



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Química
Tesis doctoral

“Bioprospección de enzimas de interés biotecnológico
producidas por levaduras antárticas: producción,
caracterización y aplicaciones industriales”



Lic. Brenda Bezus
Tesista

Dr. Sebastián F. Cavalitto
Director

Dra. Ivana Cavello
Co-directora

Año 2022

“Bioprospección de enzimas de interés biotecnológico producidas por levaduras antárticas: producción, caracterización y aplicaciones industriales ”

El presente trabajo de tesis para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Grupo de Biotecnología de Enzimas y Tratamiento de Efluentes (BEyTE), en el Centro de Investigaciones y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, con el financiamiento de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC-PBA) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Tesista: Lic. Bezus Brenda

Director: Dr. Sebastián F. Cavalitto

Co-directora: Dra. Cavello Ivana

La participación de la Expedición ANTARKOS XXXII se desarrolló dentro del marco del proyecto “Bioprospección de enzimas microbianas activas a bajas temperaturas con aplicación industrial”, financiado por el Instituto Antártico Uruguayo.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de La Plata, que me permitió llevar a cabo mis estudios de grado y posgrado, y al CINDEFI por permitirme llevar a cabo mi trabajo doctoral.

Al Instituto Antártico Uruguayo, que financió la campaña en la que se recolectaron las muestras, y a Silvana, de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de la República, porque gracias a ellos pudo llevarse a cabo este trabajo. A Silvana por la amabilidad y generosidad recibida siempre.

A la UNU-BIOLAC por brindarme una beca gracias a la cual fue posible mi estadía en México.

A Tato e Ivana, por aceptarme sin dudarlos en el laboratorio para realizar mi tesis doctoral.

A Ivana, por dirigirme y transmitirme su conocimiento durante todos estos años. Por ayudarme y aconsejarme frente a todas las dificultades que se fueron presentando. Por todos los buenos momentos compartidos durante estos seis años.

A Tato, por dirigirme, por estar siempre presente y disponible para responder todas mis preguntas y planteos.

A Juan Carlos, por recibirme en su laboratorio y por su confianza en mi trabajo.

A la Dra. Paula Pombo, por recibirme en su laboratorio y compartirme parte de su conocimiento. Y a Stefi, por acompañarme y dirigirme en los ensayos de laboratorio.

A los integrantes del laboratorio 1: Gastón, Flor, Flor, Ine, Andre, Cande, Juan, Amparo, Pato, Facundo, y demás, por los momentos compartidos durante este tiempo.

A Caro por tirarme buenas vibras cada vez que nos cruzamos, y por estar siempre dispuesta a ayudarme con lo que necesitara.

A los que trabajaron y trabajan en el CINDEFI, por la buena onda, las charlas de pasillo, y todos los festejos compartidos.

A mis compañeros de cátedra, Caro, Ceci, Belti, Mari, Ine, Flor, Pame; con los que estoy descubriendo esta hermosa profesión.

A Flor, por los miles de días compartidos tanto en la mesada como en el escritorio y en cursos, las risas y las frustraciones de ensayos fallidos.

A Mari por toda la ayuda que me brindó y por todos los momentos compartidos.

A mi familia y amigos, por estar siempre presentes. A mis padres por transmitirme el valor del esfuerzo.

A Maxi, por ser mi compañero de vida.

Parte de los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis doctoral han sido publicados en las siguientes revistas científicas:

- Yeasts from the Maritime Antarctic: tools for industry and bioremediation (2022). *Antarctic Science*, 34, p. 16-28. **BEZUS, B.**, GARMEDIA, G., VERO, S., CAVALITTO, S. & CAVELLO, I. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0954102021000420>.

- Pectin extraction from lime pomace by cold-active polygalacturonase-assisted method (2022) *International Journal of Biological Macromolecules*, 209, p. 290-298. **BEZUS, B.**, ESQUIVEL, J. C. , CAVALITTO, S. & CAVELLO, I. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.019>.

- Study of polygalacturonase production by an Antarctic yeast and obtention of dragon fruit juice by maceration at mild temperature (2022) *Food Bioscience*, 49, 101942. **BEZUS, B.**, ESQUIVEL, J. C. , CAVALITTO, S. & CAVELLO, I. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101942>.

Capítulos de libro:

- Pectinases produced by extremophilic yeasts: from cold environments to the food industry **BEZUS, B.**, CAVELLO, I., CONTRERAS ESQUIVEL, J. C. & CAVALITTO, S. 2022. *En M. Kuddus and C. Noe Aguilar eds. Value-addition in food products and processing through enzyme technology*. Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89929-1.00010-X>

Pasantías en el exterior:

- Los resultados del Capítulo 6: “Evaluación de la aplicación de la β -glucosidasa de *Mrakia* sp. 7.1.2016 en vinos” presentados en este trabajo de Tesis han sido obtenidos en el marco de una pasantía realizada en la cátedra de Bioquímica de la Universidad de la República, Cátedra de Bioquímica, Montevideo, Uruguay, bajo la dirección de la Dra. Paula Pombo. Agosto-Septiembre 2019, Montevideo, Uruguay.

-Parte de los resultados del Capítulo 7 presentados en este trabajo han sido obtenidos en el marco de una pasantía realizada en el Laboratorio de Glicobiotecnología, Universidad Autónoma de Coahuila, México, bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Contreras Esquivel, Junio-Agosto 2021, Saltillo, Coahuila, México.

“All we have yet discovered is but a trifle in comparison with what lies hid in the great treasury of nature”

Antonie van Leewenhoek (1680)

“Bioprospección de enzimas de interés biotecnológico producidas por levaduras antárticas: producción, caracterización y aplicaciones industriales”

Resumen

La bioprospección de enzimas entre microorganismos extremófilos es una herramienta utilizada en los últimos años para seleccionar enzimas que catalicen las reacciones en condiciones extremas, teniendo en cuenta su carácter biológico. Particularmente, las ventajas de utilizar enzimas provenientes de microorganismos adaptados al frío radican en la posible reducción de la temperatura de algunos procesos, con la consecuente reducción de la energía a aportar al proceso. Este trabajo de tesis se enfocó en la búsqueda de enzimas producidas por levaduras antárticas, su producción y caracterización bioquímica, así como también la evaluación de su potencial para ciertas aplicaciones. El trabajo inició a partir del aislamiento de 32 cepas de levaduras a partir de muestras antárticas. Entre ellas, se observó la prevalencia de Basidiomicetos de los géneros *Naganishia*, *Holtermaniella*, *Vishniacozyma*, *Phenoliferia*, *Mrakia* y *Cystobasidium*. Seis de las cepas fueron caracterizadas como Ascomicetos de los géneros *Metschnikowia* y *Debaryomyces*. Se pudo determinar que el 40% de las levaduras aisladas fueron psicrófilas, dejando un 60% restante de psicrotolerantes. En general se observó una media a alta tolerancia a la presencia de NaCl, habiendo algunos aislamientos que toleraron hasta 3.5 M de NaCl para su crecimiento. También se evaluó la tolerancia a los iones Ni^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Li^{+} y Cd^{+2} . Entre estos, el Cu^{+2} y el Cd^{+2} son los que resultaron más tóxicos, inhibiendo el crecimiento de la mayoría de los aislamientos. La bioprospección de enzimas hidrolíticas demostró una alta proporción de aislamientos produciendo β -glucosidasas (59%) y esterases (53%). Sólo algunas levaduras produjeron pectinasas y

xilanasas (19% y 12.5%, respectivamente), y las proteasas sólo fueron producidas por aislamientos psicrófilos.

Otra de las aplicaciones de levaduras extremófilas y sus enzimas es en la decontaminación de efluentes. En este trabajo se realizó una primera evaluación de la capacidad de estas levaduras de decolorar medio suplementado con colorantes textiles. Los géneros *Vishniacozyma*, *Cystobasidium*, *Mrakia* y *Phenoliferia* parecen ser los más promisorios para continuar con el estudio de biodecoloración de este tipo de colorantes.

La cepa *Mrakia* sp. LP 7.1.2016, que produjo seis de las ocho actividades hidrolíticas evaluadas, se seleccionó para estudiar la producción de pectinasas y β -glucosidasas en medio líquido. Se utilizó pectina como inductor, y se observó que la producción de las enzimas fue fuertemente afectada por la temperatura de cultivo, siendo mayor la expresión a 14 °C respecto de 3 °C. El cultivo fue escalado en un cultivo *Batch* a 14 °C, y, al final del crecimiento, se obtuvieron títulos de β -glucosidasa de 24 mU ml⁻¹ y de poligalacturonasa de 0.76 U ml⁻¹. Se detectaron en el cultivo una β -glucosidasa (BGLasa) y dos poligalacturonasas (PGasaI y PGasaII). La BGLasa fue purificada 62 veces hasta una preparación homogénea, con un rendimiento del proceso de 51% y actividad específica final de 27 U mg⁻¹. La proteína demostró un alto peso molecular, con al menos dos subunidades de 134 y 14 kDa. La PGasaI se pudo purificar hasta un 83% de pureza, y se le determinó un peso molecular de 33 kDa. Se consiguió una muestra con 30.3 U mg⁻¹ de actividad específica, con un rendimiento del proceso de 27.6%. Por su lado, la PGasaII fue purificada 456 veces, y se obtuvo una preparación con 12551.9 U mg⁻¹ de actividad específica. El rendimiento fue 2% y el peso molecular estimado fue cercano a 100 kDa. Todas las enzimas fueron activas en zimogramas específicos. La caracterización bioquímica demostró temperaturas óptimas de 55 °C, 47 °C y 55 °C para las BGLasa, PGasaI y PGasaII, respectivamente. El pH óptimo de reacción fue cercano a 5.0 en todos

los casos. La BGLasa y PGasaII presentaron una termoestabilidad alta, mientras que la PGasaI fue más termolábil. Todas las enzimas fueron sumamente estables a la variación de pH en un rango considerable (3.0-10.0), durante 1 hora. La BGLasa fue parcialmente inhibida por Co^{+2} (70% de actividad residual), mientras que los iones divalentes Ca^{+2} , Mg^{+2} y Mn^{+2} generaron un efecto positivo (14-19%) sobre la actividad. En el caso de las PGasas, ambas fueron inhibidas por Hg^{+2} . Se calcularon los parámetros cinéticos de las enzimas estudiadas y sus especificidades de sustrato. Se pudo determinar que las PGasas estudiadas poseen un mecanismo de acción del tipo *endo*.

Las BGLasas son utilizadas para liberar volátiles aromáticos a partir de sus precursores glucosídicos durante la producción de vinos. La BGLasa pura de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 fue capaz de aumentar ocho veces la cantidad de terpenos detectados en el vino mediante la técnica GC-MS. Se detectaron aumentos en los terpenos nerol, geraniol, y en los óxidos de *trans* y *cis* linalool.

Por su parte, se evaluó la capacidad del extracto pectinolítico producido y las enzimas puras, así como también de otro extracto pectinolítico antártico, producido por la levadura *Tausonia pullulans* 8E, para extraer pectina a partir de pomaza de lima a 20 °C. Entre los extractos, sólo el producido por el *T. pullulans* fue útil para extraer pectina, mientras que ambas enzimas puras de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 también aumentaron la extracción. Los rendimientos utilizando las enzimas PGasaI y la PGasaII fueron entre 10 y 12 g de pectina por cada 100 g de pomaza inicial. Se trabajó con el extracto producido por *T. pullulans* 8E para evaluar el efecto de distintos parámetros en el rendimiento en pectina obtenido, como la temperatura, que no alteró significativamente los rendimientos entre 20 °C y 30 °C, y el tiempo de extracción, frente al cual sí se observaron diferencias al usar tiempos de 30 o 120 minutos. Las pectinas obtenidas con el extracto producido por *T. pullulans* 8E, con cerca de un 70% de esterificación, tuvieron 45% de ácidos urónicos, 50% de

azúcares neutros, de los cuales muchos existieron de forma libre mientras que otros se encontraban covalentemente unidos a la molécula de pectina. Las pectinas obtenidas con las enzimas PGasaI y PGasaII, con grados de esterificación entre 73-80%, obtuvieron mayores contenidos de ácidos urónicos (65-85%) y menor de azúcares neutros (~30%). La pectina obtenida enzimáticamente con el extracto de *T. pullulans* 8E pudo utilizarse para formar geles con fibra, FOS y azúcares de bajas calorías.

El extracto pectinolítico de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016, por su parte, sí fue útil para macerar pitaya de pulpa roja y blanca a 23 °C, y aumentar el rendimiento de jugo de pitaya. Se lograron aumentos de 16% y 20% en los rendimientos de jugo de pitaya de pulpa roja y blanca, respectivamente. El color del jugo de pitaya roja se vio incrementado luego del tratamiento enzimático. También se evaluó la maceración de morrón, utilizando ambos extractos pectinolíticos y la PGasaI. A partir de la realización de un diseño experimental de Doehlert con las variables relación sólido-líquido (1:2-1:6), el tiempo de macerado (1-5 h) y el título total de poligalacturonasa (1-100 U), se determinó que las variables tiempo y título de enzima fueron significativas para explicar la variación del rendimiento de vegetal obtenido, mientras que la relación sólido-líquido no lo fue en el rango estudiado para ninguno de los dos extractos. Se lograron rendimientos de maceración cercanos al 90%. La enzima PGasaI (10 U) se logró un 24% más de maceración respecto del control sin enzima, luego de 6 horas. Utilizando las enzimas producidas por *T. pullulans* 8E y *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 se extrajeron 2.8 y 0.7 veces más de actividad antioxidante por gramo de morrón, respectivamente, en comparación con el macerado sin enzimas. Los aumentos en polifenoles fueron de 0.9 y 0.2 veces, respectivamente. En cuanto a los azúcares reductores, las diferencias fueron de 2.9 y 1.5 con las enzimas de *T. pullulans* 8E y *Mrakia* sp. LP 7.1.2016, respectivamente. Estos extractos podrían ser utilizados en distintos procesos en los cuales es necesario macerar

vegetales, ya sea para preparar un puré vegetal licuado a bajas temperaturas o en algún proceso extractivo de compuestos vegetales de interés.

*“Bioprospecting of enzymes of biotechnological interest
produced by Antarctic yeasts: production,
characterization and industrial applications”*

Abstract

Enzyme bioprospection among extremophile microorganisms was recently used as a tool to select enzymes that catalyze reactions under extreme conditions. Particularly, the advantage of the use of cold-active enzymes lies in the possible reduction of some process's temperature, with the consequent reduction of the energy intake. The present thesis was focused on the search of enzymes produced by Antarctic yeasts, their production and biochemical characterization, as well as the evaluation of their potential for certain applications. The work started from the isolation of 32 yeast strains from Antarctic samples. Among them, a prevalence of Basidiomycetes of the genera *Naganishia*, *Holtermanniella*, *Vishniacozyma*, *Phenoliferia*, *Mrakia* and *Cystobasidium* was observed. Six of the strains were characterized as Ascomycetes of the genera *Metschnikowia* and *Debaryomyces*. Among the total yeasts, 40% were psychrophilic, leaving the remaining 60% as psychrotolerant. In general, a high tolerance to the presence of NaCl in the culture medium was observed, with some isolates that tolerated up to 3.5 M of NaCl for their growth. Tolerance to Ni⁺², Zn⁺², Cu⁺², Li⁺ and Cd⁺² ions was also evaluated. Among these, Cu⁺² and Cd⁺² were the most toxic, inhibiting the growth of most isolates. Bioprospecting for hydrolytic enzymes demonstrated a high proportion of isolates producing β-glucosidases (59%) and esterases (53%). Only some yeasts produced pectinases and xylanases (19% and 12.5%, respectively), and proteases were only produced by psychrophilic isolates.

Another potential application of extremophile yeasts and their enzymes is in effluents decontamination processes. In this work, a first evaluation of the ability of these yeasts to decolorize medium supplemented with textile dyes was carried out. The genera *Vishniacozyma*, *Cystobasidium*, *Mrakia* and *Phenoliferia* seem to be the most promising to continue with the study of biodecolorization of dyes.

The strain *Mrakia* sp. LP 7.1.2016, which produced six of the eight hydrolytic activities evaluated, was selected to study the production of pectinases and β -glucosidases in liquid medium. Pectin was used as an inducer, and it was observed that enzyme production was strongly affected by culture temperature, being more expressed at 14 °C than at 3 °C. The culture was scaled up in a Batch culture at 14 °C, and, at the end of growth, β -glucosidase titers of 24 mU ml⁻¹ and polygalacturonase of 0.76 U ml⁻¹ were obtained. One β -glucosidase (BGLase) and two polygalacturonases (PGaseI and PGaseII) were detected in the enzymatic extract. The BGLase was purified 62 times until a homogeneous preparation, with a process yield of 51% and final specific activity of 27 U mg⁻¹. The protein demonstrated a high molecular weight, with at least two subunits of 134 and 14 kDa. PGaseI could be purified to 83% purity, and a molecular weight of 33 kDa was determined. A sample with 30.3 U mg⁻¹ of specific activity was obtained, with a process yield of 27.6%. On the other hand, PGaseII was purified 456 times, and a preparation with 12551.9 U mg⁻¹ of specific activity was obtained. The yield was 2% and the estimated molecular weight was close to 100 kDa. All enzymes were active in specific zymograms. Biochemical characterization demonstrated optimal temperatures of 55 °C, 47 °C, and 55 °C for BGLase, PGaseI, and PGaseII, respectively. The optimum reaction pH was close to 5.0 in all cases. BGLase and PGaseII showed high thermostability, while PGaseI was more thermolabile. All the enzymes were extremely stable to pH variation in a considerable range (3.0-10.0), for one hour. BGLase was partially inhibited by Co⁺²

(70% residual activity), while the divalent ions Ca^{+2} , Mg^{+2} , and Mn^{+2} generated a positive effect (14-19%) on activity. In the case of PGases, both were inhibited by Hg^{+2} . The kinetic parameters of the studied enzymes and their substrate specificities were calculated. It was possible to determine that the PGases studied have an endo-type mechanism of action.

BGLases are used to release aromatic volatiles from their glycosidic precursors during wine production. Pure BGLase from *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 was able to increase eight times the amount of terpenes detected in the wine using the GC-MS technique. Increases were detected in the terpenes nerol, geraniol, and in the oxides of trans and cis linalool.

The pectinolytic extract produced and the pure enzymes, as well as another Antarctic pectinolytic extract, produced by the yeast *Tausonia pullulans* 8E, were evaluated to aid pectin extraction from lime pomace at 20 °C. Among the extracts, only the one produced by *T. pullulans* was useful to extract pectin, while both pure enzymes from *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 also increased the extraction. The yields using the PGaseI and PGaseII enzymes were between 10 and 12 g of pectin per 100 g of initial pomace. The extract produced by *T. pullulans* 8E was used to evaluate the effect of different parameters on the pectin yield obtained, such as temperature, which did not significantly alter yields between 20 °C and 30 °C, and extraction time, where differences were observed when using times of 30 or 120 minutes. The pectins obtained with the extract produced by *T. pullulans* 8E, with about 70% esterification, had 45% uronic acids, 50% neutral sugars, many of which existed in free form while others were covalently bound to the pectin molecule. The pectins obtained with the PGaseI and PGaseII enzymes, with degrees of esterification between 73-80%, obtained higher uronic acid contents (65-85%) and lower neutral sugars (~30%). The pectin obtained enzymatically with the extract of *T. pullulans* 8E was used to form gels with fiber, FOS and low-calorie sugars.

The pectinolytic extract of *Mrakia* sp. LP 7.1.2016, for its part, was useful for macerating pitaya with red and white pulp at 23 °C, and increasing the yield of pitaya juice. Increments of 16% and 20% in the yield were achieved for red and white pitaya, respectively. Color of red pitaya juice was increased after the enzymatic treatment. *Capsicum annuum* L. maceration was also evaluated, using both pectinolytic extracts and PGaseI. From a Doehlert experimental design with the variables solid-liquid ratio (1:2-1:6), maceration time (1-5 h) and the total title of polygalacturonase (1-100 U) , it was determined that the variables time and enzyme titer were significant to explain the variation in the yield of the vegetable obtained, while the solid-liquid relationship was not significant in the range studied for either of the two extracts. Maceration yields close to 90% were achieved. The enzyme PGaseI (10 U) achieved 24% more maceration compared to the control without enzyme, after 6 hours. Using the enzymes produced by *T. pullulans* 8E and *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 2.8 and 0.7 times more antioxidant activity were extracted per gram of vegetal, respectively, compared to the treatment without enzymes. The increment in polyphenols were 0.9 and 0.2 times, respectively. Regarding reducing sugars, the differences were 2.9 and 1.5 with the enzymes of *T. pullulans* 8E and *Mrakia* sp. LP 7.1.2016, respectively. These extracts could be used in different processes when it is necessary to macerate vegetables, either to prepare a liquefied vegetable puree at low temperatures or in some extractive process of vegetable compounds of interest.

CONTENIDO

Capítulo 1	1
Introducción general	1
El Continente Antártico	1
Microorganismos adaptados al frío	4
Diversidad de levaduras adaptadas al frío en ambientes Antárticos.....	6
Adaptaciones moleculares	8
RNA polimerasas.....	8
Regulación de la fluidez de las membranas celulares	8
Moléculas crioprotectoras.....	10
Ajuste del metabolismo según la temperatura de crecimiento.....	11
Defensa antioxidante hacia las especies reactivas de oxígeno.....	11
Enzimas adaptadas al frío	12
Enzimas provenientes de levaduras adaptadas al frío.....	15
Potenciales aplicaciones de enzimas hidrolíticas adaptadas al frío.....	20
Microorganismos Antárticos como herramientas para procesos de biodecontaminación	25
Biorremediación de colorantes textiles.....	25
OBJETIVOS	29
Objetivos específicos	29
HIPÓTESIS.....	30
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
Capítulo 2	44
Aislamiento de levaduras a partir de muestras antárticas y estudio de su potencial biotecnológico.....	44
Introducción	46
Bioprospección	46
Objetivos particulares de este capítulo	49
Materiales y métodos.....	50
Sitios de muestreo	50
Procesamiento de las muestras para el aislamiento de levaduras.....	50
Identificación molecular de las levaduras.....	51
Diversidad, riqueza y dominancia.....	53
Efecto de la temperatura en el crecimiento de las levaduras.....	53
Tolerancia al NaCl y a iones metálicos.....	53
Bioprospección de enzimas hidrolíticas extracelulares	54
Ensayo cualitativo para determinar la habilidad de decoloración por parte de las levaduras	56

Resultados y discusión.....	58
Aislamiento e identificación de las levaduras	58
Actividades enzimáticas extracelulares.....	72
Decoloración de colorantes textiles: <i>screening</i> en medio sólido	84
Conclusiones de este capítulo	92
Referencias bibliográficas	93
<i>Sitios web</i>	99
Capítulo 3.....	100
Determinación de las condiciones de cuantificación de las actividades enzimáticas β -glucosidasa y poligalacturonasa	100
Introducción	100
Modelo cinético de Michaelis-Menten.....	100
Sustratos para la determinación de la actividad β -glucosidasa.....	101
Sustratos para la determinación de la actividad poligalacturonasa	102
OBJETIVOS DE ESTE CAPÍTULO	102
Materiales y métodos.....	103
Obtención del extracto enzimático con actividad poligalacturonasa y β -glucosidasa	103
Ensayo de actividad poligalacturonasa (PGasa)	103
Ensayo de actividad β -glucosidasa (BGLasa)	104
Determinación del rango de linealidad para efectuar las determinaciones de actividad poligalacturonasa y β -glucosidasa.....	104
Resultados y discusión.....	106
Determinación del rango de linealidad en la medida enzimática.....	106
Referencias bibliográficas	110
Capítulo 4	111
Producción de enzimas de interés biotecnológico por parte de la levadura <i>Mrakia</i> sp. LP 7.1.2016.....	111
Introducción	113
β -glucosidasas	113
Enzimas pectinolíticas	118
Objetivos de este capítulo	126
Materiales y Métodos.....	127
Cepa utilizada.....	127
Preparación de los inóculos	127
Estudio de la producción de enzimas en medio líquido en matraces Erlenmeyer	128
Cultivos <i>Batch</i> en biorreactor tipo tanque agitado	129
Cálculo de parámetros del crecimiento del cultivo microbiano.....	130
Ensayos enzimáticos	131

Caracterización bioquímica de las actividades β -glucosidasa y poligalacturonasa presentes en el extracto enzimático	134
Resultados y Discusión	140
Elección de la cepa: el género <i>Mrakia</i>	140
Estudio de la producción de las enzimas	142
Escalado a fermentador tipo tanque agitado	149
Determinación de otras actividades enzimáticas en el extracto obtenido con pectina como sustrato	156
Caracterización de las actividades poligalacturonasa y β -glucosidasa en el extracto enzimático	158
Conclusiones de este capítulo	176
Referencias bibliográficas	178
Sitios web	187
Capítulo 5.....	188
Purificación de poligalacturonasas y β -glucosidasa producidas por <i>Mrakia</i> sp. lp 7.1.2016 y caracterización bioquímica.....	188
Introducción	191
Purificación de enzimas	191
Purificación mediante el uso de columnas de intercambio iónico.....	193
Purificación de β -glucosidasas (BGLasas)	193
Purificación de poligalacturonasas (PGasas).....	194
Objetivos de este capítulo	195
Materiales y métodos.....	196
Obtención del extracto enzimático.....	196
Determinación de la actividad enzimática y el contenido de proteínas.....	196
Concentración del extracto enzimático.....	197
Esquema de purificación.....	200
Cromatografía de filtración en gel (desalado).....	200
Cromatografía de intercambio aniónico	201
Cromatografía de intercambio catiónico.....	201
Cromatografía de filtración en gel.....	201
SDS-PAGE y zimogramas.....	202
Caracterización bioquímica.....	203
Resultados y discusión.....	208
Purificación de las enzimas a partir del mismo extracto enzimático.....	208
SDS- PAGE y zimogramas.....	215
Caracterización bioquímica de la enzima BGLasa	221
Caracterización de las PGasas	239
Conclusiones de este capítulo	257

Referencias bibliográficas	258
Capítulo 6	266
Aplicación de la β -glucosidasa de <i>Mrakia</i> sp. LP 7.1.2016 en la liberación de aromas en vinos.....	266
introducción.....	268
Elaboración del vino.....	268
Enzimas involucradas en los procesos de vinificación.....	269
β -glucosidasas para la liberación de aromas en vinos	270
Objetivo general de este capítulo	274
Objetivos particulares	274
Materiales y Métodos.....	275
Enzima.....	275
Efecto del etanol en la actividad enzimática	275
Efecto de la glucosa, fructosa y sacarosa en la actividad enzimática	275
Cálculo de la constante K_i de inhibición por glucosa	276
Efecto del metabisulfito en la actividad enzimática.....	276
Estabilidad de la enzima a pH enológico	277
Aplicación de la β -glucosidasa en vino	277
Análisis estadístico	279
Resultados y discusión.....	280
Efecto del etanol en la actividad enzimática	280
Efecto de los azúcares en la actividad enzimática.....	282
Cálculo de la constante de inhibición por glucosa	284
Efecto del metabisulfito en la actividad enzimática.....	286
Estabilidad de la enzima a pH enológico	287
Tratamiento enzimático del vino	288
Conclusiones de este capítulo	296
Referencias bibliográficas	297
Capítulo 7.....	302
Aplicaciones biotecnológicas de pectinasas antárticas	302
Objetivo general de este capítulo	302
Primera parte: Extracción de pectina a partir de pomaza de cítricos	302
Introducción	305
Usos de la pectina en el sector comercial.....	305
Ocurrencia, estructura y propiedades de la pectina: efecto en la gelificación	305
Métodos de obtención	309
Objetivos particulares de esta sección	312
Materiales y métodos.....	313

Preparación de las enzimas	313
Extracción de pectina a partir de pomaza de lima	313
Caracterización de la pectina	315
Preparación de geles con pectina	318
Análisis de textura.....	319
Análisis estadístico	319
Resultados y discusión.....	320
Extracción de pectina a partir de pomaza de lima	320
Caracterización de las pectinas obtenidas	331
Conclusiones de esta sección	343
Referencias bibliográficas	345
Segunda parte	351
Aplicación de PGasas en maceración de pitaya de pulpa roja y blanca para obtener jugo de pitaya.....	351
Introducción	353
Maceración enzimática	353
Pitaya.....	355
Esferas de fruta	356
Objetivos particulares de esta sección	357
Materiales y métodos	358
Extracto enzimático.....	358
Fruta	358
Maceración de la fruta.....	359
Determinaciones en jugo.....	360
Formación de perlas de pitaya	361
Formación de geles de pitaya roja.....	362
Análisis de textura.....	362
Análisis estadístico	363
Resultados y discusión.....	364
Maceración de pitaya para la obtención de jugo.....	364
Determinaciones en los jugos de pitaya.....	368
Formación de perlas y geles con los jugos de pitaya obtenidos	371
Conclusiones de esta sección	374
Referencias bibliográficas	375
Tercera parte	378
Maceración de tejidos vegetales	378
Introducción	380
Morrón (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	380

Agentes antioxidantes	380
Maceración de vegetales.....	381
Diseño estadístico de Doehlert.....	383
Objetivos particulares de esta sección	384
Materiales y métodos	385
Fuente de enzimas.....	385
Vegetal.....	386
Protocolo de maceración enzimática	386
Diseño experimental	388
Caracterización del tejido macerado	390
Análisis estadístico	392
Resultados y discusión.....	393
Variables estudiadas.....	393
Maceración	394
Caracterización de los macerados enzimáticos	406
Conclusiones de esta sección	409
Referencias bibliográficas	410
Conclusiones Generales.....	413
Anexo I.....	417
Anexo II	425
Anexo III	426
Anexo IV	428
Anexo V.....	430
Anexo VI	431

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

EL CONTINENTE ANTÁRTICO

Entre los ecosistemas ambientales en la biósfera terrestre ciertas áreas del planeta se caracterizan por sus condiciones ambientales extremas: los géiseres y fuentes termales, los ambientes hipersalinos, los desiertos, los fondos oceánicos, los glaciares, y los ambientes extremadamente fríos, entre otros (Rothschild & Mancinelli 2001). Los ambientes fríos se encuentran a lo largo y ancho del planeta, así como también en las profundidades de mares y océanos. La Antártida es considerada uno de los ambientes más agrestes del mundo, junto con el Ártico, los glaciares, los fondos oceánicos, y las altas cumbres montañosas. Se encuentra cubierta casi en su totalidad por hielo y nieve, y recibe grandes niveles de radiación solar (Convey 2010; Hamid, *et al.* 2014). Otras condiciones extremas que la caracterizan son la ausencia de agua en estado líquido, alta incidencia UV, vientos fuertes o severos y baja disponibilidad de nutrientes para los microorganismos que la habitan (Bokhorst, *et al.* 2007; Francelino, *et al.* 2011; Margesin & Miteva 2011).

La Antártida es el continente terrestre que ha sufrido el menor contacto con el hombre a lo largo de la historia, se caracteriza por ser un continente inhabitado (o inhabitable). Se arribó a este continente por primera vez a principios del Siglo XIX (Península Antártica del norte), mientras que recién se tuvo contacto con el este de la Antártida hace unos 100 años (Convey 2010). Su superficie se encuentra cubierta de hielo: sólo el 0.34 % de su área está libre de nieve o hielo, incluyendo *nunataks* (picos montañosos rodeados por campos de hielo), acantilados y ciertas áreas estacionales (Convey 2010). Aún estos lugares se consideran biológicamente estériles. Los ecosistemas terrestres desarrollados

están mejor representados en zonas costeras, particularmente a lo largo de la Península Antártica y los “oasis” de la costa este de la Antártida (Convey 2010) (Figura 1.1).



Figura 1. 1 Península Antártica (Convey & Stevens 2007).

Los biólogos generalmente reconocen tres zonas bio-geográficas dentro de este continente (Convey 2010) descritos como zona sub-Antártica, Antártida marítima y Antártida continental (Figura 1.2). Tanto los ecosistemas como los parámetros climáticos en estas tres zonas son notablemente diferentes.

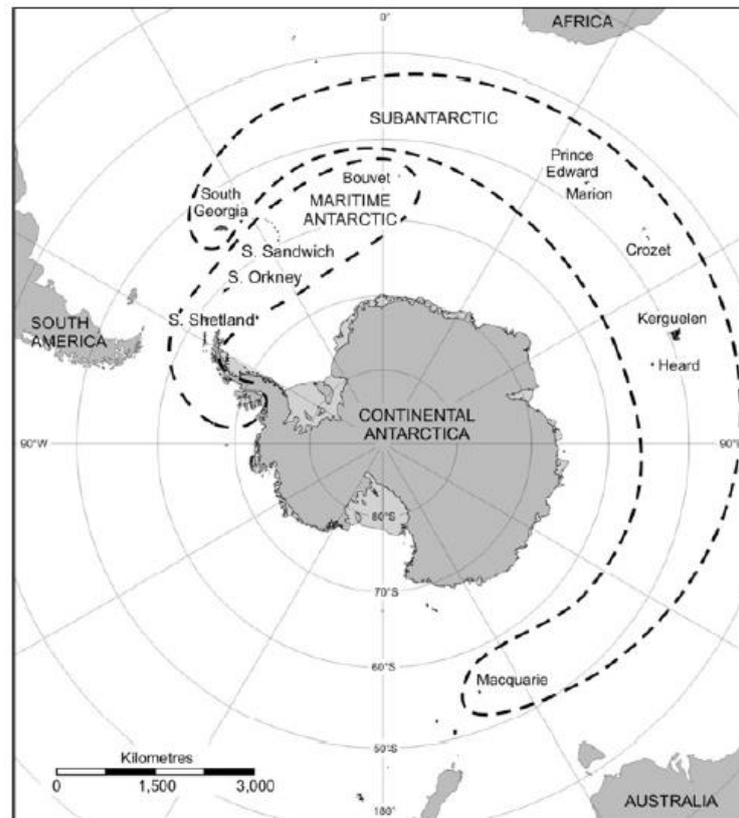


Figura 1. 2 Continente Antártico, donde se muestran las distintas zonas biogeográficas dentro del mismo: zona Sub-Antártica, Antártida marítima y Antártida Continental (Convey 2010).

La zona marítima (más específicamente la Península Fildes y Potter, Isla Rey Jorge o 25 de Mayo) experimenta un clima marítimo húmedo y frío, caracterizado por temperaturas medias anuales del aire de $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y temperaturas medias del aire en verano superiores a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un máximo de 4 meses (Convey 2010). Las precipitaciones varían entre 350 y 500 mm por año, ocurriendo en el período estival (Øvstedal & Lewis Smith 2001). Gonera & Rachlewicz (1997) encontraron una capa de nieve que no se fundió durante 260 días en 1991 y reportaron una profundidad de nieve variable, alcanzando un máximo de 2 m en la Bahía del Almirantazgo. Michel, *et al.* (2011) estudiaron las temperaturas del suelo de Península Fildes, y detectaron *permafrost* a 89 cm de profundidad, la cual es una capa que permanece congelada (a temperaturas debajo de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante dos años consecutivos. Estos suelos se clasifican como *criosoles* o

gelisoles. Considerando estas características ambientales, se puede dilucidar que tanto los microorganismos como los organismos del reino animal y vegetal que se desarrollan en estos hábitats deben haber experimentado diversos procesos de adaptación que les permitan sobrevivir en estas condiciones extremas.

MICROORGANISMOS ADAPTADOS AL FRÍO

Los microorganismos que habitan ambientes agrestes en general deben evolucionar para poder proliferar ya sea con respuestas inmediatas o adaptaciones a largo plazo (Alcaino, *et al.* 2015). Los microorganismos adaptados al frío son aquellos que se encuentran adaptados para sobrevivir en condiciones frías permanentes y extremas. Dependiendo del alcance de sus adaptaciones, se clasifican en dos grandes grupos, según la tolerancia o necesidad requerida para crecer en la condición extrema:

-Los microorganismos *psicrotolerantes* o *psicrófilos facultativos*, pueden crecer a temperaturas bajas, pero poseen temperaturas óptimas de crecimiento iguales o mayores a 20 °C (Hamid, *et al.* 2014; Morita 1975; Raspor & Zupan 2006).

-Los microorganismos *psicrófilos* (del griego ψυχρος *psyjros* que significa "frío", y φιλία, *filía* que significa "afecto", "amor", literalmente "amante del frío"), poseen una temperatura máxima de crecimiento menor a 20 °C, mientras que la temperatura óptima de crecimiento suele ser 15 °C (Raspor & Zupan 2006).

En la Tabla 1.1 se muestran las temperaturas mínimas, máximas y óptimas de crecimiento de microorganismos psicrotolerantes, psicrófilos y mesófilos, según su grado de adaptación a las condiciones frías. También se esquematizan los rangos de temperatura en la Figura 1.3.

Tabla 1.1 Temperaturas de crecimiento de microorganismos psicrotolerantes, psicrófilos y mesófilos (Scherer & Neuhaus 2006)

	Temperatura de crecimiento (°C)		
	Mínima	Óptima	Máxima
Típico psicrófilo (psicrófilo obligado)	<0	<15	<20
Típico psicrotolerante (psicrótrofo, psicrófilo facultativo)	<7	>20	>25
Típico mesófilo	>10	>25	>35

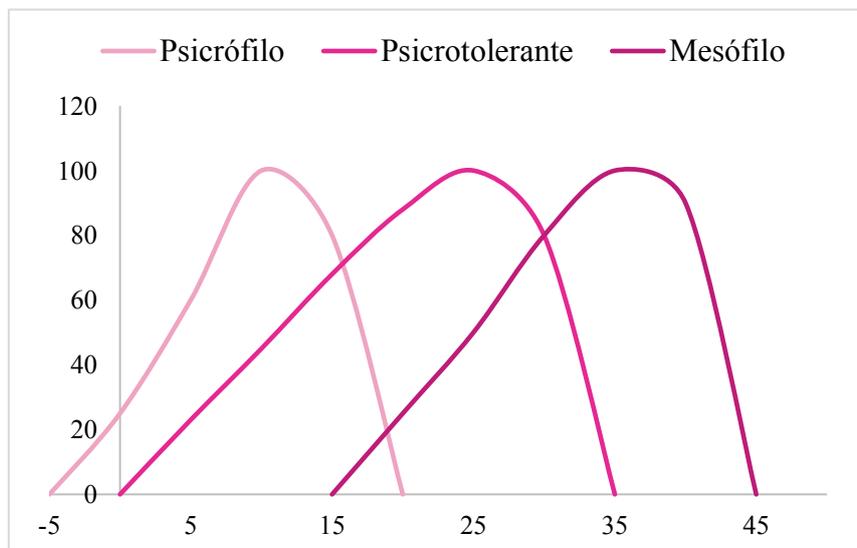


Figura 1. 3 Rango de crecimiento de microorganismos psicrófilos, psicrotolerantes y mesófilos.

Los microorganismos adaptados al frío se encuentran en cerca de tres cuartos de la superficie del planeta, en ambientes fríos como lo son las regiones polares, profundidades de los mares, en lo alto de las montañas, glaciares y deshielos, y suelos de ambientes alpinos (Buzzini, *et al.* 2017; Hamid, *et al.* 2014; Sannino, *et al.* 2017).

DIVERSIDAD DE LEVADURAS ADAPTADAS AL FRÍO EN AMBIENTES

ANTÁRTICOS

El estudio de la diversidad de levaduras en la Antártida ha sido abordado en los últimos años y la mayoría de los estudios revelan la prevalencia de especies de los géneros *Cystobasidium*, *Glaciozyma*, *Debaryomyces*, *Mrakia*, *Vishniacozyma* (antes, *Cryptococcus*), *Goffeauzyma* y *Rhodotorula* (Tabla 1.2 y Anexo I). La especie *Metschnikowia australis* ha sido descrita como endémica, siendo que sólo ha sido aislada a partir de muestras antárticas, mayormente en asociación con algas marinas (Duarte, *et al.* 2016).

Tabla 1.2 Diversidad de levaduras aisladas en distintos puntos de la Antártida en diferentes estudios. Se muestran sólo los géneros de levadura que superaron el 10% de los aislamientos en cada estudio. La tabla completa se puede consultar en el Anexo I

Microorganismo	Localización del muestreo	Porcentaje ^a	Referencia
<i>Candida glabrosa</i>	Isla Rey Jorge	11.5	Martinez, <i>et al.</i> (2016)
	Isla Rey Jorge	11.5	Martinez, <i>et al.</i> (2016)
<i>Cystobasidium laryngis</i>	Isla Rey Jorge	13.1	Rovati, <i>et al.</i> (2013)
<i>C. ongulense</i>	Isla Ongul Oriental	10.5	Tsuji & Kudoh (2020)
<i>Cystofilobasidium infirmominatum</i>		20.0	
	Isla Rey Jorge		Vaca, <i>et al.</i> (2013) ^b
	Península Antártica	10.0	Ferreira, <i>et al.</i> (2019)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Isla Rey Jorge	18.0	Martinez, <i>et al.</i> (2016)
<i>Glaciozyma martinii</i>	Isla Ongul Oriental	10.5	Tsuji & Kudoh (2020)
<i>Goffeauzyma gilvescens</i>	Isla Rey Jorge	66.7	Białkowska, <i>et al.</i> (2017)
	Isla Decepción (Antártida Marítima)	41.0	
<i>Metschnikowia australis</i>		20.0	Duarte, <i>et al.</i> (2016) ^b
	Isla Rey Jorge		Vaca, <i>et al.</i> (2013) ^b
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Antártida Marítima	13.4	Duarte, <i>et al.</i> (2013)
<i>Mrakia gélida</i>	Península Antártica	13.5	Ferreira, <i>et al.</i> (2019)
<i>Mrakia</i> sp.	Isla Decepción (Antártida Marítima)	20.5	
			Duarte, <i>et al.</i> (2016) ^b
	Isla Rey Jorge	10.5	Białkowska, <i>et al.</i> (2017)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Antártida Marítima	12.4	Duarte, <i>et al.</i> (2013)
<i>Vishniacozyma victoriae</i>	Isla Ongul Oriental	23.2	Tsuji & Kudoh (2020)
	Península Antártica	25.2	Ferreira, <i>et al.</i> (2019)
	Isla Rey Jorge	19.7	Rovati, <i>et al.</i> (2013)
	Isla Rey Jorge	15.7	Vaz, <i>et al.</i> (2011)

^a Número de levaduras de la especie correspondiente en relación al total de levaduras aisladas, expresado como porcentaje. ^b Levaduras asociadas con algas marinas (Duarte, *et al.* 2016) y esponjas marinas (Vaca, *et al.* 2013)

La especie *Phenoliferia glacialis* (antes, *Rhodotorula glacialis*) también representa una parte importante entre los aislamientos a partir de la Antártida, habiendo conformado el 9% de los aislamientos en dos grandes estudios (Duarte, *et al.* 2016; Ferreira, *et al.* 2019) (Anexo I). Otros géneros de levadura aislados de la Antártida, pero menos

representativos son *Bannozyma*, *Dioszegia*, *Filobasidium*, *Holtermanniella*, *Leucosporidium*, *Naganishia* y *Tausonia*, entre otros (Anexo I).

ADAPTACIONES MOLECULARES

Los microorganismos que habitan la Antártida han evolucionado para prosperar en las condiciones expuestas, y poseen un rol muy importante en los ciclos del carbono y del nitrógeno en su hábitat (Vero, *et al.* 2019). A continuación, se hace un breve punteo de las adaptaciones moleculares más comunes de estos microorganismos reportadas en bibliografía.

RNA polimerasas

Si bien no ha sido reportado aún en levaduras, se ha estudiado la RNA polimerasa producida por la bacteria adaptada al frío *Planococcus halocryophilus*, y se observó una reducción de las α -hélices en comparación con otras RNA polimerasas, lo cual parece ser una estrategia para la adaptación al frío (de Wijn, *et al.* 2021).

Regulación de la fluidez de las membranas celulares

Al disminuir la temperatura, la fluidez de las membranas celulares también se reduce. Con la reducción de la temperatura, éstas se ordenan y se hacen más gruesas (Shen, *et al.* 2021). Las enzimas desaturasas de ácidos grasos juegan un rol muy importante en microorganismos adaptados al frío. La proporción de ácidos grasos insaturados en la membrana de la mayoría de las levaduras adaptadas al frío oscila entre el 50 y 90% de los ácidos totales de la membrana (Alcaino, *et al.* 2015). Los ácidos grasos insaturados y de cadenas ramificadas otorgan a toda la membrana una mayor fluidez, por este motivo se encuentran en mayor proporción en estos microorganismos (Alcaino, *et al.* 2015;

Krállová 2017) (Figura 1.4). La regulación de la composición química de las membranas en bacterias psicrófilas se encuentra regulada por varios genes que se activan con los cambios de temperatura (Hassan, *et al.* 2020).

En levaduras, se estudiaron los cambios en los ácidos grasos poliinsaturados (linoleico y α -linolénico) al modificar la temperatura de crecimiento en la levadura adaptada al frío *Rhodotorula glutinis* YM25079 (He, *et al.* 2015). Se observó un aumento significativo de este tipo de ácidos grasos al reducir la temperatura de 25 °C a 15 °C, mientras que también se observó un aumento de la presencia de mRNA correspondientes a la enzima desaturasa de ácidos grasos. Este, junto con otros estudios, demuestran que este tipo de adaptación está presente en levaduras adaptadas al frío (Řezanka, *et al.* 2016; Rossi, *et al.* 2009).

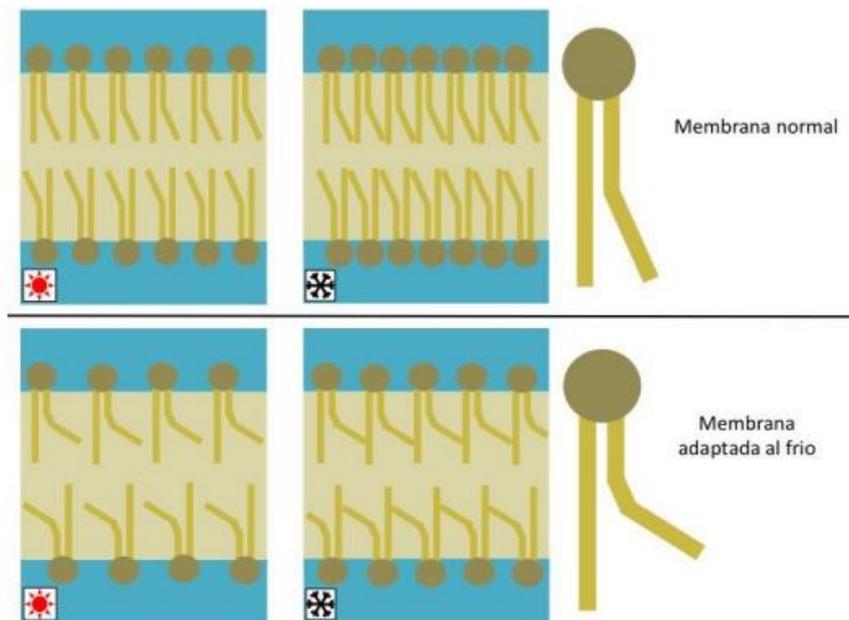


Figura 1. 4 Esquemización de los fosfolípidos de una membrana celular de un microorganismo psicrófilo, en comparación con uno mesófilo. Las insaturaciones disminuyen la rigidez (aumentando la fluidez) de las membranas, permitiéndoles seguir cumpliendo sus funciones a bajas temperaturas (http://www.cienciorama.unam.mx/a/pdf/318_cienciorama.pdf).

Moléculas crioprotectoras

Existe una serie de proteínas, sobre-expresadas en microorganismos adaptados al frío, que tienen la función de mantener la actividad fisiológica propia de los mismos. Las *cold shock proteins* (CSPs) son proteínas de bajo peso molecular que se expresan en condiciones de frío extremo y permiten a la célula sobrevivir. Actúan como chaperonas de RNA o ayudando en el plegamiento correcto de las proteínas (Shen, *et al.* 2021). Este tipo de proteínas se expresa por todo tipo de microorganismo; sin embargo, se observó que, a diferencia de microorganismos mesófilos, en los psicrófilos las CSPs se encuentran sobre-expresadas y no reprimen la síntesis de proteínas de mantenimiento celular. Además, los psicrófilos las producen en forma basal durante el crecimiento a temperaturas bajas, aumentando la expresión a medida que disminuye la temperatura (Phadtare 2004).

La producción de proteínas anticongelantes (AFPs, de *anti-freeze proteins*) también se ha observado en microorganismos adaptados al frío (Figura 1.5). Éstas reducen la temperatura de congelamiento e inhiben la formación de cristales que destruirían las células (Alcaino, *et al.* 2015; Margesin & Miteva 2011). Este tipo de moléculas es producido tanto por microorganismos como por plantas y animales (Barrett 2001; Firdaus-Raih, *et al.* 2018).

La acumulación de solutos que reducen el punto de congelamiento del citoplasma y estabilizan tanto las macromoléculas como las membranas celulares también es un mecanismo que se ha observado en microorganismos adaptados al frío. Algunas de las moléculas más representativas son polioles, como glicerol y manitol, y azúcares, como la trehalosa (D'Amico, *et al.* 2002; Rossi, *et al.* 2009; Shen, *et al.* 2021).

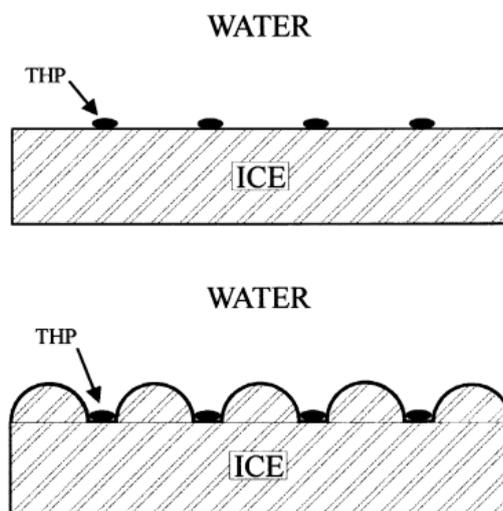


Figura 1. 5 Las proteínas anticongelantes (THP por *thermal hysteresis protein*) se unen a la superficie del hielo restringiendo en crecimiento en ese punto, eso genera un crecimiento del hielo en forma curvada alrededor del punto de unión (Barrett 2001).

Ajuste del metabolismo según la temperatura de crecimiento

Análisis ómicos y funcionales han demostrado que diversas proteínas son finamente reguladas ante el estrés por congelamiento en bacterias adaptadas al frío (Shen, *et al.* 2021). Recientemente, Touchette, *et al.* (2022) demostraron el *switch* metabólico desde un metabolismo oxidativo hacia uno fermentativo alcohólico al reducir la temperatura de crecimiento de la levadura antártica *Rhodotorula frigidialcoholis*, proveniente de permafrost.

Defensa antioxidante hacia las especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, por *reactive oxygen species*) causan daño celular mediante oxidación de DNA, proteínas y lípidos. En ambientes fríos (en los que la solubilidad de los gases es mayor) y con disponibilidad de oxígeno, el aumento de la defensa ante estas especies es una adaptación clave. En microorganismos adaptados al frío, el contenido de enzimas relacionadas con el consumo de oxígeno es más alto, como

desaturadas, superóxido dismutasas, peroxidadas, catalasas y glutatión S-transferasas (Shen, *et al.* 2021). Estas enzimas cumplen la función de convertir los radicales O_2^{-*} (superóxidos) en otros compuestos menos nocivos, protegiendo las células. En eucariotas, las enzimas más importantes que cumplen esta función son las superóxido dismutasas dependiente de Mn (MnSOD) y las dependientes de Zn o Cu (Cu/Zn-SOD) (Shen, *et al.* 2021).

Enzimas adaptadas al frío

Las enzimas son catalizadores biológicos proteicos que se encargan de catalizar un sinnúmero de reacciones químicas relacionadas con la degradación de moléculas orgánicas y el metabolismo. La temperatura es uno de los principales factores ambientales que influye en las reacciones bioquímicas. Por ello, los microorganismos que habitan ambientes fríos requieren enzimas que sean capaces de catalizar las reacciones indispensables para la vida a temperaturas bajas, en contraposición con las mismas enzimas presentes en levaduras mesófilas (Santiago, *et al.* 2016). En particular, las enzimas hidrolíticas que secretan son un factor importante que ayuda a su supervivencia en estos ambientes tan estresantes, ya que les permite sobrevivir como oligotróficos.

El mayor logro evolutivo en estas enzimas es el de mantener las velocidades catalíticas al descender la temperatura, ya que, al ocurrir esto último, la energía cinética disponible se vuelve insuficiente para superar las barreras energéticas asociadas a las reacciones enzimáticas. La dependencia de las reacciones químicas con la temperatura se puede describir por la ecuación de Arrhenius:

$$K_{cat} = A e^{\frac{-Ea}{RT}}$$

Donde k_{cat} es la velocidad catalítica, A es un factor de frecuencia de colisión, E_a es la llamada energía de activación de la reacción, R es la constante de los gases (8.31kJ mol^{-1}) y T es la temperatura, expresada en grados Kelvins (Tattersall, *et al.* 2012).

El transcurso de una reacción enzimática también es descrito mediante la teoría del estado de transición, en la que se asume la existencia de un complejo sustrato-enzima activado (ES^\ddagger) en equilibrio con el complejo en estado basal ES (Figura 1.6) (Lonhienne, *et al.* 2000).

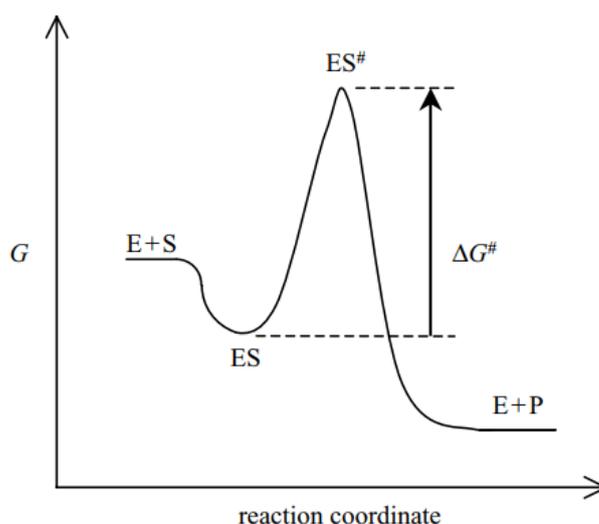


Figura 1. 6 Coordenadas de reacción para una reacción enzimática. *E*: enzima; *S*: sustrato; *P*: producto; ES^\ddagger , complejo en estado de transición; ΔG^\ddagger : energía libre de activación (D'Amico, *et al.* 2002).

Como puede verse, cualquier disminución de la temperatura inducirá una disminución exponencial de la velocidad de reacción. Una de las maneras de expresar la termodependencia de una reacción se expresa mediante el valor del coeficiente de temperatura Q_{10} , normalmente se encuentra cercano a 2-3. Este valor es una medida de la tasa de variación de la reacción como consecuencia del incremento de $10\text{ }^\circ\text{C}$ de la temperatura. Éste es el principal factor que impide el crecimiento a bajas temperaturas por parte de microorganismos no adaptados (D'Amico, *et al.* 2002).

Una posible forma de sobrellevar la disminución de la velocidad de reacción en los microorganismos adaptados al frío sería producir más enzima, sin embargo, este proceso es costoso energéticamente. Otra opción es la de poseer una afinidad al sustrato, reflejado en un menor K_m (constante de Michaelis-Menten). Sin embargo, se ha observado que el factor crucial adaptativamente hablando es el descenso de la entalpía de activación de la reacción en comparación con enzimas mesófilas (D'Amico, *et al.* 2002). Al reducir la energía de activación, la dependencia de la misma con la temperatura es menor. Varios estudios demuestran que este tipo de estrategia se da en enzimas activas en frío (Santiago, *et al.* 2016).

Las adaptaciones estructurales de las enzimas adaptadas al frío resultan en moléculas más flexibles, dada la rigidez natural provocada en las moléculas por la disminución de la temperatura (Martorell, *et al.* 2019b). Sarmiento, *et al.* (2015) han hecho una lista de las características más importantes de este tipo de macromoléculas para mantener una alta flexibilidad y también actividad a bajas temperaturas:

- Menor hidrofobicidad en el *core*,
- Mayor hidrofobicidad superficial,
- Cambios en la composición de aminoácidos: menor relación arginina/lisina, más residuos de glicina, para una mayor movilidad conformacional, menos residuos de prolina en *loops* y más en las α -hélices, más residuos hidrofóbicos sobre la superficie,
- Menos interacción entre dominios proteicos y menos puentes disulfuro, menos puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas.

Según Feller (2018), una de las consecuencias de todos estos cambios es que las velocidades de reacción de este tipo de enzima tienden a reducirse más lentamente frente a un descenso de la temperatura, en comparación con enzimas de mesófilos.

ENZIMAS PROVENIENTES DE LEVADURAS ADAPTADAS AL FRÍO

Como se vio, las enzimas activas en frío se han adaptado para compensar la reducción en las velocidades de reacción inducidas por las bajas temperaturas (D'Amico, *et al.* 2002). Las enzimas activas en frío ofrecen oportunidades nuevas de interés biotecnológico en diversos procesos, basados en su alta actividad catalítica a bajas temperaturas, baja estabilidad térmica y especificidades de sustrato diferentes (Russell 2000). Es por ello que, ya hace algunas décadas, la búsqueda de nuevas enzimas y otros metabolitos se ha volcado a los extremófilos, y entre ellos los microorganismos psicrófilos. Los hongos filamentosos y las bacterias han sido los mayormente estudiados (Lo Giudice & Fani 2015; Martorell, *et al.* 2019c; Vishniac 1996), mientras que las levaduras han sido pospuestas, empezando a ser más visibles en las publicaciones de los últimos años (Martinez, *et al.* 2016; Martorell, *et al.* 2017; Shivaji & Prasad 2009; Vishniac 2006).

Siendo la Antártida el continente frío por excelencia, muchos de los estudios en busca de enzimas activas en frío han sido desde microorganismos provenientes de este lugar (Martorell, *et al.* 2019b; Vero, *et al.* 2019). El primer reporte sobre levaduras antárticas fue publicado hace 60 años (Di Menna 1960). Luego, la mayoría de los estudios se enfocaron en bacterias y *archaea* (Martorell, *et al.* 2019c). Hace algunos años se han empezado a estudiar las levaduras de ambientes fríos, su diversidad y aplicaciones biotecnológicas. Los estudios abarcan ambientes fríos polares, como el ártico (Butinar, *et al.* 2007; Margesin, *et al.* 2002; Pathan, *et al.* 2010; Singh, *et al.* 2013; Tsuji, *et al.* 2018; Zalar & Gunde-Cimerman 2014) y la Antártida (Barahona, *et al.* 2016; Białkowska, *et al.* 2017; Carrasco, *et al.* 2012; Loperena, *et al.* 2012; Margesin, *et al.* 2005; Martinez, *et al.* 2016; Martorell, *et al.* 2017; Tsuji 2018; Tsuji & Kudoh 2020; Tsuji, *et al.* 2015; Vaz, *et al.* 2011), como fríos no polares (Brandão, *et al.* 2011; Brizzio,

et al. 2007; Cavello, *et al.* 2019; Daskaya-Dikmen, *et al.* 2018; De García, *et al.* 2007; Nakagawa, *et al.* 2004; Turchetti, *et al.* 2008; Turchetti, *et al.* 2020).

La actividad de las enzimas psicrófilas a temperaturas moderadas y bajas ofrece potenciales beneficios económicos (Cavicchioli, *et al.* 2002). Actualmente existe una tendencia de tratar los productos alimenticios en condiciones suaves para evitar su deterioro y cambios en el sabor y el valor nutricional a temperatura ambiente. Por lo tanto, la utilización de enzimas activas en frío es de sumo interés para el procesamiento alimenticio (Adapa, *et al.* 2014; Gerday, *et al.* 2000). Los procesos catalizados por enzimas activas en frío tienen dos ventajas, tienen potencial para economizar los procesos al ahorrar energía y protegen (potencialmente) frente a una posible contaminación (Cavicchioli, *et al.* 2002; Elleuche, *et al.* 2014).

En la Tabla 1.3 se muestran algunas de las enzimas estudiadas a partir de levaduras adaptadas al frío, junto con información sobre su sitio de aislamiento y la temperatura óptima de cada enzima. Puede observarse que la mayoría fueron estudiadas a partir de microorganismos de origen antártico, y las temperaturas óptimas para la catálisis son variables, habiendo algunas que presentaron temperaturas notablemente bajas (amilasa de *Cistofilobasidium capitatum*, quitinasa de *Glaciozyma antártica*, endoglucanasa de *Mrakia robertii*) y otras especialmente altas (glucosa oxidasa de *Goffeauzyma gástrica*, proteasa de *Rhodotorula mucilaginosa*, etc).

Tabla 1.3 Algunas de las enzimas estudiadas que fueron obtenidas a partir de levaduras adaptadas al frío, junto con el sitio de aislamiento de la levadura y temperatura óptima obtenida para la enzima

<i>Microorganismo</i>	<i>Lugar de aislamiento</i>	<i>Tipo de enzima</i>	<i>Temperatura óptima (°C)</i>	<i>Referencia</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Mar	Proteasa	45	Chi, <i>et al.</i> 2007
<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	Hokaido, Japón	Pectin liasa	40	Nakagawa, <i>et al.</i> 2005a
<i>C. capitatum</i>	Hokaido, Japón	Poligalacturonasa	45	Nakagawa, <i>et al.</i> 2005b
<i>C. capitatum</i>	India (suelo)	α -amilasa	4	Hamid 2015
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>		α -amilasa	25	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Antártida	Lisozima	NR	Wang, <i>et al.</i> 2012
<i>Dioszegia fristingensis</i>	Antártida	α -glucosidasa	37-40	Carrasco, <i>et al.</i> 2017
<i>Glaciozyma antártica</i>	Antártida	Quitinasa	15	Ramli, <i>et al.</i> 2011
<i>G. antártica</i>	Hielo marino Antártico	Endo- β -1,3(4)- glucanasa	20	Mohammadi, <i>et al.</i> 2021
<i>G. antarctica</i> ^a	Mar Antártico	Invertasa	30	Turkiewicz, <i>et al.</i> 2005

		α -glucosidasa	35	
<i>Goffeauzyma gástrica</i>	Antártida	Glucosa oxidasa	64	Yuivar, <i>et al.</i> 2017
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>		Invertasa	60	
<i>Dioszegia sp.</i>		Fosfatasa alcalina	47	
<i>Leucosporidium sp.</i>	Antártida	Lipasa	NR	Rashid, <i>et al.</i> 2010
<i>Mrakia frigida</i> (2 cepas)	Alpes europeos-Siberia	Pectato liasas	30	Margesin, <i>et al.</i> 2005
<i>M. robertii</i>	Himalaya	Endoglucanasa	15	Dhume, <i>et al.</i> 2019
<i>Mrakia sp.</i>	Antártida	Gelatinasa	36	Yuivar, <i>et al.</i> 2019
<i>Naganishia adeliae</i> ^b	Antártida	Xilanasa	NR	Petrescu, <i>et al.</i> 2000
<i>N. adeliae</i> ^b	Antártida	Xilanasa	45-50	Gomes, <i>et al.</i> 2000
<i>N. liquefaciens</i> ^c	Mar	Poligalacturonasas (2)	50	Abe, <i>et al.</i> 2006
<i>Papiliotrema laurentii</i> ^d	Antártida	Fitasa	40	Pavlova, <i>et al.</i> 2008
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Suelo Turco (invierno)	Lipasa	NR	Taskin, <i>et al.</i> 2016
<i>R. mucilaginosa</i>	Alga marina antártica	Proteasa	45-55	Lario, <i>et al.</i> 2015
<i>R. mucilaginosa</i>	Hielo marino	Glutación S-transferasa	35 °C	Shi, <i>et al.</i> 2020

<i>Tausonia pullulans</i> ^e	Antártida	β-galactosidasa	50	Song, <i>et al.</i> 2010
<i>T. pullulans</i> ^e	Antártida	Lipasa	40	Lascano Demera, <i>et al.</i> 2019
<i>T. pullulans</i> ^e (2 cepas)	Hokaido, Japón	β-galactosidasa	50	Nakagawa, <i>et al.</i> 2006
<i>Vanrija humicola</i> ^f	Antártida	Proteasa	37	Ray, <i>et al.</i> 1992
<i>Vishniacozyma victoriae</i> ^g	Suelo Turco (invierno)	Proteasa	15	Unver, <i>et al.</i> 2015
<i>Wickerhamomyces psychrolipolyticus f.a.</i> (2 cepas)	Hokaido, Japón	Lipasas	NR	Shimizu, <i>et al.</i> 2020
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Mar	Esterasa	35	Kim, <i>et al.</i> 2007

^a antes, *Leucosporidium antarcticus*; ^b antes, *Cryptococcus adeliae*; ^c antes, *Cryptococcus liquefacien*; ^d antes, *Cryptococcus laurentii*; ^e antes, *Guehomyces pullulans*; ^f antes, *Candida humicola*; ^g antes, *Cryptococcus victoriae*

NR: no reportado

Potenciales aplicaciones de enzimas hidrolíticas adaptadas al frío

La capacidad de inactivar por calor las enzimas activas en frío tiene especial relevancia para la industria alimentaria, donde es importante evitar cualquier modificación de los sustratos y productos originales sensibles al calor (Santiago, *et al.* 2016). Esto también es beneficioso en procesos secuenciales (por ejemplo, biología molecular) donde las acciones de una enzima deben terminar antes de emprender el siguiente proceso; con enzimas adaptadas al frío, esto podría lograrse mediante inactivación por calor en lugar de extracción química (Gerday, *et al.* 2000).

Varias industrias, especialmente las industrias de detergentes y alimenticias, están en constante búsqueda de nuevas enzimas que trabajen en condiciones extremas, como las enzimas activas en frío. Algunas enzimas que revisten interés en la industria y en las que nos enfocaremos en la primera parte del trabajo son: amilasas, xilanasas, celulasas, pectinasas, proteasas, lipasas (esterasas), inulinasas y β -glucosidasas (Figura 1.7).

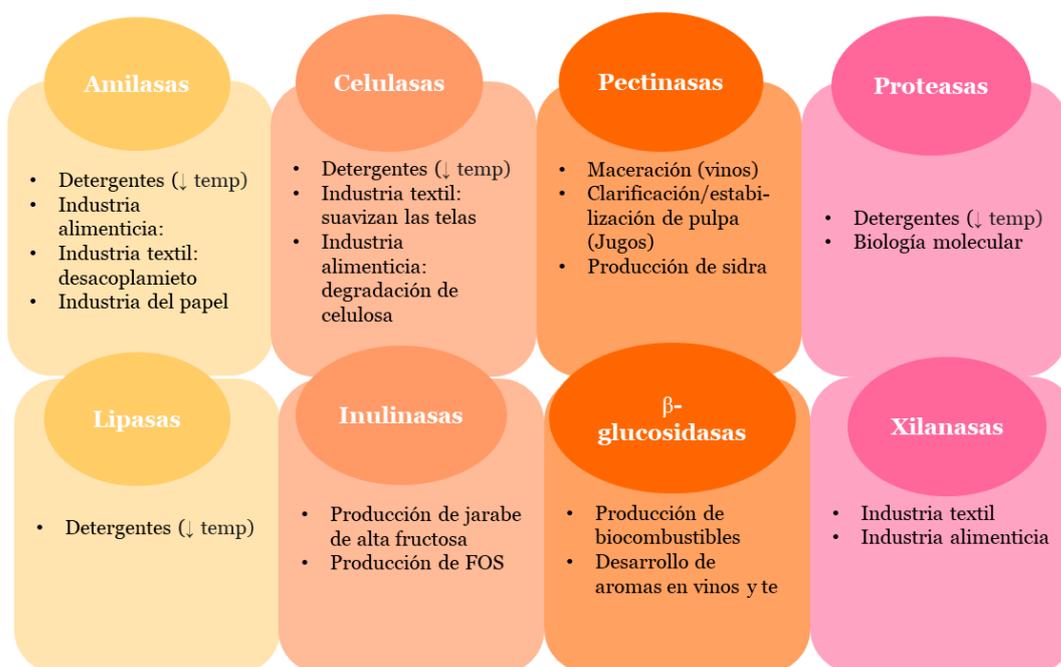


Figura 1. 7 Potenciales aplicaciones de las enzimas hidrolíticas que van a ser estudiadas.

Amilasas

Las amilasas son un tipo de enzimas que hidrolizan el almidón. Tienen aplicación principalmente en la industria de los detergentes, siendo el segundo tipo de enzima utilizado en sus formulaciones (Souza & Magalhães 2010). Las amilasas activas en frío son muy requeridas para los detergentes para lavados a bajas temperaturas (Białkowska & Turkiewicz 2014).

También se utilizan en la industria alimenticia, en la producción de panificados, de cerveza, tortas, jugos de fruta y como ayuda digestiva (Souza & Magalhães 2010). Pueden ser utilizadas para la producción de jarabes de maltotetraosa, edulcorantes sustitutos de la sacarosa (Białkowska & Turkiewicz 2014)

En la industria textil, se utilizan en el proceso de desacoplamiento, cuando se utiliza almidón como apresto. En la industria del papel, las amilasas se utilizan para modificar el almidón presente en el papel (Souza & Magalhães 2010).

Celulasas

Las celulasas son las enzimas responsables de la degradación de la celulosa en azúcares en la naturaleza. Son de interés para su utilización en la industria de los detergentes, al igual que las amilasas. En la industria textil, las celulasas eliminan las vellosidades en los hilos de celulosa, suavizando la tela e impartiendo brillo al color de la misma. En la industria alimenticia, suele usarse para macerar, formando parte de cócteles enzimáticos en conjunto con otras enzimas. También son utilizados en la producción de bioetanol de segunda generación (Juturu & Wu 2014).

Pectinasas

Las pectinasas son enzimas que atacan diferentes dominios de la compleja estructura de la pectina, polímero de origen vegetal. Estas enzimas son ampliamente utilizadas hace años en la industria alimenticia (Kashyap, *et al.* 2001). La degradación de la pectina se da en el proceso de maceración de la uva durante la manufactura del vino, y durante la producción de jugos de fruta, para clarificar o estabilizar la pulpa, según el tipo de jugo (y de pectinasa). Las pectinasas activas en frío se pueden aplicar a la industria alimentaria para la clarificación de zumos de frutas a baja temperatura (Adapa, *et al.* 2014).

Proteasas

Las proteasas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas. Se agregan en detergentes ya que permiten atacar manchas de sangre, huevo, pasto, y sudor. En el campo de los detergentes, las enzimas que actúan a temperaturas más bajas son muy útiles en las formulaciones, ya que permiten realizar los lavados a menores temperaturas, aumentan la efectividad el lavado y ahorrando energía. Ejemplos comerciales de estas enzimas son Polarzyme® (Novozyme), una serín proteasa para lavado a mano capaz de mantener su actividad en un amplio rango de temperaturas (5-60 ° C). Purafect® Prime y Properase® son dos proteasas adaptadas al frío para detergentes lavarropas con actividad óptima entre 20 y 40 ° C. Por otro lado, Excellase® es un producto para lavavajillas. Todas estas enzimas son producidas por Genencor (Martorell, *et al.* 2019b).

Lipasas

Las lipasas hidrolizan lípidos, y son de especial utilidad como aditivos en detergentes, para remover manchas de grasa (manteca, aceite, etc) presentes en las prendas. Las esterasas hidrolizan cadenas de acil-ésteres cortas (menos de 10 carbonos) (Martorell, *et al.* 2019b).

Inulinasas

La inulina es un polímero presente en las raíces de ciertas plantas como la alcachofa, la achicoria, la dalia y el yacón (Chi, *et al.* 2009). Su degradación mediante inulinasas permite obtener fructosa o FOS (fructooligosacáridos). Éstos últimos tienen características nutricionales interesantes y muy demandadas en la actualidad (Chesini 2020).

β -glucosidasas

Las β -glucosidasas son las celulasas que catalizan en último enlace en la hidrólisis de la celulosa, liberando monómeros de glucosa. Por lo tanto, estas enzimas son esenciales durante la producción de biocombustibles. Las β -glucosidasas catalizan la hidrólisis de precursores aromáticos que se encuentran en la fruta, ayudando en el desarrollo de aromas en jugos, mostos y vinos (Ahmed, *et al.* 2017; Ketudat Cairns & Esen 2010). Han sido muy estudiadas para el desarrollo de nuevos perfiles aromáticos en vinos y en té (de Ovalle, *et al.* 2021; de Ovalle, *et al.* 2018; Su, *et al.* 2010; Zhang, *et al.* 2020).

Xilanasas

Las xilanasas son enzimas hidrolíticas que clivan los enlaces β -1,4 del esqueleto del polisacárido xilano, presente en las paredes de células vegetales. Estas enzimas poseen un gran potencial biotecnológico en el desarrollo de tecnologías respetuosas con el medio ambiente en la industria del papel y la pulpa y en las industrias de piensos y alimentos, y para la generación de combustibles líquidos y químicos a partir de lignocelulosa, entre otros. En particular, las xilanasas activas en frío tienen aplicaciones potenciales en la industria textil y alimentaria (Juturu & Wu 2012).

Patentes

Patentar la aplicación de una enzima es una de las formas de que alcance el ambiente industrial o de manufacturación. Las enzimas activas en frío son mencionadas y descritas en innumerables artículos como las potenciales nuevas herramientas en pos de lograr la mejora y optimización de diversos procesos. Sin embargo, el tan nombrado potencial de estas enzimas no se ve reflejado como se esperaría (a la actualidad) en productos patentados (Duarte, *et al.* 2018). Dentro de las patentes existentes la mayoría están asociadas a productos de origen bacteriano, como la lipasa de *Bacillus pumilus* (10–1596435-0000) o la proteasa de una bacteria marina (WO2013177834). La lipasa producida por *Moesziomyces antarcticus* es comercializada por AstraZeneca, Du Pot, Nov Nordisk, DSM NV, y otros (Duarte, *et al.* 2018).

Según el **Tratado Antártico**, vigente desde el año 1959, todas las actividades que se den en el contexto de la Antártida o su diversidad, deben ser con propósitos pacíficos y los beneficios de la investigación en este continente deben ser en pos del progreso de la humanidad. El conocimiento y los beneficios obtenidos de la bioprospección en la

Antártida deben compartirse y ponerse a disposición de todos los países del mundo (Martorell, *et al.* 2019b).

MICROORGANISMOS ANTÁRTICOS COMO HERRAMIENTAS PARA PROCESOS DE BIODECONTAMINACIÓN

Además de representar una fuente promisoría de nuevas enzimas de interés biotecnológico-industrial, algunos autores sugieren que, dado que ya se encuentran adaptados a ciertas condiciones extremas, los microorganismos adaptados a ambientes extremos podrían ser útiles en diferentes procesos de bio-decontaminación (Rovati, *et al.* 2013). La biorremediación se define como el uso de organismos vivos o sus componentes (por ejemplo, enzimas) para reducir, eliminar o transformar compuestos tóxicos presentes en el medio ambiente (Martorell, *et al.* 2019a). Se basa en la idea de optimizar las condiciones del medio para acelerar los procesos de biodegradación que se dan naturalmente, pero en tiempos más largos. Actualmente, con el advenimiento de tendencias ecológicas, la biorremediación o bio-decontaminación se encuentra en auge, considerada como una de las formas más efectivas, ecológicas y menos nocivas de remediación (Martorell, *et al.* 2019a).

Biorremediación de colorantes textiles

La industria textil se encuentra entre las más contaminantes. Además del gasto de grandes cantidades de agua líquida en cada paso de teñido, las cantidades de colorante utilizadas son grandes debido a la dificultad de fijar el color en las telas. De hecho, se estima que aproximadamente entre un 2 y un 20 % de los colorantes sintéticos reactivos agregados durante los procesos de tinción terminan en los descartes de agua del proceso.

Esto, como es de esperar, resulta en efluentes altamente coloreados (Shalla, *et al.* 2018; Wang, *et al.* 2011) (Figura 1.8). Entre los colorantes producidos a lo largo del mundo, un 65% corresponde a los colorantes *azo*, lo cual implica al menos un enlace *azo* en su estructura química ($R_1-N=N-R_2$) (Shalla, *et al.* 2018) (Figura 1.9). Estos se caracterizan por su naturaleza muy recalcitrante, lo cual implica que son muy difíciles de degradar mediante los métodos tradicionales. Por este motivo, a lo largo de las últimas décadas se ha incrementado el interés en encontrar una forma de hidrolizarlos, generando a su vez una disminución en el impacto ambiental y la toxicidad de los efluentes líquidos (Forgacs, *et al.* 2004).

Existen varios reportes de los efectos tóxicos y mutagénicos de estos efluentes y los compuestos que los conforman, los cuales suelen atribuirse a los anillos de benceno presentes en su estructura química, convirtiéndolo en un problema de salud pública (Akhtar, *et al.* 2018; de Oliveira, *et al.* 2016; Tigini, *et al.* 2011). Los efectos más leves detectados por la presencia de estos contaminantes en los cursos de agua tienen que ver con la dificultad de la penetración de la luz, por lo que se ve alterado el metabolismo de los organismos fotosintéticos, generando consecuentemente altos valores de DBO (demanda biológica de oxígeno). Estos valores altos generan una disminución drástica del oxígeno disuelto, produciendo efectos adversos sobre los organismos que habitan estos ecosistemas acuáticos (Das & Charumathi 2012).



Figura 1. 8 Descarga de efluentes textiles a un curso natural de agua
(<https://www.aulavirtualusmp.pe/ojs/index.php/rc/article/viewFile/1369/1109>).

La utilización de microorganismos que producen enzimas que hidrolizan los colorantes para decolorar los efluentes textiles es un área de aplicación que ha sido estudiada en los últimos años (Khan, *et al.* 2013; Yesilada, *et al.* 2018). Aquellas levaduras que poseen la capacidad de crecer a temperaturas ambiente y menores son de especial interés ya que sus enzimas actúan a estas temperaturas, por lo que se espera que el tratamiento de las mismas se desde una óptica más eco-amigable, y de manera más económica (Rovati, *et al.* 2013).



Figura 1. 9 Algunos colorantes azo. Éstos son ampliamente utilizados en la industria textil por sus brillantes y llamativos colores, y por ser más económicos en comparación con otros colorantes. Sin embargo, muchos de ellos son altamente tóxicos (<https://www.leatherusa.org/azo-dyes>).

Los microorganismos decoloran el medio en el que se encuentran mediante diferentes métodos. La biosorción suele estar atribuida a la composición de la pared o membrana celular del microorganismo, que suele ser afin para lograr una interacción fuerte con el colorante. Trae aparejado una acumulación (bio-acumulación) del colorante en sus membranas, por lo que imparte color a la biomasa. Por otro lado, la degradación enzimática (bio-degradación) involucra el clivaje de ciertos enlaces químicos presentes en la molécula de colorante, y se da gracias a la acción de diferentes enzimas: reductasas, peroxidasas, lacasas, entre otras (Kaushik & Malik 2009; Solís, *et al.* 2012) (Figura 1.10).

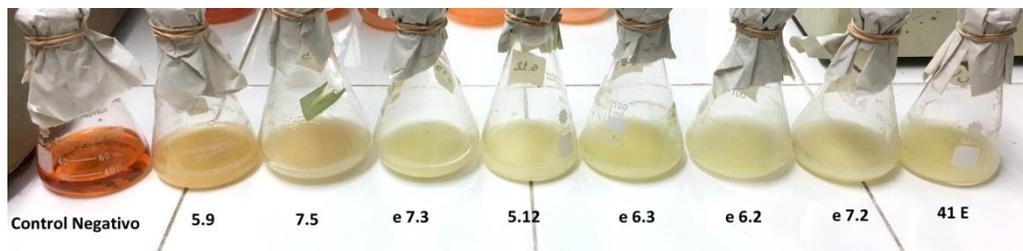


Figura 1. 10 Imagen donde se observa el proceso de bio-degradación (con desaparición de la tonalidad naranja) del colorante azo Naranja Reactivo 16, luego de ser incubado en presencia de ciertas levaduras (Ruscasso 2018).

OBJETIVOS

El presente plan de trabajo pretende contribuir desde el punto de vista académico de la siguiente manera:

- Aportar conocimiento acerca de la diversidad de levaduras presente en la Isla Rey Jorge (King George, o 25 de Mayo).
- Estudiar la producción y caracterizar las extremoenzimas producidas por dichos microorganismos.
- Estudiar las posibles aplicaciones industriales en las cuales las mismas pueden ser utilizadas.

De este modo, se plantea como **objetivo general** del presente plan de tesis, la búsqueda de microorganismos extremófilos (psicrófilos y psicrotolerantes) capaces de producir enzimas de interés biotecnológico y la evaluación de su potencial biotecnológico.

Objetivos específicos

- Caracterizar fenotípica y genotípicamente una colección de levaduras aisladas de la Isla Rey Jorge (25 de Mayo), Antártida marítima.
- Seleccionar las levaduras capaces de producir enzimas de interés biotecnológico.
- Estudiar la producción de las enzimas.
- Purificar y caracterizar la/s enzimas producidas por el/los microorganismos seleccionados (características bioquímicas y cinéticas).
- Estudiar las potenciales aplicaciones biotecnológicas de las enzimas producidas.

HIPÓTESIS

Las levaduras antárticas estudiadas en el presente trabajo serían una interesante fuente de nuevas enzimas de interés biotecnológico. Estas enzimas poseerían ciertas características propias de las enzimas provenientes de microorganismos adaptados al frío, permitiendo desarrollar ciertos procesos a temperaturas medias y bajas. Estas enzimas serían de utilidad en ciertos procesos industriales en los cuales son deseables enzimas activas a bajas temperaturas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, F., MINEGISHI, H., MIURA, T., NAGAHAMA, T., USAMI, R. & HORIKOSHI, K. 2006. Characterization of cold- and high-pressure-active polygalacturonases from a deep-sea yeast, *Cryptococcus liquefaciens* strain N6. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70, <http://doi.org/10.1271/bbb.70.296>.
- ADAPA, V., RAMYA, L. N., PULICHERLA, K. K. & RAO, K. R. S. S. 2014. Cold active pectinases: Advancing the food industry to the next generation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172, <http://doi.org/10.1007/s12010-013-0685-1>.
- AHMED, A., ASLAM, M., ASHRAF, M., NASIM, F. U.-H., BATOOL, K. & BIBI, A. 2017. Microbial β -glucosidases: screening, characterization, cloning and applications. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 5, <http://doi.org/10.12691/JAEM-5-2-2>.
- AKHTAR, M. F., ASHRAF, M., JAVEED, A., ANJUM, A. A., SHARIF, A., SALEEM, M., MUSTAFA, G., ASHRAF, M., SALEEM, A. & AKHTAR, B. 2018. Association of textile industry effluent with mutagenicity and its toxic health implications upon acute and sub-chronic exposure. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190, <http://doi.org/10.1007/s10661-018-6569-7>.
- ALCAINO, J., CIFUENTES, V. & BAEZA, M. 2015. Physiological adaptations of yeasts living in cold environments and their potential applications. *World journal of microbiology & biotechnology*, 31, <http://doi.org/10.1007/s11274-015-1900-8>.
- BARAHONA, S., YUIVAR, Y., SOCAS, 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, <http://doi.org/10.1007/s00792-016-0838-6>.
- BARRETT, J. 2001. Thermal hysteresis proteins. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 33, [http://doi.org/10.1016/s1357-2725\(00\)00083-2](http://doi.org/10.1016/s1357-2725(00)00083-2).
- BIAŁKOWSKA, A. & TURKIEWICZ, M. 2014. Miscellaneous cold-active yeast enzymes of industrial importance. In P. Buzzini and R. Margesin eds. *Cold-adapted yeasts*. Springer, Berlin, Heidelberg, 377-395 http://doi.org/10.1007/978-3-642-39681-6_17.
- BIAŁKOWSKA, A. M., SZULCZEWSKA, K. M., KRYSIAK, J., FLORCZAK, T., GROMEK, E., KASSASSIR, H., KUR, J. & TURKIEWICZ, M. 2017. Genetic and biochemical characterization of yeasts isolated from Antarctic soil samples. *Polar Biology*, 40, <http://doi.org/10.1007/s00300-017-2102-7>.
- BOKHORST, S., HUISKES, A., CONVEY, P. & AERTS, R. 2007. The effect of environmental change on vascular plant and cryptogam communities from the Falkland Islands and the Maritime Antarctic. *BMC Ecology*, 7, <http://doi.org/10.1186/1472-6785-7-15>.

- BRANDÃO, L. R., LIBKIND, D., VAZ, A. B. M., ESPÍRITO SANTO, L. C., MOLINÉ, M., DE GARCÍA, V., VAN BROECK, M. & ROSA, C. A. 2011. Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. *FEMS Microbiology Ecology*, 76, <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01030.x>.
- BRIZZIO, S., TURCHETTI, B., DE GARCÍA, V., LIBKIND, D., BUZZINI, P. & VAN BROECK, M. 2007. Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeasts isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia (Argentina). *Canadian Journal of Microbiology*, 53, <http://doi.org/10.1139/w07-010>.
- BUTINAR, L., SPENCER-MARTINS, I. & GUNDE-CIMERMAN, N. 2007. Yeasts in high Arctic glaciers: the discovery of a new habitat for eukaryotic microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91, <http://doi.org/10.1007/s10482-006-9117-3>.
- BUZZINI, P., TURK, M., PERINI, L., TURCHETTI, B. & GUNDE-CIMERMAN, N. 2017. Yeasts in polar and subpolar habitats. In P. Buzzini, M. Lachance and A. Yurkov eds. *Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity*. Springer, Cham, Switzerland, 331-365 http://doi.org/10.1007/978-3-319-62683-3_11.
- 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, <https://doi.org/10.1515/amylase-2017-0005>.
- 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, <http://doi.org/10.1186/1471-2180-12-251>.
- CAVELLO, I. A., BEZUS, B., MARTINEZ, A., GARMENDIA, G., VERO, S. & CAVALITTO, S. 2019. Yeasts from Tierra del Fuego Province (Argentina): biodiversity, characterization and bioprospection of hydrolytic enzymes. *Geomicrobiology Journal*, 36, <http://doi.org/10.1080/01490451.2019.1641769>.
- CAVICCHIOLI, R., SIDDIQUI, K. S., ANDREWS, D. & SOWERS, K. R. 2002. Low-temperature extremophiles and their applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, [http://doi.org/10.1016/s0958-1669\(02\)00317-8](http://doi.org/10.1016/s0958-1669(02)00317-8).
- CHESINI, M. 2020. Inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308: caracterización, clonado, sobreexpresión, y aplicación en procesos biotecnológicos. Universidad de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas, ^La Plata^,

- CHI, Z., CHI, Z., ZHANG, T., LIU, G. & YUE, L. 2009. Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, <http://doi.org/10.1007/s00253-008-1827-1>.
- CHI, Z., MA, C., WANG, P. & LI, H. F. 2007. Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *Bioresource Technology*, 98, <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.006>.
- CONVEY, P. 2010. Terrestrial biodiversity in Antarctica – Recent advances and future challenges. *Polar Science*, 4, <https://doi.org/10.1016/j.polar.2010.03.003>.
- CONVEY, P. & STEVENS, M. I. 2007. Ecology. Antarctic Biodiversity. *Science*, 317, <http://doi.org/10.1126/science.1147261>.
- D'AMICO, S., CLAVERIE, P., COLLINS, T., GEORLETTE, D., GRATIA, E., HOYOUNG, A., MEUWIS, M.-A., FELLER, G. & GERDAY, C. 2002. Molecular basis of cold adaptation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 357, <http://doi.org/10.1098/rstb.2002.1105>.
- DAS, N. & CHARUMATHI, D. 2012. Remediation of synthetic dyes from wastewater using yeast- An overview. *Indian Journal of Biotechnology*, 11, .
- DASKAYA-DIKMEN, C., KARBANCIUGLU-GULER, F. & OZCELIK, B. 2018. Cold active pectinase, amylase and protease production by yeast isolates obtained from environmental samples. *Extremophiles*, 22, <http://doi.org/10.1007/s00792-018-1020-0>.
- DE GARCÍA, V., BRIZZIO, S., LIBKIND, D., BUZZINI, P. & VAN BROECK, M. 2007. Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiology Ecology*, 59, <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00239.x>.
- DE OLIVEIRA, G. A., DE LAPUENTE, J., TEIXIDÓ, E., PORREDÓN, C., BORRÀS, M. & DE OLIVEIRA, D. P. 2016. Textile dyes induce toxicity on zebrafish early life stages. *Environmental Toxicology Chemistry*, 35, <http://doi.org/10.1002/etc.3202>.
- DE OVALLE, S., BRENA, B. & GONZALEZ POMBO, P. 2021. Influence of beta glucosidases from native yeast on the aroma of Muscat and Tannat wines. *Food Chemistry*, 346, <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128899>.
- DE OVALLE, S., CAVELLO, I., BRENA, B. M., CAVALITTO, S. & GONZÁLEZ-POMBO, P. 2018. Production and characterization of a β -glucosidase from *Issatchenkia terricola* and its use for hydrolysis of aromatic precursors in Cabernet Sauvignon wine. *LWT- Food Science and Technology*, 87, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.026>.

- DE WIJN, R., ROLLET, K., ERNST, F. G. M., WELLNER, K., BETAT, H., MÖRL, M. & SAUTER, C. 2021. CCA-addition in the cold: Structural characterization of the psychrophilic CCA-adding enzyme from the permafrost bacterium *Planococcus halocryophilus*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.10.018>.
- DHUME, G. M., MAHARANA, A. K., TSUJI, M., SRIVASTAVA, A. K. & SINGH, S. M. 2019. Cold-tolerant endoglucanase producing ability of *Mrakia robertii* A2-3 isolated from cryoconites, Hamtha glacier, Himalaya. *Journal of Basic Microbiology*, 59, <https://doi.org/10.1002/jobm.201800300>.
- DI MENNA, M. 1960. Yeasts from Antarctica. *Microbiology*, 23, <https://doi.org/10.1099/00221287-23-2-295>.
- DUARTE, A. W. F., DAYO-OWOYEMI, I., NOBRE, F. S., PAGNOCCA, F. C., CHAUD, L. C. S., PESSOA, A., FELIPE, M. G. A. & SETTE, L. D. 2013. Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. *Extremophiles*, 17, <http://doi.org/10.1007/s00792-013-0584-y>.
- DUARTE, A. W. F., DOS SANTOS, J. A., VIANNA, M. V., VIEIRA, J. M. F., MALLAGUTTI, V. H., INFORSATO, F. J., WENTZEL, L. C. P., LARIO, L. D., RODRIGUES, A., PAGNOCCA, F. C., PESSOA JUNIOR, A. & DURÃES SETTE, L. 2018. Cold-adapted enzymes produced by fungi from terrestrial and marine Antarctic environments. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38, <http://doi.org/10.1080/07388551.2017.1379468>.
- DUARTE, A. W. F., PASSARINI, M. R. Z., DELFORNO, T. P., PELLIZZARI, F. M., CIPRO, C. V. Z., MONTONE, R. C., PETRY, M. V., PUTZKE, J., ROSA, L. H. & SETTE, L. D. 2016. Yeasts from macroalgae and lichens that inhabit the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Microbiology Reports*, 8, <http://doi.org/10.1111/1758-2229.12452>.
- ELLEUCHE, S., SCHRÖDER, C., SAHM, K. & ANTRANIKIAN, G. 2014. Extremozymes—biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 29, <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.04.003>.
- FELLER, G. 2018. Protein folding at extreme temperatures: Current issues. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 84, <http://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.09.003>.
- FERREIRA, E. M. S., DE SOUSA, F. M. P., ROSA, L. H. & PIMENTA, R. S. 2019. Taxonomy and richness of yeasts associated with angiosperms, bryophytes, and meltwater biofilms collected in the Antarctic Peninsula. *Extremophiles*, 23, <http://doi.org/10.1007/s00792-018-1069-9>.
- FIRDAUS-RAIH, M., HASHIM, N. H. F., BHARUDIN, I., ABU BAKAR, M. F., HUANG, K. K., ALIAS, H., LEE, B. K. B., MAT ISA, M. N., MAT-SHARANI, S., SULAIMAN, S., TAY, L. J., ZOLKEFLI,

- R., MUHAMMAD NOOR, Y., LAW, D. S. N., ABDUL RAHMAN, S. H., MD-ILLIAS, R., ABU BAKAR, F. D., NAJIMUDIN, N., ABDUL MURAD, A. M. & MAHADI, N. M. 2018. The *Glaciozyma antarctica* genome reveals an array of systems that provide sustained responses towards temperature variations in a persistently cold habitat. *PLoS One*, 13, <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0189947>.
- FORGACS, E., CSERHÁTI, T. & OROS, G. 2004. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environment International*, 30, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.02.001>.
- FRANCELINO, M. R., SCHAEFER, C. E. G. R., SIMAS, F. N. B., FILHO, E. I. F., DE SOUZA, J. J. L. L. & DA COSTA, L. M. 2011. Geomorphology and soils distribution under paraglacial conditions in an ice-free area of Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Catena*, 85, <http://doi.org/10.1016/j.catena.2010.12.007>.
- GERDAY, C., AITTALEB, M., BENTAHIR, M., CHESSA, J. P., CLAVERIE, P., COLLINS, T., D'AMICO, S., DUMONT, J., GARSOUX, G., GEORLETTE, D., HOYOUX, A., LONHIENNE, T., MEUWIS, M. A. & FELLER, G. 2000. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 18, [http://doi.org/10.1016/s0167-7799\(99\)01413-4](http://doi.org/10.1016/s0167-7799(99)01413-4).
- GOMES, J., GOMES, I. & STEINER, W. 2000. Thermolabile xylanase of the Antarctic yeast *Cryptococcus adeliae*: production and properties. *Extremophiles*, 4, <http://doi.org/10.1007/s007920070024>.
- GONERA, P. & RACHLEWICZ, G. 1997. Snow cover in the vicinity of Arctowski Station, King George Island, in winter 1991. *Polish Polar Research*, vol. 18, .
- HAMID, B. 2015. Cold-active α -amylase from psychrophilic and psychrotolerant yeast. *Journal of Global Biosciences*, 4, .
- HAMID, D. B., RANA, R. S., CHAUHAN, D., SINGH, P., MOHIDIN, F. & SAHAY, S. 2014. Psychrophilic yeasts and their biotechnological applications-A review. *African Journal of Biotechnology*, 13, <http://doi.org/10.5897/AJB2014.13644>.
- HASSAN, N., ANESIO, A. M., RAFIQ, M., HOLTVOETH, J., BULL, I., HALEEM, A., SHAH, A. A. & HASAN, F. 2020. Temperature driven membrane lipid adaptation in glacial psychrophilic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 11, <http://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00824>.
- HE, J., YANG, Z., HU, B., JI, X., WEI, Y., LIN, L. & ZHANG, Q. 2015. Correlation of polyunsaturated fatty acids with the cold adaptation of *Rhodotorula glutinis*. *Yeast*, 32, <http://doi.org/10.1002/yea.3095>.
- JUTURU, V. & WU, J. C. 2014. Microbial cellulases: engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 33, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.077>.

- JUTURU, V. & WU, J. C. 2012. Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances*, 30, <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.006>.
- KASHYAP, D. R., VOHRA, P. K., CHOPRA, S. & TEWARI, R. 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: A review. *Bioresource Technology*, 77, [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00118-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00118-8).
- KAUSHIK, P. & MALIK, A. 2009. Fungal dye decolourization: recent advances and future potential. *Environment International*, 35, <http://doi.org/10.1016/j.envint.2008.05.010>.
- KETUDAT CAIRNS, J. R. & ESEN, A. 2010. β -Glucosidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, <http://doi.org/10.1007/s00018-010-0399-2>.
- KHAN, R., BHAWANA, P. & FULEKAR, M. H. 2013. Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12, <http://doi.org/10.1007/s11157-012-9287-6>.
- KIM, J.-T., KANG, S. G., WOO, J.-H., LEE, J.-H., JEONG, B. C. & KIM, S.-J. 2007. Screening and its potential application of lipolytic activity from a marine environment: characterization of a novel esterase from *Yarrowia lipolytica* CL180. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, <http://doi.org/10.1007/s00253-006-0727-5>.
- KRÁLOVÁ, S. 2017. Role of fatty acids in cold adaptation of Antarctic psychrophilic *Flavobacterium* spp. *Systematic and Applied Microbiology*, 40, <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.06.001>.
- LARIO, L. D., CHAUD, L., ALMEIDA, M. D. G., CONVERTI, A., DURÃES SETTE, L. & PESSOA, A. 2015. Production, purification, and characterization of an extracellular acid protease from the marine Antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. *Fungal Biology*, 119, <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.08.012>.
- LASCANO DEMERA, L., PORTERO-BARAHONA, P. & CARVAJAL BARRIGA, E. 2019. Production, extraction and characterization of lipases from the Antarctic yeast *Guehomyces pullulans*. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 15, <http://doi.org/10.3844/ajbb.2019.75.82>.
- LO GIUDICE, A. & FANI, R. 2015. Cold-adapted bacteria from a coastal area of the Ross Sea (Terra Nova Bay, Antarctica): linking microbial ecology to biotechnology. *Hydrobiologia*, 761, <http://doi.org/10.1007/s10750-015-2497-5>.
- LONHIENNE, T., GERDAY, C. & FELLER, G. 2000. Psychrophilic enzymes: revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility. *Biochimica et*

- Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543, [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00210-7](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00210-7).
- LOPERENA, L., SORIA, V., VARELA, H., LUPO, S., BERGALLI, A., GUIGOU, M., PELLEGRINO, A., BERNARDO, A., CALVIÑO, A., RIVAS, F. & BATISTA, S. 2012. Extracellular enzymes produced by microorganisms isolated from maritime Antarctica. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, <http://doi.org/10.1007/s11274-012-1032-3>.
- MARGESIN, R., FAUSTER, V. & FONTEYNE, P. A. 2005. Characterization of cold-active pectate lyases from psychrophilic *Mrakia frigida*. *Letters in Applied Microbiology*, 40, <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01704.x>.
- MARGESIN, R. & MITEVA, V. 2011. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Research in Microbiology*, 162, <http://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.12.004>.
- MARGESIN, R., ZACKE, G. & SCHINNER, F. 2002. Characterization of heterotrophic microorganisms in Alpine Glacier Cryoconite. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 34, <http://doi.org/10.1080/15230430.2002.12003472>.
- MARTINEZ, A., CAVELLO, I., GARMENDIA, G., RUFO, C., CAVALITTO, S. & VERO, S. 2016. Yeasts from sub-Antarctic region: biodiversity, enzymatic activities and their potential as oleaginous microorganisms. *Extremophiles*, 20, <http://doi.org/10.1007/s00792-016-0865-3>.
- MARTORELL, M. M., RUBERTO, L. A. M., DE CASTELLANOS, L. I. F. & MAC CORMACK, W. P. 2019a. Bioremediation abilities of Antarctic fungi. In Tiquia-Arashiro S. and G. M. eds. *Fungi in extreme environments: ecological role and biotechnological significance*. Springer, Cham., 517-534 https://doi.org/10.1007/978-3-030-19030-9_26.
- MARTORELL, M. M., RUBERTO, L. A. M., DE FIGUEROA, L. I. C. & MAC CORMACK, W. P. 2019b. Antarctic yeasts as a source of enzymes for biotechnological applications. In L. Rosa eds. *Fungi of Antarctica*. Springer, Cham, https://doi.org/10.1007/978-3-030-18367-7_13.
- MARTORELL, M. M., RUBERTO, L. A. M., FERNÁNDEZ, P. M., DE FIGUEROA, L. I. C. & MAC CORMACK, W. P. 2019c. Biodiversity and enzymes bioprospection of Antarctic filamentous fungi. *Antarctic Science*, 31, <http://doi.org/10.1017/S0954102018000421>.
- MARTORELL, M. M., RUBERTO, L. A. M., FERNÁNDEZ, P. M., DE FIGUEROA, L. I. C. & MAC CORMACK, W. P. 2017. Bioprospection of cold-adapted yeasts with biotechnological potential from Antarctica. *Journal of Basic Microbiology*, 57, <http://doi.org/10.1002/jobm.201700021>.

- MICHEL, R., SCHAEFER, C., POELKING, E., SIMAS, F., FERNANDES-FILHO, E. & BOCKHEIM, J. 2011. Active layer temperature in two Cryosols from King George Island, Maritime Antarctica. *Geomorphology*, 155, <http://doi.org/10.1016/j.geomorph.2011.12.013>.
- MOHAMMADI, S., HASHIM, N. H. F., MAHADI, N. M., MURAD, A. M. A. & TECHNOLOGY, P. 2021. The cold-active endo- β -1, 3 (4)-glucanase from a marine psychrophilic yeast, *Glaciozyma antarctica* PI12: heterologous expression, biochemical characterisation, and molecular modeling. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 12, .
- MORITA, R. Y. 1975. Psychrophilic bacteria. *Bacteriological reviews*, 39, <http://doi.org/10.1128/br.39.2.144-167.1975>.
- NAKAGAWA, T., IKEHATA, R., UCHINO, M., MIYAJI, T., TAKANO, K. & TOMIZUKA, N. 2006. Cold-active acid β -galactosidase activity of isolated psychrophilic-basidiomycetous yeast *Guehomyces pullulans*. *Microbiological Research*, 161, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.07.003>.
- NAKAGAWA, T., NAGAOKA, T., MIYAJI, T. & TOMIZUKA, N. 2005a. A cold-active pectin lyase from the psychrophilic and basidiomycetous yeast *Cystofilobasidium capitatum* strain PPY-1. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 42, <http://doi.org/10.1042/ba20040190>.
- NAKAGAWA, T., NAGAOKA, T., MIYAJI, T. & TOMIZUKA, N. 2005b. Cold-active polygalacturonase from psychrophilic-basidiomycetous yeast *Cystofilobasidium capitatum* strain PPY-1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69, <http://doi.org/10.1271/bbb.69.419>.
- NAKAGAWA, T., NAGAOKA, T., TANIGUCHI, S., MIYAJI, T. & TOMIZUKA, N. 2004. Isolation and characterization of psychrophilic yeasts producing cold-adapted pectinolytic enzymes. *Letters in Applied Microbiology*, 38, <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01503.x>.
- D. O. Øvstedal and R. I. Lewis Smith eds. 2001. *Book Lichens of Antarctica and South Georgia. A Guide to their identification and ecology*. Cambridge University Press, pp.
- PATHAN, A. A. K., BHADRA, B., BEGUM, Z. & SHIVAJI, S. 2010. Diversity of yeasts from puddles in the vicinity of Midre Lovénbreen Glacier, Arctic and bioprospecting for enzymes and fatty acids. *Current Microbiology*, 60, <http://doi.org/10.1007/s00284-009-9543-3>.
- PAVLOVA, K., GARGOVA, S., HRISTOZOVA, T. & TANKOVA, Z. 2008. Phytase from antarctic yeast strain *Cryptococcus laurentii* AL27. *Folia Microbiol (Praha)*, 53, <http://doi.org/10.1007/s12223-008-0004-3>.

- PETRESCU, I., LAMOTTE-BRASSEUR, J., CHESSA, J. P., NTARIMA, P., CLAEYSSENS, M., DEVREESE, B., MARINO, G. & GERDAY, C. 2000. Xylanase from the psychrophilic yeast *Cryptococcus adeliae*. *Extremophiles*, 4, <http://doi.org/10.1007/s007920070028>.
- PHADTARE, S. 2004. Recent developments in bacterial cold-shock response. *Current Issues in Molecular Biology*, 6, .
- RAMLI, A. N., MAHADI, N. M., RABU, A., MURAD, A. M., BAKAR, F. D. & ILLIAS, R. M. 2011. Molecular cloning, expression and biochemical characterisation of a cold-adapted novel recombinant chitinase from *Glaciozyma antarctica* PI12. *Microbial Cell Factories*, 10, <http://doi.org/10.1186/1475-2859-10-94>.
- RASHID, F. A. A., RAHIM, R. A. & IBRAHIM, D. 2010. Identification of lipase-producing psychrophilic yeast, *Leucosporidium* sp. *International Journal of Microbiology*, 9, .
- RASPOR, P. & ZUPAN, J. 2006. Yeasts in extreme environments. In G. Péter and C. Rosa eds. *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer Berlin Heidelberg, 371-417 http://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_15.
- RAY, M. K., DEVI, K. U., KUMAR, G. S. & SHIVAJI, S. 1992. Extracellular protease from the antarctic yeast *Candida humicola*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, <http://doi.org/10.1128/aem.58.6.1918-1923.1992>.
- ŘEZANKA, T., KOLOUCHOVÁ, I. & SIGLER, K. 2016. Lipidomic analysis of psychrophilic yeasts cultivated at different temperatures. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1861, <http://doi.org/10.1016/j.bbailip.2016.07.005>.
- ROSSI, M., BUZZINI, P., CORDISCO, L., AMARETTI, A., SALA, M., RAIMONDI, S., PONZONI, C., PAGNONI, U. M. & MATTEUZZI, D. 2009. Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts. *FEMS Microbiology Ecology*, 69, <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00727.x>.
- ROTHSCHILD, L. J. & MANCINELLI, R. L. 2001. Life in extreme environments. *Nature*, 409, <https://doi.org/10.1038/35059215>.
- ROVATI, J. I., PAJOT, H. F., RUBERTO, L., MAC CORMACK, W. & FIGUEROA, L. I. C. 2013. Polyphenolic substrates and dyes degradation by yeasts from 25 de Mayo/King George Island (Antarctica). *Yeast*, 30, <http://doi.org/10.1002/yea.2982>.
- RUSCASSO, F. 2018. Biodegradación aeróbica del colorante naranja reactivo 16 por una levadura Antártica. Universidad de La Plata. Ciencias Exactas, ^La Plata^, 141
- RUSSELL, N. J. 2000. Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. *Extremophiles*, 4, <http://doi.org/10.1007/s007920050141>.

- SANNINO, C., TASSELLI, G., FILIPPUCCI, S., TURCHETTI, B. & BUZZINI, P. 2017. Yeasts in nonpolar cold habitats. In P. Buzzini, M. Lachance and A. Yurkov eds. *Yeasts in natural ecosystems: diversity* Springer, Cham, Switzerland, 367-396 http://doi.org/10.1007/978-3-319-62683-3_12.
- 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, 10.3389/fmicb.2016.01408.
- SARMIENTO, F., PERALTA, R. & BLAMEY, J. M. 2015. Cold and hot extremozymes: industrial relevance and current trends. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3, 10.3389/fbioe.2015.00148.
- SCHERER, S. & NEUHAUS, K. 2006. Life at low temperatures. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer and E. Stackebrandt eds. *The prokaryotes*. Springer, New York, NY., 210-262 https://doi.org/10.1007/0-387-30742-7_8.
- SHALLA, A. H., BHAT, M. A. & YASEEN, Z. 2018. Hydrogels for removal of recalcitrant organic dyes: A conceptual overview. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6, <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.08.063>.
- SHEN, L., ZHANG, S. & CHEN, G. 2021. Regulated strategies of cold-adapted microorganisms in response to cold: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 10.1007/s11356-021-16843-6.
- SHI, C., WANG, X., XIAO, Z., WANG, R., QIAO, Y. & KAN, G. 2020. Cloning, characterization and expression analysis of glutathione S-transferase from the Antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* AN5. *Protein Expression and Purification*, 167, <https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.105518>.
- SHIMIZU, Y., KONNO, Y. & TOMITA, Y. 2020. *Wickerhamomyces psychrolipolyticus* f.a., sp. nov., a novel yeast species producing two kinds of lipases with activity at different temperatures. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, 10.1099/ijsem.0.003894.
- SHIVAJI, S. & PRASAD, G. S. 2009. Antarctic Yeasts: biodiversity and potential applications. In T. Satyanarayana and G. Kunze eds. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Springer, Dordrecht, 3-18 http://doi.org/10.1007/978-1-4020-8292-4_1.
- SINGH, P., TSUJI, M., SINGH, S. M., ROY, U. & HOSHINO, T. 2013. Taxonomic characterization, adaptation strategies and biotechnological potential of cryophilic yeasts from ice cores of

- Midre Lovénbreen glacier, Svalbard, Arctic. *Cryobiology*, 66, <http://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.01.002>.
- SOLÍS, M., SOLÍS, A., PÉREZ, H. I., MANJARREZ, N. & FLORES, M. 2012. Microbial decolouration of azo dyes: a review. *Process Biochemistry*, 47, <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.08.014>.
- SONG, C., LIU, G.-L., XU, J.-L. & CHI, Z.-M. 2010. Purification and characterization of extracellular β -galactosidase from the psychrotolerant yeast *Guehomyces pullulans* 17-1 isolated from sea sediment in Antarctica. *Process Biochemistry*, 45, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.02.025>.
- SOUZA, P. M. D. & MAGALHÃES, P. D. O. 2010. Application of microbial α -amylase in industry-a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, <http://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>.
- SU, E., XIA, T., GAO, L., DAI, Q. & ZHANG, Z. 2010. Immobilization of β -glucosidase and its aroma-increasing effect on tea beverage. *Food and Bioproducts Processing*, 88, <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2009.04.001>.
- TASKIN, M., UCAR, M. H., UNVER, Y., KARA, A. A., OZDEMIR, M. & ORTUCU, S. 2016. Lipase production with free and immobilized cells of cold-adapted yeast *Rhodotorula glutinis* HL25. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.08.009>.
- TATTERSALL, G. J., SINCLAIR, B. J., WITHERS, P. C., FIELDS, P. A., SEEBACHER, F., COOPER, C. E. & MALONEY, S. K. 2012. Coping with thermal challenges: physiological adaptations to environmental temperatures. *Compr Physiol*, 2, <http://doi.org/10.1002/cphy.e110055>.
- TIGINI, V., GIANANTI, P., MANGIAVILLANO, A., PANNOCCHIA, A. & VARESE, G. C. 2011. Evaluation of toxicity, genotoxicity and environmental risk of simulated textile and tannery wastewaters with a battery of biotests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.12.001>.
- TOUCHETTE, D., ALTSCHULER, I., GOSTINČAR, C., ZALAR, P., RAYMOND-BOUCHARD, I., ZAJC, J., MCKAY, C. P., GUNDE-CIMERMAN, N. & WHYTE, L. G. 2022. Novel Antarctic yeast adapts to cold by switching energy metabolism and increasing small RNA synthesis. *The ISME Journal*, 16, <http://doi.org/10.1038/s41396-021-01030-9>.
- TSUJI, M. 2018. Genetic diversity of yeasts from East Ongul Island, East Antarctica and their extracellular enzymes secretion. *Polar Biology*, 41, <http://doi.org/10.1007/s00300-017-2185-1>.

- TSUJI, M. & KUDOH, S. 2020. Soil yeasts in the vicinity of Syowa station, East Antarctica: their diversity and extracellular enzymes, cold adaptation strategies, and secondary metabolites. *Sustainability*, 12, <http://doi.org/10.3390/su12114518>.
- TSUJI, M., TANABE, Y., VINCENT, W. F. & UCHIDA, M. 2018. *Mrakia arctica* sp. nov., a new psychrophilic yeast isolated from an ice island in the Canadian High Arctic. *Mycoscience*, 59, <http://doi.org/10.1016/j.myc.2017.08.006>.
- TSUJI, M., YOKOTA, Y., KUDOH, S. & HOSHINO, T. 2015. Comparative analysis of milk fat decomposition activity by *Mrakia* spp. isolated from Skarvsnes ice-free area, East Antarctica. *Cryobiology*, 70, <http://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.04.002>.
- TURCHETTI, B., BUZZINI, P., GORETTI, M., BRANDA, E., DIOLAIUTI, G., D'AGATA, C., SMIRAGLIA, C. & VAUGHAN-MARTINI, A. 2008. Psychrophilic yeasts in glacial environments of Alpine glaciers. *FEMS Microbiology Ecology*, 63, <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00409.x>.
- TURCHETTI, B., SANNINO, C., MEZZASOMA, A., ZUCCONI, L., ONOFRI, S. & BUZZINI, P. 2020. *Mrakia stelviica* sp. nov. and *Mrakia montana* sp. nov., two novel basidiomycetous yeast species isolated from cold environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, <http://doi.org/10.1099/ijsem.0.004336>.
- TURKIEWICZ, M., PAZGIER, M., DONACHIE, S. P. & KALINOWSKA, H. 2005. Invertase and α -glucosidase production by the endemic Antarctic marine yeast *Leucosporidium antarcticum*. *Polish Polar Research*, .
- UNVER, Y., YILDIZ, M., TASKIN, M., ARSLAN, N. P. & ORTUCU, S. 2015. Protease production by free and immobilized cells of the cold-adapted yeast *Cryptococcus victoriae* CA-8. *Biocatalysis and Biotransformation*, 33, <http://doi.org/10.3109/10242422.2015.1060229>.
- VACA, I., FAÚNDEZ, C., MAZA, F., PAILLAVIL, B., HERNÁNDEZ, V., ACOSTA, F., LEVICÁN, G., MARTÍNEZ, C. & CHÁVEZ, R. 2013. Cultivable psychrotolerant yeasts associated with Antarctic marine sponges. *World journal of microbiology & biotechnology*, 29, <http://doi.org/10.1007/s11274-012-1159-2>.
- VAZ, A. B. M., ROSA, L. H., VIEIRA, M. L. A., DE GARCIA, V., BRANDÃO, L. R., TEIXEIRA, L. C. R. S., MOLINÉ, M., LIBKIND, D., VAN BROOCK, M. & ROSA, C. A. 2011. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, <http://doi.org/10.1590/S1517-83822011000300012>.

- VERO, S., GARMENDIA, G., MARTINEZ SILVEIRA, A., CAVELLO, I. & WISNIEWSKI, M. 2019. Yeast activities involved in carbon and nitrogen cycles in Antarctica. In S. Castro-Sowinski eds. *The Ecological Role of Microorganisms in the Antarctic Environment*. Springer Nature Switzerland AG, Basilea, Switzerland, 45-64 http://doi.org/10.1007/978-3-030-02786-5_3.
- VISHNIAC, H. S. 1996. Biodiversity of yeasts and filamentous microfungi in terrestrial Antarctic ecosystems. *Biodiversity & Conservation*, 5, <http://doi.org/10.1007/BF00051983>.
- VISHNIAC, H. S. 2006. Yeast biodiversity in the Antarctic. In G. Péter and C. Rosa eds. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer, Berlin, Heidelberg, 419-440 http://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_16.
- WANG, Q., HOU, Y. & YAN, P. 2012. Optimization of cold-adapted lysozyme production from the psychrophilic yeast *Debaryomyces hansenii* using statistical experimental methods. *Journal of Food Science*, 77, <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02711.x>.
- WANG, Z., XUE, M., HUANG, K. & LIU, Z. 2011. Textile dyeing wastewater treatment. In P. Hauser eds. *Advances in treating textile effluent*. IntechOpen, 91-116 <http://doi.org/10.5772/22670>.
- YESILADA, O., BIRHANLI, E. & GECKIL, H. 2018. Bioremediation and decolorization of textile dyes by white rot fungi and laccase enzymes. In R. Prasad eds. *Mycoremediation and environmental sustainability*. Springer, Cham., 121-153 http://doi.org/10.1007/978-3-319-77386-5_5.
- YUIVAR, Y., ALCAINO, J., CIFUENTES, V. & BAEZA, M. 2019. Characterization of gelatinase produced by Antarctic *Mrakia* sp. *Journal of Basic Microbiology*, 59, <https://doi.org/10.1002/jobm.201900126>.
- 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, <http://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00086>.
- ZALAR, P. & GUNDE-CIMERMAN, N. 2014. Cold-Adapted yeasts in Arctic habitats. In P. Buzzini and R. Margesin eds. *Cold-Adapted Yeasts*. Springer, Berlin, Heidelberg, 49-74 http://doi.org/10.1007/978-3-642-39681-6_3.
- ZHANG, T., FANG, K., NI, H., LI, T., LI, L. J., LI, Q. B. & CHEN, F. 2020. Aroma enhancement of instant green tea infusion using β -glucosidase and β -xylosidase. *Food Chemistry*, 315, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126287>.

CAPÍTULO 2

AISLAMIENTO DE LEVADURAS A PARTIR DE MUESTRAS ANTÁRTICAS Y ESTUDIO DE SU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Resumen

Se realizó un aislamiento directo de 32 levaduras a partir de muestras recolectadas en la Isla Rey Jorge durante otoño de 2016. Las mismas fueron aisladas e identificadas genéticamente mediante la secuenciación de la porción D1/D2 del ADN ribosómico. Se observó una prevalencia de Basidiomicetos (n=26), géneros *Naganishia*, *Holtermaniella*, *Vishniacozyma*, *Phenoliferia*, *Mrakia* y *Cystobasidium*. Los Ascomicetos se vieron representados por 6 cepas, de los géneros *Metschnikowia* y *Debaryomyces*.

Según su crecimiento a distintas temperaturas, 13 de las levaduras fueron clasificadas como psicrófilas, y 19 como psicotolerantes. Siete de las levaduras mostraron una alta tolerancia a la presencia de NaCl ya que crecieron en concentraciones entre 2.5 M y 3.5 M de esta sal. También se evaluó la tolerancia a los iones Ni^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Li^{+} y Cd^{+2} . Entre estos, el Cu^{+2} y el Cd^{+2} resultaron más tóxicos, inhibiendo el crecimiento de la mayoría de los aislamientos.

Se realizó una bioprospección de enzimas hidrolíticas extracelulares en placas con sustratos específicos para cada enzima. Las enzimas β -glucosidasas (59%) y esterases (53%) fueron las más frecuentes entre los aislamientos. Una pequeña proporción de las levaduras demostró la capacidad de producir pectinasas y xilanasas (19% y 12.5%, respectivamente). La producción de proteasas sólo se detectó entre levaduras psicrófilas.

Los géneros que demostraron una mayor producción de enzimas fueron *Vishniacozyma*, *Naganishia*, *Phenoliferia* y *Mrakia*.

Se ensayó la capacidad de decolorar medio sólido suplementado con colorantes textiles (dos colorantes *azo* y uno de antraquinona). Se observó la coloración de la biomasa luego de la decoloración, para inferir mecanismos biodegradativos o de bioacumulación. Se observó un mayor porcentaje de levaduras que decoloraron el medio de cultivo incubado a 20 °C respecto del incubado a 4 °C por parte de las levaduras psicrotolerantes, mientras que los porcentajes de levaduras que bioacumularon el colorante aumentaron también a 20 °C respecto de 4 °C. Las levaduras psicrófilas fueron efectivas en la degradación de los colorantes a 4 °C, con diferencias en cuanto a la bioacumulación de los diferentes colorantes ensayados, indicando que la naturaleza de los mismos es un factor importante para la decoloración y bioacumulación. Los géneros *Vishniacozyma*, *Cystobasidium*, *Mrakia* y *Phenoliferia* parecen ser los más promisorios para continuar con el estudio de biodecoloración de este tipo de colorantes.

Con respecto a la producción de enzimas, las levaduras pertenecientes a los géneros *Naganishia*, *Vishniacozyma*, *Phenoliferia* y *Mrakia* son las que produjeron mayor cantidad de enzimas hidrolíticas extracelulares, por lo que resultan promisorias para continuar con este estudio. Entre las cepas estudiadas en este capítulo, la levadura *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 es la elegida para continuar con el estudio de producción de enzimas pectinolíticas y β -glucosídicas en medio líquido en el próximo capítulo.

INTRODUCCIÓN

Bioprospección

La búsqueda y utilización de los recursos biológicos por el hombre data prácticamente desde la existencia de la humanidad, y ha sido clave para la supervivencia, adaptación y evolución de la especie humana (Mateo, *et al.* 2001). En este contexto, se puede definir el término bioprospección como la búsqueda sistemática dentro de la naturaleza de nuevos recursos de valor comercial y social. Los beneficios obtenibles a partir de la biodiversidad pueden ser desde genes, rutas metabólicas, compuestos biológicos o químicos, estructuras o materiales; hasta los organismos en su totalidad (Beattie, *et al.* 2011). Éstos han beneficiado hasta el momento a la humanidad a través de diversas industrias como la farmacéutica, la agropecuaria, la minera, entre otras.

La bioprospección puede llevarse a cabo de diferentes maneras, en especial teniendo en cuenta la gran diversidad de herramientas microbiológicas y moleculares de búsqueda disponibles actualmente. En la Figura 2.1 se esquematiza cómo se realiza un proceso de bioprospección clásico de una enzima antártica, desde la toma de muestra hasta llegar a la obtención de la enzima de interés para un proceso particular.

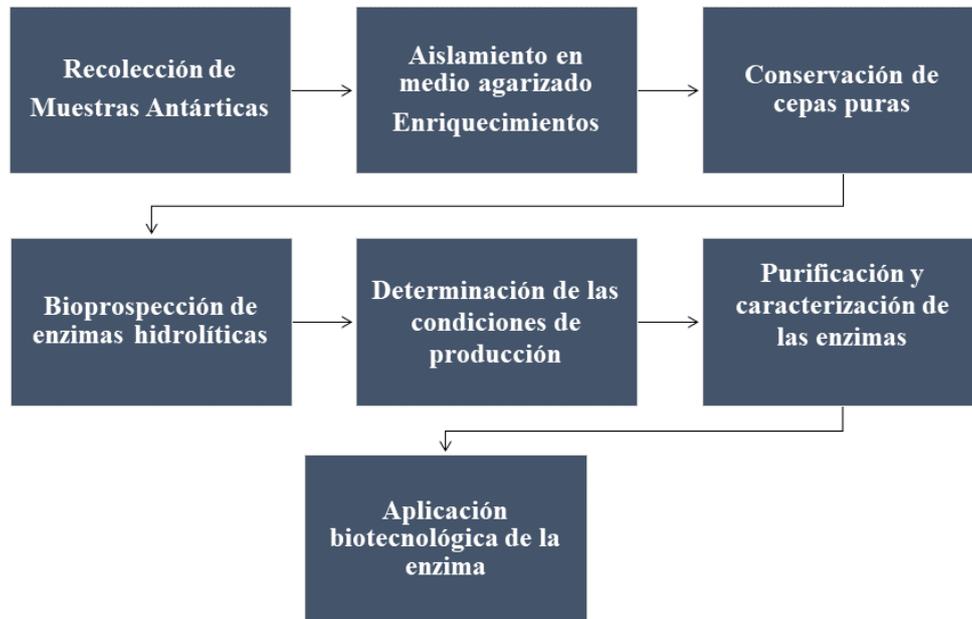


Figura 2. 1 Procedimiento clásico para la obtención de enzimas de origen antártico de interés industrial. Adaptado (Duarte, et al. 2018; Martorell, et al. 2019a).

Los estudios inician con la recolección de las muestras. Típicas muestras recolectadas son agua (de deshielo, lagos o marina), suelo, sedimentos marinos, nieve, entre otras (Martorell, et al. 2019a; Vishniac 2006). Muestras relacionadas con otros tipos de vida superior como plumas, líquenes, excrementos de pingüino u otras aves también son buena fuente para el aislamiento de bacterias, levaduras y hongos (Martorell, et al. 2019a).

El aislamiento directo de levaduras permite un estudio de la diversidad de las mismas (Martinez, et al. 2016). Por otro lado, si se busca alguna propiedad en particular (por ejemplo, la capacidad de degradar algún compuesto específico), se pueden utilizar técnicas de enriquecimiento o factores de selección (Bezus, et al. 2021; Ruberto, et al. 2005).

Los ensayos de bioprospección en placa permiten testear muchas levaduras en relativamente poco tiempo, y optimizando los materiales. Al manifestarse una característica buscada por los microorganismos, se debe realizar el escalado para observar

si la característica se reproduce. Existen distintos sistemas de cultivo, como los sumergidos y los cultivos en medio sólido; estos últimos suelen emplearse con hongos filamentosos. El diseño de los medios de cultivo y las condiciones de cultivo para la obtención de un metabolito es de suma importancia y debe ser estudiado previo al escalado. Finalmente, al contar con suficiente enzima es importante la caracterización de la misma, para evaluar las mejores condiciones de reacción, y la potencial aplicación para la que fue buscada en un inicio.

OBJETIVOS PARTICULARES DE ESTE CAPÍTULO

- Estudiar la diversidad de levaduras en muestras Antárticas provenientes de la Isla Rey Jorge.
- Caracterizarlas genótipicamente mediante secuenciación de la región D1/D2 y su análisis utilizando herramientas informáticas.
- Caracterizarlas fenotípicamente: estudiar su crecimiento a diferentes temperaturas, su tolerancia a NaCl y metales pesados.
- Estudiar el perfil de producción de enzimas hidrolíticas extracelulares de cada una de las cepas.
- Estudiar cualitativamente la capacidad de bioacumulación y/o biodegradación de colorantes textiles por parte de cada una de las cepas.
- Seleccionar la cepa más prometedora para continuar los estudios de producción, caracterización y aplicación de enzimas de interés biotecnológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de muestreo

Los muestreos fueron realizados durante el mes de mayo de 2016 por la Dra. Ivana Cavello, durante la Expedición Antarkos XXXII. Las muestras fueron recolectadas en la Península Fildes (Aspa 125), ubicada en la Isla Rey Jorge (62°11'4"S; 58°54'W), a 120 km de la costa de la Península Antártica, en los alrededores del Glaciar Collins (62°11'05.8"S 58°52'49.7"W), Half Three Point (62°12'19.8"S 58°58'56.5"W), Fossil Hill (62°13'40.3"S 58°56'53.8"W), y la Bahía Drake (62°10'28.2"S; 58°59'01.6"W) (Anexo II). Se colectaron muestras de suelo (profundidad 0-10 cm, utilizando una espátula estéril), sedimentos, líquenes, plumas de aves, guano de pingüino y agua de mar en recipientes estériles (Anexo III). Todas las muestras fueron conservadas a 4 °C hasta su procesamiento.

Procesamiento de las muestras para el aislamiento de levaduras

Para el aislamiento de levaduras, 1.0 g de cada muestra sólida se suspendió en 9.0 ml de solución fisiológica estéril, y esta mezcla se agitó durante 10 minutos. El material más grueso se dejó decantar, y 100 µl de una dilución 1/10 de cada suspensión fueron sembradas en placas de agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBCA, Merck, Darmstadt, Alemania). La muestra de agua (2.0 l) fue filtrada por filtros de poro de 0.22 µm (Millipore, USA), y los filtros se colocaron en el medio DRBCA (Figura 2.2). Las placas fueron incubadas a 4 °C y a 20 °C, y observadas periódicamente. Cada colonia fue visualmente examinada (macro y microscópicamente), y aquellas que presentaron diferente morfología fueron seleccionadas y aisladas de manera individual en placas de agar papa glucosado (PDA, Oxoid, Hampshire, Reino Unido).

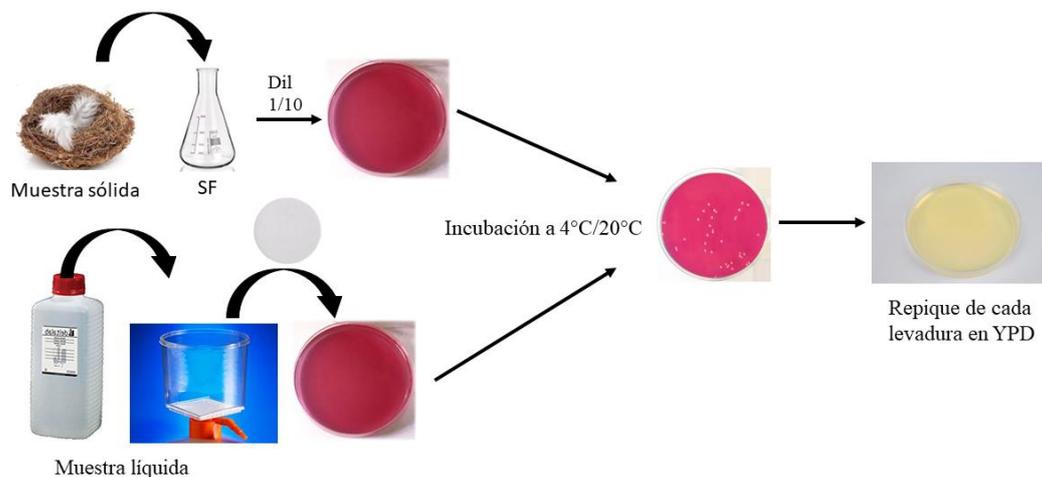


Figura 2. 2 Esquema simplificado del tratamiento de las muestras antárticas para el aislamiento de levaduras. SF: solución fisiológica.

Los cultivos puros de cada cepa fueron criopreservados a -80°C con $20\% \text{ v v}^{-1}$ glicerol. También se conservaron mediante liofilización, y se encuentran en la Colección Microbiológica del Instituto CINDEFI-CONICET y en el de la Cátedra de Microbiología, Facultad de Química, UdeLar (Montevideo, Uruguay).

Identificación molecular de las levaduras

La identificación molecular de las levaduras fue llevada a cabo por la Dra. Ivana Cavello. Todos los aislados fueron identificados molecularmente mediante el análisis de los dominios variables D1/D2 del extremo 5' del gen de la subunidad mayor de rRNA. La extracción de DNA se llevó a cabo como se detalla en Cavello, *et al.* (2019). Para llevar a cabo las reacciones de PCR, se utilizaron los *primers* ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG-3') y D2R (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG-3'). Esto permitió cubrir las zonas genómicas ITS1-ITS2 y D1/D2. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en $25.00 \mu\text{l}$ finales de reacción, conteniendo 1X Buffer de PCR (Bioron, Life Science), $0.50 \mu\text{M}$ de cada primer, 0.32 mM desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs, Bioline), 0.02 U de

Taq polimerasa (Bioron Life Sciences) y 20 ng de ADN. Se utilizó el siguiente perfil térmico: 96 °C 2 min, (96 °C 30 s) x 35, 51°C 45 s, 72 °C 120 s, y una extensión final de 7 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron secuenciados en ambas direcciones por MacroGen (MacroGen Inc., Seoul, Korea). El software MEGA 6 fue utilizado para alinear las secuencias y corregirlas. Luego, se compararon mediante la realización de BLAST con secuencias tipo, que se encuentran disponibles en NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Los análisis filogenéticos de las secuencias obtenidas se realizaron en el software MEGA 6. Para identificar una cepa al nivel de especie se utilizó el criterio recomendado por Kurtzman (2014), considerando a una cepa de determinada especie siempre que su secuencia D1/D2 no diverja en más de un 1% de secuencias tipo. Los árboles filogenéticos fueron realizados con el software MEGA 6, utilizando el método de *Maximum likelihood*, basado en el modelo de parámetros Kimura 2 (Tamura, *et al.* 2013).

Los aislados pertenecientes al género *Mrakia* fueron sometidos a un ensayo de asimilación de azúcares para complementar la identificación (Fell 2011; Kurtzman, *et al.* 2011). Para ello, se inocularon las levaduras en 5.0 ml de YNB (*Yeast Nitrogen Base*) líquido suplementado con 10.0 g l⁻¹ de maltosa o melecitosa, a partir de un cultivo fresco en medio sólido. Asimismo, se realizaron pruebas control con glucosa y sin fuente de carbono. Los controles negativos sin inocular sirvieron para comparar con los inoculados. Los tubos fueron incubados a 4 °C con una agitación de 150 rpm durante 15 días. Pasado ese tiempo, el crecimiento fue cualitativamente evaluado de forma visual mediante comparación con los controles.

Las secuencias D1/D2 de los aislamientos se encuentran depositados en Genbank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), los números de acceso se encuentran detallados en la Tabla 2.1.

Diversidad, riqueza y dominancia

La diversidad, riqueza y dominancia de las levaduras cultivables fue cuantificada usando los índices de Shannon-Wiener, Margalef y Simpson, respectivamente. Se utilizó el software PAST 3.11 (Hammer, *et al.* 2001). La dominancia se calculó como (1- índice de Simpson) (Pelissari, *et al.* 2018; Shah & Pandit 2013).

Efecto de la temperatura en el crecimiento de las levaduras

Para evaluar la capacidad de las distintas levaduras aisladas de crecer a diferentes temperaturas, las mismas fueron incubadas en placas de YPD a distintas temperaturas: 4 °C, 15 °C, 25 °C y 30 °C. Las placas fueron observadas diariamente durante 15 días, para evaluar cualitativamente su crecimiento a cada temperatura.

Aquellas levaduras capaces de crecer a 25 °C fueron clasificadas como psicotolerantes, mientras que aquellas que se desarrollaron a 4 °C pero no lograron desarrollarse a 25 °C fueron clasificadas como psicrófilas (Morita 1975; Raspor & Zupan 2006; Scherer & Neuhaus 2006).

Tolerancia al NaCl y a iones metálicos

La tolerancia a la presencia de NaCl durante el crecimiento fue evaluada incubando las levaduras a 4 °C o 20 °C (dependiendo de su naturaleza psicrófila o psicotolerante, respectivamente) en placas de YPD suplementadas con concentraciones crecientes de NaCl: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 2.5, 3.0 y 3.5 M. Se realizaron controles sin NaCl, y las placas fueron monitoreadas durante una semana para evaluar el crecimiento de forma cualitativa (Cavello, *et al.* 2019).

También fue evaluada la tolerancia a ciertos metales: Ni^{+2} (0.9 g l^{-1}), Zn^{+2} (7.0 g l^{-1}), Li^{+} (6.5 g l^{-1}), Cd^{+2} (6.0 g l^{-1}) y Cu^{+2} (1.5 g l^{-1}). Para ello, se utilizó medio líquido YNB suplementado con 10 g l^{-1} de glucosa, y la concentración correspondiente de cada metal. El medio se esterilizó mediante filtración ($0.22 \mu\text{m}$). Los tubos fueron incubados a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ o a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, y 150 rpm de agitación, y fueron monitoreados durante dos semanas para evaluar el crecimiento. Los controles se realizaron sin presencia del metal para cada levadura, y con tubos sin inocular para cada metal. Al finalizar el tiempo de incubación, el crecimiento fue evaluado visualmente (Russo and Libkind, 2016).

Bioprospección de enzimas hidrolíticas extracelulares

La producción cualitativa de enzimas hidrolíticas extracelulares fue evaluada para cada aislamiento en medio sólido. Las levaduras psicrófilas fueron testeadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, mientras que las levaduras psicotolerantes fueron evaluadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ y a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Se realizaron pruebas para evaluar producción de amilasas, celulasas, esterases, proteasas, pectinasas, inulinasas, β -glucosidasas y xilanasas. Las levaduras fueron inoculadas en los diferentes medios agarizados de manera puntual, utilizando escarbadiantes estériles. Las levaduras psicrófilas fueron incubadas durante dos semanas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, mientras que las levaduras psicotolerantes se incubaron una semana a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ y $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Luego del tiempo de incubación, se evaluó la producción mediante la visualización o no de un halo de producción.

La búsqueda de celulasas se llevó a cabo en medio CMC agarizado, el cual está compuesto de 2.0 g l^{-1} carboximetilcelulosa (CMC) de sodio (Mallinckrodt Baker Inc.), 2.0 g l^{-1} NaNO_3 , 1.0 g l^{-1} K_2HPO_4 , 0.5 g l^{-1} $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g l^{-1} KCl , 0.2 g l^{-1} peptona y 17.0 g l^{-1} agar. Las placas fueron sumergidas en una solución de Rojo Congo (1 g l^{-1}) durante 10 minutos y luego desteñidas con $\text{NaCl } 1 \text{ M}$ para evaluar las colonias

productoras de este tipo de enzimas. Estas produjeron un halo claro sobre un fondo rojo (Carrasco, *et al.* 2012).

La actividad esterasa fue evaluada en un medio compuesto por 10 g l⁻¹ peptona, 5.0 g l⁻¹ NaCl, 0.1 g l⁻¹ CaCl₂, 2.0 g l⁻¹ agar y 10 ml l⁻¹ de Tween 80 (Sigma-Aldrich). Las levaduras que produjeron este tipo de enzimas generaron un precipitado de color blanco alrededor de la colonia (Ramnath, *et al.* 2017).

La actividad proteolítica fue evaluada en un medio compuesto por 100 g l⁻¹ de leche descremada en polvo y 20.0 g l⁻¹ agar. En este caso, la leche fue esterilizada durante 30 minutos a vapor fluente, y luego fue suplementada a una solución de agar 2X, esterilizada a 121 °C durante 15 minutos. Las colonias productoras de proteasas generaron un halo claro por la degradación de las proteínas de la leche, sobre un fondo blanco (Kim, *et al.* 2001).

El medio base utilizado para evaluar la capacidad de producir amilasas, pectinasas, inulinasas y xilanasas fue: 5.0 g l⁻¹ extracto de levadura, 2.0 g l⁻¹ peptona, 1.4 g l⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 2.0 g l⁻¹ K₂HPO₄, 0.2 g l⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 1 ml l⁻¹ solución A (5.0 mg l⁻¹ FeSO₄·H₂O, 1.6 mg l⁻¹ MnSO₄·H₂O, 2.0 mg l⁻¹ CoCl₂) y 20.0 g l⁻¹ agar. Se adicionaron 10 g l⁻¹ de almidón soluble (Mallinckrodt Baker Inc.), pectina cítrica (Sigma-Aldrich), inulina o xilano de madera de abedul (Sigma-Aldrich), según la actividad hidrolítica a evaluar. Luego de la incubación, las placas de amilasas, inulinasas y pectinasas fueron sumergidas en Lugol (I₂/I⁻³, preparado disolviendo 0.5 g de I₂ y 2.5 g de IK en 330 ml de agua destilada) y observadas hasta detectar halos claros de degradación (Burhan, *et al.* 2003; Buzzini & Martini 2002; Rohban, *et al.* 2009). El revelado de las placas de xilanasas luego de la incubación se realizó de la misma manera que las placas de celulasas (Alves-Prado, *et al.* 2010).

El medio esculina-glicerol fue utilizado para detectar β -glucosidasas. La composición de este medio fue: 1.0 g l⁻¹ esculina, 0.3 g l⁻¹ FeCl₃, 1.0 g l⁻¹ hidrolizado de caseína, 25.0 g l⁻¹ extracto de levadura, 8.0 ml l⁻¹ glicerol y 20.0 g l⁻¹ agar. Un halo oscuro se desarrolló alrededor de las colonias productoras luego de la incubación (Pérez, *et al.* 2011).

Ensayo cualitativo para determinar la habilidad de decoloración por parte de las levaduras

La capacidad de las cepas para remover colorantes textiles de un medio de cultivo fue ensayada en el *normal decolorization media*, NDM, colocando 20 ml del mismo por placa. La composición del medio fue: 20.0 g l⁻¹ glucosa, 2.5 g l⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 2.5 g l⁻¹ extracto de levadura, 5.0 g l⁻¹ KH₂PO₄, 0.5 g l⁻¹ MgSO₄, 0.13 g l⁻¹ CaCl₂ y 20.0 g l⁻¹ agar (Ramalho, *et al.* 2002). Las placas fueron suplementadas con 0.1 g l⁻¹ (100 ppm) de colorante, previamente esterilizado mediante filtración (0.22 μ m). Se utilizaron, por separado, tres colorantes: Naranja Reactivo 16, Negro Reactivo 5 y Azul Reactivo 19 (todos brindados generosamente por la empresa ALCONIC SRL). Sus propiedades y estructuras químicas se muestran en la Tabla 2.1 y Figura 2.4. Las placas fueron inoculadas utilizando escarbadietes estériles y levaduras frescas en YPD sólido. La incubación se realizó durante 10 días a 4 °C o 3 días a 20 °C. Las levaduras psicrotolerantes se incubaron a 4 y 20 °C mientras que las psicrófilas se incubaron únicamente a 4 °C. Se realizaron controles sin inocular, para descartar factores abióticos de decolorización, y controles de crecimiento sin presencia del colorante. Pasado el tiempo de la incubación, se evaluó cualitativamente la desaparición del color alrededor de la cepa crecida, y la coloración de la cepa. Las levaduras que removieron el colorante del medio, pero conservaron el color de su colonia fueron clasificadas como

biodegradadoras, mientras que las que removieron el color, pero adoptaron el color del colorante fueron clasificadas como bioacumuladoras.

Tabla 2. 1 Naturaleza química y peso molecular de los colorantes utilizados en el ensayo de remoción en placa

Colorante	Naturaleza Química	Peso Molecular (g mol ⁻¹)
Naranja Reactivo 16	Azo	617.5
Negro Reactivo 5	Di-azo	991.8
Azul Reactivo 19	Antraquinona	626.6

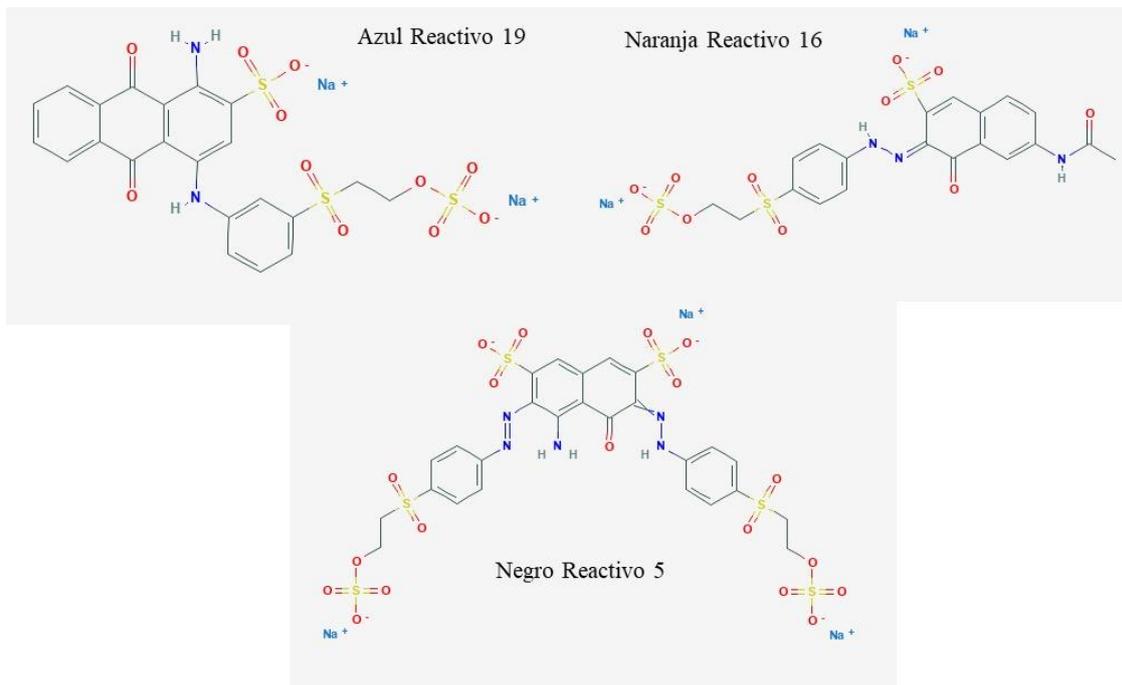


Figura 2. 3 Estructura química de los colorantes utilizados: Naranja Reactivo 16, Negro Reactivo 5 y Azul Reactivo 19.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación de las levaduras

Este capítulo se enfocó en explorar la naturaleza de las levaduras que habitan el suelo antártico, y en evaluar su potencial biotecnológico. A partir de las 13 muestras recolectadas por la Dra. Ivana Cavello en distintos puntos de la isla Rey Jorge se aislaron de manera directa 32 cepas de levaduras (Tabla 2.2). Ocho de ellas fueron aisladas a partir de muestras de agua: LP 1.2016, LP 2.2016, LP 3.2016, LP 5.2016, LP 6.2016, LP 7.2016, LP 8.2016 y LP 9.2016, mientras que el resto fueron aisladas de muestra sólida de diversa naturaleza (Anexo III).

Ascomicetos-Basidiomicetos

Los hongos son organismos eucarióticos que se caracterizan por la formación de hifas, estructuras filamentosas constituidas por una sucesión de células intercomunicadas, que en conjunto constituyen el micelio. Sin embargo, un grupo importante de hongos no produce hifas, y se caracterizan por presentar únicamente estructuras unicelulares, las levaduras. Actualmente, el reino *Fungi*, se divide en dos sub-reinos, *Dykaria*, el cual agrupa los *Phylum* Ascomycota y Basidiomycota, y el llamado «Hongos Basales» que agrupa al resto de los hongos (Guarro 2012).

Cuando se identificaron las levaduras aisladas la mayoría fueron identificados como pertenecientes al *Phylum* de los Basidiomicetos (81%, n=26), con una menor parte perteneciente a los Ascomicetos (19%, n=6). Éstos últimos están afiliados a los géneros *Metschnikowia* y *Debaryomyces*, mientras que dentro de los Basidiomicetos se encontraron cepas pertenecientes a seis géneros de levadura: *Naganishia*, *Holtermaniella*, *Vishniacozyma*, *Phenoliferia*, *Mrakia* y *Cystobasidium* (Tabla 2.2).

Tabla 2. 2 Identificación, clasificación, y número de acceso de las levaduras aisladas a partir de muestras de la Isla Rey Jorge, Antártida

Aislamiento	Identificación	Clasificación	Número de Acceso (GenBank)
LP 1.2016	<i>Metschnikowia australis</i>	Ascomiceto	MN625204
LP 2.2016	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	Basidiomiceto	MN625207
LP 3.2016	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	Basidiomiceto	MN625214
LP 5.2016	<i>Metschnikowia australis</i>	Ascomiceto	MN625221
LP 6.2016	<i>Naganishia albidosimilis</i>	Basidiomiceto	MN625222
LP 7.2016	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	Basidiomiceto	MN625226
LP 8.2016	<i>Debaryomyces</i> sp.	Ascomiceto	MN625231
LP 9.2016	<i>Metschnikowia australis</i>	Ascomiceto	MN625232
LP 1.1.2016	<i>Metschnikowia australis</i>	Ascomiceto	MN625205
LP 1.2.2016	<i>Metschnikowia australis</i>	Ascomiceto	MN625206
LP 2.1.2016	<i>Mrakia</i> sp.	Basidiomiceto	MN625208
LP 2.2.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>	Basidiomiceto	MN625209
LP 2.4.2016	<i>Phenoliferia</i> sp.	Basidiomiceto	MN625210
LP 2.5.2016	<i>Mrakia</i> sp.	Basidiomiceto	MN625211
LP 2.7.2016	<i>Mrakia</i> sp.	Basidiomiceto	MN625212
LP 2.8.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>	Basidiomiceto	MN625213
LP 3.1.2016	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	Basidiomiceto	MN625215
LP 3.2.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>	Basidiomiceto	MN625216
LP 3.4.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>	Basidiomiceto	MN625217
LP 3.5.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>	Basidiomiceto	MN625218
LP 3.6.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>	Basidiomiceto	MN625219
LP 4.2.2016	<i>Mrakia</i> sp.	Basidiomiceto	MN625220
LP 6.1.2016	<i>Mrakia</i> sp.	Basidiomiceto	MN625223
LP 6.2.2016	<i>Mrakia</i> sp.	Basidiomiceto	MN625224
LP 6.4.2016	<i>Mrakia</i> sp.	Basidiomiceto	MN625225
LP 7.1.2016	<i>Mrakia</i> sp.	Basidiomiceto	MN625227
LP 7.2.2016	<i>Phenoliferia</i> sp.	Basidiomiceto	MN625228
LP 7.3.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>	Basidiomiceto	MN625229
LP 7.4.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>	Basidiomiceto	MN625230
LP 8.1.2016	<i>Holtermanniella wattica</i>	Basidiomiceto	MN625233
LP 8.2.2016	<i>Phenoliferia</i> sp.	Basidiomiceto	MN625234
LP 11.1.2016	<i>Phenoliferia</i> sp.	Basidiomiceto	MN625235

En estudios previos se ha sugerido que las levaduras pertenecientes al *Phylum* de Basidiomicetos están mejor adaptadas a los ambientes fríos en comparación con los Ascomicetos, en concordancia con la proporción de géneros aislados (Duarte, *et al.* 2013; Martinez, *et al.* 2016; Vaz, *et al.* 2011). Sin embargo, como ya se mencionó en el Capítulo

1, existen géneros Ascomicetos que son típicamente aislados en la Antártida, principalmente de los géneros *Candida* y *Debaryomyces* (Duarte, *et al.* 2013; Vero, *et al.* 2019).

Géneros de levaduras

La Figura 2.4 muestra la distribución de géneros entre las 32 levaduras aisladas. Los géneros mayoritarios fueron *Cystobasidium* y *Mrakia*, sumando entre ambos el 50% de los aislamientos.

Se logró llegar a identificar a nivel de género y especie a un 59.4% (n=19) de los aislamientos, mientras que el resto de las levaduras no pudieron ser identificadas al nivel de especie por presentar más de un 98% de homología con secuencias tipo de distintas especies (Kurtzman 2014). Por lo tanto, estas fueron nombradas por su género seguido por “sp”.

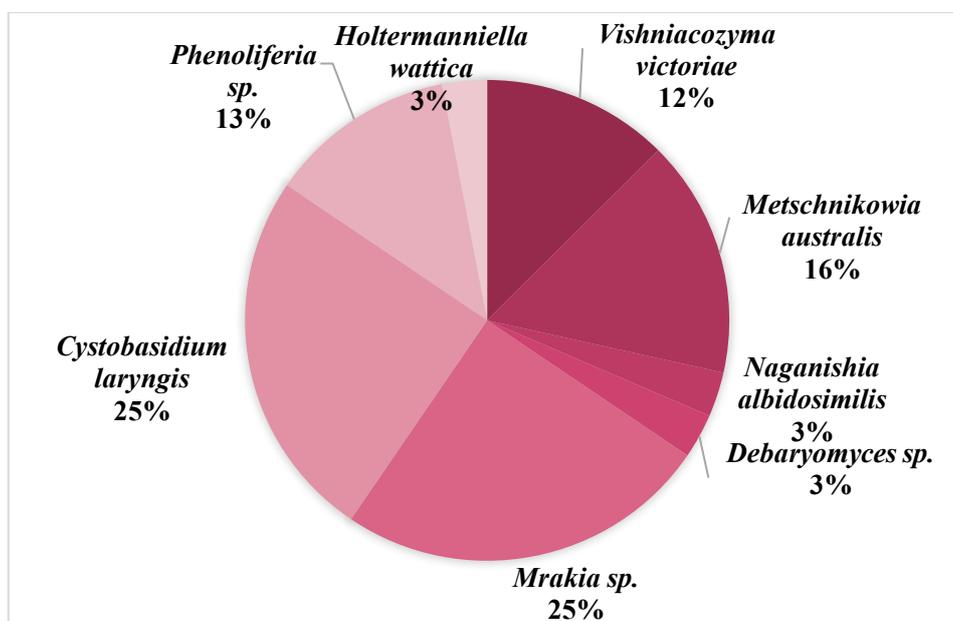


Figura 2. 4 Biodiversidad de las levaduras aisladas a partir de muestras antárticas. Se muestra la distribución porcentual de los diferentes géneros de levadura aislados a partir de muestras de la Isla Rey Jorge, Antártida.

Las cepas del género *Mrakia* fueron especialmente difíciles de identificar, dada la similitud de secuencia entre diferentes especies dentro del género. *M. gelida* y *M. frigida* poseen secuencias D1/D2 idénticas, por lo que no pueden ser identificadas mediante comparación de esta región (Fell 2011; Scorzetti, *et al.* 2002). Se realizaron tests fisiológicos de asimilación de azúcares que permitieron distinguir uno de los aislamientos: *Mrakia* sp. LP 6.2.2016, el cual no fue capaz de metabolizar maltosa ni melecitosa, lo que sugiere que se trata de una cepa de *M. frigida* (Fell 2011; Thomas-Hall, *et al.* 2010; Tsuji, *et al.* 2018). Al ser el resto de los aislamientos de este género capaces de metabolizar estos azúcares, pueden formar parte de las especies *M. gelida*, *M. blollopis* o *M. robertii* (o *M. stelviica* en el caso de LP 2.1.2016). La necesidad de un estudio en profundidad acerca de la filogenia de este género y las herramientas para su correcta identificación ha sido previamente enfatizada (Turchetti, *et al.* 2020). Entre las levaduras psicrófilas, este género abarca el 61.5% de los aislamientos (Tabla 2.2). El género *Mrakia* es típico de zonas frías, y en Antártida, y en concordancia con lo encontrado en este trabajo, ha llegado a representar un 24% de las especies presentes allí (Buzzini & Margesin 2014) (Figura 2.4). Como psicrófilo, el género se encuentra altamente adaptado al frío, y ha sido aislado no solo de ambientes antárticos (Martinez, *et al.* 2016; Tsuji 2018; Wentzel, *et al.* 2019) sino también del Ártico (Singh, *et al.* 2016), glaciares en los Alpes y en los Apeninos (Thomas-Hall, *et al.* 2010; Turchetti, *et al.* 2008; Turchetti, *et al.* 2020), agua provenientes de glaciares en la Patagonia argentina (De García, *et al.* 2007), glaciares de Groenlandia (DePriest, *et al.* 2000), bosques en Abashiri, Japón (Nakagawa, *et al.* 2004) y glaciares del noroeste de China (Luo, *et al.* 2019).

Tal como se mencionó en el Capítulo 1, el género *Phenoliferia* también fue anteriormente descrito como habitante de la región Antártica (Duarte, *et al.* 2016;

Ferreira, *et al.* 2019; Martinez, *et al.* 2016; Wentzel, *et al.* 2019). En este trabajo conformaron el 12.5% de los aislamientos.

Entre los Basidiomicetos, se aislaron miembros de los géneros *Naganishia* y *Vishniacozyma*. Tal como se señaló en la Tabla 1.2 (Capítulo 1), estos han sido reportados como dos de los géneros predominantes presentes en ambientes antárticos (Vero, *et al.* 2019). El 25% de los aislamientos en este capítulo fueron del género *Cystobasidium*. Éste fue frecuentemente encontrado en la Antártida (Martinez, *et al.* 2016; Tsuji 2018) (Tabla 1.2).

Entre los Ascomicetos, una de las cepas fue identificada como *Debaryomyces*, pero el género más representativo fue *Metschnikowia*. *M. australis* es endémica de la Antártida y se ha encontrado en asociación ecológica con macroalgas y esponjas marinas que habitan sus mares (Batista, *et al.* 2017; Gonçalves, *et al.* 2017; Vaca, *et al.* 2013). También ha sido aislada a partir de muestras de invertebrados marinos en el mar que rodea la Península Antártica (Godinho, *et al.* 2019). Tres de los cinco aislamientos de esta especie fueron obtenidos a partir de muestras de agua marina (Anexo III).

Índices de diversidad

El índice de Shannon-Wiener es una medida de la riqueza de especies y la proporción de las especies en una comunidad. También considera la distribución individual entre especies. El índice de Margalef define la diversidad de especies, mientras que el índice de Simpson es una medida de la dominancia (Pelissari, *et al.* 2018). En este trabajo se obtuvieron diversidades (Shannon=1.8) y riquezas (Magalef= 2.0) moderadas y una baja dominancia (Simpson=0.96; dominancia=0.04). Estos índices coincidieron con reportes previos sobre diversidad en regiones frías. En la Patagonia Argentina, Mestre, *et al.* (2014) reportaron índices de Shannon entre 1.46 y 2.32, al describir comunidades de

levaduras en suelos prístinos forestales. Brandão, *et al.* (2011) obtuvo un índice de Shannon de 2.5 y una baja dominancia (0.09) al estudiar comunidades del lago Nahuel Huapi. En otro estudio de la Antártida, Martínez, *et al.* (2016) obtuvieron una diversidad moderada (Shannon= 2.78), alta riqueza (Margalef= 5.59) y baja dominancia (Simpson =0.915, dominancia=0.085).

Clasificación en psicrófilos-psicrotolerantes

El sitio de muestreo se caracteriza por sus bajas temperaturas, especialmente durante el invierno y la estación de muestreo, otoño. El área de estudio ha sido abordada por varios autores en los últimos años (Carrasco, *et al.* 2012; Carrasco, *et al.* 2016; Danilovich, *et al.* 2018; Fernández, *et al.* 2017; Martínez, *et al.* 2016; Martorell, *et al.* 2019b; Martorell, *et al.* 2017; Rovati, *et al.* 2013; Wentzel, *et al.* 2019). Al incubar las levaduras a diferentes temperaturas y observar su crecimiento se detectó que un porcentaje considerable de las mismas no se desarrolló a temperaturas mayores a 15 °C (40.6%, Tabla 2.3), por ende, clasificadas como psicrófilas. Las levaduras que sí se desarrollaron a temperaturas de 25 °C y mayores fueron clasificadas como psicrotolerantes (59.4%). Si bien todos los géneros de levaduras aislados ya han sido reportados como habitantes de esta región, la proporción de levaduras psicrófilas aisladas fue más alta en comparación con otros trabajos (Martínez, *et al.* 2016; Martorell, *et al.* 2017). Esto puede estar relacionado con la estación de muestreo, ya que la mayoría de los reportes son a partir de muestreos estivales. En la Península Keller, que se encuentra ubicada geográficamente en la misma isla, el promedio de temperatura entre verano e invierno ronda los 7 grados de diferencia (Francelino, *et al.* 2011). Este factor, sumado a las diferencias en las tasas de incidencia solar, determina las especies predominantes en cada estación, lo cual está muy relacionado con el nivel de adaptación al frío de cada

género y especie. Así, el leve incremento de temperatura en los meses más cálidos favorece la predominancia de levaduras psicotolerantes, mientras que la población de psicrófilos se ve más favorecida en las estaciones más frías (Robinson 2001).

Tabla 2.3 Temperatura de crecimiento, tolerancia a NaCl y a iones metálicos por parte de las levaduras antárticas estudiadas. +, crecimiento positivo; –, no hubo crecimiento

Aislamiento	Temperatura de incubación (°C)				Clasificación	NaCl (M)	Ni ²⁺ (0.9 g l ⁻¹)	Zn ²⁺ (7.0 g l ⁻¹)	Li ⁺ (6.5 g l ⁻¹)	Cd ²⁺ (6.0 g l ⁻¹)	Cu ²⁺ (1.5 g l ⁻¹)
	4	15	25	30							
LP 1.2016	+	+	+	+	Psicrotolerante	2.5	+	+	+	–	–
LP 2.2016	+	+	+	–	Psicrotolerante	2	+	+	+	+	–
LP 3.2016	+	+	+	+	Psicrotolerante	3	+	+	+	–	+
LP 5.2016	+	+	+	+	Psicrotolerante	3.5	+	+	+	–	–
LP 6.2016	+	+	+	+	Psicrotolerante	1	+	+	+	–	–
LP 7.2016	+	+	+	+	Psicrotolerante	3.5	+	+	+	–	–
LP 8.2016	+	+	+	+	Psicrotolerante	3.5	+	+	+	–	–
LP 9.2016	+	+	+	–	Psicrotolerante	2.5	+	–	+	–	–
LP 1.1.2016	+	+	+	–	Psicrotolerante	1.5	+	–	+	–	+
LP 1.2.2016	+	+	+	+	Psicrotolerante	2.5	+	+	+	+	–
LP 2.1.2016	+	+	–	–	Psicrófilo	0	+	+	+	+	–
LP 2.2.2016	+	+	+	+	Psicrotolerante	1	+	+	+	–	–
LP 2.4.2016	+	+	–	–	Psicrófilo	0	–	–	+	+	–
LP 2.5.2016	+	+	–	–	Psicrófilo	0.5	+	+	+	+	–
LP 2.7.2016	+	+	–	–	Psicrófilo	0	–	–	+	–	–
LP 2.8.2016	+	+	+	–	Psicrotolerante	1	+	+	+	+	–
LP 3.1.2016	+	+	+	–	Psicrotolerante	1.5	+	–	+	–	–
LP 3.2.2016	+	+	+	–	Psicrotolerante	1	+	+	–	+	–
LP 3.4.2016	+	+	+	+	Psicrotolerante	1	+	+	+	–	–

LP 3.5.2016	+	+	+	+	Psicotolerante	1	-	+	+	-	-
LP 3.6.2016	+	+	+	-	Psicotolerante	1	+	+	-	+	+
LP 4.2.2016	+	+	-	-	Psicrófilo	0	+	-	+	-	-
LP 6.1.2016	+	+	-	-	Psicrófilo	0.5	-	-	+	+	-
LP 6.2.2016	+	+	-	-	Psicrófilo	0.5	+	+	+	+	-
LP 6.4.2016	+	+	-	-	Psicrófilo	0	+	-	+	+	-
LP 7.1.2016	+	+	-	-	Psicrófilo	0.5	-	-	+	-	-
LP 7.2.2016	+	+	-	-	Psicrófilo	0.5	-	+	-	+	-
LP 7.3.2016	+	+	+	-	Psicotolerante	1	+	-	+	-	-
LP 7.4.2016	+	+	+	-	Psicotolerante	1	+	+	+	-	-
LP 8.1.2016	+	+	-	-	Psicrófilo	1	+	+	+	-	-
LP 8.2.2016	+	+	-	-	Psicrófilo	0.5	-	+	-	+	-
LP 11.1.2016	+	+	-	-	Psicrófilo	0.5	+	-	+	+	-

Árboles filogenéticos

Los árboles filogenéticos fueron realizados por separado para Ascomicetos, Basidiomicetos psicrotolerantes y Basidiomicetos psicrófilos. Se incluyeron secuencias tipo de las especies más cercanas obtenidas en GenBank (Figura 2.5 A, B y C).

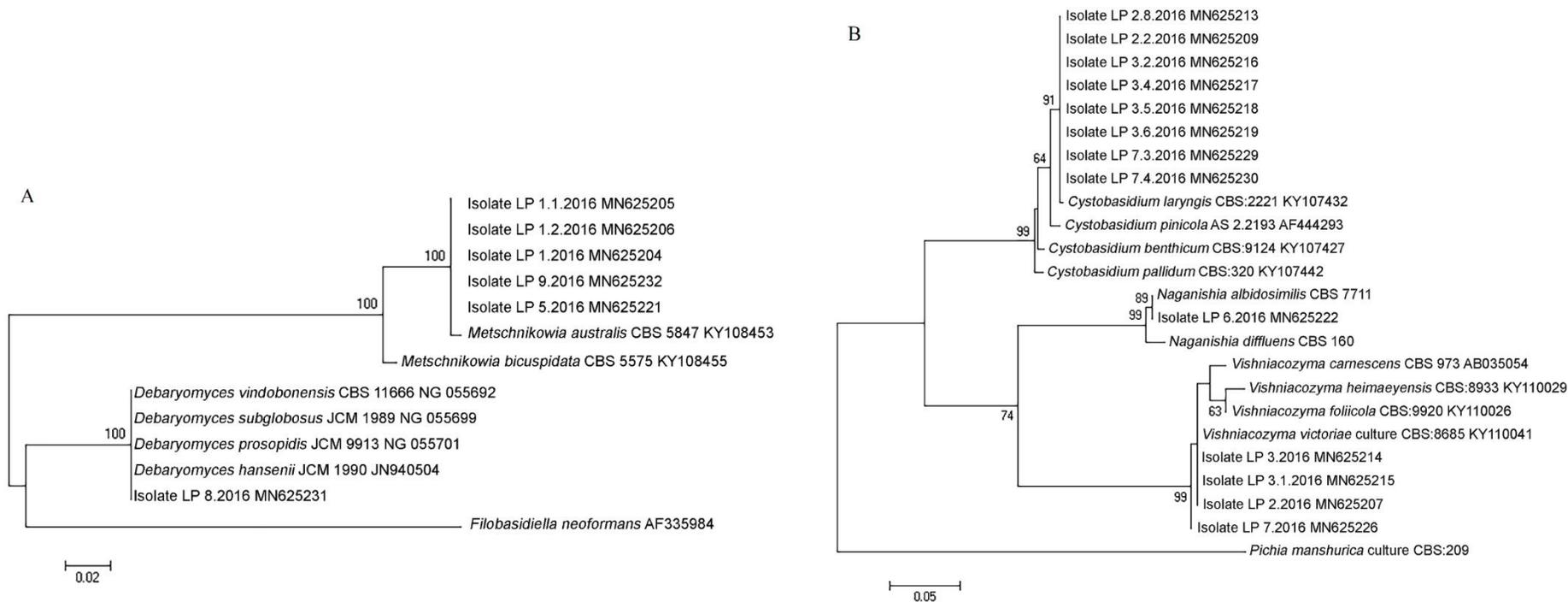


Figura 2. 5 Árboles filogenéticos basados en las secuencias del dominio D1/D2 del gen 26 s del ARN ribosómico realizado para aislados ascomicetos (A) y basidiomicetos psicrotolerantes (B), provenientes de muestras tomadas en la Isla Rey Jorge, Antártida. Para realizar los árboles se utilizó el software MEGA 6, usando el método de “Maximum Likelihood”, basado en el modelo “Kimura 2-parameter”. Se aplicaron los algoritmos “Neighbor-Join y BioNJ” para estimar las distancias filogenéticas.

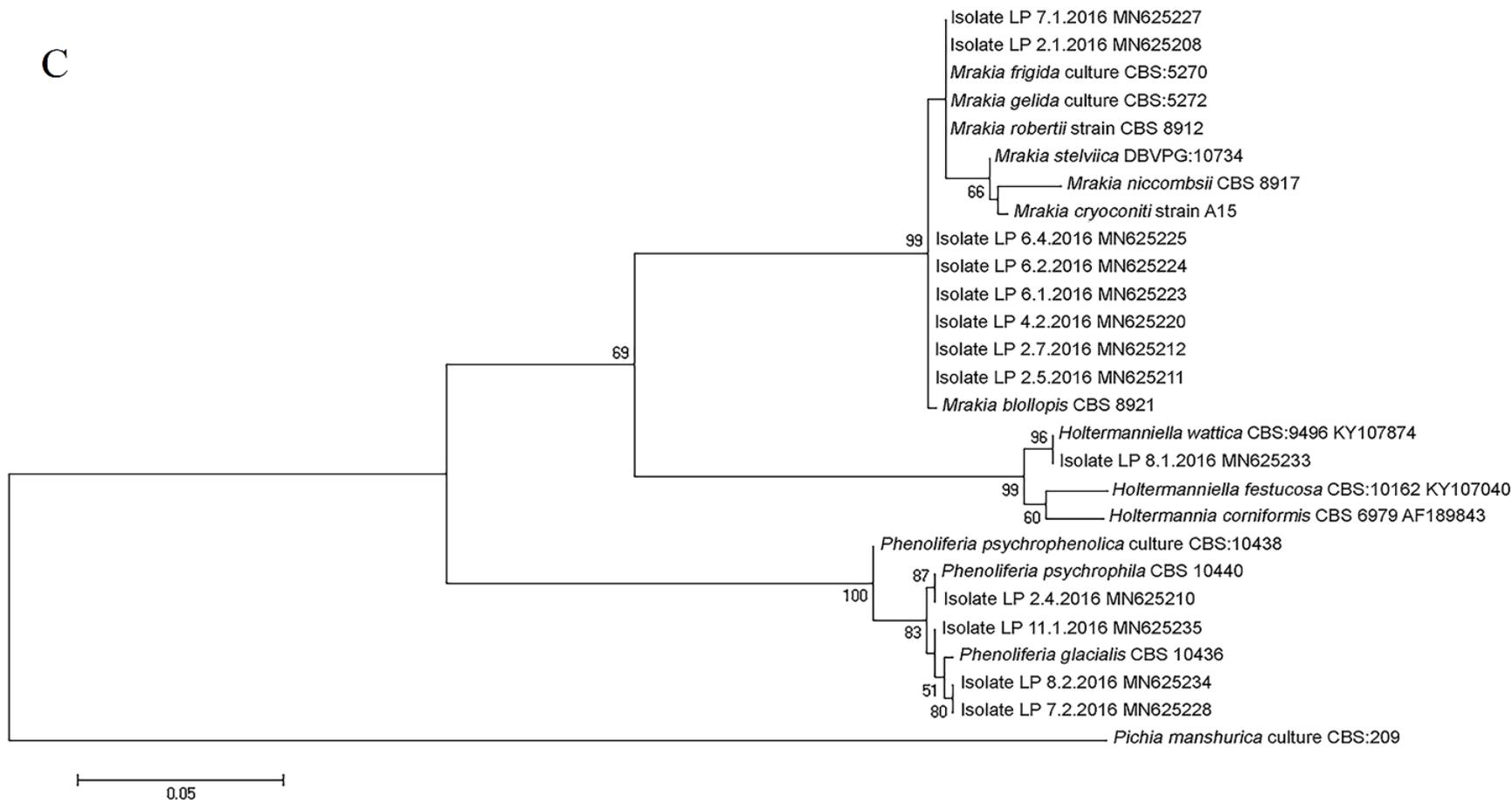


Figura 2.5 Árboles filogenéticos basados en las secuencias del dominio D1/D2 del gen 26 s del ARN ribosómico realizado para aislados psicrófilos (C) provenientes de muestras tomadas en la Isla Rey Jorge, en la Antártida.

Tolerancia a NaCl

En general, se observó una mayor tolerancia a NaCl por parte de los microorganismos psicrotolerantes. Entre éstos, las levaduras *Metschnikowia australis* LP 5.2016, *Vishniacozyma victoriae* LP 7.2016 y *Debaryomyces* sp. LP 8.2016 fueron capaces de crecer en presencia de 3.5 M de NaCl, todas ellas aisladas a partir de muestras de agua marina. *Vishniacozyma victoriae* LP 3.2016 toleró hasta 3.0 M NaCl, el 28.1% (n=9) de las levaduras totales crecieron en presencia de 2.5 M NaCl, y el 31% (n=10) en presencia de 2.0 M NaCl. La mayoría de las levaduras (84.4%, n=27) toleró 0.5 M NaCl en el medio, con excepción de algunas cepas de *Mrakia* y *Phenoliferia*. Todas las levaduras psicrotolerantes crecieron en presencia de 1 M NaCl, mientras que, entre las psicrófilas, solo *Holtermanniella wattica* fue capaz de tolerar esa concentración de sal (Tabla 2.3).

Algunos miembros de la especie *Debaryomyces hansenii* han sido reportados como halotolerantes, dado que la presencia de NaCl ha estimulado su crecimiento bajo ciertas condiciones estresantes (Aggarwal & Mondal 2009). De acuerdo con esta observación, el miembro de este género que fue aislado en este estudio, LP 8.2016, toleró, como se mencionó, hasta 3.5 M NaCl. Puede ser clasificado como halotolerante, sin embargo, hay que aclarar que ésta, junto con todas las cepas tolerantes en este estudio, crecieron mejor en ausencia de la sal, por lo que no pueden ser catalogadas como halófilas. Cavello, *et al.* (2019) también describieron altas tolerancias a NaCl por parte de cepas psicrotolerantes de *Debaryomyces hansenii* aisladas de la provincia de Tierra del Fuego.

Tolerancia a metales

Los ensayos cualitativos efectuados demostraron que muchas de las levaduras fueron capaces de crecer en presencia de Ni^{+2} (75 %, n=24) y Li^{+} (87.5%, n=28), mientras que los iones Zn^{+2} y Cd^{+2} fueron menos tolerados (56% y 44% de las levaduras, respectivamente, Tabla 2.3). En el caso del ion Cu^{+2} , muy pocas levaduras lo toleraron en las condiciones de ensayo (9%, n=3). Si bien ninguna de las levaduras tuvo tolerancia frente a todos los iones ensayados, el 28% (n=9) toleró cuatro de los cinco metales estudiados; estas levaduras tolerantes pertenecen a los géneros *Phenoliferia*, *Vishniacozyma*, *Metschnikowia*, *Mrakia* y *Cystobasidium*.

En comparación con otros estudios, esta colección de levaduras demostró mayor tolerancia a los metales: Russo, *et al.* (2016) reportaron concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de 0.78 g l^{-1} frente al ion Cd^{+2} para las levaduras psicrotolerantes *Goffeauzyma agrionensis* (antes, *Cryptococcus agrionensis*), *Rhodotorula taiwanensis*, *R. mucilaginoso* y *R. toruloides*. Al igual que en ese estudio, encontramos que Cu^{+2} fue el más tóxico para las levaduras. El Cd^{+2} también resultó altamente tóxico, mientras que los iones Li^{+} , Ni^{+2} y Zn^{+2} fueron tolerados por varias de las levaduras, al igual que observaron globalmente Russo, *et al.* (2016).

Fernández, *et al.* (2017) también evaluaron tolerancia por parte de ciertas levaduras antárticas a ciertos iones, y encontraron cepas de *Mrakia*, *Vishniacozyma*, *Metschnikowia*, *Phenoliferia* y *Holtermanniella* tolerantes a Cu^{+2} (1 mM) y Cd^{+2} (1 mM). Sin embargo, también encontraron algunas cepas de *Phenoliferia* sensibles a Cd^{+2} .

Actividades enzimáticas extracelulares

Tal como se describió en el Capítulo 1, las enzimas activas en frío son de interés emergente, debido a que pueden ser utilizadas para hidrolizar sustratos a temperaturas más bajas que las enzimas provenientes de mesófilos. La bioprospección de enzimas hidrolíticas extracelulares se realizó con todas las levaduras aisladas a partir de la isla Rey Jorge. Los resultados obtenidos en la búsqueda de producción de enzimas extracelulares utilizando sustratos específicos se detalla en la Tabla 2.4. En la Figura 2.6 pueden verse la proporción de enzimas expresadas en cada subpoblación (psicrotolerantes (4 °C o 20 °C), y psicrófilos a 4 °C). Algunas fotos representativas de la visualización de los halos de hidrólisis pueden observarse en la Figura 2.7.

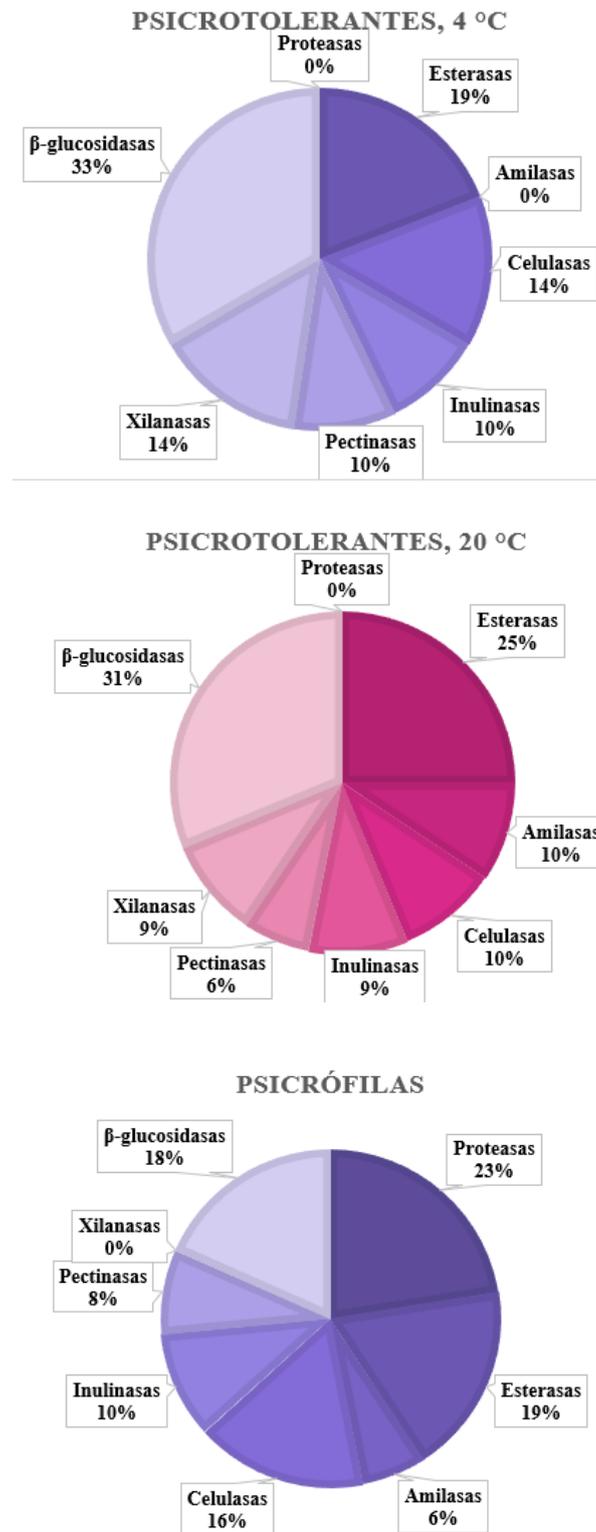


Figura 2. 6 Proporción de enzimas hidrolíticas extracelulares producidas por las levaduras psicrotolerantes a 4 °C y 20 °C, y por las levaduras psicrófilas (4 °C).

Tabla 2. 4 Perfil enzimático extracelular obtenido para cada levadura antártica estudiada. Se agruparon las levaduras psicrotolerantes y las psicrófilas. Las primeras fueron testeadas a 4 y 20 °C, mientras que las segundas fueron testeadas a 4 °C

Aislamiento	Identificación	Enzima							
		Prot	Est	Amy	Cel	Inu	Pec	Xyl	β-gluc
LP 1.2016	<i>Metschnikowia australis</i>								
LP 2.2016	<i>Vishniacozyma victoriae</i>			-/+	+/>++		+/+		+/>+
LP 3.2016	<i>Vishniacozyma victoriae</i>			-/+	+/>++	-/>+		+/>+	+/>++
LP 5.2016	<i>Metschnikowia australis</i>		-/>+						+/>+
LP 6.2016	<i>Naganishia albidosimilis</i>		-/>+			++/>-		+/>+++	++/>+++
LP 7.2016	<i>Vishniacozyma victoriae</i>		-/>++			+/>-			+/>+
LP 8.2016	<i>Debaryomyces</i> sp.								+/>+
LP 9.2016	<i>Metschnikowia australis</i>								
LP 1.1.2016	<i>Metschnikowia australis</i>								-/>+
LP 1.2.2016	<i>Metschnikowia australis</i>								
LP 2.2.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>								
LP 2.8.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>		-/>+						
LP 3.1.2016	<i>Vishniacozyma victoriae</i>			-/>+	++/>+++	-/>++	+/+	+/>+++	+/>++
LP 3.2.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>								
LP 3.4.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>								
LP 3.5.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>		+/>+			-/>+			-/>+
LP 3.6.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>		++/>+						
LP 7.3.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>		+/>++						-/>++
LP 7.4.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>		++/>+						
	Total		19						
	Total positivos (4/20 °C)	0/0	4/8	0/3	3/3	2/3	2/2	3/3	7/10
		Enzima*							

Aislamiento	Identificación	Prot	Est	Amy	Cel	Inu	Pec	Xyl	β -gluc
LP 2.1.2016	<i>Mrakia</i> sp.	++			+++				++
LP 2.4.2016	<i>Phenoliferia</i> sp.	+++	+++	+		+			++
LP 2.5.2016	<i>Mrakia</i> sp.	+++	+		+++				++
LP 2.7.2016	<i>Mrakia</i> sp.	+++	++		+++	+			++
LP 4.2.2016	<i>Mrakia</i> sp.	+++	+		+++				++
LP 6.1.2016	<i>Mrakia</i> sp.	+++	+		+++				+
LP 6.2.2016	<i>Mrakia</i> sp.	+++	+		+++				+
LP 6.4.2016	<i>Mrakia</i> sp.	+++			+++				++
LP 7.1.2016	<i>Mrakia</i> sp.	+++	+++		+++		+		++
LP 7.2.2016	<i>Phenoliferia</i> sp.	++	++	++		+	++		
LP 8.1.2016	<i>Holtermanniella wattica</i>		+++			+	+		
LP 8.2.2016	<i>Phenoliferia</i> sp.					+	++		
LP 11.1.2016	<i>Phenoliferia</i> sp.	+		+					
	Total		13						
	Total positivos (4 °C)	11	9	3	8	5	4	0	9

*Prot, proteasa; Est, esterasa; Amy, amilasa; Cel, celulasa; Inu, inulinasa; Pec, pectinasa; Xyl, xilanasa; β -gluc, β -glucosidasa. +++, actividad considerable; ++, actividad fuerte; +, actividad débil; -, no se detectó actividad. Los espacios vacíos indican que la levadura no produjo la enzima correspondiente

De manera global, se observó que, entre las levaduras psicrotolerantes, el 68% (n=13) produjo al menos una de las actividades enzimáticas extracelulares. Todas las levaduras psicrófilas produjeron al menos dos de las actividades enzimáticas buscadas, y más del 80% produjo tres o más (Tabla 2.4).

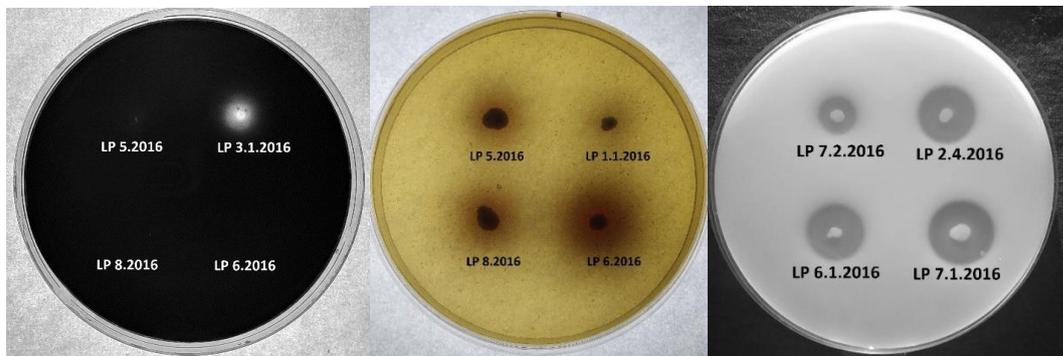


Figura 2. 7 Algunos de los halos de degradación obtenidos durante el screening de enzimas en medio agarizado. De izquierda a derecha: A) medio suplementado con almidón, para la búsqueda de amilasas. B) medio suplementado con esculina para la búsqueda de β -glucosidasas. C) Medio agar-leche, en donde se observa los halos degradativos indicando la presencia de proteasas.

Las amilasas, lipasas y proteasas activas en frío son muy útiles en detergentes para lavar la ropa: su adición permite mejorar la eficiencia del lavado a temperaturas más bajas, preservando la integridad de las prendas y reduciendo el gasto energético. Al buscar amilasas, se observó que el 19% del total de los aislamientos (n=6) fue capaz de producirlas (Tabla 2.4), mientras que sólo las levaduras psicrófilas las produjeron a 4 °C (9.5%, n=3). Esta actividad hidrolítica, si bien presente, no ha sido de las mayormente expresadas, con 16% y 6% de levaduras positivas en dos estudios recientes de bioprospección entre levaduras antárticas (Da Silva, *et al.* 2022; Martinez, *et al.* 2016), y un 7% de levaduras psicrotolerantes amilolíticas en un estudio reciente de Tierra del Fuego (Cavello, *et al.* 2019). En cuanto a los géneros productores de este tipo de enzima, en este trabajo fueron *Vishniacozyma* entre las levaduras psicrotolerantes y *Phenoliferia*

entre las psicrófilas. Otros géneros de levaduras adaptadas al frío como *Candida*, *Naganishia*, *Tausonia*, *Mrakia*, *Pichia*, *Leucosporidium*, *Cystofilobasidium*, *Solicoccozyma*, *Metschnikowia*, *Debaryomyces*, *Glaciozyma*, *Saitozyma* y *Bannozyma* fueron reportados recientemente como amilolíticos, lo que demuestra que esta característica es dependiente de la cepa (Cavello, *et al.* 2019; Da Silva, *et al.* 2022; Martinez, *et al.* 2016; Martorell, *et al.* 2017).

Las esterasas son un tipo de lipasas que se diferencian debido a su acción catalítica específicamente sobre los enlaces éster de los lípidos con ácidos grasos de cadena corta. La actividad esterasa ha sido una de las más frecuentemente observadas en levaduras adaptadas al frío (Da Silva, *et al.* 2022; De García, *et al.* 2007; Martinez, *et al.* 2016). En el presente trabajo, el 42% de las levaduras psicotolerantes y el 69% de las levaduras psicrófilas produjeron esta actividad hidrolítica. Dentro del último grupo, el género *Mrakia* representó el 67% de las levaduras que produjeron esterasas. Una cepa de este género fue estudiada para ser utilizada en la hidrólisis de la grasa de leche a bajas temperaturas (4-15 °C) (Tsuji, *et al.* 2015). Tsuji (2018) reportó que la producción de esterasas por parte de las levaduras adaptadas al frío se vio inducida por bajas temperaturas. En contraposición, en este trabajo, las cepas *Metschnikowia australis* LP 5.2016, *Naganishia albidosimilis* LP 6.2016, *Vishniacozyma victoriae* LP 7.2016 y *Cystobasidium laryngis* LP 2.8.2016 produjeron esterasas a 20 °C, pero no a 4 °C (Tabla 2.4). La expresión de esta actividad hidrolítica fue muy similar a 4 °C y a 20 °C (Figura 2.6). La mayoría de las levaduras psicrófilas que produjeron esterasas también produjeron celulasas, proteasas y β -glucosidasas (Figura 2.9).

Notablemente, ninguna de las levaduras psicotolerantes generó un halo de degradación en las placas de leche agarizadas, pero la mayoría de las psicrófilas si lo hicieron (85% de ellas, n=11); de hecho, fue la actividad hidrolítica más expresada entre

psicrotolerantes (Figura 2.6). En cuanto a los géneros, se observó que todos los aislamientos identificados como *Mrakia* presentaron esta característica, y 75% de las levaduras del género *Phenoliferia*. Se ha reportado en otros trabajos una baja proporción de levaduras psicrotolerantes produciendo proteasas: Cavello, *et al.* (2019) obtuvieron un 20% de levaduras proteolíticas a partir de una colección aislada de Tierra del Fuego, mientras que Martínez, *et al.* (2016) también reportaron un 20% de proteolíticas en una colección de levaduras antárticas. Cepas de *Vishniacozyma victoriae* fueron reportadas como proteolíticas recientemente, aunque ninguna de las cepas de esta especie produjo proteasas en el presente trabajo (Da Silva, *et al.* 2022; Martínez, *et al.* 2016).

Las celulasas son enzimas importantes desde un punto de vista industrial, principalmente hablando de la biodegradación de grandes cantidades de desechos celulósicos y la producción de bioetanol. Las celulasas también son muy utilizadas durante el bio-pulido de textiles, en la industria de los detergentes, la de alimentos y la de piensos. Las celulasas activas en frío son requeridas ya que contribuyen al ahorro energético permitiendo trabajar a bajas temperaturas (Gupta, *et al.* 2020). Al realizar la bioprospección actividad celulolítica, ésta se evidenció en un 34.4 % (psicrófilas y psicrotolerantes, n=11) de las levaduras a 4 °C, y también fue detectada a 20 °C (15.7% de las psicrotolerantes, n=3). Las levaduras psicrotolerantes que produjeron celulasas pertenecieron al género *Vishniacozyma*, mientras que, entre las psicrófilas, las que produjeron celulasas fueron todas del género *Mrakia*. Martorell, *et al.* (2017) y Da Silva, *et al.* (2022) también reportaron la producción de celulasas por levaduras de estos mismos géneros, en concordancia con lo encontrado en este trabajo (Tabla 2.4), mientras que Cavello, *et al.* (2019) encontraron cepas de los géneros *Tausonia* y *Debaryomyces*, también productoras. En los diagramas de Venn (Figura 2.8 y 2.9) se puede observar que las levaduras que produjeron celulasas también produjeron otro/s tipo/s de enzimas/s.

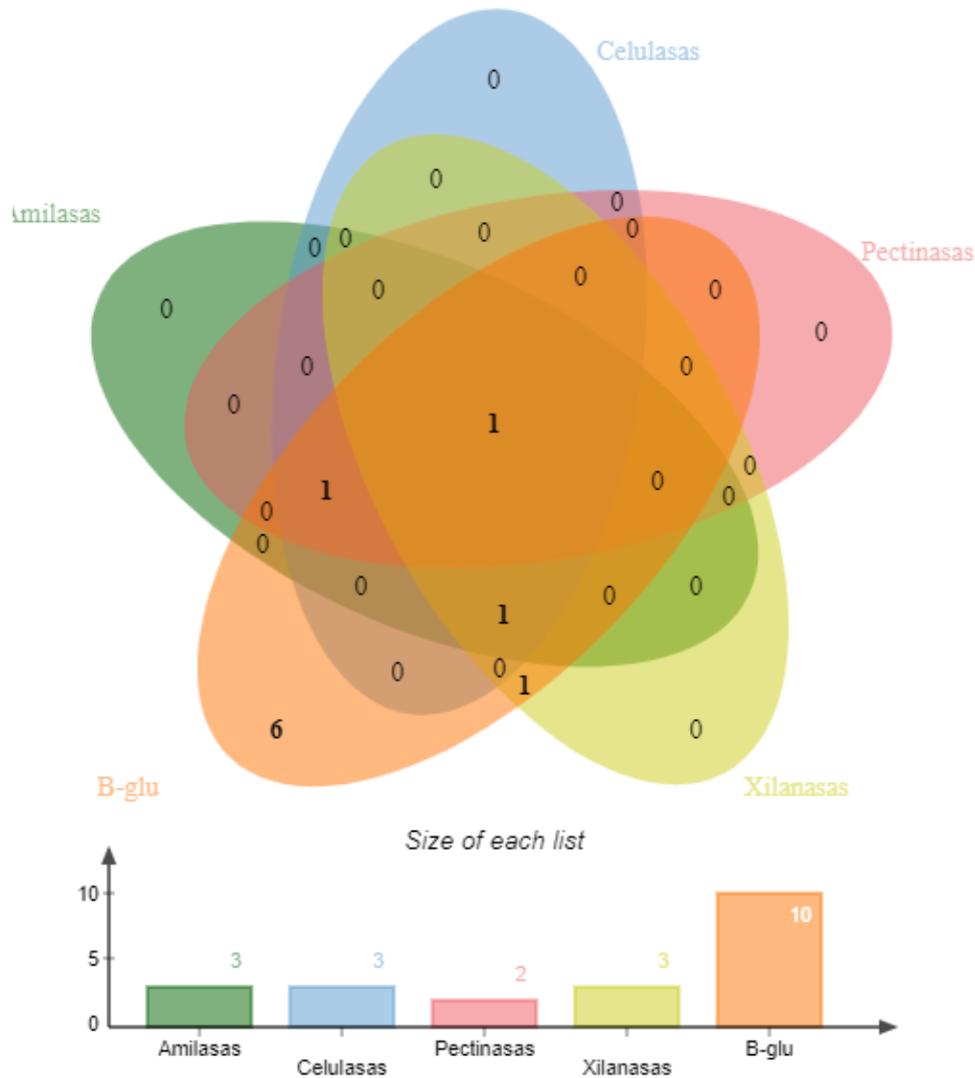


Figura 2. 8 Diagrama de Venn que muestra la cantidad de cepas que compartieron la expresión de más de una enzima. Se graficaron los resultados obtenidos para las cepas psicrotolerantes (20 °C) en cuanto a la producción de amilasas, celulasas, pectinasas, xilanasas y β -glucosidasas (B-glu). Software: (Bardou, et al. 2014).

Varias plantas almacenan inulina en sus raíces, tubérculos y bulbos, como la achicoria, la dalia y las plantas del género *Camassia*. Esta inulina tiene un alto valor biotecnológico y se considera una candidata destacada como fuente renovable de carbohidratos, ya que puede ser utilizada para obtener fructosa utilizando inulinasas. Muy poco ha sido estudiado sobre este tipo de enzimas a partir de microorganismos psicrófilos, aunque, así como con las otras enzimas hidrolíticas, la búsqueda de inulinasas activas en frío ha sido planteada en algunos estudios, en la búsqueda de opciones con menos requerimientos

energético en algunos procesos que las utilizan (Zhou, *et al.* 2014; Zhou, *et al.* 2015). Al realizar la búsqueda de inulinasas, se observó que estas fueron expresadas por el 34% (n=11) de las levaduras, mayormente de naturaleza psicrófila (38.5% entre las psicrófilas, n=5). Si bien fue producida por mayor número de levaduras psicrófilas, representa un porcentaje similar entre el resto de las enzimas expresadas por parte de las psicotolerantes (Figura 2.6). Entre las positivas, una gran diversidad de géneros presentó esta característica: *Vishniacozyma*, *Naganishia*, *Cystobasidium*, *Phenoliferia*, *Mrakia* y *Holtermanniella*. En estudios previos también se encontró que esta actividad hidrolítica, si bien no es la expresada en mayor proporción, se comparte entre una gran diversidad de géneros (Cavello, *et al.* 2019; Martinez, *et al.* 2016).

Las xilanasas fueron las enzimas menos producidas por las levaduras, con un 12.5% (n=4) entre las psicotolerantes, mientras que no fue producida por levaduras psicrófilas (Figura 2.6). Las xilanasas hidrolizan el xilano, componente de las paredes vegetales. Estas enzimas tienen aplicaciones en la industria del papel, y durante la obtención de combustibles líquidos a partir de lignocelulosa. Entre los estudios de xilanasas activas en frío a partir de levaduras podemos citar algunos artículos en los que se estudia la producción de este tipo de enzimas producidas por levaduras del ex-género *Cryptococcus* (ahora, *Vishniacozyma*, *Naganishia* y *Goffeauzyma*) y *Cladosporium* (Del-Cid, *et al.* 2014; Gomes, *et al.* 2000; Petrescu, *et al.* 2000; Scorzetti, *et al.* 2000). En concordancia, se observó aquí que las levaduras psicotolerantes que produjeron xilanasas fueron *Vishniacozyma victoriae* LP 3.2016, *Naganishia albidosimilis* LP 6.2016 y *Vishniacozyma victoriae* LP 3.1.2016. Martorell, *et al.* (2017) y Martinez, *et al.* (2016) también realizaron una bioprospección de enzimas y encontraron levaduras del género *Vishniacozyma* con esta capacidad.

La industria alimenticia es la consumidora por excelencia de pectinasas, utilizadas para eliminar la pectina durante el procesamiento del jugo, y durante la manufactura del vino. Dado que el vino se produce a bajas temperaturas (10–15 °C), la necesidad de pectinasas activas en frío es imperativa, y permite, entre otras cosas, retener diferentes propiedades organolépticas de la uva en el vino (Adapa, *et al.* 2014). En este capítulo se observó la producción de este tipo de enzimas por cuatro géneros de Basidiomicetos: *Vishniacozyma*, *Mrakia*, *Phenoliferia* y *Holtermaniella*. Puede observarse que fueron producidas en la misma proporción entre psicrófilos y psicrotolerantes (6-10%, Figura 2.6). Existen reportes de cepas pectinolíticas entre levaduras antárticas: Martínez, *et al.* (2016) reportaron un 9-14%, y Martorell, *et al.* (2017) reportaron 31% de cepas pectinolíticas. *Mrakia frigida* fue estudiada previamente como productora de poligalacturonasas, pectin liasas y pectin metil-esterasas, todos tipos diferentes de pectinasas (Margesin, *et al.* 2005; Nakagawa, *et al.* 2004).

Las enzimas β -glucosidasas están involucradas en el último paso de la degradación enzimática de la celulosa, componente mayoritario de la biomasa vegetal (Ahmed, *et al.* 2017). Estas enzimas cumplen un papel crucial en la transformación de celulosa en monómeros de glucosa. También, tal como se mencionó en el Capítulo 1, son capaces de actuar sobre monoterpenos que se encuentran en forma de glicósidos conjugados en las uvas y otras frutas. Por lo tanto, la aplicación de estas enzimas durante la manufactura de vinos o jugos de frutas permite aumentar los aromas, desarrollando aromas más característicos, dependiendo de la especie de fruta y la especificidad de la enzima involucrada (de Ovalle, *et al.* 2018). En la bioprospección llevada a cabo, el 59% (n=19) de los aislamientos produjo β -glucosidasas, fue la más expresada entre psicrotolerantes y la segunda más expresada (luego de las proteasas) entre los psicrófilos (Figura 2.6). Cavello, *et al.* (2019) reportaron un 35.5% de levaduras psicrotolerantes de Tierra del

Fuego como productoras de este tipo de enzima a 6 °C. Pavlova, *et al.* (2002) buscaron levaduras productoras de β -glucosidasas entre aislamientos obtenidos a partir de muestras tomadas en la isla Livingston, en la Antártida, y encontraron cepas productoras pertenecientes al ex-género *Cryptococcus*. En concordancia, en este estudio se observó que todas las cepas pertenecientes a las especies *Vishniacozyma victoriae* y *Naganishia albidosimilis* presentaron esta característica (Tabla 2.4).

En la Tabla 2.4 puede verse que seis de los aislamientos (psicrotolerantes) no fueron capaces de producir ninguna de las enzimas testeadas a 4 °C, miembros de los géneros *Cystobasidium* y *Metchnikowia*. De modo opuesto, *Vishniacozyma victoriae* LP 3.2016, *Phenoliferia psychrophila* LP 2.4.2016, *Mrakia* sp. LP 2.7.2016, *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 y *Phenoliferia* sp. LP 7.2.2016 demostraron la capacidad de producir 5 de las 8 actividades enzimáticas buscadas, y *V. victoriae* LP 3.1.2016 y *V. victoriae* LP 2.2016 produjeron 6 de las 8 actividades enzimáticas estudiadas.

En la Figura 2.9 se puede observar un diagrama de Venn mostrando la cantidad de levaduras psicrófilas que expresaron las diferentes combinaciones de enzimas elegidas. Puede verse que, si bien las proteasas y β -glucosidasas fueron las enzimas más expresadas, todas (excepto una cepa expresando una proteasa) las cepas produjeron además otra/s enzimas, Una de las cepas estudiadas produjo celulasas, esterases, proteasas, pectinasas y β -glucosidasas: *Mrakia* sp. LP 7.1.2016. La producción de enzimas en medio líquido por parte de esta levadura será estudiada en los próximos capítulos.

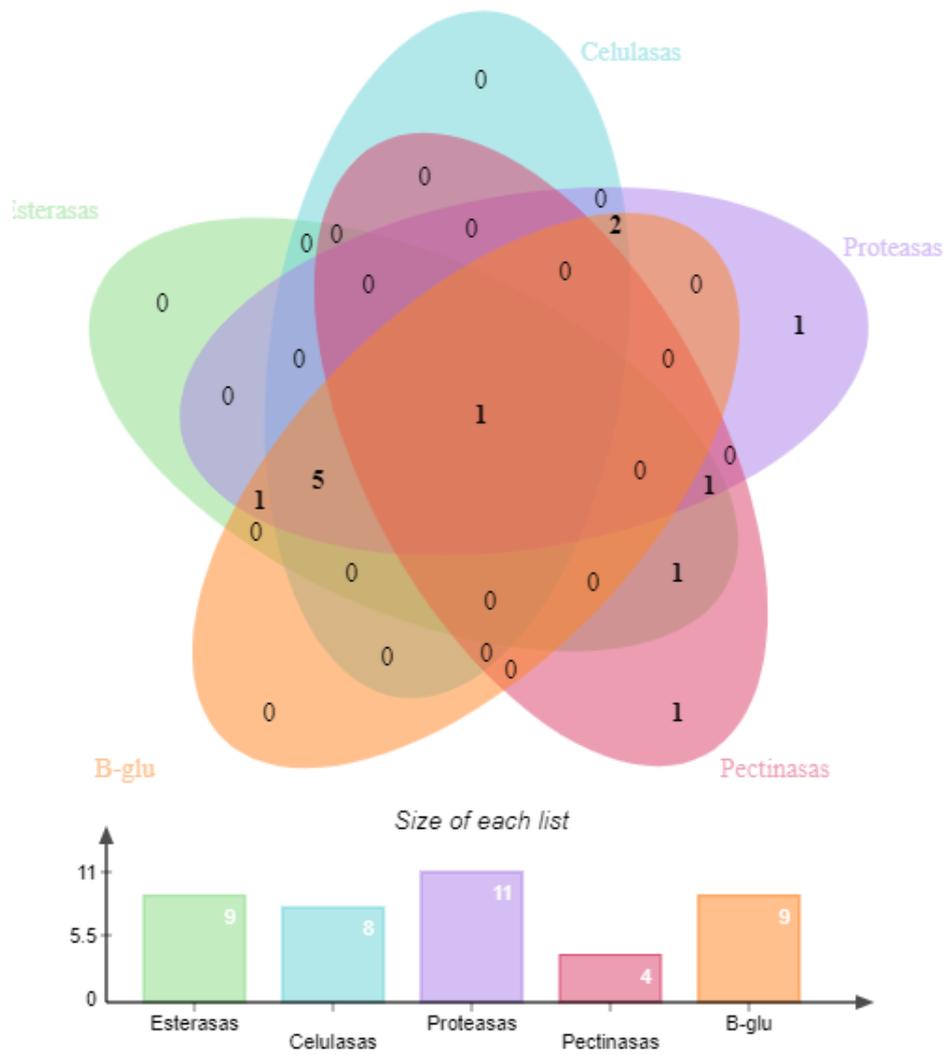


Figura 2.9 Diagrama de Venn que muestra la cantidad de cepas que compartieron la expresión de más de una enzima. Se graficaron los resultados obtenidos para las cepas psicrófilas en cuanto a la producción de esterazas, celulasas, proteasas, pectinasas y β -glucosidasas (B-glu). Software: (Bardou, et al. 2014).

Decoloración de colorantes textiles: *screening* en medio sólido

La capacidad de las levaduras antárticas aisladas de degradar colorantes a temperaturas bajas es una característica fundamental para el diseño de un plan de biorremediación a temperaturas medias y bajas, sin necesidad de un control estricto de la temperatura. Un diseño así sería coherente con las nuevas tendencias más ecológicas, debido a la importante reducción energética del proceso. Actualmente las tecnologías para descontaminar este tipo de efluente plantean su tratamiento (y reducción de la toxicidad) antes del vertido a los cursos de agua (Amoozegar, *et al.* 2015).

Se realizó una primera aproximación de la capacidad de las levaduras aisladas de decolorar medio suplementado con diferentes colorantes textiles. El ensayo de remoción de colorante en medio agarizado fue realizado a 4 °C y/o a 20 °C utilizando tres colorantes diferentes, uno mono-*azo* (Naranja Reactivo 16), uno di-*azo* (Negro Reactivo 5) y un colorante de antraquinona (Azul Reactivo 16). Luego de la incubación, se observó tanto la remoción del colorante del medio, como la coloración de las colonias. Como se detalló en el Capítulo 1, la presencia de colorante en la biomasa luego de la decoloración del medio es indicativo de que la remoción se podría estar dando por el mecanismo de bioacumulación. De no acumularse el colorante, se infiere un mecanismo degradativo.

De forma global, en la Tabla 2.5 y en la Figura 2.10 se muestra el porcentaje de levaduras que decoloraron y/o bioacumularon cada uno de los colorantes a las diferentes temperaturas ensayadas, y la relación entre la decoloración de distintos colorantes por parte de las levaduras estudiadas. Los perfiles de decoloración y bioacumulación para cada levadura se muestran en la Tabla 2.6.

Tabla 2.5 Proporción de las levaduras que lograron la decoloración del medio para cada colorante, y aquellas que bioacumularon el colorante en sus biomosas. Se muestran los resultados obtenidos para las levaduras psicotolerantes, las cuales fueron testeadas a 4 °C y a 20 °C, y las levaduras psicrófilas, que fueron testeadas a 4 °C

Colorante	%D	%B	%D	%B	%D	%B
	Levs. Psicotolerantes (4° C)		Levs. Psicotolerantes (20 °C)		Levs. Psicrófilas (4 °C)	
NR 16	68.4	15.8	84.2	31.6	92.3	23.1
NR 5	84.2	21.1	100.0	42.1	100.0	7.7
AR 19	63.2	42.1	100.0	78.9	84.6	53.8

NR 16: Naranja Reactivo 16; NR 5: Negro Reactivo 5; AR 19, Azul Reactivo 19

%D: porcentajes de levaduras que lograron la decoloración del agar; %B: porcentaje de levaduras que conservaron el color del colorante en sus biomosas (bioacumulación)

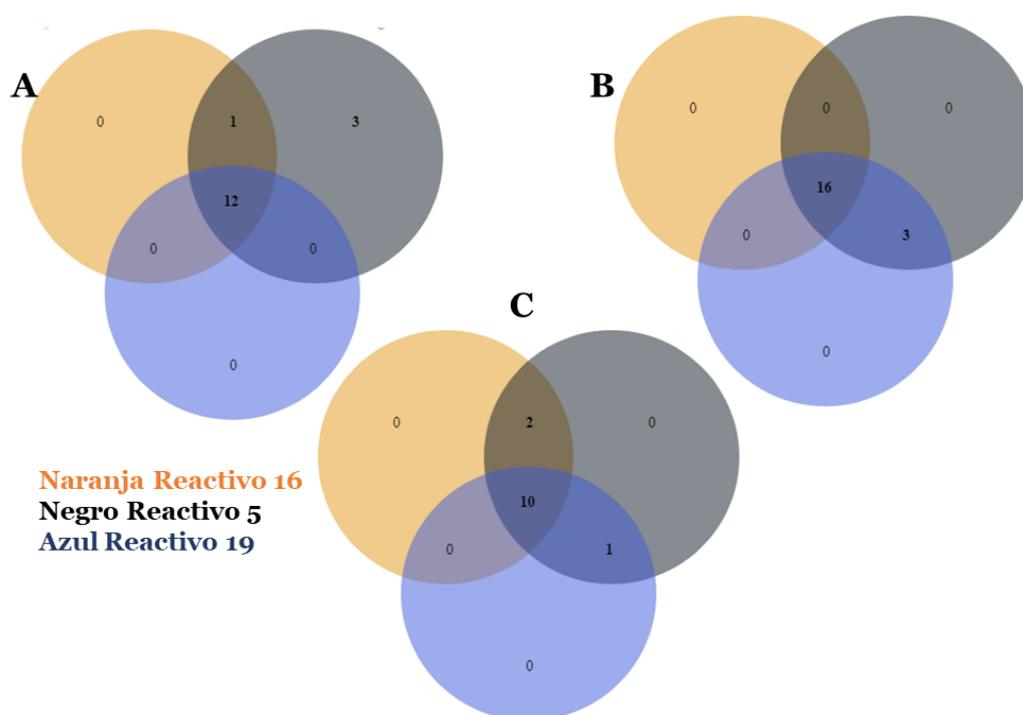


Figura 2.10 Los gráficos de Venn muestran la relación entre la decoloración de distintos colorantes y las cepas involucradas para levaduras psicotolerantes a 4 °C (A), y a 20 °C (B), y levaduras psicrófilas a 4 °C (C). Software: (Bardou, et al. 2014).

Todas las levaduras fueron capaces de remover al menos un colorante del medio entre los tres ensayados (Tabla 2.5). A 4 °C, el medio más decolorado fue el que contenía Negro

Reactivo 5 (91% de las levaduras totales, n=29, Figura 2.11, Tabla 2.5). Por el contrario, el medio con Azul Reactivo 16 fue el menos decolorado (72%, n=23). Esta diferencia sin embargo no fue observada en los ensayos a 20 °C (temperatura a la cual sólo se testearon las levaduras psicotolerantes). A esta última temperatura, el colorante menos decolorado fue el Naranja Reactivo (84%, n=16). En términos generales, las levaduras que lograron decolorar el medio con un colorante, pudieron decolorar (en casi todos los casos) los tres colorantes (Figura 2.10), siendo observado un mayor porcentaje de decoloración por parte de las levaduras psicotolerantes a 20 °C.

Tabla 2. 6 Capacidad de las levaduras aisladas de la Isla Rey Jorge (Antártida) de decolorar medio sólido suplementado con colorantes textiles (D) y bioacumularlo en sus biomásas (B). Se presentan primero los resultados para levaduras psicrotolerantes, testeadas a 4 °C y a 20 °C, y luego las levaduras psicrófilas, testeadas a 4 °C

Aislamiento	Identificación	Naranja Reactivo 16		Negro Reactivo 5		Azul Reactivo 19	
		4 °C (D/B)*	20 °C (D/B)	4 °C (D/B)	20 °C (D/B)	4 °C (D/B)	20 °C (D/B)
LP 1.2016	<i>Metschnikowia australis</i>	-/-	+/-	-/-	+/-	-/-	+/-
LP 2.2016	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	+/+	+/+	+/-	+/+	+/-	+/+
LP 3.2016	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+
LP 5.2016	<i>Metschnikowia australis</i>	+/+	+/-	+/+	+/-	+/-	+/-
LP 6.2016	<i>Naganishia albidosimilis</i>	+/-	+/+	+/-	+/+	+/+	+/+
LP 7.2016	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+/-
LP 8.2016	<i>Debaryomyces</i> sp.	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+
LP 9.2016	<i>Metschnikowia australis</i>	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+
LP 1.1.2016	<i>Metschnikowia australis</i>	+/-	-/-	+/-	+/+	+/-	+/+
LP 1.2.2016	<i>Metschnikowia australis</i>	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-
LP 2.2.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+
LP 2.8.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+	+/+
LP 3.1.2016	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	+/+	+/+	+/-	+/+	+/+	+/+
LP 3.2.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+	+/+
LP 3.4.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+	+/+
LP 3.5.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+	+/+
LP 3.6.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	-/-	+/+
LP 7.3.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+	+/+
LP 7.4.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+	+/+
Total		19					
Total positivos (D/B 4 °C o 20 °C)		13/3	16/6	16/4	19/8	12/8	19/15

Aislamiento	Identificación	Naranja Reactivo 16 4 °C (D/B)*	Negro Reactivo 5 4 °C (D/B)	Azul Reactivo 19 4 °C (D/B)
LP 2.1.2016	<i>Mrakia</i> sp.	+/-	+/+	+/+
LP 2.4.2016	<i>Phenoliferia</i> sp.	-/-	+/-	+/-
LP 2.5.2016	<i>Mrakia</i> sp.	+/+	+/-	+/+
LP 2.7.2016	<i>Mrakia</i> sp.	+/+	+/-	+/+
LP 4.2.2016	<i>Mrakia</i> sp.	+/-	+/-	+/+
LP 6.1.2016	<i>Mrakia</i> sp.	+/-	+/-	-/-
LP 6.2.2016	<i>Mrakia</i> sp.	+/-	+/-	+/+
LP 6.4.2016	<i>Mrakia</i> sp.	+/-	+/-	+/+
LP 7.1.2016	<i>Mrakia</i> sp.	+/-	+/-	+/+
LP 7.2.2016	<i>Phenoliferia</i> sp.	+/-	+/-	+/-
LP 8.1.2016	<i>Holtermanniella wattica</i>	+/+	+/-	+/-
LP 8.2.2016	<i>Phenoliferia</i> sp.	+/-	+/-	+/-
LP 11.1.2016	<i>Phenoliferia</i> sp.	+/-	+/-	-/-
	Total	13		
	Total positivos	12/3	13/1	11/7

El medio normal de decoloración (NDM) fue suplementado con cada uno de los tres colorantes testeados (100 ppm, ALCONIC SRL). *A + indica decoloración (D) del medio y B indica bioacumulación en la biomasa de la levadura. – indica que el medio no fue decolorado

A 20 °C, todas las levaduras psicrotolerantes decoloraron el medio suplementado con Azul Reactivo 19 y Negro Reactivo 5, mientras que el 84% decoloró el medio suplementado con Naranja Reactivo 16 (Tabla 2.4). A 4 °C, más del 60% de las levaduras psicrotolerantes lograron la remoción de los tres colorantes, siendo el Azul Reactivo 5 el más decolorado (84% de las levaduras, Tabla 2.4, Figura 2.10).

Todas las cepas psicrófilas decoloraron el medio suplementado con Negro Reactivo 5, entre ellas el 92% lo hizo mediante biodegradación, siendo notable el bajo porcentaje de bioacumulación de este colorante en comparación con el resto, lo que sugeriría que fue más fácil de degradar que los otros dos (Tabla 2.5). El Naranja Reactivo 16 fue removido por el 92% de las levaduras psicrófilas, y degradado por el 77% (Tabla 2.5).

Se observó una relación entre la composición química del colorante y el nivel de biodegradación: el colorante Azul Reactivo 19 (antraquinónico) fue degradado (decoloración del medio sin bioacumulación) por el 25% del total de las levaduras a 4 °C, mientras que los colorantes *azo* fueron degradados por el 75% (azul) y 59% (naranja) de las levaduras a la misma temperatura (Tabla 2.6). Esto parecería indicar que el colorante antraquinónico es más difícil de degradar que los colorantes *azo*. Entre los *azo*, el Naranja Reactivo 16 parece ser más difícil de degradar que el Negro Reactivo 5, aun cuando el Negro posee dos enlaces *azo*.



Figura 2. 11 Ensayo de decoloración en placa del colorante Negro Reactivo 5.

La decoloración del medio tuvo dependencia de la temperatura de incubación y de la cepa involucrada. En cuanto a la temperatura, entre las levaduras psicotolerantes se observó a 20 °C una mayor decoloración respecto de 4 °C. El porcentaje de bioacumulación decreció considerablemente al descender la temperatura del ensayo, siendo más acumulado el colorante Azul Reactivo 19 a 20 °C (Tabla 2.4).

Entre los géneros de levaduras, prácticamente todos los miembros de *Cystobasidium laryngis* (n=8) y *Mrakia* sp. (n=7) fueron capaces de decolorar el medio con los tres colorantes ensayados, acumulando en la mayor parte de los casos el colorante Azul Reactivo 19 en sus biomasas (Tabla 2.6). Por otro lado, miembros de *Metschnikowia australis* (n=5) demostraron ser menos efectivos en la decolorización a 4 °C, prefiriendo una temperatura de 20 °C.

Rovati, *et al.* (2013) estudiaron la capacidad de cepas antárticas de decolorar medio suplementado con colorantes *azo*. Ellos encontraron un 33% de levaduras con esta capacidad, pertenecientes a los géneros *Rhodotorula*, *Mrakia*, *Leucosporidiella*, *Bullera*, *Debaryomyces*, *Vishniacozyma*, *Solicoccozyma* y *Exophiala*. En ese trabajo, ellos utilizaron una mezcla de cuatro colorantes (Azul Reactivo 221, Rojo Reactivo 141, Negro

Reactivo 5 y Amarillo Reactivo 84) en concentración de 200 ppm. En este trabajo se coincide en la capacidad de los géneros *Mrakia*, *Debaryomyces* y *Vishniacozyma* de decolorar estos tipos de colorantes.

Martorell, *et al.* (2012) estudiaron levaduras aisladas de la selva Las Yungas para lograr la decoloración de medio suplementado con colorantes *azo* (Rojo Reactivo 141, Amarillo Reactivo 84, Negro Reactivo 5 y Azul Reactivo 221), y seleccionaron miembros de los géneros *Tricosporum*, *Barnettozyma*, *Candida* y *Cyberlindnera*, basados en su capacidad de decolorar el medio al tiempo que asimilaban el colorante como fuente de carbono y nitrógeno. Ellos pudieron encontrar una relación entre la complejidad química molecular de los colorantes con la velocidad de degradación en medio sólido.

CONCLUSIONES DE ESTE CAPÍTULO

Las enzimas activas en frío poseen propiedades atractivas para su utilización en diversos procesos. Los resultados de este capítulo demuestran que las levaduras aisladas a partir de muestras de la Isla Rey Jorge en 2016 representan una interesante fuente de nuevas enzimas hidrolíticas, siendo un puntapié inicial para el planteo del estudio de la producción, caracterización y aplicaciones biotecnológicas de enzimas hidrolíticas adaptadas al frío.

Además de mostrar potencial para la producción de enzimas potencialmente útiles desde un punto de vista industrial, las levaduras aisladas demostraron la potencial capacidad de ser utilizadas en diferentes tratamientos de decoloración de efluentes textiles, lo que podría ser útil para futuros estudios en este campo.

Entre las levaduras psicrotolerantes, se destaca el aislamiento *Vishniacozyma victoriae* LP 3.1.2016, el cual demostró un perfil de producción de enzimas hidrolíticas interesante, siendo además efectiva en la remoción del colorante del medio mediante bioacumulación. Entre las levaduras psicrófilas, *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 y *Phenoliferia* sp. LP 7.2.2016 produjeron cinco actividades enzimáticas diferentes, y también demostraron la capacidad de bioacumular y biodegradar colorantes textiles a bajas temperaturas.

Gran parte de los resultados de este capítulo fueron publicados en el siguiente artículo: Yeasts from the Maritime Antarctic: tools for industry and bioremediation (2022). *Antarctic Science*, 34, p. 16-28. **BEZUS, B.**, GARMEDIA, G., VERO, S., CAVALITTO, S. & CAVELLO, I. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0954102021000420>.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAPA, V., RAMYA, L. N., PULICHERLA, K. K. & RAO, K. R. S. S. 2014. Cold active pectinases: Advancing the food industry to the next generation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172, <http://doi.org/10.1007/s12010-013-0685-1>.
- AGGARWAL, M. & MONDAL, A. K. 2009. *Debaryomyces hansenii*: an osmotolerant and halotolerant yeast. In T. Satyanarayana and G. Kunze eds. *Yeast biotechnology: diversity and applications*. Springer, Dordrecht, 65-84 http://doi.org/10.1007/978-1-4020-8292-4_4.
- AHMED, A., NASIM, F. U.-H., BATOOL, K. & BIBI, A. 2017. Microbial β -Glucosidase: sources, production and applications. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 5, <http://doi.org/10.12691/jaem-5-1-4>.
- ALVES-PRADO, H. F., PAVEZZI, F. C., LEITE, R. S. R., DE OLIVEIRA, V. M., SETTE, L. D. & DASILVA, R. 2010. Screening and production study of microbial xylanase producers from Brazilian Cerrado. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161, <http://doi.org/10.1007/s12010-009-8823-5>.
- AMOOZEGAR, M. A., MEHRSHAD, M. & AKHOONDI, H. 2015. Application of extremophilic microorganisms in decolorization and biodegradation of textile wastewater. In S. Singh. eds. *Microbial degradation of synthetic dyes in wastewaters. Environmental science and engineering*. Springer, Cham, 267-295 http://doi.org/10.1007/978-3-319-10942-8_12.
- BARDOU, P., MARIETTE, J., ESCUDIÉ, F., DJEMIEL, C. & KLOPP, C. 2014. jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics*, 15, <http://doi.org/10.1186/1471-2105-15-293>.
- BATISTA, T. M., HILÁRIO, H. O., MOREIRA, R. G., FURTADO, C., GODINHO, V. M., ROSA, L. H., FRANCO, G. R. & ROSA, C. A. 2017. Draft genome sequence of *Metschnikowia australis* strain UFMG-CM-Y6158, an extremophile marine yeast endemic to Antarctica. *Genome announcements*, 5, <http://doi.org/10.1128/genomeA.00328-17>.
- BEATTIE, A. J., HAY, M., MAGNUSSON, B., DE NYS, R., SMEATHERS, J. & VINCENT, J. F. V. 2011. Ecology and bioprospecting. *Austral ecology*, 36, <http://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2010.02170.x>.
- BEZUS, B., RUSCASSO, F., GARMENDIA, G., VERO, S., CAVELLO, I. & CAVALITTO, S. 2021. Revalorization of chicken feather waste into a high antioxidant activity feather protein hydrolysate using a novel psychrotolerant bacterium. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 32, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101925>.
- BRANDÃO, L. R., LIBKIND, D., VAZ, A. B. M., ESPÍRITO SANTO, L. C., MOLINÉ, M., DE GARCÍA, V., VAN BROOCK, M. & ROSA, C. A. 2011. Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. *FEMS Microbiology Ecology*, 76, <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01030.x>.
- BURHAN, A., NISA, U., GÖKHAN, C., ÖMER, C., ASHABIL, A. & OSMAN, G. 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, 38, [http://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00037-2](http://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00037-2).

- P. Buzzini and R. Margesin eds. 2014. *Book Cold-adapted yeasts. Biodiversity, adaptation strategies and biotechnological significance*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-39681-6>.
- BUZZINI, P. & MARTINI, A. 2002. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *Journal of Applied Microbiology*, 93, <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01783.x>.
- 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, <http://doi.org/10.1186/1471-2180-12-251>.
- CARRASCO, M., VILLARREAL, P., BARAHONA, S., ALCAÍNO, J., CIFUENTES, V. & BAEZA, M. 2016. Screening and characterization of amylase and cellulase activities in psychrotolerant yeasts. *BMC Microbiology*, 16, <http://doi.org/10.1186/s12866-016-0640-8>.
- CAVELLO, I. A., BEZUS, B., MARTINEZ, A., GARMENDIA, G., VERO, S. & CAVALITTO, S. 2019. Yeasts from Tierra del Fuego Province (Argentina): biodiversity, characterization and bioprospection of hydrolytic enzymes. *Geomicrobiology Journal*, 36, <http://doi.org/10.1080/01490451.2019.1641769>.
- DA SILVA, M. K., DA SILVA, A. V., FERNANDEZ, P. M., MONTONE, R. C., ALVES, R. P., AC, D. E. Q., VM, D. E. O., DOS SANTOS, V. P., PUTZKE, J., ROSA, L. H. & DUARTE, A. W. F. 2022. Extracellular hydrolytic enzymes produced by yeasts from Antarctic lichens. *Anais de Academia Brasileira de Ciências*, 94, <http://doi.org/10.1590/0001-376520220210540>.
- DANILOVICH, M. E., SÁNCHEZ, L. A., ACOSTA, F. & DELGADO, O. D. 2018. Antarctic bioprospecting: in pursuit of microorganisms producing new antimicrobials and enzymes. *Polar Biology*, 41, <http://doi.org/10.1007/s00300-018-2295-4>.
- DE GARCÍA, V., BRIZZIO, S., LIBKIND, D., BUZZINI, P. & VAN BROECK, M. 2007. Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiology Ecology*, 59, <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00239.x>.
- DE OVALLE, S., CAVELLO, I., BRENA, B. M., CAVALITTO, S. & GONZÁLEZ-POMBO, P. 2018. Production and characterization of a β -glucosidase from *Issatchenkia terricola* and its use for hydrolysis of aromatic precursors in Cabernet Sauvignon wine. *Food Science and Technology*, 87, <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.026>.
- DEL-CID, A., UBILLA, P., RAVANAL, M.-C., MEDINA, E., VACA, I., LEVICÁN, G., EYZAGUIRRE, J. & CHÁVEZ, R. 2014. Cold-active xylanase produced by fungi associated with Antarctic marine sponges. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172, <http://doi.org/10.1007/s12010-013-0551-1>.
- DEPRIEST, P., IVANOVA, N., FAHSELT, D., ALSTRUP, V. & GARGAS, A. 2000. Sequences of psychrophilic fungi amplified from glacier-preserved ascolichens. *Canadian Journal of Botany-revue Canadienne De Botanique - CAN J BOT*, 78, <http://doi.org/10.1139/cjb-78-11-1450>.
- DUARTE, A. W. F., DAYO-OWOYEMI, I., NOBRE, F. S., PAGNOCCA, F. C., CHAUD, L. C. S., PESSOA, A., FELIPE, M. G. A. & SETTE, L. D. 2013. Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. *Extremophiles*, 17, <http://doi.org/10.1007/s00792-013-0584-y>.

- DUARTE, A. W. F., DOS SANTOS, J. A., VIANNA, M. V., VIEIRA, J. M. F., MALLAGUTTI, V. H., INFORSATO, F. J., WENTZEL, L. C. P., LARIO, L. D., RODRIGUES, A., PAGNOCCA, F. C., PESSOA JUNIOR, A. & DURÃES SETTE, L. 2018. Cold-adapted enzymes produced by fungi from terrestrial and marine Antarctic environments. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38, <http://doi.org/10.1080/07388551.2017.1379468>.
- DUARTE, A. W. F., PASSARINI, M. R. Z., DELFORNO, T. P., PELLIZZARI, F. M., CIPRO, C. V. Z., MONTONE, R. C., PETRY, M. V., PUTZKE, J., ROSA, L. H. & SETTE, L. D. 2016. Yeasts from macroalgae and lichens that inhabit the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Microbiology Reports*, 8, <http://doi.org/10.1111/1758-2229.12452>.
- FELL, J. W. 2011. *Mrakia* Y. Yamada & Komagata (1987). In C. Kurtzman, J. Fell and T. Boekhout eds. *The Yeasts (Fifth Edition)*. Elsevier, London, 1503-1510 <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00123-3>.
- FERNÁNDEZ, P. M., MARTORELL, M. M., BLASER, M. G., RUBERTO, L. A. M., DE FIGUEROA, L. I. C. & MAC CORMACK, W. P. 2017. Phenol degradation and heavy metal tolerance of Antarctic yeasts. *Extremophiles*, 21, <http://doi.org/10.1007/s00792-017-0915-5>.
- FERREIRA, E. M. S., DE SOUSA, F. M. P., ROSA, L. H. & PIMENTA, R. S. 2019. Taxonomy and richness of yeasts associated with angiosperms, bryophytes, and meltwater biofilms collected in the Antarctic Peninsula. *Extremophiles*, 23, <http://doi.org/10.1007/s00792-018-1069-9>.
- FRANCELINO, M. R., SCHAEFER, C. E. G. R., SIMAS, F. N. B., FILHO, E. I. F., DE SOUZA, J. J. L. L. & DA COSTA, L. M. 2011. Geomorphology and soils distribution under paraglacial conditions in an ice-free area of Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Catena*, 85, <http://doi.org/10.1016/j.catena.2010.12.007>.
- GODINHO, V. M., DE PAULA, M. T. R., SILVA, D. A. S., PARESQUE, K., MARTINS, A. P., COLEPICCOLO, P., ROSA, C. A. & ROSA, L. H. 2019. Diversity and distribution of hidden cultivable fungi associated with marine animals of Antarctica. *Fungal Biology*, 123, <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.05.001>.
- GOMES, J., GOMES, I. & STEINER, W. 2000. Thermolabile xylanase of the Antarctic yeast *Cryptococcus adeliae*: production and properties. *Extremophiles*, 4, <http://doi.org/10.1007/s007920070024>.
- GONÇALVES, V. N., VITORELI, G. A., DE MENEZES, G. C. A., MENDES, C. R. B., SECCHI, E. R., ROSA, C. A. & ROSA, L. H. 2017. Taxonomy, phylogeny and ecology of cultivable fungi present in seawater gradients across the Northern Antarctica Peninsula. *Extremophiles*, 21, <http://doi.org/10.1007/s00792-017-0959-6>.
- GUARRO, J. 2012. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30, <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.006>.
- GUPTA, S. K., KATAKI, S., CHATTERJEE, S., PRASAD, R. K., DATTA, S., VAIRALE, M. G., SHARMA, S., DWIVEDI, S. K. & GUPTA, D. K. 2020. Cold adaptation in bacteria with special focus on cellulase production and its potential application. *Journal of Cleaner Production*, 258, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120351>.
- HAMMER, O., HARPER, D. & RYAN, P. 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4, 1-9.

- KIM, J. M., LIM, W. J. & SUH, H. J. 2001. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. *Process Biochemistry*, 37, [http://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00206-0](http://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00206-0).
- KURTZMAN, C. P. 2014. Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, <http://doi.org/10.1099/ijs.0.054197-0>.
- C. P. Kurtzman, J. W. Fell and T. Boekhout eds. 2011. *Book The Yeasts, a taxonomic study. Fifth edition*. Elsevier, pp. 2354,
- LUO, B., SUN, H., ZHANG, Y., GU, Y., YAN, W., ZHANG, R. & NI, Y. 2019. Habitat-specificity and diversity of culturable cold-adapted yeasts of a cold-based glacier in the Tianshan Mountains, northwestern China. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, <http://doi.org/10.1007/s00253-018-9512-5>.
- MARGESIN, R., FAUSTER, V. & FONTEYNE, P. A. 2005. Characterization of cold-active pectate lyases from psychrophilic *Mrakia frigida*. *Letters in Applied Microbiology*, 40, <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01704.x>.
- MARTINEZ, A., CAVELLO, I., GARMENDIA, G., RUFO, C., CAVALITTO, S. & VERO, S. 2016. Yeasts from sub-Antarctic region: biodiversity, enzymatic activities and their potential as oleaginous microorganisms. *Extremophiles*, 20, <http://doi.org/10.1007/s00792-016-0865-3>.
- MARTORELL, M. M., PAJOT, H. F. & DE FIGUEROA, L. I. C. 2012. Dye-decolourizing yeasts isolated from Las Yungas rainforest. Dye assimilation and removal used as selection criteria. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 66, <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.10.005>.
- MARTORELL, M. M., RUBERTO, L. A. M., DE FIGUEROA, L. I. C. & MAC CORMACK, W. P. 2019a. Antarctic yeasts as a source of enzymes for biotechnological applications. In L. Rosa eds. *Fungi of Antarctica*. Springer, Cham, https://doi.org/10.1007/978-3-030-18367-7_13.
- MARTORELL, M. M., RUBERTO, L. A. M., FERNÁNDEZ, P. M., DE FIGUEROA, L. I. C. & MAC CORMACK, W. P. 2019b. Biodiversity and enzymes bioprospection of Antarctic filamentous fungi. *Antarctic Science*, 31, <http://doi.org/10.1017/S0954102018000421>.
- MARTORELL, M. M., RUBERTO, L. A. M., FERNÁNDEZ, P. M., DE FIGUEROA, L. I. C. & MAC CORMACK, W. P. 2017. Bioprospection of cold-adapted yeasts with biotechnological potential from Antarctica. *Journal of Basic Microbiology*, 57, <http://doi.org/10.1002/jobm.201700021>.
- MATEO, N., NADER, W. & TAMAYO, G. 2001. Bioprospecting. In S. E. Levin eds. *Encyclopedia of Biodiversity, Version Online*. Academic Press, San Diego, 471-488.
- MESTRE, M. C., FONTENLA, S. & ROSA, C. A. 2014. Ecology of cultivable yeasts in pristine forests in northern Patagonia (Argentina) influenced by different environmental factors. *Canadian Journal of Microbiology*, 60, <http://doi.org/10.1139/cjm-2013-0897>.
- MORITA, R. Y. 1975. Psychrophilic bacteria. *Bacteriological reviews*, 39, <http://doi.org/10.1128/br.39.2.144-167.1975>.
- NAKAGAWA, T., NAGAOKA, T., TANIGUCHI, S., MIYAJI, T. & TOMIZUKA, N. 2004. Isolation and characterization of psychrophilic yeasts producing cold-adapted pectinolytic enzymes. *Letters in Applied Microbiology*, 38, <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01503.x>.

- PAVLOVA, K., ANGELOVA, G., SAVOVA, I., GRIGOROVA, D. & KUPENOV, L. 2002. Studies of Antarctic yeast for β -glucosidase production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, <http://doi.org/10.1023/A:1016337529488>.
- PELISSARI, A. L., FILHO, A. F., EBLING, A. A., SANQUETTA, C. R., CYSNEIROS, V. C. & CORTE, A. P. D. 2018. Spatial variability of tree species diversity in a mixed tropical forest in Southern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90, <http://doi.org/10.1590/0001-3765201820170826>.
- PÉREZ, G., FARIÑA, L., BARQUET, M., BOIDO, E., GAGGERO, C., DELLACASSA, E. & CARRAU, F. 2011. A quick screening method to identify β -glucosidase activity in native wine yeast strains: application of Esculin Glycerol Agar (EGA) medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, <http://doi.org/10.1007/s11274-010-0425-4>.
- PETRESCU, I., LAMOTTE-BRASSEUR, J., CHESSA, J. P., NTAIRIMA, P., CLAEYSSSENS, M., DEVREESE, B., MARINO, G. & GERDAY, C. 2000. Xylanase from the psychrophilic yeast *Cryptococcus adeliae*. *Extremophiles*, 4, <http://doi.org/10.1007/s007920070028>.
- RAMALHO, P. A., SCHOLZE, H., CARDOSO, M. H., RAMALHO, M. T. & OLIVEIRA-CAMPOS, A. M. 2002. Improved conditions for the aerobic reductive decolourisation of azo dyes by *Candida zeylanoides*. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00189-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00189-8).
- RAMNATH, L., SITHOLE, B. & GOVINDEN, R. 2017. Identification of lipolytic enzymes isolated from bacteria indigenous to *Eucalyptus* wood species for application in the pulping industry. *Biotechnology Reports*, 15, <http://doi.org/10.1016/j.btre.2017.07.004>.
- RASPOR, P. & ZUPAN, J. 2006. Yeasts in extreme environments. In G. Péter and C. Rosa eds. *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer Berlin Heidelberg, 371-417 http://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_15.
- ROBINSON, C. H. 2001. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytologist*, 151, <http://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00177.x>.
- ROHBAN, R., AMOOZEGAR, M. A. & VENTOSA, A. 2009. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, <http://doi.org/10.1007/s10295-008-0500-0>.
- ROVATI, J. I., PAJOT, H. F., RUBERTO, L., MAC CORMACK, W. & FIGUEROA, L. I. C. 2013. Polyphenolic substrates and dyes degradation by yeasts from 25 de Mayo/King George Island (Antarctica). *Yeast*, 30, <http://doi.org/10.1002/yea.2982>.
- RUBERTO, L., VAZQUEZ, S., BALBO, A. & MAC CORMACK, W. 2005. Psychrotolerant hydrocarbon-degrading *Rhodococcus* strains isolated from polluted Antarctic soils. *Antarctic Science*, 17, <http://doi.org/10.1017/S0954102005002415>.
- RUSSO, G., LIBKIND, D., GIRAUDO, M. R. & DELGADO, O. D. 2016. Heavy metal capture by autochthonous yeasts from a volcanic influenced environment of Patagonia. *Journal of Basic Microbiology*, 56, <http://doi.org/10.1002/jobm.201600048>.
- SCHERER, S. & NEUHAUS, K. 2006. Life at low temperatures. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer and E. Stackebrandt eds. *The prokaryotes*. Springer, New York, NY., 210-262 https://doi.org/10.1007/0-387-30742-7_8.

- SCORZETTI, G., FELL, J. W., FONSECA, A. & STATZELL-TALLMAN, A. 2002. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Research*, 2, <http://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00117.x>.
- SCORZETTI, G., PETRESCU, I., YARROW, D. & FELL, J. 2000. *Cryptococcus adeliensis* sp. nov., a xylanase producing basidiomycetous yeast from Antarctica. *Antonie van Leeuwenhoek*, 77, <http://doi.org/10.1023/A:1002124504936>.
- SHAH, J. A. & PANDIT, A. K. 2013. Application of diversity indices to crustacean community of Wular Lake, Kashmir Himalaya. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 5, <http://doi.org/10.5897/IJBC2013.0567>.
- SINGH, S. M., TSUJI, M., GAWAS-SAKHALKER, P., LOONEN, M. J. J. E. & HOSHINO, T. 2016. Bird feather fungi from Svalbard Arctic. *Polar Biology*, 39, <http://doi.org/10.1007/s00300-015-1804-y>.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A. & KUMAR, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, <http://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- THOMAS-HALL, S. R., TURCHETTI, B., BUZZINI, P., BRANDA, E., BOEKHOUT, T., THEELEN, B. & WATSON, K. 2010. Cold-adapted yeasts from Antarctica and the Italian Alps-description of three novel species: *Mrakia robertii* sp. nov., *Mrakia blollopis* sp. nov. and *Mrakiella niccombsii* sp. nov. *Extremophiles*, 14, <http://doi.org/10.1007/s00792-009-0286-7>.
- TSUJI, M. 2018. Genetic diversity of yeasts from East Ongul Island, East Antarctica and their extracellular enzymes secretion. *Polar Biology*, 41, <http://doi.org/10.1007/s00300-017-2185-1>.
- TSUJI, M., TANABE, Y., VINCENT, W. F. & UCHIDA, M. 2018. *Mrakia arctica* sp. nov., a new psychrophilic yeast isolated from an ice island in the Canadian High Arctic. *Mycoscience*, 59, <http://doi.org/10.1016/j.myc.2017.08.006>.
- TSUJI, M., YOKOTA, Y., KUDOH, S. & HOSHINO, T. 2015. Comparative analysis of milk fat decomposition activity by *Mrakia* spp. isolated from Skarvsnes ice-free area, East Antarctica. *Cryobiology*, 70, <http://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.04.002>.
- TURCHETTI, B., BUZZINI, P., GORETTI, M., BRANDA, E., DIOLAUTI, G., D'AGATA, C., SMIRAGLIA, C. & VAUGHAN-MARTINI, A. 2008. Psychrophilic yeasts in glacial environments of Alpine glaciers. *FEMS Microbiology Ecology*, 63, <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00409.x>.
- TURCHETTI, B., SANNINO, C., MEZZASOMA, A., ZUCCONI, L., ONOFRI, S. & BUZZINI, P. 2020. *Mrakia stelviica* sp. nov. and *Mrakia montana* sp. nov., two novel basidiomycetous yeast species isolated from cold environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, <http://doi.org/10.1099/ijsem.0.004336>.
- VACA, I., FAÚNDEZ, C., MAZA, F., PAILLAVIL, B., HERNÁNDEZ, V., ACOSTA, F., LEVICÁN, G., MARTÍNEZ, C. & CHÁVEZ, R. 2013. Cultivable psychrotolerant yeasts associated with Antarctic marine sponges. *World journal of microbiology & biotechnology*, 29, <http://doi.org/10.1007/s11274-012-1159-2>.

- VAZ, A. B. M., ROSA, L. H., VIEIRA, M. L. A., DE GARCIA, V., BRANDÃO, L. R., TEIXEIRA, L. C. R. S., MOLINÉ, M., LIBKIND, D., VAN BROOCK, M. & ROSA, C. A. 2011. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, <http://doi.org/10.1590/S1517-83822011000300012>.
- VERO, S., GARMENDIA, G., MARTINEZ SILVEIRA, A., CAVELLO, I. & WISNIEWSKI, M. 2019. Yeast activities involved in carbon and nitrogen cycles in Antarctica. In S. Castro-Sowinski eds. *The Ecological Role of Microorganisms in the Antarctic Environment*. Springer Nature Switzerland AG, Basilea, Switzerland, 45-64 http://doi.org/10.1007/978-3-030-02786-5_3.
- VISHNIAC, H. S. 2006. Yeast biodiversity in the Antarctic. In G. Péter and C. Rosa eds. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer, Berlin, Heidelberg, 419-440 http://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_16.
- WENTZEL, L. C. P., INFORSATO, F. J., MONTOYA, Q. V., ROSSIN, B. G., NASCIMENTO, N. R., RODRIGUES, A. & SETTE, L. D. 2019. Fungi from admiralty bay (King George Island, Antarctica) soils and marine sediments. *Microbial Ecology*, 77, <http://doi.org/10.1007/s00248-018-1217-x>.
- ZHOU, J., GAO, Y., ZHANG, R., MO, M., TANG, X., LI, J., XU, B., DING, J. & HUANG, Z. 2014. A novel low-temperature-active exo-inulinase identified based on molecular-activity strategy from *Sphingobacterium* sp. GN25 isolated from feces of *Grus nigricollis*. *Process Biochemistry*, 49, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.06.013>.
- ZHOU, J., LU, Q., PENG, M., ZHANG, R., MO, M., TANG, X., LI, J., XU, B., DING, J. & HUANG, Z. 2015. Cold-active and NaCl-tolerant exo-inulinase from a cold-adapted *Arthrobacter* sp. MN8 and its potential for use in the production of fructose at low temperatures. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119, <http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.08.003>.

Sitios web

-<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

- <http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>

Último acceso: 18 de noviembre, 2022

CAPÍTULO 3

DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CUANTIFICACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS B-GLUCOSIDASA Y POLIGALACTURONASA

INTRODUCCIÓN

Modelo cinético de Michaelis-Menten

El modelo cinético de Michaelis-Menten suele utilizarse para describir de manera adecuada el comportamiento de la velocidad de reacción de una enzima (Doran 2013). En la Figura 3.1 se muestra un diagrama típico de la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato. Se puede observar que existe una zona lineal, o de primer orden, en la que la velocidad de reacción se relaciona de forma lineal con la concentración de sustrato. Esto ocurre cuando la enzima no está saturada en su sustrato (existe en la mezcla de reacción más enzima que sustrato). Sin embargo, al aumentar lo suficientemente la concentración de sustrato, en la llamada zona de orden cero, la actividad tiende a la máxima ($V_{m\acute{a}x}$), en esta zona los sitios activos de la enzima están saturados con el sustrato, y un aumento de la concentración de sustrato no se traduce en un aumento de actividad. Ésta es la zona en la que se debe trabajar al estudiar una enzima, ya que en ésta el aumento del producto con el tiempo ocurre de forma lineal, es decir, la velocidad de hidrólisis es constante (tiende a $V_{m\acute{a}x}$).

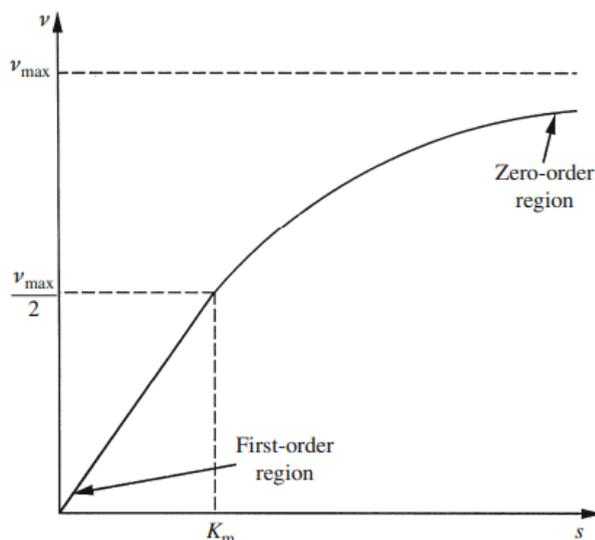


Figura 3.1 Efecto de la concentración de sustrato en la velocidad de reacción de una enzima, según el modelo de Michaelis Menten. Se muestran la región de primer orden, en la que la velocidad de reacción (v) tiene una dependencia lineal con la concentración de sustrato (s), y la región de orden cero, en la que la velocidad de reacción se acerca de forma asintótica a la velocidad máxima o V_{\max} (Doran 2013).

Sustratos para la determinación de la actividad β -glucosidasa

En la mayoría de los estudios, la actividad β -glucosidasa es cuantificada utilizando el sustrato p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (p-NPG). Éste es un sustrato sintético que al ser hidrolizado por β -glucosidasas genera como productos glucosa y p-nitrofenol. El p-nitrofenol, en condiciones alcalinas, se vuelve amarillo con una absorbancia óptima a 405 nm, que puede ser medida con la ayuda de un espectrofotómetro. Generalmente las β -glucosidasas poseen una alta afinidad por este sustrato artificial, convirtiéndolo en el más utilizado (Ahmed, *et al.* 2017; de Ovalle, *et al.* 2016; González-Pombo, *et al.* 2011).

La actividad de la β -glucosidasa también se puede medir utilizando celobiosa, el disacárido natural producido a partir de la celulosa por la acción de *endo*- y *exo*-glucanasas. La celobiosa es hidrolizada por la β -glucosidasa en dos unidades de glucosa, que pueden ser cuantificadas utilizando la prueba específica de glucosa como glucosa oxidasa peroxidasa (GOD/POD), kit de hexoquinasa o cromatografía líquida de alta

eficacia (HPLC). Otros sustratos como la salicina y la arbutina también se han utilizado para evaluar esta actividad enzimática. La enzima hidroliza la salicina o la arbutina liberando la glucosa y la aglicona (saligenen o hidroquinona, respectivamente). La glucosa liberada es cuantificada utilizando un método estándar como el método del ácido di-nitro salicílico (DNS), o kit enzimático. El sustrato sintético MUG (*4-Methylumbelliferyl- β -D-glucoside*) también puede ser utilizado para medir la actividad de la β -glucosidasa. La enzima hidroliza el MUG en β -metilumbeliferona y glucosa. La cantidad de metilumbeliferona liberada por las enzimas se mide con un fluorímetro para excitación y emisión a 380 nm y 448 nm, respectivamente (Ahmed, *et al.* 2017).

Sustratos para la determinación de la actividad poligalacturonasa

El sustrato utilizado para la determinación de actividad poligalacturonasa es el ácido poligalacturónico (PGA), que se trata de una porción de homogalacturonano desesterificada, es decir que el grado de esterificación de la pectina es cercano a 0 (Véase introducción Capítulo 4). Luego de la hidrólisis del sustrato, la actividad poligalacturonasa suele detectarse utilizando métodos colorimétricos que permiten cuantificar los azúcares reductores liberados. Entre los métodos disponibles y más utilizados se encuentran el método de Miller o del DNS y el método de Somogyi- Nelson. Utilizando una curva de calibración con ácido galacturónico pueden fácilmente estimarse los μ moles de ácido galacturónico liberados por minuto (John, *et al.* 2020).

OBJETIVOS DE ESTE CAPÍTULO

Determinar las condiciones de ensayo para las medidas de actividad enzimática.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del extracto enzimático con actividad poligalacturonasa y β -glucosidasa

Para la puesta a punto de las técnicas de medida de actividades poligalacturonasa y β -glucosidasa se utilizó un extracto enzimático extracelular producido por la levadura *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 al ser inoculada en el siguiente medio de cultivo: 10 g l⁻¹ pectina cítrica (PARAFARM), 5 g l⁻¹ extracto de levadura, 2 g l⁻¹ peptona, 1.4 g l⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 2 g l⁻¹ K₂HPO₄, 0.2 g l⁻¹ MgSO₄, y 1 ml l⁻¹ Solución A (5.0 mg l⁻¹ FeSO₄.H₂O, 1.6 mg l⁻¹ MnSO₄.H₂O, 2.0 mg l⁻¹ CoCl₂), pH inicial 6.0 (Cavello, *et al.* 2017). El cultivo se cosechó en el cuarto día de cultivo y se separó la biomasa centrifugando el medio de cultivo a 5850 x g durante 15 minutos. El extracto enzimático crudo se conservó a -20 °C.

Ensayo de actividad poligalacturonasa (PGasa)

La actividad poligalacturonasa fue detectada utilizando ácido poligalacturónico (PGA) como sustrato, como fue descrito por Cavalitto, *et al.* (1999). La mezcla de reacción consistió en 180 μ l de PGA (2 g l⁻¹ en buffer citrato-fosfato 12.5mM-6.25mM, BCP, pH 5.0) y 20 μ l de enzima en la dilución apropiada, a 20 °C. Pasado el tiempo de incubación, la reacción fue finalizada mediante la adición de 200 μ l reactivo de Somogyi, y de esta manera se cuantificaron los azúcares reductores liberados por la reacción enzimática mediante el método de Somogyi-Nelson (Nelson 1944; Somogyi 1952). Luego del agregado de 200 μ l del reactivo de Somogyi, los tubos se incubaron en un baño en ebullición durante 10 minutos. Pasado ese tiempo, se dejaron enfriar en un baño de agua-hielo durante otros 10 minutos. Luego, se agregaron 200 μ l del reactivo de Nelson, y cada tubo se sometió a vórtex para eliminar los gases producidos. Se dejaron reposar los tubos durante 30 minutos, luego de los cuales se agregó en cada uno 1.5 ml de agua destilada. Se agitó nuevamente y se midió absorbancia a 660 nm. Para cada reacción, se realizaron

reacciones blanco para determinar los azúcares reductores de la mezcla (enzima y sustrato) sin previa incubación. Se utilizó una curva de calibración con Ácido Galacturónico (GALA, Sigma-Aldrich) en un rango 0-250 ppm. Una unidad de actividad PGasa fue definida como la cantidad de enzima que libera poder reductor equivalente a 1 μmol de GALA por minuto en las condiciones de medida definidas anteriormente.

Ensayo de actividad β -glucosidasa (BGLasa)

La actividad β -glucosidasa fue determinada utilizando el sustrato cromogénico *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNPG) (González-Pombo, *et al.* 2011). Se mezclaron volúmenes iguales de enzima (en la dilución apropiada) con el sustrato (Sigma-Aldrich, 5 mM, en BCP pH 5.0) a 20 °C. La reacción fue finalizada a intervalos regulares de tiempo, mediante la toma de alícuotas de la mezcla reactiva y mezclándola con un volumen igual de buffer carbonato (0.2 M, pH 10.0). El *p*-nitrofenol (*p*NP) liberado, producto de la reacción, fue cuantificado espectrofotométricamente a 405 nm, utilizando un coeficiente de extinción molar de 18,300 M cm^{-1} . Una unidad enzimática se consideró como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de *p*NP por minuto bajo las condiciones estándar de medición especificadas.

Determinación del rango de linealidad para efectuar las determinaciones de actividad poligalacturonasa y β -glucosidasa

Antes de realizar las mediciones de actividad poligalacturonasa y β -glucosidasa, se determinó el rango de linealidad de las reacciones. Esto es, las condiciones bajo las cuales la reacción se encuentra en situación de sustrato saturante, por lo que la actividad enzimática no es subestimada. Para ello, con la concentración de sustrato y de enzima fijos, se realizó la reacción a distintos tiempos. Una vez definido, a partir de los resultados, los tiempos de reacción, se midió actividad a un tiempo fijo, variando la cantidad de

enzima en la reacción (se realizaron diluciones seriadas de la enzima). El análisis de los gráficos obtenidos permitió definir un tiempo y cantidad de enzima a agregar en el tubo de reacción para realizar una medida que no subestime la actividad enzimática en cada determinación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del rango de linealidad en la medida enzimática

Efecto del tiempo de reacción en la medida de actividad

Para determinar el tiempo de reacción de las medidas de actividad β -glucosidasa y poligalacturonasa, se realizaron las determinaciones de actividad en una alícuota de sobrenadante de un cultivo de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016, incubando la misma reacción a diferentes tiempos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.2.

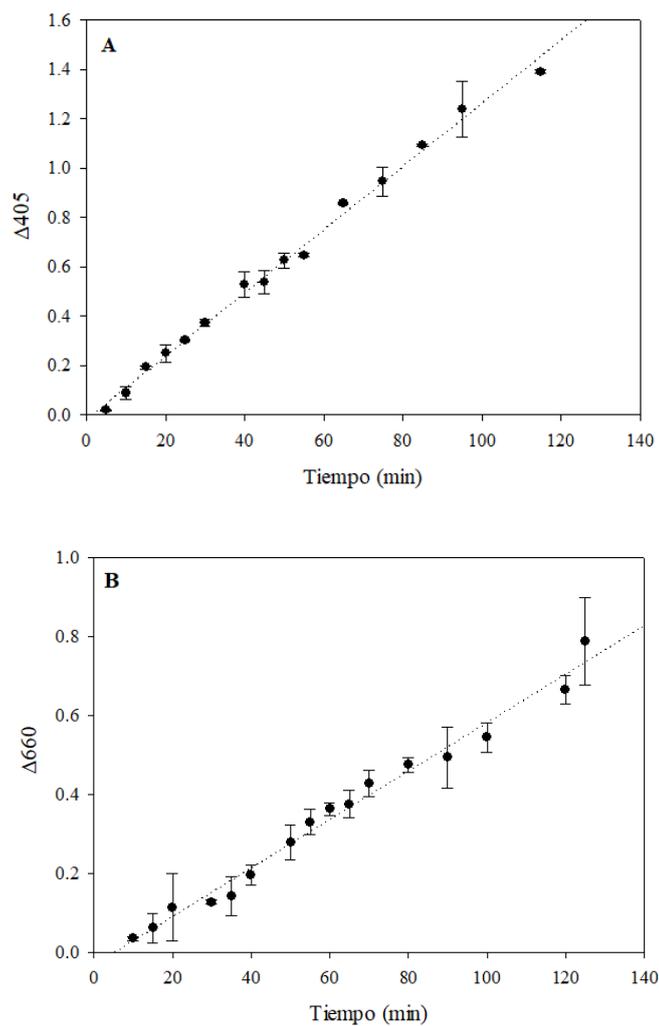


Figura 3. 2 Delta de absorbancia a 405 nm producida por una determinada cantidad de extracto enzimático en función del tiempo (A). Delta de absorbancia a 660 nm entre blanco y reacción producida por una determinada cantidad de extracto enzimático en función del tiempo (B).

En el caso de la actividad β -glucosidasa (Figura 3.2A), se puede ver que la enzima se encuentra saturada con el sustrato al menos hasta los 90 minutos de reacción, por lo que se eligieron tiempos de 10 minutos y 20 minutos para finalizar la reacción enzimática.

En la Figura 3.2B se puede observar que para la actividad poligalacturonasa, la reacción se mantiene en un rango de linealidad hasta (al menos) 90 minutos de reacción. Por lo tanto, se eligió un tiempo fijo de medición de 20 minutos.

Efecto de la concentración de la enzima en la medida de actividad

Con la concentración de sustratos (5 mM pNPG; 2 g l⁻¹ PGA) y el tiempo de reacción (20 minutos) fijos, se procedió a evaluar el rango de la linealidad de la reacción al variar la concentración de enzima presente en la reacción (diluyendo la enzima). Para ello, se utilizó un concentrado enzimático (por liofilización) y se realizaron diluciones seriadas del extracto. La determinación enzimática se realizó en condiciones estándar. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.3.

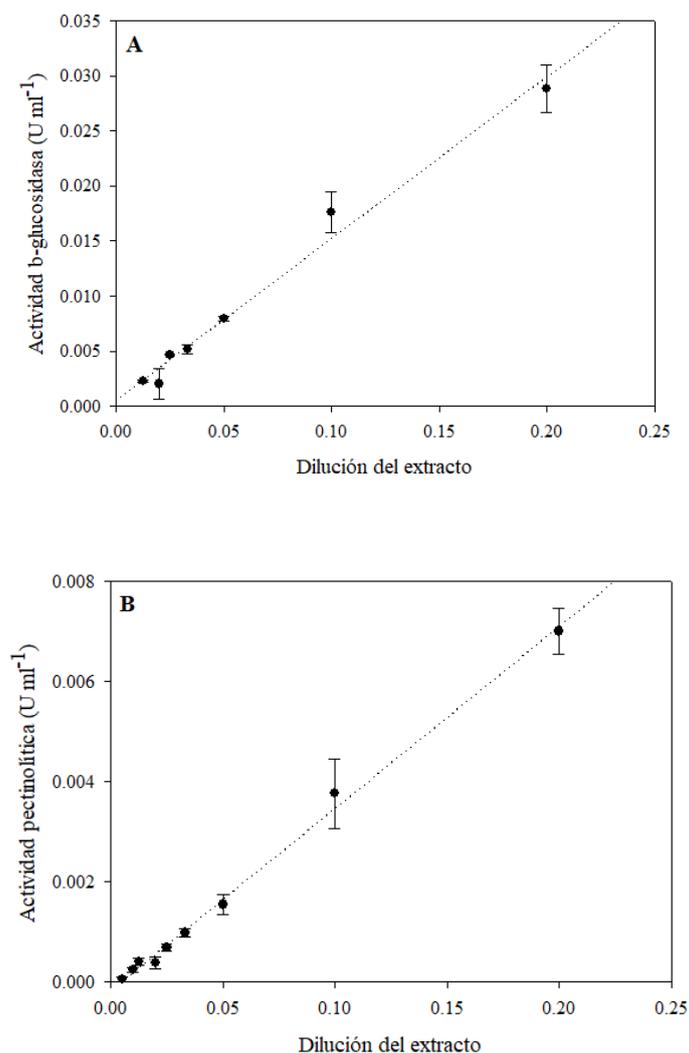


Figura 3.3 Relación entre actividad determinada y cantidad de extracto enzimático agregado (dilución) para la actividad β -glucosidasa (A) y poligalacturonasa (B).

En la Figura 3.3 puede observarse que se obtuvo una relación lineal entre la actividad determinada y la cantidad de enzima adicionada en el tubo de reacción, hasta una concentración enzimática de $30\ mU\ ml^{-1}$ en el caso del pNPG (Figura 3.3A) y $7\ mU\ ml^{-1}$ en el caso del PGA (Figura 3.3B).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, en la Tabla 3.1 se detallan las condiciones de reacción que se utilizaron durante todo el resto del presente trabajo. En los casos en los que se encontró la enzima muy diluida, se aumentó el tiempo de reacción, a fin de obtener deltas de absorbancia medibles para el cálculo de la actividad enzimática. En los

casos en que la solución enzimática provocaba un aumento de absorbancia fuera del rango en el que se observó el comportamiento lineal, se diluyó la solución las veces que fuera necesario.

Tabla 3. 1 Condiciones de medición de actividad enzimática que se utilizaron durante todo el trabajo

<i>Tipo de actividad</i>	<i>B-glucosidasa</i>	<i>Poligalacturonasa</i>
<i>Sustrato (Concentración)</i>	pNPG (5 mM)	PGA (2 g l ⁻¹)
<i>Tiempo de medición</i>	10-20 minutos	20 minutos
<i>Concentración de enzima</i>	5.0 -25.0 mU ml ⁻¹	0.05-7.0 mU ml ⁻¹

pNPG: *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido; PGA: ácido poligalacturónico

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, A., ASLAM, M., ASHRAF, M., NASIM, F. U.-H., BATOOL, K. & BIBI, A. 2017. Microbial β -glucosidases: screening, characterization, cloning and applications. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 5, <http://doi.org/10.12691/JAEM-5-2-2>.
- CAVALITTO, S., HOURS, R. & MIGNONE, C. 1999. Quantification of protopectinase SE, an endopolygalacturonase with pectin-releasing activity from *Geotrichum klebahnii*. *Biotechnology Techniques*, 13, <http://doi.org/10.1023/A:1008917912296>.
- CAVELLO, I., ALBANESI, A., FRATEBIANCHI, D., GARMEDIA, G., VERO, S. & CAVALITTO, S. 2017. Pectinolytic yeasts from cold environments: Novel findings of *Guehomyces pullulans*, *Cystofilobasidium infirmominiatum* and *Cryptococcus adeliensis* producing pectinases. *Extremophiles*, 21, <http://doi.org/10.1007/s00792-016-0904-0>.
- DE OVALLE, S., BRENA, B., FARIÑA, L. & GONZÁLEZ POMBO, P. 2016. Novel beta-glucosidase from *Issatchenkia orientalis*: characterization and assessment for hydrolysis of muscat wine glycosides. *Global Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4,
- DORAN, P. M. 2013. Chapter 12 - Homogeneous Reactions. In P. M. Doran eds. *Bioprocess Engineering Principles (Second Edition)*. Academic Press, London, 599-703 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-220851-5.00012-5>.
- GONZÁLEZ-POMBO, P., FARIÑA, L., CARRAU, F., BATISTA-VIERA, F. & BRENA, B. M. 2011. A novel extracellular β -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. *Process Biochemistry*, 46, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.016>.
- JOHN, J., KAIMAL, K. K. S., SMITH, M. L., RAHMAN, P. K. S. M. & CHELLAM, P. V. 2020. Advances in upstream and downstream strategies of pectinase bioprocessing: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.224>.
- NELSON, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 153, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)71980-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)71980-7).
- SOMOGYI, M. 1952. Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, 195, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50870-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50870-5).

CAPÍTULO 4

PRODUCCIÓN DE ENZIMAS DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO POR PARTE DE LA LEVADURA *MRAKIA SP. LP 7.1.2016*

Resumen

En este capítulo se estudió la producción de las enzimas β -glucosidasa y poligalacturonasa en cultivos sumergidos con glucosa y pectina como sustratos, utilizando la levadura *Mrakia sp. LP 7.1.2016*, seleccionada en el Capítulo 2. La naturaleza del sustrato fue clave para la producción de β -glucosidasas, ya que los títulos fueron dos veces mayores al crecer con pectina, en comparación con el sustrato glucosa. Inclusive mientras que la temperatura afectó notablemente la producción de esta actividad enzimática utilizando glucosa, la diferencia no fue observada al utilizar pectina. Esto sugiere una inducción por parte de este sustrato, o bien la represión catabólica por el sustrato glucosa. Basados en los títulos de poligalacturonasa en los sobrenadantes de los cultivos, la actividad poligalacturonasa no fue inducida por pectina, pero sí fue fuertemente afectada por la temperatura de cultivo, siendo mayor la expresión a 14 °C respecto de 3 °C. Al escalar el cultivo con glucosa a un biorreactor de 3.5 l (14 °C) se obtuvo un crecimiento típico del tipo oxidativo en una fase con una velocidad de crecimiento máxima de 0.0926 h⁻¹, consiguiéndose al final del cultivo títulos enzimáticos de 9 mU ml⁻¹ de β -glucosidasa y 1.4 U ml⁻¹ de poligalacturonasa. El cultivo con pectina también fue escalado a 14 °C, y se obtuvieron títulos de β -glucosidasa en línea con los obtenidos en Erlenmeyers (24 mU ml⁻¹), aunque la actividad poligalacturonasa se vio reducida (0.76 U ml⁻¹ frente a 1.4 U ml⁻¹ en Erlenmeyers). El crecimiento observado no

fue el típico de una sola fase, sino que se observaron dos fases de respiración, indicando una posible diauxia. La velocidad de crecimiento global fue 0.075 h^{-1} .

El extracto enzimático extracelular producido por la levadura antártica *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 al crecer con pectina como sustrato demostró ser rico en diversas actividades enzimáticas además de la poligalacturonasa y β -glucosidasa: entre las testeadas, se detectaron las actividades pectinmetilesterasa, inulinasa y celulasa. Se realizó una caracterización bioquímica de las actividades poligalacturonasa y β -glucosidasa. Éstas demostraron un pH óptimo de actividad rondando el pH 5.0, y con temperaturas óptimas de $45 \text{ }^\circ\text{C}$ y $55 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. La estabilidad al pH obtenida para ambas actividades fue considerable en comparación con otros estudios. En cuanto a la estabilidad a la temperatura, la actividad β -glucosidasa fue estable a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, con 83% de actividad residual luego de 3 h. A $55 \text{ }^\circ\text{C}$ la actividad disminuyó con un tiempo de vida media de 24 minutos, y a temperaturas mayores se inactivó aún más rápidamente. La actividad poligalacturonasa resultó más termolábil, conservando sólo 38% de actividad residual luego de 3 h a $45 \text{ }^\circ\text{C}$. A temperaturas mayores la actividad se redujo rápidamente con el tiempo de incubación, con cerca de un 10% de actividad residual que resultó estable hasta las 3 h de incubación. Al modelar la desactivación térmica de la actividad poligalacturonasa se eligió el modelo de distribución de Weibull como el que mejor explica el comportamiento observado. La rápida reducción de la viscosidad del sustrato en comparación con el porcentaje de hidrólisis del mismo sugirió la presencia de al menos una poligalacturonasa de carácter *endo* en el extracto enzimático, lo cual fue confirmado mediante el análisis de los productos de reacción en una cromatografía de capa fina. Por medio de SDS-PAGE acoplado a zimogramas se observó la presencia en el extracto de una β -glucosidasa y una poligalacturonasa con altos pesos moleculares aparentes.

INTRODUCCIÓN

β -glucosidasas

Sustratos naturales

Las enzimas β -glucosidasas (β -D-glucopiranosido glucohidrolasas, E.C. 3.2.1.21) son enzimas que hidrolizan enlaces glucosídicos para liberar residuos de glucosilo terminales no reductores de glucósidos y oligosacáridos. En la naturaleza existen una gran abundancia de moléculas que son sustrato de estas enzimas (Figura 4.1) (Ketudat Cairns & Esen 2010). Se trata de compuestos naturales presentes en el reino vegetal que cumplen diversas funciones como defensa (glucósidos cianogénicos como linamarina, durrina, prunasina y sus precursores amigdalina, DIMBOAGlc y otros flavonoides e isoflavonoides como la genistina), hormonales (éster glucosílico del ácido abscísico, salicina e indoxil b-glucósido) y precursores metabólicos (estrictosidina). La celobiosa y la laminaribiosa representan oligosacáridos derivados de la pared celular vegetal. También existen sustratos de estas enzimas en mamíferos, como las glucosil ceramidas (Ketudat Cairns & Esen 2010).

Clasificación de las β -glucosidasas

La clasificación de este tipo de enzimas es un reto, teniendo en cuenta la gran variedad de moléculas que pueden hidrolizar, entre las que varía enormemente la aglicona (porción de la molécula unida al azúcar, y que se libera por acción de estas enzimas). Existen dos formas aceptadas para su clasificación, según su especificidad de sustrato y según su similitud de secuencia o estructural (Ahmed, *et al.* 2017b).

Clasificación según su especificidad de sustrato

Las **aryl-β-glucosidasas** hidrolizan sólo enlaces aril-β-glucósidos, las **celobiasas** hidrolizan sólo celobiosa y las **β-glucosidasas con amplia especificidad de sustrato** hidrolizan una amplia gama de sustratos con diferentes enlaces, como β(1→4), β(1→3), β(1→6), α(1→4), α(1→3) y α(1→6). La mayoría de las β-glucosidasas microbianas reportadas muestran una amplia especificidad de sustrato.

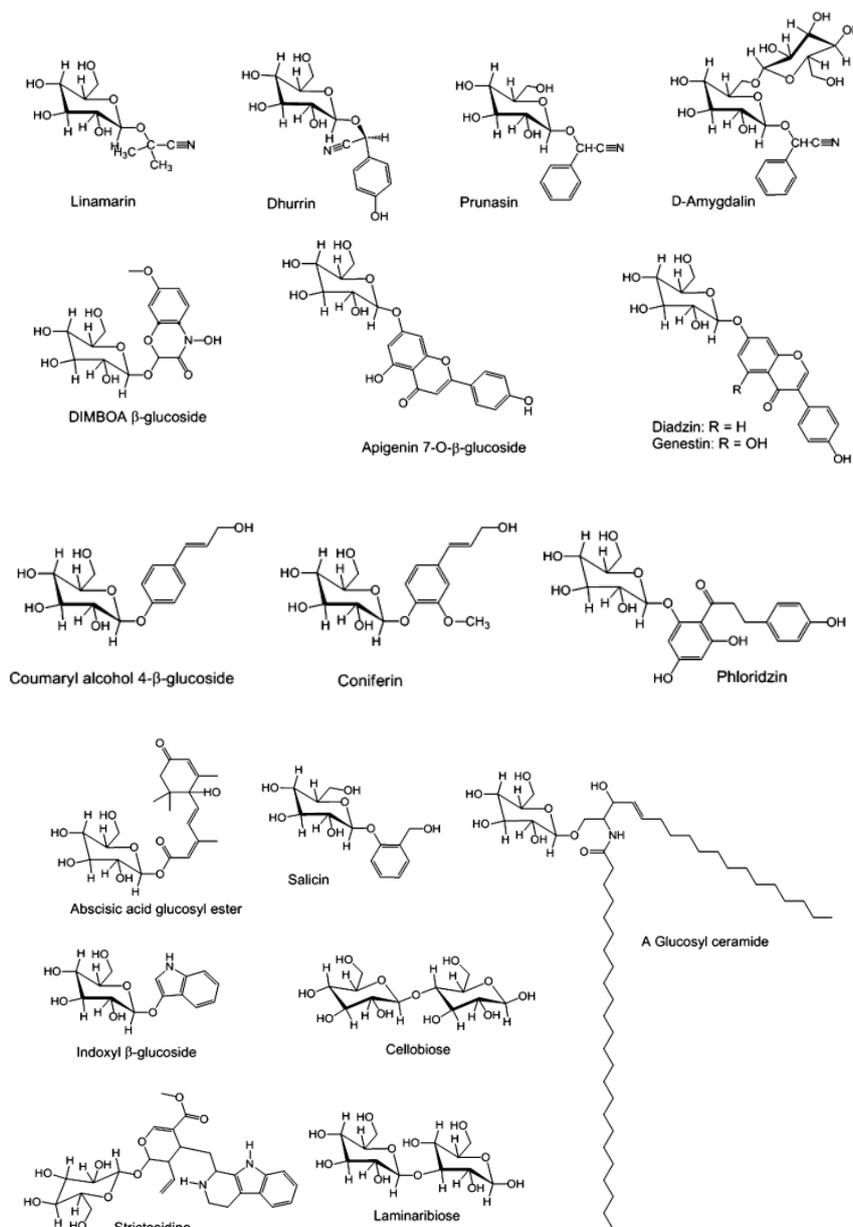


Figura 4. 1 Estructuras de algunos de los sustratos de las enzimas β-glucosidasas (Ketudat Cairns & Esen 2010).

Clasificación basada en la similitud de secuencias y análisis de *clusters* hidrofóbicos

El [Carbohydrate Active Enzymes database](#) agrupa las enzimas según similitudes estructurales y de secuencias. Las familias se agrupan de acuerdo a similitudes en la estructura del dominio catalítico y aminoácidos catalíticos conservados, lo que sugiere una ascendencia común. En esta base de datos, las β -glucosidasas se encuentran en las familias de glucosidasas GH1 y GH3. Las β -glucosidasas del grupo GH1 han sido reportadas desde arqueobacterias, plantas y animales, mientras que las pertenecientes al grupo GH3 provienen en su mayoría de bacterias, hongos y levaduras. Sin embargo, algunas β -glucosidasas también pueden formar parte de las familias GH5, GH9 y GH30 (Ahmed, *et al.* 2017b; Ketudat Cairns & Esen 2010; Singh, *et al.* 2016).

Usos de las β -glucosidasas

A continuación, se mencionan las aplicaciones más importantes de estas enzimas (Figura 4.2).

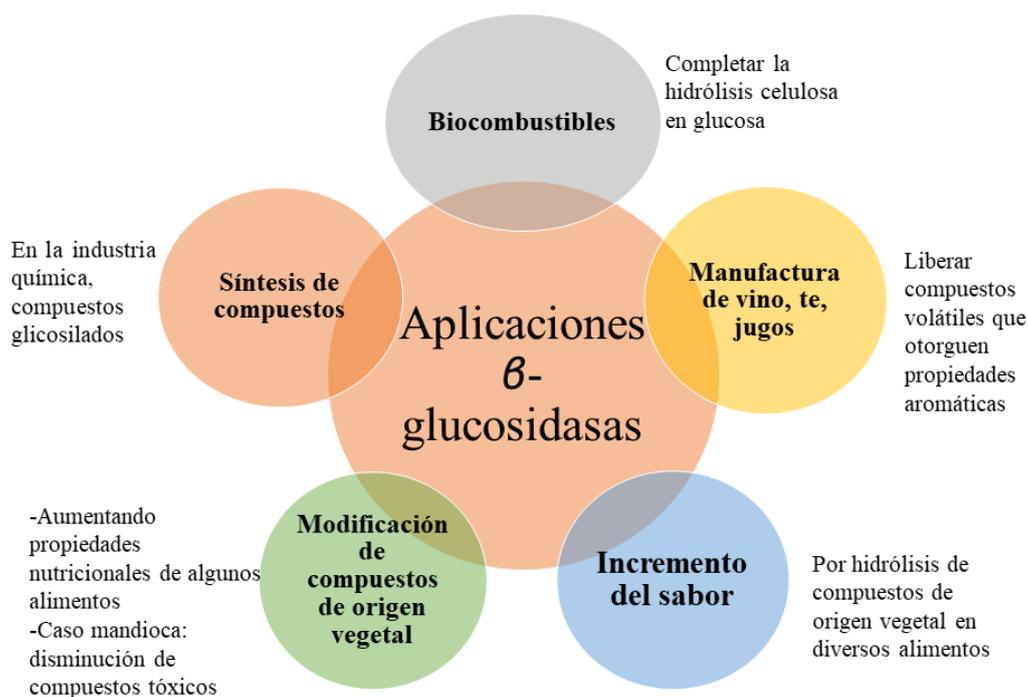


Figura 4.2 Aplicaciones de las enzimas β -glucosidasas.

Producción de biocombustibles

La producción de biocombustibles conlleva la completa hidrólisis de compuestos celulósicos para poder constituir una fuente de carbono para los microorganismos involucrados. Las β -glucosidasas catalizan la última etapa de la degradación de la lignocelulosa, ya que son las encargadas de liberar dos monómeros de glucosa a partir de la molécula de celobiosa (Figura 4.3) (Ahmed, *et al.* 2017b; Ketudat Cairns & Esen 2010). Por este motivo, son considerados uno de los cuellos de botella del proceso, especialmente teniendo en cuenta que su común inhibición por producto (glucosa) las ralentiza e inhibe, frenando el proceso. Por ese motivo, muchos estudios se han enfocado en la búsqueda de β -glucosidasas que no se inhiban con altas concentraciones de glucosa (Sørensen, *et al.* 2013).

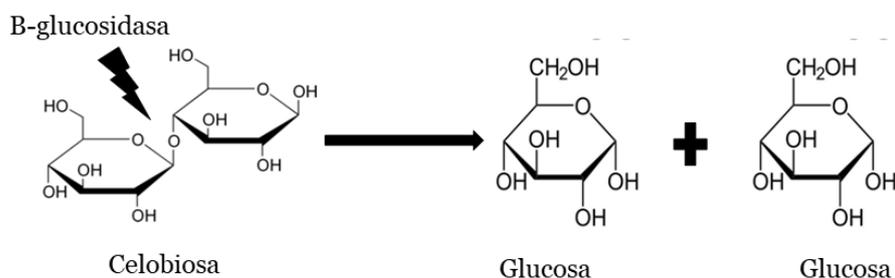


Figura 4. 3 Hidrólisis del disacárido celobiosa en dos monómeros de glucosa por parte de la enzima β -glucosidasa.

Hidrólisis de glicósidos de isoflavonas

Existen metabolitos secundarios producidos por las plantas como flavonoides e isoflavonas que, al ser hidrolizados por las β -glucosidasas, liberan la aglicona, que puede poseer diversas propiedades biológicas beneficiosas, como anticáncer, antialérgico, antioxidante, antiinflamatorio, entre otras. Por lo tanto, algunas de estas enzimas poseen

el potencial de liberar esos compuestos a partir de sus precursores, volviéndolos más biodisponibles (Ahmed, *et al.* 2017b).

Manufactura de vino, té y otras bebidas

Las β -glucosidasas poseen un rol clave en el desarrollo de aromas mediante liberación de compuestos aromáticos a partir de sus precursores glucosídicos en jugos de frutas, mostos, vinos y té (Ketudat Cairns & Esen 2010). Las β -glucosidasas endógenas por lo general o son inestables en los procesos de manufactura o muy lentas, por lo que suelen agregarse β -glucosidasas exógenas que aceleran el proceso.

Incremento de sabores

Estas enzimas se utilizan en la industria alimenticia para incrementar el sabor de los alimentos. En los productos de origen vegetal existen infinidad de compuestos hidrolizados por estas enzimas, que al liberar la aglicona pueden intensificar los sabores y aromas de los alimentos y las bebidas. Por otro lado, en los jugos cítricos, las β -glucosidasas hidrolizan la naringina, compuesto proveniente de la fruta que imparte un gusto amargo (Ketudat Cairns & Esen 2010).

Otras aplicaciones

Se ha reportado que estas enzimas sirven para detoxificación la casava o mandioca, la cual posee glucósidos cianogénicos que pueden causar problemas de salud ante un alto consumo. Esto sería de utilidad en lugares donde la mandioca constituye un alimento base en la dieta (Ahmed, *et al.* 2017b).

La actividad reversa o de transglicosilación que presentan estas enzimas puede ser aprovechada para la síntesis química de compuestos como oligosacáridos, alquil y aril β -D-glicósidos, los cuales poseen múltiples y diversas aplicaciones (Ahmed, *et al.* 2017b; Phongprathet, *et al.* 2018).

Enzimas pectinolíticas

El sustrato: la pectina

La pectina es uno de los heteropolisacáridos más complejos presentes en la naturaleza (Mohnen 2008). Se encuentra presente en la lámina media de las paredes primarias de las células vegetales, donde juega un rol importante en la adhesión celular (Yang & Anderson 2020). La estructura, abundancia y composición de la pectina es altamente compleja y variable dependiendo de la taxonomía, el tejido, el estado del desarrollo vegetal, y las condiciones ambientales (Gundala & Chinthala 2017; Popper, *et al.* 2010). Sin embargo, es altamente aceptado que está compuesta por diferentes dominios que se encuentran interconectados (Figura 4.4). Éstos dominios se clasifican en dos grandes familias de elementos estructurales de la pectina: galacturonanos y ramnogalacturonanos I (RG-I) (Ropartz & Ralet 2020). Dentro de los galacturonanos, podemos identificar al homogalacturonano, (HG), apiogalacturonano (AGA), xylogalactorunano (XGA) y ramnogalacturonano II (RG-II).

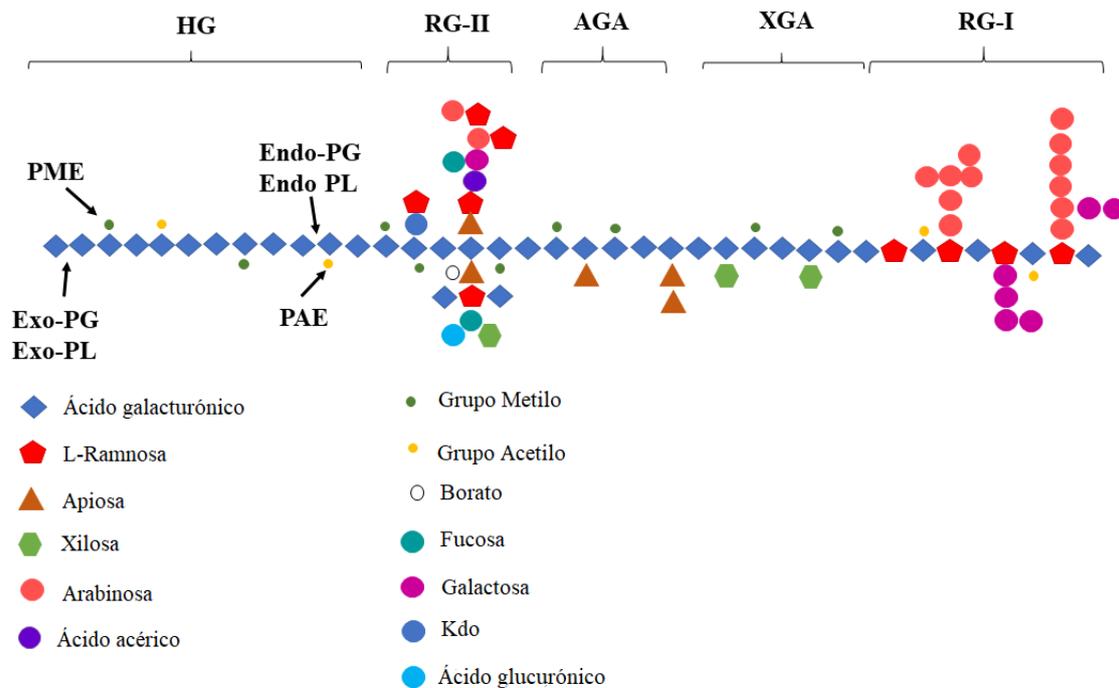


Figura 4. 4 Estructura esquemática de los diferentes dominios de la pectina: Homogalacturonano (HG), Ramnogalacturonano II (RG-II), Apiogalacturonano (AGA), Xilogalacturonano (XGA) y Ramnogalacturonano I (RG-I). Se muestran los sitios de acción de las enzimas Pectin metil esterasas (PME), Pectin acetil esterasas (PAE), endo-poligalacturonasas (endo-PG), exo-poligalacturonasas (exo-PG), endo-pectato liasas (endo-PL) y exo-pectato liasas (exo-PL). Kdo: ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-2-octulosónico.

Galacturonanos

Éstos se encuentran compuestos por un esqueleto de ácido D-galacturónico (D-GalA) unidos por enlaces α -(1,4) (Figura 4.4). Si se encuentra sin ramificaciones, se trata de homogalacturonano. Por otro lado, se pueden encontrar distintas ramificaciones que definen los diferentes elementos estructurales: apiogalacturonano (AGA), xilogalacturonano (XGA) o ramnogalacturonano II (RG-II) (Ropartz & Ralet 2020).

Los residuos de D-GalA suelen encontrarse parcialmente esterificados con grupos metilo, y tanto la distribución como el grado de esterificación de la molécula en conjunto afecta las propiedades funcionales de la pectina. En algunas especies, el D-GalA también puede encontrarse acetilado.

El ramnogalacturonano II es un homogalacturonano sustituido con azúcares de diversa naturaleza, y una gran cantidad de enlaces glicosídicos diferentes (Figura 4.4). Se pueden encontrar los azúcares ramnosa, apiosa, arabinosa, galactosa, fucosa, y los ácidos acérico y glucurónico, entre otros (Pérez, *et al.* 2003; Ropartz & Ralet 2020; Yapo 2011).

Ramnogalacturonano I (RG-I)

El esqueleto de este dominio, a diferencia de los galacturonanos, está compuesto por una secuencia alternada de residuos de ramnosa y D-GalA (Figura 4.4). Frecuentemente se encuentran unidas a la cadena principal una gran cantidad de cadenas laterales compuestas de diferentes azúcares, por lo que se llama esta región como “región pilosa” (Ropartz & Ralet 2020). Este dominio suele representar el 20-35% de la pectina total (Mohnen 2008).

Clasificación de las pectinasas

Siendo la pectina un sustrato tan complejo, existe una gran diversidad de enzimas que la hidrolizan (Figura 4.4). Las pectinasas son producidas por plantas, insectos y microorganismos. Como se observa en la Figura 4.5, estas enzimas pueden clasificarse según el dominio de la pectina en el cual actúan (Bonnin & Pelloux 2020).

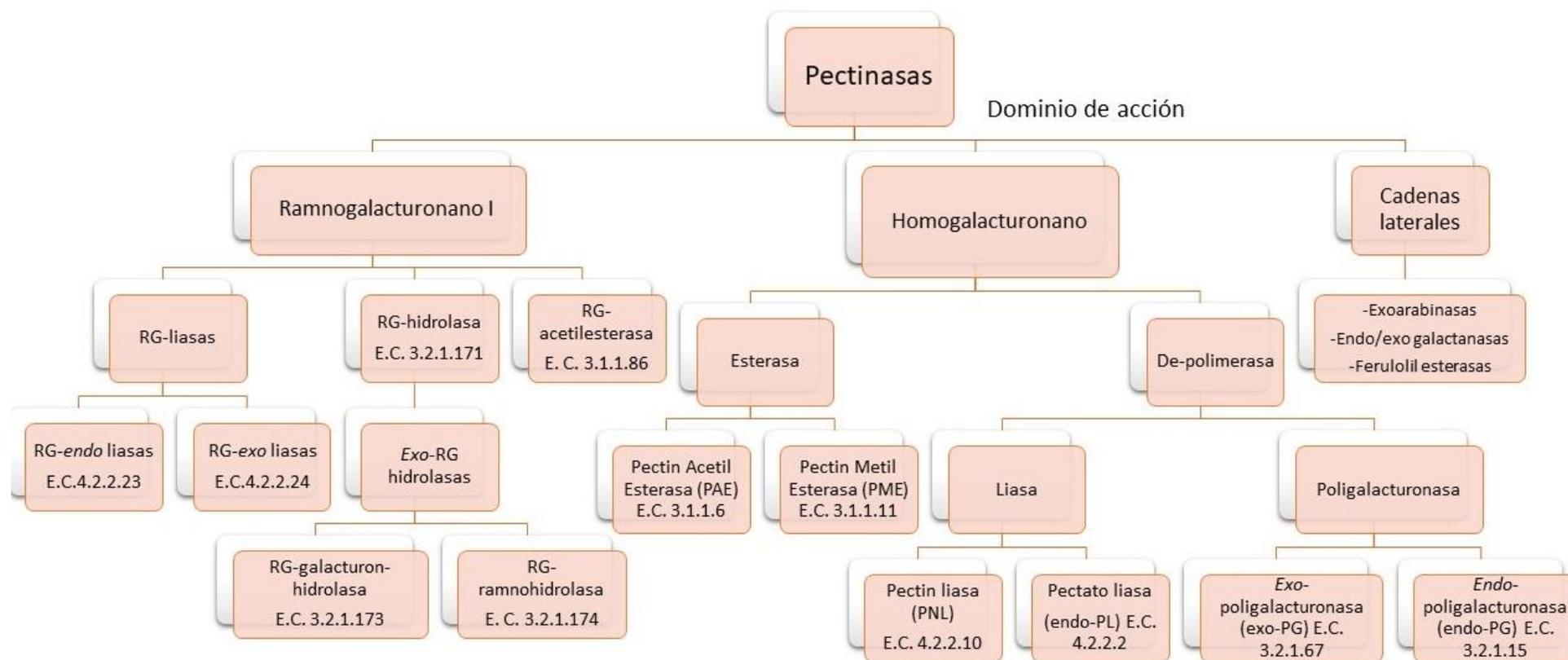


Figura 4.5 Clasificación de las pectinasas según el dominio de acción dentro de la estructura de la pectina.

El **homogalacturonano** es atacado por esterasas y de-polimerasas. Éstas últimas a su vez se sub-clasifican según su mecanismo de acción en poligalacturonasas y liasas (Figura 4.5). Las esterasas remueven el grupo metilo o acetilo que se encuentra unido a la cadena principal de homogalacturonano (Ruiz, *et al.* 2017). Las depolimerasas catalizan el clivaje de los enlaces entre dos ácidos galacturónicos contiguos. Si esta ruptura se lleva a cabo mediante un mecanismo de hidrólisis, la enzima es una poligalacturonasa; en cambio, si el mecanismo es una β -eliminación, se trata de una liasa (Ruiz, *et al.* 2017; Sieiro, *et al.* 2012; Yadav, *et al.* 2009). Las liasas actúan sobre HG metilado o no metilado, clasificándose entonces en pectin liasas o pectato liasas, respectivamente. Las esterasas actúan liberando ya sea un grupo metilo (metil esterasas) o acetilo (acetil esterasas), que se encuentra unido a un residuo de D-Gal. Por su lado, las poligalacturonasas sólo actúan sobre el HM no metilado, y según su mecanismo de acción pueden ser *endo* o *exo* enzimas, dependiendo de si hidrolizan enlaces al azar o desde el extremo no reductor de la molécula (Figura 4.4).

Entre las enzimas que atacan el **ramnogalacturonano** se destacan las hidrolasas, las cuales hidrolizan el enlace entre residuos adyacentes de ramnosa y GalA en el esqueleto principal. Las *exo*-hidrolasas pueden liberar ramnosa desde el extremo no reductor, en ese caso se llaman ramnohidrolasas; o ácido galacturónico, en ese caso son galacturon-hidrolasas. Las ramnogalacturonano liasas catalizan la escisión del enlace Rha-Gal mediante β -eliminación, existiendo también en su forma *endo* o *exo* dependiendo de los productos de reacción liberados (Figura 4.5). Las ramnogalacturonano acetil esterasas clivan los grupos acetilo presentes en la cadena principal del RG-I (Bonnin & Pelloux 2020).

Las enzimas que atacan las **cadena**s laterales de la estructura de la pectina son principalmente *endo*- y *exo*- arabinasas, galactanasas, y ferulolil esterases (Bonnin & Pelloux 2020).

Usos industriales de las pectinasas

La industria alimenticia es una gran consumidora de pectinasas, las cuales se utilizan principalmente en el procesamiento de jugo y durante la producción de vino (Figura 4.6). La mayoría de las pectinasas comerciales son, en realidad, cocteles enzimáticos obtenidos a partir de hongos, que poseen otras actividades accesorias.



Figura 4. 6 Aplicaciones de las pectinasas en la industria alimenticia. Adaptado de Bezus, et al. (2022a).

Procesamiento del jugo

La industria del jugo comercializa dos tipos de jugos: los clarificados y los que poseen pulpa. Las pectinasas se utilizan para clarificar y aumentar los rendimientos en el caso de los primeros (manzana, pera, uva, frutilla), y para estabilizar las “nubes de pectina” en

los segundos (cítricos, mango, durazno, piña) (Ishii & Yokotsuka 1973; Kashyap, *et al.* 2001).

Manufactura de sidra y vino

La industria del vino utiliza cocteles pectinolíticos para mejorar los rendimientos de extracción del jugo y para clarificar y optimizar la filtración del vino (Cabeza, *et al.* 2011). Las pectinasas favorecen la liberación de antocianinas desde la uva, siendo favorables durante la preparación de vinos tintos y rosados (Fratebianchi de la Parra, *et al.* 2017b; Kashyap, *et al.* 2001; Merín & de Ambrosini 2020; Merín & de Ambrosini 2018).

En la producción de sidra se utilizan PME's para clarificar el jugo de manzana antes de la fermentación, la cual genera una disminución del nitrógeno soluble, ralentizando la fermentación y logrando un balance final en la composición de azúcar (Lea 1995).

Maceración de vegetales

Este proceso se relaciona con la degradación selectiva de la pectina presente en la lámina media que se encuentra uniendo células adyacentes, para obtener una suspensión de células vegetales intactas. Permite obtener jugos muy viscosos, purés para ancianos y bebés y otros productos vegetales. Es necesario que las enzimas sean del tipo *endo*-poligalacturonasas (Kashyap, *et al.* 2001; Nakamura, *et al.* 1995).

Extracción de aceite vegetal

Las pectinasas, en conjunto con celulasas y hemicelulasas, ayudan en la extracción de aceite. Se han reportado buenas propiedades organolépticas en aceite de oliva extraído por métodos enzimáticos (Kashyap, *et al.* 2001; Najafian, *et al.* 2009; Ortiz, *et al.* 2017).

Fermentación del té y del café

Las pectinasas suelen utilizarse junto con otras enzimas para digerir el mucílago que cubre el grano de café, derivando en una reducción notable en los tiempos de fermentación (Amorim & Amorim 1977; Kashyap, *et al.* 2001; Serrat, *et al.* 2002). También se observó una aceleración de la fermentación en el procesamiento del té. Las pectinasas, en conjunto con tanasas, aumentan la extracción de polifenoles y polisacáridos bioactivos, aumentando la calidad nutricional del producto final (Baik, *et al.* 2015; Chandini, *et al.* 2011; Kashyap, *et al.* 2001).

OBJETIVOS DE ESTE CAPÍTULO

- Estudiar la producción enzimática de β -glucosidasas y pectinasas por parte de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 en medio líquido a escala Erlenmeyer.
- Realizar un escalado a biorreactores de escala laboratorio tipo tanque agitado.
- Realizar una caracterización bioquímica del extracto enzimático en términos de actividades β -glucosidasa y poligalacturonasa.
- Detectar otras actividades enzimáticas presentes en el extracto.
- Producir un extracto enzimático para ser utilizado en ensayos de purificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa utilizada

La cepa *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 fue aislada de una muestra antártica, tal como se detalló en el Capítulo 2. Fue elegida para continuar trabajando ya que, entre las cepas testeadas, fue la única cepa pectinolítica que presentó actividad poligalacturonasa detectable en medio líquido suplementado con pectina.

Preparación de los inóculos

La levadura se inoculó en el siguiente medio de cultivo: 10 g l⁻¹ pectina cítrica (PARAFARM) o glucosa, 5 g l⁻¹ extracto de levadura, 2 g l⁻¹ peptona, 1.4 g l⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 2 g l⁻¹ K₂HPO₄, 0.2 g l⁻¹ MgSO₄, y 1 ml l⁻¹ Solución A (5.0 mg l⁻¹ FeSO₄·H₂O, 1.6 mg l⁻¹ MnSO₄·H₂O, 2.0 mg l⁻¹ CoCl₂), pH inicial 6.0 (Cavello, *et al.* 2017). Se realizaron cultivos a 14 °C con una agitación de 150 rpm. A partir de uno de estos cultivos, se realizó un stock de levadura en glicerol al 20% v v⁻¹, en varios tubos Eppendorf de 750 µl. Estos se guardaron a -20 °C, y fueron utilizados para largar un pre-inóculo antes de cada cultivo. El proceso llevado a cabo para cada cultivo se esquematiza en la Figura 4.7. Cada 4 meses, este stock de tubos Eppendorf con levadura se renovó, debido a que se observó un aumento de la fase *lag* en la preparación del pre-inóculo.

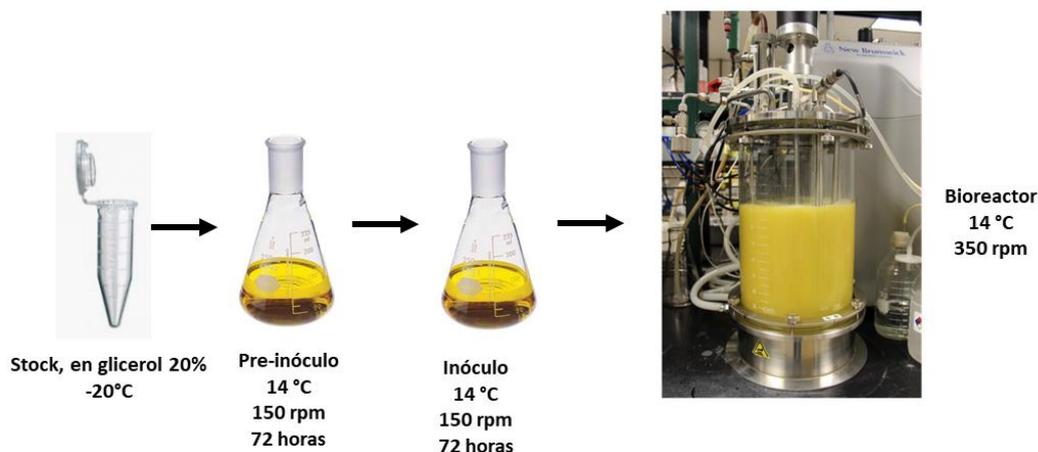


Figura 4. 7 Esquema llevado a cabo para la realización de todos los cultivos (en Erlenmeyer o en bioreactor).

Estudio de la producción de enzimas en medio líquido en matraces

Erlenmeyer

Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml, con 50 ml de medio de cultivo, y se esterilizaron a 121 °C durante 20 minutos. Se inoculó la levadura en un medio líquido compuesto por: 10 g l⁻¹ pectina cítrica (PARAFARM) o glucosa, 5 g l⁻¹ extracto de levadura, 2 g l⁻¹ peptona, 1.4 g l⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 2 g l⁻¹ K₂HPO₄, 0.2 g l⁻¹ MgSO₄, y 1 ml l⁻¹ Solución A (5.0 mg l⁻¹ FeSO₄·H₂O, 1.6 mg l⁻¹ MnSO₄·H₂O, 2.0 mg l⁻¹ CoCl₂), pH inicial 6.0, a 3 °C o 14 °C y 150 rpm (Cavello, *et al.* 2017). Luego de 72 horas, este medio crecido (inóculo líquido) fue utilizado para inocular otro matraz Erlenmeyer con la misma composición, utilizando la cantidad de cultivo necesaria para alcanzar una DO inicial de 0.06 a 600 nm (Figura 4.7). Los cultivos fueron monitoreados durante cuatro días, en los que se tomaron diariamente dos muestras líquidas de 1 ml en esterilidad, a las cuales se les determinó la densidad óptica a 600 nm utilizando un espectrofotómetro. Además, se tomó 1 ml de muestra el cual fue centrifugado a 6000 x g y el sobrenadante se conservó a -20 °C para la determinación de la actividad enzimática.

Cultivos *Batch* en biorreactor tipo tanque agitado

Se realizó el escalado de los cultivos tipo *Batch* en un biorreactor LH-210 (Inceltech, Toulouse, France) utilizando 3.5 l del mismo medio descrito arriba, suplementado con glucosa o pectina cítrica. El medio de cultivo se esterilizó dentro del biorreactor en autoclave (121 °C durante 30 minutos). Al igual que antes, se inoculó con una DO inicial a 600 nm de 0.06. El cultivo se llevó a cabo con una aireación de 0.21 ± 0.01 vvm (volumen de aire por volumen de medio por minuto), una agitación de 350 rpm y temperatura de 14 °C. Durante el cultivo, se tomaron muestras líquidas y gaseosas. El O₂ consumido y el CO₂ producido fueron cuantificados mediante mediciones en el gas de salida, el cual se analizó con un detector paramagnético de O₂ (Series 1100, Servomex, Crowborough, UK), y con un detector infrarrojo de CO₂ (Pir2000; Horiba, Japón). Estos valores sirvieron para calcular las velocidades de consumo y producción de O₂ y CO₂ (r_{O_2} y r_{CO_2}), respectivamente (Cooney, *et al.* 1977). Los moles de O₂ totales consumidos y CO₂ totales producidos se calcularon mediante integración de las curvas de las velocidades r_{O_2} y r_{CO_2} vs tiempo.

Las muestras líquidas fueron analizadas en términos de:

- Densidad óptica a 600 nm, como estimación del crecimiento celular del microorganismo.

- Peso seco, como medida del contenido total de biomasa. Para ello, se centrifugaron 10 ml de cultivo crecido a $10,000 \times g$ durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y la biomasa decantada se resuspendió en agua destilada y se secó en un frasco de vidrio previamente tarado a 105 °C hasta peso constante. La cantidad de biomasa fue calculada restando la tara del frasco correspondiente.

- Medida de pH, con un pHmetro (Mettler-Toledo, USA) previamente calibrado con soluciones calibradoras pH 4.0 y 7.0 (Biopack, Argentina).

-Contenido residual de glucosa, en el cultivo con glucosa como sustrato. Para ello, se utilizó un kit de glicemia enzimática glucosa oxidasa-peroxidasa (Wiener Lab., Argentina).

-Se guardaron alícuotas de sobrenadante a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a fin de determinar actividades enzimáticas en cada una de ellas.

Al terminar los cultivos, se separó la biomasa del sobrenadante mediante centrifugación a $5850 \times g$ y se filtró utilizando filtros con tamaño de poro de $0.45\text{ }\mu\text{m}$. El sobrenadante del cultivo se utilizó como extracto enzimático para ensayos posteriores.

Cálculo de parámetros del crecimiento del cultivo microbiano

El crecimiento del microorganismo se ajustó al modelo de Gompertz:

$$\ln \frac{N}{N_0} = a * \exp(-\exp(b - c * t))$$

Donde N es la biomasa (o densidad óptica) a tiempo t, N_0 es la biomasa (o densidad óptica) inicial y a, b y c son constantes obtenidas del modelo. Se utilizaron los datos de densidad óptica en el caso de los cultivos en Erlenmeyer y los datos de biomasa del cultivo en el caso de los biorreactores. La duración de la fase *lag* del cultivo se calculó de la siguiente manera:

$$Lag (h) = \frac{(b-1)}{c}$$

La velocidad máxima de crecimiento del microorganismo se calculó como:

$$\mu_m (h^{-1}) = \frac{c*a}{e}$$

Donde e es el número de Euler. Finalmente, se calculó el tiempo de duplicación como:

$$\text{Tiempo de duplicación (h)} = \frac{\ln(2)}{\mu_m}$$

Ensayos enzimáticos

Ensayo de actividad β -glucosidasa (BGLasa)

La actividad β -glucosidasa fue determinada utilizando *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNPG), 5 mM disuelto en BCP pH 5.0, tal como se detalló en el Capítulo 3.

Ensayo de actividad poligalacturonasa (PGasa)

La actividad poligalacturonasa fue determinada utilizando PGA 2 g l⁻¹ disuelto en BCP pH 5.0, utilizando el protocolo detallado en el Capítulo 3.

Determinación de otras actividades enzimáticas en el extracto enzimático obtenido

Actividad pectin y pectato liasa

Para realizar la determinación de actividad pectin y pectato liasa se utilizaron los sustratos pectina y ácido poligalacturónico, respectivamente, en una concentración de 2 g l⁻¹ (disueltos en BCP, pH 5.0). La determinación se realizó espectrofotométricamente a 235 nm, midiendo la velocidad de formación de productos insaturados de reacción. Se mezclaron 900 μ l de sustrato con 100 μ l de muestra. Una unidad de actividad pectin/pectato-liasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de productos 4,5-insaturados por minuto (Edstrom & Phaff 1964).

Actividad pectin metilesterasa

Para realizar este ensayo de forma cualitativa, se utilizó como sustrato pectina cítrica (10 g l⁻¹, disuelta en agua destilada, pH 5.0). Se colocaron 2 ml de sustrato en tubos de vidrio y se mezcló con 100 μ l de extracto enzimático y 10 μ l de verde de bromocresol 10 g l⁻¹ (pH 5.4 > rango de viraje > pH 3.8). Los tubos fueron tapados con Parafilm® y se

dejó reaccionar durante 16 horas a 20 °C. Pasado ese tiempo, se registró el cambio de color de las mezclas (debido a la liberación de grupos carboxílicos del sustrato) comparándolas con un blanco de sustrato. Un viraje de color azul a color amarillo indica la liberación de metanol a partir de la pectina, con la consecuente acidificación de la mezcla de reacción (Vilariño, *et al.* 1993).

Actividad arabinogalactanasa y ramnogalacturonasa

Se utilizaron arabinogalactano (Sigma-Aldrich, 2 g l⁻¹, en BCP, pH 5.0) y ramnogalacturonano (Megazyme, 2 g l⁻¹, en BCP, pH 5.0) como sustratos, y se procedió de la misma manera que la indicada para la determinación de actividad poligalacturonasa.

Actividad inulinasa

Para la determinación de actividad inulinasa, se incubaron 180 µl de inulina (0.5 g l⁻¹, en BCP pH 5.0) con 20 µl del extracto enzimático durante 20 minutos a 20 °C. Pasado ese tiempo, se determinaron azúcares reductores mediante el método de Somogyi-Nelson. Se realizó una curva de calibración con fructosa (0-250 ppm). Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 µmol de fructosa por minuto, en las condiciones de ensayo.

Actividad celulasa

Para la determinación de actividad celulasa, se incubaron 180 µl de celulosa (2.5 g l⁻¹, en BCP pH 5.0) con 20 µl del extracto enzimático durante 20 minutos a 20 °C. Pasado ese tiempo, se determinaron azúcares reductores mediante el método de Somogyi-Nelson. Se realizó una curva de calibración con glucosa (0-250 ppm). Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 µmol de glucosa por minuto, en las condiciones de ensayo.

Actividad xilanasa

Se determinó la actividad xilanasa incubando 180 μl de xilano (2.5 g l^{-1} , en BCP pH 5.0) con 20 μl del extracto enzimático durante 20 minutos a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Luego de la incubación se determinaron los azúcares reductores mediante el método de Somogyi-Nelson. Se realizó una curva de calibración con xilosa (0-250 ppm). Se definió una unidad enzimática como la cantidad de enzima cataliza la liberación de 1 μmol de xilosa por minuto, en las condiciones de ensayo.

Actividad amilasa

La actividad amilasa se determinó incubando 180 μl de almidón soluble (5 g l^{-1} en BCP, pH 5.0) con 20 μl del extracto enzimático durante 20 minutos a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Pasado ese tiempo, se determinaron los azúcares reductores utilizando la técnica de Somogyi-Nelson. La curva de calibración se realizó con glucosa (0-250 ppm) y una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 μmol de glucosa por minuto, en las condiciones de ensayo.

Actividad proteasa

La actividad proteolítica se ensayó en el sobrenadante utilizando el sustrato azocaseína (Sigma-Aldrich, USA). Para la determinación, 250 μl de una solución de azocaseína (10 g l^{-1} en BCP pH 5.0) se mezclaron con 100 μl de sobrenadante y se incubaron a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 h. La reacción fue finalizada mediante el agregado de 1 ml de ácido tricloroacético 100 g l^{-1} (TCA) y la muestra se centrifugó a $10,000 \times g$ durante 10 minutos. Se mezclaron volúmenes iguales del sobrenadante y de NaOH 1 M y se determinó la absorbancia a 440 nm. El blanco se efectuó agregando el TCA previo a la enzima. Una unidad de actividad proteolítica se definió como la cantidad de enzima que, bajo las

condiciones experimentales utilizadas, causa un aumento de 0.01 unidades de absorbancia a 440 nm por minuto (Cavello, *et al.* 2012).

Caracterización bioquímica de las actividades β -glucosidasa y poligalacturonasa presentes en el extracto enzimático

Efecto del pH en la actividad y la estabilidad de las actividades enzimáticas

La actividad y la estabilidad al pH por parte de las actividades enzimáticas fue estudiada en un rango de pH de 2.0 a 13.0, usando los métodos estándar de medida. Para evaluar el efecto del pH sobre la actividad, el sustrato utilizado en cada caso se ajustó a los diferentes valores de pH, utilizando el buffer MES (ácido 2-etanosulfónico)-Tris-Glicina (20 mM cada uno). Por otro lado, para la evaluación de la estabilidad, las enzimas fueron incubadas a cada pH utilizando el mismo buffer, y la actividad residual se midió luego de una hora de incubación, en condiciones estándar de reacción (pH 5.0). Se definió como 100% de actividad aquella obtenida al pH óptimo de la enzima en el caso de la actividad y sin incubación en el caso de la estabilidad.

Efecto de la temperatura en la actividad y la estabilidad de las actividades enzimáticas

La dependencia de la reacción con la temperatura fue evaluada mediante la realización de mediciones a diferentes temperaturas, en un rango 15 °C a 80 °C, considerando 100 % de actividad a aquella obtenida a la temperatura óptima de la enzima.

La energía de activación (E_a) y la temperatura óptima de reacción se calcularon a partir de la linealización de los datos según la regresión de Arrhenius:

$$\ln V = \frac{E_a}{R} \frac{1}{T} + \ln A$$

Donde:

V es la actividad enzimática,

T es la temperatura de medición en Kelvins,

R es la constante de los gases ($8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$),

A es una constante.

Por otro lado, para realizar las cinéticas de inactivación térmica de las enzimas, se incubaron las enzimas a distintas temperaturas entre $45 \text{ }^\circ\text{C}$ y $70 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 180 min, tomando muestras a diferentes tiempos. Estas fueron conservadas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta la medida de la actividad enzimática en las condiciones estándar de medición. La actividad remanente en cada punto fue expresada como un porcentaje del valor de actividad inicial (enzima sin exposición al calor).

En los casos en los que no se obtuvo un buen ajuste para las cinéticas de desactivación térmica de primer orden se testearon otros modelos: distribución de Weibull, modelo de isoenzimas, modelo de dos fracciones, y modelo de conversión fraccional. Las fórmulas que se utilizaron para modelar los datos experimentales se muestran a continuación.

Primer orden $\frac{A}{A_0} = \exp(-k * t)$

Distribución de Weibull $\frac{A}{A_0} = \exp(-b * t^n)$

Modelo de isoenzimas $\frac{A}{A_0} = A_L \exp(-k_l * t) + A_S \exp(-k_r * t)$

Modelo de dos fracciones $\frac{A}{A_0} = a * \exp(-k_l * t) + (1 - a) * \exp(-k_r * t)$

Modelo de conversión fraccional $\frac{A}{A_0} = A_r + (A_0 - A_r) * \exp(-k * t)$

Donde k , b , n , k_i , k_r , A_L , A_S , a , son parámetros estimados por los modelos, A es la actividad enzimática a tiempo t , y A_0 es la actividad enzimática inicial, previa a la exposición al calor.

El coeficiente de correlación (r^2), el chi cuadrado (χ^2) y el error estándar de medias (SEM) se utilizaron como criterio para definir el modelo que mejor describe el comportamiento observado (Cavello & Cavalitto 2014).

$$\chi^2 = \sum \frac{(a_{observado} - a_{predicho})^2}{(m-p)}$$

$$SEM = \sum \frac{(a_{observado} - a_{predicho})^2}{\sqrt{m}}$$

Donde a representa los valores de actividad enzimática observada o predicha por el modelo, m es el número de observaciones y p es el número de parámetros estimados por el modelo. En todos los casos se utilizó el software Statistica 7.0 para realizar los ajustes.

Efecto de los iones metálicos y EDTA en las actividades enzimáticas

El efecto de diferentes iones metálicos (Mg^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2} , Co^{+2} , K^+ , Hg^{+2} , Na^+) y EDTA en la actividad enzimática fue estudiado pre-incubando las enzimas con cada ion en una concentración de 1 mM durante 1 h a 20 °C. Luego, se midió la actividad residual en el sustrato suplementado con cada ion a la misma concentración. La actividad enzimática remanente luego del ensayo fue expresada como un porcentaje comparando con la reacción control, en la cual la enzima no fue expuesta a ninguna sustancia.

Mecanismo de acción de la actividad poligalacturonasa

Para el estudio del mecanismo de acción de la actividad poligalacturonasa, una unidad total de actividad poligalacturonasa se incubó con 100 ml de PGA 2 g l⁻¹ (en BCP, pH 5.0). Alícuotas de 10 ml se tomaron a diferentes tiempos (0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 y 360 min) y se expusieron a 100 °C durante 5 min para inactivar las enzimas. Se determinó la viscosidad de cada muestra a 30 °C usando un viscosímetro de Ostwald (Serie 100, Científica Nacional, Argentina). Se determinó el poder reductor de cada muestra mediante la técnica de Somogyi-Nelson, y se expresó como concentración de GALA, utilizando un patrón de GALA. El porcentaje de hidrólisis en cada una se calculó como (Tam 1983):

$$\% \text{ de hidrólisis} = \frac{(\text{umoles/ml})_{GALA} (PM)_{\text{subunidad PGA}} * 100}{\mu\text{g/ml}_{PGA}}$$

La disminución de la viscosidad de la mezcla reactiva se calculó como (Tam 1983):

$$\% \text{ pérdida de viscosidad} = \frac{(V_0 - V_t)}{(V_0 - V_s)} * 100$$

Donde V_0 es el tiempo determinado en el viscosímetro de la mezcla a tiempo 0, V_t es el tiempo obtenido al medir la mezcla a tiempo t , y V_s es el tiempo determinado para el solvente, BCP.

Los productos de reacción de la actividad poligalacturonasa también fueron analizados por cromatografía de capa fina. Para ello, se utilizaron láminas de aluminio, las cuales soportan una capa de sílica gel (60 F254, Merck, Darmstadt, Alemania) como fase estacionaria. Para la fase móvil se utilizó n-butanol:ácido acético:agua en las siguientes proporciones relativas: 9:4:7. Luego de la cromatografía, las láminas previamente secadas al aire se sumergieron en una solución 5 g l⁻¹ de ácido fosfomolibdico en etanol con 4%

de H_2SO_4 y se calentaron a $105\text{ }^\circ\text{C}$ hasta visualización de manchas en la placa, correspondientes a derivados químicos de los productos finales de reacción enzimática (Fratebianchi de la Parra 2017). Las muestras de los productos de reacción a diferentes tiempos, obtenidas previamente, se sembraron junto a patrones de ácido trigalacturónico y monogalacturónico (Sigma Aldrich).

SDS-PAGE y Zimogramas

Se realizó un *SDS-PAGE* (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) acoplado a dos zimogramas, utilizando el protocolo descrito por Laemmli (1970). Se utilizó un gel de 6% *stacking* y 10% de resolución. El marcador de peso molecular utilizado fue Thermo#26630 (Thermo Fisher Scientific, USA). El extracto se desaló utilizando columnas PD-10 (GE Healthcare Life Sciences, equilibrado con BCP, pH 5.0) y se concentró por liofilización. La muestra se sembró en condiciones desnaturizantes (SDS 46 g l^{-1} y sometida a ebullición en presencia de β -mercaptoetanol 0.025 ml l^{-1}) y en condiciones no desnaturizantes (sólo con SDS 46 g l^{-1}). Luego de la electroforesis, dos porciones iguales del gel (en las que se corrió la enzima en condiciones no desnaturizantes) se incubaron con Tritón X-100 $2.5\% \text{ v v}^{-1}$ con agitación suave durante una hora. Luego, una porción se incubó en BCP durante 10 minutos para luego ser incubada con una solución de esculina 1 g l^{-1} y FeCl_3 0.3 g l^{-1} a $25\text{ }^\circ\text{C}$. En este zimograma se observa la aparición de bandas oscuras sobre un fondo claro ante la presencia de actividad β -glucosidasa (Kwon, *et al.* 1994). Otra porción del gel fue también incubada en Tritón X-100 25 ml l^{-1} durante el mismo tiempo. El detergente se enjuagó con agua destilada, y el gel se incubó con PGA 4 g l^{-1} pH 5.0 durante 30 minutos a $25\text{ }^\circ\text{C}$. Pasado el tiempo de incubación, se enjuagó el gel con agua destilada y se agregó una solución de Rojo de Rutenio (Sigma-Aldrich, 0.2 g l^{-1} en agua destilada). El gel se tiñe de rojo excepto

en las zonas en las que actuó la actividad poligalacturonasa (Cruickshank & Wade 1980).

La porción del gel destinada a la visualización de las proteínas fue teñida con Coomassie coloidal 0.30 g l⁻¹ (Dyballa-Rukes & Metzger 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Elección de la cepa: el género *Mrakia*

Un *screening* en placa, como el que se llevó a cabo en el Capítulo 2, tiene como objetivo no sólo el de evaluar el potencial biotecnológico de una serie de microorganismos aislados, sino también el de servir como herramienta para la selección de los microorganismos más prometedores en la aplicación que se deseen usar. Para continuar el estudio con las cepas pectinolíticas, aquellas que desarrollaron un halo de hidrólisis en las placas con pectina fueron inoculadas en el mismo medio de cultivo utilizado para el *screening* sin la adición del agar, y se midió actividad poligalacturonasa extracelular. El único sobrenadante en el que se detectó actividad considerable fue en el del cultivo de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 (Figura 4.8), cultivada a 14 °C, dada su naturaleza psicrófila.

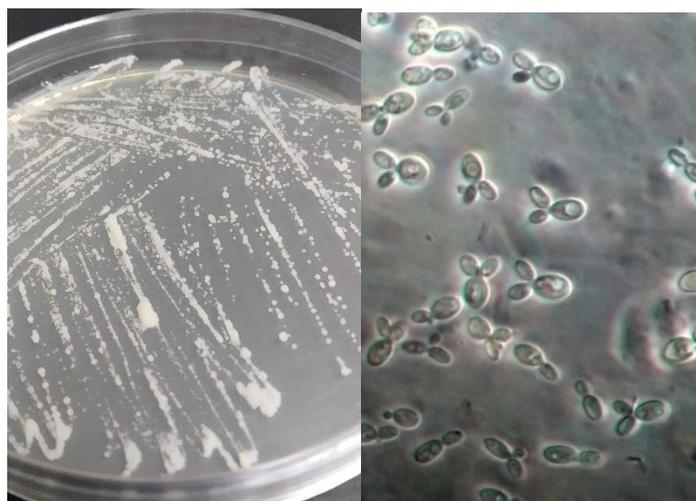


Figura 4. 8 *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 creciendo en medio YPD a 14 °C (izquierda), y observada al microscopio óptico 40X (derecha).

Mrakia sp. LP 7.1.2016 es una levadura psicrófila, es decir, no posee la capacidad de desarrollarse a una temperatura de 20 °C o mayor. El género *Mrakia* se define como psicrófilo, es decir, “amante de las bajas temperaturas” (Fell 2011). Se ha estudiado

mucho acerca de este género en los últimos años. Por un lado, presenta una filogenia interesante, con nuevas especies que siguen reportándose cada año (Park, *et al.* 2021; Tsuji, *et al.* 2018; Tsuji, *et al.* 2019; Turchetti, *et al.* 2020). Hasta el momento se han aislado cepas de las especies *Mrakia gelida*, *M. frigida*, *M. robertii*, *M. blollopis*, *M. psychrophila*, *M. cryoconite*, *M. stelviica*, *M. arctica*, *M. montana*, *M. aquatica*, *M. fibulata*, *M. hoshinonis*, *M. niccombsii*, *M. terrae* y *M. soli* (Fell 2011; Park, *et al.* 2021; Turchetti, *et al.* 2020). Además, algunas cepas de este género han sido estudiadas para procesos biotecnológicos como la producción de cerveza con bajo contenido de alcohol (De Francesco, *et al.* 2018; Tsuji & Hoshino 2019), procesos de biodecontaminación (Tsuji, *et al.* 2015; Tsuji, *et al.* 2013) o la producción de compuestos con actividad terapéutica como peltatol A, pinacidil y pirbuterol (anti-HIV, reductor de la presión sanguínea y broncodilatador, respectivamente) (Tsuji & Kudoh 2020). También se ha reportado la producción por parte de este género de una proteína *killer* (toxina) hacia la levadura *Metschnikowia bicuspidata* (Hua, *et al.* 2010; Liu, *et al.* 2012). En cuanto a la producción de enzimas, se han reportado cepas de *M. frigida* produciendo pectato liasas (Margesin, *et al.* 2005), *M. robertii* produciendo endoglucanasas (Dhume, *et al.* 2019) y *Mrakia* sp., una gelatinasa (Yuivar, *et al.* 2019). Estudios más básicos de bioprospección (en placa) muestran que existen diversas especies de este género (*M. aquatica*, *M. cryoconiti*, *M. frigida*, *M. gelida*, *M. psychrophila*, *M. robertii*) que han logrado la producción de pectinasas, cepas de diferentes lugares fríos a lo largo del mundo (Islandia, Siberia, Antártida y el Ártico) (Bezus, *et al.* 2022a).

Por otro lado, en el Capítulo 2 se evidenció la capacidad de esta levadura de producir β -glucosidasas. Pensando en una futura aplicación en vinos, el cual posee un pH entre 3.5 y 4.0, la actividad β -glucosidasa debería ser activa a pH ácido. Por lo tanto, se realizó nuevamente una placa de EGA, al igual que en el Capítulo 2, pero ajustando el pH del

medio a un valor de 4.0, para evidenciar si la actividad β -glucosídica se seguía observando. Efectivamente, se observó actividad β -glucosidasa a pH 4.0 (Figura 4.9) por lo que se propuso producir las dos actividades enzimáticas a partir del cultivo de esta levadura.



Figura 4. 9 Halo indicativo de producción de actividad β -glucosidasa, con el medio EGA a pH 4.0. La levadura *Mrakia sp.* LP 7.1.2016 fue inoculada e incubada a 4 °C durante 7 días.

La primera parte de este capítulo se enfocará específicamente en el estudio de la producción de β -glucosidasas y poligalacturonasas por parte de la levadura *Mrakia sp.* LP 7.1.2016. La segunda parte será dedicada al estudio de las propiedades bioquímicas de las actividades β -glucosidasa y poligalacturonasa del extracto enzimático obtenido en la primera parte del capítulo.

Estudio de la producción de las enzimas

Para estudiar la producción de las enzimas hidrolíticas β -glucosidasa y poligalacturonasa se realizaron cultivos sumergidos en matraces Erlenmeyer utilizando un medio complejo con dos sustratos diferentes: glucosa o pectina. Las cinéticas de producción enzimática se realizaron a dos temperaturas: 3 °C y 14 °C.

Cultivos en matraces Erlenmeyer con glucosa

En la Figura 4.10 se muestra la evolución de la densidad óptica (600 nm) y las actividades β -glucosidasa y poligalacturonasa en función del tiempo en los cultivos con glucosa realizados a 3 °C y a 14 °C.

La levadura se desarrolló con una velocidad de crecimiento mayor a 14 °C (0.1806 h^{-1} , $r^2=0.9955$) respecto de 3 °C (0.1205 h^{-1} , $r^2=0.9514$), por ende, el tiempo de duplicación a 14 °C fue menor (3.8 h) respecto del tiempo de duplicación obtenido a 3 °C (5.7 h).

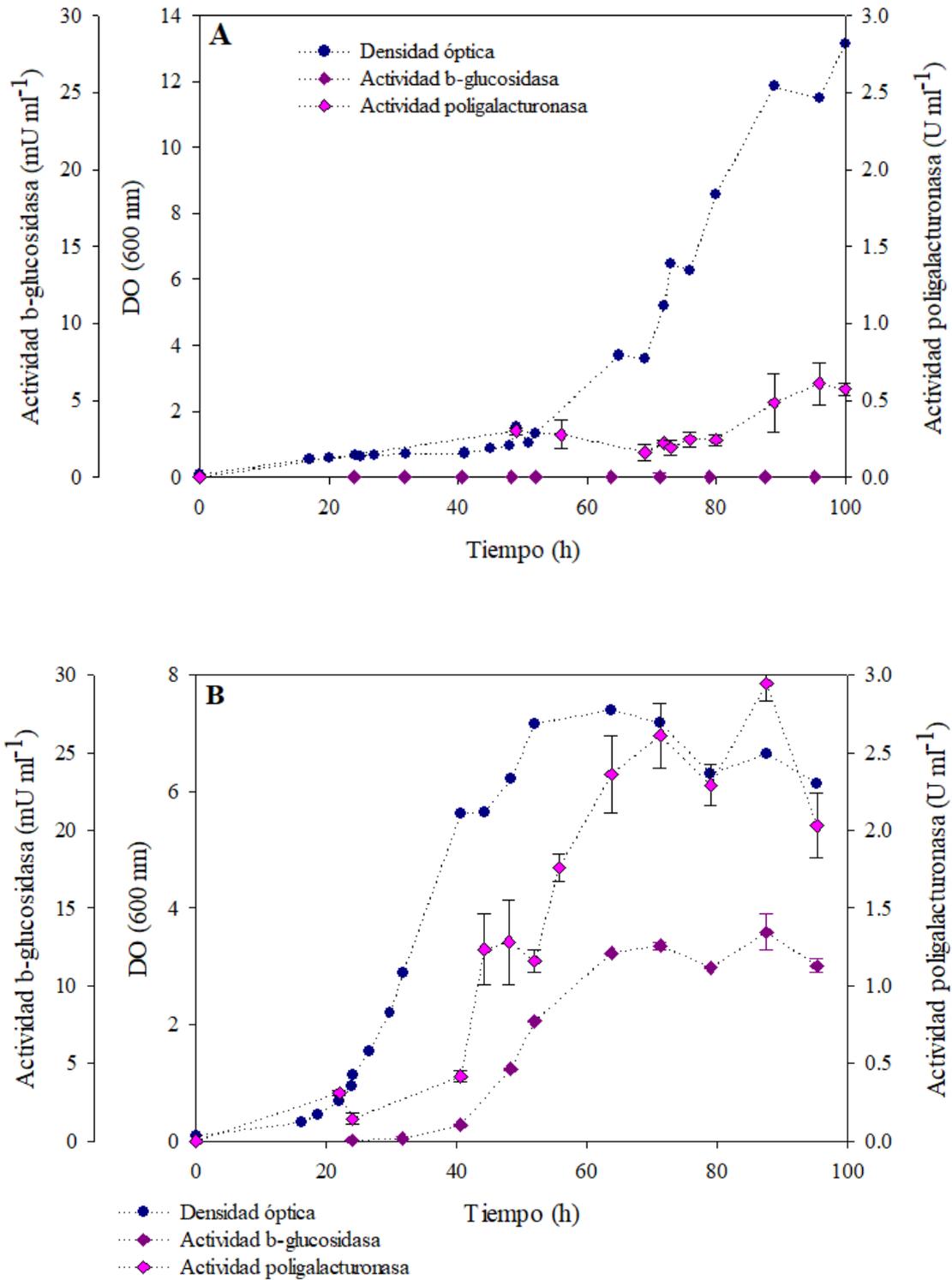


Figura 4. 10 Evolución de la densidad óptica (DO, 600 nm) y las actividades β -glucosidasa y poligalacturonasa en los cultivos realizados a escala Erlenmeyer con glucosa como sustrato a 3 °C (A) y 14 °C (B).

Ambas actividades hidrolíticas extracelulares estudiadas aumentaron en el sobrenadante durante el transcurso del tiempo de cultivo de la mano con la multiplicación celular y se obtuvieron ambos máximos de actividad en la fase estacionaria de crecimiento, tanto a 3 °C como a 14 °C. Tanto los títulos de actividad β -glucosidasa como poligalacturonasa fueron mayores en los sobrenadantes obtenidos a 14 °C. En el caso de la actividad β -glucosídica, ésta no fue detectada en el medio a 3 °C, mientras que a 14 °C se obtuvo un título máximo de $13.45 \pm 1.17 \text{ mU ml}^{-1}$ a las 87 h de cultivo. En el caso de la actividad poligalacturonasa, se obtuvieron títulos máximos de actividad de $0.61 \pm 0.14 \text{ U ml}^{-1}$ (96 h) y $2.95 \pm 0.11 \text{ U ml}^{-1}$ (87 h) en las cinéticas a 3 °C y 14 °C, respectivamente. Esto significa un título 4.8 veces mayor a 14 °C. Estos resultados indican que la temperatura es un factor que afecta considerablemente la producción de estas enzimas por parte de esta levadura.

Cultivos en Erlenmeyer con pectina

En la Figura 4.11 se muestra la evolución de la densidad óptica a 600 nm y de las actividades β -glucosidasa y poligalacturonasa en función del tiempo en los cultivos con pectina cítrica como sustrato, realizados a 3 °C y a 14 °C.

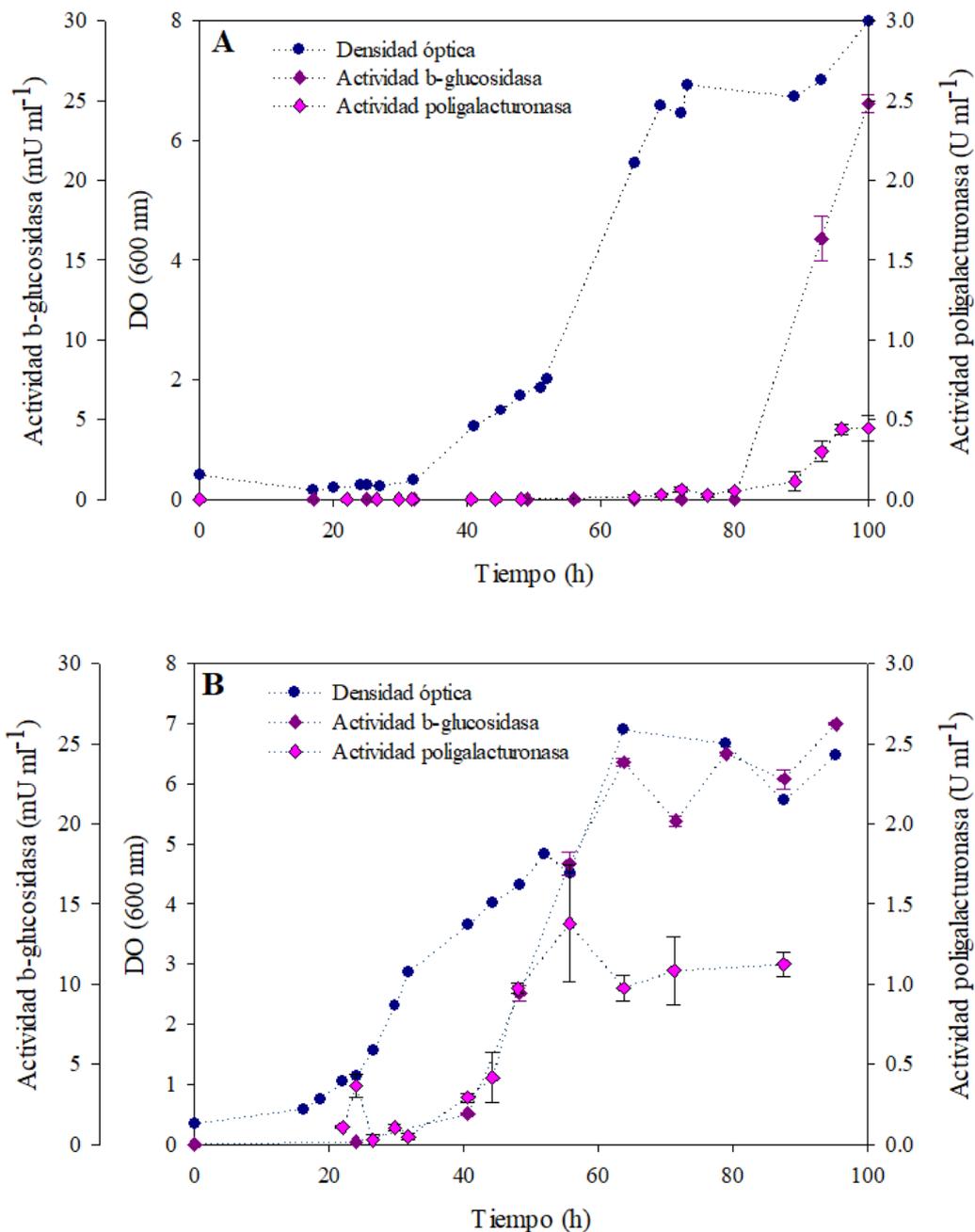


Figura 4.11 Evolución de la densidad óptica (DO, 600 nm) y las actividades β -glucosidasa y poligalacturonasa en los cultivos realizados a escala Erlenmeyer con pectina como sustrato a 3 °C (A) y 14 °C (B).

A 3 °C, la levadura creció con un $\mu_{\text{máx}}$ de 0.0943 h⁻¹ ($r^2= 0.9904$), lo que implica un tiempo de duplicación de 7.3 horas. A 14 °C, la velocidad máxima de crecimiento fue de 0.0963 h⁻¹ ($r^2=0.9888$), con un tiempo de duplicación de 7.2 h. Por lo tanto, utilizando

este sustrato no parece haber diferencias significativas en la velocidad de crecimiento de este microorganismo, como sí se observó previamente en los cultivos con glucosa. Se puede ver en la Figura 4.11B que a 14 °C se observó un comportamiento similar a dos etapas de crecimiento solapadas. Hay que tener en cuenta que la presencia del sustrato pectina otorga cierta turbidez al medio, que al crecer el microorganismo se va modificando debido a: a) el crecimiento de microorganismo, aumentando la densidad óptica a 600 nm y b) la hidrólisis del sustrato en presencia de enzimas, lo que disminuye la densidad óptica, así como la viscosidad del medio. Esta interferencia sólo se observa al principio del cultivo, cuando el aporte a la densidad óptica por parte del microorganismo es muy bajo.

En el caso de la enzima β -glucosidasa, los títulos obtenidos fueron muy similares en los cultivos realizados a ambas temperaturas, con 24.8 ± 0.6 mU ml⁻¹ (100 h) en el cultivo a 3 °C y 26.2 ± 0.6 mU ml⁻¹ (95 h) en el cultivo a 14 °C. En el caso de los títulos enzimáticos de poligalacturonasa en los cultivos realizados con pectina cítrica como sustrato, se observó algo similar a lo previamente observado en los cultivos realizados con glucosa: la producción de poligalacturonasas fue mayor en el cultivo crecido a 14 °C, obteniéndose un título 2.8 veces mayor. Los títulos de poligalacturonasa fueron 0.45 ± 0.08 U ml⁻¹ (100 h) a 3 °C y 1.38 ± 0.36 U ml⁻¹ (56 h) a 14 °C. Por lo tanto, al utilizarse el sustrato pectina, la temperatura es un factor clave para la producción de poligalacturonasas, mientras que no parece serlo para la producción de β -glucosidasas, en caso de utilizar pectina. Esta última actividad enzimática aumentó notablemente respecto de lo observado en los cultivos con glucosa.

Conclusiones de los cultivos en matraces Erlenmeyer

En la Tabla 4.1 se resumen los resultados obtenidos a partir de los cultivos realizados en matraces Erlenmeyer.

Tabla 4.1 Datos obtenidos a partir de las cinéticas realizadas a escala Erlenmeyer a partir del cultivo de la levadura psicrófila *Mrakia* sp. LP 7.1.2016

Sustrato utilizado	T (°C)	Fase lag (h)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1})	T_d^a (h)	r^{2b}	BGLasa ($mU\ ml^{-1}$)^c	PGasa ($U\ ml^{-1}$)^c
Glucosa	3	nd ^d	0.1205	5.75	0.9514	ND	0.6
Glucosa	14	9.56	0.1806	3.84	0.9955	13.5	2.9
Pectina	3	32.17	0.0943	7.35	0.9904	24.8	0.5
Pectina	14	10.53	0.0963	7.20	0.9888	26.2	1.4

^a tiempo de duplicación

^b Coeficiente de correlación para el modelo de Gompertz. Para el ajuste se usaron los datos de densidad óptica

^c Títulos máximos de enzimas obtenidos

^d no pudo determinarse con el modelo

ND: no detectada

A juzgar por los resultados obtenidos en cuanto a los títulos de actividad β -glucosidasa, la pectina (o sus productos de degradación) parecen inducir la producción de la misma. Al igual que otras celulasas, las β -glucosidasas son enzimas inducibles por varias fuentes de carbono (Ahmed, *et al.* 2017b). Su sustrato natural celobiosa fue adicionado al medio de cultivo como inductor en varios trabajos, sin embargo, es un sustrato costoso pensando en un futuro escalado (Arévalo Villena, *et al.* 2005; de Ovalle, *et al.* 2016; Pavlova, *et al.* 2002; Rajoka, *et al.* 2004). A partir de este set de cultivos puede verse que, o bien la pectina actúa como inductor de la actividad β -glucosidasa, o bien la glucosa podría actuar como represor de la síntesis de ésta. La represión de la síntesis de β -glucosidasas por parte de su producto glucosa es un fenómeno común, conocido como represión catabólica

(Ahmed, *et al.* 2017b). La pectina fue previamente utilizada como inductor para la producción de β -glucosidasas en cultivos sumergidos por parte de una cepa de *Aspergillus* (Elyas, *et al.* 2010).

En el caso de la actividad poligalacturonasa, se puede observar que el efecto de la temperatura del cultivo es un factor muy importante. Además, a 14 °C, se obtuvo un título mayor en el medio con glucosa respecto del que contiene pectina. Esto podría explicarse pensando que la/s poligalacturonasa/s medidas en uno y otro medio podrían no ser las mismas. En varios estudios se demostró que las poligalacturonasas de algunos microorganismos son inducibles por pectina o sustratos con alto contenido de pectina (como residuos agroindustriales), los cuales suelen utilizarse con frecuencia para producir este tipo de enzimas (Birgisson, *et al.* 2003; Cavello, *et al.* 2017; El Enshasy, *et al.* 2018; Fratebianchi de la Parra 2017; Khairnar, *et al.* 2009).

Para escalar el cultivo se eligió la temperatura de 14 °C. No sólo porque es a la temperatura a la que se observaron mayores títulos de enzima, sino por una cuestión operativa a la hora de trabajar a mayor escala. Los cultivos con pectina y con glucosa fueron escalados para observar el comportamiento del cultivo en biorreactores de mayor volumen.

Escalado a fermentador tipo tanque agitado

Escalado a fermentador con el sustrato glucosa

El cultivo fue escalado a un fermentador tipo tanque agitado en un cultivo *Batch* con glucosa como sustrato, utilizando 3.5 l de medio de cultivo y una temperatura de 14 °C. El curso temporal de la producción de ambas enzimas junto con el crecimiento del cultivo (biomasa) y la evolución del pH se pueden observar en la Figura 4.12, así como la evolución de las velocidades volumétricas de producción de dióxido de carbono y consumo de oxígeno.

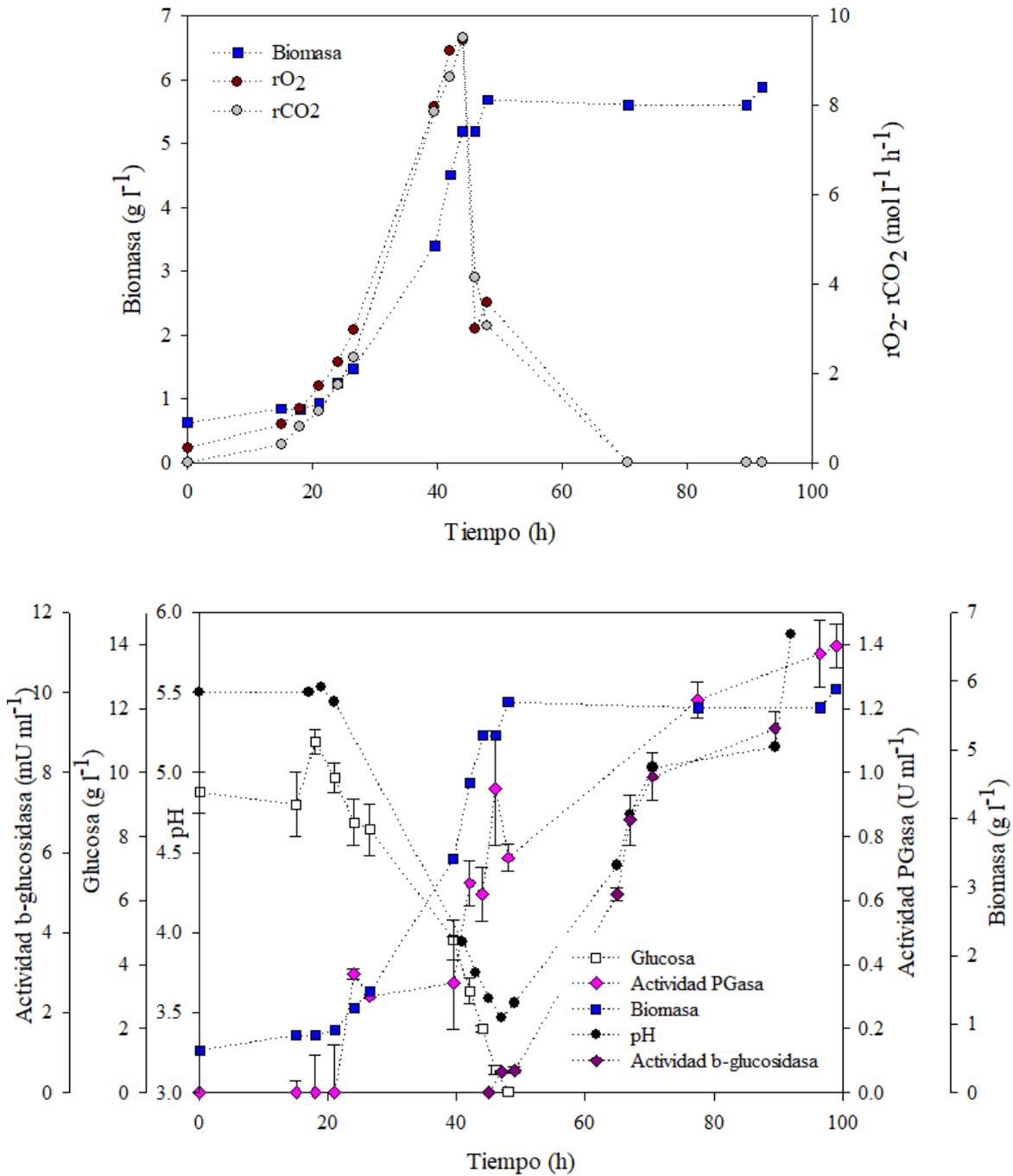


Figura 4.12 Evolución de las velocidades volumétricas de consumo de oxígeno (rO_2) y de producción de dióxido (rCO_2), el valor de pH, el contenido de biomasa, el contenido de glucosa y los títulos de actividad enzimática durante el cultivo en biorreactor de la levadura *Mrakia sp. LP 7.1.2016*. El sustrato utilizado fue glucosa.

Luego de inocular el medio de cultivo, se observó una fase *lag* de 16.3 h, luego de la cual el microorganismo creció de forma exponencial, en una etapa, con una velocidad máxima de crecimiento de 0.0926 h^{-1} ($r^2 = 0.9882$), lo que implica un tiempo de duplicación de 7.5 h. La glucosa se consumió en su totalidad al cabo de 48 h, y la biomasa final del cultivo fue de 5.86 g l^{-1} . La actividad poligalacturonasa máxima alcanzada hacia el final del cultivo fue de $1.40 \pm 0.07 \text{ U ml}^{-1}$ (99 h), y la actividad β -glucosidasa, 9 mU ml^{-1} . El pH descendió durante el cultivo hasta un valor final de 3.47 a las 47 horas de cultivo, para luego incrementarse hasta un valor de 5.9 al dar por finalizado el cultivo, a las 99 horas.

Las velocidades de consumo de oxígeno y producción de dióxido evolucionaron de la mano durante todo el cultivo, indicando metabolismo oxidativo. Luego del consumo total de la fuente de carbono glucosa no se detectó respiración por parte del cultivo. Los milimoles totales de oxígeno consumidos fueron $199.06 \text{ mmoles l}^{-1}$, y los moles de dióxido de carbono producidos fueron $177.54 \text{ mmoles l}^{-1}$.

Escalado con el sustrato pectina

Los datos obtenidos del escalado del cultivo con el sustrato pectina cítrica en el biorreactor se muestra en la Figura 4.13. La evolución de las velocidades volumétricas de producción de dióxido de carbono y consumo de oxígeno durante el cultivo se muestran en la Figura 4.14A. El curso temporal de la producción de las actividades enzimáticas junto con el crecimiento del cultivo (biomasa) y la evolución del pH se pueden observar en la Figura 4.14B.



Figura 4.13 Biorreactor utilizado para el escalado de la producción de las enzimas con pectina como sustrato (izquierda). Hacia la derecha se muestra cómo se conectó el baño termostático LAUDA que controló la temperatura durante todo el cultivo (14 °C).

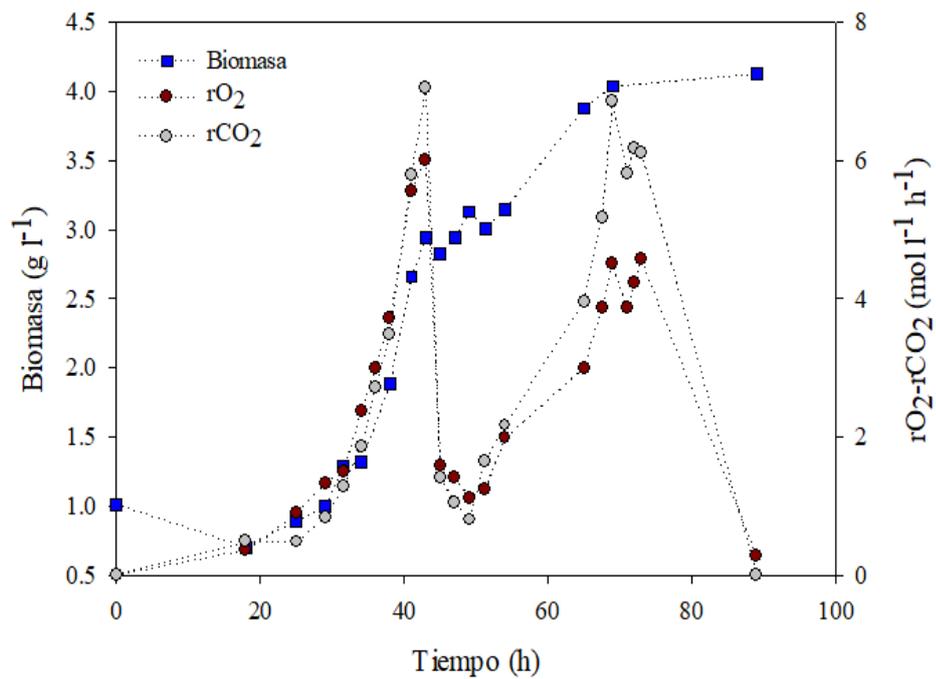


Figura 4.14A Evolución de las velocidades de consumo de oxígeno (r_{O_2}) y de producción de dióxido (r_{CO_2}) y contenido de biomasa durante el cultivo en biorreactor de la levadura *Mrakia sp.* LP 7.1.2016. El sustrato utilizado fue pectina.

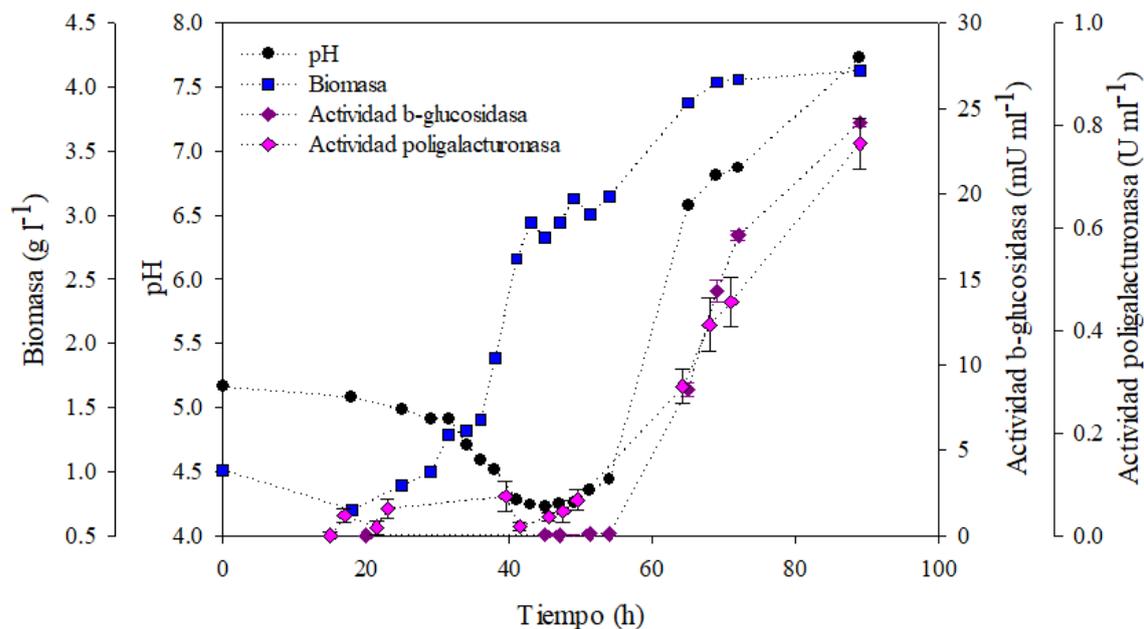


Figura 4.14B Evolución del valor de pH, el contenido de biomasa, y los títulos de actividad enzimática durante el cultivo en biorreactor de la levadura *Mrakia sp. LP 7.1.2016*. El sustrato utilizado fue pectina.

El cultivo mostró una fase *lag* o de latencia de 23.7 horas, durante el cual no se observó crecimiento en forma de aumento de la densidad óptica a 600 nm ni se detectó respiración por parte del cultivo. Pasado este tiempo, y a lo largo del cultivo, se pudieron observar dos etapas de crecimiento que fueron evidenciadas al observar las curvas de producción de oxígeno y consumo de dióxido: se observaron dos picos. La primera etapa de crecimiento se observó entre las 20 y 50 horas de cultivo. Luego, la respiración descendió abruptamente, indicando, posiblemente, una actividad metabólica más baja. Esto pudo deberse a la escasez de azúcares fácilmente disponibles, ya que coincide con el momento en el que empiezan a detectarse ambas actividades enzimáticas, sugiriendo un cambio en el tipo de fuente de carbono utilizada (Fratebianchi de la Parra 2017). La reacomodación metabólica condujo luego a una nueva fase de respiración y crecimiento, a partir de las 55 horas de cultivo. Un segundo pico de respiración se vio acompañado por una segunda fase de crecimiento (3.13 g l⁻¹ biomasa hasta 4.13 g l⁻¹ biomasa). En esta etapa, el pH del cultivo empezó a incrementarse, alcanzando a tiempo final a un valor de 7.73. El

comportamiento observado en el cultivo puede deberse a un típico crecimiento diaúxico. El crecimiento en forma de diauxia involucra el consumo inicial de la fuente de carbono más fácilmente asimilable, para luego consumir la segunda fuente de carbono. Entre las dos fases de crecimiento existe una fase *lag* (Chu & Barnes 2016). Si bien el crecimiento diaúxico es algo común (Ahamed & Vermette 2008; Kriaa & Kammoun 2016; Sharma, *et al.* 2021), hasta el momento no se ha reportado este comportamiento por parte de levaduras antárticas, lo cual puede estar relacionado con la escasez de estudios relacionados con el crecimiento de estos microorganismos a escala de fermentador. A pesar de observarse este comportamiento, los datos de biomasa obtenidos a lo largo del cultivo ajustaron bien al modelo de Gompertz para el crecimiento microbiano, obteniéndose una velocidad máxima de crecimiento de 0.0750 h^{-1} ($r^2=0,9860$) y un tiempo de duplicación de 9.3 horas.

El metabolismo se presumió oxidativo, dado que el cociente respiratorio ($r\text{CO}_2/r\text{O}_2$) se mantuvo cercano a 1 durante todo el cultivo. Los mmoles totales de oxígeno consumidos durante todo el cultivo fueron $178.57 \text{ mmoles l}^{-1}$ y los mmoles totales producidos de dióxido de carbono, $200.32 \text{ mmoles l}^{-1}$.

Es en la segunda parte del cultivo en la que se observó el aumento de la actividad β -glucosidasa y poligalacturonasa. Luego de 89 h de cultivo se obtuvo un extracto enzimático con $24.17 \pm 0.8 \text{ mU ml}^{-1}$ de actividad β -glucosidasa y $0.76 \pm 0.09 \text{ U ml}^{-1}$ de actividad poligalacturonasa. Los títulos de β -glucosidasa son similares a los obtenidos a escala Erlenmeyer. Sin embargo, el título obtenido de poligalacturonasa fue menor, al igual que ocurrió en el escalado con el sustrato glucosa. Esto podría deberse a que o bien la enzima sea poco estable a los esfuerzos de corte producidos durante la agitación para homogeneizar y airear el cultivo, o bien la levadura produzca menos poligalacturonasa en esa condición. Otra explicación es la diferencia en la disponibilidad de oxígeno del

cultivo: la limitación por oxígeno es común en cultivos en matraces Erlenmeyer, mientras que ese problema se salva en gran medida (y puede controlarse) en un biorreactor. En la mayoría de los procesos, la tensión de oxígeno del cultivo es importante para la obtención de enzimas o metabolitos (Fratebianchi, *et al.* 2017). Generalmente, la máxima producción de enzimas está asociada con no limitación de oxígeno (Zhang, *et al.* 2016).

Conclusiones de los cultivos en biorreactores

La Tabla 4.2 resume los resultados obtenidos a partir los escalados de los cultivos con ambos sustratos.

Tabla 4.2 Resultados obtenidos a partir de los cultivos Batch realizados a 14°C a escala fermentador con la levadura *Mrakia sp. LP 7.1.2016*

Sustrato utilizado	Fase lag (h)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1})	r^2	T_d (h)	$Y_{x/s}$ (g/g)^a	BGLasa ($U\ ml^{-1}$)^b	PGasa ($U\ ml^{-1}$)
Glucosa	16.35	0.0926	0.9882	7.49	0.59	0.009	1.40
Pectina	23.70	0.0750	0.9860	9.29	0.41	0.024	0.76

^a $Y_{x/s}$: rendimiento en biomasa, g de biomasa obtenidos al final del Batch respecto de los gramos de sustrato iniciales

^b Títulos máximos de actividad alcanzados en el cultivo

r^2 , coeficiente de correlación para el modelo de Gompertz

t_d , tiempo de duplicación

Se observa que los títulos de PGasa obtenidos al escalar el cultivo con el sustrato pectina fueron la mitad que los obtenidos con glucosa. Por otro lado, en el caso de los títulos de actividad β -glucosidasa, el título de enzima obtenido es casi tres veces mayor al utilizar el sustrato pectina, respecto del sustrato glucosa. Teniendo esto en cuenta, y que la actividad β -glucosídica es la producida en menor medida, y con el objetivo de trabajar con un único extracto enzimático, se decidió continuar el estudio utilizando en

los cultivos el sustrato **pectina**. El extracto enzimático obtenido a partir del cosechado de ese cultivo se caracterizó bioquímicamente, tal como se detalla a continuación.

Determinación de otras actividades enzimáticas en el extracto obtenido con pectina como sustrato

La mayoría de los extractos enzimáticos comerciales provienen de hongos y constan de varias proteínas, muchas de ellas enzimas con diferentes capacidades hidrolíticas. Por ej., Pectinex (Novozymes) posee pectinasas, hemicelulasas y β -glucanasas y el producto Vino Taste® Pro (Novozymes), posee actividades pectinasa, β -glucanasa, proteasa y arabinasa (<https://biosolutions.novozymes.com>). Para caracterizar el extracto obtenido por *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 creciendo con pectina como sustrato, en cuanto a actividades enzimáticas accesorias, se utilizaron diferentes sustratos tanto de enzimas pectinolíticas como de otra naturaleza. En la Tabla 4.3 se detallan los sustratos utilizados con el tipo de actividad determinada y los títulos obtenidos.

Tabla 4.3 Actividades enzimáticas determinadas en el extracto enzimático obtenido

Sustrato utilizado	Actividad enzimática	Título enzimático (U ml ⁻¹)
Actividades pectinolíticas		
Pectina	Pectin metil esterasa ^a	+
Pectina	Pectin liasa	ND
PGA	Pectato liasa	ND
Arabinogalactano	Arabinogalactanasa	ND
Ramnogalacturonano	Ramnogalacturonasa	ND
Otras actividades		
Celulosa	Celulasa	0.011 ± 0.003
Inulina	Inulinasa	0.060 ± 0.010
Xilano	Xilanasas	ND
Almidón	Amilasa	ND
Azocaseína	Proteasa	ND

ND: no detectado; ^a determinada cualitativamente

Tal como se detalló en la introducción de este capítulo, al ser la pectina un heteropolisacárido tan complejo, existen diversas enzimas que la atacan. Además, la pectina se encuentra en la naturaleza de modos tan variados (metilada, esterificada, con diferentes proporciones de dominios, etc), que la actividad sobre distintas pectinas puede otorgar diferente información. Entre las actividades pectinolíticas testeadas, sólo fue detectada (además de la actividad poligalacturonasa) la actividad pectin metil esterasa, responsable de liberar grupos metilo a partir de la pectina esterificada. Si bien se ha sugerido que las levaduras (a diferencia de los hongos filamentosos) no son productoras de PMEs, hay varios trabajos que reportan la presencia de esta actividad en sus extractos enzimáticos (Cavello, *et al.* 2017; Nakagawa, *et al.* 2002; Sahay, *et al.* 2013; Vaughn, *et al.* 1969). No se detectó actividad sobre ramnogalacturonano ni sobre arabinogalactano, esta última estructura puede encontrarse en las cadenas laterales del ramnogalacturonano-I (Fratebianchi de la Parra 2017). La levadura antártica *Tausonia pullulans* 8E, productora de pectinasas, tampoco produjo ramnogalacturonasas (Cavello, *et al.* 2017).

Se detectaron en el extracto actividades celulasa (11 mU ml^{-1}) e inulinasa (60 mU ml^{-1}). La producción de endoglucanasa, un tipo de celulasa, ha sido estudiada por parte de la levadura *Mrakia robertii* A2-3, aislada del Himalaya (Dhume, *et al.* 2019). No existen reportes previos de la producción de inulinasas por este género de levadura. Tampoco se detectó la presencia de actividad proteolítica en el extracto de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016, mientras que una levadura antártica, *Mrakia* sp., produjo una gelatinasa de 37 kDa (Yuivar, *et al.* 2019).

Caracterización de las actividades poligalacturonasa y β -glucosidasa en el extracto enzimático

Se caracterizaron bioquímicamente las actividades β -glucosidasa y poligalacturonasa presentes en el extracto enzimático extracelular que fue obtenido en el fermentador utilizando pectina cítrica como sustrato.

Efecto del pH en la actividad y estabilidad de las actividades β -glucosidasa y poligalacturonasa

El efecto del pH de reacción estudiado para ambas actividades se representa en la Figura 4.15. La actividad β -glucosidasa obtuvo un óptimo entre pH 4.0-5.0, de igual manera, la actividad poligalacturonasa fue máxima a pH 5.0. En ambos casos la mayor actividad fue detectada en el rango de pH 3.0-7.0, por lo que demuestra que ambas actividades enzimáticas poseen un amplio rango de pH óptimo.

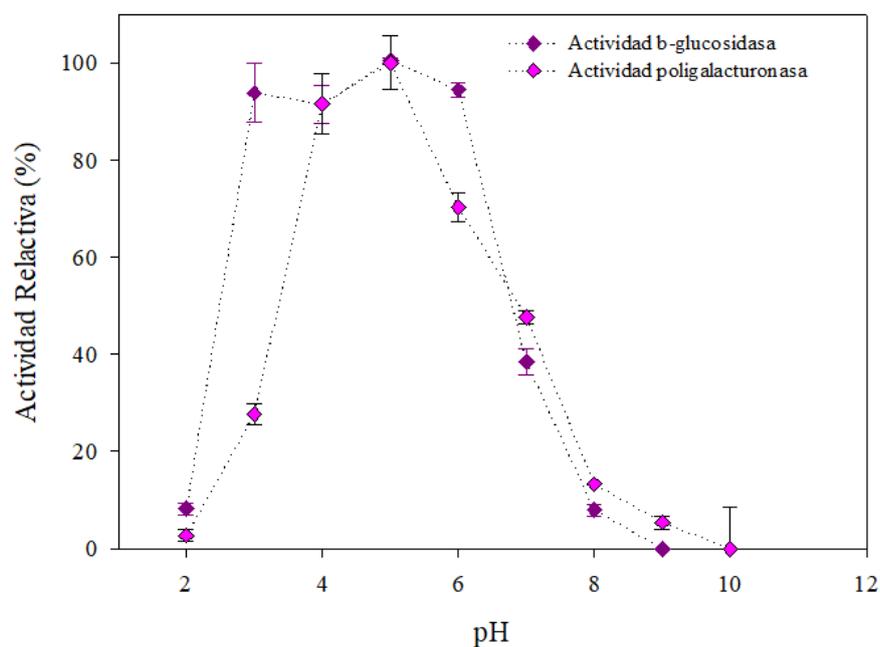


Figura 4.15 Efecto del pH en las actividades poligalacturonasa y β -glucosidasa presentes en el extracto enzimático de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 producido en las secciones anteriores.

Existen muchos estudios de β -glucosidasas producidas por hongos filamentosos, entre los cuales se reportan mayormente pHs óptimos entre 4.5 y 6.0, a excepción de la β -glucosidasa producida por *Tolypocladium cylindrosporum*, que presentó un pH óptimo de 2.4 (Sørensen, *et al.* 2013). En cuanto a β -glucosidasas producidas por levaduras, la mayoría poseen pHs óptimos entre 4.5 y 5.0, por lo que el pH óptimo obtenido se encuentra también en el valor esperado (Baffi, *et al.* 2011; González-Pombo, *et al.* 2011; González-Pombo, *et al.* 2008; Koleva, *et al.* 2006; Liu, *et al.* 2021; Rajoka, *et al.* 2004; Saha & Bothast 1996; Saha, *et al.* 1994; Wanapu, *et al.* 2012).

La β -glucosidasa de la bacteria antártica *Exiguobacterium antarcticum* producida de manera heteróloga obtuvo su mayor actividad catalítica en el rango de pH 6.0-9.0 (Crespim, *et al.* 2016). La bacteria Gram positiva *Micrococcus antarcticus* produjo una β -glucosidasa que también ha sido expresada heterológamente, con un pH óptimo de 6.5 (Fan, *et al.* 2011). Se ha reportado que los pHs óptimos de β -glucosidasas producidas por bacterias suelen ser ligeramente mayores que los observadas en el reino eucariota, entre 6.0-7.0 (Ahmed, *et al.* 2017a).

Las poligalacturonasas suelen ser ligeramente ácidas, a diferencia de las pectin/pectato liasas, que suelen actuar a pHs neutros a básicos; esta característica se mantiene en las pectinasas activas en frío (Bezus, *et al.* 2022a). Por lo tanto, el rango de actividad y pH óptimo de la actividad poligalacturonasa estudiada se encuentra entre los valores esperados. Entre las poligalacturonasas activas en frío previamente estudiadas y caracterizadas, se pueden mencionar las poligalacturonasa de *Cystofilobasidium capitatum* SPY11, *C. capitatum* PPY-1, *C. capitatum* S3B y S5, *C. macerans* S3A, *M. aquatica* H2 y *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales poseen pHs óptimos entre 4.0 y 5.0 (Birgisson, *et al.* 2003; Nakagawa, *et al.* 2005b; Poondla, *et al.* 2015; Sahay, *et al.* 2013).

La estabilidad al pH se evaluó incubando el extracto enzimático durante una hora a distintos pHs, y luego determinando la actividad residual. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.16.

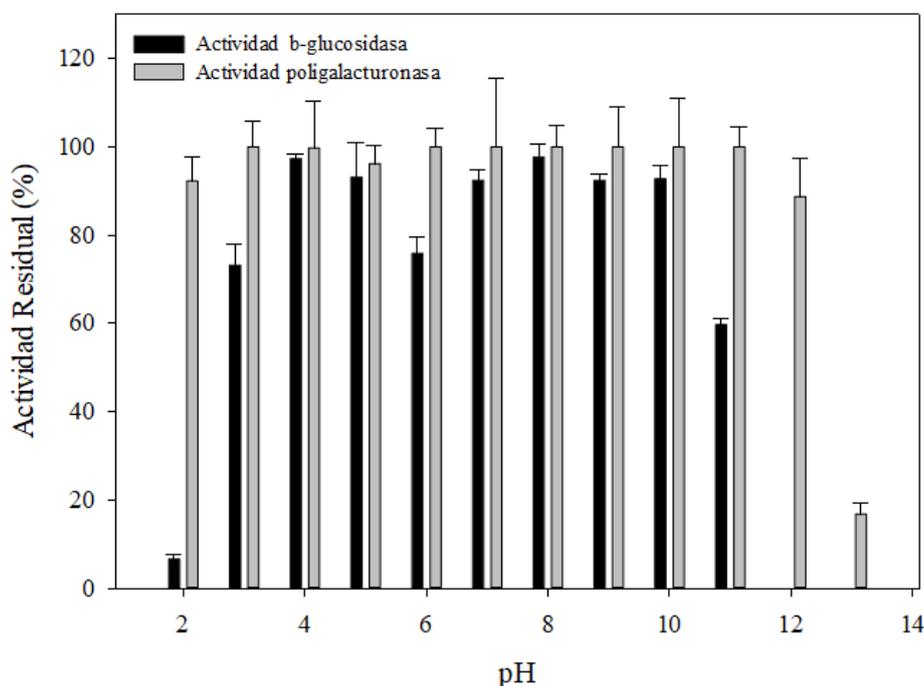


Figura 4.16 Estabilidad al pH de las actividades β -glucosidasa y poliglacturonasa presentes en el extracto enzimático de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016.

Ambas actividades enzimáticas resultaron altamente estables en rangos considerables de pH. La actividad β -glucosidasa se conservó en más del 60% luego de la incubación entre pH 3.0 y 11.0, en tanto que la actividad poliglacturonasa fue conservada en más del 90% luego de la incubación durante 1 hora entre pH 2.0 y 12.0.

La estabilidad al pH obtenida para la actividad β -glucosidasa presente en el extracto fue alta en comparación con otras reportadas: algunas sólo fueron estables en un rango muy acotado, como la enzima producida por *Hanseniaspora thailandica*, que fue estable entre pH 6.0 y 7.0, o la producida por *Aureobasidium pullulans*, que resultó estable entre pH 4.0 y 7.0 (Phongprathet, *et al.* 2018; Saha, *et al.* 1994). Luego de la incubación de la

β -glucosidasa producida por *Debaryomyces vanriijiae* también se observó una reducción de la actividad enzimática (rango de pH 3.0-7.0) (Belancic, *et al.* 2003). La estabilidad a pHs ácidos no es común en este tipo de enzima y es una característica promisoría pensando en su posible aplicación en vinos.

La actividad poligalacturonasa resultó muy estable frente al cambio de pH. De igual manera, la poligalacturonasa producida por la cepa *A. pullulans* fue altamente estable a la incubación entre pH 3.0 y 10.0 (Bennamoun, *et al.* 2016). Otras poligalacturonasas no se han encontrado tan estables a estos cambios, como las producidas por *C. capitatum* PPY-1 y *Streptomyces lydicus*, que fueron estables a la desnaturalización irreversible por pH en los rangos 2.5-7.0 y 4.0-7.0, respectivamente (Jacob, *et al.* 2008; Nakagawa, *et al.* 2005b), o la producida por *Penicillium notatum*, que fue estable en el rango 5.0-8.0 (Amin, *et al.* 2017).

Efecto de la temperatura en la actividad y estabilidad de las actividades β -glucosidasa y poligalacturonasa

Para estudiar el efecto de la temperatura en la actividad de las enzimas, se incubaron las mezclas reactivas a distintas temperaturas. Los resultados se muestran en la Figura

4.17. Las temperaturas óptimas de reacción para las actividades β -glucosidasa y poligalacturonasa fueron 55 °C y 45 °C, respectivamente.

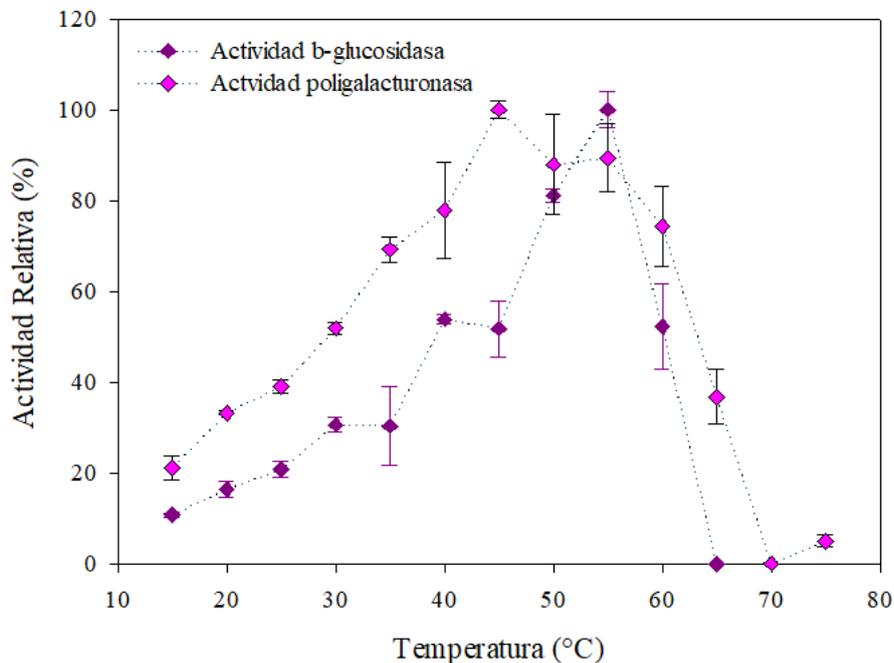


Figura 4.17 Efecto de la temperatura en la actividad de las enzimas estudiadas.

Tal como se mencionó en el Capítulo 1 (Tabla 1.3), las temperaturas óptimas de las enzimas activas en frío estudiadas hasta la actualidad se encuentran dentro de un rango de gran amplitud, donde la mayoría se encuentra en el rango 30-50 °C. Teniendo esto en cuenta, la temperatura óptima obtenida para la actividad β -glucosidasa resulta alta, incluso al compararla con la única β -glucosidasa antártica estudiada previamente, producida por *Naganishia albida* AL₃, la cual obtuvo una temperatura óptima de 45 °C (Koleva, *et al.* 2006). Entre las β -glucosidasas producidas por hongos filamentosos, la mayoría suelen presentar temperaturas óptimas de reacción cercanas a 60 °C, o incluso mayores (Sørensen, *et al.* 2013). Las β -glucosidasas reportadas de levaduras poseen, en su mayoría, temperaturas óptimas más bajas, típicamente entre 40 °C y 50 °C (Baffi, *et al.* 2011; Gueguen, *et al.* 2001; Saha & Bothast 1996; Turan & Zheng 2005; Wanapu, *et*

al. 2012). Por lo tanto, la temperatura óptima obtenida para la actividad β -glucosidasa estudiada en este capítulo resulta en línea con las reportadas para mesófilas, y alta pensando que se trata de un extracto enzimático producido por una levadura psicrófila.

El valor de temperatura óptima obtenido para la actividad poligalacturonasa concuerda con las reportadas para otras poligalacturonas activas en frío, con temperaturas óptimas entre 40 °C y 50 °C (Abe, *et al.* 2006; Birgisson, *et al.* 2003; Nakagawa, *et al.* 2005b; Sahay, *et al.* 2013). En general, las poligalacturonas provenientes de microorganismos mesófilos no mostraron una temperatura óptima mucho mayor (con algunas excepciones): poligalacturonas producidas por distintas cepas de *A. niger* tuvieron temperaturas óptimas entre 40 °C y 50 °C (Anand, *et al.* 2017; Buga, *et al.* 2010; Kant, *et al.* 2013). Las temperaturas óptimas de poligalacturonas producidas por *Mucor circinelloides* ITCC 6025 (Thakur, *et al.* 2010), *A. awamori* (Nagai, *et al.* 2000) y *Penicillium janthinellum* SW09 (Ma, *et al.* 2016) también se encontraron en ese rango. Entre las poligalacturonas producidas por levaduras mesófilas se puede mencionar la poligalacturonasa producida por *Saccharomyces cerevisiae*, también con una temperatura óptima de 50 °C, y la producida por *Kluyveromyces marxianus*, con máxima actividad a 55 °C (Fernández-González, *et al.* 2004; Serrat, *et al.* 2004). En ese sentido, si bien hay algunas reportadas, son pocas las poligalacturonas activas en frío que posean, efectivamente, una temperatura óptima de reacción baja.

Los datos obtenidos para el estudio de la actividad presentada por las enzimas a diferentes temperaturas se linealizaron según la ecuación de Arrhenius (Figura 4.18), y se calcularon las energías de activación correspondiente a cada actividad enzimática en estudio, siendo 42.24 kJ mol⁻¹ y 37.86 kJ mol⁻¹ para las actividades β -glucosidasa y poligalacturonasa, respectivamente.

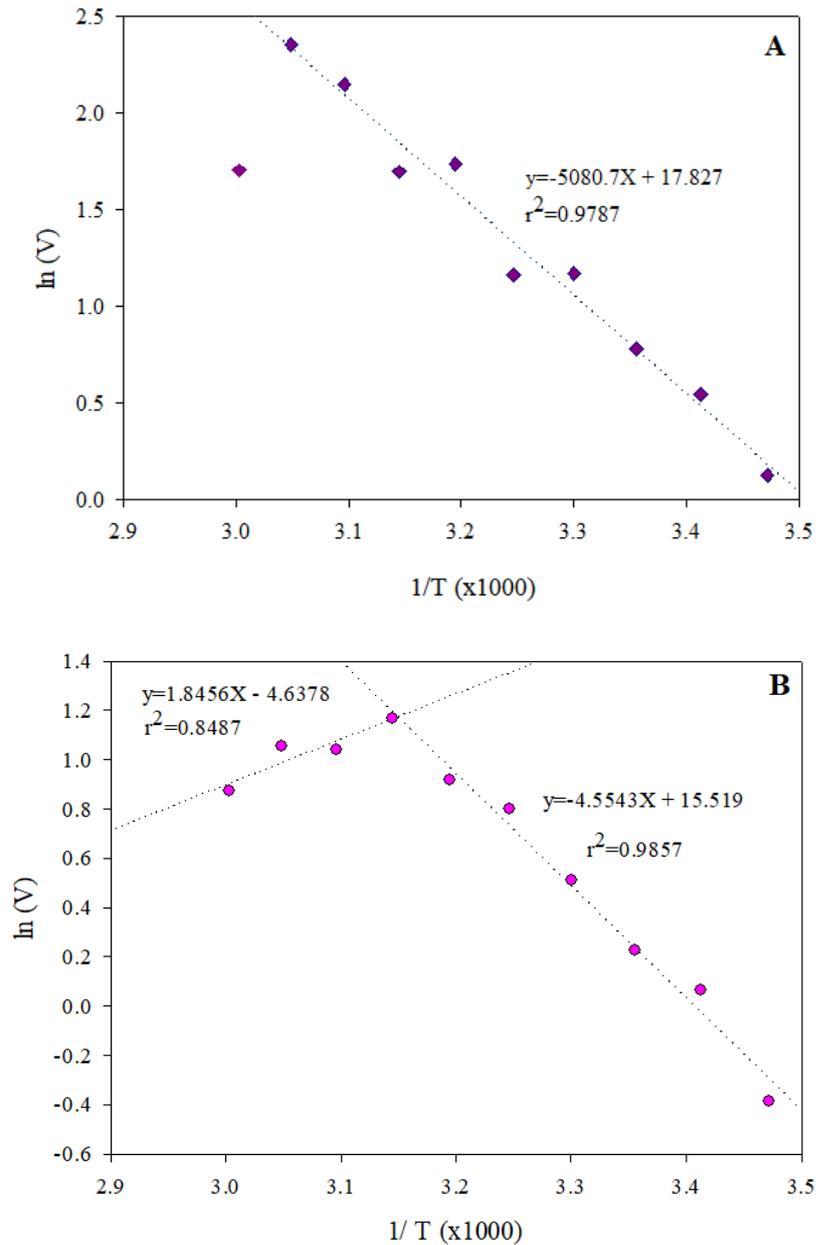


Figura 4.18 Linealización de Arrhenius para las actividades β -glucosidasa (A) y poligalacturonasa (B) obtenidas a diferentes temperaturas.

Como ya se mencionó en el Capítulo 1, la disminución de la energía de activación de las reacciones es una de las estrategias mediante la cual se sorteán parcialmente los efectos de las bajas temperaturas. Este valor representa la barrera energética que la enzima debe superar para hidrolizar su sustrato. En el caso de la actividad β -glucosidasa, el valor obtenido es ligeramente menor a los observados en otros trabajos: Rajoka, *et al.* (2004)

reportaron una E_a de 50.3 kJ mol^{-1} para la β -glucosidasa de *Kluyveromyces marxianus*, mientras que Steinweg, *et al.* (2013) estudiaron la actividad β -glucosídica en diferentes ecosistemas del suelo y obtuvieron un valor medio de E_a para β -glucosidasas de 44 kJ mol^{-1} .

Ortega, *et al.* (2004) calcularon las energías de activación para preparaciones pectinolíticas comerciales, y reportaron valores de 26.5 , 45.6 y 4.2 kJ mol^{-1} para *Rapidase C80*, *Pectinase CCm* y *Pectinex 3XL*, respectivamente. La energía de activación obtenida para la actividad poligalacturonasa estudiada en este capítulo es mayor a las mencionadas, que provienen de enzimas producidas por hongos. Margesin, *et al.* (2005) calcularon la E_a de la enzima pectato liasa producida por la levadura psicrófila *M. frigida*, y obtuvieron un valor de 35.6 kJ mol^{-1} , similar al obtenido en este capítulo. La energía de activación obtenida para la actividad poligalacturonasa de un extracto pectinolítico antártico fue menor, de $23.13 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Bezus, *et al.* 2022b). En ese sentido, la energía de activación aquí obtenida está en rango con otras reportadas, pero no resulta precisamente baja.

Se estudió el efecto de la temperatura en la estabilidad de las actividades enzimáticas incubándolas a distintas temperaturas y midiendo a distintos tiempos la actividad residual. Las cinéticas de inactivación térmica se muestran en la Figura 4.19. Los resultados obtenidos de los modelados estadísticos de la muerte térmica de las enzimas se muestran en la Tabla 4.4.

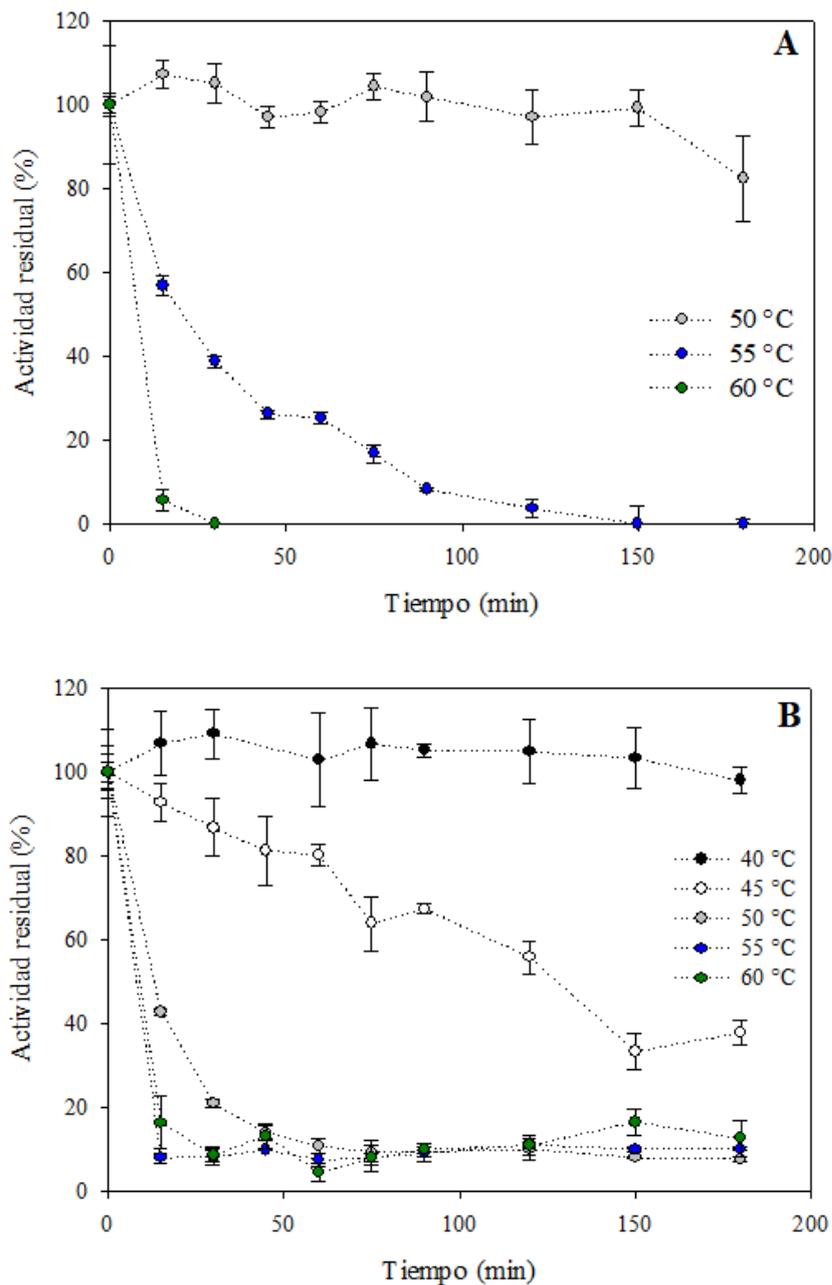


Figura 4.19 Efecto de la temperatura en la estabilidad de las actividades β -glucosidasa (A) y poligalacturonasa (B).

La actividad β -glucosidasa fue relativamente estable a 50 °C, conservando luego de 3 horas de incubación un 83% de actividad residual (Figura 4.19A). A su temperatura óptima de reacción (55 °C), la actividad no resultó estable, con un tiempo de vida media de 24 minutos, obtenido a partir de una regresión según una cinética de primer orden (Tabla 4.4). A 60 °C, la actividad descendió rápidamente, no siendo detectable luego de

30 minutos de incubación. La estabilidad obtenida resulta mayor a la reportada para la β -glucosidasa producida por *N. albida* AL₃, la cual retuvo cerca de 50% de su actividad luego de la incubación durante 30 minutos a 50 °C (Koleva, *et al.* 2006). También en comparación con la β -glucosidasa de *S. cerevisiae* 71B-1122, la cual sólo conservó ~45% de actividad residual luego de la incubación durante 30 minutos a 50 °C (Wanapu, *et al.* 2012).

Tabla 4.4 Ajuste de los modelos cinéticos para la inactivación térmica de las actividades enzimáticas. Se modeló la cinética obtenida a 55 °C de la actividad β -glucosidasa y las obtenidas a 45 °C, 50 °C y 55 °C en el caso de la actividad poligalacturonasa

Modelo	r ²	χ^2	SEM	Comentarios
β -glucosidasa				
Primer orden	0.981	0.0007	0.005	k: 0.028897
Poligalacturonasa				
Primer orden	[0.909; 0.947]	[0.003; 0.004]	[0.008; 0.021]	Rechazado: bajos r ²
Distribución Weibull	[0.959; 0.998]	[2.0E-4; 0.002]	[4.0E-4; 0.004]	Elegido: buenos r ² , bajos SEM y χ^2
Isoenzimas	[0.909; 1.000]	[4.4E-5; 0.011]	[8.4E-5; 0.021]	Rechazado, alto χ^2 y SEM
Dos fracciones	[0.960; 1.000]	[3.8E-5; 0.003]	[8.4E-5; 0.006]	Rechazado: parámetros negativos
Conversión fraccional	[0.959; 0.998]	[2.0E-4; 0.002]	[4.0E-4; 0.006]	Rechazado: parámetros negativos

La actividad poligalacturonasa resultó más termolábil en comparación con la β -glucosídica (Figura 4.19B). A 40 °C, la actividad poligalacturonasa fue 100% estable durante las 3 h de incubación. A 45 °C, esta se mantuvo en disminución, con un 38% de actividad residual luego de 3 h de incubación. A 50 °C, la actividad poligalacturonasa descendió rápidamente con el tiempo de incubación: luego de 30 minutos, sólo se detectó un 21% de actividad residual, mientras que existió un porcentaje de actividad (7-10%) que se mantuvo activa hasta las 3 horas de incubación. A temperaturas mayores se

observó el mismo comportamiento: una desactivación inicial y un porcentaje de actividad remanente (8-12%) que permanece activo a mayores tiempos de incubación. Entre los modelos estudiados, los de isoenzimas y la distribución de Weibull fueron los que mejor explicaron este comportamiento. Fue este último el elegido, debido a que obtuvo la combinación de los mejores r^2 y menores SEM y χ^2 . El parámetro b, que emula la velocidad de desactivación enzimática, obtuvo valores de 0.002, 0.506 y 2.374 a 45 °C, 50 °C, y 55 °C. Las pectinasas activas en frío han sido reportadas como termolábiles. Margesin, *et al.* (2005) estudiaron pectato liasas producidas por levaduras de la especie *M. frigida* y observaron que luego de la incubación a 40 °C durante una hora se perdía prácticamente toda la actividad enzimática. Las pectinasas producidas por *C. capitatum* S3B y S5 y *M. aquatica* H2 perdieron también entre 50% y 80% de su actividad luego de la incubación a 40 °C durante 1 h. La poligalacturonasa producida por la levadura psicrotolerante *C. capitatum* S3A fue un poco más estable: conservó un 95% de su actividad luego de la incubación a 40 °C (Birgisson, *et al.* 2003). Con una estabilidad similar, la actividad poligalacturonasa del extracto producido por la levadura antártica *Tausonia pullulans* 8E conservó 91% de su actividad luego de la incubación durante 1 h a 35 °C, y 64% luego de la incubación a 45 °C (Bezus, *et al.* 2022b). En comparación con lo observado en enzimas de algunos hongos, la poligalacturonasa producida por *A. niger* SA6 retuvo el 75% de su actividad inicial luego de la incubación durante una hora a 50 °C (Bugá, *et al.* 2010), y la producida por *A. niger* AN07 fue 100% estable durante una hora a 55 °C (Patidar, *et al.* 2017).

Si bien la actividad poligalacturonasa estudiada en este capítulo resultó más termolábil que otras mesófilas, es más estable que la poligalacturonasa de *Piskurozyma capsuligena* B-13, la cual sólo retuvo 50% de su actividad luego de la incubación a 40 °C durante 3 h

(Merin, *et al.* 2014), y la exo-poligalacturonasa de *A. niger* MTCC 478, que sólo conservó 40% de su actividad inicial luego de 1 h a 40 °C (Anand, *et al.* 2017).

Efecto de los iones metálicos y EDTA

El efecto de iones metálicos y el EDTA se estudió pre-incubando y luego llevando a cabo las reacciones enzimáticas en presencia de los diferentes compuestos. En la Tabla 4.5 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 4. 5 *Efecto de iones metálicos y EDTA (1 mM) en la actividades poligalacturonasa y β -glucosidasa presentes en el extracto enzimático de *Mrakia sp.* LP 7.1.2016*

Compuesto	Actividad Residual (%)	
	β -glucosidasa	Poligalacturonasa
NaCl	107.77 \pm 5.02	111.06 \pm 9.50
CaCl ₂	108.86 \pm 6.18	89.14 \pm 7.42*
CoCl ₂	101.12 \pm 3.08	108.36 \pm 3.53
EDTA	107.10 \pm 3.94	100.55 \pm 6.97
FeCl ₃	103.36 \pm 2.64	82.02 \pm 3.32*
HgCl ₂	98.58 \pm 7.51	30.21 \pm 3.48*
KCl	110.46 \pm 5.30	87.63 \pm 2.37*
MgCl ₂	109.30 \pm 5.87	105.16 \pm 1.33
MnCl ₂	96.94 \pm 12.73	70.88 \pm 7.97*
ZnCl ₂	101.94 \pm 3.52	80.03 \pm 8.21*

La actividad obtenida por la enzima sin la exposición a iones y/o EDTA fue considerada como el 100% de actividad. Los resultados son la media de tres determinaciones \pm la desviación estándar.

**valores significativamente diferentes al control según el test de ANOVA ($p < 0.05$)*

La actividad β -glucosidasa no demostró sensibilidad a los iones metálicos ensayados. Las β -glucosidasas no suelen ser enzimas metal-dependientes, por lo que no suelen verse afectadas por la presencia de EDTA, tal como se observa en la actividad β -glucosidasa de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016. Sin embargo, algunas β -glucosidasas mostraron mayor actividad en presencia de algunos metales como Mg^{+2} , Ca^{+2} o Mn^{+2} , lo cual se piensa que se debe a que contribuyen a la estabilidad estructural de la enzima (Ahmed, *et al.* 2017a). Esto no se observó en las condiciones de ensayo (Tabla 4.5). Por otro lado, hay varios reportes de β -glucosidasas sensibles a Hg^{+2} (Baffi, *et al.* 2013; Koleva, *et al.* 2006). La falta de inhibición por parte de este ion en la actividad β -glucosidasa estudiada en este trabajo podría estar indicando que no hay grupos tiol que jueguen un papel importante, ya sea en su actividad catalítica o en la conformación tridimensional de la enzima (Ahmed, *et al.* 2017a).

La actividad poligalacturonasa se vio fuertemente inhibida por Hg^{+2} . Esto sugiere la presencia de al menos una poligalacturonasa tiol-dependiente en el extracto enzimático (Fratebianchi de la Parra, *et al.* 2017a). La inhibición de poligalacturonas por parte de este ion ha sido reportada en varios estudios (de Lima Damásio, *et al.* 2010; Fratebianchi de la Parra, *et al.* 2017a; Jacob, *et al.* 2008; Kant, *et al.* 2013; Ladeira Ázar, *et al.* 2020; Mohamed, *et al.* 2006), inclusive por parte de otro extracto pectinolítico antártico, producido por *T. pullulans* 8E (Bezus, *et al.* 2022b). Otros iones ejercieron una inhibición más leve: Ca^{+2} , Fe^{+3} , K^{+} , Mn^{+2} y Zn^{+2} (entre 11-30% inhibición). Estos iones también produjeron inhibición de la actividad (aunque en mucho mayor medida) de la poligalacturonasa de *A. niger* MTCC 3323 (Kant, *et al.* 2013), pero no afectaron la actividad de la poligalacturonasa producida por la levadura psicrotolerante *C. capitatum* PPY-1 (Nakagawa, *et al.* 2005b). El extracto con actividad poligalacturonasa producido

por *T. pullulans* 8E fue inhibido por Co^{+2} , mientras que este ion no afectó la actividad poligalacturonasa del extracto de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 (Bezus, *et al.* 2022b).

Mecanismo de acción de la poligalacturonasa

Para poder inferir un mecanismo de acción (*endo-exo*) del extracto con actividad poligalacturonasa se evaluó la viscosidad relativa de una solución de sustrato a diferentes tiempos de reacción, en relación al aumento de poder reductor en el medio. En la Figura 4.20 se muestran los resultados de la experiencia.

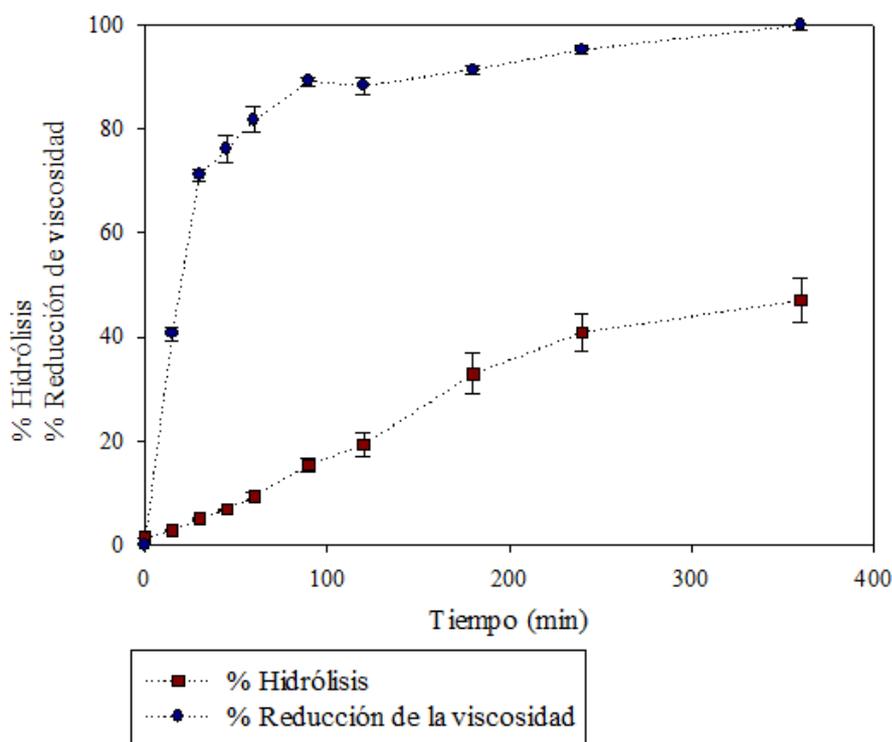


Figura 4.20 Pérdida de viscosidad (%) y grado de hidrólisis (%) del PGA en función del tiempo. Se incubaron 100 ml de PGA con 1 U de poligalacturonasa y se tomaron muestras a diferentes tiempos para estudiar el mecanismo de acción (*endo/exo*) del extracto enzimático.

Se observó que, a tiempos cortos de incubación, ocurre una reducción sustancial de la viscosidad del sustrato, de la mano con bajos porcentajes de hidrólisis: luego de 30 minutos de reacción, la reducción de viscosidad ya era del 71%, con tan sólo 5% de

hidrólisis del sustrato. Este comportamiento, junto con el hecho de que, luego de 6 horas de incubación no se logró una hidrólisis completa del sustrato, sugiere la presencia de (al menos) una *endo*-poligalacturonasa en el extracto enzimático. Estas enzimas son las que, tal como se mencionó en la introducción de este capítulo, hidrolizan los enlaces entre dos unidades de ácido galacturónico al azar, por lo que (a diferencia de las *exo*-PGasas) logran la reducción de la viscosidad del polímero y la acumulación de fragmentos de pectina en forma de dímeros o trímeros (dependiendo del porcentaje de esterificación del sustrato). Estas enzimas son las utilizadas en procesos como maceración vegetal, clarificación de jugos, reducción de viscosidad de extractos, etc.

Los productos de reacción también se analizaron por cromatografía de capa fina (Figura 4.21). Se observó que, a partir de los 90 minutos de reacción ya se empezó a hacer evidente la presencia de tri, di y monogalacturonatos, lo cual indica que existe en el extracto enzimático al menos una *endo*-poligalacturonasa, tal como indicaba el análisis de disminución de viscosidad.

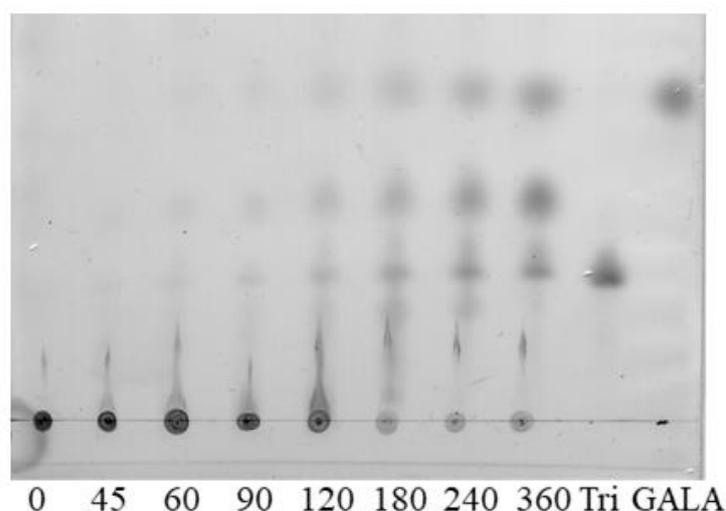


Figura 4.21 Análisis de los productos de reacción a partir de la reacción del extracto con actividad poligalacturonasa con PGA a diferentes tiempos, junto con patrones de ácido galacturónico (GALA) y ácido trigalacturónico (Tri).

SDS-PAGE y zimogramas

Se realizó un SDS-PAGE acoplado a zimogramas con esculina y PGA para detectar actividades β -glucosidasa y poligalacturonasa, respectivamente (Figura 4.22). En el SDS-PAGE no se observaron gran cantidad de bandas proteicas, mientras que se distinguió una banda mayoritaria a la altura de 35 kDa, aproximadamente. En los zimogramas se observó la presencia de una banda con actividad β -glucosidasa, de alto peso molecular (fuera del rango de la escalera de peso molecular) y una banda con actividad poligalacturonasa, con un peso molecular aparente entre 70 y 100 kDa.

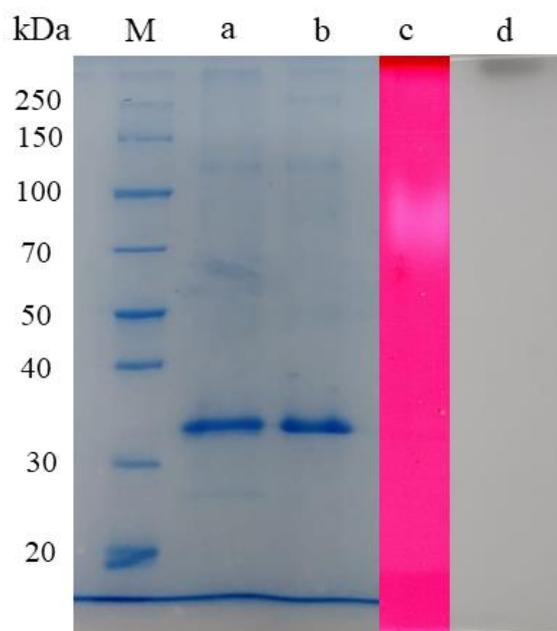


Figura 4.22 SDS-PAGE del extracto enzimático obtenido con pectina como sustrato, sembrado en condiciones desnaturalizantes (a) y no-desnaturalizantes con SDS (b), junto a un zimograma de actividad poligalacturonasa (c) y actividad β -glucosidasa (d). Para el SDS-PAGE se utilizó el marcador de peso molecular Thermo#26630. Los zimogramas se incubaron durante 30 minutos con PGA (c) y esculina- Fe^{+3} (d) a 24 °C. El zimograma realizado con PGA se reveló mediante el agregado de Rojo de Rutenio 0.02% p v⁻¹. Las zonas claras indican la presencia de actividad enzimática. En el zimograma de actividad β -glucosidasa, la banda parda indica la presencia de actividad.

El zimograma realizado parece indicar que existe una única β -glucosidasa en el extracto enzimático, con un peso molecular sumamente alto (> 250 kDa). La β -glucosidasa estudiada a partir de la levadura antártica *N. albida* AL3 también demostró

un peso molecular alto, mayor a 78 kDa (Koleva, *et al.* 2006), pero aparentemente menor al obtenido en este trabajo. La β -glucosidasas producida por *Candida sake* obtuvo un peso molecular de 240 kDa (Gueguen, *et al.* 2001). Otras β -glucosidasas producidas por levaduras obtuvieron pesos moleculares menores: *S. cerevisiae* 71B-1122 produjo una β -glucosidasa de 67 kDa (Wanapu, *et al.* 2012) y *M. pulcherrima*, una de 49 kDa (González-Pombo, *et al.* 2008).

La mayoría de las pectinasas producidas por microorganismos adaptados al frío estudiadas hasta el momento fueron proteínas con pesos moleculares entre 36 y 55 kDa (Abe, *et al.* 2006; Cavello, *et al.* 2017; Margesin, *et al.* 2005; Miura, *et al.* 2001; Nakagawa, *et al.* 2005a; Nakagawa, *et al.* 2005b; Poondla, *et al.* 2015). Cavello, *et al.* (2017) estudiaron poligalacturonasas producidas por levaduras antárticas, y encontraron que, entre los tres extractos estudiados, dos contaban con al menos dos poligalacturonasas. En ese estudio, los pesos moleculares aparentes de las poligalacturonasas fueron en su mayoría cercanos a 55 kDa, aunque también se detectaron poligalacturonasas de alto peso molecular, como en el presente trabajo. Las cepas que produjeron estas enzimas de peso molecular aparente mayor a lo común fueron *N. adeliensis* 5.9 y *C. infirmominiatum* e9.2. En cuanto a poligalacturonasas producidas por hongos, se han reportado en su mayoría de pesos moleculares menores: *A. niger* SA6 produjo poligalacturonasas de 35 y 40 kDa (Buga, *et al.* 2010), *A. sojae*, de 47 kDa (Fratebianchi de la Parra, *et al.* 2017a), y *Trichoderma harzianum*, una de 31 kDa (Mohamed, *et al.* 2006). Aunque, la cepa *A. niger* MTCC 3323 produjo un heterodímero con subunidades de 34 y 69 kDa (Kant, *et al.* 2013) y *Calonectria pteridis* produjo una poligalacturonasa de 68 kDa (Ladeira Ázar, *et al.* 2020). Por lo tanto, los pesos moleculares de estas enzimas son muy variables, encontrándose la poligalacturonasa de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 dentro del rango de las poligalacturonasas de alto peso molecular.

En la Tabla 4.6 se resumen las propiedades bioquímicas determinadas para las actividades β -glucosidasa y poligalacturonasa en el extracto enzimático estudiado.

Tabla 4. 6 Propiedades bioquímicas más importantes obtenidas para las actividades β -glucosidasa y poligalacturonasa determinadas en el extracto enzimático estudiado

Actividad enzimática	β -glucosidasa	Poligalacturonasa
pH óptimo	4.0-5.0	5.0
Estabilidad al pH	3.0-11.0	2.0-12.0
Temperatura óptima (°C) ^a	55.09	44.51
Energía de activación (kJ mol ⁻¹) ^a	42.24	37.86
Estabilidad a la temperatura ^b	50 °C	40 °C
Inhibición por iones metálicos	-	Hg ⁺² , Ca ⁺² , Fe ⁺³ , K ⁺ , Mn ⁺² , Zn ⁺²
Peso molecular aparente (kDa)	> 250	Entre 70 y 100

^a cálculos a partir del gráfico de Arrhenius

^b máxima temperatura a la que se observó > 50% de actividad residual luego de 3 h

CONCLUSIONES DE ESTE CAPÍTULO

-Se logró obtener un extracto enzimático cultivando la levadura psicrófila *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 con pectina como sustrato. El mismo presenta actividades enzimáticas diversas, entre las cuales se enfocó en este trabajo en el estudio de las actividades β -glucosidasa y poligalacturonasa.

-El estudio de la producción enzimática a dos diferentes temperaturas, y con dos sustratos distintos demostró que en el caso de la actividad β -glucosidasa, la producción fue fuertemente dependiente del sustrato utilizado, observándose títulos mucho mayores con pectina respecto de glucosa. La temperatura afectó la producción de esta actividad enzimática sólo en el medio con glucosa, cultivo en el cual no se detectó actividad β -glucosidasa a 3 °C. En el caso de la producción de actividad poligalacturonasa, también se vio fuertemente afectada por la temperatura de incubación, siendo mayor a 14 °C respecto de 3 °C, mientras que, la producción de esta actividad fue mayor en el medio de cultivo conteniendo glucosa respecto del de pectina.

-Entre los dos sustratos ensayados, la pectina es el mejor desde el punto de vista de la producción de β -glucosidasas. Al escalar los cultivos se observó que la diferencia entre los títulos de poligalacturonasa utilizando glucosa y pectina se mantuvo, pero los títulos de enzima fueron menores. La aparente inducción de la actividad β -glucosidasa por pectina, produciéndose casi tres veces más en presencia de ese sustrato que con glucosa, fue la razón por la que la pectina fue elegida para seguir trabajando.

-La actividad β -glucosidasa máxima obtenida con este sustrato se mantuvo al escalar el cultivo, mientras que la actividad poligalacturonasa se vio reducida al escalar la producción a fermentador, sugiriendo que la agitación o la diferencia en la tensión de oxígeno disuelto podrían generar un efecto negativo en la producción o estabilidad de la/las enzimas poligalacturonasa/s.

-Se detectaron también en el extracto actividad inulinasa (la cual no había sido detectada en placa), celulasa y pectin metil esterasa.

-La actividad poligalacturonasa obtuvo temperaturas y pHs óptimos típicos de este tipo de enzima. La estabilidad al pH resultó alta en un amplio rango, mientras que sí demostró termolabilidad, rasgo frecuentemente mencionado en enzimas activas en frío. Por el contrario, la actividad β -glucosidasa demostró una temperatura óptima alta, y una mayor termoestabilidad que la poligalacturonasa.

-Dada la sensibilidad a la presencia del ion Hg^{+2} , se sugiere que existe en el extracto al menos una poligalacturonasa tiol-dependiente, mientras que la actividad β -glucosidasa no fue afectada por la presencia de diferentes iones metálicos.

-Se determinó que existe en el extracto enzimático al menos una poligalacturonasa con un mecanismo de acción *endo*. Por lo tanto, podría ser utilizada en procesos como maceración de tejidos vegetales, clarificación de jugos, reducción de viscosidad en diversos productos y otros procesos que involucran degradación de la pectina.

-La actividad y estabilidad a pH 4.0 presentada por la actividad β -glucosidasa sugiere que podría ser útil en procesos en los que se utiliza esta enzima en medio ácido, así como la liberación de aromas en vinos.

Parte de los resultados de este capítulo fueron publicados en el siguiente artículo: Study of polygalacturonase production by an Antarctic yeast and obtention of dragon fruit juice by maceration at mild temperature (2022) *Food Bioscience*, 49, 101942. **BEZUS, B.**, ESQUIVEL, J. C. , CAVALITTO, S. & CAVELLO, I
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101942>.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, F., MINEGISHI, H., MIURA, T., NAGAHAMA, T., USAMI, R. & HORIKOSHI, K. 2006. Characterization of cold- and high-pressure-active polygalacturonases from a deep-sea yeast, *Cryptococcus liquefaciens* strain N6. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70, <http://doi.org/10.1271/bbb.70.296>.
- AHAMED, A. & VERMETTE, P. 2008. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 40, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.11.030>.
- AHMED, A., ASLAM, M., ASHRAF, M., NASIM, F. U.-H., BATOOL, K. & BIBI, A. 2017a. Microbial β -glucosidases: screening, characterization, cloning and applications. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 5, <http://doi.org/10.12691/JAEM-5-2-2>.
- AHMED, A., NASIM, F. U.-H., BATOOL, K. & BIBI, A. 2017b. Microbial β -Glucosidase: sources, production and applications. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 5, <http://doi.org/10.12691/jaem-5-1-4>.
- AMIN, F., BHATTI, H. N., BILAL, M. & ASGHER, M. 2017. Improvement of activity, thermostability and fruit juice clarification characteristics of fungal exo-polygalacturonase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.086>.
- AMORIM, H. & AMORIM, V. 1977. Coffee enzymes and coffee quality. In R. L. Ory and A. J. St. Angelo eds. *Enzymes in Food and Beverage Processing*. American Chemical Society, Washington, 27-56 <http://doi.org/10.1021/bk-1977-0047.ch003>.
- ANAND, G., YADAV, S. & YADAV, D. 2017. Production, purification and biochemical characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 478 suitable for clarification of orange juice. *3 Biotech*, 7, <http://doi.org/10.1007/s13205-017-0760-3>.
- ARÉVALO VILLENA, M., UBEDA IRANZO, J. F., CORDERO OTERO, R. R. & BRIONES PÉREZ, A. I. 2005. Optimization of a rapid method for studying the cellular location of β -glucosidase activity in wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 99, <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02627.x>.
- BAFFI, M. A., MARTIN, N., TOBAL, T. M., FERRAREZI, A. L., LAGO, J. H. G., BOSCOLO, M., GOMES, E. & DA-SILVA, R. 2013. Purification and characterization of an ethanol-tolerant β -Glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus* and its potential for hydrolysis of wine aroma precursors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171, <http://doi.org/10.1007/s12010-013-0471-0>.
- BAFFI, M. A., TOBAL, T., HENRIQUE, J., LAGO, G., LEITE, R. S., BOSCOLO, M., GOMES, E. & DA-SILVA, R. 2011. A novel β -glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus*: characterization and application in winemaking. *Journal of Food Science*, 76, <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02293.x>.
- BAIK, J. H., SHIN, K.-S., PARK, Y., YU, K.-W., SUH, H. J. & CHOI, H.-S. 2015. Biotransformation of catechin and extraction of active polysaccharide from green tea leaves via simultaneous treatment with tannase and pectinase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, <https://doi.org/10.1002/jsfa.6955>.

- BELANCIC, A., GUNATA, Z., VALLIER, M. J. & AGOSIN, E. 2003. Beta-glucosidase from the grape native yeast *Debaryomyces vanrijae*: purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a Muscat grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, <http://doi.org/10.1021/jf0257771>.
- BENAMOUN, L., HILIGSMANN, S., DAKHMOUCHE, S., AIT-KAKI, A., LABBANI, F.-Z. K., NOUADRI, T., MERAIHI, Z., TURCHETTI, B., BUZZINI, P. & THONART, P. 2016. Production and properties of a thermostable, pH—stable exo-polygalacturonase using *Aureobasidium pullulans* isolated from Saharan soil of Algeria grown on tomato pomace. *Foods*, 5, <https://doi.org/10.3390/foods5040072>.
- BEZUS, B., CAVELLO, I., CONTRERAS ESQUIVEL, J. C. & CAVALITTO, S. 2022a. Pectinases produced by extremophilic yeasts: From cold environments to the food industry. In M. Kuddus and C. Noe Aguilar eds. *Value-addition in Food Products and Processing through Enzyme Technology*. Elsevier, Cambridge, Mass., USA, 437-452 <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89929-1.00010-X>.
- BEZUS, B., ESQUIVEL, J. C. C., CAVALITTO, S. & CAVELLO, I. 2022b. Pectin extraction from lime pomace by cold-active polygalacturonase-assisted method. *International Journal of Biological Macromolecules*, 209, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.019>.
- BIRGISSON, H., DELGADO, O., GARCÍA ARROYO, L., HATTI-KAUL, R. & MATTIASSON, B. 2003. Cold-adapted yeasts as producers of cold-active polygalacturonases. *Extremophiles*, 7, <http://doi.org/10.1007/s00792-002-0310-7>.
- BONNIN, E. & PELLOUX, J. 2020. Pectin degrading enzymes. In V. Kontogiorgos eds. *Pectin: Technological and Physiological Properties*. Springer, Cham, Switzerland, 37-60 https://doi.org/10.1007/978-3-030-53421-9_3.
- BUGA, M. L., IBRAHIM, S. & NOK, A. J. 2010. Partially purified polygalacturonase from *Aspergillus niger* (SA6). *African Journal of Biotechnology*, 9,
- CABEZA, M. S., BACA, F. L., MUÑOZ PUNTES, E., LOTO, F., BAIGORÍ, M. D. & MORATA, V. I. 2011. Selection of psychrotolerant microorganisms producing cold-active pectinases for biotechnological processes at low temperature. *Food Technology and Biotechnology*, 49,
- CAVELLO, I., ALBANESI, A., FRATEBIANCHI, D., GARMEDIA, G., VERO, S. & CAVALITTO, S. 2017. Pectinolytic yeasts from cold environments: Novel findings of *Guehomyces pullulans*, *Cystofilobasidium infirmominiatum* and *Cryptococcus adeliensis* producing pectinases. *Extremophiles*, 21, <http://doi.org/10.1007/s00792-016-0904-0>.
- CAVELLO, I. A. & CAVALITTO, S. F. 2014. Kinetic modelling of thermal inactivation of a keratinase from *Purpureocillium lilacinum* LPSC # 876 and the influence of some additives on its thermal stability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173, <http://doi.org/10.1007/s12010-014-0977-0>.
- CAVELLO, I. A., CAVALITTO, S. F. & HOURS, R. A. 2012. Biodegradation of a keratin waste and the concomitant production of detergent stable serine proteases from *Paecilomyces lilacinus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167, <http://doi.org/10.1007/s12010-012-9650-7>.
- CHANDINI, S. K., RAO, L. J., GOWTHAMAN, M. K., HAWARE, D. J. & SUBRAMANIAN, R. 2011. Enzymatic treatment to improve the quality of black tea extracts. *Food Chemistry*, 127, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.078>.

- CHU, D. & BARNES, D. J. 2016. The lag-phase during diauxic growth is a trade-off between fast adaptation and high growth rate. *Scientific Reports*, 6, <http://doi.org/10.1038/srep25191>.
- COONEY, C. L., WANG, H. Y. & WANG, D. I. 1977. Computer-aided material balancing for prediction of fermentation parameters. *Biotechnology and Bioengineering*, 19, <http://doi.org/10.1002/bit.260190106>.
- CRESPIM, E., ZANPHORLIN, L. M., DE SOUZA, F. H., DIOGO, J. A., GAZOLLA, A. C., MACHADO, C. B., FIGUEIREDO, F., SOUSA, A. S., NOBREGA, F. & PELLIZARI, V. H. 2016. A novel cold-adapted and glucose-tolerant GH1 β -glucosidase from *Exiguobacterium antarcticum* B7. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.018>.
- CRUICKSHANK, R. H. & WADE, G. C. 1980. Detection of pectic enzymes in pectin-acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 107, [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90508-4](http://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90508-4).
- DE FRANCESCO, G., SANNINO, C., SILEONI, V., MARCONI, O., FILIPPUCCI, S., TASSELLI, G. & TURCHETTI, B. 2018. *Mrakia gelida* in brewing process: An innovative production of low alcohol beer using a psychrophilic yeast strain. *Food Microbiology*, 76, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.018>.
- DE LIMA DAMÁSIO, A. R., DA SILVA, T. M., MALLER, A., JORGE, J. A., TERENCEZ, H. F. & POLIZELI, M. D. L. T. D. M. 2010. Purification and partial characterization of an exopolygalacturonase from *Paecilomyces variotii* liquid cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160, <http://doi.org/10.1007/s12010-009-8682-0>.
- DE OVALLE, S., BRENA, B., FARIÑA, L. & GONZÁLEZ POMBO, P. 2016. Novel beta-glucosidase from *Issatchenkia orientalis*: characterization and assessment for hydrolysis of muscat wine glycosides. *Global Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4,
- DHUME, G. M., MAHARANA, A. K., TSUJI, M., SRIVASTAVA, A. K. & SINGH, S. M. 2019. Cold-tolerant endoglucanase producing ability of *Mrakia robertii* A2-3 isolated from cryoconites, Hamtha glacier, Himalaya. *Journal of Basic Microbiology*, 59, <https://doi.org/10.1002/jobm.201800300>.
- DYBALLA-RUKES, N. & METZGER, S. 2009. Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *JoVE*, 3, <http://doi.org/10.3791/1431>.
- EDSTROM, R. D. & PHAFF, H. J. 1964. Purification and certain properties of pectin transesterase from *Aspergillus fonsecaeus*. *Journal of Biological Chemistry*, 239,
- EL ENSHASY, H. A., ELSAYED, E. A., SUHAIMI, N., MALEK, R. A. & ESAWY, M. 2018. Bioprocess optimization for pectinase production using *Aspergillus niger* in a submerged cultivation system. *BMC Biotechnology*, 18, <http://doi.org/10.1186/s12896-018-0481-7>.
- ELYAS, K. K., MATHEW, A., SUKUMARAN, R. K., ALI, P. P. M., SAPNA, K., KUMAR, S. R. & MOL, K. R. R. 2010. Production optimization and properties of beta glucosidases from a marine fungus *Aspergillus*-SA 58. *New Biotechnology*, 27, <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.02.007>.
- FAN, H.-X., MIAO, L.-L., LIU, Y., LIU, H.-C. & LIU, Z.-P. 2011. Gene cloning and characterization of a cold-adapted β -glucosidase belonging to glycosyl hydrolase family 1 from a

- psychrotolerant bacterium *Micrococcus antarcticus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 49, <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.03.001>.
- FELL, J. W. 2011. *Mrakia* Y. Yamada & Komagata (1987). In C. Kurtzman, J. Fell and T. Boekhout eds. *The Yeasts (Fifth Edition)*. Elsevier, London, 1503-1510 <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00123-3>.
- FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M., ÚBEDA, J. F., VASUDEVAN, T. G., OTERO, R. R. C. & BRIONES, A. I. 2004. Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *FEMS Microbiology Letters*, 237, <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09705.x>.
- FRATEBIANCHI, D., CRESPO, J. M., TARI, C. & CAVALITTO, S. 2017. Control of agitation rate and aeration for enhanced polygalacturonase production in submerged fermentation by *Aspergillus sojae* using agro-industrial wastes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 92, <http://doi.org/10.1002/jctb.5006>.
- FRATEBIANCHI DE LA PARRA, D. 2017. Tesis Doctoral. Estudio de la producción de poligalacturonasas de *Aspergillus sojae*: producción, caracterización y aplicación en procesos de vinificación. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Química, ^La Plata^, 197
- FRATEBIANCHI DE LA PARRA, D., CAVELLO, I. & CAVALITTO, S. 2017a. Purification and biochemical and kinetic properties of an endo-polygalacturonase from the industrial fungus *Aspergillus sojae*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 27, <http://doi.org/10.1159/000460296>.
- FRATEBIANCHI DE LA PARRA, D., MIRIAN, G., TENORIO, C., CAVALITTO, S. & RUIZ-LARREA, F. 2017b. Characterization and winemaking application of a novel pectin-degrading enzyme complex from *Aspergillus sojae* ATCC 20235. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 56, <http://doi.org/10.5073/vitis.2017.56.85-93>.
- GONZÁLEZ-POMBO, P., FARIÑA, L., CARRAU, F., BATISTA-VIERA, F. & BRENA, B. M. 2011. A novel extracellular β -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. *Process Biochemistry*, 46, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.016>.
- GONZÁLEZ-POMBO, P., PÉREZ, G., CARRAU, F., GUISÁN, J. M., BATISTA-VIERA, F. & BRENA, B. M. 2008. One-step purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*. *Biotechnology Letters*, 30, <http://doi.org/10.1007/s10529-008-9708-3>.
- GUEGUEN, Y., CHEMARDIN, P. & ARNAUD, A. 2001. Purification and characterization of an intracellular beta-glucosidase from a *Candida sake* strain isolated from fruit juices. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 95, <http://doi.org/10.1385/abab:95:3:151>.
- GUNDALA, P. B. & CHINTHALA, P. 2017. Extremophilic pectinases. In R. Sani and R. Krishnaraj eds. *Extremophilic Enzymatic Processing of Lignocellulosic Feedstocks to Bioenergy*. Springer, Cham, Switzerland, 155-180 http://doi.org/10.1007/978-3-319-54684-1_9.
- HUA, M. X., CHI, Z., LIU, G. L., BUZDAR, M. A. & CHI, Z. M. 2010. Production of a novel and cold-active killer toxin by *Mrakia frigida* 2E00797 isolated from sea sediment in Antarctica. *Extremophiles*, 14, <http://doi.org/10.1007/s00792-010-0331-6>.

- ISHII, S. & YOKOTSUKA, T. 1973. Susceptibility of fruit juice to enzymic clarification by pectin lyase and its relation to pectin in fruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21, <http://doi.org/10.1021/jf60186a027>.
- JACOB, N., ASHA POORNA, C. & PREMA, P. 2008. Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. *Bioresource Technology*, 99, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.002>.
- KANT, S., VOHRA, A. & GUPTA, R. J. E. R. 2013. Purification and physicochemical properties of polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 3323. *Protein Expression and Purification*, 87, <http://doi.org/10.1016/j.pep.2012.09.014>.
- KASHYAP, D. R., VOHRA, P. K., CHOPRA, S. & TEWARI, R. 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: A review. *Bioresource Technology*, 77, [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00118-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00118-8).
- KETUDAT CAIRNS, J. R. & ESEN, A. 2010. β -Glucosidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, <http://doi.org/10.1007/s00018-010-0399-2>.
- KHAIRNAR, Y., KRISHNA, V. K., BORASTE, A., GUPTA, N., TRIVEDI, S., PATIL, P., GUPTA, G., GUPTA, M., JHADAV, A., MUJAPARA, A., JOSHI, B. & MISHRA, D. 2009. Study of pectinase production in submerged fermentation using different strains of *Aspergillus niger*. *International Journal of Microbiology Research*, 1, <http://doi.org/10.9735/0975-5276.1.2.13-17>.
- KOLEVA, L., PISHTIYSKI, I. & PAVLOVA, K. 2006. Purification and properties of extracellular β -glucosidase from the Antarctic yeast strain *Cryptococcus albidus* AL₃. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 12,
- KRIAA, M. & KAMMOUN, R. 2016. Producing *Aspergillus tubingensis* CTM507 Glucose oxidase by solid state fermentation versus submerged fermentation: process optimization and enzyme stability by an intermediary metabolite in relation with diauxic growth. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91, <https://doi.org/10.1002/jctb.4753>.
- KWON, K.-S., LEE, J., KANG, H. G. & HAH, Y. C. 1994. Detection of beta-glucosidase activity in polyacrylamide gels with esculin as substrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, <http://doi.org/10.1128/AEM.60.12.4584-4586.1994>.
- LADEIRA ÁZAR, R. I. S., DA LUZ MORALES, M., PICCOLO MAITAN-ALFENAS, G., FALKOSKI, D. L., FERREIRA ALFENAS, R. & GUIMARÃES, V. M. 2020. Apple juice clarification by a purified polygalacturonase from *Calonectria pteridis*. *Food and Bioprocess Processing*, 119, <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.11.013>.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, <http://doi.org/10.1038/227680a0>.
- LEA, A. G. H. 1995. Enzymes in the production of beverages and fruit juices. In G. A. Tucker and L. F. J. Woods eds. *Enzymes in Food Processing*. Springer, Boston, MA, 223-249 https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2147-1_7.
- LIU, G.-L., WANG, K. & BUZDAR, M. 2012. Purification and characterization of the cold-active killer toxin from the psychrotolerant yeast *Mrakia frigida* isolated from sea sediments in Antarctica. *Process Biochemistry*, <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.02.016>.

- LIU, X., LI, Y., YU, Z., LIU, X., HARDIE, W. J. & HUANG, M. 2021. Screening and characterisation of β -glucosidase production strains from *Rosa roxburghii* Tratt. *International Journal of Food Engineering*, 17, <http://doi.org/10.1515/ijfe-2020-0152>.
- MA, Y., SUN, S., HAO, H. & XU, C. 2016. Production, purification and characterization of an exopolygalacturonase from *Penicillium janthinellum* sw09. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88, <http://doi.org/10.1590/0001-3765201620150051>.
- MARGESIN, R., FAUSTER, V. & FONTEYNE, P. A. 2005. Characterization of cold-active pectate lyases from psychrophilic *Mrakia frigida*. *Letters in Applied Microbiology*, 40, <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01704.x>.
- MERIN, G., MENDOZA, L. M. & MORATA, V. 2014. Pectinolytic yeasts from viticultural and enological environments: Novel finding of *Filobasidium capsuligenum* producing pectinases. *Journal of Basic Microbiology*, 54, <http://doi.org/10.1002/jobm.201200534>.
- MERÍN, M. G. & DE AMBROSINI, V. I. M. 2020. Application of a grape surface majority pectinolytic species, *Aureobasidium pullulans*, to low-temperature red winemaking: development and stability of wine colour. *Journal of Wine Research*, 31, <http://doi.org/10.1080/09571264.2020.1816534>.
- MERÍN, M. G. & DE AMBROSINI, V. I. M. 2018. Kinetic and metabolic behaviour of the pectinolytic strain *Aureobasidium pullulans* GM-R-22 during pre-fermentative cold maceration and its effect on red wine quality. *International Journal of Food Microbiology*, 285, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.003>.
- MIURA, T., ABE, F., INOUE, A., USAMI, R. & HORIKOSHI, K. 2001. Purification and characterization of novel extracellular endopolygalacturonases from a deep-sea yeast, *Cryptococcus* sp. N6, isolated from the Japan Trench. *Biotechnology Letters*, 23, <http://doi.org/10.1023/A:1012488115482>.
- MOHAMED, S. A., FARID, N. M., HOSSINY, E. N. & BASSUINY, R. I. 2006. Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum*. *Journal of Biotechnology*, 127, <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.06.009>.
- MOHNEN, D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006>.
- NAGAI, M., KATSURAGI, T., TERASHITA, T., YOSHIKAWA, K. & SAKAI, T. 2000. Purification and characterization of an endo-polygalacturonase from *Aspergillus awamori*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64, <http://doi.org/10.1271/bbb.64.1729>.
- NAJAFIAN, L., GHODSVALI, A., HADDAD KHODAPARAST, M. H. & DIOSADY, L. L. 2009. Aqueous extraction of virgin olive oil using industrial enzymes. *Food Research International*, 42, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.10.002>.
- NAKAGAWA, T., NAGAOKA, T., MIYAJI, T. & TOMIZUKA, N. 2005a. A cold-active pectin lyase from the psychrophilic and basidiomycetous yeast *Cystofilobasidium capitatum* strain PPY-1. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 42, <http://doi.org/10.1042/ba20040190>.
- NAKAGAWA, T., NAGAOKA, T., MIYAJI, T. & TOMIZUKA, N. 2005b. Cold-active polygalacturonase from psychrophilic-basidiomycetous yeast *Cystofilobasidium capitatum*

- strain PPY-1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69, <http://doi.org/10.1271/bbb.69.419>.
- NAKAGAWA, T., YAMADA, K., MIYAJI, T. & TOMIZUKA, N. 2002. Cold-active pectinolytic activity of psychrophilic-basidiomycetous yeast *Cystofilobasidium capitatum* strain PPY-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94, [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(02\)80140-2](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(02)80140-2).
- NAKAMURA, T., HOURS, R. A. & SAKAI, T. 1995. Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *Journal of Food Science*, 60, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb09805.x>.
- ORTEGA, N., DE DIEGO, S., PEREZ-MATEOS, M. & BUSTO, M. D. 2004. Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. *Food Chemistry*, 88, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.035>.
- ORTIZ, G. E., PONCE-MORA, M. C., NOSEDA, D. G., CAZABAT, G., SARAVALLI, C., LÓPEZ, M. C., GIL, G. P., BLASCO, M. & ALBERTÓ, E. O. 2017. Pectinase production by *Aspergillus giganteus* in solid-state fermentation: optimization, scale-up, biochemical characterization and its application in olive-oil extraction. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 44, <http://doi.org/10.1007/s10295-016-1873-0>.
- PARK, Y., MAENG, S., OH, J., SUNG, G.-H. & SRINIVASAN, S. 2021. *Mrakia terrae* sp. nov. and *Mrakia soli* sp. nov., two novel basidiomycetous yeast species isolated from soil in Korea. *Mycobiology*, 49, <http://doi.org/10.1080/12298093.2021.1986927>.
- PATIDAR, M. K., NIGHOJKAR, A., NIGHOJKAR, S. & KUMAR, A. 2017. Purification and characterization of polygalacturonase produced by *Aspergillus niger* AN07 in solid state fermentation. *Canadian Journal of Biotechnology*, 1, <http://doi.org/10.24870/cjb.2017-000102>.
- PAVLOVA, K., ANGELOVA, G., SAVOVA, I., GRIGOROVA, D. & KUPENOV, L. 2002. Studies of Antarctic yeast for β -glucosidase production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, <http://doi.org/10.1023/A:1016337529488>.
- PÉREZ, S., RODRÍGUEZ-CARVAJAL, M. A. & DOCO, T. 2003. A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie*, 85, [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(03\)00053-1](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(03)00053-1).
- PHONGPRATHET, S., VICHITPHAN, K., HAN, J., VICHITPHAN, S. & SWANGKAEW, J. 2018. *Hanseniaspora thailandica* BC9 β -Glucosidase for the production of β -D-hexyl glucoside. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, <http://doi.org/10.4014/jmb.1712.12037>.
- POONDLA, V., BANDIKARI, R., SUBRAMANYAM, R. & REDDY OBULAM, V. S. 2015. Low temperature active pectinases production by *Saccharomyces cerevisiae* isolate and their characterization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.09.008>.
- POPPER, Z. A., MICHEL, G., HERVÉ, C., DOMOZYCH, D. S., WILLATS, G. T. W., TUOHY, M. G., KLOAREG, B. & STENGEL, D. B. 2010. Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. *Annual Review of Plant Biology*, 62, <http://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103809>.

- RAJOKA, M. I., KHAN, S., LATIF, F. & SHAHID, R. 2004. Influence of carbon and nitrogen sources and temperature on hyperproduction of a thermotolerant β -glucosidase from synthetic medium by *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 117, <http://doi.org/10.1385/abab:117:2:075>.
- ROPARTZ, D. & RALET, M.-C. 2020. Pectin structure. In V. Kontogiorgos eds. *Pectin: Technological and Physiological Properties*. Springer, Cham, Switzerland, 17-36 https://doi.org/10.1007/978-3-030-53421-9_2.
- RUIZ, H., RODRIGUEZ-JASSO, R., H ALMANZA, A., CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C. & AGUILAR, C. 2017. Pectinolytic enzymes. In A. Pandey, S. Negi and C. R. Soccol eds. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, 47-71 <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00003-8>.
- SAHA, B. C. & BOTHAST, R. J. 1996. Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel beta-glucosidase from *Candida peltata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, <http://doi.org/10.1128/AEM.62.9.3165-3170.1996>.
- SAHA, B. C., FREER, S. N. & BOTHAST, R. J. 1994. Production, purification, and properties of a thermostable β -glucosidase from a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, <http://doi.org/10.1128/AEM.60.10.3774-3780.1994>.
- SAHAY, S., HAMID, B., SINGH, P., RANJAN, K., CHAUHAN, D., RANA, R. S. & CHAURSE, V. K. 2013. Evaluation of pectinolytic activities for oenological uses from psychrotrophic yeasts. *Letters in Applied Microbiology*, 57, <http://doi.org/10.1111/lam.12081>.
- SERRAT, M., BERMÚDEZ, R. & VILLA, T. 2002. Production, purification, and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing wastewater. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 97, <http://doi.org/10.1385/ABAB:97:3:193>.
- SERRAT, M., BERMÚDEZ, R. C. & VILLA, T. G. 2004. Polygalacturonase and ethanol production in *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 117, <https://doi.org/10.1385/ABAB:117:1:49>.
- SHARMA, S. G., WALIA, A., CHAUHAN, A. & SHIRKOT, C. 2021. Statistical optimization of alkaline protease from *Bacillus amyloliquefaciens* SP1. *Indian Journal of Experimental Biology*, 59,
- SIEIRO, C., GARCÍA-FRAGA, B., LOPEZ-SEIJAS, J., F. DA SILVA, A. & VILLA, T. G. 2012. Microbial pectic enzymes in the food and wine industry. In B. Valdez eds. *Food Industrial Processes - Methods and Equipment*. InTech, Rijeka, Croatia, 201-218 <http://doi.org/10.5772/33403>.
- SINGH, G., VERMA, A. K. & KUMAR, V. 2016. Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases. *3 Biotech*, 6, <http://doi.org/10.1007/s13205-015-0328-z>.
- SØRENSEN, A., LÜBECK, M., LÜBECK, P. S. & AHRING, B. K. 2013. Fungal beta-glucosidases: a bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. *Biomolecules*, 3, <http://doi.org/10.3390/biom3030612>.

- STEINWEG, J. M., JAGADAMMA, S., FRERICHS, J. & MAYES, M. A. 2013. Activation energy of extracellular enzymes in soils from different biomes. *PLoS One*, 8, <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0059943>.
- TAM, S. Y. T. 1983. A new calculation method for distinguishing endo- from exo-polygalacturonases. *Journal of Food Science*, 48, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb10782.x>.
- THAKUR, A., PAHWA, R., SINGH, S. & GUPTA, R. 2010. Production, purification, and characterization of polygalacturonase from *Mucor circinelloides* ITCC 6025. *Journal of Enzyme Research*, 2010, <https://doi.org/10.4061/2010/170549>.
- TSUJI, M. & HOSHINO, T. 2019. Ethanol fermentation by the basidiomycetous yeast *Mrakia blollopis* under low temperature conditions. *In eds.* 120-132 <http://doi.org/10.1201/9781315109084-9>.
- TSUJI, M. & KUDOH, S. 2020. Soil yeasts in the vicinity of Syowa station, East Antarctica: their diversity and extracellular enzymes, cold adaptation strategies, and secondary metabolites. *Sustainability*, 12, <http://doi.org/10.3390/su12114518>.
- TSUJI, M., TANABE, Y., VINCENT, W. F. & UCHIDA, M. 2018. *Mrakia arctica* sp. nov., a new psychrophilic yeast isolated from an ice island in the Canadian High Arctic. *Mycoscience*, 59, <http://doi.org/10.1016/j.myc.2017.08.006>.
- TSUJI, M., TANABE, Y., VINCENT, W. F. & UCHIDA, M. 2019. *Mrakia hoshinonis* sp. nov., a novel psychrophilic yeast isolated from a retreating glacier on Ellesmere Island in the Canadian High Arctic. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69, <http://doi.org/10.1099/ijsem.0.003216>.
- TSUJI, M., YOKOTA, Y., KUDOH, S. & HOSHINO, T. 2015. Comparative analysis of milk fat decomposition activity by *Mrakia* spp. isolated from Skarvsnes ice-free area, East Antarctica. *Cryobiology*, 70, <http://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.04.002>.
- TSUJI, M., YOKOTA, Y., SHIMOHARA, K., KUDOH, S. & HOSHINO, T. 2013. An application of wastewater treatment in a cold environment and stable lipase production of Antarctic basidiomycetous yeast *Mrakia blollopis*. *PLoS One*, 8, <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0059376>.
- TURAN, Y. & ZHENG, M. 2005. Purification and characterization of an intracellular beta-glucosidase from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry (Mosc)*, 70, <http://doi.org/10.1007/s10541-005-0270-5>.
- TURCHETTI, B., SANNINO, C., MEZZASOMA, A., ZUCCONI, L., ONOFRI, S. & BUZZINI, P. 2020. *Mrakia stelviica* sp. nov. and *Mrakia montana* sp. nov., two novel basidiomycetous yeast species isolated from cold environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, <http://doi.org/10.1099/ijsem.0.004336>.
- VAUGHN, R. H., JAKUBCZYK, T., MACMILLAN, J. D., HIGGINS, T. E., DAVE, B. A. & CRAMPTON, V. M. 1969. Some pink yeasts associated with softening of olives. *Applied microbiology*, 18, <http://doi.org/10.1128/am.18.5.771-775.1969>.

- VILARIÑO, C., DEL GIORGIO, J. F., HOURS, R. A. & CASCONI, O. 1993. Spectrophotometric method for fungal pectinesterase activity determination. *LWT - Food Science and Technology*, 26, <https://doi.org/10.1006/fstl.1993.1023>.
- WANAPU, C., SRIPUNYA, P. & BOONKERD, N. 2012. Selection of yeast strains containing β -glucosidase for improving wine aroma. *Journal of Agricultural Science and Technology B*, 2,
- YADAV, S., YADAV, P. K., YADAV, D. & YADAV, K. D. S. 2009. Pectin lyase: A review. *Process Biochemistry*, 44, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.09.012>.
- YANG, Y. & ANDERSON, C. T. 2020. Biosynthesis, localisation, and function of pectins in plants. In V. Kontogiorgos eds. *Pectin: technological and physiological properties*. Springer, Cham, Switzerland, 1-15 http://doi.org/10.1007/978-3-030-53421-9_1.
- YAPO, B. M. 2011. Pectin rhamnogalacturonan II: on the “small stem with four branches” in the primary cell walls of plants. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2011, <http://doi.org/10.1155/2011/964521>.
- YUIVAR, Y., ALCAINO, J., CIFUENTES, V. & BAEZA, M. 2019. Characterization of gelatinase produced by Antarctic *Mrakia* sp. *Journal of Basic Microbiology*, 59, <https://doi.org/10.1002/jobm.201900126>.
- ZHANG, D., LUO, Y., CHU, S., ZHI, Y., WANG, B. & ZHOU, P. 2016. Enhancement of cellulase and xylanase production using pH-shift and dissolved oxygen control strategy with *Streptomyces griseorubens* JSD-1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178, <http://doi.org/10.1007/s12010-015-1875-9>.

Sitios web

Carbohydrate Active Enzymes database: <http://www.cazy.org/>

BRENDA enzyme data-base: <https://www.brenda-enzymes.org/>

Sitio web comercial de Novozymes: <https://biosolutions.novozymes.com>

Último acceso: 17 de noviembre 2022

CAPÍTULO 5

PURIFICACIÓN DE POLIGALACTURONASAS Y B-GLUCOSIDASA PRODUCIDAS POR *MRAKIA SP. LP* 7.1.2016 Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Resumen

En este capítulo se describe la purificación y caracterización de una β -glucosidasa (BGLasa) y dos poligalacturonasas (PGasaI y PGasaII) cuya producción fue estudiada en el capítulo anterior. Se probaron tres técnicas para concentrar el extracto enzimático: liofilización, concentración a presión reducida (rotavapor) y concentración mediante filtros tangenciales. El extracto enzimático concentrado por rotavapor fue sometido a procesos cromatográficos para purificar las enzimas. Luego de cuatro pasos, la BGLasa fue purificada 62 veces hasta una preparación homogénea, evaluada por SDS-PAGE. El rendimiento del proceso fue 51%, con una actividad específica final de 27 U mg^{-1} . La proteína demostró un alto peso molecular, con al menos dos subunidades de 134 y 14 kDa. La PGasaI se pudo purificar hasta un 83% de pureza, y se le determinó un peso molecular de 33 kDa. Luego de cuatro pasos de purificación, la proteína se purificó 1.4 veces, y se consiguió una muestra con 30.3 U mg^{-1} de actividad específica, con un rendimiento del proceso de 27.6%. Por su lado, la PGasaII fue parcialmente purificada (456 veces), y se obtuvo una preparación con $12551.9 \text{ U mg}^{-1}$ de actividad específica. El rendimiento fue 2% y el peso molecular estimado fue cercano a 100 kDa. Todas las enzimas fueron activas en zimogramas específicos, que fueron acoplados a los respectivos SDS-PAGEs.

Las enzimas fueron caracterizadas bioquímicamente. La BGLasa estudiada obtuvo su máxima actividad a 55 °C, y pH 5.0. Fue estable hasta 50 °C, conservando 87% de su actividad luego de 3 h de incubación. Al evaluarse su estabilidad a 55 °C, se obtuvo una vida media de 15.6 minutos a partir de la regresión a una cinética de inactivación térmica de primer orden. La estabilidad al pH fue alta: conservó más del 80% de su actividad luego de ser incubada en un rango de pH 3.0-10.0 durante una hora. La BGLasa fue parcialmente inhibida por Co^{+2} (70% de actividad residual), mientras que los iones divalentes Ca^{+2} , Mg^{+2} y Mn^{+2} generaron un efecto positivo (14-19%) sobre la actividad. Se calcularon los parámetros cinéticos de la enzima: se obtuvieron valores de K_m de 0.38 mM frente a pNPG y 1.79 frente a celobiosa, mientras que las $V_{m\acute{a}x}$ fueron $20.06 \mu\text{mol}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ y $5.65 \mu\text{mol}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectivamente. Al analizar su actividad frente a distintos sustratos se observó que la enzima es muy selectiva frente a sustratos sintéticos, siendo sólo activa frente a pNPG. En cuanto a los sustratos naturales, la enzima fue activa frente a celobiosa (19%), sacarosa (14%) y salicina (20%), y se detectaron trazas de actividad frente a CMC y maltosa (0.76 y 0.07%, respectivamente). Se realizó un isoelectroenfoque con la enzima purificada, que demostró que la enzima posee un punto isoelectrónico cercano a 3.50.

En el caso de las PGasas estudiadas, ambas fueron mayormente activas a pH cercano a 5.0, mientras que la temperatura óptima para cada una de las enzimas fue de 47 °C para la PGasaI y 55 °C para la PGasaII. Ambas fueron muy estables en un amplio rango de pH (2.00-12.00) durante una hora. Por otro lado, la estabilidad a la temperatura sí fue muy diferente entre ambas enzimas: la PGasaI fue estable durante 3 horas hasta los 43 °C, mientras que a los 45 °C ya se observó una inactivación gradual, conservando ~40% de actividad luego de 3 horas. La PGasaII, por el contrario, fue mucho más resistente frente al aumento de la temperatura: resultó completamente estable a la incubación durante 3

horas a 60 °C. Recién al ser incubada a 65 °C se inactivó gradualmente, conservando un ~ 25% de su actividad inicial luego de 3 horas de incubación. Los valores de K_m obtenidos fueron 0.17 mg ml⁻¹ y 2 mg ml⁻¹ para la PGasaI y la PGasaII, respectivamente. Los valores de $V_{m\acute{a}x}$ fueron 7.9 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ y 10000 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Los análisis por cromatografía en capa fina (CCF) revelaron que ambas PGasas son del tipo *endo*. En el caso de la PGasaI se observaron como productos de la hidrólisis del ácido poligalacturónico tanto tri- como di- galacturonanos, y ácido monogalacturónico. En el caso de la PGasaII, no se observaron productos de bajo peso molecular, sino que los productos aparentan ser de alto peso molecular. El ion Hg^{+2} afectó fuertemente la actividad de ambas PGasas, indicando que se trata de enzimas tiol-dependientes.

INTRODUCCIÓN

Purificación de enzimas

Durante el estudio de las enzimas, la purificación es esencial para poder realizar su caracterización y para conocer su mecanismo de acción. Los métodos de purificación hoy en día son variados, y muchos incluyen técnicas de ADN recombinante (Grasselli 2015; Labrou 2014).

Los primeros pasos de purificación de una muestra suelen tener como objetivo clarificar la muestra y concentrar el producto de interés. Las técnicas más empleadas en estas etapas son la filtración, la centrifugación y la precipitación con solventes, polímeros o sales (Figura 5.1) (Walsh 2015). Si el producto a purificar es intracelular, lo que ocurre generalmente, la liberación del contenido celular puede considerarse entonces como el primer paso en el fraccionamiento o recuperación de un producto (Grasselli 2015).

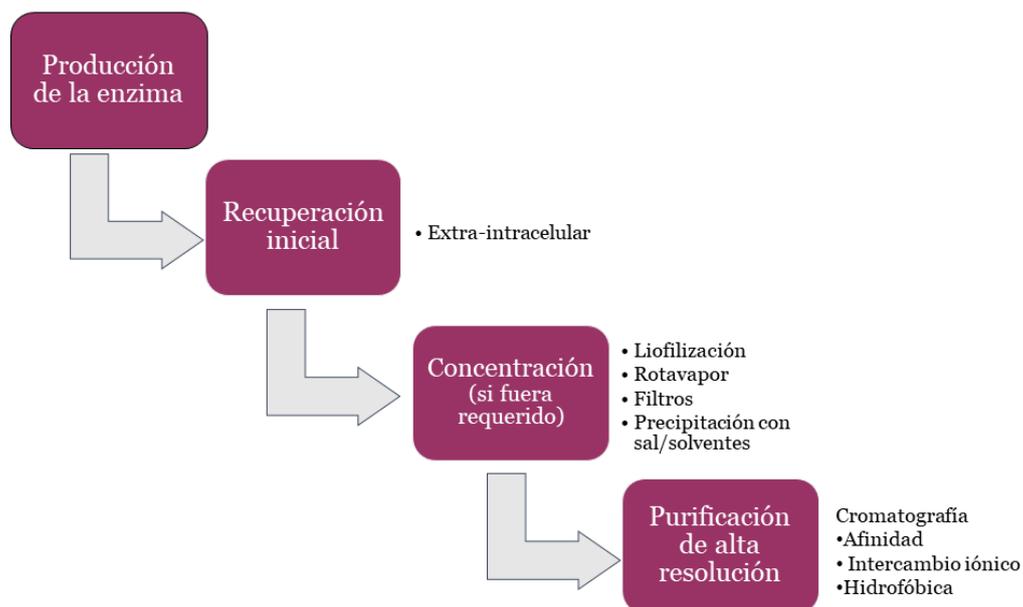


Figura 5.1 Procedimiento general para la purificación de una proteína (enzima). Adaptado de Walsh (2015).

Para las etapas de purificación intermedia, las técnicas más frecuentemente utilizadas son las cromatográficas. Existen varias técnicas cromatográficas, entre las que se encuentran la cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía de filtración en gel o exclusión molecular. Debido a la complejidad de las moléculas a ser purificadas, en la mayoría de los casos son necesarios varios pasos para obtener un producto puro y homogéneo. La selección de las diferentes matrices cromatográficas se realiza sobre la base del estudio de las propiedades químicas y físicas a purificar, y del resto de los componentes que se encuentran con ella, buscando sus principales diferencias. La cantidad de pasos cromatográficos necesarios para obtener el producto puro dependerá así de la complejidad de la muestra al llegar a esta etapa, y de la diferencia de sus propiedades fisicoquímicas respecto del resto (Grasselli 2015; Labrou 2014).

Existen dos parámetros muy importantes que se pueden definir para un proceso de purificación:

-Rendimiento: se determina como el porcentaje de producto obtenido después de una etapa de purificación respecto de la cantidad de producto antes de la misma. En una purificación de varias etapas, para calcular el rendimiento total del proceso, se tiene en cuenta la cantidad inicial de proteína de la muestra.

-Pureza: el grado de pureza es inversamente proporcional a la cantidad de impurezas separadas desde el inicio. Uno de los parámetros más importantes para analizar la pureza es la actividad específica (AE). Esta se define como la proporción de proteína de interés respecto de la cantidad total de proteínas de la muestra, y debe aumentar en los sucesivos pasos de purificación.

En todo esquema de purificación se busca una alta pureza en la muestra final, con el mayor rendimiento posible. Sin embargo, a medida que aumentan los pasos en un proceso de purificación, si bien aumenta la pureza, se ve reducido el rendimiento.

Purificación mediante el uso de columnas de intercambio iónico

Todas las proteínas poseen los grupos ionizables amino y carboxilo (y otros), por lo que su carga varía a medida que se ve modificado el pH del medio. En su punto isoeléctrico (pI), la proteína no posee carga neta. Debajo de este punto (pHs más ácidos) los grupos básicos se protonan, otorgándole carga positiva. Por encima del mismo, los grupos ácidos se de-protonan, otorgándole carga negativa. La adsorción de una proteína en un relleno cromatográfico de intercambio depende de la carga superficial de la proteína, la cual va de la mano con la carga neta de la misma. Por lo tanto, debajo de su punto isoeléctrico las proteínas son retenidas en un relleno de intercambio catiónico, mientras que por encima de su pI son retenidas en un relleno de intercambio aniónico (Xia 2007).

Purificación de β -glucosidasas (BGLasas)

La mayoría de las BGLasas reportadas en bibliografía poseen puntos isoeléctricos más bien ácidos. Por lo tanto, muchos de estudios en los que se han purificado este tipo de enzimas, y que utilizan un *buffer* ligeramente ácido, han optado por la utilización de enzimas de intercambio aniónico, como la Q-Sepharose (de Ovalle, *et al.* 2016; Gueguen, *et al.* 2001) o la Diethyl-aminoethyl (DEAE) Sepharose (Gao, *et al.* 2022; Swangkeaw, *et al.* 2009; Wanapu, *et al.* 2012).

Purificación de poligalacturonasas (PGasas)

En el caso de las PGasas también se han reportado puntos isoeléctricos mayormente ácidos, pero que varían en un rango de pH entre 3.55-8.5 (de Lima Damásio, *et al.* 2010; Esquivel & Voget 2004; Jayani, *et al.* 2005; Nagai, *et al.* 2000). Por lo tanto, existe en bibliografía una gran diversidad de técnicas adoptadas para su purificación, principalmente cromatografías de exclusión (Kant, *et al.* 2013), de interacción iónica, tanto aniónica como catiónica (Anand, *et al.* 2017; de Lima Damásio, *et al.* 2010; Nagai, *et al.* 2000; Patidar, *et al.* 2017) y de afinidad (Alqahtani, *et al.* 2022).

OBJETIVOS DE ESTE CAPÍTULO

- ◆ Purificar las enzimas PGasa y BGLasa presentes en el extracto producido por la levadura *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 en el capítulo anterior.
- ◆ Realizar la caracterización bioquímica de dichas enzimas.
- ◆ Determinar sus pesos moleculares.
- ◆ Comparar las características bioquímicas obtenidas con otras presentes en bibliografía, pertenecientes a microorganismos psicrófilos, psicrotolerates y mesófilos.
- ◆ Plantear una posible utilidad biotecnológica de las enzimas caracterizadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del extracto enzimático

Se inoculó la levadura *Mrakia* sp LP 7.1.2016 en medio líquido con pectina según se detalló en el Capítulo 4. Los cultivos *Batch* con volúmenes de 1.5 o 3.5 litros fueron llevados a cabo en Biorreactores LH-210 (Inceltech, Toulouse, France) de volúmenes útiles de 3 y 5 litros, que fueron esterilizados junto con el medio de cultivo a 121 °C durante 20 minutos. Los cultivos se llevaron a cabo con una aireación de 0.21 ± 0.01 vvm (volumen de aire por volumen de medio por minuto) a una temperatura de 14 °C y con una agitación de 350 rpm, inoculando con la cantidad de inóculo necesaria para iniciar con una DO_{600} de 0.06. El cultivo fue monitoreado mediante muestras gaseosas y con la ayuda de un electrodo de pH (Mettler Toledo, USA). Al observar un aumento del pH del cultivo, se inició la toma de muestras líquidas hasta observar los mayores títulos enzimáticos durante el estudio del cultivo (Capítulo 4).

Determinación de la actividad enzimática y el contenido de proteínas

En cada paso de purificación se analizaron las muestras en términos de actividad enzimática (PGasa y BGLasa) según los protocolos de medición detallados en el Capítulo 3.

Para la medición de actividad BGLasa usando el sustrato celobiosa se mezclaron volúmenes iguales de sustrato (10 mM, en BCP pH 5.0) y enzima a 20 °C. La reacción se finalizó a intervalos regulares de tiempo tomando una alícuota de la mezcla reactiva y exponiéndola a 100 °C durante 1 minuto. La actividad se determinó determinando la cantidad de glucosa liberada a partir de celobiosa utilizando el kit de glucosa oxidasa/peroxidasa (Wiener Lab., Argentina). Una unidad de BGLasa se definió como la cantidad de enzima que libera 2 μ moles de glucosa en las condiciones de ensayo.

La determinación de proteína soluble se realizó mediante el método de Bradford (1976), utilizando como estándar una solución de seroalbúmina bovina (Sigma-Aldrich, USA).

Concentración del extracto enzimático

Para trabajar con el extracto, se procedió a una concentración inicial. Se probaron tres métodos de concentración: liofilización (liofilizador L-3, RIFICOR), concentración a presión reducida utilizando un rotavapor (Tecnal TE-211), y filtración tangencial (Vivaflow 200, Sartorius) (Figura 5.2).

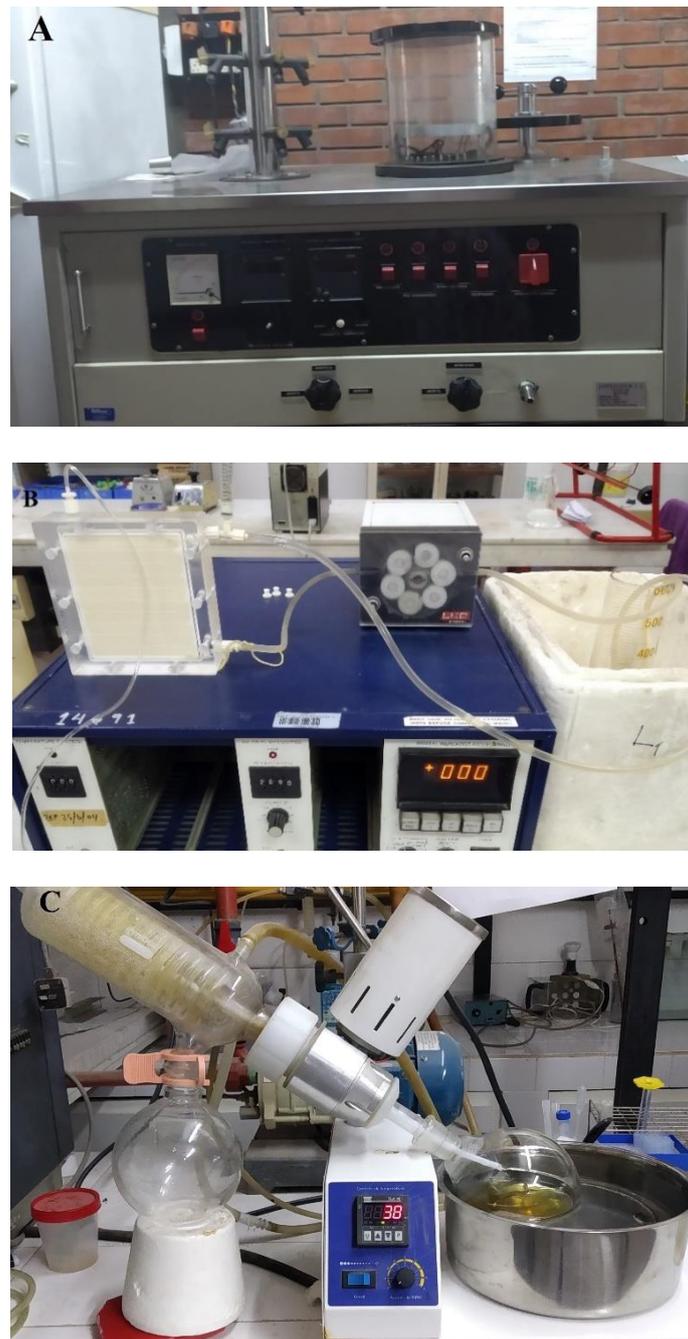


Figura 5.2 Métodos de concentración utilizados: liofilización, utilizando un liofilizador (A), concentración mediante la utilización de cartuchos de filtros tangenciales (B) y rotavapor (C).

Para la liofilización y la rotaevaporación, el extracto crudo se filtró utilizando papel Whatman N°1, y luego un filtro de nitrocelulosa de 0.8 μm de poro. La liofilización se realizó hasta deshidratación total y luego se re-suspendió en un volumen pequeño de agua destilada. Para utilizar el rotavapor, 300 ml del filtrado se redujeron a 21 ml, utilizando una temperatura de 38 $^{\circ}\text{C}$ -40 $^{\circ}\text{C}$ durante todo el proceso. Para la filtración tangencial, el

extracto crudo filtrado por papel Whatman N°1 se sometió a filtración con un filtro de 0.2 μm de poro (Vivascience, Sartorius, UK) para separar restos de células, conservando el filtrado. Luego, este último se concentró con un filtro tangencial con membrana de corte de 10 kDa (Vivaflow 200, Sartorius, UK) para concentrar el extracto, con un volumen final de concentrado de 26 ml (inicial, 240 ml). La técnica de concentración que permitió recuperar la mayor cantidad de las enzimas fue la elegida para continuar con los siguientes pasos de purificación. En la Figura 5.3 se esquematiza todo el procedimiento.

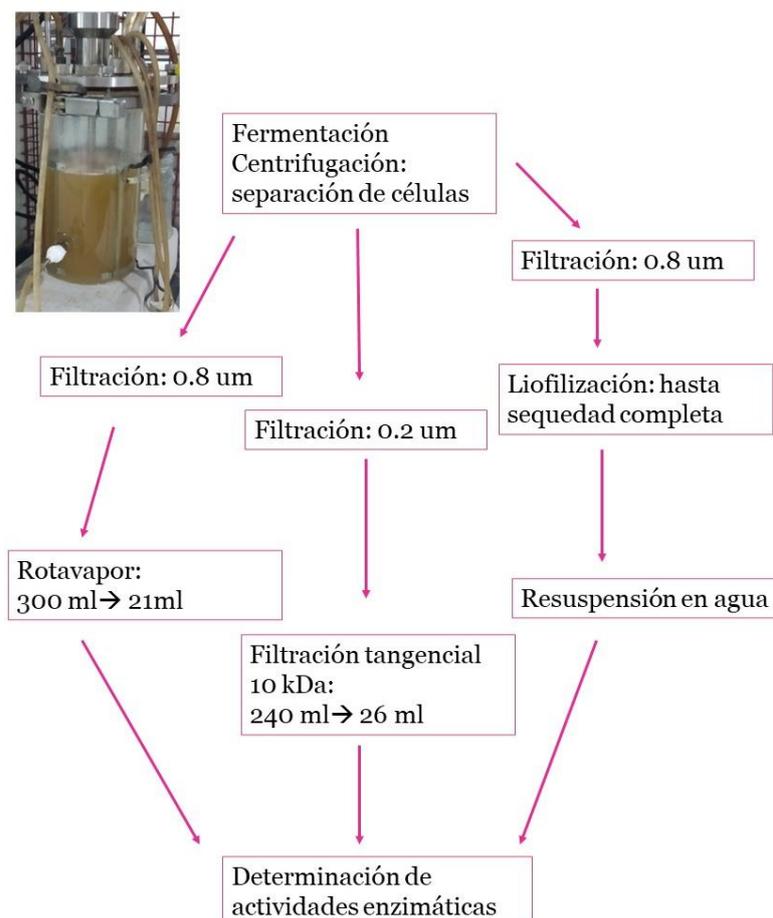


Figura 5.3 Esquema del procedimiento llevado a cabo para la concentración del extracto enzimático con diferentes métodos.

Esquema de purificación

En la Figura 5.4 se muestra el esquema general completo de purificación de las tres enzimas.

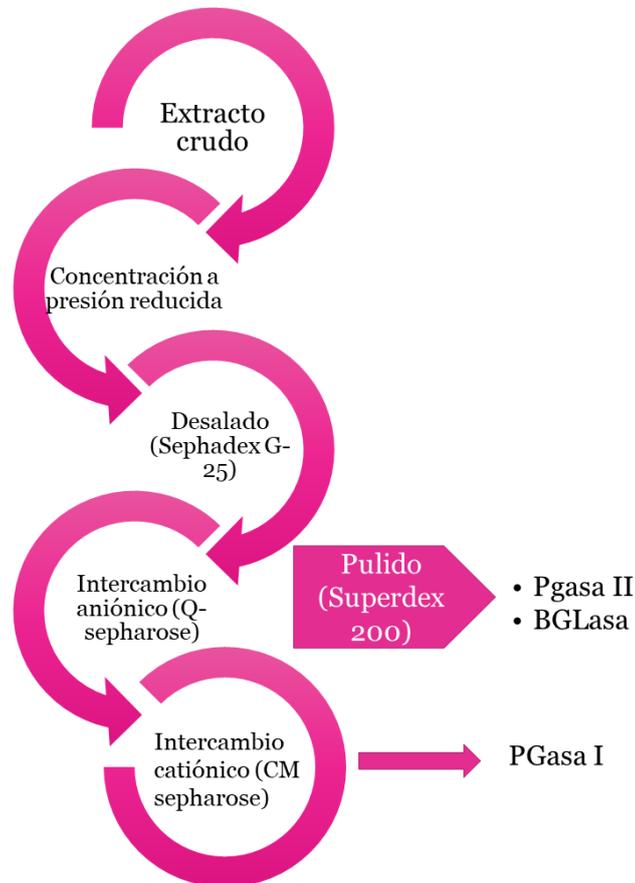


Figura 5.4 Esquema general y simplificado de purificación para la separación de las 3 enzimas estudiadas: β -glucosidasa (BGLasa), y dos poligalacturonasas (PGasaI y PGasaII) producidas por *Mrakia sp.* 7.1.2016.

Cromatografía de filtración en gel (desalado)

El extracto concentrado fue desalado utilizando una columna cromatográfica *Sephadex* G-25 (coarse) (General Electric Little Chalfont, UK) equilibrada con buffer citrato fosfato (12.5 mM ácido cítrico, 6.25 mM Na₂HPO₄, BCP) a pH 5.0. La elución se llevó a cabo de manera isocrática con el mismo *buffer* (dos volúmenes de columna) y a un flujo de 1 ml min⁻¹ para separar la sal de las muestras proteicas. Se recogieron fracciones de 5 ml y se juntaron aquellas en las que se detectó actividad enzimática.

Cromatografía de intercambio aniónico

La suspensión enzimática obtenida en el paso anterior fue cargada en una columna Q-*Sepharose* (General Electric Little Chalfont, UK). La misma fue previamente equilibrada con BCP pH 5.0 y la elución de las proteínas no ligadas se llevó a cabo con dos volúmenes del mismo *buffer* (1 ml min^{-1}). Luego, se aplicó un gradiente lineal en NaCl (0.00-1.00 M) en BCP, a lo largo de ocho volúmenes de columna, y al mismo flujo. Se recolectaron fracciones de 5 ml, y se determinó la actividad poligalacturonasa y β -glucosídica en todas las fracciones. Las fracciones que presentaron las distintas actividades fueron *pooladas* por separado.

Cromatografía de intercambio catiónico

Las fracciones no retenidas en la columna anterior que presentaron actividad PGasa (PGasaI) fueron aplicadas en una columna *Carboxymethyl (CM)-Sepharose Fast Flow* (General Electric), pre-equilibrada con BCP pH 5.0. Se aplicaron dos volúmenes de columna de BCP pH 5.0 y luego un gradiente lineal de NaCl (0.00-0.20 M) en BCP pH 5.0, a lo largo de 5 volúmenes de columna (flujo 1 ml min^{-1}). Las fracciones recolectadas fueron de 3 ml, y se juntaron aquellas con actividad PGasa.

Cromatografía de filtración en gel

Las suspensiones enzimáticas de BGLasa y PGasa retenidas en la columna de intercambio aniónico (PGasaII) fueron sometida a un último paso de pulido sometiéndolas a una última corrida cromatográfica en una columna Superdex-200 (General Electric) equilibrada con BCP 0.15 M NaCl, pH 5.0, y eluidas isocráticamente con el mismo *buffer* a un flujo de 0.2 ml min^{-1} . Éstas fueron guardadas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ y utilizadas para realizar su caracterización bioquímica y para evaluación de aplicaciones biotecnológicas en los próximos capítulos.

Todas las cromatografías en columna se llevaron a cabo en un equipo de FPLC AKTA FPLC_U900, General Electric, GE Healthcare (Figura 5.5).



Figura 5.5 Equipo de FPLC AKTA FPLC_U900 (General Electric, GE Healthcare) utilizado para los ensayos de purificación.

SDS-PAGE y zimogramas

Se realizaron SDS-PAGE acoplados a zimogramas, según el protocolo descrito por Laemmli (1970). Para ello, se utilizaron geles de separación acrílico-bis 6% p v⁻¹ de *stacking* y 12% de resolución. Se utilizó como marcador de pesos moleculares el marcador de Thermo Scientific: #26630. Las proteínas puras fueron sembradas en los geles sin tratamiento previo (sólo SDS) y con un previo tratamiento con SDS, β-mercaptoetanol y calor (5 minutos a 100 °C). Luego de la electroforesis, la porción del gel destinada al zimograma fue incubada con Tritón X-100 2.5% v v⁻¹ durante una hora, para *re-foldear* la enzima. Para realizar el zimograma de la enzima BGLasa, el gel fue luego sumergido en BCP (pH 5.0) durante 10 minutos con una agitación suave. Luego, fue incubado con esculina 0.1% p v⁻¹ y 0.03% p v⁻¹ FeCl₃ a 25 °C hasta observar la aparición de bandas oscuras en un fondo claro, indicativo de actividad enzimática (Kwon, *et al.* 1994). Otro

zimograma para BGLasa se realizó incubando (luego del Tritón X-100) otra porción del gel durante 30 minutos en *4-Methylumbelliferyl-β-D-glucoside* (MUG, Sigma-Aldrich) 0.5 mM, pH 5.0, y visualizando las bandas bajo luz UV ($\lambda = 365 \text{ nm}$) (González-Pombo, *et al.* 2011). Para los zimogramas de las PGasas, luego de la incubación con Tritón X-100, los geles fueron sumergidos en el sustrato: PGA 0.4% p v⁻¹ a 25 °C durante 40 minutos en el caso de la PGasaII y 2 horas en el caso de la PGasaI. Luego, se lavó rápidamente con agua destilada y se sumergió el gel en una solución de Rojo de Rutenio (Sigma-Aldrich, 0.02% p v⁻¹) hasta tinción del gel. El mismo fue desteñido con agua destilada, y se observaron bandas de actividad de color claro en un fondo rojo (Cruickshank & Wade 1980). La porción del gel destinada al SDS-PAGE para la observación de las bandas proteicas fue teñida con Coomassie coloidal 0.30 g l⁻¹ (Dyballa-Rukes & Metzger 2009).

Caracterización bioquímica

Efecto de la temperatura en la actividad de las enzimas

La dependencia de la reacción con la temperatura fue evaluada mediante la realización de mediciones a diferentes temperaturas, en un rango de 15 °C-80 °C, considerando como 100% a aquella obtenida a la temperatura óptima de la enzima.

Para calcular la energía de activación (E_a) de cada enzima, se graficaron los datos obtenidos de actividad a las diferentes temperaturas según la linealización de Arrhenius, tal como se detalló en el Capítulo 4. El coeficiente de temperatura (Q_{10}), el factor por el cual aumenta la velocidad de reacción debido a un aumento de temperatura de 10 °C, fue calculado utilizando las ecuaciones de Dixon y Webb (Javed, *et al.* 2009):

$$\text{Ln } Q_{10} = \frac{E_a \times 10}{R T^2}$$

Donde R es la constante de los gases y T la temperatura, en grados Kelvin.

Efecto de la temperatura en la estabilidad de las enzimas

Para determinar la estabilidad a la temperatura de las diferentes enzimas, estas fueron incubadas en el rango 40-70 °C, durante 180 min. Se tomaron muestras a intervalos regulares de tiempo y fueron conservadas a -20 °C hasta medida de la actividad enzimática en las condiciones estándar de medición. La actividad remanente en cada punto fue expresada como un porcentaje del valor de actividad inicial (enzima sin exposición al calor).

Se ajustaron las cinéticas obtenidas a los modelos cinéticos de inactivación térmica mencionados en el Capítulo 4. El tiempo de vida media de las enzimas para las cuales una cinética de primer orden explicó la inactivación térmica fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_d}$$

donde K_d es la constante de primer orden de la inactivación térmica de la enzima.

Efecto del pH en la actividad y la estabilidad de las enzimas

La actividad y la estabilidad al pH de las diferentes enzimas fue estudiada en un rango de 2.0 a 13.0, usando los métodos estándar de medida. Para evaluar el efecto del pH sobre la actividad, el sustrato utilizado en cada caso se ajustó a los diferentes pHs. Por otro lado, para la evaluación de la estabilidad, las enzimas fueron incubadas a cada pH en *buffer* MES-Tris-Glicina (20 mM cada uno, ajustado a cada pH), y la actividad residual se midió luego de una incubación durante una hora a 20 °C. Se consideró 100% de actividad aquella obtenida en el pH óptimo de la enzima en el caso de la actividad y sin incubación en el caso de la estabilidad.

Efecto de los iones metálicos y EDTA en la actividad de las enzimas

El efecto de diferentes iones metálicos (se utilizaron las sales MgCl₂, ZnCl₂, CaCl₂, MnCl₂, CoCl₂, KCl, HgCl₂, NaCl, FeCl₃) y EDTA en la actividad enzimática fue estudiado pre-incubando las enzimas con cada ion o EDTA en una concentración de 1 mM o 10 mM (según se indique) durante una hora a temperatura ambiente. Luego, se midió la actividad residual en el sustrato suplementado con cada ion a la misma concentración. La actividad enzimática remanente luego del ensayo fue expresada como un porcentaje comparando con el control, el cual no fue expuesto a ninguna sustancia. Para este ensayo, las enzimas fueron previamente desaladas utilizando una columna de desalado PD-10 (Cytiva).

Determinación de parámetros cinéticos

Las constantes cinéticas K_m y V_{máx} de las enzimas purificadas fueron calculadas a partir de la linealización de los datos de actividad en función de la concentración de sustrato a una regresión lineal según la transformación de Hanes-Hultin (Hultin 1967):

$$\frac{S_0}{V_0} = \frac{K_m}{V_{máx}} + \frac{S_0}{V_{máx}}$$

Donde S₀ y V₀ corresponden a la concentración inicial de sustrato y a la velocidad inicial de reacción, respectivamente.

Para la enzima BGLasa, el sustrato pNPG fue ensayado en un rango de concentración en la reacción de 0.078 -12.50 mM, mientras que la celobiosa fue ensayada entre 0.78 y 25.00 mM. En el caso de las PGasas, el rango de concentración utilizado de PGA fue entre 0.14 y 9.0 g l⁻¹.

El número de recambio o k_{cat}, definido como el número de moléculas de producto generado por cada molécula de enzima y por unidad de tiempo, se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$K_{cat} = \frac{V_{m\acute{a}x}}{E_t}$$

Donde E_t es la concentración de enzima, que se calculó utilizando la concentración de proteínas de la fracción purificada y el peso molecular calculado a partir de los ensayos de SDS-PAGE.

Especificidad de sustrato

BGLasa

Se ensayaron sustratos sintéticos: p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido, o-nitrofenil- β -D-glucopiranosido, p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido, p-nitrofenil- β -D-galactopiranosido, o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido, p-nitrofenil- α -L-ranopiranosido y p-nitrofenil- α -L-arabinopiranosido (Sigma-Aldrich), en una concentración de 5 mM, en las condiciones de ensayo detalladas en el Capítulo 3.

Para el caso de sustratos naturales, se testeó la actividad frente a los disacáridos celobiosa, sacarosa, maltosa y salicina (10 mM) y frente al polisacárido carboximetilcelulosa (5.0 g l⁻¹). Para llevar a cabo la reacción, se mezclaron volúmenes iguales de enzima y sustrato, y se tomaron muestras a diferentes tiempos, en las cuales se inactivó la enzima sumergiendo las alícuotas en un baño a ebullición durante 2 minutos. Luego, se determinó la concentración de glucosa en cada muestra mediante el método de glucosa oxidasa/peroxidasa (Trinder 1969), utilizando un kit enzimático glucosa oxidasa/peroxidasa (Spinreact). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. La actividad frente a los disacáridos de glucosa se calculó de la misma manera que frente a celobiosa. La actividad se relativizó a la obtenida frente a pNPG.

PGasas

Se determinó la actividad frente a pectinas con diferentes grados de metilación (Sigma-Aldrich #9135, #9311 y #8471), arabinogalactano (Sigma #A-9029) y ramnogalacturonano (Megazyme), siguiendo el mismo protocolo que se utilizó en el Capítulo 4. La actividad se refirió a la obtenida frente a PGA.

Isoelectroenfoque (IEF)

Se realizó un isoelectroenfoque con la BGLasa purificada. Este fue realizado en un Sistema Phast (GE Healthcare, Amersham Pharmacia PhastSystem) utilizando un PhastGel 12.5 para IEF, homogéneo (GE Healthcare). Se utilizó un marcador con proteínas de PI conocido (#17-0472-01, GE Healthcare). Previo a la tinción del gel, la actividad enzimática fue visualizada mediante luz UV luego de incubar el gel durante 10 minutos a 37 °C con MUG (0.5 mM). Luego de la visualización de la banda de actividad, el gel se tiñó con nitrato de plata en el sistema Phast, según las indicaciones del proveedor.

Estudio del mecanismo de acción de las PGasas mediante cromatografía de capa fina

Los productos de reacción de las dos PGasas fueron analizados por cromatografía de capa fina. El protocolo utilizado fue el detallado en el Capítulo 4. Las muestras de reacción fueron obtenidas incubando 50 mU de PGasa con 20 ml de PGA (2 g l⁻¹, pH 5.0) a 20 °C. La reacción se finalizó sometiendo a 100 °C durante 5 minutos alícuotas de la reacción a diferentes tiempos. Se determinaron en cada muestra los azúcares reductores con el método de Somogyi-Nelson y se calculó el porcentaje de hidrólisis del sustrato calculando la cantidad de GALA en la reacción a partir de la interpolación en una curva de calibración con GALA (Tam 1983).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Purificación de las enzimas a partir del mismo extracto enzimático

Se utilizaron técnicas clásicas para purificar las distintas enzimas presentes en el mismo extracto enzimático (Capítulo 4). El primer paso de purificación consistió en la concentración del sobrenadante, para el cual se testearon distintos métodos de concentración, que se muestran en la Tabla 5.1. Se puede observar que tanto las técnicas de evaporación a presión reducida como liofilización no provocaron la pérdida de ninguna de las actividades enzimáticas. Se eligió descartar el método de filtración tangencial, dado que generaba una pérdida parcial de las actividades enzimáticas iniciales (principalmente la actividad PGasa), por lo que podría afectar fuertemente el rendimiento final. Tanto la técnica de evaporación a presión reducida como la de liofilización se utilizaron de forma indistinta durante el resto del estudio para concentrar el extracto enzimático (Figura 5.6).

Tabla 5.1 Métodos de concentración utilizados para concentrar el extracto crudo producido por *Mrakia* sp. LP 7.1.2016

Método	Actividad β -glucosidasa remanente (%)	Actividad poligalacturonasa remanente (%)
Liofilización	100 %	100 %
Rotavapor (38 °C-40 °C)	100%	100%
Filtración tangencial	98%	75%

En cada caso, se muestra el porcentaje de actividad remanente teniendo en cuenta el volumen y la actividad enzimática iniciales y finales



Figura 5.6 Sobrenadante del cultivo de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 proveniente de un fermentador de 3 litros concentrado mediante rotavapor a presión reducida.

Se ensayaron técnicas de precipitación con sulfato de amonio, intentando encontrar una condición en la que la diferencia de hidrofobicidad de las enzimas permitiera su separación. Sin embargo, no fue posible encontrar una concentración a la cual la actividad BGLasa fuera detectada en el *pellet* y la PGasa en el sobrenadante (o viceversa). Por lo tanto, se procedió a realizar cromatografías en resinas de intercambio iónico. Al no conocer los puntos isoeléctricos de ninguna de las enzimas, se decidió utilizar una columna de intercambio aniónico fuerte, como es la *Q-Sepharose*. Se utilizó una columna de intercambio aniónico ya que, tal como se mencionó en la introducción de este capítulo, las BGLasas suelen tener puntos isoeléctricos ácidos, por lo que los rellenos de intercambio aniónico son los más elegidos para purificar este tipo de enzimas. Al realizar las corridas en esta columna, utilizando un pH de 5.0, se notó la presencia de no uno, sino dos picos con actividad PGasa, a las que se llamará PGasaI y PGasaII (Figura 5.7). La PGasaI fue la PGasa que no se vio retenida por este relleno a pH 5.0, por lo que se infiere un posible punto isoeléctrico mayor. Por otro lado, la PGasaII fue la PGasa retenida en la columna, eluida con una concentración salina de aproximadamente 20% (0.2 M NaCl). La BGLasa fue más fuertemente retenida en la resina, con lo que fue la última de estas

enzimas en eluir, con una concentración salina de aproximadamente 40% (0.4 M NaCl) (Figura 5.7).

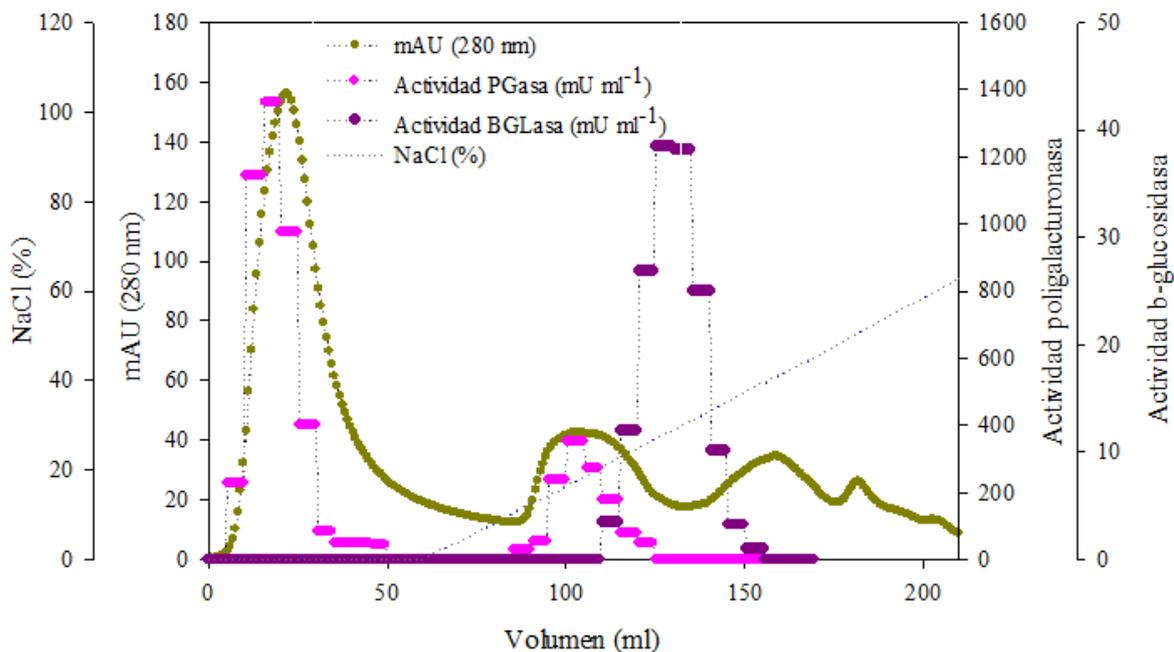


Figura 5.7 Cromatograma obtenido en la cromatografía de intercambio aniónico Q- Sepharose. Se muestra cómo varió la actividad β -glucosidasa y poligalacturonasa con el volumen eluido. Se llamó PGasaI al pico de poligalacturonasa no retenido en la columna (volumen 5-40 ml) y PGasaII a la poligalacturonasa que fue retenida en la columna y posteriormente eluida con ~ 0.20 M de NaCl (volumen 100-125 ml).

La fracción de la BGLasa obtenida a partir de la corrida cromatográfica en Q- Sepharose fue sometida a un *polish* final en una columna *Superdex-200*. Los distintos pasos de purificación de la enzima BGLasa, junto con las determinaciones de proteína y actividad específica en cada etapa se muestran en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2 Pasos de purificación de la enzima β -glucosidasa de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016. Cada determinación se realizó por triplicado

Paso de purificación	Volumen total (ml)	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U mg ⁻¹)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracto Crudo	1350	74.5	32	0.4		
Concentrado	136	59.0	29	0.5	1.1	90.6
<i>Sephadex</i> G-25	367	48.9	27	0.6	1.2	82.4
Q- <i>Sepharose</i>	42	1.9	21	10.9	25.0	64.2
<i>Superdex-200</i>	7	0.6	17	27.0	62.1	51.4

Luego de cuatro pasos de purificación se logró obtener un preparado enzimático de BGLasa purificada 62 veces respecto de la muestra inicial. La actividad específica final obtenida fue de 27 U mg⁻¹, con un rendimiento del proceso de 51%. Como puede observarse en la Tabla 5.2, la etapa de purificación que comprometió más el rendimiento fue la etapa de Q-*Sepharose*, la cual, sin embargo, también fue la mejor etapa en cuanto al enriquecimiento de la muestra proteica en BGLasa: la actividad específica luego de esta etapa se incrementó unas 22 veces: desde 0.5 a 10.9 U mg⁻¹.

En la fracción PGasaI se pudo detectar cualitativamente la presencia de actividad pectinmetilesterasa (PME). Como se explicó en el Capítulo 4, este tipo de pectinasas atacan los grupos metilo de la pectina, liberando metanol y pectina con bajos niveles de esterificación como productos. Esta fracción (que presentaba PGasaI + PME) fue sometida entonces a otro paso de purificación en una columna de intercambio catiónico, la columna CM-*Sepharose*. La PGasaI se vio retenida mientras que, a partir de este paso de purificación, no se detectó en ninguna fracción la PME. La Figura 5.8 muestra el cromatograma obtenido en la columna de interacción iónica CM-*Sepharose*.

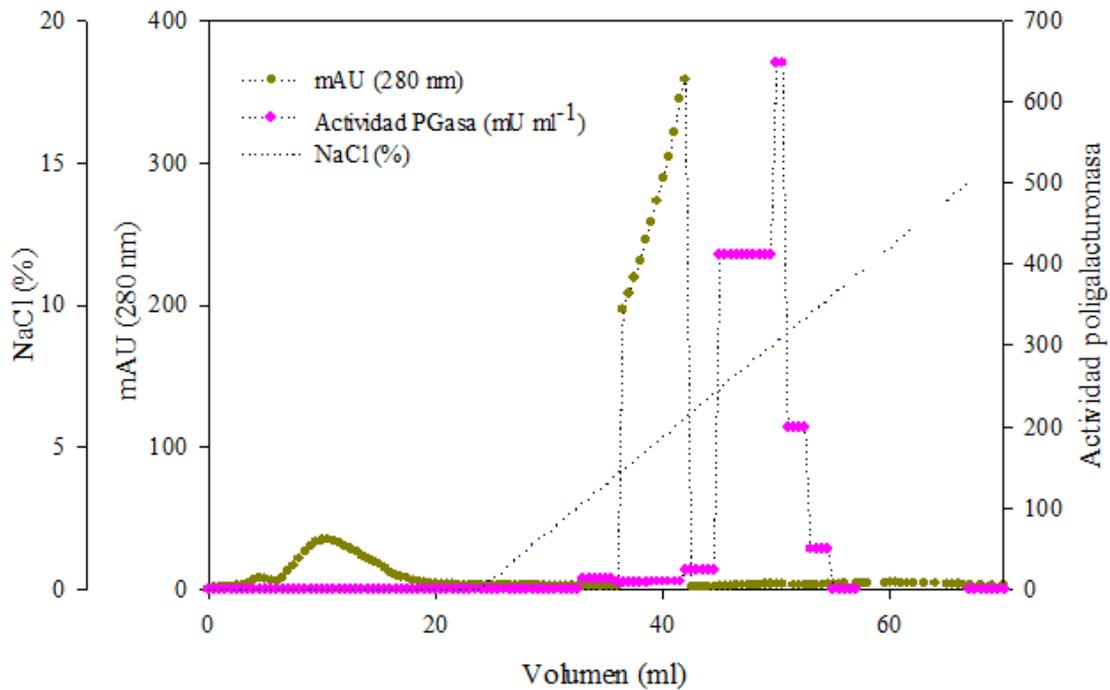


Figura 5.8 Cromatograma obtenido durante la cromatografía de intercambio catiónico CM-Sepharose para la purificación de la poligalacturonasa I. Se midió actividad poligalacturonasa.

La Tabla 5.3 muestra los pasos de purificación de las PGasa I. Luego de dos cromatografías de intercambio se logró obtener una preparación enzimática con una actividad específica de 30.3 U mg^{-1} , habiendo purificado la enzima 1.4 veces con un rendimiento final de 27.6%. Puede observarse que luego de la última etapa de purificación (CM-Sepharose), si bien se logró reducir la concentración proteica de la suspensión enzimática, también disminuyó considerablemente la actividad, por lo que el factor de purificación no aumentó en esta última etapa. Esto podría estar relacionado con una posible inestabilidad de la enzima (en su forma pura) al procedimiento. Sin embargo, esta etapa era necesaria ya que, tal como se mencionó anteriormente, la muestra no se encontraba pura ya que contenía actividad PME. Teniendo en cuenta que la enzima eluyó de la columna de intercambio con una concentración cercana a 5% NaCl (5% de 1 M, concentración en el buffer B), lo que implica una concentración muy baja, de 0.05 M, se consideró que no era necesario realizar un paso más de desalado.

Tabla 5.3 Pasos de purificación de la enzima poligalacturonasaI de *Mrakia sp.* LP 7.1.2016. Cada determinación se realizó por triplicado

Pasos de purificación	Volumen total (ml)	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U mg ⁻¹)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	3500	173.9	3815	21.9		100
Concentrado	420	201.0	3623	18.0	0.8	95.0
<i>Sephadex</i> G-25	1511	97.8	4420	45.2	2.5	115.9
<i>Q-Sepharose</i>	2397	92.4	3619	39.2	2.2	94.9
<i>CM-Sepharose</i>	3835	34.7	1052	30.3	1.4	27.6

En el caso de la fracción de PGasaII, luego de la columna *Q-Sepharose* fue sometida, al igual que la BGLasa, a un *poolish* final en una columna *Superdex-200*. La Tabla 5.4 muestra los pasos de purificación de las PGasaII.

Tabla 5.4 Pasos de purificación parcial de la enzima poligalacturonasa II de *Mrakia sp.* 7.1.2016. Cada determinación se realizó por triplicado

Pasos de purificación	Volumen total (ml)	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U mg ⁻¹)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	3500	173.9	3815.0	21.9		100
Concentración	420	201.0	3623.5	18.0	0.8	95.0
<i>Sephadex</i> G-25	1511	97.8	4419.9	42.5	2.5	115.9
<i>Q-Sepharose</i>	1381	9.0	247.9	27.5	1.3	6.5
<i>Superdex-200</i>	181	0.01	71.7	12551.9	456.3	2.0

Se observa que el rendimiento de esta enzima fue mucho más bajo luego de las etapas de purificación implementadas, con 2.0% de rendimiento final. Sin embargo, la actividad específica obtenida fue muy alta: 12551.9 U mg⁻¹, habiendo sido purificada 456.3 veces.

El factor de purificación disminuyó luego de la etapa de cromatografía en la columna *Q-Sepharose*. Esto se debe a que, es en esta etapa en la que se empieza a determinar la

actividad PGasa únicamente debida a la enzima PGasaII, siendo previamente detectadas ambas PGasas (PGasaI y PGasaII). La etapa que más contribuyó al aumento de la actividad específica fue el pulido en la columna de superdex-200. Al realizar un SDS-PAGE se observó que este último paso permitió separar una proteína de un peso molecular más bajo que se encontraba en alta concentración (Figura 5.9).

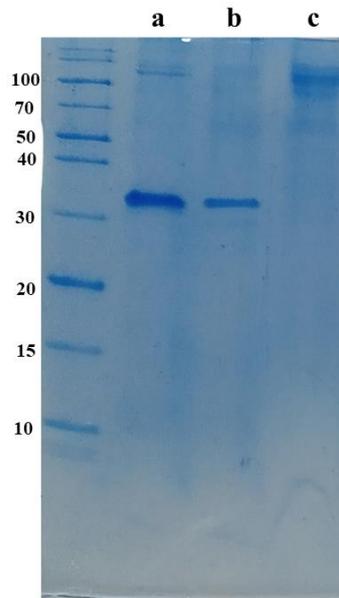


Figura 5.9 SDS-PAGE de fracciones de las distintas etapas de purificación de la enzima poligalacturonasa II. Concentrado por rotavapor (a), Q-Sepharose (b) y Superdex-200 (c). Hacia la izquierda se corrió un marcador de peso molecular.

El rendimiento total de las PGasas (rendimiento PGasaI + rendimiento PGasaII) es la actividad PGasa global recuperada, que sería 29.6%. Observando el cromatograma obtenido en la corrida en Q-Sepharose (Figura 5.7), y las tablas de purificación obtenida se puede sugerir que la PGasaII se encuentra en menor proporción en el extracto enzimático inicial, siendo la PGasaI la mayoritaria.

SDS- PAGE y zimogramas

Se realizaron SDS-PAGE acoplados a zimogramas para cada una de las enzimas purificadas para poder evidenciar la homogeneidad de las muestras puras obtenidas. En la Figura 5.10 se observa el SDS-PAGE y ambos zimogramas realizados para la BGLasa purificada.

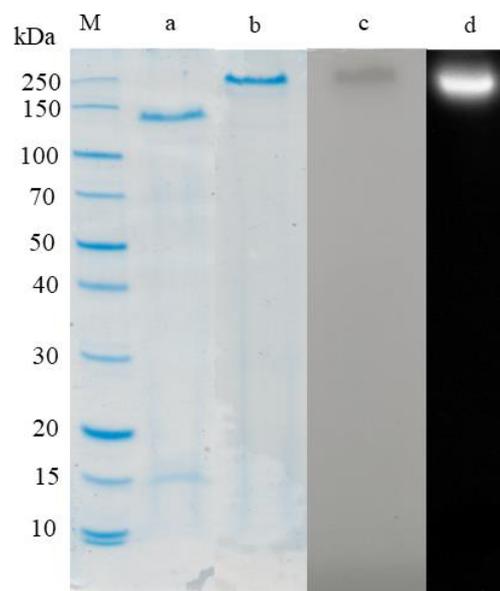


Figura 5.10 SDS-PAGE y zimogramas con esculina (c) y MUG (d) de la β -glucosidasa purificada. Se sembró la muestra sin hervir (b, c y d) y hervida y tratada con β -mercaptoetanol (a). M: marcador de peso molecular.

Se observó una banda proteica homogénea, que se correspondió con ambos zimogramas, cuando la muestra se sembró sin desnaturalizar ni tratar con β -mercaptoetanol. Sin embargo, cuando la misma fue desnaturalizada por calor en presencia de β -mercaptoetanol, se observaron dos bandas de pesos moleculares aparentes de 134 y 14 kDa (Figura 5.9, calle a), lo que sugiere que la enzima está compuesta por al menos dos subunidades. Este peso molecular resulta mayor al reportado para otras BGLasas, como la producida por *S. cerevisiae* 71B-1122, de 67 kDa (Wanapu, *et al.* 2012), o la producida por *Metschnikowia pulcherrima*, de 49 kDa (González-Pombo, *et al.* 2008). En

el caso de la única BGLasa antártica producida por una levadura previamente estudiada, la producida por *N. albida* AL₃, se demostró que la misma poseía un peso molecular mayor a 78 kDa (Koleva, *et al.* 2006). En contraposición con lo observado en este trabajo en cuanto a la naturaleza polimérica de la enzima (al menos dos subunidades), por lo general se ha reportado que las BGLasas son monoméricas (Ahmed, *et al.* 2017a).

En el caso de la PGasaI, luego de los sucesivos pasos de purificación, se pudo constatar la obtención de una preparación relativamente homogénea, con un 82.7% de pureza (cuantificado utilizando el software Gel-analyzer) en el SDS-PAGE (Figura 5.11). Esta aparenta un peso molecular de 33 kDa. El zimograma sin embargo, muestra que la actividad enzimática se encontró a lo largo de la zona inicial de corrida de la calle. En este caso, la muestra se corre únicamente con presencia de SDS. Ya en otros trabajos se ha observado que el SDS puede generar cambios conformacionales en algunas enzimas, generando como resultado una visualización en el zimograma de bandas con mayor peso molecular en comparación con la muestra desnaturalizada por calor (Cavello 2013; Muga, *et al.* 1993). Para confirmar que la PGasaI era la banda observada a la altura de 33 kDa, se utilizaron dos metodologías. Por un lado, se utilizaron columnas Vivaspin (Sartorius Vivaspin™) con membrana de corte de 50 kDa, y se volvió a sembrar el gel, sin observarse diferencias en el SDS-PAGE ni en el zimograma lo cual indica que la enzima es menor a 50 kDa (y que las impurezas detectadas no son de mayor peso molecular). Además, se sembró la preparación enzimática en una columna de exclusión molecular *Superdex-200*, recolectándose únicamente la enzima en un volumen que corresponde a un peso molecular estimado (según los tres patrones de peso molecular conocido corridos en la misma columna) de 32 kDa (Figura 5.12).

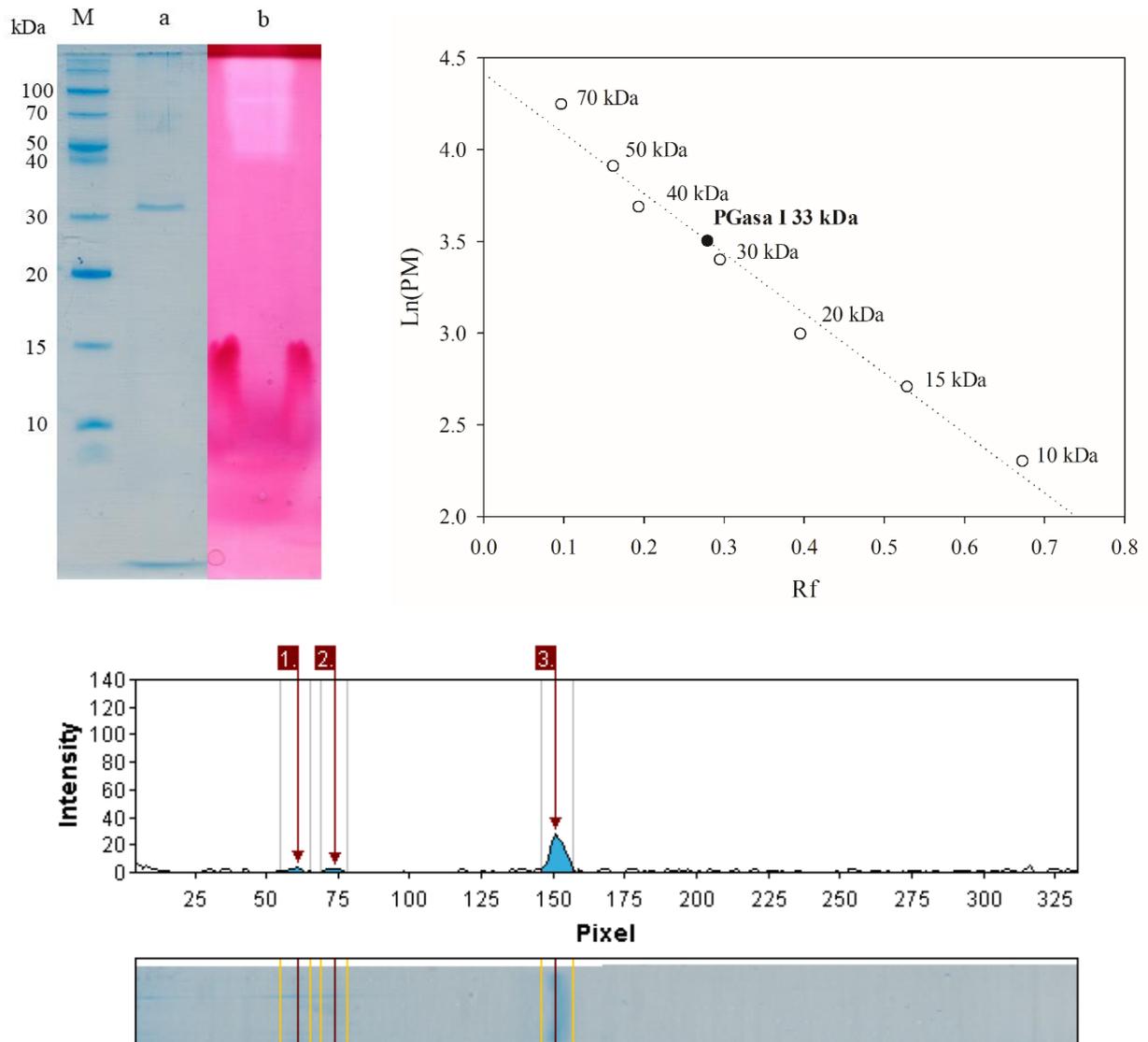


Figura 5.11 Arriba: Izquierda: SDS-PAGE y zimograma de la PGasaI purificada; Derecha: curva realizada para estimar el peso molecular utilizando el patrón de pesos moleculares. Abajo: determinación de la pureza de la muestra utilizando el software GelAnalyzer 19.1.

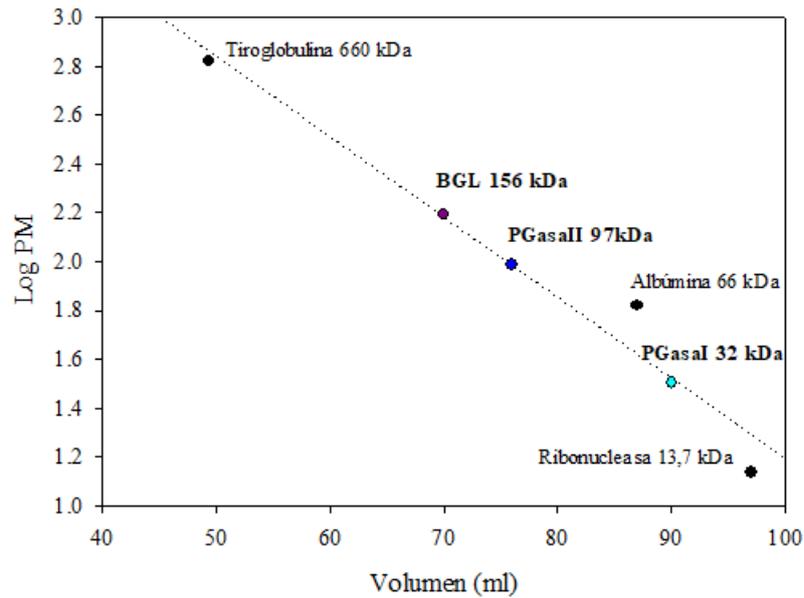


Figura 5.12 Estimación de peso molecular de las enzimas estudiadas en la columna de exclusión superdex-200.

En el caso de la PGasaII, a pesar de obtener una actividad específica tan alta ($12551.9 \text{ U mg}^{-1}$), al realizar el SDS-PAGE se observó que la enzima no logró ser purificada a homogeneidad, ya que se observaron en la muestra más de una banda proteica (Figura 5.13). Con el SDS-PAGE obtenido se dificulta estimar el peso molecular de la enzima, que, en base a lo observado en el zimograma, tendría un peso molecular cercano a los 100 kDa. Este valor coincide con el estimado mediante exclusión molecular, de 97 kDa (Figura 5.12).

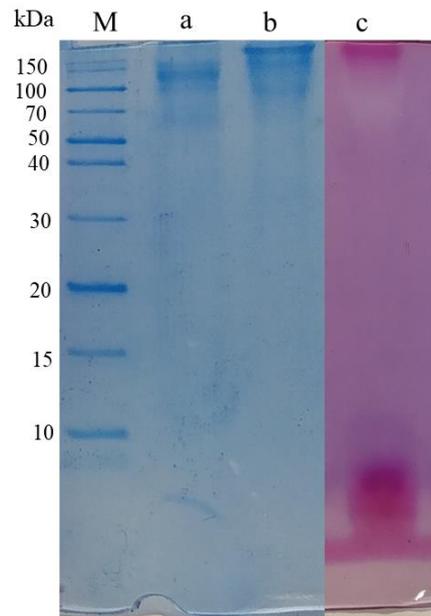


Figura 5.13 SDS-PAGE y zimograma de la poligalacturonasaII purificada. Se sembró la enzima sin hervir (a) y hervida y con tratamiento con β -mercaptoetanol (b) y el zimograma para detectar actividad poligalacturonasa (c).

La mayoría de las PGasas microbianas poseen pesos moleculares más bien bajos, cercanos a los 40 kDa (Jayani, *et al.* 2005), como la PGasa producidas por *C. capitatum*, *N. liquefaciens* y *W. anomalus*, que se encuentran en el rango 36-43 kDa (Abe, *et al.* 2006; Martos, *et al.* 2014; Nakagawa, *et al.* 2005). Sin embargo, también han sido reportadas PGasas con pesos moleculares mayores, como la producida por *Paecilomyces variotii*, con un peso molecular de 77.3 kDa (de Lima Damásio, *et al.* 2010) y la producida por *A. niger*, que fue un heterodímero con subunidades de 34 y 69 kDa (Kant, *et al.* 2013). Por lo tanto, los pesos moleculares obtenidos resultan dentro del rango de pesos moleculares reportados para estas enzimas.

En la Tabla 5.5 se resumen los datos más importantes obtenidos en esta sección.

Tabla 5.5 Detalles de la purificación de las tres enzimas a partir del extracto enzimático de *Mrakia* sp.

LP 7.1.2016

	<i>β</i> -glucosidasa	Poligalacturonasa I	Poligalacturonasa II
<i>Pasos de purificación</i>	4	4	4
<i>Rendimiento (%)</i>	51	28	2
<i>Factor de purificación</i>	62	1	456
<i>Actividad específica final (U mg⁻¹)</i>	27	30	12551
<i>Peso molecular (SDS-PAGE) (kDa)</i>	Subunidades de 134 y 14	33	~100

Caracterización bioquímica de la enzima BGLasa

Efecto de la temperatura en la actividad y la estabilidad de la BGLasa

La Figura 5.14 muestra la actividad de la BGLasa en función de la temperatura de incubación de la reacción. Se puede observar que la temperatura óptima de reacción se encontró en el rango 50-55 °C. Desde el análisis de la linealización de Arrhenius se obtuvo una temperatura óptima de 55 °C (Figura 5.15), al igual que se obtuvo para la actividad BGLasa en el extracto enzimático en el Capítulo 4. La enzima fue activa en el rango 15-60 °C. A 15 °C, la actividad relativa fue de 12% mientras que a 60 °C fue de 42%. No se detectó actividad a 65 °C.

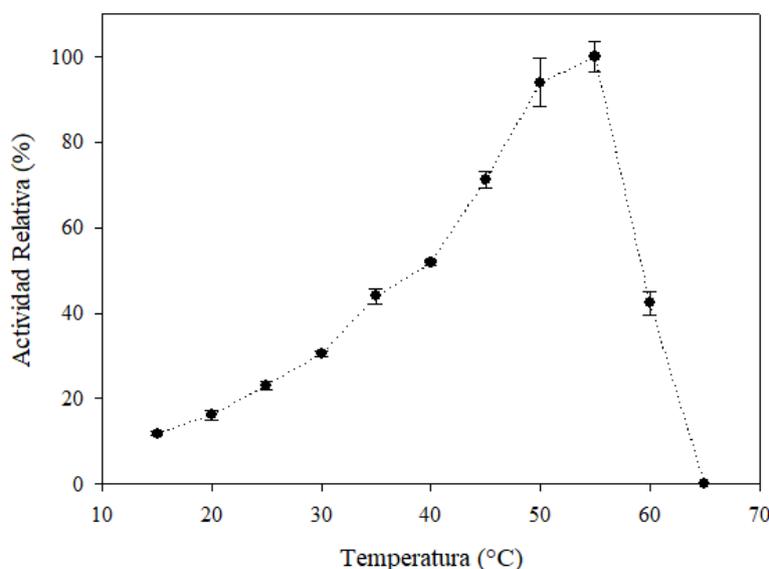


Figura 5.14 Efecto de la temperatura en la actividad de la enzima β -glucosidasa purificada del extracto de *Mrakia sp.* LP 7.1.2016.

La Figura 5.15 muestra la regresión de Arrhenius, a partir de la cual se calculó la energía de activación (E_a) para la reacción catalizada por la enzima. El valor obtenido fue de 45.72 kJ mol⁻¹, ligeramente mayor al obtenido para la misma enzima caracterizada en su extracto crudo (42.24 kJ mol⁻¹, Capítulo 4). Existen pocos reportes en los que se haya calculado la energía de activación de BGLasas, sin embargo, es notable que la BGLasa producida por un hongo termófilo obtuvo una energía de activación de 46.2 kJ mol⁻¹, muy

similar a la obtenida en este trabajo. Existen reportes de E_a menores, como la obtenida para la BGLasa producida por *Aspergillus fumigatus* (14.8 kJ mol^{-1}) (Das, *et al.* 2015) y la obtenida para la BGLasa producida por *A. niger* (19.0 kJ mol^{-1}) (Ahmed, *et al.* 2013). Por otro lado, la BGLasa producida por *Fusarium solani* obtuvo una E_a ligeramente mayor, de 53.3 kJ mol^{-1} (Bhatti, *et al.* 2013). Steinweg, *et al.* (2013) estudiaron la energía de activación de BGLasas provenientes de suelos de diferentes biomas y obtuvo un promedio de 44 kJ mol^{-1} . Si bien algunas BGLasas producidas por levaduras fueron estudiadas, no se realizó un cálculo de la energía de activación de las mismas.

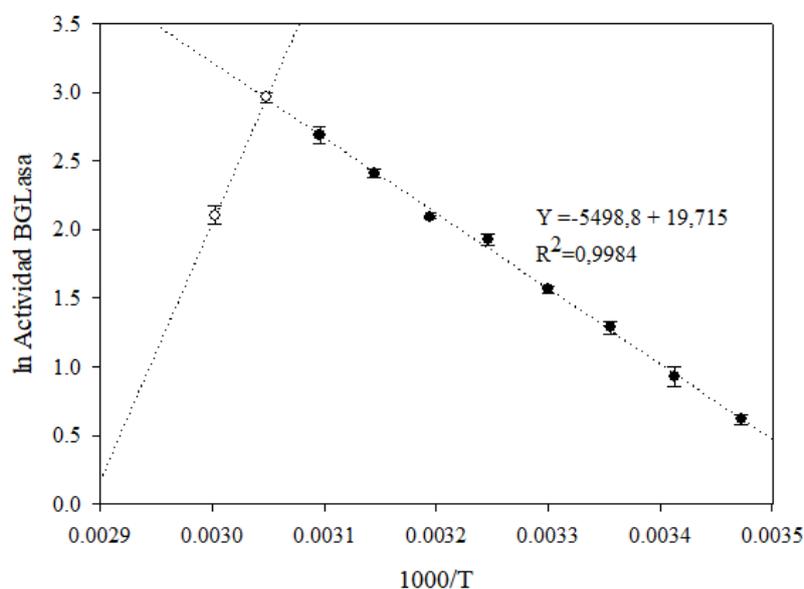


Figura 5.15 Linealización de Arrhenius para el cálculo de la temperatura óptima y la energía de activación de la enzima β -glucosidasa.

En la Tabla 5.6 se muestran los valores obtenidos de Q_{10} , calculados a diferentes temperaturas, a partir de la regresión de Arrhenius. El coeficiente Q_{10} representa el incremento de la velocidad de catálisis ante un aumento de temperatura de $10 \text{ }^\circ\text{C}$. Se observó que el parámetro fue disminuyendo a medida que aumentaba la temperatura, lo cual está íntimamente relacionado con la inactivación térmica de la enzima. Los valores

obtenidos para este parámetro son muy similares a los reportados por la BGLasa producida por el hongo termófilo *Thermothelomyces thermophilus* (antes, *Myceliophthora thermophila*) (Bonfá, *et al.* 2018).

Tabla 5.6 Coeficiente Q_{10} calculado a distintas temperaturas

Temperatura (°C)	Q_{10}
20	1.89
30	1.82
40	1.75
50	1.69
60	1.64

En la Tabla 5.7 se muestran algunas características bioquímicas de BGLasas de levaduras y hongos, junto con las obtenidas para la BGLasa en este trabajo.

Las temperaturas óptimas de BGLasas de diversos orígenes microbianos son variables, pero comúnmente se encuentran en el rango 30-65 °C (Ketudat Cairns & Esen 2010). Hasta el momento sólo existe un reporte de una BGLasa antártica, producida por la levadura Antártica *N. albida*, la cual demostró una temperatura óptima de reacción de 45 °C (Koleva, *et al.* 2006). Existen, por otro lado, varios reportes de BGLasas producidas por bacterias psicrófilas, cuyas temperaturas óptimas estuvieron en el rango de 20-40 °C, bastante más bajas que la observada en este trabajo (Chen, *et al.* 2010; Park, *et al.* 2013; Zhou, *et al.* 2011). Teniendo esto en cuenta, la temperatura óptima determinada para la BGLasa producida por *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 es la más alta entre las BGLasas producidas por levaduras adaptadas al frío hasta el momento, y, si observamos las temperaturas óptimas de BGLasas provenientes de mesófilos en la Tabla 5.7, podemos observar que la obtenida aquí es incluso mayor al promedio de las presentadas por las mismas.

Tabla 5.7 Características más relevantes de la β -glucosidasa estudiada, y otras reportadas en bibliografía que provienen de levaduras y hongos

Microorganismo	T óptima (°C)	Termo-estabilidad	pH óptimo	Estabilidad al pH*	Referencia
Adaptado al frío					
<i>Mrakia sp.</i>	55	T _{1/2} 15 min (55 °C)	5.0	3.0-11.0 (1h)	Este trabajo
<i>Naganishia albida</i>	45	T _{1/2} ~30 min (50 °C)	5.0	NR	Koleva, <i>et al.</i> (2006)
Mesófilo					
<i>Aureobasidium pullulans</i>	75	T _{1/2} ~ 1 h (80 °C)	4.5	3.0-8.0 (55%-77%)	Saha, <i>et al.</i> (1994)
<i>Candida sake</i>	52	NR	4.25	NR	Gueguen, <i>et al.</i> (2001)
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	40	NR	4.0	NR	Gao, <i>et al.</i> (2022)
<i>H. uvarum</i>	50	20-80 °C	5.0	3.0-8.0	Fan, <i>et al.</i> (2022)
<i>Komagataella pastoris</i> (antes, <i>Pichia pastoris</i>)	40	Hasta 53 °C (30 min)	7.3	5.5-9.5 (2 h)	Turan & Zheng (2005)
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	40	NR	4.0	NR	Gao, <i>et al.</i> (2022)
<i>Nakazawaea peltata</i> (antes, <i>Candida peltata</i>)	50	T _{1/2} ~ 30 min (50 °C)	5.0	3.0-7.0 (62%-21%)	Saha & Bothast (1996)

<i>Pichia kudriavzevii</i> (antes, <i>Issatchenkia orientalis</i>)	50	NR	5.0	NR	de Ovalle, <i>et al.</i> (2016)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50	Hasta 40 °C (4 h)	5.0	NR	Wanapu, <i>et al.</i> (2012)
<i>Schwanniomyces vanriijiae</i> (antes, <i>Debaryomyces vanriijiae</i>)	40	Hasta 45 °C (1 h)	5.0	3.0-7.0 (>80% luego de 1 h)	Belancic, <i>et al.</i> (2003)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (antes, <i>Pichia anomala</i>)	40	NR	4.5	3.0-8.0 (1 h)	Swangkeaw, <i>et al.</i> (2009)
<hr/>					
Hongos					
<i>Aspergillus</i> sp.	60	53% residual (1 h, 80 °C)	6.0	3.0-9.0 (24 h)	El-Ghonemy (2021)
<i>Aspergillus niger</i>	50	NR	5.0	NR	Narasimha, <i>et al.</i> (2016)
<i>Penicillium funiculosum</i>	60	T _{1/2} 60 min (60 °C)	4.0-5.0	NR	Ramani, <i>et al.</i> (2012)
<i>P. simplicissimum</i>	60	100%, 4 h a 50 °C	4.4-5.2	4.0-6.8 (12 h)	Bai, <i>et al.</i> (2013)

* se considera el rango al cual la actividad remanente es >50%. NR: no reportado

En la Figura 5.16 se muestra la estabilidad de la BGLasa a diferentes temperaturas. La BGLasa producida por *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 demostró ser 100% estable a 45 °C durante las tres horas de incubación, mientras que luego de la incubación a 50 °C conservó el 87% de su actividad inicial. A 55 °C la enzima se inactivó completamente luego de dos horas. El análisis de la cinética de primer orden arrojó una vida media de 15.6 minutos (Tabla 5.8). A 60 °C no se detectó actividad luego de 15 minutos de incubación. La estabilidad de la enzima fue muy similar a la observada cuando fue caracterizada como parte del extracto enzimático (Capítulo 4).

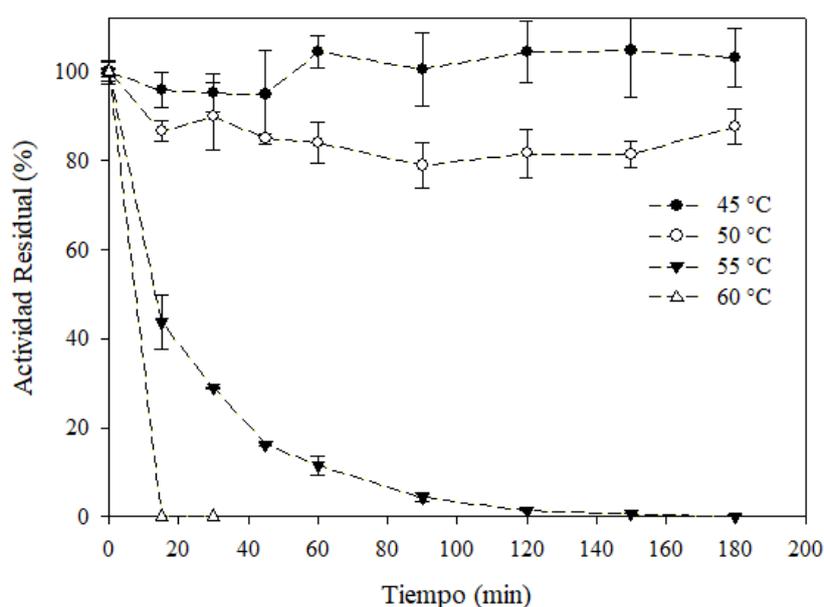


Figura 5.16 Termo-estabilidad de la enzima β -glucosidasa de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016, evaluada a diferentes temperaturas.

Tabla 5.8 Parámetros obtenidos en el modelado a una cinética de primer orden para describir la inactivación térmica a 55 °C de la BGLasa producida por *Mrakia* sp. LP 7.1.2016

Modelo primer orden, 55 °C

Ecuación	Act. Residual/Actividad inicial=Exp(-0.04439*t)
r^2	0.9880
χ^2	0.0013
SEM	0.0034
$t_{1/2}$	15.61 min

La estabilidad a 45 °C de la BGLasa obtenida fue alta considerando que toleró tres horas a 45 °C sin pérdida de actividad, cuando la BGLasa antártica previamente estudiada por Koleva, *et al.* (2006) solo conservó 65% de actividad residual luego de la incubación durante 30 minutos a la misma temperatura. La BGLasa producida por *S. cerevisiae* 71B-1122 se inactivó rápidamente a 50 °C, conservando sólo cerca del 45% de su actividad inicial luego de 30 minutos de incubación (Wanapu, *et al.* 2012), y la BGLasa producida por *Schwanniomyces vanriijiae* conservó sólo cerca del 60% de actividad enzimática luego de la incubación a 50 °C durante 1 hora (Belancic, *et al.* 2003). A pesar de su origen antártico, la estabilidad a la temperatura de la BGLasa purificada en este capítulo resulta alta en comparación con los datos bibliográficos obtenidos (Tabla 5.7). Nótese que las BGLasas provenientes de hongos demuestran en general una mayor estabilidad en temperaturas altas (Tabla 5.7).

Efecto del pH en la actividad y la estabilidad de la enzima

En la Figura 5.17 se puede observar el comportamiento de la enzima BGLasa al llevarse a cabo la reacción a distintos pHs, y luego de la incubación a diferentes pHs durante una hora (estabilidad).

La enzima resultó activa en el rango de pH 2.0-8.0, con un pH óptimo de reacción de 5.0. A pH 2.0, la actividad relativa fue de 8%, mientras que a pH 8.0 fue de 19%.

El pH óptimo obtenido, tal como se mencionó en el Capítulo 4, concuerda con el de otras BGLasas reportadas, las cuales en su mayoría poseen su mayor actividad en el rango 4.0-7.5 (Ketudat Cairns & Esen 2010). La enzima demostró una buena actividad relativa a pH 4.0 (55%). La BGLasa producida por la levadura *N. albida* AL₃ demostró sólo un 35% de actividad relativa a ese pH, mientras que la BGLasa de *S. cerevisiae* 71B-1122 un 20% (Koleva, *et al.* 2006; Wanapu, *et al.* 2012).

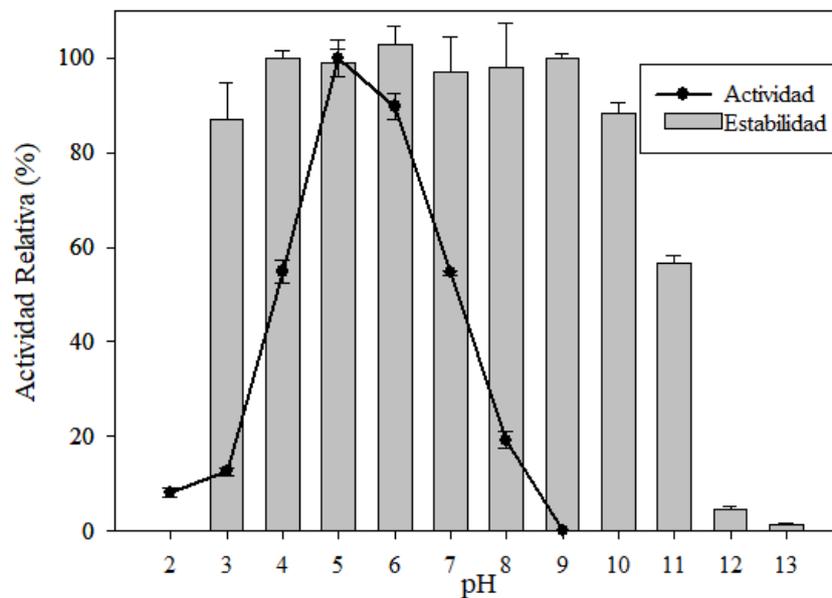


Figura 5.17 Efecto del pH en la actividad y la estabilidad de la enzima β -glucosidasa. Para el ensayo de estabilidad, la incubación se llevó a cabo durante 1 h a 20 °C y luego se midió actividad en condiciones estándar de reacción.

En cuanto a la estabilidad al pH, se observó una buena estabilidad en el rango 3.0-11.0 (>50% de actividad residual). A pH 3.0 y 4.0, las actividades residuales fueron de 87% y 100%, respectivamente. La estabilidad a pH ácido es buena, tal como se encontró para la BGLasa producida por *Schwanniomyces vanrijiae*, que, tal como lo observado en este trabajo, conservó un porcentaje considerable de actividad (>80%) luego de la incubación a pH ácido cercano a 3.0 (Belancic, *et al.* 2003). Como se mencionó anteriormente, uno de los focos de aplicación de las BGLasas es para modificar las propiedades aromáticas de algunos productos alimenticios como el té y el vino (Ahmed, *et al.* 2017b; Singh, *et al.* 2016). Para poder ser utilizadas en este último, una BGLasa necesita ser activa y estable a pH ácido del vino (pH 3.0-4.0). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta sección, pensaremos en su posible aplicación para desarrollar perfiles aromáticos en vinos.

Efecto de los iones metálicos y EDTA en la actividad enzimática

En la Tabla 5.9 se muestra el efecto de distintos iones metálicos y EDTA en la actividad de la enzima. Sólo se observaron efectos significativos en algunos iones al ser ensayados en una concentración de 10 mM, mientras que todas las sustancias ensayadas a 1 mM no presentaron efecto, al igual que se observó en el Capítulo 4. La BGLasa resultó parcialmente inhibida por Co^{+2} (70% de actividad residual), mientras que otros cationes divalentes generaron un efecto positivo (14-19%) sobre la actividad (Ca^{+2} , Mg^{+2} y Mn^{+2} , 10 mM). Este efecto, en el caso de los iones Ca^{+2} , Mg^{+2} y Mn^{+2} fue observado en otras BGLasas de levaduras (de Ovalle, *et al.* 2016; Koleva, *et al.* 2006). Sin embargo, la BGLasa de *P. terricola* fue inhibida por Mn^{+2} (de Ovalle, *et al.* 2018). Por otro lado, en el caso del Co^{+2} , se ha observado previamente inhibición en un 30% en otras BGLasas (Baffi, *et al.* 2013; de Ovalle, *et al.* 2018).

El EDTA no afectó la actividad enzimática, esto sugiere que la enzima no es metal-dependiente. Este resultado concuerda con otros estudios de BGLasas microbianas (Baffi, *et al.* 2013; de Ovalle, *et al.* 2016; de Ovalle, *et al.* 2018; Koleva, *et al.* 2006). La enzima tampoco se vio afectada por la presencia de Hg^{+2} , a diferencia de las BGLasas de *N. albida* AL₃ y *Sporidiobolus pararoseus*, las cuales sí fueron afectadas por ese ion (Baffi, *et al.* 2013; Koleva, *et al.* 2006). En la BGLasa de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016, esto podría indicar que los grupos sulfhidrilo no están implicados o no son esenciales para su actividad catalítica (Daroit, *et al.* 2008).

Tabla 5.9 Efecto de iones metálicos y EDTA en la actividad de la enzima β -glucosidasa de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016

Compuesto	Actividad relativa (%)	
	1 mM	10 mM
CaCl ₂	99.03 ± 5.76	114.6 ± 4.54*
CoCl ₂	101.57 ± 6.71	69.96 ± 5.31*
EDTA	106.00 ± 4.59	99.02 ± 1.70
FeCl ₃	93.11 ± 7.05	-
HgCl ₂	105.2 ± 5.7	94.88 ± 1.90
KCl	95.47 ± 5.49	108.36 ± 5.83
MgCl ₂	94.80 ± 5.08	114.60 ± 5.14*
MnCl ₂	107.72 ± 1.75	119.04 ± 3.35*
NaCl	94.29 ± 5.29	96.50 ± 1.79
ZnCl ₂	91.05 ± 6.89	99.29 ± 7.30

La actividad obtenida sin la presencia de ningún compuesto se consideró como 100% de actividad. Los resultados son la media de tres determinaciones junto con la desviación estándar. Los asteriscos indican los valores significativos ($p < 0.05$ en un LSD de Fisher, ANOVA) respecto del control

El Fe⁺³ sólo se testeó a una concentración de 1 mM ya que, a concentraciones mayores genera una intensa coloración amarilla en el medio, interfiriendo con la determinación de la actividad enzimática

Parámetros cinéticos

La Figura 5.18 muestra el efecto de la concentración de sustrato en la actividad de la BGLasa (Figura 5.18A) y la linealización de Hanes-Hultin obtenida para el cálculo de los parámetros cinéticos de la enzima (Figura 5.18B).

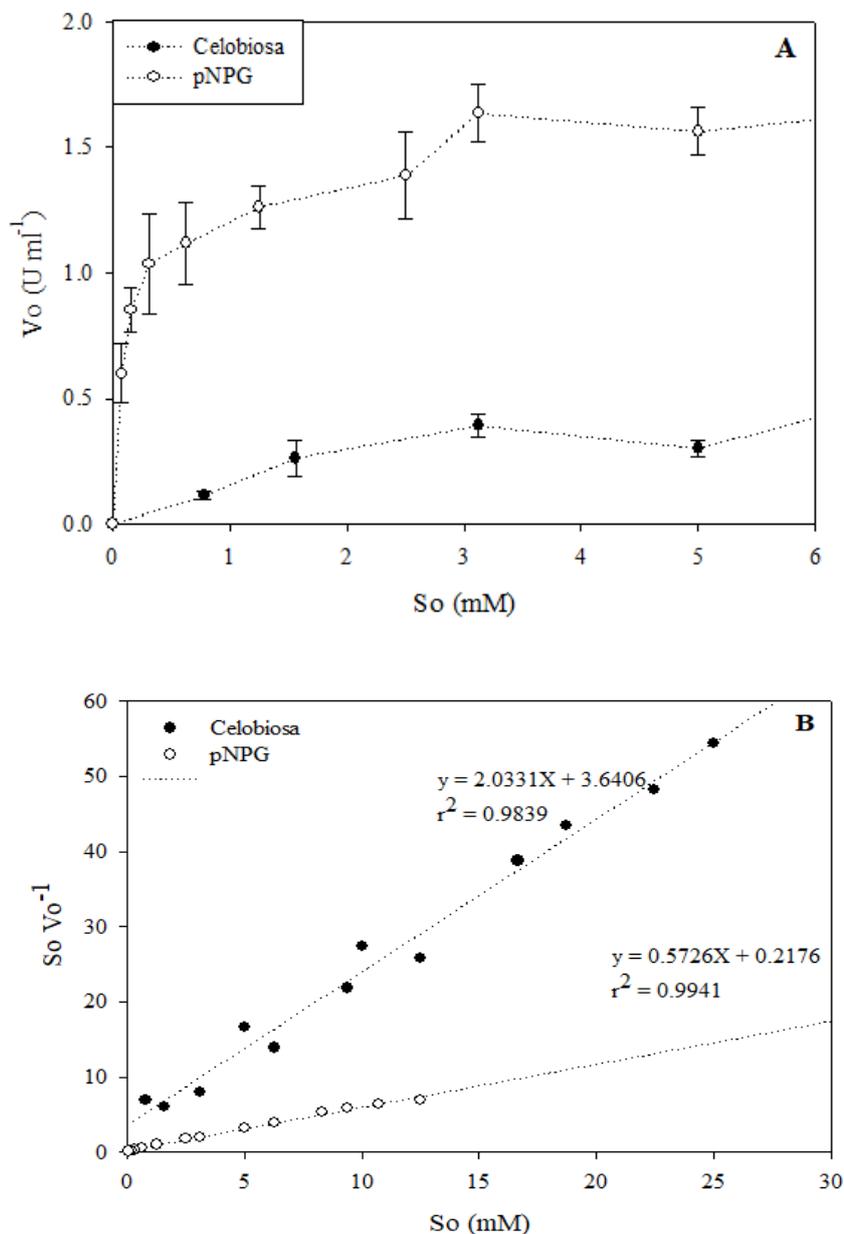


Figura 5.18 Efecto de la concentración de sustrato en la actividad de la β -glucosidasa estudiada (A) y linealización de Hanes-Hultin para el cálculo de los parámetros cinéticos (B).

Los valores obtenidos de K_m fueron 0.38 mM (pNPG) y 1.79 mM (celobiosa), mientras que las $V_{m\acute{a}x}$ fueron $20.06 \mu\text{mol}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ (pNPG) y $5.65 \mu\text{mol}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ (celobiosa).

En la Tabla 5.10 se muestran los parámetros cinéticos de otras BGLasas microbianas, en comparación con las obtenidas en este estudio.

La constante de una enzima K_m se ha utilizado para evaluar que tan afín es a su sustrato. Como K_m representa la concentración de sustrato a la cual la velocidad de catálisis es la mitad de la máxima, cuanto más bajo es el K_m de una enzima, más afín es la enzima al sustrato. Se han reportado valores de K_m (sustrato pNPG) entre 0.21 mM y 4.35 mM, por lo que el obtenido para la BGLasa de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 se encuentra entre los más bajos (Baffi, *et al.* 2013; de Ovalle, *et al.* 2016; de Ovalle, *et al.* 2018; González-Pombo, *et al.* 2008).

Tabla 5.10 Parámetros cinéticos obtenidos para la BGLasa estudiada, y para otras BGLasas reportadas en bibliografía de levaduras y hongos

Microorganismo productor de BGLasa	Km (mM)		Vmax (U mg ⁻¹)		Referencia
	pNPG	Cel	pNPG	Cel	
<i>Mrakia</i> sp.	0.38	1.79	20.06	5.65	Este trabajo
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1.17	1.00	897	800	Saha, <i>et al.</i> (1994)
<i>Aspergillus versicolor</i>	0.24				Huang, <i>et al.</i> (2021)
<i>A. japonicus</i>	0.6				Korotkova, <i>et al.</i> (2009)
<i>Aspergillus</i> sp.	0.4		232.6		El-Ghonemy (2021)
<i>Candida sake</i>	6.9				Gueguen, <i>et al.</i> (2001)
<i>Fusarium solani</i>	0.038		1.89		Boudabbous, <i>et al.</i> (2017)
<i>Malbranchea pulchella</i>	0.33		13.67		Monteiro, <i>et al.</i> (2020)
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0.125				Roth & Srinivasan (1978)
Novozymes 188 (<i>A. niger</i>)	1.03	5.63	3.76	33.74	Dekker (1986)
<i>Pichia kudriavzevii</i>	0.83		0.05		de Ovalle, <i>et al.</i> (2016)
<i>P. pastoris</i>	0.12		10		Turan & Zheng (2005)
<i>P. terricola</i>	4.35				de Ovalle, <i>et al.</i> (2018)
<i>Penicillium janthinellum</i>	3.3		444.4		Kaur & Chadha (2015)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.44		55.56		Wanapu, <i>et al.</i> (2012)
<i>Schwanniomyces etchellsii</i> (BGLII)	0.33	24	25	41.2	Wallecha & Mishra (2003)

pNPG: p-nitrofenil-b-D-glucopiranosido; Cel: celobiosa. Los espacios vacíos son valores no reportados

La constante catalítica K_{cat} , o número de recambio, se define como la cantidad de moléculas de producto formado por molécula de enzima por unidad de tiempo (en condiciones de saturación de sustrato). Por lo tanto, refleja la máxima velocidad de formación del producto, mientras que la constante de especificidad K_{cat}/K_m ha sido referida como una medida de la eficiencia cinética. Permite evaluar la especificidad de una enzima para un dado sustrato. Una mayor constante de especificidad implica un mayor número de recambio (elevada K_{cat}) y mayor afinidad por el sustrato (menor K_m) (Buchholz, *et al.* 2012). Suponiendo un peso molecular de 148 kDa para la enzima estudiada, se hizo un cálculo del K_{cat} de la enzima, y se calculó la constante de especificidad. Los resultados se muestran en la Tabla 5.11. Se obtuvo un K_{cat} de 49.8 s^{-1} para el pNPG y un K_{cat} de 14.0 s^{-1} para el sustrato celobiosa. Las constantes de especificidad fueron $131.0 \text{ ml mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $7.8 \text{ ml mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para el pNPG y la celobiosa, respectivamente. No existen muchos reportes del cálculo de la constante de recambio para BGLasas. Entre las disponibles, la obtenida para la BGLasa estudiada esta entre las más bajas, mientras que la constante de especificidad tomó un valor similar a la BGLasa producida por *P. terricola* (Tabla 5.11).

Tabla 5.11 Constante catalítica y constante de especificidad de la β -glucosidasa estudiada, en comparación con otros trabajos

Microorganismo	$K_{cat} \text{ (s}^{-1}\text{)}$		$K_{cat}/K_m \text{ (ml mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$		Referencia
	pNPG	Cel	pNPG	Cel	
<i>Mrakia</i> sp.	49.8	14.0	131.0	7.8	Este trabajo
<i>Pichia terricola</i>	460		110		de Ovalle, <i>et al.</i> (2018)
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	898.3	137.7	267.3	6.8	Méndez-Líter, <i>et al.</i> (2020)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>		156		222.8	Smaali, <i>et al.</i> (2007)
<i>Nakazawaea wickerhamii</i>	2274		726		Freer (1993)

Especificidad de sustrato

En la Tabla 5.12 se muestra la especificidad de sustrato de la enzima BGLasa de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016. Entre los sustratos sintéticos ensayados, la enzima demostró una gran especificidad, ya que sólo se detectó actividad frente a pNPG. Por otro lado, al ensayar sustratos naturales se detectó actividad frente a celobiosa (19%), sacarosa (14%) y salicina (20%), y trazas frente a CMC y maltosa (0.76 y 0.07%, respectivamente). La BGLasa estudiada mostró una gran especificidad frente a sustratos sintéticos. La diferencia de actividad observada entre pNPG (100%) y oNPG (no detectada) demuestra que la enzima es selectiva sobre la porción de la aglicona. Tampoco se observó que la enzima fuese activa frente a pNPGal, lo cual demuestra que no sólo la aglicona es importante para el reconocimiento del sustrato, sino también la glucosa. De manera similar, la BGLasa producida por *P. terricola* demostró poca actividad relativa frente a piranosidos α y β (de Ovalle, *et al.* 2018)

Tabla 5.12 Actividad porcentual relativa de la β -glucosidasa de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 sobre diferentes sustratos naturales y sintéticos

	Sustrato	Tipo de enlace	Actividad relativa (%)
Aril-D-glucósidos	p-Nitrofenil- β -D-glucopiranosido	β (Glc)	100.00 \pm 7.85
	o-Nitrofenil- β -D-glucopiranosido	β (Glc)	ND
	p-Nitrofenil- α -D-glucopiranosido	α (Glc)	ND
	p-Nitrofenil- β -D-galactopiranosido	β (Gal)	ND
	o-Nitrofenil- β -D-galactopiranosido	β (Gal)	ND
	p-Nitrofenil- α -L-ramnopiranosido	α (Rham)	ND
	p-Nitrofenil- α -L-arabinopiranosido	α (Ara)	ND
	p-Nitrofenil- α -L-arabinofuranósido	α (Ara)	ND
	p-Nitrophenyl- β -D-xylopiranosido	β (Xyl)	ND
		Salicina	β (Glc)
Di-glucósidos	Celobiosa	(1 \rightarrow 4)- β	18.95 \pm 0.43
	Sacarosa	(1 \rightarrow 2)- β	13.71 \pm 0.52
	Maltosa	(1 \rightarrow 4)- α	0.07 \pm 0.01
	Carboximetilcelulosa	(1 \rightarrow 4)- β	0.76 \pm 0.04

ND: no se detectó actividad. Para el cálculo de la actividad relativa, se consideró la actividad enzimática obtenida frente a pNPG como 100%

La mayoría de los trabajos en los que se estudia la especificidad de las BGLasas se encuentra que éstas presentan una alta actividad catalítica y una alta afinidad con los sustratos artificiales pNPG y MUG, en comparación con la celobiosa (Bonfá, *et al.* 2018; de Ovalle, *et al.* 2018; Nam, *et al.* 2010). Se ha sugerido que la cinética de la BGLasa depende de la configuración de su sustrato y la celobiosa requiere un cambio

conformacional para la catálisis. La enzima tendría una estructura muy rígida en el subsitio S1 en el cual se acomoda la glucosa de la celobiosa, pero la segunda glucosa de la celobiosa alteraría la conformación mediante una rotación para encajar en el sitio de unión del sustrato. Esta podría ser la razón detrás de la menor eficiencia observada para las BGLasas frente al sustrato celobiosa, respecto de la observada con el sustrato sintético pNPG (Bonfá, *et al.* 2018; Singhanian, *et al.* 2013). Además, la celobiosa libera dos moléculas de glucosa al hidrolizar un enlace, causando, a su vez, inhibición enzimática por producto, en caso de existir. La inhibición competitiva por producto es muy común en este tipo de enzimas (Zhang, *et al.* 2021).

Isoelectroenfoque

Se realizó un isoelectroenfoque, el cual se muestra en la Figura 5.19. Se puede observar que la enzima posee un punto isoeléctrico estimado cercano a 3.5. Este resultado es coherente teniendo en cuenta que, a pH 5.0, fue retenida por una columna de intercambio aniónico. Tal como fue mencionado previamente, los puntos isoeléctricos de estas enzimas suelen ser ácidos: por ejemplo, la BGLasa producida por *Schwanniomyces vanrijiae* posee un pI cercano a 3.0 (Belancic, *et al.* 2003), la de *P. terricola*, un pI de 3.5 (de Ovalle, *et al.* 2018), y la BGLasa producida por *S. pararoseus*, un pI de 5.0 (Baffi, *et al.* 2013).

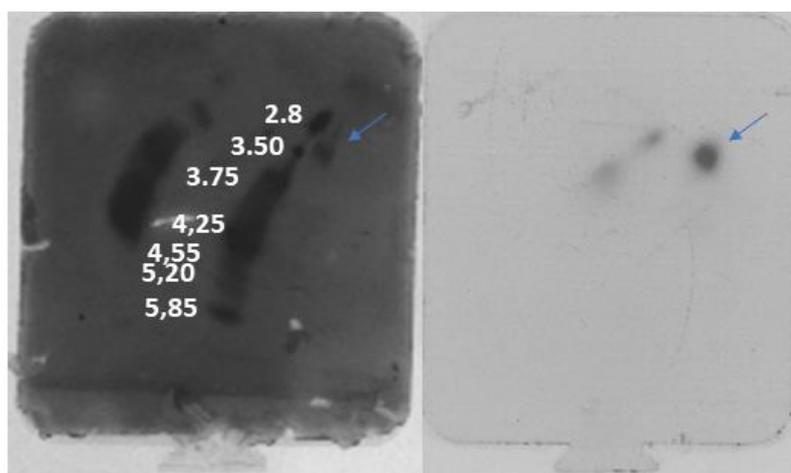


Figura 5.19 Isoelectroenfoco realizado con la BGLasa purificada. A la derecha se observa un zimograma realizado con el sustrato MUG. El mismo gel fue teñido luego con plata, y se observa a la izquierda. El patrón fue sembrado dos veces. La β -glucosidasa se señala con una flecha.

Caracterización de las PGasas

La PGasaI, de bajo peso molecular y la PGasaII, de alto peso molecular, obtenidas en la primera parte de este capítulo, fueron caracterizadas en cuanto a sus propiedades bioquímicas. En la Tabla 5.13 se muestran las propiedades bioquímicas más relevantes de PGasas reportadas en bibliografía, junto con las determinadas en este capítulo.

Tabla 5.13 Características más relevantes de las poligalacturonasas estudiadas, y otras reportadas en bibliografía

Microorganismo	Temperatura óptima (°C)	Estabilidad a la temperatura	pH óptimo	Estabilidad al pH*	Referencia
Psicrófilos					
<i>Mrakia</i> sp. (PGasaI)	46.6	43 °C 100%, 3 h	5.0-6.0	2.0-12.0 (1h)	Este trabajo
<i>Mrakia</i> sp. (PGasaII)	54.8	60 °C 100%, 3 h	3.0-6.0	2.0-13.0 (1h)	Este trabajo
<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	6	NR	5.0	NR	Sahay, <i>et al.</i> (2013)
<i>C. capitatum</i>	45	55°C ~100%, 1 h 60 °C 0%, 1 h	4.4	2.5-7.0	Nakagawa, <i>et al.</i> (2005)
<i>C. capitatum</i>	40	30 °C ~85%, 1 h 40 °C ~25%, 1 h	5.0	NR	Birgisson, <i>et al.</i> (2003)
<i>C. macerans</i>	50	40 °C ~100%, 1 h 50 °C ~10%, 1 h	4.0	NR	Birgisson, <i>et al.</i> (2003)
<i>Mrakia aquatica</i>	50	40 °C ~50%, 1 h	4.0	NR	Birgisson, <i>et al.</i> (2003)
<i>Naganishia liquefaciens</i>	50	NR	NR	NR	Abe, <i>et al.</i> (2006)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	25	NR	7.0	NR	Sahay, <i>et al.</i> (2013)
<i>R. mucilaginosa</i>	40	NR	4.0-9.0	NR	Sahay, <i>et al.</i> (2013)
Mesófilos					
Levaduras					
<i>Aureobasidium pullulans</i>	40	NR	4.5	NR	Oskay (2022)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	55	55 °C ~75%, 4 h	NR	3.0-5.0	Serrat, <i>et al.</i> (2002)

<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	NR	40 °C ~100%, 8 h 55 °C ~37%, 15 min	4.2	3.5-6.0	Martos, <i>et al.</i> (2014)
<hr/>					
Hongos					
<i>Aspergillus niger</i>	40	60 °C 50%, 30 min 70 °C ~40%, 30 min	6.0	NR	Almulaiky, <i>et al.</i> (2020)
<i>A. niger</i>	55	60 °C 60%, 1 h 65 °C ~30%, 40 min	5.0	4.0-7.0	Patidar, <i>et al.</i> (2017)
<i>Calonectria pteridis</i>	60	T _{1/2} 66 min (60 °C)	4.0	3.6-6.0	Ladeira Ázar, <i>et al.</i> (2020)
<i>Mucor circinelloides</i>	42	NR	5.5	NR	Thakur, <i>et al.</i> (2010)
<i>Paecilomyces variotii</i>	65	T _{1/2} 50.6 min (55 °C)	4.0	3.0-6.0	de Lima Damásio, <i>et al.</i> (2010)
<i>Penicillium janthinellum</i>	45	NR	5.0	4.0-8.0	Ma, <i>et al.</i> (2016)
<i>P. notatum</i>	50	NR	6.0	5.0-8.0	Amin, <i>et al.</i> (2017a)
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	50-60	NR	4.8	3.8-8.0	Quiroga, <i>et al.</i> (2009)
<i>Thermoascus aurantiacus</i> (termófilo)	60-65	T _{1/2} 10 min (60 °C)	5.5	5.0-6.0	Martins, <i>et al.</i> (2007)
<i>Trichoderma harzianum</i>	40	NR	5.0	NR	Mohamed, <i>et al.</i> (2006)

* se considera el rango al cual la actividad remanente es >50%

NR: no reportado

Efecto de la temperatura en la actividad de las enzimas

En la Figura 5.20 se visualiza el efecto de la temperatura en la actividad de las enzimas PGasaI y PGasaII. Ambas presentaron actividad a 15 °C (16% y 21%, respectivamente). La PGasaI presentó actividad hasta los 65 °C, con 22% de actividad relativa, mientras que la PGasaII demostró actividad hasta los 70 °C (23% de actividad).

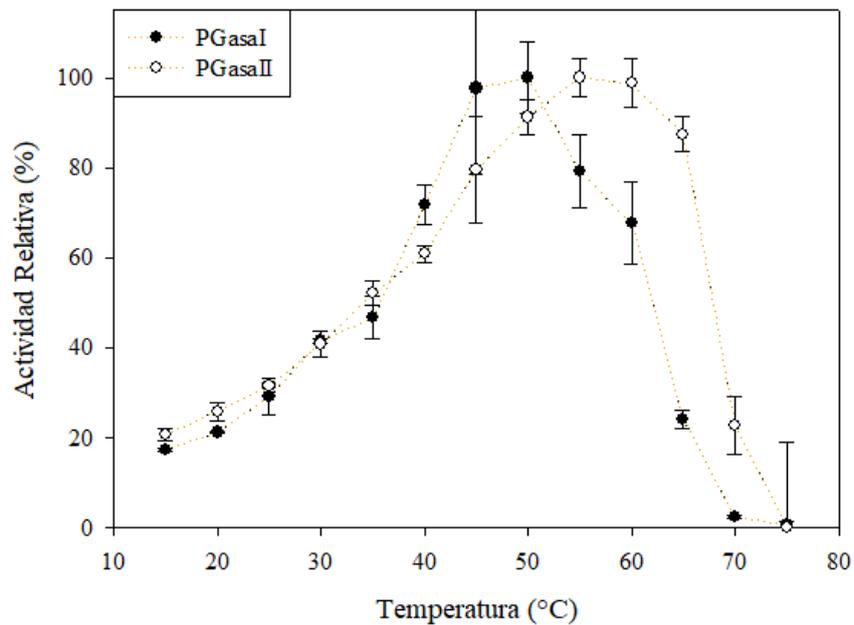


Figura 5.20 Efecto de la temperatura en la actividad de las enzimas PGasaI y PGasaII de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016.

Las temperaturas óptimas de las enzimas se calcularon a partir del gráfico de Arrhenius (Figura 5.21), resultando en 46.6 °C para la PGasaI y 54.8 °C para la PGasaII. A partir de este gráfico también se calcularon las energías de activación de ambas enzimas. En el caso de la PGasaI, fue de 41.80 kJ mol⁻¹ y en el caso de la PGasaII fue 31.32 kJ mol⁻¹. Estos datos, junto con los valores de Q10 se muestran en la Tabla 5.14. En general, los valores de Q10 calculados para la PGasaI fueron mayores que los calculados para la PGasaII (11% mayor en promedio), indicando que, ante un cambio de temperatura igual, la actividad de la PGasaI es más sensible, aumentando más que la actividad de la PGasaII.

Los valores de Q10 van disminuyendo con la temperatura, esto se debe a los efectos de inestabilidad térmica de las mismas al aumentar la temperatura.

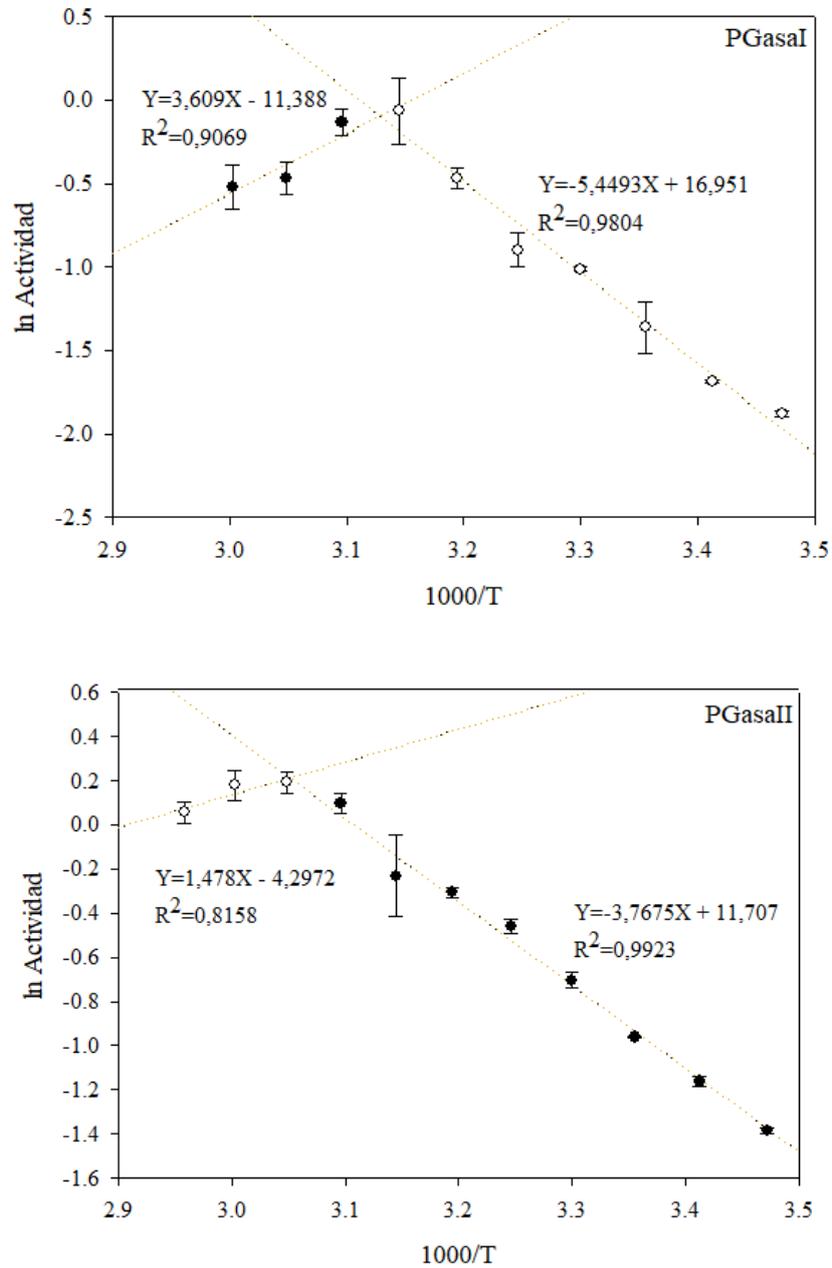


Figura 5.21 Linealizaciones de Arrhenius para el cálculo de las temperaturas óptimas y las energías de activación de las enzimas PGasaI y PGasaII.

Tabla 5.14 Energía de activación (E_a), temperatura óptima y coeficiente de temperatura Q_{10} de las poligalacturonasas purificadas

Parámetro	PGasaI	PGasaII
Energía de activación, E_a (kJ mol^{-1}) ^a	41.80	31.32
Coeficiente Q_{10} (40 °C) ^b	1.67	1.47
Coeficiente Q_{10} (50 °C)	1.62	1.43
Coeficiente Q_{10} (60 °C)	1.57	1.40
Temperatura óptima (°C) ^a	46.64	54.76

^a Calculado a partir de la regresión de Arrhenius. ^b Temperatura a la cual fue calculado

La temperatura óptima de la PGasaI es la más cercana a la obtenida para el extracto enzimático del cuál se purificó, otra razón para sugerir que es la PGasa mayoritaria en el extracto enzimático. Esta temperatura, como se mencionó antes, está en línea con las reportadas para PGasas producidas por levaduras adaptadas al frío (Abe, *et al.* 2006; Birgisson, *et al.* 2003; Nakagawa, *et al.* 2005). Por otro lado, la temperatura óptima de la PGasaII resulta alta en comparación con las reportadas (Tabla 5.13). Las energías de activación obtenidas para la reacción catalizada por las PGasas es similar a la obtenida para la pectato liasa producida por la levadura psicrófila *Mrakia frígida* ($37.86 \text{ kJ mol}^{-1}$) (Margesin, *et al.* 2005), y un poco mayor a la obtenida para el extracto enzimático con actividad poligalacturonasa producido por la levadura *T. pullulans* 8 E ($23.13 \text{ kJ mol}^{-1}$) (Bezus, *et al.* 2022).

Termoestabilidad de las enzimas

Para estudiar la estabilidad de las PGasas a diferentes temperaturas, éstas fueron incubadas durante tres horas y se midió la actividad remanente a distintos tiempos de incubación. En la Figura 5.22 se muestran los resultados obtenidos. Ambas enzimas presentaron termoestabilidades significativamente diferentes: mientras que la PGasaI fue estable sólo hasta 40 °C, desactivándose rápidamente a 45 °C, la PGasaII fue 100%

estable hasta los 60 °C (3 horas), sufriendo inactivación progresiva recién a los 65 °C y una inactivación abrupta a los 69 °C-70 °C.

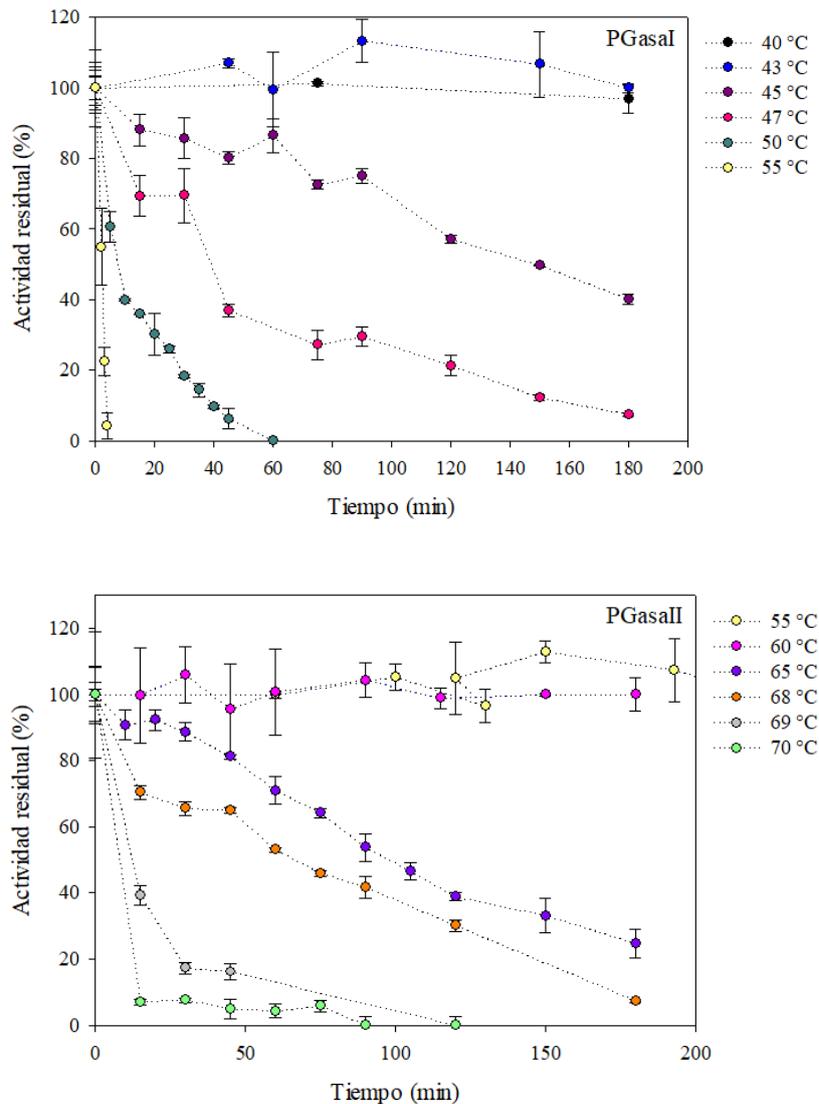


Figura 5.22 Termo-estabilidad de las enzimas poligalacturonasa I (PGasaI) y poligalacturonasa II (PGasaII) a diferentes temperaturas.

Nuevamente, se analizaron los resultados obtenidos mediante el modelado utilizando los distintos modelos de inactivación térmica ya mencionados. Los resultados obtenidos a partir del análisis de la inactivación térmica de la PGasaI y la PGasaII se muestran en la Anexo IV. En vista de los resultados, el modelo de distribución de Weibull es el más adecuado para describir el comportamiento de la inactivación térmica de ambas enzimas. Al mismo resultado se había llegado al analizar las cinéticas de muerte térmica del

extracto en el Capítulo 4. Los valores de los parámetros b a 45 °C, 47 °C y 50 °C para la PGasaI fueron 0.002 (el mismo que se había obtenido en el extracto enzimático), 0.03 y 0.16, respectivamente (Anexo IV). Nuevamente se sugiere que la PGasa mayoritaria en el extracto era la PGasaI, ya que el extracto presentaba reducción de la actividad ante la incubación a estas temperaturas, a diferencia de la PGasaII. Los valores de b obtenidos del modelado para la PGasaII a 65 °C, 68 °C, 69 °C y 70 °C fueron 0.0016, 0.04, 0.16 y 0.53.

Se puede observar que, en el caso de la PGasaI, el comportamiento observado al aumentar la temperatura fue similar al de otras PGasas de microorganismos adaptados al frío reportados por Birgisson, *et al.* (2003) (Tabla 5.13). Estas enzimas empiezan a inactivarse a temperaturas bajas como 40 °C, en el caso de la PGasaI, 45 °C, temperatura a la cual la actividad se reduce en un 60% luego de tres horas de incubación (Figura 5.22A). Entre las PGasas de levaduras mesófilas estudiadas, de los cuales no existen muchos reportes, se observa que la estabilidad es mayor (Tabla 5.13). Estas enzimas empiezan a inactivarse en tiempos relativamente cortos a partir de los 50-55 °C. La PGasaII estudiada en este capítulo se mostró mucho más estable: en el tiempo de incubación estudiado empezó a inactivarse a partir de una temperatura de 65 °C (Figura 5.22B), lo cual es más similar a las PGasas estudiadas producidas por hongos, que suelen tener estabilidades más altas (Tabla 5.13). Se observa entonces que ambas PGasas, a pesar de ser producidas por el mismo microorganismo psicrófilo, poseen una estabilidad a la temperatura muy diferente.

Efecto del pH en la actividad y la estabilidad de las enzimas

Se evaluó el pH óptimo de reacción de ambas enzimas (Figura 5.23). La actividad catalítica de la PGasaI fue máxima entre pH 5.0 y 6.0, mientras que la de la PGasaII se maximizó entre 3.0 y 6.0.

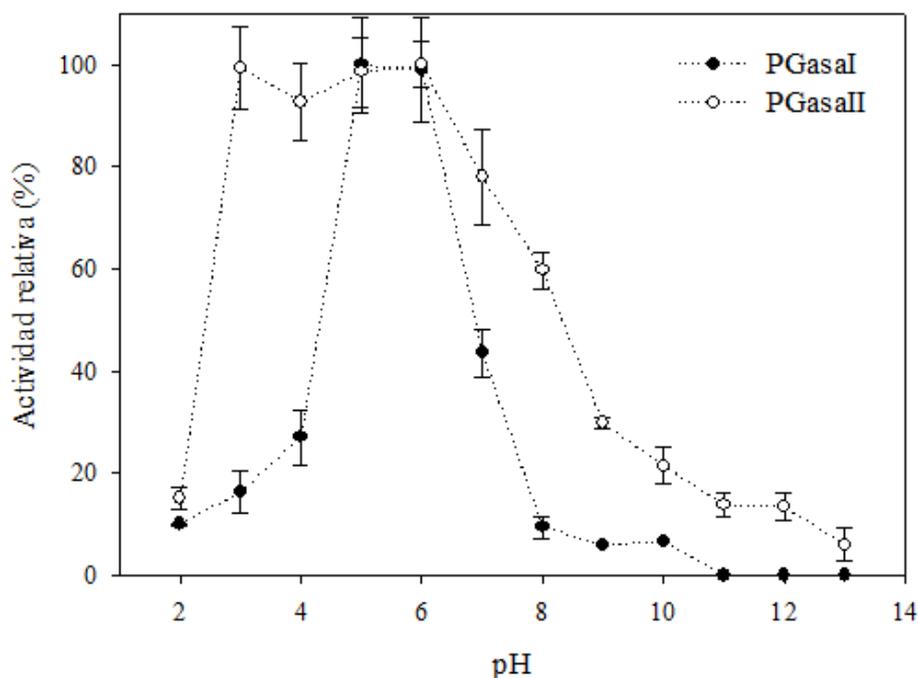


Figura 5.23 Efecto del pH en la actividad de las poligalacturonasas estudiadas.

Las curvas obtenidas son coherentes con la obtenida para el extracto enzimático en el Capítulo 4. El pH óptimo de las PGasas suele ser levemente alcalino por lo que se encuentra dentro del rango esperado (Tabla 5.13) (Birgisson, *et al.* 2003; Fratebianchi de la Parra 2017; Gomes, *et al.* 2011; Kumar, *et al.* 2014; Sahay, *et al.* 2013).

Además de la actividad en distintos valores de pH, la estabilidad de las enzimas también es un factor importante para su utilización. En el caso de las PGasas, al ser utilizadas mayormente durante la producción de vinos o jugos cítricos, una buena estabilidad a pH ácido es deseable. Ambas enzimas presentaron una gran estabilidad en

un rango amplio de pH luego de una hora de incubación, tal como se muestra en la Figura 5.24.

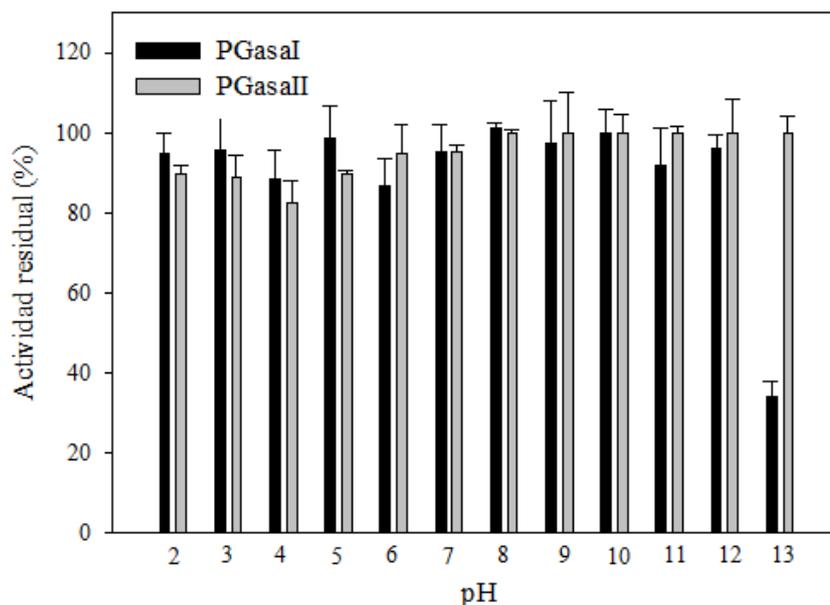


Figura 5.24 Estabilidad de las poligalacturonas estudiadas luego de ser incubadas durante una hora a diferentes valores de pH.

Se han reportado rangos de estabilidad para PGasas de 3-4 unidades de pH en el rango cercano a la neutralidad (Tabla 5.13). Teniendo esto en cuenta, la estabilidad de ambas enzimas comprende un rango mayor que lo reportado en otros trabajos.

Efecto de los iones metálicos y EDTA en la actividad enzimática

El efecto de distintos iones y EDTA en la actividad enzimática se evaluó a una concentración de 1 mM (Tabla 5.15). Al igual que lo observado para el extracto enzimático (Capítulo 4), ambas PGasas se vieron fuertemente inhibidas por el ion Hg^{+2} , lo cual sugiere que ambas enzimas son tiol-dependientes, es decir, existen residuos de cisteína involucrados en la unión de la enzima al sustrato o bien en el proceso catalítico. Esta característica es comúnmente encontrada en PGasas de microorganismos (Amin, *et al.* 2017b; Fratebianchi de la Parra 2017; Ladeira Ázar, *et al.* 2020). Al igual que había

ocurrido con el extracto, algunos iones ejercieron cierta inhibición sobre la actividad de la PGasaI, como Ca^{+2} , Fe^{+3} , K^{+} , Mn^{+2} y Zn^{+2} (15-40% inhibición), siendo el ion Mn^{+2} el que inhibió en mayor medida la actividad enzimática (40%). La PGasa producida por la levadura *W. anomalous* también fue levemente inhibida por los iones Ca^{+2} y K^{+} (Martos, *et al.* 2014).

Existen, por otro lado, reportes de la estimulación de la actividad PGasa de microorganismos ante la adición de ciertos iones metálicos (Jacob, *et al.* 2008). La PGasaI se observó levemente estimulada ante la presencia del ion Mg^{+2} .

Tabla 5.15 Efecto de iones metálicos y EDTA en la actividad de las enzimas. Los compuestos se ensayaron a una concentración de 1 mM

Compuesto	Actividad relativa (%)	
	PGasaI	PGasaII
CaCl_2	70.81 ± 9.75 *	76.21 ± 4.93 *
CoCl_2	96.64 ± 6.02	97.21 ± 2.07
EDTA	88.56 ± 2.82	99.52 ± 2.24
FeCl_3	74.67 ± 2.51 *	80.65 ± 2.50 *
HgCl_2	42.38 ± 7.35 *	45.13 ± 0.46 *
KCl	85.16 ± 9.26 *	98.25 ± 1.08
MgCl_2	120.68 ± 9.42 *	71.71 ± 4.61 *
MnCl_2	60.46 ± 4.11 *	66.88 ± 1.54 *
NaCl	95.13 ± 4.99	102.07 ± 6.94
ZnCl_2	87.65 ± 2.01 *	73.96 ± 0.93 *

La actividad obtenida sin la presencia de ningún compuesto se consideró como 100% de actividad. Los resultados son la media de tres determinaciones junto con la desviación estándar. Los asteriscos indican los valores significativos ($p < 0.05$ en un LSD de Fisher, ANOVA) respecto del control

Parámetros cinéticos

Para calcular las constantes cinéticas, K_m y $V_{m\acute{a}x}$, se realizaron las reacciones de determinación de actividad a pH 5.0 y 20 °C utilizando diferentes concentraciones de sustrato (Figura 5.25 A y B). Las constantes fueron calculadas a partir de la regresión de Hanes-Hultin, siendo 0.17 mg ml⁻¹ y 7.9 μmol mg⁻¹ min⁻¹, para la PGasaI y 2.0 mg ml⁻¹ y 10000 μmol mg⁻¹ min⁻¹ para la PGasaII (Figura 5.26 A y B). Ambos valores de K_m se encuentra dentro del rango reportado: PGasas producidas por *A. sojæ*, *W. anomalus* y *A. niger* tuvieron valores de K_m entre 0.13 y 2.4 mg ml⁻¹ (Fratebianchi de la Parra 2017; Martos, *et al.* 2014) y, en general, se han reportado valores para PGasas microbianas de hasta 5 mg ml⁻¹ (Anand, *et al.* 2017).

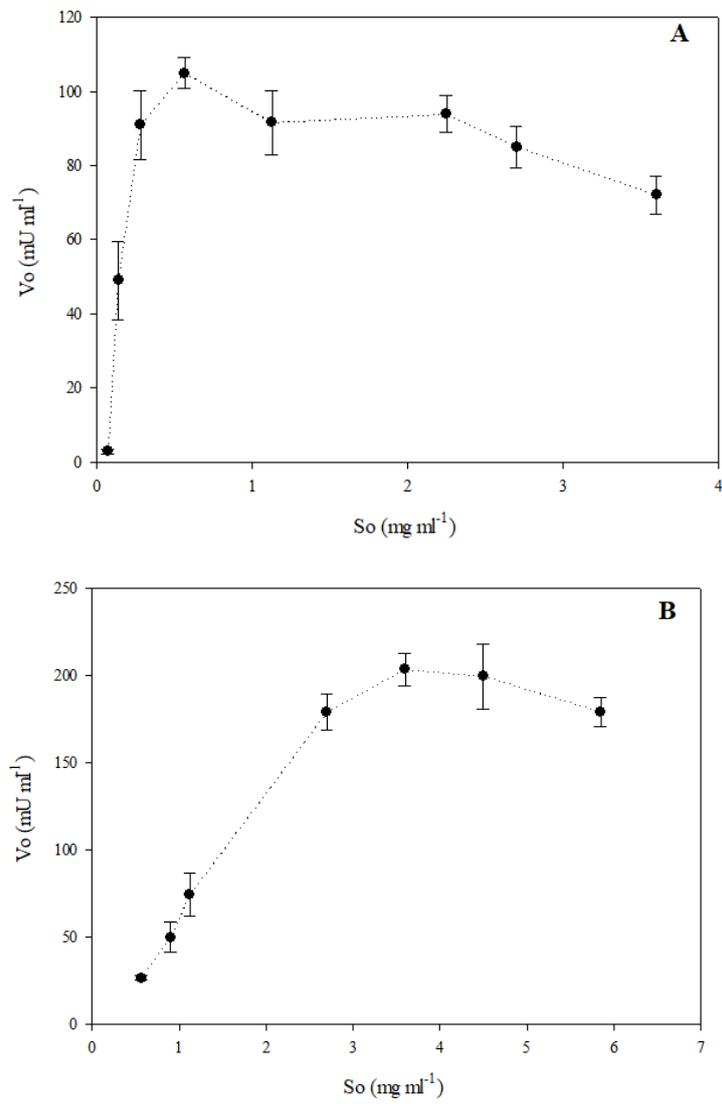


Figura 5.25 Gráfico de Michaelis-Menten para la poligalacturonasa I (A) y la poligalacturonasa II (B).

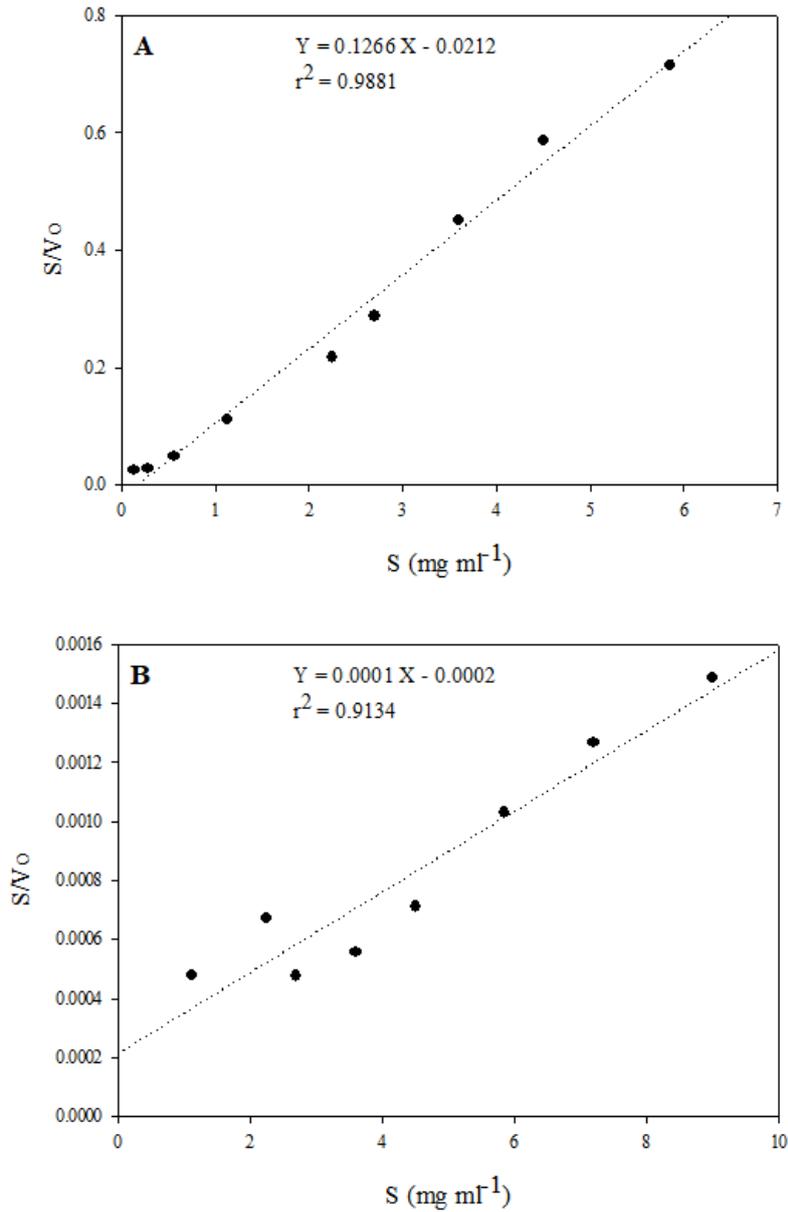


Figura 5.26 Linealización de Hanes-Hultin para el cálculo de los parámetros cinéticos de la poligalacturonasa I (A) y la poligalacturonasa II (B).

El número de recambio (k_{cat}) y la constante de especificidad (k_{cat}/k_m) de la PGasa I estudiada fueron 480 s^{-1} y $2824 \text{ ml mg}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente (Tabla 5.16). Estos valores resultan altos en comparación con los obtenidos a partir de otras PGasas (Tabla 5.16).

Tabla 5.16 Constante catalítica y constante de especificidad de las poligalacturonasa I estudiada, en comparación con otros trabajos

Microorganismo	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($ml\ mg^{-1}\ s^{-1}$)	Referencia
<i>Mrakia</i> sp., PGasal	480	2824	<i>Este trabajo</i>
<i>A. niger</i>	194	84	Anand, <i>et al.</i> (2017)
<i>A. sojae</i>	7.5	56	Fratebianchi de la Parra (2017)
<i>K. marxianus</i>	1.83	61	Serrat, <i>et al.</i> (2002)
<i>Trichoderma harzianum</i>	595	174	Mohamed, <i>et al.</i> (2006)

Especificidad de sustrato

Se estudió la actividad frente a distintos sustratos pectinolíticos: PGA y pectinas con diferente grado de esterificación, ramnogalacturonano y arabinogalactano, y los resultados se muestran en la Tabla 5.17.

Tabla 5.17 Actividad de las poligalacturonas estudiadas de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 frente a distintos sustratos. Cada determinación se realizó por triplicado. ND: no detectado

Sustrato	Grado de esterificación	Actividad Relativa (%)	
		PGasal	PGasaII
PGA Sigma #p-3850	0	100.0 ± 4.9	100.0 ± 3.8
Pectina Sigma #9311 de cítricos	20-35%	116.5 ± 6.1	29.6 ± 6.1
Pectina Sigma #8471 de manzana	50%	65.8 ± 5.4	24.8 ± 4.3
Pectina Sigma #9135 de cítricos	63%	78.6 ± 8.7	32.6 ± 1.8
Ramnogalacturonano (Megazyme)	-	ND	ND
Arabinogalactano Sigma #A-9029	-	ND	ND

La PGasaI fue muy activa sobre otras pectinas, relativo a la actividad sobre PGA. De hecho, hasta presentó cerca de un 79% de actividad frente a pectina de cítrico con un grado de esterificación del 63%. Por su lado, el sustrato preferido de la PGasaII fue indudablemente el PGA, contra el que exhibió la mayor actividad catalítica. Sin embargo, también fue (en comparación) cerca de un 30% activa frente a pectinas de distinto grado de esterificación ensayadas. Este comportamiento es el esperado para las PGasas microbianas: la PGasa de *A. sojae* fue menos del 50% activa frente sustratos esterificados en relación a su sustrato predilecto, el PGA (Fratebianchi de la Parra 2017). Es común encontrar PGasas microbianas con preferencia por sustratos más bien no esterificados (como el PGA) o con bajos porcentajes de esterificación (Fratebianchi de la Parra 2017; Martins, *et al.* 2007; Serrat, *et al.* 2002). Teniendo esto en cuenta, podría decirse que la PGasaI estudiada es de amplio espectro en cuanto a pectinas con diferente grado de esterificación.

Modo de acción

Los productos de la reacción de hidrólisis del PGA con la PGasaI y la PGasaII fueron analizados mediante cromatografía de capa fina (Figura 5.27). En el caso de la PGasaI, se observó que luego de un tiempo considerable de reacción, y con 40% de hidrólisis del sustrato, los productos mayoritarios de la degradación fueron los ácidos di y tri-galacturónicos, sugiriendo el carácter *endo* de la enzima, la cual posee por definición un patrón de corte al azar. Este tipo de enzimas son las más utilizadas en la industria. La reacción de la PGasaII se estabilizó con menos de un 10% de hidrólisis del sustrato. En este caso, el CCD no demostró productos de reacción de tamaño “pequeño”, como ácidos tri-galacturónico, di-galacturónico, o GALA. El CCD fue realizado por segunda vez, esta vez corriendo dos veces la placa con la fase móvil (la placa fue secada una vez

finalizada la corrida, y luego vuelta a correr), para evaluar si se observaba mejor definición de los productos de reacción. En la Figura 5.27 se ve que (en ambos CCD realizados para la PGasaII) esta enzima produce oligómeros de pectina largos, evidenciado porque únicamente se observa un chorreado inicial de oligómeros de alto peso molecular. Al no observarse GALA, se sugiere que también se trata de una PGasa del tipo *endo*, tal como la PGasaI.

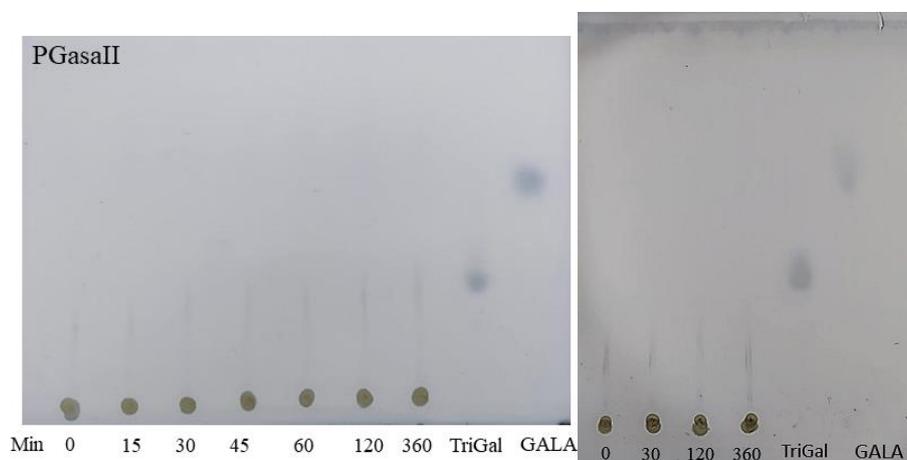
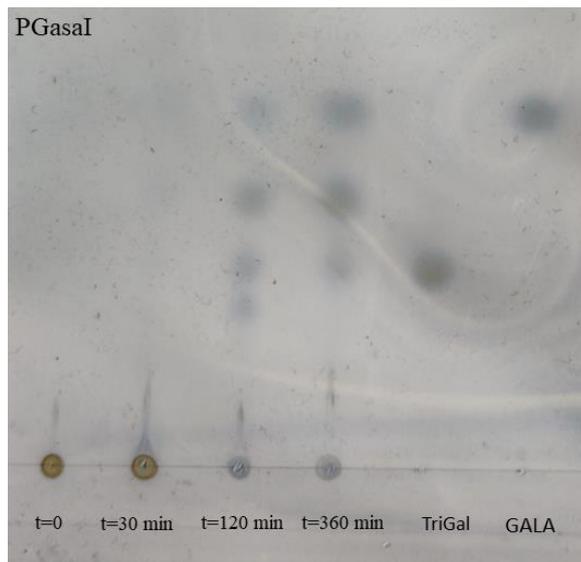
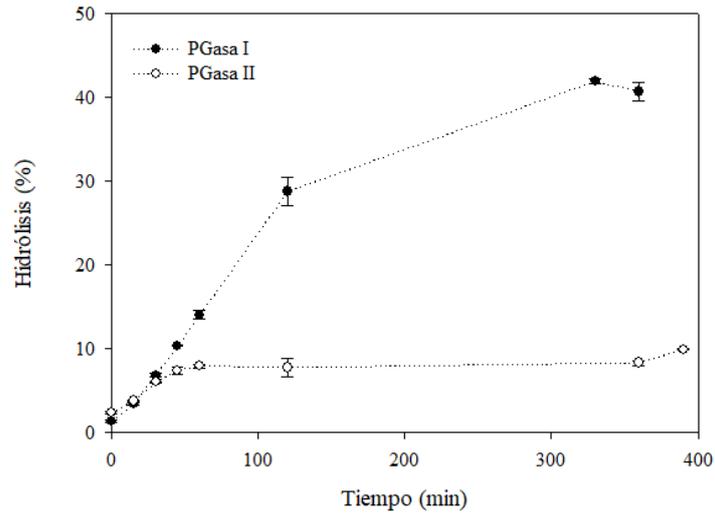


Figura 5.26 Porcentaje de hidrólisis del PGA en función del tiempo (arriba) y cromatografía de capa fina con los productos de reacción de la PGasaI y PGasaII. El CCD de los productos de reacción de la PGasaII se realizó una segunda vez, realizando la corrida dos veces para evaluar si se lograba una mejor definición de los productos de reacción.

CONCLUSIONES DE ESTE CAPÍTULO

◆ Utilizando técnicas clásicas de purificación se lograron separar las enzimas producidas en el capítulo anterior. Se purificó a homogeneidad una enzima y dos de manera parcial a partir del mismo extracto enzimático producido por la levadura antártica *Mrakia* sp. LP 7.1.2016.

◆ La BGLasa fue purificada hasta homogeneidad evaluada mediante SDS-PAGE, con dos subunidades y un peso molecular estimado de 148 kDa. Se separaron dos PGasas, una de bajo peso molecular (PGasaI, 33 kDa) y otra de peso molecular mayor (PGasaII, ~100 kDa).

◆ Las características de las enzimas muestran que son activas a temperaturas medias, aunque las temperaturas óptimas resultan altas, teniendo en cuenta que proceden de un microorganismo psicrófilo y en comparación con la información bibliográfica disponible de enzimas activas en frío.

◆ La actividad y la estabilidad al pH por parte de la BGLasa es buena en comparación con otras BGLasas reportadas, con lo cual se plantea su posible utilización para liberar aromas en vinos en el Capítulo 6.

◆ Las PGasas demostraron diferencias en sus propiedades bioquímicas, especialmente en lo que temperatura óptima de reacción y estabilidad térmica se refiere. Ambas poseen una buena estabilidad en un amplio rango de pH, por lo que podrían ser utilizadas en procesos alimenticios como la clarificación de jugos, obtención de pectina o maceración de vegetales. Ambas PGasas demostraron poseer un modo de acción del tipo *endo*, por lo que podrían ser útiles en este tipo de aplicaciones.

◆ Con los estudios realizados en este capítulo se contribuye significativamente al conocimiento de las propiedades bioquímicas de enzimas provenientes de levaduras adaptadas al frío.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, F., MINEGISHI, H., MIURA, T., NAGAHAMA, T., USAMI, R. & HORIKOSHI, K. 2006. Characterization of cold- and high-pressure-active polygalacturonases from a deep-sea yeast, *Cryptococcus liquefaciens* strain N6. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70, <http://doi.org/10.1271/bbb.70.296>.
- AHMED, A., ASLAM, M., ASHRAF, M., NASIM, F. U.-H., BATOOL, K. & BIBI, A. 2017a. Microbial β -glucosidases: screening, characterization, cloning and applications. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 5, <http://doi.org/10.12691/JAEM-5-2-2>.
- AHMED, A., NASIM, F. U.-H., BATOOL, K. & BIBI, A. 2017b. Microbial β -Glucosidase: sources, production and applications. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 5, <http://doi.org/10.12691/jaem-5-1-4>.
- AHMED, S., EL-SHAYEB, N., HASHEM, A., SALEH, S. & ABDEL-FATTAH, A. 2013. Biochemical studies on immobilized fungal β -glucosidase. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 30, <http://doi.org/10.1590/S0104-66322013000400007>.
- ALMULAIKY, Y. Q., ALBISHRI, A. A., KHALIL, N., ALGAMAL, Y., ALDHAHRI, M., AL-HARBI, S. A., AL-TALHI, H. A. & ALHADI, R. 2020. Polygalacturonase by *Aspergillus niger* using seaweed waste under submerged fermentation: production, purification and characterization. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 25, <http://doi.org/10.26717/BJSTR.2020.25.004249>.
- ALQAHTANI, Y. S., MORE, S. S., R, K., SHAIKH, I. A., K, J. A., MORE, V. S., NIYONZIMA, F. N., MUDDAPUR, U. M. & KHAN, A. A. 2022. Production and purification of pectinase from *Bacillus subtilis* 15A-B92 and its biotechnological applications. *Molecules*, 27, <http://doi.org/10.3390/molecules27134195>.
- AMIN, F., BHATTI, H. N., BILAL, M. & ASGHER, M. 2017a. Improvement of activity, thermostability and fruit juice clarification characteristics of fungal exo-polygalacturonase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.086>.
- AMIN, F., BHATTI, H. N., BILAL, M. & ASGHER, M. 2017b. Purification, kinetic, and thermodynamic characteristics of an exo-polygalacturonase from *Penicillium notatum* with industrial perspective. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 183, <http://doi.org/10.1007/s12010-017-2455-y>.
- ANAND, G., YADAV, S. & YADAV, D. 2017. Production, purification and biochemical characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 478 suitable for clarification of orange juice. *3 Biotech*, 7, <http://doi.org/10.1007/s13205-017-0760-3>.
- BAFFI, M. A., MARTIN, N., TOBAL, T. M., FERRAREZI, A. L., LAGO, J. H. G., BOSCOLO, M., GOMES, E. & DA-SILVA, R. 2013. Purification and characterization of an ethanol-tolerant β -Glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus* and its potential for hydrolysis of wine aroma precursors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171, <http://doi.org/10.1007/s12010-013-0471-0>.

- BAI, H., WANG, H., SUN, J., IRFAN, M., HAN, M., HUANG, Y., HAN, X. & YANG, Q. 2013. Production, purification and characterization of novel beta glucosidase from newly isolated *Penicillium simplicissimum* H-11 in submerged fermentation. *EXCLI journal*, 12,
- BELANCIC, A., GUNATA, Z., VALLIER, M. J. & AGOSIN, E. 2003. Beta-glucosidase from the grape native yeast *Debaryomyces vanriijiae*: purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a Muscat grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, <http://doi.org/10.1021/jf0257771>.
- BEZUS, B., ESQUIVEL, J. C. C., CAVALITTO, S. & CAVELLO, I. 2022. Pectin extraction from lime pomace by cold-active polygalacturonase-assisted method. *International Journal of Biological Macromolecules*, 209, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.019>.
- BHATTI, H., BATOOL, S. & AFZAL, N. 2013. Production and characterization of a novel β -glucosidase from *Fusarium solani*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 15,
- BIRGISSON, H., DELGADO, O., GARCÍA ARROYO, L., HATTI-KAUL, R. & MATTIASSON, B. 2003. Cold-adapted yeasts as producers of cold-active polygalacturonases. *Extremophiles*, 7, <http://doi.org/10.1007/s00792-002-0310-7>.
- BONFÁ, E. C., DE SOUZA MORETTI, M. M., GOMES, E. & BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. 2018. Biochemical characterization of an isolated 50 kDa beta-glucosidase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* M.7.7. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.008>.
- BOUDABBOUS, M., BEN HMAD, I., SAIBI, W., MSSAWRA, M., BELGHITH, H. & GARGOURI, A. 2017. Trans-glycosylation capacity of a highly glycosylated multi-specific β -glucosidase from *Fusarium solani*. *Bioprocess and biosystems engineering*, 40, <http://doi.org/10.1007/s00449-016-1721-7>.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- K. Buchholz, V. Kasche and U. T. Bornscheuer eds. 2012. *Book Biocatalysts and enzyme technology*. John Wiley & Sons, pp. 431,
- CAVELLO, I. 2013. Queratinasas microbianas: microorganismos, producción y caracterización. Universidad Nacional de La Plata. Departamento de Química, ^La Plata^, 339 pp.
- CHEN, S., HONG, Y., SHAO, Z. & LIU, Z. 2010. A cold-active β -glucosidase (Bgl1C) from a sea bacteria *Exiguobacterium oxidotolerans* A011. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, <http://doi.org/10.1007/s11274-010-0317-7>.
- CRUICKSHANK, R. H. & WADE, G. C. 1980. Detection of pectic enzymes in pectin-acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 107, [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90508-4](http://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90508-4).
- DAROIT, D. J., SIMONETTI, A., HERTZ, P. F. & BRANDELLI, A. 2008. Purification and characterization of an extracellular beta-glucosidase from *Monascus purpureus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18,
- DAS, A., PAUL, T., GHOSH, P., HALDER, S., DAS MOHAPATRA, P., PATI, B. & MONDAL, K. 2015. Kinetic study of a glucose tolerant b-glucosidase from *Aspergillus fumigatus* ABK9

- entrapped into alginate beads. *Waste and Biomass Valorization*, 6, <http://doi.org/10.1007/s12649-014-9329-0>.
- DE LIMA DAMÁSIO, A. R., DA SILVA, T. M., MALLER, A., JORGE, J. A., TEREZI, H. F. & POLIZELI, M. D. L. T. D. M. 2010. Purification and partial characterization of an exopolygalacturonase from *Paecilomyces variotii* liquid cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160, <http://doi.org/10.1007/s12010-009-8682-0>.
- DE OVALLE, S., BRENA, B., FARIÑA, L. & GONZÁLEZ POMBO, P. 2016. Novel beta-glucosidase from *Issatchenkia orientalis*: characterization and assessment for hydrolysis of muscat wine glycosides. *Global Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4,
- DE OVALLE, S., CAVELLO, I., BRENA, B. M., CAVALITTO, S. & GONZÁLEZ-POMBO, P. 2018. Production and characterization of a β -glucosidase from *Issatchenkia terricola* and its use for hydrolysis of aromatic precursors in Cabernet Sauvignon wine. *Food Science and Technology*, 87, <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.026>.
- DEKKER, R. F. 1986. Kinetic, inhibition, and stability properties of a commercial beta-D-glucosidase (cellobiase) preparation from *Aspergillus niger* and its suitability in the hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 28, <http://doi.org/10.1002/bit.260280918>.
- DYBALLA-RUKES, N. & METZGER, S. 2009. Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *JoVE*, 3, <http://doi.org/10.3791/1431>.
- EL-GHONEMY, D. H. 2021. Optimization of extracellular ethanol-tolerant β -glucosidase production from a newly isolated *Aspergillus* sp. DHE7 via solid state fermentation using jojoba meal as substrate: purification and biochemical characterization for biofuel preparation. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19, <http://doi.org/10.1186/s43141-021-00144-z>.
- ESQUIVEL, J. C. & VOGET, C. E. 2004. Purification and partial characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. *Journal of Biotechnology*, 110, <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.01.010>.
- FAN, T., JING, S., ZHANG, H., YANG, X., JIN, G. & TAO, Y. 2022. Localization, purification, and characterization of a novel β -glucosidase from *Hanseniaspora uvarum* Yun268. 87, <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16068>.
- FRATEBIANCHI DE LA PARRA, D. 2017. Tesis Doctoral. Estudio de la producción de poligalacturonasas de *Aspergillus sojae*: producción, caracterización y aplicación en procesos de vinificación. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Química, ^La Plata^, 197 pp.
- FREER, S. N. 1993. Kinetic characterization of a beta-glucosidase from a yeast, *Candida wickerhamii*. *J Biol Chem*, 268, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)98355-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)98355-9).
- GAO, P., SAM, F. E., ZHANG, B., PENG, S., LI, M. & WANG, J. 2022. Enzymatic characterization of purified β -glucosidase from non-*Saccharomyces* yeasts and application on chardonnay aging. *Foods*, 11, <http://doi.org/10.3390/foods11060852>.

- GOMES, J., ZENI, J., CENCE, K., TONIAZZO, G., TREICHEL, H. & VALDUGA, E. 2011. Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC 9642. *Food and Bioproducts Processing*, 89, <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.10.002>.
- GONZÁLEZ-POMBO, P., FARIÑA, L., CARRAU, F., BATISTA-VIERA, F. & BRENA, B. M. 2011. A novel extracellular β -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. *Process Biochemistry*, 46, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.016>.
- GONZÁLEZ-POMBO, P., PÉREZ, G., CARRAU, F., GUISÁN, J. M., BATISTA-VIERA, F. & BRENA, B. M. 2008. One-step purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*. *Biotechnology Letters*, 30, <http://doi.org/10.1007/s10529-008-9708-3>.
- M. Grasselli eds. 2015. *Book Proteínas puras. Entre el laboratorio y la industria*. Universidad Nacional de Quilmes, **Bernal, Argentina**, pp. 276,
- GUEGUEN, Y., CHEMARDIN, P. & ARNAUD, A. 2001. Purification and characterization of an intracellular beta-glucosidase from a *Candida sake* strain isolated from fruit juices. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 95, <http://doi.org/10.1385/abab:95:3:151>.
- HUANG, C., FENG, Y., PATEL, G., XU, X.-Q., QIAN, J., LIU, Q. & KAI, G.-Y. 2021. Production, immobilization and characterization of beta-glucosidase for application in cellulose degradation from a novel *Aspergillus versicolor*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 177, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.154>.
- HULTIN, E. 1967. Statistical calculations of the accuracy of the Michaelis constant from viscosimetric determinations of polymetaphosphatase and dextranase activity. *Acta Chemica Scandinava*, 21,
- JACOB, N., ASHA POORNA, C. & PREMA, P. 2008. Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. *Bioresource Technology*, 99, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.002>.
- JAVED, M. R., RASHID, M. H., NADEEM, H., RIAZ, M. & PERVEEN, R. 2009. Catalytic and thermodynamic characterization of endoglucanase (CMCase) from *Aspergillus oryzae* cmc-1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157, <http://doi.org/10.1007/s12010-008-8331-z>.
- JAYANI, R. S., SAXENA, S. & GUPTA, R. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 40, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.026>.
- KANT, S., VOHRA, A. & GUPTA, R. J. E. R. 2013. Purification and physicochemical properties of polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 3323. *Protein Expression and Purification*, 87, <http://doi.org/10.1016/j.pep.2012.09.014>.
- KAUR, A. & CHADHA, B. J. A. B. 2015. *Penicillium janthinellum*: a source of efficient and high levels of β -glucosidase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175, <http://doi.org/10.1007/s12010-014-1330-3>.
- KETUDAT CAIRNS, J. R. & ESEN, A. 2010. β -Glucosidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, <http://doi.org/10.1007/s00018-010-0399-2>.

- KOLEVA, L., PISHTIYSKI, I. & PAVLOVA, K. 2006. Purification and properties of extracellular β -glucosidase from the Antarctic yeast strain *Cryptococcus albidus* AL₃. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 12,
- KOROTKOVA, O. G., SEMENOVA, M. V., MOROZOVA, V. V., ZOROV, I. N., SOKOLOVA, L. M., BUBNOVA, T. M., OKUNEV, O. N. & SINITSYN, A. P. 2009. Isolation and properties of fungal beta-glucosidases. *Biochemistry (Mosc)*, 74, <http://doi.org/10.1134/s0006297909050137>.
- KUMAR, D., RAMESH, B., SUBRAMANYAM, R. & OBULAM, V. S. 2014. Low temperature active pectinases production by *Saccharomyces cerevisiae* isolate and their characterization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, <http://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.09.008>.
- KWON, K.-S., LEE, J., KANG, H. G. & HAH, Y. C. 1994. Detection of beta-glucosidase activity in polyacrylamide gels with esculin as substrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, <http://doi.org/10.1128/AEM.60.12.4584-4586.1994>.
- LABROU, N. E. 2014. Protein purification: an overview. *Methods in Molecular Biology (Clifton N.J.)*, http://doi.org/10.1007/978-1-62703-977-2_1.
- LADEIRA ÁZAR, R. I. S., DA LUZ MORALES, M., PICCOLO MAITAN-ALFENAS, G., FALKOSKI, D. L., FERREIRA ALFENAS, R. & GUIMARÃES, V. M. 2020. Apple juice clarification by a purified polygalacturonase from *Calonectria pteridis*. *Food and Bioproducts Processing*, 119, <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.11.013>.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, <http://doi.org/10.1038/227680a0>.
- MA, Y., SUN, S., HAO, H. & XU, C. 2016. Production, purification and characterization of an exopolygalacturonase from *Penicillium janthinellum* sw09. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88 Suppl 1, <http://doi.org/10.1590/0001-3765201620150051>.
- MARGESIN, R., FAUSTER, V. & FONTEYNE, P. A. 2005. Characterization of cold-active pectate lyases from psychrophilic *Mrakia frigida*. *Letters in Applied Microbiology*, 40, <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01704.x>.
- MARTINS, E. S., SILVA, D., LEITE, R. S. & GOMES, E. 2007. Purification and characterization of polygalacturonase produced by thermophilic *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 in submerged fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91, <http://doi.org/10.1007/s10482-006-9114-6>.
- MARTOS, M. A., BUTIUK, A. P., ROJAS, N. L. & HOURS, R. A. 2014. Purification and characterization of a polygalacturonase produced by *Wickerhamomyces anomalus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57, <http://doi.org/10.1590/S1982-88372014000100017>.
- MÉNDEZ-LÍTER, J. A., NIETO-DOMÍNGUEZ, M., DE TORO, B. F., SANTANA, A. G., PRIETO, A., ASENSIO, J. L., DE EUGENIO, L. I. & MARTINEZ, M. J. 2020. A glucotolerant b-glucosidase from the fungus *Talaromyces amestolkiae* and its conversion into a glycosynthase for glycosylation of phenolic compounds. *Microbial Cell Factories*, <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01386-1>.
- MOHAMED, S. A., FARID, N. M., HOSSINY, E. N. & BASSUINY, R. I. 2006. Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum*. *Journal of Biotechnology*, 127, <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.06.009>.

- MONTEIRO, L. M. O., VICI, A. C., PINHEIRO, M. P., HEINEN, P. R., DE OLIVEIRA, A. H. C., WARD, R. J., PRADE, R. A., BUCKERIDGE, M. S. & POLIZELI, M. D. L. T. D. M. 2020. A highly glucose tolerant β -glucosidase from *Malbranchea pulchella* (MpBg3) enables cellulose saccharification. *Scientific Reports*, 10, <http://doi.org/10.1038/s41598-020-63972-y>.
- MUGA, A., ARRONDO, J. L. R., BELLON, T., SANCHO, J. & BERNABEU, C. J. A. O. B. 1993. Structural and functional studies on the interaction of sodium dodecyl sulfate with β -galactosidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300, <http://doi.org/10.1006/abbi.1993.1061>.
- NAGAI, M., KATSURAGI, T., TERASHITA, T., YOSHIKAWA, K. & SAKAI, T. 2000. Purification and characterization of an endo-polygalacturonase from *Aspergillus awamori*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64, <http://doi.org/10.1271/bbb.64.1729>.
- NAKAGAWA, T., NAGAOKA, T., MIYAJI, T. & TOMIZUKA, N. 2005. Cold-active polygalacturonase from psychrophilic-basidiomycetous yeast *Cystofilobasidium capitatum* strain PPY-1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69, <http://doi.org/10.1271/bbb.69.419>.
- NAM, K. H., SUNG, M. W. & HWANG, K. Y. 2010. Structural insights into the substrate recognition properties of beta-glucosidase. *Biochem Biophys Res Commun*, 391, <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.038>.
- NARASIMHA, G., SRIDEVI, A., RAMANJANEYULU, G. & RAJASEKHAR REDDY, B. 2016. Purification and characterization of β -glucosidase from *Aspergillus niger*. *International Journal of Food Properties*, 19, <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1023398>.
- OSKAY, M. 2022. Production, partial purification, and characterization of polygalacturonase from *Aureobasidium pullulans* P56 under submerged fermentation using agro-industrial wastes. *Current Microbiology*, 79, <http://doi.org/10.1007/s00284-022-02991-6>.
- PARK, D.-J., LEE, Y.-S. & CHOI, Y.-L. 2013. Characterization of a cold-active β -Glucosidase from *Paenibacillus xylanilyticus* KJ-03 capable of hydrolyzing isoflavones daidzin and genistin. *The Protein Journal*, 32, <http://doi.org/10.1007/s10930-013-9520-3>.
- PATIDAR, M. K., NIGHOJKAR, A., NIGHOJKAR, S. & KUMAR, A. 2017. Purification and characterization of polygalacturonase produced by *Aspergillus niger* AN07 in solid state fermentation. *Canadian Journal of Biotechnology*, 1, <http://doi.org/10.24870/cjb.2017-000102>.
- QUIROGA, E. N., SGARIGLIA, M. A., MOLINA, C. F., SAMPIETRO, D. A., SOBERÓN, J. R. & VATTUONE, M. A. 2009. Purification and characterization of an exo-polygalacturonase from *Pycnoporus sanguineus*. *Mycological Research*, 113, <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.09.007>.
- RAMANI, G., MEERA, B., VANITHA, C., RAO, M. & GUNASEKARAN, P. 2012. Production, purification, and characterization of a β -glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167, <http://doi.org/10.1007/s12010-012-9645-4>.
- ROTH, W. W. & SRINIVASAN, V. R. 1978. Affinity chromatographic purification of β -glucosidase of *Candida Guilliermondii*. *Preparative Biochemistry*, 8, <http://doi.org/10.1080/00327487808068218>.

- SAHA, B. C. & BOTHAST, R. J. 1996. Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel beta-glucosidase from *Candida peltata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, <http://doi.org/10.1128/AEM.62.9.3165-3170.1996>.
- SAHA, B. C., FREER, S. N. & BOTHAST, R. J. 1994. Production, purification, and properties of a thermostable β -glucosidase from a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, <http://doi.org/10.1128/AEM.60.10.3774-3780.1994>.
- SAHAY, S., HAMID, B., SINGH, P., RANJAN, K., CHAUHAN, D., RANA, R. S. & CHAURSE, V. K. 2013. Evaluation of pectinolytic activities for oenological uses from psychrotrophic yeasts. *Letters in Applied Microbiology*, 57, <http://doi.org/10.1111/lam.12081>.
- SERRAT, M., BERMÚDEZ, R. & VILLA, T. 2002. Production, purification, and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing wastewater. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 97, <http://doi.org/10.1385/ABAB:97:3:193>.
- SINGH, G., VERMA, A. K. & KUMAR, V. 2016. Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases. *3 Biotech*, 6, <http://doi.org/10.1007/s13205-015-0328-z>.
- SINGHANIA, R. R., PATEL, A. K., SUKUMARAN, R. K., LARROCHE, C. & PANDEY, A. 2013. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 127, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.012>.
- SMAALI, I., MAUGARD, T., LIMAM, F., LEGOY, M.-D. & MARZOUKI, N. 2007. Efficient synthesis of gluco-oligosaccharides and alkyl-glucosides by transglycosylation activity of β -glucosidase from *Sclerotinia sclerotiorum*. *World journal of microbiology & biotechnology*, 23, <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9185-6>.
- STEINWEG, J. M., JAGADAMMA, S., FRERICHS, J. & MAYES, M. A. 2013. Activation energy of extracellular enzymes in soils from different biomes. *PLoS One*, 8, <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0059943>.
- SWANGKEAW, J., VICHITPHAN, S., BUTZKE, C. & VICHITPHAN, K. 2009. The characterisation of a novel *Pichia anomala* β -glucosidase with potentially aroma-enhancing capabilities in wine. *Annals of Microbiology*, 59, <http://doi.org/10.1007/BF03178336>.
- TAM, S. Y. T. 1983. A new calculation method for distinguishing endo- from exopolygalacturonases. *Journal of Food Science*, 48, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb10782.x>.
- THAKUR, A., PAHWA, R., SINGH, S. & GUPTA, R. 2010. Production, purification, and characterization of polygalacturonase from *Mucor circinelloides* ITCC 6025. *Journal of Enzyme Research*, 2010, <https://doi.org/10.4061/2010/170549>.
- TRINDER, P. 1969. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *Journal of clinical pathology*, 22, <http://doi.org/10.1136/jcp.22.2.158>.
- TURAN, Y. & ZHENG, M. 2005. Purification and characterization of an intracellular beta-glucosidase from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry (Moscow)*, 70, <http://doi.org/10.1007/s10541-005-0270-5>.

- WALLECHA, A. & MISHRA, S. 2003. Purification and characterization of two beta-glucosidases from a thermo-tolerant yeast *Pichia etchellsii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1649, [http://doi.org/10.1016/s1570-9639\(03\)00163-8](http://doi.org/10.1016/s1570-9639(03)00163-8).
- WALSH, G. 2015. Protein purification and characterization. In G. Walsh eds. *Proteins: Biochemistry and Biotechnology*. Wiley Online Library, Ireland, 91-140 <http://doi.org/10.1002/9781119117599.ch4>.
- WANAPU, C., SRIPUNYA, P. & BOONKERD, N. 2012. Selection of yeast strains containing β -glucosidase for improving wine aroma. *Journal of Agricultural Science and Technology B*, 2,
- XIA, X. 2007. Protein isoelectric point. In X. Xia eds. *Bioinformatics and the Cell: Modern Computational Approaches in Genomics, Proteomics and Transcriptomics*. Springer, 207-219
- ZHANG, P., ZHANG, R., SIRISENA, S., GAN, R. & FANG, Z. 2021. Beta-glucosidase activity of wine yeasts and its impacts on wine volatiles and phenolics: A mini-review. *Food Microbiology*, 100, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103859>.
- ZHOU, J., ZHANG, R., SHI, P., HUANG, H., MENG, K., YUAN, T., YANG, P. & YAO, B. 2011. A novel low-temperature-active β -glucosidase from symbiotic *Serratia* sp. TN49 reveals four essential positions for substrate accommodation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, <http://doi.org/10.1007/s00253-011-3323-2>.

CAPÍTULO 6

APLICACIÓN DE LA β -GLUCOSIDASA DE *MRAKIA* SP. LP 7.1.2016 EN LA LIBERACIÓN DE AROMAS EN VINOS

Resumen

Las β -glucosidasas catalizan la liberación de volátiles aromáticos a partir de sus precursores glucosídicos durante la producción de vinos. En este capítulo se evaluó la capacidad de la β -glucosidasa producida por *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 de aumentar la concentración de moléculas aromáticas en vino Moscatel rosado. Previo a la aplicación en vino, se evaluó la actividad de la enzima en presencia de diferentes compuestos enológicos: etanol, glucosa, metabisulfito (MBS) y otros azúcares presentes en el vino. La enzima demostró una buena actividad en presencia de etanol, MBS y fructosa. Sin embargo, fue fuertemente inhibida por glucosa, con una constante de inhibición K_i de 0.12 mM. Se evaluó la estabilidad de la enzima a pH enológico (3.0 y 4.0) durante 14 días, obteniéndose una alta estabilidad a pH 4.0 (100% de actividad luego de 14 días), tanto a 3 °C como a 20 °C. Por otro lado, a pH 3.0 la estabilidad de la enzima fue dependiente de la temperatura de incubación: a 20 °C la enzima tuvo una vida media de 4.2 horas, mientras que a 3 °C conservó un 60% de su actividad luego de 14 días.

La β -glucosidasa fue aplicada en un vino Moscatel rosado joven para evaluar su influencia de sobre precursores aromáticos presentes en el mismo. La misma se incubó con el vino (pH 4.0) a temperatura ambiente (~23 °C) durante 14 días. Los compuestos aromáticos presentes en la fase gaseosa en equilibrio con el vino fueron evaluados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), y comparados con

un control, incubado sin enzima. Se observaron diferencias significativas en el contenido de terpenos entre el control y el vino tratado: el contenido total de terpenos aumento cerca de ocho veces en el vino tratado. Las mayores diferencias se observaron en los monoterpenos nerol y geraniol, y en los óxidos de *trans* y *cis* linalool. La β -glucosidasa antártica producida por *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 podría tener aplicación en esta área.

INTRODUCCIÓN

Argentina es un país que ha crecido y evolucionado como resultado de una intensa mezcla de diferentes etnias y culturas, permitiendo desarrollar tradiciones propias y variaciones de las existentes en otros países. El proceso de elaboración del vino en nuestro país fue importado desde España tempranamente luego del descubrimiento de América por parte de los españoles, ya que representaba (y representa) una parte esencial en las prácticas católicas. La gran confluencia en nuestro país de inmigrantes españoles e italianos a lo largo de la historia incentivó el aumento de la producción de esta bebida, altamente solicitada. Si bien el consumo per cápita de vino viene en franca disminución desde hace ya algunos años (Instituto Nacional de vitivinicultura, [consumo per cápita](#)), éste se considera una parte muy importante de la cultura y la tradición de nuestro país, al punto de declararse oficialmente como la bebida nacional en el año 2013 ([Ley 26870/2013](#)).

Elaboración del vino

En el proceso de vinificación, la composición de la uva es un factor determinante en vistas de lograr una buena calidad del producto final. Sin embargo, muchas de las características de un buen vino, las cuales suelen formar parte de su tipicidad, no son detectadas en la uva. Esto se debe a que, durante la vinificación se desarrollan una red compleja de reacciones bioquímicas, catalizadas por enzimas, las cuales provienen tanto de las mismas uvas como de los microorganismos involucrados en el proceso (Ugliano 2009).

Cada etapa de la vinificación involucra la modificación bioquímica de diferentes constituyentes del vino, por parte de enzimas específicas, modificando y modelando las características organolépticas del vino (Ugliano 2009). Por lo tanto, comprender el rol de

cada tipo de enzima durante la vinificación puede ayudar a desarrollar estrategias racionales y efectivas a fin de poder optimizar el modelado de la composición y las propiedades sensoriales del vino.

La mayoría de las enzimas involucradas en las transformaciones que se dan durante la vinificación provienen de las mismas uvas y de levaduras del vino. Sin embargo, ciertas condiciones típicas de este proceso, como alta concentración de azúcar, bajo pH y alta concentración de polifenoles, puede potencialmente inhibir la actividad de estas enzimas (de Ovalle, *et al.* 2021; Ugliano 2009). Por este motivo, muchas veces estas reacciones se dan de forma incompleta, quedando en el medio una gran proporción de sustrato no transformado, disponible para contribuir a las propiedades sensoriales del vino. Muchas de estas reacciones contribuyen de forma benéfica a la calidad del vino, por lo que generalmente se adicionan durante el proceso enzimas exógenas, activas en las condiciones de vinificación, para obtener un mayor nivel de transformación de estos sustratos.

Las enzimas exógenas son un componente importante en la vinificación moderna. Principalmente durante la clarificación del mosto del vino, se utilizan varios preparados de enzimas exógenas que se encuentran disponibles comercialmente, y permiten la liberación de compuestos aromáticos a partir de sus precursores inodoros (Ugliano 2009).

Enzimas involucradas en los procesos de vinificación

Si bien la elaboración de vino es un proceso complejo, puede a grandes rasgos dividirse en cuatro etapas: el procesamiento pre-fermentativo, la fermentación alcohólica, el procesamiento post-fermentativo y el añejamiento (Fratebianchi de la Parra 2017). En la Figura 6.1 se muestran algunas de las enzimas que pueden agregarse de forma exógena

durante las diferentes etapas de elaboración del vino, y su correspondiente función (Ugliano 2009). Nos enfocaremos en la función/utilidad de las enzimas β -glucosidasas.

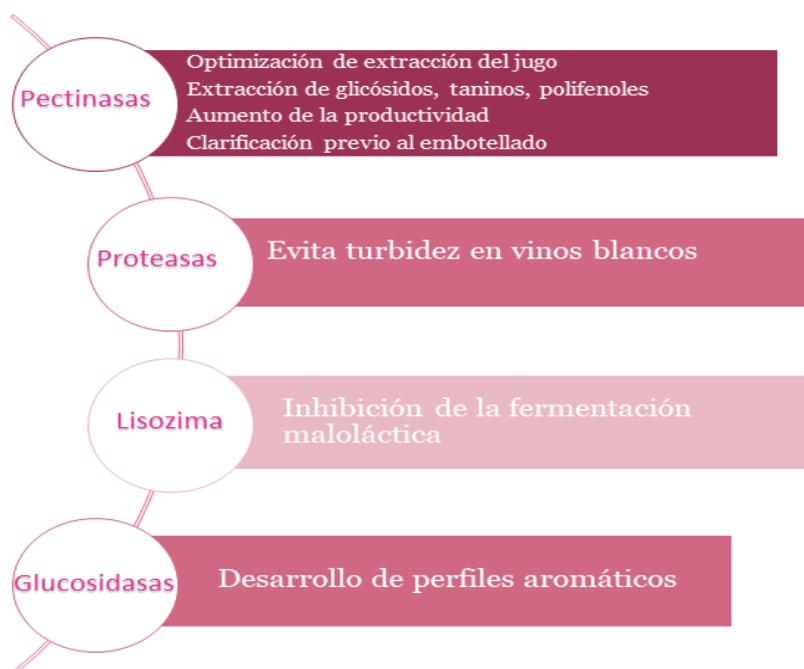


Figura 6.1 Enzimas exógenas que se suelen agregar al vino y sus funciones.

β -glucosidasas para la liberación de aromas en vinos

El aroma del vino es el resultado de una compleja red de interacciones entre los compuestos aromáticos presentes en su seno y la matriz en la que se encuentran. Es considerada una de las características más importantes en relación con la calidad del vino y la aceptación de los consumidores (Villamor & Ross 2013). Por lo tanto, desde hace ya algunos años se estudian sus propiedades sensoriales, así como las técnicas que permiten incrementarlas (Zhang, et al. 2011). Hoy en día es bien sabido que uno de los factores más importantes que afectan el aroma típico varietal de los vinos es la presencia de compuestos provenientes de la uva (Pogorzelski & Wilkowska 2007). Sin embargo, como ya se mencionó, la mayoría de los compuestos aromáticos en las uvas se encuentran presentes como precursores glucosídicos no volátiles, constituyendo una potencial

reserva de moléculas aromáticamente activas que pueden ser liberadas durante el proceso de producción, incrementando de esta manera la complejidad aromática del vino (Hernandez-Orte, *et al.* 2009).

Los glicósidos de compuestos no volátiles se encuentran por lo general en forma de O-D-glicósidos, o O-di-glicósidos, en los cuales la aglicona se encuentra unida a una unidad de glucosa, arabinosa, ramnosa o apiosa (Ugliano 2009). Esta aglicona, que se encuentra unida al azúcar, puede ser un compuesto aromático activo una vez liberado gracias a una secuencia de hidrólisis enzimáticas (de Ovalle, *et al.* 2021; Maicas & Mateo 2005; Padilla, *et al.* 2016). Algunas agliconas que se encuentran presentes en la uva de manera conjugada (no volátil) son: monoterpenos, norisoprenoides C13, alcoholes alifáticos, y derivados del benceno (Michlmayr, *et al.* 2012; Palmeri & Spagna 2007; Pogorzelski & Wilkowska 2007; Swiegers, *et al.* 2005) (Figura 6.2). Estos han sido frecuentemente relacionados con las propiedades sensoriales del vino (de Ovalle, *et al.* 2016).

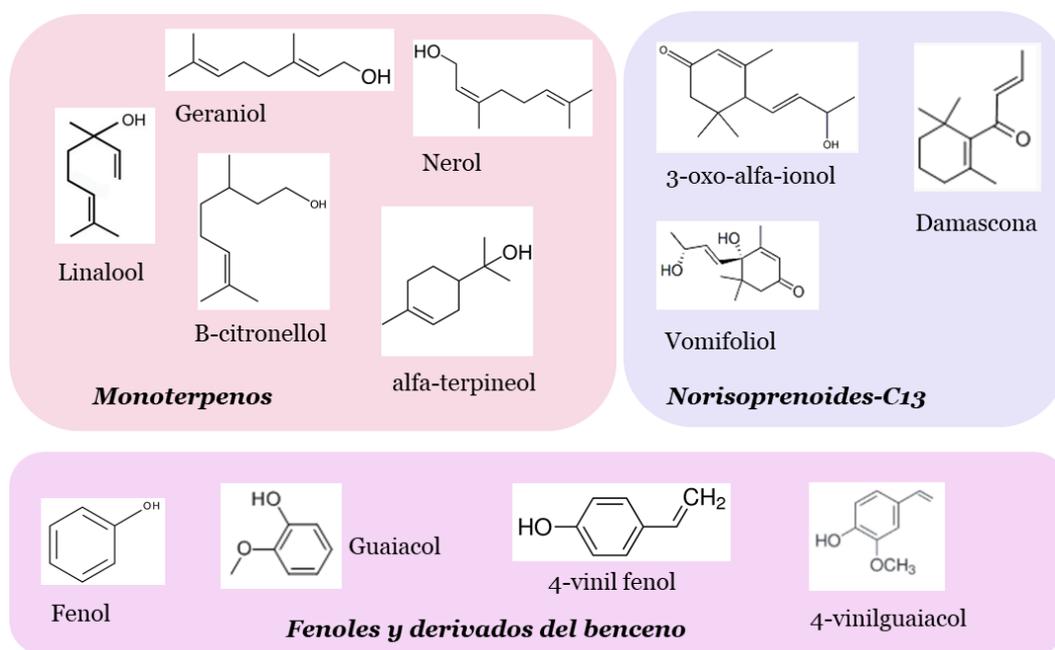


Figura 6.2 Algunos de los compuestos volátiles que contribuyen a los aromas varietales. Estructuras químicas obtenidas de www.chemwhat.es.

Las agliconas (grupo que está unido al glúcido, pero es ajeno a él) pueden ser liberadas tanto por hidrólisis ácida o por acción enzimática. La primera opción es sumamente lenta, por lo que se reserva para vinos de añejamiento (Ugliano 2009). En cuanto a la liberación por acción enzimática, se da gracias a enzimas glicosidasas, las cuales se suelen encontrar en las uvas, las levaduras fermentativas (*Saccharomyces*), las levaduras no fermentativas (no-*Saccharomyces*) o en preparados enzimáticos exógenos (Palmeri & Spagna 2007). Estas enzimas actúan sobre agliconas unidas a azúcares. Si ese azúcar es una glucosa, entonces hablaremos de enzimas glucosidasas.

Las levaduras que más contribuyen con glucosidasas durante la fermentación son las no-*Saccharomyces* (de Ovalle, *et al.* 2016; Ugliano 2009). Esto se debe a que las glucosidasas producidas por las levaduras fermentadoras no suelen ser estables a las condiciones de vinificación, por lo que no son las que más aportan a este tipo de modificaciones químicas del vino. Entre las enzimas involucradas en estas transformaciones, se ha demostrado que las β -glucosidasas provenientes de estas levaduras pueden impactar fuertemente en el desarrollo de aromas varietales, y contribuir a la tipicidad del vino (de Ovalle, *et al.* 2016). Sin embargo, debido a que las glucosidasas asociadas a las uvas y levaduras presentes naturalmente en el vino son limitadas, el agregado de enzimas exógenas es una práctica muy utilizada. De esta forma se logra incentivar la liberación de compuestos volátiles ligados a glucósidos, y su aplicación permite modular los aromas del vino, promoviendo la expresión de determinadas características sensoriales (Ugliano 2009). Para este propósito, frecuentemente se utilizan preparados enzimáticos comerciales provenientes de hongos, principalmente *Aspergillus niger*. Estos no se encuentran purificados, sino que se trata de cocteles enzimáticos, por lo que poseen actividades enzimáticas diversas (Maicas & Mateo 2005). Es sabido que estas preparaciones pueden promover reacciones colaterales que dañan la calidad del vino

y conducen a una pérdida de la tipicidad del mismo (Arévalo Villena, *et al.* 2005; Fia, *et al.* 2016).

De esta manera, en la búsqueda de alternativas al uso de preparaciones comerciales, varios estudios se han enfocado en el aislamiento y la caracterización de enzimas específicas desde distintas levaduras, aisladas principalmente desde la biodiversidad de ecosistemas vitivinícolas, así como en el estudio de la liberación de volátiles en distintos tipos de vino (Arévalo-Villena, *et al.* 2007; de Ovalle, *et al.* 2021; de Ovalle, *et al.* 2018; Michlmayr, *et al.* 2012; Romo-Sánchez, *et al.* 2014).

OBJETIVO GENERAL DE ESTE CAPÍTULO

Evaluar el potencial de la β -glucosidasa producida por *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 en la liberación de aromas en vinos.

Objetivos particulares

- ◆ Estudiar el comportamiento de la enzima frente a condiciones enológicas, como etanol, azúcares y metabisulfito.
- ◆ Estudiar su estabilidad en el tiempo a pH enológico (3.0-4.0).
- ◆ Estudiar el efecto de la aplicación de esta enzima en un vino Moscatel rosado joven, determinando la naturaleza de los volátiles presentes en el *headspace* o fase gaseosa del vino.
- ◆ Realizar una semi-cuantificación del efecto de la enzima en el vino mediante comparación de las señales obtenidas en los espectros de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), de los vinos control y tratado para cada uno de los compuestos detectados.

Los ensayos detallados en este capítulo se llevaron a cabo en la Cátedra de Bioquímica de la Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, bajo la supervisión de la Dra. Paula González-Pombo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Enzima

La enzima β -glucosidasa fue producida por la levadura *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 tal como se detalló en el Capítulo 4 y purificada como se detalló en el Capítulo 5. La enzima liofilizada fue resuspendida en agua para su utilización. La actividad β -glucosidasa se cuantificó como se detalló en el Capítulo 3, obteniéndose una preparación enzimática con 100 mU ml⁻¹.

Efecto del etanol en la actividad enzimática

El efecto del etanol (10-25% v v⁻¹) en la actividad enzimática fue evaluado agregando a la mezcla de reacción la concentración correspondiente de etanol, y realizando la medida de actividad enzimática según las condiciones estándar de ensayo, como se detalló en el Capítulo 3. La actividad residual fue calculada en comparación con la actividad obtenida por la enzima sin la presencia de etanol, y considerando este valor como el 100% de actividad.

Efecto de la glucosa, fructosa y sacarosa en la actividad enzimática

El efecto de la glucosa, fructosa y sacarosa (1-20% p v⁻¹) en la actividad enzimática fue evaluado agregando a la mezcla de reacción la concentración correspondiente de cada azúcar, y realizando la medida de actividad enzimática según las condiciones estándar de ensayo. La actividad residual fue calculada comparando con la actividad obtenida por la enzima sin la presencia de ninguno de los azúcares, y considerando este valor como el 100% de actividad.

Cálculo de la constante K_i de inhibición por glucosa

Para estudiar la inhibición de la reacción por glucosa se realizó la medición de la actividad enzimática en series manteniendo fija la concentración de pNPG en la reacción (0.10, 0.25, 0.50, 1.25 y 5.00 mM) y variando la concentración de glucosa (0-1.7 mM). La constante de inhibición, K_i , se calculó luego de realizar los gráficos de Dixon (Dixon 1953) con los datos obtenidos a partir de dos series diferentes (0.10 y 0.50 mM pNPG) de determinaciones de actividad enzimática utilizando distintas cantidades de glucosa. La ecuación que se utiliza para realizar los gráficos de Dixon tiene la siguiente forma:

$$\frac{1}{v_o} = (m I) + b : S_0 = \text{constante},$$

Donde I es la concentración del inhibidor, m la pendiente y b la ordenada al origen. El valor de K_i se determinó graficando los datos obtenidos a dos concentraciones de sustrato diferentes. La naturaleza de la inhibición puede determinarse mediante la gráfica de las distintas rectas: la intersección en el segundo cuadrante (abscisas negativas y ordenadas positivas) indica una inhibición competitiva. Si la intersección se da en el tercer cuadrante (abscisas y ordenadas negativas) la inhibición es no competitiva o mixta. Finalmente, ante la obtención de rectas paralelas se trata de una inhibición acompetitiva (Yoshino & Murakami 2009). Para las inhibiciones competitivas, no competitivas y mixtas, el punto de intersección entre las rectas graficadas corresponde a la constante de inhibición, K_i .

Efecto del metabisulfito en la actividad enzimática

El efecto del metabisulfito de potasio (MBS, 60.0 mg l⁻¹) en la actividad enzimática fue evaluado agregando a la mezcla de reacción el componente, y realizando la medida de actividad enzimática según las condiciones estándar de ensayo. La actividad residual

fue calculada comparando con la actividad obtenida por la enzima sin la presencia de MBS, y considerando este valor como el 100% de actividad.

Estabilidad de la enzima a pH enológico

La caracterización de la β -glucosidasa de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 evidenció un amplio rango de estabilidad al pH (Capítulo 5) luego de una hora de incubación. Para su utilización en vinos, es necesario extender el estudio a 14 días (tiempo de tratamiento), a los pH de elaboración del vino (entre 3.0 y 4.0). Para ello, se diluyó la enzima pura en BCP a pH 3.0 y 4.0. Se tomó una muestra inicial a tiempo 0, la cual fue considerada como la portadora del 100% de actividad para cada pH. La enzima se incubó en ensayos por duplicado a 20 °C y 4 °C durante 14 días. Se tomaron muestras durante el tiempo de incubación, las cuales fueron preservadas a -20°C hasta medición de la actividad enzimática según condiciones estándar de ensayo.

Aplicación de la β -glucosidasa en vino

Tratamiento enzimático del vino

Para este ensayo se utilizó un vino Moscatel rosado joven (Figura 6.3). Al ser joven, es el más adecuado para realizar este tipo de ensayo, ya que posee una mayor proporción de glicósidos conjugados. Se incubaron 40 ml de vino (ajustado con NaOH 1.0 M hasta pH 4.0) con 1 U l⁻¹ de enzima, en frascos de vidrio de color ámbar, a temperatura ambiente (~23 °C) con agitación suave, durante 14 días. Los controles negativos fueron incubados sin enzima exógena, agregando una cantidad equivalente de buffer que la agregada de enzima en los tratamientos. Luego de 14 días, se evaluó la naturaleza de los volátiles en el vino tratado y sin tratar. Cada tratamiento se realizó por duplicado.



Figura 6.3 Vino Moscatel rosado joven utilizado para los ensayos.

Micro-extracción en fase sólida mediante el método “headspace”, o en fase gaseosa

Para la extracción de compuestos aromáticos desde el vino tratamiento y control, un mililitro de la muestra se mezcló con una concentración saturante de NaCl, y se agregó 0.5 ml de agua destilada en un vial tapado con un septo de goma. Además, se adicionaron en cada caso 15 μ l de una solución de patrones estándar (300 ppm n-heptanol y 2-octanol en una solución hidroalcohólica 50%). Se agitó esta mezcla a 40 °C durante 15 minutos, con agitación magnética. Luego, una fibra DBV/CAR/PDMS (50/30 μ m, Stableflex, Supelco, Bellefonte, PA) fue expuesta en el *headspace*, o fase gaseosa durante 30 minutos, sin agitación de la fase líquida, pero aún a 40 °C, a fin de que la misma absorbiera los compuestos volátiles. La fibra fue pre-acondicionada según indicaciones del proveedor antes de la exposición. Luego de la extracción, la fibra fue desorbida en el *inlet* de un GC/GC-MS durante 1 minuto, a una temperatura de 260 °C (Michlmayr, *et al.* 2012).

Identificación de los compuestos aromáticos

Para la identificación de los volátiles aislados, se realizaron análisis en un equipo GC-MS en un espectrómetro de masas Shimadzu QP 5050, equipado con librerías de referencia (Adams 2001; de Ovalle, *et al.* 2018; McLafferty & Stauffer 1991) (Figura 6.4). La columna cromatográfica utilizada fue una CARBOWAX (25 m x 0.25 mm i.d.), y el programa utilizado fue: 60 °C (1 min), pendiente de 60 °C a 240 °C de a 3 °C min⁻¹ y luego 240 °C durante 1 min. La identificación de los compuestos fue confirmada comparando los índices de retención y los espectros de MS relevantes. Los resultados obtenidos fueron expresados como factor de respuesta relativo porcentual, en comparación con el área obtenida por el estándar n-heptanol. Los resultados se presentan como un promedio de dos determinaciones y su desviación estándar.



Figura 6.4 Fibra utilizada (dentro del porta-fibra) en su estuche (izquierda) y equipo de GC donde se inyectó la fibra DBV/CAR/PDMS para ser desorbida dentro del equipo luego de ser tratada para la absorción en el headspace (derecha).

Análisis estadístico

Se realizaron test LSD de ANOVA, y aquellas diferencias que obtuvieron un valor $p < 0.05$ fueron consideradas como significativas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Capítulo 4 se demostró que la levadura antártica *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 es capaz de producir una BGLasa activa a pH 4.0. Por otro lado, se evidenció que la enzima es altamente estable en condiciones moderadamente ácidas, tanto formando parte del extracto (Capítulo 4) como en su forma pura (Capítulo 5). Para poder ser aplicada en vino, una enzima debe ser activa a la temperatura de fermentación o estacionamiento del vino, y tolerar ciertas condiciones enológicas, como el bajo pH, y alta concentración de azúcares o etanol (dependiendo del momento de aplicación). Por ese motivo, se evaluó el efecto de estas condiciones enológicas en la actividad y estabilidad de la enzima.

Efecto del etanol en la actividad enzimática

En la Figura 6.5 se observa el efecto de distintas concentraciones de etanol en la actividad de la BGLasa producida por *Mrakia* sp. LP 7.1.2016. Se puede observar que este compuesto no afectó negativamente la actividad enzimática en el rango ensayado (5-25 v v⁻¹).

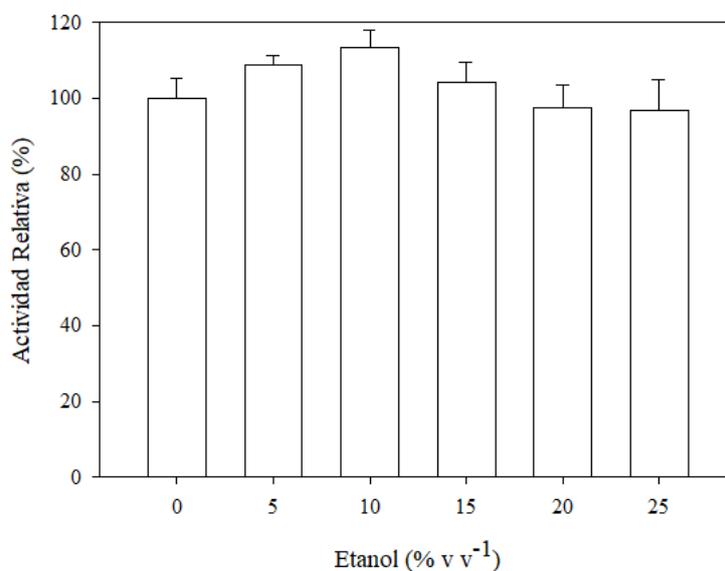


Figura 6.5 Actividad de la enzima β -glucosidasa en presencia de distintas concentraciones de etanol.

El etanol en altas concentraciones ha sido reportado como inhibidor de la actividad BGLasa, por lo que, para la aplicación en vinos, varios estudios se han enfocado en encontrar BGLasas que actúen en presencia de etanol (Cordero Otero, *et al.* 2003; Rodríguez, *et al.* 2007; Swangkeaw, *et al.* 2011; Zhang, *et al.* 2021b). Se ha hipotetizado que el etanol podría, al cambiar la polaridad del medio, provocar una alteración en la conformación de la enzima y de su sitio activo, reduciendo así la actividad (Cordero Otero, *et al.* 2003).

Sin embargo, el efecto no inhibitorio del etanol en la enzima en las concentraciones ensayadas no resulta extraño, de hecho, han sido reportadas varias BGLasas en las que la actividad enzimática aumenta en presencia de alcoholes. Esto está relacionado con la actividad glicosil-transferasa que poseen algunas BGLasas (catálisis de la reacción opuesta a la de hidrólisis), la cual fue reportada en varias de estas enzimas (Hernández-Guzmán, *et al.* 2016; Karnaouri, *et al.* 2013).

Barbagallo, *et al.* (2004) estudió el comportamiento frente al etanol de un extracto β -glucosídico producido por levaduras aisladas de mostos y vinos. En ese estudio, se pudo ver un comportamiento variable frente al etanol, siendo el extracto producido por *Pichia anomala* ALL 112 el que presentó un comportamiento similar al que se obtuvo en este trabajo, con una actividad máxima a concentraciones entre 12-14% de etanol. En ese estudio también se encontró que un preparado enzimático comercial de *A. niger* presentó actividad BGLasa notablemente reducida (50-60% de inhibición) en presencia de 12-15% de etanol. Considerando que los niveles de alcohol en los vinos suelen encontrarse entre un 12 y un 15% (Winefolly.com) en la mayoría de los vinos, los resultados obtenidos para la BGLasa producida por *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 en este punto son prometedores.

Efecto de los azúcares en la actividad enzimática

El vino posee azúcares provenientes de la uva: glucosa y mayormente fructosa. El contenido de azúcares es máximo al inicio de la fermentación, mientras que, a medida que va siendo consumido durante la misma, disminuye, al tiempo que aumenta el contenido de etanol. Algunas prácticas involucran el agregado de sacarosa al vino, para contrarrestar el bajo contenido de azúcar en algunas uvas. Esta práctica se denomina *chaptalización* y no está permitida en nuestro país y el Mercosur (Reglamento Vitivinícola del Mercosur), pero sí en otros países.

Se evaluó la actividad BGLasa en presencia de tres azúcares: glucosa, fructosa y sacarosa a distintas concentraciones de los mismos (Figura 6.6). La presencia de glucosa generó, a concentraciones relativamente bajas, una fuerte inhibición (Figura 6.6A). Por el contrario, la fructosa generó un aumento de la actividad enzimática, la cual fue máxima en una concentración de 100 g l^{-1} , con 244% de actividad relativa respecto del control. En el caso de la sacarosa, al aumentar la concentración de la misma en la reacción, la actividad β -glucosídica relativa se fue incrementando, hasta un valor de 146% de actividad relativa en presencia de 200 g l^{-1} de sacarosa (Figura 6.6B). Sin embargo, debido a la fuerte inhibición generada por la glucosa, uno de los azúcares mayoritarios en la uva, se concluye que esta enzima, al no ser negativamente afectada por etanol, podría ser utilizada luego de la etapa fermentativa (azúcar baja y etanol alto), más no al inicio de la fermentación (azúcar alta y etanol nulo).

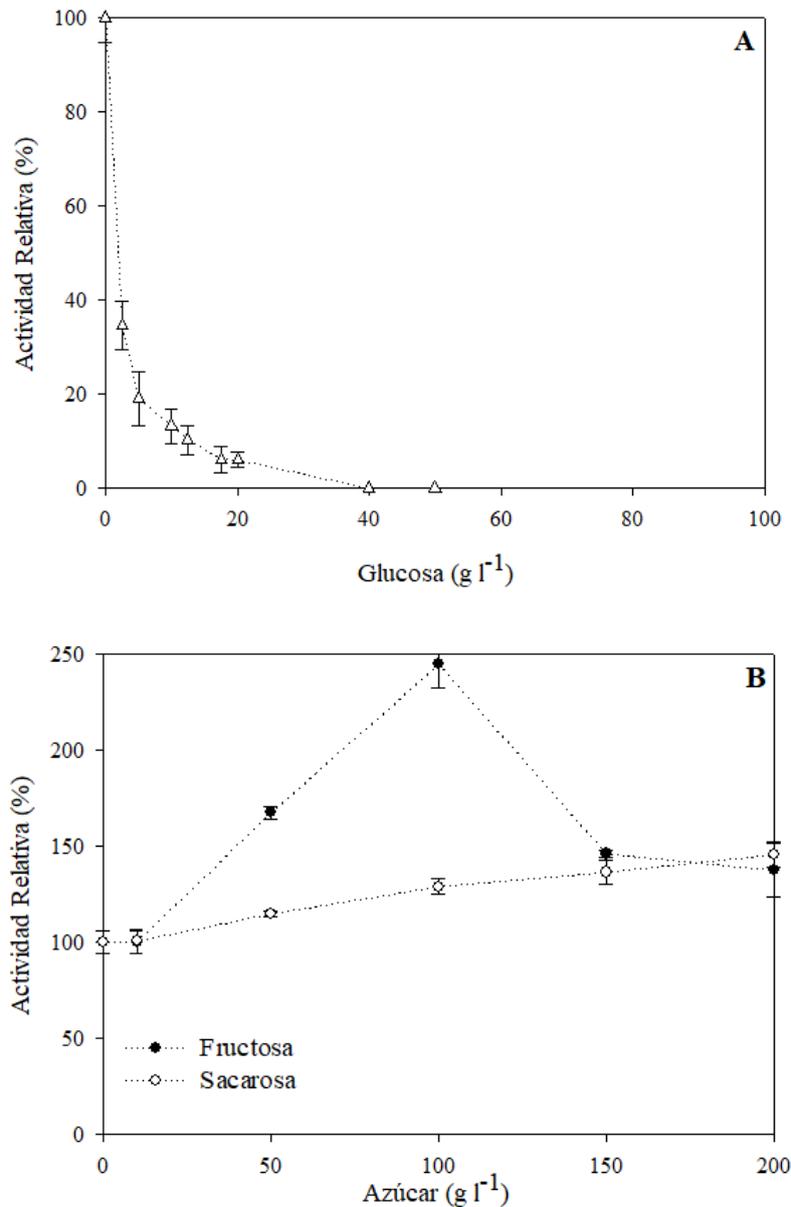


Figura 6.6 Efecto de los azúcares glucosa (A), fructosa y sacarosa (B) en la actividad de la β -glucosidasa producida por *Mrakia* sp. LP 7.1.2016.

La inhibición de BGLasas por glucosa es un típico caso de inhibición por producto, que es reportado por la mayoría de las BGLasas estudiadas, inclusive por BGLasas presentes en preparados comerciales (Zhang, *et al.* 2021b). Varios estudios que proponen el tratamiento del mosto del vino con BGLasas han realizado una búsqueda de este tipo de enzimas tolerantes y activas en presencia de glucosa, por lo que, en los últimos años se han aislado BGLasas que no se ven fuertemente afectadas por la presencia de este

azúcar, al menos en las concentraciones en las que se encuentra inicialmente en el vino ($\sim 200 \text{ g l}^{-1}$). Inclusive se ha reportado la estimulación de la actividad β -glucosídica en presencia de glucosa (Zhang, *et al.* 2021b).

Cálculo de la constante de inhibición por glucosa

Para conocer más acerca del efecto de este azúcar sobre la enzima, se realizaron los gráficos de Dixon, que permiten obtener la constante de inhibición (Figura 6.7). En este gráfico, se representa el inverso de la actividad enzimática en función de la concentración de inhibidor (en este caso glucosa), en diferentes series con distinta concentración de sustrato (pNPG). A partir de la gráfica se pudo constatar que el efecto inhibitorio fue de carácter competitivo, debido a que las rectas se intersectaron en el cuadrante de las abscisas negativas. Por otro lado, se descartó la inhibición mixta ya que, a concentraciones altas de sustrato en la reacción (5 mM), la velocidad de reacción no se vio alterada por la concentración del inhibidor: la enzima se encontró saturada en su sustrato y, en consecuencia, no inhibida. Se observa en la Figura 6.7 que los valores obtenidos en la secuencia de 5 mM pNPG describen una recta paralela al eje de las abscisas.

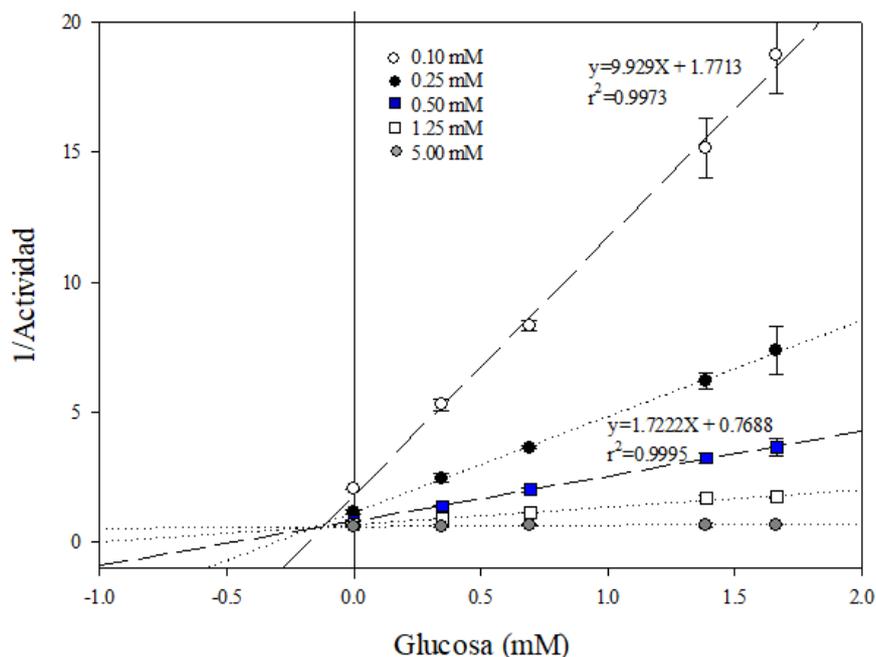


Figura 6.7 Gráfica de Dixon utilizada para calcular la constante de inhibición, k_i , por glucosa. Se utilizaron los valores obtenidos con dos concentraciones de sustrato: 0.10 mM y 0.50 mM para calcular la constante de inhibición. A su vez, se muestran graficados los valores obtenidos con 0.25, 1.25 y 5 mM de pNPG.

El valor de la constante de inhibición obtenida fue de 0.12 mM. Entre los trabajos de BGLasas en los que se estudia este parámetro se pueden mencionar la enzima de *Myceliophthora thermophila*, producida heterológicamente, con un K_i de 0.28 mM (Karnaouri, *et al.* 2013), y la producida por *A. niger*, con un K_i de 543 mM (Yan & Lin 1997), demostrando que existe un amplio rango de valores de K_i reportados. El K_i de la BGLasa producida por *Candida peltata* fue de 1400 mM (Saha & Bothast 1996) y el de la BGLasa de *Periconia sp.*, 20 mM (Harnpicharnchai, *et al.* 2009). Vale aclarar que en todos los casos se reportó un mecanismo de inhibición del tipo competitivo, al igual que el obtenido para la enzima estudiada. Durante la inhibición competitiva, el sustrato y el inhibidor compiten por el sitio activo de la enzima (Figura 6.8), siendo el K_i la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor.

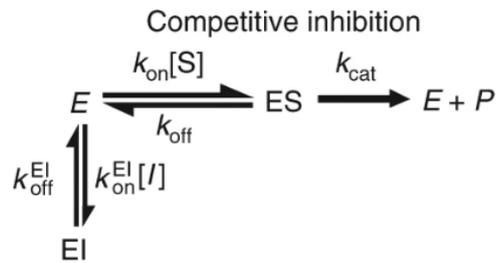


Figura 6.8 Inhibición competitiva de una enzima. S=sustrato; E=enzima; I=inhibidor; P=producto; ES=complejo enzima-sustrato; EI= complejo enzima-inhibidor. Tomado de Robin, et al. (2018).

La fórmula que puede describir el valor de la velocidad de catálisis en presencia de inhibidor es:

$$V = \frac{V_{\text{max}} S}{K_m \left(1 + \frac{1}{K_i}\right) + S}$$

Se puede observar que, a medida que disminuye el valor de la constante K_i , disminuye también la velocidad de catálisis, por lo que, un K_i más chico indica una inhibición competitiva más fuerte. En ese sentido, la BGLasa estudiada (como ya se vio) es fuertemente inhibida competitivamente por glucosa, en comparación con otras BGLasas.

Efecto del metabisulfito en la actividad enzimática

El dióxido de azufre (SO_2) es normalmente añadido durante la elaboración del vino como metabisulfito, y cumple la función de inhibir el crecimiento microbiano no deseado (Garde-Cerdán & Ancín-Azpilicueta 2007). Al estar presente en el vino, su efecto sobre las enzimas enológicas debe ser considerado (Zhang, et al. 2021b).

La presencia de metabisulfito de potasio en la reacción (60 mg l^{-1}) no afectó la actividad enzimática, con un 99% de actividad relativa respecto del control sin metabisulfito. González-Pombo et al. (2011) obtuvieron resultados similares en cuanto a

la estabilidad y actividad en presencia de este compuesto, dentro del estudio de una BGLasa producida por una cepa de *Pichia terricola*. Cordero Otero, *et al.* (2003) estudiaron el efecto de este compuesto en BGLasas producidas por diferentes levaduras aisladas de ambientes vitivinícolas y encontraron de la misma manera que el SO₂ no afectó significativamente la actividad, con excepción de la enzima producida por *Schwanniomyces polymorphus*, la cual tuvo una mayor actividad en presencia de este compuesto, sin embargo, se desconocen las razones. No existen muchos estudios en los que se evalúe la influencia de este compuesto.

Estabilidad de la enzima a pH enológico

El pH ácido característico tanto del mosto como del vino es otro de los factores limitantes a la hora de aplicar enzimas (Zhang, *et al.* 2021b). Según lo estudiado en el Capítulo 5, la BGLasa estudiada posee actividad y es estable a pH 4.0. Para evaluar su estabilidad a largo plazo, la enzima se incubó durante 14 días a pH 3.0 y 4.0 (Figura 6.9). La enzima demostró una marcada estabilidad a pH 4.0, conservando 100% de su actividad luego de 14 días, tanto a 4 °C como a 20 °C. Sin embargo, a pH 3.0 se observó que su estabilidad dependió de la temperatura de incubación. Así, al ser incubada a 20 °C, el tiempo de vida media de la enzima fue de 4.2 h, mientras que cuando fue incubada a 4 °C la enzima conservó un 60% de su actividad inicial luego de los 14 días de incubación.

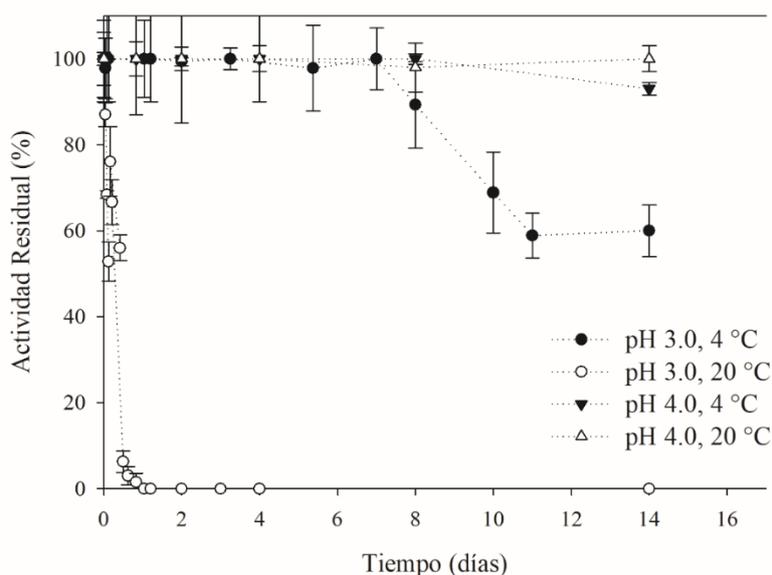


Figura 6.9 Efecto del pH en la estabilidad de la actividad β -glucosídica evaluada durante 14 días, a dos temperaturas diferentes.

Entre los estudios disponibles en bibliografía existen pocos que evalúen la estabilidad de este tipo de enzimas en un tiempo prolongado. La BGLasa producida por *M. pulcherrima* es inestable a largo plazo a pH 4.0 y se inactiva inmediatamente a valores de pH más bajos (González-Pombo, *et al.* 2008). Por otro lado, la BGLasa producida por *P. terricola* sólo fue estable a pH 4.0 luego de un proceso de inmovilización que estabilizó la enzima (González-Pombo, *et al.* 2011). *Fusarium solanis* produjo una BGLasa que conservó solo el 40 % de su actividad inicial después de 24 horas a pH 4.0 (Boudabbous, *et al.* 2017).

Tratamiento enzimático del vino

La BGLasa estudiada fue incubada en un vino Moscatel rosado joven, para evaluar su influencia en el aroma final del mismo. Los resultados obtenidos a partir del GC-MS (Tabla 6.1 y Figura 6.10) muestran las áreas de los compuestos aromáticos detectados en

el vino tratado con la enzima y en el vino control (incubado sin enzima). Luego de 14 días, se detectaron 34 y 30 compuestos en los vinos tratados y control, respectivamente. Se observaron diferencias significativas entre las áreas obtenidas para algunos de los compuestos entre el vino tratado y el control: α -terpineno, linalool, α -terpineol, óxidos de *trans* y *cis* linalool (piranoides), nerol y geraniol. Éstos se encontraron en mayor proporción en el vino tratado, mientras que cuatro de ellos (α -terpineno, α -terpineol, óxido de *cis* linalool (piranoide) y óxido de *trans* linalool (piranoide) únicamente fueron detectados en el vino tratado. El área correspondiente al monoterpeno nerol se vio aumentada 10.3 veces, y la del geraniol, 7.2 veces en comparación con el vino control. La concentración total de terpenos detectados en el vino control fue 8.3 veces mayor que la del vino control (Figura 6.10). Por lo tanto, la BGLasa estudiada fue capaz de liberar aromas, siendo específica para los monoterpenos detectados.

Tabla 6.1 Detección de compuestos volátiles en vino Moscatel rosado tratado con β -glucosidasa y control (sin tratar). Se indican descriptores para algunos de los compuestos. Las letras indican valores significativamente diferentes ($p < 0.05$) según el test LSD de ANOVA. Los ensayos se realizaron por duplicado

		Factor de respuesta relativo (%) ^a		
	Compuesto volátil	Vino control	Vino Tratado	Descriptor ^b
Ácidos	1 butanol	0.400 ± 0.097	0.481 ± 0.237	Vino, medicina
	1 pentanol	0.335 ± 0.005 a	0.841 ± 0.001 b	Aceitoso, dulce, balsámico
	ácido hexanoico	0.312 ± 0.033 a	0.639 ± 0.053 b	Queso
	ácido propanoico	0.534 ± 0.011	0.753 ± 0.213	Pungente, ácido
	Sub-total	1.581 ± 0.146	2.714 ± 0.504	
Alcoholes	2 metil 1 propanol	1.134 ± 0.332	0.533 ± 0.202	Etéreo
	3 etoxy 1 propanol	0.518 ± 0.097	0.563 ± 0.052	Maduro, pera
	3 metil 1 pentanol	1.630 ± 0.331 a	2.856 ± 0.205 b	Fermentado, pungente, coñac y vino, cacao
	benzil alcohol	0.309 ± 0.074	0.511 ± 0.022	Tostado, dulce, frutal
	Sub-total	3.591 ± 0.834	4.463 ± 0.481	
Ésteres	2 feniletil acetato	5.465 ± 0.425	5.839 ± 0.236	Rosa, miel, tabaco
	etil 4 hidroxibutirato	0.198 ± 0.019	0.339 ± 0.054	N/A
	etil decanoato	0.353 ± 0.138	0.368 ± 0.010	Floral, uvas, frutal
	etil hexanoato	0.270 ± 0.042	0.234 ± 0.013	Frutal, manzana verde, banana
	etil lactato	0.212 ± 0.060	0.184 ± 0.004	Manteca
	etil octanoato	6.231 ± 2.015	21.391 ± 6.524	Dulce, floral, frutal, peras
	etil fenil lactato	0.403 ± 0.050	0.552 ± 0.080	Picante
	etil piruvato	17.983 ± 2.039	24.019 ± 1.915	Etéreo, frutal, dulce
hexil acetato	0.555 ± 0.075	0.730 ± 0.157	Frutal, verde, dulce	

	isoamil acetato	25.709 ± 2.103	22.989 ± 8.099	Banana
	isobutil acetato	60.46 ± 8.366 a	18.872 ± 2.228 b	Manzana, banana
	Sub-total	117.839 ± 15.332	96.039 ± 19.584	
Compuestos C6	1 hexanol	0.167 ± 0.019	0.211 ± 0.022	Hierba verde
	trans 3 hexen 1 ol	0.391 ± 0.085	0.533 ± 0.033	Verde, floral
	Sub-total	0.558 ± 0.104	0.744 ± 0.055	
Terpenos	alfa terpineno	ND a	0.344 ± 0.008 b	Madera, cítrico
	alfa terpineol	ND a	0.827 ± 0.107 b	Floral, pino
	óxido de cis linalool (furanoide)	0.250 ± 0.012	0.259 ± 0.035	Tierra, floral, dulce, madera
	óxido de cis linalool (piranoide)	ND a	4.527 ± 0.203 b	Cítrico, verde
	Geraniol	0.164 ± 0.023 a	1.187 ± 0.191 b	Cítrico, floral
	Limoneno	0.332 ± 0.021	0.350 ± 0.017	Cítrico
	Linalool	0.245 ± 0.002 a	0.509 ± 0.002 b	Floral
	Nerol	1.215 ± 0.219 a	12.505 ± 1.717 b	Cítrico, floral
	Ácido trans geránico	0.316 ± 0.018	0.285 ± 0.040	N/A
	óxido de trans linalool (furanoide)	0.239 ± 0.018	0.303 ± 0.024	Dulce, floral, cremoso
	óxido de trans linalool (piranoide)	ND a	1.907 ± 0.083 b	Madera
	Sub-total	2.761 ± 0.313 a	23.003 ± 2.427 b	
Otros	Acetoína	12.971 ± 1.106	18.482 ± 2.531	N/A
	Pantolactona	1.066 ± 0.042 a	0.205 ± 0.030 b	Algodón, caramelo
	Sub-total	14.036 ± 1.148	18.687 ± 2.561	

ND: no detectado; N/A: datos no disponibles. ^a el factor de respuesta relativa se expresó como el radio porcentual entre el área cromatográfica de cada compuesto sobre el área obtenida para el estándar interno n-heptanol. ^b Los descriptores para los compuestos fueron obtenidos de: thegoodscentcompany.com

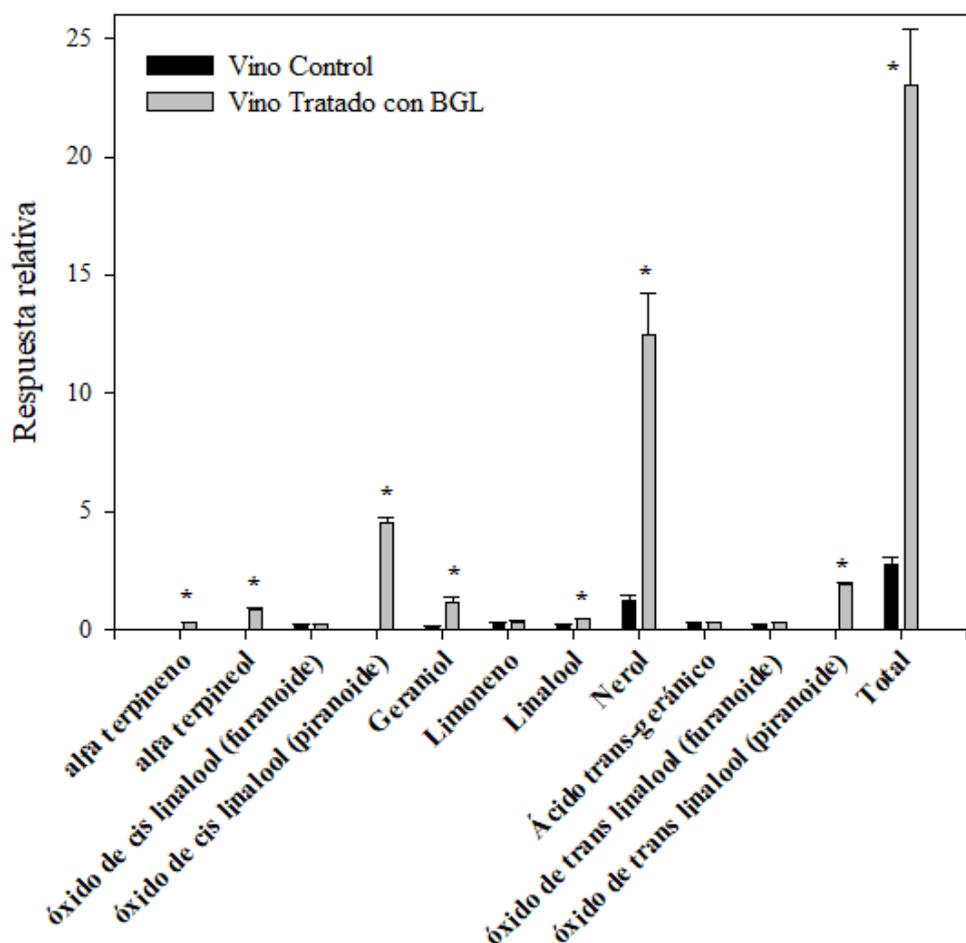


Figura 6.10 Área de terpenos obtenidas para los vinos tratado y control, luego de 14 días de tratamiento. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el vino tratamiento y el control ($p < 0.05$).

Cerca de 70 terpenoides fueron identificados en las bayas de la uva y en el vino; entre ellos linalool, geraniol, nerol, citronelol y α -terpineol son los que han sido identificados como los mayores contribuyentes al aroma del vino (Padilla, *et al.* 2016; Yang, *et al.* 2019; Zhang, *et al.* 2021b). Tanto el geraniol como el nerol se encuentran en grandes cantidades en vinos aromáticos, como Moscatel, Riesling y Gewürztraminer (Swiegers, *et al.* 2005). Los terpenos mencionados se caracterizan por tener bajos umbrales de olores, estos son, las concentraciones a las cuales el olor de cada sustancia es percibido por el

olfato humano. De esta manera, contribuyen a otorgar notas florales a los vinos (Padilla, *et al.* 2016; Wilkowska & Pogorzelski 2017).

Los compuestos C6 o de 6 átomos de carbono presentes en los vinos son un grupo de compuestos volátiles formados durante la etapa pre-fermentativa de la elaboración del vino. Incluye volátiles como hexanal, hexanol, cis-3-hexenol, trans-2-hexenol y cis- y trans isómeros del 2 y 3 hexenal. Algunos de estos compuestos, y dependiendo de la concentración a la cual se encuentran, pueden tener un efecto negativo en la calidad del vino, debido a su descriptor “herbáceo” (Ugliano 2009). Éstos compuestos no fueron encontrados en gran medida en el vino estudiado, ni hubo diferencias significativas entre el vino control y el tratado en los mismos (Tabla 6.1).

Diferentes estudios en los que se aplicaron BGLasas exógenas en vinos sugieren que la diferencia de especificidad de las enzimas permite desarrollar perfiles aromáticos diferentes (Tabla 6.2). La BGLasa de *Rhodotorula mucilaginosa* mostró preferencia en la liberación de terpenos, C13-norisoprenoides y compuestos bencénicos, al ser incubada con los precursores del vino (Hu, *et al.* 2016b). Por otro lado, la BGLasa de *S. pararoseus* fue específica para la liberación de los terpenos linalool, α -terpineol, nerol y geraniol en vinos blancos y tintos (Baffi, *et al.* 2013), y la BGLasa de *P. terricola* fue selectiva para norisoprenoides C13 (de Ovalle, *et al.* 2018).

Tabla 6.2 Algunos de los estudios de aplicación de β -glucosidasas en distintos vinos y los compuestos detectados en los vinos tratados.

<i>Microorganismo de origen</i>	<i>Vino tratado</i>	<i>Naturaleza de los compuestos liberados</i>	<i>Compuestos</i>	<i>Referencia</i>
<i>Mrakia sp.</i>	Moscatel rosado joven	Terpenos	α -terpineno, α -terpineol, óxidos de <i>cis</i> y <i>trans</i> linalool (p), geraniol, linalool, nerol	Este trabajo
<i>AR-2000</i> ^a	Mosto Airén	Norisoprenoides C13	4-vinilguaiacol	Palomo, <i>et al.</i> (2005)
<i>AR-2000</i> ^a	Mosto Macabeo	Terpenos	geraniol	Palomo, <i>et al.</i> (2005)
<i>AR-2000</i> ^a	Mosto Albillo	Terpenos y fenoles	geraniol y 4-vinilguaiacol	Palomo, <i>et al.</i> (2005)
<i>AR-2000</i> ^a	Mosto Chardonnay	Terpenos	geraniol	Palomo, <i>et al.</i> (2005)
<i>Aspergillus niger</i>	Moscatel blanco	Terpenos y norisoprenoides C13	α -terpineol and geraniol, oxidos de linalool, vomifoliol 3-oxo- α -ionol	González-Pombo, <i>et al.</i> (2014)
<i>A. niger</i>	Tannat	Norisoprenoides C13	3-oxo-7,8 dihidro- α -ionol, 3-oxo- α -ionol, dehidrovomifoliol, vomifoliol	de Ovalle, <i>et al.</i> (2021)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Blanco Niagara	Monoterpenos	linalool, α -terpineol, nerol, geraniol	Alves Baffi, <i>et al.</i> (2012)
<i>A. pullulans</i>	Tinto Isabel	Monoterpenos	linalool, α -terpineol, nerol, geraniol	Alves Baffi, <i>et al.</i> (2012)
<i>B-glucosidasa</i> ^b	Moscatel	Alcoholes C6, terpenos, fenoles, lactonas	3-hexen-1-ol, α -terpineol, nerol, geraniol, oxido de linalool, 4-metil-2,6-di-tert-butil-fenol, eugenol, siringol, metil vainillato, apocinina (acetovanilona), butirolactonas	Romo-Sánchez, <i>et al.</i> (2014)
<i>Candida easanensis</i>	Moscatel	Terpenos y Norisoprenoides C13	nerol, geraniol y β -damascenona	Thongekkaew, <i>et al.</i> (2019)
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Mosto uvas Pinot noir	Norisoprenoides C13, compuestos C6, derivados del benceno y terpenos	Principalmente: 1-hexenol, linalool, geraniol, bergamol, β -ionona, β -damascenona, alcohol benzílico	Hu, <i>et al.</i> (2016a)
<i>Kuraishia molischiana</i>	Moscatel de Lunel	Monoterpenos y alcoholes	nerol, geraniol, linalool, g-terpineno, 2-feniletanol, benzil alcohol.	Guéguen, <i>et al.</i> (1997)
<i>Oenococcus oeni</i>	Cabernet Sauvignon	Terpenos	Linalool	Zhang, <i>et al.</i> (2021a)
<i>P. terricola</i>	Cabernet Sauvignon	Norisoprenoides C13 y fenoles	Vomifoliol, 3-oxo- α -ionol, 2,6-dimetoxifenol, guaiacol	de Ovalle, <i>et al.</i> (2018)

<i>Pichia kudriavzevii</i>	Moscatel	Norisoprenoides C13, terpenos y fenoles	4-vinilguaiacol, terpenos y norisoprenoides no especificados	de Ovalle, <i>et al.</i> (2016)
<i>P. kudriavzevii</i>	Tannat	Norisoprenoides C13 y terpenos	3-oxo-7,8 dihidro- α -ionol, 3-oxo- α -ionol, dehidrovomifoliol, vomifoliol, ho-diol, geraniol, α -terpineol, linalool, geraniol, 3-oxo- α ionol, 3-hidroxi-7,8-dehidro- β ionol, 3-hidroxi- β damascenona	de Ovalle, <i>et al.</i> (2021)
Preparado comercial	Mosto Chardonnay	Terpenos y norisoprenoides C13	vitispirano, β -damascenona, β -ionona, 2-feniletanol	Codresi, <i>et al.</i> (2012)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Precusores aromáticos de vino Meili joven	Compuestos bencénicos y norisoprenoides C13	hexil acetato, linalool, feniletil, nerol, geraniol	Hu, <i>et al.</i> (2016b)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Moscatel	Terpenos, ésteres	citronellol, nerol, geraniol	Wanapu, <i>et al.</i> (2012)
<i>Schwanniomyces pseudopolymorphus</i>	Mosto Chardonnay	Monoterpenos	limoneno, 1-hexanol, 3-hexen-1-ol, citronelol, 2-feniletanol	Cordero Otero, <i>et al.</i> (2003)
<i>S. pseudopolymorphus</i>	Airén	Terpenos y alcoholes	linalool, 1-hexanol, 3-hexen-1-ol, citronelol, 2-feniletanol	Arévalo-Villena, <i>et al.</i> (2007)
<i>S. pseudopolymorphus</i>	Riesling	Terpenos y alcoholes	1-hexanol, 3-hexen-1-ol, geraniol, linalool, hotrienol, α -terpineol, citronelol	Arévalo-Villena, <i>et al.</i> (2007)
<i>S. pseudopolymorphus</i>	Moscatel	Terpenos y alcoholes	linalool, α -terpineol, nerol, geraniol	Arévalo-Villena, <i>et al.</i> (2007)
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	Blanco Niagara	Terpenos	linalool, α -terpineol, nerol, geraniol	Baffi, <i>et al.</i> (2011)
<i>S. pararoseus</i>	Tinto Isabel	Terpenos	linalool, α -terpineol, nerol, geraniol	Baffi, <i>et al.</i> (2011)
<i>Trichosporon asahii</i>	Cabernet Sauvignon	Compuestos C6, terpenos, aldehidos, norisoprenoides C13	1-hexanol, limoneno, belzaldehido, damascenona, citronelol	Wang, <i>et al.</i> (2012)

^a Preparado comercial (Gist Brocades), ^b Preparado comercial (Lallemand)

CONCLUSIONES DE ESTE CAPÍTULO

Este es el primer reporte de la utilización de una β -glucosidasa antártica en el tratamiento de un vino para el desarrollo de un perfil aromático. Luego del tratamiento con la enzima, se obtuvo en el vino un alto contenido de terpenos, principalmente nerol, geraniol, α -terpineol y óxidos de linalool, compuestos que son conocidos por impartir notas florales y cítricas en los vinos. La β -glucosidasa de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 podría ser útil en este campo de aplicación, ayudando en el desarrollo rápido de aromas en vinos. En principio podría ser utilizada para estimular el desarrollo de aromas cítricos y florales en vinos altos en precursores terpénicos como lo son el Moscatel, el Riesling y el Gewürztraminer.

Se propone a futuro la evaluación de las características sensoriales finales en vinos tratados por esta enzima utilizando paneles sensoriales, así como también la evaluación de la actividad en otros tipos de vino.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- R. P. Adams eds. 2001. *Book Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy*. Stockton: Allured-Carol Steam IL, pp.
- ALVES BAFFI, M., TOBAL, T., LAGO, J., BOSCOLO, M., GOMES, E. & DA SILVA, R. 2012. Wine aroma improvement using a β -glucosidase preparation from *Aureobasidium pullulans*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169, <http://doi.org/10.1007/s12010-012-9991-2>.
- ARÉVALO-VILLENA, M., ÚBEDA IRANZO, J. & BRIONES PÉREZ, A. 2007. Enhancement of aroma in white wines using a β -glucosidase preparation from *Debaryomyces pseudopolymorphus* (A-77). *Food Biotechnology*, 21, <http://doi.org/10.1080/08905430701410605>.
- ARÉVALO VILLENA, M., UBEDA IRANZO, J. F., CORDERO OTERO, R. R. & BRIONES PÉREZ, A. I. 2005. Optimization of a rapid method for studying the cellular location of β -glucosidase activity in wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 99, <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02627.x>.
- BAFFI, M. A., MARTIN, N., TOBAL, T. M., FERRAREZI, A. L., LAGO, J. H. G., BOSCOLO, M., GOMES, E. & DA-SILVA, R. 2013. Purification and characterization of an ethanol-tolerant β -Glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus* and its potential for hydrolysis of wine aroma precursors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171, <http://doi.org/10.1007/s12010-013-0471-0>.
- BAFFI, M. A., TOBAL, T., HENRIQUE, J., LAGO, G., LEITE, R. S., BOSCOLO, M., GOMES, E. & DA-SILVA, R. 2011. A novel β -glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus*: characterization and application in winemaking. *Journal of Food Science*, 76, <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02293.x>.
- BARBAGALLO, R. N., SPAGNA, G., PALMERI, R., RESTUCCIA, C. & GIUDICI, P. 2004. Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.03.005>.
- BOUDABBOUS, M., BEN HMAD, I., SAIBI, W., MSSAWRA, M., BELGHITH, H. & GARGOURI, A. 2017. Trans-glycosylation capacity of a highly glycosylated multi-specific β -glucosidase from *Fusarium solani*. *Bioprocess and biosystems engineering*, 40, <http://doi.org/10.1007/s00449-016-1721-7>.
- CODRESI, C., RAPEANU, G. & ALEXE, P. 2012. Effect of β -glucosidases in the making of Chardonnay wines, Fascicle VI: Food Technology. *Annals of the University Dunarea de Jos of Galati*, 36, .
- CORDERO OTERO, R., UBEDA IRANZO, J., BRIONES-PEREZ, A., POTGIETER, N., VILLENA, M. A., PRETORIUS, I. & RENSBURG, P. V. 2003. Characterization of the β -glucosidase activity produced by enological strains of non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of Food Science*, 68, <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb07062.x>.
- DE OVALLE, S., BRENA, B., FARIÑA, L. & GONZÁLEZ POMBO, P. 2016. Novel beta-glucosidase from *Issatchenkia orientalis*: characterization and assessment for hydrolysis of muscat wine glycosides. *Global Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4,

- DE OVALLE, S., BRENA, B. & GONZALEZ POMBO, P. 2021. Influence of beta glucosidases from native yeast on the aroma of Muscat and Tannat wines. *Food Chemistry*, 346, <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128899>.
- DE OVALLE, S., CAVELLO, I., BRENA, B. M., CAVALITTO, S. & GONZÁLEZ-POMBO, P. 2018. Production and characterization of a β -glucosidase from *Issatchenkia terricola* and its use for hydrolysis of aromatic precursors in Cabernet Sauvignon wine. *Food Science and Technology*, 87, <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.026>.
- DIXON, M. 1953. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochemical Journal*, 55, <http://doi.org/10.1042/bj0550170>.
- FIA, G., OLIVIER, V., CAVAGLIONI, A., CANUTI, V. & ZANONI, B. 2016. Side activities of commercial enzyme preparations and their influence on the hydroxycinnamic acids, volatile compounds and nitrogenous components of white wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 22, <https://doi.org/10.1111/ajgw.12232>.
- FRATEBIANCHI DE LA PARRA, D. 2017. Tesis Doctoral. Estudio de la producción de poligalacturonasas de *Aspergillus sojae*: producción, caracterización y aplicación en procesos de vinificación. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Química, ^La Plata^, 197
- GARDE-CERDÁN, T. & ANCÍN-AZPILICUETA, C. 2007. Effect of SO₂ on the formation and evolution of volatile compounds in wines. *Food Control*, 18, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.11.001>.
- GONZÁLEZ-POMBO, P., FARIÑA, L., CARRAU, F., BATISTA-VIERA, F. & BRENA, B. M. 2014. Aroma enhancement in wines using co-immobilized *Aspergillus niger* glycosidases. *Food Chemistry*, 143, <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.107>.
- GONZÁLEZ-POMBO, P., FARIÑA, L., CARRAU, F., BATISTA-VIERA, F. & BRENA, B. M. 2011. A novel extracellular β -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. *Process Biochemistry*, 46, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.016>.
- GONZÁLEZ-POMBO, P., PÉREZ, G., CARRAU, F., GUISÁN, J. M., BATISTA-VIERA, F. & BRENA, B. M. 2008. One-step purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*. *Biotechnology Letters*, 30, <http://doi.org/10.1007/s10529-008-9708-3>.
- GUÉGUEN, Y., CHEMARDIN, P., PIEN, S., ARNAUD, A. & GALZY, P. 1997. Enhancement of aromatic quality of Muscat wine by the use of immobilized β -glucosidase. *Journal of Biotechnology*, 55, [http://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00069-2](http://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00069-2).
- HARNPICHARNCHAI, P., CHAMPREDA, V., SORNLAKE, W. & EURWILAICHITR, L. 2009. A thermotolerant beta-glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia* sp., with a possible use for biomass conversion to sugars. *Protein Expression and Purification*, 67, <http://doi.org/10.1016/j.pep.2008.05.022>.
- HERNÁNDEZ-GUZMÁN, A., FLORES-MARTÍNEZ, A., PONCE-NOYOLA, P. & VILLAGÓMEZ-CASTRO, J. C. 2016. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from *Sporothrix schenckii*. *FEBS Open Bio*, 6, <http://doi.org/10.1002/2211-5463.12108>.

- HERNANDEZ-ORTE, P., CERSOSIMO, M., LOSCOS, N., CACHO, J., GARCIA-MORUNO, E. & FERREIRA, V. 2009. Aroma development from non-floral grape precursors by wine lactic acid bacteria. *Food Research International*, 42, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.023>.
- HU, K., QIN, Y., TAO, Y. S., ZHU, X. L., PENG, C. T. & ULLAH, N. 2016a. Potential of glycosidase from non-*Saccharomyces* isolates for enhancement of wine aroma. *Journal of Food Science*, 81, <http://doi.org/10.1111/1750-3841.13253>.
- HU, K., ZHU, X. L., MU, H., MA, Y., ULLAH, N. & TAO, Y. S. 2016b. A novel extracellular glycosidase activity from *Rhodotorula mucilaginosa*: its application potential in wine aroma enhancement. *Letters in Applied Microbiology*, 62, <http://doi.org/10.1111/lam.12527>.
- KARNAOURI, A., TOPAKAS, E., PASCHOS, T., TAOUKI, I. & CHRISTAKOPOULOS, P. 2013. Cloning, expression and characterization of an ethanol tolerant GH3 β -glucosidase from *Myceliophthora thermophila*. *PeerJ*, 1, <http://doi.org/10.7717/peerj.46>.
- MAICAS, S. & MATEO, J. J. 2005. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, <http://doi.org/10.1007/s00253-004-1806-0>.
- F. W. McLafferty and D. B. Stauffer eds. 1991. *Book The wiley/NBS Registry of mass spectral data*. New York: Wiley and Sons, pp. 1064,
- MICHLMAYR, H., NAUER, S., BRANDES, W., SCHÜMANN, C., KULBE, K. D., DEL HIERRO, A. M. & EDER, R. 2012. Release of wine monoterpenes from natural precursors by glycosidases from *Oenococcus oeni*. *Food Chemistry*, 135, <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.099>.
- PADILLA, B., GIL, J. V. & MANZANARES, P. 2016. Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: from spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Frontiers in Microbiology*, 7, <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00411>.
- PALMERI, R. & SPAGNA, G. 2007. β -Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.007>.
- PALOMO, E. S., HIDALGO, M. C. D. A.-M., GONZÁLEZ-VIÑAS, M. Á. & PÉREZ-COELLO, M. S. 2005. Aroma enhancement in wines from different grape varieties using exogenous glycosidases. *Food Chemistry*, 92, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.025>.
- POGORZELSKI, E. & WILKOWSKA, A. 2007. Flavour enhancement through the enzymatic hydrolysis of glycosidic aroma precursors in juices and wine beverages: a review. *Flavour and Fragrance Journal*, 22, <http://doi.org/10.1002/ffj.1784>.
- ROBIN, T., REUVENI, S. & URBACH, M. 2018. Single-molecule theory of enzymatic inhibition. *Nature Communications*, 9, <http://doi.org/10.1038/s41467-018-02995-6>.
- RODRÍGUEZ, M. E., LOPES, C., VALLES, S., GIRAUDO, M. R. & CABALLERO, A. 2007. Selection and preliminary characterization of β -glycosidases producer Patagonian wild yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.07.004>.
- ROMO-SÁNCHEZ, S., ARÉVALO-VILLENA, M., GARCÍA ROMERO, E., RAMIREZ, H. L. & BRIONES PÉREZ, A. 2014. Immobilization of β -glucosidase and its application for enhancement of

- aroma precursors in Muscat wine. *Food and Bioprocess Technology*, 7, <http://doi.org/10.1007/s11947-013-1161-1>.
- SAHA, B. C. & BOTHAST, R. J. 1996. Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel beta-glucosidase from *Candida peltata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, <http://doi.org/10.1128/AEM.62.9.3165-3170.1996>.
- SWANGKEAW, J., VICHITPHAN, S., BUTZKE, C. E. & VICHITPHAN, K. 2011. Characterization of β -glucosidases from *Hanseniaspora* sp. and *Pichia anomala* with potentially aroma-enhancing capabilities in juice and wine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, <http://doi.org/10.1007/s11274-010-0474-8>.
- SWIEGERS, J. H., BARTOWSKY, E. J., HENSCHKE, P. A. & PRETORIUS, I. S. 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>.
- THONGEKKEAW, J., FUJII, T., MASAKI, K. & KOYAMA, K. 2019. Evaluation of *Candida easanensis* JK8 β -glucosidase with potentially hydrolyse non-volatile glycosides of wine aroma precursors. *Natural Product Research*, 33, <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1481845>.
- UGLIANO, M. 2009. Enzymes in Winemaking. In M. C. P. M.V. Moreno-Arribas eds. *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer, 103-126 http://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5_6.
- VILLAMOR, R. R. & ROSS, C. F. 2013. Wine matrix compounds affect perception of wine aromas. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4, <http://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182707>.
- WANAPU, C., SRIPUNYA, P. & BOONKERD, N. 2012. Selection of yeast strains containing β -glucosidase for improving wine aroma. *Journal of Agricultural Science and Technology B*, 2,
- WANG, Y., XU, Y. & LI, J. 2012. A novel extracellular β -glucosidase from *Trichosporon asahii*: yield prediction, evaluation and application for aroma enhancement of Cabernet Sauvignon. *Journal of Food Science*, 77, <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02705.x>.
- WILKOWSKA, A. & POGORZELSKI, E. 2017. Aroma enhancement of cherry juice and wine using exogenous glycosidases from mould, yeast and lactic acid bacteria. *Food Chemistry*, 237, <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.120>.
- YAN, T. R. & LIN, C. L. 1997. Purification and characterization of a glucose-tolerant beta-glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC 31494. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61, <http://doi.org/10.1271/bbb.61.965>.
- YANG, Y., JIN, G. J., WANG, X. J., KONG, C. L., LIU, J. & TAO, Y. S. 2019. Chemical profiles and aroma contribution of terpene compounds in Meili (*Vitis vinifera* L.) grape and wine. *Food Chemistry*, 284, <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.106>.
- YOSHINO, M. & MURAKAMI, K. 2009. A graphical method for determining inhibition constants. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24, <http://doi.org/10.3109/14756360902829766>.

- ZHANG, J., WANG, T., ZHAO, N., XU, J., QI, Y., WEI, X. & FAN, M. 2021a. Performance of a novel β -glucosidase BGL0224 for aroma enhancement of Cabernet Sauvignon wines. *LWT*, 144, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111244>.
- ZHANG, M., PAN, Q., YAN, G. & DUAN, C. 2011. Using headspace solid phase micro-extraction for analysis of aromatic compounds during alcoholic fermentation of red wine. *Food Chemistry*, 125, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.008>.
- ZHANG, P., ZHANG, R., SIRISENA, S., GAN, R. & FANG, Z. 2021b. Beta-glucosidase activity of wine yeasts and its impacts on wine volatiles and phenolics: A mini-review. *Food Microbiology*, 100, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103859>.

Sitios web

-Ley 26870: <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/ley-26870-218039>

-Estadísticas Instituto Nacional de Vitivinicultura:

<https://www.argentina.gob.ar/inv/estadisticas-vitivincolas/consumo-capita>

-<https://www.chemwhat.es/>

-Contenido de alcohol en el vino, <https://winefolly.com/tips/alcohol-content-in-wine/>

<http://www.thegoodscentcompany.com/search3.php?qName=limonene&submit.x=0&submit.y=0>

-Reglamento Vitivinícola del Mercosur:

https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/reglamentovitivinicoladel_mercosur.pdf

Último acceso, 18 de noviembre, 2022.

CAPÍTULO 7

APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE PECTINASAS ANTÁRTICAS

OBJETIVO GENERAL DE ESTE CAPÍTULO

Demostrar la utilidad de pectinasas de origen antártico en aplicaciones biotecnológicas del ámbito alimenticio.

PRIMERA PARTE: EXTRACCIÓN DE PECTINA A PARTIR DE POMAZA DE CÍTRICOS

Resumen

La pectina, polímero altamente solicitado en la industria alimenticia, puede ser obtenida a partir de su materia prima mediante un proceso de extracción enzimático en medio acuoso. En este capítulo se evaluó la capacidad de dos extractos pectinolíticos y dos poligalacturonasas parcialmente puras de extraer pectina a 20 °C a partir de pomaza de lima. Los extractos pectinolíticos utilizados fueron el de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016, cuya obtención se detalló en el Capítulo 4, y un extracto pectinolítico previamente estudiado en el laboratorio, que demostró potencial en otras aplicaciones; este es producido por la levadura antártica *Tausonia pullulans* 8E. Las poligalacturonasas PGasaI y PGasaII también fueron testeadas en este proceso. Entre los extractos crudos ensayados, sólo el producido por *T. pullulans* 8E fue capaz de extraer pectina. El extracto de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 extrajo un conjunto de oligómeros producto de la degradación extensiva de la pectina, lo cual impidió su precipitación. Por su lado, las poligalacturonasas parcialmente purificadas a partir de ese mismo extracto, PGasaI y PGasaII, lograron la obtención de pectina, con rendimientos entre 10 y 12 g de pectina por cada 100 g de pomaza inicial. Se

trabajó con el extracto producido por 8E para evaluar el efecto de distintos parámetros en el rendimiento en pectina obtenido. La temperatura, en el rango 20-30 °C, no fue un factor que altere significativamente los rendimientos obtenidos, mientras que sí se observó diferencias en la cantidad de pectina obtenida al variar el tiempo del tratamiento desde 30 minutos a 120 minutos, con rendimientos de 11.2% y 15.1%, respectivamente. Por el contrario, la productividad fue máxima en la extracción de 30 minutos (0.40 g pectina 100 g pomaza⁻¹ min⁻¹), respecto de la de 120 minutos (0.13 g pectina 100 g pomaza⁻¹ min⁻¹).

Las pectinas obtenidas fueron caracterizadas en términos de composición de ácidos urónicos y azúcares neutros. Las pectinas obtenidas con el extracto de 8E tuvieron un contenido de ácidos urónicos bajo, cercano al 45%, mientras que cerca del 50% del contenido fueron azúcares neutros. La naturaleza de esos azúcares se analizó observando el perfil de elución en una cromatografía de intercambio iónico *Diethylaminoethyl Sepharose* (DEAE), a partir del cual se pudieron identificar una gran proporción de azúcares que se encuentran de forma libre, y no unidos de forma covalente a la molécula de pectina. Por su lado, las pectinas obtenidas con las enzimas PGasaI y PGasaII obtuvieron un contenido de ácidos urónicos entre 65 y 85%, y azúcares neutros de 30%. El análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) permitió determinar el grado de esterificación de las pectinas, que fue cercano al 70% en el caso de las obtenidas con el extracto de 8E, y entre 73% y 88% en el caso de la obtenida utilizando las PGasaI y II de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016, por lo que todas las pectinas obtenidas fueron pectinas de alto grado de esterificación. Se determinó la viscosidad de soluciones con diferentes concentraciones de polímero, a partir de las cuales se estimó el peso molecular de las pectinas obtenidas, que fue entre 7×10^4 y 1×10^5 g mol⁻¹. La

pectina obtenida enzimáticamente con el extracto 8E fue utilizada para formar geles con inulina, fructooligosacáridos y azúcares de bajas calorías.

INTRODUCCIÓN

Usos de la pectina en el sector comercial

La pectina es un hidrocoloide capaz de formar redes en solución acuosa, por lo que, hace ya más de cien años, comenzó a comercializarse como agente gelificante en la industria alimenticia (Chan, *et al.* 2017). Se adiciona en mermeladas y rellenos de panadería, y también es utilizado como estabilizante en yogures y otras bebidas lácteas, y como agente espesante en otros alimentos (Chan, *et al.* 2017; Ciriminna, *et al.* 2016). Los oligosacáridos de pectina (POS, por *pectin oligosaccharides*), que se obtienen a partir de la degradación parcial de la pectina, poseen propiedades beneficiosas para la salud: se han reportado actividades prebióticas, anticáncer, inmunomoduladoras, hipoglicémicas, antialérgica, antiinflamatoria, anticoagulante y antiulcerosa (Ding & Cui 2020; Prandi, *et al.* 2018). Comercialmente, la pectina aporta significativamente al mercado global de los hidrocoloides. Hoy en día, las aplicaciones alimentarias de la pectina son diversas, desde bebidas, confitería y lácteos hasta procesamiento de carne. La pectina también ha atraído una atención sustancial de las industrias farmacéutica, cosmética y de polímeros (Djordjević, *et al.* 2022; Thakur, *et al.* 1997).

Ocurrencia, estructura y propiedades de la pectina: efecto en la gelificación

La pectina se encuentra en las paredes de las células vegetales, constituyendo cerca de un tercio de las paredes de dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas. Allí, se encuentra asociada a otros componentes celulares, como celulosa y hemicelulosa (Figura 7.1). Es más abundante en la lámina media, donde cumple un papel importante en la adhesión entre células adyacentes (Yang & Anderson 2020).

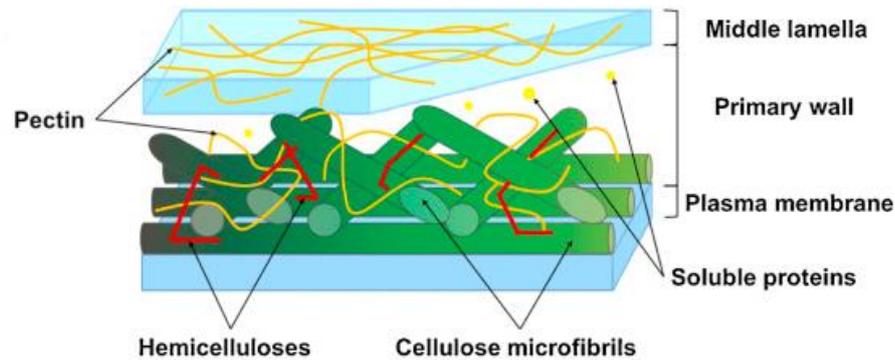


Figura 7.1 Estructura de la pared celular vegetal. Las pectinas suelen encontrarse asociadas a otros componentes de la pared celular, como la celulosa o la hemicelulosa (Chan, et al. 2017).

La estructura de la pectina se explicó en detalle en la Introducción del Capítulo 3. A efectos de lo estudiado en este capítulo, es importante recordar que la pectina contiene, en proporciones variables, distintos dominios: homogalacturonano (HG), ramnogalacturonano I (RG-I) y ramnogalacturonano II (RG-II), los cuales poseen composición variable (Figura 7.2).

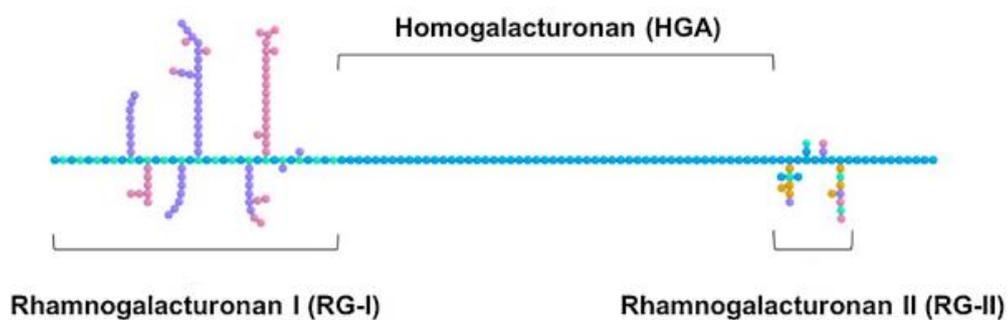


Figura 7.2 Dominios mayoritarios encontrados en las moléculas de pectina: homogalacturonano (HG), ramnogalacturonano I (RG-I) y ramnogalacturonano II (RG-II) (Chan, et al. 2017).

Una característica muy importante de la pectina, y que influye fuertemente en sus propiedades reológicas, es su grado de esterificación. Según esta característica, las pectinas se clasifican en pectinas de bajo metoxilo (LMP, por *low-methoxyl pectin*), las

cuales poseen un grado de esterificación con metanol entre 20% y 40%, y pectinas de alto metoxilo (HMP, por *high-methoxyl pectin*) cuando este porcentaje se encuentra arriba del 60%. Esta diferencia es muy importante ya que define las condiciones de gelificación: las LMP forman geles en presencia de iones divalentes, mientras que las HMP gelifican en presencia de azúcares y pH ácido (cerca de 3.0) (Chan, *et al.* 2017; Sriamornsak 2003).

La gelificación puede definirse como la formación de una red tridimensional (3D) de cadenas poliméricas, entre las que se entrampan moléculas de disolvente y solutos (Chan, *et al.* 2017). Las condiciones requeridas para la gelificación y las propiedades del gel dependen en última instancia de la estructura molecular, las fuerzas intermoleculares que mantienen unida la red y la naturaleza de las zonas de unión en las que se entrecruzan las moléculas de polímero. Las zonas de unión en los geles de polisacáridos son complejas y las estructuras moleculares se mantienen unidas por un gran número de interacciones débiles individuales, como las interacciones electrostáticas y los enlaces de hidrógeno (Axelos & Thibault 1991). Las HMP y LMP tienen diferentes mecanismos de gelificación, aunque las características del gel se rigen por las mismas propiedades macromoleculares, como la composición, el tamaño y la conformación de los polímeros.

Los geles de HMP se obtienen a pH ácido en presencia de una alta concentración de sacarosa o algún soluto similar. Una alta concentración de sacarosa reduce la actividad de agua, necesario para promover las interacciones cadena-cadena en lugar de las interacciones cadena-disolvente; mientras que el pH incentiva la protonación de los residuos de carboxilo, minimizando la repulsión electrostática. Los geles se estabilizan mediante enlaces de hidrógeno intermoleculares e interacciones hidrofóbicas entre ésteres metílicos (Thibault & Ralet 2003; Walkinshaw & Arnott 1981) (Figura 7.3A).

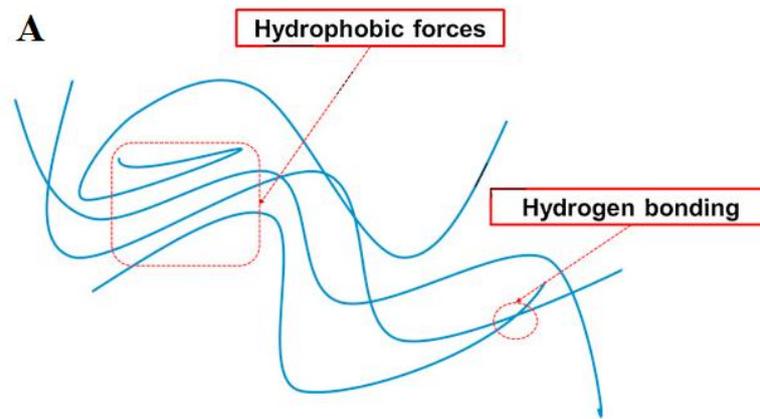


Figura 7.3A Gelificación con pectinas de alto metoxilo (*Chan, et al. 2017*). La gelificación con pectinas de alto metoxilo se produce gracias a la formación de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas entre metil-ésteres.

En el caso de los geles LMP, la estabilización se da mediante enlaces cruzados iónicos a través de puentes de calcio entre dos carboxilatos de dos cadenas diferentes, en lugar de enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Este modelo es conocido como "caja de huevos", y se caracteriza por la presencia de zonas de unión formadas por asociaciones ordenadas lado a lado de ácido galacturónico (GalA), en las que secuencias específicas de monómeros de GalA en cadenas adyacentes se unen intermolecularmente a través de enlaces electrostáticos e iónicos de grupos carboxilo, formando estructuras que se asemejan a una caja de huevos (Braccini & Pérez 2001; Cao, *et al.* 2020) (Figura 7.3B).

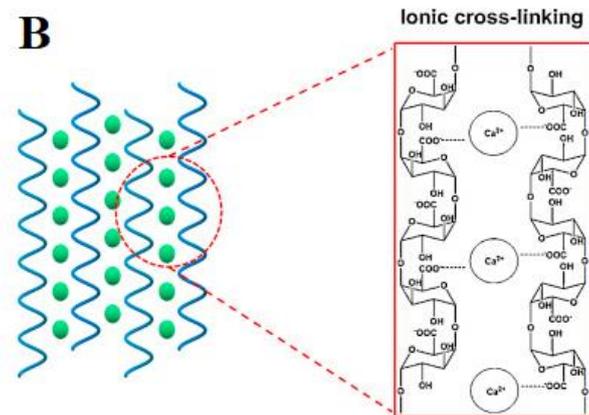


Figura 7.3B Gelificación con pectinas bajo metoxilo (Chan, *et al.* 2017). El mecanismo de gelificación de las pectinas de bajo metoxilo se rige por la formación de redes iónicas a través de iones de calcio (divalentes) entre dos grupos carboxilo de dos cadenas diferentes muy próximas.

Métodos de obtención

Históricamente, el orujo de manzana ha sido la principal fuente comercial de pectina, pero actualmente el 85.0% de la pectina se obtiene como un subproducto de la industria del jugo de cítricos, obteniéndose a partir de la cáscara o pomaza de los mismos (Adetunji, *et al.* 2017; Ciriminna, *et al.* 2016). Un 14.0% de la pectina se obtiene del orujo de manzana y un 0.5% de la pulpa de remolacha azucarera. La cáscara de cítricos y el orujo de manzana están disponibles en grandes cantidades como residuos de la producción de jugos y aceites esenciales, mientras que la pulpa de remolacha azucarera se obtiene de la industria azucarera. Las distintas especies de plantas tienen diferente contenido de pectina y estas pectinas a su vez poseen diferentes propiedades fisicoquímicas (Chan, *et al.* 2017; Yang & Anderson 2020). Hoy existen numerosos estudios en los que se busca cómo aprovechar frutas o residuos vegetales para la obtención de este polímero tan utilizado (Tabla 7.1).

Tabla 7.1 Estudios de extracción de pectina por distintos métodos: clásico que involucra la utilización de ácidos, y alternativas como ultrasonido, microondas y enzimáticos

Método de obtención	Fuente	Tipo de pectina obtenida ^a	Rendimiento (%)	Referencia
<i>Clásico</i>				
<i>HCl</i>	Cáscara de mango	HMP	19-32	do Nascimento Oliveira, <i>et al.</i> (2018)
<i>HCl</i>	Pomaza de durazno	HMP	7	Faravash & Ashtiani (2007)
<i>Ultrasonido</i>				
	Residuos de tomate	HMP	~ 15	Grassino, <i>et al.</i> (2016)
	Cáscara de mango	HMP	17	Wang, <i>et al.</i> (2016)
<i>Microondas</i>				
	Cáscara de naranja	LMP	29	Hosseini, <i>et al.</i> (2016)
	Remolacha azucarera	HMP	10-16%	Fishman, <i>et al.</i> (2008)
<i>Enzimático</i>				
Viscozyme ^b	Hojas de té verde	LMP	8.5	Zhang, <i>et al.</i> (2020)
Laminex C2K ^b	Cáscara de lima	HMP	22	Dominiak, <i>et al.</i> (2014)
Celulasa-xilanas	Cladodios de nopal	LMP	17	Bayar, <i>et al.</i> (2018)
Celluclast ^b	Pomaza de manzana	NR	19	Wikiera, <i>et al.</i> (2015)
Celluclast ^b	Pomaza de kiwi	NR	4.5	Yuliarti, <i>et al.</i> (2015)
Celluclast ^b	Pomaza de manzana	HMP	8	Dranca & Oroian (2019)
Viscozyme ^b	Pomaza de yuza	LMP	7.3	Lim, <i>et al.</i> (2012)
Poligalacturonasa	Cáscara de limón	HMP	23.3	Franchi, <i>et al.</i> (2014)
Poligalacturonasa	Cáscara de maracuyá	HMP	17-26	Vasco-Correa & Zapata Zapata (2017)
Cóctel enzimático	Calabaza	Intermedio	14	Ptichkina, <i>et al.</i> (2008)

^a LMP: pectinas de bajo grado de esterificación; HMP: pectinas de alto grado de esterificación; NR: no reportado

^b Cócteles enzimáticos

La pectina se puede extraer utilizando agua, *buffers*, agentes quelantes, ácidos y/o bases. Las propiedades de las pectinas extraídas, así como el nivel de pureza varían según el método utilizado. Los métodos más usados en el sector comercial son los que utilizan

ácidos, porque permiten maximizar los rendimientos y a su vez obtener fracciones de pectina enriquecidas en GalA (Chan, *et al.* 2017). Éstos métodos suelen emplear ácidos fuertes (clorhídrico, sulfúrico o nítrico, pH 1.0 a 3.0), altas temperaturas (80-95 °C) y tiempos relativamente cortos de extracción (30-120 minutos) (Marić, *et al.* 2018). Últimamente, de la mano con la tendencia hacia procesos más ecológicos y conscientes del uso energético, han surgido numerosas investigaciones acerca de otros métodos de extracción, entre los cuales se destacan la utilización de ultrasonido, microondas, o enzimas (Marić, *et al.* 2018). En este capítulo se estudiará la extracción de pectina mediante métodos enzimáticos.

Obtención mediante métodos enzimáticos

La obtención enzimática de pectina a partir de la materia prima conlleva una reacción heterogénea (en dos fases), en la que la enzima, que se encuentra en la fase líquida, debe actuar sobre el sustrato sólido. Se han reportado diferentes fuentes vegetales y se puede realizar utilizando diferentes enzimas. En la Tabla 7.1 se muestra una revisión bibliográfica donde se ve que no sólo se han usado pectinasas para extraer pectina, sino también celulasas, hemicelulasas, y cócteles enzimáticos con diversas actividades enzimáticas. La mayoría de los procesos de extracción se llevaron a cabo a temperaturas en el rango 40-50 °C (Adetunji, *et al.* 2017; Dominiak, *et al.* 2014; Wikiera, *et al.* 2015).

OBJETIVOS PARTICULARES DE ESTA SECCIÓN

- Evaluar el potencial de los pooles pectinolíticos antárticos de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 y *T. pullulans* 8E, así como el de las poligalacturonasas PGasaI y PGasaII parcialmente puras obtenidas en el Capítulo 5 en el proceso de obtención enzimática de pectina a partir de pomaza de lima.
- Evaluar el rendimiento y la productividad del proceso de obtención de pectina.
- Realizar una caracterización de la pectina extraída mediante la evaluación del contenido de ácidos urónicos y azúcares neutros.
- Analizar los grupos funcionales presentes en la pectina extraída y su grado de esterificación.
- Estimar su peso molecular.
- Según los resultados de la caracterización, evaluar la potencial utilización de la pectina obtenida.

Los ensayos detallados en este capítulo se llevaron a cabo en el Laboratorio de Glicobiotecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, México, bajo la supervisión del Dr. Juan Carlos Contreras Esquivel.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las enzimas

Para la evaluación de esta aplicación, se utilizaron dos extractos enzimáticos provenientes de cultivos de las levaduras antárticas: el estudiado en los capítulos anteriores de esta tesis, producido por *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 tal como se detalla en el Capítulo 4, y el extracto pectinolítico con actividad poligalacturonasa de la levadura antártica psicotolerante *T. pullulans* 8E, la cual fue previamente estudiada en nuestro laboratorio (Albanesi 2015; Cavello, *et al.* 2017; Herlein 2018). Este último extracto fue utilizado porque resultó promisorio al ser evaluada en otras aplicaciones biotecnológicas. Los detalles concernientes a su caracterización, que fue realizada en trabajos previos, se encuentran detallados en el Anexo V. Además, se probaron las enzimas PGasaI y PGasaII parcialmente purificadas a partir del extracto enzimático de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 utilizando el protocolo detallado en el Capítulo 5.

Extracción de pectina a partir de pomaza de lima

Para la obtención de pectina se utilizó pomaza de lima como materia prima. Esta fue obtenida a partir de una empresa local (Agroindustrias del Sur, OPD, Acapulco, Guerrero, México). La pomaza fue tamizada (Mesh $35 < \text{Ø} < 50$) y conservada en seco hasta su utilización.

Para la extracción de pectina, se utilizó el protocolo descrito en Dominiak, *et al.* (2014), con ligeras modificaciones. Se pesaron 1.60 g de pomaza en tubos cónicos y se agregó el título correspondiente de poligalacturonasa y se completó con agua, c.s.p. 50 ml. La incubación se llevó a cabo en un agitador orbital a 20 °C con una agitación de 150 rpm. El tiempo de extracción también fue variable y se indica en cada caso. Se realizó un control utilizando el mismo método, sin adición de enzima, en el cual se obtuvo la pectina

control (PC). Luego de la incubación, los tubos se centrifugaron a $4000 \times g$ durante 30 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, se separaron los residuos sólidos del sobrenadante y se inactivaron las enzimas exponiendo los sobrenadantes a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min, para luego filtrarlos utilizando filtros Whatman N° 1.

Una vez frío, se agregaron en cada caso dos volúmenes de etanol 96%, y se dejó reposando durante toda la noche para permitir la precipitación del polímero. Luego las pectinas fueron lavadas con etanol 96% dos veces, utilizando una tela muselina para filtrar el sólido. Una vez lavadas, las pectinas se dejaron secar en estufa a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta peso constante, se pesaron en balanza analítica y se conservaron a temperatura ambiente.

Rendimiento y productividad

El rendimiento de pectina fue calculado de la siguiente manera:

$$\text{Rendimiento en pectina (\%)} = \frac{P_p}{P_i} \times 100$$

Donde P_p es el peso seco de pectina obtenido y P_i es el peso seco inicial de la pomaza.

Para calcular la productividad se dividió el rendimiento por el tiempo de extracción (t, min):

$$\text{Productividad (P)} = \frac{\text{Rendimiento (\%)}}{t}$$

Efecto del título enzimático en el rendimiento

Para estudiar el efecto del título enzimático en el rendimiento en pectina obtenido se realizó la extracción tal como se detalló, incubando durante 30 minutos y con diluciones seriadas del extracto enzimático ($5\text{-}1000\text{ mU ml}^{-1}$). En este ensayo se utilizó el pool enzimático producido por la levadura *T. pulullans* 8E.

Efecto del tiempo de extracción

Una vez fijo el título enzimático se realizaron extracciones utilizando dos tiempos: 30 minutos y 120 minutos, con el método detallado anteriormente.

Efecto de la temperatura de extracción

Para evaluar el efecto de la temperatura en el rango 20-30 °C, se realizaron extracciones con un tiempo de extracción de 30 minutos a 20 °C, 25 °C y 30 °C, utilizando en método previamente descrito.

Caracterización de la pectina

Determinación del contenido de ácidos urónicos

Para la determinación del porcentaje de ácidos urónicos (GALA) en cada muestra de pectina se utilizó el método de *meta*-hidroxi difenil (Blumenkrantz & Asboe-Hansen 1973). Para ello, se colocó una solución de pectina (100 ppm, disuelta en acetato de amonio 50 mM, pH 5.0) en baño agua-hielo, y pasados 10 minutos se agregaron 1.2 ml de Na₂B₄O₇ (75 mM, disuelto en H₂SO₄). Los tubos fueron sometidos a ebullición durante 5 minutos y luego enfriados en un baño de agua-hielo. Pasados 15 minutos, se agregaron 20 µl de *m*-hidroxi-difenilo (0.15% p v⁻¹, disuelto en 0.5% p v⁻¹ NaOH) en las muestras evaluadas, mientras que para cada muestra se llevó a cabo un blanco, en el cual se agregaron 20 µl de NaOH 0.5% p v⁻¹. Los tubos se agitaron y luego de 20 minutos se determinó absorbancia a 520 nm. Se realizó una curva de calibración con GALA (0-150 ppm). Cada determinación se realizó por triplicado.

Determinación del contenido de azúcares neutros

Para la determinación de azúcares neutros, 0.25 ml de una solución de pectina (100 ppm, disuelto en acetato de amonio 50 mM, pH 5.0) se mezclaron con 1 ml de orcinol (1 g l⁻¹ en 80% v v⁻¹ H₂SO₄) en baño agua-hielo. Los tubos se calentaron a ebullición durante 5 minutos y se enfriaron en un baño de agua-hielo. Luego se agitaron y se determinó la absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro. Se realizó una curva de calibración con glucosa (0-150 ppm) (Tollier & Robin 1979). Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

Perfil de elución en cromatografía de intercambio aniónico***Diethylaminoethyl Sepharose (DEAE)***

Se estudió la distribución de azúcares en la muestra utilizando el protocolo descrito en Goldberg, *et al.* (1994), con algunas modificaciones. Dos ml de cada pectina (4000 ppm, disueltas en acetato de amonio 50 mM, pH 5.0) se inyectaron en una columna *Diethylaminoethyl Sepharose* (DEAE HiScreen CaptoTM, 5 ml), previamente equilibrada con *buffer* acetato de amonio (50 mM, pH 5.0). Luego de la inyección de la muestra, la columna se lavó con ocho volúmenes de columna del mismo *buffer*, y se aplicó un gradiente lineal en 10 volúmenes de columna, desde 0 a 1.0 M NH₄Cl (en *buffer* NH₄Ac, pH 5.0). Se recolectaron fracciones de 2 ml y se determinaron ácidos urónicos y azúcares neutros en cada una de ellas.

Espectroscopía infrarroja con transformadas de Fourier - Reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)

Se utilizó FTIR-ATR para analizar la composición de las pectinas obtenidas. Se obtuvieron los espectros de cada sólido (sin previo tratamiento) utilizando un espectrómetro Perkin Elmer *Frontier* FTIR, equipado con un accesorio de cristal de diamante ATR Universal. Se colectaron una serie de 16 escaneos para cada muestra, en el rango espectral 4000-600 cm^{-1} , con una resolución de 1 cm^{-1} . Se utilizó el software *Spectrum* (Perkin Elmer) para analizar los espectros y luego se realizó una corrección de la línea de base y se normalizaron las señales obtenidas.

El grado de esterificación (GE) de cada muestra se calculó a partir de la relación de las áreas de las bandas obtenidas a 1730 cm^{-1} (correspondiente a los grupos carboxílicos esterificados) y la suma de las áreas de las bandas obtenidas a 1730 y 1600 cm^{-1} (correspondiente al número total de grupos carboxílicos). Se realizó una curva de calibración a partir del análisis de pectinas comerciales con GE conocidos (0, 30, 60 y 90% de esterificación, Sigma-Aldrich) (Pappas, *et al.* 2004).

Determinación de viscosidad- Estimación del peso molecular de las pectinas

La viscosidad intrínseca de cada pectina obtenida se determinó mediante la medida de viscosidad. Se prepararon soluciones en concentraciones de 5, 8, 10, 12, 15 y 20 mg ml^{-1} de las diferentes pectinas, utilizando como solvente hexametáfosfato de sodio 1.0% p v^{-1} . La viscosidad de cada solución se determinó a 30 °C utilizando un viscosímetro de Ostwald (KIMAX, N° 350).

La viscosidad específica (η_{sp}) se define como:

$$\eta_{\text{sp}} = \frac{(t-t_0)}{t_0},$$

Donde t es el tiempo de flujo de la solución de pectina, y t_0 es el tiempo de flujo del solvente.

La viscosidad intrínseca es definida como el límite de la viscosidad reducida al acercarse la concentración a 0. Puede calcularse como el límite de $x \rightarrow 0$ en la siguiente gráfica (Christensen 1954):

$$\eta_r = \frac{\eta_{sp}}{c},$$

en función de C , donde η_r es la viscosidad reducida, η_{sp} es la viscosidad específica y C es la concentración de pectina (% p v⁻¹).

La viscosidad intrínseca obtenida a partir de esa gráfica se utilizó en la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada, para estimar el peso molecular (M_w) de la pectina (Sayah, *et al.* 2016):

$$[\eta] = k M_w^a,$$

Donde η es la viscosidad intrínseca, M_w es el peso molecular y k (0.0226 cm³ g⁻¹) y a (0.8215) son constantes previamente calculadas (Masuelli 2011).

Preparación de geles con pectina

Se propuso la formación de geles utilizando inulina como fuente de fibra, y azúcares de bajas calorías como lo son la alulosa y la isomalt. Además, se incorporaron fructooligosacáridos (FOS). Para la preparación se realizó un *mix* de sólidos de inulina:FOS:alulosa:isomalt con proporciones 20:20:30:30. La inulina y los FOS se obtuvieron de Ingredion (México), mientras que alulosa e isomalt se adquirieron en Dgrace y Palsgaard, ambos de México, respectivamente.

Se utilizó una de las pectinas obtenidas por métodos enzimáticos (utilizando pool enzimático 8E y tiempo de extracción 30 minutos) y dos pectinas comerciales:

Sigma#9135 y Fluka#76280. Cada pectina (2% p v⁻¹) se disolvió en agua destilada y se ajustó el pH a 3.0 usando ácido cítrico (10% p v⁻¹). Se disolvió el *mix* de sólidos en una concentración de 65% p v⁻¹ y se midieron los °Brix usando un refractómetro (ATAGO, Japón). 25 ml de la solución se calentaron a ebullición durante 15 minutos, y luego se alicuotaron en recipientes cilíndricos (1.5 cm diámetro x 3 cm altura) hasta una altura de 2.5 cm. La gelificación se desarrolló a temperatura ambiente (Bouaziz, *et al.* 2014). Se realizaron cuatro geles con cada pectina.

Análisis de textura

Para el análisis de textura se utilizó un Analizador de Textura (Stable Micro System, UK). Las pruebas se realizaron a una temperatura de 25 °C. Una sonda cilíndrica con diámetro de 10 mm se introdujo en las muestras a una velocidad de 1 mm s⁻¹, y se midió la fuerza aplicada para un 50% de compresión (es decir, 1.25 cm).

Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y fueron expresadas como la media ± desvío estándar. Se utilizaron test de ANOVA y se consideró significativa una diferencia con un p<0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de pectina a partir de pomaza de lima

La cáscara y pomaza de cítricos es, en la actualidad, la principal fuente de pectina, la cual se obtiene como un subproducto a partir de los residuos de la industria del jugo (Chan, *et al.* 2017). La extracción enzimática de pectina se presenta como una alternativa más ecológica ya que permite trabajar en soluciones acuosas, evitando así el desecho de grandes cantidades de ácidos, y permite trabajar a temperaturas menores, por lo que los procesos son energéticamente menos costosos. Como ya se mencionó, la mayoría de los estudios de extracción enzimática de pectina que existen en bibliografía se llevan a cabo a temperaturas entre 40 y 50 °C (Tabla 7.2). En esta tesis se intenta demostrar que las enzimas provenientes de microorganismos antárticos permiten realizar los mismos procesos a temperaturas menores, resultando en un ahorro energético.

El extracto pectinolítico producido por *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 fue estudiado y caracterizado en el Capítulo 3. El extracto enzimático producido por *T. pullulans* 8E también presenta actividades enzimáticas diversas, como poligalacturonasa, β -glucosidasa y pectinmetilesterasa. Esta levadura proviene, al igual que *Mrakia* sp. LP 7.1.2016, de una bioprospección realizada en una colección de levaduras de origen antártico, y demostró la producción en placa de varias enzimas de interés biotecnológico (Martinez, *et al.* 2016). El extracto pectinolítico producido por la levadura *T. pullulans* 8E ha sido estudiado previamente y demostró ser útil para la clarificación de jugos a temperatura ambiente, por lo que fue elegida para trabajar también en esta aplicación (Albanesi 2015; Cavello, *et al.* 2017). La caracterización parcial del extracto en términos de actividad óptima, pH óptimo, estabilidad a la temperatura y al pH y efecto de iones metálicos y EDTA se encuentra detallada en el Anexo V.

Se evaluó la capacidad de estos dos extractos pectinolíticos de extraer pectina a partir de pomaza de lima proveniente de una industria de jugo. Para evaluar cualitativamente la capacidad de los extractos se realizó una primera extracción a 20 °C utilizando un título de poligalacturonasa de 140 mU ml⁻¹ y un tiempo de extracción de 3 horas (Figura 7.4)

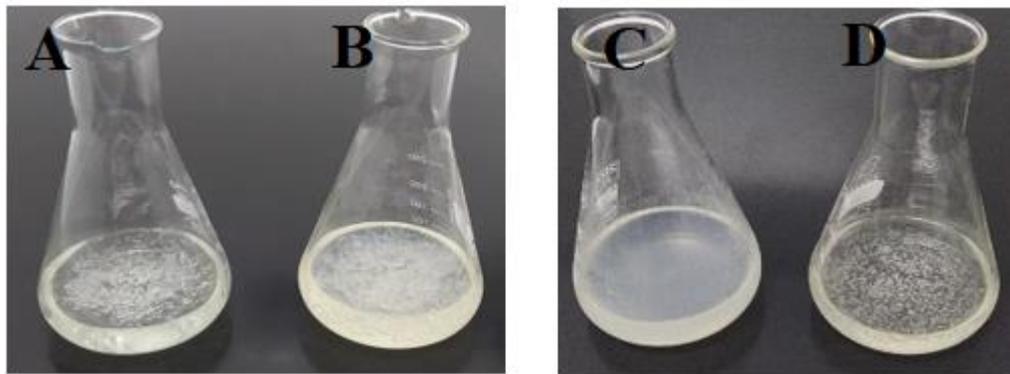


Figura 7.4 Evaluación de la capacidad de extraer pectina por parte de los extractos pectinolíticos de *T. pullulans* 8E (B) y *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 (C). A y D son los correspondientes controles.

En la Figura 7.4 se observa la precipitación de la pectina con etanol, luego de la extracción. Se observa que, sin enzima (tratamiento control) se obtiene cierto porcentaje de pectina (A y D, controles sin enzima). En B, tratamiento con el extracto 8E, podemos ver una mayor densidad de burbujas que quedan atrapadas dentro del polímero de pectina: el rendimiento en pectina es visualmente mucho mayor (Figura 7.4 B). Por otro lado, en C, tratamiento con el extracto LP 7.1.2016, se observa un líquido viscoso y turbio, sin la presencia de pectina precipitada. La turbidez observada puede deberse posiblemente a la presencia de oligosacáridos de pectina de bajo peso molecular, lo que indica que la pectina extraída fue parcialmente degradada, impidiendo su posterior precipitación.

La apariencia de la pectina antes y después del secado se muestra en la Figura 7.5.

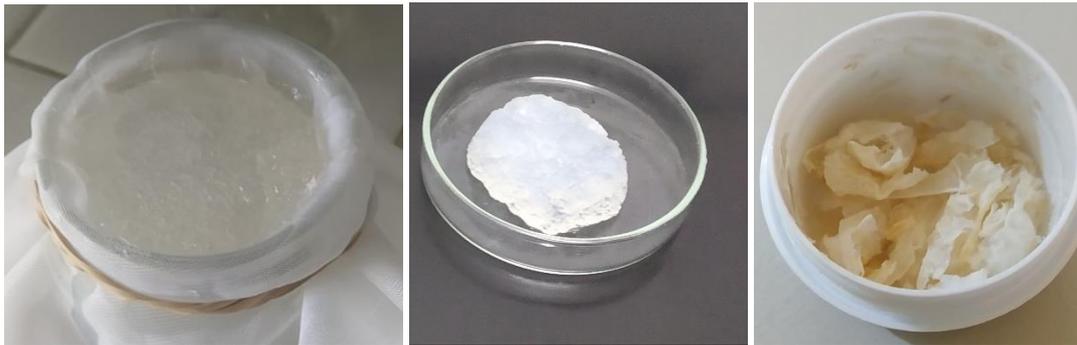


Figura 7.5 De izquierda a derecha: polímero de pectina precipitado, filtrado por tela muselina. Polímero antes de secar. Polímero seco.

Estos resultados demuestran que el extracto de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 no es útil en la extracción de pectina a partir de pomaza de lima. Una posible razón para la degradación de la pectina es la presencia de pectinmetilesterasa en el extracto enzimático, confirmada en el Capítulo 4. Las poligalacturonasas actúan sobre pectinas no esterificadas (PGA, o pectinas LM). Los cítricos poseen pectinas HM, por lo que las poligalacturonasas son las enzimas más adecuadas para la extracción a partir de esta fuente: la “desprenden” del sólido sin degradarla. Sin embargo, al hacerse presente la pectinmetilesterasa, se genera un efecto sinérgico con las poligalacturonasas, en el que, a medida que la primera desesterifica, la segunda depolimeriza, generando la degradación de la pectina. El extracto de *T. pullulans* 8E también posee actividad pectinmetilesterasa, sin embargo, puede que la relación entre esta actividad y la poligalacturonasa en el extracto sea menor.

Para evidenciar que la no-capacidad extractiva dependía de la presencia de esta enzima, se realizó la extracción usando las enzimas PGasaI y PGasaII purificadas a partir del mismo extracto enzimático. Para ello se utilizó una concentración de 15 mU ml⁻¹ de cada una (por separado) durante 21 h a 20 °C. Al deber usarse un título menor de enzima (debido a los bajos rendimientos de las purificaciones) se realizó la extracción en un

mayor tiempo (21 horas). Utilizando las enzimas purificadas sí se obtuvo pectina, la cual fue precipitada y los rendimientos se muestran en la Figura 7.6. Los rendimientos fueron de 12% y 10% utilizando la PGasaI y la PGasaII, respectivamente, mientras que el control obtuvo un rendimiento del 4%.

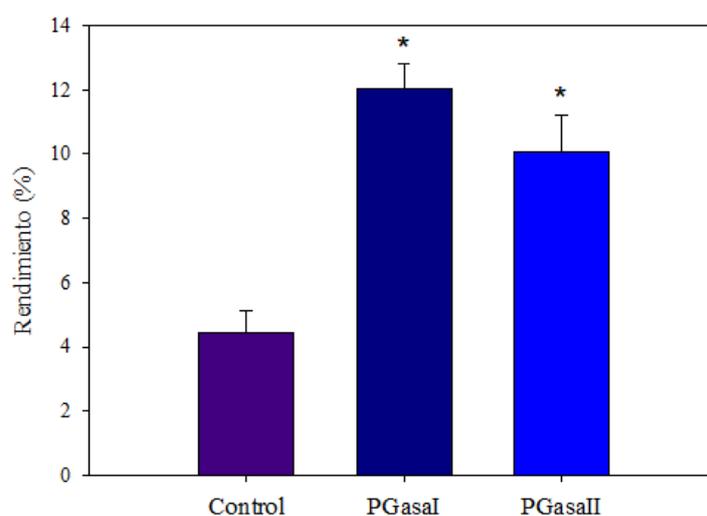


Figura 7.6 Rendimientos obtenidos en la obtención de pectina a partir de pomaza de lima con las enzimas PGasaI y PGasaII del extracto de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016. Condiciones: 15 mU ml⁻¹ PGasa, 21 h, 20 °C y 150 rpm.

Estos resultados muestran que ambas enzimas (PGasaI y PGasaII parcialmente purificadas) permiten la extracción de pectina, ya que se observó una diferencia significativa en el rendimiento respecto del control. Ambas pectinas obtenidas fueron parcialmente caracterizadas en las siguientes secciones. Sin embargo, dado que se disponía de pocas enzimas PGasaI y PGasaII purificadas, se continuó el estudio de la extracción con el extracto de *T. pullulans* 8E.

Efecto del título enzimática y el tiempo de extracción en el rendimiento y la productividad

Teniendo en cuenta los resultados de la sección previa, se continuó trabajando con el extracto pectinolítico obtenido con la levadura *T. pullulans* 8E. Se realizó la extracción con un tiempo fijo de 2 horas variando el título de PGasa (Figura 7.7).

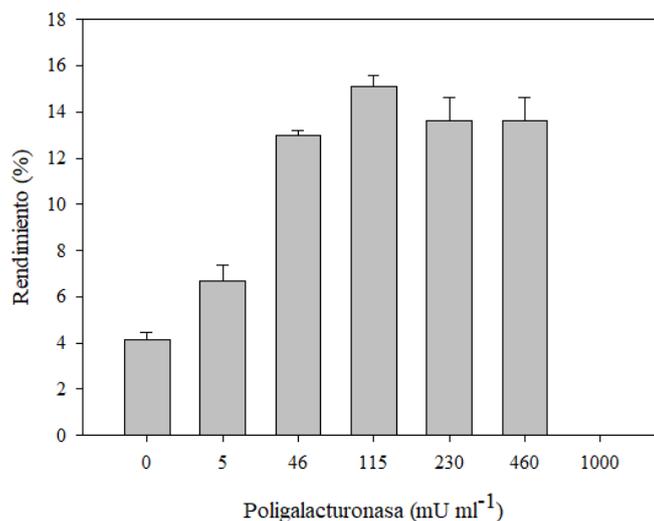


Figura 7.7. Efecto del título de poligalacturonasa en el rendimiento en pectina obtenido a partir de pomaza de lima usando el extracto pectinolítico de *T. pullulans* 8E. Condiciones de la extracción: 120 minutos, 20 °C y 150 rpm.

A partir de este ensayo se puede observar que título enzimático que permite maximizar el rendimiento de este proceso es 115 mU ml⁻¹, mientras que, a mayores títulos enzimáticos, como 1000 mU ml⁻¹ se observó lo mismo que con el extracto de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016: la pectina era degradada y no-precipitable. Es muy probable que en estas condiciones la actividad PME comience a ser evidente, cabe recordar que el extracto 8E posee actividad PME (Cavello, *et al.* 2017).

Con el título enzimático fijo en 115 mU ml⁻¹, se realizó la extracción a dos tiempos de incubación: 30 minutos y 120 minutos. El rendimiento y la productividad se calcularon en ambos casos y se muestran en las Figuras 7.8 y Tabla 7.2, junto con una revisión

bibliográfica. Los rendimientos obtenidos por el extracto 8E fueron significativamente diferentes al control, el cual obtuvo un rendimiento de 4.3%, sin diferencias a 30 y 120 minutos. El extracto de 8E logró un rendimiento de 11.91 ± 0.94 g pectina $100 \text{ g pomaza}^{-1}$ luego de 30 minutos, y $15.09 \pm 0.44\%$ luego de 120 minutos. Esto supone un aumento de 260% en el rendimiento respecto del control utilizando un tiempo de extracción de 30 minutos, porcentaje que aumenta hasta el 380% en la extracción de 120 min. Al observar otros trabajos, vemos que los rendimientos obtenidos están en línea con los obtenidos por Contreras Esquivel, *et al.* (1999) y Contreras-Esquivel, *et al.* (2006b), trabajos en los que se obtuvieron rendimiento de 17.4% y 17.6%, respectivamente. Sin embargo, una comparación directa de los rendimientos no sería del todo adecuada debido a a) la diferente naturaleza de las enzimas (o cócteles enzimáticos) utilizadas en cada estudio; b) la diferencia en la fuente utilizada como materia prima, y el procesamiento previo de la misma; y c) la temperatura utilizada en este trabajo, que no ha sido previamente utilizada en extracciones enzimáticas para esta aplicación. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo abren la puerta a la realización de más estudios en condiciones similares para poder realizar comparaciones más legítimas.

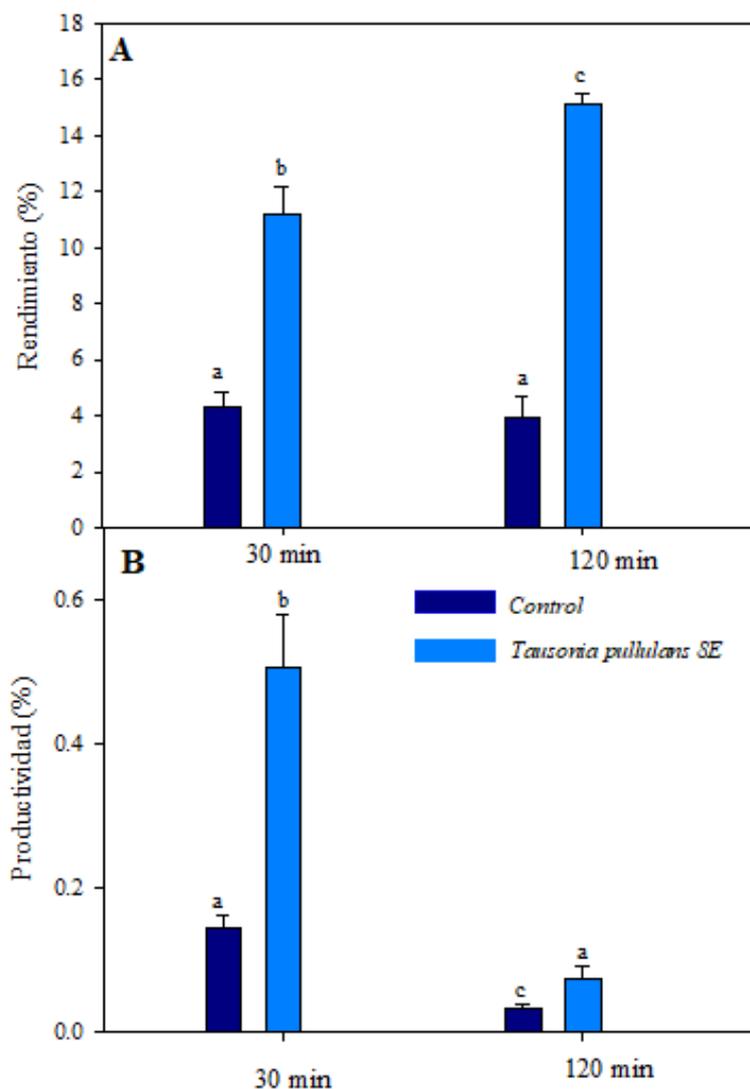


Figura 7.8 Rendimientos (A) y productividad (B) durante la extracción de pectina a partir de pomaza de lima, utilizando 115 mU ml^{-1} de poligalacturonasas del extracto de *T. pullulans* 8E. La incubación se llevó a cabo durante 30 y 120 minutos a 20°C con una agitación de 150 rpm. El control se llevó a cabo utilizando el mismo procedimiento, pero sin el agregado de enzima.

La productividad es un parámetro que tiene en cuenta el tiempo requerido para un proceso, el cual es muy importante al pensar en una aplicación industrial. La mayoría de los trabajos no consideran este parámetro, por lo que fue calculada para los distintos estudios mencionados en la Tabla 7.2, y comparado con las obtenidas en este trabajo. La máxima productividad obtenida con el extracto de 8E fue en la extracción de 30 minutos, con $0.40 \pm 0.07 \text{ g pectina } 100 \text{ g pomaza}^{-1} \text{ min}^{-1}$. La productividad se redujo a 0.13 ± 0.01

g pectina 100 g pomaza⁻¹ min⁻¹ cuando el proceso se llevó a cabo en 120 minutos (Figura 7.8 y Tabla 7.2). En el caso de las extracciones llevadas a cabo con las PGasasI y PGasasII, se obtuvieron productividades bajas debido al tiempo de extracción implementado: 0.08 y 0.06 g pectina 100 g pomaza⁻¹ min⁻¹, respectivamente.

La productividad obtenida para las extracciones con el extracto enzimático de 8E obtuvo un valor muy alto en este estudio en comparación con otros, ya que la mayoría de los estudios emplean tiempos de extracción muy largos (Tabla 7.2). La innovación de realizar el proceso a temperaturas más bajas como 20 °C, utilizando enzimas que son activas a estas temperaturas, combinado con la reducción del tiempo del proceso, podría resultar en una disminución importante del costo energético del proceso, lo cual se considera una ventaja desde el punto de vista económico y ecológico.

Tabla 7.2 Reportes de obtención de pectina utilizando distintas enzimas y a partir de diferentes fuentes

Enzima	Material	Temperatura de extracción (°C)	Rendimiento ^a	Productividad ^b	Referencia
Poligalacturonasa (<i>Tausonia pullulans</i> 8E)	Pomaza de lima	20	11.21 (30 min ^c)	0.40	Esta tesis
			15.09 (120 min)	0.13	
PGasal PGasalII (<i>Mrakia</i> sp. LP 7.1.2016)	Pomaza de lima	20	12.04 (1260 min)	0.08	Esta tesis
			10.08 (1260 min)	0.06	
Laminex C2K (DuPont Industrial Biosciences)	Cáscara de lima	50	22.5 (240 min)	0.09	Dominiak, <i>et al.</i> (2014)
Validase (TRL, DSM)	Cáscara de lima	50	26.3 (240 min)	0.11	Dominiak, <i>et al.</i> (2014)
Multifect B (DuPont Industrial Biosciences)	Cáscara de lima	50	17.7 (240 min)	0.07	Dominiak, <i>et al.</i> (2014)
Celulasa (Sigma Aldrich) y xilanasa (DSM)	Cladodios de <i>Opuntia ficus indica</i>	55-60	16.67 (720 min)	0.02	Bayar, <i>et al.</i> (2018)
Pectinasa (<i>Geotrichum klebahnii</i> ATCC 42397)	Albedo de limón	37	28.0 (360 min)	0.08	Zapata, <i>et al.</i> (2009)
Viscozyme (Novozymes)	Hojas de té verde	30	8.5 (180 min)	0.05	Zhang, <i>et al.</i> (2020)
Aladdin (Bio-Chem)	Pomaza de vino de espino	60	62.29 (240 min)	0.26	Sun, <i>et al.</i> (2020)
Celluclast (Novozymes)	Pomaza de manzana	50	18.95 (1080 min)	0.02	Wikiera, <i>et al.</i> (2015)
Celluclast	Pomaza de kiwi	25	4.48 (30 min)	0.15	Yuliarti, <i>et al.</i> (2015)
Celluclast	Colza	50	5.41 (270 min)	0.02	Jeong, <i>et al.</i> (2014)
Celluclast	Pomaza de manzana	50	8.08 (1440 min)	0.006	Dranca & Oroian (2019)

Viscozyme (Novozymes) ^d	Pomaza de yuza	40	7.3 (60 min)	0.12	Lim, <i>et al.</i> (2012)
Pectinasa (<i>Aspergillus kawachi</i>)	Cáscara de limón	50	17.4 (120 min)	0.15	Contreras Esquivel, <i>et al.</i> (1999)
Poligalacturonasa (<i>Aspergillus kawachii</i>)	Cáscara de limón	37	23.3 (360 min)	0.06	Franchi, <i>et al.</i> (2014)
Poligalacturonasa (<i>Aspergillus niger</i>)	Pomaza de limón	37	17.6 (720 min)	0.02	Contreras-Esquivel, <i>et al.</i> (2006b)
Poligalacturonasa (<i>Geotrichum klebahnii</i> ATCC 42397)	Cáscara de granadilla	30	17-25.8 (360 min)	0.05-0.07	Vasco-Correa & Zapata Zapata (2017)
Extracto <i>Aspergillus awamori</i>	Calabaza	45	14 (180 min)	0.08	Ptichkina, <i>et al.</i> (2008)
Viscoferm (Novozymes)	Pomaza de manzana	50-60	17.86 (1080 min)	0.02	Wikiera, <i>et al.</i> (2015)

Laminex: pectinasa, celulasa, xilanasa, hemicelulasa, arabinoxilanasa; **Validase:** pectinasa, celulasa, hemicelulasa, xilanasa, mananasa, β -glucanasa; **MultifectB:** pectinasa, celulasa, hemicelulasa, β -glucanasa; **Alladin:** celulasa; **Viscozyme:** glucanasa; **Celluclast:** celulasa; **Viscoferm:** xilanasa, β -glucosidasa, celulasa; **Extracto de *Aspergillus awamori*:** xilanasa, celulasa, β -glucosidasa, pectinasa.

^agramos de pectina cada 100 g de materia prima inicial.

^bValores de productividad expresados como g de pectina cada 100 g material inicial por minuto, calculados como se indica en materiales y métodos. ^cTiempo de extracción. ^dProceso combinado con método físico.

Efecto de la temperatura en la extracción de pectina

El efecto de la temperatura en el rendimiento en pectina obtenido se evaluó en el rango 20 – 30 °C (Figura 7.9). Al aumentar la temperatura de incubación se observó un incremento muy leve en el rendimiento, similar al aumento obtenido en el control. Por lo tanto, a partir de estos resultados se puede concluir que la extracción de pectina con este extracto puede realizarse a temperatura ambiente obteniendo rendimientos comparables siempre que ésta se mantenga en el rango 20-30 °C.

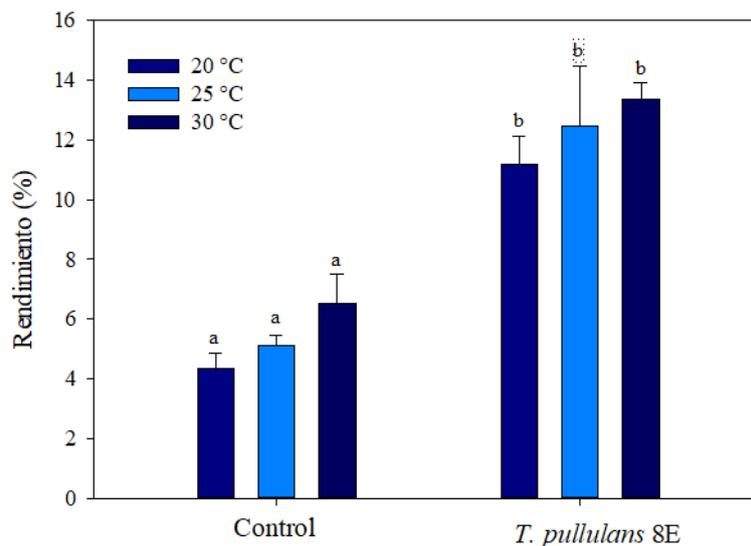


Figura 7.9 Rendimiento en pectina obtenido en la extracción con el extracto de *T. pullulans* 8E realizada a 20 °C, 25 °C y 30 °C, cada una con su control. Condiciones: 30 minutos, 115 mU ml⁻¹ PGasa, 150 rpm.

Escalado de la producción de pectina utilizando el extracto 8E

Con el objetivo de obtener pectina suficiente para ensayos de caracterización y gelificación, se realizó una extracción de pectina escalando el proceso 10 veces (Figura 7.10). Se obtuvieron rendimientos acordes a los obtenidos anteriormente.

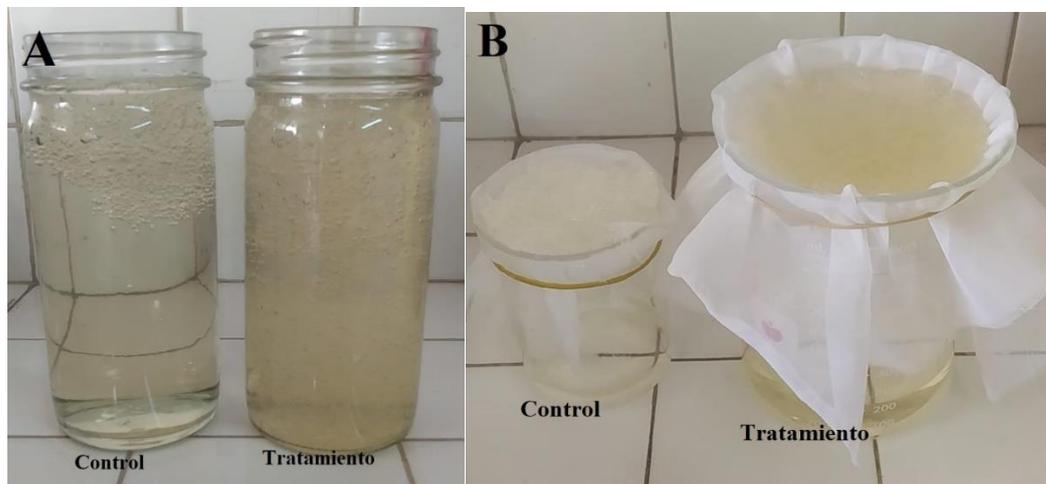


Figura 7.10 Escalado de la obtención de pectina a partir de pomaza de lima utilizando el extracto pectinolítico producido por la levadura antártica *T. pullulans* 8E. Precipitación de la pectina control y con tratamiento enzimático (A) y pectina obtenida luego del lavado en cada caso (B).

Caracterización de las pectinas obtenidas

Tanto los rendimientos como las características de las pectinas extraídas son importantes cuando se estudia la obtención de pectina. Las siguientes pectinas, a las cuales se les otorga la siguiente nomenclatura, fueron caracterizadas:

- ✓ **PC:** pectina control
- ✓ **P30:** pectina obtenida adicionando el extracto de *T. pullulans* 8E, con un tiempo de extracción de 30 minutos.
- ✓ **P120:** pectina obtenida adicionando el extracto de *T. pullulans* 8E, con un tiempo de extracción de 120 minutos.

- ✓ **PPG1:** pectina obtenida adicionando la poligalacturonasa I purificada en el Capítulo 5 a partir del extracto producido por *Mrakia* sp. LP 7.1.2016.
- ✓ **PPG2:** pectina obtenida adicionando la poligalacturonasa II purificada en el Capítulo 5 a partir del extracto producido por *Mrakia* sp. LP 7.1.2016.

Contenido de ácidos urónicos y azúcares neutros

Al analizar la PC se obtuvo un contenido de urónicos de $42.8 \pm 7.4\%$, mientras que los valores para P30 y P120 fueron muy similares entre sí y difieren del control: $46.3 \pm 3.0\%$ y $44.7 \pm 4.0\%$, respectivamente (Tabla 7.3). La PPG1 y la PPG2 obtuvieron $85.0 \pm 4.7\%$ y $64.3 \pm 5.7\%$ de urónicos, respectivamente.

Con respecto al contenido de azúcares neutros, se obtuvo un contenido de $49.9 \pm 4.0\%$ y $53.1 \pm 5.6\%$ para las pectinas P30 y P120, respectivamente. La PC tuvo $55.8 \pm 5.2\%$ y las PPG1 y PPG2 tuvieron $32.4 \pm 5.6\%$ y $31.1 \pm 10.3\%$, respectivamente.

En contenido de ácidos urónicos en las pectinas obtenidas con el extracto de 8E fue menor al reportado en otras pectinas obtenidas por métodos enzimáticos: Dranca & Oroian (2019) obtuvieron una pectina con 97% p p⁻¹ de urónicos, y Franchi, *et al.* (2014) y Wikiera, *et al.* (2015) obtuvieron pectinas con valores cercanos al 60%. Esta propiedad en las pectinas estudiadas en este capítulo, junto con la proporción de azúcares que resultó alta (cercana al 50%, Tabla 7.3) podría estar indicando una alta proporción de dominios de ramnogalacturonano en la pectina obtenida, recordemos que esta región se caracteriza por poseer numerosas ramificaciones con azúcares de distinta naturaleza. El contenido de ácidos urónicos obtenido para las pectinas PPG1 y PPG2, sin embargo, fue alto, más en concordancia con los reportes mencionados, y la proporción de azúcares, más baja. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la pectina debería contener al menos un 65% de ácidos urónicos (Willats, *et al.* 2006). Una

posible explicación para esta diferencia en porcentaje es que, en el caso del pool enzimático 8E utilizado, ante un mayor título enzimático se pudieron ver fuertemente atacadas las porciones de homogalacturonano, fácilmente disponibles para las poligalacturonasas del extracto enzimático, dejando una proporción mayor de ramnogalacturonanos. Sin embargo, en ese caso, se habría observado también una mayor proporción de ácidos urónicos en la PC. La gran proporción de azúcares podría no deberse únicamente a la presencia de ramificaciones de la pectina, sino también a la co-precipitación de azúcares presentes en el material de partida (Wikiera, *et al.* 2015). El análisis del patrón de elución en una columna de intercambio iónico que será analizado en las próximas secciones es de ayuda para analizar la presencia de este tipo de azúcares.

Tabla 7.3 Propiedades de las pectinas caracterizadas. Se reportan las medias \pm desvío estándar de tres determinaciones

Propiedad	P30	P120	PPG1	PPG2	PC
Contenido de ácidos urónicos (%)	44.7 \pm 4.0	46.3 \pm 3.0	85.0 \pm 4.7	64.3 \pm 5.7	42.8 \pm 7.4
Contenido de azúcares neutros (%)	49.9 \pm 4.0	53.1 \pm 5.6	32.4 \pm 5.6	31.1 \pm 10.3	55.8 \pm 5.2
Grado de esterificación (%)	71.7	69.1	87.9	73.4	60.8
Viscosidad intrínseca (dl g ⁻¹)	0.2726	0.3331	0.2038	0.3094	1.6082
Peso molecular estimado (g mol ⁻¹)	9.5 x 10 ⁴	1.2 x 10 ⁵	6.6 x 10 ⁴	1.1 x 10 ⁵	8.2 x 10 ⁵

Estudio de distribución de azúcares mediante cromatografía de intercambio aniónico

La distribución de azúcares en las muestras de pectina se estudió en las pectinas PC, P30 y P120. La corrida cromatográfica en la columna de intercambio iónico permite diferenciar entre la proporción de azúcares neutros que se encuentran covalentemente unidos a la molécula de pectina y aquellos que se encuentran en forma libre (Contreras-

Esquivel, *et al.* 2006b). Los azúcares neutros libres no se ven retenidos en el relleno de dietil amino-etil (DEAE), por lo que eluyen con el *flowthrough* o fracción no retenida de la columna. Por el contrario, los azúcares que están fuertemente unidos a la pectina eluyen junto con los ácidos urónicos, que se retienen en la columna gracias a su carga negativa. Las tres pectinas analizadas mostraron la presencia de ambos tipos de azúcar (Figura 7.11). Se observó una alta proporción de azúcares neutros unidos covalentemente a los ácidos urónicos, en concordancia con los resultados obtenidos previamente, sugiriendo la presencia de ramnogalacturonanos (Tabla 7.3).

Varias cosas pueden ser analizadas a partir de las eluciones obtenidas: por un lado, las tres pectinas analizadas eluyeron a una concentración de cloruro de amonio relativamente baja (~ 0.1 M), esto concuerda con su alto grado de esterificación. Al encontrarse la pectina más esterificada, habría menor grupos carboxilo cargados negativamente, una baja densidad de carga se condice con una interacción con el relleno menos fuerte. Una temprana elución es coherente con un mediano a alto grado de esterificación.

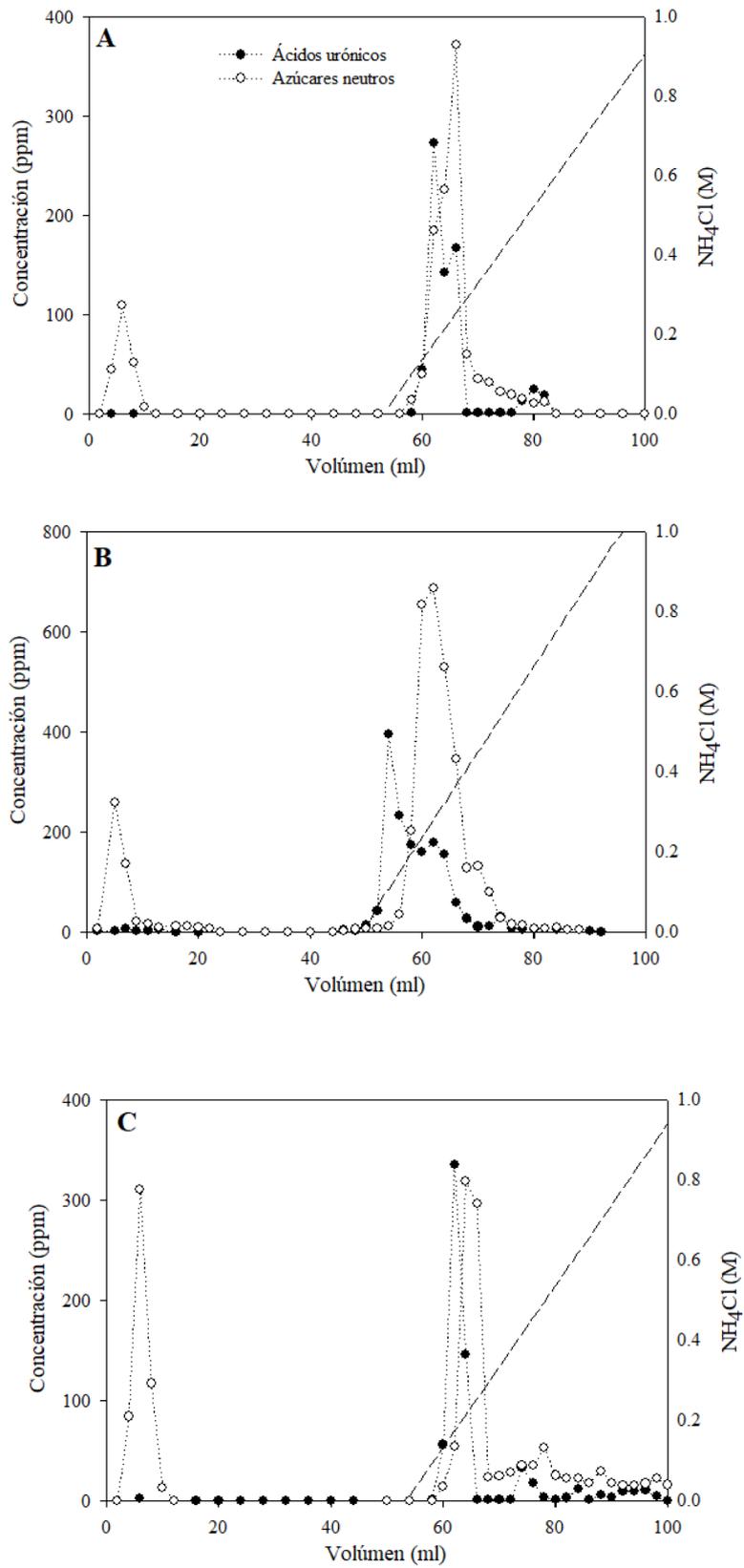


Figura 7.11 Perfil de elución en la columna DEAE HiScreen Capto™ de las pectinas P30 (A), P120 (B) y PC (C). En cada fracción recolectada se determinaron ácidos urónicos y azúcares neutros.

La P120 eluyó en un único pico de ácidos urónicos, sugiriendo la presencia de una población homogénea de pectina. Por su lado, los cromatogramas de P30 y PC muestran además una pequeña población de ácidos urónicos que eluyen a una concentración iónica más alta, demostrando la presencia de más de una población. La presencia de distintas poblaciones de pectina fue previamente descrita por Contreras-Esquivel, *et al.* (2006b).

Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier - reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)

El espectro FTIR nos permite adquirir información estructural y de grupos funcionales presentes en las muestras de pectina. En la Figura 7.12 se muestran los espectros obtenidos para cada una de las pectinas obtenidas, y una comercial: Sigma#9135.

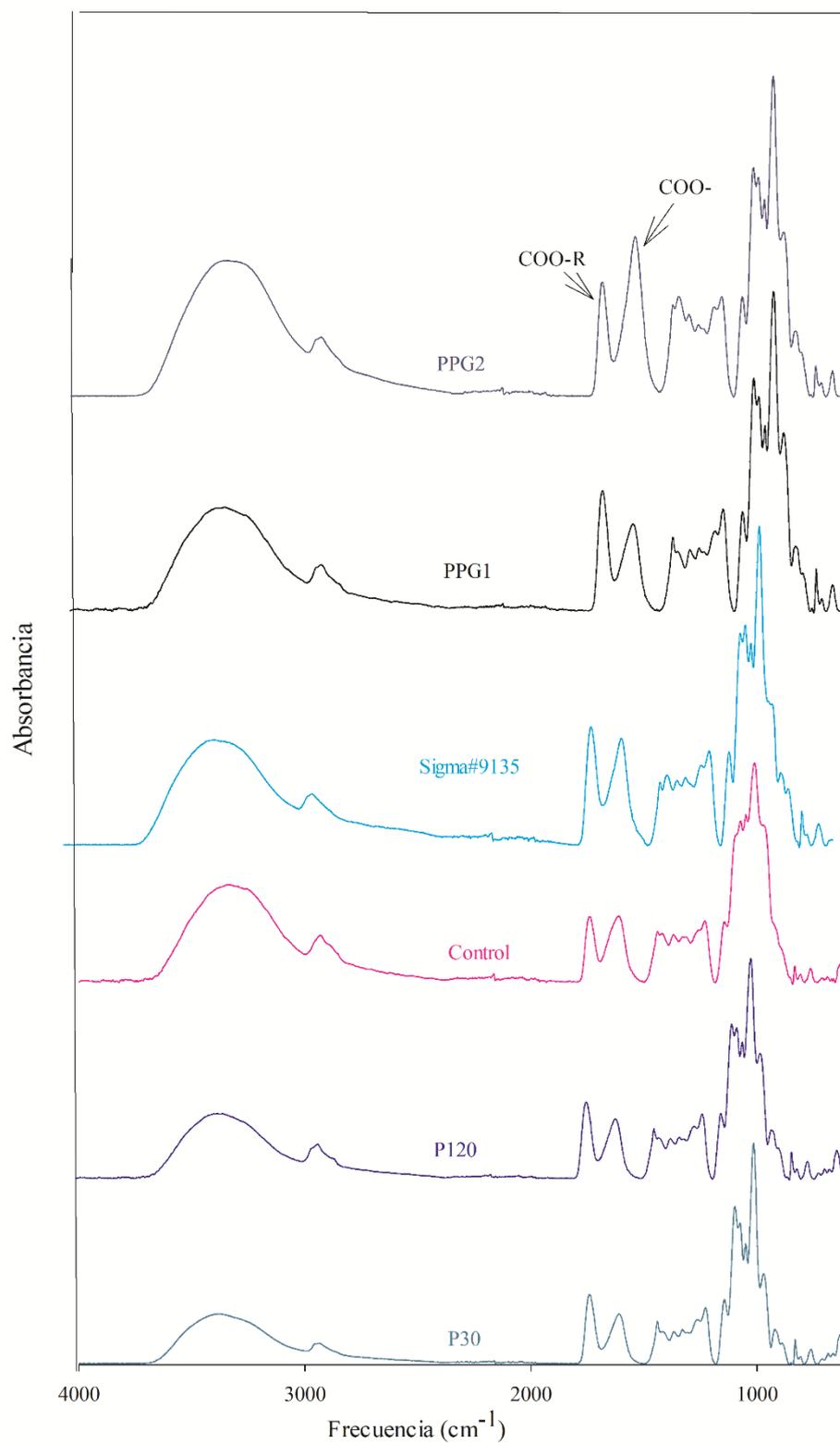


Figura 7.12 Espectros FTIR-ATR de as pectinas obtenidas y la pectina comercial Sigma#9135.

Las áreas de absorción observadas en la región 3000-3700 cm^{-1} representa las vibraciones de *stretching* de los grupos –OH. Esta banda ancha ha sido previamente observada en el análisis de moléculas de pectina, y se debe a la presencia de las redes de puentes de hidrógeno en el esqueleto de ácido galacturónico (Thu Dao, *et al.* 2021).

El pico de absorción a 2930 cm^{-1} , presente en todas las pectinas analizadas, corresponde al *stretching* de los grupos O-CH₃ de los metil ésteres de los ácidos galacturónicos (Lim, *et al.* 2012).

Las bandas de absorción en la región entre 800 y 1300 cm^{-1} son generalmente consideradas como la región *fingerprint* de polisacáridos de la pectina (Dranca & Oroian 2019; Thu Dao, *et al.* 2021). El patrón obtenido en esta región fue muy similar entre pectinas obtenidas de manera enzimática y la pectina comercial Sigma #9135, mientras que se observa ligeramente diferente en la pectina control.

En todos los casos se observaron patrones de pectinas con altos grados de esterificación: se observaron tanto las señales de grupos carboxílicos libres (1630 – 1600 cm^{-1} , COO–) como las de grupos carboxilos esterificados (1760 – 1730 cm^{-1} , C=O). Haciendo una relación entre estas dos áreas, y comparando con una curva de calibración realizada con pectinas de grado de esterificación conocido se pudo calcular el grado de esterificación de las pectinas (Tabla 7.3) (Pappas, *et al.* 2004; Thu Dao, *et al.* 2021). La pectina control tuvo un valor de 60.8%, mientras que P30 y P120 tuvieron 71.7% y 69.1%, respectivamente. Estos valores fueron muy similares a los observados en la pectina comercial: 64.1%. En el caso de las pectinas PPG1 y PPG2, los valores obtenidos fueron ligeramente más altos: 87.9% y 73.4%, respectivamente.

El grado de esterificación de una pectina depende tanto del método de extracción utilizado para obtenerla como de la fuente que se utiliza como materia prima (Bayar, *et al.* 2018). Algunos materiales de partida, como es el caso de las hojas de té verde, la

pomaza de vino de espino, o la pomaza de yuza, derivaron en la extracción de LMP (Lim, *et al.* 2012; Sun, *et al.* 2020; Zhang, *et al.* 2020), mientras que las pectinas obtenidas a partir de cáscara, albedo y pomaza de limón y de manzana culminaron, por lo general, en la obtención de HMP (Tabla 7.2) (Dranca & Oroian 2019; Zapata, *et al.* 2009). Sin embargo, cuando se utilizan métodos enzimáticos para la obtención, la naturaleza de las enzimas involucradas en el proceso es un factor a tener en cuenta, y que podría potencialmente modificar la estructura de la pectina. Por ejemplo, Contreras-Esquivel, *et al.* (2006b) analizaron la pectina obtenida a partir de pomaza de limón utilizando pectinasas de *Aspergillus kawachi* y encontraron que la pectina obtenida era LMP, aun cuando es sabido que las pectinas presentes en los cítricos son HMP. En la industria alimenticia se prefieren las HMP frente a las LMP, ya que las primeras son las útiles para gelificar mermeladas y confituras mediante el agregado de azúcar.

Medida de viscosidad y estimación del peso molecular de las pectinas

La medida de viscosidad permitió estimar un peso molecular para las pectinas, el cual se muestra en la Tabla 7.3. Las pectinas obtenidas utilizando enzimas obtuvieron pesos moleculares entre 6.6×10^4 y 1.2×10^5 g mol⁻¹, mientras que la PC obtuvo un peso molecular estimado de 8.2×10^5 g mol⁻¹. En el caso de la pectina comercial Sigma #9135, se obtuvo un peso molecular de 4.0×10^5 g mol⁻¹. Se observa que las pectinas obtenidas con el extracto de 8E obtuvieron un peso molecular menor: probablemente, a medida que la pectina es extraída a partir de la materia prima, también es parcialmente hidrolizada debido a la presencia de poligalacturonasas.

Los pesos moleculares obtenidos estuvieron en concordancia con otros reportados para pectinas obtenidas mediante métodos enzimáticos (Contreras-Esquivel, *et al.* 2006a; Kar & Arslan 1999).

Preparación de geles de pectina

Para la preparación de los geles se propuso la utilización de inulina como fuente de fibra. La inulina es considerada un ingrediente funcional ya que se han demostrado sus efectos benéficos en la salud (Kaur & Gupta 2002). Por otro lado, los fructooligosacáridos, también utilizados en la formación de los geles, son oligosacáridos vegetales muy estudiados en los últimos tiempos debido a sus importantes efectos benéficos en la salud. Se utilizan como ingredientes en varios alimentos, ya que son considerados como fibra dietética libre en calorías (Sabater-Molina, *et al.* 2009). Los azúcares alulosa e isomalt son bajos en calorías, por lo que se utilizan actualmente para reemplazar los azúcares tradicionales, obteniendo productos dulces pero menos calóricos (Sentko & Willibald-Ettle ; 2012; Zhang, *et al.* 2016). Todos estos ingredientes fueron combinados con la pectina para obtener geles. Lo primero que se observó, visualmente, es que los geles producidos con la pectina obtenida por métodos enzimáticos fueron menos turbios (Figura 7.13).

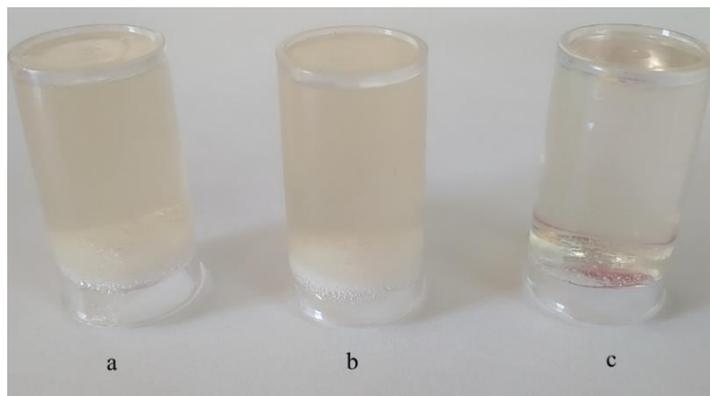


Figura 7.13 Geles con pectina-inulina-FOS y azúcares bajos en calorías, preparados con las pectinas comerciales Fluka#76280 (a), Sigma#9135 (b) y la P30, obtenida mediante métodos enzimáticos (c).

Los °Brix, determinados luego de la disolución de los sólidos, fueron 42.4, 42.2 y 41.6 para los geles con Fluka#76280, Sigma#9135 y P30, respectivamente. Las fuerzas de compresión obtenidas para los tres tipos de geles se muestran en la Tabla 7.4.

Tabla 7.4 Fuerza de compresión (50% o 1.25 cm de compresión) de los geles obtenidos con pectinas comerciales (Fluka#76280 y Sigma#9135) y pectina extraída con el extracto pectinolítico de *T. pullulans* 8E durante 30 minutos. Se muestra el promedio y el desvío estándar de 4 mediciones.

Pectina utilizada	Fuerza (N)
Fluka#76280	1.44 ± 0.57
Sigma#9135	1.23 ± 0.18
Extraída con extracto <i>T. pullulans</i> 8E	0.23 ± 0.02

Los test de penetración en un análisis de textura permiten determinar la firmeza de un gel, la cual puede definirse como la fuerza requerida para lograr determinada deformación. En la Tabla 7.4 se muestran las fuerzas obtenidas para un 50% de deformación de los geles, donde se puede observar que la fuerza requerida para deformar los geles preparados con la pectina obtenida enzimáticamente resultó mucho menor que la de aquellos geles en los que se utilizaron pectinas comerciales. En comparación, la fuerza de deformación de un gel formado con pectina e inulina en Bouaziz, *et al.* (2014) obtuvo un valor de 5.7 N, aunque la concentración de pectina en ese caso fue del doble que la utilizada en este trabajo (4% p v⁻¹). Una fuerza menor implica una menor firmeza, sugiriendo que los geles obtenidos en este trabajo son más blandos que los obtenidos con pectinas comerciales. Hay dos posibles explicaciones para el fenómeno observado: por un lado, como se mencionó anteriormente, el porcentaje de ácidos urónicos obtenidos fue bajo en comparación con otros trabajos. Dado que son justamente los puentes de hidrógeno formados a partir de unidades de ácidos urónicos los que estabilizan los geles, el bajo porcentaje de estos ácidos puede tener que ver con la imposibilidad de formar

geles más fuertes. Las interacciones hidrofóbicas, que también mantienen estables estas estructuras, son menos fuertes al encontrarse la pectina más ramificada. Otra posible razón, y quizás la más probable, tiene que ver con el peso molecular de la pectina obtenida, la cual fue considerablemente menor a la obtenida para la pectina comercial #9135. El peso molecular de la pectina influye fuertemente en la formación del gel (Chan, *et al.* 2017). Sea cual fuere el motivo, este ensayo es de utilidad para abordar la posible utilización de esta pectina obtenida con el extracto 8E: podría ser útil para formar geles más bien laxos, los cuales son requeridos en algunos alimentos específicos, o también para aportar textura en panificados y otros productos de pastelerías.

CONCLUSIONES DE ESTA SECCIÓN

El extracto pectinolítico producido por la levadura *T. pullulans* 8E permitió extraer pectina, pero el producido por *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 no, demostrando que diferentes extractos pectinolíticos de diferentes levaduras antárticas pueden ser útiles en diferentes procesos. Es necesario seguir enriqueciendo el conocimiento acerca de los extractos enzimáticos activos en frío de diversos orígenes.

Por su parte, el extracto pectinolítico producido por 8E resultó útil para extraer pectina a partir de pomaza de lima. El rendimiento fue promedio, pero la productividad se destacó entre otros trabajos. Además, se destaca la temperatura de extracción baja, que permite la reducción de costos energéticos.

El extracto pectinolítico producido por *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 no es útil en la obtención de pectina, sin embargo, se observó que las PGasas purificadas a partir de este extracto sí permiten obtener pectina a partir de pomaza de lima, y las propiedades de estas pectinas fueron *a priori* muy buenas, especialmente el alto porcentaje de ácidos urónicos obtenido y el alto grado de esterificación. La limitante de utilizar enzimas puras en este proceso es 1) el alto costo de purificación de las mismas por métodos tradicionales y 2) el bajo rendimiento obtenido en este proceso. En este sentido, y habiendo demostrado que estas PGasas son útiles para este proceso sería interesante a futuro una posible producción heteróloga de estas enzimas para la obtención de las mismas en mayores cantidades.

La pectina obtenida a partir de la extracción con el extracto pectinolítico producido por 8E posee características funcionales interesantes, como su alto grado de esterificación. Permitted formar geles con fibra, FOS y azúcares de bajo contenido calórico. El estudio de la formación de este tipo de geles más saludables es escaso, haciendo de este trabajo un aporte considerable a este tópico de estudio. Los geles formados fueron laxos, podrían ser útiles en alimentos más bien blandos.

Gran parte de los resultados de este capítulo fueron publicados en el siguiente artículo:
Pectin extraction from lime pomace by cold-active polygalacturonase-assisted method
(2022) *International Journal of Biological Macromolecules*, 209, p. 290-298. **BEZUS, B.**,
ESQUIVEL, J. C. , CAVALITTO, S. & CAVELLO, I.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.019>.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADETUNJI, L. R., ADEKUNLE, A., ORSAT, V. & RAGHAVAN, V. 2017. Advances in the pectin production process using novel extraction techniques: a review. *Food Hydrocolloids*, 62, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.015>.
- ALBANESI, A. P. 2015. Grade. Búsqueda y caracterización de microorganismos adaptados al frío con capacidad de degradar sustancias pécticas presentes en residuos agroindustriales. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas, ^La Plata, Argentina^,
- AXELOS, M. & THIBAUT, J. 1991. The chemistry of low-methoxyl pectin gelation. In R. H. Walter eds. *The Chemistry and Technology of Pectin*. Academic Press, San Diego, 109-108
- BAYAR, N., FRIJI, M. & KAMMOUN, R. 2018. Optimization of enzymatic extraction of pectin from *Opuntia ficus indica* cladodes after mucilage removal. *Food Chemistry*, 241, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.051>.
- BLUMENKRANTZ, N. & ASBOE-HANSEN, G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90377-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90377-1).
- BOUAZIZ, M. A., RASSAOUI, R. & BESBES, S. 2014. Chemical composition, functional properties, and effect of inulin from tunisian *Agave americana L.* leaves on textural qualities of pectin gel. *Journal of Chemistry*, 2014, <https://doi.org/10.1155/2014/758697>.
- BRACCINI, I. & PÉREZ, S. 2001. Molecular basis of Ca⁺²-induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. *Biomacromolecules*, 2, <http://doi.org/10.1021/bm010008g>.
- CAO, L., LU, W., MATA, A., NISHINARI, K. & FANG, Y. 2020. Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review. *Carbohydrate Polymers*, 242, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116389>.
- CAVELLO, I., ALBANESI, A., FRATEBIANCHI, D., GARMEDIA, G., VERO, S. & CAVALITTO, S. 2017. Pectinolytic yeasts from cold environments: Novel findings of *Guehomyces pullulans*, *Cystofilobasidium infirmominiatum* and *Cryptococcus adeliensis* producing pectinases. *Extremophiles*, 21, <http://doi.org/10.1007/s00792-016-0904-0>.
- CHAN, S. Y., CHOO, W. S., YOUNG, D. J. & LOH, X. J. 2017. Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology. *Carbohydrate Polymers*, 161, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.033>.
- CHRISTENSEN, P. E. 1954. Methods of grading pectin in relation to the molecular weight (intrinsic viscosity) of pectin. *Journal of Food Science*, 19, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1954.tb17435.x>.

- CIRIMINNA, R., FIDALGO, A., DELISI, R., ILHARCO, L. M. & PAGLIARO, M. J. A. F. I. H.-T. 2015. Pectin production and global market. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 27, <http://doi.org/10.1002/bbb.1551>.
- CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C., ESPINOZA-PÉREZ, J. D., MONTANEZ, J. C., CHARLES-RODRIGUEZ, A. V., RENOVATO, J., AGUILAR, C. N., RODRIGUEZ-HERRERA, R. & WICKER, L. 2006a. Extraction and characterization of pectin from novel sources. In M. L. Fishman, P. X. Qi and L. Wicker eds. *Advances in Biopolymers*. American Chemical Society, Washington, DC, 215-229 <http://doi.org/10.1021/bk-2006-0935.ch014>.
- CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C., VOGET, C. E., VITA, C. E., ESPINOZA-PÉREZ, J. D. & RENARD, C. M. G. C. 2006b. Enzymatic extraction of lemon pectin by endo-polygalacturonase from *Aspergillus niger*. *Food Science and Biotechnology*, 15,
- CONTRERAS ESQUIVEL, J. C., HOURS, R. A., VOGET, C. E. & MIGNONE, C. F. 1999. *Aspergillus kawachii* produces an acidic pectin releasing enzyme activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88, [http://doi.org/10.1016/s1389-1723\(99\)80174-1](http://doi.org/10.1016/s1389-1723(99)80174-1).
- DING, H. & CUI, S. W. 2020. Pectin bioactivity. In V. Kontogiorgos eds. *Pectin: Technological and Physiological Properties*. Springer, Cham, Switzerland, 165-188 https://doi.org/10.1007/978-3-030-53421-9_9.
- DJORDJEVIĆ, M., DJORDJEVIĆ, M., MARAVIĆ, N., ŠORONJA-SIMOVIĆ, D. & ŠEREŠ, Z. 2022. Sugar Beet Pectin and Its Diverse Uses. In V. Misra, S. Srivastava and A. K. Mall eds. *Sugar Beet Cultivation, Management and Processing*. Springer, Singapore, 971-1005 https://doi.org/10.1007/978-981-19-2730-0_48.
- DO NASCIMENTO OLIVEIRA, A., DE ALMEIDA PAULA, D., BASÍLIO DE OLIVEIRA, E., HENRIQUES SARAIVA, S., STRINGHETA, P. C. & MOTA RAMOS, A. 2018. Optimization of pectin extraction from Ubá mango peel through surface response methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.154>.
- DOMINIAC, M., SØNDERGAARD, K. M., WICHMANN, J., VIDAL-MELGOSA, S., WILLATS, W. G. T., MEYER, A. S. & MIKKELSEN, J. D. 2014. Application of enzymes for efficient extraction, modification, and development of functional properties of lime pectin. *Food Hydrocolloids*, 40, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.03.009>.
- DRANCA, F. & OROIAN, M. 2019. Optimization of Pectin Enzymatic Extraction from *Malus domestica* 'Fálticeni' Apple Pomace with Celluclast 1.5L. *Molecules*, 24, <http://doi.org/10.3390/molecules24112158>.

- FARAVASH, R. S. & ASHTIANI, F. Z. 2007. The effect of pH, ethanol volume and acid washing time on the yield of pectin extraction from peach pomace. 42, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01324.x>.
- FISHMAN, M. L., CHAU, H. K., COOKE, P. H. & HOTCHKISS JR, A. T. 2008. Global structure of microwave-assisted flash-extracted sugar beet pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, <http://doi.org/10.1021/jf072600o>.
- FRANCHI, M. L., MARZIALETTI, M. B., POSE, G. N. & CAVALITTO, S. F. 2014. Evaluation of enzymatic pectin extraction by a recombinant polygalacturonase (PGI) from apples and pears pomace of argentinean production and characterization of the extracted pectin. *Journal of Food Processing and Technology*, 5, <http://doi.org/10.4172/2157-7110.1000352>.
- GOLDBERG, R., PRAT, R. & MORVAN, C. 1994. Structural features of water-soluble pectins from mung bean hypocotyls. *Carbohydrate Polymers*, 23, [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(94\)90103-1](https://doi.org/10.1016/0144-8617(94)90103-1).
- GRASSINO, A. N., BRNČIĆ, M., VIKIĆ-TOPIC, D., ROCA, S., DENT, M. & BRNČIĆ, S. R. 2016. Ultrasound assisted extraction and characterization of pectin from tomato waste. *Food Chemistry*, 198, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.095>.
- HERLEIN, A. T. 2018. Grade. Estudio de la producción de enzimas pectinolíticas por parte de *Gueomyces pullulans* 8E. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas,
- HOSSEINI, S. S., KHODAIYAN, F. & YARMAND, M. S. 2016. Optimization of microwave assisted extraction of pectin from sour orange peel and its physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 140, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.12.051>.
- JEONG, H.-S., KIM, H.-Y., AHN, S. H., OH, S. C., YANG, I. & CHOI, I.-G. 2014. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions for extraction of pectin from rapeseed cake (*Brassica napus* L.) using commercial enzymes. *Food Chemistry*, 157, <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.040>.
- KAR, F. & ARSLAN, N. 1999. Effect of temperature and concentration on viscosity of orange peel pectin solutions and intrinsic viscosity–molecular weight relationship. *Carbohydrate Polymers*, 40, [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00062-4](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00062-4).
- KAUR, N. & GUPTA, A. K. 2002. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences*, 27, <http://doi.org/10.1007/BF02708379>.
- LIM, J., YOO, J., KO, S. & LEE, S. 2012. Extraction and characterization of pectin from Yuza (*Citrus junos*) pomace: a comparison of conventional-chemical and combined physical-

- enzymatic extractions. *Food Hydrocolloids*, 29, <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.02.018>.
- MARIĆ, M., GRASSINO, A. N., ZHU, Z., BARBA, F. J., BRNČIĆ, M. & RIMAC BRNČIĆ, S. 2018. An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction. *Trends in Food Science & Technology*, 76, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.022>.
- MARTINEZ, A., CAVELLO, I., GARMENDIA, G., RUFO, C., CAVALITTO, S. & VERO, S. 2016. Yeasts from sub-Antarctic region: biodiversity, enzymatic activities and their potential as oleaginous microorganisms. *Extremophiles*, 20, <http://doi.org/10.1007/s00792-016-0865-3>.
- MASUELLI, M. A. 2011. Viscometric study of pectin. Effect of temperature on the hydrodynamic properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48, <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.11.014>.
- PAPPAS, C. S., MALOVIKOVA, A., HROMADKOVA, Z., TARANTILIS, P. A., EBRINGEROVA, A. & POLISSIOU, M. G. 2004. Determination of the degree of esterification of pectinates with decyl and benzyl ester groups by diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) and curve-fitting deconvolution method. *Carbohydrate Polymers*, 56, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.03.014>.
- PRANDI, B., BALDASSARRE, S., BABBAR, N., BANCALARI, E., VANDEZANDE, P., HERMANS, D., BRUGGEMAN, G., GATTI, M., ELST, K. & SFORZA, S. 2018. Pectin oligosaccharides from sugar beet pulp: molecular characterization and potential prebiotic activity. *Food & function*, 9, <http://doi.org/10.1039/c7fo01182b>.
- PTICHKINA, N. M., MARKINA, O. A. & RUMYANTSEVA, G. N. 2008. Pectin extraction from pumpkin with the aid of microbial enzymes. *Food Hydrocolloids*, 22, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.04.002>.
- SABATER-MOLINA, M., LARQUÉ, E., TORRELLA, F. & ZAMORA, S. 2009. Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 65, <http://doi.org/10.1007/BF03180584>.
- SAYAH, M. Y., CHABIR, R., BENYAHIA, H., RODI KANDRI, Y., OUAZZANI CHAHDI, F., TOUZANI, H. & ERRACHIDI, F. 2016. Yield, esterification degree and molecular weight evaluation of pectins isolated from orange and grapefruit peels under different conditions. *PLoS One*, 11, <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0161751>.

- SENTKO, A. & WILLIBALD-ETTLE, I. 2012. Isomalt. In K. O'Donnell and M. W. Kearsley eds. *Sweeteners and sugar alternatives in food technology*. John Wiley & Sons, Ltd., 243-274 <https://doi.org/10.1002/9781118373941.ch11>.
- SRIAMORNSAK, P. 2003. Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: a review. *Silpakorn University International Journal*, 3,
- SUN, D., CHEN, X. & ZHU, C. 2020. Physicochemical properties and antioxidant activity of pectin from hawthorn wine pomace: a comparison of different extraction methods. *International Journal of Biological Macromolecules*, 158, <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.052>.
- THAKUR, B. R., SINGH, R. K., HANDA, A. K. & RAO, M. A. 1997. Chemistry and uses of pectin — A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, <http://doi.org/10.1080/10408399709527767>.
- THIBAUT, J.-F. & RALET, M.-C. 2003. Physico-chemical properties of pectins in the cell walls and after extraction. In F. Voragen, H. Schols and R. Visser eds. *Advances in Pectin and Pectinase Research* Springer Netherlands, Dordrecht, 91-105
- THU DAO, T. A., WEBB, H. K. & MALHERBE, F. 2021. Optimization of pectin extraction from fruit peels by response surface method: conventional versus microwave-assisted heating. *Food Hydrocolloids*, 113, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106475>.
- TOLLIER, M.-T. & ROBIN, J. P. 1979. Adaptation de la méthode à l'orcinol-sulfurique au dosage automatique des glucides neutres totaux: conditions d'application aux extraits d'origine végétale. *Annales de Technologie Agricole*, 28,
- VASCO-CORREA, J. & ZAPATA ZAPATA, A. D. 2017. Enzymatic extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) at laboratory and bench scale. *Food Science and Technology - LWT*, 80, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.024>.
- WALKINSHAW, M. D. & ARNOTT, S. 1981. Conformations and interactions of pectins. II. Models for junction zones in pectinic acid and calcium pectate gels. *Journal of Molecular Biology*, 153, [http://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90468-x](http://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90468-x).
- WANG, M., HUANG, B., FAN, C., ZHAO, K., HU, H., XU, X., PAN, S. & LIU, F. 2016. Characterization and functional properties of mango peel pectin extracted by ultrasound assisted citric acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.011>.
- WIKIERA, A., MIKA, M. & GRABACKA, M. 2015. Multicatalytic enzyme preparations as effective alternative to acid in pectin extraction. *Food Hydrocolloids*, 44, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.018>.

- WILLATS, W. G., KNOX, J. P. & MIKKELSEN, J. D. 2006. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, 17, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.10.008>.
- YANG, Y. & ANDERSON, C. T. 2020. Biosynthesis, localisation, and function of pectins in plants. In V. Kontogiorgos eds. *Pectin: technological and physiological properties*. Springer, Cham, Switzerland, 1-15 http://doi.org/10.1007/978-3-030-53421-9_1.
- YULIARTI, O., GOH, K. K., MATIA-MERINO, L., MAWSON, J. & BRENNAN, C. 2015. Extraction and characterisation of pomace pectin from gold kiwifruit (*Actinidia chinensis*). *Food Chemistry*, 187, <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.148>.
- ZAPATA, A., ESCOBAR G., C. A., CAVALITTO, S. F. & HOURS, R. A. 2009. Evaluation of pectin solubilization capability from lemon peel using protopectinase-SE. *Vitae*, 16,
- ZHANG, C., ZHU, X., ZHANG, F., YANG, X., NI, L., ZHANG, W., LIU, Z. & ZHANG, Y. 2020. Improving viscosity and gelling properties of leaf pectin by comparing five pectin extraction methods using green tea leaf as a model material. *Food Hydrocolloids*, 98, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105246>.
- ZHANG, W., YU, S., ZHANG, T., JIANG, B. & MU, W. 2016. Recent advances in d-allulose: physiological functionalities, applications, and biological production. *Trends in Food Science & Technology*, 54, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.06.004>.

SEGUNDA PARTE

APLICACIÓN DE PGASAS EN MACERACIÓN DE PITAYA DE PULPA ROJA Y BLANCA PARA OBTENER JUGO DE PITAYA

Resumen

La capacidad del extracto pectinolítico de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 para macerar pitaya de pulpa roja y blanca con el objetivo de aumentar el rendimiento de jugo de pitaya fue evaluada a 23 °C. Para ello, tres títulos crecientes de unidades de poligalacturonasa del extracto enzimático se incubaron con pitaya de pulpa roja y de pulpa blanca en un medio acuoso, en agitación durante 8 horas. Se evaluó el rendimiento en volumen de los jugos obtenidos en comparación con el control (con enzima inactivada), encontrándose, en promedio, un 16% de aumento en el caso del jugo de pitaya roja, y un 20% de aumento en el caso del jugo de pitaya blanca. La disminución del sólido, indicativo directo de la maceración, fue en promedio, en un 20% en el caso de la pitaya roja, y 28% en el caso de la pitaya blanca. No hubo diferencias significativas entre los tres tratamientos enzimáticos. Se determinaron los °Brix, contenido de azúcares reductores, la transmitancia a 610 nm y el color (en los jugos de pitaya roja). Los °Brix y la concentración de azúcares reductores no fueron significativamente diferentes entre los tratamientos entre sí, mientras que al analizar los azúcares reductores liberados por gramo de pitaya se observó un promedio de 43% de incremento en ambas frutas respecto de los controles. La transmitancia a 610 nm fue significativamente mayor en los jugos tratados, presuntamente debido al aumento de los componentes celulares liberados durante el tratamiento. El color del jugo de pitaya roja aumentó con el tratamiento enzimático, respecto del control, observándose la diferencia en el componente de la escala CIELAB correspondiente a el color rojo. Los jugos se utilizaron para preparar bolas de fruta

mediante esferificación con alginato, las cuales obtuvieron una dureza cercana a los 10 N al realizar el análisis de textura. Utilizando el jugo de pitaya roja se prepararon geles con pectina comercial y azúcares de bajas calorías, estos obtuvieron una fuerza de compresión de 3.8 N.

INTRODUCCIÓN

Maceración enzimática

La maceración enzimática es un proceso por el cual se logra la desorganización de los tejidos vegetales gracias a la aplicación de enzimas. Nakamura, *et al.* (1995) clasificaron los preparados enzimáticos que desintegran los tejidos vegetales según el grado de desintegración del tejido:

- 1) Las enzimas de “licuefacción” son grupos o mezclas de enzimas que actúan sobre las cadenas de ácido poligalacturónico pero también puede desintegrar totalmente los tejidos vegetales. Se utilizan principalmente en la producción de alimentos con altas proporciones de sólidos solubles como el tomate pasta o puré, y también para mejorar los rendimientos en la producción de jugos de frutas. Por lo general, se utilizan cócteles con una combinación de enzimas celulolíticas y pectolíticas para lograr una licuefacción casi completa.
- 2) Las enzimas “maceradoras”, son aquellas capaces de producir una suspensión de células individuales sueltas y se utilizan para preparar bases de néctar de frutas, purés de verduras y bebes y alimentos para gerontes. Para tales efectos, sólo la cementación intercelular material que mantiene unidas las células y una parte de la pared primaria se deben remover sin dañar las paredes celulares secundarias, evitando así la lisis celular. Por esta razón, en este caso, las celulasas en la mezcla de enzimas son indeseables

Las primeras (o su aplicación) son las más conocidas y utilizadas. Así, por ejemplo, durante el proceso de vinificación, se aplican estas enzimas para incrementar los rendimientos del jugo, y la extracción de compuestos que otorgan propiedades organolépticas deseadas al mismo. El mismo concepto es válido para otros procesos del ámbito alimenticio (Belda, *et al.* 2016; Chandini, *et al.* 2011; Farias, *et al.* 2020;

Fratebianchi de la Parra, *et al.* 2017; Merín & de Ambrosini 2020; Nur ‘Aliaa, *et al.* 2011). En la Figura 7.14 se observan macerados de zapallo obtenido gracias a la acción de las enzimas del cóctel enzimático Pectinex Ultra SP-L, de Novozymes (Shavakhi, *et al.* 2021). En la Figura 7.15 se observa la maceración de mandioca al utilizar una poligalacturonasa producida por *Wickerhamomyces anomalus* (Martos, *et al.* 2013).



Figura 7.14 Macerados de zapallo obtenidos luego de la maceración con el cóctel enzimático Pectinex (Novozymes). Tomado de Shavakhi, *et al.* (2021).



Figura 7.15 Maceración de mandioca utilizando una poligalacturonasa de *Wickerhamomyces anomalus* (a) junto a un control (b) (Martos, *et al.* 2013).

En esta sección nos referiremos a la maceración de frutas utilizando un preparado enzimático que puede ser clasificado como “licuefacción”, o, mejor dicho, utilizando un preparado enzimático en procesos en los que no se requiere que las células vegetales permanezcan enteras. Este uso es el más distribuido por parte de pectinasas, las cuales suelen encontrarse como parte de cócteles enzimáticos, conteniendo otras actividades enzimáticas accesorias.

Pitaya

La pitaya o fruto del dragón, *Hylocereus* sp., es nativa de México, América Central y América Latina. La comercialización de las variedades *Hylocereus undatus* y *H. monacanthus* ha crecido enormemente alrededor del mundo. La variedad *Hylocereus undatus* es rosa por fuera mientras que posee pulpa blanca, por lo que se la llama pitaya blanca; mientras que la variedad *H. monacanthus* posee cáscara y pulpa color rosamorado, por lo que se la llama pitaya roja (Zainoldin & Baba 2009). *H. monacanthus* es la que más ha llamado la atención debido a su color intenso y su gusto, por lo que en algunos países se preparan bebidas con su pulpa (Hendra, *et al.* 2020; Mercado-Silva 2018). La pitaya es baja en calorías y rica en vitaminas y micronutrientes, por lo que su consumo otorga efectos beneficiosos para la salud. Ha sido estudiada debido a sus propiedades antioxidantes y anticáncer, y es rica en betacianinas, betaninas, filocactinas, hilocereninas y sus isómeros (Wu, *et al.* 2006; Zainoldin & Baba 2009). Estos compuestos poseen propiedades antioxidantes, anticáncer, antilipídica y antimicrobiana (Gengatharan, *et al.* 2015). Esta fruta es consumida principalmente en países asiáticos, pero debido a sus propiedades benéficas para la salud ha ganado popularidad en el resto del mundo. Además de consumirse de forma fresca, como fruta, se ha propuesto su utilización para preparar distintos productos alimenticios, sin embargo, esto representa un desafío debido a su alto contenido de pectina (10-20%), el cual dificulta el procesamiento industrial (Jiang, *et al.* 2020). Por este motivo se ha estudiado previamente el tratamiento de esta fruta con pectinasas en procesos de clarificación de jugo y de extracción de betacianinas (Gengatharan, *et al.* 2021; Nur 'Aliaa, *et al.* 2011). Las betacianinas son uno de los pigmentos mayormente encontrados en la pitaya roja, se trata de ingredientes coloreados y bioactivos que han sido estudiados para ser incorporados en productos alimenticios (Gengatharan, *et al.* 2021; Gengatharan, *et al.* 2015).

Esferas de fruta

Las perlas de fruta o *boba pearls* son pequeñas esferas, frecuentemente compuestas por tapioca (almidón de mandioca), las cuales han adquirido creciente popularidad alrededor del mundo en los últimos tiempos. Estas esferas se adicionan en bebidas como té o leche (Figura 7.16). Debido a que el abuso del consumo de bebidas con alto contenido de azúcar puede contribuir a diversas complicaciones en la salud, se ha explorado la posibilidad de crear *boba pearls* a partir de frutas y sus jugos (Bubin, *et al.* 2019; Liu, *et al.* 2021).



Figura 7.16 Bebidas con perlas de tapioca o bobba pearls. <https://lilyvolt.com/bubble-tea-boba>.

OBJETIVOS PARTICULARES DE ESTA SECCIÓN

- ◆ Evaluar la capacidad del extracto pectinolítico de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 en el proceso de maceración de las frutas pitaya roja y blanca, para obtener jugos de fruta.
- ◆ Usar el jugo obtenido para preparar productos alimenticios saludables como geles de pitaya y bolitas de fruta que pueden ser utilizadas en bebidas.

Los ensayos detallados en este capítulo se llevaron a cabo en el Laboratorio de Glicobiotecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, México, bajo la supervisión del Dr. Juan Carlos Contreras Esquivel.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracto enzimático

El extracto pectinolítico de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 fue producido en un fermentador de 1.5 l tal como se detalló en el Capítulo 4. Luego, fue liofilizado hasta sequedad completa. Se resuspendió en agua destilada y se centrifugó a $6000 \times g$ durante 30 minutos. Luego se filtró con filtros de tamaño de poro $0.2 \mu\text{m}$ y se desaló utilizando una columna *Sephadex* G25 (Cytiva, Hiprep, 5 ml). Para ello, se equilibró la columna con BCP pH 5.0 y se eluyó la muestra (2 ml) a lo largo de dos volúmenes de columna, a un flujo de 1 ml min^{-1} . Las fracciones de varias corridas cromatográficas que presentaron actividad poligalacturonasa y no contenían sal fueron pooleadas para su utilización en los posteriores ensayos.

Fruta

Las pitayas fueron adquiridas en el supermercado (Saltillo, México) durante el mes de julio. Se adquirieron pitayas de pulpa blanca y morada (Figura 7.17).



Figura 7.17 Pitayas rojas y blancas utilizadas en este trabajo.

Maceración de la fruta

Se cortaron fragmentos de fruta cilíndricos de 1.5 cm de alto por 1 cm de diámetro, utilizando un sacabocados (Figura 7.18). Diez gramos de fruta fueron sumergidos en 20 ml totales de agua con extracto enzimático en Erlenmeyers de 150 ml. El pH se ajustó a 5.0 con ácido ascórbico 10 % p v⁻¹. Para el control, se utilizó enzima inactivada térmicamente. Se testearon tres títulos de enzima: 100, 200 y 500 mU g⁻¹ pitaya (tratamientos 1, 2 y 3 respectivamente). La maceración se llevó a cabo con una agitación de 150 rpm durante 8 horas, a 23 °C. A tiempo inicial y cada dos horas se tomaron muestras de 200 µl de la fracción líquida y se determinaron los °Brix, el pH y la conductividad, utilizando un conductímetro digital (Horiba, Japón), un pHmetro digital (Horiba, Japón) y un refractómetro digital (Atago, Japón).

Al terminar el tratamiento, se separó el líquido macerado del tejido sin macerar y las semillas mediante filtración utilizando tela muselina, y se extrajo manualmente el jugo aplicando presión. Luego, se inactivaron las enzimas exponiendo los filtrados a 100 °C durante 5 minutos, y se midió el volumen de filtrado. El sólido retenido en el filtro fue secado hasta peso constante en una estufa a 50 °C. Se determinó en los filtrados: pH, conductividad, color, transmitancia a 610 nm y °Brix. El filtrado fue conservado a -20 °C. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.



Figura 7.18 Fragmentos de fruta cortados utilizando un sacabocados para la realización de los ensayos.

Determinaciones en jugo

Contenido de azúcares reductores

El contenido de azúcares reductores en los jugos fue realizado utilizando la técnica de Somogyi-Nelson, tal como se detalló en Materiales y Métodos de la Sección 1 de este capítulo.

Transmitancia

La transmitancia a 610 nm de cada jugo obtenido fue determinada usando un espectrofotómetro (Thermo Spectronic, Thermo Scientific™, USA).

Medida del color del jugo de pitaya roja

Para determinar el color de los jugos de pitaya roja se utilizó un colorímetro (3nh Technology, China). La escala estándar de color utilizada es la CIELAB, con los parámetros L^* (luminosidad/oscuridad), a^* (+ a = color rojo, - a = color verde) y b^* (+ b = color amarillo, - b = color azul) (Figura 7.19).

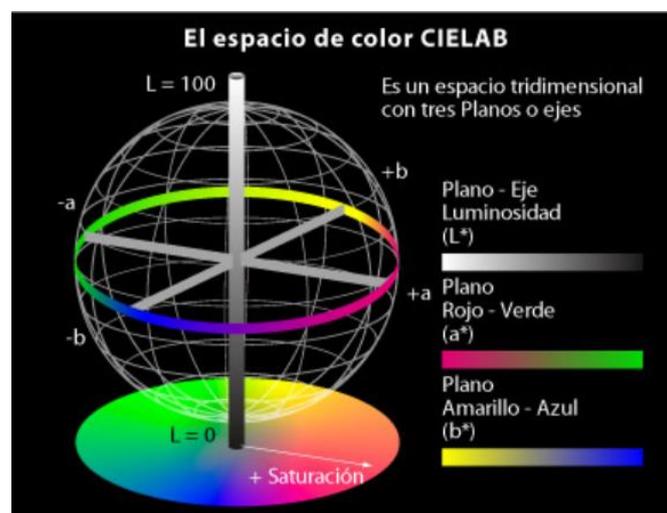


Figura 7.19 Representación esquemática de los parámetros de color, utilizados en el modelo CIELAB (Commission Internationale d'Eclairage).

La diferencia de color, comparando con el control fue calculada como (Gaurav 2003):

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(L^*_2 - L^*_1)^2 + (a^*_2 - a^*_1)^2 + (b^*_2 - b^*_1)^2},$$

donde (L^*_1, a^*_1, b^*_1) son los valores de la escala CIELAB para el jugo control, y (L^*_2, a^*_2, b^*_2) corresponde a los valores obtenidos para el jugo obtenido luego del tratamiento.

El cambio total en el color puede clasificarse como muy diferente ($\Delta E^* > 3$), diferente ($1.5 < \Delta E^* < 3$) y poco diferente ($\Delta E^* < 1.5$) (Gengatharan, *et al.* 2021).

Formación de perlas de pitaya

Las perlas de pitaya se formaron utilizando un encapsulador Encapsulator STARTUP (EncapBioSystems, Suiza, Figura 7.20). El jugo obtenido de los tratamientos 1 fue centrifugado durante 10 minutos a $4000 \times g$ (4°C) y el sobrenadante se mezcló con un volumen de alginato de sodio 2 % p v⁻¹ (I-8-150, Kimica corporation, Tokyo). Los parámetros utilizados fueron 2000 Hz de frecuencia, 1000 V de voltaje, y una temperatura de 35°C . El líquido fue goteado en una solución de CaCl_2 50 mM con agitación suave, a una velocidad de 30 gotas por minuto. Una vez finalizado el goteo, las perlas se dejaron en esta solución durante 15 minutos. Luego, fueron filtradas por tela muselina y conservadas en refrigeración en una solución de CaCl_2 (5 mM) hasta el análisis de textura. Se utilizó un calibre Vernier para medir el diámetro de las perlas obtenidas.



Figura 7.20 Encapsulador utilizado para la formación de las esferas de jugo de pitaya (EncapBioSystems).

Formación de geles de pitaya roja

Los geles de pitaya roja se realizaron bajo el mismo protocolo que se utilizó en la Sección 1 de este capítulo, a excepción de que la pectina (Sigma #9135) fue disuelta directamente en el jugo de pitaya roja (Tratamiento 1). Se realizaron 4 geles.

Análisis de textura

El análisis de las perlas de pitaya se realizó utilizando un equipo *Texture Analyzer TA XT Plus*, equipado con el software *Texture Expert Exceed 2.1*. (Microsystem, Londres, UK) (Figura 7.21). Para el test de compresión, se utilizó un disco cilíndrico ($\text{Ø}=40$ mm), y se reporta la fuerza para un 80% de compresión, calculada a una velocidad de 3.5 mm s^{-1} . Para el test de perforación, se utilizó una sonda cilíndrica de 1 mm de diámetro, la cual se introdujo en las perlas, a una velocidad de 10 mm s^{-1} . La fuerza de penetración se expresa en Newtons. Los valores son el promedio de 20 determinaciones y su desviación estándar (Rajmohan & Bellmer 2019).

Para el análisis de textura del gel de pitaya de pulpa roja, se utilizó un equipo de textura Texture Analyzer (Stable Micro Systems, Godalming, Inglaterra) a 25 °C. Una sonda cilíndrica de 10 mm de diámetro se introdujo en los geles a una velocidad de 1 mm s⁻¹, y se reportó una fuerza aplicada para un 50% de compresión (1.25 cm).

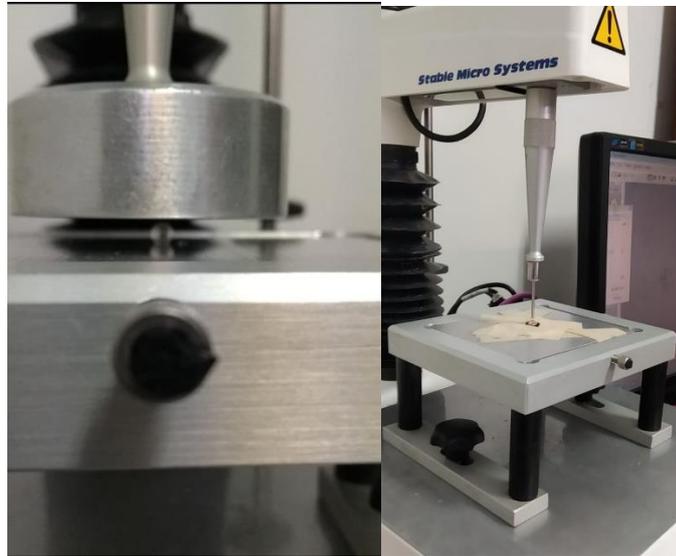


Figura 7.21 Ensayo de compresión (izquierda) y perforación (derecha) realizado a las perlas obtenidas, en un Texture Analyzer TA XT Plus (Microsystem).

Análisis estadístico

Las determinaciones se realizaron por triplicado, y se muestran los resultados como el promedio \pm la desviación estándar. Las diferencias que obtuvieron un $p < 0.05$ en el test de ANOVA fueron consideradas como significativas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Maceración de pitaya para la obtención de jugo

En esta sección se testeó el extracto pectinolítico producido en el Capítulo 4 en la maceración (o licuefacción) de pitaya, para evaluar si el tratamiento enzimático con este pool aumenta el rendimiento de jugo de fruta. La forma más directa de evaluar el rendimiento es observar el volumen obtenido luego de la maceración, en comparación con un control sin enzima (en este caso, con enzima inactivada). Además, la evaluación del sólido remanente, también en comparación con el control es una medida del nivel de maceración del tejido (Figura 7.22).

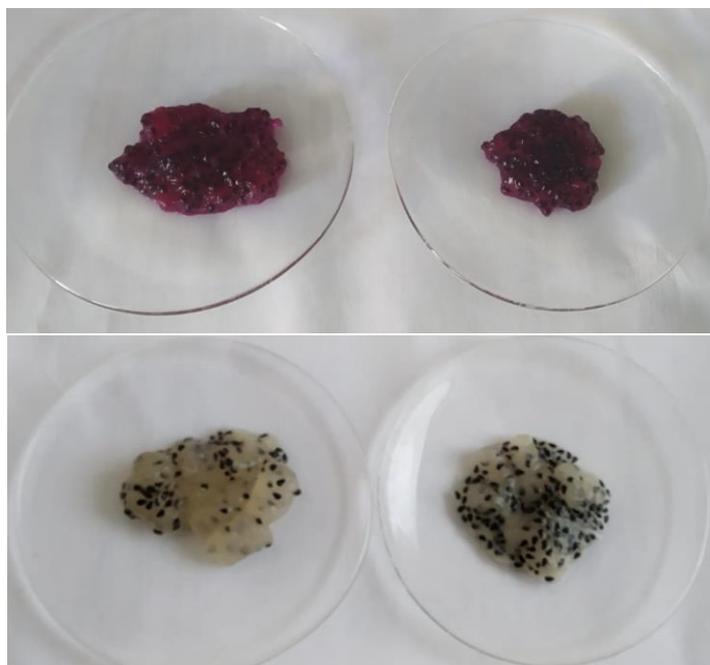


Figura 7.22 Fruta remanente luego de la maceración. Arriba, remanente del control (izquierda) y el tratamiento 1 (derecha) con pitaya de pulpa roja. Abajo, remanente del control (izquierda) y tratamiento 1 (derecha) con pitaya de pulpa blanca.

La maceración de la fruta se realizó durante 8 h, durante las cuales se observó que, en todas las muestras, incluidos los controles, aumentó la conductividad (valores iniciales $1317 \pm 340 \mu\text{S cm}^{-1}$ en pitaya roja, 1438 ± 526 en pitaya blanca) y los °Brix, que fueron

inicialmente 1.07 ± 0.22 en pitaya roja y 0.94 ± 0.27 en pitaya blanca. La evolución de estos parámetros en el tiempo se muestra en la Figura 7.23.

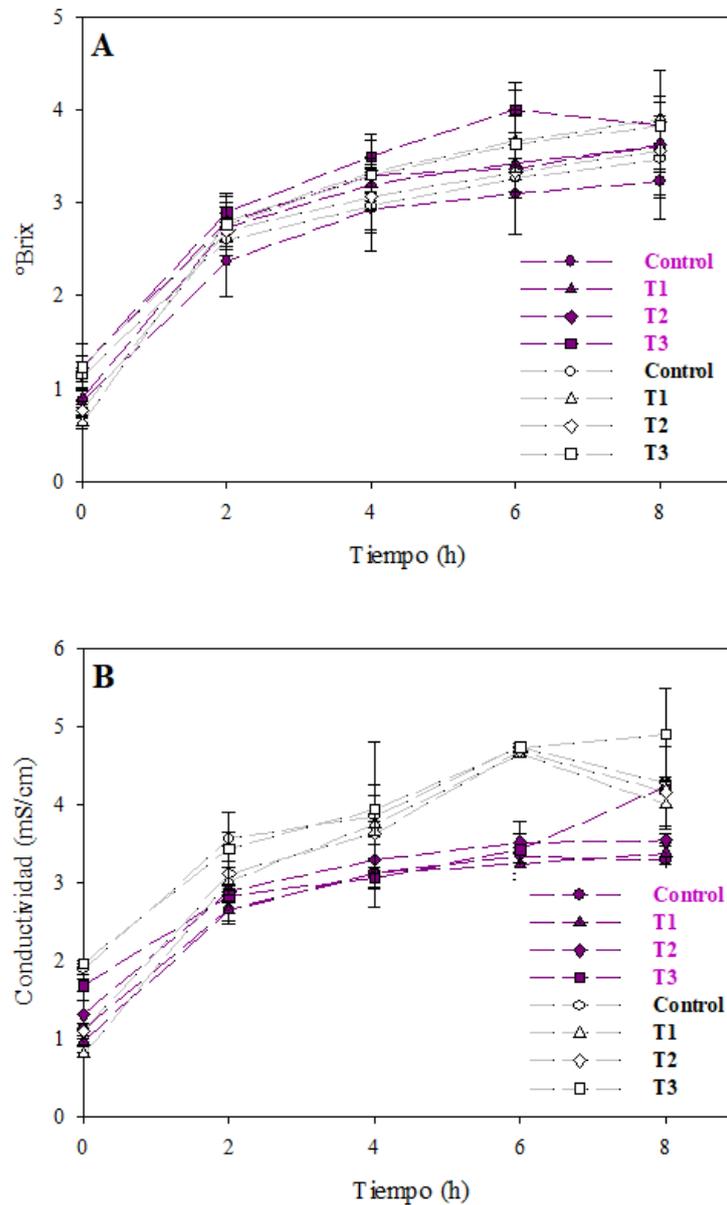


Figura 7.23 Evolución de °Brix (A) y conductividad (B) durante las maceraciones de pitaya de pulpa roja (fucsia) y de pulpa blanca (gris). Los ensayos tuvieron una duración de 8 horas a 23 °C, con agitación de 150 rpm. Los valores son las medias de tres replicas y su desviación estándar.

El volumen del jugo de pitaya roja obtenido luego del tratamiento fue 14.5-16.7% mayor que el obtenido en el tratamiento control, demostrando que el extracto enzimático

logró macerar el tejido (Tabla 7.5). En el caso de la pitaya blanca, el incremento del volumen obtenido fue mayor: 18.2-22.7% (Tabla 7.5).

Tabla 7.5 Volumen y sólido residual en base seca obtenidos luego de las maceraciones de pitaya roja y blanca a 23 °C. Los tratamientos 1,2 y 3 (T1, T2 y T3) corresponden al agregado de 100, 200, y 500 mU de poligalacturonasa, por gramo de pitaya, respectivamente. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y estén expresadas como el promedio \pm la desviación estándar

Pitaya roja (<i>Hylocereus monacanthus</i>)				
	Control	T1	T2	T3
Volumen (ml)	18.6 \pm 0.5 ^a	21.3 \pm 0.6 ^b	21.5 \pm 0.5 ^b	21.7 \pm 0.3 ^b
Sólido residual (mg)	716.4 \pm 71.0 ^a	541.9 \pm 79.6 ^b	581.7 \pm 27.3 ^b	605.4 \pm 81.3 ^b
Pitaya blanca (<i>Hylocereus undatus</i>)				
	Control	T1	T2	T3
Volumen (ml)	17.6 \pm 0.5 ^c	21.0 \pm 0.7 ^d	21.6 \pm 1.0 ^d	20.8 \pm 0.8 ^d
Sólido residual (mg)	817.9 \pm 10.8 ^c	638.0 \pm 50.2 ^d	530.0 \pm 131.8 ^d	594.7 \pm 97.9 ^d

Con respecto al sólido remanente, se observaron diferencias significativas entre control y tratamientos, tanto en los tratamientos de pitaya roja (15-25% de reducción respecto del control) como en los de pitaya blanca (22-35% de reducción) (Tabla 7.5). No se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos con diferentes títulos de enzima.

Los incrementos de rendimiento obtenidos son similares a los obtenidos previamente por Jiang, *et al.* (2020), quienes usaron pectinasas para aumentar en un 16% el rendimiento de vino producido a partir de pitaya, macerada con las enzimas. Nur 'Aliaa, *et al.* (2011) y Lima, *et al.* (2015) también reportaron incrementos en los rendimientos de

jugo de uva y de pitaya de pulpa roja luego de maceración con pectinasas. Adedeji & Ezekiel (2019) reportaron un aumento del rendimiento en jugo de mango desde 52% hasta 79-88% luego de tratamiento con PGasas, y Joshi, *et al.* (2008), 26% de incremento en el rendimiento de jugo de ciruela utilizando la misma actividad macerativa. Hay que tener en cuenta que la mayoría de los reportes bibliográficos que utilizan este tipo de enzimas para macerar tejidos utilizan temperaturas entre 27 y 60 °C, en tanto que la temperatura de trabajo propuesta para este ensayo está entre las más bajas.

En cuanto a la observación de la disminución del tejido remanente, el ablandamiento de los tejidos vegetales mediante maceración arroja valores reducidos de peso seco, por lo que la disminución observada en los peso seco se puede relacionar directamente con la presencia de maceración mediante las enzimas presentes en el extracto enzimático (Sreenath, *et al.* 1986).

Al aumentar los títulos de poligalacturonasa no se observaron diferencias en el rendimiento, demostrando que un título enzimático de 100 mU por gramo de pitaya es suficiente para macerar el tejido sin que haya una mayor maceración a títulos mayores. En otros trabajos previos ya se ha observado que un incremento de los títulos enzimáticos no siempre está relacionado con un mejor desempeño en el proceso, por lo que es importante estudiar el título de enzima en los procesos de manera de no utilizar más enzima de la necesaria (Bagger-Jørgensen & Meyer 2004; Cavello, *et al.* 2017).

Determinaciones en los jugos de pitaya

Los valores de pH y conductividad finales no fueron significativamente diferentes en los jugos obtenidos de los tratamientos control y con enzima, tal como puede observarse en la Tabla 7.6.

Tabla 7.6 Características de los jugos obtenidos luego de la maceración de pitaya de pulpa roja y blanca a 23 °C. Los tratamientos 1,2 y 3 (T1, T2 y T3) corresponden al agregado de 100, 200, y 500 mU de poligalacturonasa, por gramo de pitaya, respectivamente. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y están expresadas como el promedio \pm la desviación estándar

Parámetro	Pitaya roja (<i>Hylocereus monacanthus</i>)			
	Control	T1	T2	T3
pH	4.75 \pm 0.10	4.73 \pm 0.03	4.73 \pm 0.13	4.89 \pm 0.06
Conductividad (mS cm ⁻¹)	3.29 \pm 0.18	3.38 \pm 0.14	3.54 \pm 0.08	4.23 \pm 0.50
Transmitancia ₆₁₀	17.10 \pm 1.04 ^a	6.97 \pm 0.50 ^b	6.60 \pm 1.11 ^b	6.43 \pm 1.27 ^b
°Brix	3.2 \pm 0.4 ^a	3.6 \pm 0.3 ^{ab}	3.6 \pm 0.3 ^{ab}	3.8 \pm 0.3 ^b
Azúcares reductores (mg mg ⁻¹) ^a	43.73 \pm 10.81 ^a	63.14 \pm 4.44 ^{bc}	59.11 \pm 11.27 ^{ab}	63.80 \pm 11.59 ^{bc}
Parámetro	Pitaya blanca (<i>Hylocereus undatus</i>)			
	Control	T1	T2	T3
pH	4.70 \pm 0.03	4.59 \pm 0.03	4.60 \pm 0.06	4.64 \pm 0.01
Conductividad (mS cm ⁻¹)	4.28 \pm 0.07	4.00 \pm 0.31	4.16 \pm 0.03	4.90 \pm 0.60
Transmitancia ₆₁₀	63.65 \pm 1.77 ^c	32.50 \pm 9.62 ^d	35.13 \pm 4.88 ^d	33.80 \pm 0.57 ^d
°Brix	3.5 \pm 0.4 ^c	3.9 \pm 0.5 ^c	3.6 \pm 0.5 ^c	3.8 \pm 0.3 ^c
Azúcares reductores (mg mg ⁻¹) ^a	42.48 \pm 9.49 ^d	62.13 \pm 3.33 ^e	60.10 \pm 8.94 ^e	56.98 \pm 3.37 ^e

Letras diferentes indican diferencias significativas según ANOVA

^a Los azúcares reductores se expresaron como mg de azúcares extraídos por gramo inicial de pitaya

°Brix y azúcares reductores liberados

Se determinaron los °Brix de los jugos y los azúcares reductores liberados por gramo inicial de pitaya, y se muestran en la Tabla 7.6. No se observaron diferencias entre los °Brix determinados en jugos control y tratados. Resultados similares fueron obtenidos previamente luego del tratamiento con enzimas de jugos de arándano (Siddiq, *et al.* 2018).

Por otro lado, en el caso de los azúcares reductores, se observó que, al tener en cuenta los azúcares totales liberados por gramo inicial de pitaya, hubo una mayor cantidad de los mismos en los tratamientos, respecto de los controles. En los jugos control, se liberaron 43.7 y 42.5 mg totales de azúcares reductores por gramo de pitaya de pulpa roja y pulpa blanca, respectivamente. El tratamiento con poligalacturonasas de la pitaya de pulpa roja resultó en un promedio de 62 mg azucares reductores por gramo de pitaya liberados, 42% más que lo observado en el control. Lo mismo fue observado en el caso de la pitaya de pulpa blanca, en este caso, con 61 mg de azucares reductores liberados por gramo inicial de pitaya, el incremento fue del 43% respecto del control sin enzimas.

Transmitancia

Se determinó la transmitancia a 610 nm en cada jugo, y los resultados se muestran en la Tabla 7.6. En todos los casos se observaron diferencias significativas entre tratamiento y control, pero no hubo diferencias entre los tratamientos. La transmitancia fue mayor en los jugos control, en el caso de los jugos de pitaya de pulpa roja, en el tratamiento se observó un 61% (en promedio) menor que el control, mientras que esta reducción en el caso de los jugos de pitaya de pulpa blanca fue, en promedio, 47% menor. Esta reducción de la transmitancia podría estar asociada a una mayor presencia de fragmentos de células vegetales en suspensión en el jugo, lo cual es resultado de la maceración (y licuefacción) del tejido.

Determinación del color en el jugo de pitaya de pulpa roja

Con la ayuda de un colorímetro, se determinó el color en los jugos obtenidos a partir de las maceraciones de pitaya de pulpa roja. Los parámetros obtenidos de la escala CIELAB se muestran en la Tabla 7.7. El valor del parámetro ΔE^*_{ab} , que indica una medida de la diferencia de color en comparación con el jugo control, fue mayor en el caso del tratamiento 1 (3.27), y mínima en el tratamiento 3 (1.49). Las diferencias significativas se encontraron en el eje a^* , el cual corresponde al eje de los colores verde-rojo. Se confirma entonces que la diferencia obtenida es debido a un incremento del color rojo en el jugo de pitaya obtenido mediante la acción de enzimas.

Tabla 7.7 Medida de color (escala CIELAB) en el jugo de pitaya rojo obtenido. Tratamiento 1, 2 y 3 consistieron en 100, 200 y 500 mU de poligalacturonasa por gramo de pitaya, respectivamente. Los valores son el promedio de tres réplicas junto a su desvío estándar

Parámetro	Control	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
L^*	15.22 ± 0.06	15.40 ± 0.04	15.33 ± 0.12	15.72 ± 0.39
a^*	13.27 ± 1.39	16.51 ± 0.87	16.28 ± 0.18	14.32 ± 0.27
b^*	-0.06 ± 0.05	-0.44 ± 0.22	-0.26 ± 0.31	-0.99 ± 0.11
ΔE^*_{ab}	-	3.27	3.01	1.49

Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0.05$, ANOVA

El tratamiento de frutas con pectinasas ha conducido en otros procesos a la obtención de productos con mejores características cromáticas: la liberación de pigmentos, polifenoles y antocianinas desde las frutas ha sido estudiada, principalmente a partir de la uva, en el contexto de la manufactura del vino (Alpeza, *et al.* 2017; Merín & de Ambrosini 2020). También se ha estudiado recientemente la extracción de betacianinas desde la pitaya utilizando tratamientos enzimáticos, y se obtuvieron resultados prometedores

(Gengatharan, *et al.* 2021). En el caso del tratamiento de la pitaya de pulpa roja, el tratamiento 1 fue el mejor para la extracción de pigmentos rojos (Tabla 7.7).

Formación de perlas y geles con los jugos de pitaya obtenidos

Los jugos de pitaya obtenidos con el tratamiento 1 se utilizaron para preparar bolitas de fruta mediante gelificación ionotrópica con alginato (Figura 7.24). El diámetro de las perlas fue 4.0 ± 0.1 mm. La fuerza para un 80% de compresión obtenida durante el análisis de textura fue 10.68 ± 1.30 N y 9.78 ± 1.49 N para las perlas de pitaya de pulpa roja y blanca, respectivamente. En cuanto a la fuerza de perforación obtenida, los valores fueron 0.51 ± 0.02 N y 0.52 ± 0.03 N para las bolitas de pitaya de pulpa roja y blanca, respectivamente (Tabla 7.8).

Tabla 7.8 Análisis de textura de las perlas obtenidas con pitaya roja y pitaya blanca, y los geles de pitaya roja. Los valores son el promedio con la desviación estándar de 20 determinaciones en el caso de las perlas y 4 determinaciones en el caso de los geles

Perlas de pitaya		
	Fuerza de compresión (N) ^a	Fuerza de perforación (N)
Perlas de pitaya de pulpa roja (<i>Hylocereus monacanthus</i>)	10.68 ± 1.30	0.51 ± 0.02
Perlas de pitaya de pulpa blanca (<i>Hylocereus undatus</i>)	9.78 ± 1.49	0.52 ± 0.03
Fuerza de compresión (N) ^b		
Gel de pitaya roja	3.80 ± 0.52	

^aEn los análisis de perlititas, se reporta la fuerza para el 80% de compresión

^bEn los análisis de deformación del gel se reporta la fuerza para el 50% de compresión

Utilizando el jugo de pitaya de pulpa roja obtenido mediante maceración se preparó un gel con una pectina comercial, tal como se detalló en la Sección 1 de este capítulo (Figura

7.24). En este caso, la fuerza requerida para un 50% de compresión del gel fue 3.80 ± 0.52 N.

La fuerza de compresión, tal como se mencionó en la primera parte de este capítulo, es una medida de la dureza de un producto: cuanto más duro, más fuerza es necesaria para deformarlo. Respecto de las perlas de pitaya y alginato, Bubin, *et al.* (2019) reportaron fuerzas de 256 g para las mismas, mientras que en este trabajo se obtuvieron fuerzas mayores: 1089 y 997 g para las perlas de pitaya roja y blanca, respectivamente. Si bien hay estudios donde se obtienen fuerzas mayores, en los que se ha utilizado alginatos diferentes o componentes como quitosano (Belščak-Cvitanović, *et al.* 2015), pensando en su aplicación en bebidas es deseable una fuerza intermedia, de modo que resistan hasta ser consumidas pero generen esa sensación característica al explotar en la boca durante su consumo.

Se obtuvo un gel de pitaya utilizando el jugo de pitaya roja, el cual resulta más característico debido a su tonalidad (Figura 7.24). Los test de penetración demostraron una buena firmeza, en línea con la reportada por Bouaziz, *et al.* (2014), de 5.7 N (gel con 4% de pectina). Este gel podría ser utilizado en el desarrollo de productos alimenticios con este color característico en panaderías.



Figura 7.24 Perlas obtenidas con jugo de pitaya roja y pitaya blanca. Gel obtenido con pectina y jugo de pitaya roja.

CONCLUSIONES DE ESTA SECCIÓN

Mediante la utilización del extracto enzimático estudiado se logró un aumento en el rendimiento de jugo de pitaya obtenido directamente a partir de la fruta a 23 °C, en comparación con el control. Los rendimientos obtenidos son comparables con otros estudios en los que se utilizaron enzimas mesófilas, mientras que realizar el proceso a temperaturas más bajas podría significar un ahorro energético importante. Además, se utilizó el jugo obtenido para preparar geles de pitaya y bolitas de fruta, las cuales podrían ser utilizadas en algunos productos alimenticios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEDEJI, O. E. & EZEKIEL, O. O. 2019. Pretreatment of selected peels for polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* CICC 2040: Purification and application in mango juice extraction. *Bioresource Technology Reports*, 7, <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100306>.
- ALPEZA, I., KOVAČEVIĆ GANIĆ, K., VANZO, A. & HERJAVEC, S. 2017. Improved chromatic and sensory characteristics of Plavac Mali wines - Efficiency of maceration enzymes. *Czech Journal of Food Sciences*, 35, <http://doi.org/10.17221/346/2016-CJFS>.
- BAGGER-JØRGENSEN, R. & MEYER, A. S. 2004. Effects of different enzymatic pre-press maceration treatments on the release of phenols into blackcurrant juice. *European Food Research and Technology*, 219, <http://doi.org/10.1007/s00217-004-1006-2>.
- BELDA, I., CONCHILLO, L. B., RUIZ, J., NAVASCUÉS, E., MARQUINA, D. & SANTOS, A. 2016. Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking. *International Journal of Food Microbiology*, 223, <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.003>.
- BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A., KOMES, D., KARLOVIĆ, S., DJAKOVIĆ, S., ŠPOLJARIĆ, I., MRŠIĆ, G. & JEŽEK, D. 2015. Improving the controlled delivery formulations of caffeine in alginate hydrogel beads combined with pectin, carrageenan, chitosan and psyllium. *Food Chemistry*, 167, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.011>.
- BOUAZIZ, M. A., RASSAOUI, R. & BESBES, S. 2014. Chemical composition, functional properties, and effect of inulin from tunisian *Agave americana* L. leaves on textural qualities of pectin gel. *Journal of Chemistry*, 2014, <https://doi.org/10.1155/2014/758697>.
- BUBIN, S. F. A., MAT ALI, S., SHUKRI, R., WAN IBADULLAH, W. Z., RAMLI, N. S., MUSTAPHA, N. A. & MOHAMMAD RASHEDI, I. F. 2019. Characterization and stability of pitaya pearls from hydrocolloids by reverse spherification. *International Journal of Food Properties*, 22, <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1647234>.
- CAVELLO, I., ALBANESI, A., FRATEBIANCHI, D., GARMEDIA, G., VERO, S. & CAVALITTO, S. 2017. Pectinolytic yeasts from cold environments: Novel findings of *Guehomyces pullulans*, *Cystofilobasidium infirmominiatum* and *Cryptococcus adeliensis* producing pectinases. *Extremophiles*, 21, <http://doi.org/10.1007/s00792-016-0904-0>.
- CHANDINI, S. K., RAO, L. J., GOWTHAMAN, M. K., HAWARE, D. J. & SUBRAMANIAN, R. 2011. Enzymatic treatment to improve the quality of black tea extracts. *Food Chemistry*, 127, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.078>.
- FARIAS, V. L. D., ARAÚJO, Í. M. D. S., ROCHA, R. F. J. D., GARRUTI, D. D. S. & PINTO, G. A. S. 2020. Enzymatic maceration of Tabasco pepper: Effect on the yield, chemical and sensory aspects of the sauce. *LWT*, 127, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109311>.
- FRATEBIANCHI DE LA PARRA, D., MIRIAN, G., TENORIO, C., CAVALITTO, S. & RUIZ-LARREA, F. 2017. Characterization and winemaking application of a novel pectin-degrading enzyme complex from *Aspergillus sojae* ATCC 20235. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 56, <http://doi.org/10.5073/vitis.2017.56.85-93>.
- S. Gaurav eds. 2003. *Book Digital color imaging handbook*. CRC Press, pp. 816, <https://doi.org/10.1201/9781420041484>.

- GENGATHARAN, A., DYKES, G. & CHOO, W. S. 2021. Betacyanins from *Hylocereus polyrhizus*: Pectinase-assisted extraction and application as a natural food colourant in ice cream. *Journal of Food Science and Technology*, 58, <http://doi.org/10.1007/s13197-020-04651-8>.
- GENGATHARAN, A., DYKES, G. A. & CHOO, W. S. 2015. Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. *LWT - Food Science and Technology*, 64, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.052>.
- HENDRA, R., MASDEATRESA, L., ABDULAH, R. & HARYANI, Y. 2020. Red dragon peel (*Hylocereus polyrhizus*) as antioxidant source. *AIP Conference Proceedings*, 2243, <http://doi.org/10.1063/5.0001391>.
- JIANG, X., LU, Y. & LIU, S. Q. 2020. Effects of pectinase treatment on the physicochemical and oenological properties of red dragon fruit wine fermented with *Torulaspora delbrueckii*. *LWT - Food Science and Technology*, 132, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109929>.
- JOSHI, V., PARMAR, M. & RANA, N. 2008. Purification, characterization of pectinase produced from apple pomace and its evaluation in the fruit juice extraction and clarification. *Journal of Biotechnology*, 136, <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.07.1866>.
- LIMA, M. D. S., DA CONCEIÇÃO PRUDÊNCIO DUTRA, M., TOALDO, I. M., CORRÊA, L. C., PEREIRA, G. E., DE OLIVEIRA, D., BORDIGNON-LUIZ, M. T. & NINOW, J. L. 2015. Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced in industrial scale by different processes of maceration. *Food Chemistry*, 188, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.014>.
- LIU, Y., CHENG, H. & WU, D. 2021. Preparation of the orange flavoured “boba” ball in milk tea and its shelf-life. *Journal of Applied Sciences*, 11, <https://doi.org/10.3390/app11010200>.
- MARTOS, M., ZUBRESKI, E., COMBINA, M., GARRO, O. & HOURS, R. 2013. Isolation of a yeast strain able to produce a polygalacturonase with maceration activity of cassava roots. *Food Science and Technology (Campinas)*, 33, 10.1590/S0101-20612013005000047.
- MERCADO-SILVA, E. M. 2018. Pitaya—*Hylocereus undatus* (Haw). In S. Rodrigues, E. de Oliveira Silva and E. S. de Brito eds. *Exotic Fruits*. Academic Press, Cambridge, Mass., USA, 339-349 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803138-4.00045-9>.
- MERÍN, M. G. & DE AMBROSINI, V. I. M. 2020. Application of a grape surface majority pectinolytic species, *Aureobasidium pullulans*, to low-temperature red winemaking: development and stability of wine colour. *Journal of Wine Research*, 31, <http://doi.org/10.1080/09571264.2020.1816534>.
- NAKAMURA, T., HOURS, R. A. & SAKAI, T. 1995. Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *Journal of Food Science*, 60, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb09805.x>.
- NUR ‘ALIAA, A. R., SITI MAZLINA, M. K. & TAIP, F. S. 2011. Effects of commercial pectinases application on selected properties of red pitaya juice. *Journal of Food Process Engineering*, 34, <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2009.00388.x>.
- RAJMOHAN, D. & BELLMER, D. 2019. Characterization of spirulina-alginate beads formed using ionic gelation. *International Journal of Food Science*, 2019, <http://doi.org/10.1155/2019/7101279>.

- SHAVAKHI, F., CHAI, K. F. & GHAZALI, H. M. 2021. Enzymatic maceration and liquefaction of pumpkin (*Cucurbita moschata* L.) flesh for the preparation of a suitable base feed for spray drying. 45, <https://doi.org/10.1111/jfpp.15075>.
- SIDDIQ, M., DOLAN, K. D., PERKINS-VEAZIE, P. & COLLINS, J. K. 2018. Effect of pectinolytic and cellulytic enzymes on the physical, chemical, and antioxidant properties of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) juice. *LWT- Food Science and Technology*, 92, <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.008>.
- SREENATH, H. K., KOGEL, F. & RADOLA, B. J. 1986. Macerating properties of a commercial pectinase on carrot and celery. *Journal of Fermentation Technology*, 64, [https://doi.org/10.1016/0385-6380\(86\)90055-5](https://doi.org/10.1016/0385-6380(86)90055-5).
- WU, L.-C., HSU, H.-W., CHEN, Y.-C., CHIU, C.-C., LIN, Y.-I. & HO, J.-A. A. 2006. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *Food Chemistry*, 95, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.002>.
- ZAINOLDIN, K. & BABA, A. 2009. The effect of *Hylocereus polyrhizus* and *Hylocereus undatus* on physicochemical, proteolysis, and antioxidant activity in yogurt. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 3,

Sitios web

Enzimas para maceración: <https://www.enzymeinnovation.com/fruit-vegetable/apple-pear-fruit-maceration/>

Pectinex Ultra SP-L de Novozymes: <https://biosolutions.novozymes.com/en/juice-fruit-vegetables/products/vegetables/pectinex-ultra-sp-l>

Último acceso: 18 de noviembre, 2022.

TERCERA PARTE

MACERACIÓN DE TEJIDOS VEGETALES

Resumen

La maceración de vegetales utilizando enzimas que maceran el tejido sin licuefacionarlo permite obtener células enteras de vegetales, que pueden utilizarse en alimentos altamente nutricionales. Por otro lado, la maceración con licuefacción permite extraer compuestos a partir de tejidos vegetales (como colorantes) y mejorar la calidad nutricional de alimentos, jugos, extractos, etc. En esta sección del capítulo se evaluó la capacidad de los extractos pectinolíticos antárticos y de la enzima PGasaI de macerar morrón. Se realizó un diseño experimental de Doehlert con las variables relación sólido-líquido (1:2-1:6), el tiempo de macerado (1-5 h) y el título total de poligalacturonasa (1-100 U). Se encontró que las variables tiempo y título de enzima fueron significativas para explicar la variación del rendimiento de vegetal obtenido, mientras que la relación sólido-líquido no lo fue en el rango estudiado para ninguno de los dos extractos. Se lograron rendimientos de maceración cercanos al 90%. La enzima PGasaI se evaluó logró un 24% más de maceración respecto del control sin enzima, con un título de 10 U totales, luego de 6 horas.

Se analizaron la actividad antioxidante, polifenoles totales y azúcares reductores de los macerados obtenidos en la mejor condición del Doehlert utilizando ambos extractos enzimáticos, para compararlos con un control en el que no se agregó enzima. Utilizando las enzimas producidas por *T. pullulans* 8E y *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 se extrajeron 2.8 y 0.7 veces más de actividad antioxidante por gramo de morrón, respectivamente, en comparación con el macerado sin enzimas. Los aumentos en polifenoles fueron de 0.9 y 0.2 veces, respectivamente. En cuanto a los azúcares reductores, las diferencias fueron de

2.9 y 1.5 con las enzimas de *T. pullulans* 8E y *Mrakia* sp. LP 7.1.2016, respectivamente. Estos extractos podrían ser utilizados en distintos procesos en los cuales es necesario macerar vegetales, ya sea para preparar un puré vegetal licuado a bajas temperaturas o en algún proceso extractivo de compuestos vegetales de interés.

INTRODUCCIÓN

Morrón (*Capsicum annuum* L.)

El morrón (*Capsicum annuum* L.) es una importante hortaliza cultivada en diferentes regiones templadas y tropicales del mundo. Este fruto posee un alto valor biológico: alto contenido en sustancia seca, vitamina C y complejo B, minerales, aceites esenciales y carotenoides, entre otros. Además, es utilizado extensivamente en la industria culinaria y alimentaria de diferentes países. La capsaicina, el alcaloide picante del morrón rojo ha sido ampliamente estudiada por sus efectos biológicos que son de relevancia farmacológica. Estos incluyen: influencia cardioprotectora, efecto antilítogénico, antiinflamatorio y analgésico, influencia termogénica y efectos beneficiosos sobre el sistema gastrointestinal. Por lo tanto, los capsaicinoides pueden tener un valor clínico potencial para el alivio del dolor, la prevención del cáncer y la pérdida de peso (Srinivasan 2016). En este trabajo se eligió este fruto como modelo para probar la capacidad de maceración o de licuefacción de los pools enzimáticos antárticos y la enzima PGasaI parcialmente purificada en el Capítulo 5.

Agentes antioxidantes

Los agentes antioxidantes inhiben la peroxidación lipídica tanto en los alimentos como en los organismos vivos, lo que ayuda a prevenir algunas enfermedades. Esta característica los hace muy importantes para el cuidado de la salud. También se ha reportado que ayudan a prevenir la oxidación de lípidos en los alimentos, mejorando su calidad y aumentando su vida útil (Gulcin 2020).

El ensayo de captación de radicales ABTS (2,2'-azino-bis-3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) es un método de decoloración en el que el catión preformado (ABTS^{*+}) se reduce a ABTS mediante moléculas donantes de electrones (antioxidantes),

lo que reduce la absorbancia (Callegaro, *et al.* 2018). La eliminación de radicales libres es uno de los mecanismos por los cuales los antioxidantes actúan en los sistemas biológicos. El método ABTS puede reflejar ambos mecanismos antioxidantes: transferencia de electrones y transferencia de átomos de hidrógeno (Gulcin 2020).

Maceración de vegetales

Tal como se explicó en la Parte 2 de este capítulo, la maceración de vegetales se considera como la desintegración del tejido vegetal. Sin embargo, hay autores que consideran la maceración un proceso que conlleva la obtención de células vegetales enteras, a este proceso le llamaremos maceración sin licuefacción (MsL) a partir de este momento, para diferenciarlo de la maceración con licuefacción (ML). La MsL puede conducir a la obtención de células vegetales intactas, que conservan compuestos con actividades beneficiosas dentro de las mismas, por lo que se ha sugerido que estas pulpas son adecuadas principalmente para el consumo de bebés y ancianos (Franchi 2016; Zapata, *et al.* 2012). Por otro lado, la ML de vegetales ha sido más mencionada (como “maceración”), y ha sido estudiada con diversos objetivos. Además de los ejemplos mencionados en la introducción de la Parte 2 de este capítulo, podemos mencionar algunos de los trabajos más recientes en los que se utilizó la maceración enzimática con los siguientes objetivos:

- Reducción de la consistencia de la pulpa de pimiento y aumento el rendimiento del extracto utilizado para preparar la salsa Tabasco (Farias, *et al.* 2020).

- Maceración de grosellas negras para obtención de un jugo con mayor contenido de antocianinas y fenoles (Landbo & Meyer 2004).

- Obtención de un puré vegetal (zapallo, *cucurbita moschata* L.) óptimo para poder ser secado por spray (Shavakhi, *et al.* 2021).

- Obtención de un jugo de espárragos con mejores propiedades nutricionales (Sun, *et al.* 2007).

- Extracción enzimática de compuestos bioactivos. La investigación en este campo es continua y tiene potencial de ser comercialmente atractiva (Puri, *et al.* 2012). Por ejemplo, se han utilizado enzimas para la obtención de antocianinas a partir de cerezos nativos (*Prunus lepalensis* L.) (Swier, *et al.* 2018). También se ha estudiado la extracción de carotenoides a partir de gac (*Momordica cochinchinensis*) (Debaste, *et al.* 2013).

-La maceración del tejido de mandioca con enzimas ha sido propuesta como alternativa para la producción de un puré de yuca (mandioca) deshidratado, que permita mejorar las propiedades funcionales y nutricionales del producto. En este caso se propuso la utilización de enzimas en un proceso MsL (Martos, *et al.* 2013).

Por lo tanto, se puede ver que la maceración de vegetales es utilizada con distintos objetivos, dependiendo del objetivo último del estudio. En este capítulo se estudiará la capacidad de los extractos enzimáticos estudiados en este capítulo y la PGasaI purificada en el Capítulo 5 para macerar tejido vegetal. Se utilizará morrón (*Capsicum annuum* L.) como vegetal modelo, y se evaluará si existe maceración y de qué tipo (MsL o ML).

Diseño estadístico de Doehlert

El diseño experimental de Doehlert es un diseño del tipo matricial que permite describir una región en torno a una respuesta óptima, con n^2+n+1 puntos experimentales, siendo n el número de variables. Para el estudio de tres variables es necesario realizar un total de 13 experiencias, entre las cuales 12 experimentos serán equidistantes del experimento central, los cuales forman un cubo-octaedro (Figura 7.25). El experimento central posee las coordenadas codificadas $(0,0,0)$, y se realiza por triplicado con el fin de determinar la varianza propia del diseño (Ferreira, *et al.* 2004).

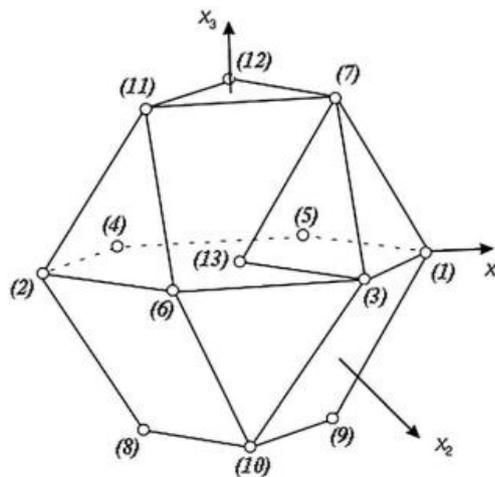


Figura 7.25 Cubo-octaedro con los 13 puntos experimentales para las 3 variables codificadas en el diseño experimental de Doehlert. Tomado de Cavello (2013).

OBJETIVOS PARTICULARES DE ESTA SECCIÓN

- ◆ Evaluar la capacidad de los extractos pectinolíticos antárticos de las levaduras *T. pullulans* 8E y *Mrakia* sp. LP 7.1.2016, y de la enzima PGasaI en el proceso de maceración a 20 °C de *Capsicum annuum* L. (morrón, variedad roja).
- ◆ Evaluar la capacidad de estas enzimas de macerar el tejido con obtención de un puré vegetal con células enteras o con licuefacción del tejido.
- ◆ Utilizar diseños estadísticos para modelar la variable respuesta rendimiento de macerado en función de las variables: relación sólido-líquido, título enzimático y tiempo de maceración.
- ◆ Determinar características de los macerados obtenidos, como actividad antioxidante, concentración de polifenoles y de azúcares reductores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fuente de enzimas

El extracto pectinolítico de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 fue producido en un fermentador de 3.5 o 1.5 l tal como se detalla en el Capítulo 4 de la presente tesis. El extracto pectinolítico de *T. pullulans* 8E fue producido como se detalló previamente. Ambos extractos se concentraron mediante liofilización y luego se sometieron a un desalado usando filtros tangenciales (Vivascience 10 MW, Sartorius). La actividad poligalacturonasa del extracto de *T. pullulans* 8E no se vio afectada por la concentración en estos filtros, por lo que en este caso también se realizó un cambio de buffer (5 volúmenes de BCP pH 5.0).

La enzima PGasaI fue purificada como se detalló en el Capítulo 5 a partir de un extracto enzimático producido por *Mrakia* sp. LP 7.1.2016. Se concentró para el ensayo utilizando un concentrador centrífugo con membrana de corte de 3 kDa (VivaspinTM, Sartorius).

La actividad poligalacturonasa fue cuantificada como se describió en el Capítulo 3. El extracto enzimático concentrado producido por *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 obtuvo un título enzimático de 26.7 U ml⁻¹, el de *T. pullulans* 8E, 21 U ml⁻¹, y la solución de PGasa I, 0.8 U ml⁻¹.

Vegetal

Los morrones (*Capsicum annuum L.*) de la variedad roja fueron adquiridos en una verdulería en la ciudad de La Plata (Figura 7.26). Se seleccionaron vegetales sanos y la superficie fue sanitizada utilizando etanol 70% v v⁻¹. Se les quitaron las semillas utilizando un cuchillo limpio y un sacabocados para cortarlo.



Figura 7.26 Variedad de morrón (*Capsicum annuum L.*) utilizado en este estudio.

Protocolo de maceración enzimática

Se utilizó el protocolo de Zapata, *et al.* (2012) con ligeras modificaciones. Este permite separar las células enteras de los restos celulares, en caso de obtenerse. El morrón fue cortado utilizando un sacabocados, de manera de obtener pequeños cilindros de 5 mm (diámetro). Tres gramos se mezclaron con buffer BCP (pH 5.0) y se agitaron durante 30 minutos en un shaker (Huanghua Faithful, China) a 150 rpm, 20 °C. Pasado ese tiempo, se agregó la enzima en una concentración requerida en cada ensayo según el diseño estadístico que se indicará en cada caso. El tiempo de maceración también fue variable en cada experimento. Pasado el tiempo de incubación, el tejido no macerado (TNM) se separó mediante retención en un tamiz Tyler de malla N° 16, y el tejido macerado (TM) fue separado del sobrenadante (S) mediante centrifugación a 3000 x g durante 15 minutos (Figura 7.27A). Se evaluó la capacidad de las preparaciones enzimáticas de liberar células vegetales sanas a partir del tejido. Para ello, se realizó el procedimiento y se evaluó la

presencia de células enteras observando los macerados al microscopio óptico (40X). En caso de no observarse células sanas, se utilizó el protocolo observado en la Figura 7.27B, en el que se obtiene únicamente tejido macerado (licuado) o no macerado (TNM).

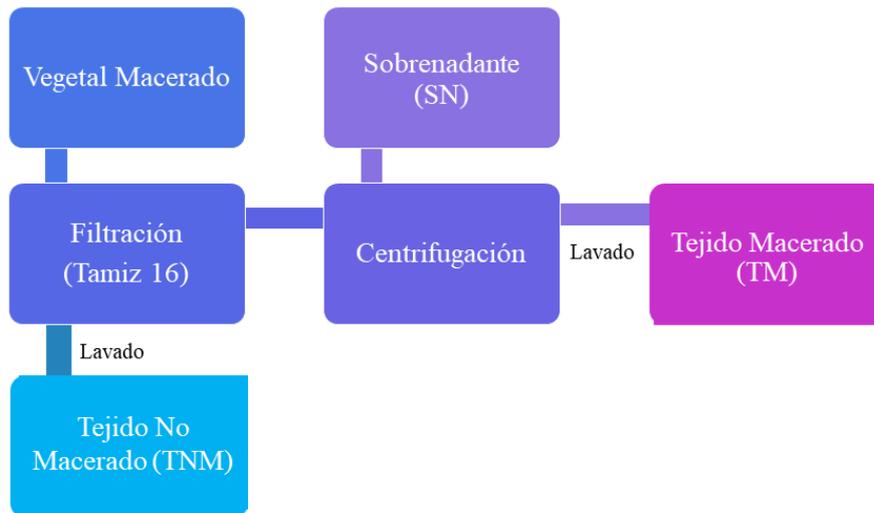


Figura 7.27A Esquema metodológico para el ensayo de maceración sin licuefacción (MsL, con obtención de células enteras).

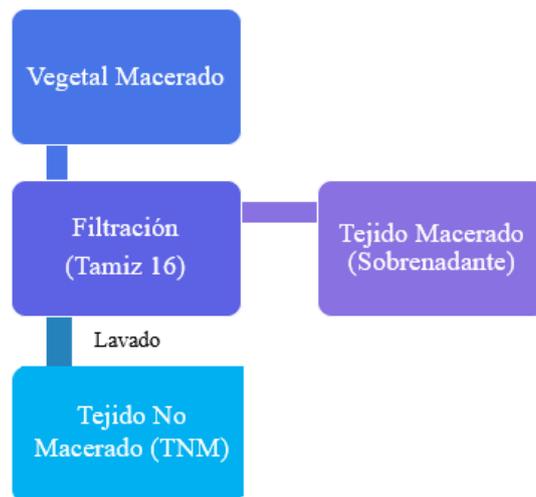


Figura 7.27B Esquema metodológico para el ensayo de maceración vegetal con licuefacción (ML).

En ambos protocolos, el TNM fue lavado con 10 ml de agua destilada. Se realizaron pesos secos de las fracciones macerada y no macerada.

La variable respuesta fue el porcentaje de tejido macerado, calculado como:

$$\% \text{ Tejido macerado} = \frac{P_{TM}}{P_{TM} + P_{TNM}} * 100$$

Donde P_{TM} son los gramos de peso seco obtenidos a partir de la porción de tejido macerada, y P_{TNM} son los gramos de peso seco obtenidos a partir de la porción de tejido no macerada.

Diseño experimental

Se realizó un ensayo de Doehlert con tres variables (Figura 7.28). Para cada uno de los extractos, se evaluaron tres variables: la relación sólido:líquido (1:2-1:6), el título enzimático (1-100 U totales) y el tiempo (1-5 h). Los valores codificados y reales de cada experimento se muestran en la Tabla 7.9. El punto central se realizó por triplicado (experimentos 1, 2 y 3).



Figura 7.28 Ensayo estadístico de Doehlert para la maceración de morrón. A la derecha, morrón cortado previo a la maceración.

Tabla 7.9 Ensayos de maceración realizados con el extracto enzimático de 8E. Valores codificados y reales de las variables 1 (V1, relación sólido:líquido), variable 2 (V2, tiempo) y variable 3 (V3, unidades enzimáticas totales)

Experimento	V1 Cod (X ₁)	V1 real	V2 Cod (X ₂)	V2 real	V3 Cod (X ₃)	V3 real
1	-0.816	1:2	-0.5	2	-0.289	34
2	-0.816	1:2	0	3	0.577	83.5
3	-0.816	1:2	0.5	4	-0.289	34
4	0	1:4	0	3	0	50.5
5	0	1:4	0	3	0	50.5
6	0	1:4	0	3	0	50.5
7	0	1:4	1	5	0	50.5
8	0	1:4	0.5	4	0.866	100
9	0	1:4	-0.5	2	0.866	100
10	0	1:4	-1	1	0	50.5
11	0	1:4	-0.5	2	-0.866	1
12	0	1:4	0.5	4	-0.866	1
13	0.816	1:6	-0.5	2	0.289	67
14	0.816	1:6	0	3	-0.577	17.5
15	0.816	1:6	0.5	4	0.289	67

En el caso de la enzima PGasaI se realizó un tratamiento con una cantidad de enzima de 10 U totales, manteniendo la relación sólido:líquido en 1:6 y un tiempo de maceración de 6 horas a 150 rpm y 20 °C. El rendimiento se comparó con el obtenido con un tratamiento en el que sólo se agregó buffer BCP. Cada tratamiento se realizó por triplicado y se reportan los promedios \pm el desvío estándar.

Caracterización del tejido macerado

En el caso del proceso MsL, con obtención de células vegetales, el TM se trató con un volumen de etanol 96% y se agitó para romper las células. Se realizaron las determinaciones en el TM y el SN. En el caso del proceso ML, sólo se separó el tejido no macerado con ayuda del tamiz y se realizaron las determinaciones en el macerado (sin centrifugar).

Evaluación de la actividad antioxidante por el método del radical

ABTS*+ (2,2'- azino-bis-3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio)

El método del radical ABTS se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS*+, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones. El radical catiónico ABTS*+ es un cromóforo que absorbe a $\lambda = 415$ o 734 nm, y se genera por una reacción de oxidación del ABTS con persulfato de potasio (Re, *et al.* 1999).

Para el ensayo, se dejaron reaccionar $10 \mu\text{l}$ de muestra con $990 \mu\text{l}$ de una solución del radical ABTS*+. Este radical fue preparado por oxidación, mezclando ABTS (3.60 g l^{-1}) con $\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$ (0.66 g l^{-1}) y dejando reaccionar durante una noche en oscuridad a temperatura ambiente. Para el ensayo se utilizó buffer fosfato salino (PBS, 5 mM , $\text{pH } 7.4$) para llevar esta solución a una absorbancia inicial (a 734 nm) de ~ 0.7 . El tiempo de reacción fue de 10 minutos al resguardo de la luz, luego de los cuales se determinó la disminución de la absorbancia a 734 nm , la cual está asociada a la reducción de la concentración de ABTS*+. El porcentaje de *scavenging* o inhibición del radical ABTS se calculó como:

$$\% \text{ scavenging} = \frac{A_B - A_m}{A_B} * 100$$

Donde A_B es la absorbancia del blanco, en este caso realizada con PBS, y A_m es la absorbancia de la muestra al tiempo de reacción dado.

Además, los resultados se expresaron en actividad antioxidante en equivalentes de Trolox (TEAC), un análogo de la vitamina E. Para ello, se realizó una curva de calibración con este compuesto en concentraciones entre 0-4 mM. Cada determinación se realizó por triplicado.

Determinación de fenoles totales

Para esta determinación se utilizó el método de Folin-Ciocalteu (Dewanto, *et al.* 2002). Para ello, 1 ml de extracto diluido se mezcló con 125 μ l de reactivo de Folin-Ciocalteu y 625 μ l de agua destilada y se dejó reaccionar durante 6 minutos. Pasado ese tiempo, se adicionaron 1.25 ml de solución de Na_2CO_3 (7% p v⁻¹) y 1.0 ml de agua. Luego de 90 minutos se leyó la absorbancia a 760 nm, usando agua destilada como blanco. Para la curva patrón se usó ácido gálico como estándar (0-50 ppm). Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico por gramo inicial de vegetal

Determinación de azúcares reductores

Se determinaron los azúcares reductores mediante el método Somogyi-Nelson, ya explicado en secciones previas (Nelson 1944; Somogyi 1952). Se utilizó una curva de calibración con glucosa (0-250 ppm).

Análisis estadístico

Los análisis del modelo de Doehlert realizado se llevaron a cabo utilizando el software Statgraphics Plus. La relación matemática que correlaciona las variables dependientes e independientes se expresó en el siguiente polinomio de segundo orden:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_{ij}$$

Donde Y es la respuesta predicha, β_0 es la constante del modelo (el intercepto), y β_i , β_{ii} , β_{ij} son los coeficientes para los efectos lineales, cuadráticos y de interacción, respectivamente. Finalmente, X_1 , X_2 , y X_3 son los valores independientes codificados de los parámetros estudiados.

En las determinaciones analíticas, se reportan los promedios de tres réplicas con su desvío estándar. Se realizaron análisis de ANOVA, considerando significativas las diferencias que obtuvieron un $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variables estudiadas

En esta parte del trabajo se propuso evaluar la capacidad de dos extractos pectinolíticos antárticos de generar macerados vegetales con propiedades funcionales, utilizando como modelo el morrón. Primero se propuso estudiar tres variables que pueden afectar el proceso, tratándose de una reacción heterogénea: la relación sólido-líquido, las unidades enzimáticas y el tiempo de maceración.

Se ha reportado que ciertos procesos de extracción de compuestos desde un sólido a un líquido la relación entre el sólido y el líquido en el proceso posee una importancia significativa. Por ejemplo, la extracción de pectina mediada por ultrasonidos a partir de cáscara de granada fue fuertemente afectada por la relación sólido-líquido (Moorthy, *et al.* 2015), la cual también afectó la extracción de compuestos a partir de extractos vegetales (Durdun, *et al.* 2016). Por lo tanto, se propuso evaluar si existen diferencias en el rendimiento de macerado obtenido al usar relaciones sólido-líquido en un rango 1:2-1:6.

Hace algunos años la actividad protopectinasa era considerada como una actividad propia de algunas pectinasas, y consistía en la capacidad de la enzima de hidrolizar el sustrato (pectina) pero encontrándose en estado insoluble, como protopectina (Nakamura, *et al.* 1995; Rojas, *et al.* 2008; Zapata, *et al.* 2012). La mayoría de los trabajos actuales consideran esta actividad como una variación de la actividad pectinolítica sobre sustrato soluble, y no como una actividad hidrolítica diferente (Ropartz & Ralet 2020). Sin embargo, en la mayoría de los casos se ha visto que la actividad sobre un sustrato pectinolítico insoluble es menor que la presentada por la misma enzima frente al sustrato en solución (Fratebianchi de la Parra 2017).

Las unidades enzimáticas son un factor importante a considerar cuando se realizan procesos enzimáticos. Varios procesos han demostrado que un aumento de la cantidad de enzima no siempre va de la mano con un aumento del rendimiento, lo cual también fue observado en las primeras secciones de este capítulo (Cavello, *et al.* 2017; Franchi 2016; Swer, *et al.* 2018). Por lo tanto, se ensayó en este capítulo un rango amplio (1-100 U poligalacturonasa) para evaluar cuál es el rango óptimo de enzima a agregar.

El tiempo de maceración (o de extracción) ha demostrado ser una variable que afecta fuertemente el rendimiento en este tipo de procesos (Franchi 2016; Kapasakalidis, *et al.* 2009; Moorthy, *et al.* 2015). En este capítulo, el tiempo de maceración se varió entre 1 y 5 horas en el caso de los ensayos con extractos enzimáticos, mientras que se dejó durante 6 horas en el caso del tratamiento con PGasaI, ya que se utilizó un título de enzima menor.

Maceración

Extractos de T. pullulans 8E y Mrakia sp. LP 7.1.2016

Se realizó el primer Doehlert utilizando el extracto con actividad poligalacturonasa producido por *T. pullulans* 8E, tal como se detalló en materiales y métodos (Tabla 7.9). Luego del tiempo de maceración se observó degradación del tejido, y la intensidad de los colores del sobrenadante fue variable en los distintos puntos experimentales (Figura 7.29).

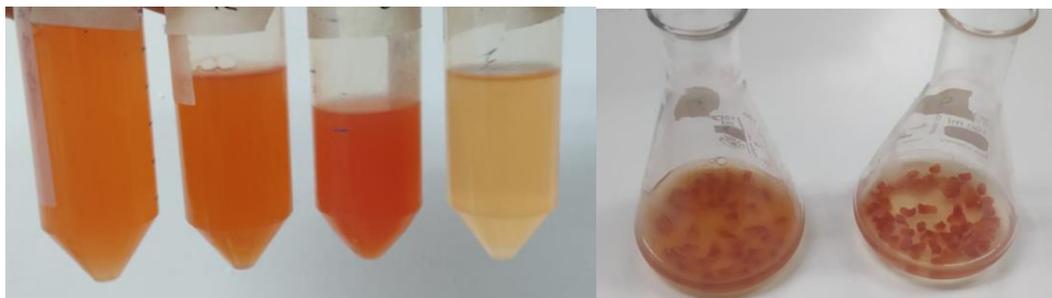


Figura 7.29 Hacia la izquierda se observa la diferencia de maceración en algunos de los experimentos del diseño de Doehlert (extracto 8E). El color más intenso en las porciones maceradas indica una mayor maceración del tejido. Hacia la derecha, maceración en dos de los experimentos del Doehlert al finalizar el tiempo de maceración.

Para evidenciar si este extracto actúa como macerativo o de licuefacción (proceso MsL o ML), el tejido macerado obtenido según el esquema de la Figura 7.27 se observó al microscopio óptico. Se observaron muchos restos celulares, incluidos cúmulos de lo que parecen ser vacuolas conteniendo pigmentos, sin embargo se encontró que las células no se encontraban íntegras, sino que las paredes celulares se rompieron durante el proceso (Figura 7.30). Por lo tanto, si bien este extracto macera el tejido, también destruye las células, por lo que podría ser clasificado como un producto enzimático para macerar el tejido vegetal hasta su licuefacción (ML). Este resultado contrasta con lo observado en otros trabajos: Franchi (2016) obtuvo células enteras de manzana y de zapallo luego de macerarlos con la poligalacturonasa de *Geotrichum klebahnii* y *Aspergillus sojae*, y Martos, *et al.* (2013) trabajaron con un extracto con actividad poligalacturonasa producido por *Wickerhamomyces anomalus* para macerar tejido de mandioca y obtuvieron células enteras y disgregadas de la misma. Zapata, *et al.* (2012) estudiaron la MsL de albedo de naranja utilizando un extracto pectinolítico producido por *Geotrichum klebahnii*. Ellos también obtuvieron células individuales intactas luego de macerar el tejido con ese extracto enzimático. Los resultados obtenidos en este capítulo con los extractos utilizados frente al morrón podría ser explicado por la cantidad de enzimas accesorias que posee el extracto (entre ellas, celulasas) lo vuelva un tratamiento muy

drástico para esta aplicación. Por otro lado, el tejido de morrón podría resultar más sensible al tratamiento enzimático respecto a los utilizados en los otros trabajos mencionados, debido a una diferencia en su composición. Nakamura, *et al.* (1995) estudiaron la maceración enzimática con pectinasas de distintos tejidos vegetales y observaron que el tejido de morrón era uno de los más macerados (considerando las distintas enzimas ensayadas).

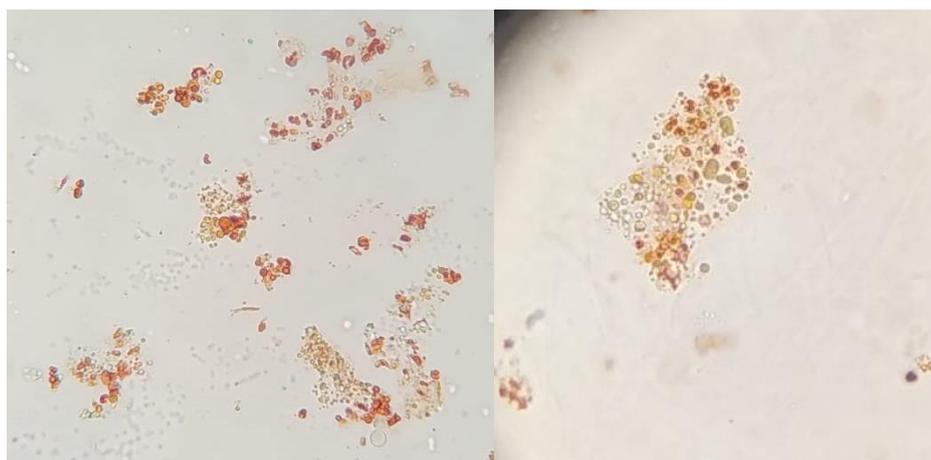


Figura 7.30 Fotografía del tejido macerado obtenido con el pool pectinolítico producido por *T. pullulans* 8E, observado al microscopio (40X).

El mismo Doehlert fue realizado con el extracto de *Mrakia* sp. LP 7.12016. En este caso, a simple vista, luego de la incubación se observó una mayor maceración, como desaparición del tejido inicial (Figura 7.31). Recuérdese que, al analizar ambos extractos en el proceso de extracción de pectina a partir de cáscara de lima, el extracto 8E fue útil mientras que el extracto 7.1.2016 degradó la pectina, por lo que se podría sugerir que es un extracto que produce un efecto más drástico.



Figura 7.31 Maceración de morrón utilizando el extracto enzimático de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016. Izquierda: morrón inicial. Centro: luego del tratamiento enzimático. Derecho: porción macerada.

Se observó al microscopio el tejido macerado y se observó que, nuevamente, no se trataba de células enteras, por lo que este extracto también es del tipo de licuefacción (Figura 7.32).

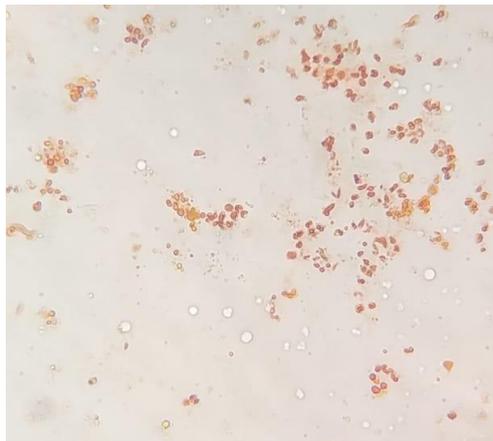


Figura 7.32 Fotografía del tejido macerado obtenido con el extracto pectinolítico producido por *Mrakia* sp. LP 7.1.2016, observado al microscopio (40X).

Los valores de la variable respuesta para cada uno de los puntos testeados para cada extracto enzimático se muestran en la Tabla 7.10.

Tabla 7.10 Rendimiento de tejido macerado de *Capsicum annum L.* obtenido para cada experimento de los Doehlert realizados con los pooles pectinolítico antárticos. Los detalles de cada experimento se encuentran en la Tabla 7.9.

Ensayo	Rendimiento macerado (%) 8E	Rendimiento macerado (%) 7.1.2016
1	56.1	69.1
2	73.8	87.4
3	63.9	80.8
4	70.0	81.0
5	69.7	81.1
6	69.4	80.0
7	86.7	88.1
8	74.1	82.8
9	68.1	80.7
10	52.9	68.9
11	47.1	42.1
12	47.4	50.9
13	60.2	75.7
14	60.0	67.2
15	69.5	86.0

En el caso del modelado utilizando el e extracto 8E se obtuvo un r^2 de 91%, y el r^2 ajustado por grados de libertad, 75%, indicando que el modelo obtenido puede explicar casi el 91% de la variación obtenida. El gráfico de Pareto obtenido a partir del análisis del modelo se muestra en la Figura 7.33. En el caso del extracto 8E, las variables significativas que explican gran parte de la variación experimental en la variable respuesta son el título de enzima y el tiempo, ambos de manera positiva, y el título de enzima la cuadrado, con un efecto negativo (Tabla ANOVA en Anexo 5).

Gráfico de Pareto estandarizado para Rendimiento macerado

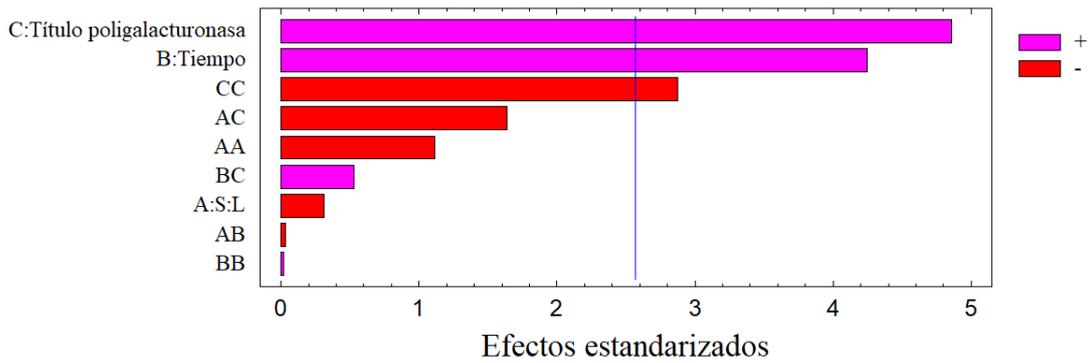


Figura 7.33 Gráfico de Pareto mostrando los efectos estandarizados obtenidos en el diseño de Doehlert de tres variables realizado con el extracto enzimático de *T. pullulans* 8E.

En el caso del modelo al utilizar el extracto de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016, el r^2 fue de 92.7%, y el r^2 ajustado por grados de libertad, 79.7%, indicando que el modelo obtenido puede explicar casi el 80% de la variación obtenida. El gráfico de Pareto, que muestra los factores que fueron significativos para el modelado de la variable respuesta, fue muy similar al obtenido para el extracto de 8E, y se muestra en la Figura 7.34 (Tabla ANOVA del modelo en Anexo 5).

Gráfico de Pareto estandarizado para Rendimiento macerado

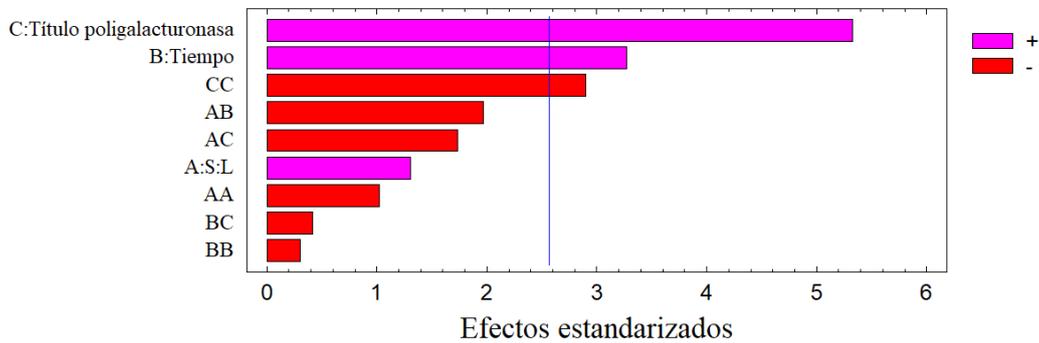


Figura 7.34 Gráfico de Pareto mostrando los efectos estandarizados obtenidos en el diseño de Doehlert de tres variables realizado con el extracto enzimático de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016.

El análisis estadístico de los resultados permitió obtener un polinomio de segundo orden que refleja cómo los efectos lineales y cuadráticos, así como las distintas interacciones de los mismos afectan el rendimiento del macerado de morrón. El polinomio obtenido que describe la influencia de cada variable y sus interacciones sobre esta variable es:

Extracto de *T. pullulans* 8E:

$$\text{Maceración (\%)} = 69.7 - 0.84274 * V1 + 11.375 * V2 + 13.0196 * V3 - 5 * V1^2 - 0.246442 * V1 * V2 - 11.333 * V1 * V3 + 0.1 * V2^2 + 3.29099 * V2 * V3 - 14 * V3^2$$

Extracto de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016:

$$\text{Maceración (\%)} = 80.7 + 5.28125 * V1 + 13.2 * V2 + 21.5069 * V3 - 7 * V1^2 - 21 * V1 * V2 - 18.0489 * V1 * V3 - 2.2 * V2^2 - 4 * V2 * V3 - 21 * V3^2$$

Donde debe reemplazarse cada valor codificado de las variables relación S:L (V1c), tiempo (V2c) y enzima (V3c) para obtener el valor de la variable respuesta (porcentaje de maceración). Utilizando estos polinomios se obtuvieron las superficies de respuesta, manteniendo la variable relación S:L en valores constantes y variando las otras dos variables. Los resultados se muestran en las Figuras 7.35 y 7.36.

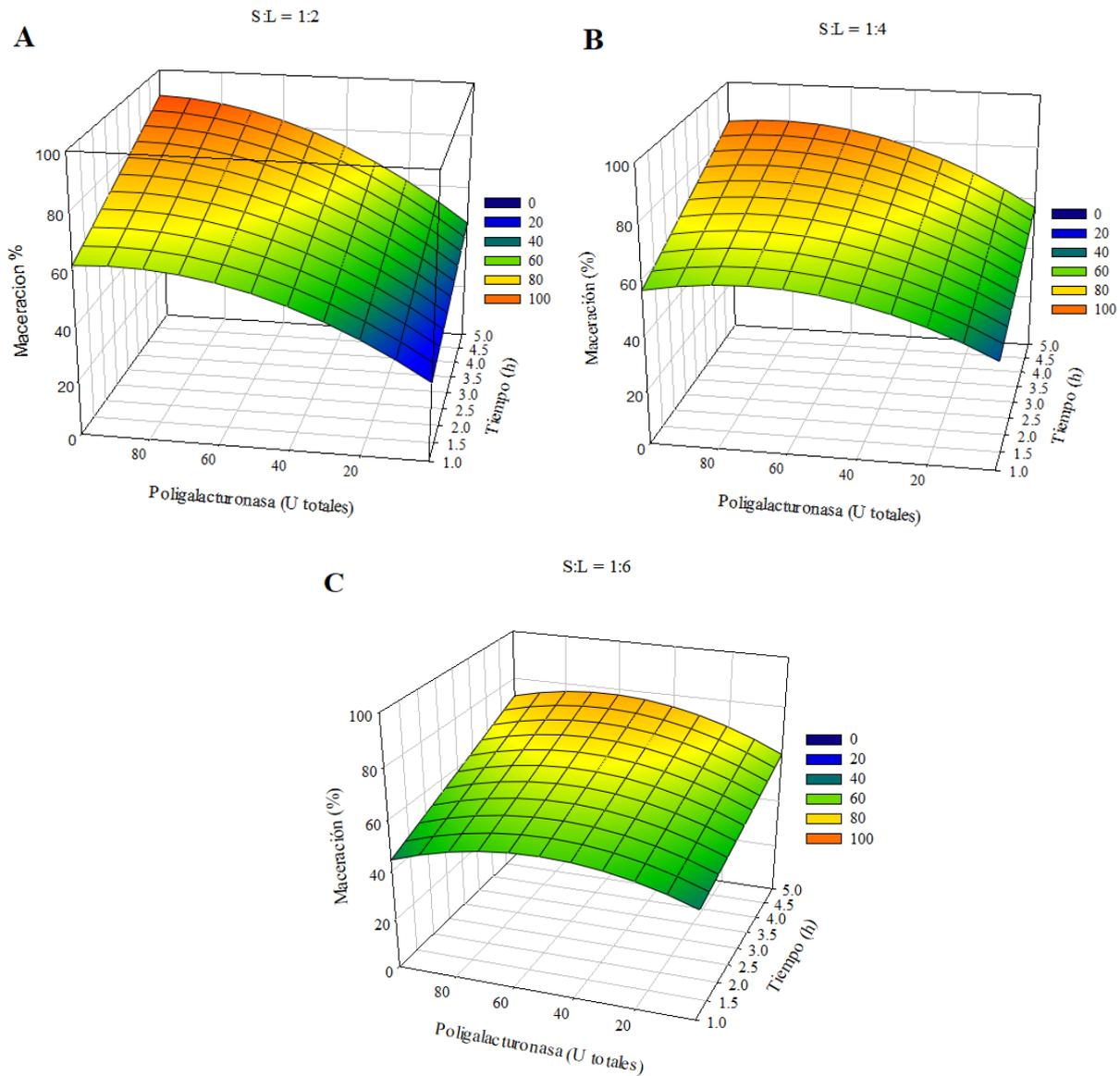


Figura 7.35 Superficies de respuesta obtenidas analizando como variable respuesta el % de reducción de sólido. La maceración se llevó a cabo utilizando el pool enzimático producido por *T. pullulans* 8E. Se muestran las superficies manteniendo fija la relación sólido líquido en 1:2 (A), 1:4 (B) y 1:6 (C).

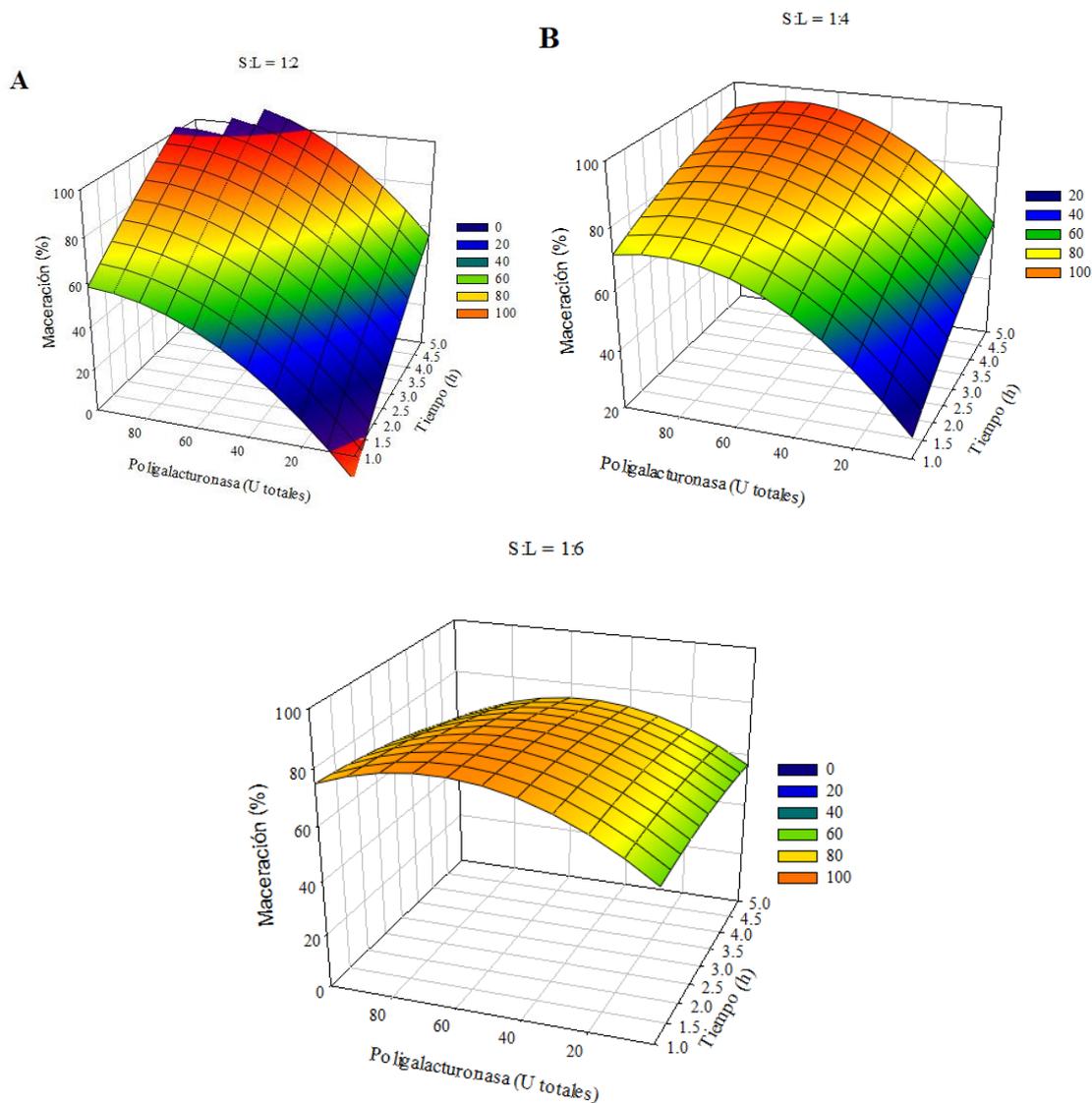


Figura 7.36 Superficies de respuesta obtenidas analizando como variable respuesta el % de reducción de sólido. La maceración se llevó a cabo utilizando el pool enzimático producido por *Mrakia sp. LP 7.1.2016*. Se muestran las superficies manteniendo fija la relación sólido líquido en 1:2 (A), 1:4 (B) y 1:6 (C).

Observando las superficies de respuesta obtenidas, podemos ver que ambos modelos estiman que al aumentar las unidades de enzima y aumentar el tiempo de maceración, el porcentaje de maceración se maximiza. Esto tiene sentido y está en concordancia con muchos trabajos en los que se utilizan enzimas en procesos de extracción a partir de vegetales. Kapasakalidis, *et al.* (2009) utilizaron celulasas para incrementar la extracción de fenoles a partir de pomaza de grosella, y llegaron a la conclusión del rendimiento de estos compuestos estuvo en dependencia del dosaje de enzima, la temperatura y el tiempo.

Nath, *et al.* (2016) estudiaron la maceración de morrón con enzimas pectinolíticas y celulolíticas provistas por Sigma-Aldrich, a 60 °C durante 1 h. Ellos reportaron que los extractos con actividad pectinolítica fueron los más exitosos en la licuefacción, en comparación con los meramente celulolíticos. Esto tiene sentido teniendo en cuenta la estructura de la pared vegetal, el cual se trata de un entramado de pectina, celulosa y hemicelulosa (principalmente). Por otro lado, al igual que en este trabajo se observó que el porcentaje de maceración fue (en el rango estudiado) dosaje-dependiente, observándose una mayor ML al aumentar el título enzimático. El extracto Viscozyme L al 0.3% ([Viscozyme L, Novozymes](#)) logró un 87.5% de maceración. Obsérvese que este valor ronda al aquí obtenido con 50.5 unidades enzimáticas totales luego de 5 horas de maceración a 20 °C (Tabla 7.10, condición 7). Sin embargo, debe considerarse que Nath, *et al.* (2016) realizaron un pre-ablandamiento del tejido a altas temperaturas, con inactivación de enzimas endógenas del vegetal. La pertinencia de este proceso debe ser evaluada teniendo en cuenta los objetivos últimos del estudio. En este estudio sólo se pretendía evaluar cómo las enzimas exógenas ayudan en la maceración del vegetal, por lo que no se inactivaron las enzimas endógenas.

En la Figura 7.37 se muestra el sólido remanente luego de realizar la maceración correspondiente al experimento 7 sin enzima exógena (A), utilizando el extracto de *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 (B) y se muestra el sólido inicial (sin macerar, C). Se puede observar que prácticamente la totalidad del tejido blando se desintegró durante la maceración al agregar la enzima exógena Figura 7.37B.

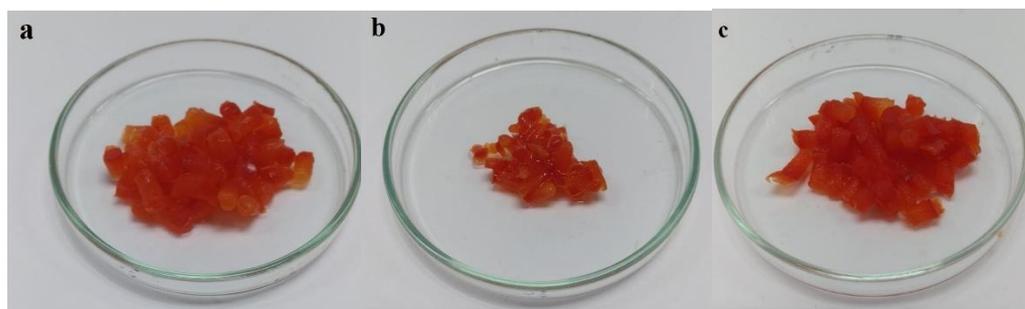


Figura 7.37. Sólido de morrón remanente luego de maceración con las condiciones indicadas en el experimento 7 del Doehlert, sin enzima exógena (a), con enzima exógena de *Mrakia sp. lp 7.1.2016* (b) y se muestra el sólido inicial sin macerar (c).

Validación de los modelos

Para realizar la validación se eligieron dos puntos al azar dentro del espacio estudiado y se realizó la ML en las condiciones correspondientes. Se puede observar en la Tabla 7.11 que los porcentajes de maceración obtenidos son similares a los predichos, y no existieron diferencias significativas entre los valores.

Tabla 7.11 Validación de los modelos obtenidos para la disminución del sólido remanente durante la maceración con los dos pools pectinolíticos antárticos utilizados. Diferentes letras indican diferencias significativas según ANOVA ($p < 0.05$)

Pool enzimático <i>T. pullulans</i> 8E				
Relación S:L	Tiempo (h)	Título enzima (U totales)	Respuesta experimental	Respuesta predicha
1:6	5.0	19.4	67.4 ± 0.9	69.2
1:2.8	3.5	33.3	67.5 ± 1.2	69.0

Pool enzimático <i>Mrakia sp.</i> LP 7.1.2016				
Relación S:L	Tiempo (h)	Título enzima	Respuesta experimental	Respuesta predicha
1:5	2.0	10.9	54.8 ± 1.0	57.3
1:2.8	3.5	33.3	73.3 ± 5.0	71.2

Maceración con PGasaI

Se utilizó la PGasaI parcialmente purificada en el Capítulo 5 para evaluar su poder macerativo o de licuefacción. Para ello, se mantuvo la relación sólido:líquido en 1:6, basado en los resultados anteriores, y se utilizaron 10 U totales en el tratamiento. Se comparó con un control sin enzima y se incubaron durante 6 horas a 20 °C y 150 rpm. Se utilizaron títulos de PGasa menores porque se disponía de menos enzima que en el caso del extracto enzimático, debido a los pasos de purificación previos. Visualmente se observó maceración del tejido, al comparar con el control (Figura 7.38). Se realizó la separación de las distintas fracciones y se observó el tejido macerado en el microscopio, tras lo cual se pudo constatar que, al igual que lo observado con los extractos, no se obtuvieron células íntegras, sino que se obtuvo una licuefacción del tejido macerado, es decir, el proceso fue ML. Teniendo esto en cuenta, y que, en este caso, se trata de una enzima y no de un cóctel enzimático, se podría sugerir que las células de morrón son más delicadas que las de otros tejidos vegetales a los que se sometieron a este proceso en bibliografía (Franchi 2016; Martos, *et al.* 2013; Zapata, *et al.* 2012).



Figura 7.38 Maceración de morrón sin enzima (Erlenmeyer izquierda) y utilizando la enzima PGasaI (Erlenmeyer derecha) luego de 6 horas de tratamiento. Tubos cónicos con macerado control (izquierda) y tratamiento con PGasaI (derecha):

Los rendimientos obtenidos se muestran en la Tabla 7.12. Se obtuvieron diferencias significativas, siendo el rendimiento con PGasaI un 24% mayor que el obtenido sin PGasaI. Esto demuestra que esta enzima es capaz de licuar el tejido de morrón, pero serían necesarios mayores títulos enzimáticos para alcanzar los rendimientos obtenidos con los pooles enzimáticos testeados.

Tabla 7.12 Rendimiento de tejido macerado obtenido para el ensayo utilizando PGasaI y un control sin enzima

Tratamiento	Rendimiento maceración (%)
Control	53.7 ± 0.8 ^a
PGasaI (10 U)	66.5 ± 4.2 ^b

Caracterización de los macerados enzimáticos

Se determinaron las propiedades de los siguientes macerados de morrón:

- 1) 8E: el macerado obtenido en el tratamiento 7 del Doehlert, que fue el que obtuvo un mayor rendimiento. Para este, en todas las determinaciones se realizó un blanco con el extracto enzimático en la misma dilución en la que fue utilizada.
- 2) 7.1: el macerado obtenido en la misma condición, ya que, de la misma forma fue el que obtuvo el mayor rendimiento. Nuevamente se realizó un blanco con el extracto enzimático en la misma dilución en la que se encuentra en el macerado.
- 3) Un macerado de morrón obtenido en las mismas condiciones, pero sin el agregado de enzima exógena.

Se determinó la actividad antioxidante mediante el método del radical ABTS^{•+}, los azúcares reductores y los polifenoles totales. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.13.

Tabla 7.13 Propiedades determinadas en los macerados de morrón obtenidos

Macerado	Enzima 8E	Enzima 7.1	Sin enzima
TEAC ($\mu\text{moles Trolox g morrón}^{-1}$)	8.98 ± 0.71^a	3.98 ± 0.45^b	2.39 ± 0.33^c
Azúcares reductores (mg g morrón^{-1})	150.4 ± 5.8^a	96.5 ± 4.4^b	38.3 ± 1.0^c
Polifenoles totales ($\text{mg ác. Gálico g morrón}^{-1}$)	1.17 ± 0.08^a	0.72 ± 0.02^b	0.61 ± 0.02^c

En la Tabla 7.13 puede verse que la cantidad de azúcares reductores, polifenoles y actividad antioxidante extraída a partir del tejido de morrón fue mayor utilizando los extractos enzimáticos, con respecto al macerado obtenido sin el agregado de enzima exógena. Estos resultados son coherentes teniendo en cuenta que el rendimiento de macerado fue mayor utilizando las enzimas, respecto del control sin enzimas, que obtuvo un 49.5% de maceración. Las diferencias entre el macerado obtenido con el extracto 8E y el obtenido con el extracto 7.1.2016 puede deberse a interferencias en las mediciones debido a la presencia de compuestos de bajo peso molecular en este último extracto.

Nath, *et al.* (2016) reportaron que la concentración de fenoles totales en un extracto obtenido de morrón fue un poco más del doble al utilizar el extracto Viscozyme L, respecto del extracto obtenido sin utilización de enzima exógena. Se puede ver en la tabla 7.13 que, en el caso del extracto 8E, se obtuvo un resultado similar: la concentración de prácticamente es el doble a la obtenida sin enzima exógena. Por otro lado, la actividad antioxidante (en ese caso, determinada con el radical DPPH) fue 1.4 veces mayor al

utilizar Viscosyme L respecto del control. En este trabajo, el macerado con extracto 8E logró extraer a partir de la misma cantidad de morrón inicial, 2.8 veces más actividad antioxidante que el control sin enzima exógena, y el extracto de 7.1.2016, 0.7 veces más (Tabla 7.13).

Se ha propuesto la utilización de vegetales para extracción de carotenoides, ya que estos pigmentos pueden utilizarse como colorantes alimenticios naturales (Navarro-González, *et al.* 2011). Los métodos más comunes implican la extracción por solventes, lo que resulta peligroso para el consumo humano y el medio ambiente. La creciente demanda de productos “verdes” y saludables ha dado lugar a procesos alternativos ecológicos y eficientes, que reducen a su vez la formación de subproductos. Una de las tecnologías verdes estudiada en los últimos años es la que involucra procesos naturales como la maceración con enzimas (Puri, *et al.* 2012). Así, se puede mejorar los rendimientos de compuestos bioactivos mediante la interrupción de las paredes celulares de los tejidos vegetales y liberar pigmentos, fenoles y flavonoides que de otro modo no están disponibles y pueden perderse en los residuos de la prensa (Nath, *et al.* 2016). Teniendo esto en cuenta, y que aquí sumamos la ventaja de realizar las maceraciones a 20 °C, estos extractos podrían ser estudiados a futuro en algún proceso puntual para obtener pigmentos o metabolitos vegetales de valor económico.

CONCLUSIONES DE ESTA SECCIÓN

En esta sección se estudió la capacidad de dos extractos enzimáticos pectinolíticos antárticos y una poligalacturonasa de macerar morrón a 20 °C. Las tres soluciones enzimáticas fueron capaces de macerar ese vegetal a esta temperatura, obteniéndose licuefacción del tejido. Se estudiaron tres factores que podrían afectar el proceso, siendo significativos dentro del espacio estudiado el título de enzima y el tiempo de maceración al utilizar ambos extractos enzimáticos.

La obtención de una mayor cantidad de antioxidantes y polifenoles sugiere que estas enzimas podrían ser propuestas para procesos de extracción enzimática de este tipo de sustancias a temperaturas bajas, lo cual podría ser beneficioso en caso de extracción de compuestos termolábiles, resultando a su vez en un ahorro energético. También podrían ser útiles para colaborar en la maceración de vegetales en distintos procesos alimenticios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CALLEGARO, K., WELTER, N. & DAROIT, D. J. 2018. Feathers as bioresource: microbial conversion into bioactive protein hydrolysates. *Process Biochemistry*, 75, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.09.002>.
- CAVELLO, I. 2013. Queratinasas microbianas: microorganismos, producción y caracterización. Universidad Nacional de La Plata. Departamento de Química, ^La Plata^, 339
- CAVELLO, I., ALBANESI, A., FRATEBIANCHI, D., GARMEDIA, G., VERO, S. & CAVALITTO, S. 2017. Pectinolytic yeasts from cold environments: Novel findings of *Guehomyces pullulans*, *Cystofilobasidium infirmominiatum* and *Cryptococcus adeliensis* producing pectinases. *Extremophiles*, 21, <http://doi.org/10.1007/s00792-016-0904-0>.
- DEBASTE, F., MAI, C. & TRUONG, V. 2013. Optimisation of enzyme-assisted extraction of oil rich in carotenoids from gac fruit (*Momordica cochinchinensis* Spreng.). *Food Technology and Biotechnology*, 53,
- DEWANTO, V., WU, X., ADOM, K. K. & LIU, R. H. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, <http://doi.org/10.1021/jf0115589>.
- DURDUN, C., PAPUC, C., NICORESCU, V., GAJAILA, I., GORAN, G., PETCU, C. & STEFAN, G. 2016. The influence of solid-to-solvent ratio and extraction method on total phenolic content, flavonoid content and antioxidant properties of some ethanolic plant extracts. *Revista de Chimie -Bucharest- Original Edition-*, 67,
- FARIAS, V. L. D., ARAÚJO, Í. M. D. S., ROCHA, R. F. J. D., GARRUTI, D. D. S. & PINTO, G. A. S. 2020. Enzymatic maceration of Tabasco pepper: effect on the yield, chemical and sensory aspects of the sauce. *LWT - Food Science and Technology*, 127, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109311>.
- FERREIRA, S. L., DOS SANTOS, W. N., QUINTELLA, C. M., NETO, B. B. & BOSQUE-SENDRA, J. M. 2004. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry. *Talanta*, 63, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.01.015>.
- FRANCHI, M. L. 2016. Doctoral. Aplicación de pectinasas a procesos industriales que involucran la producción frutihortícola: PPasa-SE de *Geotrichum klebahnii*, PGI de *Aspergillus kawachii* y PGzyme de *Asperillus sojae*. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Ciencias Biológicas, ^La Plata, Argentina^,
- FRATEBIANCHI DE LA PARRA, D. 2017. Tesis Doctoral. Estudio de la producción de poligalacturonasas de *Aspergillus sojae*: producción, caracterización y aplicación en procesos de vinificación. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Química, ^La Plata^, 197
- GULCIN, İ. 2020. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, 94, <http://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>.

- KAPASAKALIDIS, P. G., RASTALL, R. A. & GORDON, M. H. 2009. Effect of a cellulase treatment on extraction of antioxidant phenols from black currant (*Ribes nigrum* L.) pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, <http://doi.org/10.1021/jf8029176>.
- LANDBO, A.-K. & MEYER, A. S. 2004. Effects of different enzymatic maceration treatments on enhancement of anthocyanins and other phenolics in black currant juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.08.003>.
- MARTOS, M., ZUBRESKI, E., COMBINA, M., GARRO, O. & HOURS, R. 2013. Isolation of a yeast strain able to produce a polygalacturonase with maceration activity of cassava roots. *Food Science and Technology (Campinas)*, 33, <http://doi.org/10.1590/S0101-20612013005000047>.
- MOORTHY, I. G., MARAN, J. P., SURYA, S. M., NAGANYASHREE, S. & SHIVAMATHI, C. S. 2015. Response surface optimization of ultrasound assisted extraction of pectin from pomegranate peel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.037>.
- NAKAMURA, T., HOURS, R. A. & SAKAI, T. 1995. Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *Journal of Food Science*, 60, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb09805.x>.
- NATH, P., KAUR, C., RUDRA, S. G. & VARGHESE, E. 2016. Enzyme-assisted extraction of carotenoid-rich extract from red capsicum (*Capsicum annuum*). *Agricultural Research*, 5, <http://doi.org/10.1007/s40003-015-0201-7>.
- NAVARRO-GONZÁLEZ, I., GARCÍA-VALVERDE, V., GARCÍA-ALONSO, J. & PERIAGO, M. J. 2011. Chemical profile, functional and antioxidant properties of tomato peel fiber. *Food Research International*, 44, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.005>.
- NELSON, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 153, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)71980-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)71980-7).
- PURI, M., SHARMA, D. & BARROW, C. J. 2012. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, 30, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.014>.
- RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M. & RICE-EVANS, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- ROJAS, N. L., CAVALITTO, S. F., MIGNONE, C. F. & HOURS, R. A. 2008. Role of PPase-SE in *Geotrichum klebahnii*, a yeast-like fungus able to solubilize pectin. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11, <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-34582008000100012>.
- ROPARTZ, D. & RALET, M.-C. 2020. Pectin structure. In V. Kontogiorgos eds. *Pectin: Technological and Physiological Properties*. Springer, Cham, Switzerland, 17-36 https://doi.org/10.1007/978-3-030-53421-9_2.

- SHAVAKHI, F., CHAI, K. F. & GHAZALI, H. M. 2021. Enzymatic maceration and liquefaction of pumpkin (*Cucurbita moschata* L.) flesh for the preparation of a suitable base feed for spray drying. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45, <https://doi.org/10.1111/jfpp.15075>.
- SOMOGYI, M. 1952. Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, 195, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50870-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50870-5).
- SRINIVASAN, K. 2016. Biological activities of red pepper (*Capsicum annuum*) and its pungent principle capsaicin: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, <http://doi.org/10.1080/10408398.2013.772090>.
- SUN, T., POWERS, J. R. & TANG, J. 2007. Effect of enzymatic macerate treatment on rutin content, antioxidant activity, yield, and physical properties of asparagus juice. *Journal of Food Science*, 72, <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00345.x>.
- SWER, T. L., MUKHIM, C., BASHIR, K. & CHAUHAN, K. 2018. Optimization of enzyme aided extraction of anthocyanins from *Prunus nepalensis* L. *LWT - Food Science and Technology*, 91, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.043>.
- ZAPATA, A. D. Z., MONTOYA, C. A. G., CAVALITTO, S. F., HOURS, R. A. & ROJANO, B. A. 2012. Enzymatic maceration of albedo layer from sour orange (*Citrus aurantium* L.) with protopectinase-se and measurement of antioxidant activity of the obtained products. *LWT - Food Science and Technology*, 45, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.08.009>.

CONCLUSIONES GENERALES

A lo largo de este trabajo de tesis se caracterizó genética y bioquímicamente una colección de levaduras aisladas a partir de muestras de la Antártida Marítima. Se realizó una bioprospección de levaduras capaces de producir ocho actividades hidrolíticas de interés industrial, y la capacidad de remover tres colorantes textiles del medio de cultivo. Se eligió la levadura *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 para estudiar la producción de β -glucosidasas y poligalacturonasas a nivel Erlenmeyer para luego realizar un escalado a fermentador tipo tanque agitado. Se estudiaron las propiedades bioquímicas del extracto obtenido y se utilizó para la purificación de tres enzimas a partir del mismo extracto enzimático. La BGLasa y PGasaI fueron purificadas mientras que la PGasaII fue parcialmente purificada. Las tres enzimas fueron caracterizadas bioquímicamente. La BGLasa fue estudiada en el proceso de liberación de aromas en un vino Moscatel, mientras que las poligalacturonasas fueron estudiadas en procesos de maceración para obtención de jugo (pitaya) o macerado (morrón) y en la extracción de pectina a partir de pomaza de lima, donde se incorporó el estudio de otro extracto pectinolítico Antártico de interés que ha sido previamente utilizado en el laboratorio. Las conclusiones generales a las cuales se abordan luego de este trabajo (algunas de las cuales se esquematizan en la Figura 8) se pueden resumir de la siguiente manera:

- ◆ Las levaduras aisladas a partir de muestras Antárticas representan una fuente interesante de nuevas enzimas de interés biotecnológico. Además, poseen potencial en procesos de biodecontaminación, como la decoloración de efluentes textiles.
- ◆ Las características de la colección de levaduras aisladas de la Isla Rey Jorge presentan similitudes con otras campañas, pero también muestra características propias

de una biodiversidad que va rotando según la estación, como la alta proporción de levaduras psicrófilas.

◆ A partir de las 32 levaduras estudiadas en el Capítulo 2, se continuó trabajando sólo con una levadura: el potencial de estas levaduras es enorme y, si bien existen varios estudios de bioprospección, el estudio en profundidad de las enzimas producidas por estos microorganismos es escaso en bibliografía.

◆ En cuanto a parámetros de producción de estas enzimas, se observó que, a producción de β -glucosidasas es sustrato dependiente, siendo mayor ante la utilización de pectina en el medio de cultivo, mientras que, la producción de la actividad poligalacturonasa está en fuerte dependencia con la temperatura del cultivo, siendo mayor los títulos de la misma al cultivar la levadura a 14 °C, respecto de 3 °C.

◆ El estudio bioquímico tanto de los extractos enzimáticos como de las enzimas purificadas permite postularlas para distintas aplicaciones: la β -glucosidasa estudiada demostró una buena estabilidad a pH ácido, por lo que se postuló para una posible utilización en la liberación de aromas en vinos. Al determinar que la enzima es fuertemente afectada por su producto, como así no por el etanol, pudo identificarse que la aplicación en vino debería ser luego de la fermentación alcohólica, no así en el mosto. Tampoco sería útil en el proceso de producción de bioscombustibles.

◆ La β -glucosidasa logró un incremento de volátiles en el vino, mostrando especificidad por monoterpenos que otorgarían aromas cítricos y florales.

◆ La aplicación de extractos pectinolíticos para diferentes aplicaciones se muestra más compleja: se testearon dos extractos pectinolíticos y las enzimas purificadas en diferentes procesos. Los extractos pectinolíticos producidos por *Mrakia* sp. LP 7.1.2016 y *T. pullulans* 8E poseen PME, sin embargo, la obtención de pectina íntegra se logró solo con la el extracto de *T. pullulans* 8E. Por otro lado, ambas PGasas purificadas a partir del

extracto de *Mrakia sp.* LP 7.1.2016 lograron la extracción de pectina con buenas propiedades.

◆ El extracto pectinolítico de *Mrakia sp.* LP 7.1.2016 fue capaz de macerar pitaya blanca y roja para la obtención de jugo. También fue capaz de macerar morrón: la presencia de celulasas en este extracto elimina la posibilidad de obtener células vegetales enteras. La enzima PGasaI, proveniente del extracto enzimático, tampoco condujo a la obtención de células enteras. Los dos extractos pectinolíticos estudiados lograron cerca de un 80% de maceración del morrón en las condiciones estudiadas, observándose que el rendimiento aumentó conjuntamente con el aumento del tiempo de maceración y de título enzimático. Dado que se obtuvo un macerado con polifenoles y actividad antioxidantes proveniente del morrón, estos extractos podrían ser útiles en procesos de maceración de vegetales o de extracción de compuestos a partir de los mismos a bajas temperaturas (20 °C).

◆ Las PGasas purificadas a partir del extracto de *Mrakia sp.* LP 7.1.2016, que poseen propiedades bioquímicas diferentes, demostraron ser útiles en la obtención de pectina y, en el caso de la PGasaI, en la maceración de morrón. Sería útil a futuro plantear la secuenciación de la cepa de levadura para buscar los genes de las mismas y producirlas en un sistema heterólogo, que permita obtener grandes rendimientos de las enzimas a fin de ser evaluadas en distintos procesos.

◆ La levadura *Mrakia sp.* LP 7.1.2016, elegida para el estudio de poligalacturonasas y β -glucosidasas, mostró potencial para la producción también de otras enzimas, abriendo la puerta al desarrollo de otros estudios.

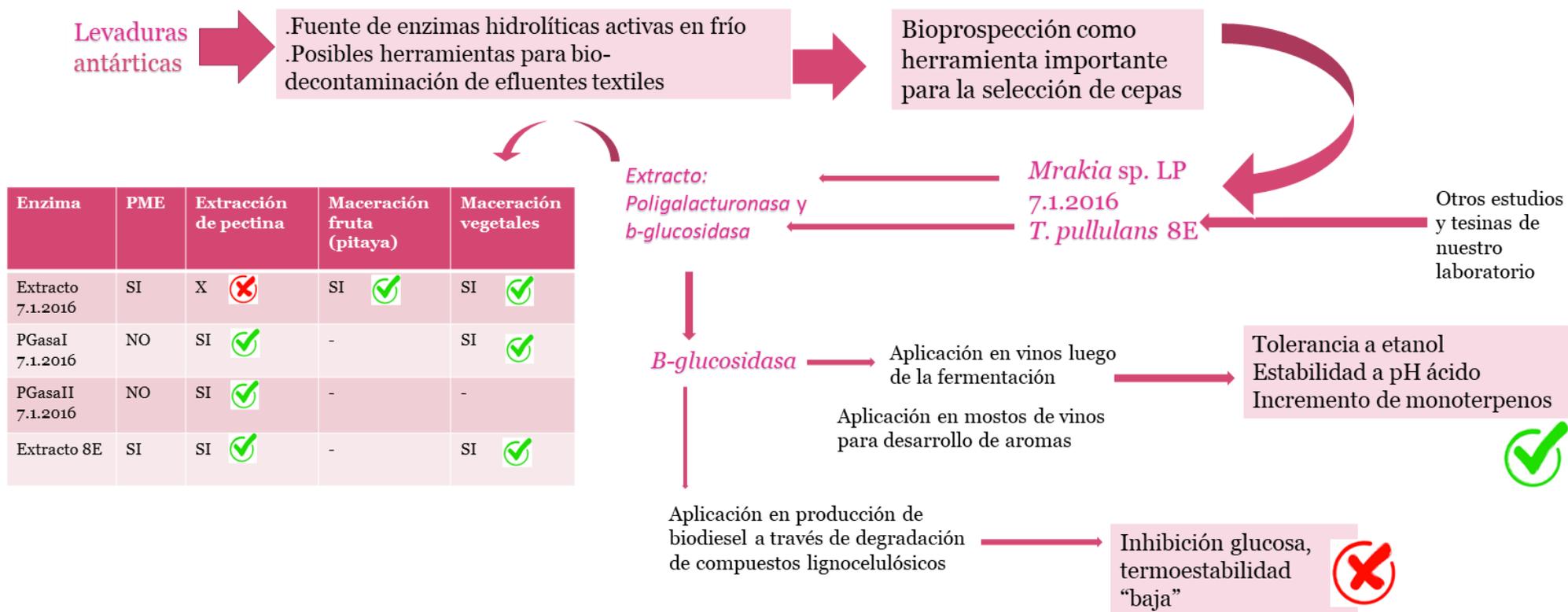


Figura 8 Resumen esquemático de varios de los estudios realizados en la tesis junto a sus principales conclusiones.

Anexo I

Diversidad de levaduras aisladas a partir de la Antártida.

Género y especie	Lugar de muestreo	Porcentaje	N° de cepas	N° total de cepas	Referencia
<i>Antarctomyces sp.</i>	Península Antártica	0.3	1	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
<i>Anthracoystis penniseti</i>	Isla Decepción (Antártida Marítima)	0.5	1	205	Duarte <i>et al.</i> 2016*
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Isla Rey Jorge	1.1	1	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
<i>Bannozyma arctica</i>	Península Antártica	0.3	1	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
<i>Bannozyma yamatoana</i>	Península Antártica	0.3	1	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
	Isla Rey Jorge	2.2	2	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
<i>Candida davisiana</i>	Península Antártica	1.0	3	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
	Antártida marítima	3.1	3	97	Duarte <i>et al.</i> 2013
	Isla Rey Jorge	4.9	3	61	Martinez <i>et al.</i> 2016
<i>Candida glabrosa</i>	Antártida marítima	7.2	7	97	Duarte <i>et al.</i> 2013
	Isla Rey Jorge	11.5	7	61	Martinez <i>et al.</i> 2016
	Isla Rey Jorge	7.9	7	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
<i>Candida sake</i>	Isla Decepción (Antártida Marítima)	4.4	9	205	Duarte <i>et al.</i> 2016*
	Antártida marítima	3.1	3	97	Duarte <i>et al.</i> 2013
	Antártida marítima	3.3	2	61	Martinez <i>et al.</i> 2016
	Isla Rey Jorge	2.2	2	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
	Isla Rey Jorge	2.2	2	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
<i>Candida sp.</i>	Isla Rey Jorge	1.6	1	61	Rovati <i>et al.</i> 2013
<i>Candida zeylanoides</i>	Isla Rey Jorge	1.6	1	61	Martinez <i>et al.</i> 2016
	Isla Rey Jorge	1.1	1	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
<i>Cylindrobasidium sp.</i>	Isla Rey Jorge	1.6	1	61	Rovati <i>et al.</i> 2013

<i>Cystobasidium laryngis</i>	Península Antártica	1.3	4	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
	Antártida marítima	7.2	7	97	Duarte <i>et al.</i> 2013
	Isla Rey Jorge	11.5	7	61	Martinez <i>et al.</i> 2016
	Isla Rey Jorge	13.1	8	61	Rovati <i>et al.</i> 2013
	Isla Rey Jorge	3.4	3	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
<i>Cystobasidium lysinophilum</i>	Isla Ongul Oriental	2.1	2	95	Tsuji <i>et al.</i> 2020
<i>Cystobasidium minutum</i>	Isla Rey Jorge	1.6	1	61	Martinez <i>et al.</i> 2016
<i>Cystobasidium ongulense</i>	Isla Ongul Oriental	10.5	10	95	Tsuji <i>et al.</i> 2020
<i>Cystobasidium pallidum</i>	Isla Rey Jorge	1.6	1	61	Rovati <i>et al.</i> 2013
<i>Cystobasidium pinicola</i>	Isla Rey Jorge	1.0	1	20	Vaca <i>et al.</i> 2012
<i>Cystobasidium tubakii</i>	Isla Ongul Oriental	2.1	2	95	Tsuji <i>et al.</i> 2020
<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	Antártida marítima	4.1	4	97	Duarte <i>et al.</i> 2013
<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	Antártida marítima	4.1	4	97	Duarte <i>et al.</i> 2013
	Isla Rey Jorge	20.0	4	20	Vaca <i>et al.</i> 2012
	Isla Rey Jorge	1.6	1	61	Martinez <i>et al.</i> 2016
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Península Antártica	10.0	31	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
	Isla Rey Jorge	8.8	5	57	Bialkowska <i>et al.</i> 2017
	Antártida marítima	3.1	3	97	Duarte <i>et al.</i> 2013
	Isla Rey Jorge	18.0	11	61	Martinez <i>et al.</i> 2016
	Isla Rey Jorge	6.6	4	61	Rovati <i>et al.</i> 2013
	Isla Rey Jorge	4.5	4	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
<i>Debaryomyces macquariensis</i>	Isla Rey Jorge	5.3	3	57	Bialkowska <i>et al.</i> 2018
	Antártida marítima	4.1	4	97	Duarte <i>et al.</i> 2013
	Isla Rey Jorge	1.6	1	61	Martinez <i>et al.</i> 2016
<i>Dioszegia antarctica</i>	Península Antártica	4.5	14	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
<i>Dioszegia athyri</i>	Isla Decepción (Antártida Marítima)	0.5	1	205	Duarte <i>et al.</i> 2016*
<i>Dioszegia aurantiaca</i>	Isla Rey Jorge	1.1	1	89	Vaz <i>et al.</i> 2011

<i>Dioszegia crocea</i>	Península Antártica	1.9	6	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
	Isla Rey Jorge	1.1	1	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
<i>Dioszegia fristingensis</i>	Península Antártica	0.1	3	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
<i>Dioszegia hungarica</i>	Península Antártica	1.3	4	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
	Isla Rey Jorge	1.6	1	61	Rovati <i>et al.</i> 2013
	Isla Rey Jorge	2.2	2	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
<i>Dioszegia sp.</i>	Isla Rey Jorge	1.6	1	61	Rovati <i>et al.</i> 2013
	Isla Rey Jorge	1.1	1	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
<i>Dioszegia xingshanensis</i>	Isla Decepción (Antártida Marítima)	2.4	5	205	Duarte <i>et al.</i> 2016*
<i>Exophiala sp.</i>	Isla Rey Jorge	1.6	1	61	Rovati <i>et al.</i> 2013
<i>Exophiala xenobiotica</i>	Isla Rey Jorge	4.5	4	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
<i>Filobasidium magnum</i>	Península Antártica	0.3	1	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
	Isla Decepción (Antártida Marítima)	0.5	1	205	Duarte <i>et al.</i> 2016*
<i>Filobasidium sp.</i>	Isla Rey Jorge	1.1	1	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
	Península Antártica	0.3	1	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
<i>Glaciozyma antártica</i>	Isla Ongul Oriental	1.0	1	95	Tsuji <i>et al.</i> 2020
	Península Antártica	1.3	4	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
	Isla Rey Jorge	1.6	1	61	Martinez <i>et al.</i> 2016
<i>Glaciozyma litorale</i>	Isla Decepción (Antártida Marítima)	3.4	7	205	Duarte <i>et al.</i> 2016*
<i>Glaciozyma martinii</i>	Isla Ongul Oriental	10.5	10	95	Tsuji <i>et al.</i> 2020
	Península Antártica	5.5	17	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
	Isla Decepción (Antártida Marítima)	0.5	1	205	Duarte <i>et al.</i> 2016*
<i>Goffeauzyma gilvescens</i>	Isla Ongul Oriental	2.1	2	95	Tsuji <i>et al.</i> 2020
<i>Goffeauzyma gástrica</i>	Isla Rey Jorge	1.8	1	57	Bialkowska <i>et al.</i> 2020
	Isla Rey Jorge	1.6	1	61	Martinez <i>et al.</i> 2016

<i>Goffeauzyma gilvescens</i>	Isla Rey Jorge	66.7	38	57	Bialkowska <i>et al.</i> 2017
	Isla Rey Jorge	1.6	1	61	Martinez <i>et al.</i> 2016
	Isla Rey Jorge	1.6	1	61	Rovati <i>et al.</i> 2013
<i>Holtermanniella festucosa</i>	Isla Decepción (Antártida Marítima)	1.5	3	205	Duarte <i>et al.</i> 2016*
<i>Holtermanniella nyarrowii</i>	Península Antártica	0.3	1	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
	Isla Decepción (Antártida Marítima)	0.5	1	205	Duarte <i>et al.</i> 2016*
<i>Holtermanniella wattica</i>	Isla Ongul Oriental	3.2	3	95	Tsuji <i>et al.</i> 2020
	Península Antártica	0.3	1	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
<i>Kodamea ohmeri</i>	Isla Rey Jorge	1.1	1	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
<i>Kondoa changbaiensis</i>	Península Antártica	1.0	3	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
<i>Leuconeurospora pulcherrima</i>	Isla Rey Jorge	4.5	4	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
<i>Leuconeurospora sp.</i>	Isla Rey Jorge	1.8	1	57	Bialkowska <i>et al.</i> 2017
<i>Leucosporidiella sp.</i>	Isla Rey Jorge	1.0	1	20	Vaca <i>et al.</i> 2012
<i>Leucosporidium creatinivorum</i>	Península Antártica	1.6	5	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
	Isla Rey Jorge	6.6	4	61	Rovati <i>et al.</i> 2013
	Isla Rey Jorge	5.0	1	20	Vaca <i>et al.</i> 2012
	Isla Rey Jorge	5.6	5	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
<i>Leucosporidium fragarium</i>	Península Antártica	2.9	9	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
	Isla Decepción (Antártida Marítima)	0.5	1	205	Duarte <i>et al.</i> 2016*
	Isla Rey Jorge	6.6	4	61	Martinez <i>et al.</i> 2016
	Isla Rey Jorge	6.7	6	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
<i>Leucosporidium muscorum</i>	Isla Decepción (Antártida Marítima)	3.9	8	205	Duarte <i>et al.</i> 2016*
	Isla Rey Jorge	1.6	1	61	Martinez <i>et al.</i> 2016
	Isla Rey Jorge	2.2	2	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
	Isla Rey Jorge				
<i>Leucosporidium scottii</i>	Antártida marítima	5.2	5	97	Duarte <i>et al.</i> 2013
	Isla Rey Jorge	6.7	6	89	Vaz <i>et al.</i> 2011

<i>Leucosporidium sp.</i>	Península Antártica	0.3	1	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
<i>Metschnikowia australis</i>	Isla Decepción (Antártida Marítima)	41.0	84	205	Duarte <i>et al.</i> 2016*
	Antártida marítima	3.1	3	97	Duarte <i>et al.</i> 2013
	Isla Rey Jorge	8.2	5	61	Martinez <i>et al.</i> 2016
	Isla Rey Jorge	65.0	13	20	vaca <i>et al.</i> 2012
	Isla Rey Jorge	2.2	2	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Antártida marítima	13.4	13	97	Duarte <i>et al.</i> 2013
	Isla Rey Jorge	1.1	1	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
<i>Microbotryozyma collariae</i>	Península Antártica	0.6	2	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
<i>Microbotryozyma sp.</i>	Península Antártica	0.3	1	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
<i>Microglossum sp.</i>	Isla Rey Jorge	5.6	5	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
<i>Mrakia aquatica</i>	Península Antártica	3.5	11	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
<i>Mrakia blollopis</i>	Península Antártica	0.3	1	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
<i>Mrakia frigida</i>	Península Antártica	0.6	2	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
	Isla Rey Jorge	1.6	1	61	Martinez <i>et al.</i> 2016
<i>Mrakia gélida</i>	Isla Ongul Oriental	5.3	5	95	Tsuji <i>et al.</i> 2020
	Península Antártica	13.5	42	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
<i>Mrakia robertii</i>	Península Antártica	2.3	7	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
<i>Mrakia sp.</i>	Isla Decepción (Antártida Marítima)	20.5	42	205	Duarte <i>et al.</i> 2016*
	Isla Rey Jorge	3.3	2	61	Rovati <i>et al.</i> 2013
	Península Antártica	0.6	2	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
<i>Nadsonia commutata</i>	Isla Rey Jorge	2.2	2	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
<i>Naganishia adeliensis</i>	Isla Ongul Oriental	1.1	1	95	Tsuji <i>et al.</i> 2020
	Isla Rey Jorge	1.8	1	57	Bialkowska <i>et al.</i> 2017
	Antártida marítima	4.1	4	97	Duarte <i>et al.</i> 2013
<i>Naganishia albida</i>	Isla Rey Jorge	1.8	1	57	Bialkowska <i>et al.</i> 2017

<i>Naganishia albidosimilis</i>	Isla Ongul Oriental	4.2	4	95	Tsuji <i>et al.</i> 2018
	Antártida marítima	2.1	2	97	Duarte <i>et al.</i> 2013
	Isla Rey Jorge	1.6	1	61	Martinez <i>et al.</i> 2016
<i>Naganishia antarctica</i>	Isla Rey Jorge	1.1	1	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
<i>Naganishia friedmannii</i>	Isla Ongul Oriental	17.9	17	95	Tsuji <i>et al.</i> 2020
<i>Naganishia globosa</i>	Isla Rey Jorge	1.8	1	57	Bialkowska <i>et al.</i> 2017
<i>Papiliotrema laurentii</i>	Antártida marítima	6.2	6	97	Duarte <i>et al.</i> 2013
<i>Papiliotrema pseudoalba</i>	Antártida marítima	1.0	1	97	Duarte <i>et al.</i> 2013
<i>Phenoliferia glacialis</i>	Isla Ongul Oriental	8.4	8	95	Tsuji <i>et al.</i> 2020
	Península Antártica	9.0	28	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
	Isla Decepción (Antártida Marítima)	9.3	19	205	Duarte <i>et al.</i> 2016*
	Marítima)	1.0	1	97	Duarte <i>et al.</i> 2013
	Antártida marítima	4.5	4	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
	Isla Rey Jorge				
<i>Phenoliferia psychrophenolica</i>	Península Antártica	2.3	7	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
	Isla Rey Jorge	1.6	1	61	Martinez <i>et al.</i> 2016
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Isla Rey Jorge	1.1	1	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
<i>Piskurozyma fildesensis</i>	Península Antártica	0.3	1	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
<i>Protomyces inouyei</i>	Península Antártica	1.3	4	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
<i>Pseudozyma sp.</i>	Isla Decepción (Antártida Marítima)	2.4	5	205	Duarte <i>et al.</i> 2016*
	Marítima)				
<i>Pseudozyma tsukubaensis</i>	Isla Decepción (Antártida Marítima)	0.5	1	205	Duarte <i>et al.</i> 2016*
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Isla Rey Jorge	3.3	2	61	Rovati <i>et al.</i> 2013

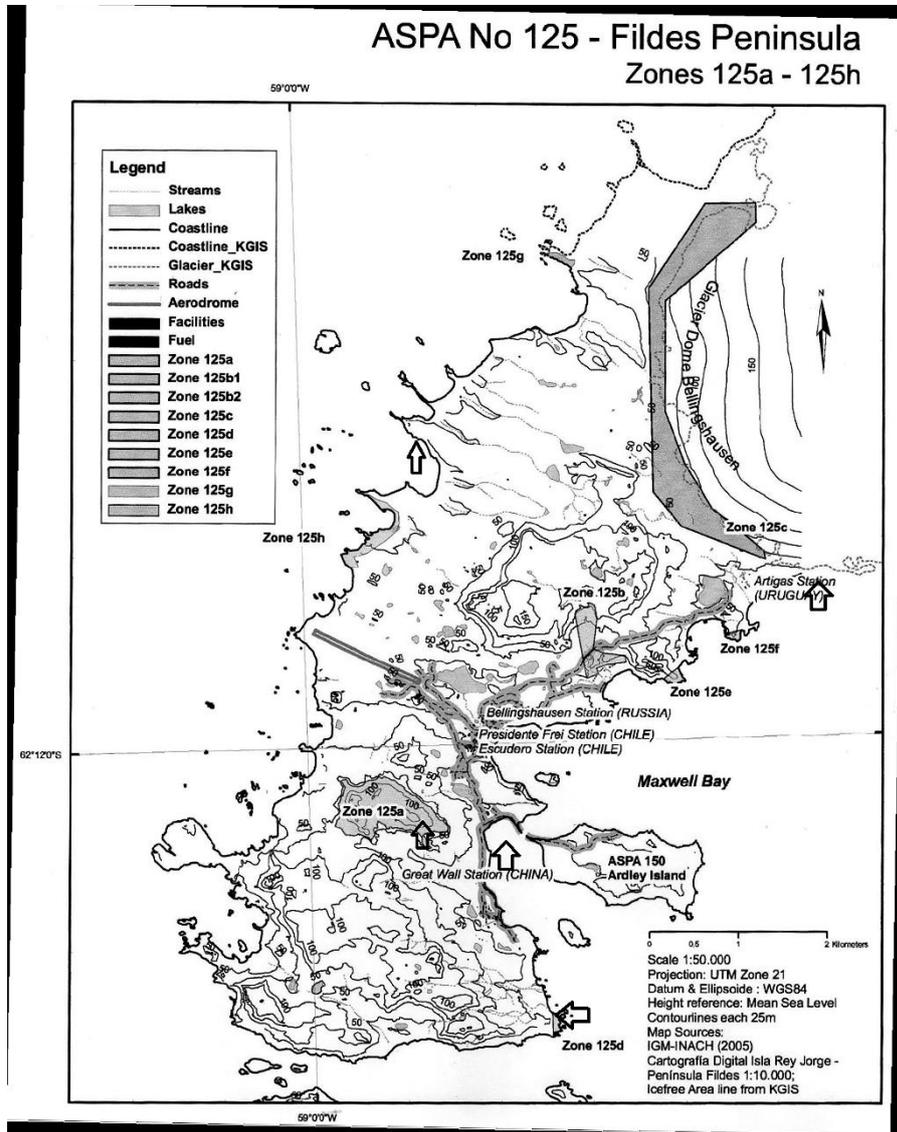
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Península Antártica	3.5	11	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
	Isla Rey Jorge	10.5	6	57	Bialkowska <i>et al.</i> 2017
	Antártida marítima	12.4	12	97	Duarte <i>et al.</i> 2013
	Isla Rey Jorge	1.6	1	61	Martinez <i>et al.</i> 2016
	Isla Rey Jorge	1.6	1	61	Rovati <i>et al.</i> 2013
	Isla Rey Jorge	2.2	2	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
<i>Rhodotorula sp.</i>	Isla Rey Jorge	8.2	5	61	Rovati <i>et al.</i> 2013
<i>Solicoccozyma aeria</i>	Isla Rey Jorge	3.3	2	61	Martinez <i>et al.</i> 2016
<i>Solicoccozyma keelungensis</i>	Isla Rey Jorge	1.6	1	61	Martinez <i>et al.</i> 2016
<i>Solicoccozyma terrícola</i>	Isla Rey Jorge	1.6	1	61	Rovati <i>et al.</i> 2013
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	Isla Decepción (Antártida Marítima)	1.9	4	205	Duarte <i>et al.</i> 2016*
<i>Sporobolomyces sp.</i>	Isla Rey Jorge	1.6	1	61	Rovati <i>et al.</i> 2013
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	Isla Rey Jorge	1.1	1	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
<i>Symmetrospora marina</i>	Isla Decepción (Antártida Marítima)	0.5	1	205	Duarte <i>et al.</i> 2016*
<i>Tausonia pullulans</i>	Isla Ongul Oriental	1.0	1	95	Tsuji <i>et al.</i> 2020
	Antártida marítima	3.1	3	97	Duarte <i>et al.</i> 2013
	Isla Rey Jorge	1.6	1	61	Martinez <i>et al.</i> 2016
<i>Tilletiopsis washingtonensis</i>	Isla Decepción (Antártida Marítima)	1.5	3	205	Duarte <i>et al.</i> 2016*
<i>Tremella indecorata</i>	Antártida marítima	1.0	1	97	Duarte <i>et al.</i> 2013
<i>Udeniomyces puniceus</i>	Isla Ongul Oriental	1.1	1	95	Tsuji <i>et al.</i> 2020
<i>Ustilaginaceae sp.</i>	Isla Decepción (Antártida Marítima)	1.5	3	205	Duarte <i>et al.</i> 2016*
<i>Vishniacozyma carnescens</i>	Isla Ongul Oriental	6.3	6	95	Tsuji <i>et al.</i> 2020
	Isla Decepción (Antártida Marítima)	1.5	3	205	Duarte <i>et al.</i> 2016*
<i>Vishniacozyma tephrensensis</i>	Isla Rey Jorge	1.6	1	61	Martinez <i>et al.</i> 2016

<i>Vishniacozyma victoriae</i>	Isla Ongul Oriental	23.2	22	95	Tsuji <i>et al.</i> 2020
	Península Antártica	25.2	78	310	Ferreira <i>et al.</i> 2018
	Isla Decepción (Antártida Marítima)	0.5	1	205	Duarte <i>et al.</i> 2016*
	Antártida marítima	8.2	8	97	Duarte <i>et al.</i> 2013
	Antártida marítima	8.2	5	61	Martinez <i>et al.</i> 2016
	Isla Rey Jorge	19.7	12	61	Rovati <i>et al.</i> 2013
	Isla Rey Jorge	15.7	14	89	Vaz <i>et al.</i> 2011
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Antártida marítima	3.1	3	97	Duarte <i>et al.</i> 2013

Anexo II

Península Fildes, donde se muestran los sitios de muestreo con una flecha.

Zonas Aspa 125c (Glaciar Collins), Aspa 125a (Fossil Hill), Aspa125d (Half Three Point), y Fossil Hill.



Anexo III

Identificación, sitio de muestreo, tipo de muestra y número de acceso de los aislamientos (Genbank) obtenidos a partir de las muestras recolectadas en la Isla Rey Jorge, Antártida.

Aislamiento	Identificación	Sitio de muestreo	Tipo de muestra	Número de Acceso
LP 1.2016	<i>Metschnikowia australis</i>	Collins Glacier (Aspa 125c)	Agua marina	MN625204
LP 2.2016	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	Collins Glacier (Aspa 125c)	Agua marina	MN625207
LP 3.2016	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	Collins Glacier (Aspa 125c)	Agua marina	MN625214
LP 5.2016	<i>Metschnikowia australis</i>	Collins Glacier (Aspa 125c)	Agua marina	MN625221
LP 6.2016	<i>Naganishia albidosimilis</i>	Collins Glacier (Aspa 125c)	Agua marina	MN625222
LP 7.2016	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	Collins Glacier (Aspa 125c)	Agua marina	MN625226
LP 8.2016	<i>Debaryomyces</i> sp.	Collins Glacier (Aspa 125c)	Agua marina	MN625231
LP 9.2016	<i>Metschnikowia australis</i>	Collins Glacier (Aspa 125c)	Agua marina	MN625232
LP 1.1.2016	<i>Metschnikowia australis</i>	Half Three Point (Aspa 125d)	Guano de pingüino	MN625205
LP 1.2.2016	<i>Metschnikowia australis</i>	Half Three Point (Aspa 125d)	Guano de pingüino	MN625206
LP 2.1.2016	<i>Mrakia</i> sp.	Fosill Hill (Aspa 125a)	Plumas de aves	MN625208
LP 2.2.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>	Fosill Hill (Aspa 125a)	Plumas de aves	MN625209
LP 2.4.2016	<i>Phenoliferia</i> sp.	Fosill Hill (Aspa 125a)	Plumas de aves	MN625210
LP 2.5.2016	<i>Mrakia</i> sp.	Fosill Hill (Aspa 125a)	Plumas de aves	MN625211
LP 2.7.2016	<i>Mrakia</i> sp.	Fosill Hill (Aspa 125a)	Plumas de aves	MN625212
LP 2.8.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>	Fosill Hill (Aspa 125a)	Plumas de aves	MN625213
LP 3.1.2016	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	Collins Glacier (Aspa 125c)	Plumas de nidos	MN625215
LP 3.2.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>	Collins Glacier (Aspa 125c)	Plumas de nidos	MN625216
LP 3.4.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>	Collins Glacier (Aspa 125c)	Plumas de nidos	MN625217
LP 3.5.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>	Collins Glacier (Aspa 125c)	Plumas de nidos	MN625218
LP 3.6.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>	Collins Glacier (Aspa 125c)	Plumas de nidos	MN625219
LP 4.2.2016	<i>Mrakia</i> sp.	Fosill Hill (costa)	Musgo	MN625220
LP 6.1.2016	<i>Mrakia</i> sp.	Half Three Point (Aspa 125d)	Líquenes en piedras	MN625223
LP 6.2.2016	<i>Mrakia</i> sp.	Half Three Point (Aspa 125d)	Líquenes en piedras	MN625224

LP 6.4.2016	<i>Mrakia</i> sp.	Half Three Point (Aspa 125d)	Líquenes en piedras	MN625225
LP 7.1.2016	<i>Mrakia</i> sp.	Half Three Point (Aspa 125d)	Crecimiento sobre piedras	MN625227
LP 7.2.2016	<i>Phenoliferia</i> sp.	Half Three Point (Aspa 125d)	Crecimiento sobre piedras	MN625228
LP 7.3.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>	Half Three Point (Aspa 125d)	Crecimiento sobre piedras	MN625229
LP 7.4.2016	<i>Cystobasidium laryngis</i>	Half Three Point (Aspa 125d)	Crecimiento sobre piedras	MN625230
LP 8.1.2016	<i>Holtermanniella wattica</i>	Collins Glacier (Aspa 125c)	Crecimiento de líquenes	MN625233
LP 8.2.2016	<i>Phenoliferia</i> sp.	Collins Glacier (Aspa 125c)	Crecimiento de líquenes	MN625234
LP 11.1.2016	<i>Phenoliferia</i> sp.	Fosill Hill (costa)	Guano de pingüino	MN625235

Anexo IV

Análisis de las cinéticas de inactivación térmica obtenidas a 45 °C, 47 °C y 50 °C de la PGasaI y las cinéticas de inactivación térmica obtenidas a 65 °C, 68 °C, 69 °C y 70 °C de la PGasaII

Modelo	r^2	X^2	SEM	Parámetros	Comentarios
<i>PGasaI</i>					
Primer orden	[0.9300-0.9510]	[0.0025-0.0048]	[0.0072-0.0127]	k: 0.004382; 0.015962; 0.067042	
Distribución de Weibull	[0.9380-0.9899]	[0.0009-0.0041]	[0.0023-0.0096]	b: 0.002022; 0.033738; 0.165894 n: 1.163628; 0.821227; 0.689180	
Isoenzimas	[0.9300-0.9928]	[0.0009-0.0058]	[0.0016-0.0096]	Al: 0.499951; 0.618516; 0.331192 Kl: 0.004382; 0.010457; 0.355357 As: 0.500031; 0.374817; 0.669878 Kr: 0.004382; 0.03693; 0.043799	
Dos fracciones	[0.9423-0.9928]	[0.0003-0.0048]	[0.0006-0.0096]	a: -3.07732; 0.373593; 0.330067 Kl: 0.009384; 0.038276; 0.354926 Kr: 0.007865; 0.010521; 0.043802	Rechazado, estimación de parámetro negativo
Conversión fraccional	[0.9477-0.9717]	[0.0021-0.0045]	[0.0054-0.0104]	Ar: -3.09618; 0.085376; 0.109914 k: 0.000867; 0.01984; 0.094296	Rechazado, estimación de parámetro negativo
<i>PGasaII</i>					
Primer orden	[0.9088-0.9831]	[0.0022-0.0048]	[0.0042-0.0104]	K: 0.006794; 0.010706; 0.056536; 0.165432	

<i>Distribución de Weibull</i>	[0.9643-0.9941]	[0.0007-0.0046]	[0.0014-0.0075]	<i>b:</i> 0.001636; 0.043338; 0.156897; 0.533709. <i>n:</i> 1.30988; 0.668349; 0.673236; 1.63664	
<i>Isoenzimas</i>	[0.9737-0.9831]	[0.0015-0.0062]	[0.0021-0.0055]	<i>Al:</i> 0.521838; 0.828019; 0.494507; 0.499725 <i>Kl:</i> 0.007299; 0.007644; 0.055952; 0.165389. <i>As:</i> 0.52184; 0.17198; 0.494507; 0.499725. <i>Kr:</i> 0.007299; 1.236832; 0.055952; 0.165389	
<i>Dos fracciones</i>	[0.9914-1.0]	[0.000-0.0012]	[0.000-0.0021]	<i>a:</i> -0.543573; 0.171972; 0.998891; 0.080859 <i>Kl:</i> 0.024569; 1.545785; 0.063268; 0,007132 <i>Kr:</i> 0.010329; 0.007644; -0.100875; 0,898458	<i>Rechazado, estimación de parámetros negativos</i>
<i>Conversión fraccional</i>	[0.9334-0.9991]	[0.0001-0.0036]	[0.0003-0.0076]	<i>Ar:</i> -1.03699; 0.26249; 0.123103; 0.056276 <i>k:</i> 0.00269; 0.018957; 0.081686; 0,2751	<i>Rechazado, estimación de parámetro negativo</i>

Anexo V

Caracterización parcial del extracto con actividad poligalacturonasa producido por la levadura antártica *Tausonia pullulans* 8E

Característica	
pH óptimo	5.0
Temperatura óptima	40 °C, Energía de activación 23.13 kJ mol ⁻¹
Estabilidad al pH	Estable en el rango 2.0-6.0
Estabilidad a la temperatura	64% de actividad residual luego de 1 h a 45 °C
Efecto de iones metálicos/EDTA	Inhibición por Hg ⁺² y Co ⁺²
Otras actividades enzimáticas accesorias	Pectin metilesterasa, β-glucosidasa
Peso molecular	Al menos 3 poligalacturonasas con pesos cercanos a 55 kDa (SDS-PAGE + zimografía)

Referencias

ALBANESI, A. P. 2015. Grade. Búsqueda y caracterización de microorganismos adaptados al frío con capacidad de degradar sustancias pécticas presentes en residuos agroindustriales. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas, La Plata, Argentina.

BEZUS, B., ESQUIVEL, J. C. C., CAVALITTO, S. & CAVELLO, I. 2022. Pectin extraction from lime pomace by cold-active polygalacturonase-assisted method. *International Journal of Biological Macromolecules*, 209, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.019>.

CAVELLO, I., ALBANESI, A., FRATEBIANCHI, D., GARMEDIA, G., VERO, S. & CAVALITTO, S. 2017. Pectinolytic yeasts from cold environments: novel findings of *Guehomyces pullulans*, *Cystofilobasidium infirmominiatum* and *Cryptococcus adeliensis* producing pectinases. *Extremophiles*, 21, <http://doi.org/10.1007/s00792-016-0904-0>.

HERLEIN, A. T. 2018. Grade. Estudio de la producción de enzimas pectinolíticas por parte de *Gueomyces pullulans* 8E. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas.

Anexo VI

Análisis de la varianza de los modelos que describen el porcentaje de maceración de morrón con la relación sólido líquido del sólido, el tiempo y el título de enzima poligalacturonasa

Tabla 1. Análisis de varianza para la variable rendimiento de macerado (%), usando el extracto enzimático producido por *T. pullulans* 8E

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Valor-F	Valor-p
A: Relación S:L	2.83737	1	0.10	0.7660
B: Tiempo	517.562	1	185.02	0.0081
C: Título poligalacturonasa	678.003	1	23.60	0.0046
AA	35.7587	1	1.24	0.3153
AB	0.0363876	1	0	0.9730
AC	76.9819	1	2.68	0.1625
BB	0.012	1	0	0.9845
BC	8.1225	1	0.28	0.6177
CC	237.445	1	8.27	0.0348
Falta de ajuste	143.623	5		

Tabla 2. Análisis de varianza para la variable rendimiento de macerado (%), usando el extracto enzimático producido por *Mrakia* sp. LP 7.1.2016

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Valor-F	Valor-p
A: Relación S:L	111.431	1	1.71	0.2481
B: Tiempo	696.96	1	10.68	0.0222
C: Título poligalacturonasa	1850.08	1	28.36	0.0031
AA	68.6593	1	1.05	0.3520
AB	251.907	1	3.86	0.1066
AC	195.253	1	2.99	0.1442
BB	5.808	1	0.09	0.7774
BC	11.2225	1	0.17	0.6955
CC	547.841	1	8.40	0.0339
Error total	326.225	5		