

79



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

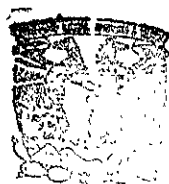
“IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA
ENZIMA ATP-CITRATO LIASA EN LA LEVADURA
Phaffia rhodozyma”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICA FARMACEUTICA BIOLÓGICA
P R E S E N T A :
MARIA DE LOS ANGELES MARTINEZ GONZALEZ



MEXICO, D. F.



2001

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

299430



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

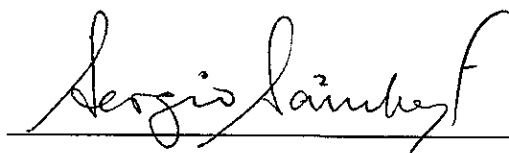
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

- Presidente:** Profra. María Guadalupe Tsuzuki Reyes
- Vocal:** Profra. Luz del Carmen Castellanos Roman
- Secretario:** Dr. Sergio Sánchez Esquivel
- 1er. suplente:** Prof. Marco Antonio Ortiz Jiménez
- 2º. suplente:** Profra. María Elena Ibarra Rubio

El tema fue desarrollado en el:
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología
Laboratorio de Microbiología Industrial



Dr. Sergio Sánchez Esquivel
Asesor



Q.F.B. Ruth Edith Martín Fuentes
Supervisora Técnica



Ma. de los Ángeles Martínez González
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Por permitirme alcanzar esta meta y por ser mi guía durante todos estos años. Señor, te pido que me sigas iluminando y bendiciendo como hasta ahora y que no permitas que me partes del camino que me has marcado. Amén.

A mis Padres:

Por su infinito amor y paciencia, por alentarme a ser cada día mejor y por enseñarme a que debo esforzarme por alcanzar mis sueños. Gracias a ustedes soy lo que soy.

A mis hermanos:

A Laura: por ser mi compañera inseparable de toda la vida y mi mejor amiga, por sus consejos y apoyo incondicional, por hacerme sentir alguien importante en su vida y por todo su cariño.

A Luis: por que desde su llegada me trajo alegría y una infinita ternura, gracias por demostrar tu apoyo y preocupación por mí siempre y por ser el mejor de los hermanos.

A mi Abuelita Angelina y a mi tío Agustín:

Porque fueron dos personas fundamentales en mi vida, por enseñarme a vivir con alegría. Gracias por todo el amor y cariño que siempre me brindaron y aunque ya no están aquí conmigo, los llevo siempre presentes en mi corazón.

A toda mi familia:

Por el apoyo en los momentos más difíciles, por preocuparse siempre por mí y por darme la mejor de las familias. A todos ustedes que han formado parte de mi vida.... Mil gracias.

AGRADECIMIENTOS

A Roque:

Por que desde que apareciste a mi vida, le diste un nuevo rumbo lleno de alegría y sueños, por tu apoyo incondicional, por darme la confianza que necesitaba para llegar a esta etapa tan importante y por tu infinito amor.

Al Dr. Sánchez:

Por sus consejos y asesoría que me llevaron a concluir satisfactoriamente este trabajo, por el interés que siempre mostró en mi y que alcanzara esta meta, para usted tomo mi respeto y mi agradecimiento.

A Ruth Martín:

Por su apoyo y asesoría que fueron vitales para la culminación de este trabajo, pero sobre todo gracias por la amistad que me brindaste y que espero perdure por siempre.

A mis amigos:

Por todo su cariño y apoyo en los momentos más difíciles, en especial a Alma, Brianda y Rome por ser como mis hermanas y que gracias a su apoyo yo pude alcanzar esta meta. Los quiero mucho.

A mis compañeros del laboratorio de Biomédicas:

Por toda su ayuda y sus consejos que influyeron en este trabajo, en especial a Beth, Betty, Iveta y Lauris por brindarme su apoyo y su amistad. Siempre los recordaré.

A los miembros del H. Jurado:

Por sus atinados comentarios y sugerencias que influyeron en la mejora de este trabajo.

I. Índice general

II. Índice de figuras	IV
III. Índice de tablas	VI
1. Introducción	1
1.1 Uso y función de carotenoides	3
1.2 Biosíntesis y regulación de carotenoides	6
1.3 <i>Phaffia rhodozyma</i> . Características	12
1.4 Astaxantina. Propiedades fisicoquímicas	14
2. Antecedentes	15
2.1 Factores que promueven la acumulación de lípidos en levaduras.	
2.1.1. <i>Influencia del medio de cultivo</i>	15
2.1.1.1 Fuente de Carbono	16
2.1.1.2 Fuente de nitrógeno	17
2.1.1.3 pH, temperatura y aereación	18
2.2 Biosíntesis de lípidos en levaduras	
2.2.1. <i>Orígenes de acetil-CoA</i>	19
2.2.2 <i>Regulación de la biosíntesis de lípidos</i>	22
3. Justificación del proyecto	26
4. Hipótesis	28
5. Objetivos	29

6. Estrategia	30
7. Metodología	32
7.1 Procedimiento para realizar una fermentación	32
7.1.1 Preparación del preinóculo	32
7.1.2 Inoculación del medio de producción	32
7.2 Determinación de crecimiento	
7.2.1 Determinación de la curva patrón	32
7.2.2 Determinación de crecimiento en muestras	33
7.3 Determinación de pH	34
7.4 Determinación de glucosa	34
7.5 Determinación de carotenoides totales	35
7.6 Separación y cuantificación de astaxantina	
7.6.1 Separación	36
7.6.2 Cuantificación	37
7.7 Extracción de proteínas	
7.7.1 Método de polvos de acetona	37
7.7.2 Extracción de proteína total	38
7.8 Determinación de proteína por el método de Lowry ..	38
7.9 Determinación de actividad enzimática de la ATP-CL .	40
7.10 Determinación de radioactividad	
7.10.1 Intracelular y extracelular	41
7.10.2 Carotenoides	42

7.10.3 Astaxantina	42
7.10.4 Contador de centelleo	42
8. Resultados	43
9. Análisis y discusión de resultados	58
10. Conclusiones	67
11. Perspectivas	69
12. Anexos	
12.1 Anexo I. Métodos	71
12.2 Anexo II. Medios de cultivo	73
12.3 Anexo III Cálculos de cinética enzimática	74
13. Referencias	75

II. Índice de figuras

Figura 1. Vía general de biosíntesis de isoprenoides.

Figura 2. Desaturación de fitoeno a licopeno y la ciclización de los extremos para producir β -caroteno en los diferentes organismos carotenogénicos.

Figura 3. Estructura de la astaxantina.

Figura 4. Rutas metabólicas que proporcionan las unidades de acetil-CoA necesarias para la biosíntesis de lípidos en levaduras.

Figura 5. Regulación de la biosíntesis de lípidos en levaduras.

Figura 6. Cinética de producción de la enzima ATP-CL.

Figura 7. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima ATP-CL.

Figura 8. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima ATP-CL.

Figura 9. Cinética enzimática para citrato de la ATP-CL.

Figura 10. Cinética enzimática para ATP de la ATP-CL.

Figura 11. Determinación de K_m para citrato de la ATP-CL.

Figura 12. Determinación de K_m para ATP de la ATP-CL.

Figura 13. Cinética de crecimiento de *P. rhodozyma* en glucosa 1 y 6%.

Figura 14. Cinética de consumo de glucosa en *P. rhodozyma*.

Figura 15. Cinética de pH.

Figura 16. Cinética de producción específica de carotenoides.

Figura 17. Actividad de la ATP-CL a las 72 h de fermentación.

Figura 18. Producción de carotenoides a las 72 h de fermentación.

Figura 19. Porcentaje de incorporación de citrato marcado al interior de la célula.

Figura 20. Porcentaje de incorporación de marca a carotenoides totales.

Figura 21 a. Autorradiografía I de glucosa al 1%.

Figura 21 b. Autorradiografía II de glucosa al 1%.

Figura 21 c. Autorradiografía I de glucosa al 6%.

Figura 22. Actividad de ATP-CL en 3 diferentes cepas de *P. rhodozyma*.

III. Índice de tablas

Tabla 1. Principales carotenoides permitidos como aditivos en alimentos.

Tabla 2. Genes que participan en la biosíntesis de carotenoides en bacterias.

Tabla 3. Porcentaje de incorporación de citrato a la célula y de inhibición de la enzima ATP-CL en concentraciones de glucosa 1 y 6% a las 72 h de fermentación.

1. Introducción

Los carotenoides son los pigmentos más ampliamente distribuidos en la naturaleza. Aunque se encuentran principalmente en plantas, los carotenoides también pueden encontrarse en bacterias, algas, hongos y animales, especialmente en aves, como el flamingo, peces e invertebrados [1].

Los carotenoides juegan una función biológica muy importante en humanos y animales como precursores de vitamina A, estimulantes de la respuesta inmune y en la prevención del cáncer y otras enfermedades degenerativas [2].

Los carotenoides son tetraterpenos de 40 átomos de carbono y pueden ser de dos clases: 1) los carotenos, que son compuestos hidrocarbonados y 2) las xantofilas, derivados oxigenados de los carotenos.

La astaxantina pertenece al grupo de las xantofilas; es un antioxidante extremadamente potente y su actividad es 10 veces mayor que el β -caroteno, la zeaxantina, la luteína y la cantaxantina y 500 veces mayor que el α -tocoferol [3-5].

La astaxantina es ubicua en la naturaleza, especialmente en el ambiente marino y es el principal pigmento en crustáceos, salmones y truchas [2]. Éstos animales son incapaces de sintetizar astaxantina *de novo*, por lo que el pigmento debe ser suplementado en su dieta para adquirir su color naranja característico. Por lo anterior, la astaxantina tiene un amplio uso en la acuicultura al adicionarse al alimento de estos peces.

Solamente en algunos microorganismos se ha demostrado la síntesis de astaxantina: entre éstos sobresalen el alga verde *Haematococcus pluvialis* [6], la levadura roja *Phaffia rhodozyma* [7] y las bacterias *Brevibacterium*, *Mycobacterium lacticola* [8], *Agrobacterium aurantiacum* [9] y *Paracoccus carotinifaciens* [10].

De los microorganismos productores de astaxantina, *P. rhodozyma* es el de más fácil manejo y cultivo, además de tener la característica única de fermentar algunos azúcares, como glucosa, sacarosa, maltosa y rafinosa [11], por lo que se le considera promisorio para la síntesis a gran escala. Sin embargo poco se conoce acerca de las rutas metabólicas involucradas en la biosíntesis de astaxantina, así como de su regulación.

Aunque la mayoría de los trabajos de investigación han sido enfocados hacia la producción biotecnológica de astaxantina por *P. rhodozyma*, los estudios de caracterización de las cepas, así como la optimización de los medios de producción, han aportado algunos datos acerca del efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno adecuadas y su concentración para promover la biosíntesis del pigmento. Se ha visto que, en limitaciones de nutrientes, hay una acumulación de lípidos y, por lo tanto, de carotenoides ya que comparten varios pasos en las rutas biosintéticas. Por lo anterior este trabajo pretende dar fundamentos bioquímicos a los efectos observados en otros trabajos y aportar nueva evidencia en el estudio bioquímico y fisiológico de esta levadura.

1.1 Usos y función de los carotenoides.

Los carotenoides como grupo, son moléculas extremadamente lipofílicas con poca o nula solubilidad en agua. Por ello, su localización está restringida a áreas hidrofóbicas de las células, excepto cuando están asociados con proteínas o están sustituidos por grupos polares fuertes, en cuyo caso pueden encontrarse en ambientes acuosos.

Los carotenoides presentan dobles enlaces conjugados que conforman un cromóforo largo, otorgándoles la capacidad de absorber la luz en la región visible. Por esto podemos observar colores que van del amarillo al rojo, incluyendo al naranja.

Muchas de las funciones de los carotenoides son consecuencia de esta capacidad para absorber la luz, por lo que su papel natural es dar color. Sin embargo, también está establecida su función como antioxidantes en los organismos fotosintéticos y en muchos organismos no fotosintéticos aerobios, participando en la desactivación de los radicales libres que se producen durante el metabolismo normal de las células. La cadena poliénica de los carotenoides es altamente reactiva y rica en electrones, consecuentemente, en presencia de oxidantes forman radicales libres de vida corta [12]. Se sabe que los radicales libres, como el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) y el hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) son especies altamente reactivas, capaces de iniciar la peroxidación de lípidos, de inactivar proteínas, o de causar daño en moléculas de DNA o RNA. En microorganismos y plantas se ha demostrado que los carotenoides inactivan radicales libres,

peróxidos y otros oxidantes mediante un proceso en el que se transfiere la energía de altos niveles de excitación a un triplete del carotenoide [13-14].

Los carotenoides han sido relacionados como agentes protectores contra algunas formas de cáncer (particularmente el cáncer de pulmón), en algunos casos de ataques cardíacos, degeneración macular y cataratas. También han sido usados exitosamente en el tratamiento de protoporfiria eritropoyética y otras enfermedades relacionadas con fotosensibilidad [15].

Se ha demostrado que la astaxantina protege a la piel de los daños ocasionados por la luz UV, incrementa la producción de lipoproteínas de alta densidad y estimula la respuesta del sistema inmune [16].

Existe gran evidencia que sugiere que la astaxantina modula tanto la respuesta inmune humoral como la celular. Este pigmento estimula la liberación de interleucina-1 y el factor α de necrosis tumoral en ratón. Este efecto es mucho más potente que el de la cantaxantina o el β -caroteno y se ha visto que existe una mayor inducción de citocinas. Así mismo, la astaxantina presenta una significativa estimulación en la producción de inmunoglobulinas A, M y G y sobre los linfocitos T-ayudadores, incluso cuando no hay cantidades suficientes de antígeno para promover la respuesta inmune [17-19].

En cuanto a la acuicultura se refiere, la astaxantina ha jugado un papel muy importante en la cría de salmones y truchas en cautiverio, como aditivo en los alimentos de estos peces para conferir su pigmentación naranja característica, ya que éstos animales no son capaces de sintetizarla *de novo*. Sin embargo, es una

práctica muy costosa, debido a que la astaxantina es el más caro de los componentes de la formulación del alimento, representando alrededor del 10 al 15% del costo total.

La astaxantina fue aprobada por la FDA como aditivo de uso en la acuicultura desde 1995 [20]. Actualmente se cuenta con una síntesis química de astaxantina realizada por las compañías Roche y BASF, las mayores compañías productoras de carotenoides sintéticos en el mundo [21].

Compuesto	Fuente no microbiana	Fuente microbiana	Usos
β -Caroteno	zanahorias síntesis	<i>Blakeslea trispora</i> <i>Dunaliella salina</i>	colorante de alimentos
Licopeno	jitomates	<i>Blakeslea trispora</i> <i>Streptomyces crestomycetius</i> subsp. <i>rubescens</i>	colorante de alimentos
Luteína	alfalfa, maíz, plantas verdes	<i>Spongicoccum escentricum</i> <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	alimento para aves
Zeaxantina	alfalfa, maíz, plantas verdes	<i>Flavobacterium sp.</i>	alimento para aves y peces
Cantaxantina	crustáceos, aves, síntesis	<i>Cantharellus cinnabarinus</i> <i>Brevibacterium KY-4313</i> <i>Rhodococcus maris</i>	alimento para aves y peces
Astaxantina	crustáceos, aves, flores (<i>Adonis annua</i>), síntesis	<i>Mycobacterium lacticola</i> <i>Phaffia rhodozyma</i> <i>Haematococcus pluvialis</i> <i>Paracoccus carotinifaciens</i>	alimento para peces

Tabla 1. Principales carotenoides permitidos como aditivos en alimentos.

La astaxantina se comercializa a un precio mayor de \$2500 USD por Kg. Roche comercializa un producto denominado Carophyll pink que contiene 5% de astaxantina [22]. En la tabla 1 [8] se muestran algunos carotenoides de amplio uso industrial, así como su fuente de obtención.

La acuicultura es un sector que está creciendo rápidamente, esta industria fue valuada en el año 2000 en \$40 billones de dólares [23]. Una proporción importante de esta industria involucra la cría de salmón y camarón, aumentando el consumo mundial del 3-5% al 25-30% [23]. En 1992 se reportó una producción de 270,000 toneladas métricas de salmón a nivel mundial y para 1999 fue de 750,000 toneladas. Los estimados para el año 2001 apuntaron a alcanzar el millón de toneladas mientras que para el año 2005 se busca el producir alrededor de 1.3 millones de toneladas métricas [24]. El mercado de astaxantina está estimado en más de \$100 millones de dólares [25]. Esta creciente demanda abre un amplio mercado para la producción microbiana de astaxantina.

1.2 Biosíntesis y regulación de carotenoides.

Los carotenoides comparten las etapas iniciales de su biosíntesis con las vías de síntesis de una gran variedad de isoprenoides y sus derivados: monoterpenos, sesquiterpenos, giberelinas y esteroides. El isopentenil pirofosfato (IPP) es el precursor de todos los isoprenoides [26]. La vía de biosíntesis más conocida de IPP es la del mevalonato (Fig.1), que a partir de acetil-CoA produce IPP, teniendo como intermediarios la β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA) y el mevalonato.

La formación de IPP por esta ruta se ha descrito en animales, plantas, hongos y bacterias [26]. Una vía alternativa descubierta recientemente parte de piruvato y gliceraldehído-3-fosfato, teniendo como intermediarios la hidroximetilamina y la D-1-desoxi-xilulosa [27].

Esta vía se ha descrito en eubacterias [27], en el alga verde *Scenedesmus obliquus* [28], en las plantas superiores [29] y en la cianobacteria *Synechocystis* [30]. El IPP proveniente de esta vía, en muchos casos se isomeriza a dimetilalil pirofosfato (DMAPP), al cual se le adicionan secuencialmente 3 moléculas más de IPP para formar geranil-geranil pirofosfato (GGPP). Los intermediarios formados durante estas adiciones son precursores de una gran variedad de isoprenoides (Fig. 1)

Vía de Rhomer

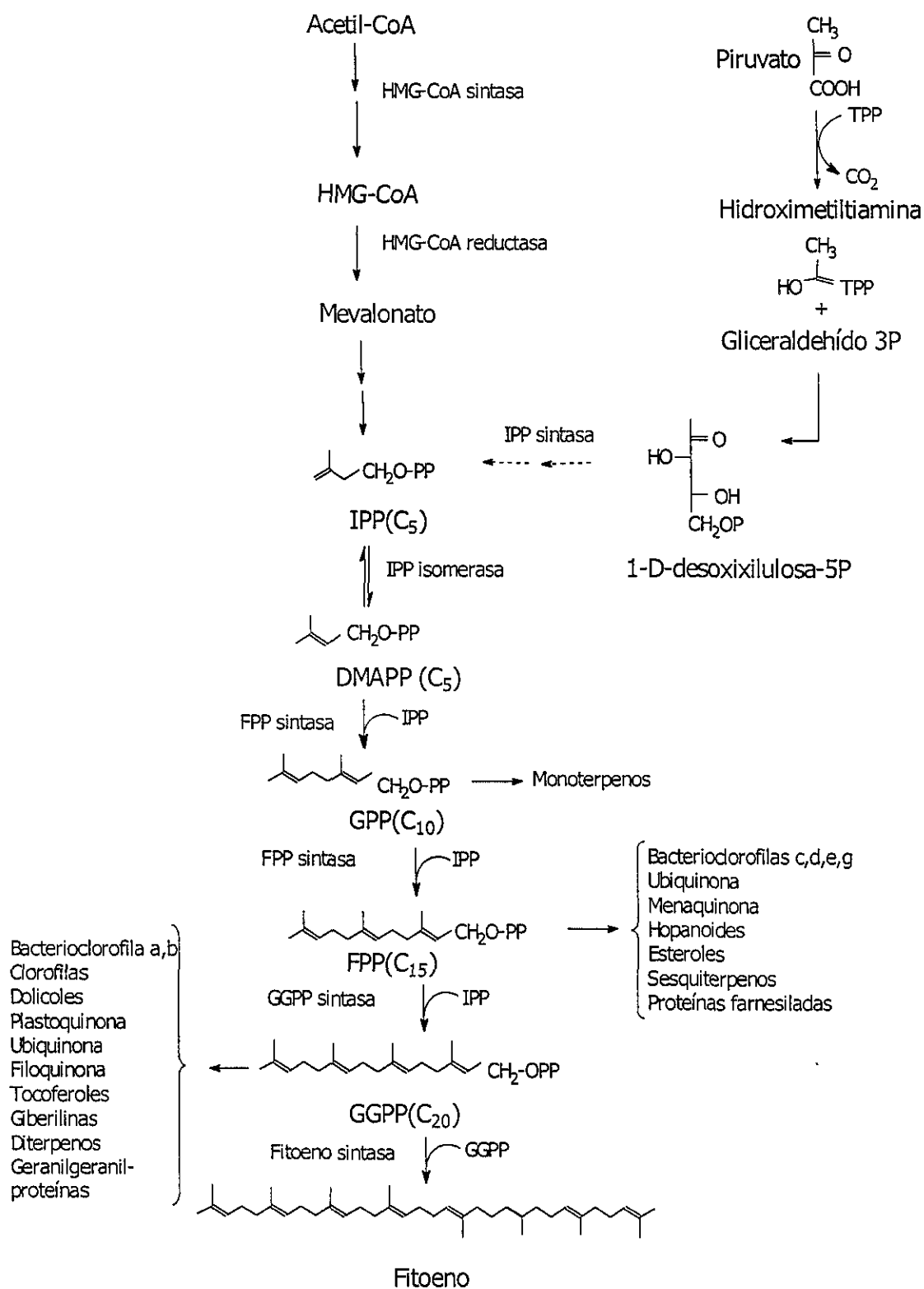


Fig.1 Vía general de biosíntesis de isoprenoides. A la derecha la vía de Rhomer [88].

La condensación de dos moléculas de GGPP produce el fitoeno, que es el primer precursor de los carotenoides de 40 átomos de carbono. En organismos no fotosintéticos una sola enzima del tipo CrtI lleva a cabo las desaturaciones para transformar el fitoeno en neurosporeno y, posteriormente en licopeno (Fig. 2). En organismos fotosintéticos participan dos clases de enzimas, la primera del tipo CrtP produce ζ -caroteno y la segunda, una enzima ζ -caroteno desaturasa produce, el licopeno (Fig. 2). En la tabla 2 se muestran los genes que participan en la biosíntesis de carotenoides en bacterias.

Función enzimática	Gen
<i>Formación de fitoeno y precursores</i>	
GGPP sintasa	<i>crt E</i>
Fitoeno sintasa	<i>crt B</i>
<i>Formación de licopeno</i>	
Fitoeno desaturasa	<i>crtI</i>
<i>Formación de β-caroteno</i>	
Licopeno ciclasa	<i>crtY</i>
<i>Formación de xantofilas</i>	
β -Caroteno hidroxilasa	<i>crtZ</i>
β -C-4-oxigenasa	<i>crtW</i>

Tabla 2. Genes que participan en la biosíntesis de carotenoides en bacterias [56].

La mayoría de los organismos carotenogénicos producen carotenoides cíclicos que se forman con la participación de ciclasas, las cuales actúan sobre los extremos de la molécula del licopeno para producir β -caroteno y α -caroteno, los cuáles son los precursores de la mayoría de las xantofilas naturales y de sus derivados glicosilados.

Organismos no fotosintéticos
algunas eubacterias y
hongos

Organismos fotosintéticos
cianobacterias, algas y
plantas superiores

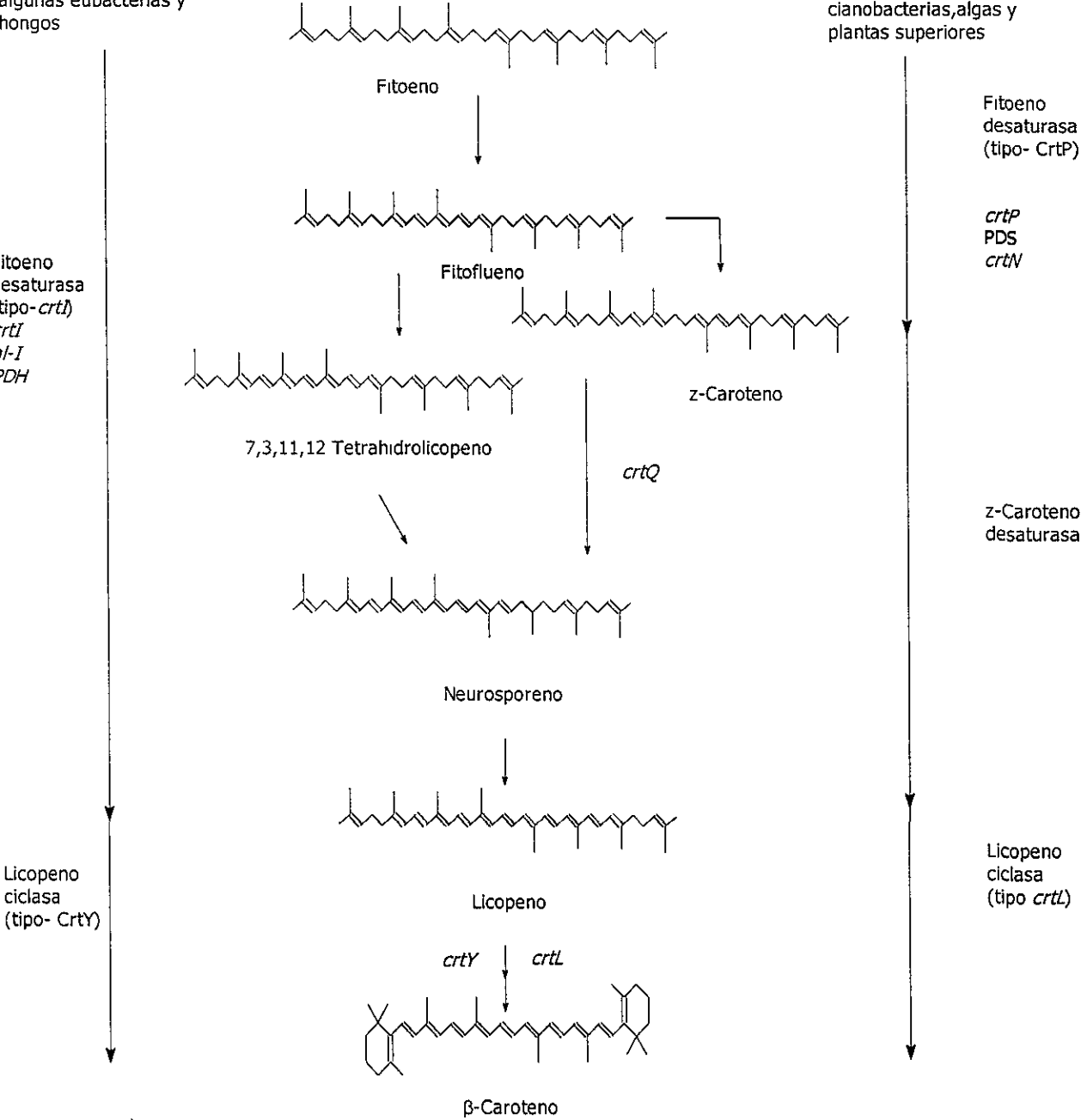


Fig.2 Desaturación de fitoeno a licopeno y la ciclización de los extremos para producir β-caroteno en los diferentes organismos carotenogénicos [88].

La regulación por producto final o bien por algún intermediario de la biosíntesis es un mecanismo regulatorio común en varios organismos. En levaduras, la HMGR es retrorregulada por intermediarios tempranos y por intermediarios tardíos (regulación cruzada) de la vía de los isoprenoides [30].

La mayor inhibición de la síntesis de carotenoides ocurre con el producto más desaturado, el licopeno, mientras que una menor desaturación o la presencia de anillos de β -ionona dan lugar a una menor inhibición [31].

En *P. rhodozyma*, la producción de astaxantina es inhibida por β -ionona, que posee un anillo análogo a los del β -caroteno [32]. Además, existe evidencia que indica que la vía de síntesis de astaxantina es retrorregulada también por producto final [33].

La síntesis de astaxantina en *P. rhodozyma* se reduce drásticamente en condiciones microaerófilas, acumulándose principalmente β -caroteno y β -zeacaroteno [34]. Esto sugiere que los grupos oxigenados de la astaxantina sólo se forman en presencia de ciertos niveles de oxígeno. Se ha sugerido mantener una tensión de oxígeno mayor al 30% para una adecuada producción de astaxantina. La presencia de oxígeno singulete y peróxido de hidrógeno fotogenerados artificialmente o bien, el uso de inhibidores de la cadena respiratoria como la antimicina, en presencia de luz, inducen la síntesis de astaxantina en *P. rhodozyma* [35-36].

Otro mecanismo regulador de la síntesis de carotenoides es la represión catabólica por glucosa. En *P. rhodozyma*, las concentraciones altas de glucosa

promueven además un metabolismo fermentativo [34]. Entre diversas fuentes de carbono probadas, la celobiosa produce la mayor pigmentación, pero otros disacáridos como la maltosa y la sacarosa también dan buena pigmentación. Aparentemente las fuentes de carbono de asimilación lenta promueven una mayor pigmentación de las células, pero a expensas de un menor crecimiento.

Se han reportado diversos factores que estimulan la formación de carotenoides como son: el incremento de fuente de carbono [37], la presencia de aminoácidos como metionina, valina, glicina, triptófano, fenilalanina, tirosina y leucina [38-39], el uso de fuentes de carbono como el glicerol [40-41], el etanol [42], el acetato [43], la xilosa [44], el succinato, residuos de jitomate, los niveles altos o bajos de fosfatos, la limitación de hierro, cobre, zinc o manganeso, el pH, los inhibidores de fosfatasas como fluoruro de sodio [45] entre otros factores.

1.3 *Phaffia rhodozyma*. Características.

La levadura *P. rhodozyma* es un basidiomiceto y fue descubierta y aislada por Herman Jan Phaff y colaboradores en 1960, a partir de exudados de la capa mucoide de los árboles presentes en las regiones montañosas de Alaska y Japón. Durante el estudio de esta levadura, una de sus propiedades se hizo evidente: en agar extracto de levadura-malta crecían colonias de color rosa, lo que sugería la presencia de carotenoides. Una característica única de esta levadura es su capacidad de fermentar azúcares como la glucosa, maltosa, sacarosa y rafinosa produciendo etanol y gas [46]. Se encuentra filogenéticamente relacionada con

otros géneros de levaduras productoras de carotenoides como *Rhodotorula* y *Cryptococcus*, pero estas levaduras presentan un metabolismo aerobio estricto.

Arthur Andrews en la Universidad de California, EUA descubrió que el principal carotenoide presente en esta levadura es la astaxantina (del 40 al 95% de los carotenoides totales dependiendo de la cepa y medio de cultivo) [47,49]. El además, observó que la astaxantina presente en esta levadura tiene una configuración absoluta 3R,3R' [48]. Esto se contrapone con la mayoría de las configuraciones presentes en la naturaleza, lo que sugiere una vía biosintética única. Además de sintetizar astaxantina, produce equineno-3-hidroxi equinenoa y foenicoxantina [49].

El estado sexual de *P. rhodozyma* se denomina *Xanthophyllomyces dendrorhous* [50].

La temperatura óptima de crecimiento de *P. rhodozyma* es de 22 a 25°C, en medios con concentraciones de NaCl de hasta un 9% y es auxótrofa para biotina. Presenta actividad de ureasa, produce polisacáridos similares al almidón, licua la gelatina y no tiene actividad lipolítica [7].

Las cepas silvestres de *P. rhodozyma* pueden producir, como máximo, de 300 a 450 µg de astaxantina por gramo de levadura [51], mientras que en cepas mutantes se ha logrado obtener hasta 3000 µg de astaxantina por gramo de levadura; sin embargo éstas cepas resultan ser muy inestables, por lo que se éstas deben mejorarse, así como seguir trabajando en la optimización del medio de cultivo para una mayor producción del pigmento.

1.4 Astaxantina. Propiedades fisicoquímicas.

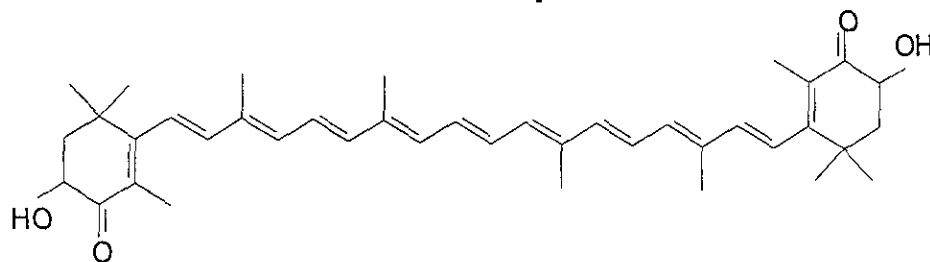


Fig. 3 Estructura de la astaxantina

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β -caroten-4,4'-diona) es un oxicarotenoide de fórmula molecular $C_{40}H_{52}O_4$ (Fig. 3) y un peso molecular de 596.86. Forma cristales color violeta oscuro, de apariencia fina y su punto de fusión va de 217 a 219°C [46,52]. Es insoluble en soluciones acuosas y solubles en solventes orgánicos como el diclorometano, el cloroformo, la acetona y el dimetilsulfóxido entre otros. Es sensible al oxígeno, la luz, el calor, los ácidos y álcalis, por lo que se debe de proteger contra estos agentes durante su extracción. Absorbe luz en el rango de UV, presentando una λ máx (nm) de: 468, en éter de petróleo; 472, en hexano; 478, en etanol; 480, en acetona; 485, en tetracloruro de carbono y 498, en cloroformo [46,52-53].

2. Antecedentes

Considerando el contenido total de lípidos presente en las levaduras han surgido diferentes clasificaciones. Una clasificación considera a dos grupos [52]:

- a) Las especies que contienen del 18 al 20% de lípidos respecto a su peso seco
- b) Las especies que contienen del 20 al 80% de lípidos respecto a su peso seco.

Otra clasificación sugiere 3 divisiones de acuerdo al contenido de lípidos de su peso seco [53]:

- a) menos del 5%
- b) del 5 al 15% y
- c) más del 15%.

Sin embargo, el contenido de lípidos en levaduras puede variar ampliamente de acuerdo a sus condiciones de crecimiento, particularmente si crecen con un exceso de fuente de carbono que aumente la producción de lípidos. Por lo que una clasificación más acertada se basa en una prueba bioquímica que identifica la presencia de la enzima **ATP-citrato liasa** (ATP-CL) [54]. Considerando así a 2 grupos:

- a) levaduras *oleaginosas*, si la enzima se encuentra presente y
- b) levaduras *no oleaginosas*, si no se encuentra la enzima.

2.1 Factores que promueven la acumulación de lípidos en levaduras.

2.1.1. Influencia del medio de cultivo

El principal requisito para la acumulación de lípidos en levaduras es una deficiencia en un nutriente y un exceso de la fuente de carbono. En cultivos en lote, la proliferación celular, cuando el nutriente limitante se ha acabado, muestra que el exceso de la fuente de carbono sigue siendo asimilada por la célula y canalizada a la biosíntesis de lípidos. Este patrón de 2 estados es más pronunciado en levaduras oleaginosas. La fuente de nitrógeno es usualmente el nutriente limitante, utilizándose una relación C:N de 50:1. Sin embargo, otros nutrientes limitantes utilizados son: fosfatos, sulfatos y magnesio [55-56].

2.1.1.1 Fuente de carbono

El tipo de la fuente de carbono utilizado para crecer afecta considerablemente el contenido de lípidos en células. Variaciones en el contenido de lípidos de 39, 47, 57 y 62% se han observado en *Rhodotorula gracilis* crecida en celobiosa, sacarosa, glucosa y xilosa, respectivamente [57]. Similarmente en *Candida curvata* crecida en etanol, glucosa, lactosa y xilosa se obtienen valores de lípidos del 30, 33, 40 y 49% respectivamente [58].

Variaciones en el contenido de lípidos y en la composición de los ácidos grasos ocurren cuando las levaduras se crecen en presencia de ácidos grasos [59-60]. Estos sustratos modifican la longitud de la cadena de ácidos grasos, así como el grado de insaturaciones de las mismas, por lo que los ácidos grasos o sus ésteres han sido utilizados como sustratos o co-sustratos en levaduras oleaginosas, para incrementar el contenido específico de un ácido graso en particular.

El etanol es un sustrato que potencializa la producción de lípidos [61-63]. Se ha observado que en *P. rhodozyma*, si se adicionan pequeñas cantidades de etanol, se incrementa la producción de astaxantina [64]. Este incremento se relaciona probablemente con la alteración en la respiración y la consiguiente formación de especies de O₂ reactivas. También es posible que el etanol induzca enzimas específicas como el sistema P450 oxidasa. La adición de acetato al medio de cultivo también incrementa la producción de carotenoides [38]. Se ha propuesto, que tanto el etanol como el acetato inhiben las enzimas del ciclo del glioxilato, produciendo un incremento en la producción de acetyl-CoA [64].

Otra posibilidad es que el etanol provoque un aumento en la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa, lo que conlleva a la desregulación de la enzima, la cual juega un papel clave en la biosíntesis de isoprenoides [64].

2.1.1.2 Fuente de nitrógeno

La concentración de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo tiene una gran importancia en el contenido de lípidos en la mayoría de las levaduras [52]. Cuando la concentración de la fuente de carbono está en exceso y se incrementa la fuente de nitrógeno se produce un decremento en la concentración total de lípidos. Se ha reportado que las altas concentraciones de lípidos se obtienen cuando se utiliza un fuente de nitrógeno orgánica, en comparación de cuando se utiliza una fuente de nitrógeno inorgánica [65]. En la levadura oleaginosa *Rhodospiridium toruloides* el contenido de lípidos se incrementa de un 18% con

NH₄Cl como fuente de nitrógeno, hasta arriba del 50% de lípidos en peso seco cuando se utilizan glutamato, urea o arginina como fuente de nitrógeno [66]. El incremento de lípidos en células crecidas en glutamato viene acompañado por un marcado incremento en la concentración intracelular de citrato y su posterior excreción de la célula [66].

Estudios en *P. rhodozyma* han demostrado, que al crecer a la levadura en concentraciones decrecientes de sulfato de amonio en un rango de 60 a 10 mM, existe un incremento en el contenido total de lípidos y, por lo tanto, un incremento en la producción de astaxantina de 140 a 230 µg/g, en concentraciones de 61 a 12.9 mM de sulfato de amonio respectivamente, este incremento va acompañado de una disminución de la síntesis de proteínas [56].

En el alga *H. pluvialis*, la limitación de nitrógeno también es un factor importante para la acumulación de carotenoides [67]. Estos datos sugieren que la reducción en la síntesis de proteínas puede estimular la biosíntesis de carotenoides.

2.1.1.3. pH, temperatura y aireación.

No existen reportes de cambios significativos en el contenido de lípidos cuando se crecen las células a diferentes valores de pH. Tal es el caso de *Candida* 107, que no presentó cambio en su contenido lipídico cuando se creció en un medio de cultivo con valores de pH de 3 a 7.5 [68].

Estudios en *P. rhodozyma* han demostrado que cambios en el pH afectan el crecimiento y la producción de pigmentos. El pH óptimo para la producción de

astaxantina en fermentador a pH controlado es de 4.5. A pH de 3.5 se acumula β -zeacaroteno, mientras que a pH de 4.5 no se encuentra presente este compuesto [69].

La temperatura afecta considerablemente el contenido de lípidos en las levaduras [55-53], ya que se ha observado que existe un aumento en la acumulación de lípidos cuando desciende la temperatura. En la levadura oleaginosa *Candida* 107 se observó que el contenido lipídico varió de 17.9 a 21.5 y a 14% a temperaturas de 19, 30 y 33°C, respectivamente [70].

2.2 Biosíntesis de lípidos en levaduras.

2.2.1 Orígenes de acetil-CoA

La biosíntesis de lípidos es un proceso citosólico y depende del suministro de moléculas de acetil-CoA debido a que ésta es la unidad precursora básica para la biosíntesis (Fig. 3). Estas unidades provienen de la fuente de carbono utilizada para crecer. Los azúcares C_6 pueden ser catabolizados vía glucólisis o bien, por la vía de las pentosas para generar piruvato. Debido a que no existe la enzima citosólica piruvato deshidrogenasa en levaduras, el piruvato es transportado dentro de la mitocondria donde es oxidado a acetil-CoA. El acetil-CoA puede ser liberado al citosol vía varios compuestos: citrato, acetato o acetil-carnitina [71-72]. Una cuarta fuente de acetil-CoA citosólico es originado por el catabolismo de las pentosas. Se ha visto que existe una inducción de la enzima pentulosa fosfocetolasa, cuando las levaduras crecen aeróbicamente en xilosa. Esta enzima

cataliza el rompimiento de la xilulosa 5-fosfato para generar gliceraldehído-3-fosfato y acetil fosfato [73-74], este último compuesto es convertido en acetil-CoA en el citosol, por la enzima fosfotransacetilasa.

En levaduras no oleaginosas como *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis*, la acetil-CoA proviene de la mitocondria vía carnitina acetiltransferasa, proporcionando las unidades necesarias para la biosíntesis de lípidos [75]. En levaduras oleaginosas como en células de mamíferos, se cree que el citrato es el principal donador de unidades de acetil-CoA para la biosíntesis de lípidos [76]. El citrato es exportado de la mitocondria vía citrato-malato translocasa al citosol [77], en donde es escindido por la enzima **ATP-citrato liasa**, generando acetil-CoA y oxaloacetato. Este es el único mecanismo conocido de metabolismo de citrato citosólico y no ha sido detectado en microorganismos no oleaginosos [78-79].

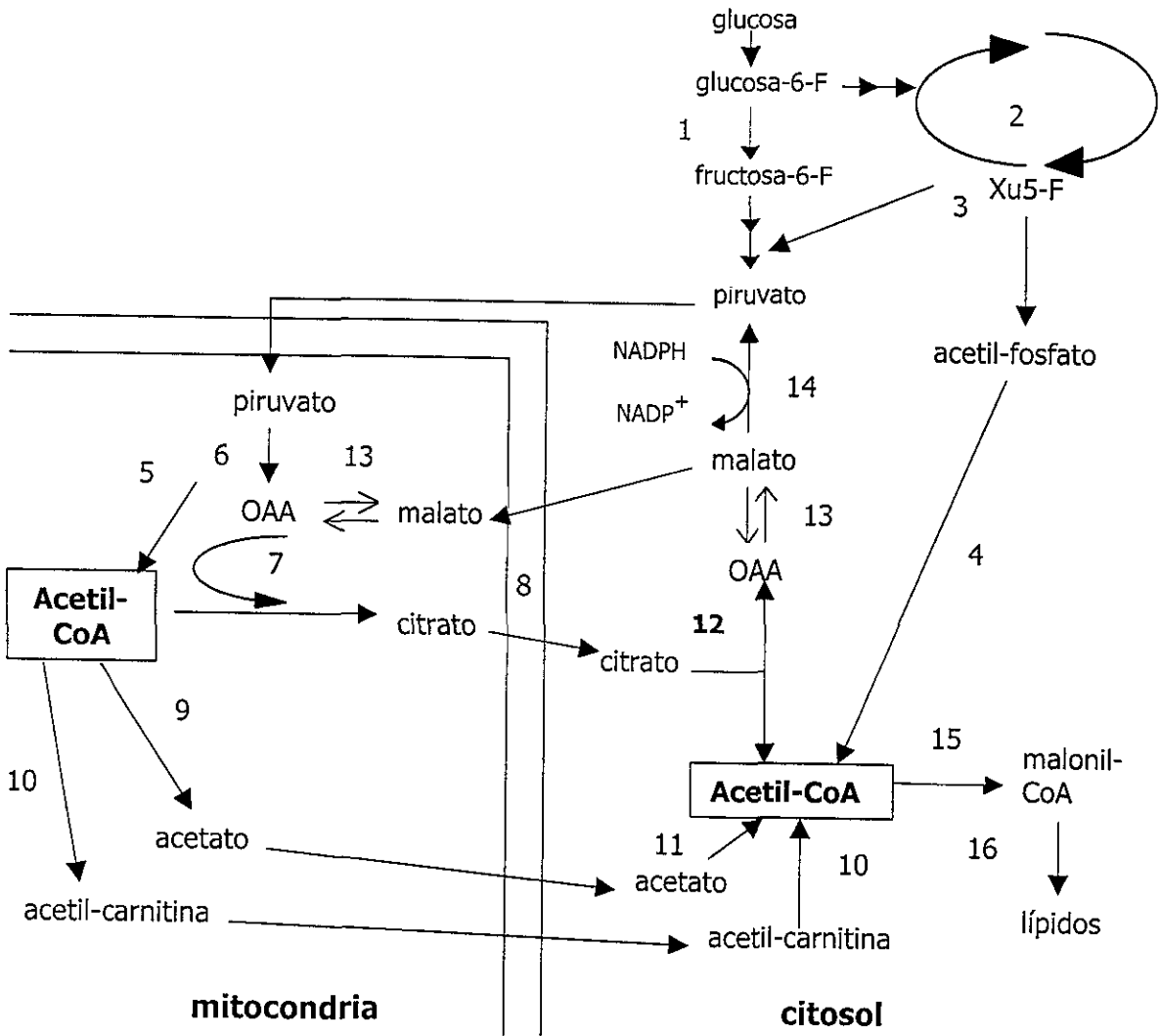


Fig. 4 Rutas metabólicas que proporcionan las unidades de acetil-CoA necesarias para la biosíntesis de lípidos en levaduras.

1. glucólisis; **2.** ciclo de las pentosas; **3.** fosfoacetolasa; **4.** fosfotransacetilasa; **5.** piruvato deshidrogenasa; **6.** piruvato carboxilasa; **7.** citrato sintasa; **8.** sistema citrato/malato translocasa; **9.** acetil-CoA hidrolasa; **10.** acetil-carnitina transferasa; **11.** acetil-CoA sintasa; **12.** ATP-citrato liasa; **13.** malato deshidrogenasa; **14.** enzima málica; **15.** acetil-CoA carboxilasa; **16.** complejo para la síntesis de lípidos.

OAA: oxaloacetato; **Xu5-F:** xilulosa 5-fosfato.

2.2.2. Regulación de la biosíntesis de lípidos en levaduras.

Los 2 principales mecanismos que deben ser estudiados para entender más acerca de la regulación de la biosíntesis de lípidos en levaduras son:

- a) Conocer los factores que controlan la biosíntesis de ácidos grasos, incluyendo cómo se regula la longitud de la cadena y el grado de insaturación y
- b) Entender el mecanismo de la acumulación de lípidos, incluyendo el flujo de carbono a acetil-CoA, en levaduras oleaginosas.

La biosíntesis de lípidos en levaduras no oleaginosas está controlada principalmente a nivel de la acetil-CoA carboxilasa y la ácido graso sintasa. Cuando se crecen las levaduras en presencia de ácidos grasos exógenos existe una represión de ambas enzimas [80].

El citrato estimula la actividad de la acetil-CoA carboxilasa, pero las concentraciones requeridas son superiores a las que ocurren en condiciones fisiológicas [81].

En levaduras oleaginosas la enzima ATP-CL es necesaria para la acumulación de lípidos, sin embargo, está claro que la regulación de la biosíntesis de ácidos grasos no está dada por un paso único, sino que está regulada por varios pasos metabólicos [82]. El control de la biosíntesis de ácidos grasos opera a nivel de la glucólisis, del metabolismo del citrato mitocondrial, del transporte de sustratos al citosol, de la generación de acetil-CoA citoplasmático y la conversión de este último a malonil-CoA (Fig. 4).

Estudios bioquímicos en levaduras oleaginosas han aportado evidencia experimental en cuanto a la regulación de la biosíntesis de lípidos (Fig. 5), generándose la siguiente hipótesis:

Existe un decremento de AMP cuando se crecen las levaduras en una fuente limitante de nitrógeno [83]. Lo anterior conlleva a la subsecuente inactivación alostérica de la enzima mitocondrial NAD^+ -isocitrato deshidrogenasa [76,81], previniendo así la formación innecesaria de ATP.

El isocitrato es acumulado dentro de la mitocondria y entra en equilibrio con el citrato vía la enzima reversible aconitasa, la cual no se ve afectada por cambios en la carga energética de la célula. Éste citrato es exportado fuera de la mitocondria por la enzima citrato/malato translocasa y una vez en el citosol, es escindido por la enzima ATP-CL en acetil-CoA y oxaloacetato. El acetil-CoA proporcionará las unidades carbonadas necesarias para la biosíntesis de lípidos y el oxaloacetato será convertido a malato por la enzima malato deshidrogenasa y posteriormente descarboxilado a piruvato [82].

Habrà la inhibición por retroalimentación tanto del flujo del citrato como de la enzima ATP-CL, por productos finales del metabolismo de lípidos, como son ácidos grasos, carotenoides, etc. [77].

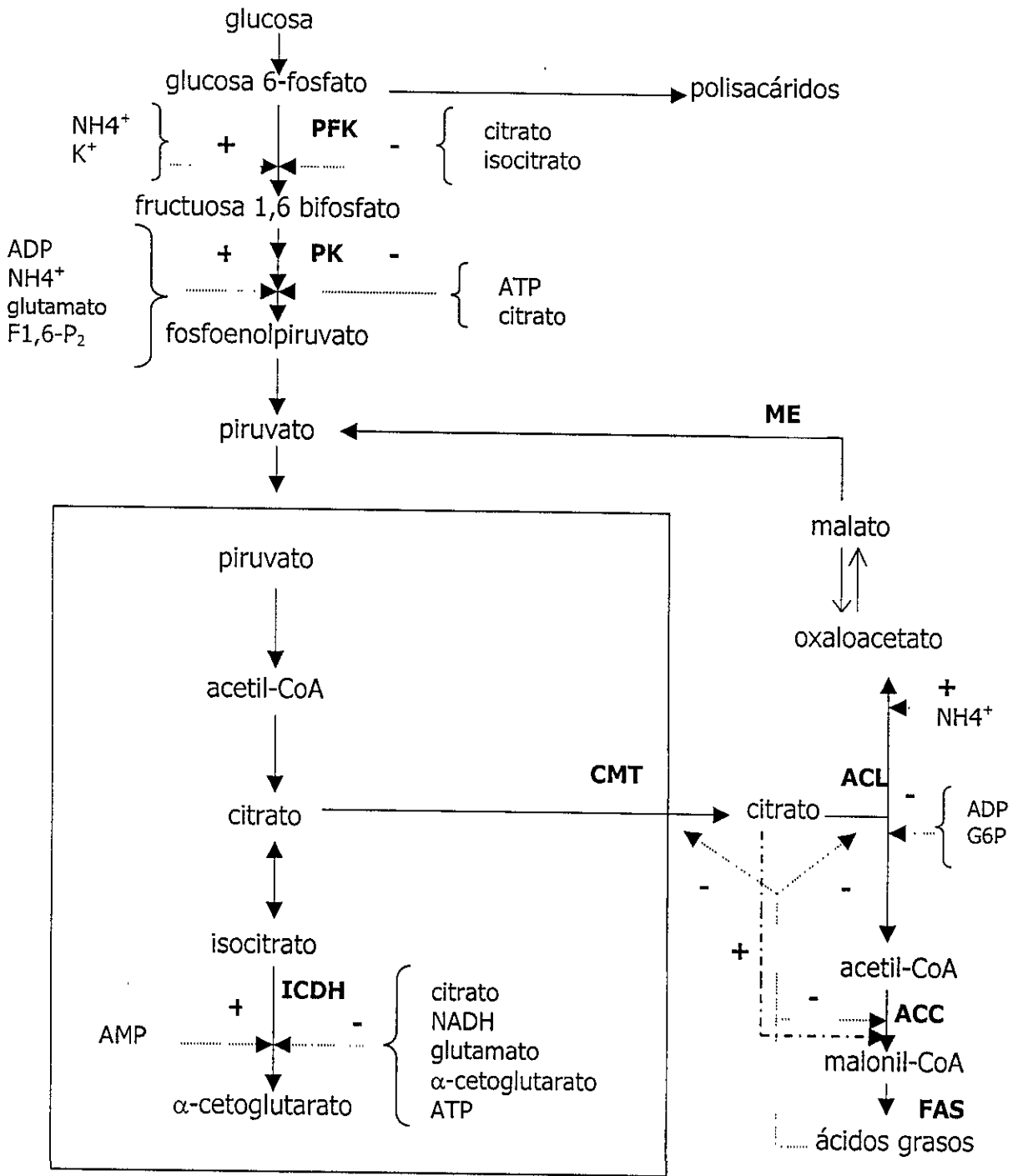


Fig. 5 Regulación de la biosíntesis de lípidos en levaduras

PKF: fosfofructocinasa; **CMT:** citrato/malato translocasa; **ICDH:** NAD⁺-isocitrato deshidrogenasa; **PK:** piruvato cinasa; **ACL:** ATP-citrato liasa; **ACC:** acetil-CoA carboxilasa; **FAS:** complejo ácido graso sintetasa; **ME:** enzima málica; + activador; - inhibidor alostérico.

Bajo las condiciones anteriores, la síntesis tanto de proteínas como de ácidos nucleicos disminuye, por lo que la biosíntesis de lípidos se ve favorecida; esta acumulación no se debe a que la velocidad de síntesis de lípidos aumente (máximo 20%), sino más bien al cese de otras actividades metabólicas [83].

Otros estudios han demostrado el papel que juegan algunas enzimas en la acumulación de lípidos. Se ha confirmado la presencia de la enzima fosfoacetolasa en las levaduras oleaginosas *Candida* 107 y *Rhodotorula graminis*. Esta enzima también proporciona unidades de acetil-CoA para la biosíntesis de lípidos [78].

Se han logrado clonar los genes de la ATP-CL de hígado de rata en plantas, lo cual sólo permite una modesta producción del 16% de lípidos [85], por lo que la ATP-CL no explica completamente la acumulación de lípidos.

Se ha reportado una relación directa entre la acumulación de lípidos y la actividad enzimática de la enzima málica en los hongos *Mucor circinelloides* y *Aspergillus nidulans*. Esta enzima cataliza la descarboxilación oxidativa del malato dando como productos: piruvato, CO₂ y NADPH. Se ha propuesto que esta enzima provee de las unidades necesarias de NADPH para la biosíntesis de lípidos, vía el complejo ácido graso sintetasa [84].

3. Justificación del proyecto

P. rhodozyma ha sido un microorganismo de amplio estudio debido a las características que presenta: 1) la producción de astaxantina, pigmento ampliamente utilizado en la acuicultura y por sus propiedades antioxidantes en animales y humanos y 2) por ser la única levadura carotenogénica que fermenta azúcares.

Por ser *P. rhodozyma* una levadura carotenogénica podría considerarse como un microorganismo oleaginoso, sin embargo, esta clasificación sólo podrá ser la correcta si se identifica la presencia de la enzima ATP-CL, prueba bioquímica necesaria para la clasificación de las levaduras en oleaginosas y no oleaginosas.

Se han llevado a cabo diversos estudios de *P. rhodozyma* y han consistido principalmente en la manipulación y optimización del medio de cultivo para una mayor producción de pigmentos, sin embargo, pocos han sido los estudios relacionados con su fisiología y bioquímica.

Por trabajos anteriores en nuestro laboratorio, se ha visto que en altas concentraciones de glucosa y adicionando citrato al medio de cultivo se estimula la producción de carotenoides. Así mismo se ha propuesto que el citrato mitocondrial, vía la enzima ATP-CL, es la principal fuente de acetil-CoA necesaria para la biosíntesis de lípidos en levaduras oleaginosas. Por otro lado, se sabe que la biosíntesis de lípidos y carotenoides provienen de este mismo precursor, por lo que el identificar la presencia de la enzima ATP-CL en *P. rhodozyma* no sólo

serviría para la clasificación de esta levadura, sino que proporcionaría información necesaria para el mayor conocimiento de la regulación metabólica de la biosíntesis de lípidos, y por ende de carotenoides en esta levadura.

4. Hipótesis

- ❖ *Phaffia rhodozyma* podría considerarse un microorganismo oleaginoso debido a que es una levadura carotenogénica, por lo que pensamos que se encontrará presente la enzima ATP-citrato liasa.
- ❖ Esperamos observar un efecto del citrato sobre el crecimiento y la producción de pigmentos cuando éste se adiciona en diferentes etapas del crecimiento de *P. rhodozyma*; así mismo se espera observar una diferencia en la utilización del citrato cuando es adicionado en altas y bajas concentraciones de glucosa.
- ❖ Si la enzima ATP-CL se encuentra presente en esta levadura, será posible encontrar carotenoides marcados provenientes de la acetil-CoA formada a partir del ácido cítrico marcado con C^{14} adicionado al medio de cultivo.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general:

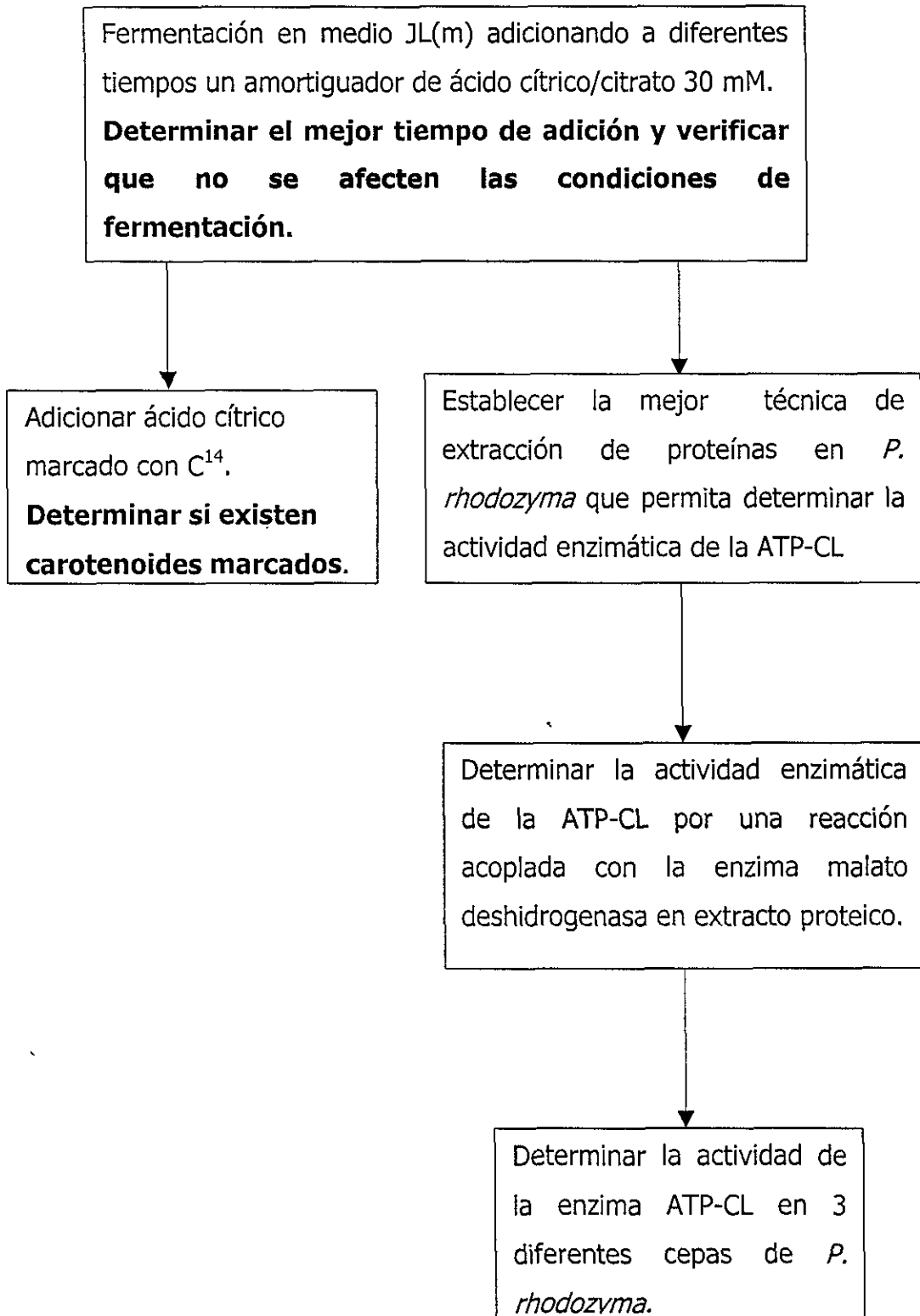
- ❖ Identificar la presencia de la enzima ATP-citrato liasa en la levadura *Phaffia rhodozyma*.

5.2 Objetivos particulares:

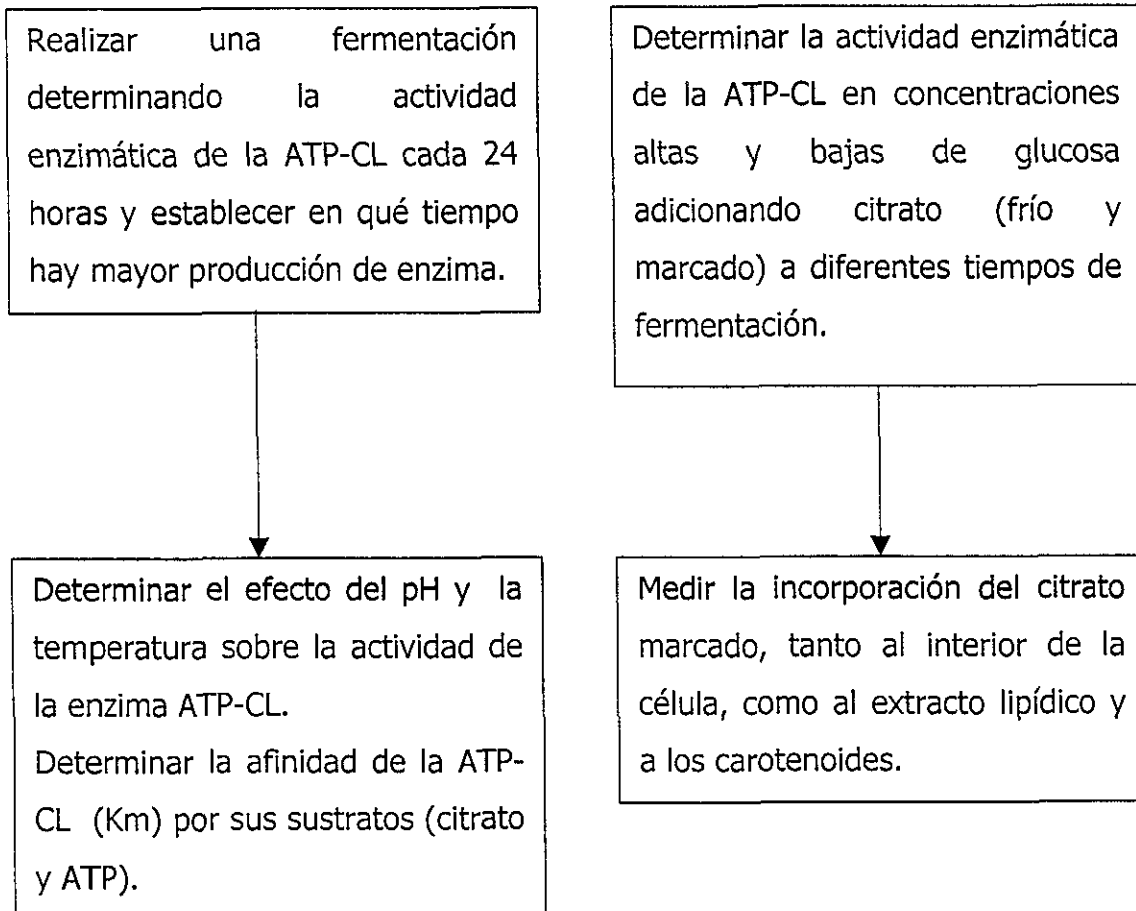
- ❖ Verificar el efecto del citrato en el crecimiento y la producción de carotenoides en la levadura *P. rhodozyma* en cultivo en lote, utilizando un medio de cultivo completo en bajas y altas concentraciones de glucosa.
- ❖ Identificar la presencia de carotenoides marcados radioactivamente cuando se adiciona citrato marcado con C^{14} , como evidencia de la presencia de la enzima ATP-CL.
- ❖ Medir la actividad de la enzima ATP-CL en extracto crudo de proteínas y determinar a qué tiempo de la fermentación hay mayor producción de la enzima.
- ❖ Determinar el pH óptimo y temperatura óptima de la enzima ATP-CL.
- ❖ Determinar la afinidad de la ATP-CL por sus sustratos (citrato y ATP).

6. Estrategia

6.1 Experimentos preliminares



6.2 Experimentos finales



7. Metodología

7.1 Procedimiento para realizar una fermentación.

7.1.1 Preparación del preinóculo

Sembrar por estría una caja de agar YM (ver anexo 2) con la levadura *P. rhodozyma* NRRL Y 10922 e incubar a 22°C durante 48 horas. Una vez crecido el microorganismo tomar una asada y transferirla a un matraz Erlenmeyer de 250 mL con deflectores con caldo YM (ver anexo 2) e incubar a 22°C con agitación a 150 rpm durante 24 horas.

7.1.2 Inoculación del medio de producción.

EL preinóculo se ajusta a una absorbancia de 1.5 con solución salina isotónica (SSI) a una longitud de onda de 540 nm.

Se inoculan 2 mL del preinóculo ajustado por cada 100 mL de medio de cultivo.

Se reparten 30 mL del medio de cultivo inoculado en matraces Erlenmeyer de 250 mL con deflectores.

7.2 Determinación de crecimiento

7.2.1 Determinación de la curva patrón.

Se crece a *P. rhodozyma* en caldo YM a 22°C y 150 r.p.m. de agitación durante 48 horas, se lavan las células 2 veces por centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos con solución salina isotónica. Decantar el sobrenadante y el sedimento se resuspende en un volumen igual con SSI. De esta suspensión se hacen

diluciones, ajustando la absorbancia en el espectrofotómetro a 540 nm en un rango de 0.1 a 1.2. De cada dilución se toman triplicados de 3 mL cada uno y se colocan en charolas de aluminio secas y previamente pesadas. Dejar secar en un horno a 60°C hasta obtener el peso constante.

Con los pesos obtenidos se puede realizar la curva patrón de crecimiento, graficando la absorbancia contra el peso seco en mg de células por mL; obteniendo la ecuación de la recta, con la cual se realizan los cálculos de crecimiento en todos los experimentos por interpolación de la absorbancia (ver gráfica anexo 1).

7.2.2 Determinación de crecimiento en muestras

Tomar 1 mL de cultivo, centrifugar durante 5 minutos a 5000 r.p.m. y decantar el sobrenadante, el sedimento se resuspende en SSI para obtener la dilución necesaria que entre dentro del rango de la curva patrón. Homogeneizar la suspensión y medir en el espectrofotómetro a 540 nm. El valor de la absorbancia se interpola en la curva para obtener el crecimiento en mg de células por mL, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$y = (mx + b) * F.D.$$

$$y = 0.6372x * F.D.$$

y = Absorbancia

m = pendiente = 0.6372

x = mg células/mL

b = ordenada al origen = 0

F.D. = factor de dilución

7.3 Determinación de pH

La determinación del pH se realiza de la siguiente forma: se toman 2 mL de cultivo de la levadura, centrifugar y a partir del sobrenadante determinar el pH con un potenciómetro, el cual contiene un electrodo combinado y calibrado con amortiguadores a pH 4 y pH 7.

7.4 Determinación de glucosa

Método enzimático, colorimétrico, de punto final, TRINDER, GOD-POD. (KIT)

FUNDAMENTO.

Este método utiliza dos enzimas que son: la glucosa oxidasa y peroxidasa (GOD/POD). La glucosa es oxidada por la glucosa oxidasa en solución acuosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Este último reacciona en presencia de la peroxidasa con el fenol y la 4-aminofenazona, para formar un compuesto de color rojo. La intensidad de color que se desarrolla es proporcional a la concentración de glucosa y puede ser medida espectrofotométricamente entre 460 y 560 nm.

MÉTODO.

Se marcan los tubos correspondientes a la muestra, el blanco y el patrón y se adicionan los reactivos según lo marca la siguiente tabla:

	Blanco	Patrón	Muestra
Agua destilada	0.01 mL	*	*
Patrón	*	0.01 mL	*
Muestra	*	*	0.01 mL
Mezcla de reacción	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL

La muestra se toma del sobrenadante obtenido para la determinación de pH.

Mezclar bien e incubar por 10 minutos a 37°C, evitando que los tubos estén expuestos a la luz. Una vez terminada la incubación se lee en el espectrofotómetro a 510 nm, durante los 10 minutos posteriores a la incubación.

La concentración de glucosa contenida en las muestras se calcula con la concentración del estándar de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Glucosa (mg/dL)} = (\text{Absorbancia de la muestra} / \text{Absorbancia del estándar}) * 100$$

$$\text{Glucosa (mmol/L)} = (\text{Absorbancia de la muestra} / \text{Absorbancia del estándar}) * 5.5$$

La reacción es lineal hasta 500 mg/dL (27.75 mmol/L); a concentraciones mayores es necesario realizar diluciones de la muestra con SSI.

Las diluciones necesarias en los experimentos se muestran en la siguiente tabla:

	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Glucosa 1%	1:25	1:25	S.D.*	S.D.*	S.D.*
Glucosa 6%	1:100	1:100	1:100	1:10	S.D.*

*S.D.: sin dilución

7.5 Determinación de carotenoides totales

La cuantificación de pigmentos se hizo de acuerdo con Sedmak [86].

Se toman 0.5 mL de cultivo y se centrifuga a 5000 rpm durante 5 minutos; decantar el sobrenadante. Se agregan 0.5 mL de perlas de vidrio y se homogeneiza en un vórtex. Después de esto, se agrega un mL de DMSO (dimetil sulfóxido) y se incuba durante un minuto en baño maría a 58°C y se agita en

vórtex durante 45 segundos, con el fin de romper la pared celular de las levaduras. Una vez agitados los tubos se adicionan 0.2 mL de NaH_2PO_4 . El pigmento se extrae adicionando 2 mL de una mezcla de solventes orgánicos: hexano / acetato de etilo (1:1) y agitando en vórtex durante un minuto.

Se centrifugan las muestras a 5000 rpm durante 10 minutos y con una pipeta Pasteur se extrae la fase orgánica y se mide en el espectrofotómetro a 480 nm. Es importante señalar que toda la extracción se realiza en condiciones de oscuridad para proteger a los carotenoides de su descomposición por la luz.

Para determinar la concentración de carotenoides presentes en una muestra se utiliza la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g de carotenoides} = ((A)(10^6) / ({}^{1\%}E_{1\text{cm}})(100)) * \text{F.D.}$$

$$\mu\text{g de carotenoides/mL} = \mu\text{g de carotenoides} / 0.5 \text{ mL de muestra}$$

A	= Absorbancia observada
${}^{1\%}E_{1\text{cm}}$	= coeficiente de extinción específico para astaxantina en hexano = 2100
F.D.	= factor de dilución = 2

7.6 Separación y cuantificación de astaxantina.

7.6.1 Separación

La separación del pigmento se hace por medio de una cromatografía en capa fina en placas de sílica gel 60 (Kiesel DC-alufalien sin indicador fluorescente) de 20 X 20 cm X 0.2 mm de espesor.

Una vez que se extraen los carotenoides de la levadura y que se determina la absorbancia, se evapora el hexano presente en las muestras con un flujo de gas

nitrógeno y se sellan los tubos con papel parafilm, se mantienen en la oscuridad y congelación hasta la aplicación de la cromatoplaca.

La muestra se resuspende en hexano, la cantidad de solvente depende de la absorbancia obtenida: se aplicaron 4 μL de muestra y 1 μL de estándar de astaxantina, proporcionado por Hoffman La Roche. (ver preparación del estándar en anexo 1).

La cromatoplaca se eluye durante 15 minutos utilizando como fase móvil una mezcla de solventes que contiene éter de petróleo y acetona, en proporción de 80:20 en una cámara de elución previamente saturada (1 hora).

7.6.2 Cuantificación

Una vez eluída la placa, se cuantifica la astaxantina en un densitómetro (CAMAG), lo cual consiste en hacer pasar un haz de luz a una longitud de onda de 480 nm; la cantidad de luz absorbida y emitida forma un pico de absorción, el área bajo la curva es integrada por el mismo aparato en mV.

Para determinar la concentración de astaxantina se utiliza la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Área del estándar}}{\text{Área de la muestra}} \times [\text{estándar}] = [\text{muestra}] \times \text{F.D.} = [\text{muestra}]_{\text{real}}$$

7.7 Extracción de proteínas

7.7.1 Método de polvos de acetona

Se toman 25 mL de cultivo de la levadura y se filtran al vacío por un filtro buchner utilizando un papel filtro Whatman No. 41, se añaden 50 mL de SSI

para lavar las células y después 25 mL de acetona fría. Se deja evaporar la acetona y se guarda el papel filtro con las levaduras en congelación hasta el momento de hacer el extracto proteico.

Para realizar el extracto proteico se raspa el papel filtro con la espátula y se colocan los polvos de levadura en un mortero, en el cual se trituran con hielo seco. El macerado se resuspende en 5 mL de un amortiguador de fosfatos 50 mM a pH = 7.2. Se centrifuga durante 45 minutos a 20,000 rpm y a una temperatura de 0 a 4°C. El sobrenadante se guarda en un tubo eppendorff en congelación hasta la determinación enzimática. El sedimento se desecha.

7.7.2 Extracción de proteína total

Se toma 1 mL de cultivo, se centrifuga a 5000 rpm durante 5 minutos y se decanta el sobrenadante. Se resuspende el sedimento en un mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10% y se congela durante toda la noche (mínimo 12 horas).

Transcurrido este tiempo, las muestras se descongelan y se dejan hidrolizar durante una hora en 1 mL de NaOH 0.4 N.

7.8 Determinación de proteína por el método de Lowry

FUNDAMENTO

Este método tiene como base la formación de un compuesto colorido entre el grupo fenólico de la tirosina (o grupo aromático en el caso del triptofano, histidina y fenilalanina) de las proteínas y del ácido fosfowolframomolibdico (color

oro) que oxida al grupo hidroxilo de la tirosina en condiciones alcalinas, dando un color azul intenso que se puede medir a 595 nm.

SOLUCIONES.

SOLUCIÓN A: Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1N

SOLUCIÓN B: Tartrato de sodio / potasio al 2%

SOLUCIÓN C: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1%

Al momento de utilizarse:

Solución de Lowry: **1.0 mL Sol. B + 1.0 mL Sol. C en 98 mL de Sol. A

Reactivo de Folin: Diluir la solución (2N) con un volumen de agua (1:2)

**Deben adicionarse en ese orden para evitar la precipitación.

MÉTODO.

Se toman 100 μL de la muestra y se afora a un volumen final de un mL con agua destilada. Se añaden 5 mL de la solución de Lowry y se agita en un homogenizador vórtex. Dejar reposar 10 minutos y se adicionan 500 μL de reactivo de Folin dejando reposar durante 30 minutos. Leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

Para poder hacer la cuantificación de proteínas en una muestra problema se realiza una curva patrón (por duplicado) utilizando albúmina sérica bovina en concentración de 1 mg de proteína en un mL de NaOH 0.1N.

* El color es estable de 30 minutos a 5 horas.

BSA mg/ μL	μL BSA	μL agua dest.
50	50	950
100	100	900
150	150	850
200	200	800
250	250	750

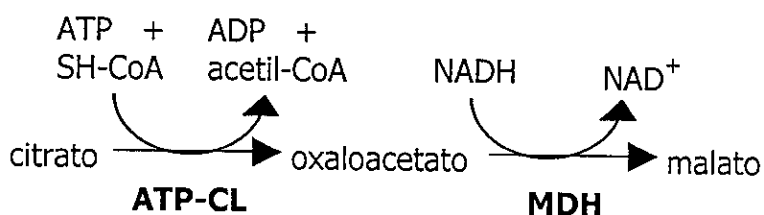
7.9 Determinación de la actividad enzimática de la ATP-CL

FUNDAMENTO

La determinación de la actividad enzimática de la enzima ATP-CL se basa en una reacción acoplada con la enzima malato deshidrogenasa dependiente de NADH [87].

La enzima ATP-CL cataliza la ruptura de citrato en acetil-CoA y oxaloacetato, este último es utilizado como sustrato por la enzima malato deshidrogenasa, consumiéndose NADH. La disminución de esta coenzima es la que se detecta espectrofotométricamente en la región de UV a 340 nm.

REACCIÓN



MEZCLA DE REACCIÓN

300 μ L	de	Extracto de proteína
322 μ L		0.5 M Tris-HCl (pH 8.4)
100 μ L		2 mM CoA-SH
10 μ L		10 mM NADH
50 μ L		0.2 M MgCl ₂
1,0 μ L		β -mercaptoetanol
100 μ L		0.2 M citrato de sodio
17 μ L		malato deshidrogenasa (MDH) (10 U)

Se lee a 340 nm a 25°C por 2 minutos cada 10 segundos. Transcurrido éste tiempo se inicia la reacción con 100 µL de ATP 0.2M y se mide otros 2 minutos cada 10 segundos.

El cálculo de la disminución neta de absorbancia se hace realizando una resta:

$$\text{Absorbancia inicial} - \text{Absorbancia final} = \text{disminución neta por la reacción.}$$

7.10 Determinación de radioactividad

A cada matraz Erlenmeyer de 250 mL con 30 mL de medio de producción se le adicionan 5 µCi de ácido cítrico marcado con C¹⁴ en los carbonos 1 y 5, en un amortiguador de ácido cítrico/ citrato 30 mM ajustado a diferente pH de acuerdo al tiempo de adición.

7.10.1 Determinación de radioactividad intracelular y

extracelular

Se toman 0.5 mL de cultivo, se lava 3 veces por centrifugación con solución salina isotónica. Del sobrenadante del primer lavado se guardan 100 µL para la determinación de radioactividad extracelular.

Al sedimento de células se le agregan 0.5 mL de perlas de vidrio y se adiciona 1 mL de DMSO, se incuba a 58°C durante 1 minuto y se agita en un homogeneizador vórtex durante otro minuto para romper la pared celular. Una vez hecho esto se toman 100 µL para la determinación de la radioactividad intracelular.

7.10.2 Determinación de radioactividad en carotenoides totales

Para la determinación de radioactividad en carotenoides totales se sigue el mismo método de extracción para carotenoides (sección 7.4). Del extracto orgánico se toman 0.5 mL para la determinación de radioactividad.

7.10.3 Determinación de radioactividad en astaxantina

Para la determinación de marca en astaxantina se sigue el mismo procedimiento de separación y cuantificación (secciones 7.5.1 y 7.5.2). Las placas son expuestas a autorradiografía durante 72 horas y después son reveladas (ver anexo 1).

7.10.4 Cuantificación de radioactividad en el contador de centelleo

Para hacer la cuantificación de marca, las muestras se colocan en un vial y se adicionan 4 mL de solución de centelleo (ver anexo 1). Se leen en el contador de centelleo durante un minuto. Para hacer el cálculo de las cuentas por minuto (cpm) totales por matraz deben tomarse en cuenta las respectivas diluciones.

8. Resultados

8.1 Identificación y caracterización de la enzima ATP-CL en P. rhodozyma

Con el objeto de determinar la presencia de la enzima ATP-CL en la levadura *P. rhodozyma*, se determinó la actividad de la enzima en la fracción soluble del extracto crudo de proteína, mediante una reacción acoplada con la enzima malato deshidrogenasa. En esta fracción se logró medir la actividad de la enzima ATP-CL, observándose un decremento de absorbancia cuando la reacción se inició con la adición de ATP. Una vez estandarizado el método de detección de la enzima se prosiguió a realizar una cinética de producción de la misma, observándose un pico máximo a las 72 h de fermentación (Fig. 6). Esta fermentación se llevó a cabo en medio completo de producción JL(m) con una concentración de glucosa del 6% como fuente de carbono.

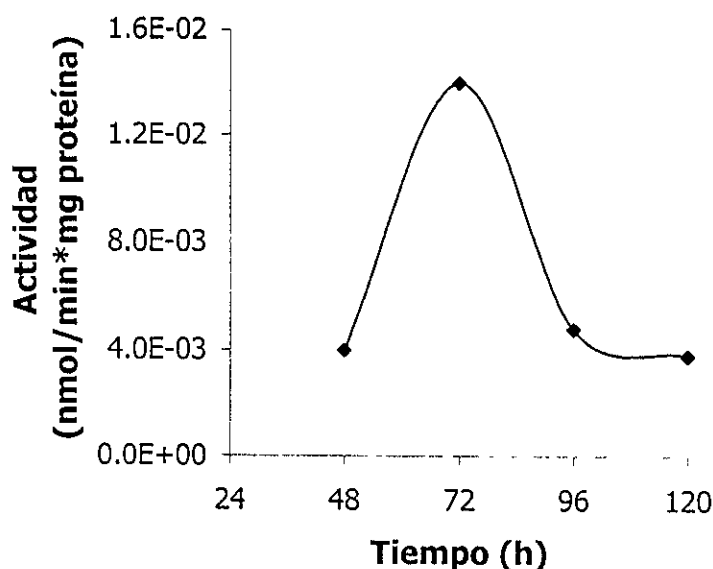


Figura 6. Cinética de producción de la enzima ATP-CL

Posteriormente se evaluó el efecto del pH sobre la actividad de la enzima ATP-CL, resultando la mejor actividad a un pH de 8.4 (Fig. 7). El efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima ATP-CL se realizó a un pH de 8.4 obtenido en el experimento anterior, siendo ésta de 26°C (Fig. 8). Las determinaciones se realizaron con extractos crudos obtenidos después de 72 h de fermentación utilizando el mismo medio de cultivo y la misma concentración de fuente de carbono de acuerdo con el resultado obtenido anteriormente.

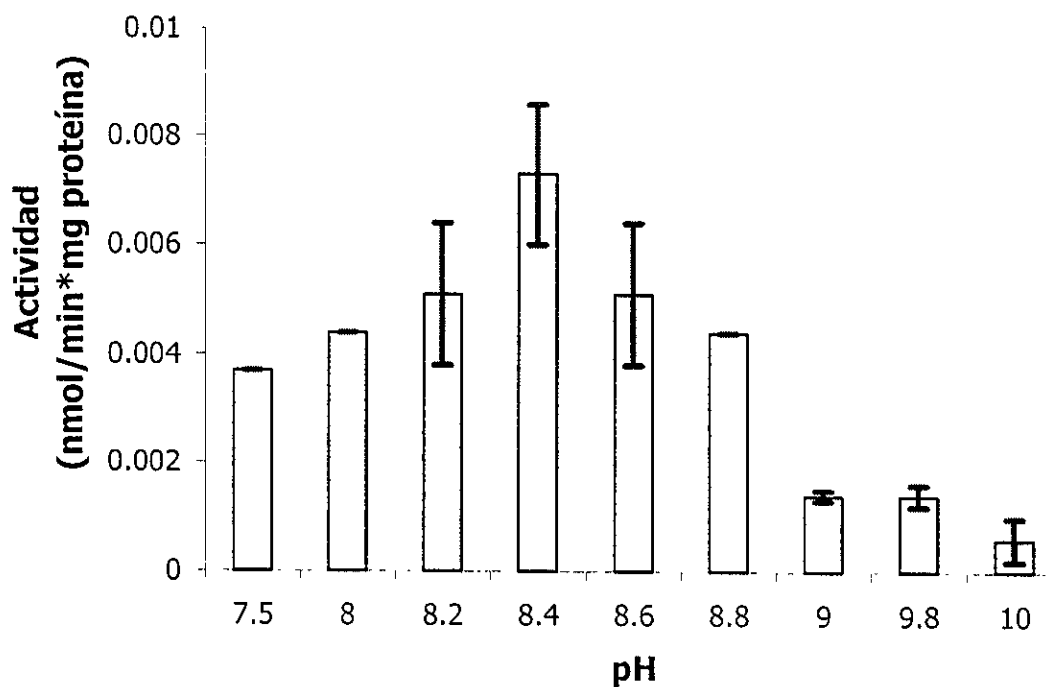


Figura 7. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima ATP-CL.

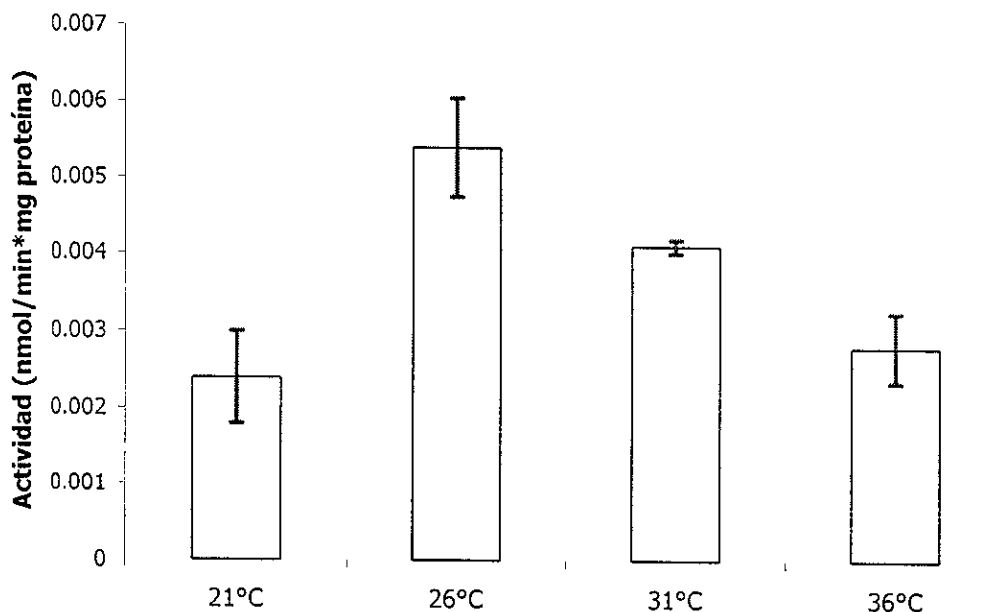


Figura 8. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima ATP-CL.

Una vez determinado el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de la ATP-CL, se realizó la cinética enzimática para 2 sustratos de la enzima: citrato y ATP. Esto con la finalidad de poder calcular la constante de Michaelis-Menten (K_m) para cada sustrato y definir la afinidad de la enzima por sus sustratos. Los ensayos se llevaron a cabo con extractos de 72 h de fermentación, utilizando un pH de 8.4 y una temperatura de 25°C. Las cinéticas para ambos sustratos se muestran a continuación:

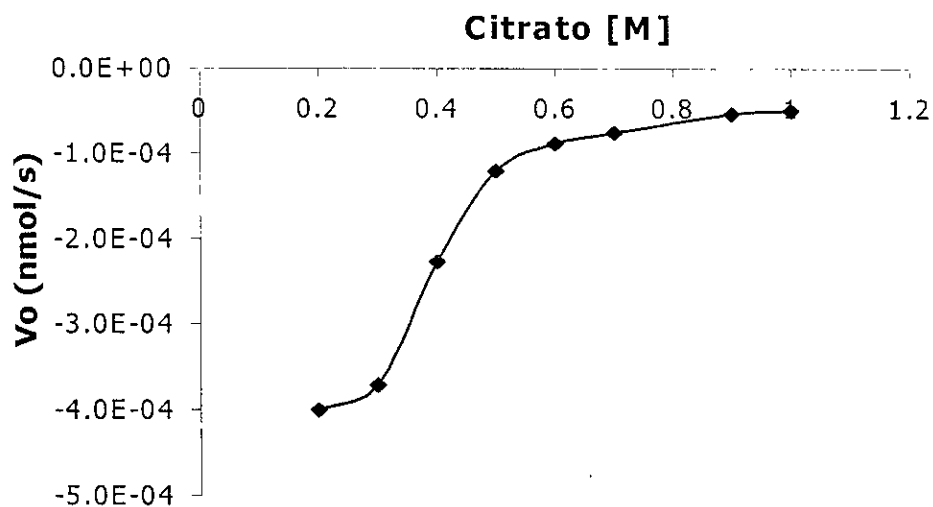


Figura 9. Cinética enzimática para citrato de la ATP-CL

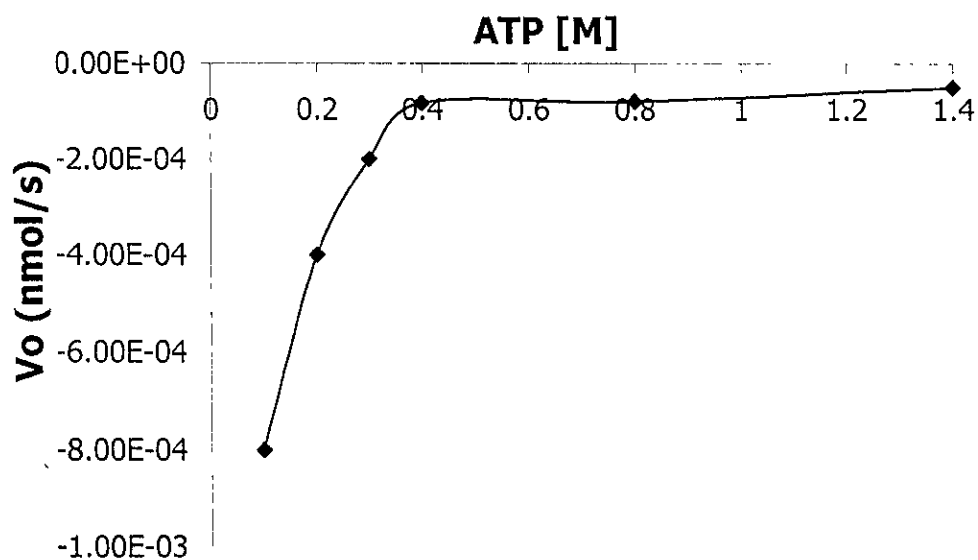


Figura 10. Cinética enzimática para ATP de la ATP-CL

Para realizar el cálculo de la K_m , los datos se ajustaron al modelo de Hanes-Woolf el cual sigue la siguiente ecuación:

$$[S]/V_o = ([S])(1/V_{max}) + (k_m/V_{max})$$

$$y = mx + b$$

donde $m = 1/V_{max}$

$b = K_m/V_{max}$

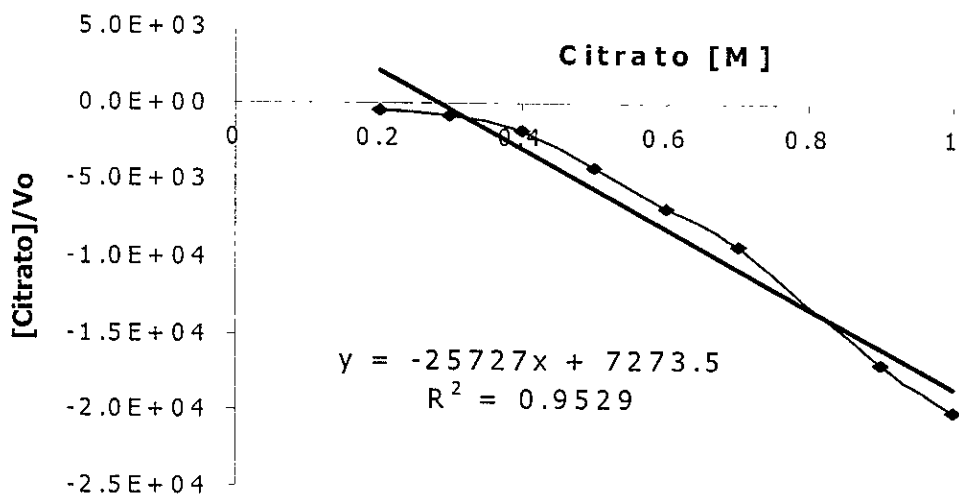


Figura 11. Determinación de K_m para citrato de la ATP-CL

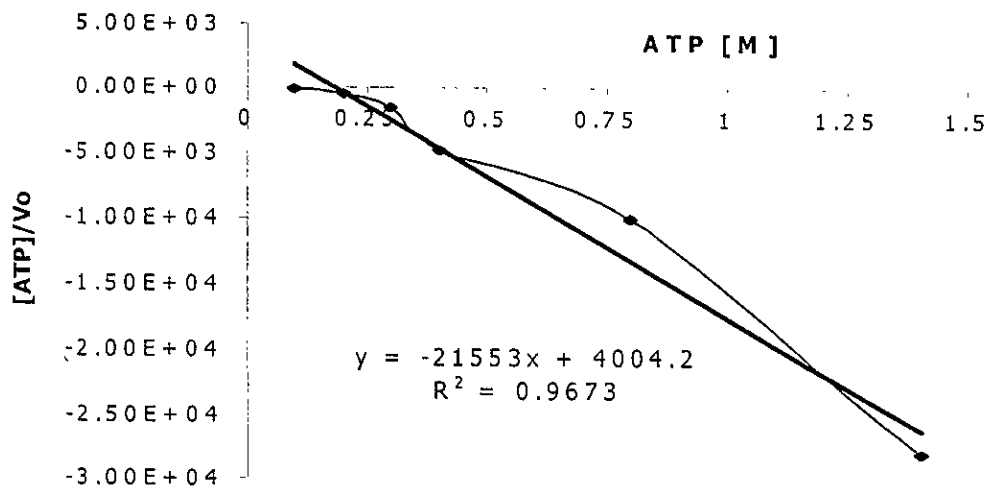


Figura 12. Determinación de K_m para ATP de la ATP-CL

De las gráficas anteriores (Fig. 11 y 12) se obtuvieron las ecuaciones lo que permitió el cálculo de la K_m para citrato y ATP siendo éstos de 0.28 M y 0.19 M respectivamente así como la velocidad máxima (V_{max}) resultando ser de $3.8 \cdot 10^{-5}$ nmol/min*mg de proteína para citrato y $4.64 \cdot 10^{-5}$ nmol/min*mg de proteína para ATP (ver cálculos en anexo 3).

8.2 Efecto de la adición de citrato en glucosa al 1 y 6%

Con el objeto de conocer más acerca del efecto del citrato tanto en el crecimiento, producción de carotenoides y actividad de la enzima ATP-CL, este se adicionó a concentraciones bajas y altas de glucosa, así mismo se midió la incorporación del citrato al interior de la célula y su posterior incorporación a carotenoides. Se tomaron muestras cada 24 horas, durante 96 horas de fermentación y se obtuvieron las cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa, producción de carotenoides y pH bajo estas condiciones. Como puede observarse en las figuras 13 a 16 cuando se adicionó citrato a las 0 y 24 horas de fermentación se obtuvo una estimulación del crecimiento en ambas concentraciones de glucosa, dicho efecto estimulador no se observa sobre la producción específica de pigmentos en presencia de citrato.

Adicionalmente se determinó la actividad de la enzima ATP-CL y se comparó con la producción específica de carotenoides a las 72 horas de fermentación, como puede observarse en las figuras 17 y 18, cuando la levadura crece en presencia de citrato (0 y 24 h de adición), se obtiene una inhibición de la actividad enzimática en ambas concentraciones de glucosa.

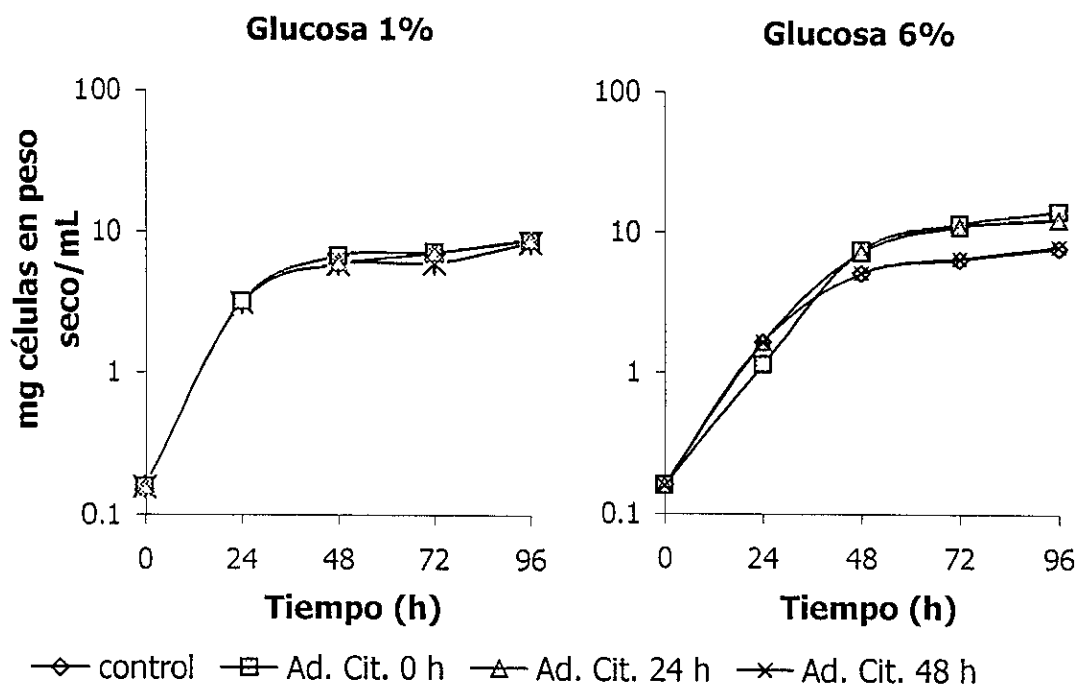


Figura 13. Cinética de crecimiento de *P. rhodozyma* en glucosa 1 y 6%

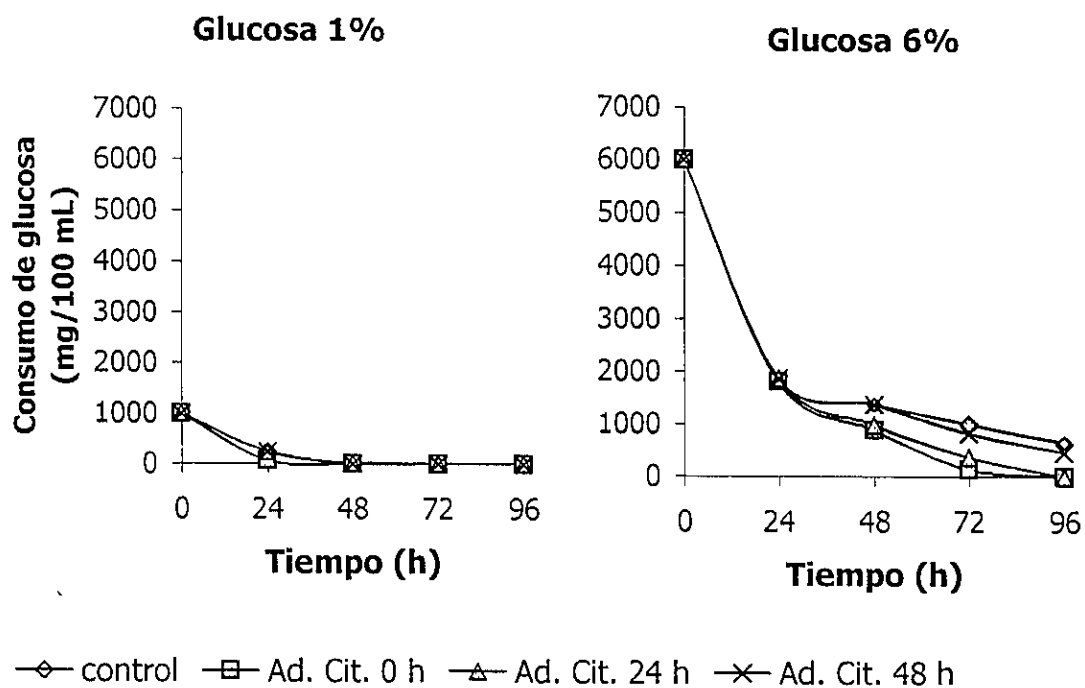


Figura 14. Cinética de consumo de glucosa en *P. rhodozyma*

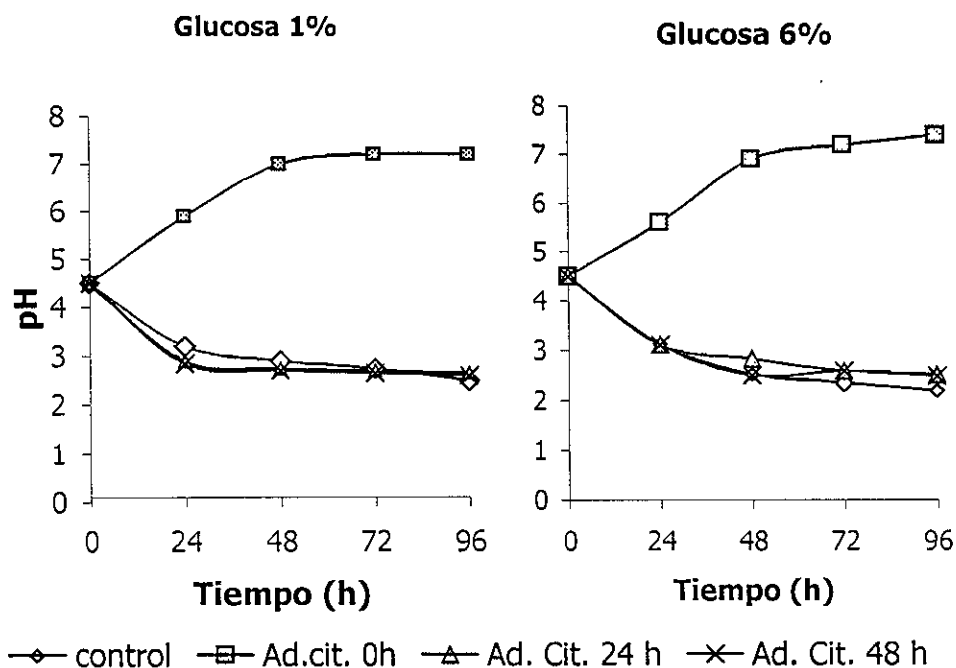


Figura 15. Cinética de pH

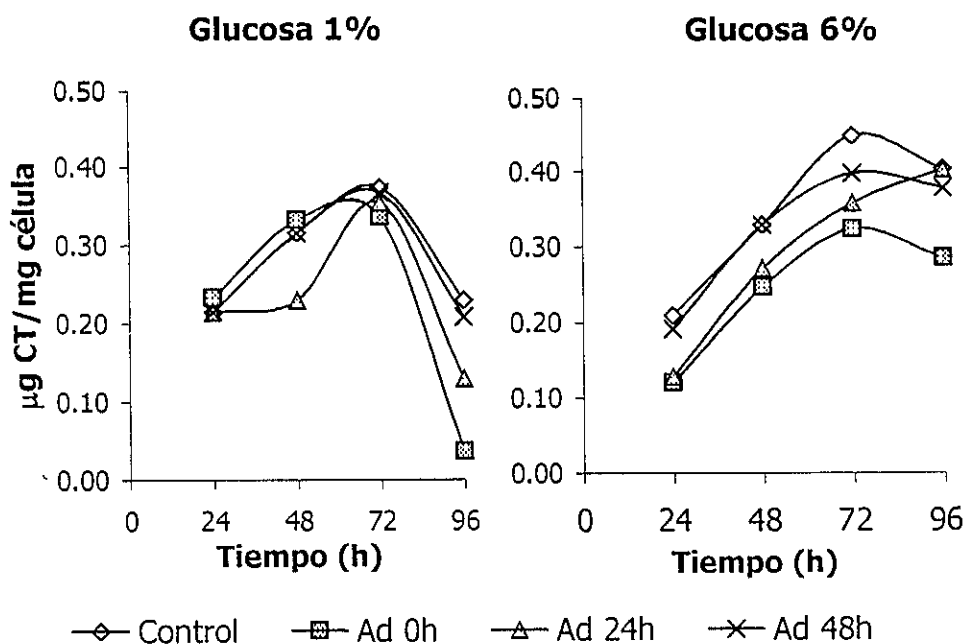


Figura 16. Cinética de producción específica de carotenoides

Glucosa 1 y 6%

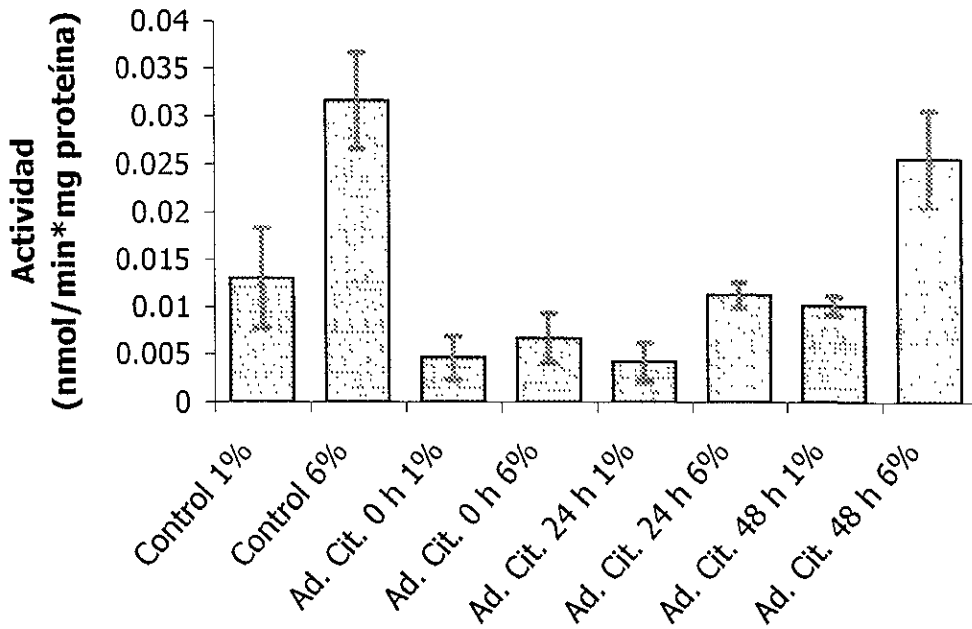


Figura 17. Actividad ATP-CL a las 72 h de fermentación

Glucosa 1 y 6%

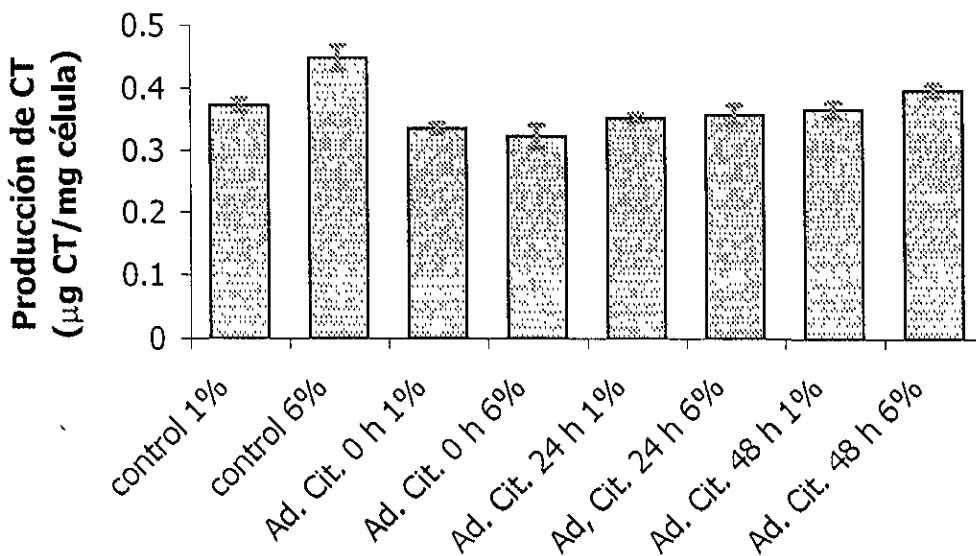


Figura 18. Producción de carotenoides a las 72 h de fermentación.

Por experimentos preliminares se observó que, al adicionarse citrato radioactivo al medio de cultivo, existían carotenoides marcados, por lo que se realizó un experimento adicionando citrato marcado a diferentes tiempos de fermentación y en concentraciones altas y bajas de glucosa y se midió su incorporación al interior de la célula así como el porcentaje de esta marca que se encontraba en carotenoides (Figs. 19 y 20). En estas gráficas podemos observar que el citrato fue incorporado a la célula cuando se adicionó citrato a las 0 y 24 horas de fermentación, mientras que las 48 horas se incorporó mucho menos, esto se presentó en las 2 concentraciones de glucosa empleadas.

Adicionalmente se observó una correlación inversa con la radioactividad remanente en el medio de cultivo. Por otro lado se puede observar que en glucosa al 1% la incorporación de marca a carotenoides es de un máximo de 80% cuando se adiciona citrato a las 24 horas de fermentación, mientras que en glucosa 6% la máxima incorporación que se observa es de un 30% en la adición a las 24 h de fermentación.

Haciendo una correlación entre la cantidad de citrato incorporado al interior de la célula y la actividad de la enzima ATP-CL a las 72 h de fermentación (tabla 3) se observó que a mayor cantidad de citrato incorporado, mayor será la inhibición de la actividad enzimática, este efecto se observa en glucosa al 1 y 6%, por lo que estos datos sugieren una regulación de la enzima por sustrato.

Condiciones	Glucosa 1%		Glucosa 6%	
	% incorporación	% inhibición	% incorporación	% inhibición
Ad. Cit. 0 h	72.7	64.6	67.2	78.8
Ad. Cit. 24 h	65.4	67.6	64.1	64.2
Ad. Cit. 48 h	10	21.5	13	18.9

Tabla 3. Porcentaje de incorporación de citrato a la célula y de inhibición de la enzima ATP-CL en concentraciones de glucosa de 1 y 6% a las 72 h de fermentación.

Ya que se encontró presencia de marca en el extracto de carotenoides, se realizó una cromatografía en capa fina para determinar en cuál(es) carotenoide se encontraba la marca presente, posteriormente esta placa se sometió a autorradiografía durante 72 horas (Fig. 21 a,b y c)

Las placas muestran que no existe astaxantina marcada, sólo se observa una mancha con radioactividad en todas las condiciones de adición que eluye junto con el frente de elución.

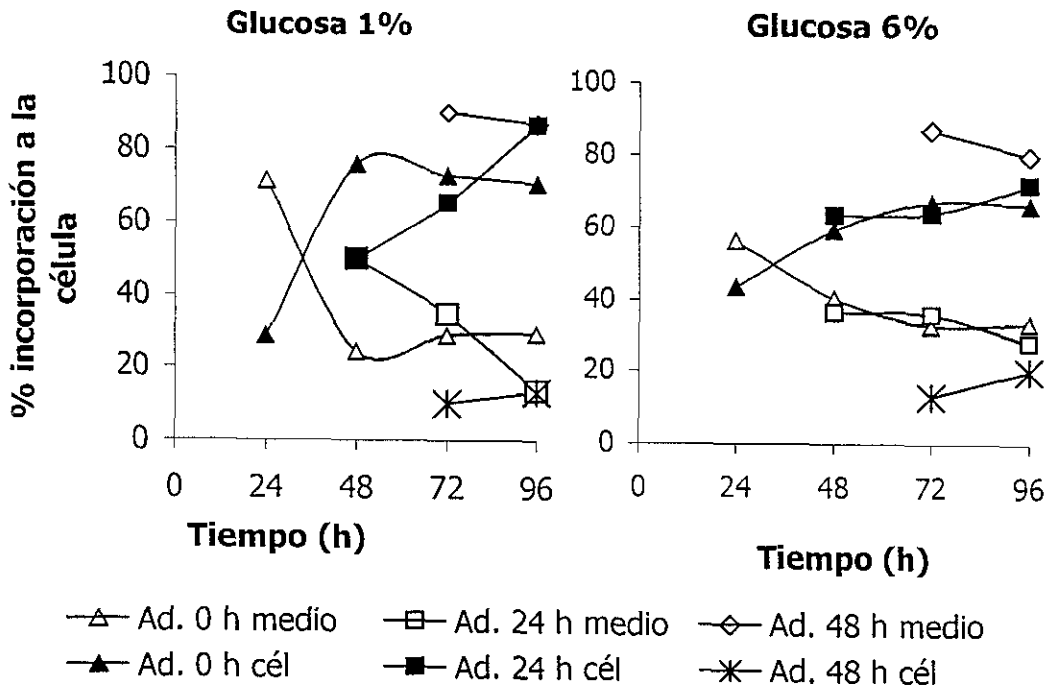


Figura 19. % de incorporación de citrato marcado al interior de la célula

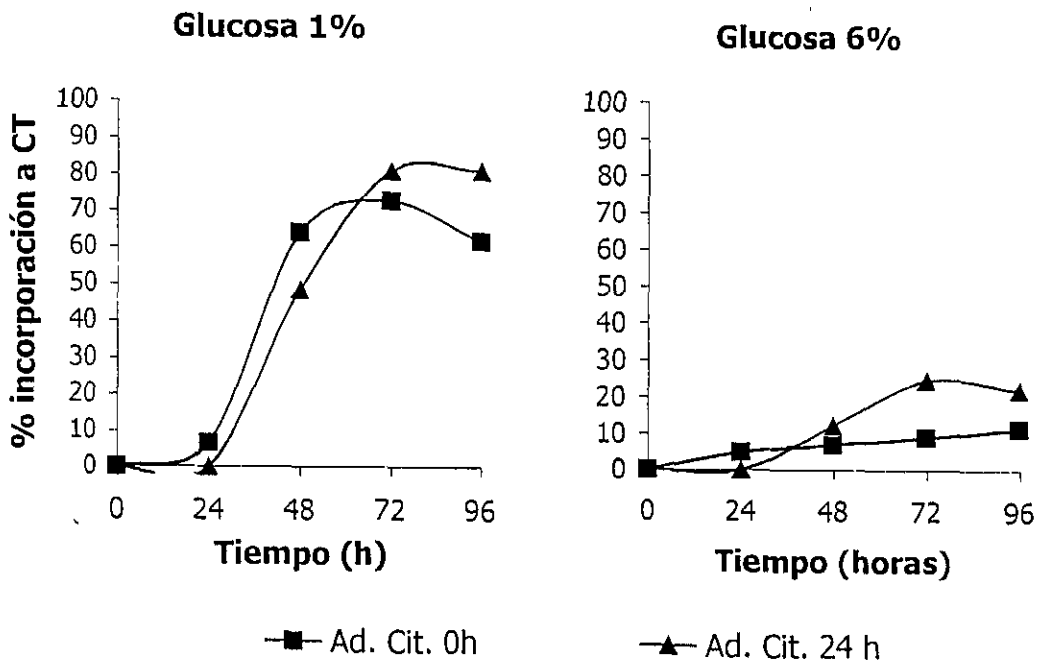


Figura 20. % de incorporación de marca a CT

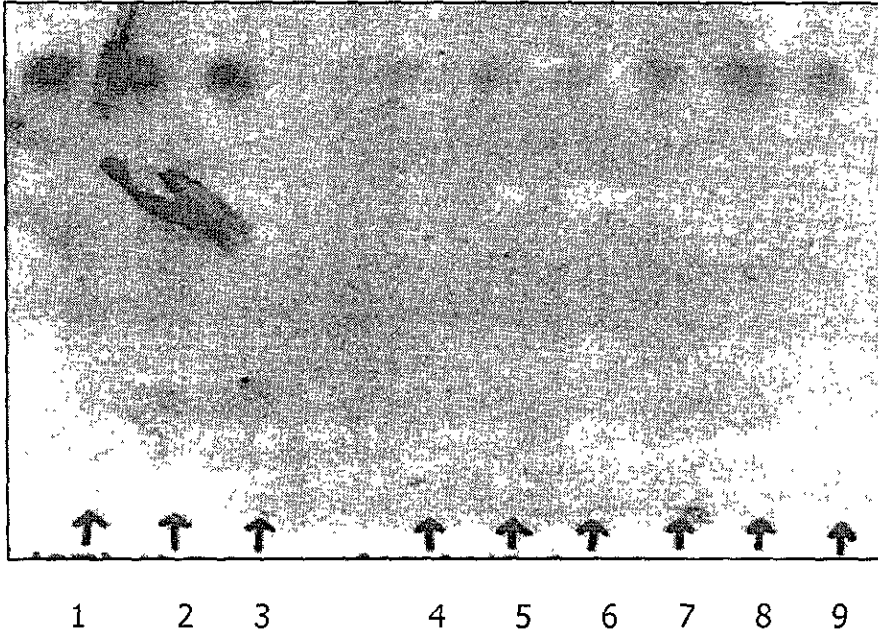


Fig. 21(a) Autorradiografía I de glucosa al 1%.
 1, 2 y 3. Adición de citrato a las 24 h (72 h de fermentación)
 4, 5 y 6 Adición de citrato a las 0 h (72 h de fermentación)
 7, 8 y 9 Adición de citrato a las 24 h (48 h de fermentación)

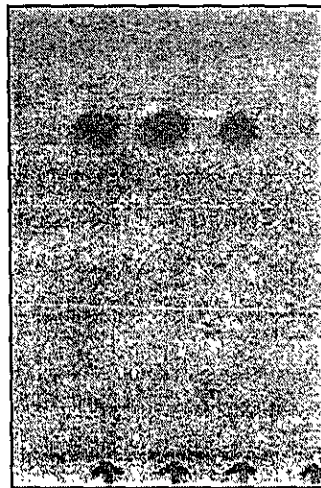


fig. 21(b) Autorradiografía II de glucosa al 1%.
 1, 2 y 3. Adición de citrato a las 24 h (96 h de fermentación)

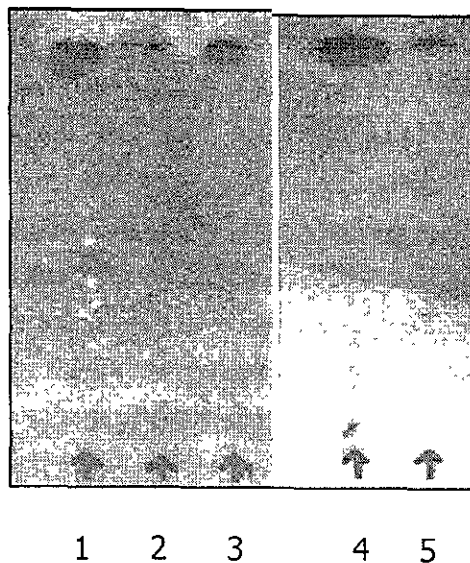


Fig. 21(c) Autorradiografía I de glucosa al 1%.
 1, 2 y 3. Adición de citrato a las 0 h (72 h de fermentación)
 4 y 5 Adición de citrato a las 0 h (96 h de fermentación)

8.3 Determinación de actividad de ATP-CL en 3 cepas silvestres de *P. rhodozyma*

Debido a que en otras levaduras oleaginosas se han reportado diferencias en la actividad de la enzima ATP-CL dependiendo de la cepa utilizada, se midió la actividad de ATP-CL en 3 diferentes cepas de *P. rhodozyma*, con la finalidad de observar si existía una diferencia significativa en la actividad de esta enzima.

Como puede observarse en la figura 22, en la cepa NRRL Y 10922, que fue la utilizada en todos los experimentos anteriores se obtiene una actividad de ATP-CL entre un 40% y un 75% mayor con respecto a la cepa UCD 67-210 y UCD 67-385, respectivamente. La determinación se realizó en extractos de proteína de 72 h de fermentación, crecidas en medio JL(m) con glucosa al 6% (Fig. 22).

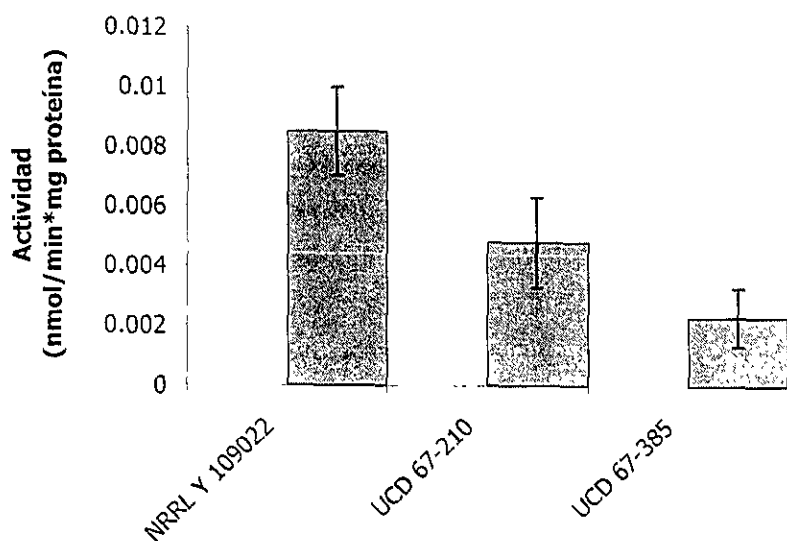


Figura 22. Actividad de ATP-CL en 3 diferentes cepas de *P. rhodozyma*

9. Análisis y discusión de resultados.

Para contar con evidencia de la presencia de la enzima ATP-CL en la levadura *P. rhodozyma* se realizaron varios experimentos preliminares adicionando citrato 30 mM marcado radioactivamente, a las 24 h de fermentación en medio JL(m), utilizando como fuente de carbono glucosa al 6%. Se decidió utilizar esta concentración de citrato ya que se ha reportado que bajo esta condición existe una estimulación de la síntesis de carotenoides [56]; cabe señalar que se hicieron experimentos previos adicionando citrato al medio de cultivo y se vio que a esta concentración estimulaba el crecimiento, y no se afectaba la producción de pigmentos. En estos experimentos se encontraron carotenoides marcados, lo que sugería la presencia de la enzima ATP-CL y por lo tanto predecía que el citrato estaba siendo escindido en oxaloacetato y acetil-CoA, y esta última se estaba utilizando como precursor para la biosíntesis de lípidos y, por lo tanto, de carotenoides.

Con dicha evidencia, se prosiguió a tratar de medir *in vitro* la enzima ATP-CL, partiendo de que esta última es una proteína citosólica, se requirió establecer la mejor técnica de extracción de proteínas. Las técnicas que se probaron fueron: sonicación, rompimiento mecánico y polvos de acetona (realizadas a 4°C), resultando ser esta última la mejor técnica de extracción y por lo tanto la que se utilizó para ensayos posteriores.

De acuerdo a la literatura [87], el método propuesto para la determinación de la actividad de la ATP-CL fue un método espectrofotométrico, sin embargo debido

a que la ATP-CL depende de ATP y éste no puede ser cuantificado en el espectrofotómetro, se utilizó una reacción acoplada con la enzima malato deshidrogenasa (MDH) la cual es dependiente de NADH y el consumo de esta coenzima puede ser detectado en la región UV a 340 nm.

Lo primero que se hizo fue determinar por separado la actividad de la MDH para corroborar que ningún componente de la mezcla de reacción que se emplearía para determinar la actividad de la ATP-CL así como el pH de la misma interfiriera con su actividad.

La medición de la ATP-CL se realizó en la fracción soluble de proteína ya que se ha reportado que esta enzima se encuentra presente en el citosol [76]. Se encontró actividad de ATP-CL en la levadura *P. rhodozyma* y se observó un máximo de actividad a las 72 h de fermentación en medio JL(m) con glucosa al 6%* (Fig. 6). Esta actividad máxima correlacionó bien con el valor máximo de contenido de carotenoides obtenido para el control (Fig. 18).

El pH al cual se obtuvo una mayor actividad de ATP-CL fue de 8.4 (Fig. 7); este valor se esperaba ya que en los protocolos reportados para la determinación de la ATP-CL en diferentes levaduras, utilizan valores de pH por arriba de 8.0 [87].

La temperatura a la cual se obtuvo la mayor actividad de ATP-CL resultó ser de 26°C (Fig. 8).

**Bajo éstas condiciones se realizaron los ensayos de pH y temperatura óptimos y cinética para citrato y ATP.*

Este valor estuvo por arriba de la temperatura óptima de crecimiento de la levadura, sin embargo, se sabe que la temperatura óptima de reacción no siempre concuerda con la temperatura óptima de crecimiento.

Para la determinación de la constante de Michaelis-Menten para citrato y ATP se llevaron a cabo ensayos utilizando un pH de 8.4 y a temperatura ambiente (Figs. 9 y 10). Los datos se ajustaron al modelo de Hanes-Woolf. De la ecuación de la recta obtenida se calcularon los valores de K_m que fueron de 0.28 M para citrato y 0.19 M para ATP (Figs. 11 y 12). Esto nos indicó una mayor afinidad de la enzima por ATP que por citrato.

Experimentos previos en nuestro laboratorio mostraron que el citrato estimula la síntesis de carotenoides en *P. rhodozyma* en un medio químicamente definido, por lo que se quiso por un lado verificar la estimulación en un medio de producción completo (JL(m)) y por otro averiguar qué pasa con la producción cuando el citrato se adiciona a diferentes tiempos de la fermentación, es decir en diferentes fases del crecimiento.

Por otro lado se sabía que el citrato se incorpora a la célula debido a los efectos observados en la síntesis de carotenoides y a los experimentos preliminares con citrato radioactivo, sin embargo no se sabía qué porcentaje de la cantidad adicionada era la que realmente se incorporaba a la célula, por lo que se realizó un experimento adicionando citrato marcado radioactivamente, no sólo para observar cualitativamente si había o no carotenoides con marca sino también

cuantificar el porcentaje de incorporación a la célula y qué proporción de éste se incorporaba a carotenoides.

Debido a que sólo se habían realizado experimentos creciendo a la levadura en altas concentraciones de glucosa (6%), en presencia y ausencia de citrato, se decidió realizar un experimento en un medio de cultivo con una baja concentración de glucosa (1%) adicionando también citrato. Con este experimento se pretendió observar una diferencia en el consumo de citrato y por lo tanto en su incorporación a la célula con el respectivo efecto en el crecimiento y producción de carotenoides y si existía una diferencia en la actividad de la enzima ATP-CL con respecto a la obtenida en un cultivo con glucosa al 6%.

En las cinéticas de crecimiento de *P. rhodozyma* en glucosa al 1 y 6% se observa que, existe una estimulación del crecimiento cuando se adiciona citrato a las 0 y 24 h de fermentación (fase exponencial de crecimiento), en ambas concentraciones de glucosa, aunque es más marcado este efecto en glucosa al 6%, sin embargo cuando el citrato se adiciona a las 48 h de fermentación y se ha alcanzado la fase estacionaria, no se observa ningún efecto por citrato (Fig.13).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la incorporación de citrato marcado a la célula (Fig. 19), los cuáles indican que en glucosa al 1% la máxima incorporación al interior de la célula a las 96 h de fermentación es de alrededor del 70 y 87% en la adición a las 0 y 24 h respectivamente, mientras que en la adición a las 48 h la máxima incorporación es de tan sólo el 13%. Por otro lado en glucosa al 6% la máxima incorporación es del 73 y 65% en la adición a las 0 y

24 h respectivamente y en la adición a las 48 h es de tan sólo un 10% (Fig. 19). Esto nos indica que en la adición a las 48 h la incorporación de citrato a la célula es muy bajo con respecto a las otras adiciones. Esto se podría explicar ya que la adición se está realizando cuando comienza la fase estacionaria del crecimiento, es decir, la levadura ya ha crecido y su metabolismo disminuye. Por otro lado podemos observar en la cinética de pH (Fig. 15), que en la adición a las 0 h en ambas concentraciones de glucosa, el pH en vez de disminuir, aumenta, sin embargo al parecer este incremento no afecta el crecimiento ni la producción de pigmentos.

Se midió la actividad de la enzima ATP-CL cada 24 h durante 96 h, en todas las condiciones de adición y en ambas concentraciones de glucosa, observándose en todos los casos un pico máximo de actividad a las 72 h de fermentación (no se muestran los datos).

Realizando la comparación a las 72 h de fermentación de las actividades enzimáticas obtenidas de todas las condiciones de adición en ambas concentraciones de glucosa podemos observar (Fig. 17) que, cuando no existe adición de citrato la enzima es alrededor de un 40% más activa en glucosa al 6% que al 1%. Cuando existe adición de citrato a las 0, 24 y 48 h observamos que la actividad de la enzima se ve inhibida en promedio, alrededor de un 70, 65 y 20% respectivamente en ambas concentraciones de glucosa (Tabla 3). Estos valores corresponden aproximadamente con los porcentajes de incorporación de citrato a la célula, por lo que parece existir una relación entre la cantidad de

citrato incorporado a la célula y el porcentaje de inhibición de la actividad enzimática, esto nos sugiere que la enzima sufre una regulación por sustrato.

En lo que se refiere a la síntesis de carotenoides, podemos observar (Fig. 16), que la máxima producción se obtiene a las 72 h de fermentación en ambas concentraciones de glucosa y que la producción de carotenoides es mayor en glucosa al 6% que en glucosa al 1%.

Estos resultados coinciden con los reportados en trabajos previos en nuestro laboratorio, en donde la síntesis de carotenoides se ve favorecida en altas concentraciones de glucosa [87]; así mismo, estos valores corresponden con el máximo de actividad de la enzima ATP-CL.

En la figura 20 podemos observar el % de marca que se incorpora a carotenoides. En ambas concentraciones de glucosa el máximo de la incorporación de la marca se obtiene a las 72 h de fermentación, con la adición de citrato a las 24 h, siendo de un 30% en glucosa al 6% y de un 81% en glucosa al 1%. Estos resultados sugieren que por un lado, aunque existe una alta incorporación de citrato marcado al interior de la célula y por otro, hay un alto contenido de carotenoides en la célula cuando se crece en glucosa al 6%, el citrato no está siendo dirigido a la síntesis de carotenoides, por lo que debe de existir una fuente de acetyl-CoA alterna cuando existen altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo, mientras que en glucosa al 1% observamos que más del 80% del citrato marcado se incorpora a carotenoides. Esto sugiere que en bajas concentraciones de glucosa, el citrato adicionado es la fuente más

importante de acetil-CoA necesaria para la biosíntesis de lípidos y por ende, de carotenoides.

Haciendo la comparación de todas las condiciones de adición con respecto al control sin adición de citrato en ambas concentraciones de glucosa, podemos ver (Fig. 18) que no existe una estimulación por citrato en el contenido de carotenoides en la levadura. Estos resultados se contraponen con los obtenidos con anterioridad en nuestro laboratorio, lo que puede ser debido a que las condiciones de experimentación fueron diferentes, ya que la estimulación por citrato en una concentración de 30 mM fue obtenida en un medio químicamente definido [56]. Así mismo la estimulación en medio JL(m) se obtuvo con una concentración de citrato 400 mM adicionado al medio, cuando la fuente de carbono había sido consumida en su totalidad [88].

Por otro lado, no se observa una relación directa entre la producción de pigmentos y la actividad de la enzima ATP-CL. Aunque la actividad enzimática se ve inhibida por la presencia de citrato, esta inhibición no es proporcional a la inhibición del contenido de carotenoides en la célula.

Se ha mencionado que la regulación de biosíntesis de lípidos es un proceso integrado por varios pasos en diversas rutas metabólicas y no es un mecanismo regulado por un solo paso, es por eso que estos resultados sugieren que la regulación de la biosíntesis de lípidos y, por lo tanto, de carotenoides no se basa sólo en la actividad de la ATP-CL sino que deben ser otros factores los que estén regulando la biosíntesis.

Al utilizar citrato marcado en la fermentación, no se observó la presencia de radioactividad en astaxantina, sólo se observó una mancha en todas las adiciones en ambas concentraciones de glucosa que eluía junto con el frente, que posiblemente corresponde a un compuesto(s) no polar saturado. Pueden ser precursores de carotenoides que no fueron oxidados, o bien una mezcla de lípidos que se extrajeron junto con los carotenoides. Esto último es muy probable ya que los carotenoides se extraen con una mezcla de solventes medianamente polar.

La explicación que se puede dar a estos resultados es que la marca que tuviera la astaxantina fuera muy poca y no pudo ser detectada o bien, como ya se mencionó anteriormente, que exista otra fuente de acetil-CoA para la biosíntesis de carotenoides.

Por último, se decidió probar la actividad de la enzima ATP-CL en 3 diferentes cepas de *P. rhodozyma*, ya que existen reportes en otras levaduras en donde la actividad de la enzima varía de cepa a cepa. Tal es el caso de la levadura oleaginosa *Rhodospiridium toruloides* en donde se observa una actividad de 50 nmol/min*mg de proteína de ATP-CL en la cepa silvestre IFO8766, mientras que en la cepa silvestre CBS315 la actividad es de cero; sin embargo, esta última cepa presenta una actividad de 80 nmol/min*mg de proteína de la enzima acetil-carnitin transferasa (CAT). Esto nos indica que a pesar de que la levadura *R. toruloides* es considerada un microorganismo oleaginoso, existen cepas que no presentan la actividad de ATP-CL y, por lo tanto, no se observa una acumulación

de lípidos (menor al 4%). La cepa silvestre IFO8766 presenta una actividad de CAT de tan sólo 10 nmol/min*mg de proteína, por lo que el suplemento de unidades de acetil-CoA citosólicas provienen de la ATP-CL. Por otro lado la cepa ATCC26217 de *R. toruloides* presenta una actividad de ATP-CL de 85 y de CAT de 104 nmol/min*mg de proteína. Estos resultados reportados nos indican que en algunos microorganismos oleaginosos ambas enzimas están activas y por lo tanto el suplemento de unidades de acetil-CoA proviene de 2 rutas diferentes [89].

Por otro lado, se ha reportado la actividad de la enzima fosfoacetolasa (Fig. 4) en levaduras oleaginosas como *Candida 107* (NCYC 911) y *Rhodotorula graminis* (NCYC 502), en donde las unidades de acetil-CoA provienen directamente de la glucosa y, por lo tanto, se duda con respecto a la necesidad de la enzima ATP-CL en este tipo de microorganismos. Sin embargo, en otras levaduras oleaginosas no se ha encontrado la actividad de fosfoacetolasa y la presencia de la ATP-CL sigue siendo indispensable [78].

En nuestros resultados observamos (Fig. 22) que la cepa NRRL Y 109022, la cual es la que utilizamos para todos los experimentos de este trabajo, tiene la máxima actividad de ATP-CL a las 72 h de fermentación en glucosa al 6% con respecto a las otras 2 cepas probadas. Sin embargo, la actividad es muy baja, por lo que se tendrían que buscar otras rutas alternas de formación de acetil-CoA citosólico en ésta levadura, ya que sabiendo de donde viene esta unidad precursora de la biosíntesis de lípidos se podrá tener una mayor idea de dónde están los puntos clave en su regulación.

10. Conclusiones

- ❖ La enzima citosólica ATP-citrato liasa se encuentra presente en la levadura *P. rhodozyma* lo cual la clasifica como una levadura oleaginosa.
- ❖ La enzima presenta un máximo de actividad a las 72 h de fermentación en concentraciones bajas y altas de glucosa, en presencia o ausencia de citrato.
- ❖ El pH óptimo de reacción de la enzima ATP-CL es de 8.4 y su temperatura óptima es de 26°C.
- ❖ Las constantes de Michaelis-Menten para citrato y ATP son de 0.28 M y 0.19 M respectivamente, indicando que la enzima tiene mayor afinidad por ATP.
- ❖ Existe una incorporación de citrato a la célula cuando éste es adicionado en las primeras 24 h de fermentación en concentraciones bajas y altas de glucosa, por lo que la entrada de citrato a la célula parece estar regulada por la fase de crecimiento a la cual se realiza la adición del citrato.
- ❖ El citrato adicionado a un medio de cultivo completo estimula el crecimiento de la levadura *P. rhodozyma* en concentraciones bajas y altas de glucosa, sin embargo no se observa estimulación sobre la síntesis de carotenoides.
- ❖ La actividad de la enzima ATP-CL se ve inhibida por la presencia de citrato en el medio de cultivo, por lo que parece que la actividad enzimática es regulada por la presencia de sustrato.
- ❖ No existe ninguna relación aparente entre la actividad de la enzima ATP-CL y la síntesis de carotenoides.

- ❖ La incorporación de marca a carotenoides en glucosa al 6% sugiere la existencia de una ruta alterna de acetil-CoA para la biosíntesis de carotenoides, mientras que en glucosa al 1% parece ser que el citrato es la mayor fuente de acetil-CoA.
- ❖ No se observó astaxantina marcada con radioactividad, por lo que sugiere que su biosíntesis está dada a partir de otra fuente de acetil-CoA o bien, que la marca es muy poca para poder ser detectada.
- ❖ La cepa silvestre NRRL Y 109022 resultó ser la cepa con mayor actividad de ATP-CL a comparación de las otras 2 cepas silvestres probadas.

11. Perspectivas

Como ya se ha mencionado en este trabajo, el conocimiento de la regulación de la biosíntesis de lípidos está directamente relacionada con la síntesis de carotenoides, los cuáles juegan un papel muy importante en la industria de alimentos, la industria farmacéutica y, en el caso de la astaxantina, en la acuicultura.

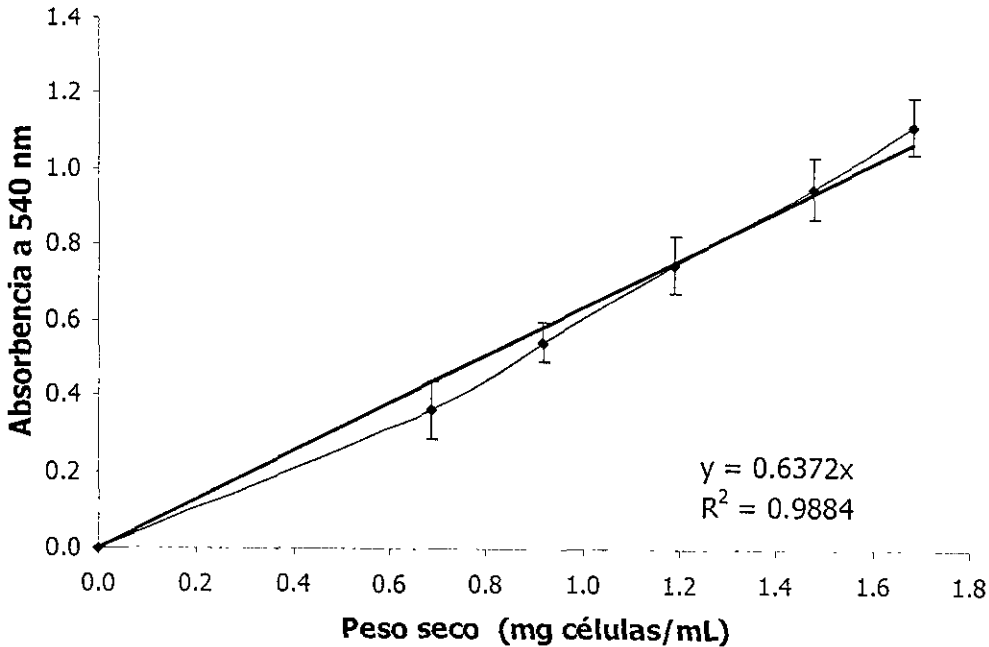
Es por eso que se debe de seguir profundizando en el estudio de la regulación metabólica de la síntesis de estos metabolitos secundarios. Mientras más se conozca de la bioquímica y fisiología de la levadura *P. rhodozyma*, mayor será el manejo que se podría dar sobre ésta y su medio de cultivo para una mayor producción, la cual sea redituable dentro de un proceso industrial.

Se ha mencionado que para que exista la biosíntesis de lípidos, deben de proporcionarse unidades de acetil-CoA al citosol y que en levaduras oleaginosas se cree que la fuente más importante de este precursor es el citrato intramitocondrial que es exportado al citosol y escindido por la enzima ATP-CL, sin embargo debè de esclarecerse si ésta es la única fuente de acetil-CoA en esta levadura, o bien, como se ha planteado en este trabajo, exista una ruta alterna que suplemente estas unidades.

Si se logra determinar el origen de las unidades de acetil-CoA se tendrá evidencia de las diferentes rutas involucradas en la biosíntesis de lípidos y se podrá profundizar aun más en el esclarecimiento de su regulación.

Aunque los lípidos y carotenoides comparten rutas metabólicas para su síntesis, es necesario conocer aun más de los pasos limitantes que ocurren en la formación de carotenoides, así como continuar con el estudio de los factores que desencadenan la síntesis de estos metabolitos secundarios.

En este trabajo se caracterizó a la enzima ATP-CL, sin embargo falta purificarla para conocer su peso molecular y su secuencia de aminoácidos para poder comparar a esta enzima con otras ya estudiadas en diversas levaduras oleaginosas. Con la enzima pura se pueden realizar estudios más finos en cuanto a su regulación alostérica por ATP y AMP y si existe una retroregulación por productos finales. Por otro lado, falta investigar aún más el efecto del citrato para poder asegurar su estímulo en la biosíntesis de carotenoides y medir la cantidad de citrato acumulado dentro de la célula cuando se crece a la levadura en una limitación por fuente de nitrógeno, así como cuantificar no sólo la producción de carotenoides, sino la producción de lípidos y determinar si existe una acumulación bajo estas condiciones. Por otro lado se puede medir la actividad de la enzima ATP-CL bajo estas condiciones limitantes de nitrógeno para tratar de establecer una relación entre la biosíntesis y la producción de lípidos y carotenoides.

ANEXO I**1. Curva patrón de crecimiento de *P. rhodozyma* en caldo YM.****2. Preparación del estándar de astaxantina.**

Pesar 21 mg de astaxantina y disolverla en 25 mL de diclorometano (frío). Tomar alícuotas de 0.1 mL en viales de 2 mL y secarlas con flujo de nitrógeno, sellar perfectamente los viales y conservar en congelación. La concentración del estándar es de 84 μg de astaxantina.

3. Solución de centelleo para la determinación de radioactividad

PPO	0.4 %
(2,5-difeniloxazol)	
POPOP	0.04%
(1,4-bis[5-fenil-2-oxazol]benceno	
Solvente empleado: tolueno.	

4. Solución para revelar placas con radioactividad

La solución comercial empleada fue la siguiente: Kodak developer D-76, que contiene: hidroquinona y sulfato de p-metilaminofenol.

5. Instrumentos utilizados en las diferentes técnicas y determinaciones.

EQUIPO	MARCA
Potenciómetro modelo 350 digital pH meter.	Beckman
Espectrofotómetro (Spectronic 21-D)	Spectronic Instruments
Agitador vórtex modelo Mistral	Lab-line, Instruments, INC.
Incubadora con agitación orbital	Gallempkamp
Centrífuga con ángulo fijo modelo Lourdes	Vernitron Medical Products, INC.
Centrífuga clínica	SOL-BAT
Autoclave digital	DIECSA
Densitómetro	CAMAG
Ultracentrífuga	Beckman. Mod. L8-55M
Contador de centelleo	Beckman. Mod. LS-1801

ANEXO II***Medios de cultivo y cepas utilizadas.*****CALDO YM**

Extracto de levadura	0.3%
Extracto de malta	0.3%
Bacto peptona	0.5%
Glucosa	1.0%
H ₂ O	100 mL

AGAR YM

Extracto de levadura	0.3%
Extracto de malta	0.3%
Bacto peptona	0.5%
Glucosa	1.0%
Agar	1.5%
H ₂ O	100 mL

MEDIO DE PRODUCCIÓN JOHNSON & LEWIS MODIFICADO (JL(m))

KH ₂ PO ₄	0.1%
CaCl ₂ *2H ₂ O	0.01%
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.05%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5%
Extracto de levadura	0.1%
H ₂ O	100 mL

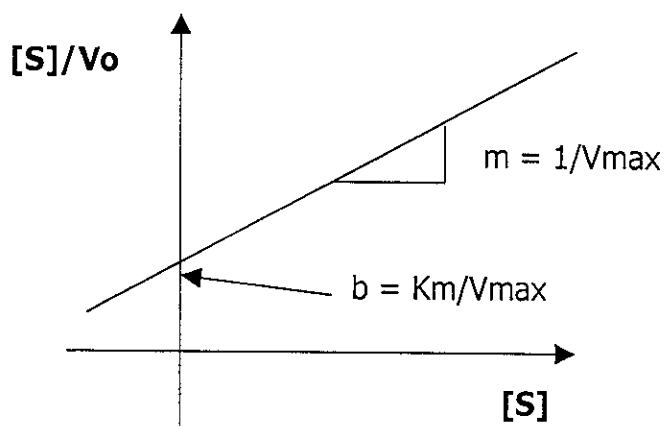
Ajustar el pH a 4.5 con ácido ftálico 1 M

CEPAS EMPLEADAS DE *P. rhodozyma*

Cepa silvestre NRRL Y 109022
Cepa silvestre UCD 67-210
Cepa silvestre UCD 67-385

ANEXO III**Cálculos para la determinación de K_m para citrato y ATP.**

Modelo de Hanes-Woolf para enzimas que siguen un comportamiento de Michaelis-Menten.

**Ecuación 1:**

$$[S]/V_o = K_m/V_{max} + [S]/V_{max}$$

$$y = b + mx$$

Para el cálculo de la K_m para citrato:

$$y = -25727x + 7273.5 \dots\dots \text{ecuación obtenida de la figura 11}$$

$$b = K_m/V_{max}, \text{ por lo tanto :}$$

$$k_m = b * V_{max}, \text{ y :}$$

$$V_{max} = 1/m, \text{ por lo tanto:}$$

$$K_m = b/m$$

$$K_m = 7273.5/25727 = \mathbf{0.28 \text{ M}}$$

Para el cálculo de la K_m para ATP:

$$y = -21533x + 4004.2 \dots\dots \text{ecuación obtenida de la figura 12}$$

$$K_m = 4004.2/21533 = \mathbf{0.19 \text{ M}}$$

13. Referencias

1. Britton, G. (1991). "Carotenoids". *Methods in Plants Biochemistry*, 7:473-519.
2. Johnson, E. (1991). "Astaxanthin from Microbial Sources". *Critical Review in Biotechnology*, 11(14):297-326.
3. Schroeder, W.A and Johnson E. (1995). "Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage". *Journal of Industrial Microbiology*, 14:502-507.
4. Miki, W. (1991). "Biological functions and activities of carotenoids". *Pure Applied Chemistry*. 63:141-146.
5. Shimidzu, N. (1996). "Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms". *Fisheries Science*. 62:134-137.
6. Lotan T., Hirschberg J. (1995). "Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding β -C-4-oxygenase, that converts β -carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis*". *FEBS Letters*. 364:125-128.
7. Miller, M.W., Yoneyama, M., (1976). "*Phaffia*, a new yeast in the Deuteromycotina (Blastomycetes)". *International Journal of Systematic Bacteriology*". 26(2):286-291.
8. Nellis, H.J., Lennher, A. P., (1991). "Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds". *Journal of Applied Bacteriology*. 70:181-191.
9. Yokoyama, A. (1994). "Production of astaxanthin and 4- β -ketozeaxanthin by the marine bacterium *Agrobacterium aurantiacum*". *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58(10):1842-1844.
10. Tsubokura, A., Yoneda, H., Mizuta, H. (2000) "*Paracoccus carotinifaciens* sp. Nov., a new aerobic gram-negative astaxanthin-producing bacterium". *Int J Syst. Bacteriology* Jan;49 Pt 1:277-82.
11. Phaff, H.J., Miller, M.W. (1972). "A comparative study of the yeast flora associated with trees on the Japanese islands and on the west coast of north America". *In. Proc. IV IFS: Fermentation Technology Today, Tokio. Society of Fermentation Technology, Osaka*. P. 759-774.

12. Schiedt, K., S. Liaaen-Jensen. (1995). "Isolation and analysis". En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H.Pfander (eds.). *Carotenoids Vol. 1ª: Isolation and analysis*, p. 81-103
13. Britton, G. (1995). "Structure and properties of carotenoids in relation function". *FASEB Journal*, 9:551-558.
14. Di Mascio, P., (1990). "Carotenoid, tocopherols and thiols as biological singulet molecular quenchers". *Biochemistry Society Trans.* 18:1054-1056.
15. Mathews-Roth, M.M. (1993) "Carotenoids in erythropoietic protoporphyria and other photosensitivity diseases". *Annual N.Y. Academy of Science.* 691:127-138.
16. Todd, L., Cysewski, G. (2000) "Therapeutic options of erythropoietic protoporphyria". *British Journal of Dermatology.* Apr:142(4):826-7.
17. Okai, Y., Higashi-Okai, K. (1996). "Possible immunomodulating activities of carotenoids in *in vitro* cell culture experiments" *International Journal of Immunopharmacology* 18:753-758.
18. Jyonouchi, H. (1995) "Astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, augments antibody responses in cultures including T-helper cell clones and suboptimal doses of antigen" *Journal of Nutrition.* 125:2483-2492.
19. Jyonouchi, H.(1995). "Effect of carotenoids on *in vitro* immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells: astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, enhances *in vitro* immunoglobulin production in response to a T-dependent stimulant and antigen" *Nut. Cancer.* 23:171-183.
20. Fang T.J. Chiou T.Y. (1996). " Batch cultivation and astaxanthin production by a mutant of the red yeast, *Phaffia rhodozyma* NCHU-FS501". *Journal of Industrial Microbiology.* 16:175-181.
21. Nanomura, A.M. (1990). "Industrial biosynthesis of carotenoids". En: Krinsky NI, col., (eds). *Carotenoids: Chemistry and Biology*, p.365-375. Plenum Press, NY.
22. Bernhard, K. (1990). "Synthetic astaxanthin, the route of a carotenoid from research to commercialization". En; Kinsky NI, col., (eds). *Carotenoids: Chemisty and Biology*, p. 337-363. Plenum Press, NY.

23. Jonhson, E.A., Shroeder, W.A. (1994) "Microbial carotenoids". *Advanced Biochemistry Engineering*.
24. Torrissen, O.J. (1989). "Pigmentation of salmonids: carotenoid deposition and metabolism in salmonids". *Critical Review Aquatic Science* 1:209.
25. Johnson, E.A., Villa, T.G. and Lewis, M.J. (1980). "Pigmentation of egg yolks with astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Poultry Science*. 59:1777-1782.
26. Disch, A., J. Schewender. (1998). "Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714". *Biochemistry Journal*. 333:381-388.
27. Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B. and Sahm, M. (1993). "Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps winding to isopentenyl diphosphate". *Biochemistry Journal*. 295:517-524.
28. Schewender, J. (1996). "Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*". *Biochemistry Journal*. 316:73-80.
29. Lichtenthaler, H.(1997). "Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway". *FEBS Letters*. 40:271-274.
30. Hampton R, Dimster-Denk D. Rine J. (1996). "The biology of HMG-CoA reductase: the pros of contra-regulation". *TIBS*. 21:140-145.
31. Sandmann G. (1994). "Carotenoids biosynthesis in microorganism and plants". *European Journal of Biochemistry*. 223:7-24.
32. Lewis MJ, Ragot, N., Berlant M.-C. and Miranda M. (1990). "Selection of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma* with β -ionone". *Applied Environment Microbiology*. 59:2944-2945.
33. Johnson E.A, Schroeder WA., (1996). "Biotechnology of astaxanthin production in *Phaffia rhodozyma*". En: Tadeoka Gr, Teranishi R, Williams PJ, Kobayashi A (eds). *Biotechnology for Improved Foods and Flavors*. p. 39-50. American Chemical Society, Washington DC.

34. Johnson E.A., Lewis MJ (1979). "Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*". *Journal of General Microbiology*. 115:173-183.
35. Schroeder, W.A and Johnson E. (1995). "Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage". *Journal of Industrial Microbiology*, 14:502-507.
36. Schroeder, W.A and Johnson E. (1995). "Singlet oxygen and peroxil radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*". *Journal of Biological Chemistry*. 270:18374-18379.
37. Fleno B., (1988). "Astaxanthin producing yeast cells, methods for their preparation and their use" *WO 88:08025*.
38. Meyer P.S., Du Preez JC., (1993). "Effect of acetic acid on astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*". *Biotechnology Letters*. 15:919-924.
39. Meyer P.S., Du Preez J.C., (1994). "Effect of culture conditions on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma* in batch and chemostat culture". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 40:780-785.
40. Johnson E.A. (1994). "Process for *in vivo* production of astaxanthin and *Phaffia rhodozyma* yeast of enhanced astaxanthin content" *US Pat 5,356,809*.
41. Fleno B. (1994). "Astaxanthin producing yeast cells, methods for their preparation and their use". *US Pat 5,356,810*.
42. Yamane Y., Higashida, K., Nakashimada, Y., Kakinozo, T. And Nishio, N. (1997). "Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis". *Applied Environmental Microbiology*. 63:4471-4478.
43. Meyer P.S., Du Preez J.C., Kilian S.G., (1993). "Selection and evaluation of astaxanthin-overproducing mutant of *Phaffia rhodozyma*". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 9:514-520.
44. Parajó J.C., Santos, V. and Vázquez, M., (1997). "Optimization of carotenoids and xylitol by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*)". *Biotechnology Letters*. 19:139-141.
45. Bramley P.M., Mackenzie A., (1988). "Regulation of carotenoid biosynthesis". *Current Top Cell Reg*. 29:291-243.

46. Johnson E.A., An G., (1991). "Astaxanthin from microbial sources". *Crit. Rev Biotechnology*. 11:297-326.
47. Andrewes, A.G., Phaff H.J. and Starr M.P., (1976). "Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red pigmented fermenting yeast". *Phytochemistry*. 15:1003-1007.
48. Andrewes, A.G., Starr M.P., (1976). "(3R,3'R)-Astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*". *Phytochemistry*. 15:1009-1011.
49. Golubev, W.I., (1995) "Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*)". *Yeast*. 11:101-110.
50. An, G.H., Schuman D.B. and Johnson E.A., (1989). "Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content". *Applied and Environmental Microbiology*. 55(1):116-124.
51. Britton, G., (1995). "Structure and properties of carotenoids in relation to function". *FASEB Journal*. 9:1551-1558.
52. Ratledge, C., (1982). *Progress in Industrial Microbiology*. 16:119. En: A.H. Rose and J.S. Harrison. *The Yeast*, Vol. 3, p. 373, Academic Press (1989).
53. Rattray, J.B.M., Schibeci, A. and Kibley, D.K., (1975). *Bacteriological Reviews*. 39:197. En: A.H. Rose and J.S. Harrison. *The Yeast*, Vol. 3, p. 373, Academic Press (1989).
54. Boulton, C.A. and Ratledge, C., (1981). *Journal of General Microbiology*. 127:169 y 127:423. En: A.H. Rose and J.S. Harrison. *The Yeast*, Vol. 3, p.373, Academic Press (1989).
55. Kessell, R.H.J., (1968). *Journal of Applied Bacteriology*. 31:220. En: A.H. Rose and J.S. Harrison. *The Yeast*, Vol. 3, p. 376, Academic Press (1989).
56. Flores-Cotera, L.B., Martín, R. and Sánchez, S., (2001). "Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55:341-347.
57. Yoon, S.H., (1982). *Journal of Fermentation Technology*. 60:243. En: A.H. Rose and J.S. Harrison. *The Yeast*, Vol. 3, p. 378, Academic Press (1989).

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

58. Evans, C.T. and Ratledge, C., (1983). *Lipids*. 18:623. En: A.H. Rose and J.S. Harrison. *The Yeast*, Vol. 3, p. 378, Academic Press (1989).
59. Ratledge, C., (1980). "Hydrocarbons in Biotechnology". En D.E.F. Harrison, I.J. Higgins and R. Walsby. (eds). p.133-153. Hyden and Son, London.
60. Boulton, C.A. and Ratledge, C., (1984). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 129:2871. En: A.H. Rose and J.S. Harrison. *The Yeast*, Vol. 3, p. 377, Academic Press (1989).
61. Eroshin, V.K. and Drylova, N.I., (1983). *Biotechnology and Bioengineering*. 25:1693. En: A.H. Rose and J.S. Harrison. *The Yeast*, Vol. 3, p. 379, Academic Press (1989).
62. Zhelifonova, V.P., (1983). *Mikrobiolgiya, USSR (International edition)*, 5-2:219. En: A.H. Rose and J.S. Harrison. *The Yeast*, Vol. 3, p. 379, Academic Press (1989).
63. Yamauchi, H., (1983). *Journal of Fermentation Technology*. 61:275. En: A.H. Rose and J.S. Harrison. *The Yeast*, Vol. 3, p. 379, Academic Press (1989).
64. Gu, W.L., An G.H. and Johnson E.A., (1997). "Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 19:114-117.
65. Witter, B., (1974). *Archives of Microbiology*. 101:321. En: A.H. Rose and J.S. Harrison. *The Yeast*, Vol. 3, p. 380, Academic Press (1989).
66. Evans C.T. and Ratledge, C., (1984). "Effect of nitrogen source on lipid accumulation in oleaginous yeast". *Journal of General Microbiology*. 130:1693-1704.
67. Kakinozo T., Kobayashi M. and Nagai S. (1992). "Effect of carbon/nitrogen ratio on the encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*". *Journal of Fermentation Bioengineering*. 74:403-405.
68. Hall, M.J. and Ratledge C., (1977). *Applied and Environmental Microbiology*. 35:577. En: A.H. Rose and J.S. Harrison. *The Yeast*, Vol. 3, p. 381, Academic Press (1989).
69. Johnson, E.A. and Lewis, M. (1979). "Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*". *Journal of General Microbiology*. 115:173-183.

70. Choi, S.Y., Ryu, D.Y. and Rhee, J.S. (1982). *Biotechnology and Bioengineering*. 24:1165. En: A.H. Rose and J.S. Harrison. *The Yeast*, Vol. 3, p. 382, Academic Press (1989).
71. Lowenstein, J.M., (1967). *Biochemical Society Simposia*. 27:115. En: A.H. Rose and J.S. Harrison. *The Yeast*, Vol. 3, p. 406, Academic Press (1989).
72. Kohlaw, G.B. and Tan-Wilson, A., (1977). *Journal of Bacteriology*. 129:1159. En: A.H. Rose and J.S. Harrison. *The Yeast*, Vol. 3, p. 406, Academic Press (1989).
73. Evans, C.T. and Ratledge, C., (1984). *Archives of Microbiology*. 139:48. En: A.H. Rose and J.S. Harrison. *The Yeast*, Vol. 3, p. 417, Academic Press (1989).
74. Ratledge, C. and Holdsworth, J.E., (1985). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 22:217. En: A.H. Rose and J.S. Harrison. *The Yeast*, Vol. 3, p. 417, Academic Press (1989).
75. Sheridan R. and Ratledge, C., (1990). "Pathways of acetyl-CoA formation in *Candida albicans*". *FEMS Microbiology Letters*. 69:165-170.
76. Botham, P.A. and Ratledge, C., (1979). "A biochemical explanation for lipid accumulation in *Candida* 107 and other oleaginous microorganisms". *Journal of General Microbiology*. 114:361-375.
77. Evans C.T., (1983). *European Journal of Biochemistry*. 130:195. En: A.H. Rose and J.S. Harrison. *The Yeast*, Vol. 3, p. 417, Academic Press (1989).
78. Boulton, C.A. and Ratledge, C., (1981). "Correlation of lipid accumulation in yeasts with possession of ATP-CL". *Journal of General Microbiology*. 127:169-176.
79. Boulton, C.A. and Ratledge, C., (1981). *Journal of General Microbiology*. 127:423. En: A.H. Rose and J.S. Harrison. *The Yeast*, Vol. 3, p. 373, Academic Press (1989).
80. Mishina, M. and Kaminko, T., (1976). *European Journal of Biochemistry*. 71:295. En: A.H. Rose and J.S. Harrison. *The Yeast*, Vol. 3, p. 415, Academic Press (1989).

81. Evans, C.T., (1983). *European Journal of Biochemistry*. 130:617. En: A.H. Rose and J.S. Harrison. *The Yeast*, Vol. 3, p. 415-417, Academic Press (1989).
82. Evans, C.T. and Ratledge, C., (1985). *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 3:349. En: A.H. Rose and J.S. Harrison. *The Yeast*, Vol. 3, p. 417, Academic Press (1989).
83. Boulton, C.A. and Ratledge, C., (1983). *Journal of General Microbiology*. 129:2871. En: A.H. Rose and J.S. Harrison. *The Yeast*, Vol. 3, p. 417, Academic Press (1989).
84. Ratledge, C. and Wynn J.P., (2000). "Understanding microbial obesity". *SIM*. 50(4):181-185.
85. Rangasamy, D. and Ratledge, C., (2000). "Genetic enhancement of fatty acid synthesis by targeting rat liver ATP-citrate lyase into plastids of tobacco". *Plant Physiology*. 122.
86. Sedmak, J.J., (1990), "Extraction and quantification of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*". *Biotechnology Techniques*. 4:107-112.
87. Srere, J., (1962), "Citrate cleavage enzyme. *Methods in Enzymology*. 5:641-644.
88. Martín, R. (2001) . "Efecto de la fuente de carbono en la producción microbiana del pigmento astaxantina". Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
89. Ratledge, C. and Gilbert S.C., (1985). "Carnitine acetyl transferase activity in oleaginous yeast". *FEMS Microbiology Letters*. 27:273-275.