

“ANÁLISIS DE LAS AMILASAS PRESENTES EN CEPAS DE *Aureobasidium pullulans* NATIVAS PARA SU APLICACIÓN A LA PRODUCCIÓN DE CERVEZA”

Tesis de la Licenciatura en Bioquímica  
Florencia Tourné

Tutora: Dra. Paola Panizza  
Co-tutora: Dra. Karina Medina

Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones  
Departamento de Biociencias  
Facultad de Química

Montevideo-Uruguay  
2023



## AGRADECIMIENTOS

A Sonia, por recibirme al finalizar el curso de Microbiología y entusiasmarse con la idea de que formara parte del equipo.

A Pao por ser mi guía principal, acompañarme paso a paso, tratarme siempre con amabilidad y enseñarme tanto a lo largo de estos años. ¡Gracias Pao!

A Karina, por aceptar co-tutorear, darme herramientas y mostrarse receptiva siempre.

A Cecilia, porque gracias a su trabajo de investigación previo, es que fue posible realizar esta tesis.

A Paula, por aceptar corregirla, interesarse por el trabajo realizado y ponerse más que a disposición durante el último tramo.

A todo el equipo de Micro Molecular y LBB (muchxs de lxs cuales hoy son amigxs), por frustrarse conmigo cuando las cosas iban mal y por alegrarse de igual forma (o más) cuando iban bien. Calidad humana difícil de encontrar en cualquier lado.

Ahora los personales:

A mi familia y mis amigxs de la vida, por hacerme el aguante durante este proceso, por bancar cada catarsis cuando las cosas no salían y el camino se hacia eterno, por casi que hacerse expertxs en el tema de tanto escucharme y estar ahí para aconsejarme.

Mención mega especial para lxs amigxs que me dejó esta carrera; ¿Qué decirles? Tengo cero dudas de que son lo más increíble de todo este proceso. Gracias por acompañarnos, escucharnos, apoyarnos, aconsejarnos y trasladar nuestra amistad más allá de la Facultad.

Y por último:

A vos que me lees... ¿ A quién más ?

## RESUMEN

La cerveza es una de las bebidas alcohólicas más populares en nuestro país, y es por esto el interés tan grande de la industria nacional en evitar que los productos importados sigan ganando mercado. Para ello, se necesita elaborar productos que escapen del patrón normal y permitan diversificar la comercialización de la bebida.

En la producción de cerveza los restos de almidón no degradados pueden ocasionar la elaboración de un producto resultante rico en carbohidratos, algo muy poco benéfico para la salud del consumidor. En este sentido, en el presente trabajo se propone contribuir con el proceso de elaboración de cervezas bajas en calorías, mediante el estudio de la actividad enzimática amilasa de cepas de *Aureobasidium pullulans*, la cual influiría en el desarrollo del producto de interés por su implicación en la descomposición e hidrólisis del almidón.

Consecuentemente, el uso de amilasas en la elaboración de cervezas, puede significar la posibilidad de crear productos con alto valor agregado, no solo ayudando a mantener la aprobación de los habituales consumidores, sino atrayendo nuevos.

El hecho de que diversas cepas de *Aureobasidium pullulans* nativas, encontradas en cepas de uvas de vinificación y en frutos nativos, hayan demostrado su potencial como productoras de amilasas extracelulares en ensayos preliminares, las vuelve interesantes para su estudio. En este trabajo se analizó la producción de amilasas a partir de estas cepas nativas, buscando elaborar un preparado de aplicación a la industria cervecera. Se realizó una caracterización parcial de las mismas, en la que se estudió su peso molecular y la estabilidad a distintas temperaturas de almacenamiento y frente a la liofilización. En paralelo se realizó la caracterización a nivel molecular del sistema amilolítico de las cepas de trabajo, analizando secuencias de  $\alpha$ -amilasas y glucoamilasas de *Aureobasidium pullulans* previamente reportadas y diseñando primers dirigidos a zonas parcialmente conservadas para los distintos grupos de enzimas. Utilizando dichos primers, se logró amplificar fragmentos de estas enzimas en las cepas de trabajo, los cuales fueron enviados a secuenciar. Dentro de los resultados más relevantes obtenidos, se encontró que las cepas estudiadas presentan una batería de enzimas  $\alpha$ -amilasas y glucoamilasas responsables de su capacidad de degradar almidón, las cuales muestran diferencias con las enzimas previamente reportadas. En conclusión, *Aureobasidium pullulans* de origen nativo es un microorganismo con potencial para la producción de amilasas, con miras a su aplicación en la industria cervecera.

**Palabras claves:** Cerveza, Cepas nativas, *Aureobasidium pullulans*; Amilasas; Sistema amilolítico.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
1.1 CERVEZA .....	7
1.1.1 <i>Introducción.....</i>	7
1.1.2 <i>Marco histórico, orígenes e influencia en el mercado.....</i>	7
1.1.3 <i>Componentes principales .....</i>	9
1.1.4 <i>Proceso general de elaboración de cerveza.....</i>	20
1.1.5 <i>Impacto en el mercado nacional y desarrollos innovadores.....</i>	29
1.2 LEVADURAS NATIVAS .....	31
1.2.1 <i>Ventajas de su aplicación en la industria cervecera .....</i>	31
1.2.2 <i>Características necesarias para su aplicación en la producción de cervezas bajas en carbohidratos.....</i>	32
1.2.3 <i>Aureobasidium pullulans: una levadura con potencial .....</i>	32
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
2.1 OBJETIVO GENERAL .....	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
3.1 MATERIALES.....	39
3.1.1 <i>Cepas de partida.....</i>	39
3.1.2 <i>Reactivos utilizados.....</i>	39
3.2 MÉTODOS .....	39
3.2.1 <i>Producción y obtención de enzimas.....</i>	39
3.2.2 <i>Determinación de la actividad enzimática.....</i>	42
3.2.3 <i>Análisis de las condiciones de almacenamiento.....</i>	43
3.2.4 <i>Análisis de la liofilización como método de concentración del crudo enzimático .....</i>	43
3.2.5 <i>Extracción de DNA .....</i>	43
3.2.6 <i>Geles de Agarosa .....</i>	43
3.2.7 <i>Optimización de tiempo de crecimiento en cultivo para extracciones de DNA.....</i>	44
3.2.8 <i>Concentración del ADN por precipitación.....</i>	45
3.2.9 <i>Evaluación de concentración y calidad de muestras genómicas .....</i>	46
3.2.10 <i>Optimización de la preparación de la biblioteca de secuenciación Nanopore .....</i>	46
3.2.11 <i>Diseño de primers para la amplificación de amilasas de Aureobasidium pullulans .....</i>	46
3.2.12 <i>Análisis genético por PCR.....</i>	47
3.2.13 <i>Análisis e identificación de secuencias .....</i>	48
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>49</b>
4.1 <i>AUREOBASIDIUM PULLULANS AISLAMIENTO Y ALMACENAMIENTO .....</i>	49
4.2 <i>CONFIRMACIÓN DE ACTIVIDAD AMILASA POR ENSAYOS PRELIMINARES .....</i>	49
4.3 <i>PRODUCCIÓN DE AMILASAS Y ANÁLISIS DE SU ACTIVIDAD.....</i>	50

4.4	ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS POR SDS-PAGE .....	52
4.5	CONCENTRACIÓN DEL CRUDO ENZIMÁTICO.....	54
4.6	CURVA DE CRECIMIENTO .....	54
4.7	MEDIDAS DE PESO SECO.....	55
4.8	RECuentos de UFC a distintos tiempos de crecimiento en cultivo.....	56
4.9	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE $\alpha$ -AMILASAS Y GLUCOAMILASAS DE <i>AUREOBASIDIUM PULLULANS</i> .....	59
4.9.1	<i>Análisis bioinformático de secuencias conservadas para <math>\alpha</math>-amilasas y glucoamilasas de Aureobasidium pullulans, árbol filogenético y alineamiento de secuencias</i> .....	59
4.9.2	<i>Diseño de cebadores degenerados para la amplificación de <math>\alpha</math>-amilasas y glucoamilasas en las cepas de A. pullulans nativas (CH18-5G y BTP18-8).....</i>	62
4.9.3	<i>Optimización de extracciones de ADN genómico con kits comerciales ..</i> .....	62
4.9.4	<i>Evaluación de lisis enzimática de las células a distintos tiempos. ....</i>	64
4.9.5	<i>Determinación de la calidad y cantidad de ADN genómico (Qubit y Nanodrop).....</i>	65
4.9.6	<i>Secuenciación de la cepa CH18-5G en MiniON Nanopore.....</i>	66
4.9.7	<i>Detección de genes de <math>\alpha</math>-amilasas y glucoamilasas en cepas de Aureobasidium Pullulans .....</i>	67
4.9.8	<i>Análisis e identificación de secuencias .....</i>	69
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>72</b>
<b>6.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>73</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXO.....</b>	<b>78</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 CERVEZA

### 1.1.1 Introducción

La cerveza es una bebida que surge en la antigüedad, en el período comprendido entre los años 7000 y 3000 AC (Antes de Cristo), en pueblos ubicados en la región de la Mesopotamia, el imperio Egipcio, el imperio Griego y el imperio Romano. La elaboración de este fermentado milenario ha ido evolucionando por múltiples factores a lo largo de la historia. A pesar del paso del tiempo, en la actualidad sigue siendo de las bebidas alcohólicas de mayor consumo a nivel mundial y la tercera bebida más consumida luego del té y el café. En ella se ve el reflejo claro de la evolución de la ciencia; gracias a la cual se puede contar con un producto seguro para el consumo y con una inmensa variedad en el mercado.

Hoy en día, el mercado de la cerveza se está volviendo cada vez más competitivo y surge la necesidad de innovar, desarrollando nuevos productos que escapen del patrón normal y puedan diversificar la comercialización de la bebida.

### 1.1.2 Marco histórico, orígenes e influencia en el mercado

La producción de bebidas alcohólicas es tan antigua como la historia. Si bien inicialmente se llevaron a cabo de forma espontánea, desde los primeros tiempos del Neolítico, los humanos dependían de los procesos de fermentación para introducir sabores deseables y aumentar la vida útil y la seguridad de los alimentos y bebidas (Steensels et al., 2015; Willaert, 2012). La fermentación directa de los jugos de frutas, como el de la uva, sin duda tuvo lugar durante muchos miles de años antes de que el hombre comenzara con la elaboración de cerveza y, probablemente por coincidencia, la cocción del pan. La evidencia histórica más antigua de la elaboración formal de cerveza se remonta a alrededor de 6000 AC, en la antigua Babilonia, donde se encuentra una pieza de cerámica que muestra a los trabajadores removiendo o desnatando una tina de elaboración de cerveza (Willaert, 2012). Ahora, la forma antigua de elaboración se puede recuperar parcialmente de escenas de tumbas, tabletas de arcilla y restos de cerveza en vasijas de cerámica (Sicard & Legras, 2011).

La bebida se mencionó por primera vez en la "Épopeya de Gilgamesh" de Mesopotamia, una de las primeras obras literarias. La evidencia muestra que la elaboración de cerveza era una práctica popular del lugar desde antes del 3500AC. En el poema "el hombre salvaje", a Enkidu se le da de beber cerveza. Según el poema, "comió hasta saciarse, bebió siete jarras de cerveza, se le iluminó la cara y cantó de alegría"(Harrison & Albanese, 2019; Sicard & Legras, 2011). La cebada crecía en formas silvestres en estas regiones, y esas civilizaciones descubrieron que humedecer, germinar y secar los granos conducía a un producto más dulce y menos perecedero (Basso et al., 2016).

La elaboración de cerveza se hizo popular en otras áreas del Medio Oriente, incluido el Antiguo Egipto e Israel. Las prácticas de elaboración de cerveza se habían extendido a Roma

durante el reinado de César y a otras partes de Europa. Cuando los europeos se establecieron en América del Norte, trajeron consigo prácticas de elaboración de cerveza. Las cervezas ofrecían a las personas una alternativa más sabrosa al agua potable y a menudo se pensaba que poseían propiedades terapéuticas (Harrison & Albanese, 2019). Además, era la bebida elegida en muchas civilizaciones, en parte debido a razones de seguridad, ya que el producto final fermentado creaba un "medio antimicrobiano", proporcionando una alternativa al agua que en muchos casos, no era segura para el consumo humano (Miguel et al., 2022).

Durante todo este período, la elaboración de la cerveza fue básicamente un proceso impredecible. Las personas con experiencia en la elaboración de cerveza reconocieron que el uso de recipientes de elaboración de cerveza antiguos producía mejores productos que los nuevos. Ahora se sabe que las grietas, hendiduras y poros presentes en los recipientes más antiguos, pero que faltan en los más nuevos, albergaban las levaduras y bacterias responsables de la fermentación (Harrison & Albanese, 2019). Fue solo a mediados del siglo XVII que los científicos comenzaron a comprender qué había detrás de la fermentación con investigaciones sucesivas, que incluyeron la descripción de la levadura por Antonie van Leeuwenhoek en 1680 y su asociación con la fermentación del mosto de cerveza por Cagniard de Latour en 1836 (Basso et al., 2016). Varias teorías se desarrollaron durante el siglo XIX en un intento de explicar los cambios que ocurren durante la fermentación. Gran parte del debate se centró en la cuestión de si la fermentación era un proceso puramente químico o un proceso biológico. La cuestión fue resuelta en gran medida por Louis Pasteur en las décadas de 1860 y 1870, cuando publicó informes (p. ej., "Etudes sur la Biere") que concluyeron que la fermentación se debía a la acción de la levadura. Años más tarde, en 1883, Emil Christian Hansen estableció el método de utilizar cultivos de levadura puros para producir cerveza en Carlsberg Brewery en Copenhague, Dinamarca. Anteriormente había demostrado que el cultivo utilizado en la elaboración de la cerveza era a menudo un cultivo mixto y que el metabolismo de las levaduras silvestres causaba muchos de los defectos en la cerveza procesada incorrectamente (Harrison & Albanese, 2019). Durante los siguientes años, la práctica de usar cultivos de levadura pura para producir cerveza se hizo más ampliamente aceptada, permitiendo la mejora de procesos controlados e industriales (Basso et al., 2016; Harrison & Albanese, 2019). La mayoría de los procesos de fermentación modernos se inician y gestionan mediante cultivos iniciadores bien definidos de una sola cepa (Steensels et al., 2015). En 1897, Buchner demostró el propósito y la función de las enzimas de levadura en el proceso de fermentación; descubrió que los extractos libres de células contenían enzimas que podían fermentar azúcares (Harrison & Albanese, 2019). Desde finales del siglo XIX, la industrialización y el progreso en la ciencia cervecera permitieron un proceso más consistente y eficiente (Miguel et al., 2022).

Hoy, después de más de 8000 años, la cerveza no solo sigue siendo una bebida popular, sino que es la bebida alcohólica de mayor consumo a nivel mundial y representa un aporte significativo a las economías de muchos países (Willaert, 2012). Los principales países consumidores de cerveza son República Checa, Irlanda, Alemania, Austria y Reino Unido. Si bien el consumo de cerveza per cápita de los Estados Unidos es menor que en países europeos, ha llegado a ser mayor que el volumen de leche y agua embotellada consumida en el país (Harrison & Albanese, 2019). Aproximadamente la mitad de la cerveza mundial se elabora en China (26,7 %), EE. UU. (11,9 %), Brasil (7,2 %) y la Federación Rusa (4,7 %) (Rubio-Flores & Serna-Saldivar, 2016).



### 1.1.3 Componentes principales

La cerveza se define como una bebida alcohólica fermentada a partir de cereales malteados, agua, lúpulo y levadura. Esta es la definición clásica y se aplica en Alemania desde el siglo XVI. Muchos países, sin embargo, ahora permiten el uso de sustancias adicionales en este producto. Por ejemplo, algunos cerveceros utilizan varias enzimas y agentes antiespumantes durante el proceso de fermentación. Otros complementan la costosa malta de cebada con cereales no malteados como maíz, arroz o trigo, que contribuyen al sabor de la cerveza y reducen los costos de procesamiento (Harrison & Albanese, 2019). Para la transformación del mosto cervecero en cerveza, los azúcares contenidos en el cereal malteado deben ser fermentados por la levadura produciendo etanol y dióxido de carbono como productos mayoritarios del metabolismo primario (Kunze W, 2006).

Los cuatro componentes principales tienen una función en el proceso de elaboración de la bebida y aportan características importantes que definen el producto final.

#### 1.1.3.1 Cebada

La cebada (*Hordeum vulgare*) es el grano más utilizado en la producción de cerveza, aunque la malta también se pueda obtener de otros cereales como trigo, sorgo, arroz y avena. Está compuesta en mayor porcentaje por carbohidratos (70- 85%), con porcentajes más bajos de proteínas, minerales, lípidos y otras sustancias (Hough, 2011; Kunze W, 2006). La composición exacta, así como las propiedades de este alimento, varían según la variedad y el proceso de cultivo (Moreano, 2011).

Este cereal pertenece a la familia de las gramíneas y es un cultivo de ciclo vegetativo corto (aproximadamente 180 días) que resiste a la sequía y a las bajas temperaturas. En Uruguay, es sembrada en primavera (Moreano, 2011). Como se observa en la **Figura 1**, se clasifican morfológicamente, según la disposición de los granos en la espiga; hexásticas (seis hileras en el raquis de la espiga /cebada forrajera) y dísticas (dos hileras /cebada cervecera) (Moreano, 2011).



**Figura 1:** Morfología de la cebada según la disposición de los granos en la espiga. A: *Hordeum distichon* (cebada de dos hileras), B: *Hordeum hexastichon* (cebada de seis hileras) (Moreano, 2011).

Existe también una clasificación de acuerdo al uso del grano, cebada desnuda se le denomina a la variedad creada por mejoramiento genético para brindar un mayor aporte nutritivo para el humano y cebada maltera, aquellas que por mejoramiento genético tienen un buen rendimiento cervecero (Moreano, 2011).

El carbohidrato más abundante en la cebada es el almidón. Los gránulos de almidón se componen de dos polisacáridos principales ( $\alpha$ -glucanos), amilosa y amilopectina. La amilosa y la amilopectina tienen estructuras y propiedades diferentes. La amilosa es lineal, tiene un peso molecular de  $10^5$ – $10^6$  g/mol y está compuesta de aproximadamente 500-5000 unidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ - (1,4). La amilopectina es una molécula mucho más grande, con una estructura más compleja, altamente ramificada y se compone de tres tipos diferentes de cadenas  $\alpha$ - (1,4) glucosilo, unidas a través de ramas  $\alpha$ - (1,6) para formar una molécula de peso molecular  $10^7$ – $10^8$  g/mol (Blanco et al., 2014).

Los azúcares tanto de la cebada como de los cereales que se utilizan son los sustratos utilizados durante la fermentación alcohólica y para poder extraerlos es necesaria la etapa de malteado (detallado en 1.1.4), que permitirá luego la obtención del mosto cervecero. Durante este proceso, se activan las enzimas que degradan el almidón en azúcares simples, que luego serán el sustrato de las levaduras para generar mayoritariamente etanol y dióxido de carbono (Bamforth, 2008; Ferreyra, 2014; M. Larroque, 2020).

En la cebada se encuentran enzimas y complejos enzimáticos que son denominador común en muchos cereales y plantas: enzimas degradadoras de almidón ( $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -amilasa, dextrina límite), enzimas degradadoras de grasas y enzimas disociadoras de éster fosfórico (M. Larroque, 2020).

El proceso de malteado simula el ciclo de germinación natural del grano. Las empresas malteras humedecen los granos de cebada y les permiten brotar. A medida que las plántulas comienzan a brotar, el interior almidonado de los granos comienza a cambiar. Esta modificación hace que el endospermo duro y almidonado comience a descomponerse en azúcares de malta naturales (maltosa) (Blanco et al., 2014).

Las  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasas son de importancia primordial en la hidrólisis de almidón. Durante las etapas de malteado y maceración degradan el almidón presente en el grano de cereal para transformarlo en azúcares fermentables y dextrinas. La primera es una endoenzima, mientras que la segunda es una exoenzima. La  $\alpha$ -amilasa se produce durante el proceso de malteado en respuesta a la formación de una hormona vegetal (ácido giberélico) que se produce durante la germinación y estimula la producción de enzimas. No solo provoca la activación de la  $\alpha$ -amilasa, sino que también de otras enzimas (endo  $\beta$ -glucanasas, proteasas y dextrinas límite) responsables en menor medida de la hidrólisis del almidón (Blanco et al., 2014; Larroque, 2020).

La  $\alpha$ -amilasa (1,4-D-glucanohidrolasa) es la enzima que inicia la descomposición de los gránulos de almidón nativo mediante la hidrólisis de polímeros de glucosa con enlaces 1,4. Esta enzima ataca aleatoriamente las cadenas de amilosa y amilopectina para producir una mezcla de maltosa, maltotriosa y una variedad de dextrinas. La  $\beta$ -amilasa elimina las unidades de maltosa de los extremos no reductores. En combinación, estas enzimas pueden degradar parcialmente la amilosa y la amilopectina del almidón (Blanco et al., 2014).

Hoy en día, el malteado se realiza en empresas distintas a las de producción de cerveza y la malta llega en sacos o granel para ser utilizada en las cervecerías. Son muy pocos los productores que realizan el proceso de malteado (Solís, 2017).

#### 1.1.3.2 Agua

De los cuatro componentes antes mencionados, el agua es el que se encuentra en mayor proporción en la cerveza. Se utiliza durante todo el proceso de elaboración, comenzando por el remojo para la germinación del grano durante el malteado y hasta para la limpieza de equipos. Es por esto que, es de suma importancia que los productores de esta bebida estén en conocimiento de las propiedades del agua que van a utilizar, ya que eso influirá en la calidad del producto final. Es común oír que el desarrollo exitoso de una cerveza, depende del tipo y uso adecuado del agua (Solís, 2017).

El agua utilizada para la elaboración debe ser potable y satisfacer todos los requerimientos bromatológicos establecidos por los decretos nacionales. Más allá de que existan distintos tipos de aguas, se deben reunir las características sensoriales, físicas, químicas y microbiológicas reglamentadas (M. Larroque, 2020).

El contenido de minerales como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{HCO}_3^-$  influyen en el pH del mosto cervecero, mientras que otros como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{SO}_4^{-2}$  afectan más el sabor; los primeros dos dando sensación de dulzor y acidez y el último aportando amargor, sequedad y astringencia. Se establece como parámetro óptimo una concentración de entre 50 a 200 ppm de calcio en el

agua utilizada. En cuanto a los valores de bicarbonato de calcio, variaran según el tipo de cerveza que se quiera lograr y por ende la acidez que se quiera alcanzar (M. Larroque, 2020).

El magnesio ( $Mg^{+2}$ ) por su parte, tiene gran influencia ya que es cofactor de enzimas relevantes durante el proceso de fermentación de la levadura. Tiene efectos similares al calcio en cuanto a la reducción del pH y la concentración máxima propuesta ronda los límite 30 mg/L, ya que a valores considerablemente superiores, puede tener tener una influencia en el sabor, aportando amargor (Ferreyra, 2014).

Otro mineral que afecta el sabor es el hierro ( $Fe^{2+}$ ), transmitiendo un gusto metálico a altas concentraciones. Además, puede generar colores oscuros por la interacción con sustancias fenólicas. Es por esto, que deben evitarse las aguas con altas concentraciones del mismo (Ferreyra, 2014).

La composición química del agua tiene relación con la zona geográfica y esta con la calidad de las bebidas desarrolladas. Ciudades como Burton (Inglaterra) y Munich (Alemania) son reconocidas por elaborar cervezas de alta aceptación, debido a la pureza del agua de la zona (Ferreyra, 2014). Asimismo, los productores de cerveza pueden modificar la composición del agua por agregado de distintas concentraciones de sales o remoción de iones con el fin de producir determinado estilo de bebida (M. Larroque, 2020).

### 1.1.3.3 Lúpulo

El lúpulo es una planta que pertenece a la familia de las Cannabinaceas y al género *Hummulus*. *Humulus lupulus* es la especie comercial, y a diferencia del Cannabis, no tiene efectos alucinógenos. Esta planta es nativa de las regiones templadas de Norte América, Europa y Asia y resiste el invierno (Hough, 2011; Palmer, 2006). Se cultiva en la mayoría de las regiones de clima moderado; entre las latitudes 35° y 55° de los hemisferios norte y sur (Almaguer et al., 2014). Crece de forma vertical (es una trepadora) y posee raíces bien profundas, por lo que la profundidad de los suelos en donde se desarrolle es de suma importancia. Hasta que no cesa su crecimiento vertical, no se producen las flores, que salen de las ramas laterales (Ferreyra, 2014; M. Larroque, 2020). La luz del día tiene gran influencia sobre el crecimiento de la planta, ya que la misma necesita de fotoperíodos de alrededor de 15 horas para no entrar en un estado de latencia (Ferreyra, 2014).

En Europa Central se comenzó con este cultivo hace 1000 años y para el año 1500, ya se conocían cultivos en Europa Occidental y Gran Bretaña (Hough, 2011). Hoy en día, existen cultivos en América del Sur, particularmente en la zona de la Patagonia Argentina, pero los mayores productores de lúpulo son Alemania y Estados Unidos, representando el 75-80% de la producción mundial. Otros países productores de lúpulo son la República Checa, Polonia, Eslovenia, Inglaterra, Ucrania, China, Sudáfrica, Australia y Nueva Zelanda (Almaguer et al., 2014; Larroque, 2020).

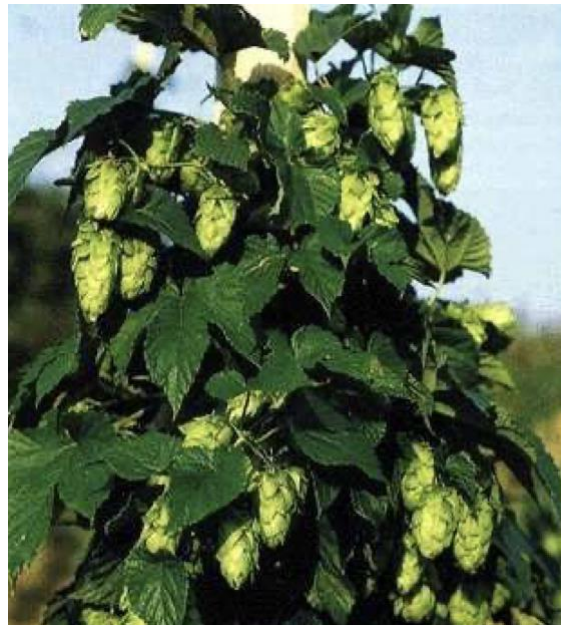
A comienzos del siglo XVIII, el lúpulo se agregaba después de la fermentación para conservar la cerveza durante su transporte. Pero se descubrió que no solo esa función era importante, sino que esta planta aportaba un aroma y sabor característico al producto final.

Otorga un gusto amargo y refrescante al balancear la dulzura de los azúcares de la malta (Palmer, 2006).

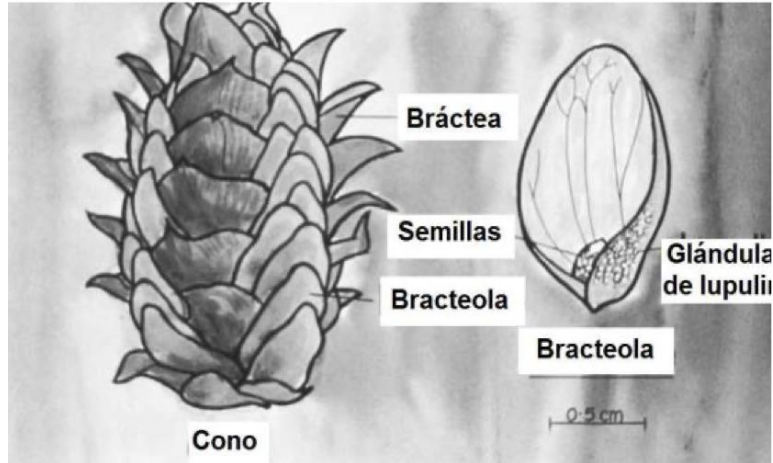
Alrededor del 97% del lúpulo cultivado en todo el mundo se destina a la elaboración de cerveza(Almaguer et al., 2014). Existe una amplia variedad de plantas (aproximadamente 100) utilizadas para la elaboración de cerveza, que según sus componentes, influirán distintamente en el sabor y/o aroma de las bebidas (M. Larroque, 2020; Palmer, 2006).

La planta de lúpulo como se muestra en la **Figura 2**, se caracteriza por sus flores cónicas (similar a una piña) color verde claro y hojas similares a las de la parra (Palmer, 2006). El cono de lúpulo (**Figura 3**) consiste en estructuras con forma de pétalo llamadas 'brácteas' y 'bractéolas' alrededor de un eje central. En la base de las bractéolas se forman las glándulas de lupulina a medida que madura el lúpulo, donde se sintetizan y acumulan los principales principios cerveceros del lúpulo. Ives le otorga el nombre de “Lupulina” en 1821, al polvo amarillo secretado por las glándulas, donde se almacenan estas sustancias (Almaguer et al., 2014).

Los conos son la porción utilizada a nivel industrial y deben ser manipulados con sumo cuidado para que puedan conservarse estos componentes de interés, dado que las glándulas están unidas muy debilmente a los mismos (Almaguer et al., 2014).



**Figura 2:** Planta de lúpulo con hojas y flores (utilizadas para la elaboración de cerveza)(Ferreya, 2014).



**Figura 3:** Detalle del Cono de lúpulo maduro con las bracteolas y las glándulas de lupulina (Ferreyra, 2014).

En la industria cervecera, se utilizan las plantas que producen flores femeninas, carecen de semillas y tienen dentro las pequeñas glándulas doradas productoras de aceites esenciales y resinas amargas (humulonas y  $\alpha$ -ácidos) que son importantes en la producción de cerveza por su aporte al aroma y sabor, respectivamente (Hough, 2011). Los  $\alpha$ -ácidos, además, colaboran con la estabilidad de la espuma y debido a su poder antiséptico son inhibidores del crecimiento de bacterias gram positivas (M. Larroque, 2020).

Por lo general, a nivel comercial, los lúpulos macho se eliminan de los campos de cultivo para evitar la fertilización de la planta hembra y así la producción de semillas. Se piensa que estas últimas, pueden causar sabores indeseados en la cerveza, producto de la oxidación de ácidos grasos. Sumado a que existe evidencia de que los lúpulos que carecen de las mismas, son más ricos en sustancias amargas y aromáticas. No obstante, las plantas macho conservan su importancia, debido a que son necesarias para desarrollar nuevas variedades de lúpulo por programas de mejoramiento (Almaguer et al., 2014).

Los conos de lúpulo tienen una composición muy variada en donde se incluyen compuestos como resinas, aceites esenciales, proteínas, polifenoles, lípidos, ceras, celulosa y aminoácidos (**Tabla 1**) (Almaguer et al., 2014). Los compradores se interesan en conseguir variedades de lúpulo que sean ricas en  $\alpha$ -ácidos y/o aporten aromas atractivos, aunque lo último es difícil de cuantificar. Algunos lúpulos solo aportan amargor, otros solo influyen en el aroma y también se encuentran algunos que cumplen la doble función (Hough, 2011; Palmer, 2006). Más allá de la genética, la variación en la composición de las plantas, se debe a las condiciones del suelo donde son cultivadas (Ferreyra, 2014).



**Tabla 1:** Composición química de los conos de lúpulo (Almaguer et al., 2014).

Componente	Cantidad (%)
Resinas	15-30
Aceites esenciales	0.5-3
Proteínas	15
Monosacáridos	2
Polifenoles (taninos)	4
Pectinas	2
Aminoácidos	0,1
Ceras y esteroides	Rastros-25
Ceniza	8
Humedad	10
Celulosa	43

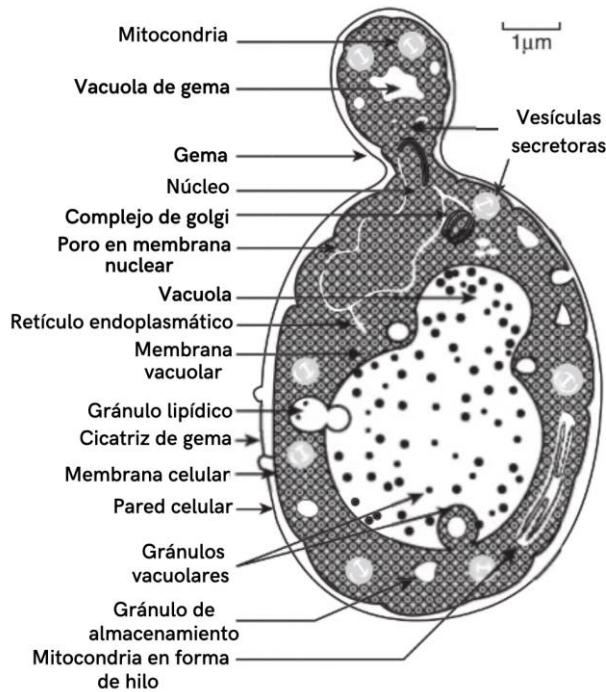
La cosecha de lúpulo ocurre a finales de verano o principios de otoño, cuando el mismo está maduro y con alto contenido de resina. En ese momento, el contenido de humedad en el mismo es alto (75 a 80%) y la composición del mismo puede variar, por lo que se procede a una etapa de secado en horno a 60 -75°C hasta que el contenido de humedad descienda a un 10%. La velocidad del aire y temperatura durante el secado deben ser controladas, ya que los  $\alpha$ -ácidos pueden destruirse. Por último, se recomienda un almacenamiento a baja temperatura hasta su uso, para evitar la degradación de compuestos (Almaguer et al., 2014; Ferreyra, 2014).

Existen pérdidas de los componentes del lúpulo durante la etapa de cocción del mosto (que se verá más adelante) y durante la fermentación. Sólo alrededor del 50% de los  $\alpha$ -ácidos disponibles en el lúpulo pueden isomerizarse y pasar a solución. El porcentaje final nunca excede los 40% y puede ser tan bajo como 10% (Ferreyra, 2014). Cuanto mas tiempo se hierve, mayor es el porcentaje de isomerización, y la cerveza se vuelve mas amarga (Palmer, 2006). Los aceites esenciales tienden a volatilizarse durante la ebullición, por esto los cerveceros suelen añadir lúpulos de aroma sobre el final del proceso de cocción (Ferreyra, 2014). Agregando distintos tipos de lúpulo en distintos momentos de la etapa de hervor, permite lograr un perfil de aroma y sabor más balanceado (Solís, 2017). En la actualidad, hay cerveceros que recurren a la utilización de extractos de lúpulo ya isomerizados o lupulado en seco que consiste en añadir el lúpulo seco en tanques de acondicionamiento (Ferreyra, 2014).

#### 1.1.3.4 Levadura

En la fabricación de cerveza se emplean levaduras, que son microorganismos eucariotas, más precisamente hongos unicelulares que generalmente se reproducen asexualmente por gemación. Pertenecen al phylum *Ascomycota* del reino Fungi (Hough, 2011). Las levaduras comprenden 149 géneros y 1500 especies, identificandose y clasificandose según su morfología y fisiología (Kurtzman et al., 2011).

Las levaduras (**Figura 4**) tienen forma ovalada o esférica con un tamaño aproximado de entre 8 y 10  $\mu\text{m}$ , que va a variar de acuerdo a la etapa del ciclo celular en el que se encuentren. Son los eucariotas más simples, su célula está compuesta por pared celular, membrana plasmática, citoplasma con organelos y el núcleo con su respectiva membrana nuclear. Son organismos quimio- heterótrofos y carecen de movilidad (M. Larroque, 2020).



**Figura 4:** Esquema de una célula de levadura en gemación (Lewis, 2003) .

La mayoría de las levaduras son organismos mesófilos que crecen a temperaturas de entre 20-25  $^{\circ}\text{C}$ . Estos microorganismos no se encuentran en hábitats específicos, sino que se encuentran ampliamente distribuidos en ambientes acuáticos, atmosféricos y terrestres (Kurtzman et al., 2011).

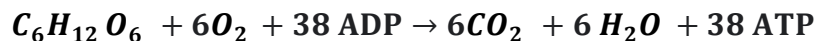
No fue hasta fines del siglo XIX, tras el descubrimiento de Luis Pasteur, que la levadura comenzó a formar parte de los ingredientes permitidos para la fabricación de cerveza en la German Beer Purity Law de 1516 - The Reinheitsgebot. Antes de ello, se ignoraba su presencia en la bebida; la forma que encontraban los vikingos de propagarla era pasándose los palos utilizados para remover el mosto como clase de herencia familiar, ya que eso aseguraría mantener el éxito de la cerveza producida (Palmer, 2006).

Hoy en día, el uso de estos microorganismos está ampliamente distribuido, se emplean en la industria alimenticia para la producción de alimentos fermentados o ingredientes alimentarios, así como para la producción de enzimas, hormonas o vacunas. Asimismo, son objeto de investigación en la biología y agricultura (Ferreira, 2014).

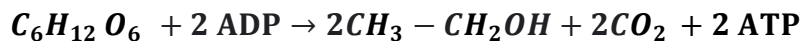


En la elaboración de alimentos como cerveza, pan y vino predomina la especie *Saccharomyces cerevisiae*, también conocida como “hongo del azúcar”. Son las más conocidas y durante años han sido para el estudio, el organismo eucariota modelo por excelencia. Se pueden encontrar de forma natural en muchos ambientes, como la corteza de los árboles, frutas y cereales. Dentro de sus características más valiosas, presentan alta capacidad de producción de alcohol y toleran elevadas concentraciones del mismo, lo cual es crucial a la hora de elaborar el tipo de bebidas antes mencionadas (Ferreyra, 2014; M. Larroque, 2020).

Estos microorganismos son organismos anaeróbicos facultativos, por lo cual pueden vivir en presencia o ausencia de oxígeno. En el primer caso, el desarrollo de las funciones biológicas se da por el proceso de respiración (**Ecuación 1**) y en el segundo caso, para poder obtener energía, la levadura lleva a cabo el proceso de fermentación (**Ecuación 2**). La fermentación alcohólica consiste en metabolizar azúcares simples como glucosa o maltosa (presentes entre los componentes de elaboración de la cerveza) para generar etanol (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-OH), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y ATP (Ferreyra, 2014; Solís, 2017).



**Ecuación 1:** Ilustra el proceso llevado a cabo en la respiración aerobia (Solís, 2017).



**Ecuación 2:** Ilustra el proceso llevado a cabo en la fermentación alcohólica (Solís, 2017).

Los carbohidratos y compuestos nitrogenados son los nutrientes principales para el desarrollo de estos microorganismos (Ferreyra, 2014).

Las levaduras cerveceras pueden utilizar numerosas fuentes de carbono, entre ellas: glucosa, sacarosa, fructosa, maltosa, galactosa, rafinosa y maltotriosa. La maltosa es el principal azúcar del mosto, representa el 50-55% del contenido total de hidratos de carbono y es captado por las levaduras a través de la membrana celular para ser hidrolizado internamente por una maltasa ( $\alpha$ - glucosidasa) a dos unidades de glucosa. Las fuentes de nitrógeno presentes en el mosto son aminoácidos, iones de amonio y algunos di- y tri-péptidos y son utilizadas por las levaduras para la formación de proteínas, independientemente del proceso de fermentación (Ferreyra, 2014).

Es en ausencia de oxígeno que la levadura lleva a cabo el proceso de fermentación alcohólica. En este proceso exotérmico, no solo se genera etanol y dióxido de carbono, sino que se producen otros metabolitos como esteroides, cetonas, alcoholes fusel, varios fenoles y ácidos grasos, que van a tener influencia en el aroma y sabor de la cerveza (Ferreyra, 2014; Solís, 2017).

Según las condiciones en las que se lleve a cabo la fermentación, se producirán distintas concentraciones de estos compuestos; a temperaturas más altas, se generarán más ésteres, lo que incide directamente en el desarrollo de aromas frutales de las cervezas, mientras que a

temperaturas menores, la concentración de fenoles será mayor y el producto final poseerá un sabor más especiado (Ferreira, 2014; Solís, 2017). El diacetilo puede tener beneficios en concentraciones pequeñas, otorgando un sabor mantecoso a la cerveza, pero puede oxidarse con el pasar del tiempo y generar sabores rancios. Los alcoholes de fusel, son los causantes de los efectos adversos del consumo abundante de bebidas alcohólicas y suelen aportar sabores fuertes. En cuanto al aporte de los ácidos grasos en el perfil del sabor de la cerveza, generan un gusto indeseable producto de la oxidación, aunque participan de reacciones que llevan a compuestos de interés (Palmer, 2006).

En la elaboración de cerveza se utilizan dos tipos principales de levaduras, las levaduras llamadas tipo “Ale” y las levaduras “Lager”. Ambas se clasifican de acuerdo a sus características morfológicas, fisiológicas y tecnológicas, aunque en la antigüedad eran únicamente clasificadas por sus propiedades de floculación (M. Larroque, 2020). Las levaduras Ale y Lager son genéticamente distintas; las primeras suelen ser *S. cerevisiae* y las segundas son *S.pastorianus* (*syn. Saccharomyces carlbergensis*), que es un híbrido entre especies de *S. cerevisiae* y *S. eubayanus* (Varela, 2016). Las Ale son conocidas como “Top Fermentig”, ya que suben a la parte superior del fermentador durante el proceso de fermentación. El rango de temperatura óptimo de las mismas es entre 14 y 25°C y su metabolismo se orienta más a la respiración que a la fermentación. Generan turbidez en el producto final, debido a que tienen un bajo poder floculante, lo que provoca que queden en suspensión por más tiempo (Palmer, 2006; Solís, 2017). El hecho de que algunas cepas puedan subir a la superficie durante el proceso de fermentación y otras tiendan a sedimentar y depositarse en la base del fermentador, radica en las diferencias existentes en la estructura química de las paredes celulares (Hough, 2011). Las levaduras Lager, se hunden y tienden a localizarse en el fondo del fermentador. Prefieren temperaturas más bajas que las Ale, trabajando en un rango de entre 4 y 12°C. y se inclinan más hacia la fermentación que a la respiración. Son cepas floculantes, por lo que generan cervezas más clarificadas (Solís, 2017). La formación de flóculos se da por la unión de miles o millones de células, que son atraídas entre sí por la formación de puentes de calcio entre grupos carboxilos de células adyacentes que fueron aproximadas por el establecimiento de puentes de hidrógeno (Hough, 2011).

A nivel mundial, varias empresas han reunido diferentes variedades de levaduras para ser comercializadas con destino a la producción de cerveza (Palmer, 2006). El hecho de que el cultivo sea estandarizado y comercializado, asegura una producción homogénea, con sabor, aroma y condiciones de fermentación controladas, ya que el comportamiento del microorganismo frente a las distintas condiciones de elaboración está bien estudiado y raramente ocurren eventos indeseados (Palmer, 2006).

En general, los fabricantes tienen su propia variedad de levadura, ya que las diferencias entre los estilos de cerveza producidos, se debe en gran parte al tipo de levadura utilizada. Del mismo modo, la levadura se adaptará y evolucionará según las condiciones de fabricación, es por eso que más allá de que existan productores del mismo estilo de cerveza y con la misma variedad inicial de levadura, el producto final tendrá características únicas (Palmer, 2006).

Si bien las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* son muy buenas para la producción de alimentos fermentados, y su uso está ampliamente instalado entre los productores de bebidas alcohólicas debido a su resistencia al etanol, últimamente, se han estado estudiando otras levaduras pertenecientes al mismo género, así como también a distintos grupos taxonómicos (Burini, 2021). En el pasado, este tipo de levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces* nativas, eran indeseadas por los cerveceros pero a raíz de la investigación llevada a cabo durante los últimos años, esta tendencia se ha ido modificando. Esto se debe a que a pesar de que las levaduras no convencionales tienen bajos rendimientos de fermentación y tienen poca resistencia a etanol, tienen la capacidad de impactar positivamente en el perfil organoléptico de la bebida. Tanto en vinos como en cervezas, diferentes levaduras no-*Saccharomyces* y una diversidad de levaduras *Saccharomyces* nativas, han sido responsables de brindar aromas y sabores distintivos, lo que permite innovar en un mercado que hoy en día se ha vuelto extremadamente competitivo (Larroque et al., 2021). Estas levaduras "nativas", también conocidas como "autóctonas" o "salvajes", reciben su nombre para ser distinguidas de los cultivos iniciadores de levaduras añadidos exógenamente (Varela, 2016).

En la actualidad, varias especies de levaduras no-*Saccharomyces* se encuentran en fermentaciones espontáneas de ciertos estilos de cerveza (cerveza lambic belga y cerveza americana coolship), incluidas *Meyerozyma guilliermondii*, *Debaryomyces spp.*, *Pichia spp.*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Brettanomyces anomalus*, *Brettanomyces custersii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Candida krusei*, *Cryptococcus keutzingii* y *Rhodotorula mucilaginosa*, pero no muchos se han probado como cultivos iniciadores únicos o mixtos para la producción de cerveza. La fermentación espontánea es un proceso microbiano complejo que involucra la acción de diferentes microorganismos como bacterias y levaduras (*Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*). En el pasado, la producción de bebidas fermentadas eran resultado de este tipo de procesos, ya sea por microorganismos presentes en las superficies de los materiales utilizados para la elaboración o introducidos inconscientemente por los humanos responsables, igualmente, hoy en día hay empresas que lo siguen utilizando (Varela, 2016).

La búsqueda de levaduras no convencionales es un campo de estudio reciente, pero el increíble potencial de viabilidad comercial de las mismas, hace que los investigadores estén ansiosos por explorar diferentes entornos utilizando diferentes técnicas para poder aislarlas e introducir las en la industria cervecera. Dentro de las aproximaciones más destacadas, se encuentra el desarrollo de cervezas con bajo contenido de alcohol o bajo contenido de carbohidratos (se discutirá más adelante), producción de cervezas funcionales y enfoques de biosaborizantes (Michel et al., 2016; Varela, 2016).

#### 1.1.3.5 Enzimas cerveceras

Las enzimas son catalizadores biológicos de naturaleza proteica que aceleran reacciones pero no son alteradas por ellas ni tampoco forman parte del producto final. Su activación o inactivación depende de varias condiciones (Solís, 2017). Las principales enzimas implicadas en el proceso de elaboración de cerveza son las presentes en la cebada pero en algunos casos se adicionan enzimas externas.

Como ya se mencionó anteriormente, las enzimas naturalmente presentes en el grano de cebada son las amilasas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) que actúan sobre el almidón produciendo dextrinas y maltosa, las enzimas proteolíticas entre ellas las proteasas que degradan proteínas formando aminoácidos y péptidos, lo que reduce la turbidez y fomenta la retención de espuma y las peptidasas que liberan aminoácidos libres de los extremos de las proteínas, los que sirven como alimento para las levaduras en la fermentación y las glucanasas que llevan a cabo la solubilización e hidrólisis de los glucanos, que son los componentes principales de la pared celular del endospermo amiláceo de cebada (Carrera, 2003; Solís, 2017)

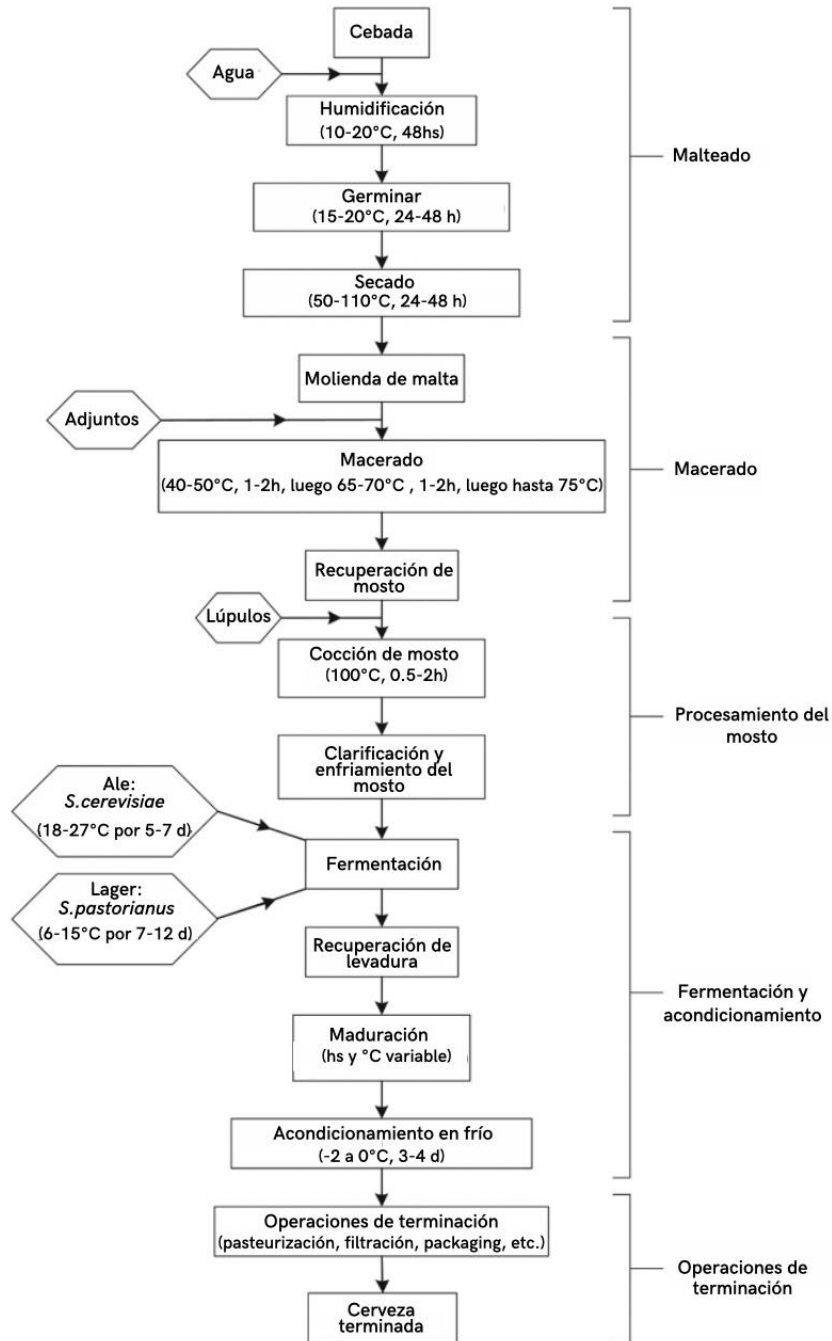
Si la actividad enzimática en el macerado es baja, el rendimiento del extracto será bajo, la separación del mosto llevará tiempo, el proceso de fermentación será lento y se producirá bajo contenido alcohólico, entonces se verá afectado el sabor y la estabilidad del producto final. En ese caso, se adicionan enzimas para complementar las enzimas de la malta y prevenir esos problemas, pero también pueden tener otras aplicaciones como su uso en la producción de cervezas bajas en carbohidratos (Blanco et al., 2014).

Hay muchas enzimas disponibles comercialmente para el proceso cervecero, pero todas ellas caen en las siguientes categorías: proteasas, amilasas, glucanasas o enzimas desramificantes (Blanco et al., 2014; Carrera, 2003). Lo más común es lograr ajustes en la fermentabilidad agregando glucoamilasas o  $\alpha$ -amilasas fúngicas en la maceración o al inicio de la fermentación, respectivamente. La amiloglucosidasa es una exoenzima que escinde ambos (1-4 y 1-6) enlaces glucosídicos, actuando sobre los residuos de glucosa externos de amilosa o amilopectina, produciendo principalmente glucosa y en menor concentración maltosa y dextrinas límite. La amiloglucosidasa ayuda en la degradación de las dextrinas a fracciones de carbohidratos fermentables más simples y complementa la intrínseca actividad de la  $\alpha$ -amilasa. Otra enzima que puede ser agregada durante el paso de maceración es la pululanasa (enzima desramificante) que provoca la hidrólisis de los puntos de ramificación  $\alpha$ -1-6 del almidón, lo que conduce a la máxima fermentabilidad del mosto. Esto aumenta el rendimiento porcentual de la producción de cerveza pero también reduce la cantidad de dextrina presente en la cerveza (Blanco et al., 2014).

#### **1.1.4 Proceso general de elaboración de cerveza**

El proceso de elaboración de la cerveza implica extraer y descomponer los carbohidratos de la cebada malteada para obtener una solución azucarada (“mosto”) que contiene nutrientes esenciales para el crecimiento anaeróbico de la levadura. Durante la fermentación, se consumirán esos azúcares simples, con liberación de calor y producción de etanol y otros subproductos con propiedades aromatizantes. Las enzimas, provenientes del grano de cebada y de la levadura, son las responsables de catalizar los cambios biológicos ocurridos durante el proceso de elaboración de la bebida (Willaert, 2012).

Hay cinco etapas principales en la fabricación de cerveza: molienda y maceración, cocción, fermentación, maduración y acondicionamiento y operaciones de terminación. En la **Figura 5** se muestra una descripción general del proceso de elaboración (Harrison & Albanese, 2019).



**Figura 5:** Esquema del proceso general de elaboración de la cerveza (Harrison & Albanese, 2019).

Los cereales utilizados en la producción de cerveza no contienen cantidades suficientes de azúcares fermentables, como ya se mencionó anteriormente (1.1.3.1), la extracción de los azúcares de la cebada u otros cereales requiere de un paso previo denominado “malteado”, generalmente llevado a cabo por empresas externas a las de fabricación de cerveza. La malta

resultante contribuye de manera importante al color final y las características del cuerpo de la cerveza terminada (Harrison & Albanese, 2019; Solís, 2017).

El principal objetivo del malteado es producir un amplio suministro de enzimas que degradan el almidón, las proteínas y otros componentes del grano. Los cambios enzimáticos posteriores proporcionan azúcares fermentables a partir del almidón y compuestos necesarios (p. ej., aminoácidos y ácidos grasos) a partir de otros sustratos para apoyar el crecimiento de levadura. Este paso consiste en introducir los granos durante dos o tres días en tanques de agua fría para mantener la humedad. Seguido de una etapa de germinación durante 4-5 días, la cual ocurre a una temperatura de 12-17°C y a 44-47 % de humedad en presencia de oxígeno. Al finalizar, se secan los granos en hornos con variaciones de temperatura en condiciones controladas que eliminan el agua sin inactivar las enzimas deseadas, hasta aproximadamente un 5 % de humedad. Los compuestos de sabor generados por el calor y el pardeamiento no enzimático que se forman durante el proceso de secado, pueden afectar el sabor de la cerveza terminada (Harrison & Albanese, 2019; Solís, 2017).

#### 1.1.4.1 Molienda y maceración

La molienda consiste en romper el grano que fue previamente sometido a un proceso de malteado con el fin de que el mismo pueda hidratarse y se de una correcta extracción de sus azúcares. Al molerse, se expone el endospermo almidonado del grano, lo que hace que los carbohidratos estén más disponibles. Los granos no deben de quedar excesivamente molidos, debido a que la generación de harina puede causar problemas en el filtrado posterior, pero tampoco deben de quedar granos enteros, sino el agua no podrá ingresar a los mismos (Ferreira, 2014; Harrison & Albanese, 2019).

En la etapa del macerado, la malta previamente molida se suspende en agua. En este proceso, la malta con el agua (en relación 3/1) se calientan a 50-75°C durante 1-4 hs, lo que activa las enzimas presentes en la cebada (Ferreira, 2014; Solís, 2017). La finalidad de este procedimiento es la generación de azúcares fermentables (maltosa (50-60%), maltotriosa (15-20%), glucosa (10-15%)) y no fermentables (dextrinas). Los primeros, serán el sustrato de la levadura en el proceso de fermentación alcohólica. Los segundos, son oligosacáridos de bajo peso molecular que abarcan del 20 al 25% de los carbohidratos totales de la cerveza y la mayoría de las cepas de *Saccharomyces* no pueden degradarlos ni fermentarlos. Estos últimos son responsables de aportarle cuerpo a la cerveza, por esto es necesario disminuirlos cuando se busca producir cervezas bajas en carbohidratos (se discutirá más adelante) (Solís, 2017).

A medida que el almidón se calienta en agua comienza la gelatinización que favorece el ataque de las enzimas hidrolíticas. Si bien el almidón se puede degradar en ciertos casos por debajo de su temperatura de gelatinización, su hidrólisis ocurre más rápidamente después que los gránulos se han hinchado convenientemente. A 65 °C se maximiza la conversión del almidón en azúcares simples (Ferreira, 2014).

Los cerveceros suelen tener control del macerado al variar los rangos de temperaturas utilizados, ya que cada rango activa e inactiva diferentes enzimas. De acuerdo a las características deseadas en el producto final y a la composición de la malta, se deben

seleccionar precisamente las condiciones de temperatura y tiempo de maceración, ya que los efectos se pronuncian más a medida que el tiempo de operación es mayor. Muchas empresas malteras suelen incluir la composición enzimática de sus productos, lo que vuelve más sencillo poder tener conocimiento de actividades específicas a cada temperatura y resistencia a la desnaturalización térmica (Solís, 2017).

En Uruguay, se utilizan distintos métodos de maceración para la producción de cervezas artesanales, pero el más común es de 1 hora a 67°C y 30 minutos a 72°C. Esto resulta en cervezas con gran cantidad de dextrinas. De esta forma, si se quieren obtener cervezas con altos niveles de alcohol o un contenido bajo en calorías, se pueden probar diferentes perfiles de temperatura de maceración para minimizar la formación de carbohidratos no fermentables y las actividades de las amilasas evitando periodos de altas temperaturas (Solís, 2017).

El pH es otro factor importante a considerar en esta etapa. El pH normal de la malta es de aproximadamente 5,8 y no es lo suficientemente ácido para una actividad enzimática óptima. Se puede ajustar la acidez mediante la adición de ácido, generalmente ácido láctico, o mediante fermentación bacteriana. *Lactobacillus delbrueckii* convierte los azúcares en ácido láctico de manera eficiente a temperaturas de 42–51°C. Debido a que la variedad de microorganismos que pueden crecer a estas temperaturas es pequeña, es más fácil mantener una fermentación bacteriana de cultivo puro y reducir la posibilidad de contaminación por otros microbios. No obstante, la modificación bacteriana requiere una supervisión mucho mayor y, si no se controla, puede contribuir al deterioro de la cerveza (Harrison & Albanese, 2019).

Luego de finalizado el macerado, se filtra el líquido “mosto” para ser separado de los sólidos “bagazo”. El mosto contiene los compuestos solubles, incluidos los azúcares fermentables y los oligosacáridos no fermentables (Harrison & Albanese, 2019; Hough, 2011).

Dentro de los factores que influyen en las características únicas de una cerveza, se encuentra la composición del mosto, la cual dependerá de la mezcla de granos utilizada y el perfil enzimático de los mismos (Harrison & Albanese, 2019).

#### 1.1.4.2 Cocción del mosto

El mosto obtenido luego del macerado, se hierve por un tiempo de 60-90 minutos. En esta etapa se agrega el lúpulo, en concentraciones que van a depender de cada receta y estilo de elaboración. El lúpulo se agrega directamente sobre el mosto que fue agitado previamente. Es común agregarlo en distintas etapas del hervido (como se discutió anteriormente), siendo el agregado al comienzo el que aporta amargor y sobre el final se aportara mayormente aroma (Ferreyra, 2014; Solís, 2017).

Durante esta etapa se producen varios cambios, entre ellos (Ferreyra, 2014; Solís, 2017):

- Detención de la actividad enzimática: se frenan los procesos de proteólisis, lipólisis y amilólisis debido a la desnaturalización de las enzimas producto de la temperatura

- Esterilización del mosto: solo algunos pocos microorganismos térmofílos sobreviven a temperaturas de 100°C, siendo la cerveza un medio no apto para el crecimiento de los mismos.
- Extracción e isomerización de compuestos derivados del lúpulo: los principales compuestos responsables del amargor (alfa ácidos) son insolubles en agua pero luego de la cocción se isomerizan a iso-alfa ácidos. Esto dependerá de la cantidad de lúpulo adicionada, la concentración de alfa ácidos en el lúpulo empleado y el porcentaje de utilización del lúpulo.
- Coagulación de proteínas: la eliminación de parte de la proteína de alto peso molecular es uno de los objetivos de la etapa de ebullición. El exceso de proteína puede dar problemas de clarificación y pueden durante la etapa de almacenamiento reaccionar con polifenoles dando turbidez, lo que acortará el tiempo de conservación. Por otro lado, algunas proteínas son necesarias en la cerveza para producir buena retención de espuma y para mejorar la sensación en boca. El pH por encima de 5,0 favorece la precipitación. El hervor o agitación durante la cocción también es necesario para que se de una correcta precipitación.
- Modificación del color por caramelización de azúcares, formación de melanoidina y oxidación de taninos: El aumento en el color se debe al pardeamiento no enzimático o reacción de Maillard (una reacción entre aminas o aminoácidos y compuestos carbonílicos de los azúcares para crear productos insolubles llamados melanoidinas, que son las responsables de las diferentes tonalidades de amarillo o marrón que se observan en los diferentes tipos de cerveza) (Morales, 2018).
- Concentración del mosto por evaporación del agua: la cocción permite la evaporación de los compuestos volátiles formados en la maceración o del lúpulo así como una concentración de los azúcares y demás componentes no volátiles.
- Caída en el pH y formación de sustancias reductoras: La baja en el pH favorece la clarificación y la capacidad de almacenamiento de la cerveza. Además, durante el hervor pueden formarse sustancias reductoras que, al disminuir el potencial de óxido reducción, protegen al mosto de reacciones oxidativas.
- Eliminación de sustancias que contienen azufre: El hervor permite eliminar este tipo de sustancias formadas en el mosto por oxidación de grupos tiol, lo que mejora el sabor de la cerveza.

Algunos cerveceros agregan clarificantes sobre el final de la etapa de ebullición. No pueden ser agregados muy temprano porque corren riesgo de degradación, pero tampoco muy tarde porque pueden no disolverse (Ferreira, 2014).

Finalizada la cocción, el mosto debe clarificarse y enfriarse. A nivel industrial, lo primero se logra por trasvase a un contenedor cilíndrico, donde la fuerza centrífuga hace que la presión vertical del líquido levantado en los bordes tienda a impulsar las partículas hacia el fondo (proceso cervecero denominado whirlpool). En caso de ser necesaria la filtración del mosto

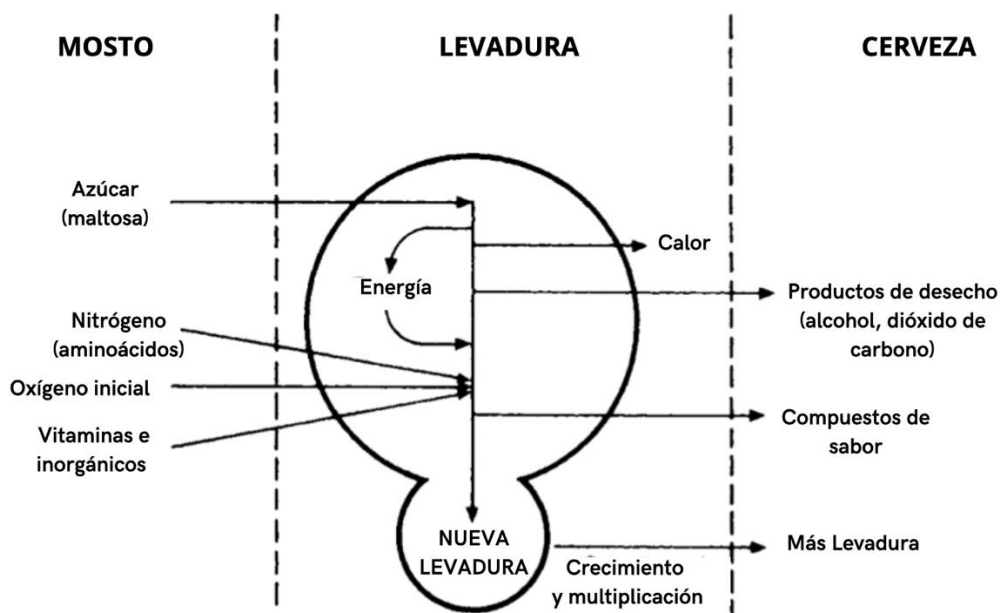


caliente, puede llevarse a cabo utilizando filtros horizontales, lo que permite la formación de mostos excepcionalmente claros (Ferreira, 2014). Una vez que el lúpulo se separó del mosto, puede ser utilizado como fertilizante (Harrison & Albanese, 2019). Luego, el mosto debe enfriarse a la temperatura de inoculación de la levadura para comenzar con el proceso de fermentación. La manipulación durante esta etapa debe llevarse a cabo cuidadosamente para evitar contaminaciones; el tiempo de espera hasta la fermentación debe ser lo más corto posible (Solís, 2017).

#### 1.1.4.3 Fermentación

Los pasos anteriores se llevan a cabo con la finalidad de crear un medio de crecimiento adecuado para la levadura, la cual se inocula para dar lugar a la conversión de los azúcares fermentables en etanol, CO<sub>2</sub> y componentes del sabor (en menor proporción), lo cual se ilustra en la **Figura 6** (Harrison & Albanese, 2019; Hutkins, 2006; Solís, 2017).

Antes de agregar la levadura, el mosto debe llegar a una temperatura de aproximadamente 20°C y airearse con aire estéril. La fermentación de la cerveza es un proceso anaeróbico, pero un entorno aeróbico al principio, provoca una entrada más rápida de la levadura a la fase de crecimiento exponencial. Además, el oxígeno juega un papel importante en la biosíntesis de lípidos de membrana celular, necesarios para el crecimiento del microorganismo en el mosto (Hutkins, 2006).



**Figura 6:** Eventos bioquímicos mediados por levaduras durante el proceso de fermentación cervecera (Lewis, 2003).

Esta etapa de fermentación juega un rol muy importante en lo que será la calidad de la cerveza elaborada, debido a la producción de productos volátiles secundarios como alcoholes superiores y ésteres. Es por esto que las condiciones del proceso y el tipo de levadura con la

que se inocula, deben ser correctamente seleccionados (Solís, 2017). Además, es importante mantener las condiciones de higiene y desinfección de la sala de fermentación, así como la estabilidad de la temperatura y humedad, para garantizar una tasa de crecimiento adecuada de la levadura (Harrison & Albanese, 2019).

El tipo de fermentación, va a depender fundamentalmente de la cepa de levadura utilizada y por ende del tipo de cerveza que se desee (Harrison & Albanese, 2019; Solís, 2017). Las cervezas Ale, se producen con levaduras de fermentación alta inoculadas aproximadamente a los 18°C por 7 a 10 días. Estas levaduras tienden a formar pequeños grupos de células que se transportan a la parte superior del líquido en fermentación y se adsorben en burbujas de dióxido de carbono. Estas células de levadura se pueden recolectar de la superficie para reutilizarlas con el siguiente lote de fermentación. En cambio, las cervezas del tipo Lager, tienen un período de fermentación de 14 a 21 días y la temperatura a la cual se inoculan las levaduras ronda entre los 8 y 13°C. Las células de levaduras tienden a flocular y depositarse en el fondo de la cuba de fermentación, por lo que pueden recogerse para ser reutilizarlas en fermentaciones posteriores (Ferreyra, 2014; Harrison & Albanese, 2019). Las cervezas Ale tendrán sabores más frutados, mientras que las Lager serán más secas (Ferreyra, 2014).

Los recipientes de fermentación tienen tamaño y diseño variables según los distintos tipos de cervezas producidas. Hoy en día, la mayoría están hechos de acero inoxidable, pero eran comunes los materiales como madera, cobre y hormigón. Suelen estar cerrados, para reducir la exposición al aire y evitar la contaminación (Hutkins, 2006).

Al comienzo, el proceso de fermentación es muy lento, pero se acelera una vez que la levadura comienza a crecer. La producción mayoritaria de alcohol, dióxido de carbono y la mayoría de los compuestos de sabor se producen sobre el comienzo y durante la fase estacionaria del crecimiento de la misma. Luego, la fermentación se enlentece a medida que se agota el azúcar fermentable y la levadura comienza a perder la suspensión (floculación) (Lewis, 2003).

Para saber cuando finalizar con el proceso, por lo general se hacen medidas de la evolución de la densidad, ya que el consumo de azúcares causa una disminución de la misma (Ferreyra, 2014). También puede seguirse por la producción de dióxido de carbono o alcohol. Al final de la fermentación, el líquido resultante (cerveza “verde”) se separa del sedimento y se transfiere a tanques de madera (p. ej., roble) o de acero revestidos de vidrio. Además, al terminar, es importante una rápida disminución del pH para aumentar la estabilidad del producto y disminuir posibles contaminantes (Harrison & Albanese, 2019).

#### 1.1.4.4 Maduración y acondicionamiento

Llegado este punto, la cerveza se denomina “verde” o inmadura, ya que todavía contiene levaduras que no sedimentaron (y puede contener otros microorganismos), compuestos insolubles que dan aspecto turbio indeseable y también puede contener componentes químicos que imparten sabores desagradables. Además, contiene poco o nada del dióxido de carbono producido anteriormente. De modo que, de aquí en más los fabricantes tienen el desafío de promover un desarrollo y maduración de sabor aceptables e introducir

carbonatación en la cerveza. Por consiguiente, se podría decir que estos pasos son tan importantes como cualquiera de los anteriores (Hutkins, 2006).

El proceso de maduración se da entre el final de la fermentación y la etapa de envasado y carbonatación. El objetivo principal que buscan los cerveceros con esta fase es la precipitación de las sustancias aún en suspensión y de la levadura remanente y refinar el sabor del producto final por eliminación de sustancias volátiles no deseadas (Solís, 2017).

Existen tres estrategias generales para llevar a cabo la maduración; en todas ellas se realiza un enfriamiento del producto, con el fin de que las levaduras junto a las proteínas (que se encuentran en suspensión) se ubiquen en el fondo del fermentador, facilitando su remoción (Ferreira, 2014; Lewis, 2003). La primera consiste en enfriar la cerveza verde a una temperatura igual o menor a 0°C por una semana o dos, en este caso el dióxido de carbono se puede inyectar para lograr la carbonatación. Otra estrategia común es el krausening, que consiste en llevar a cabo una fermentación secundaria, mezclando la cerveza verde con mosto recién fermentado y manteniéndola a 8°C por 3 semanas. En este tiempo, los compuestos de sabor indeseables tales como diacetilo y acetaldehído son reducidos por la acción de la levadura a compuestos más o menos insípidos. La tercera estrategia se llama lagering y es también un tipo de fermentación secundaria, donde el producto de fermentación primaria se enfría para lograr la floculación de gran parte de la levadura y se traslada a un recipiente nuevo antes de agotar el azúcar fermentable. Al igual que en el caso anterior, la levadura lleva a cabo la fermentación lentamente a 8°C, nuevamente atrapando CO<sub>2</sub> para la carbonatación y reducción de diacetilo y acetaldehído. Además, existe una cuarta estrategia de maduración moderna que acorta considerablemente el tiempo de maduración de muchas cervezas y se denomina reposo de diacetilo. Al final de la fermentación primaria, la cerveza simplemente se mantiene a la temperatura de fermentación (15°C en esta etapa para lagers, 20°C para ales) hasta que el diacetilo se reduce a la especificación, según lo determinado por la medición (Lewis, 2003). El dióxido de carbono que se produce en las fermentaciones secundarias se disuelve en la cerveza porque el recipiente se cierra y la cerveza se 'acondiciona'. Conjuntamente, se producen otros gases y sustancias volátiles que son perjudiciales para el sabor de la cerveza, por ejemplo, sulfuro de hidrógeno y algunas dicetonas. La liberación de presión ocasional, pero sistemática, en el recipiente de maduración permitirá la ventilación de estos compuestos a la atmósfera (Briggs, 2004).

Como ya se mencionó, la maduración se caracteriza por mejorar el sabor en la bebida, pero esa mejora resulta difícil de cuantificar, ya que dependerá en gran parte de la metodología utilizada y esta del tipo de cerveza que se quiera producir (Briggs, 2004; Solís, 2017). Además, los tiempos de maduración deben estar bien regulados, ya que con el pasar del mismo, el sabor puede suavizarse demasiado y la cerveza puede perder cuerpo y amargor (Solís, 2017).

Todos los procesos de maduración descritos consumen tiempo e insumos, pero son necesarios para obtener un producto de calidad, ya que los cambios de sabor que tienen lugar a medida que madura una cerveza son profundamente importantes en el desarrollo del carácter y, por lo tanto, de la identidad de marca de la cerveza (Briggs, 2004; Lewis, 2003). Tanto las marcas nacionales como internacionales, suelen tener sabores estables y ampliamente reconocidos por sus consumidores. Asimismo, se suelen utilizar materiales

colorantes como caramelo o tratamientos con lúpulo posteriores a la fermentación, con el fin de poder ajustar los perfiles del color, aroma y sabor para brindar características únicas al producto final (Briggs, 2004).

Durante la maduración también se produce la clarificación de la cerveza por la sedimentación natural en frío de las levaduras, las proteínas inestables y otros complejos en solución pero este proceso puede mejorarse y acelerarse considerablemente por medios físicos y químicos (Briggs, 2004; Harrison & Albanese, 2019).

#### 1.1.4.5 Operaciones de terminación

Luego de la maduración y antes del envasado, la cerveza debe pasar por una serie de etapas que comprenden: clarificación, filtración, ajuste del nivel de dióxido de carbono y el tratamiento con agentes estabilizadores (Lewis, 2003).

La cerveza se filtra a una temperatura mínima de 28°C y clarifica para eliminar sólidos restantes y que quede de un color brillantemente claro. Además, se le agregan agentes estabilizadores para evitar el desarrollo de turbidez “neblina fría” por las proteínas o polifenoles residuales cuando el producto se mantiene a temperaturas refrigeradas en el mercado. El nivel final de dióxido de carbono se ajustará a 0,45–0,52% (Harrison & Albanese, 2019; Lewis, 2003).

Es común realizar una filtración gruesa con tierra de diatomeas para eliminar la gran mayoría de las partículas en suspensión y luego una filtración fina con, por ejemplo, filtros de láminas para lograr una claridad brillante. La centrifugación a veces reemplaza a la primera, o se pueden usar clarificadores (cola de pescado, es decir, colágeno especialmente preparado) para coagular y sedimentar las partículas.

Después de las etapas de filtración, se agregan los agentes estabilizadores. Los más modernos son, en su mayor parte, adsorbentes insolubles. Incluyen geles de sílice especialmente preparados, que eliminan ciertas proteínas de la cerveza, y/o PVPP (polivinilpirrolidona), un compuesto relacionado en estructura con el nailon, que elimina los polifenoles de la cerveza. También es común el uso de proteasas (Harrison & Albanese, 2019; Lewis, 2003).

Una vez finalizadas estas últimas etapas, la cerveza resultante tiene un sabor maduro, carbonatación adecuada, es brillantemente clara y es estable contra la formación de neblina fría y libre de oxígeno (Lewis, 2003).

Aquí finaliza el proceso de elaboración y la bebida ya está lista para su envasado y posterior comercialización.

La cerveza puede ser empacada en latas, botellas o barriles. Generalmente la cerveza enlatada o embotellada se pasteuriza para aumentar su vida útil. En este proceso, se elimina cualquier microorganismo que pueda estar presente y estropear el sabor de la cerveza (Harrison & Albanese, 2019; Lewis, 2003).

El proceso de pasteurización implica aplicación de calor pero el sabor de la cerveza puede verse afectado negativamente si se recalienta, por eso es que se ha recurrido a métodos alternativos. Anteriormente, se aplicaban temperaturas de 62°C durante un máximo de 20 minutos, pero surge como alternativa pasteurizar rápidamente (“pasteurización flash”) la cerveza a 71–75°C durante 15 a 30 segundos (Harrison & Albanese, 2019). Esta última metodología, en la cual la cerveza se calienta y enfría rápidamente, ofrece algunas ventajas, como una menor pérdida de sabor debido al calentamiento, pero debe seguir el envasado aséptico (estéril o libre de microbios) y esa es una tecnología desafiante y costosa (Lewis, 2003). Otra alternativa es la “pasteurización en frío” que implica el uso de filtros de membrana seguidos de un envasado aséptico (Harrison & Albanese, 2019).

La cerveza almacenada en barriles podrá estar pasteurizada o no. En el segundo caso, debe enfriarse hasta temperaturas de refrigeración y su vida útil será aproximadamente de un mes, mientras que si se pasteuriza podrá extenderse a tres meses (Harrison & Albanese, 2019).

Una vez hecho esto, la botella ya está lista para etiquetar y entrar al almacén desde donde se distribuye a los mayoristas y, finalmente, a los consumidores (Lewis, 2003).

### **1.1.5 Impacto en el mercado nacional y desarrollos innovadores**

#### **1.1.5.1 Consumo e influencia en el mercado**

La cerveza es hoy la bebida alcohólica más consumida en Uruguay. Su consumo anual supera los 100 millones de litros, según datos del volumen físico comercializados en el mercado local y declarados por los fabricantes e importadores ante la Dirección General Impositiva (DGI) (el Observador, 2022).

En conjunto con los datos anteriores, también se informa un crecimiento significativo del consumo de cerveza importada, siendo este más de un 35% del consumo total. Es por esto que, surge la necesidad de elaborar productos innovadores que compitan con los extranjeros y frenen su aceptación masiva en el mercado local (el Observador, 2022; Medina, 2018).

#### **1.1.5.2 El “boom” de las cervecerías artesanales**

Hace ya varios años que la popularidad de las cervecerías artesanales va en continuo aumento en varios países del mundo y Uruguay no es la excepción. Si bien los países sudamericanos más avanzados en el tema son Brasil y luego Argentina, entre los años 2007-2008 comenzaron a instalarse las primeras cervecerías artesanales en el país y su número ha ido en aumento (M. Larroque, 2020). Este auge en la producción motiva la generación de conocimiento por parte de los investigadores, quienes buscan brindar herramientas para el desarrollo de productos distintivos a los productores (Medina, 2018).

Las cervezas artesanales e industriales difieren en los procesos de elaboración, la calidad de las materias primas y los volúmenes de producción. Las primeras se elaboran de forma menos automatizada (con protocolos de elaboración más variados y controlados manualmente) y a pequeña escala, por lo cual dan lugar a la experimentación en búsqueda de nuevos sabores, mayor diversificación e innovación (M. Larroque, 2020). El desarrollo de productos y

procesos nuevos e innovadores, involucran biotecnología y bioprocesamiento (Hutkins, 2006).

### 1.1.5.3 Nuevas tendencias: “Cervezas bajas en calorías”

Hoy en día, la popularidad de las cervezas artesanales en el país y la necesidad de competir con los productos internacionales en conjunto con una sociedad más consciente sobre la salud, han definido las nuevas tendencias en el sector cervecero (Miguel et al., 2022). En este sentido, las cervezas bajas en calorías es uno de los principales productos innovadores en esta estrategia de diversificación (Medina, 2018).

Actualmente en Uruguay, no se comercializa ningún tipo de cerveza nacional baja en carbohidratos, pero la incursión en esta línea de estudio se ve prometedora, teniendo en cuenta lo que reflejan las tendencias en otros países más avanzados en el tema. En 2002 entró al mercado la primera cerveza baja en calorías en Estados Unidos y hoy en día se encuentra entre las más vendidas en Norteamérica (Solís, 2017).

El aporte calórico de las cervezas está dado en su mayoría por el alcohol y los carbohidratos residuales. Estas calorías no aportan un valor nutricional a la bebida, por lo cual comúnmente se denominan “calorías vacías” (Solís, 2017).

El mosto (**descrito en 1.1.4.1**) contiene una mezcla de azúcares fermentables (es decir, glucosa y maltosa), así como azúcares no fermentables más complejos (en particular, dextrinas y dextrinas límite), producto de la hidrólisis incompleta del almidón durante la etapa de maceración. Los azúcares simples se fermentan fácilmente, pero la fracción de carbohidratos complejos no puede ser degradada por la levadura y quedará presente en el producto final. Estos últimos son carbohidratos calóricos, lo que significa que pueden hidrolizarse a glucosa durante la digestión, adsorberse en el torrente sanguíneo y usarse como energía o almacenarse como grasa. Las calorías de una cerveza se pueden reducir reduciendo o eliminando de alguna manera los carbohidratos no fermentables pero calóricos de la cerveza (Hutkins, 2006).

A nivel mundial, se han estudiado un montón de enfoques para poder reducir el contenido de dextrinas en las cervezas. Una estrategia común en la actualidad consiste en agregar enzimas que hidrolizan los carbohidratos no fermentables para formar azúcares libres que luego se fermentan durante el paso de fermentación primaria. Las enzimas más comúnmente utilizadas son glucoamilasas comerciales (derivadas de *Aspergillus niger* y otros hongos) que se añaden al mosto durante el macerado y actúan en conjunto las enzimas endógenas de la malta (Hutkins, 2006). Otra metodología posible es la dilución de la cerveza en agua. En este último caso, no solo se obtiene una cerveza con menor contenido calórico sino que también se reduce el contenido alcohólico. De todas formas, el producto final resulta en una solución acuosa con características distantes de las de la cerveza convencional (Solís, 2017). Igualmente, podrían utilizarse azúcares simples como adjuntos, a expensas de la malta y así las fracciones de dextrina también se reducirían. Sin embargo, esto proporciona cervezas de cuerpo delgado, ya que son las dextrinas las que aportan la sensación en la boca y las propiedades corporales de la cerveza. También, se pueden utilizar preparados de malta con mayor actividad amilolítica para que la hidrólisis del almidón sea más completa (Hutkins,



2006). Recientemente, para producir cervezas bajas en calorías se han estado utilizando levaduras manipuladas genéticamente ya sea a través de programas de mejoramiento de levadura convencionales o mediante técnicas moleculares, con el objetivo de aumentar la actividad de la amiloglicosidasa, que descompone los enlaces glucosídicos -1,4 y -1,6 en la dextrina (Hutkins, 2006; Solís, 2017). No obstante, esta última no puede ser utilizada para producir cervezas en Uruguay, ya que las reglamentaciones no permiten el uso de microorganismos genéticamente modificados.

## **1.2 LEVADURAS NATIVAS**

### **1.2.1 Ventajas de su aplicación en la industria cervecera**

En Uruguay, se ha apostado al uso de levaduras nativas para poder desarrollar cervezas bajas en calorías. Esto surge dado que la levadura es la única materia prima que puede otorgar un diferencial local al producto final; el lúpulo es importado y las cervecerías locales obtienen la cebada del mismo lugar. Además, las levaduras comerciales utilizadas en la elaboración, son también importadas, entonces no solo que el costo de producción es mayor, sino que es difícil diferenciarse de las cervezas elaboradas a escala masiva (Medina, 2018). Esto último es justamente lo que los consumidores están teniendo a rechazar, ya que buscan encontrar productos innovadores que salgan del portafolio normal, pero también desean distinciones a nivel sensorial (Mannise, 2022).

La utilización de levaduras nativas (*Saccharomyces* como no-*Saccharomyces*) en la producción de cerveza resulta ventajosa no solo por permitir la diversificación de productos en un mercado en crecimiento, sino por aportar a los mismos un valor territorial. Además, son las que se adaptan mejor a las condiciones medioambientales del país (Burini, 2021; Medina, 2018).

Estas levaduras suelen secretar enzimas que pueden generar un impacto en el aroma y sabor del producto final al interactuar y activar precursores aromáticos (compuestos aromáticos glicosilados que provienen fundamentalmente del lúpulo) en el mosto. En consecuencia, pueden generar impacto en el llamado fenotipo del aroma y sabor, lo que constituye un factor importante y diferencial a la hora de seleccionar levaduras (Mannise, 2022). Asimismo, pueden ser productoras de enzimas con actividad amilolítica (descriptas en 1.1.3.5), lo que las hace buenas candidatas para poder abordar el problema de los carbohidratos residuales, ya que las levaduras cerveceras no poseen este tipo de características (Blanco et al., 2014).

El aislamiento, la selección y la caracterización de levaduras nacionales es clave para el desarrollo de cervezas innovadoras (Mannise, 2022). Las mismas pueden ser aisladas de insumos de la industria cervecera o también pueden utilizarse levaduras aisladas a partir de la uva y equipamiento de bodegas que ya fueron probadas y funcionaron bien en vinos (Medina, 2018).

### **1.2.2 Características necesarias para su aplicación en la producción de cervezas bajas en carbohidratos**

La búsqueda de distintas cepas, estudio de sus características y selección de las mismas es algo que lleva mucho tiempo. Por lo general cuesta encontrar cepas que aporten un valor agregado al producto y además sean buenas fermentadoras. Además, es importante tener en cuenta que muchas veces se tiene un buen comportamiento a nivel del laboratorio, pero esto puede cambiar en condiciones industriales. El manejo en fábricas de estas levaduras es diferente en cuanto a tasas de inoculación, temperaturas de fermentación, estrategias de nutrición, etc., por lo que se necesita tener una buena comprensión del desempeño de las mismas, antes de poder ser introducidas a los elaboradores (Burini, 2021).

Para producir cervezas bajas en calorías, se necesita contar con levaduras que sean capaces de degradar el almidón a azúcares simples para que los mismos puedan ser fermentados. El problema radica en que esta fermentación viene de la mano con mayor producción de alcohol y esto es algo indeseado, ya que el mismo presenta mayor valor energético que los carbohidratos (Burini, 2021). Así pues, los científicos persiguen la búsqueda de levaduras con actividad amilolítica (enzimas que degraden el almidón) que al fermentar los azúcares simples, produzcan etanol pero también glicerol. Este último da cuerpo y estructura a la cerveza pero no influye en la graduación alcohólica (Medina, 2018).

Existen una serie de pasos a realizar antes de decidir si una levadura nativa es buena candidata para la producción de cervezas reducidas en carbohidratos. Se debe realizar el screening de actividad  $\alpha$ -amilasa (enzima de primordial importancia en la hidrólisis de almidón), prueba de fermentación, estudio de compuestos producidos en cromatógrafo de gases y análisis descriptivo sensorial (Blanco et al., 2014; Medina, 2018).

### **1.2.3 *Aureobasidium pullulans*: una levadura con potencial**

#### **1.2.3.1 Generalidades del microorganismo**

*Aureobasidium pullulans* es un hongo ubicuo tipo levadura, conocido popularmente como “levadura negra”(Chi et al., 2009; Hernández, 2011). Es un microorganismo de naturaleza ubicua que puede sobrevivir en una amplia gama de ambientes, es polimórfico y oligotrófico (Bozoudi & Tsaltas, 2018; Gaur et al., 2010). Es distinguido como epífito o endófito natural de varias especies de plantas (por ejemplo, manzana, uva, pepino, judías verdes y repollo) sin causar ningún síntoma de enfermedad (Gaur et al., 2010). Hasta el momento, no existe patogenicidad comprobada en humanos (Deshpande et al., 1992).

Esta levadura se encuentra en una amplia gama de ambientes tropicales y templados con un contenido de humedad fluctuante en la filósfera, es aislado de superficies interiores húmedas y también de la filósfera y carpósfera de cultivos de frutas y vegetales (Bozoudi & Tsaltas, 2018; Gaur et al., 2010). *A. pullulans* es una de las especies de levadura predominantes aisladas de las uvas en todas las etapas de madurez y otros tejidos de la vid (Bozoudi & Tsaltas, 2018). También se ha encontrado en ambientes estresados osmóticamente como el agua hipersalina y las rocas. Rara vez se encuentra en ambientes de frío intenso, aunque esto

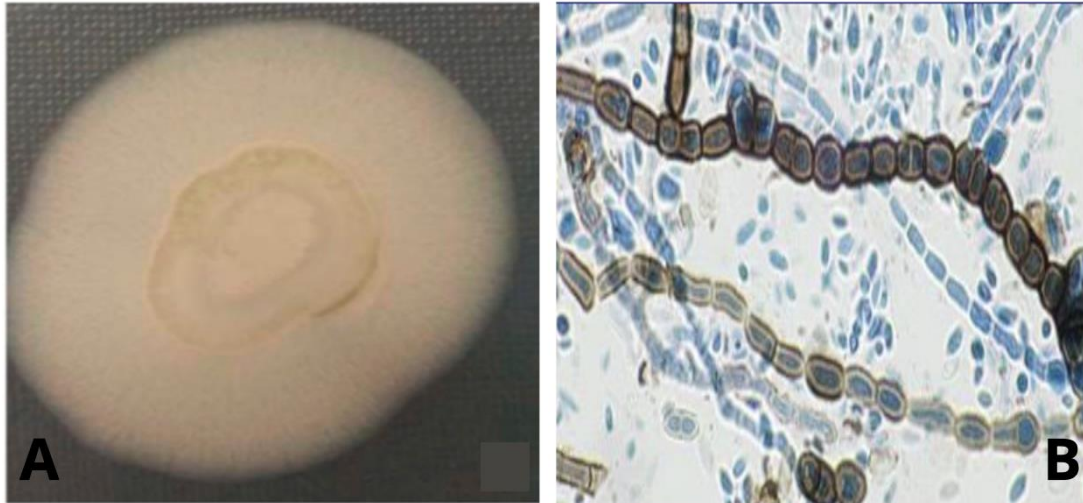


puede deberse a que la mayoría de los estudios de aislamiento y caracterización de microorganismos en el frío se han limitado a zonas donde prevalecen hongos de otro phylum (Zalar et al., 2008). Sin embargo, levaduras similares a *A. pullulans* han sido aisladas del hielo glacial en los hábitats costeros del Ártico y el agua de mar adyacente (Gaur et al., 2010).

Anteriormente, *A. pullulans* se colocó dentro del antiguo filo Deuteromycota, Orden Moniliales y Familia Dematiaceae, utilizando el criterio de conidiogénesis, es decir, la producción sincrónica de conidios holoblásticos. Recientemente ha sido reclasificada como una levadura ascomiceta y se ubica en el Orden Dothideales, Familia Dothideaceae. Se caracterizó taxonómicamente sobre la base de sus características morfológicas y nutricionales comprendiendo especies únicas con tres variedades diferentes como *A. pullulans* var. *pululanos*, *A. pullulans* var. *melanogenum* y *A. pullulans* var. *aubasidani* (Gaur et al., 2010).

*A. pullulans* es una especie que se caracteriza por una alta variabilidad genética, por lo que las características morfológicas y culturales por sí solas no son suficientes para evaluar la variabilidad interespecífica y diferenciar cepas estrechamente relacionadas. Por lo tanto, se utilizan técnicas moleculares (RAPD-PCR y otras técnicas de PCR) para diferenciar con éxito las poblaciones de la especie y obtener información sobre la complejidad genética de este microorganismo (Bozoudi & Tsaltas, 2018).

Esta especie exhibe polimorfismo, ya que puede crecer como levadura en ciernes o como micelio dependiendo de las condiciones ambientales. Las formas morfológicas de este hongo (**Figura 7**) dependen de factores como la temperatura, el pH y la concentración de oxígeno y de factores nutricionales, principalmente la fuente y la concentración de carbono, nitrógeno y minerales (Gaur et al., 2010). Las colonias son inicialmente suaves y eventualmente se cubren con una secreción mucosa, comienzan siendo de color crema, rosa claro o marrón claro y finalmente se vuelven negruzcas debido a la producción de una melanina específica en la etapa de producción de clamidosporas; rasgo característico de este hongo. Al observar al microscopio óptico, se distinguen tres formas características: filamentos septados ramificados alargados, clamidosporas grandes y células de levadura elípticas más pequeñas (Chi et al., 2009). Las hifas se ven hialinas, lisas y de paredes delgadas de 2 -16  $\mu\text{m}$  de ancho con células a menudo más anchas que largas formando micelios rugosos y compactos. *A. pullulans* puede reconocerse por las conidias rectas y por la presencia de cadenas lobuladas de clamidosporas de paredes gruesas (Gaur et al., 2010).



**Figura 7:** *Aureobasidium Pullulans* A) colonia en Sabouraud Dextrose Agar (Bozoudi & Tsaltas, 2018) B) Observación microscópica de conidios de pigmentación oscura de una o dos células y conidios hialinos, unicelulares, de forma ovoide, que se producen en denticulos cortos (Mycology. *Aureobasidium pullulans*. University of Adelaide, 2022).

*A. pullulans* es bien conocido por producir el exopolisacárido (EPS) pululano que ayuda al hongo a adherirse a los hábitats ambientales y también protege a las células de la desecación. El pululano es un polímero de subunidades de maltotriosa con enlaces  $\alpha$ -1,6, o un glucano lineal que contiene enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 en una proporción de 2:1. También contiene como característica estructural menor, subunidades de maltotetraosa unidas a  $\alpha$ -1,6 en un bajo porcentaje y distribuidas al azar alrededor del 1 al 7% de los residuos totales en toda la molécula de pululano (Manitchotpsit et al., 2011).

Fue en el trabajo de Cooke en 1891, cuando se informó de este hongo por primera vez. Al día de hoy, se ha recopilado mucha información sobre el estilo de vida y fisiología del mismo y existe una extensa lista documentada de los hábitats y la geografía de las cepas que han sido aisladas. *A. pullulans* se ha aislado y estudiado a lo largo de todo el mundo debido a su fácil dispersión por la producción de propágulos similares a levaduras (Bozoudi & Tsaltas, 2018; Gaur et al., 2010).

#### 1.2.3.2 Aplicación industrial

Las propiedades de *A. pullulans* se han venido estudiando y documentando durante los últimos cien años. La presencia cosmopolita del microorganismo y su adaptación a los diversos hábitats con condiciones ambientales variadas, lo convierten en una fuente de primera clase para usos biotecnológicos (Bozoudi & Tsaltas, 2018).

*A. pullulans* es un hongo de importancia industrial que produce una variedad de metabolitos de interés como enzimas, antibióticos, proteínas unicelulares (SCP) y polisacáridos (principalmente pululano), muchos de los cuales se han aislado, caracterizado y probado para diversas aplicaciones tanto biológicas como no biológicas (Bozoudi & Tsaltas, 2018; Gaur et al., 2010).

Dentro de sus propiedades, se destaca su potencial para controlar y monitorear la contaminación ambiental, ya que debido a su naturaleza ubicua cualquier cambio en su aparición podría ser un indicador de alteraciones ambientales generadas por productos químicos u otros organismos biológicos. Además, parece ser un organismo prometedor para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos, tanto para quimioterapia como para aplicaciones no médicas. Se demostró la actividad antimicrobiana extracelular contra varias bacterias Gram positivas y Gram negativas. De la misma forma, algunos aislados de *A. pullulans* mostraron actividad antagónica contra varios hongos fitopatógenos y fueron considerados como posibles agentes de biocontrol de enfermedades postcosecha. Se destaca también su importancia en la industria farmacéutica, ya que gran cantidad de metabolitos fúngicos bioactivos y estructuralmente diversos como el pululano se han utilizado para el desarrollo de productos valiosos como medicamentos y cosméticos (Chi et al., 2009; Gaur et al., 2010). El pululano además se ha utilizado para fabricar biopelículas y adhesivos empleados en las industrias de alimentos; sirve como sustrato modelo para la enzima desramificadora de almidón pululanasa, que se utiliza industrialmente en combinación con glucoamilasa y  $\beta$ -amilasa en la producción de jarabes de glucosa y maltosa a partir de almidón (Chi et al., 2009; Deshpande et al., 1992). Otro de los usos biotecnológicos de esta especie de levadura, es en la industria vitivinícola y cervecera, debido a que es una gran productora de enzimas extracelulares como proteasas, lipasas y amilasas, siendo estas últimas de gran importancia por su papel fundamental en los procesos de fermentación (Bozoudi & Tsaltas, 2018; Chi et al., 2009).

Aunque hace años que se viene estudiando la morfología, distribución e importancia económica de este hongo, los procesos basados en su uso aún están en sus inicios. Se requieren estudios genéticos más exhaustivos para poder descubrir nuevas propiedades y bioproductos novedosos que tengan aplicaciones útiles y con ello lograr un mejor aprovechamiento del mismo (Chi et al., 2009; Deshpande et al., 1992; Gaur et al., 2010).

### 1.2.3.3 Sistema amilolítico y su potencial industrial

Las enzimas microbianas son ideales para procesos y aplicaciones industriales, debido a que son fáciles de aislar y se pueden producir a corto plazo en grandes cantidades, además el costo de producción es bajo y algunas de ellas son estables en condiciones extremas. Dentro de las posibles aplicaciones industriales se incluyen la producción química, la bioconversión y la biorremediación, para las cuales las investigaciones se han centrado predominantemente en proteasas, lipasas y amilasas (Gopinath et al., 2017).

Las enzimas amilolíticas obtenidas de bacterias, hongos y levaduras, son de gran importancia en aplicaciones biotecnológicas como la sacarificación de almidón, la industria textil, papelería y farmacéutica y *Aureobasidium* ha sido reportado como productor de varias de ellas, tales como  $\alpha$ -amilasas, glucoamilasas, glucosidasas, pululanasa y ciclodextrinasas (Gopinath et al., 2017; Hernández-Castillo et al., 2019a).

Por su parte, *Aureobasidium pullulans* cuenta con un sistema enzimático amilolítico complejo; produce al menos cuatro tipos de enzimas amilolíticas (glucoamilasa,  $\alpha$ -glucosidasa,  $\beta$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa) extracelulares usando diferentes sustratos para su inducción (Gopinath et al., 2017; Saha et al., 1993). La glucoamilasa es una exoenzima que

hidroliza los enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 para liberar D-glucosa a partir de almidón y oligosacáridos más pequeños como la maltosa y la maltotriosa. La  $\alpha$ -glucosidasa, es una exoenzima que hidroliza los enlaces  $\alpha$ -1,4, liberando glucosa, de manera menos eficiente que la glucoamilasa. La  $\beta$ -glucosidasa, es una endoenzima que hidroliza los enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos de la estructura interna del almidón, liberando glucosa como principal producto. La  $\alpha$ -amilasa es una endoenzima que hidroliza enlaces  $\alpha$ -1,4 y fue descrita anteriormente (1.1.3.1) por ser la más relevante en los procesos de elaboración de cerveza (Hernández-Castillo et al., 2019a). Todas las  $\alpha$ -amilasas actúan sobre el almidón (polisacárido) como sustrato principal. Son metaloenzimas que requieren iones metálicos (calcio) para mantener su estabilidad, actividad y conformación estructural. Estas enzimas tienen cuatro arreglos conservados (I–IV), que se encuentran como hebras  $\beta$  3, 4 y 5 en el bucle que conecta la hebra  $\beta$ -7 con la hélice  $\alpha$ -7 (Gopinath et al., 2017).

La amilasa es la enzima que posee el mayor potencial para su uso en fines industriales y medicinales, representando aproximadamente el 25% del mercado mundial de enzimas. Se clasifican en términos generales en los subtipos  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , de los cuales los dos primeros han sido los más estudiados, además se pueden dividir en endoamilasas y exoamilasas. Actúan sobre los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1-4 y, por lo tanto, también se denominan glucósido hidrolasas. Juegan un papel importante en la elaboración de cerveza y bebidas fermentadas a partir de azúcares (a base de almidón), ya que los procesos fermentativos en condiciones de humedad, pH y temperatura controladas, son un buen medio para la producción de las mismas (Gopinath et al., 2017).

La actividad amilasa producida por bacterias es mucho mayor que la producida por *A. pullulans*, pero debido a que la mayoría de las levaduras de los ambientes son seguras (GRAS, generalmente consideradas seguras) en comparación con las bacterias y que estas últimas solo pueden producir  $\alpha$ -amilasas, el interés en las levaduras amilolíticas ha aumentado en los últimos años y se ha reconocido su valor potencial para la conversión de biomasa almidonada en proteína unicelular y etanol (Gaur et al., 2010).

*A. pullulans* muestra una fuerte capacidad amilolítica; tiene la capacidad de secretar amilasas en el medio de cultivo y ha mostrado un nivel muy alto de actividad. Además, se ha observado que las amilasas de *A. pullulans* no están unidas a las células sino que están reguladas por el crecimiento en el almidón (Deshpande et al., 1992). El almidón es el mejor sustrato para la producción de células de levadura a gran escala debido a su bajo precio y su disponibilidad en la mayoría de las regiones del mundo (Chi et al., 2009).

Los niveles de producción de enzimas amilolíticas varían dentro de un mismo género, especie e incluso cepa. Asimismo, cepas aisladas de entornos ricos en almidón, tendrán mayor actividad enzimática que las aisladas de medios pobres en el mismo. Igualmente, en los procesos de fermentación, condiciones como pH, temperatura y nutrientes también afectarán la tasa de producción enzimática. Las enzimas fúngicas tienen la ventaja de ser secretadas extracelularmente y la producción o secreción de las mismas puede examinarse mediante diferentes métodos comunes, incluidas técnicas basadas en sólidos o basadas en soluciones (Gopinath et al., 2017).

Se han establecido diferentes métodos para la producción de enzimas microbianas. En el caso de la amilasa, el extracto crudo puede funcionar bien, pero para aplicaciones industriales específicas (como productos farmacéuticos), se requiere la purificación de la enzima. Esto puede lograrse mediante cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica, filtración en gel, inmunoprecipitación, separación en gel de polietilenglicol/sefarosa y sistemas acuosos de dos fases y de gradiente, donde el tamaño y la carga de la amilasa determina el método elegido (Gopinath et al., 2017).

Las posibles aplicaciones industriales de las enzimas dependerán de la capacidad de seleccionar, mejorar y purificar a gran escala las mismas. La ventaja de trabajar con enzimas microbianas es que en muchos casos los microorganismos se pueden ajustar para producir enzimas eficientes que sean termoestables y estables en condiciones estrictas. Con esto y las distintas metodologías de purificación y técnicas de ingeniería genética, la aplicación de amilasas microbianas en los procesos químico-industriales se encuentra en aumento (Gopinath et al., 2017).

En razón de lo antes expuesto, este trabajo se centra en la producción y caracterización de amilasas fúngicas nativas con la finalidad de contribuir al desarrollo de cervezas bajas en carbohidratos. En búsqueda de levaduras nativas productoras de amilasas, el grupo de la Dra. Karina Medina aisló e identificó (por secuenciación de la subunidad grande (LSU o 28S) del DNA ribosomal (DNAr) nuclear) cepas de *Aureobasidium pullulans* obtenidas de uvas de vinificación y frutos autóctonos. Estos aislamientos fueron reportados como productores de amilasas en ensayos preliminares, pero no pasaron las pruebas de fermentación (por generar efectos indeseados en el producto final). En este sentido, estas cepas nativas no pueden ser incorporados en los procesos de elaboración de cerveza, pero sus enzimas podrían.

La hipótesis de la presente tesina se basa en la producción y caracterización de amilasas de cepas de *Aureobasidium pullulas* nativas para desarrollar un preparado enzimático de utilidad en la elaboración de cervezas bajas en calorías. Las enzimas amilolíticas permitirán lograr una reducción en el contenido de carbohidratos residuales, lo que contribuirá al desarrollo de un producto diferencial y con identidad país.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general del presente trabajo es el estudio a nivel bioquímico y molecular de amilasas producidas por cepas de *Aureobasidium pullulans* nativas con la finalidad de evaluar su potencial de aplicación en la industria cervecera, buscando aumentar la degradación de almidón para garantizar una producción de glucosa más rápida y mayor, y en consecuencia, aumentar el rendimiento cervecero y producir cervezas con contenido calórico reducido.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Producción, obtención y caracterización de enzimas producidas por *Aureobasidium pullulans* aislado y cultivado en medio de producción.
2. Determinación de la actividad enzimática de las enzimas aisladas mediante ensayo de actividad con 3,5 Ácido dinitrosalicílico.
3. Evaluación de la estabilidad de la actividad enzimática posterior al proceso de liofilización.
4. Secuenciado del genoma de las cepas por Nanopore para la caracterización de genes que codifican para las enzimas.
5. Diseño de primers específicos y amplificación por PCR.
6. Secuenciación de fragmentos enzimáticos.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 MATERIALES

#### 3.1.1 Cepas de partida

Se trabajó con aislamientos de *Aureobasidium pullulans* obtenidos de cepas de uvas de vinificación y frutos autóctonos por el grupo de la Dra. Karina Medina e identificados por secuenciación de la subunidad grande (LSU o 28S) del DNA ribosomal (DNAr) nuclear, una de las secuencias más utilizadas en la caracterización molecular de la comunidad fungi a nivel de género y de especie. Las cepas de trabajo CH16-5G (aislada de cepas de uvas Chardonnay presentes en Pan de Azúcar, Maldonado) y BTP18-8 (aislada de Pitanga en los Titanes, Canelones) fueron seleccionadas mediante un ensayo de producción de amilasas en placa, utilizando medio TSA (+ Almidón) y revelado con lugol (Área Enología y Biotecnología de Fermentaciones, 2020; Macpherson, 1953). Se escogieron por ser las dos que presentaban mayor actividad en el ensayo semi-cuantitativo en placa.

#### 3.1.2 Reactivos utilizados

Las sales utilizadas en las soluciones buffer y medios de cultivo fueron  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaOH}$ , Tris y tartrato de sodio y potasio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). El Ácido 3,5-dinitrobenzoico (DNS) fue cedido por el Área Bioquímica del DEPPIO, Facultad de Química. Todos los medios de cultivo comerciales fueron de Thermo Scientific™ (Medios de cultivo deshidratados Oxoid™) (**Anexo 1**). El almidón utilizado fue (Starch Almidon Soluble, Merck). La agarosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.).

### 3.2 MÉTODOS

#### 3.2.1 Producción y obtención de enzimas

##### 3.2.1.1 *Aureobasidium pullulans* aislamiento y almacenamiento

Las cepas CH16-5G y BTP18-8 fueron crecidas en medio PDA (**Anexo 1**) e incubadas en estufa a 28 °C por 48 horas para ser usadas como inóculo en el resto de los experimentos. Para almacenar las cepas, se cultivó al microorganismo en medio PDB (**Anexo 1**) por 48 horas a 28 °C en un shaker (150 rpm), se agregó glicerol hasta una concentración de 15 %, se tomaron alícuotas de 1 mL y se preservaron en freezer a -70 °C.

##### 3.2.1.2 Ensayo semicuantitativo en placa de actividad amilasa

Se descongelaron alícuotas de las cepas CH16-5G y BTP18-8 y se incubaron durante 48 horas en estufa a 28 °C en placas de PDA. Luego se sembraron en placas de medio TSA (**Anexo 1**) con almidón 5 g/L como sustrato de manera de lograr una estría o un pequeño punto/botón (como muestra la **Figura 8**) y se incubaron por 48 horas a 28 °C. Se reveló con



solución de Lugol (disolución acuosa de Yodo y Yoduro Potásico). Se consideraron positivas las colonias con halo amarillento (la observación debe ser rápida). También se sembró una placa con los controles positivos (22BE, B3E, 4E), es decir, levaduras que presentaban actividad amilasa confirmada (Área Enología y Biotecnología de Fermentaciones, 2020).



**Figura 8:** Esquema de siembra de microorganismos en placa para la realización del ensayo semi-cuantitativo de actividad amilasa (Área Enología y Biotecnología de Fermentaciones, 2020).

### 3.2.1.3 Fermentación sumergida para la producción de amilasas

La producción de enzimas se realizó cultivando al microorganismo en dos medios distintos (con almidón como sustrato) por 48 horas a 28 °C en un shaker (150 rpm). El primero, según (Mulay & Deopurkar, 2018), con modificaciones.

Medio de producción 1

Extracto de levadura	1 g
Peptona	0.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g
NaCl	0.15 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.102 g
Almidón	1 g
CaCl <sub>2</sub> **	0.00125 g
Agua c. s. p	100 mL

\*\* La solución de CaCl<sub>2</sub> se agregó a cada matraz, posterior al autoclavado a 121°C.

Medio de producción 2

**TSB (Tryptone Soya Broth)** (Digerido pancreático de Caseína 17 g/L; Digerido enzimático de soja 3 g/L; NaCl 5 g/L; Fosfato dipotásico de hidrógeno 2.5 g/L; Glucosa 2.5 g/L).



TSB	30 g/L
Almidón	5 g
Agua c. s. p	1 L

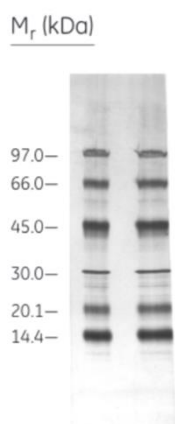
A partir de colonias aisladas en medio PDA de las levaduras CH18-5G y BTP18-8, se inocularon precultivos de 20 mL de los medios de producción. Se incubaron en shaker a 28 °C y 150 rpm. Luego de pasadas las 48 horas, se utilizó 1 mL del precultivo para inocular 100 mL de medio de producción fresco y se incubaron los cultivos en las mismas condiciones.

#### 3.2.1.4 Obtención de las enzimas de producción extracelular

Luego de la incubación en medio de producción, el cultivo se centrifugó a 10.000 g por 15 minutos a 4 °C y se separó el sobrenadante para obtener el extracto enzimático crudo. En cada ronda de manipulación posterior a este paso, se procuró mantener los extractos siempre en frío (Hernández-Castillo et al., 2019b).

#### 3.2.1.5 Análisis del crudo enzimático por SDS-PAGE

Se evaluaron los extractos enzimáticos por electroforesis SDS-PAGE (acrilamida 12%). Se prepararon los buffers (resolving, stacking y running), el gel concentrador y el gel separador según (Sambrook, 2001). Se cargaron las muestras más el buffer de carga. La corrida electroforética se realizó a 75 V hasta apilar las muestras en el stacking y cuando entraron al resolving buffer se subió el voltaje a 100 V durante 45 minutos. El gel se tiñó con Coomassie Blue R-250, mediante incubación en solución de tinción (mezcla de metanol y ácido acético) overnight, con agitación suave (Kit Contents KIT SAFETY DATA SHEET, 2022). Luego se eliminó la solución de tinción y se agregó la solución de desteñido (1:1:8; isopropanol, ác. acético, H<sub>2</sub>O), la cual fue renovada en forma periódica hasta lograr una buena visualización de las bandas presentes. Se evaluaron los resultados por fotografía tomada con Syngene™ GBox F3 (Thermo Fisher Scientific). El marcador de peso molecular utilizado fue Amersham Low Molecular Weight (**Figura 9**).



**Figura 9:** Marcador de peso molecular Amersham Low Molecular Weight utilizado en electroforesis SDS-PAGE (acrilamida 12%) (Product Booklet GE Healthcare, 2006).

### 3.2.2 Determinación de la actividad enzimática

Para la determinación de la actividad enzimática se utilizó un método comúnmente empleado en el área Bioquímica (Bernfeld, 1955).

La actividad enzimática se determinó incubando 0.5 mL de enzima (extracto crudo/sobrenadante de caldo fermentado) con 0.5 mL de almidón al 1% \* en buffer fosfato (pH 7.0, 0.1 M) por 3 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo añadiendo 1 mL de 3,5 Ácido dinitrosalicílico \*\* seguido de ebullición por 5 minutos. Se agregaron 7,5 mL de agua destilada y se registró la medida de absorbancia a 540 nm. El blanco se realizó alternando el orden de agregado de los reactivos; al extracto enzimático se le agregó 1 mL de DNS (Ácido 3,5 dinitrosalicílico) y posteriormente se adicionaron 0,5 mL de almidón al 1 %, luego se llevó a ebullición por 5 minutos y por último se le añadió 7.5 mL de agua (Porciúncula, 2017).

Una unidad de actividad amilasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de azúcar reductor por minuto bajo las condiciones del ensayo. Las unidades de enzima presentes en la muestra a ensayar se calculan según la **Ecuación 4**.

$$Abs\ 540nm = 0.2467 [maltosa] - 0.0252$$

**Ecuación 3:** Ecuación de la curva, correspondiendo *Abs 540nm* al eje de las ordenadas y la concentración de maltosa en mg/mL al eje de las abscisas (Porciúncula, 2017).

$$UE/mL = \frac{Cantidad\ de\ maltosa\ liberada\ (mg)}{t\ reacción\ (min) \times volumen\ enzima\ (mL)}$$

**Ecuación 4:** Cálculo de actividad enzimática en Unidades de enzima por mL (Porciúncula, 2017).

\* Para la preparación de almidón al 1 % se comenzó por el agregado de un volumen pequeño de buffer fosfato (pH 7.0, 0.1M) (casi a ebullición) a modo de crear una suspensión en forma de pasta. Luego se continuó con el agregado del resto del volumen y se llevó a ebullición hasta tornarse transparente.

\*\* Para la preparación de 500 mL de 3,5 ácido dinitrosalicílico (DNS), se disolvieron 5 g del reactivo en 250 mL de agua tibia y lentamente se agregaron 100 mL de NaOH 2,0 N con agitación magnética constante (en campana de flujo). Luego, se agregaron lentamente 150 g de tartarato de Na y K hasta disolución completa. Se ajustó a volumen con agua destilada.

### 3.2.3 Análisis de las condiciones de almacenamiento

Se probaron dos condiciones de almacenamiento de los extractos crudos: almacenamiento a 4 °C (heladera) y a -18 °C (freezer). Las muestras se guardaron en estas condiciones por 48 horas y luego se corrieron en un gel de poliacrilamida al 12%. Las medidas de actividad enzimática se realizaron previo al almacenamiento en frío de los extractos crudos.

### 3.2.4 Análisis de la liofilización como método de concentración del crudo enzimático

Se llevó a cabo la liofilización del crudo enzimático por congelamiento en baño criogénico a -40 °C, seguido de refrigeración a -70 °C y posterior sublimación del hielo a presión reducida en un liofilizador. La actividad del liofilizado fue evaluada mediante el ensayo de actividad enzimática mencionado anteriormente (3.2.2). Los equipos utilizados (liofilizador y rotaevaporador) son de Labotechgroup.

### 3.2.5 Extracción de DNA

Se analizaron distintos métodos de extracción. En todos los casos se partió de cultivos en medio PDB incubados por 24- 48 horas a 28 °C en shaker a 150 rpm.

Se utilizaron múltiples kits comerciales; QIAGEN DNeasy UltraClean Microbial Kit, ZYMO Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit y YeaStar Genomic DNA kit, que en lo que difieren es en la lisis enzimática o mecánica “bead beating”. Se optimizaron algunos de los pasos (tiempos de lisis, tipos de vortex y adaptadores, momentos de extracción, etc.).

Para los métodos no enzimáticos, se suspendieron 0.75 mL de cultivo en BashingBead buffer en un tubo de lisis y se colocó en el vortex (Vortex- Genie 2, 230 V) utilizando el adaptador QIAGEN (cat. no. 13000-V1-24) a máxima velocidad por 25 minutos (también se probaron tiempos menores). Luego, se colocó en microcentrifuga a 10.000 g por 1 minuto. Se conservó el sobrenadante y respetando una serie de pasos que incluyen pasaje a columnas, agregado de buffer de lisis, pre lavados, lavados y elución (se realizó en dos etapas de 25 µL c/u y dejando reposar 5 minutos a temperatura ambiente antes de centrifugar), se lograron obtener las muestras de DNA utilizadas en el resto de los experimentos.

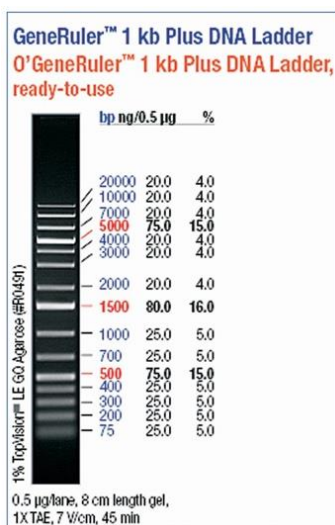
En cuanto a la metodología enzimática, difiere de la anterior, en la utilización de buffer de digestión, RNasa y Zymolasa con períodos de incubación a 37 °C por 2 horas (se probaron tiempos menores y mayores (40 minutos, 1 hora, 16 horas)) y en la posterior adición de cloroformo y buffer de lisis. La elución se probó con agua MQ y buffer TE.

### 3.2.6 Geles de Agarosa

Se evaluó la integridad de los extractos genómicos por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % (Sambrook, 2001). Los geles se tiñeron con GoodView™ (1 µl por cada 10 mL de solución de gel de agarosa).

Para cada muestra se sembraron 3 µl de reacción más 1 µl de loading buffer. El marcador de peso molecular utilizado fue GeneRuler 1Kb DNA Ladder (Thermo Scientific) y se cargaron 5 µl por gel (**Figura 10**). La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 30 minutos, en

una fuente Labnet's ENDURO™ Gel XL y se analizó el resultado utilizando el equipo de análisis de geles Syngene™ GBox F3.



**Figura 10:** Marcador de peso molecular, GeneRuler 1Kb DNA Ladder (Thermo Scientific) (Fisher Scientific (Thermo Fisher), 2023).

### 3.2.7 Optimización de tiempo de crecimiento en cultivo para extracciones de DNA

#### 3.2.7.1 Curva de crecimiento por medida de OD (600 nm)

Se realizó una curva de crecimiento por medidas de densidad óptica (D.O.) a diferentes tiempos de crecimiento en cultivo. Se largaron precultivos de la cepa CH18-5G en 20 mL de medio PDB con diferencia de 12 horas. A las 48 horas siguientes se inoculó 1 mL de los precultivos en 100 mL del mismo medio. En ambos casos, se incubaron en shaker a 28 °C (150 rpm). Se tomaron muestras a distintos tiempos de incubación (4:30 hs, 11:45 hs, 11:55 hs, 13:55 hs, 16:10 hs, 18:30 hs, 21:15 hs, 23:40 hs, 25:50 hs, 28:05 hs, 30:25 hs, 33:10 hs, 36:20 hs, 39:30 hs, 43:35 hs, 48:15 hs, 51:25 hs, 55:30 hs, 111:00 hs, 122:55 hs) y se realizaron medidas de OD (600 nm). Se registraron los valores y se graficó el log del OD (600 nm) en función del tiempo para determinar la curva de crecimiento.

En paralelo, se realizó la curva de crecimiento para *S. cerevisiae* (cepa de referencia).

Nota: la curva de crecimiento no se realizó para la cepa BTP18-8.

#### 3.2.7.2 Medidas de Peso seco

Se tomaron alícuotas de 1 mL a distintos tiempos (13:55 hs, 18:30 hs, 21:15 hs, 25:50 hs, 30:25 hs, 33:10 hs, 36:20 hs, 39:30 hs, 43:35 hs, 48:15 hs, 51:25 hs, 55:30 hs, 111:00 hs, 122:55 hs) de crecimiento en cultivo (**detallado en 3.2.7.1**). Las muestras se colocaron en tubos previamente pesados y se centrifugaron a 10.000 g por 2 minutos. Las células decantadas se pusieron a secar en estufa a 50 °C durante 5 días aproximadamente. Se realizaron medidas de peso seco en balanza analítica con diferencia de dos días hasta peso

constante. Se realizaron los cálculos de biomasa celular en términos de peso seco (gr) por unidad de volumen (mL), según la **Ecuación 5**.

Nota: Solo se realizó para la cepa CH18-5G.

$$\text{Peso seco} \left( g \frac{mS}{mL} \right) = \frac{(\text{Peso Tubo} + \text{Muestra Seca}) - (\text{Peso inicial Tubo})}{\text{Volumen de Muestra}}$$

**Ecuación 5:** Cálculo de la cantidad de biomasa presente en una muestra en términos de peso seco por unidad de volumen (Rodríguez Cavallini, 2005).

### 3.2.7.3 Recuentos de UFC a distintos tiempos de crecimiento en cultivo

Se tomaron alícuotas a distintos tiempos (16:10 hs, 21:15 hs, 28:05 hs, 33:10 hs, 36:20 hs, 48:15 hs) de crecimiento en cultivo (**detallado en 3.2.7.1**) y se realizaron diluciones seriadas (-4, -5, -6, -7) por duplicado basadas en la estimación de la concentración de inóculo a cada tiempo según la curva de crecimiento ya reportada para *S. cerevisiae* (**Ecuación 6**) (Stahl et al., 2004). Se extendió 0,1 mL de cada dilución en una placa de PDA con la ayuda de un rastrillo estéril.

Los recuentos en placa se realizaron 48 horas después de la incubación en estufa a 28 °C. Solo se realizó para la cepa CH18-5G.

Si un cultivo bacteriano tiene una densidad estimada de .. UFC/ml a determinado tiempo, sabiendo que se siembran 0,1 mL en la placa se pueden calcular las diluciones a sembrar para obtener placas con número de colonias en un rango contable (**Ecuación 6**).

$$UFC/mL = \frac{\text{Colonias enumeradas}}{\text{mL sembrados}} \times \text{factor de dilución}$$

**Ecuación 6:** Cálculo de UFC/ml según factor de dilución (Arana et al., 2010).

### 3.2.7.4 Evaluación de lisis enzimática de las células a distintos tiempos

A distintos tiempos (13:55 hs, 18:30 hs, 21:15 hs, 25:50 hs, 30:25 hs, 33:10 hs, 36:20 hs, 48:15 hs) de crecimiento en cultivo (**detallado en 3.2.7.1**), se extrajeron muestras y se realizaron los primeros pasos del ZYMO YeaStar Genomic DNA kit (**detallado en 3.2.5**), hasta la incubación con la enzima. Esto se realizó para ambas cepas (CH18-5G y *S. cerevisiae*), con el objetivo de establecer comparaciones.

## 3.2.8 Concentración del ADN por precipitación

Al final de varias etapas de extracción de ADN genómico, las réplicas de una misma muestra se juntaron en un mismo tubo. Se añadieron 2.5 µL de etanol absoluto y 0,025 µL de NaCl 4 M por µL de solución de ADN. Se llevó a freezer por 24 horas. El precipitado se recogió luego de su centrifugación (10.000 g por 15 minutos) a 4 °C y se lavó con etanol al 70 % (en

igual cantidad que el ADN precipitado). El etanol se eliminó y el ADN se secó en bloque térmico (Labnet Accublock Digital Dry Bath D1100) a 40 °C hasta eliminar el etanol. Al finalizar, se resuspendió en 50 µL de buffer TE (Sambrook, 2001).

### **3.2.9 Evaluación de concentración y calidad de muestras genómicas**

Para evaluar la calidad y concentración de las muestras de ADN extraídas, se utilizó un NanoDrop espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific, 2010) y el fluorímetro Qubit (Invitrogen).

### **3.2.10 Optimización de la preparación de la biblioteca de secuenciación Nanopore**

La preparación de bibliotecas se realizó con el Rapid barcoding kit de Nanopore (Oxford NANOPORE Technologies, 2022). Se tomaron 7,5 µL de muestra de DNA genómico (de concentración conocida) de cada una de las cepas (CH18-5G y BTP18-8) y se mezclaron con 2,5 µL de Mix de Fragmentación (RB-01 y RB-02 respectivamente). Se incubaron a 30 °C por 1 minuto y luego a 80 °C por otro minuto. Posteriormente, se enfriaron rápidamente en hielo. Se juntaron las muestras con barcoding en un mismo tubo, del cual se tomaron 10 µL y se le agregó 1 µL de RAP. Se mezclaron suavemente, y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Las instrucciones de uso y preparación de materiales se encuentran detalladas en el manual de uso (Rapid Barcoding Sequencing (SQK-RBK004), NANOPORE).

### **3.2.11 Diseño de primers para la amplificación de amilasas de *Aureobasidium pullulans***

Se realizaron búsquedas bibliográficas de códigos de secuencias de  $\alpha$ -amilasas y glucoamilasas reportadas para *Aureobasidium pullulans*. Se buscaron secuencias homólogas en la base de datos GeneBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), de libre acceso, utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1997). Se escogió la base de datos de la colección de nucleótidos (Database: nucleotide collection). Se seleccionaron todas las secuencias encontradas para el género *Aureobasidium*.

Se utilizó el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) (Kumar et al., 2018) para la construcción de árboles filogenéticos. Se dividieron las secuencias en grupos según su similitud.

Mediante Vector NTI (Software de análisis y diseño de secuencia) se realizaron alineamientos para obtener las regiones más conservadas entre las secuencias génicas seleccionadas para cada grupo.

Se diseñaron primers degenerados (degeneraciones marcadas en color rojo) (**Tabla 2**) dirigidos a zonas parcialmente conservadas mediante Prime3Plus (Software empleado para el diseño de cebadores). Se mandaron a sintetizar a la empresa Macrogen, Korea.

**Tabla 2:** Cebadores específicos diseñados para la utilización en las reacciones de PCR.

Gen	“Forward” y “Reverse” 5’-3’	Temperatura de melting (T <sub>m</sub> ) (°C)
Amilasa 1	AAGCTBGACTACATYCAGCAGATGG	64.2
	CYTTGTADGTVAVRTAWCCYGTATCTTGC	63.4
Amilasa 2	ACATGGGN TTCACDGCYGTNRG	60.3
	SRAADCGWGS DTKR TCRTGR TTTTC	59.2
Amilasa 3	ATGGGCGGCGAAGAACCTAC	62.5
	CTTGTA RARTRC RCTGT CRAARTTGAC	60.7
Glucoamilasa 1	GGAGCKGCHTTYK CWCTYCC	58.4
	GCAGTMCCMGCACARTTDCC	58.4
Glucoamilasa 2	GCCTTCTTGATGTACTTGTAGTTGAAGC	67.2
	TGGCTCTC RTCTGAGA AACTGTTG	65.8

### 3.2.12 Análisis genético por PCR

El ADN molde de las levaduras CH18-5G y BTP18-8 fue extraído con kits comerciales (**detallado en el apartado 3.2.5**). Las amplificaciones fueron realizadas en un volumen final de 25 µL (**Tabla 3**). Se utilizó el termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) y se realizó el ensayo en las condiciones especificadas (**Tabla 4**).

**Tabla 3:** Volúmenes de stocks a emplear en la reacción de PCR para un volumen final de 25 µL.

Componentes de reacción	Para 25 µL
Buffer GC	5
dNTPs	2
Pr Fwd	2,5
Pr Rev	2,5
DNA	1
Phusion	0,25
H <sub>2</sub> O	11,75

**Tabla 4:** Condiciones de amplificación

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1 ciclo	98	1 min
30 ciclos	98	10 seg
	55	30 seg
	72	1 min
1 ciclo	72	10 min
	4	∞

Se respetó la concentración de DNA (25-125 ng en 25 µL) sugerida por el protocolo (Thermo Scientific Phusion High-Fidelity PCR Kit). Para este experimento, se estimó la concentración y calidad del ADN a utilizar, mediante la visualización de las bandas obtenidas en gel de agarosa (**Figura 20 A**).

En cada reacción se incluyó un control positivo para descartar la presencia de inhibidores en la muestra genómica. Se usaron primers ITS1 e ITS4 (**Tabla 5**) que amplifican la región espaciadora interna transcrita (ITS por sus siglas en inglés) (Ferrer & Yenush, 2018).

**Tabla 5:** Cebadores utilizados para la amplificación de la región espaciadora interna transcrita (Ferrer & Yenush, 2018).

Primer	Secuencia 5'-3'	Tm (°C)
<b>ITS1</b>	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	59
<b>ITS4</b>	TCCTCCGCTTATTGATATGC	52

Se trabajó con un blanco control que incluía todos los componentes de reacción excepto la muestra de DNA (se sustituyó con el mismo volumen de H<sub>2</sub>O) para descartar contaminación en los demás componentes.

Finalizada la reacción de PCR, los resultados se revelaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (**detallado en 3.2.6**), concentración que permite discriminar los tamaños de banda esperados (**Tablas 8 y 9**).

En base al marcador de peso molecular (**Figura 10**), se puede conocer el tamaño de los productos obtenidos y comparar con los esperados.

### 3.2.13 Análisis e identificación de secuencias

Los fragmentos de ADN obtenidos tras la amplificación, se enviaron a secuenciar a Macrogen, Korea.

Sobre las secuencias obtenidas, se seleccionaron las partes de mejor calidad y se diseñaron primers específicos para enviar a resecuenciar y obtener la secuencia completa del gen.

Se realizó un análisis informático empleando el software Vector NTI (Software de análisis y diseño de secuencia) de las secuencias obtenidas y las secuencias reportadas seleccionadas para diseñar los primers iniciales.

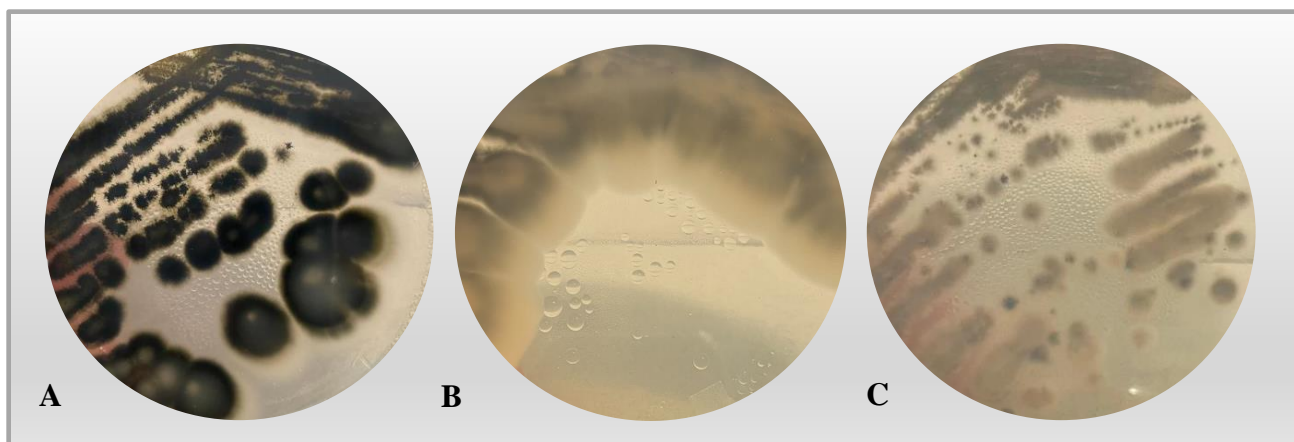
Se construyeron árboles filogenéticos con el software MEGA (Kumar et al., 2018) de las secuencias obtenidas y las secuencias reportadas seleccionadas para diseñar los primers iniciales.



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 *Aureobasidium pullulans* AISLAMIENTO Y ALMACENAMIENTO

Las cepas de *Aureobasidium pullulans* fueron aisladas previamente en el marco de la tesis de maestría de la Lic. Cecilia Schinca a partir de cepas de uvas de vinificación y frutos autóctonos. Fueron crecidas en medio PDA e incubadas en estufa a 28 °C por 48 horas para ser usadas como inóculo en los distintos ensayos. Las cepas de *A. pullulans* crecen como levaduras pero al cabo de los días forman un pseudomicelio y comienzan a tener una coloración grisácea a negra como se muestra en la **Figura 11**. En el resto de los ensayos solo se trabajó con las cepas CH18-5G (**Figura 11 B**) y BTP18-8 (**Figura 11 C**), por ser las que presentaban mayor actividad amilasa en ensayos preliminares.

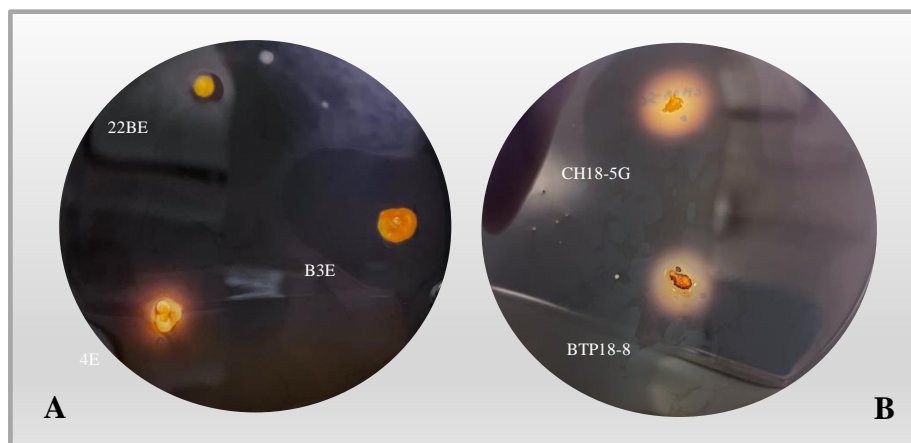


**Figura 11:** Cultivos en PDA (fotografías tomadas pasadas las 120 horas de sembrado en placas, para poder visualizar la coloración grisácea/negra) de algunas cepas de *Aureobasidium pullulans* aisladas. **A:** Cepa CH18-6G. **B:** Cepa CH18-5G. **C:** BTP18-8. Estas cepas fueron las que presentaron mayor actividad amilasa en ensayos previos.

### 4.2 CONFIRMACIÓN DE ACTIVIDAD AMILASA POR ENSAYOS PRELIMINARES

Para corroborar la presencia de actividad amilasa en las cepas de trabajo (CH18-5G y BTP18-8), se utilizó el análisis semi-cuantitativo de actividad amilasa en placa (Área Enología y Biotecnología de Fermentaciones, 2020; Macpherson, 1953). Como se muestra en las **Figura 12**, se logró ver un halo amarillo alrededor del punto/botón correspondiente a cada cepa. Se sembraron también cepas de levaduras previamente identificadas como productoras de amilasas cedidas por la Dra. Silvana Vero, con el objetivo de usarlas como control positivo; sin embargo, estas cepas (22BE, B3E y 4E) presentaron un halo más pequeño que CH18-5G y BTP18-8. Con el resultado de los ensayos en placa se pudo confirmar que las cepas nativas de *Aureobasidium pullulans* resultan sumamente interesantes para su estudio como productoras de amilasas. CH18-5G es la que presentó un halo de mayor tamaño (lo que se

corresponde con lo visto por el grupo de la Dra. Medina) por lo que en algunos de los ensayos posteriores se decidió trabajar únicamente con este aislamiento.



**Figura 12:** Ensayo semi-cuantitativo de actividad amilasa en placa de TSA (+ Almidón) a las 48 horas de crecimiento a 28 °C. **A:** cepas control (22BE, B3E y 4E) y **B:** Cepas de trabajo (CH18-5G y BTP18-8).

#### 4.3 PRODUCCIÓN DE AMILASAS Y ANÁLISIS DE SU ACTIVIDAD

Se realizó la producción de amilasas inoculando colonias de las cepas de *A. pullulans* aisladas en PDA (48 horas, 28 °C) en medio líquido. Se comenzó utilizando el medio 1 (**detallado en 3.2.1.3**), para la producción de amilasas utilizando las cepas BTP18-8 y CH18-5G, que eran las que mostraban mayor actividad en los ensayos en placa.

Dado que las levaduras de trabajo presentaban buena actividad amilasa en el ensayo en placa descrito anteriormente (**4.2**), se decidió utilizar también el medio de producción 2 (**ver 3.2.1.3**). Esto se realizó con la intención de reproducir las condiciones de ese ensayo de actividad amilasa preliminar y así poder alcanzar condiciones de cultivo mejores para la producción enzimática.

Los cultivos se incubaron por 48 horas, luego de las cuales se obtuvo un crudo enzimático mediante centrifugado y recuperación del sobrenadante. La actividad amilasa presente en el crudo se analizó mediante el ensayo descrito en Materiales y Métodos (**3.2.2**).

Este método se basa en determinar la maltosa liberada por la acción hidrolítica de la enzima sobre el almidón. La cantidad de maltosa liberada se determina utilizando la capacidad de esta de reducir el ácido 3,5-dinitrosalicílico (Bernfeld, 1955).

Las medidas de actividad enzimática se realizaron enseguida de la obtención del crudo. En la **Tablas 6** se muestran los resultados de los ensayos.

**Tabla 6:** Medidas de actividad enzimática (UE/mL) en medio de producción 1 y 2 (48 horas, 28 °C, 150 rpm) para extractos enzimáticos de las cepas CH18-5G y BTP18-8.

Cepa	Medio de producción	UE/mL
CH18-5G	1	1.284
	2	0.3103
BTP18-8	1	3.979
	2	1.203

Se observaron valores de actividad que se encuentran dentro del rango de los valores máximos de actividad reportados en bibliografía (Hernández-Castillo et al., 2019a; Mulay & Deopurkar, 2017; Saha et al., 1993), el problema es que fueron medidas irreproducibles. De todas formas, estos valores provienen de la actividad enzimática medida en el crudo y podrían mejorar en caso de concentrar y purificar.

Sin embargo, estos valores no solo no fueron reproducibles sino que tampoco se conciben con lo visto en ensayos preliminares, donde CH18-5G está reportada como la cepa con mayor actividad amilasa.

Se repitió el ensayo en múltiples ocasiones para evaluar su reproducibilidad y en muchos casos los resultados obtenidos no solo fueron menores sino que no fueron coherentes, ya que se obtuvo un valor mayor para el blanco que para las muestras. Esto vuelve a reafirmar la necesidad de concentrar el extracto, ya que muchas veces pueden haber restos de azúcares reductores en el extracto crudo. Entonces, en caso de que la actividad amilasa no sea muy alta, las muestras blanco pueden arrojar valores de absorbancia que pueden ser solapables con los valores producto de la actividad enzimática en las muestras.

Como se puede ver en la **Tabla 6**, el cambio de medio de producción no tuvo influencia positiva en los valores de actividad enzimática de ninguno de los cultivos, ya que no logró mejorar, ni siquiera igualar, las condiciones de producción enzimática como se esperaba. Además, se mantiene la superioridad en actividad enzimática de BTP18-8 con respecto a CH18-5G vista en el medio de producción 1. De todas formas, es esperable que exista una diferencia en la producción de amilasas entre el medio de producción 2 y el medio utilizado en ensayos preliminares, ya que el primero no imita exactamente las condiciones del segundo debido a que el medio comercial TSB (**Anexo 1**) contiene glucosa como fuente de carbono a diferencia del medio TSA. En muchos casos, puede suceder que en presencia de monosacáridos fácilmente metabolizables, se de una represión catabólica, afectando así la capacidad de sintetizar amilasas. Existe evidencia (Mulay & Deopurkar, 2017) de cepas de *A.pullulans* en donde la producción de amilasas no se ve reprimida en presencia de glucosa, así como también hay reportes (Li et al., 2007) en donde la actividad enzimática observada en presencia de glucosa es considerablemente menor a la observada en presencia de almidón. Se podría preparar el medio TSB de componentes, eliminando la glucosa y ver si los valores de actividad mejoran.

Se realizaron medidas de actividad enzimática de la cepa 22BE (datos no mostrados), la cual fue la utilizada como control positivo en los ensayos en placa. Dicho aislamiento era el que exhibía el halo amarillo más grande dentro de las 3 cepas control utilizadas, es por ello su selección. Los valores de actividad obtenidos con la cepa 22BE son menores a los vistos para las cepas de trabajo, con ambos medios de producción. De todas formas, esto se condice con lo visto en ensayos preliminares, donde las tres levaduras control presentaban halos más pequeños que las cepas de trabajo.

Se realizaron también ensayos de actividad utilizando otras cepas de *Aureobasidium pullulans* que habían sido clasificadas como productoras de amilasas en ensayos preliminares realizados previamente por el grupo de la Dra. Medina (**detalladas en Tabla 7**). En todos los casos, se detuvo la reacción a los 3 minutos y se midieron las muestras en seguida de obtener los crudos. Algunas de ellas presentaron actividad amilasa, pero en tres de ellas los valores de absorbancia resultaron inferiores a los valores blanco. Lamentablemente no fue posible repetirlos ni optimizar las condiciones porque se ingresó en un período de cuarentena debido a la pandemia de COVID-19, lo que nos llevó a priorizar otras aproximaciones.

**Tabla 7:** Medidas de actividad enzimática (UE/mL) en medio de producción 1 (48 horas, 28 °C, 150 rpm) para extractos enzimáticos de las cepas CH18-6G, 718-106G, BBHP17-1, T18-B6 y R18-25F.

Cepa	UE/mL
CH18-6G	-0.3610
718-106G	0.2312
BBHP17-1	0.4364
T18-B6	-3.134
R18-25F	-1.540

Cabe destacar que el ensayo de producción enzimática y medidas de actividad, especialmente para las cepas CH18-5G y BTP18-8, se realizó múltiples veces a lo largo de todo el trabajo experimental (descongelando distintas alícuotas de las cepas de trabajo para asegurar la pureza de las mismas) pero nunca se lograron reproducir (ni mejorar) los valores que se encuentran aquí expuestos, tanto para el medio de producción 1 como para el 2. Es posible que la baja concentración de las amilasas en el crudo, esperable ya que nos encontrábamos utilizando directamente el sobrenadante del medio de cultivo sin concentrar ni purificar, no permitieran cuantificar en forma correcta la actividad. Por esto, se plantea la búsqueda de metodologías que posibilitaran concentrar las proteínas en el extracto, las cuales se discutirán más adelante.

#### 4.4 ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS POR SDS-PAGE

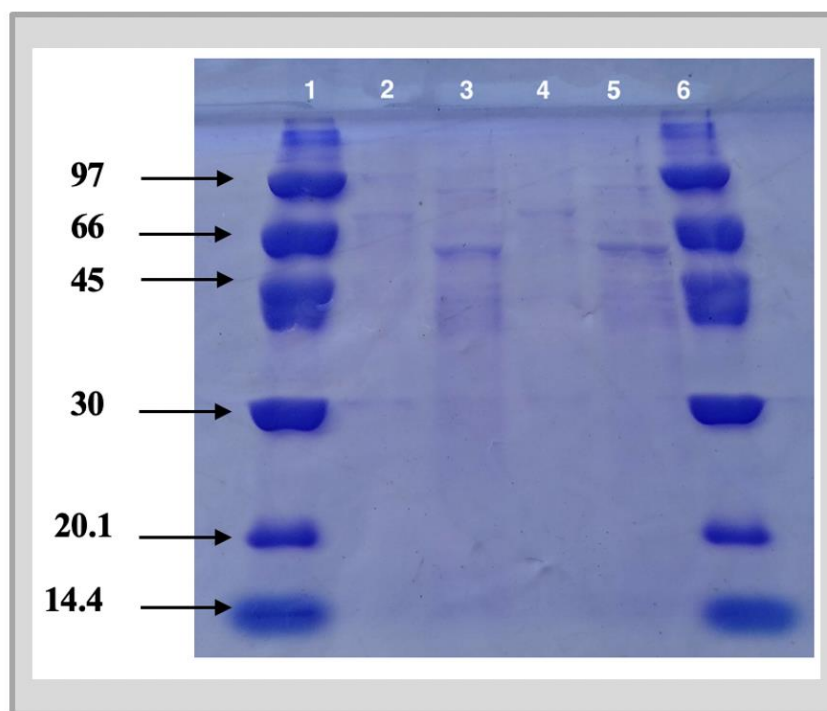
Los extractos enzimáticos crudos obtenidos según lo descrito en (3.2.1.4) a partir de las cepas CH18-5G y BTP18-8 utilizando el medio de producción 1 (3.2.1.3) y conservados en freezer y en heladera fueron evaluados mediante SDS-PAGE. El revelado se realizó con solución de Coomassie Blue (3.2.1.5). Se observaron tres bandas en los dos extractos de cada una de las cepas, pero con diferencia de tamaño entre las mismas. Para la cepa CH18-5G, tanto para el

extracto almacenado en freezer como el almacenado en heladera, se observaron bandas de 97 kDa, 66 kDa y 30 kDa aproximadamente, mientras que para la cepa BTP18-8, en ambos extractos, se vieron bandas de 98 kDa, 96 kDa y 66 kDa aproximadamente.

Se puede ver que el número de bandas es bajo, por lo que las proteínas secretadas por las cepas son pocas, lo que podría facilitar la purificación de las proteínas de interés y eventualmente permitir la utilización del extracto crudo para una posible aplicación en la fermentación de cerveza. A su vez, como se puede observar en la **Figura 13**, no hay diferencias en el patrón de bandas cuando el extracto se conserva en heladera o en freezer, es decir, no se observa diferencia en la degradación de proteínas entre ambas temperaturas.

Las amilasas previamente reportadas para cepas de *Aureobasidium pullulans* tienen pesos moleculares que van desde 50.5 kDa a 67.8 kDa (**Tablas 8 y 9**), por lo que la banda de 66 kDa podría corresponder a amilasas presentes en las cepas de trabajo.

En este punto se planteó continuar con una etapa de concentración y purificación de las proteínas de interés, para poder estudiarlas más en profundidad y confirmar su tamaño. Pero, por temas de cuarentena debido a la pandemia de COVID-19, hubo que cortar con los ensayos bioquímicos y priorizar el trabajo computacional.



**Figura 13:** Electroforesis SDS-PAGE (acrilamida 12%) de extractos enzimáticos crudos de CH18-5G y BTP18-8. (1 y 6): Marcador de peso molecular: Amersham Low Molecular Weight. 2: CH18-5G (heladera). 3: BTP18-8 (heladera). 4: CH18-5G (freezer). 5: BTP18-8 (freezer).

## 4.5 CONCENTRACIÓN DEL CRUDO ENZIMÁTICO

Dado que se observó que la actividad en el sobrenadante era baja, se decidió concentrar los crudos enzimáticos para poder estudiar mejor la enzima. Se planteó por un lado analizar la liofilización como una forma de concentrar la enzima.

La liofilización es una técnica, que mediante la congelación del producto y tras la aplicación de vacío, el agua es eliminada por sublimación, obteniendo de esta manera una pasta seca (Sneyder et al., 2016). Esta metodología, es ampliamente utilizada para la preservación en el tiempo de productos, especialmente de muestras biológicas. Además, podría ser de utilidad para desarrollar un preparado comercial para su aplicación a la fermentación de cerveza.

Sin embargo, no se detectó actividad enzimática luego del proceso de liofilización del crudo. Esto estaba dentro de lo esperado, debido a que al liofilizar, la enzima puede perder su estabilidad no resistiendo el proceso. Es posible mejorar la estabilidad de la enzima agregando distintos coadyuvantes que permitan su estabilización, pero debido a que la actividad se interrumpió por la pandemia no fue posible continuar esta línea. Queda pendiente optimizar las condiciones de cultivo y liofilización para mejorar este resultado.

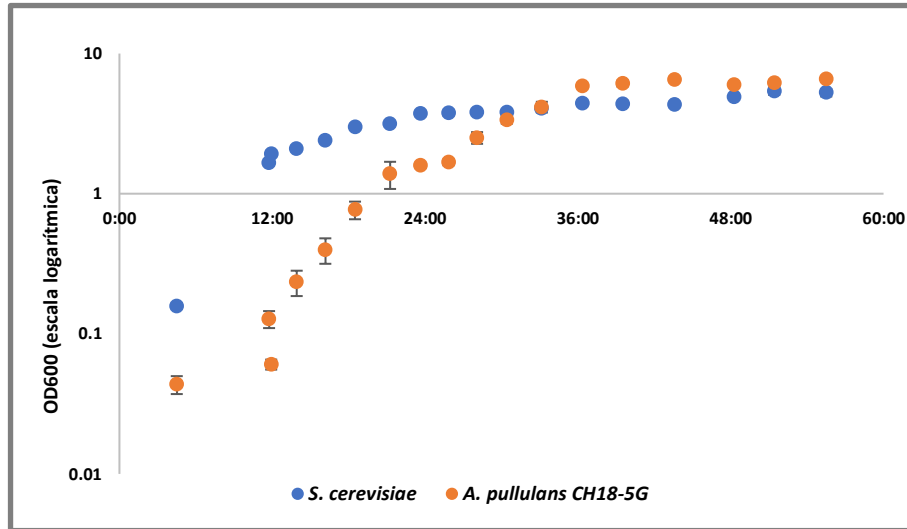
Por otro lado, se planteó la realización de una precipitación con sulfato de amonio para fraccionar el crudo y concentrar las amilasas presentes en el mismo (Duong-Ly & Gabelli, 2014; Wingfield, 2016). Pero, al igual que con la optimización del proceso de liofilización, no fue posible continuar con estos ensayos debido a la cuarentena por motivos sanitarios, priorizándose otras aproximaciones.

## 4.6 CURVA DE CRECIMIENTO

El objetivo de este ensayo es poder conocer la curva de crecimiento del cultivo, lo cual resulta de gran utilidad para futuros trabajos a realizarse con estas cepas nativas. Esta información puede ser útil para optimizar las condiciones de producción enzimática. Conociendo la curva de producción de actividad podrían solaparse ambos resultados y así seleccionar el momento óptimo para la producción enzimática. En este trabajo en particular, sirvió para poder determinar el momento óptimo para realizar las extracciones de ADN (se discutirá más adelante).

Se analizó la curva de crecimiento en medio PDB a 28 °C y 150 rpm, realizando el ensayo en paralelo para la cepa CH18-5G y para *Saccharomyces cerevisiae* (cepa de referencia), con el objetivo de tener un control de la metodología y además poder establecer comparaciones entre ambos cultivos. Los tiempos de toma de muestra y las medidas de OD 600 nm correspondientes se muestran en el **Anexo 2**.

Los resultados obtenidos de la curva de crecimiento (**Figura 14**) muestran que a las 24 horas el microorganismo se encuentra en fase exponencial y a las 48 horas la cepa ya se encuentra en fase estacionaria. La curva de *S. cerevisiae*, muestra un resultado coherente con resultados reportados previamente (Stahl et al., 2004).



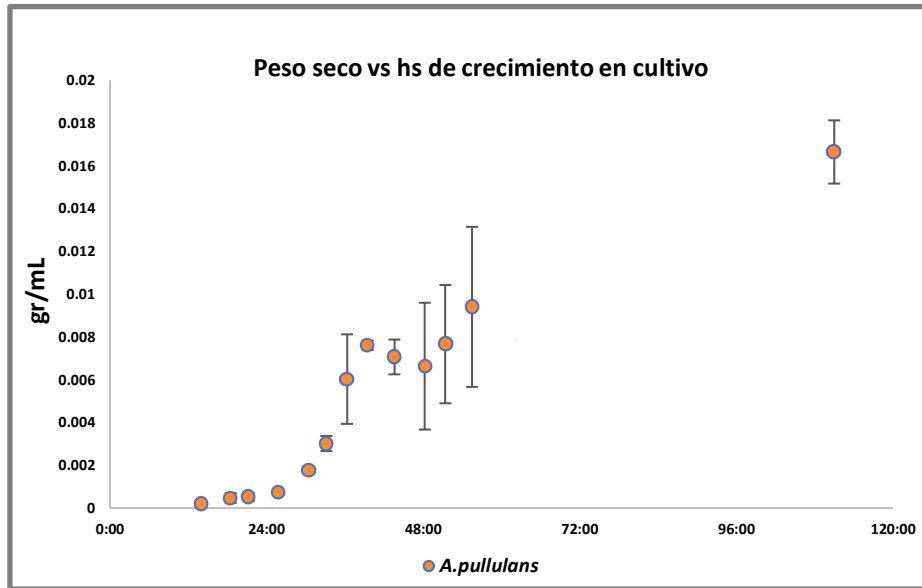
**Figura 14:** Curva de crecimiento de CH18-5G (naranja) y *S.cerevisiae* (azul) por medida de OD (600 nm) a distintos tiempos de crecimiento en cultivo (PDB, 28 °C, 150 rpm).

#### 4.7 MEDIDAS DE PESO SECO

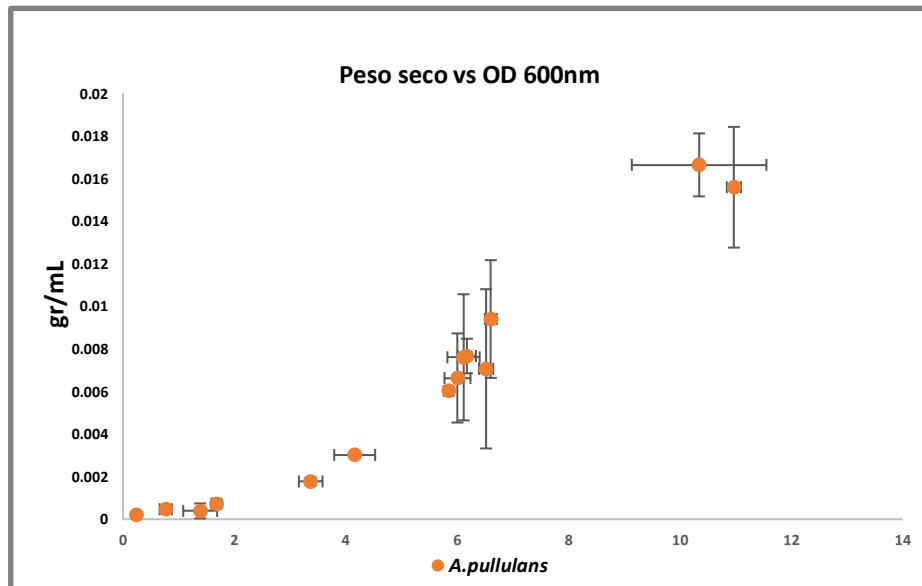
La cantidad de biomasa presente en una muestra puede medirse en términos de pesos seco por unidad de volumen. Las células se separan del líquido por centrifugación o filtración. Los resultados se expresan en g.m.s/ mL (**Ecuación 5**). Es un método directo para medida de masa celular, pero la principal desventaja es que su determinación incluye no solo microorganismos activos sino microorganismos muertos, material inerte, polímeros extracelulares y materia orgánica adsorbida. Es un método simple, pero consume bastante tiempo y es poco reproducible. A la vez, los componentes volátiles de las células pueden perderse en el secado y puede existir alguna degradación. También la muestra seca puede recobrar humedad durante el pesado, principalmente si el ambiente tiene humedad relativa alta (Arnaiz, 2018; Rodríguez Cavallini, 2005).

Durante la toma de muestras a distintos tiempos de incubación para la realización de la curva de crecimiento, también se tomaron muestras para hacer medidas de peso seco en algunos de los tiempos y correlacionarlas con la medida de OD600 (**Anexo 3**). Es de utilidad poder ver si existe correlación entre este ensayo y el anterior, dado que en muchas ocasiones, las levaduras tienden a precipitar o formar agregados, provocando imprecisión en las medidas de O.D.

En las gráficas de las **Figuras 15 y 16** se pueden observar los resultados obtenidos para el peso seco (gr/mL) vs el tiempo de cultivo (horas) y la relación del peso seco (gr/mL) vs OD600, respectivamente. Se puede ver una clara correlación entre las medidas de biomasa celular en función del tiempo por ambas metodologías.



**Figura 15:** Medidas de Peso seco a distintos tiempos (horas) de crecimiento de CH18-5G en cultivo (PDB, 28 °C, 150 rpm).



**Figura 16:** Medidas de Peso seco vs OD 600 nm a distintos tiempos (horas) de crecimiento de CH18-5G en cultivo (PDB, 28 °C, 150 rpm).

#### 4.8 RECUENTOS DE UFC A DISTINTOS TIEMPOS DE CRECIMIENTO EN CULTIVO

El recuento en placa es uno de los métodos más utilizados para determinar cuál es el número de microorganismos viables en un medio líquido. Esta medida nos permite determinar el número de células viables a los distintos tiempos de crecimiento en cultivo y correlacionarlo



con las medidas de OD 600 nm y de peso seco, las cuales refieren al número de células totales.

Durante la toma de muestras a distintos tiempos de crecimiento en cultivo (PDB, 28 °C, 150 rpm) para la construcción de la curva de crecimiento de la cepa CH18-5G, también se realizaron recuentos en placa en algunos de los tiempos. Las diluciones realizadas (ver **3.2.7.2**) para cada uno de los tiempos de cultivo, así como el resultado de los recuentos en placa calculados según la **Ecuación 7** se muestran en el **Anexo 4**. Cada dilución se sembró por duplicado y los recuentos en placa fueron promediados.

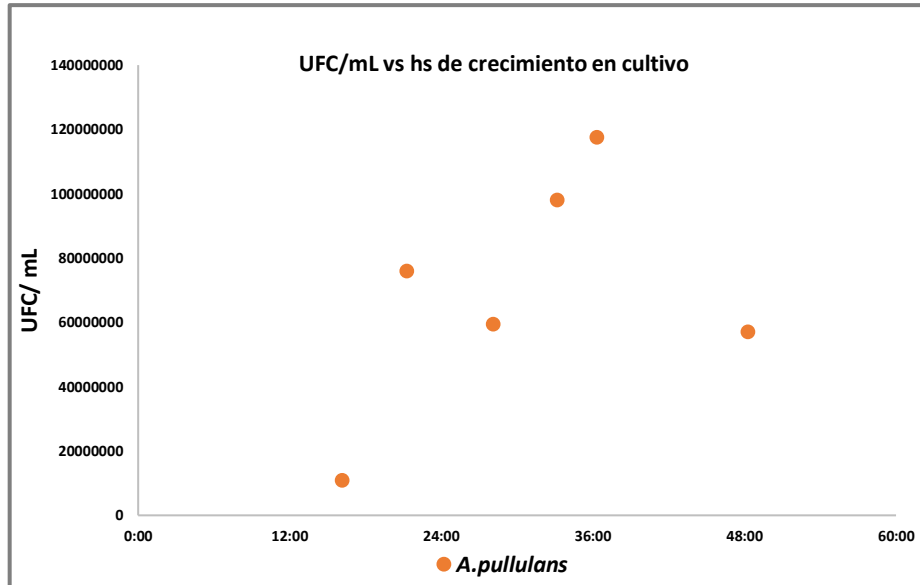
En la **Figura 17**, se puede ver la correlación del número de células viables con respecto al tiempo de crecimiento en cultivo (PDB, 28 °C, 150 rpm) para la cepa CH18-5G. A las 24 horas, como también se podía ver con las otras medidas de biomasa celular (O.D. 600 nm y peso seco), la cepa se encuentra en fase exponencial, mientras que a las 48 horas, se comienza a dar la fase de muerte.

Además, se realizó el ensayo de actividad enzimática en placa para una de las muestras (21:15 horas dilución  $10^{-6}$ ), de manera de comprobar que las cepas mantenían la actividad durante su incubación, lo cual fue logrado con éxito, ya que la placa se encuentra minada de halos amarillos (**Figura 18**). Esto se podría haber realizado para las 48 horas, de manera de tener la correlación con el tiempo de incubación al cual se realizaban las determinaciones de actividad enzimática en el extracto en crudo. La razón por la cual se hace al tiempo de 21:15 horas, es que por error se utilizaron placas de TSA (+Almidón) para ese tiempo y esa dilución, en lugar de PDA como en el resto.

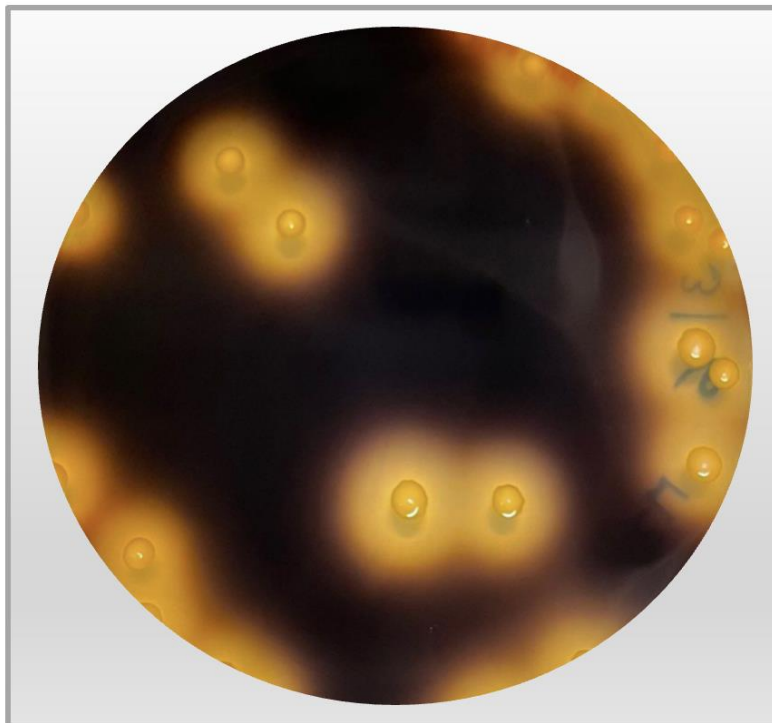
$$UFC/mL = \frac{\text{Colonias enumeradas}}{\text{mL sembrados}} \times \text{factor de dilución}$$

**Ecuación 7:** Cálculo de UFC/mL.

Nota: para el cálculo de UFC/mL se utilizan los datos de las placas que caen dentro del rango contable: 25-250 colonias para levaduras (marcadas en color amarillo). En este rango y al tiempo de 48 horas de incubación, las colonias de *A.pullulans* son bien puntiformes y se puede realizar con facilidad el recuento.



**Figura 17:** Recuentos de UFC/ mL a distintos tiempos (horas) de crecimiento de CH18-5G en cultivo (PDB, 28 °C, 150 rpm).



**Figura 18:** Ensayo de actividad enzimática en placa (medio TSA (+Almidón) y revelado con lugol) para la cepa CH18-5G a las 21:15 horas de crecimiento en cultivo (PDB, 28 °C, 150 rpm). Dilución  $10^{-6}$ .

## 4.9 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE $\alpha$ -AMILASAS Y GLUCOAMILASAS DE *Aureobasidium Pullulans*

Dado que las cepas mostraron actividad amilasa en ensayos semi-cuantitativos (4.2), pero no se logró obtener un extracto con actividad que permitiera continuar con esa línea de estudio, y que la situación sanitaria no permitió continuar con la optimización de estos ensayos, se decidió trabajar en la caracterización a nivel molecular del sistema amilolítico de las cepas de trabajo. Para ello se siguieron dos caminos; por un lado, la amplificación de los genes de  $\alpha$ -amilasas y glucoamilasas presentes en las cepas de trabajo utilizando primers dirigidos a zonas parcialmente conservadas. Por otro lado, el secuenciado del ADN genómico de dichas cepas, ya que contamos en el laboratorio con un secuenciador MiniON Nanopore. Este camino, además de ayudar a cumplir con el objetivo de caracterizar a nivel molecular el sistema amilolítico de las levaduras CH18-5G y BTP18-8, presenta valor en la caracterización de las cepas nativas de *Aureobasidium pullulans*.

### 4.9.1 Análisis bioinformático de secuencias conservadas para $\alpha$ -amilasas y glucoamilasas de *Aureobasidium pullulans*, árbol filogenético y alineamiento de secuencias

Con el objetivo de poder amplificar los genes de  $\alpha$ -amilasas y glucoamilasas en las cepas de trabajo (CH18-5G y BTP18-8) y abrir desde allí una nueva línea de estudio, se realizó un análisis bioinformático de las secuencias de estos genes presentes en bases de datos.

A partir de códigos de secuencias de  $\alpha$ -amilasas y glucoamilasas de *Aureobasidium pullulans* reportados en bibliografía, se buscaron secuencias homólogas en la base de datos GeneBank del NCBI, utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Se seleccionaron secuencias de amilasas que pertenecieran al género *Aureobasidium*. En las **Tablas 8 y 9** se presenta cada secuencia seleccionada para el trabajo con el número de acceso a la misma, su descripción, el tamaño de cada gen y el peso molecular de la proteína traducida, así como también el tamaño del amplicón esperado.

Mediante Vector NTI (Software de análisis y diseño de secuencia) se realizaron múltiples alineamientos para buscar las regiones más conservadas entre las secuencias génicas seleccionadas. Dado que fue imposible encontrar regiones 100% conservadas entre todas las secuencias, se utilizó el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) para poder agrupar las secuencias de mayor similitud entre sí mediante la construcción de un árbol filogenético (Hall, 2013) (**Figura 19**). Los grupos de secuencias más similares entre sí se alinearon nuevamente con Vector NTI, identificando así regiones conservadas sobre las cuales poder diseñar los cebadores.

Se obtuvieron cinco grupos de secuencias especificados con códigos de colores (tres para  $\alpha$ -amilasas y dos para glucoamilasas). Dado que la secuencia NW\_013581204.1 (Amy T) presentó muy bajo porcentaje de conservación con respecto a todas las otras secuencias, se decidió dejarla de lado en esta instancia, si bien no se descarta analizar su presencia en las cepas de trabajo en el futuro.

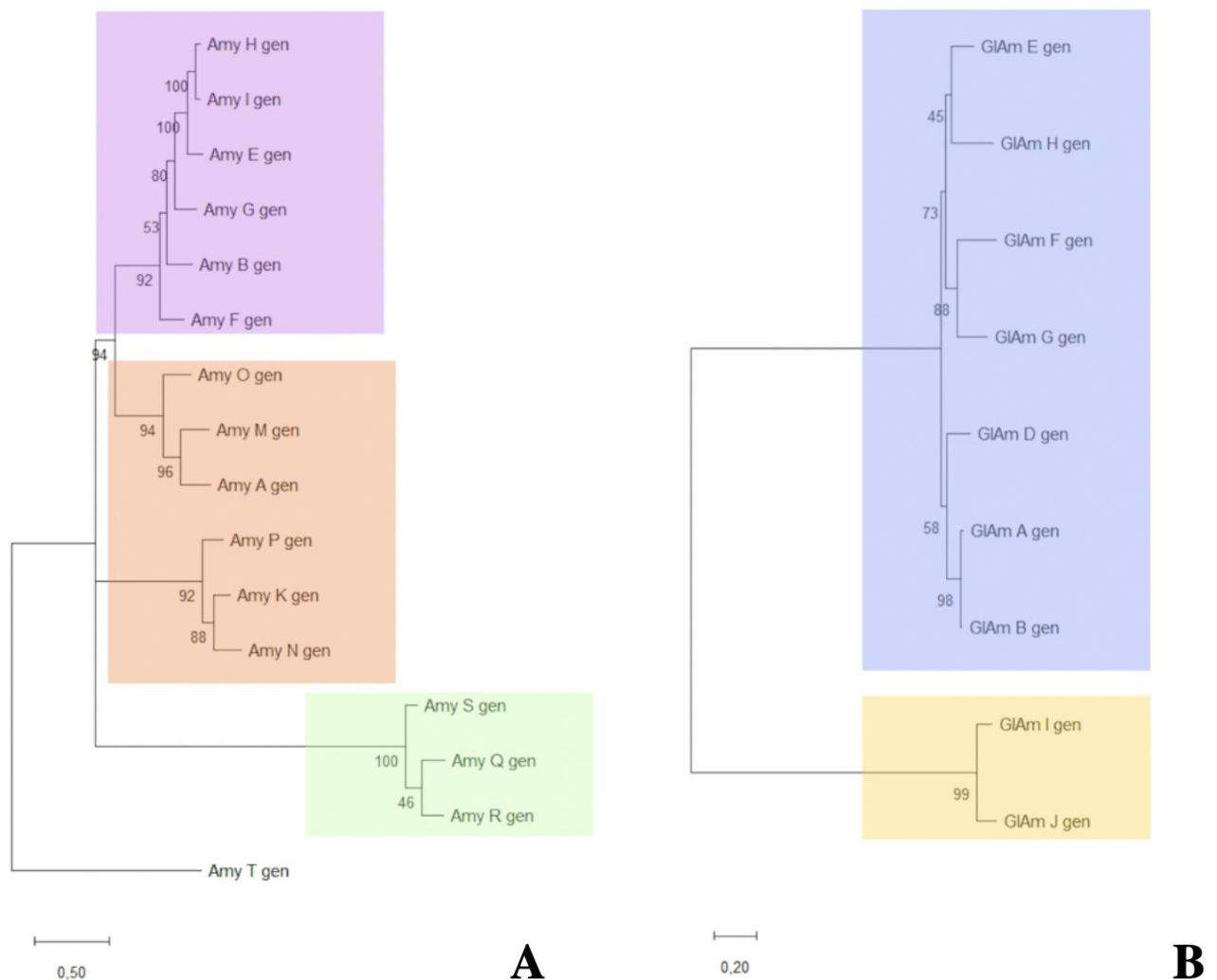
**Tabla 8:** Secuencias seleccionadas en la base de datos GeneBank del NCBI para  $\alpha$ -amilasas de *Aureobasidium*. Amilasa 1 (---), Amilasa 2 (---), Amilasa 3 (---) y secuencia descartada (**Amy T**).

Nombre	Accesion number (gen)	Descripción	Tamaño gen (pb)	PM proteína (Da)	Tamaño amplicón (pb)
<u><a href="#">Amy B</a></u>	NW_013566986.1AUE XF2481DRAFT_6529 3	Carbohydrate-binding module family 20 protein <i>A. subglaciale</i>	1769	61828	1059
<u><a href="#">Amy E</a></u>	NW_024470053.1M43 7DRAFT_36305	Amilasas de <i>A.melanogenum</i>	2232	66736	1261
<u><a href="#">Amy F</a></u>	NW_021941038.1 M438DRAFT_75141	Alpha- amylase <i>A.pullulans</i>	2209	67465	1006
<u><a href="#">Amy G</a></u>	NW_013581208.1 M436DRAFT_36803	Alpha- amylase <i>A. namibiae</i>	2190	67509	1208
<u><a href="#">Amy H</a></u>	HM590632.1	Alpha- amylase <i>A.pullulans</i>	2247	67711	1262
<u><a href="#">Amy I</a></u>	KU886204.1	Alpha- amylase <i>A.pullulans</i>	2245	67758	1260
<u><a href="#">Amy A</a></u>	NW_013581207.1 M436DRAFT_38983	Putative alpha- amylase <i>A.namibiae</i>	1670	53660	935
<u><a href="#">Amy K</a></u>	NW_013581207.1 M436DRAFT_78697	Alpha- amylase <i>A.namibiae</i>	1752	54513	955
<u><a href="#">AmyM</a></u>	NW_024470056.1 M437DRAFT_73240	Alpha- amylase <i>A. melanogenum</i>	1678	53945	943
<u><a href="#">Amy N</a></u>	NW_024470056.1 M437DRAFT_42314	Alpha- amylase <i>A. melanogenum</i>	1748	54553	951
<u><a href="#">Amy O</a></u>	NW_021941035.1 M438DRAFT_300942	Putative alpha- amylase <i>A.pullulas</i>	1640	50469	892
<u><a href="#">Amy P</a></u>	NW_021941026.1 M438DRAFT_316292	Alpha- amylase <i>A.pullulans</i>	2290	54363	949
<u><a href="#">Amy Q</a></u>	NW_013581203.1 M436DRAFT_44317	<i>A.namibiae</i> CBS 147.97 unplaced genomic scaffold	1806	59930	1806
<u><a href="#">Amy R</a></u>	NW_024470067.1 M437DRAFT_52066	<i>A.melanogenum</i> CBS 110374 unplaced genomic scaffold	1687	58767	1634
<u><a href="#">Amy S</a></u>	NW_021941048.1 M438DRAFT_305127	<i>A.pullulans</i> EXF-150 unplaced genomic scaffold	1912	58855	1660
<u><a href="#">Amy T</a></u>	NW_013581204.1 M436DRAFT_42741	<i>A. namibiae</i> CBS 147.97 unplaced genomic scaffold			

**Tabla 9:** Secuencias seleccionadas en la base de datos GeneBank del NCBI para glucoamilasas de *Aureobasidium*. Glucoamilasa 1 (---), Glucoamilasa 2 (---).

Nombre	Accesion number (gen)	Descripción	Tamaño gen (pb)	PM proteína (Da)	Tamaño amplicón (pb)
<u><a href="#">GIaM A</a></u>	KX578909.1	Glucoamylase <i>A.melanogenum</i>	2125	65588	2067
<u><a href="#">GIaM B</a></u>	HM246719.1	Glucoamylase <i>A.pullulans</i>	2152	66730	2124
<u><a href="#">GIaM D</a></u>	NW_024470053 M437DRAFT_36981	Glucoamylase <i>A.melanogenum</i>	2113	65586	2055

<a href="#">GIAm E</a>	NW_013581208.1 M436DRAFT_68960	<i>A. namibiae</i> CBS 147.97 unplaced genomic scaffold	2102	64939	2044
<a href="#">GIAm F</a>	NW_021941038.1 M438DRAFT_407942	Glucoamylase <i>A.pullulans</i>	2486	65178	2046
<a href="#">GIAm G</a>	KL584758.1 AUEXF2481DRAFT_65044	<i>A.subglaciale</i> EXF-2481 carbohydrate-binding module	2052	65323	1994
<a href="#">GIAm H</a>	CP061982.1 2297530:2299669	Chromosome	2140		2072
<a href="#">GIAm I</a>	CP061917.1:2333781-2335905	<i>A. melanogenum</i> strain P16 chromosome 1	2125		1926
<a href="#">GIAm J</a>	CP061980.1	<i>A.melanogenum</i> strain TN3-1 chromosome 1	2118		1919



**Figura 19:** Árboles filogenéticos construidos con el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) de secuencias de amilasas de *Aureobasidium* obtenidas de la base de datos GeneBank del NCBI. **A:** Secuencias de  $\alpha$ -amilasas. **B:** Secuencias de glucoamilasas

#### 4.9.2 Diseño de cebadores degenerados para la amplificación de $\alpha$ -amilasas y glucoamilasas en las cepas de *A. pullulans* nativas (CH18-5G y BTP18-8)

A partir de las secuencias encontradas en el punto anterior (ver 4.9.1), se diseñaron primers dirigidos a zonas parcialmente conservadas para los distintos grupos de enzimas. Esto se realizó con el objetivo de amplificar fragmentos de estas enzimas en las cepas CH18-5G y BTP18-8 y realizar un análisis e identificación de secuencias.

Se diseñaron parejas de cebadores específicos para cada grupo de  $\alpha$ -amilasas y glucoamilasas reportadas en *Aureobasidium*. Se seleccionaron las regiones conservadas de las secuencias alineadas por Vector NTI y se exportaron a Prime3Plus. El criterio utilizado para la selección de las regiones conservadas fue que abarcaran la mayor parte de secuencia posible, es decir, seleccionar una región cercana al comienzo de secuencia y otra lo más próxima posible al final, para lograr obtener un fragmento de la secuencia del mayor tamaño posible. En cuanto al diseño de primers, se tuvieron en cuenta ciertas características como:

- Tamaño de entre 20 y 25 nucleótidos
- T<sub>m</sub> (melting temperature) entre 55- 75°C y con  $\Delta T_m < 5^\circ$ .
- Contenido G+C aproximadamente 45 – 60 % .
- Distribución de bases homogénea: evitar poliA/T y poliG/C
- G/C (unión más fuerte) en los extremos 3': favorece acción de la ADN polimerasa, aumenta eficiencia de reacción pero no más de 2 consecutivas, ya que sino disminuye especificidad. T/A unión más débil, separación *primer* –molde en esa zona, disminuye eficiencia.
- Minimizar secuencias que promuevan la formación de horquillas con  $\Delta G$  negativo y homodímeros y heterodímeros que comprometieran el extremo 3' de las secuencias, procurando el mayor  $\Delta G$  posible.

Dado que fue muy difícil encontrar regiones 100% conservadas que cumplieran con estas condiciones, se diseñaron cebadores dirigidos a zonas parcialmente conservadas en todos los casos (**Tabla 2**), introduciendo degeneraciones en aquellas posiciones en las que no existe consenso, de manera de contemplar todas las bases presentes en las secuencias reportadas previamente. En el **Anexo (5, 6, 7, 8 y 9)** se pueden encontrar los alineamientos de los distintos grupos de secuencias.

El tamaño del amplicón esperado por cada pareja de cebadores para las secuencias reportadas se muestra en las **Tablas 8 y 9**. La longitud del amplicón en las cepas de trabajo (CH18-5G y BTP18-8) puede diferir de éstas en el caso de que haya sufrido inserciones o deleciones. En particular, dado que estos genes contienen intrones, la variabilidad en el largo de éstos podría generar diferencias en el largo de los amplicones.

#### 4.9.3 Optimización de extracciones de ADN genómico con kits comerciales

La caracterización molecular del sistema amilolítico requiere la extracción de ADN genómico del microorganismo de interés. Para ello se recurrió a diversos kits comerciales. Sin embargo, las condiciones indicadas en las instrucciones de los fabricantes no fueron

adecuadas para obtener un ADN de buena calidad y con buen rendimiento a partir de las levaduras CH18-5G y BTP18-8, por lo que fue necesario optimizar los procedimientos.

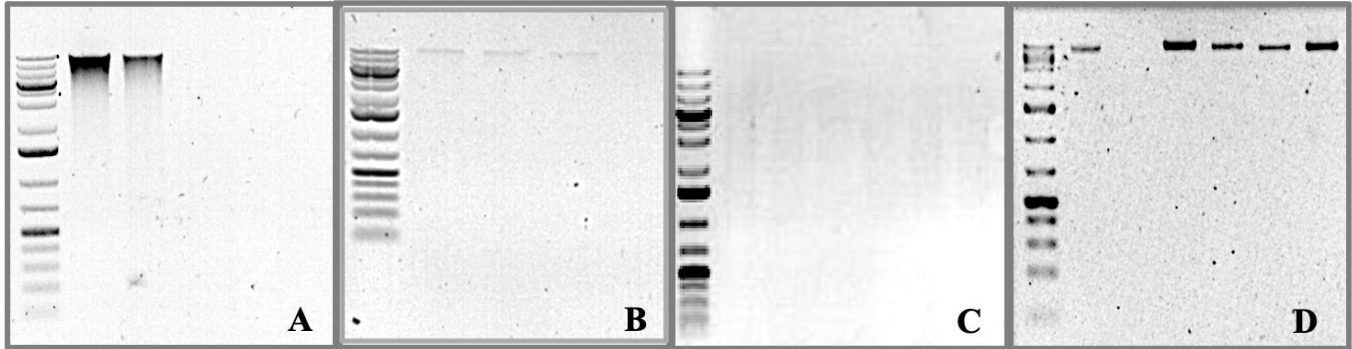
Se optimizaron varios de los pasos en cada uno de los kits, mediante múltiples extracciones, para alcanzar el resultado deseado. Algunos de los problemas experimentados fueron; producto de extracción nulo, ADN genómico en cantidad adecuada pero degradado, ADN genómico íntegro pero en escasa cantidad y baja calidad.

En el caso de los kits de agitación mecánica para la ruptura de la pared celular, se observó que es crucial el tiempo y velocidad a la cual se colocan las muestras en el vortex y también la posición de las mismas. Al utilizar agitación mediante vortex convencional, no se obtuvieron buenos resultados. Las mejores extracciones se lograron con el ZYMO Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit a la velocidad máxima de agitación por 25 minutos, utilizando un adaptador QIAGEN (cat. no. 13000-V1-24) en un Vortex- Genie 2, 230 V, lo que permitió colocar los tubos con las muestras de manera horizontal. En este caso, no es relevante el tiempo de cultivo, funcionó bien tanto para las 24 hs post cultivo como para las 48 hs. Al realizar la extracción utilizando este kit, se obtuvo ADN en gran concentración pero que mostraba cierta degradación (**Figura 20 A**). Al intentar cuidar el proceso de agitación (reduciendo la velocidad de agitación en vortex), se obtuvo producto genómico de mayor calidad, pero en muy baja concentración (**Figura 20 B**). Se realizó también la extracción utilizando QIAGEN DNeasy UltraClean Microbial Kit, pero pese a los múltiples intentos, nunca se obtuvo producto final (**Figura 20 C**).

Con el objetivo de evitar la degradación del ADN, se analizó también la extracción del ADN utilizando el kit enzimático ZYMO YeaStar Genomic DNA kit. Se realizaron diversas extracciones tratando de optimizar tiempos de incubación con la enzima y soluciones de elución, en las cuales no se obtuvo producto alguno. En este caso, se determinó que el tiempo de cultivo tenía una gran relevancia para la degradación enzimática de la pared y por lo tanto para la extracción de ADN. Se vió que trabajando a las 24hs de cultivo, que es donde el microorganismo se encuentra en fase exponencial e incubando con la enzima por al menos 2hs, se obtiene el ADN genómico de la cepa de interés (**Figura 20 D**). Además, cuando se obtuvo ADN, las eluciones se realizaron con Agua MQ y no con buffer TE, porque anteriormente a optimizar las condiciones, se había visto que el eluyente no tenía efecto alguno.

Luego de estas etapas de optimización, se lograron productos tanto con los kits de lisis mecánica como enzimática, pero los primeros, al devolver un producto poco íntegro, solo fueron utilizados para extraer ADN a utilizar en PCR, ya que al ser una técnica muy sensible y debido a que se busca amplificar un fragmento relativamente corto, no influye en demasía la ruptura de las hebras.

El kit enzimático tiene la particularidad de entregar un mejor producto final desde el punto de vista cualitativo, lo que resulta de gran utilidad para aplicaciones posteriores como es el caso de la secuenciación, donde la integridad del producto genómico tiene gran influencia en el resultado final, es por esto que fue necesario optimizar los distintos kits hasta obtener el resultado deseado.



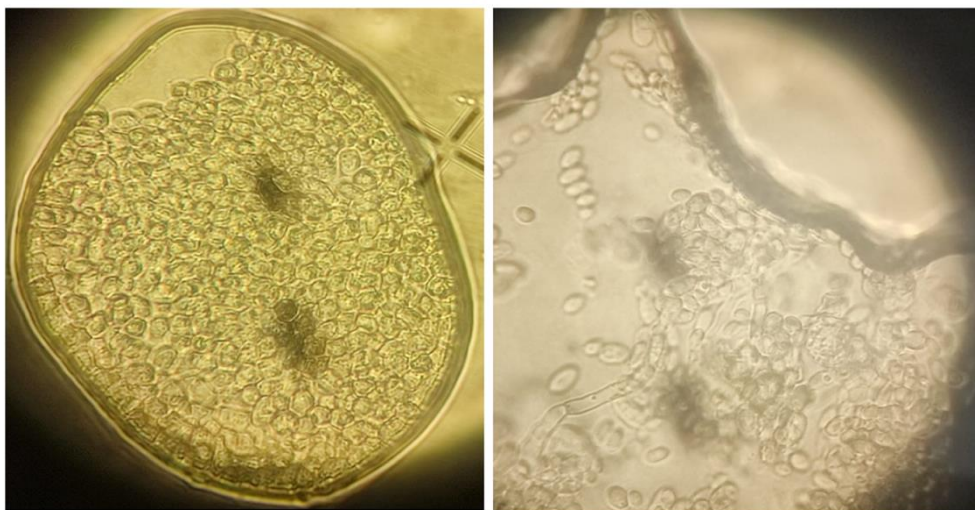
**Figura 20:** Extracciones de ADN genómico utilizando kits comerciales.

**A:** Extracción genómica con ZYMO Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit a la velocidad máxima de agitación por 25 minutos. **B:** Extracción genómica con ZYMO Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit a la velocidad media de agitación por 25 minutos. **C:** Extracción genómica con QIAGEN DNeasy UltraClean Microbial Kit a la velocidad máxima de agitación por 25 minutos. **D:** Extracción genómica con ZYMO YeaStar Genomic DNA kit.

#### 4.9.4 Evaluación de lisis enzimática de las células a distintos tiempos.

Con el objetivo de evaluar la influencia del tiempo de cultivo en la lisis enzimática, durante la construcción de la curva de crecimiento de la cepa CH18-5G, también se extrajeron muestras a determinados tiempos (**ver 3.2.7.4**) para evaluar la lisis enzimática de la pared celular aplicando los primeros pasos del kit ZYMO YeaStar Genomic DNA kit (**detallado en 3.2.5**).

En las imágenes tomadas con el microscopio de contraste de fases (**Figura 21**), se ven las células de *A. Pullulans* sin lisar y una vez sometidas a la lisis enzimática se pudo ver claramente como se perdía su estructura debido a la ruptura de la membrana plasmática. Se vió lo mismo para todos los tiempos en los que se realizó el ensayo.



**Figura 21:** Vista de células de *A.pullulans* (cepa CH18-5G) en microscopio de contraste de fases.



#### 4.9.5 Determinación de la calidad y cantidad de ADN genómico (Qubit y Nanodrop)

Para evaluar la calidad y concentración de las muestras de ADN extraídas, se utilizó un NanoDrop espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific) y el fluorímetro Qubit (Invitrogen).

Las muestras de ADN genómico obtenidas en los diversos procesos de extracción con el ZYMO YeaStar Genomic DNA kit, fueron concentradas utilizando un concentrador SpeedVac (Thermo Scientific), lo que permitió llegar a un valor de concentración aceptable para poder secuenciar. Es recomendable partir de al menos 500 ng de ADN genómico, por lo que se usaron 7,5  $\mu$ L de muestra, de forma que teniendo en cuenta los valores de concentración mostrados en la **Tabla 10**, se partió de 587,25 ng de ADN de CH18-5G y de 547,5 ng de ADN de BTP18-8.

**Tabla 10:** Medidas de concentración de muestras genómicas de las cepas CH18-5G y BTP18-8 por Fluorímetro Qubit (Invitrogen).

Muestra genómica	$\mu$ g/mL
CH18-5G	78,3
BTP18-8	73.0

Sin embargo, la calidad del ADN genómico de trabajo estaba un tanto distante de los valores de referencia para una óptima secuenciación **Tabla 11**. El índice de pureza  $\lambda_{260} / \lambda_{230}$  arroja un valor por debajo del rango aceptado como “puro” (entre 1,8 y 2,2), lo que indica que probablemente la muestra estaba contaminada con sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos, lo cual puede llegar a interferir en un ensayo posterior de secuenciación (Thermo Scientific, 2010).

De todas maneras, estos fueron los valores más cercanos a los óptimos. Teniendo en cuenta que se realizaron varios procedimientos de extracción con kits que variaban en la pureza del producto final y no se consiguió una pureza mayor, se decidió continuar igual con el ensayo de secuenciación (pese a no estar en las condiciones ideales). Como se puede ver, los valores de concentración ( $\mu$ g/mL) de ADN genómico fueron superiores al medir con NanoDrop, lo cual es esperable que suceda, ya que el Qubit utiliza fluorocromos específicos y permite una cuantificación de cadena simple o doble de DNA, lo que produce una medida más precisa. Las muestras a ser medidas en Qubit requieren de una preparación previa y la concentración detectada puede llegar a ser hasta 10 veces menor que la medida en el Nanodrop (Servei de genómica de la UAB, 2016) .

**Tabla 11:** Cuantificación de muestras genómicas de las cepas CH18-5G y BTP18-8 y evaluación de calidad por NanoDrop espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific).

Muestra genómica	[ $\mu\text{g/mL}$ ]	$\lambda_{260} / \lambda_{280}$	$\lambda_{260} / \lambda_{230}$
CH18-5G	137.93	1.936	0.458
BTP18-8	181.52	1.958	0.358

#### 4.9.6 Secuenciación de la cepa CH18-5G en MiniON Nanopore

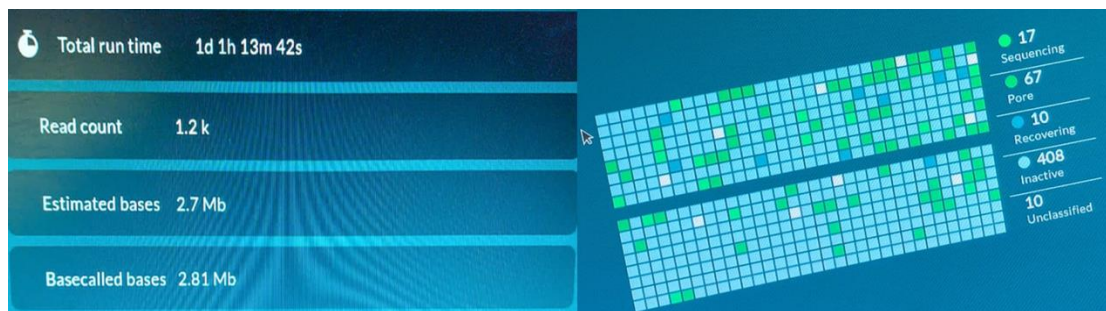
Para lograr este objetivo, a partir de las muestras de ADN genómico de la cepa CH18-5G se preparó una biblioteca utilizando el Rapid barcoding kit de Nanopore (**detallado en 3.2.10**). El mismo consiste en una transposasa que escinde simultáneamente las moléculas molde y adhiere etiquetas a los extremos escindidos. Luego, se agregan adaptadores de secuenciación rápida a los extremos etiquetados (Oxford NANOPORE Technologies, 2022).

Luego de realizada la secuenciación por Nanopore (con una corrida de 1 día/ 1 hora/ 13 minutos/ 42 segundos), se logró una lectura de 1.2 Kb. Las bases estimadas eran de 2.7 Mb (**Figura 22**), por lo cual no se puede seguir trabajando con este resultado, dado que es muy poca la información.

Se piensa que puede ser que el método para preparar las librerías (Rapid kit) no haya sido el más efectivo, dado que indagando profundamente en bibliografía se logró ver que a veces ocasionaba problemas (Barbitoff et al., 2021). A su vez, el ADN genómico de partida carecía de la pureza deseada para este tipo de ensayos, algunos de sus valores detectados por Nanodrop no estaban dentro de los rangos ideales (**Tabla 11**), pero fueron los mejores que se pudieron alcanzar.

En primera instancia se probó trabajar con el Rapid Kit debido a su fácil y rápido manejo, sumado a la evidencia de su utilización para el secuenciado de levaduras en otros trabajos reportados, pero se dispone de otro kit de preparación de librerías de ADN (Ligation Kit de Nanopore). Este último consiste en un protocolo más extenso y complejo pero que en algunas ocasiones puede brindar mejores resultados (Oxford NANOPORE Technologies, 2022).

Dada la poca fortuna con los resultados obtenidos en la secuenciación, se plantea a futuro continuar optimizando los métodos de extracción para obtener ADN genómico de mejor calidad, y realizar el secuenciado nuevamente utilizando el Ligation Kit, acompañado de una celda con mayor cantidad de poros activos que mejore las probabilidades de éxito.



**Figura 22:** Resultado de secuenciación del ADN genómico de la cepa CH18-5G por MiniON Nanopore con preparación de librerías utilizando el Rapid Kit (Oxford NANOPORE Technologies, 2022).

#### 4.9.7 Detección de genes de $\alpha$ -amilasas y glucoamilasas en cepas de *Aureobasidium Pullulans*

Utilizando los primers diseñados (**Tabla 2**) se realizó la amplificación de los genes de amilasas presentes en las cepas CH18-5G y BTP18-8, utilizando las condiciones descritas en **3.2.12**. En los primeros ensayos no se logró amplificación en las muestras, por lo que se realizaron diversos controles para establecer las causas. Finalmente se pudo comprobar que el termociclador utilizado no estaba funcionando de forma correcta, por lo que se cambió de equipo, obteniendo finalmente productos de amplificación en las muestras. Una vez obtenidos los fragmentos amplificados, se visualizaron las muestras por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (**detallado en 3.2.6**). En base al marcador de peso molecular (GeneRuler 1Kb DNA Ladder), se puede conocer el tamaño de los productos obtenidos y comparar con los esperados.

En la **Figura 23 A**, se reflejan los resultados de amplificación de los genes ITS, utilizados como control (**3.2.12**) para la cepa CH18-5G y *S.cerevisiae*. En los primeros tres carriles, se puede ver el producto de amplificación de este gen en la cepa de trabajo, con un tamaño de aproximadamente 650 pb, tal como era de esperarse (Alrubayae et al., 2016). En cuanto al carril de la cepa de referencia *S.cerevisiae*, se puede observar amplificación con un tamaño de banda mayor (850 pb), lo que también sigue en línea con lo esperado (Segura et al., 2010).

En la **Figura 23 B**, se puede ver que en la cepa CH18-5G hubo amplificación con los cinco pares de primers diseñados y que los tamaños de banda se corresponden con los productos esperados.

Para el gen Amilasa 1 se ve una única banda de aproximadamente 1250 bp, lo cual resulta coherente, ya que se esperaban amplicones de entre 1000 y 1260 pb (**detallado en Tabla 8**). Hay cuatro secuencias (Amy E, Amy G, Amy H y Amy I) de las seleccionadas para diseñar este par de primers que darían amplicones de entre 1200-1260 pb, por lo que la banda obtenida podría corresponder a un amplicón con homología a estas secuencias.

Para el gen Amilasa 2, se ven 3 bandas, dos de ellas se encuentran casi superpuestas con un tamaño aproximado de 1000 pb (una de ellas se encuentra apenas por encima de ese tamaño) y la otra banda que se ve, es considerablemente más tenue y tiene un tamaño de 700 pb. En este caso, se esperaba obtener un amplicón entre 890 y 955 pb (**Tabla 8**). Es difícil establecer cuál de las bandas cercanas a 1000 pb podría corresponder a un amplicón con homología a las secuencias del grupo 2. Es posible que haya más de un gen que corresponde a amilasas de este grupo en el genoma de la cepa CH18-5G, aunque también podría deberse a la presencia de amplificación inespecífica, especialmente la banda de 700 pb que se ve más tenue.

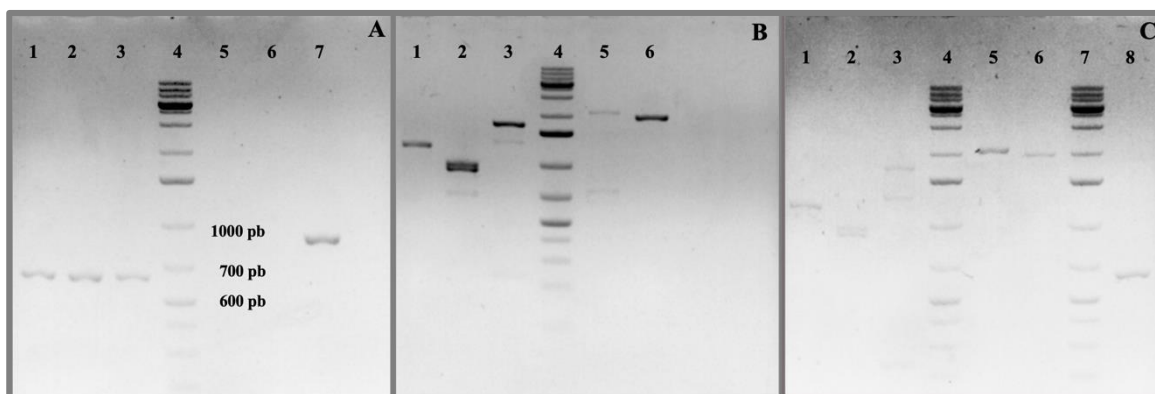
Para el gen amilasa 3, se ven dos bandas, una de ellas de aproximadamente 1800 pb y la otra (que es también más tenue) de aproximadamente 1400 pb. Para este gen, se esperaban obtener amplicones de entre 1600 y 1800 pb (**Tabla 8**), lo cual podría relacionarse con la banda más concentrada y de mayor tamaño, mientras que la banda de 1400 pb podría deberse a amplificación inespecífica. Dentro de los genes utilizados para el diseño de este par de primers, Amy Q es la secuencia que daría un amplicón más cercano a los 1800 pb, por lo que la banda obtenida podría corresponder a alguna enzima homóloga a ésta.

Para el gen glucoamilasa 1, se amplificaron dos bandas, una que tiene un tamaño apenas por encima de los 2000 pb y otra de 700 pb, en este caso, ambas bandas tienen intensidad similar. Según las secuencias utilizadas para el diseño de este par de cebadores, se esperaban amplicones de entre 2000 y 2100 pb (**Tabla 9**), de modo que la banda de mayor tamaño se podría corresponder con la amplificación de una secuencia homóloga a éstas.

Por último, para el gen glucoamilasa 2, se ve una sola banda, bastante concentrada y apenas por debajo de la banda de 2000 pb. El tamaño esperado en este caso era de aproximadamente 1900 pb (**Tabla 9**), lo que se condice con lo visto en el gel.

Los resultados de la amplificación con el ADN de la cepa BTP18-8 (**Figura 23 C**), reflejan algo similar a lo visto para la cepa CH18-5G. Se obtuvo producto de amplificación con los cinco pares de primers previamente diseñados.

Se probó subir la temperatura de *annealing* a 55,5°C y 56°C para los pares de primers Amilasa 2, Amilasa 3 y Glucoamilasa 1, con las dos cepas en los primeros dos y solo con CH18-5G en el caso del último. Esto se realizó con la finalidad de poder reducir los productos de amplificación inespecíficos. Desafortunadamente, los geles obtenidos mostraron el mismo resultado que cuando se realizó la PCR con una temperatura de *annealing* de 55°C.



**Figura 23:** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. **A** 1-3: ITS (CH18-5G), 4: Marcador PM (Gene Ruler 1Kb), 7: ITS (*S.cerevisiae*). **B** Ceba CH18-5G; 1: Amil 1, 2: Amil 2, 3: Amil 3, 4: Marcador PM (Gene Ruler 1Kb), 5: Glucoamil 1, 6: Glucoamil 2. **C** Ceba BTP18-8; 1: Amil 1, 2: Amil 2, 3: Amil 3, 4: Marcador PM (Gene Ruler 1Kb), 5: Glucoamil 1, 6: Glucoamil 2, 7: Marcador PM (Gene Ruler 1Kb), 8: C+ (ITS).

Nota: en el último carril de la **Figura 23 C**, se ve el control positivo para la cepa BTP18-8, el cual muestra un producto de amplificación de aproximadamente 650 pb tal como se esperaba (Alrubayae et al., 2016).

#### 4.9.8 Análisis e identificación de secuencias

Una vez que se revelaron los resultados de PCR, se enviaron a secuenciar los amplicones obtenidos a Macrogen, Korea. Dado que no fue posible optimizar las condiciones de reacción para obtener un único fragmento de banda en los productos de Amilasa 2, Amilasa 3 y Glucoamilasa 2, se enviaron a secuenciar únicamente los amplicones correspondientes a Amilasa 1 y Glucoamilasa 1 de cada una de las cepas (CH18-5G y BTP18-8).

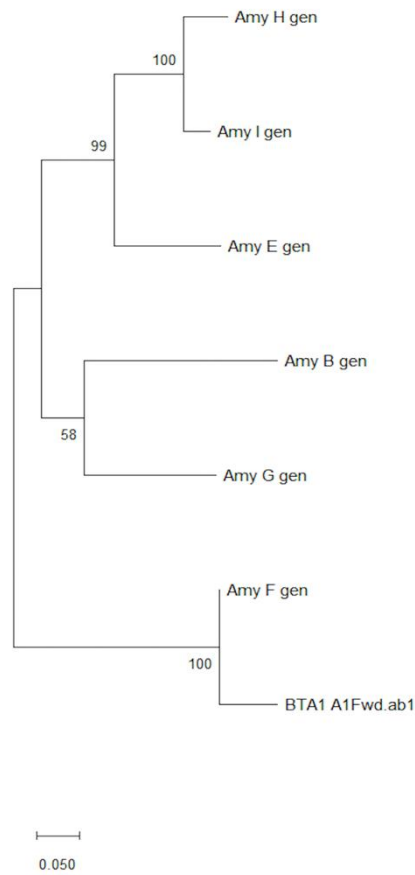
Al recibir las secuencias, se analizaron y se vió que tres de ellas (Amilasa 1 de CH18-5H (CHA1), Glucoamilasa 1 de CH18-5G (CHG1) y Glucoamilasa 1 de BTP18-8 (BTG1)) no fueron de muy buena calidad, lo que podría deberse a que exista más de una secuencia dentro de un mismo tamaño de amplicón. Solo se pudo seguir trabajando con la secuencia Amilasa 1 de BTP18-8 (BTA1).

Se realizó un análisis informático empleando el software Vector NTI, con el cual se realizaron alineamientos con la secuencia para Amilasa 1 de BTP18-8 (BTA1) y las secuencias seleccionadas para diseñar los primers iniciales (que permitieron amplificar los productos deseados) (**parcialmente mostrado en Figura 24**). Lo anterior se llevó a cabo con el fin de poder comparar la similitud entre la enzima amplificada y las reportadas. Además, con el software MEGA se realizó un árbol filogenético entre las secuencias del grupo Amilasa 1 y la secuencia obtenida (BTA1) (**Figura 25**) para poder evaluar la relación de similitud con el grupo. Con estos dos resultados, se pudo ver que la enzima amplificada difiere de las enzimas previamente reportadas, ya que no se encuentran zonas con porcentajes elevados de conservación y se observa una distancia clara de las demás secuencias en el árbol filogenético.

A partir de la secuencia Amilasa 1 de BTP18-8 (BTA1), se seleccionaron las partes de mejor calidad y se diseñó un primer (**Figura 24**) teniendo en cuenta las características detalladas en (4.9.2) para poder continuar con el secuenciado y a futuro lograr obtener la secuencia completa de este gen.

	cov	pid	721	.	.	:	.	.	.	.	8
800											
1	Amil	100.0%	100.0%	-----							
2	Amil	0.0%	0.0%	-----							
3	Amy	100.0%	1.3%	ACCGTATCTCTGCCAGATCTTAGAACCGAAGATTCGAACGTCAGATCTATCTGGAACAGCTGGATCACAAAACCTGTAGC							
4	Amy	100.0%	1.0%	ACAGTTCCTCCGCGACTTGAGAACCGAAGACTCCAATGACTCTCTATGTGGAATACCTGGATAAAAACAGCTTGATC							
5	Amy	100.0%	1.2%	ATTGTGCTCTCCAGATTTGAGAACAGAAGACGATGCTGTACTATCCATGTGGAACCTGGATCGCACAGCTTGTTGCG							
6	Amy	100.0%	1.1%	ACCGTGTCTCTGCCAGATTTGAGGACCGAAGATTCGAACGTCAGTGTCTATCTGGAATTCATGGATAACACAGCTCGTGT							
7	Amy	100.0%	1.0%	ACAGTATCTCTGCCAGACTTGAGAACCGAAGACTCCAACGTAAGTCTCCATGTGGAATACCTGGATCAAAACAGCTTGTT							
8	Amy	100.0%	1.0%	ACAGTATCTCTGCCAGACTTGAGAACCGAAGACTCCAACGTAAGTCTCCATGTGGAATACCTGGATCAAAACAGCTCGTGT							
9	BTA1	0.0%	0.0%	ATTGTGCTCTCCAGATTTGAGAACAGAAGACGATGCTGTACTATCCATGTGGAACCTGGATCACACAGCTTGTTGCG							
10	Seq	0.0%	0.0%	-----							
	cov	pid	801	.	.	:	.	.	.	.	
880											
1	Amil	100.0%	100.0%	-----							
2	Amil	0.0%	0.0%	-----							
3	Amy	100.0%	1.3%	AAACTACACCA-----TTGACGGTCTTCGTGTCGA							
4	Amy	100.0%	1.0%	AAACTACACCAGTACATTTATGAGATGT-CTGAAGCATGGACTTCGCTAACACTCTCCAGTCGATGGTCTGAGAATCGA							
5	Amy	100.0%	1.2%	AAATTACACCA-----TTGATGGTCTCCGATCGA							
6	Amy	100.0%	1.1%	AAACTACACTAGTGCCTCACAGATA---CCGAAAAGTAGGCCATTGCTAACAGCTTCCAGTCGATGGTCTCGAATTGA							
7	Amy	100.0%	1.0%	CAACTACACCAGTAAGTCGACGAGTTTC-TTGAAGCAAAGACTTCGCTAACGCTTCTAGTCGATGGTCTGAGAATCGA							
8	Amy	100.0%	1.0%	GAATTACACCAGTAAGTCGATGAAATGT-CTGAAGCAAAGACTTCGCTAACGCTTCTAGTCGATGGTCTGCGAATCGA							
9	BTA1	0.0%	0.0%	AGATTACACCAGTGCCTAGTCTTTGACACTTTGGAATTGTTCCCTGCTCACCTTTCTAGTTGATGGTCTCCGATCGA							
10	Seq	0.0%	0.0%	-----							
	cov	pid	881	.	9	.	.	.	.	:	.
960											
1	Amil	100.0%	100.0%	-----							
2	Amil	0.0%	0.0%	-----							
3	Amy	100.0%	1.3%	CAGTGCTAAATCGGTCGAGAAGAGCTTCTACCCACCTTTC-GAGCAAGCAGCCGGTGTATATACAG-TTGGAGAGGTCTT							
4	Amy	100.0%	1.0%	CTCTGCCAAATCCGTCGACAAGCCTTCTATCAACCATTTC-CAACAAGCCGCCGGTGTCTATGCGAG-TCGGTGAAGTCTA							
5	Amy	100.0%	1.2%	TAGTGCCAAATCAGTCAACAAGCCTTCTATCCGCCCTTC-GAACAAGCAGCCGGTGTATACATAG-CCGGCGAAGTGT							
6	Amy	100.0%	1.1%	CTCTGCCAAGTCTGTGAGAAGTCTTCTATCCGCGTTC-GAACAGGCTGCCGGAGTATACCAGG-TTGGGGAATCTT							
7	Amy	100.0%	1.0%	CTCTGCCAAGTCCGTTGACAAGCATTCTATCAACCATTTC-CAACAAGCCGCCAGTGTCTATGCGAG-TTGGTGAAGTCTA							
8	Amy	100.0%	1.0%	TTCTGCCAAATCCGTTGACAAGCATTCTATCAACCATTTC-GAACAAGCCGCCAGTGTCTATGCGAG-TTGGTGAAGTCTA							
9	BTA1	0.0%	0.0%	TAGTGCCAAATCAGTCAACAAGCCTTCTATCCGCCCTTCGGAACAAGCAGCCGGTGTATACATAGCTTGGCGAAGTGT							
10	Seq	0.0%	0.0%	-----							
	cov	pid	961	.	.	.	0	.	.	.	.
1040											
1	Amil	100.0%	100.0%	-----							
2	Amil	0.0%	0.0%	-----							
3	Amy	100.0%	1.3%	TGAAGGCGACCCAAGCAAATCT--GCGACTACCAG-AACTACCTGG-ATGGTGCCT-GAACTCCCATCATAC----							
4	Amy	100.0%	1.0%	CGACGGCGACCCGAACTACTTCT--GCGATTATCAG-AACTATCTAG-ACGGCATGCT-CAACTACCCATCGTAT-GA-C							
5	Amy	100.0%	1.2%	TGAAGGCAACCCAACCACCTTTT--GCGACTACCAG-AATTATATGG-ATGGCATGCT-GAACTCCCCTCTTAT----							
6	Amy	100.0%	1.1%	CGATGGTGACCCGACGTAAGTCT--GTGATTACCAG-AACTACATGG-ACGGCATGCT-CAACTCCCATCGTATGTG-C							
7	Amy	100.0%	1.0%	CGATGGCGACCCGAACTACTTCT--GCGACTACCAG-AACTACCTGG-ACGGCATGCT-CAACTACCAACGTATGAAAC							
8	Amy	100.0%	1.0%	CGATGGCGACCCGAACTACTTCT--GCGACTACCAG-AACTACCTGG-ACGGCATGCT-CAACTACCAACGTATGAAAC							
9	BTA1	0.0%	0.0%	TGAAGGCAACCCAACCACCTTTTGGGGATTACCAGAAATTATGGAACGGCA <b>TGCTGGAACCTCCCTTTTCG</b> TAAAGC							
10	Seq	0.0%	0.0%	----- <b>TGCTGGAACCTCCCTTTTCG</b> -----							

**Figura 24:** Alineamiento de las secuencias seleccionadas para el diseño de primers Amilasa 1 y la secuencia obtenida para el amplicón Amilasa 1 de BTP18-8 (BTA1) visualizado con el software de libre acceso Mview (A multiple alignment viewer). Se muestra parte del alineamiento, incluyendo la zona de unión del cebador diseñado (marcado en amarillo) a partir de la secuencia del amplicón BTA1.



**Figura 25:** Árbol filogenético realizado con el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) de las secuencias seleccionadas para el diseño de los primers Amilasa 1 y la secuencia obtenida del amplicón Amilasa 1 de BTP18-8 (BTA1). Las secuencias se recortaron de forma que la zona comparada corresponde a los primeros 571 pb de la secuencia BTA1.



## 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo, se realizaron medidas actividad amilasa en extractos crudos de ambas cepas de trabajo (CH18-5G y BTP18-8), arrojando resultados variables. Es necesaria una etapa de optimización de la producción de las enzimas para que el desarrollo de un preparado de aplicación a la producción de cerveza se pueda poner en consideración. Lo anterior no pudo ser llevado a cabo en este trabajo debido a las restricciones ocasionadas producto de la pandemia. Por otro lado, los extractos enzimáticos crudos analizados mostraron pocas bandas, lo que facilitaría la purificación de las enzimas encargadas de la degradación de almidón. En el futuro, se podrían optimizar las condiciones de cultivo (temperatura de incubación, tiempos, % de componentes del medio de cultivo, etc.) para lograr un extracto con mayor actividad. Sumado a esto, sería útil optimizar los pasos de concentración, ya sea por liofilización o precipitación con sulfato de amonio, y establecer un protocolo para la purificación de las enzimas. La obtención de las enzimas purificadas y su posterior caracterización en mayor profundidad permitiría evaluar su potencial para la industria cervecera y determinaría la posibilidad de desarrollar un preparado comercial. Estos datos también significarían un gran aporte al conocimiento de las cepas de *Aureobasidium pullulans* nativas y sus enzimas.

Utilizando métodos moleculares se pudo determinar que las cepas estudiadas presentan una batería de enzimas  $\alpha$ -amilasas y glucoamilasas responsables de su capacidad de degradación de almidón. Al menos una de ellas muestra diferencias en su secuencia con las enzimas previamente reportadas para esta especie. Estos resultados, son un punta pie para continuar con la secuenciación de los genes de las  $\alpha$ -amilasas y glucoamilasas amplificadas y así poder tener un mayor conocimiento sobre la batería de enzimas amilolíticas de las cepas de trabajo. La secuenciación de estos genes de amilasas, serviría para futuros estudios de expresión de los genes o caracterización de las enzimas. Además, sería de utilidad para optimizar las condiciones de producción de las mismas por las levaduras seleccionadas. Todo esto en conjunto, puede aportar a mejorar la aplicabilidad de las cepas en el futuro.

Los resultados obtenidos en este proyecto aportan datos que sugieren que *Aureobasidium pullulans* de origen nativo es un microorganismo con potencial para la producción de amilasas, con miras a su aplicación en la industria cervecera.



## 6. REFERENCIAS

- Almaguer, C., Schönberger, C., Gastl, M., Arendt, E. K., & Becker, T. (2014). Humulus lupulus - a story that begs to be told. A review. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(4), 289–314. <https://doi.org/10.1002/jib.160>
- Alrubayae, I., Almusa, A., Jafar, F. N., Alrubayae, I. M. N., Aseel, ;, Almusa, A. A., Furdos, ;, & Jafar, N. (2016). *Molecular identification of Aureobasidium pullulanus isolated from pigeon dropping in Basra Fungal pathogenicity View project Control of Drug releasing View project Molecular identification of Aureobasidium pullulanus isolated from pigeon dropping in Basra*. 6(20).
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 25, Issue 17). Oxford University Press. <http://nar.oxfordjournals.org/>
- Arana, I., Orruño, M., & Barcina, I. (2010). 2. Enumeración De Microorganismos. *Como Resolver Aspectos Practicos de Microbiologia [2012/05] [Cas]*, 7. Área Enología y Biotecnología de Fermentaciones. (2020). *Detección de actividad amilasa*.
- Arnaiz, C. (2018). En Procesos Biológicos. *Technologia Del Agua · October 2000, October 2000*.
- Bamforth, C. (2008). *Tap into the Art and Science of Brewing*. Oxford University Press.
- Barbitoff, Y. A., Matveenko, A. G., Matiiv, A. B., Maksiutenko, E. M., Moskalenko, S. E., Drozdova, P. B., Polev, D. E., Beliavskaia, A. Y., Danilov, L. G., Predeus, A. V., & Zhouravleva, G. A. (2021). Chromosome-level genome assembly and structural variant analysis of two laboratory yeast strains from the Peterhof Genetic Collection lineage. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 11(4). <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab029>
- Basso, R. F., Alcarde, A. R., & Portugal, C. B. (2016). Could non-Saccharomyces yeasts contribute on innovative brewing fermentations? In *Food Research International* (Vol. 86, pp. 112–120). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.002>
- Bernfeld, P. (1955). *Amylases  $\alpha$  and  $\beta$ , Methods in Enzimology* (1st ed.). Academic Press.
- Blanco, C. A., Caballero, I., Barrios, R., & Rojas, A. (2014). Innovations in the brewing industry: Light beer. In *International Journal of Food Sciences and Nutrition* (Vol. 65, Issue 6, pp. 655–660). <https://doi.org/10.3109/09637486.2014.893285>
- Bozoudi, D., & Tsaltas, D. (2018). The multiple and versatile roles of Aureobasidium pullulans in the vitivinicultural sector. In *Fermentation* (Vol. 4, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/fermentation4040085>
- Briggs, D. E. , B. C. A. , B. P. A. , S. R. (2004). *Brewing Science and practice*. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC.
- Burini, J. A. , E. J. I. , L. C. , L. D. (2021). *Non-conventional yeasts as tools for innovation and differentiation in brewing*. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.01.003>
- Carrera, J. E. (2003). *Production and application of industrial enzymes*.
- Chi, Z., Wang, F., Chi, Z., Yue, L., Liu, G., & Zhang, T. (2009). Bioproducts from Aureobasidium pullulans, a biotechnologically important yeast. In *Applied*

- Microbiology and Biotechnology* (Vol. 82, Issue 5, pp. 793–804).  
<https://doi.org/10.1007/s00253-009-1882-2>
- Deshpande, M. S., Rale, V. B., & Lynch, J. M. (1992). *Aureobasidium pullulans in applied microbiology: A status report*.
- Duong-Ly, K. C., & Gabelli, S. B. (2014). Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 541). Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0>
- el Observador. (2022). El consumo de cerveza recuperó el nivel prepandemia e importada volvió a crecer. *El Observador*.
- Ferrer, Maria., & Yenush, L. (2018). Aislamiento, selección e identificación de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* nativas de Alboraya para la producción de cerveza. *Universitat Politècnica De València*, 0(0), 11–36.
- Ferreira, L. (2014). *Elaboración de cerveza: Historia y evolución, desarrollo de actividades de capacitación e implementación de mejoras tecnológicas para productores artesanales*. Cátedra de Agroindustrias y Laboratorio de investigación en Productos Agroindustriales, Facultad de Cs. Agrarias y Forestales UNLP.
- Fisher Scientific (Thermo Fisher). (2023). *Fisher Scientific*.  
<https://www.fishersci.es/shop/products/fermentas-o-generuler-ready-to-use-1kb-dna-ladder/11551615>
- Gaur, R., Singh, R., Gupta, M., & Gaur, M. K. (2010). *Aureobasidium pullulans*, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan. In *African Journal of Biotechnology* (Vol. 9, Issue 47, pp. 7989–7997). Academic Journals. <https://doi.org/10.5897/ajb10.948>
- Gopinath, S. C. B., Anbu, P., Arshad, M. K. M., Lakshmipriya, T., Voon, C. H., Hashim, U., & Chinni, S. v. (2017). Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. In *BioMed Research International* (Vol. 2017). Hindawi Limited.  
<https://doi.org/10.1155/2017/1272193>
- Hall, B. G. (2013). Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1229–1235.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/mst012>
- Harrison, M. A., & Albanese, J. B. (2019). Beer/Brewing. In *Encyclopedia of Microbiology* (pp. 467–477). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.13014-6>
- Hernández, A. (2011). *Evaluación de la actividad amilolítica y producción de ácido glucónico de Aureobasidium pullulans en cultivos por lote y semilote utilizando almidón extraído de cebada maltera de baja calidad* [Instituto Politécnico Nacional. Centro de investigación en biotecnología aplicada].  
<https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/18639/TESIS%20ANGELICA%20HERNANDEZ%20NAVARRETE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Hernández-Castillo, M. I., Hernández-Navarrete, A., Jiménez-Montejo, F. E., Cruz-López, M. del C., Hidalgo-Lara, M. E., & López Y López, V. E. (2019a). Use of low quality barley starch for the production of amyolytic enzymes by aureobasidium pullulans. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 35(2), 435–446.  
<https://doi.org/10.20937/RICA.2019.35.02.14>
- Hernández-Castillo, M. I., Hernández-Navarrete, A., Jiménez-Montejo, F. E., Cruz-López, M. del C., Hidalgo-Lara, M. E., & López Y López, V. E. (2019b). Use of low quality barley starch for the production of amyolytic enzymes by aureobasidium pullulans.

- Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 35(2), 435–446.  
<https://doi.org/10.20937/RICA.2019.35.02.14>
- Hough, J. S. (2011). *Biología de la cerveza y de la malta*. Ed. Acribia, S. A.
- Hutkins, R. W. (2006). *Microbiology and Technology of Fermented Foods/ Beer-fermentation*.
- Kit Contents KIT SAFETY DATA SHEET. (2022). *Kit Contents KIT SAFETY DATA SHEET*.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kunze W. (2006). *Tecnología para Cerveceros y Malteros* (Primera edici{on). VLB Berlín.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T., & Robert, V. (2011). Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In *The Yeasts* (Vol. 1, pp. 87–110). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0>
- Larroque, M. (2020). *Selección de levaduras no tradicionales para la elaboración de cervezas artesanales*. Facultad de Química, Universidad de la República.
- Larroque, M. N., Carrau, F., Fariña, L., Boido, E., Dellacassa, E., & Medina, K. (2021). Effect of Saccharomyces and non-Saccharomyces native yeasts on beer aroma compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 337. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108953>
- Lewis, M. J. (2003). *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology/ BEER AND BREWING* (Vol. 3).
- Li, H., Chi, Z., Wang, X., & Ma, C. (2007). Amylase production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d. *Journal of Ocean University of China*, 6(1), 60–65. <https://doi.org/10.1007/s11802-007-0060-3>
- Macpherson, M. J. (1953). *ISOLATION AND IDENTIFICATION OF AMYLOLYTIC STREPTOCOCCI FROM THE RUMEN OF THE SHEEP*.
- Manitchotpisit, P., Skory, C. D., Leathers, T. D., Lotrakul, P., Eveleigh, D. E., Prasongsuk, S., & Punnapayak, H. (2011).  $\alpha$ -Amylase activity during pullulan production and  $\alpha$ -amylase gene analyses of *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(9), 1211–1218. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0899-y>
- Mannise, N. , S. C. , B. E. , C. F. , M. K. (2022). *Industrial application of native yeasts for the production of craft beers*.
- Medina, K. , L. L. (2018). En la Facultad de Química estudian levaduras nativas para elaborar cervezas con menos carbohidratos. *La Diaria* .
- Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Methner, F. J., Wagner, R. S., & Hutzler, M. (2016). Review: Pure non-Saccharomyces starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. In *Journal of the Institute of Brewing* (Vol. 122, Issue 4, pp. 569–587). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jib.381>
- Micology. *Aureobasidium pullulans*. University of Adelaide. (2022). *Micology. Aureobasidium pullulans*. <https://www.adelaide.edu.au/mycology/fungal-descriptions-and-antifungal-susceptibility/hyphomycetes-conidial-moulds/aureobasidium>
- Miguel, G. A., Carlsen, S., Arneborg, N., Saerens, S. M. G., Laulund, S., & Knudsen, G. M. (2022). Non-Saccharomyces yeasts for beer production: Insights into safety aspects

- and considerations. In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 383). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109951>
- Morales, M. (2018). *Chemical reactions in beer. Revista de Química*. <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjutMzezpL9AhVjrZUCHW9SDRYQFnoECAkQAQ&url=https%3A%2F%2Frevistas.pucp.edu.pe%2Findex.php%2Fquimica%2Farticle%2Fdownload%2F20105%2F20112%2F&usg=AOvVaw203NBhm57oiUkSBYTLLeL-o>
- Moreano, F. (2011). *Determinación del contenido de betaglucanos en líneas avanzadas y en variedades de cebada, procesada y no procesada, por medio de un método enzimático*. Universidad Técnica de Ambato (Facultad de Ciencias e Ingeniería).
- Mulay, Y. R., & Deopurkar, R. L. (2017). Production of amylase from indigenously isolated strain of *Aureobasidium Pullulans* and its hyper producing mutant. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 7(3), 287–293. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2017/18.7.3.287-293>
- Mulay, Y. R., & Deopurkar, R. L. (2018). Purification, Characterization of Amylase from Indigenously Isolated *Aureobasidium pullulans* Cau 19 and Its Bioconjugates with Gold Nanoparticles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184(2), 644–658. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2575-4>
- Oxford NANOPORE Technologies. (2022). *Oxford NANOPORE Technologies*. <https://nanoporetech.com>
- Palmer, JJ. (2006). *How to brew: everything you need to know to brew beer right the first time* (3ra. ed.). Boulder, CO: Brewers Publications.
- Porciúncula, C. , G. P. (2017). *Curso Práctico de Bioquímica. Enzima  $\beta$ -amilasa de soja*. Product Booklet GE Healthcare. (2006). *Amersham High Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis*. [https://www.solarbio.com/pdf/0\\_20180821dxjvyh.pdf](https://www.solarbio.com/pdf/0_20180821dxjvyh.pdf)
- Rodríguez Cavallini, E. (2005). *Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio. Costa Rica : Editorial Universidad de Costa Rica, 1*.
- Rubio-Flores, M., & Serna-Saldivar, S. O. (2016). Technological and Engineering Trends for Production of Gluten-Free Beers. In *Food Engineering Reviews* (Vol. 8, Issue 4, pp. 468–482). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s12393-016-9142-6>
- Saha, B. C., Silman, R. W., & Bothast, R. J. (1993). Amylolytic Enzymes Produced by a Color Variant Strain of *Aureobasidium pullulans*. In *CURRENT MICROBIOLOGY* (Vol. 26).
- Sambrook, Joseph. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ed.). ,Cold Spring Harbor, N.Y.
- Segura, L. E., Kirchmayr, M. R., Flores, E. P., & Gschaedler, A. C. (2010). *PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas PCR-RFLP of the ITS-5.8S regions as an identification tool for yeasts: advantages and disadvantages*. 8(2), e-Gnosis. [www.e-gnosis.udg.mx/vol8/art2](http://www.e-gnosis.udg.mx/vol8/art2)
- Servei de genòmica de la UAB. (2016). *Servei de genòmica de la Universitat Autònoma de Barcelona*. <https://sct.uab.cat/genomica-bioinformatica/es/content/qubit-0>
- Sicard, D., & Legras, J. L. (2011). Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. In *Comptes Rendus - Biologies* (Vol. 334, Issue 3, pp. 229–236). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.12.016>
- Sneyder, R. B., Giraldo, G. I., & Montes, L. M. (2016). Encapsulación De Alimentos Probióticos Mediante Liofilización En Presencia De Prebióticos. *Informacion Tecnologica*, 27(6), 135–144. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000600014>

- Solís, R. , B. N. , G. J. (2017). *Generación de cerveza artesanal baja en calorías y elaboración de un plan de negocios para su comercialización*. Universidad ORT, Facultad de Ingeniería.
- Stahl, G., Salem, S. N. B., Chen, L., Zhao, B., & Farabaugh, P. J. (2004). Translational accuracy during exponential, postdiauxic, and stationary growth phases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 3(2), 331–338. <https://doi.org/10.1128/EC.3.2.331-338.2004>
- Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H., & Verstrepen, K. J. (2015). Brettanomyces yeasts - From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 206, pp. 24–38). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.005>
- Thermo Scientific. (2010). NanoDrop Nucleic Acid Technical Guide. *Nucleic Acid - Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers, Revised 11*, 1–30. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Thermo-Scientific-NanoDrop-Products-Nucleic-Acid-Technical-Guide-EN.pdf>
- Varela, C. (2016). The impact of non-Saccharomyces yeasts in the production of alcoholic beverages. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 100, Issue 23, pp. 9861–9874). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7941-6>
- Willart, R. (2012). *Food Biochemistry and Food Processing/ Biochemistry of Beer Fermentation* (Benjamin K. Simpson Ph.D., Ed.; Second).
- Wingfield, P. T. (2016). Protein precipitation using ammonium sulfate. In *Current Protocols in Protein Science* (Vol. 2016, p. A.3F.1-A.3F.9). <https://doi.org/10.1002/0471140864.psa03fs84>
- Zalar, P., Gostinčar, C., de Hoog, G. S., Uršič, V., Sudhadham, M., & Gunde-Cimerman, N. (2008). Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology*, 61, 21–38. <https://doi.org/10.3114/sim.2008.61.02>

## 7. ANEXO

Anexo 1: Composición de medios de cultivos comerciales utilizados en el trabajo. Todos los medios de cultivo comerciales fueron de Thermo Scientific™ (Medios de cultivo deshidratados Oxoid™).

### **PDA (Potato Dextros Agar)**

Extracto de patata	4,0 g
Dextrosa	20,0 g
Agar- Agar	15,0 g

(Fórmula por litro de agua destilada) pH:  $5,5 \pm 0,2$

### **PDB (Potato Dextrose Broth)**

Glucosa	20,0 g
Extracto de patata	4,0 g

(Fórmula por litro de agua destilada) pH:  $5,5 \pm 0,2$

### **TSA (Tryptic Soy Agar)**

Peptona de caseína	15,0 g
Peptona de soja	5,0 g
Cloruro de sódico	5,0 g
Agar- Agar	15,0 g

(Fórmula por litro de agua destilada) pH:  $7,3 \pm 0,2$

### **TSB (Tryptone Soya Broth)**

Digerido pancreático de Caseína	17,0 g
Digerido enzimático de soja	3,0 g
Cloruro de Sodio	5,0 g
Fosfato dipotásico de hidrógeno	2,5 g
Glucosa	2,5 g

(Fórmula por litro de agua destilada) pH:  $7,3 \pm 0,2$

Anexo 2: Tabla de medidas de OD600 nm vs tiempo (horas) de crecimiento en cultivo (PDB, 28 °C, 150 rpm) para *S.cerevisiae* y CH18-5G.

Tiempo (hs)	OD 600nm	
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. pullulans CH18-5G</i>
04:30	0,158	0,0435
11:45	1,65	0,1275
11:55	1,915	0,0605
13:55	2,1	0,234
16:10	2,39	0,398
23:40	3,71	1,584
25:50	3,76	1,676
28:05	3,825	2,51
30:25	3,79	3,37
18:30	2,98	0,767
33:10	4,035	4,16
21:15	3,16	1,385
48:15	4,8895	6,006
36:20	4,411	5,8465
51:25	5,395	6,175
39:30	4,35	6,115
55:30	5,255	6,605
43:35	4,34	6,52
122:55	6,145	10,345
111:00	6,03	10,97

Anexo 3: Tabla de medidas de peso seco (gr/mL) vs tiempo (horas) de crecimiento en cultivo (PDB, 28 °C, 150 rpm) para CH18-5G.

Tiempo (Hs)	gr/mL
13:55	0,00019
18:30	0,00047
21:15	0,00052
25:50:00	0,00073
30:25:00	0,001775
33:10:00	0,00302
36:20:00	0,00603
39:30:00	0,007605
43:35:00	0,007065
48:15:00	0,006635
51:25:00	0,007665
55:30:00	0,009405
111:00:00	0,016645
122:55:00	0,015595

Anexo 4: Tabla de conteo de UFC para la cepa CH18-5G en medio PDA (28 °C, 48 horas) sembrado por método de superficie (0,1 mL). Placas que caen dentro del rango contable: 25-250 colonias para levaduras (marcadas en color amarillo).

Tiempo (hs)	Dilución siembra en superficie	Colonias en placa		<i>A.pullulans</i> (UFC/mL)
16:10	10 <sup>-4</sup>	73	143	1,1 x 10 <sup>7</sup>
21:15	10 <sup>-5</sup>	76	76	7,6 x 10 <sup>7</sup>
	10 <sup>-6</sup>	23	23	
28:05	10 <sup>-5</sup>	64	55	5,9 x 10 <sup>7</sup>
	10 <sup>-6</sup>	5	12	
33:10	10 <sup>-5</sup>	98	98	9,8 x 10 <sup>7</sup>
	10 <sup>-6</sup>	9	9	
36:20	10 <sup>-5</sup>	109	126	1,2 x 10 <sup>8</sup>
	10 <sup>-6</sup>	8	14	
	10 <sup>-7</sup>	3	3	
48:15	10 <sup>-5</sup>	66	48	5,7 x 10 <sup>7</sup>
	10 <sup>-6</sup>	6	2	
	10 <sup>-7</sup>	1	1	



Anexo 5: Alineamiento de las secuencias seleccionadas para el diseño de primers Amilasa 1 visualizado con el software de libre acceso Mview (A multiple alignment viewer). Se muestra parte del alineamiento, incluyendo la zona de unión de los cebadores diseñados (marcados en amarillo).

	cov	pid	301		4
400					
1 Amil	100.0%	100.0%	-----		
2 Amil	0.0%	0.0%	-----		
3 Amy	100.0%	1.3%	TCTTACCCTGCACAATGGAGGAGCCAATCGATCTATCAAGTCTTGACTGATAGATTTGCTCGCACTGATACTTCGACGTCGGCCTCATGTGATGTCAAC		
4 Amy	100.0%	1.0%	CCTGACCCCTGCACAATGGAGAAGCCAGTCGATCTATCAGGTTCTACCAGTCGTTTTGCGAGGACCGATGGTTCAACAACCTGCTTCTGTAATGTCAAC		
5 Amy	100.0%	1.0%	CCTTAGTCTGCACAATGGAGAAGTCAGTCGATCTATCAAGTCTCACCAGTCGCTTGGAAAGGACTGATGGCTGACAACCGCCTCTTGCAGATGTCAAC		
6 Amy	100.0%	1.1%	CCTGACTCCAGCGCAATGGAGAAGCCAATCAATTTATCAGGTCCTTGCTGATCGTTTTGCAAGGACTGATGGTTGCAACCTGCTTCTGCAGATGTCAAC		
7 Amy	100.0%	1.0%	TCTCACCCTGCACAATGGAGAAGTCAGTCGATCTATCAAGTCTTACCAGTCGTTTTGCGAGGACAGATGGTTCTACTACTGCCTCTGTGATGTCAAC		
8 Amy	100.0%	1.0%	TCTCACCCTGCACAATGGAGAAGCCAATCGATTTATCAAGTCTTACCAGTCGTTTTGCGAGGACAGATGGTTCTACCCTGCTTCTGTGATGTCAAC		
500					5
1 Amil	100.0%	100.0%	-----		
2 Amil	0.0%	0.0%	-----		
3 Amy	100.0%	1.3%	AAAGTATTGTGGCGCACATGGCAAGGCATAATCAAGAAGCTCGACTACATCAGCAGATGGGCTTACAGCGGTGTGATTTGATCAGGCATTGTGATGT		
4 Amy	100.0%	1.0%	GAGTATTGTGGTGGATCATTCCAAGGTATCATCAACAAGCTGGACTACATCAGCAGATGGGCTTCACTGCGGTTCTGATTTATGAAGCTGGTGAACAT		
5 Amy	100.0%	1.0%	AACTACTGTGGAGGTACATGGCAAGGTATCATTAACAAGCTTGACTACATCAGCAGATGGGCTTACTGCTC-----		
6 Amy	100.0%	1.1%	AAATATTGTGGCGCACATGGCAGGATCATCAAGAAGCTGGACTACATCAGCAGATGGGCTTACTGCGGTTCTGATTTATGCGGCCAAATGTATGT		
7 Amy	100.0%	1.0%	AAATATTGTGGCGGATCCTTCCAAGGCATCATCAAGAAGCTGGACTACATCAGCAGATGGGCTTACTGCGGTTCTGATTTATGATAGCTGGCGGACAC		
8 Amy	100.0%	1.0%	AAAGTATTGTGGTGGGCTCTTCCAAGGTATCATCAAGAAGCTGGACTACATCAGCAGATGGGCTTACTGCGGTTCTGCTACGTTTAAATGATGATGGTTC		
600					6
1 Amil	100.0%	100.0%	-----		
2 Amil	0.0%	0.0%	-----		
3 Amy	100.0%	1.3%	-ACCTCGATTCTGACGTGGTTTTCTAGATTTGGGTCAGCCCTGTTGGAAGAATCTGGAAGCTCTGGTCAAGATGGTGAATCTACCATGGACTGGGC		
4 Amy	100.0%	1.0%	CATGACAGCTCTGATATGCTTACAGATCTGGATTAGTCTGTTGGAAGAATCTGGAAGTTCAGGCAAGATGGTGAATCTACCATGGACTGGGC		
5 Amy	100.0%	1.0%	-----GATTTGGTTCAGTCCCGCTGTTGAAGAATCTGGAAGCTCTGGACAAGATGGCGACTGATCATGGACTGGGC		
6 Amy	100.0%	1.1%	TGCATCAGCTCTAATGTGCGTCCGAGATCTGGATTAGTCCCGCTGTTGAAGAATCTGATGTTCAAGGCTCTGGAAGATGGTGAATCTACCATGGACTGGGC		
7 Amy	100.0%	1.0%	CATGACAGTCTAATGTACACCGCAGATCTGGATCAGTCTGTTGGAAGAATCTACAGTCTGGCAAGATGGTGAATCTACCATGGACTGGGC		
8 Amy	100.0%	1.0%	--CTACAGCTTAAACATACATCGTAGATCTGGATTAGTCTGTTGGAAGAATTTACAGTCTGGCAAGATGGTGAATCTACCATGGACTGGGC		
700					7
1 Amil	100.0%	100.0%	-----		
2 Amil	0.0%	0.0%	-----		
3 Amy	100.0%	1.3%	TCAGGACATCTACCAAGTCAACCAAACTTGGATCTGCTGCCGACTTGGTGTCCCTCTCCAAGGCTCTCATGATCGAGGCAT-----		
4 Amy	100.0%	1.0%	ACAAGACATCTACCAAATCAACCAAACTTGGCTTGTGCTGCCGATTTGGTGTCACTCTCCAAGGCTCTCATAGTCTGGCATGGTGAAGATCAATCTCT		
5 Amy	100.0%	1.0%	CCAGGACATATACAGGTCAACCAAACTTGGCTTGTGCTGCCGACTGATACACTGTCCAAGGCTCTGCATGCCGTCGAT-----		
6 Amy	100.0%	1.1%	ACAAGACATCTATCAAGTCAACCAAACTTGGCTTGTGCTGCCGACTTGGTGTCCCTCTCCAAGGCTCTCATGATCTGGCATGGTGAAGATACCTTTT		
7 Amy	100.0%	1.0%	TCAAGATATCTACCAAGTCAATCAAACTTGGTCTGCTGCCGACTTGGTATCACTGTCCAAGGCTCTCCACGATGGTGAAGATGATTTCT		
8 Amy	100.0%	1.0%	TCAAGACATCTATCAAGTCAACCAAACTTGGTCTGCTGCCGATTTGGTGTCACTTTCCAAGGCTCTCATGATCTGGCATGGTGAAGATGAACTTCC		
1500					5
1 Amil	100.0%	100.0%	-----		
2 Amil	0.0%	0.0%	-----		
3 Amy	100.0%	1.3%	AAGTACTACACTCTGGGCTCGTTTCATGGAGAACCATGATGTTGCGGTTCCCTCGTTGACATCAGACTATGCACTCGCAAAAAACGCCATCGCTTT		
4 Amy	100.0%	1.0%	AAGATACAACACTCTTAGGCTCGTTCTAGAAAACCATGATGATGAGCAGCTTGGATCCCTGACTCCGACTACGCATTCGGAAGAATGCTATTGCAAT		
5 Amy	100.0%	1.0%	AAGACACACCCTCTCGGCTCCTTCATGGAGAATCAGGACTCGCTCGTTTTCCCTCGCTGACCAATGACTACGCATCGCCAAAAAAACGCCATCGCTTT		
6 Amy	100.0%	1.1%	AAGTACTACGTTCTCGGTCATTCATAGAGAACCATGACTCGCAGCCTCCCTTCATGACTTCGCACTACGCATTCGCAAAAAACGCCATGACTTT		
7 Amy	100.0%	1.0%	AAGACACAACACTCTTAGGCTCGTTTCATGGAGAACCATGATGAGCAGCTTGGATCATTGACTTCGATTAAGCAAAATGCTTGGGTT		
8 Amy	100.0%	1.0%	AAGACACAACACTCTTAGGCTCGTTTCATGGAGAACCATGATGAGCAGCTTGGATCATTGACTTCCGATTAAGCAAAATGCTATTGGGTT		
1600					6
1 Amil	100.0%	100.0%	-----		
2 Amil	0.0%	0.0%	-----		
3 Amy	100.0%	1.3%	CACCATGCTAGCAGATGGCTCCCAATCATCTACCAAGGCAAGAACAGCATTTCTCGGCGCGGCGTCCGAAACAACAGAGAGGCATCTGGCAGTCT		
4 Amy	100.0%	1.0%	CACAATGCTCGCTGATGGTATCCCAATCATCTACCAAGGCAAGAACAGCATTTCTCAGGCTCCAGTGTGCCGGAATAACAGAGAAGCATTGGCTCTCC		
5 Amy	100.0%	1.0%	CACCATGCTGGCGGATGGCATTCCATCATCTATCAAGGCAAGAACAACATTTCCGCGGCTCCGCTGTGCCGAAACAACAGAGAAGCATTGGGTTGCA		
6 Amy	100.0%	1.1%	CACGATGCTAGCAGATGGCTCCGATCATCTACCAAGGCAAGAACAGCATTTCTTGGCGGCGTGTGCCCAACAACAGAGAAGCAGCTTGGCTGTCC		
7 Amy	100.0%	1.0%	TACAATGCTCGCGGACGGTATCCCAATCATCTACCAAGGCAAGAACAGCATTTCTCAGGCTCTAGTGTGCTTAAACAACAGAGAAGCATTGGGTTATCT		
8 Amy	100.0%	1.0%	TACAATGCTCGCGGACGGTATCCCAATCATCTACCAAGGCAAGAACAGCATTTCTCAGGCTCTAGTGTGCTTAAACAACAGAGAAGCATTGGCTATCT		
1700					7
1 Amil	100.0%	100.0%	-----		
2 Amil	0.0%	0.0%	-----		
3 Amy	100.0%	1.3%	GGGACTCGACACTCTCGCAACTATATCCGTTTATCGCCAGCATCAACAAGCTCAGAAAACAGGCCATTAAAGCAAGATACGGGATGTTACTTACAAG		
4 Amy	100.0%	1.0%	GGCTATTCGACTCTCGCGAGTTGATCCGTTTATGCGAGCTCAACATGATTAGGAAAACAGGCATCAAGCAAGATACGGGATTTGACATACAAG		
5 Amy	100.0%	1.0%	GGATACTCGACTCTCGACATTGATCCATCTCGGTTACTTGAACAAGATCAGGAAACAGGCCGATTAAAGCAAGATACGGGATGACTTACAAG		
6 Amy	100.0%	1.1%	GGATACCAAGCTCTCGCAGTTGACCCCTTATGACTACCATCAACAAGATAGGAAAGCAGGCATCAAGCAAGATACGGGATGACTTACAAG		
7 Amy	100.0%	1.0%	GGCTACCCACTCTTCACAACTGATCCGTTTATGCTACTGTCAACAAGATCAGAAAACAGGCCATCAAGCAAGATACGGGATGACTTACAAG		
8 Amy	100.0%	1.0%	GGCTACCCACTCTTCACAACTGATCCGTTTATGCTACTGTCAACAAGATCAGAAAACAGGCCATCAAGCAAGATACGGGATGACTTACAAG		
1800					8
1 Amil	100.0%	100.0%	-----		
2 Amil	0.0%	0.0%	-----		
3 Amy	100.0%	1.3%	CAAACTCTGATACTCGGATGCTCTACATTGTGATGAGGAAAGGTACAACCTGGCTCTCAAGTATTGGTGTCTTACAACAAGGGCTCTTGGCAG		
4 Amy	100.0%	1.0%	CTTACCAGTTTACTCTGAGCTCTACGATTGTGATGAGGAAAGGACACGAGGATCCCAAGTCTGGTGTCTTACAACAAGGGCTCTTGGCAG		
5 Amy	100.0%	1.0%	CCGTCCCTGTACTCCGACGCTCGACATAGTATGCGAAAGGTTACACCGGCTCCCAAGTCTGGCGGATTTACAACAAGGGATCTTCCGGTATG		
6 Amy	100.0%	1.1%	CCTTACCAGTGTATCCGATGCTCGACATCGTTATGAGGAAAGGACACAGGATCCCAAGTCTGGTGTCTTACAACAAGGGCTCTTGGCAG		
7 Amy	100.0%	1.0%	CCTTACCAGTCTACTCTGACGCTCAACTATCGTATGAGGAAAGGACACGAGGATCCCAAGTCTGGTGTCTTACAACAAGGGCTCTTGGCAG		
8 Amy	100.0%	1.0%	CCTTACCAGTCTACTCTGACGCTCAACTATCGTATGAGGAAAGGACACGAGGATCCCAAGTCTGGTGTCTTACAACAAGGGCTCTTGGCAG		

**Anexo 6:** Alineamiento de las secuencias seleccionadas para el diseño de primers Amilasa 2 visualizado con el software de libre acceso Mview (A multiple alignment viewer). Se muestra parte del alineamiento, incluyendo la zona de unión de los cebadores diseñados (marcados en amarillo).

			cov	pid	501	.	.	.	:	.	.	.	6
600	-----												
1	Amil	100.0%	100.0%	-----									
2	Amil	0.0%	0.0%	-----									
3	Amy	100.0%	1.0%	AGCTTCCACGACTGACTCGCATGTC-TGCTAGGTTGCGACGTCGCCGATGGAAGTACTACAGCCAAATGCAGCCCGTCGGCAAACTACTGCGGAGGTACTT									
4	Amy	100.0%	1.0%	-----CAGGTTTGCTCGCACTGATGGCTTACCACGGCATCTTGTGATC---TTAGTGATTATTGTGGGGGCACCT									
5	Amy	100.0%	1.0%	AGTTTGTGCGATTGACTAAGACCTCTCGACAGTTTTCGACGTCCCGATGGAAGCACCACAGCGCCCTGTAACCCAGTCGGTAAATAGTGTGGTGGCACCT									
6	Amy	100.0%	1.0%	-----CCGTTTGTCTCGCACTGATGGCTTACCACGGCATCTTGTGATC---TGAGGAGACTGACTGTGGCGGCACAT									
7	Amy	100.0%	0.7%	AGTTT-----ACTGACTGATATCTT-C---CAGCTTCGCGGTACCGATGGAAGCACCACAGCCAAATGCAATCCCGTGGGTAAGTACTGTGGAGGCACAT									
8	Amy	100.0%	1.0%	-----TAGATTGCTCGCACTGATGGATCTACGACTGCGTCTGTGACC---TCGGCGATTACTGTGGGGGCACAT									
			cov	pid	601	.	.	.	:	.	.	.	7
700	-----												
1	Amil	100.0%	100.0%	-----ACATGGGNTTACDGCYGNRG-----									
2	Amil	0.0%	0.0%	-----									
3	Amy	100.0%	1.0%	ACCAAGGTATCATCAAGCAGCTTGACTACATCCAGAACATGGGGTTACGTCGCTAAAGTTTACCAGGTGTGGCTTCGAGCCGCTGAACGGCAAAACGCTA									
4	Amy	100.0%	1.0%	GGGAAGGTCTCATCAACACTTAGACTATATACAAGACATGGGCTTACGGCTTTGGT-----ATAGGCTCACTCAACAT---CAGCTAGTACTG									
5	Amy	100.0%	1.0%	ATCAAGGGATCATCAAGCAATGGACTATATCTCAACATGGGTTACGTCGCTGAGTTCCAGCAAATGTGGCTCGAGCCGTTGACCGGCAAAATGCTG									
6	Amy	100.0%	1.0%	GGAAAGGCTTGATGAATAAATCGACTACATACAGAACATGGGTTACAGCTGTCACT-----ATGAGAGTCTATATCC---AGATAAGTACTG									
7	Amy	100.0%	0.7%	ATCAAGGCATCATCAAGCAGCTGGACTACATCCAGAACATGGGTTACGTCGCTAAAGTTCCCAAGCTGTGGCGCGAAACGGCGAAACGGTCAACGCTA									
8	Amy	100.0%	1.0%	GGCAAGGACTCATCAGCCACCTGGACTATATCCAAAACATGGGTTTACAGCTGTCACT-----ATGAGGTGCCAAATG---CAGCAAGTACTG									
			cov	pid	701	.	.	.	:	.	.	.	8
800	-----												
1	Amil	100.0%	100.0%	-----									
2	Amil	0.0%	0.0%	-----									
3	Amy	100.0%	1.0%	AGAC-ACGAACAGATCTGGATCTCTCTGTCACATTCAGATTGACAGCTGGACCCCTACGGCCAAACATGGCAGCGGCTACTGGCAGCAGGATCTGTAC									
4	Amy	100.0%	1.0%	ACGT-ACGAACAGGTGTGGATCTCACCAGTGTAAAGAATCTCAATGCTTCCAGCGACAGGGGTGGAGCTACATGGATCTGGCCCAAGACATCTGAC									
5	Amy	100.0%	1.0%	AACCGAAGGACAGATCTGGATTTCCCTATCACATATCAGATCAGACCTGGACCCCTATGGCGAACCATGGCATGGCTACTGGCAACAAGATCTGTAT									
6	Amy	100.0%	1.0%	ATTG-TCT-ACAGGTGTGGATCTCACCAGTGTCAAGAATCTCAGTCTTAACTGCCGATGGGTCAAGCTACCGGCTACTGGCACACGACATCTAT									
7	Amy	100.0%	0.7%	ATACATGGAACAGATCTGGATCTCTCTATCACATTGAGATTGACAGCTTGGACCCCTACGGCGAGCCATGGCATGGATCTGGCAACAAGATCTGTAC									
8	Amy	100.0%	1.0%	ATTG-ATGAACAGGTGTGGATCTCACCAGTGTGGAGAACCTCAATGCTCGACTGCTGATGGATCAAGCTATCATGGGTACTGGCAACAATAATATAT									
			cov	pid	801	.	.	.	:	.	.	.	9
900	-----												
1	Amil	100.0%	100.0%	-----									
2	Amil	0.0%	0.0%	-----									
3	Amy	100.0%	1.0%	AAGCTCAACAGTGCCTTTGGCCTGCGCAGCATCTCAGGGCTTTGGCAAAGCTGTGCACGACAGAGGCATGGTGTGGTGTGATCGTACAG---GGCAACA									
4	Amy	100.0%	1.0%	AGCTCAATACCAATTTTGGCTCTGTCGACAGCTGGTCAAACTCAAGTGGCTTACATAATAGAGGAATGGTAAGATGACCAATGACATGCTTGA-									
5	Amy	100.0%	1.0%	CAGCTCAACAGTGCCTTTGGCACCAGATGATCTCAGGGCTTTGGCCACAGCTCTACACAACAGAGGGATGGTCACTGAGAAATGCAACAAGCAAACTC									
6	Amy	100.0%	1.0%	GAAGTCAATACGAATCTGGCTCTGGCGGATCTCGTTTCACTACAGAGCATTGATGAGCGAGGCAT-----									
7	Amy	100.0%	0.7%	AAGCTGAACAGTGCATTGGTACTGACAGCATCTCAGAGCTTGGCTTCAAGCTCTACACAACAGGGGCATGGTGTGAT--TGTGACGCCGGCGAC									
8	Amy	100.0%	1.0%	GCCCTCAACACCACTTTGGCTCTGTCGACAGCTAGTATCACTACAGAAGCCCTGCACAAGAGAGGAATGGTATGACGGACTTCTT---GTTCCAGT									
			cov	pid	1401	.	.	.	:	.	.	.	5
1500	-----												
1	Amil	100.0%	100.0%	-----									
2	Amil	0.0%	0.0%	-----									
3	Amy	100.0%	1.0%	ACGGTGTCCATATGGTCTTTGCCCTTACAAAACACTATGGACAGCGCTTTGAAATACGCAATGTACGTTGAGATCGAAAGAGTAGAGATATCTTCTTA									
4	Amy	100.0%	1.0%	ACAACAACGCCGAATACGCTGCGCATACCAAGACTCCCTGTCCGGCGTATGAACTACCCAT-----									
5	Amy	100.0%	1.0%	ACGGCGATCCGATGGTCTTTGCCCTTACCAAGACTATATGGACAGTGTCTCAACTACGCAATGTACGT---GCAAAAGAAATGAACATACCTTCTCC									
6	Amy	100.0%	1.0%	ACAACAACGCTGACTAGCTGCGGCTACCGGGCTCCATATCAGTCTAATGAACTACCCACT-----									
7	Amy	100.0%	0.7%	ATGGCGACCATACGGCTTTGCCCTTACCAAGACTATGGACAGTGTTTGAACTACGGGATGTAAGTGTGATGGATAATGGCTTACCT-TC-CCCTG									
8	Amy	100.0%	1.0%	ACAACAACGCCGACTAGCTGCGCATACCAAGACTCCTTTGAGGATGAACTACCCAAAT-----									
			cov	pid	1501	.	.	.	:	.	.	.	6
1600	-----												
1	Amil	100.0%	100.0%	-----									
2	Amil	0.0%	0.0%	-----									
3	Amy	100.0%	1.0%	CTTACTACTACCATCATCAGTACTATGCGGCTACGGACGCTTCTCCTCGACTGCCGGAAGCATGTCGAAGTTCGTGAAGCACTTAAACGGCATGAAGAG									
4	Amy	100.0%	1.0%	-----GTACTACAACATAAACCCTGTGCTTTCGATCACTCCGGTGATTCGAGGCTTGGAAACAGGGCGTCAACACCATGAAATC									
5	Amy	100.0%	1.0%	TTGCTTACATCATTCTCAGGTAATGACAGCCACAGATGCATTCTCCTCAACTGCTGGAAGCATGTCCAAATTTGTCACTGAGCTCAACGGCATGAAGAG									
6	Amy	100.0%	1.0%	-----CTACTACAACATCACTCCGCTTTCAGTCCACTCCGGCGACATCAACAATTTGAAACAGGGCATCAATACCATGAAATC									
7	Amy	100.0%	0.7%	CTTACAAGAAAAT---AGGTACTACGGGCTACCGGGCTTCTCGTCTACCTTGGAAAGCATGTCGGCTTGTCAAGCACTGAATGGCATGAAAGG									
8	Amy	100.0%	1.0%	-----GTACTACAACATAAACCCTCGCCTTTCGCTCCACTCCGGCTCCATCGCAGCATAGCCACCGGCATCGAGACCATGAAAGT									
			cov	pid	1601	.	.	.	:	.	.	.	7
1700	-----												
1	Amil	100.0%	100.0%	-----GAAAAAYGAYMHSCWGHITYS-----									
2	Amil	0.0%	0.0%	-----									
3	Amy	100.0%	1.0%	TCAATGTAAGACACTAGCGTTCTGGGATCGTTCTCAGAAAAACACGCAAGCTCGCTTTGCGTCACTGACCAACGACATGCTCTGGCAGAAACATC									
4	Amy	100.0%	1.0%	CACCTGCAAAAGATGTAACCTCTAGGTTCTTTCTCGAAAAACAGATAAACCCACGCTTTCCCTCTTTGACTCTGACATGTGCTGGCAAAAACCGG									
5	Amy	100.0%	1.0%	CAAATGTAAGACACACAGCGTACTTGGATCGTTCTCGAAAAACACGCAAGCTCGCTTTGACTATTGACCAAGCAAGTCCCTGGCTAAAAACATC									
6	Amy	100.0%	1.0%	CACCTGCAAGGATACATCCCTCTAGGTTCTTTCTCGAAAAACAGATAAACCTCGCTTTCCCTCTTTGACTACAGATATGGCATTGGCATAAAGCGCC									
7	Amy	100.0%	0.7%	CAATGCAAGGACACCAAGCTTTGGATCCTTTTCAAAAAACAGCAACCACTCGCTTTGCTCGTTGACCAAGCGACATGCTCACTAGCCAAAGAACATC									
8	Amy	100.0%	1.0%	AACTTCAAGAGCGTACTGCTCGGCTCTTCTCGAAAAACAGATAAACCTCGATTGCAAGTTGACGCTGATGCGGCTTGGCAAGGATGCG									
			cov	pid	1701	.	.	.	:	.	.	.	8
1800	-----												
1	Amil	100.0%	100.0%	-----									
2	Amil	0.0%	0.0%	-----									
3	Amy	100.0%	1.0%	ATCACCTACAGCATGATGGGCGATGGAATTTCCATCATGTACGAAGGCCAGGAACAGCATTACAGCGGCGCTCAAGATCCTTACAACCGCGAAGCTGTCT									
4	Amy	100.0%	1.0%	ATCGGGTTGCAATGTTGGCAGATGTTATCCATTTGTTTATCAAGGCCAAGAACAGCATTTCGATGGTGGTGATACACCGCAACAAGAGAACAACTCT									
5	Amy	100.0%	1.0%	ATTACTACAGCATGATGGGCGAGGAATTTCCATCTGTACGAAGGCCAGGAGCAGCATTACAGCGGCGCCAGGATCCTTACAATCGCGAGGCTGTCT									
6	Amy	100.0%	1.0%	ATCGTTTTGAGTGTGGGATGGTATCCAGTCACTTACGAAGGCCAAGAACAGCATTTTCCGGATCCTCTACGCGGAAGAAATAGAGAGCGCTTT									
7	Amy	100.0%	0.7%	ATCGCTCTACCATGAGGCGATGGCATTCCATCATCTACGAAGGCCAGGAACAGCATTTCAGTGGCGCTCAGGACCCATCAACCGGAGGCTGTCT									
8	Amy	100.0%	1.0%	ATTGCGTTTTGAGTGTGGTGGCATTCCCATCGTCTATCAAGGCCAAGAACAGCATTTCAGCGCTCATCGACACTACACAACAGGAGCAGCTTT									

Anexo 7: Alineamiento de las secuencias seleccionadas para el diseño de primers Amilasa 3 visualizado con el software de libre acceso Mview (A multiple alignment viewer). Se muestra parte del alineamiento, incluyendo la zona de unión de los cebadores diseñados (marcados en amarillo).

```

cov pid 101 . . . . : . . . . 2
200
1 Amil 100.0% 100.0% ---ATGGGCGGCGAAGAACCTAC-----
2 Amil 0.0% 0.0% -----
3 Amy 100.0% 1.1% ---ATGGGCGGCGAAGAACCTACACCCGAGAACTACACTCTGCTCCAGGGCTTCGAGTGGAACTGCCTGCCGATGGCAAGCACTACAACCGTCTGCAGC
4 Amy 100.0% 1.2% ---ATGGGCGGCGAAGAACCTACACCTGAAAACCTACACCTTGTCCAGGGTTTCGAATGGAACTGCCTGCTGATGGCAAGCACTACAAGCGTTTGAAG
5 Amy 100.0% 1.0% ACCATGGGCGGCGAAGAACCTACTCCTGAGAACTACACTCTGCTCCAGGGCTTCGAGTGGAACTGTTCTGCTGATGGCAAGCACTATGTTCTGTTGAAGC

cov pid 201 . . . . : . . . . 3
300
1 Amil 100.0% 100.0% -----
2 Amil 0.0% 0.0% -----
3 Amy 100.0% 1.1% ATGCAATGCCCGCATACAAGCACATTGGTATCTCCAACATCTGGCTACCTCCGGCTGCAAAGCCAGCTCTCCCAAGCTAAACCTCTCTGTCGCCCCATA
4 Amy 100.0% 1.2% ATGCGATGCCCGCTACAAGCACATCGGCATCTCCAACATCTGGCTCCGGCTGCAAAGCCAGCTCTCCCAAGCT-----ACATCCCACCA
5 Amy 100.0% 1.0% GTGCCATGCCCGCATACAAGCACATTGGTATCTCCAACATCTGGCTCCCTCCGGCTGCAAAGCCAGCTCCCCCAAGCTAAGCTCTCAACTCCACATCT

cov pid 301 . . . . : . . . . 4
400
1 Amil 100.0% 100.0% -----
2 Amil 0.0% 0.0% -----
3 Amy 100.0% 1.1% TCTCTCCA--GATTGAACCCACATACTGACTTGCCACC-----CAGGGCAACGGCTACGACGTCTACGATCTCTACGACCTCGGCAATTGCGAC
4 Amy 100.0% 1.2% CCTCACAA-----CTGCCAACACAGAACGAGCTGACTTCCACACAGGGCAATGGCTATGATGTATGACCTGTACGATCTCGGCAATTGAT
5 Amy 100.0% 1.0% CCGCACAACTCTCCGATTCCCCATACTGACTCGGACACCTCTT-----CAGGGCAACGGCTACGACGTCTACGATCTCTACGACCTCGGCAATTGCGAC

cov pid 401 . . . . : . . . . 5
500
1 Amil 100.0% 100.0% -----
2 Amil 0.0% 0.0% -----
3 Amy 100.0% 1.1% CAAAAGGGCGGCGTAGCAAAAATGGGGCACAAAGACGAACCTCTCGCCCTGGCTCCTCGCAAAAAGATTCCGGCATCGGCTCTACTGGGACGGCG
4 Amy 100.0% 1.2% CAAAAGGGCGGCGTAGCAAAAATGGGGCACAAAGACGAACCTCTCGCCCTTCTCCGCGCCAAAAGACCGGAACTCGGCTCTACTGGGACGGCG
5 Amy 100.0% 1.0% CAAAAGGGCGGCAAGGCCACAAAATGGGGCACGAAAGATGAATTGATGACCCTCTCAAATCCGCAAAAGGACTCTGGCATCGGTCTCTACTGGGACGGCG

cov pid 1501 . . . . : . . . . 6
1600
1 Amil 100.0% 100.0% -----
2 Amil 0.0% 0.0% -----
3 Amy 100.0% 1.1% CTCGCCCGAAACTCTTCGCTACGGCGAGCTCAACGACTACTGGGCAACCCCAACTGCATAGGATGGGTGAGACGGCGACGCATGATCGTAAAAACG
4 Amy 100.0% 1.2% CTCGCACGCAAGCTCTTCGATACGGCGAGCTCAACGACTACTGGGCAACCCCAACTGCATGGTTGGGTGAGAAGAGGAACACACGACAGAAAGATG
5 Amy 100.0% 1.0% CTCGCGAGAAAACCTACGCTTACGGCAATTGAACGATTACTGGAACGATGCAAACTGTATCGGTTGGGTGAGAAGAGGTACACATGATAGAAAGGACG

cov pid 1601 . . . . : . . . . 7
1700
1 Amil 100.0% 100.0% -----
2 Amil 0.0% 0.0% -----
3 Amy 100.0% 1.1% GATGCGCAGTCTCATGAGCAACACCGGACCGGAGAAATCCAGATGCAGTCCGTCGAGCACAAGGGCGAAGTCTGGACTGATTGCTAGGCTGGGA
4 Amy 100.0% 1.2% GATGCGCGGTGGTTATGAGCAACACCGGACTGGAGAGATCAAGATGCATGTTGGACTGAGCACAAGGGAGAGGTGTGGACGGATCTGCTGGGCTGGGA
5 Amy 100.0% 1.0% GATGTCGGTGTGATGAGCAATACCGGCTGGAGAGATTGATGACGTCAGTGGGCTGAGCATAAGGTTGAAGTGTGGACGGATATCTTGGGCTGGGA

cov pid 1701 . . . . : . . . . 8
1800
1 Amil 100.0% 100.0% -----
2 Amil 0.0% 0.0% -----
3 Amy 100.0% 1.1% GCAAGGAGAGGTGACGATTGATGAGGAGGGCAATGGTGTGTTCAAGTGTCTGGTTGCAGTGTGCTGTGTGGACGAATAAGGATGCAGAGGGTAGAGAA
4 Amy 100.0% 1.2% GCAGGGAGAGGTACCAATTGACGATGAAGCAATGGTCTGTTCAAGTGCCTGGTTGCAGTGTGCTGTGTTGGTCAACAAGGATGCAGAGGGCAGAGAG
5 Amy 100.0% 1.0% GCAAGGAGAGGTTACTATTGATGAGGAAGTAAATGGTGTGTTCAAGTGTCTGGATGCAGTGTGCTGTTGGGTCAACAAGGATGCCAGGGCAGAGAG

cov pid 1801 . . . . : . . . . 9
1900
1 Amil 100.0% 100.0% -----
2 Amil 0.0% 0.0% -----
3 Amy 100.0% 1.1% -----GTCAAYTTYGACAGYGAYATYTACAAG-----
4 Amy 100.0% 1.2% CACTTCCCTGTCAACTTTGACAGTGATATTTACAAGGAGGCTCGAAGCAGGATGGTATGAGGAAGAGAAGGAGGATGCCAAAAG-----
5 Amy 100.0% 1.0% AACTTCCCTGTCAATTTGACAGCGACATTTACAAGGAGGCTGGCAAGCAGAACGGCGACAAGGAAGAGAAGGAGGATGAGGAGAACCAAGGAATAGAAGACG

```



Anexo 8: Alineamiento de las secuencias seleccionadas para el diseño de primers Glucoamilasa 1 visualizado con el software de libre acceso Mview (A multiple alignment viewer). Se muestra parte del alineamiento, incluyendo la zona de unión de los cebadores diseñados (marcados en amarillo).

			pid 101	2 200
1	Glucoamil	100.0%	100.0%	-----GGAGCGCHYYKDMCTVCF-----
2	Glucoamil	0.0%	0.0%	-----
3	GLAm	100.0%	0.7%	-----ATGGGTTTCCTTTCCACTCTCCCTGTCTCTGGAGCTGCTTTGCTCTCCCTT
4	GLAm	100.0%	0.7%	-----ATGGATCACAGCAGATTCACTTTTCCTTTCCACTCTCCCTGTCTCTGGAGCTGCTTTGCTCTCCCT
5	GLAm	100.0%	0.7%	-----ATGGTTCCTTTCCACTCTCCCTGTCTCTGGAGCTGCTTTGCTCTCCCT
6	GLAm	100.0%	0.7%	-----ATGGTTCCTTTCCACTCTCCCTGTCTCTGGAGCTGCTTTGCTCTCCCT
7	GLAm	100.0%	0.6%	CTCAGTAAAGAACAGAAACAACAACACACGCCATCTCCATCATGCGCTTCTTACTCTCTCTCTGCTCTGGAGGCTTCTCACTTCCAT
8	GLAm	100.0%	0.7%	-----ATGGTTCCTTTCCACTCTCCCTGTCTCTGGAGCTGCTTTGCTCTCCCT
9	GLAm	100.0%	0.7%	-----TTCTTATCATGCGTTTCCTTTTACTATTCCCATGTTCTCTGGAGCTGCTTCCGCTCCCT
-----				
			pid 201	3 300
1	Glucoamil	100.0%	100.0%	-----
2	Glucoamil	0.0%	0.0%	-----
3	GLAm	100.0%	0.7%	CACCCAGAGCATTCAAGAGCGTGCTACTGGCTCCCTCTCTCCTGGCTCTGCTGAGAACACTGTTGCCCTGCAGGGGCTCCTCAACAACATCGGTGC
4	GLAm	100.0%	0.7%	CACCCAGAGCATTCAAGAGCGTGCTACTGGCTCCCTCTCTCCTGGCTCTGCTGAGAACACTGTTGCCCTGCAGGGGCTCCTCAACAACATCGGTGC
5	GLAm	100.0%	0.7%	CGCTGAGGACATTCAAGAGCGTGCTACTGGCTCTCTCCTGGCTCTGCTGAGAACACTGTTGCCCTGCAGGGGCTCCTCAACAACATCGGTGC
6	GLAm	100.0%	0.7%	CGCCGAGAATCAGAGCGTGCTACTGGCTCTCTCCTGGCTCTGCTGAGAACACTGTTGCCCTGCAGGGGCTCCTCAACAACATCGGTGC
7	GLAm	100.0%	0.6%	CGCTGAAAGCATTCAAGAGCGTGCTACTGGCTCTCTCCTGGCTCTGCTGAGAACACTGTTGCCCTGCAGGGGCTCCTCAACAACATCGGTGC
8	GLAm	100.0%	0.7%	CACTGAGAACATTCAAGAGCGTGCTACTGGCTCTCTCCTGGCTCTCATCGGAGAACACTGTTGCCCTGCAGGGGCTCCTCAACAACATCGGTGC
9	GLAm	100.0%	0.7%	CTTTCGAGAACATTCAAGAGCGTGCTACTGGCTCCCTGGCTTCATCTGAGAACACTGTTGCCCTGCAGGGGCTCCTCAACAACATCGGTGC
-----				
			pid 301	4 400
1	Glucoamil	100.0%	100.0%	-----
2	Glucoamil	0.0%	0.0%	-----
3	GLAm	100.0%	0.7%	AAGTGTTTCAAGGCCTTGCGGCAAGTGTGTTGTTGTTGCTTCTCCTCGAAGTGAACCTGACTGTAAAGAGATCTGTAGCATCTGATTCGATA
4	GLAm	100.0%	0.7%	AAGTGTTTCAAGGCCTTGCGGCAAGTGTGTTGTTGTTGCTTCTCCTCGAAGTGAACCTGACTGTAAAGAGATCTGTAGCATCTGATTCGATA
5	GLAm	100.0%	0.7%	AGCGCGCTCAAGGCCTTGCGGCAAGTGTGTTGTTGTTGCTTCTCCTCGAAGTGAACCTGACTGTAAAGAGATCTGTAGCATCTGATTCGATA
6	GLAm	100.0%	0.7%	CAGCGCTCAAGGCCTTGCGGCAAGTGTGTTGTTGTTGCTTCTCCTCGAAGTGAACCTGACTGTAAAGAGATCTGTAGCATCTGATTCGATA
7	GLAm	100.0%	0.6%	GAGCGGCTCAAGGCCTTGCGGCAAGTGTGTTGTTGTTGCTTCTCCTCGAAGTGAACCTGACTGTAAAGAGATCTGTAGCATCTGATTCGATA
8	GLAm	100.0%	0.7%	CAGTGTTTCAAGGCCTTGCGGCAAGTGTGTTGTTGTTGCTTCTCCTCGAAGTGAACCTGACTGTAAAGAGATCTGTAGCATCTGATTCGATA
9	GLAm	100.0%	0.7%	CAGTGTTTCAAGGCCTTGCGGCAAGTGTGTTGTTGTTGCTTCTCCTCGAAGTGAACCTGACTGTAAAGAGATCTGTAGCATCTGATTCGATA
-----				
			pid 401	5 500
1	Glucoamil	100.0%	100.0%	-----
2	Glucoamil	0.0%	0.0%	-----
3	GLAm	100.0%	0.7%	TGAATTACCCCTAACGTCATCAAGACTTCAACCTGGACCGTGAAGTGTGTTGTTGTTGCTTCTCCTCGAAGTGAACCTGACTGTAAAGAGATCTGTAGCATCTGATTCGATA
4	GLAm	100.0%	0.7%	TGAATTACCCCTAACGTCATCAAGACTTCAACCTGGACCGTGAAGTGTGTTGTTGTTGCTTCTCCTCGAAGTGAACCTGACTGTAAAGAGATCTGTAGCATCTGATTCGATA
5	GLAm	100.0%	0.7%	TGAACATCACTGACTCATGATCCAGACTTTACACCTGGACCGTGAAGTGTGTTGTTGTTGCTTCTCCTCGAAGTGAACCTGACTGTAAAGAGATCTGTAGCATCTGATTCGATA
6	GLAm	100.0%	0.7%	TGAACATCACTGACTCATGATCCAGACTTTACACCTGGACCGTGAAGTGTGTTGTTGTTGCTTCTCCTCGAAGTGAACCTGACTGTAAAGAGATCTGTAGCATCTGATTCGATA
7	GLAm	100.0%	0.6%	GAAATCTGACTGACTCATCAAGACTTTACACCTGGACCGTGAAGTGTGTTGTTGTTGCTTCTCCTCGAAGTGAACCTGACTGTAAAGAGATCTGTAGCATCTGATTCGATA
8	GLAm	100.0%	0.7%	AGATTCCATTCAATCATAAAGACTTCTACCTGGACCGTGAAGTGTGTTGTTGTTGCTTCTCCTCGAAGTGAACCTGACTGTAAAGAGATCTGTAGCATCTGATTCGATA
9	GLAm	100.0%	0.7%	CGAACTATTCTTGACTTAATCAAGATTTTATACCTGGACCGTGAAGTGTGTTGTTGTTGCTTCTCCTCGAAGTGAACCTGACTGTAAAGAGATCTGTAGCATCTGATTCGATA
-----				
			pid 2001	1 2100
1	Glucoamil	100.0%	100.0%	-----
2	Glucoamil	0.0%	0.0%	-----
3	GLAm	100.0%	0.7%	CCTCCATCGCGTAACTTCAACGAGCAAAAAGACCCTCTACGGCAGAAATATTACATGTTGGCAGCATCCCAGACTGGAAACTGGAACACTGCG
4	GLAm	100.0%	0.7%	CCTCCATCGCGTAACTTCAACGAGCAAAAAGACCCTCTACGGCAGAAATATTACATGTTGGCAGCATCCCAGACTGGAAACTGGAACACTGCG
5	GLAm	100.0%	0.7%	CCTCCATCGCGTAACTTCAACGAGCAAAAAGACCCTCTACGGCAGAAATATTACATGTTGGCAGCATCCCAGACTGGAAACTGGAACACTGCG
6	GLAm	100.0%	0.7%	CCGCCATCGCGTAACTTCAACGAGCAAAAAGACCCTCTACGGCAGAAATATTACATGTTGGCAGCATCCCAGACTGGAAACTGGAACACTGCG
7	GLAm	100.0%	0.6%	CCGCCATCGCGTAACTTCAACGAGCAAAAAGACCCTCTACGGCAGAAATATTACATGTTGGCAGCATCCCAGACTGGAAACTGGAACACTGCG
8	GLAm	100.0%	0.7%	CCGCCATCGCGTAACTTCAACGAGCAAAAAGACCCTCTACGGCAGAAATATTACATGTTGGCAGCATCCCAGACTGGAAACTGGAACACTGCG
9	GLAm	100.0%	0.7%	CCTCCATCGCGTAACTTCAACGAGCAAAAAGACCCTCTACGGCAGAAATATTACATGTTGGCAGCATCCCAGACTGGAAACTGGAACACTGCG
-----				
			pid 2101	2 2200
1	Glucoamil	100.0%	100.0%	-----
2	Glucoamil	0.0%	0.0%	-----
3	GLAm	100.0%	0.7%	TAATGCTGTCGCGTTGTTGCTTCCAATATACAGACTTAAACCTTGTGGACCGTCAACCTTGGCACCAGGCAAGCTTCAACTACAAGTAC
4	GLAm	100.0%	0.7%	CAATGCAAGTTGCGTTGTTGCTTCCAATATACAGACTTAAACCTTGTGGACCGTCAACCTTGGCACCAGGCAAGCTTCAACTACAAGTAC
5	GLAm	100.0%	0.7%	AAATGCAAGTTGCGTTGTTGCTTCCAATATACAGACTTAAACCTTGTGGACCGTCAACCTTGGCACCAGGCAAGCTTCAACTACAAGTAC
6	GLAm	100.0%	0.7%	CAACGCAAGTTGCGTTGTTGCTTCCAATATACAGACTTAAACCTTGTGGACCGTCAACCTTGGCACCAGGCAAGCTTCAACTACAAGTAC
7	GLAm	100.0%	0.6%	CAATGCAAGTTGCGTTGTTGCTTCCAATATACAGACTTAAACCTTGTGGACCGTCAACCTTGGCACCAGGCAAGCTTCAACTACAAGTAC
8	GLAm	100.0%	0.7%	CAAGGCAAGTTGCTTCAAGTGTGCTTACAGACTTAAACCTTGTGGACCGTCAACCTTGGCACCAGGCAAGCTTCAACTACAAGTAC
9	GLAm	100.0%	0.7%	AAATGCAAGTTGCGTTGTTGCTTCCAATATACAGACTTAAACCTTGTGGACCGTCAACCTTGGCACCAGGCAAGCTTCAACTACAAGTAC
-----				
			pid 2201	3 2300
1	Glucoamil	100.0%	100.0%	-----GGHAAVTGTGCKGGKACTGC-----
2	Glucoamil	0.0%	0.0%	-----
3	GLAm	100.0%	0.7%	ATCAAGAAGGCACAGGATGACCTGTACTGGGAGAGTGATCCTAACAGATCTTACACTGTTGCTGGCAATGTTGCTGGACTGCTACTGAGAACGATA
4	GLAm	100.0%	0.7%	ATCAAGAAGGCACAGGATGGAAGTGTACTGGGAGAGTGATCCTAACAGATCTTACACTGTTGCTGGCAATGTTGCTGGACTGCTACTGAGAACGATA
5	GLAm	100.0%	0.7%	ATCAAGAAGGCACAGGATGGAAGTGTACTGGGAGAGTGATCCTAACAGATCTTACACTGTTGCTGGCAATGTTGCTGGACTGCTACTGAGAACGATA
6	GLAm	100.0%	0.7%	ATCAAGAAGGCACAGGATGGAAGTGTACTGGGAGAGTGATCCTAACAGATCTTACACTGTTGCTGGCAATGTTGCTGGACTGCTACTGAGAACGATA
7	GLAm	100.0%	0.6%	ATCAAGAAGGCACAGGATGGAAGTGTACTGGGAGAGTGATCCTAACAGATCTTACACTGTTGCTGGCAATGTTGCTGGACTGCTACTGAGAACGATA
8	GLAm	100.0%	0.7%	ATCAAGAAGGCACAGGATGGAAGTGTACTGGGAGAGTGATCCTAACAGATCTTACACTGTTGCTGGCAATGTTGCTGGACTGCTACTGAGAACGATA
9	GLAm	100.0%	0.7%	GTCAAAAAGGCAGTGTGTTGAGCTGGGAGTGTGCTGAAATAGATGTATACGTTGGAGCAATGTTGCTGGGACTGCGGTCAGAGTGTATA
-----				
			pid 2301	4 2400
1	Glucoamil	100.0%	100.0%	-----
2	Glucoamil	0.0%	0.0%	-----
3	GLAm	100.0%	0.7%	GCTGGAGGTAG
4	GLAm	100.0%	0.7%	GTTGGAGGTAG
5	GLAm	100.0%	0.7%	GTTGGAGGTAG
6	GLAm	100.0%	0.7%	GCTGGAGGTAG
7	GLAm	100.0%	0.6%	GCTGGAGGTAG
8	GLAm	100.0%	0.7%	GCTGGAGGTAG
9	GLAm	100.0%	0.7%	GTTGGAGGTAG

**Anexo 9:** Alineamiento de las secuencias seleccionadas para el diseño de primers Glucoamilasa 2 visualizado con el software de libre acceso Mview (A multiple alignment viewer). Se muestra parte del alineamiento, incluyendo la zona de unión de los cebadores diseñados (marcados en amarillo).

```

| [ . . . . . 1 100
1 Glucoamil 100.0% 100.0% -----
2 Glucoamil 0.0% 0.0% -----
3 GlAm 100.0% 1.3% CTACCTCCAGCTATCGTTCTCAGTAGCAGTACCAGCACAAATGCCAGCAACAGTGAAGATCTGTTAGGATCACTCTCCAAAGTAACAGTGCCATCCTGT
4 GlAm 100.0% 1.3% CTATCTCCAGCTGTCACTTCCGTAGCAGTACCAGCACAGTTCCAGCAACAGTGAAGAACGATTGGGATCACTCTCCAAAGTAACAGTACCATCCTGC

cov pid 101 . . . . . : . . . . . 2 200
1 Glucoamil 100.0% 100.0% GCCTTCTTGATGTACTTGTAGTTGAAGC-----
2 Glucoamil 0.0% 0.0% -----
3 GlAm 100.0% 1.3% GCCTTCTTGATGTACTTGTAGTTGAAGCTGGTGCCGGTGGCAAAGTTGATGGTGACGGTCCACAAAGGGTTAGAGCTCGTATATTTGGAAGCAGACAACG
4 GlAm 100.0% 1.3% GCCTTCTTGATGTACTTGTAGTTGAAGCTAGTACAGTAGCAAAGTTGATAGTACAGTCCACAAAGGGTTGGAGCTAGTACTTGGACGCAGATAGCG

cov pid 201 . . . . . : . . . . . 3 300
1 Glucoamil 100.0% 100.0% -----
2 Glucoamil 0.0% 0.0% -----
3 GlAm 100.0% 1.3% CGACAGCATTAGCAGTGTTCAGTTTCCGAGTGCAGGAAATGCTGCCAACGATGTAATATTTCTCGCCGTAGGAGGTGGTCTTTTGTCTCGTTGAAGGTTAC
4 GlAm 100.0% 1.3% CGACTGCGTATCAGTGTTCAGTTTCCGAGTGTGGGATGCTGCCAGCATGTAGATGTTTTCTCCGTAAGCGGTCTGCTTTTGTCTCGTTGAAGGTTAC

cov pid 301 . . . . . : . . . . . 4 400
1 Glucoamil 100.0% 100.0% -----
2 Glucoamil 0.0% 0.0% -----
3 GlAm 100.0% 1.3% GGCATGGAGGTAGGAGTTGTGCAGGAGCCGCCGGTGGTGTGGTGGGTGCCGGTCCAGGGAGAGCCGGGGTTGCCCCAGTTGGTGTGTGGCTGCG
4 GlAm 100.0% 1.3% GGCATGGCGGTGGGGTTGTGCAAGAGCCGCCGGTGTGGTGGTGGGTGTACCTGTGGAAGGGGAGCCGGGGTTGCCCCAGTTGGTGTGTGGCTGCG

cov pid 1801 . . . . . : . . . . . 9 1900
1 Glucoamil 100.0% 100.0% -----
2 Glucoamil 0.0% 0.0% -----
3 GlAm 100.0% 1.3% CAAGTGCCTTGAACACAAGAGCTGAGTCACGGGTCCAGGTGTAGAAGTCTTGATTGACGTTAGGGGTAATTCATATCGAATCAGATGCTACAGATCTCTT
4 GlAm 100.0% 1.3% CAAGTGCCTTGAACACAGAGCCGAATCAGTGTCCAGGTGTAGAAGTCTTGATTGATGTTAGGGATAGTTCATATCGATCAGATGTTACAG---TCTC

cov pid 1901 . . . . . : . . . . . 0 2000
1 Glucoamil 100.0% 100.0% -----
2 Glucoamil 0.0% 0.0% -----
3 GlAm 100.0% 1.3% ACAGTCAGGGTTCGACTTCGAGGGAGAAGCAACTACAACCAGCACTGGCGCCAGAAGCCTTGGAACCACCTTGACCCGATGTTGTTGAGGACGCCCTGC
4 GlAm 100.0% 1.3% ACAGTCGGGGTTGGACTTCGAAGGGGAAGCAACTACAACCAGCACTAGCACCAGAAGCCTTGAGCCACTAGCACCAGTGTGTCGAGGACACCCCTGC

cov pid 2001 . . . . . : . . . . . 1 2100
1 Glucoamil 100.0% 100.0% -----
2 Glucoamil 0.0% 0.0% CAACAGTGTCTCAGAYGAGAGCCA-----
3 GlAm 100.0% 1.3% AGGGCAACAGTGTCTCAGACGAGAGCCAAGGAGAGGGAGCCAGTAGCACGCTCTTGAATGCTCTCGGGTGAAGGGAGAGCAAAAGCAGCTCCGAGAA
4 GlAm 100.0% 1.3% AGAGCAACAGTGTCTCAGATGAGAGCCAAGGAGCAAGAGAGCCAGTAGCACGCTCTTGCATGTTTTCTGGAGAGGGGAAAAGCAAGAGCAGCTCCAAGGA

cov pid 2101 . . . . . ] 2128
1 Glucoamil 100.0% 100.0% -----
2 Glucoamil 0.0% 0.0% -----
3 GlAm 100.0% 1.3% GCACAGGAAGAGTGAAAGGAAACGCAT
4 GlAm 100.0% 1.3% GCACAGGGAGAGTAGAAAGGAAACGCAT

```

