básicos se compensa con un mayor número de argininas, que puede generar más interacciones por residuo que la lisina o histidina.

Ding y col., (2021) describen la importancia de la bisagra de una amilasa proveniente de la bacteria *Saccharophagus degradans* para su actividad a bajas temperaturas. Esta estructura presentó una gran flexibilidad estructural, capaz de adoptar un gran rango de conformaciones. En el análisis previo de GT nativa, se encontró diferencias entre la bisagra esta enzima y AHja que apuntarían a una mayor flexibilidad de esta estructura, principalmente el contenido de prolinas y tirosinas, proponiéndose como la principal adaptación a bajas temperaturas en esta enzima. Consecuentemente, el análisis realizado en este trabajo permite sacar conclusiones similares. Esta bisagra es 10 residuos más larga en GT, posee 5 residuos más catalogados como flexibles, tiene dos prolinas menos y un mayor número de argininas. En línea con los resultados discutidos previamente, la bisagra de GT tiene un mayor número de argininas. En general, estos resultados apuntan a que efectivamente la bisagra de GT es un motivo estructural más flexible que el de su molde mesófilo, siendo probablemente una característica significativa para la actividad a bajas temperaturas de esta enzima comparada a su contraparte mesófila, la cual, para las condiciones estudiadas, presentó una temperatura de

máxima actividad a los 70°C, siendo más estable entre los 45 y 65°C (Fagerstrom y Kalkkinen, 1995).

Por último, se identificó los residuos catalíticos de GT, descritos en la resolución de la estructura de AHja (Bott y col., 2008). Todos los residuos descritos se encuentran conservados en GT, indicando la importancia de estos para el correcto funcionamiento de la enzima. La conservación de residuos catalíticos en enzimas adaptadas al frío respecto de sus contrapartes mesófilas y termófilas es algo común (Feller y Gerday, 2003), contrastando con las múltiples modificaciones que pueden presentar en otros sitios de su estructura.

El consenso general es que si bien existe una gran variedad de modificaciones que puede sufrir una enzima para adaptarse a temperaturas más bajas, cada familia de enzimas adopta su propio repertorio (D'Amico y col., 2006; Santiago y col., 2016), haciendo la caracterización y el análisis de estas enzimas y el enigma que presentan una tarea compleja, donde el establecimiento de una regla general para este fenómeno ha sido motivo de debate en la comunidad científica hasta el día de hoy. En ese contexto, este trabajo buscó aportar con información sobre características estructurales y bioquímicas de enzimas provenientes de levaduras antárticas, microorganismos de los que queda mucho por estudiar y aprender, pudiendo ser un gran aporte para la ciencia, las industrias y el bienestar humano y del planeta en general.

CONCLUSIONES

Este trabajo presenta una aproximación inicial a la caracterización bioinformática de secuencias putativas de enzimas provenientes de levaduras antárticas, por lo que en el futuro los esfuerzos deben estar puestos en realizar estos análisis con un mayor número de secuencias y evaluar la agrupación de estas respecto del tipo de enzima o la arquitectura estructural, dándole mayor robustez a las pruebas estadísticas realizadas y permitiendo realizar análisis más profundos.

A partir de los análisis de correlación y comparación de medias, se puede concluir que las secuencias predichas como enzimas adaptadas al frío presentan diferencias significativas respecto de sus contrapartes mesófilas. Estas diferencias se encontraron en características asociables a una mayor adaptación a temperaturas bajas, específicamente, se observó una disminución de las interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno, y un aumento de la superficie apolar excluida y accesible al solvente. Estos resultados se condicen con los obtenidos en trabajos del mismo laboratorio y otros ejemplos encontrados en la literatura.

En nuestra experiencia, *P. pastoris* y el sistema de expresión pPICZ α A presenta la desventaja de introducir modificaciones a la secuencia nativa de la enzima expresada que podrían tener un impacto en sus propiedades catalíticas y estructurales. Esto se deberá comprobar en futuros estudios para el caso mostrado en este trabajo y así determinar si es necesario utilizar otro sistema de expresión que permita conservar las propiedades de la enzima expresada.

La enzima expresada y parcialmente purificada en este trabajo presentó características bioquímicas de una enzima adaptada a bajas temperaturas, comparándola con lo

reportado en la literatura sobre su homólogo mesófilo. Sin embargo, sus características difieren respecto de la enzima nativa, lo que es atribuible a las modificaciones estructurales inducidas por el sistema de expresión utilizado, el grado de pureza con el que se logró aislar y las condiciones utilizadas para los ensayos de actividad enzimática, los cuales difieren de las condiciones empleadas en la caracterización de la enzima nativa. En cuanto a sus características estructurales, existen diferencias respecto de su homólogo mesófilo, asociables a adaptaciones a bajas temperaturas.

GT no es una buena candidata para la aplicación industrial que se tenía pensada en un principio, debido principalmente a su temperatura de máxima actividad, que es bastante similar a las enzimas ya utilizadas en la industria, y la disminución de la afinidad de esta enzima por el almidón soluble, reflejado en el aumento considerable de su K_m respecto de GT nativa.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Al-Ghanayem, A. A., & Joseph, B. (2020). Current prospective in using cold-active enzymes as eco-friendly detergent additive. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(7), 2871-2882.
- 2) An, J., Nie, Y., & Xu, Y. (2019). Structural insights into alcohol dehydrogenases catalyzing asymmetric reductions. *Critical reviews in biotechnology*, 39(3), 366-379.
- 3) Ang, D. L., Hoque, M. Z., Hossain, M. A., Guerriero, G., Berni, R., Hausman, J. F., ... & Siddiqui, K. S. (2021). Computational analysis of thermal adaptation in extremophilic chitinases: the achilles' heel in protein structure and industrial utilization. *Molecules*, 26(3), 707.
- 4) Atalah, J., Cáceres-Moreno, P., Espina, G., & Blamey, J. M. (2019). Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. *Bioresource technology*, 280, 478-488.
- 5) Baeza, M., Flores, O., Alcaíno, J., & Cifuentes, V. (2019). Yeast Thriving in Cold Terrestrial Habitats: Biodiversity and Industrial/Biotechnological Applications. In *Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance* (pp. 253-268). Springer, Cham.
- 6) Baeza, M., Zúñiga, S., Peragallo, V., Barahona, S., Alcaino, J., & Cifuentes, V. (2021). Identification of stress-related genes and a comparative analysis of the amino acid compositions of translated coding sequences based on draft genome sequences of Antarctic yeasts. *Frontiers in microbiology*, 12, 623171.
- 7) Baeza, M., Zúñiga, S., Peragallo, V., Gutierrez, F., Crisostomo, S. K. B., Alcaino, J., & Cifuentes, V. (2022). Response to cold: a comparative transcriptomic analysis in eight cold-adapted yeasts. *Frontiers in Microbiology*, 222.

- 8) Barahona, S., Yuivar, Y., Socias, G., Alcaíno, J., Cifuentes, V., & Baeza, M. (2016). Identification and characterization of yeasts isolated from sedimentary rocks of Union Glacier at the Antarctica. *Extremophiles*, 20(4), 479-491.
- 9) Bhatia, R. K., Ullah, S., Hoque, M. Z., Ahmad, I., Yang, Y. H., Bhatt, A. K., & Bhatia, S. K. (2021). Psychrophiles: a source of cold-adapted enzymes for energy efficient biotechnological industrial processes. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(1), 104607.
- 10) 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.
- 11) Berg, K., Leiros, I., & Williamson, A. (2019). Temperature adaptation of DNA ligases from psychrophilic organisms. *Extremophiles*, 23(3), 305-317.
- 12) Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L., Schwede, T. 2017. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Scientific Reports* 7 .
- 13) Bienert, S., Waterhouse, A., de Beer, T.A.P., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L., Schwede, T. 2017. The SWISS-MODEL Repository - new features and functionality. *Nucleic Acids Res.* 45, D313-D319.
- 14) Bott, R., Saldajeno, M., Cuevas, W., Ward, D., Scheffers, M., Aehle, W., ... & Hansson, H. (2008). Three-dimensional structure of an intact glycoside hydrolase family 15 glucoamylase from *Hypocrea jecorina*. *Biochemistry*, 47(21), 5746-5754.
- 15) Bowie JU, Lüthy R, Eisenberg D. 1991. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science*. 253(5016):164-70. doi: 10.1126/science.1853201. PMID: 1853201.
- 16) Burgess, R. R. (2018). A brief practical review of size exclusion chromatography: rules of thumb, limitations, and troubleshooting. *Protein expression and purification*, 150, 81-85.

- 17a) Carrasco, M., Alcaíno, J., Cifuentes, V., & Baeza, M. (2017). Purification and characterization of a novel cold adapted fungal glucoamylase. *Microbial cell factories*, 16(1), 1-10.
- 17b) Carrasco, M., Alcaíno, J., Cifuentes, V., & Baeza, M. (2017). Purification and characterization of a novel α -glucosidase from an Antarctic yeast *Dioszegia fristingensis* isolate. *Amylase*, 1(1), 50-58.
- 18) 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), 1-11.
- 19) Carrasco, M., Rozas, J. M., Barahona, S., Alcaíno, J., Cifuentes, V., & Baeza, M. (2012). Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. *BMC microbiology*, 12(1), 1-9.
- 20) Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS microbiology reviews*, 24(1), 45-66.
- 21) Collins, T., Meuwis, M. A., Gerday, C., & Feller, G. (2003). Activity, stability and flexibility in glycosidases adapted to extreme thermal environments. *Journal of molecular biology*, 328(2), 419-428.
- 22) D'Amico, S., Collins, T., Marx, J. C., Feller, G., Gerday, C., & Gerday, C. (2006). Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO reports*, 7(4), 385-389.
- 23) Daum, G., Lees, N. D., Bard, M., & Dickson, R. (1998). Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(16), 1471-1510.
- 24) Deshavath, N. N., Mukherjee, G., Goud, V. V., Veeranki, V. D., & Sastri, C. V. (2020). Pitfalls in the 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for the reducing sugars: Interference of

furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *International journal of biological macromolecules*, 156, 180-185.

25) Ding, N., Zhao, B., Ban, X., Li, C., Venkataram Prasad, B. V., Gu, Z., & Li, Z. (2021). Carbohydrate-binding module and linker allow cold adaptation and salt tolerance of maltopentaose-forming amylase from marine bacterium *Saccharophagus degradans* 2-40 T. *Frontiers in microbiology*, 12, 708480.

26) Duarte, A. W. F., Dos Santos, J. A., Vianna, M. V., Vieira, J. M. F., Mallagutti, V. H., Inforsato, F. J., ... & Durães Sette, L. (2018). Cold-adapted enzymes produced by fungi from terrestrial and marine Antarctic environments. *Critical reviews in biotechnology*, 38(4), 600-619.

27) Fagerstrom, R., & Kalkkinen, N. (1995). Characterization, subsite mapping and partial amino acid sequence of glucoamylase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Biotechnology and applied biochemistry*, 21(2), 223-231.

28) Feller, G. (2013). Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology. *Scientifica*, 2013.

29) Feller, G., & Gerday, C. (1997). Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 53(10), 830-841.

30) Feller, G., & Gerday, C. (2003). Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nature reviews microbiology*, 1(3), 200-208.

31) Flores, S. S., Clop, P. D., Barra, J. L., Argaraña, C. E., Perillo, M. A., Nolan, V., & Sánchez, J. M. (2022). His-tag β -galactosidase supramolecular performance. *Biophysical Chemistry*, 281, 106739.

32) Fryszkowska, A., & Devine, P. N. (2020). Biocatalysis in drug discovery and development. *Current Opinion in Chemical Biology*, 55, 151-160.

- 33) Gianese, G., Bossa, F., & Pascarella, S. (2002). Comparative structural analysis of psychrophilic and meso-and thermophilic enzymes. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 47(2), 236-249.
- 34) Goyal, D., Swaroop, S., Prakash, O., & Pandey, J. (2022). Survival Strategies in Cold-adapted Microorganisms. In *Survival Strategies in Cold-adapted Microorganisms* (pp. 173-186). Springer, Singapore.
- 35) Gromiha, M. M., & Selvaraj, S. (2004). Inter-residue interactions in protein folding and stability. *Progress in biophysics and molecular biology*, 86(2), 235-277.
- 36) Guex, N., Peitsch, M.C., Schwede, T. 2009. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis* 30, S162-S173.
- 37) Hames, B. D. (Ed.). (1998). *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach* (Vol. 197). OUP Oxford.
- 38) Hashim, N. H. F., Mahadi, N. M., Illias, R. M., Feroz, S. R., Abu Bakar, F. D., & 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.
- 39) Kopetzki, E., Lehnert, K., & Buckel, P. (1994). Enzymes in diagnostics: achievements and possibilities of recombinant DNA technology. *Clinical chemistry*, 40(5), 688-704.
- 40) Kuddus, M. (2018). Cold-active enzymes in food biotechnology: An updated mini review. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 6(3), 5-3.
- 41) Kumar, V., Sharma, N., & Bhalla, T. C. (2014). In Silico Analysis of-Galactosidases Primary and Secondary Structure in relation to Temperature Adaptation. *Journal of amino acids*, 2014.

- 42) Lindenmuth, B. E., & McDonald, K. A. (2011). Production and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* endoglucanase in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, 77(2), 153-158.
- 43) 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.
- 44) Lüthy R, Bowie JU, Eisenberg D. 1992. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*. 356(6364):83-5. doi: 10.1038/356083a0. PMID: 1538787.
- 45) Madeira F, Pearce M, Tivey ARN, et al. 2022. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Research*. 2022 Apr:gkac240. DOI: 10.1093/nar/gkac240. PMID: 35412617.
- 46) Mandelman, D., Ballut, L., Wolff, D. A., Feller, G., Gerday, C., Haser, R., & Aghajari, N. (2019). Structural determinants increasing flexibility confer cold adaptation in psychrophilic phosphoglycerate kinase. *Extremophiles*, 23(5), 495-506.
- 47) Margesin, R., Neuner, G., & Storey, K. B. (2007). Cold-loving microbes, plants, and animals—fundamental and applied aspects. *Naturwissenschaften*, 94(2), 77-99.
- 48) McKenzie, R. L., Aucamp, P. J., Bais, A. F., Björn, L. O., & Ilyas, M. (2007). Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 6(3), 218-231.
- 49) McKenzie, R. L., Aucamp, P. J., Bais, A. F., Björn, L. O., Ilyas, M., & Madronich, S. (2011). Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 10(2), 182-198.
- 50) Parvizpour, S., Hussin, N., Shamsir, M. S., & Razmara, J. (2021). Psychrophilic enzymes: structural adaptation, pharmaceutical and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 105(3), 899-907.

- 51) Peragallo Papic, V. (2020-05). Identificación y análisis de enzimas comúnmente expresadas en levaduras antárticas. Disponible en <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/178355>
- 52) Pla, I. A., Damasceno, L. M., Vannelli, T., Ritter, G., Batt, C. A., & Shuler, M. L. (2006). Evaluation of Mut⁺ and MutS *Pichia pastoris* phenotypes for high level extracellular scFv expression under feedback control of the methanol concentration. *Biotechnology progress*, 22(3), 881-888.
- 53) Seo, K. H., & Rhee, J. I. (2004). High-level expression of recombinant phospholipase C from *Bacillus cereus* in *Pichia pastoris* and its characterization. *Biotechnology letters*, 26(19), 1475-1479.
- 54) Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A.M., Gumienny, G., Haas, J., Schwede, T. 2020. QMEANDisCo - distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics* 36, 1765-1771.
- 55) Ramli, A.N.M., Mahadi, N.M., Shamsir, M.S. *et al.* Structural prediction of a novel chitinase from the psychrophilic *Glaciozyma antarctica* PI12 and an analysis of its structural properties and function. *J Comput Aided Mol Des* 26, 947–961 (2012). <https://doi.org/10.1007/s10822-012-9585-7>
- 56) Ramya, L. N., & Pulicherla, K. K. (2015). Molecular insights into cold active polygalacturonase enzyme for its potential application in food processing. *Journal of food science and technology*, 52(9), 5484-5496.
- 57) Russell, R. J., Gerike, U., Danson, M. J., Hough, D. W., & Taylor, G. L. (1998). Structural adaptations of the cold-active citrate synthase from an Antarctic bacterium. *Structure*, 6(3), 351-361.
- 58) Sanchez, S., & Demain, A. L. (2011). Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. *Organic Process Research & Development*, 15(1), 224-230.

- 59) 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.
- 60) Saqib, A. A. N., & Whitney, P. J. (2011). Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono-and di-saccharide sugars. *Biomass and bioenergy*, 35(11), 4748-4750.
- 61) Shivaji, S., & Prasad, G. S. (2009). Antarctic yeasts: biodiversity and potential applications. In *Yeast biotechnology: diversity and applications* (pp. 3-18). Springer, Dordrecht.
- 62) Shoda, S. I., Uyama, H., Kadokawa, J. I., Kimura, S., & Kobayashi, S. (2016). Enzymes as green catalysts for precision macromolecular synthesis. *Chemical reviews*, 116(4), 2307-2413.
- 63) Siddiqui KS, Cavicchioli R (2006) Cold-adapted enzymes. *Annu Rev Biochem* 75:403–433. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142723>
- 64) Sočan, J., Purg, M., & Åqvist, J. (2020). Computer simulations explain the anomalous temperature optimum in a cold-adapted enzyme. *Nature communications*, 11(1), 1-11.
- 65) Teixeira, R. S. S., da Silva, A. S. A., Ferreira-Leitão, V. S., & da Silva Bon, E. P. (2012). Amino acids interference on the quantification of reducing sugars by the 3, 5-dinitrosalicylic acid assay mislead carbohydrase activity measurements. *Carbohydrate research*, 363, 33-37.
- 66) Tina K. G., Bhadra R. and Srinivasan N. (2007). PIC: Protein Interactions Calculator, *Nucleic Acids Research*, Vol. 35, Web Server issue W473–W476.
- 67) Trono, D. (2019). Recombinant enzymes in the food and pharmaceutical industries. In *Advances in Enzyme Technology* (pp. 349-387). Elsevier.
- 68) Vander Meersche, Y., Cretin, G., de Brevern, A. G., Gelly, J. C., & Galochkina, T. 2021. MEDUSA: Prediction of Protein Flexibility from Sequence. *Journal of molecular biology*, 433(11), 166882. [10.1016/j.jmb.2021.166882](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166882)

- 69) Vester, J. K., Glaring, M. A., & Stougaard, P. (2015). Improved cultivation and metagenomics as new tools for bioprospecting in cold environments. *Extremophiles*, 19(1), 17-29.
- 70) Villarreal, P., Carrasco, M., Barahona, S., Alcaíno, J., Cifuentes, V., & Baeza, M. (2016). Tolerance to ultraviolet radiation of psychrotolerant yeasts and analysis of their carotenoid, mycosporine, and ergosterol content. *Current Microbiology*, 72(1), 94-101.
- 71) Villarreal, P., Carrasco, M., Barahona, S., Alcaíno, J., Cifuentes, V., & Baeza, M. (2018). Antarctic yeasts: analysis of their freeze-thaw tolerance and production of antifreeze proteins, fatty acids and ergosterol. *BMC microbiology*, 18(1), 1-10.
- 72) Vite-Vallejo, O., Palomares, L. A., Dantán-González, E., Ayala-Castro, H. G., Martínez-Anaya, C., Valderrama, B., & Folch-Mallol, J. (2009). The role of N-glycosylation on the enzymatic activity of a *Pycnoporus sanguineus* laccase. *Enzyme and microbial technology*, 45(3), 233-239.
- 73) Vogt, G., Woell, S., & Argos, P. (1997). Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs. *Journal of molecular biology*, 269(4), 631-643.
- 74) Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T. 2018. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46(W1), W296-W303.
- 75) Yadav, D. K., Yadav, N., Yadav, S., Haque, S., & Tuteja, N. (2016). An insight into fusion technology aiding efficient recombinant protein production for functional proteomics. *Archives of biochemistry and biophysics*, 612, 57-77.
- 76) Yang, G., Mozzicafreddo, M., Ballarini, P., Pucciarelli, S., & Miceli, C. (2021). An in-silico comparative study of lipases from the Antarctic psychrophilic ciliate *Euplotes focardii* and the

mesophilic congeneric species *Euplotes crassus*: Insight into Molecular Cold-Adaptation. *Marine drugs*, 19(2), 67.

77) Yuivar, Y., Barahona, S., Alcaíno, J., Cifuentes, V., & Baeza, M. (2017). Biochemical and thermodynamical characterization of glucose oxidase, invertase, and alkaline phosphatase secreted by Antarctic yeasts. *Frontiers in molecular biosciences*, 4, 86.

78) Yuivar, Y., Alcaíno, J., Cifuentes, V., & Baeza, M. (2019). Characterization of gelatinase produced by Antarctic *Mrakia* sp. *Journal of basic microbiology*, 59(8), 846-852.

79) Zheng, X., Fang, B., Han, D., Yang, W., Qi, F., Chen, H., & Li, S. (2016). Improving the Secretory Expression of an α -Galactosidase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. *PloS one*, 11(8), e0161529.

ANEXO

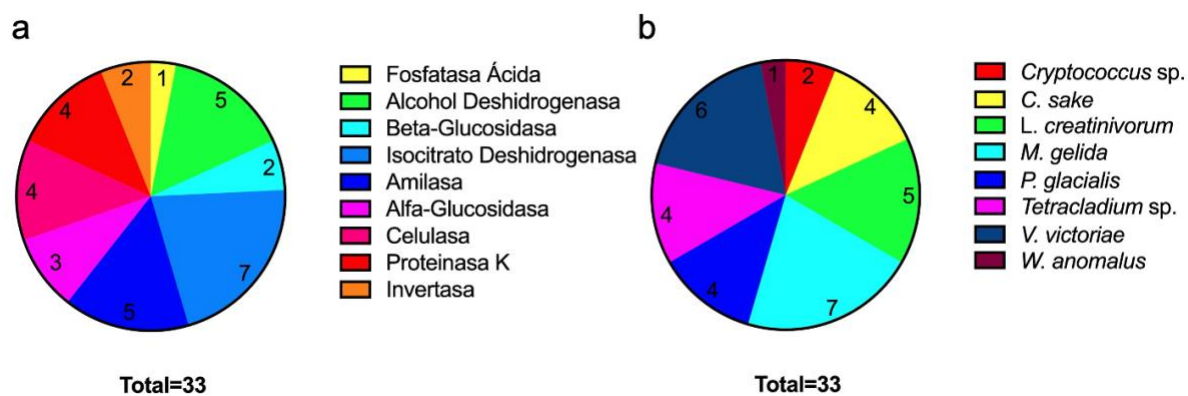


Figura 1 Anexo: Composición del set de datos de secuencias utilizado para los análisis bioinformáticos. (a) Frecuencia de tipos de enzimas. (b) Frecuencia de cada levadura.

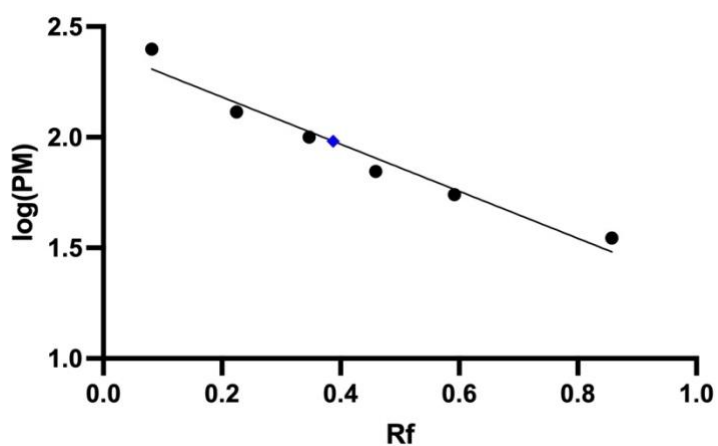


Figura 2 Anexo: Gráfico del logaritmo del peso molecular versus el avance relativo de las bandas del patrón de peso de la Figura 7b, utilizado para calcular el peso molecular de GT. El rombo azul corresponde al peso molecular calculado para GT.

Tabla 1 Anexo: Sitios de glicosilación predichos en la secuencia de GT		
Posición	N-Glicosilación ¹	O-Glicosilación ¹
23	+	
25		+
57	+	
67	+	
273	+	
389		+
464		+
475		+
560		+
566		+
570		+
571		+
572		+
578		+
580		+
585		+
586		+
587		+
591		+
592		+
593		+
595		+
597		+
598		+
599		+
600		+
606		+
653		+

¹La presencia de + en cada columna indica si la posición señalada corresponde a una N-Glicosilación o una O-Glicosilación.

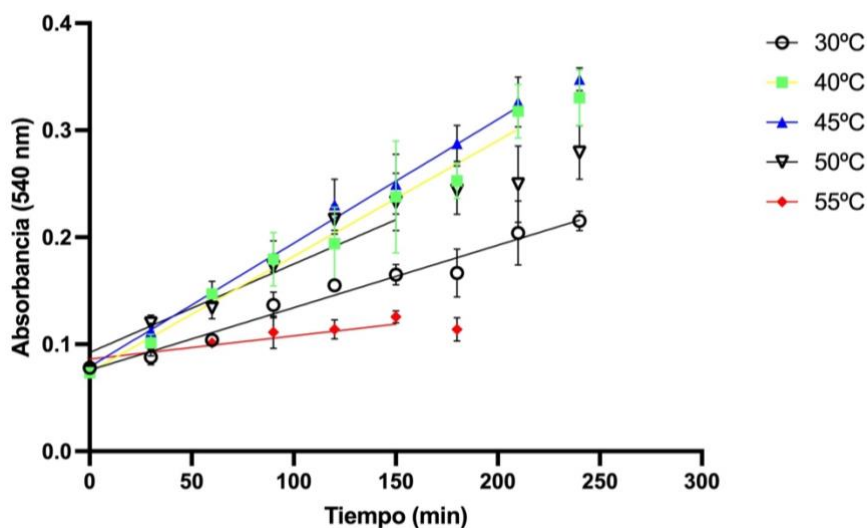


Figura 3 Anexo: Determinación de velocidad de reacción de GT a distintas temperaturas. Se midió la absorbancia a distintos intervalos de tiempo por triplicado hasta los 240 minutos. La velocidad de reacción para cada temperatura se calculó como la pendiente de la zona lineal de la curva respectiva. Las reacciones se llevaron a cabo a pH 7,0, con almidón soluble como sustrato.

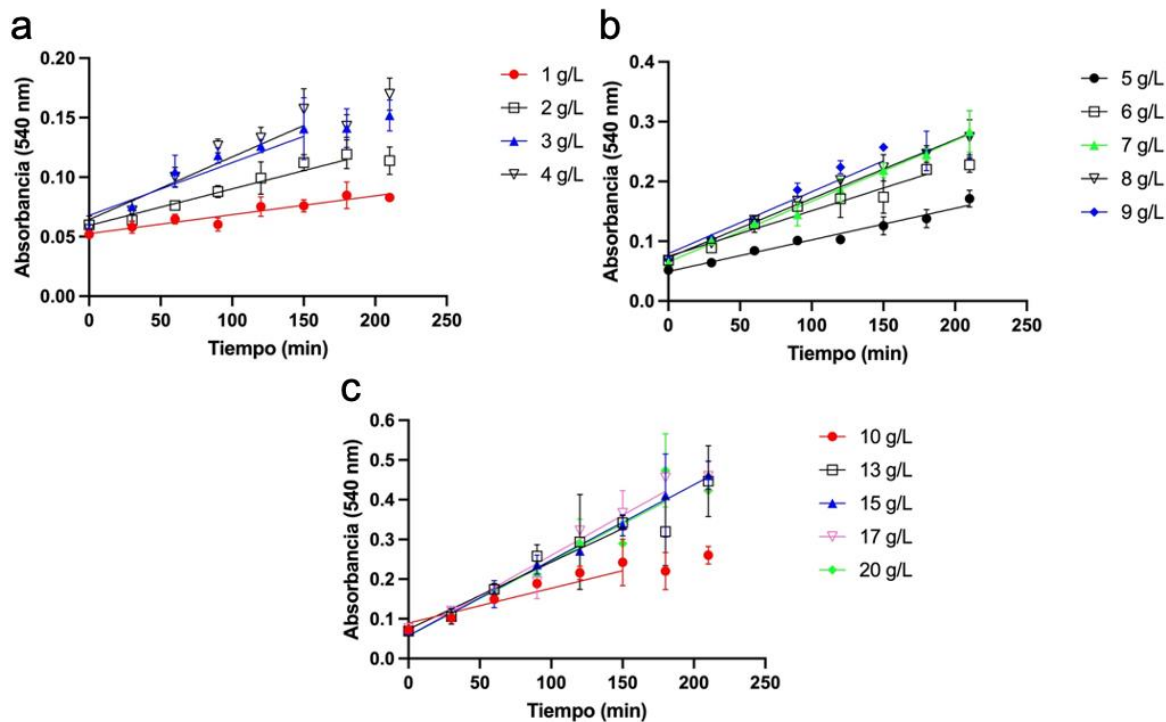


Figura 4 Anexo: Determinación de velocidad de reacción de GT a distintas concentraciones de sustrato. Se midió la actividad de GT por medio del método de DNS con almidón soluble como sustrato a concentraciones de 1, 2, 3, 4 (a), 5, 6, 7, 8, 9 (b), 10, 13, 15, 17 y 20 g/L (c). La medición de cada punto se hizo por triplicado hasta los 210

minutos. La velocidad de reacción a cada concentración se determinó por la pendiente de la zona lineal de cada curva. Las reacciones se llevaron a cabo a 45°C y pH 7.0.

Tabla 2 Anexo: Secuencias utilizadas en este trabajo y sus respectivos moldes

Secuencia	Código molde	Organismo
Csake_FA ¹	2gfi	Debaryomyces castellii
Crysp_AD ²	7kqv	Cladosporium herbarum
Csake_AD	7kqv	Cladosporium herbarum
Lcrea_AD	6alj	Homo sapiens
Mgeli_AD	6lpn	Homo sapiens
Pgla_AD	7kqv	Cladosporium herbarum
Lcrea_bglu ³	3abz	Kluyveromyces marxianus
Mgeli_bglu	6jbs	Lentinula edodes
Crysp_ID ⁴	3blx	Saccharomyces cerevisiae
Lcrea_ID	1lwd	Sus scrofa
Mgeli_ID	6adi	Homo sapiens
Pgla_ID	6kdf	Homo sapiens
Tetsp_ID	2qfw	Saccharomyces cerevisiae
Vvic_ID	2qfw	Saccharomyces cerevisiae
Wanom_ID	2qfw	Saccharomyces cerevisiae
Mgeli_amy ⁵	6yqa	Aspergillus oryzae
Pgla_amy	2gjr	Bacillus halmapalus
Tetsp_amy	1e43	Bacillus amyloliquefaciens
Vvic_amy	6xsj	Aspergillus oryzae
GT	2vn4	Hypocrea jecorina
Lcrea_aglu ⁶	3abz	Kluyveromyces marxianus
Mgeli_aglu	6jbs	Lentinula edodes
Vvic_aglu	1uok	Bacillus cereus
Csake_cel ⁷	1cz1	Candida albicans
Pgla_cel	2pc8	Candida albicans
Tetsp_cel	7lpo	Cryptococcus neoformans var. grubii serotype A
Vvic_cel	4mdo	Humicola grisea var. thermoidea
Csake_PK ⁸	1dpj	Saccharomyces cerevisiae
Lcrea_PK	1dpj	Saccharomyces cerevisiae
Mgeli_PK	1dpj	Saccharomyces cerevisiae
Vvic_PK	1dpj	Saccharomyces cerevisiae
Mgeli_inv ⁹	5ann	Xanthophyllomyces dendrorhous
Vvic_inv	4eqv	Saccharomyces cerevisiae

¹FA: Fosfatasa Ácida (EC 3.1.3.2)

²AD: Alcohol Deshidrogenasa (EC 1.1.1.1)

³bglu: β -Glucosidasa (EC 3.2.1.74)

⁴ID: Isocitrato Deshidrogenasa (EC 1.1.1.41)

⁵amy: Amilasa (EC 3.2.1.1)

⁶aglu: α -Glucosidasa (EC 3.2.1.3)

⁷cel: Celulasa (EC 3.2.1.4)

⁸PK: Proteinasa K (EC 3.4.21.64)

⁹inv: Invertasa (EC 3.2.1.26)

Tabla 3 Anexo: Levadura de procedencia y tipo de enzima de ORFs encontrados en Seminario de Título

	AD ¹	Amy ²	α -Glu ³	β -Glu ⁴	ID ⁵	Cel ⁶	Inv ⁷	PK ⁸	FA ⁹
<i>Cryptococcus</i> sp.	x		x	x	x				x
<i>Candida sake</i>	x		x	x	x	x		x	x
<i>Leucosporidium creatinivorum</i>	x		x	x	x	x		x	
<i>Mrakia gelida</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Phenoliferia glacialis</i>	x	x	x	x	x	x			x
<i>Tetracladium</i> sp.	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Vishniacozyma victoriana</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	x			x	x		x		

¹Alcohol Deshidrogenasa (EC 1.1.1.1)

²Amilasa (EC 3.2.1.1)

³ α -Glucosidasa (EC 3.2.1.3)

⁴ β -Glucosidasa (EC 3.2.1.74)

⁵Isocitrato Deshidrogenasa (EC 1.1.1.41)

⁶Celulasa (EC 3.2.1.4)

⁷Invertasa (EC 3.2.1.26)

⁸Proteinasa K (EC 3.4.21.64)

⁹Fosfatasa Ácida (EC 3.1.3.2)

Tabla 4 Anexo: Secuencias iniciales y parámetros de selección

Nombre secuencia	GMQE ¹¹	%_ident_m ¹⁰	Verify 3D
Crysp_FA ¹	0.38	9.1	77.88
Csake_FA	0.82	48.7	96.63
Mgeli_FA	0.27	11	86.56
Pgla_FA	0.3	12.7	80.63
Tetsp_FA	0.25	13.1	73.39
Vvic_FA	0.55	24.7	81.9
Crysp_AD ²	0.82	59.2	80.37
Csake_AD	0.77	51.7	84.27
Lcrea_AD	0.83	47.9	92.16
Mgeli_AD	0.77	47.7	89.37
Pgla_AD	0.82	59.2	80.37
Tetsp_AD	0.64	18.9	73.85
Vvic_AD	0.51	20.8	85.67
Wanom_AD	0.81	27.2	74.14
Crysp_bglu ³	0.43	10.5	58.64
Csake_bglu	-	-	-
Lcrea_bglu	0.77	42.5	88.93

Mgeli_bglu	0.73	41.2	90.53
Pgla_bglu	0.52	7.3	68.89
Tetsp_bglu	0.71	29.4	74.84
Vvic_bglu	0.71	25.4	76.61
Wanom_bglu	0.71	9.7	88.16
Crysp_ID ⁴	0.79	53.3	92.98
Csake_ID	0.86	61.8	78.6
Lcrea_ID	0.87	63.4	90.27
Mgeli_ID	0.85	63.4	92.04
Pgla_ID	0.75	54.6	82.69
Tetsp_ID	0.77	60.6	92.89
Vvic_ID	0.82	64.2	93.17
Wanom_ID	0.9	67.8	90.63
Mgeli_amy ⁵	0.65	38.9	91.4
Pgla_amy	0.8	35.7	90.44
Tetsp_amy	0.76	41.9	93.57
Vvic_amy	0.73	39	98.3
Glucoamilasa tetracladium	0.82	55.7	91.58
Crysp_aglu ⁶	0.76	9.3	40
Csake_aglu	0.78	27.1	83.75
Lcrea_aglu	0.77	42.5	88.93
Mgeli_aglu	0.73	41.2	90.53
Pgla_aglu	0.1	5.3	0
Tetsp_aglu	0.68	26.6	76.25
Vvic_aglu	0.74	43.1	91.47
Csake_cel ⁷	0.7	35.6	98.65
Lcrea_cel	0.39	16.2	83.23
Mgeli_cel	0.65	24.9	92.25
Pgla_cel	0.71	35.8	97.48
Tetsp_cel	0.73	34.1	87.91
Vvic_cel	0.8	42.8	89.5
Csake_PK ⁸	0.74	59.4	86.54
Lcrea_PK	0.62	43.8	87.31
Mgeli_PK	0.68	47.6	92.33
Tetsp_PK	0.57	25.2	79
Vvic_PK	0.67	49.3	90.74
Mgeli_inv ⁹	0.87	55.2	97.64
Tetsp_inv	0.6	18.5	82.35
Vvic_inv	0.64	34.9	87.47
Wanom_inv	0.47	7.6	17.5

¹FA: Fosfatasa Ácida (EC 3.1.3.2)

²AD: Alcohol Deshidrogenasa (EC 1.1.1.1)

³bglu: β -Glucosidasa (EC 3.2.1.74)

⁴ID: Isocitrato Deshidrogenasa (EC 1.1.1.41)

⁵amy: Amilasa (EC 3.2.1.1)

⁶aglu: α -Glucosidasa (EC 3.2.1.3)

⁷cel: Celulasa (EC 3.2.1.4)

⁸PK: Proteinasa K (EC 3.4.21.64)

⁹inv: Invertasa (EC 3.2.1.26)

¹⁰%_ident_m: % de identidad con secuencia molde

¹¹GMQE: Global Model Quality Estimate. Es un valor entre 0 y 1 que indica la calidad del modelo creado.

En gris se muestran las secuencias seleccionadas-