

00551
16



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



DIRECCION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE QUIMICA
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUIMICAS

299.359

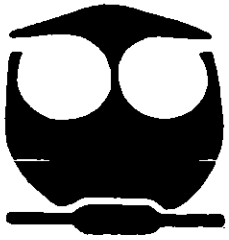
EFFECTO DE LA FUENTE DE NITROGENO SOBRE EL
CRECIMIENTO Y LA CAROTENOGENESIS EN LA
LEVADURA *P. rhodozyma*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUIMICAS)

P R E S E N T A :

ERIKA GRAJALES ESQUIVEL



MEXICO, D.F.,

DICIEMBRE 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Microbiología Industrial del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la asesoría del Dr. Sergio Sánchez Esquivel.

Jurado del examen de la Q.A. Erika Grajales Esquivel para optar por el grado de Maestra en Ciencias (Bioquímicas), con la réplica de la tesis: "Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento y la carotenogénesis en la levadura *Phaffia rhodozyma* " nombrado en reunión ordinaria por los miembros del Subcomité Académico el día 17 de septiembre del 2001.

PRESIDENTE	Dra. Amelia Farrés González-Saravia
VOCAL	Dra. Alicia González Manjarrez
SECRETARIO	Dr. Miguel Lara Flores
SUPLENTE	Dr. Jesús Aguirre Linares
SUPLENTE	Dra. Martha Patricia Coello Coutiño

Aunque no están todos los que son, si son todos los que están:

AGRADECIMIENTOS, DEDICATORIAS Y ALGO MÁS.....

A MI FAMILIA:

*Hay algo denso, unido, sentado en el fondo,
repetiendo su número, su señal idéntica.
cómo se nota que las piedras han tocado el tiempo,
en su fina materia hay olor a edad,
y el agua que trae el mar, de sal y sueño.*

A MIS PAPÁS, CARLOS Y ALTAGRACIA, seres fundamentales en mi vida. A quienes no solo admiro y respeto sino que amo profundamente. GRACIAS por su apoyo incondicional en cualquier empresa en la que me he aventurado.

A CARLOS (mi hermanito!! hermanote!!), OLIVIA(la manola mina y su buñuelo), CLARA (la manola mamima), FÉLIX (Felillo claro!!), ALEJANDRO (el janito de Ovi) Y PAOLA (mi preciosa Pavo) porque de cada uno ¡¡¡Verdaderamente he aprendido algo !!!! y porque con ustedes he compartido miles de vivencias que conforman parte de mi memoria histórica.

PARA TODA LA GENTE DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL:

Al Dr. Sergio Sánchez un agradecimiento sincero por permitirme estar en su grupo y orientarme a través no solo del desarrollo de este trabajo sino de la ciencia en general.

Al grupo de Phaffia, Dr. Luis Flores Cotera por todas las pláticas acerca de la levadura rosada, Daniela Castro, mi aprendiz de hechicera, Ruth Martín por su experiencia, Ángeles M. y Luz.

A Laura Escalante, Beatriz Ruiz, Magdalena Contreras, Veronica Noverón y Lety García por su apoyo incondicional que en miles de ocasiones me permitió continuar con mi trabajo. ¡¡¡Un millón de gracias!!! Así como Iveta, Angeles S. Elizabeth L., Romina y Lalo por la crítica constructiva.

Aunque lo prometido no hubiera sido deuda: A Silvia Guzmán, Gabriela Maldonado, Eli Moreno, Israel Pichardo, Joaquín Villanueva, Miguel Esparza, Enrique Sánchez y Agustín Luz. Las brumas del Norte y el Sur me dejaron un poco Oeste y así pasaron aquellos días. Biología, Química y Biomédicas, una mezcla que resultó bastante constructiva, además de inolvidablemente divertida.

Y de nuevo a Silvia, mi mejor amiga de toda la vida, eso lo tengo por cierto. Por las inagotables charlas, para ti agua de luna, fresca, con puntos de plata.

A mi comité tutorial: Dra. Amanda Gálvez Mariscal, Dra. Alicia González Manjarrez y el Dr. Sergio Sánchez Esquivel por sus valiosas críticas y aportaciones al trabajo de más de dos años.

A los miembros del jurado por el tiempo dedicado a la revisión del trabajo, en especial a la Dra. Amelia Farrés González-Saravia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM por las becas otorgadas.

INDICE GENERAL

RESUMEN	I
1. ANTECEDENTES	1
1.1 DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS CAROTENOIDES	1
1.2 BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES	2
1.3 FUNCIONES DE LOS CAROTENOIDES	5
1.2.1 Precursores de la vitamina A	5
1.2.2 Pigmentos accesorios	5
1.2.3 Antioxidantes	5
1.4 ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVAS	6
1.5 EL MODELO BIOLÓGICO: <i>P. rhodozyma</i>	7
1.6 ASTAXANTINA	9
1.6.1 Propiedades	9
1.6.2 Usos y producción	10
1.6.3 Regulación de biosíntesis de astaxantina por factores ambientales	12
1.7 LA FUENTE DE NITRÓGENO	13
1.7.1 Transporte de diversas fuentes de nitrógeno	14
1.7.2 Metabolismo central del nitrógeno	14
1.7.3 Aminoácidos	15
1.7.4 El catabolismo de la arginina	17
2. JUSTIFICACION	18
3. OBJETIVO GENERAL	19
4. HIPÓTESIS	20
5. ESTRATEGIAS	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS	21

6.1 CONSERVACIÓN DE LA CEPA	21
6.2 MEDIOS DE CULTIVO	21
6.3 FERMENTACIÓN	23
6.4 MUESTREO	23
6.5 DETERMINACIONES AL SOBRENADANTE	24
6.6 DETERMINACIONES A LAS CÉLULAS	25
6.7 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO DE PROTEÍNAS DE <i>P. rhodozyma</i>	27
6.8 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA	28
6.9 MEDICIONES CON ¹⁴ CARBONO. CONTADOR DE CENTELLEO	29
6.10 MEDICIÓN DE LA ENZIMA OXIDO NITRICO SINTASA	30
6.11 EXPERIMENTOS EN ANAEROBIOSIS	30
6.12 EXPERIMENTOS EN PRESENCIA DE UN INHIBIDOR DE CAROTENOGÉNESIS	31
6.13 EXPERIMENTOS EN PRESENCIA DE UN DONADOR DE ÓXIDO NÍTRICO	32
7. RESULTADOS	33
7.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>P. rhodozyma</i>	33
7.2 EFECTO DE LA ADICIÓN DE AMINOÁCIDOS SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA CAROTENOGÉNESIS EN <i>P. rhodozyma</i>	36
7.2.1 Adición de combinaciones de aminoácidos	36
7.2.2 Adición de aminoácidos individuales	39
7.2.3 Concentración óptima de arginina	40
7.3 ADICIÓN DE ARGININA A DIFERENTES TIEMPOS EN UNA FERMENTACIÓN DE <i>P. rhodozyma</i>	43
7.4 LA ARGININA COMO FUENTE DE CARBONO Y NITRÓGENO	47
7.5 EL CATABOLISMO DE LA ARGININA A TRAVÉS DE LA ARGINASA	50
7.6 SISTEMA DE CÉLULAS EN REPOSO (SCR)	54
7.6.1 SCR sin adición del efector	56
7.6.2 SCR adicionados con el efector	57

7.7 LA PRESENCIA DE LA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA	60
7.8 EFECTO DE LA ARGININA EN AUSENCIA DE OXÍGENO	63
7.9 LA ARGININA ES TÓXICA CUANDO SE USA UN INHIBIDOR DE CAROTENOGÉNESIS	66
7.10 EL SNP: UN DONADOR DE ÓXIDO NÍTRICO	71
8. DISCUSIÓN	74
8.1 CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES DE <i>P. rhodozyma</i> CULTIVADA EN UN MEDIO QUÍMICAMENTE DEFINIDO ADICIONADO CON SULFATO DE AMONIO	74
8.2 ALGUNOS AMINOÁCIDOS ESTIMULAN EL CRECIMIENTO Y LA CAROTENOGÉNESIS EN <i>P. rhodozyma</i>	75
8.3 LA ARGININA NO ES UTILIZADA COMO BLOQUE DE CONSTRUCCIÓN DE CAROTENOIDES	76
8.4 EL METABOLISMO DE ARGININA, UNA DE LAS RUTAS	79
8.5 EL SISTEMA DE CÉLULAS EN REPOSO, ESTRATEGIA PARA DIFERENCIAR ENTRE UNA INDUCCIÓN Y UNA ACTIVACIÓN	79
8.6 UNA EXPLICACIÓN PARA LA ACUMULACIÓN DE CAROTENOIDES EN <i>P. rhodozyma</i> CULTIVADA CON ARG (LA PRESENCIA DE NOS)	82
8.7 OTRAS EVIDENCIAS DE LA EXISTENCIA DE NOS EN <i>P. rhodozyma</i>	84
8.8 LOS CAROTENOIDES PROTEGEN A <i>P. rhodozyma</i> CONTRA EL ESTRÉS OXIDATIVO GENERADO POR ÓXIDO NÍTRICO	86
9. CONCLUSIONES	87
10. REFERENCIAS	89
ANEXO I Especificaciones del equipo	
ANEXO II Cálculo de la concentración de astaxantina	
ANEXO III Cálculo de la actividad específica de NOS	

RESUMEN

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- β -caroten-4,4'-diona) es un pigmento rosado que pertenece al grupo de las xantofilas. Es un metabolito secundario al que se le han atribuido diferentes funciones biológicas: 1) es responsable de la coloración de salmones, crustáceos y muchas aves; 2) aumenta la respuesta inmune y previene el cáncer; 3) funciona como antioxidante a través de la inactivación de radicales libres que se producen durante el metabolismo normal de las células.

Las fuentes de obtención de este pigmento incluyen a la levadura *Phaffia rhodozyma* que es capaz de sintetizar diversos carotenoides entre los que la astaxantina constituye hasta un 85%. Existen muchos reportes del efecto de factores nutricionales y ambientales sobre la síntesis y la regulación de la producción de este pigmento en esta levadura. Sin embargo, y aun considerando la importancia nutricional del nitrógeno, existe poca información sobre la influencia de este nutriente en la síntesis de esta xantofila en *P. rhodozyma*. En este trabajo evaluamos el efecto que diversas fuentes de nitrógeno tienen sobre el crecimiento de la levadura y la producción de carotenoides, para posteriormente elegir de entre estas fuentes la que presentara mayor acción positiva o negativa. Finalmente caracterizamos el efecto de una de ellas, buscando establecer su mecanismo de acción. Así, al probar el efecto de amonio y de 20 aminoácidos sobre la síntesis de carotenoides se seleccionó a la arginina por estimular poco más del 100% la producción del pigmento cuando se utilizó en una concentración 10 mM con respecto a un control con la misma concentración de sulfato de amonio. A través del uso de ^{14}C -arginina se pudo comprobar que esta estimulación de la carotenogénesis en presencia del aminoácido no se debía a que su esqueleto carbonado fuera utilizado por la célula como bloque de construcción de los carotenoides. La utilización de un sistema de células en reposo sugirió que la arginina ejercía su efecto estimulador a través de la inducción de síntesis de proteínas (probablemente algunas de las enzimas de la vía carotenogénica) en *P. rhodozyma*. Nos basamos en el catabolismo de este aminoácido para tratar de explicar el mecanismo por medio del cual provoca la acumulación de carotenoides en la levadura, por un lado sabíamos que la arginina es degradada a ornitina y urea a través de la arginasa, por tanto se probaron individualmente estas dos fuentes de nitrógeno para buscar si existía alguna estimulación en la producción. Además se midió la actividad de la óxido nítrico sintasa, enzima que, en presencia de oxígeno y arginina, forma citrulina y óxido

nítrico, una especie de oxígeno reactiva que parece generar estrés oxidativo en las células de *P. rhodozyma*. Los resultados mostraron una alta actividad enzimática cuando la levadura se cultivó en presencia de arginina. Además, al cultivar a la levadura en ausencia de O₂ pero en presencia del aminoácido se observó que no hay estimulación en la producción del pigmento, lo que apoya fuertemente la hipótesis de la generación de óxido nítrico, y su efecto sobre la síntesis de las enzimas carotenogénicas, debido a que la enzima necesita el O₂ para llevar a cabo su actividad. Por último se utilizó nitroprusiato de sodio, un donador de óxido nítrico, que a una concentración de 0.1 mM provoca una alta producción de carotenoides como respuesta de *P. rhodozyma* a la generación de estrés oxidativo.

1. ANTECEDENTES

1.1 DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS CAROTENOIDES.

En 1831 Wachenroder propuso el término *caroteno* para el pigmento hidrocarbonado que cristalizó de las zanahorias. Tiempo después, Berzelius llamó a los pigmentos amarillos más polares, extraídos de hojas de otoño, *xantofilas* y Tswett, quien separó muchos de estos compuestos por técnicas cromatográficas, llamó al grupo entero *carotenoides* (Allen, J. et al., 1995).

Los carotenoides son compuestos coloridos que se encuentran en la naturaleza. Los únicos organismos capaces de sintetizar estos pigmentos son las bacterias, los hongos, las algas y las plantas (Johnson and An, 1991). Estructuralmente son isoprenoides que contienen una cadena poliénica característica de 40 átomos de carbono con dobles enlaces conjugados. Por hidrogenaciones, deshidrogenaciones, ciclizaciones, oxidación o por combinación de estos procesos, obtenemos los dos grupos de pigmentos: los hidrocarbonados (carotenos) y sus derivados oxigenados (xantofilas).

En general los carotenoides son moléculas extremadamente lipofílicas con poca o ninguna solubilidad en agua. Por tanto casi siempre se localizan en áreas hidrofóbicas de las células como membranas o glóbulos grasos (Bramley and Mckenzie, 1988). Solo cuando están asociados a proteínas, o están substituidos por grupos polares fuertes, como en el caso de la mayoría de las xantofilas, pueden encontrarse en ambientes acuosos (Armstrong, 1996).

Estos pigmentos presentan coloraciones que van del amarillo al rojo (Johnson, 1991) debido a su propiedad de absorber luz, la cual deriva de la presencia de dobles enlaces conjugados que conforman un largo cromóforo. Así un cromóforo que contiene siete o más dobles enlaces conjugados tiene la capacidad de absorber luz en la región del visible (Britton, 1995).

En los últimos 35 años se han identificado más de 600 estructuras de carotenoides diferentes. Son adicionados a algunos alimentos, bebidas y forrajes en forma de extractos naturales, muchos de los cuales fueron obtenidos por síntesis microbiana, o como productos de síntesis química, lo que ha despertado un creciente interés sobre su modo de acción y función en los sistemas vivos.

1.2 BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES.

Las rutas metabólicas de biosíntesis de carotenoides se encuentran relacionadas con la formación de compuestos tales como isoprenos y sus derivados, monoterpenos, sesquiterpenos, giberelinas y esteroides (Johnson and An, 1991). En todos los organismos carotenogénicos parece existir, en los primeros pasos de formación, una vía común de síntesis, mientras que las diferencias se encuentran en los pasos finales de síntesis de carotenos y sobre todo en las xantofilas.

La biosíntesis inicia con la vía del acetato/mevalonato, donde la hidroximetil glutaril coenzima A sintasa (HMG-CoA sintasa) condensa tres moléculas de acetil-coenzima A, para formar HMG-CoA, posteriormente se produce el primer precursor isoprenoide de 5 carbonos, mevalonato (MVA), por la acción de la HMG-CoA reductasa. Los siguientes pasos incluyen la fosforilación y descarboxilación para la formar el isopentenil-pirofosfato (IPP). La formación de IPP por esta ruta se ha descrito para animales, plantas hongos y bacterias (Disch, 1998). El IPP es isomerizado a dimetilalil pirofosfato (DMAPP) por la IPP isomerasa, entonces se adicionan secuencialmente tres moléculas más de IPP catalizadas por fenil transferasas para formar geranil-geranil pirofosfato (GGPP). Los intermediarios formados durante estas adiciones a DMAPP hasta GGPP, son precursores de otras moléculas: el geranil pirofosfato (C₁₀): de monoterpenos; el farnesil pirofosfato (C₁₅): de esteroides, hopanoides, bacterioclorofilas (c,d,e,g), menaquinona, etc.; y el GGPP (C₂₀): de quinonas, giberelinas, diterpenos, bacterioclorofilas (a,b), tocoferoles, etc; (Goodwin, 1993, Armstrong, 1994, Bach 1995, Fraser, 1997, Armstrong, 1997).

La formación del primer esqueleto de los carotenoides de 40 átomos de carbono llamado fitoeno (compuesto incoloro), se realiza al condensarse dos moléculas de GGPP, por acción de la fitoeno sintasa. El fitoeno es desaturado para su conversión en licopeno, molécula de la cual derivan los carotenoides cíclicos y acíclicos (Fig. 1.1). En esta desaturación participan dos tipos de enzimas desaturasas: CrtI, produce licopeno o neurosporeno en tres o cuatro desaturaciones que requieren de ATP, en organismos no fotosintéticos y CrtP., que forma ζ-caroteno en organismos fotosintéticos, y los cuales posteriormente producen licopeno, por otra enzima ζ-caroteno desaturasa (Armstrong and Hearts, 1996 y 1997).

En la biosíntesis de carotenoides cíclicos, enzimas ciclasas actúan sobre los extremos de licopeno. Existen dos tipos de ciclasas: CrtY, en eubacterias no fotosintéticas y hongos; y CrtL

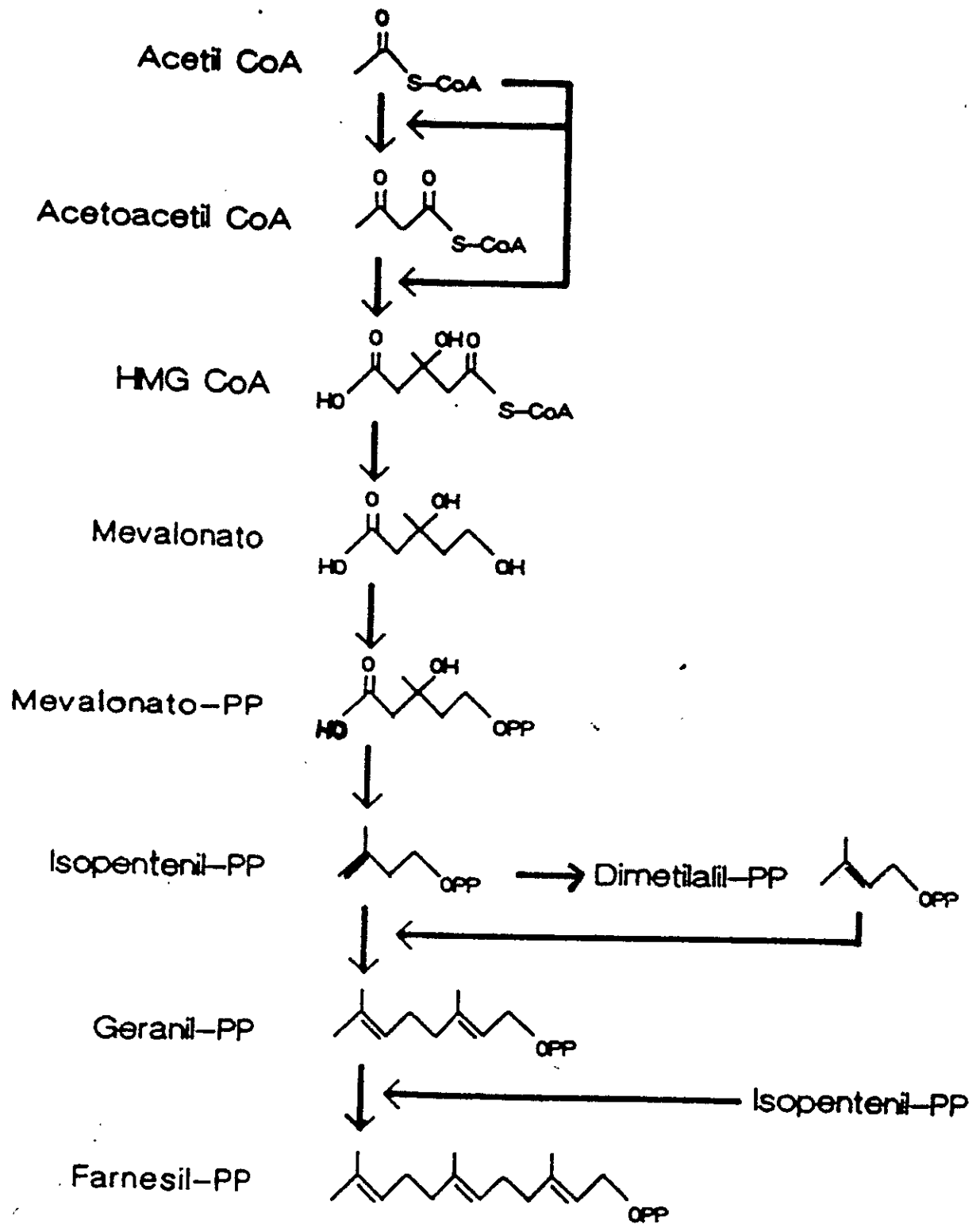


Fig. 1.1 Ruta metabólica general de biosíntesis de carotenoides. CoA: Coenzima A; HMG: hidroximetilglutarilCoA; PP:pirofosfato (Tomado de Velázquez, 1995).

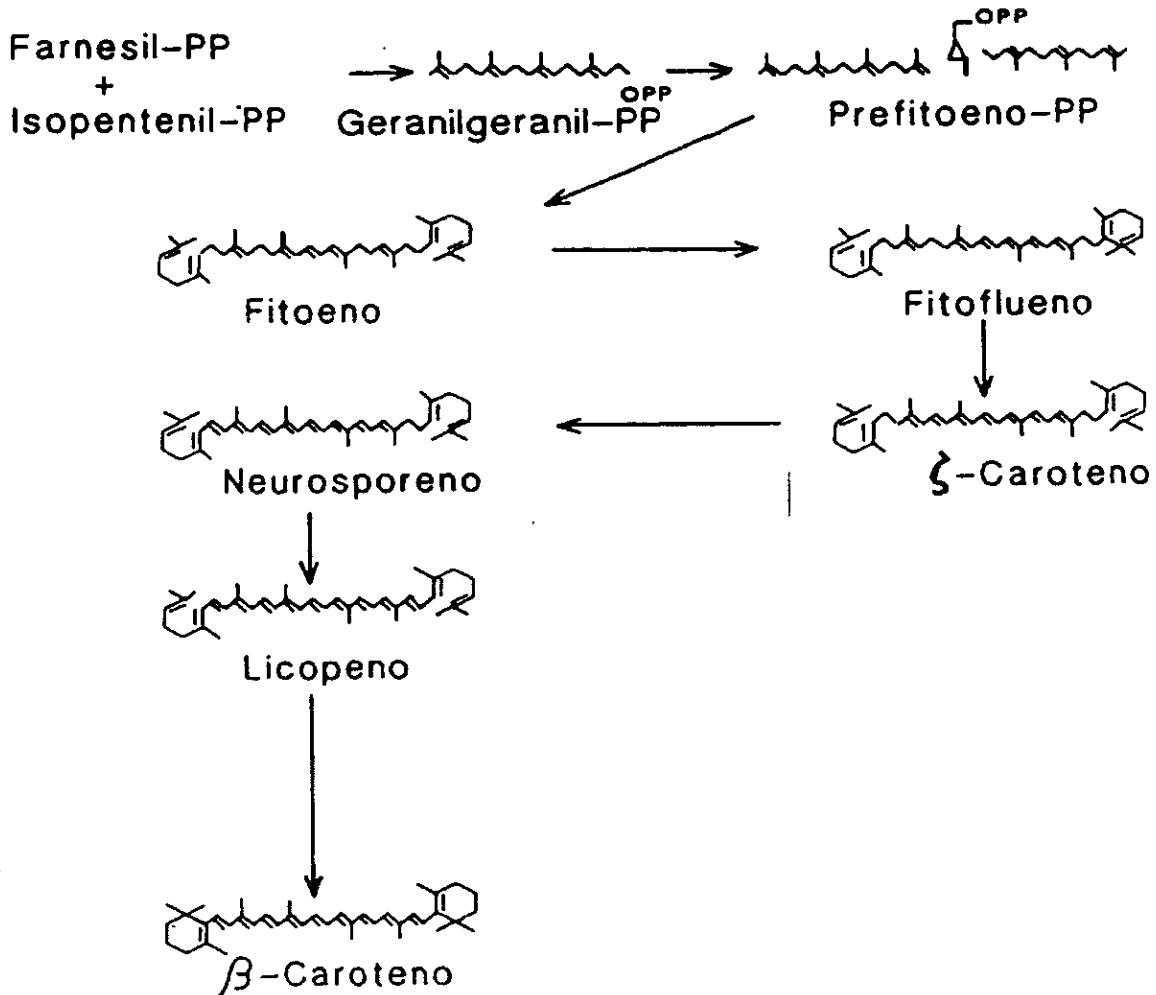


Fig. 1.1 Continuación.

en cianobacterias, algas y plantas superiores. Ambos tipos de enzimas producen β -caroteno en dos β ciclizaciones y son estructuralmente diferentes. (Armstrong, 1996).

Las xantofilas y sus derivados glucosilados son productos de la oxidación de α - y β -caroteno. Aunque las rutas biosintéticas no se conocen en todos los microorganismos, estudios hechos en bacterias, principalmente *Erwinia herbicola*, han permitido hipotetizar algunas vías, donde se involucran enzimas principalmente hidroxilasas, oxigenasas y glucosidasas, con varios productos finales e intermediarios (Armstrong, 1996 y 1997) dependiendo de cada organismo.

Las EOR se generan de manera espontánea por la excitación del dióxigeno o por la reducción parcial del mismo. Por ejemplo, durante la fotosíntesis, el fotosistema II lleva a cabo la oxidación completa del agua en dióxigeno, mientras que durante la respiración, la citocromo oxidasa lleva a cabo la reducción completa del dióxigeno en agua (Fig. 1.2). El peróxido de hidrógeno también se genera por la acción de varias enzimas, siendo la más importante la superóxido dismutasa. El óxido nítrico solo se produce por la acción de la óxido nítrico sintasa. En cambio el peroxinitrito se produce de manera espontánea (Hansberg, 1989).

De estos EORs el oxígeno en singlete y el radical hidroxilo son los compuestos más reactivos (Hansberg, 1999). Se sabe que el oxígeno singlete es una especie altamente reactiva capaz de iniciar la peroxidación de lípidos, de inactivar proteínas o de causar daño en moléculas de DNA o RNA (Di Mascio, et al, 1990).

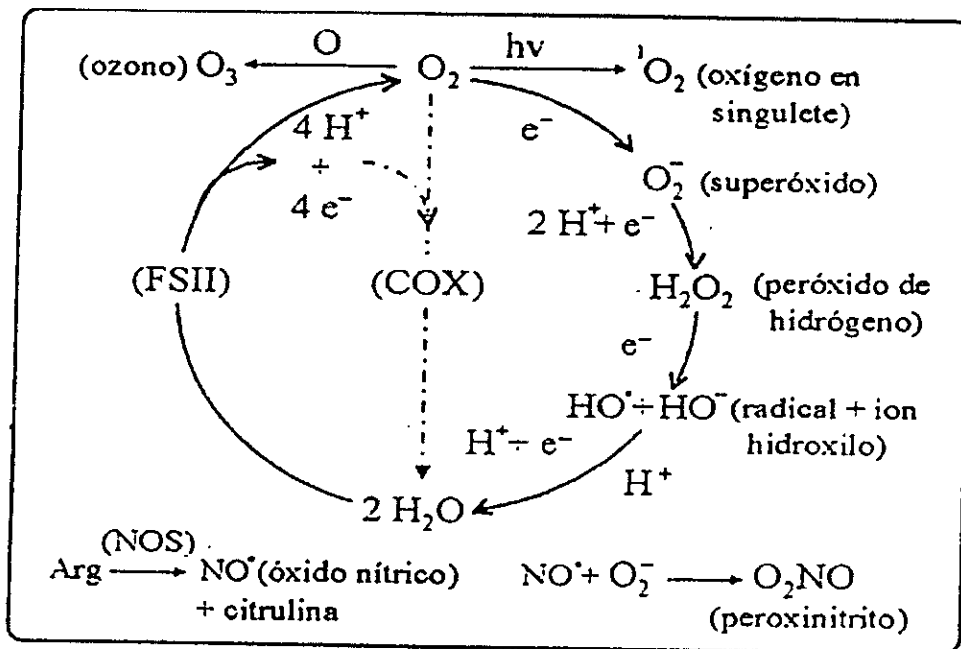


Fig. 1.2 Las principales especies de oxígeno reactivas (EOR) y la manera como se producen. Fotosistema II (FSII); Citocromo oxidasa (COX); Óxido nítrico sintasa (NOS). Tomado de Hansberg, 1999.

1.5 EL MODELO BIOLÓGICO: *Phaffia rhodozyma*.

La levadura *P. rhodozyma* fue inicialmente aislada por Herman J. Phaff y colaboradores japoneses en 1960 a partir de resinas de varias especies de *Betula* y árboles relacionados. Esta levadura se encuentra generalmente en regiones montañosas de latitudes de alta elevación, y

generalmente a bajas temperaturas. Muchas cepas de esta especie se han aislado de varias regiones de Rusia (Johnson and Schroeder, 1996).

P. rhodozyma es un basidiomiceto, se ha demostrado su ciclo sexual en una cepa nombrada *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Golubev, 1995). Sin embargo, estudios moleculares han demostrado la existencia de más de una especie de *P. rhodozyma*, por lo que no se pueden utilizar ambos nombres como sinónimos, ya que no todas las especies de *P. rhodozyma* son *X. dendrorhous* (Fell and Blatt, 1999). Sus células vegetativas pueden ser sencillas, dobles y ocasionalmente forman cadenas cortas. Sus dimensiones varían de 3.5 a 10.0 μm de ancho por 5 a 13.5 μm de largo y la forma de las células puede ser esférica u ovoide (Miller et al., 1976). La gemación ocurre con frecuencia en el mismo sitio.

Existen dos características importantes en *P. rhodozyma*, una es su propiedad de formar carotenoides con un color rojo intenso y la otra es su capacidad para fermentar azúcares. Esta última característica no la posee ninguna de las otras levaduras rojas que se conocen. Entre ellas están la clase deuteromycetos y basidiomycetos con los géneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula* (con quienes *P. rhodozyma* está filogenéticamente relacionada, Johnson and An, 1991) y *Rhodospiridium*, además de los ballistosporógenos *Sporidiobolus* y *Sporobolomyces*. Típicamente estas levaduras rojas contienen β -caroteno, γ -caroteno, toruleno y torularodina como carotenoides principales (Andrews et al., 1976; Andrews and Starr, 1981). Sin embargo, ninguna de ellas es capaz de producir astaxantina, principal carotenoide sintetizado por *P. rhodozyma*, el cual constituye hasta un 85% del total. Este pigmento es responsable de la coloración de salmones crustáceos y muchas aves.

En cuanto al metabolismo de *P. rhodozyma*, se sabe que es capaz de asimilar diversas fuentes de carbono como: D-glucosa, maltosa, sacarosa, celobiosa, trealosa, rafinosa, almidón soluble, etanol, D-manitol, salicina (débil), α -metil-glicósido, 2-cetogluconato y lactato (Fleno, et al., 1994).

Todos los pigmentos de *P. rhodozyma* se encuentran no esterificados ni unidos a ninguna otra molécula. En la siguiente tabla se muestra el tipo y la concentración de carotenoides producidos por la levadura *P. rhodozyma*.

Tabla 1.2 Carotenoides aislados de *P. rhodozyma*.

CAROTENOIDE	% DE CAROTENOIDES TOTALES*
β -caroteno	2-2.5
γ -caroteno	0.01
Neurosporeno	0.01
Licopeno	0.01
Equinenona	2-4
3-hidroxi equinenona	3-4
3 hidroxi-3',4'-didehidro- β - ψ -caroten-4-ona	0.3-0.5
Foenicoxantina	5.7
Astaxantina	83-87

*Extraídos con acetona de células de *P. rhodozyma* cultivadas en un medio sintético a 22 °C, durante 5 días. Tomado de Andrews, et al., 1976.

1.6 ASTAXANTINA

1.6.1 Propiedades.

La astaxantina es un carotenoide oxidado y por lo tanto pertenece al grupo de las xantofilas. Como la mayoría de los carotenoides, la astaxantina está compuesta de 8 unidades isoprenoide.

El nombre sistemático de la astaxantina es: 3,3'-dihidroxi- β,β -caroten-4,4'-diona y su fórmula química: $C_{40}H_{52}O_4$. Tiene un peso molecular de 596.86 g/mol y un punto de fusión de 224 °C. Cuando se encuentra en forma cristalina su color es violeta oscuro, pero cuando se encuentra en solución su color característico es naranja-rosáceo. Es soluble en diclorometano, cloroformo, acetona y DMSO. Tiene una absorción máxima en el espectro visible de 489 nm en cloroformo, 480 nm en acetona y 478 nm en etanol. Además, se sabe que el cromóforo poliénico conjugado de los carotenoides es altamente sensible a la luz, oxígeno y calor. Otras partes de la molécula son fácilmente modificados por ácidos o álcalis, tal es el caso de la astaxantina, que en presencia de cualquier base puede sufrir una oxidación rápida e irreversible al correspondiente 2,3-dehidro derivado, llamado astaceno ($C_{40}H_{48}O_4$).

La astaxantina presenta dos carbonos asimétricos en las posiciones 3 y 3' y puede existir en cuatro configuraciones, de las cuales la astaxantina posee la conformación 3R, 3R' (Fig. 1.3).

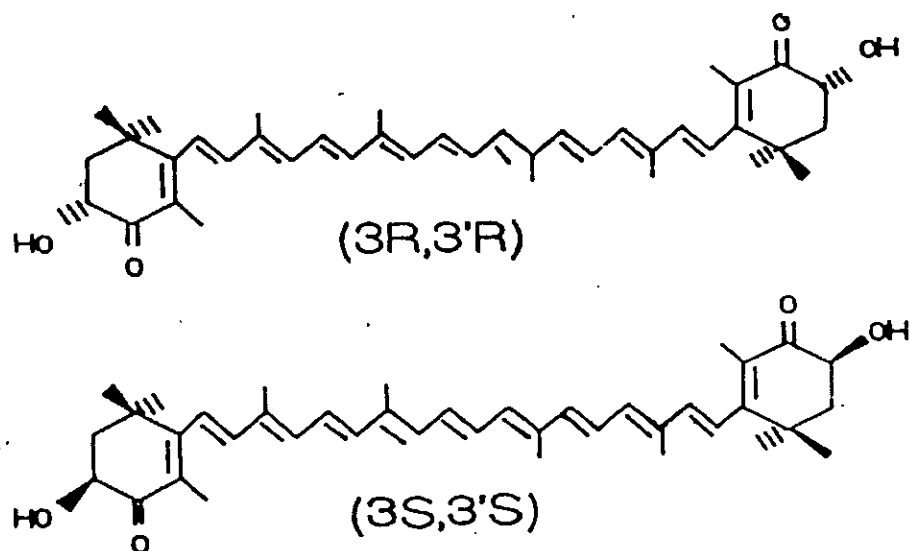


Fig. 1.3 Estructura química de isómeros conformacionales de la astaxantina.

1.6.2 Usos y producción.

Un factor importante en la aceptación por parte del consumidor de algunos productos marinos, entre ellos los salmónidos, es el color de su carne. Por ello, en el caso de los peces que se reproducen en cautiverio, los carotenoides se incluyen en su dieta para obtener esa pigmentación deseada (Meyer, et al., 1993). De acuerdo con Johnson and An (1991) aproximadamente 460 000 toneladas de salmones cultivados en cautiverio serían producidos para el final de la década. Además, mientras que más de 250 000 toneladas de trucha también en cautiverio fueron producidas en todo el mundo durante 1987, se ha estimado que dentro de pocos años, más del 20% de la producción de peces en el mundo derivará de la industria acuicultural. Esta industria depende grandemente de la producción de productos de alta calidad, siendo la pigmentación el factor de mayor calidad. Se estima que más de 100 000 kg de carotenoides fueron requeridos en el año 2000 para la alimentación de estos peces. Ahora bien, solo algunos microorganismos producen astaxantina (Nellis and De Leenheer, 1989) de los cuales *P. rhodozyma* es uno de los mejores candidatos para la producción de este carotenoide a nivel industrial, por su alto contenido de pigmento (Johnson and Lewis, 1979).

La síntesis de astaxantina en *P. rhodozyma* inicia con la formación de isopentenil-pirofosfato (IPP) a partir de acetilCoA a través de 3 reacciones feniltransferasa, el IPP forma

geranylgeranyl-pirofosfato (GGPP) vía geranyl pirofosfato y farnesil pirofosfato. La condensación de dos moléculas de GGPP forma fitoeno el cual, vía pasos de deshidrogenación y formación de los anillos sintetiza astaxantina a partir de β -caroteno. Esta última parte de la biosíntesis no ha sido bien determinada pero Andrews (1976) ha propuesto la ruta metabólica esquematizada en la Fig. 1.4.

El sistema enzimático que transforma el GGPP a astaxantina no es conocido, y por tanto no se sabe como es que *P. rhodozyma* produce (3R,3'R) astaxantina y si existen o no algunos pasos regulatorios durante esta parte de la biosíntesis (Fleno, et al., 1994).

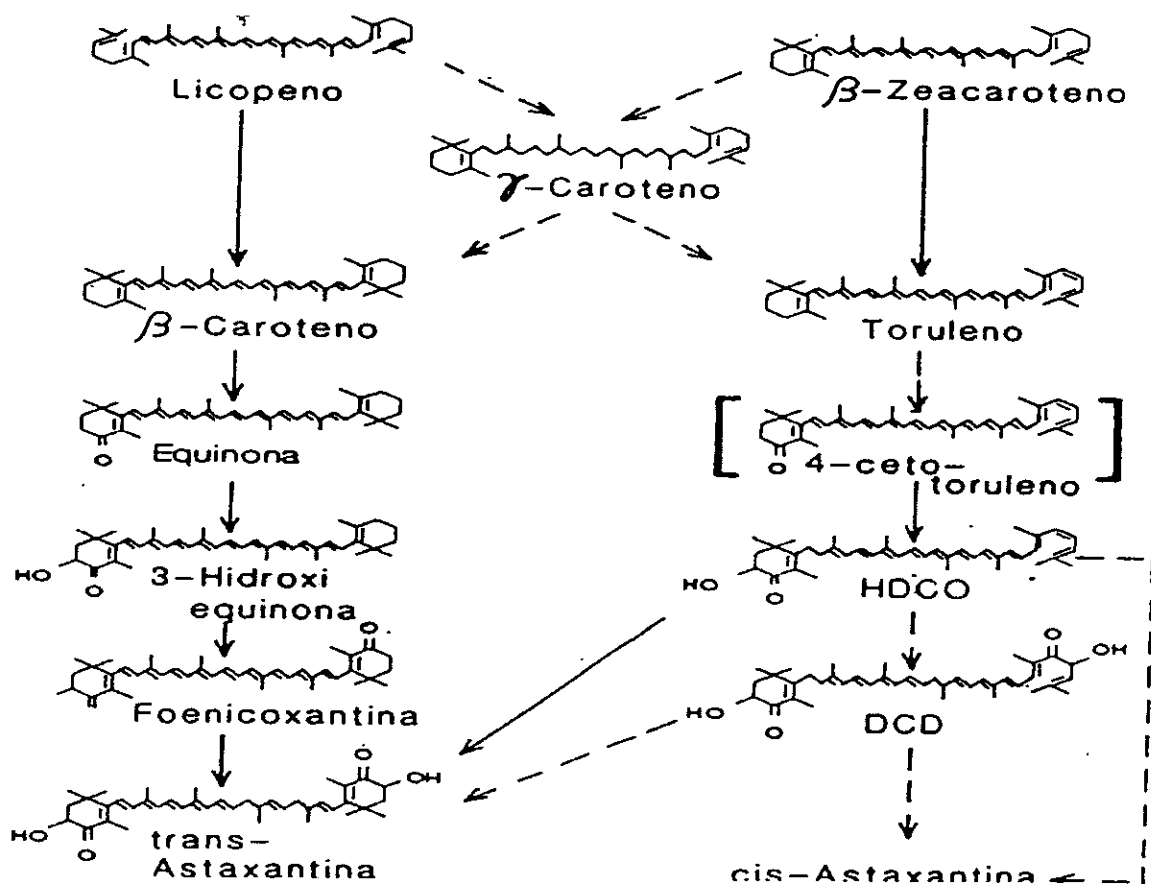


Fig. 1.4 Ruta de biosíntesis de astaxantina en *P. rhodozyma* propuesta por Andrews (izquierda, 1976) y An (derecha, 1991). HDCO: 3-hidroxi-3'-4'-didehidro- β - ψ -caroten-4-ona; DCD: 3,3'-dihidroxi- β - γ -caroten-4-4'-diona. Tomado de Velázquez, 1995.

Por otro lado, la conversión de acetilCoA a IPP en algunos otros organismos que también producen isoprenoides y las enzimas que toman parte en ella han sido descritos con gran detalle, pero se conoce poco de las enzimas que convierten IPP a GGP.

Hoffman-La Roche Suiza, produce astaxantina sintética (Carophyll pink) que cuesta aproximadamente US \$2500/Kg, el cual contiene 8% w/w de astaxantina, aunque todavía no ha sido aprobada por la FDA (Johnson and Lewis, 1991). Esto nos indica que la astaxantina es el componente más costoso de las dietas de los salmones (An et al., 1991).

Es importante mencionar también que el mercado mundial para el uso de astaxantina es de al rededor de US \$200 millones según predicciones hechas por An, et al. (1989) y Meyer et al. (1993).

Ahora bien, debido a la alta eficiencia de la transferencia de la astaxantina a la carne de salmónidos y al hecho de que la preparación con *P. rhodozyma* podría sustituir algunos nutrientes requeridos para el crecimiento de los peces, la inclusión de esta levadura en su alimentación puede mejorar ambas cosas, el color y el sabor de los salmones de manera más efectiva que el aditivo sintético (Johnson et al., 1980).

Además de dar color, la astaxantina tiene propiedades antioxidantes (Palozza and Krinsky, 1992) gracias a lo cual se ha demostrado que juega un papel importante en la activación del sistema inmune y en la prevención de carcinogénesis y otras enfermedades degenerativas (Miller, 1996).

1.6.3 Regulación de biosíntesis de astaxantina por factores ambientales y nutricionales.

Tanto la masa celular de *P. rhodozyma* como los carotenoides que produce pueden ser alterados por cambios en la composición del medio de cultivo y por la influencia de factores ambientales (Meyer et al., 1994; Calo et al., 1995; Meyer and du Preez, 1993; Johnson and An, 1991; Johnson et al., 1994). Muchos de estos factores no son específicos y los cambios que ocasionan son debidos a alteraciones del metabolismo celular. En *P. rhodozyma* bajas tensiones de oxígeno y/o altos niveles de glucosa promueven un metabolismo fermentativo y en estas condiciones la producción de astaxantina se reduce notablemente. El rendimiento celular y μ_{max} disminuyen también de manera significativa a concentraciones iniciales de glucosa mayores de 10- 15 g/L (Johnson and Lewis, 1979; Fang and Cheng, 1993).

La fuente de carbono es otro elemento importante en la producción de astaxantina en *P. rhodozyma*, la fructosa y la glucosa permiten obtener una buena pigmentación y un rápido crecimiento (Meyer and du Preez, 1994a). En succinato y en glucono δ lactona el crecimiento es lento pero se obtienen altas concentraciones de astaxantina. La adición de una concentración de etanol 0.2% incrementa la producción de carotenoides totales en *P.*

rhodozyma (Gu *et al*, 1997). Bajas concentraciones de ácido acético adicionadas a un medio de cultivo conteniendo glucosa 1%, disminuyen la producción de pigmentos y astaxantina de las células (Meyer and du Preez, 1993). La rafinosa produce células con la mayor concentración de astaxantina pero el crecimiento celular es pobre en comparación con otras fuentes de carbono. Aparentemente las fuentes de carbono de lenta asimilación promueven una mayor pigmentación de las células, pero con menor crecimiento.

En la mayor parte de los estudios realizados, la formación de astaxantina generalmente esta asociada al crecimiento, sobre todo en cepas mutantes (Johnson and Lewis, 1979; Fang and Chiou, 1996; Meyer and du Preez, 1994). En cultivo por lote es común un aumento del contenido de astaxantina de las células después de agotarse la fuente de carbono, sin embargo, por lo general, este incremento es a expensas de una reducción en la masa celular sin que ocurra un aumento considerable en la cantidad de astaxantina presente. Por ello Johnson y Lewis han sugerido que la presencia de una fuente de carbono es necesaria para la síntesis de astaxantina. En algunos hongos como *P. blakesleeanus*, *Epicoccum nigrum* y *Sporobolomyces roseus* la síntesis de pigmentos no empieza hasta que el crecimiento ha cesado y la formación de carotenoides es estimulada por exceso de carbohidratos y nitrógeno limitante (Bramley and Mackenzie, 1988).

Otros factores que se han reportado como estimuladores de la formación de carotenoides en diferentes microorganismos incluyen: alimentación incrementada de fuente de carbono, limitación de nitrógeno, presencia de aminoácidos como metionina, valina, glicina, triptófano, fenilalanina, tirosina, y leucina, uso de fuentes de carbono como glicerol, acetato, succinato y citrato de sodio, los niveles de oxígeno disuelto, inducción por luz, adición de piridoxina, residuos de tomate, tipo de cultivo (lote alimentado, continuo), fosfatos, limitación de hierro, cobre, zinc o manganeso, potasio y citrato, pH, inhibidores de fosfatasas (Na F), α pineno y limoneno (Bramley and Mackenzie, 1988; Johnson and An, 1991; Fleno et al., 1988; Fleno et al., 1994; Johnson et al., 1994; Flores-Cotera, et. al., 2001, Flores-Cotera, and Sánchez, 2001).

1.7 LA FUENTE DE NITRÓGENO.

El nitrógeno ocupa el cuarto lugar, después del carbono, hidrógeno y oxígeno, en su contribución a la masa de las células vivas. El nitrógeno atmosférico, N_2 , es abundante pero demasiado inerte para su utilización en la mayoría de los procesos bioquímicos, y solo unos

pocos organismos son capaces de fijarlo para producir nitrógeno asimilable para el resto de los organismos (Nelson, et al., 2001).

1.7.1 Transporte de diversas fuentes de nitrógeno.

La mayoría de las levaduras son capaces de utilizar una gran cantidad de compuestos nitrogenados incluyendo sales inorgánicas, aminoácidos, urea y γ -amino butirato (GABA). Cuando la fuente de nitrógeno proviene de una sal inorgánica, tal es el caso de las sales de amonio: sulfato, cloruro, fosfato, citrato, tartrato y oxalato, entre otros, el amonio es transportado al interior de la célula por simple difusión si la concentración de este ion es superior a 20 mM. Además, existen en la célula 3 permeasas: Mep1p, Mep2p, Mep3p que son activadas cuando la concentración de amonio es menor a 5 mM (ter Schure, et al., 1995).

Por otra parte, los aminoácidos se transportan a través de la membrana plasmática contra un gradiente de concentración, por una permeasa general de aminoácidos (gap) con una alta capacidad y una baja afinidad. Además, varias permeasas de aminoácidos compiten en el transporte específico de éstos con una baja capacidad y una alta afinidad incluso en concentraciones mucho menores hacia dentro de la célula. Son 7 sistemas antiporte de aminoácidos y todos son movidos por una fuerza protón motriz que toma su energía de la hidrólisis de ATP. Los sustratos que transportan son: arginina, arginina-lisina, histidina, fenilalanina-triptofano, tirosina, glutamina-asparagina e isoleucina-valina (Hofman-Bang, J., 1999).

Los componentes nitrogenados pueden ser incorporados directamente a la síntesis de proteínas o bien degradados hacia amonio y glutamato para entrar a la ruta biosintética en el inicio. Cualquier aminoácido puede ser sintetizado cuando existe suficiente glutamina o glutamato, además de varios esqueletos de carbono intermediarios.

Para poder usar una fuente de nitrógeno, las levaduras tiene que convertirla en glutamato y glutamina. Estos dos aminoácidos sirven como donadores de nitrógeno para la extensa gama de compuestos celulares que contienen este elemento. Ambos aminoácidos pueden ser sintetizados usando amonio como donador del grupo amino.

1.7.2 Metabolismo central del nitrógeno.

Todos los aminoácidos pueden ser catabolizados para formar amonio y glutamato. Si es necesario, estos dos metabolitos pueden interconvertirse a través del α -cetoglutarato, los

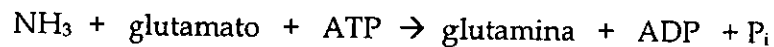
cofactores NADPH y NADP, así como energía en forma de ATP. Además, juntos pueden formar glutamina. A la interconversión entre estos 3 compuestos nitrogenados se le conoce como el metabolismo central del nitrógeno (MCN) (ter Schure, et al., 2000).

Son cuatro las reacciones incluidas en el MCN.

- La reacción 1 es catalizada por la NADP-glutamato deshidrogenasa (NADP-GDH) :



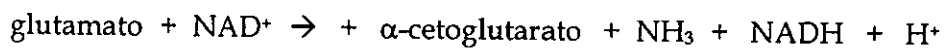
- La reacción 2 es catalizada por la glutamina sintetasa (GS) :



- La reacción 3 es catalizada por la glutamina 2-oxogluturato aminotransfesa (GOGAT) :



- La reacción 4 es catalizada por la glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD (NAD-GDH):



Así, cualquier compuesto nitrogenado que pueda ser transportado dentro de la célula y pueda ser metabolizado hasta formar glutamato o amonio puede ser utilizado como única fuente de nitrógeno.

1.7.3 Aminoácidos.

Los esqueletos carbonados de los aminoácidos generalmente entran al ciclo del ácido cítrico y de allí se oxidan para producir energía química o se canalizan hacia la gluconeogénesis. En algunos casos las rutas de reacción están estrechamente relacionadas con pasos del catabolismo de ácidos grasos.

No obstante, hay un factor importante que distingue la degradación de aminoácidos de los demás procesos catabólicos: cada aminoácido contiene un grupo amino. Por tanto todas las

rutas degradativas pasan a través de una etapa clave en la que se separa al grupo α -amino del esqueleto carbonado, desviándolo hacia rutas especializadas para el metabolismo del grupo amino (Fig. 1.5).

En su habitat natural *S. cerevisiae* es capaz de crecer en una gran variedad de fuentes de nitrógeno, sin embargo no en todas crece bien. Existen las llamadas buenas fuentes de nitrógeno, que permiten un crecimiento más rápido. Entre ellas se encuentran la glutamina y la asparagina, las cuales sirven como una excelente fuente tanto de glutamato como de glutamina intracelular. Las malas o pobres fuentes de nitrógeno como el aminoácido prolina y la urea. Aunque no se sabe muy bien porque, se ha observado que en presencia de amonio o glutamato las levaduras tienen velocidades de crecimiento menores.

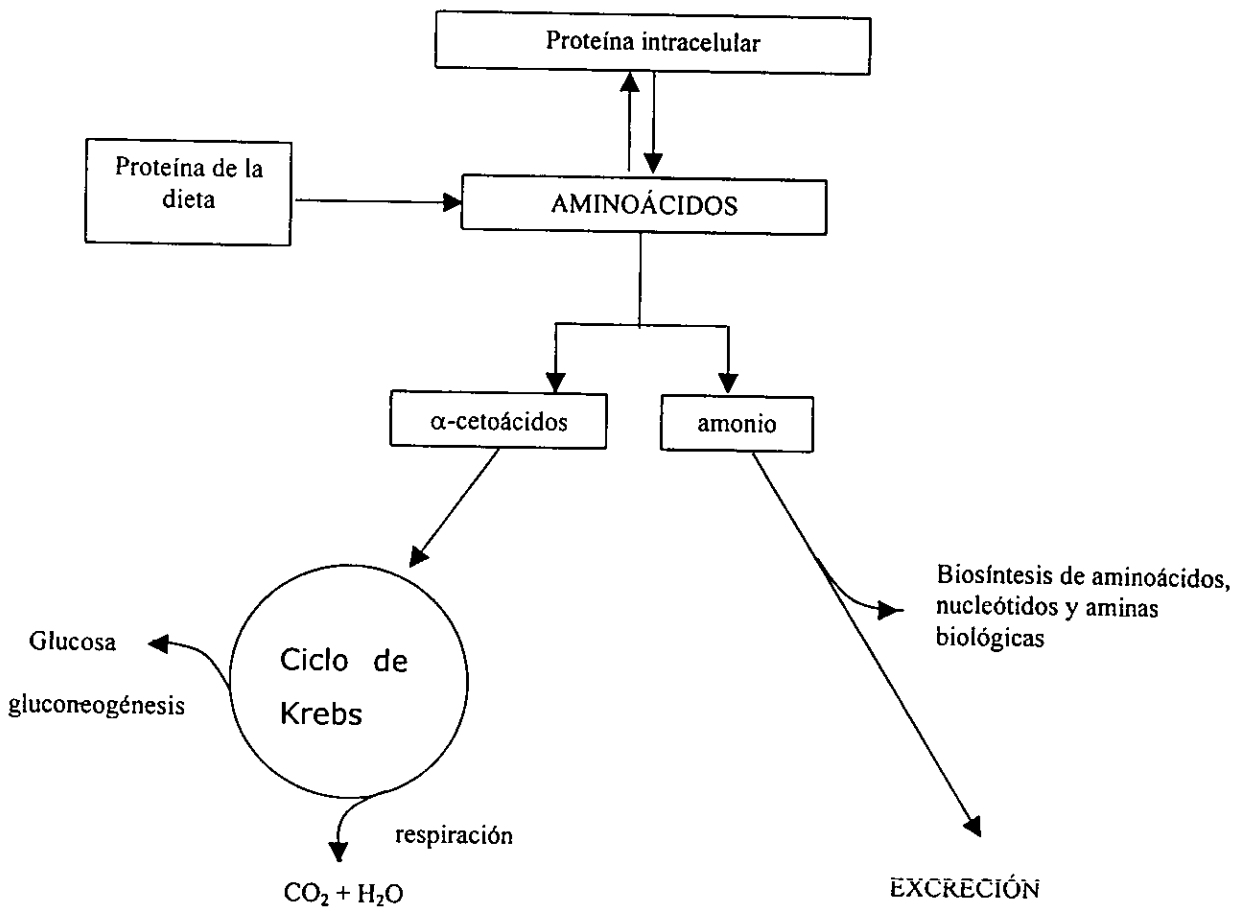


Fig. 1.5 Catabolismo de los aminoácidos donde se muestran las rutas seguidas por el esqueleto hidrocabonado y los grupos amino.

En algunos organismos, tal es el caso de las células de mamífero, la arginina puede ser atacada en su grupo guanidino por el oxígeno molecular, a través de la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), para formar citrulina y óxido nítrico (NO), el cual es considerado como una especie de oxígeno reactiva (ver tabla 1.1 p. 6) (Boucher, et al., 1999).

2. JUSTIFICACIÓN

La acuicultura es una de las áreas con un rápido crecimiento en el mundo entero, que involucra el cultivo de moluscos, crustáceos y peces, tanto de agua dulce como marinos. Un factor importante en la aceptación de estos productos es el desarrollo del color. Sin embargo, debido a que se demostró el potencial cancerígeno de los colorantes sintéticos rojos y amarillos, a principios de la década de los 80, la FDA (Food and Drug Administration, EUA) prohibió el uso de la mayoría de éstos en alimentos. Esto provocó la búsqueda de pigmentos extraídos de fuentes naturales con el fin de sustituir los sintetizados químicamente. Así, los carotenoides han captado el interés de la mayoría de las compañías productoras de colorantes debido a su capacidad pigmentante, pero también debido a su función antioxidante en las células de los organismos que las producen. A este respecto, los recursos biotecnológicos han sido aprovechados para la producción de un número considerable de carotenoides, tal es el caso del pigmento astaxantina responsable de la coloración de salmones, crustáceos y muchas aves. Son muchas las fuentes de obtención del pigmento y entre ellas se encuentra la levadura *P. rhodozyma*, la cual es el modelo biológico que se utilizó en esta investigación.

Existen muchos reportes sobre los diversos factores que pueden afectar la biosíntesis de astaxantina en *P. rhodozyma*, entre los que se encuentran los de Johnson y su grupo, quienes han realizado diversos estudios sobre la síntesis y la regulación de este pigmento. Este grupo ha reportado el efecto de varios factores ambientales, entre los cuales figuran: la temperatura, el pH y la luz (An, et al., 1990). Además ha sugerido la existencia de un fenómeno de retroregulación por producto final (Johnson and Schroeder, 1995). También se han reportado efectos nutricionales como el uso de un precursor de carotenoides llamado

En algunos organismos, tal es el caso de las células de mamífero, la arginina puede ser atacada en su grupo guanidino por el oxígeno molecular, a través de la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), para formar citrulina y óxido nítrico (NO), el cual es considerado como una especie de oxígeno reactiva (ver tabla 1.1 p. 6) (Boucher, et al., 1999).

2. JUSTIFICACIÓN

La acuicultura es una de las áreas con un rápido crecimiento en el mundo entero, que involucra el cultivo de moluscos, crustáceos y peces, tanto de agua dulce como marinos. Un factor importante en la aceptación de estos productos es el desarrollo del color. Sin embargo, debido a que se demostró el potencial cancerígeno de los colorantes sintéticos rojos y amarillos, a principios de la década de los 80, la FDA (Food and Drug Administration, EUA) prohibió el uso de la mayoría de éstos en alimentos. Esto provocó la búsqueda de pigmentos extraídos de fuentes naturales con el fin de sustituir los sintetizados químicamente. Así, los carotenoides han captado el interés de la mayoría de las compañías productoras de colorantes debido a su capacidad pigmentante, pero también debido a su función antioxidante en las células de los organismos que las producen. A este respecto, los recursos biotecnológicos han sido aprovechados para la producción de un número considerable de carotenoides, tal es el caso del pigmento astaxantina responsable de la coloración de salmones, crustáceos y muchas aves. Son muchas las fuentes de obtención del pigmento y entre ellas se encuentra la levadura *P. rhodozyma*, la cual es el modelo biológico que se utilizó en esta investigación.

Existen muchos reportes sobre los diversos factores que pueden afectar la biosíntesis de astaxantina en *P. rhodozyma*, entre los que se encuentran los de Johnson y su grupo, quienes han realizado diversos estudios sobre la síntesis y la regulación de este pigmento. Este grupo ha reportado el efecto de varios factores ambientales, entre los cuales figuran: la temperatura, el pH y la luz (An, et al., 1990). Además ha sugerido la existencia de un fenómeno de retroregulación por producto final (Johnson and Schroeder, 1995). También se han reportado efectos nutricionales como el uso de un precursor de carotenoides llamado

ácido mevalónico (Calo, et al., 1995a); la utilización de etanol (Gu, et al., 1997); la variación de los niveles de citrato y fosfato y amonio (Flores-Cotera et al., 2001); así como la producción de astaxantina en medios complejos: melazas (Haard, 1998); subproductos de maíz (Hayman, et al., 1995) y jugo de uva (Meyer, et al., 1994b) entre otros.

En lo que a la fuente de nitrógeno se refiere, los factores que se han reportado como estimuladores de la formación de carotenoides en diferentes microorganismos incluyen: la limitación de este nutriente y la presencia de aminoácidos como metionina, valina, glicina, triptófano, fenilalanina, tirosina, y leucina (Bramley and Mackenzie, 1988; Johnson and An, 1991).

Sin embargo, aun considerando que la biosíntesis de metabolitos secundarios (incluidos los que no contienen nitrógeno) puede estar estrechamente conectada con el metabolismo del nitrógeno, debido a que algunos aminoácidos o compuestos de nitrógeno parecen estimular su producción ya que actúan como disparadores de la diferenciación, en lugar de ser precursores; además se ha sospechado que la limitación de nitrógeno es el disparador del metabolismo secundario; y que exceso de nitrógeno amínico suprime la síntesis de metabolitos secundarios, a la fecha no existen reportes completos sobre la influencia de la fuente de nitrógeno en la síntesis de este carotenoide en una cepa silvestre de *P. rhodozyma* cultivada en un medio químicamente definido.

En el laboratorio de microbiología industrial del IIBm se han venido desarrollando diversos proyectos sobre la producción de astaxantina en una cepa silvestre de *P. rhodozyma*. Dentro de los logros alcanzados se ha establecido un medio químicamente definido (Flores-Cotera, et al., 2001). Este medio permitirá caracterizar sistemáticamente la influencia de diversos factores nutricionales sobre el crecimiento de la levadura y la producción de carotenoides. Con base en ello, el presente trabajo se ha planteado el siguiente:

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la fuente de nitrógeno sobre la síntesis de carotenoides en la levadura *P. rhodozyma*.

ácido mevalónico (Calo, et al., 1995a); la utilización de etanol (Gu, et al., 1997); la variación de los niveles de citrato y fosfato y amonio (Flores-Cotera et al., 2001); así como la producción de astaxantina en medios complejos: melazas (Haard, 1998); subproductos de maíz (Hayman, et al., 1995) y jugo de uva (Meyer, et al., 1994b) entre otros.

En lo que a la fuente de nitrógeno se refiere, los factores que se han reportado como estimuladores de la formación de carotenoides en diferentes microorganismos incluyen: la limitación de este nutriente y la presencia de aminoácidos como metionina, valina, glicina, triptófano, fenilalanina, tirosina, y leucina (Bramley and Mackenzie, 1988; Johnson and An, 1991).

Sin embargo, aun considerando que la biosíntesis de metabolitos secundarios (incluidos los que no contienen nitrógeno) puede estar estrechamente conectada con el metabolismo del nitrógeno, debido a que algunos aminoácidos o compuestos de nitrógeno parecen estimular su producción ya que actúan como disparadores de la diferenciación, en lugar de ser precursores; además se ha sospechado que la limitación de nitrógeno es el disparador del metabolismo secundario; y que exceso de nitrógeno amínico suprime la síntesis de metabolitos secundarios, a la fecha no existen reportes completos sobre la influencia de la fuente de nitrógeno en la síntesis de este carotenoide en una cepa silvestre de *P. rhodozyma* cultivada en un medio químicamente definido.

En el laboratorio de microbiología industrial del IIBm se han venido desarrollando diversos proyectos sobre la producción de astaxantina en una cepa silvestre de *P. rhodozyma*. Dentro de los logros alcanzados se ha establecido un medio químicamente definido (Flores-Cotera, et al., 2001). Este medio permitirá caracterizar sistemáticamente la influencia de diversos factores nutricionales sobre el crecimiento de la levadura y la producción de carotenoides. Con base en ello, el presente trabajo se ha planteado el siguiente:

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la fuente de nitrógeno sobre la síntesis de carotenoides en la levadura *P. rhodozyma*.

4. HIPÓTESIS

Si el catabolismo del nitrógeno está estrechamente conectado con la biosíntesis de metabolitos secundarios, entonces aun cuando la estructura de los carotenoides no contiene ningún átomo de nitrógeno, tanto la concentración como la naturaleza química de este nutrimento tendrán un efecto sobre la producción de pigmentos en la levadura de *P. rhodozyma*.

5. ESTRATEGIAS

1. Evaluar la acción de diversas fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento y la producción de carotenoides, utilizando un medio químicamente definido previamente establecido en el laboratorio y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (fuente inorgánica) como control.
2. Seleccionar aquellas fuentes de nitrógeno que muestren mayor efecto sobre la producción de carotenoides.
3. Determinar si el efecto del aminoácido seleccionado es "per se" o por algún producto de su metabolismo.
4. Caracterizar el efecto de la fuente seleccionada:
 - Inhibitoria (por inhibición o represión)
 - Estimuladora (por activación o inducción).
5. Sentar las bases para localizar el sitio de acción de los efectores seleccionados.

4. HIPÓTESIS

Si el catabolismo del nitrógeno está estrechamente conectado con la biosíntesis de metabolitos secundarios, entonces aun cuando la estructura de los carotenoides no contiene ningún átomo de nitrógeno, tanto la concentración como la naturaleza química de este nutriente tendrán un efecto sobre la producción de pigmentos en la levadura de *P. rhodozyma*.

5. ESTRATEGIAS

1. Evaluar la acción de diversas fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento y la producción de carotenoides, utilizando un medio químicamente definido previamente establecido en el laboratorio y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (fuente inorgánica) como control.
2. Seleccionar aquellas fuentes de nitrógeno que muestren mayor efecto sobre la producción de carotenoides.
3. Determinar si el efecto del aminoácido seleccionado es "per se" o por algún producto de su metabolismo.
4. Caracterizar el efecto de la fuente seleccionada:
 - Inhibitoria (por inhibición o represión)
 - Estimuladora (por activación o inducción).
5. Sentar las bases para localizar el sitio de acción de los efectores seleccionados.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 CONSERVACIÓN DE LA CEPA.

La cepa de *P. rhodozyma* NRRL Y-10922 fue proporcionada por The Agricultural Research Service Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois., 61604 USA.

La cepa se obtuvo a partir de un liofilizado el cual fue previamente resuspendido en 1 ml de medio YM. En el primer paso la levadura fue sembrada en agar YM para confirmar la viabilidad del liofilizado, además de descartar cualquier probable contaminación.

Se observó un buen crecimiento después de 72 horas de incubación. Las características de las colonias se describen a continuación: redondas, cóncavas, con margen entero, cremosas, opacas y con el color naranja-rosáceo que las caracteriza.

Se procedió a cultivar la levadura en matraces de 250 ml con deflectores. El volumen de llenado fue del 12%. En estos matraces se observó que durante las primeras 24 horas de fermentación la producción de pigmentos es tan pobre que apenas se aprecia a simple vista, por lo cual este punto se tomó como parámetro de referencia inicial para la cuantificación de carotenoides en los subsecuentes experimentos, de ahí que las gráficas de cinéticas de producción inicien a las 24 h.

De esta suspensión de levaduras se tomaron 0.5 ml y se platearon en cajas con agar YM, el crecimiento en estas cajas fue abundante y transcurridas 96 h se mandaron liofilizar al cepario del IIBm, asegurando así que la cepa de *P. rhodozyma* usada en cada uno de los experimentos de este proyecto fuera la misma, pues se parte de una misma clona. Por tal razón, en cada uno de los experimentos se utilizó un nuevo liofilizado el cual se resuspendió en 0.5 ml de caldo YM, se sembró en agar del mismo medio y se cultivó durante 48 h a 22° C y con agitación de 150 rpm y de estas cajas se tomó una asada para sembrar los preinóculos en medio YM.

6.2 MEDIOS DE CULTIVO.

♣ Medio de cultivo YM

COMPONENTES	1 L
Extracto de levadura	9 g
Extracto de malta	9 g
Bacto peptona	15 g

Glucosa	30 g
---------	------

NOTAS: Disolver en H₂O destilada , Agar 1.5 g por cada 100 ml. Esterilizar 121 lb/ 15 min.

♣ Medio de cultivo químicamente definido para la levadura *Phaffia rhodozyma*,
(Flores-Cotera, 2001)

NUTRIENTE	REACTIVO	MOLARIDAD	(w/v)
C	Glucosa	170 mM	30 g
N	(NH ₄) ₂ SO ₄	2 mM	0.26 g
P	Na ₂ HPO ₄	4 mM	0.56 g
	NaH ₂ PO ₄	4 mM	0.55 g
K	K ₂ SO ₄	0.7 mM	0.12 g
Mg	MgSO ₄	1.2 mM	0.3 g
Ca	CaCl ₂ · H ₂ O	0.15 mM	22 mg
Cu	CuSO ₄ · 5H ₂ O	5 mM	1.25 mg
Fe	FeSO ₄ · 7H ₂ O	21 mM	5.8 mg
Mn	MnSO ₄ · H ₂ O	10 mM	1.7 mg
Zn	ZnSO ₄ · H ₂ O	40 mM	11.5 mg
Co	CoSO ₄ · 7H ₂ O	0.71 mM	0.2 mg
B	H ₃ BO ₄	1.67 mM	0.13 mg
Mo	Na ₂ Mo ₄ · 2H ₂ O	2 mM	0.5 mg
Na	NaCl	17 mM	1.0 mg
S	Na ₂ SO ₄	2.11 mM	0.3 mg
Vitaminas	Sol. de vitaminas	--	0.5 ml

NOTAS: Esterilizar por separado las sales de P, Ca, B, Mo, esterilizar por filtración la solución de vitaminas.

♣ Solución de vitaminas

VITAMINA	Cantidad (mg)
Pantotenato de Calcio	60
Tiamina	30
Biotina	2
Cianocobalamina	3
Piridoxina	15
Riboflavina	30
Niacina	180

Disolver en 400 ml de agua destilada, ajustar a pH 3.5 - 4.0 con HCl.

- ♣ Solución salina isotónica (SSI).

NaCl	0.85 g/l
------	----------

- ♣ Solución de aminoácidos.

Pesar cada aminoácido por separado y disolverlos en agua destilada, agregar unas gotas de KOH 4 M de ser necesario. Medir el pH de los aminoácidos y esterilizarlos por filtración.

6.3 FERMENTACIÓN

PREINÓCULO:

- 1) Tomar una asada de células de *P. rhodozyma* procedentes de una caja con agar YM e inocularlas en medio YM líquido. Cultivarlas por 24 h/150 rpm/22 °C
- 2) Centrifugarlas 10 000 rpm/10 min, desechar sobrenadante y resuspender en solución salina isotónica. Repetir el procedimiento dos veces más.
- 3) Preparar el medio químicamente definido.
- 4) Medir DO del preinóculo a $\lambda = 540$ nm
- 5) La concentración del preinóculo debe ser del 2% con una D.O. de 1.5
- 6) Agregar la suspensión del preinóculo al medio de cultivo
- 7) Vaciar 30 ml del medio de cultivo en matraces bafleados de 250 ml (volumen de llenado 12%). Este es el mismo medio de cultivo para todas las condiciones y la única variante será la fuente de nitrógeno.

La toma de muestra se realiza cada 24 h desde el tiempo cero hasta las 96 hrs (a menos que se haga otra indicación).

6.4 MUESTREO.

- 1) En tubos de ensayo (5 ml) poner 2 ml del medio de cultivo de cada condición.
- 2) De la misma manera, tomar 1 ml del medio de cultivo y ponerlos en tubos Eppendorf (respaldos).
- 3) Centrifugar los tubos del paso No. 1 a 10 000 rpm/ 10 min y guardar tanto las células como el sobrenadante.
- 4) A las células se les determinará peso seco (D.O. a 540 nm), carotenoides totales, proteína total (según se indique en cada experimento).

- 5) Al sobrenadante se le determina amonio residual, pH y glucosa residual (según se indique en cada experimento).

6.5 DETERMINACIONES AL SOBRENADANTE

❖ Glucosa oxidasa residual

Método enzimático, colorimétrico, de punto final, Trinder, GOD-POD (Lott and Turner, 1975).

1. Hacer diluciones de las muestras cuando sea necesario.
2. Añadir 1.25 ml de reactivo completamente disuelto a cada tubo y llevarlos a 37°C
3. Añadir 0.01 ml de agua destilada al tubo blanco, 0.01 ml del estándar y 0.01 ml de muestra a cada tubo problema; mezclar con suavidad.
4. Transcurridos 10 min leer la absorbancia de cada tubo contra el reactivo blanco a 520 nm.

La concentración de glucosa se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Glucosa (mg/dl)} = \frac{\text{Abs. del problema}}{\text{Abs. del estándar}} \times \text{Concentración del estándar (mg/dl)}$$

❖ Amonio residual por el método de Berthelot

SOLUCIÓN A (para 1 litro de reactivo)

1. Disolver 10 g de fenol en agua.
2. Agregar inmediatamente después 50 mg de nitroprusiato de sodio.
3. Guardar en un frasco ámbar y colocarlo en el refrigerador 4°C.
4. Será estable durante 1 mes.

SOLUCIÓN B (para 2 litros de reactivo)

1. Disolver 10 g de NaOH en agua.
2. Agregar 16.8 ml de hipoclorito de sodio al 56% ó 4.9 ml de hipoclorito de sodio al 17%.

METODOLOGÍA:

1. Hacer diluciones de las muestras hasta obtener una concentración menor a 30 mM; con el fin de lograr una buena sensibilidad en la lectura del espectrofotómetro.
2. Poner en tubos alícuotas de 25 μ l de muestra
3. Agregar 1.25 ml de la solución A y agitar con vortex.
4. Agregar 1.25 ml de la solución B y agitar nuevamente.
5. Dejar reaccionar 30 min.
6. Leer en el espectrofotómetro a 625 nm.
7. Realizar una curva patrón a diferentes concentraciones.

CONCENTRACIÓN mM	ml de NH ₄ Cl (10 mM)	ml de H ₂ O destilada
10	1 m	-----
8	0.8	0.2
6	0.6	0.4
4	0.4	0.6
2	0.2	0.8
1	0.1	0.9
0.5	0.05	0.95
Blanco	-----	1.0

6.6 DETERMINACIONES A LAS CÉLULAS

❖ DENSIDAD ÓPTICA

- 1) Resuspender las células en 2 ml de solución salina isotónica para conseguir el volumen original. Agitar con vortex.
- 2) Tomar 1ml de la mezcla y vaciarlo a otro tubo de 5ml.
- 3) El remanente de células se congela para determinar carotenoides totales.
- 4) Hacer una dilución 1:5 (agregar 4 ml más de solución salina isotónica). Agitar con vortex.
- 5) Leer D.O. en el espectrofotómetro a 540 nm.

❖ Curva densidad óptica vs. peso seco

1. Preinóculo: En un matraz con medio YM, inocular la levadura *P. rhodozyma* (con una asada raspando la caja sembrada). Cultivar durante 24 h.

2. Inocular los matraces con las células del punto anterior y cultivarlos durante 48 h.
3. Preparar las charolas que sean necesarias para la determinación del peso seco, rotular y dejar secar en el horno durante 24 h.
4. Pasado el tiempo, enfriar las charolas en el desecador y pesarlas en una balanza analítica. El tiempo que se dejen las charolas en el desecador, se respetará durante todo el procedimiento.
5. Juntar el contenido de los 3 matraces en uno solo y homogeneizar.
6. Centrifugar a 6000 rpm durante 10min.
7. Desechar el sobrenadante.
8. Resuspender las células con solución salina isotónica al volumen original.
9. Volver a centrifugar y repetir los pasos 7 y 8 dos veces más.
10. Leer D.O. en el espectrofotómetro a una $\lambda=540\text{nm}$.

Se tomarán 5 puntos para realizar la gráfica de D.O. vs. Peso seco, por lo que se tendrán que hacer las diluciones correspondientes a los siguientes puntos: 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8. Las diluciones se calcularán partiendo del valor que se obtenga en el paso # 10.

11. Tomar 5 ml de cada dilución y vaciarlos a las charolas (por triplicado) y colocarlas en el horno a 80°C durante 24 h.
12. Pasado el tiempo sacar las charolas y enfriar en el desecador. Pesar en balanza analítica.
13. Repetir el paso anterior hasta que el peso se estabilice.
14. Calcular el peso seco. (Peso charola con muestra menos el peso charola sola)

❖ Carotenoides totales

1. Agregar 0.5 ml de levadura a un tubo de ensayo.
2. Centrifugar a 6500 rpm/10 min.
3. Desechar sobrenadante.
4. Agitar el pellet en vortex hasta deshacer el agregado.
5. Agregar perlas de vidrio hasta cubrir la superficie del contenido.
6. Agregar 0.8 ml de dimetil sulfóxido (DMSO), calentar 1 min en baño María a $58-60^{\circ}\text{C}$, tapar los tubos con canicas
7. Agitar el tubo en vortex durante 1 min.
8. Agregar 0.2 ml K_2PO_4 0.01 M a los tubos.

9. Agregar 2.5 ml de mezcla fría de hexano/acetato de etilo (1:1), tapar con las canicas y protegerlos de la luz
10. Agitar 1 min en vortex.
11. Mantener en el congelador durante 30 min.
12. Centrifugar a 5000 rpm/5 min.
13. Remover la fase orgánica con una pipeta y leer a 480 nm.

La concentración volumétrica de carotenoides se calcula con la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g Carotenoides} = \frac{(A) (10^6)}{(1\% \text{ E } 1 \text{ cm}) (100)}$$

Donde:

A = absorbancia a 480 nm.

10^6 = factor de conversión para expresar carotenoides en μg .

1% E 1 cm = coeficiente de extinción específica.

100 = constante para eliminar el factor porcentaje.

❖ Polvos de acetona

1. Montar en un matraz de Kitasato un embudo Buchner. Poner en el embudo papel filtro Whatman 0.45 μm . Aplicar al matraz vacío.
2. Vaciar 30 ml del medio de cultivo.
3. Lavar con 30 ml de solución salina isotónica.
4. Agregar 25 ml de acetona.
5. Retirar el papel filtro y meter este en el congelador durante al menos 10 min.

6.7 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO DE PROTEÍNAS DE *P. rhodozyma*.

En un mortero triturar trozos de hielo seco, raspar la monocapa de células del papel filtro con una espátula y verterlas en el mortero para triturarlas hasta que el hielo seco sublime casi en su totalidad. Incorporar todo el contenido y resuspender en 3 ml de buffer de fosfatos 50 mM, pH= 7.2 frío. Tomar los 3 ml y vaciarlos a tubos para ultracentrífuga. Centrifugar a una temperatura mínima de 4°C y máxima de 14°C; 45,000 rpm por 45min. Recuperar la mayor cantidad de sobrenadante de cada tubo, teniendo cuidado de no tomar células.

Vaciar el sobrenadante a tubos Eppendorf y realizar la determinación de proteínas por Lowry. Si no se quiere realizar la determinación en ese momento se pueden congelar los tubos.

6.8 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Extraer carotenoides por el método de Sedmak. (Usar solo hexano). Secar con atmósfera de N₂ cuidando de regular la salida del gas para evitar la formación de burbujas en el tubo. El secado se realizará dentro de un baño María con una temperatura de 50 a 55°C, girando los tubos y una vez que se hayan secado, se taparán con papel parafilm.

PREPARACIÓN DE LA CÁMARA DE ELUCIÓN

Limpiar las paredes de la cámara con 50 ml de acetona. Preparar mezcla de elución 20:80 acetona/éter de petróleo. Para remover el oxígeno de la cámara, inyectar el N₂ dentro de ésta durante 2 min. Agregar de 60 a 65 ml de la mezcla de elución, dejar un minuto el N₂, tapar y mezclar. Dejar saturando al menos una hora.

SOLVENTES: Se requieren 25 ml de diclorometano y 2 frascos de 30 ml cada uno con hexano. A uno de ellos se le agregaran 10 µl de etanol absoluto.

ESTANDAR: 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 N₂. Sellar los viales con parafilm y conservar en refrigeración (-20°C).

Cada vial contiene 84 µg de astaxantina. Para checar la concentración de astaxantina, agregar a un vial: 0.5 ml de diclorometano, 0.1 ml de etanol y 1.0 ml de hexano. De esta solución tomar 0.5 ml y llevarla a 25 ml de hexano. Leer en el espectrofotómetro a $\lambda=472$ nm.

Para utilizar los viales se resuspenden en 1.5 ml de diclorometano

PREPARACIÓN DE LA PLACA

Se preparan placas de silica gel 60 de 10 X 20 cm, marcándolas con una línea en la base inferior de 1 cm, señalando cada cm de ésta por medio de una pequeña marca ya que las muestras se aplicarán por arriba de éste. Cubrir la placa con una caja negra y ponerle el dispositivo de la atmósfera de N₂.

APLICACIÓN DE LAS MUESTRAS

1. Tomar con una microjeringa 2 µl de estandar de astaxantina y aplicarlos a la placa; por arriba del punto que se marcó en la preparación de ésta. (Evitar que dentro de la microjeringa se formen burbujas de aire)

2. Guardar el estandar en el congelador inmediatamente después de su uso (en cada aplicación)
3. Tapar el punto aplicado con la cámara de N₂.
4. Enjuagar la microjeringa con hexano después de cada aplicación y limpiar la punta.
5. Repetir los pasos anteriores con cada muestra (el volumen de aplicación varía de acuerdo a la concentración de carotenoides en la muestra).
6. Leer en el densitómetro CAMAG.

6.9 MEDICIONES CON ¹⁴CARBONO. CONTADOR DE CENTELLEO.

Se adicionó arginina marcada (L-[U-¹⁴C] monohidrocloreto de arginina, de Amersham Pharmacia Biotech, con una actividad específica de 278 mCi/mMol, P.M. 219 g/mol a esta actividad específica, y una concentración de radioactividad igual a 50 µCi/ml) al medio de químicamente definido que contenía a la levadura y se cultivó por 96 horas, tiempo en el cual se ha detectado que ocurre la máxima acumulación de carotenoides totales. Transcurrido este tiempo se lavaron las células y se guardó el sobrenadante para posterior determinación del analito radioactivo residual, es decir, la cantidad de arginina que no había sido incorporada. A las células lavadas se les midió DO a 540 nm y se les extrajeron carotenoides por el método de Sedmak y se transfirieron a viales de policarbonatos a los cuales se les adicionó 4 ml de solución de centelleo. Posteriormente se analizaron con ayuda de un analizador de líquido de centelleo Tri-Carb modelo 1500 Packard Instruments Company.

En un primer experimento se midieron carotenoides totales extraídos a las 72 y 96 horas de crecimiento, además se separaron los carotenoides a través de una cromatografía en capa fina y cada una de las manchas que lograron definirse fueron cortadas de la placa cromatográfica para poder ser medidas en el analizador de líquido de centelleo y conocer si la distribución del carbono marcado era uniforme en todos los carotenoides encontrados.

Al igual que en los demás experimentos se contaba con un control de medio químicamente definido más amonio 10 mM, al cual se le hicieron los mismos tratamientos y se compararon contra la fermentación que contenía la arginina marcada.

Una vez realizado este primer experimento se planeó un experimento más fino, donde se tenían más controles y se medían todos los componentes de la fermentación, es decir, sobrenadante, células completas, células rotas y carotenoides totales, esto con el fin de asegurar que se estuvieran midiendo todos los compuestos marcados. En este experimento

se incluyeron los controles de [U-¹⁴C] glucosa de Amersham Pharmacia Biotech con una actividad específica de 311 mCi/mmol y una concentración radioactiva de 200 µCi/ml y L-[U-¹⁴C] ácido glutámico con una actividad específica de 262 mCi/mmol y una concentración radioactiva de 100 µCi/ml, estos controles se incluyeron con el fin de asegurar que se estaba incorporando el sustrato marcado con ¹⁴Carbono. La concentración utilizada fue la misma que la de la arginina, es decir 10 mM. Se realizó el mismo procedimiento que en el experimento anterior, es decir, se midió D O a 540 nm, se extrajeron carotenoides y se midió la incorporación del carbono marcado tanto a las células completas como a los carotenoides y el residual en el medio de cultivo.

6.10 MEDICIÓN DE LA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA.

Se utilizó un Kit colorimétrico (Calbiochem Nitric oxide synthase assay Kit, colorimetric) capaz de medir la actividad de la enzima NOS, a través de la formación de nitratos y nitritos, productos de degradación del óxido nítrico (Moncada, 1992; Nims, 1995). La reacción enzimática que se lleva a cabo en este ensayo colorimétrico es la que se muestra en la Fig. 6.1.

6.11 EXPERIMENTOS EN ANAEROBIOSIS.

En estos experimentos se cultivó a la levadura en presencia de Arg pero en ausencia total de O₂. Estos cultivos se realizaron en botellas de 100 ml con un volumen de llenado del 20%. Las botellas tenían tapones de rosca con un pequeño tapón interno de goma por el cual se pudo crear vacío al conectar una jeringa de 1 ml a una bomba de vacío durante 5 min y posteriormente inyectarle nitrógeno con un flujo de 80 psi durante 10 min. Los medios de cultivo estaban formulados de acuerdo al medio químicamente definido más la fuente de nitrógeno, es decir 10 mM de sulfato de amonio (control) y 10 mM de arginina. Los cultivos se mantuvieron a 150 r.p.m. y 22° C durante 192 h, esto debido a que aun cuando normalmente los ensayos se monitorean hasta 96 h, era importante seguir el desarrollo de la levadura a través del tiempo y sabíamos que en condiciones fermentativas la velocidad de crecimiento es más lenta. Se tomaron muestras cada 24 horas con una jeringa de 1 ml para evitar la pérdida de la anaerobiosis. A estas muestras se les midió D.O. a 540 nm, así como carotenoides totales. Los experimentos se realizaron por triplicado.

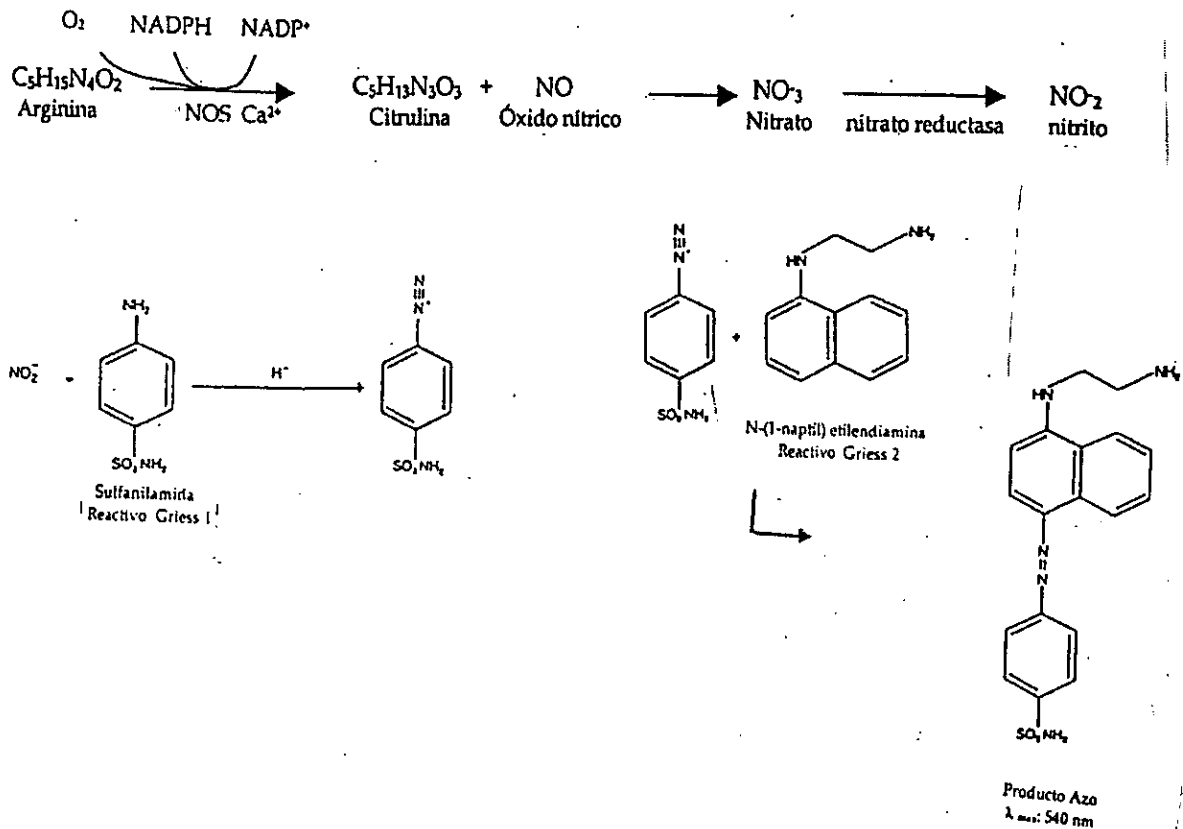
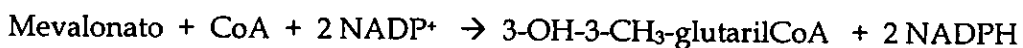


Fig. 6.1 Medición de NOS a través de una reacción enzimática donde se mide la concentración de nitratos y nitritos con los reactivos de Griess.

6.12 EXPERIMENTOS EN PRESENCIA DE UN INHIBIDOR DE CAROTENOGÉNESIS.

Se llevaron a cabo experimentos donde se utilizó un inhibidor de la carotenogénesis, un compuesto llamado mevinolin (6- α -metilcompactin, monacolin-K SIGMA) de *Aspergillus niger*, que inhibe la enzima hidroximetilglutaril CoA reductasa, la cual es clave en la ruta del mevalonato, del cual se derivan miles de moléculas incluyendo esteroides, isoprenoides, etc (Hampton, et al., 1996). Esta enzima actúa sobre los grupos CH-OH de donadores, con NAD⁺ o NADP⁺ como aceptores.



La concentración del mevinolin se definió de acuerdo a los reportes de otros inhibidores de la misma enzima, ésta fue de 20 $\mu\text{g/ml}$. Se probaron diferentes condiciones, la primera con la

adición del inhibidor al tiempo cero en presencia y ausencia de arginina. La segunda adicionando el inhibidor a las 24 horas, en presencia y ausencia de arginina, la cual también fue adicionada en la hora 24. El ensayo se realizó durante 168 h con el fin de observar si los cultivos se podían recuperar. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

6.13 EXPERIMENTOS EN PRESENCIA DE UN DONADOR DE ÓXIDO NÍTRICO.

Se realizaron experimentos con SNP (nitroprusiato de sodio) a concentraciones 0.1, 0.5 y 1.0 mM adicionado a las 24 h de iniciada la fermentación, en un medio de cultivo químicamente definido que contenía 10 mM de sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno. Se tomaron muestras cada 24 h y se midió DO a 540 nm, además se extrajeron carotenoides por el método de Sedmak.

7. RESULTADOS

7.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *P. rhodozyma*

Para poder observar el efecto de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento y la producción de carotenoides en la levadura *P. rhodozyma* era necesario conocer las condiciones bajo las que la levadura tenía un crecimiento óptimo. *P. rhodozyma* es una levadura anaerobia facultativa, capaz de crecer en diferentes fuentes de carbono y en un medio mínimo químicamente definido. Por tanto la cuestión era variar el tipo de fuente de nitrógeno que se emplearía. En este experimento era importante dejar claro varios puntos:

1.- Si la levadura era capaz de crecer sin alguna fuente de nitrógeno.

2.- Si la fuente de nitrógeno inorgánica era adicionada en una concentración óptima según la formulación del medio de cultivo químicamente definido propuesto por Flores-Cotera, 2001.

Se cultivó la levadura durante 120 h en el medio químicamente definido y se variaron las concentraciones de la fuente de nitrógeno inorgánica, de 0.0, 0.2, 2.0, 20.0, y 200.0 mM de sulfato de amonio. Se tomaron muestras cada 24 horas y se realizaron los análisis correspondientes para determinar peso seco, carotenoides totales y específicos, así como pH del medio de cultivo. En las siguientes gráficas se muestran los resultados:

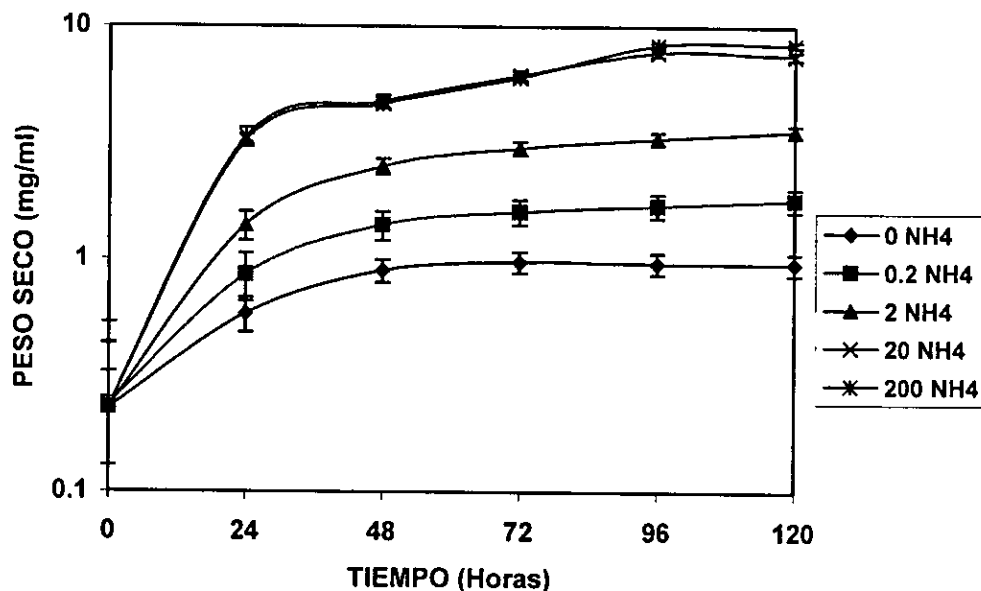


Fig. 7.1 Cinética de crecimiento de *P. rhodozyma* cultivada con diferentes concentraciones milimolares de sulfato de amonio.

En esta gráfica (Fig. 7.1) se observa una cinética de crecimiento típica, con una fase logarítmica y una fase estacionaria, en estas curvas no observamos una fase de adaptación (fase lag) debido a las condiciones de cultivo de los preinóculos. Además, en ella se hace patente que *P. rhodozyma* es capaz de crecer sin ninguna fuente de nitrógeno, aunque solo alcanza valores de al rededor del 10% con respecto a los valores que alcanzan las otras condiciones. Esto puede deberse a que, en general, las levaduras tienen muchas reservas de nutrimentos. En cuanto a las demás condiciones observamos que el crecimiento de la levadura es mayor conforme se incrementa la concentración de amonio.

Los valores de pH del medio de cultivo durante la fermentación bajaron dramáticamente, desde un pH cercano a 5.0 hasta 2.0. Podemos ver en la siguiente gráfica (Fig. 7.2) que los valores más ácidos se obtienen al cultivar a la levadura con una concentración de 200 mM, mientras que en la condición 0 mM de amonio el pH se mantiene muy por encima de los demás. Por otra parte, la caída del pH en las condiciones 0.2, 2.0 y 20.0 es muy similar, lo que nos indica que el pH del medio de cultivo no es un factor limitante para el crecimiento de la levadura.

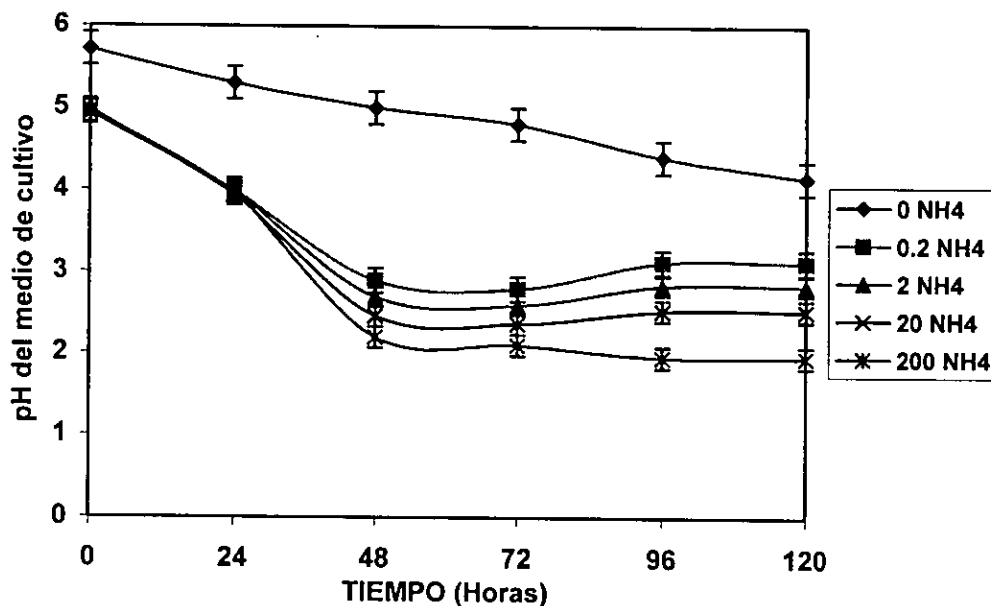


Fig. 7.2 Evolución del pH del medio de propagación de *P. rhodozyma* cultivada con diferentes concentraciones milimolares de sulfato de amonio.

En cuanto a la carotenogénesis en la levadura, podemos observar que a las 96 h la concentración de 20.0 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es la óptima para la producción tanto volumétrica como específica (Fig. 7.3).

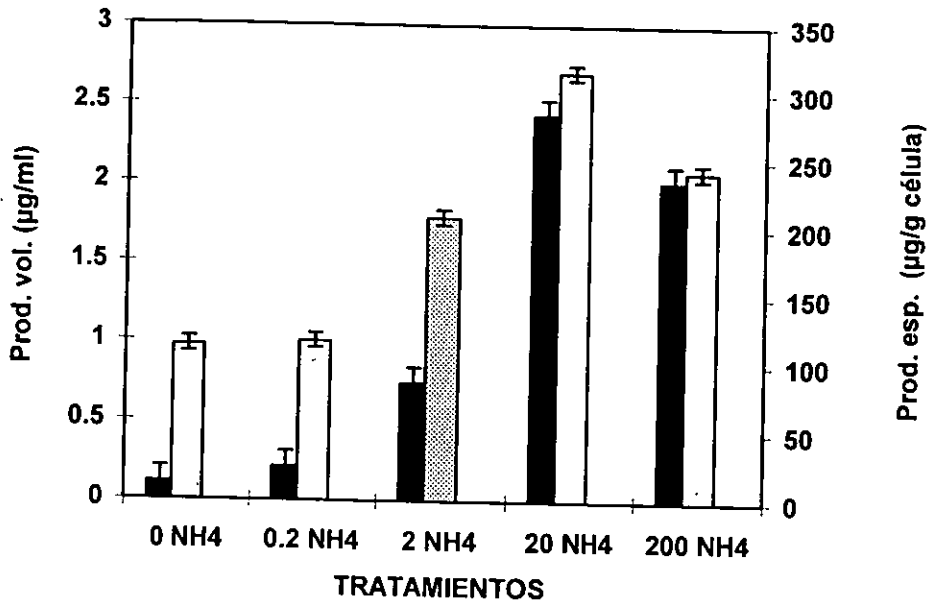


Fig. 7.3 Producción volumétrica (Barras oscuras) y específica (barras claras) de carotenoides de *P. rhodozyma* a las 96 h cuando es cultivada con diferentes concentraciones milimolares de sulfato de amonio.

7.2 EFECTO DE LA ADICIÓN DE AMINOÁCIDOS, SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA CAROTENOGENESIS EN *P. rhodozyma*

7.2.1 Adición de combinaciones de aminoácidos.

Con el fin de llevar a cabo una evaluación rápida del efecto de varios aminoácidos sobre el crecimiento de *P. rhodozyma* y la síntesis de pigmentos, se aplicó una prueba donde se incluyeron los 20 aminoácidos estándar en diferentes combinaciones, en una matriz de 5 X 4, tal y como se muestra en la siguiente tabla.

1	2	3	4	5	
Gly	Asn	Cys	Met	Gln	6
His	Leu	Ile	Val	Lys	7
Phe	Tyr	Trp	Thr	Pro	8
Glu	Ser	Ala	Asp	Arg	9

Este diseño experimental utiliza nueve diferentes combinaciones de los aminoácidos (Sherman, 1971). Estas combinaciones están dispuestas de tal forma que permiten determinar los requerimientos por uno o más aminoácidos y en este caso particular permiten observar si alguno o varios aminoácidos tienen un efecto sobre la producción de carotenoides en *P. rhodozyma*.

Se ensayaron nueve diferentes combinaciones de aminoácidos en concentraciones individuales de 2 mM, por tanto las combinaciones 1 a 5 tenían una concentración total de aminoácidos de 8 mM, mientras que las combinaciones 6 a 9 tenían una concentración total de 10 mM. Además se establecieron 2 controles que contenían diferentes concentraciones de la fuente inorgánica (8 y 10 mM). Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

La adición de los aminoácidos se realizó a las 24 horas, ya que la fuente de nitrógeno orgánica que se agrega al medio de cultivo como concentración arrancadora (0.2 mM de sulfato de amonio) se había agotado (resultados no mostrados) de esta manera, se aseguró el efecto que se observó solo se debió a la acción de los aminoácidos agregados al medio de cultivo y no al sulfato de amonio.

Las cinéticas de crecimiento mostraron que tanto la velocidad de crecimiento de *P. rhodozyma*, como el crecimiento final hasta las 120 h, expresado en términos de peso seco, fue mayor en todas las condiciones con aminoácidos con respecto a los controles que contenían sulfato de amonio. Los valores de peso seco varían de 9.05 mg/ml en la combinación cinco a 6.63 mg/ml en la combinación seis.

El pH disminuyó al inicio pero después se observó una tendencia hacia la alcalinidad y a partir de la hora 24 inició un ascenso hasta alcanzar valores entre 6.5 y 7.3, lo cual confirma la idea de que el pH en el medio de cultivo, no afecta negativamente el crecimiento ni la producción de carotenoides en *P. rhodozyma*. Por su parte, los controles con la fuente inorgánica reportaron una disminución en el pH, alcanzando valores de al rededor de 2.

En la figura 7.4 se observa la producción volumétrica, expresada en μg de carotenoides/ml. Los muestreos se realizaron en diferentes tiempos para establecer una cinética de producción. Podemos ver que a las 24 horas se acumularon $0.65 \mu\text{g}$ carotenoides/ml en todos los tratamientos y esto es debido a que en ese momento el medio de cultivo de todos los matraces era el mismo.

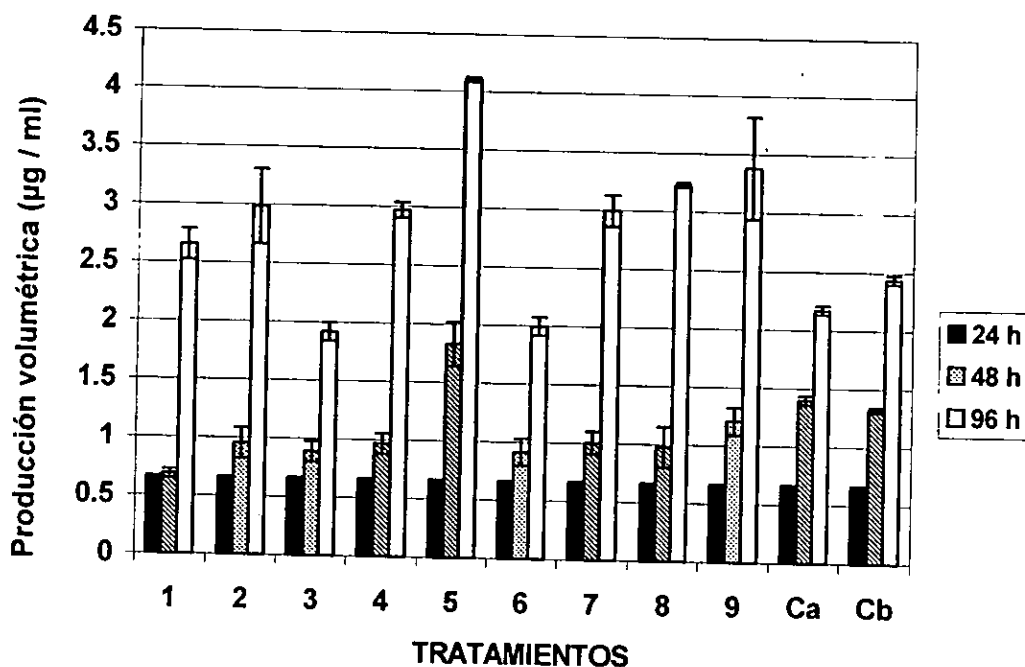


Fig. 7.4. Producción volumétrica de carotenoides por *P. rhodozyma* cultivada con diferentes fuentes de nitrógeno orgánicas. Las determinaciones se realizaron por triplicado a los tiempos 24, 48 y 96 h. Los tratamientos se refieren a cada una de las 9 diferentes combinaciones de aminoácidos. Ca= 8 mM de amonio, Cb= 10 mM amonio

Sin embargo, a partir de la hora 48 se puede observar un aumento apreciable en el contenido de carotenoides en la combinación 5, la cual en la mayoría de los casos, duplica los valores de producción de las otras combinaciones, no así de los controles, a los cuales solamente los rebasa en una tercera parte. Al final de la fermentación, la acumulación de carotenoides sigue siendo mayor en la combinación 5 y en orden descendente, encontramos las combinaciones 9, 8, 4, 7, 2, 1, Ca, Cb, 3 y 6. A diferencia de lo ocurrido a las 48 horas, a las 96 la mayoría de los tratamientos, excepto el 3 y 6, supera a los dos controles.

Al analizar los valores de producción específica de carotenoides (expresados en $\mu\text{g/g}$ de célula) mostrados en la figura 7.5, se observan resultados similares.

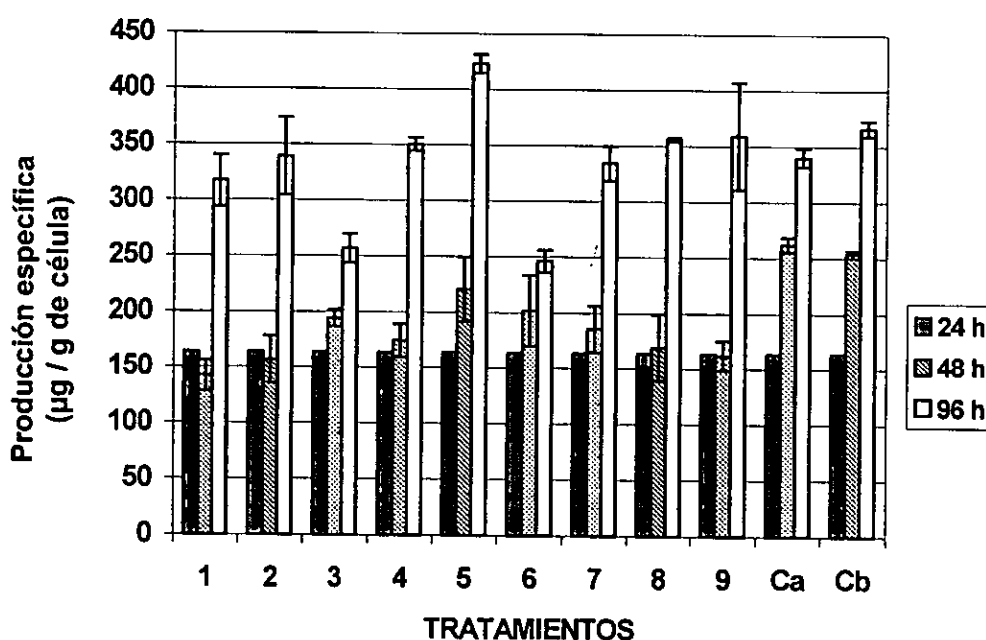


Fig. 7.5 Producción específica de carotenoides por *P. rhodozyma* cultivada en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno orgánicas. Las determinaciones se realizaron por triplicado a los tiempos 24, 48 y 96 h. Los tratamientos se refieren a cada una de las 9 diferentes combinaciones de aminoácidos. Ca= 8 mM de amonio, Cb= 10 mM de amonio.

Encontramos que la combinación con el valor de producción más alto fue la 5 con 423.08 μg carotenoides/g de célula, seguida de la combinación 9 con 359.26 μg carotenoides/g de célula. Todos los aminoácidos presentes en estas condiciones podrían ser responsables del aumento en la producción, sin embargo al analizar la matriz vemos que en la intersección entre 5 y 9 está el aminoácido arginina, al cual se podría atribuir el efecto estimulador en la

producción. Además de éste, se eligió a la prolina por estar presente en la combinación 5 y en la tercera combinación con mayor producción, la 8 con 355.58 µg carotenoides/ g de célula. Así como ácido glutámico, que además de estar presente en la combinación 9 (junto con Arg) tiene un papel central en el metabolismo del nitrógeno (ter Schure, et al., 2000) También se eligieron la leucina y valina ya que estos son precursores de un intermediario clave en la síntesis de isoprenoides, la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA y esto tal vez pudiera explicar el efecto estimulador que estos aminoácidos poseen sobre la producción de carotenoides de algunos organismos (Nelis and De Leenheer, 1989; Meyer and du Preez, 1994b).

Por otra parte, es importante mencionar que las combinaciones que presentan una pobre producción de carotenoides (3 y 6) tienen un aminoácido en común, la cisteína. Este aminoácido parece ser el responsable del efecto negativo no solo en la producción de carotenoides, sino también en el crecimiento de la levadura.

7.2.2 Adición de aminoácidos individuales.

El siguiente paso consistió en probar la acción de los aminoácidos que al parecer tuvieron un efecto estimulador sobre la producción de carotenoides. También se probó la cisteína, el único aminoácido que tuvo un efecto negativo y por último un control 2.0 mM de sulfato de amonio. Los aminoácidos se adicionaron en la misma concentración que el control. Se cultivó a la levadura en el medio químicamente definido, a 150 rpm, 22 °C y durante 96 h y se tomaron muestreos cada 24 h. A continuación se presentan los resultados de crecimiento, pH, producción volumétrica y específica de carotenoides totales, a las 96 h de crecimiento.

Tabla 7.1 Valores de crecimiento, pH y producción de carotenoides (volumétrica y específica) de *P. rhodozyma* cultivada en presencia de diferentes aminoácidos

Amino-ácidos	2.0 mM Valina	2.0 mM Leucina	2.0 mM Prolina	2.0 mM Cisteína	2.0 mM Arginina	2.0 mM Glutámico	2.0 mM Amonio
PS (mg/ml)	3.57	3.44	3.48	0.99	9.31	3.67	3.40
CT (µg/ml)	0.86	0.97	0.79	0.16	3.46	1.041	0.73
CE (µg/g célula)	240.89	281.97	227.01	161.61	371.64	283.65	214.70
pH	5.46	5.31	6.40	5.08	5.44	6.41	2.30

PS= peso seco; CT= carotenoides totales (prod. volumétrica); CE= carotenoides específicos

Es importante mencionar que aun cuando se realizaron las cinéticas de crecimiento, pH y producción de carotenoides, en esta tabla solo se muestran los resultados de la hora 96, porque en este tiempo observamos la máxima acumulación de carotenoides totales, además, durante todos los puntos de la cinética, se observa la misma tendencia que al final.

De acuerdo a estos resultados se seleccionó el aminoácido que presentó un mayor efecto estimulador sobre la producción de carotenoides, es decir, la arginina y se realizaron experimentos para caracterizar dicho efecto.

7.2.3 Concentración óptima de arginina.

Primero que nada, debíamos conocer la concentración óptima del aminoácido, donde se reportaba el mejor crecimiento, pero sobre todo, la mejor producción de carotenoides.

Se probaron 3 concentraciones del aminoácido y se cultivaron con sus correspondientes controles de sulfato de amonio. Los resultados se ensayaron por triplicado y a continuación se presentan:

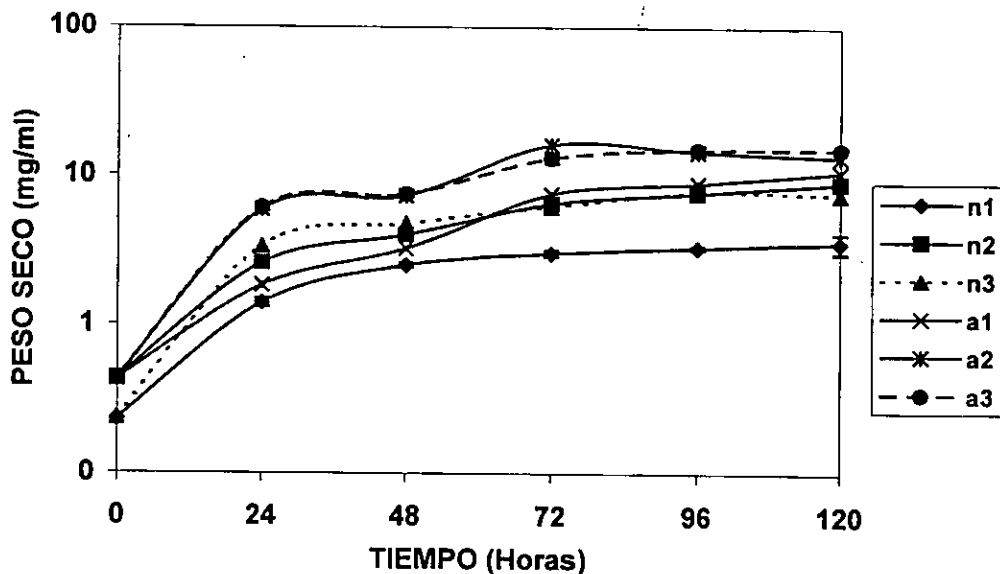


Fig. 7.6 Cinética de crecimiento de *P. rhodozyma* cultivada en diferentes concentraciones de sulfato de amonio y arginina. n1= 2 mM de amonio, n2 = 10 mM de amonio, n3 = 20 mM amonio, a1= 2 mM arginina, a2= 10 mM arginina, a3=20 mM arginina

Esta gráfica muestra que el crecimiento de *P. rhodozyma* es mayor cuando se emplea una fuente de nitrógeno orgánica. Incluso si se compara la concentración de amonio donde se reporta el mayor crecimiento celular, 10 mM, con la más baja de arginina, 2 mM, se observa

que aun cuando inicialmente la primera reporta valores más altos, en los últimos puntos, la segunda lo supera en un 30%.

El crecimiento tanto en la concentración que contiene 10 mM de arginina como la de 20 mM presenta valores muy altos, de alrededor de 13 y 15 mg/ml, inclusive en algunos puntos los cultivos de la concentración 10 mM superan a los de 20 mM, esto indica que la concentración óptima, es 10 mM.

El pH del medio de cultivo no afectó el crecimiento de la levadura y fue disminuyendo hasta alcanzar valores de alrededor de 1.5, en el caso de los cultivos con amonio y 3.5 en los medios con arginina.

El efecto de la arginina en la carotenogénesis es muy importante, pues los valores de producción a 96 horas rebasan en más del 50% los valores de los cultivos control.

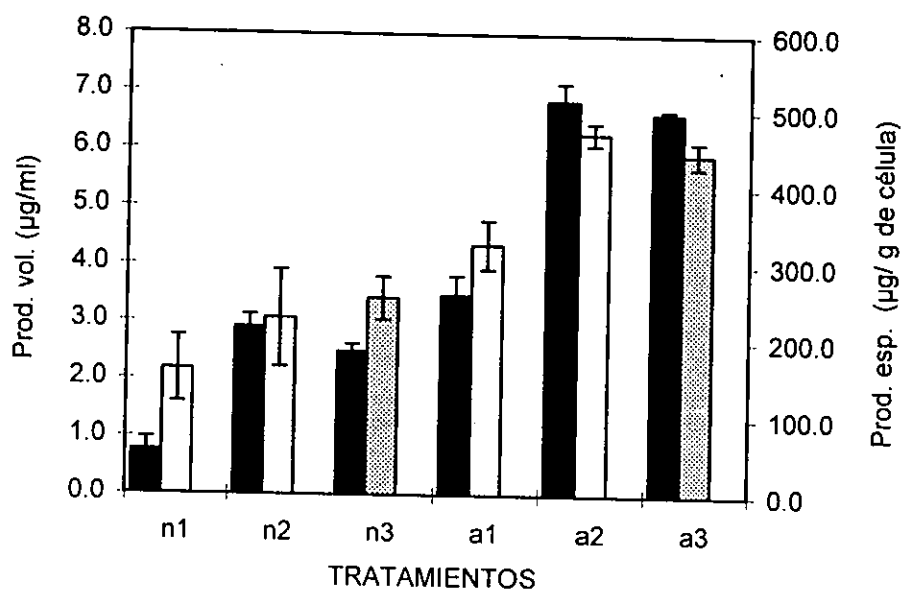


Fig. 7.7 Producción volumétrica (barras oscuras) y específica (barras claras) de carotenoides en *P. rhodozyma* cultivada en diferentes concentraciones de sulfato de amonio y arginina. n1= 2 mM de amonio, n2 = 10 mM de amonio, n3 = 20 mM amonio, a1= 2 mM arginina, a2= 10 mM arginina, a3=20 mM arginina.

Es importante mencionar que una vez obtenida la concentración óptima de Arg para el crecimiento y la producción de carotenoides por *P. rhodozyma*, se volvieron a ensayar los aminoácidos Glu, Pro, Val y Leu en la concentración 10 mM, sin embargo, como en el experimento anterior Tabla 7.1, en ninguno de los casos se obtuvieron producciones tan altas como en el caso de la Arg.

En este punto era importante conocer cual era el perfil de carotenoides que se obtenía al cultivar a *P. rhodozyma* con Arg como única fuente de nitrógeno, pues se ha encontrado que la formulación de los medios pueden alterar dicho perfil (Andrews, et al., 1976; Girard, et al., 1994; Johnson and Lewis, 1979). Para ello se utilizó una cromatografía en capa fina con un estandar de astaxantina (Hoffman-LaRoche). El siguiente esquema muestra una de las placas cromatográficas que revelan dos manchas principales. Para mayor detalle sobre la cuantificación de estos carotenoides ver el anexo II.

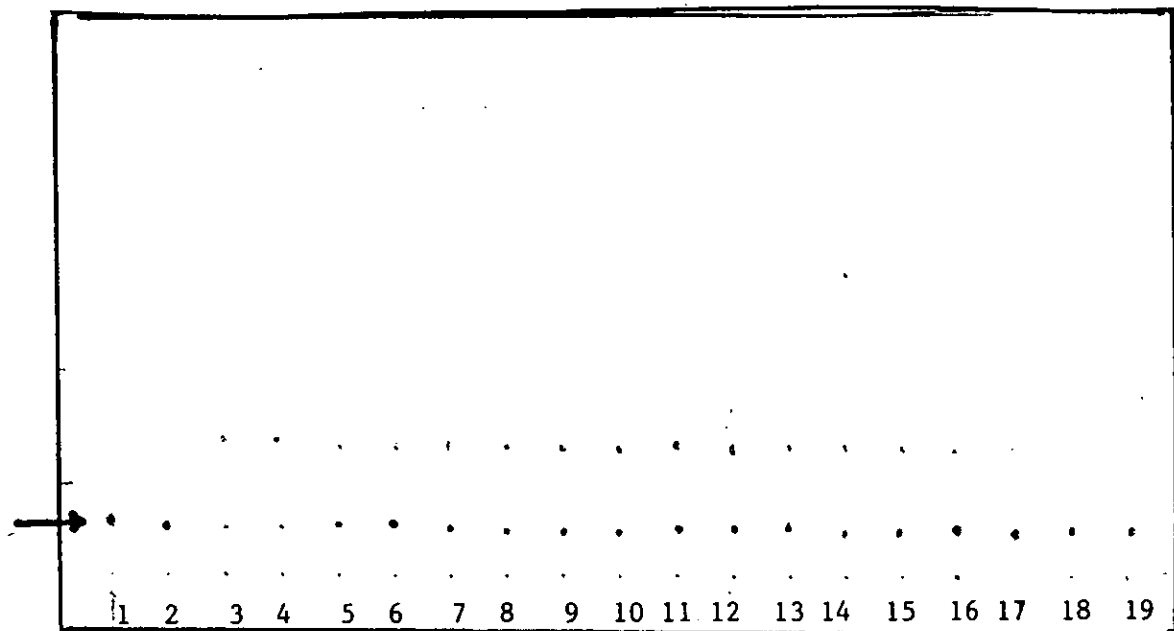


Fig. 7.8 Cromatograma en placas de silica gel 60 de 10 x 20 cm (E. Merck AG, Darmstad, Alemania) que contiene estandar de astaxantina y carotenoides de *P. rhodozyma* cultivada con 2, 10 y 20 mM de amonio y Arg. Carriles: 1, 2: 2 μ l de estandar; 3, 4: 10 μ l de 2 mM amonio; 5, 6: 10 μ l de 10 mM de amonio; 7, 8: 8 μ l de 20 mM de amonio; 9, 10: 10 μ l de 2 mM de Arg; 11, 12: 6 μ l de 10 mM de Arg; 13, 14: 8 μ l de 10 mM de Arg; 15, 16: 6 μ l de 20 mM de Arg; 17, 18: 8 μ l de 20 mM de Arg; 19: 3 μ l de estandar. Las concentraciones de amonio y Arg arriba mencionadas, se refieren a la fuente de nitrógeno empleada en el medio de cultivo para crecimiento de *P. rhodozyma* y la consiguiente extracción de los carotenoides que se aplicaron en cada carril. Los compuestos que se observan en la placa corresponden a un carotenoide no identificado y a la astaxantina (donde lo indica la flecha).

El cromatograma (Fig. 7.8) muestra que en ambos casos (cultivos con Arg o amonio) el perfil de carotenoides solo contiene dos picos, uno que corresponde al de astaxantina, y que representa al rededor de un 70-80% y otro pico más pequeño con un porcentaje de 20%. Por tanto, sabemos que cuando cultivamos a *P. rhodozyma* en presencia de Arg no solo se obtiene una buena concentración de carotenoides, sino que además la astaxantina está presente mayoritariamente.

7.3 ADICIÓN DE ARGININA A DIFERENTES TIEMPOS EN UNA FERMENTACIÓN DE *P. rhodozyma*.

Para conocer más acerca del efecto estimulador de la arginina sobre la producción de carotenoides, se cultivó a la levadura en el medio químicamente definido con la concentración arrancadora de sulfato de amonio (2 mM) y posteriormente se adicionó una concentración 10 mM de Arg a los tiempos 0, 12, 24, 48 y 72 h de iniciada la fermentación, además de un control con 2 mM de amonio adicionado al tiempo cero.

En este ensayo se midió el crecimiento de la levadura, el consumo de glucosa, las producciones volumétrica y específica de carotenoides.

Este experimento es muy claro y sirve como modelo para comprobar el efecto estimulador de la Arg. Se observa que la adición de este aminoácido estimuló el crecimiento de la levadura (Fig. 7.9) por ejemplo, tanto a las 12 como a las 24, 48 e incluso 72 horas de adición, el crecimiento se disparó inmediatamente y llegó a valores prácticamente iguales que la condición donde se adicionó la Arg desde el inicio (tiempo cero).

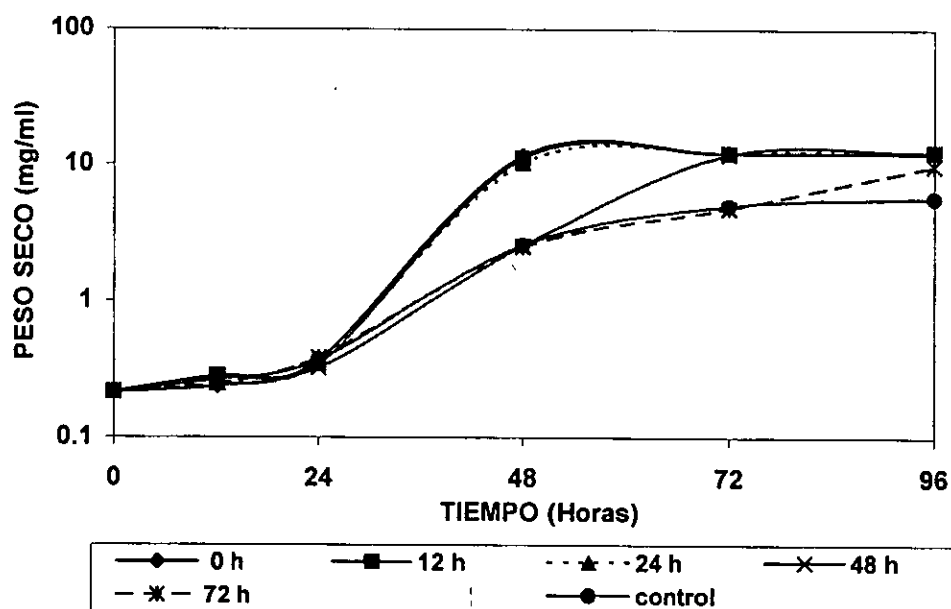


Fig. 7.9 Cinética de crecimiento de *P. rhodozyma* cultivada en un medio químicamente definido con adición de 10 mM de Arg a las 0, 12, 24, 48 y 72 h y un control con 2 mM de amonio. Condiciones: T= 22 °C, agitación: 150 rpm

También se midió la glucosa residual con el fin de conocer la cinética de consumo cuando la levadura se cultivó en diferentes relaciones C:N.

El consumo de glucosa (Fig. 7.10) siguió una relación directamente proporcional al crecimiento, lo cual concuerda ya que justamente la levadura utiliza esta fuente de carbono para crecer.

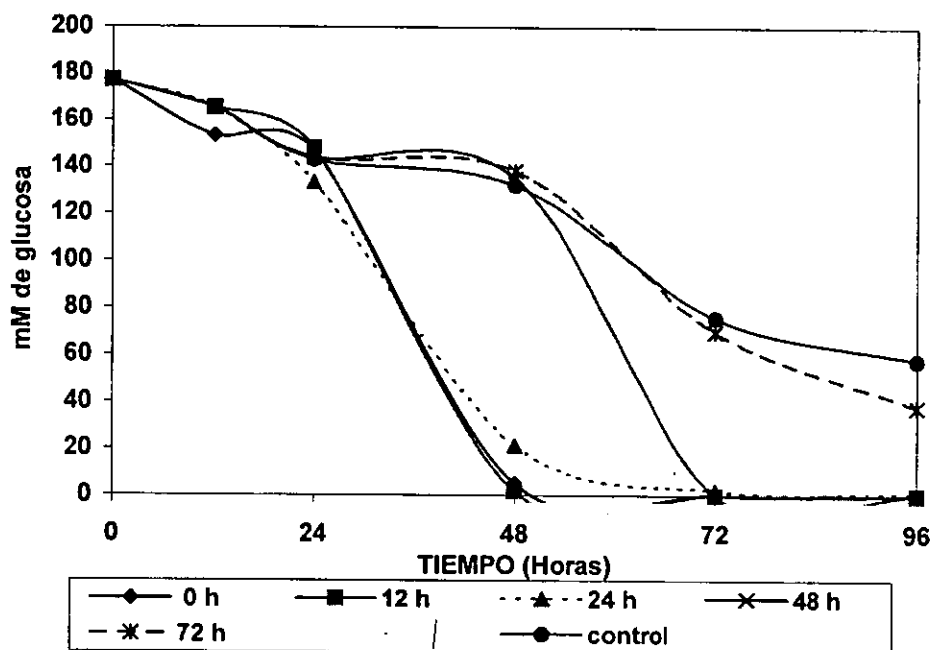


Fig. 7.10. Cinética de consumo de glucosa de *P. rhodozyma* medido por un método enzimático GOD-POD. La levadura fue cultivada en un medio químicamente definido con 170 mM de glucosa y con adición de 10 mM de Arg a las 0, 12, 24, 48 y 72 h y un control con 2 mM de amonio. Condiciones: T= 22 °C, agitación: 150 rpm.

En las condiciones donde se adicionó la arginina al tiempo 0 y 12 e incluso 24 h, el consumo de glucosa es exactamente igual y esto es debido a que la célula incorporó primero el amonio existente en el medio químicamente definido (resultados no mostrados), por tanto, la relación C:N era la misma y la levadura incorporó la glucosa a la misma velocidad y a la hora 48 se había agotado ya este nutriente. Mientras la levadura se mantuvo con una alta relación C:N, esto es en las condiciones de adición a las 48 y 72 h, la glucosa no fue consumida y solo hasta que la arginina se agregó al medio químicamente definido empezó la incorporación de esta fuente de carbono.

En la producción volumétrica de carotenoides (Fig. 7.11) se observó que cuando la adición se hizo tanto a las cero como a las 12 h la tendencia es la misma, lo que concuerda con lo antes

expuesto sobre el crecimiento de la levadura en estas dos condiciones. Esto también se observó a la hora 24, 48 y 72 (aunque en esta última no es tan evidente), es decir, hay una estimulación en la producción cuando se adicionó el aminoácido.

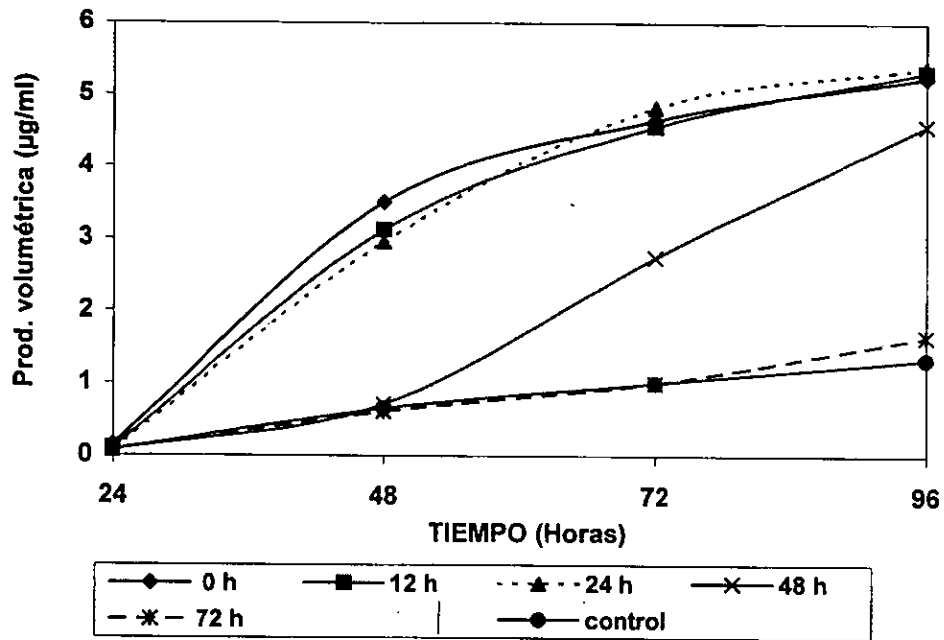


Fig. 7.11 Producción volumétrica de carotenoides por *P. rhodozyma*. La levadura fue cultivada en un medio químicamente definido adicionado con 10 mM de Arg a las 0, 12, 24, 48 y 72 h y un control con 2 mM de amonio. Condiciones: T= 22 °C, agitación: 150 rpm.

Ahora bien, si se observa la misma gráfica pero reajustada en función de los valores de peso seco, es decir, la gráfica de producción específica (Fig. 7.12) podemos observar que tanto a las 0, 12 y 24 horas la producción es la misma, es decir, está en función del crecimiento, mientras que a las 48 horas, aun cuando reportó valores menores, si se vió una tendencia hacia arriba. Por el contrario, en el caso de las 72 horas, los valores tienden a decaer, debido a que en este caso aunque en la producción volumétrica se observe una estimulación, en este tiempo la levadura ha alcanzado un crecimiento muy alto, por tanto la producción por gramo de célula (específica) es muy baja.

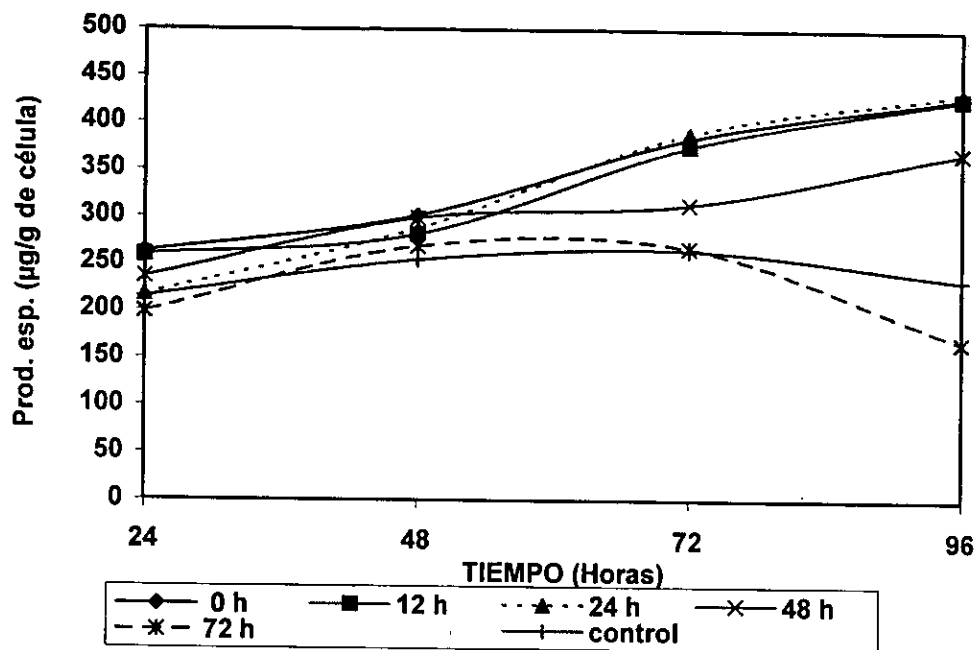


Fig. 7.12 Producción específica de carotenoides por *P. rhodozyma*. La levadura fue cultivada en un medio químicamente definido adicionado con 10 mM de Arg a las 0, 12, 24, 48 y 72 h y un control con 2 mM de amonio. Condiciones: T= 22 °C, agitación: 150 rpm.

7.4 LA ARGININA COMO FUENTE DE CARBONO Y NITRÓGENO.

El catabolismo de Arg hacia α -cetoglutarato podría provocar la acumulación de citrato, el cual se rompe fuera de la mitocondria, en oxaloacetato y acetil-CoA, siendo éste el primer precursor en la síntesis de lípidos y, por tanto, de carotenoides (Botham, et al., 1979). En el marco de la estimulación de la síntesis de carotenoides por Arg, esto significaría que el esqueleto hidrocarbonado de dicho aminoácido estaría sirviendo como bloque de construcción para las unidades isoprenoides de los carotenoides, es decir, que la acción de la Arg se debiera a la utilización de ésta no solo como una buena fuente de nitrógeno, sino también como fuente de carbono. Para corroborar esto se realizaron experimentos con ^{14}C -Arg marcada en todos los carbonos de la molécula con una actividad específica de 278 mCi/mmol. En la tabla 7.2 se muestran los porcentajes de incorporación a carotenoides del carbono marcado. Se tomaron muestras a las 72 y 144 h, se extrajeron carotenoides y se midieron directamente en el contador de líquido de centelleo, aparte se separaron en una cromatografía en capa fina, y las 2 manchas que aparecieron se rasparon de la placa y también se leyeron en el contador. En el caso la condición con ^{14}C -Arg, se observa que el carbono si se incorpora a la cadena isoprenoide de los carotenoides aunque muy escasamente. Observamos que tanto en el estandar de astaxantina como en el control de amonio y el control negativo (muestra de placa cromatográfica con sílica gel) el contador detecta cierta concentración de radioactividad mínima, siendo los valores tan bajos en las cuentas por minuto (cpm) que indican ruido de fondo.

Así, los resultados mostrados en la tabla 7.2 indican que los carotenoides están marcados pero en una proporción muy baja (menos del 0.7%).

Tabla 7.2 Porcentajes de incorporación de ^{14}C -Arg a los carotenoides producidos por *P. rhodozyma*

MUESTRA	cpm	cpm	μCi	% INC.
Estandar	128	118	0.0023	---
Control negativo	71	74	0.0013	---
10 mM amonio muestra a las 144 h de fermentación	528	576	0.0105	---
10 mM amonio ¹	130	120	0.0023	---
10 mM amonio ²	100	110	0.0020	0.0670
10 mM Arg muestra a las 72 h de fermentación	1013	1036	0.0196	0.6539

10 mM Arg muestra a las 72 h ¹ de fermentación	197	124	0.0030	0.1024
10 mM Arg muestra a las 72 h ² de fermentación	167	144	0.0029	0.0992
10 mM Arg muestra a las 144 h de fermentación	852	903	0.0168	0.5601
10 mM Arg muestra a las 144 h ¹ de fermentación	109	90	0.0019	0.0635
10 mM Arg muestra a las 144 h ² de fermentación	108	86	0.0018	0.0619

¹ Muestra de la mancha superior del cromatograma (carotenoide no identificado)

² Muestra de la mancha inferior del cromatograma (astaxantina).

cpm= cuentas por minuto, datos crudos del contador de líquido de centelleo

Posteriormente se usaron varios controles (¹⁴C-glucosa y ¹⁴C-ácido glutámico además del amonio no marcado) con el fin de conocer si la incorporación del sustrato radiactivo se estaba llevando a cabo de manera eficiente. Se midió el porcentaje de incorporación de radioactividad en carotenoides, sobrenadante y células completas, a las 96 horas de fermentación. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Como se puede observar en las gráficas de pastel (Fig 7.13), los resultados mostraron que solo alrededor del 1.0% de los carbonos de la Arg son utilizados por la levadura para sintetizar carotenoides, aun cuando el 91% de estos es incorporado. Los controles nos muestran que la incorporación de carbonos de la glucosa a carotenoides es de tan solo 8% y solo el 65% se incorporó. Mientras que en el caso del glutamato alrededor del 2% de sus carbonos forma parte de las unidades isoprenoides de los carotenoides. Por lo que se pudo confirmar que el efecto positivo en la acumulación de carotenoides en levaduras cultivadas con Arg no se debe a que este aminoácido sea usado como fuente de carbono directa para formar los esqueletos carbonados.

En síntesis, los resultados obtenidos nos sugieren que *P. rhodozyma* es capaz de producir una mayor cantidad de carotenoides cuando se cultiva en presencia de Arg, pero que este aminoácido no parece ser utilizado directamente como fuente de carbono para la carotenogénesis.

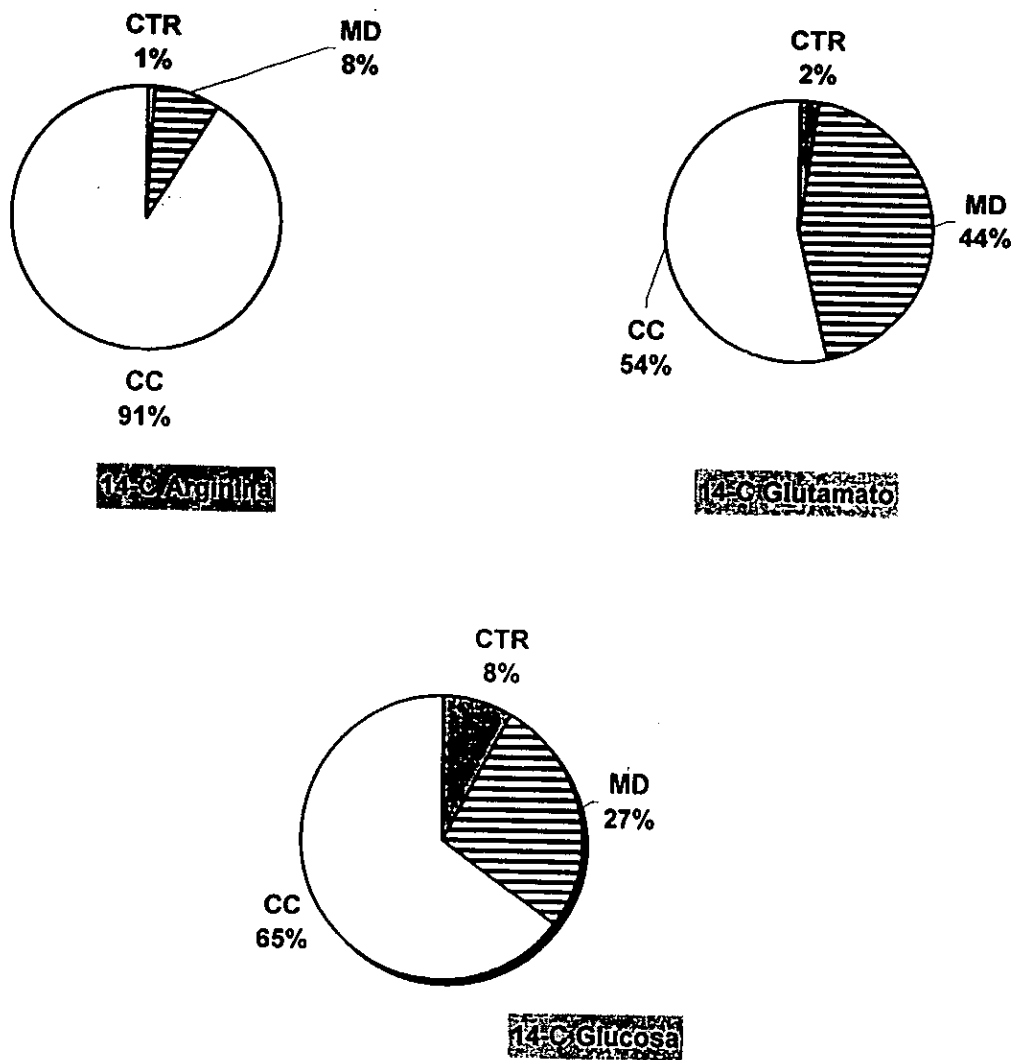


Fig. 7.13 Incorporación de moléculas marcadas con ^{14}C Carbono a células de *P. rhodzyma* cultivadas en un medio químicamente definido, durante 96 horas a $22^\circ\text{C}/150$ rpm. En las gráficas de pastel se muestran los porcentajes de incorporación de carbono marcado a las células completas (CC), carotenoides (CTR) y el remanente en el medio de cultivo (MD).

7.5 EL CATABOLISMO DE LA ARGININA A TRAVÉS DE LA ARGINASA.

Posteriormente se probó si la arginina era la responsable "per se" del efecto positivo o si se trataba de algún intermediario de su metabolismo. En levaduras, la arginina es transportada al interior de la célula por dos mecanismos: la permeasa general de aminoácidos y una permeasa específica (Eddy, 1980). Una vez adentro es degradada por la arginasa para producir ornitina y urea, las cuales pueden ser usadas como fuentes de nitrógeno independientes (Voet, 1990).

Para realizar estos ensayos se utilizaron concentraciones 10 mM de arginina, urea y ornitina. Además dos controles, uno que contenía sulfato de amonio 10 mM y otro que contenía 10 mM de urea + 10 mM de ornitina. En ensayos previos también se probó 10 mM de ácido glutámico, 20 mM de amonio + 10 mM de carbonatos y 20 mM de amonio ya que: por una parte la ornitina se convierte en ácido glutámico (después de varios pasos enzimáticos); y por la otra, la urea se rompe en dos moléculas de amonio y CO₂. El crecimiento en estas tres últimas condiciones no es muy bueno, sin embargo la condición 20 mM de amonio es mejor que la condición 20 mM de amonio + 10 mM de carbonatos, por lo cual creemos que los carbonatos inhiben el crecimiento (tabla 7.3). Esto concuerda con lo descrito por Hofman-Bang (1999) que indica que se ha observado que en presencia de amonio o glutamato las levaduras tienen velocidades de crecimiento menores, aunque aun se desconoce la razón. A pesar de ello, se obtienen buenas producciones en presencia de 10 mM Glu y 20 mM de amonio, no así en 10 mM de carbonatos + 20 mM de amonio lo que confirma la sospecha de que los carbonatos afectan negativamente la producción de carotenoides en *P. rhodozyma*.

Tabla 7.3 Valores de crecimiento, pH y producción de carotenoides en *P. rhodozyma* cultivada en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno

Fuente de nitrógeno	NH ₄ 10 mM	Arginina 10 mM	Ornitina + urea 10 mM (c/u)	Ornitina 10 mM	Urea 10 mM	Ac. glu 10 mM	CO ₃ ²⁻ /NH ₄ 20 mM	NH ₄ 20 mM
PS (mg/ml)	12.31	12.74	12.10	10.87	9.51	7.86	5.06	6.68
CT (µg/ml)	5.09	7.87	5.24	5.51	1.66	3.31	0.83	1.56
CE (µg/g cell)	413.46	617.66	433.39	506.53	175.07	420.63	164.50	232.80
pH	4.58	4.53	6.58	8.33	5.58	5.87	4.77	4.20

PS= peso seco; CT= carotenoides totales (prod. volumétrica), CE= carotenoides específicos; Resultados obtenidos a las 96 h

Ahora bien, los resultados que se presentan en las gráficas 7.14 a 7.16 corresponden solo a las cinco primeras condiciones, ya que en las tres últimas condiciones no se observa un efecto apreciable, como se puede ver en la tabla anterior, que contiene los valores finales tanto de crecimiento, como producción y pH.

Así, cuando se cultivó la levadura en presencia de la combinación de ornitina más urea se observa un crecimiento máximo, debido a que la levadura puede aprovechar de manera más eficiente ambas fuentes de nitrógeno (Fig. 7.14). Cuando se utilizan por separado solo la ornitina parece ser eficiente, ya que cuando la levadura crece en presencia de urea como única fuente de nitrógeno, su velocidad de crecimiento es muy lenta, aunque al final alcanza valores similares a los de las demás condiciones.

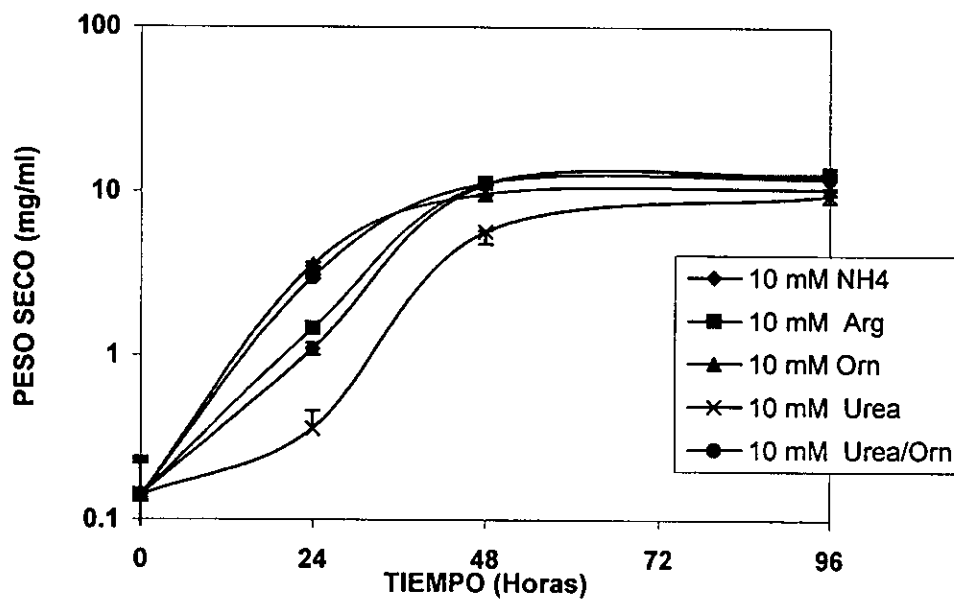


Fig. 7.14 Cinética de crecimiento de *P. rhodozyma* cultivada en diferentes fuentes de nitrógeno.

Al comparar las producciones volumétricas (Fig. 7.15) podemos ver claras diferencias entre los cultivos con Arg y con sus intermediarios ornitina y urea. Siendo este último el que presenta la producción más baja, de al rededor de una quinta parte con respecto a lo reportado en la condición con Arg. Los valores de producción de los cultivos con ornitina y

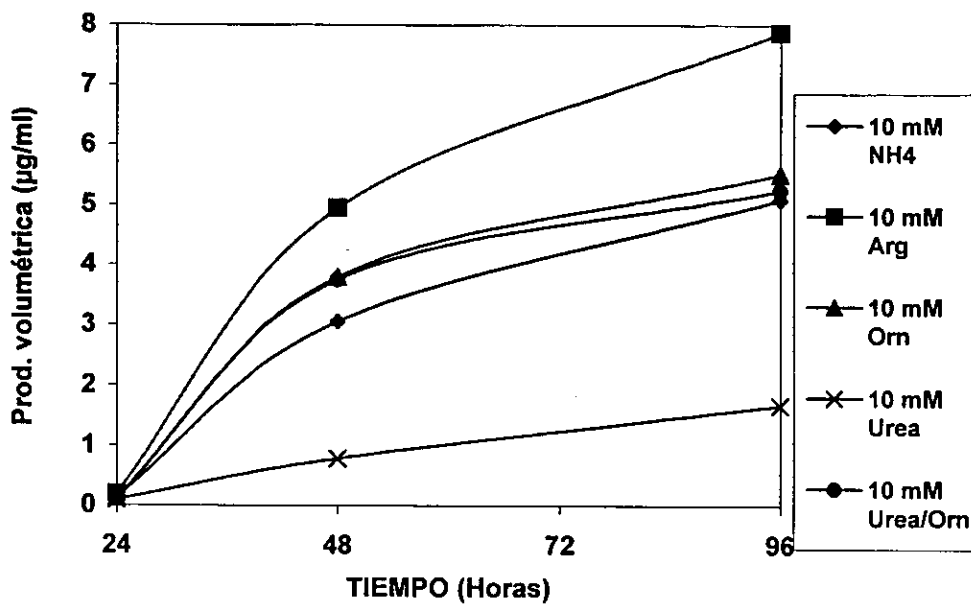


Fig. 7.15 Cinética de producción volumétrica de carotenoides de *P. rhodozyma* cultivada en diferentes fuentes de nitrógeno.

ornitina + urea son prácticamente iguales, lo que parece indicar que la contribución más importante al efecto estimulador está dada por la ornitina.

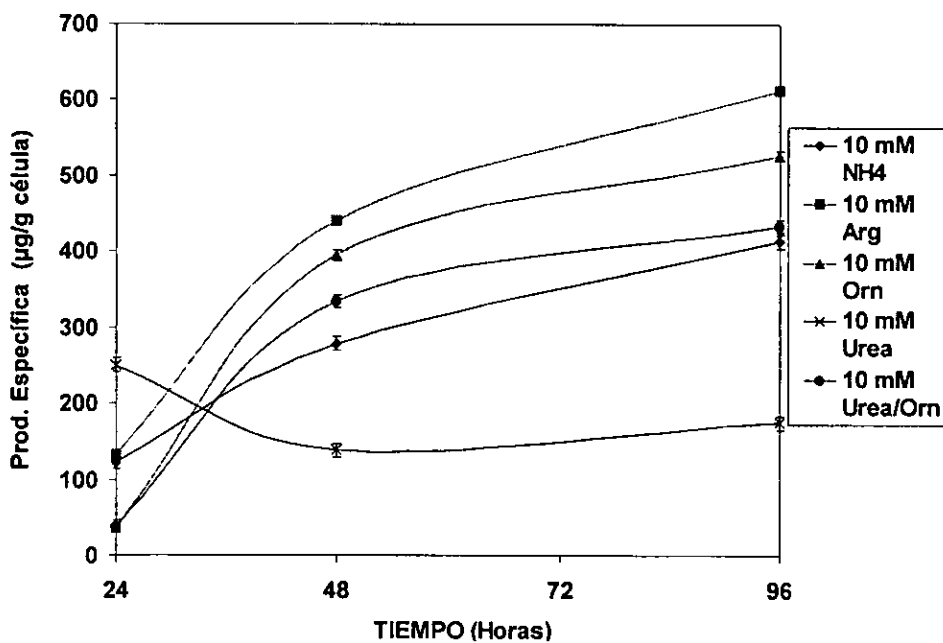


Fig. 7.16 Cinética de producción específica de carotenoides de *P. rhodozyma* cultivada en diferentes fuentes de nitrógeno.

Esto se aprecia más claramente en la gráfica de producción específica (Fig. 7.16) donde incluso la condición con ornitina reporta un valor de 506.53 $\mu\text{g/g}$ de célula, es decir, 16% más que la condición de ornitina con urea, el cual tiene un valor de 433.39 $\mu\text{g/g}$ de célula.

7.6 SISTEMA DE CÉLULAS EN REPOSO (SCR).

El siguiente paso consistió en caracterizar el efecto de la fuente seleccionada, es decir, arginina para conocer si existe una activación o una inducción a través de un SCR.

En un SCR se tiene un sistema *in vivo-in vitro*, esto significa que se detendrá el crecimiento celular, debido a que no se le proporcionan los macronutrientes (fuente de carbono y nitrógeno principalmente) a las células, solamente se les mantiene en un estado de latencia al ponerlas en un medio con sales. Sin embargo, las enzimas que se sintetizaron durante la fase de crecimiento previo al SCR, estarán activas y serán capaces de sintetizar el metabolito de interés.

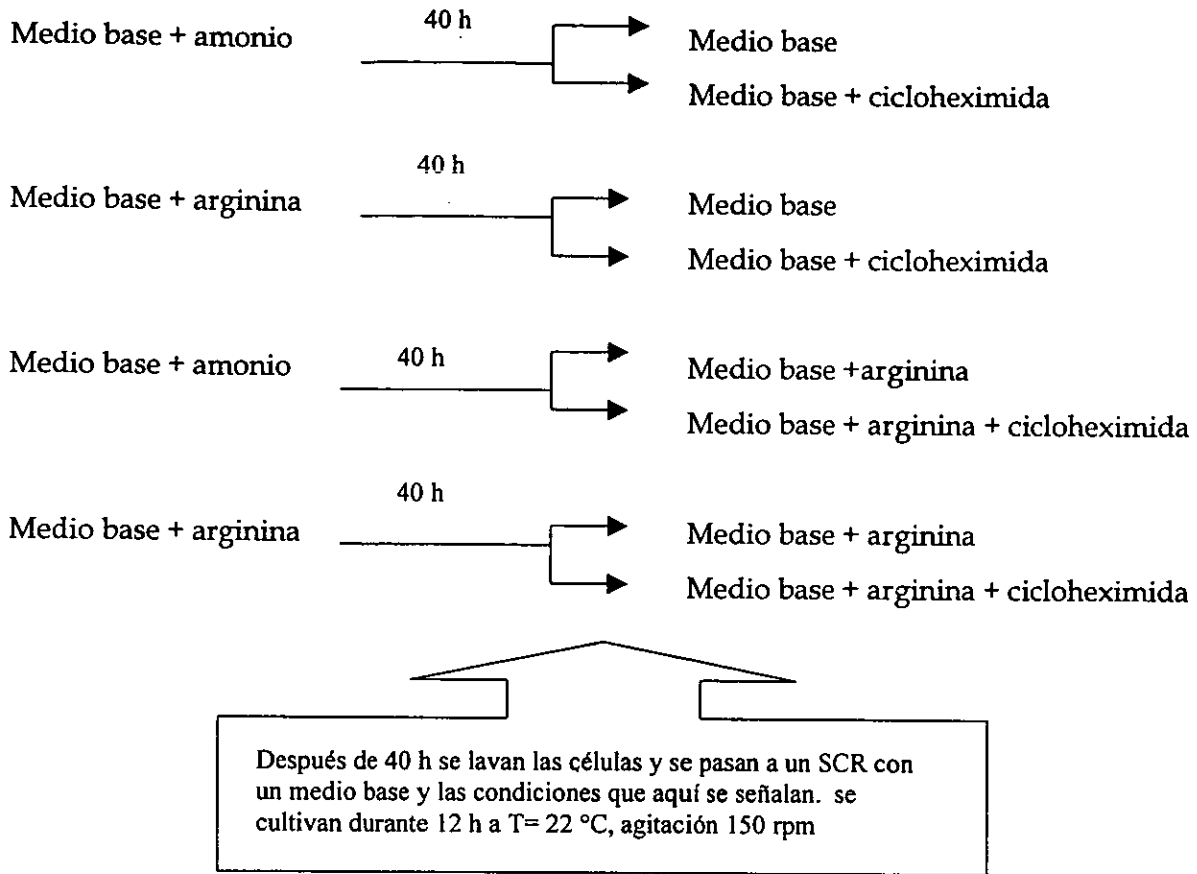
En otras palabras este sistema consiste en permitir el crecimiento celular hasta un periodo donde se asegura que ya ha iniciado la síntesis del metabolito que interesa, donde se sabe que las enzimas de la ruta metabólica ya estarán presentes.

Se cultivó *P. rhodozyma* por 40 h en un medio completo y posteriormente se pasó a un medio base sin fuente de nitrógeno ni carbono. Una vez que las células se transfirieron al SCR se tomaron muestras del cultivo a las 3, 6, 9, 12, 24 y 32 h y en otro sistema idéntico los muestreos se llevaron a cabo a las 12, 15, 18, 21, 24 y 36 h. Esto se realizó con el fin de conocer exactamente en que periodo de tiempo se podría ver mejor la acción del efector, debido a que las células pueden sufrir un periodo de adaptación variable o, por el contrario, las enzimas pueden degradarse rápidamente. De esta forma se pudo dilucidar qué tipo de estimulación se estaba ejerciendo (inducción o activación).

Sin embargo, es importante mencionar que en general en un SCR lo que se puede distinguir es:

NIVEL	ESTIMULACIÓN	INHIBICIÓN
Actividad enzimática	Activación	Inhibición
Formación de enzimas	Inducción	Represión

Los resultados mostraron que el mejor período para distinguir el efecto de la arginina era durante las primeras 12 horas. Tomando en cuenta eso, se ensayaron 4 condiciones diferentes:



Transcurridas 40 horas de crecimiento las células se centrifugaron y se lavaron con S.S.I. y se inocularon en el medio químicamente definido sin glucosa, amonio ni citratos y se tomaron muestras cada 3 horas, durante 12 horas.

Se utilizó un antibiótico (cicloheximida 50 µg/ ml) que inhibe la síntesis de proteínas en eucariontes para evitar la generación de resultados falsos.

Los resultados están divididos en dos partes: en la primera, las gráficas muestran las cinéticas de crecimiento y producción de las células sometidas al SCR a los cuales no se les adicionó arginina. En la segunda, las gráficas muestran los sistemas a los cuales se les adicionó arginina 10 mM.

7.6. 1 SCR sin adición del efector.

Para asegurarnos de que el SCR estaba funcionando se tomaron muestras cada 3 horas durante 12 horas y se midió la densidad óptica de éstas para corroborar que el crecimiento se detenía cuando la levadura se encontraba dicho sistema. Esto se observa en la curva de crecimiento (Fig. 7.17) la cual no tiene ningún cambio de pendiente. También observamos que el pH del medio de cultivo varía lo que significa que el metabolismo de la célula continúa, no así su crecimiento.

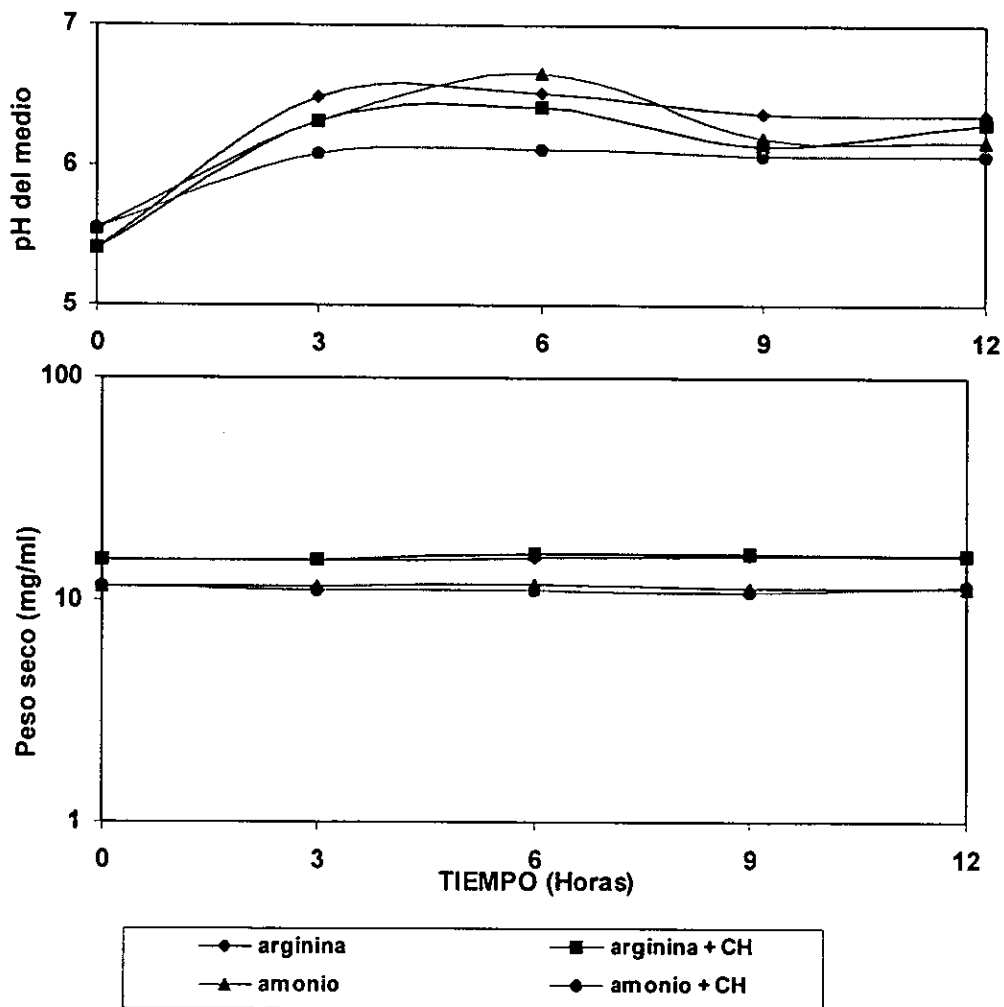


Fig. 7.17 Cinética de crecimiento y pH de *P. rhodozyma* sometida a un sistema de células en reposo en un medio mínimo con sales y cicloheximida en el caso de los controles. Las células provenían de un medio completo con arginina o amonio, cultivado por 40h.

En la acumulación de carotenoides, se aprecia una evidente estimulación de la arginina que fue adicionada en el medio completo, ya que los valores de producción reportados en el SCR son más altos con respecto a los controles con amonio (Fig 7.18). Esto también indica que el sistema está funcionando, pues las enzimas preformadas continúan activas, además los controles con cicloheximida indican que el efecto que se observa es por la presencia de estas enzimas. Pues los valores entre el control con y sin arginina son muy similares y los resultados que se ven no son falsos positivos.

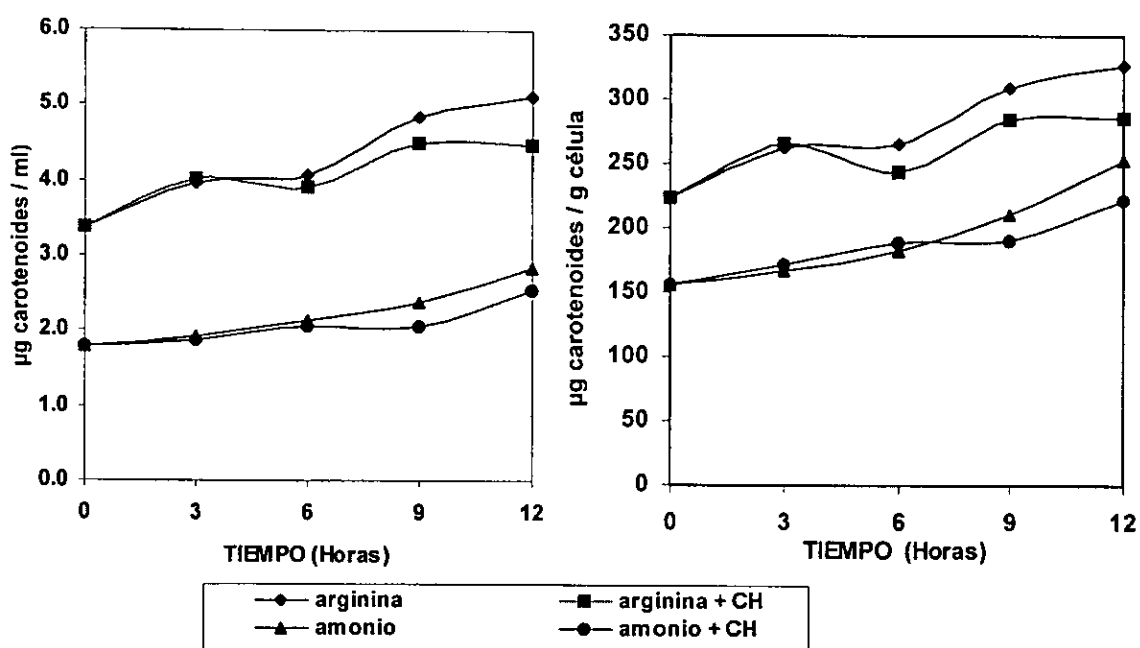


Fig. 7.18 Producciones volumétrica y específica de carotenoides por *P. rhodozyma* sometida a un sistema de células en reposo en un medio mínimo con sales y cicloheximida en el caso de los controles. Las células provenían de un medio completo con arginina o amonio, cultivado por 40h.

7.6.2 SCR adicionados con el efector.

P. rhodozyma fue cultivada por 40h en un medio completo con arginina o amonio, y posteriormente las células se transfirieron al medio con sales, se les adicionó 10 mM de arginina o 10 mM de sulfato de amonio y en el caso de los controles también se les adicionó 50 µg/ml de cicloheximida.

La cinética de crecimiento que se muestra en la Fig. 7.19 indica que en este caso hay un muy ligero cambio de pendiente, sin embargo podemos considerar que no hay crecimiento.

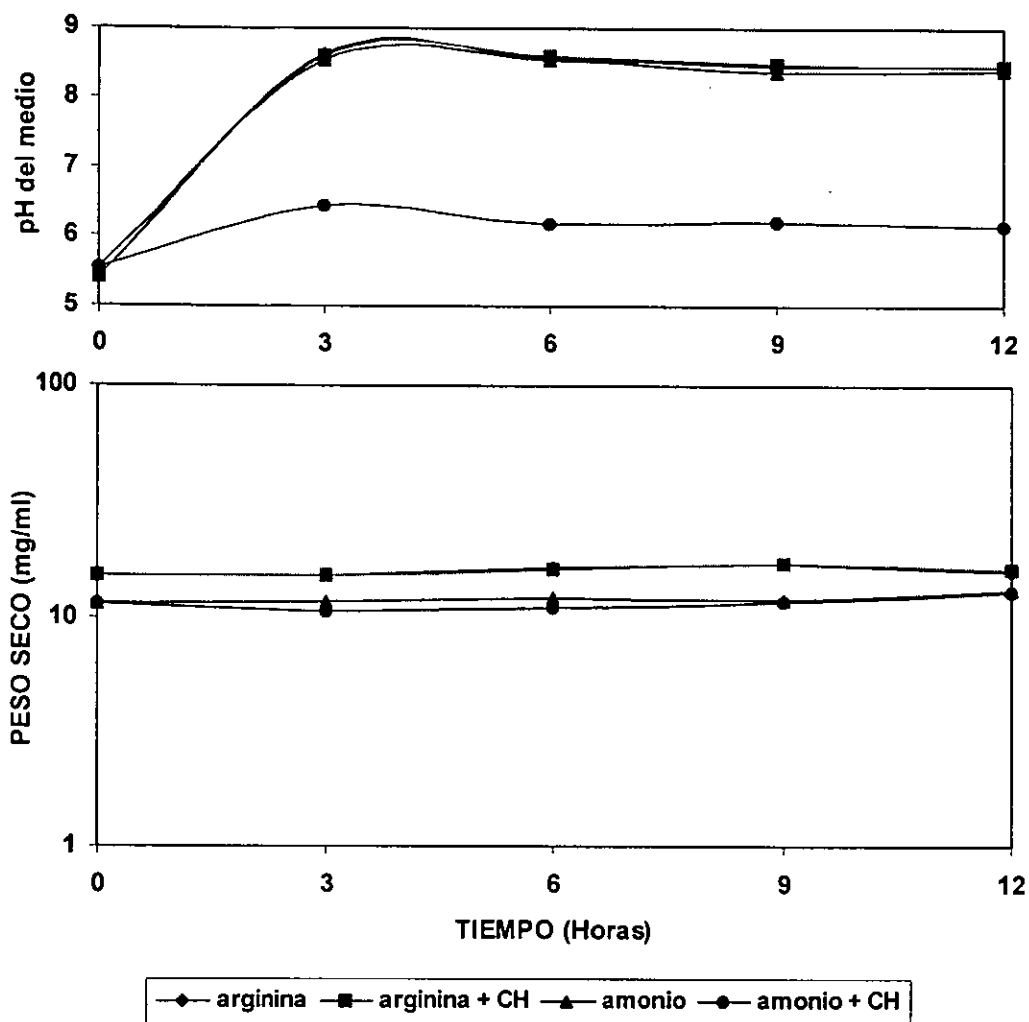


Fig. 7.19 Cinética de crecimiento y pH de *P. rhodozyma* sometida a un sistema de células en reposo en un medio mínimo con sales y adicionados con 10 mM de arginina o 10 mM de sulfato de amonio, además de cicloheximida en el caso de los controles. Las células provenían de un cultivo de 40 h en un medio completo con arginina o amonio.

Cuando se adiciona el efector (arginina) al SCR se observa la misma tendencia que en los sistemas del apartado 7.5.1. Incluso si se comparan las gráficas Fig. 7.18 y 7.20 se observan prácticamente los mismos valores, lo cual indica que el efecto estimulador de la Arg no es debido a que este aminoácido (por no existir diferencias en la producción de carotenoides si se adiciona o no el efector), por tanto, los resultados sugieren que el efecto es debido a una

inducción, es decir, que de alguna forma la presencia de la arginina provoca que la célula sintetice en mayor medida las enzimas involucradas en la vía carotenogénica.

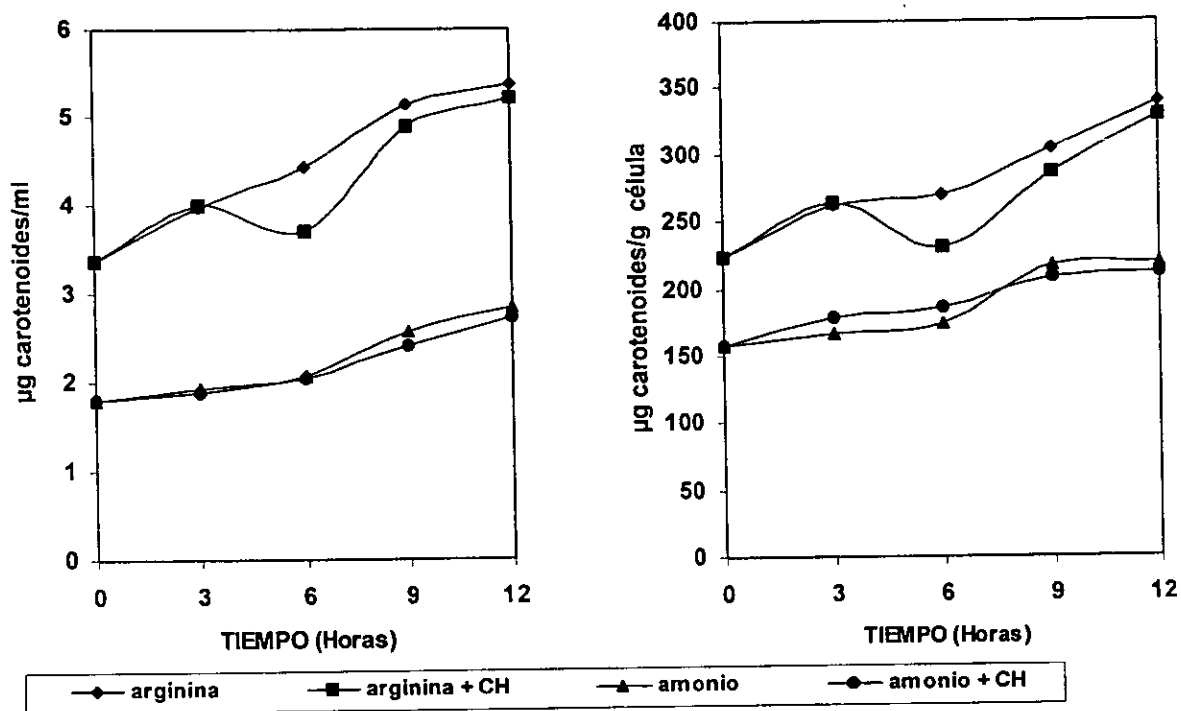


Fig. 7.20. Producciones volumétrica y específica de carotenoides por *P. rhodzyma* sometida a un sistema de células en reposo en un medio mínimo con sales y adicionados con 10 mM de arginina o 10 mM de sulfato de amonio, además de cicloheximida en el caso de los controles. Las células provenían de un cultivo de 40 h en un medio completo con arginina o amonio.

7.7 LA PRESENCIA DE LA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA.

Hasta el momento se sabía que *P. rhodozyma* era capaz de sintetizar una mayor cantidad de carotenoides cuando se cultivaba en presencia de Arg, la cual no se utiliza totalmente como fuente de carbono para la síntesis de carotenoides. En algunos organismos este aminoácido puede ser atacado en su grupo guanidino por el oxígeno molecular, a través de la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), para formar citrulina y óxido nítrico (NO), el cual es considerado como una especie de oxígeno reactiva (EOR). Basados en estos hechos, se sospechó que la arginina podría provocar un estrés oxidativo en la célula, debido a la generación de NO y que en respuesta a este fenómeno se produciría una mayor concentración de carotenoides.

El siguiente paso consistió en probar esta hipótesis, a través de la búsqueda de la existencia de la enzima óxido nítrico sintasa en la levadura *P. rhodozyma*. Para ello se utilizó un Kit colorimétrico (Calbiochem Nitric oxide synthase assay Kit, colorimetric) capaz de medir la actividad de la enzima NOS.

Se realizaron ensayos con extractos crudos de proteína intracelular de *P. rhodozyma*, la cual fue cultivada durante 96 h a 22° C/ 150 rpm, bajo dos condiciones: arginina 10 mM y amonio 10 mM. Se tomaron muestras a diferentes tiempos, se extrajo la proteína intracelular, para después realizar el ensayo colorimétrico así como la cuantificación de proteína total, a través del método de Lowry.

Como se puede observar, (Fig. 7.21) en los extractos enzimáticos provenientes de células cultivadas con 10 mM de arginina, la actividad enzimática de NOS es muy elevada tanto a las 24 como a las 36 horas, lo que se puede correlacionar directamente con la producción de carotenoides que se observa a estos tiempos. En el caso de amonio, ésta alcanza valores de 75% menores, con respecto a los de arginina, y esto también se relaciona con la menor producción de carotenoides en esta condición.

Se incluyeron como controles extractos enzimáticos de la levadura cultivada con 10 mM de ornitina, 10 mM de ornitina + 10 mM de urea, además de 10 mM de glutámico (Fig. 7.22) de ellos se ensayó la actividad enzimática tanto a las 24 como a las 48 horas de fermentación.

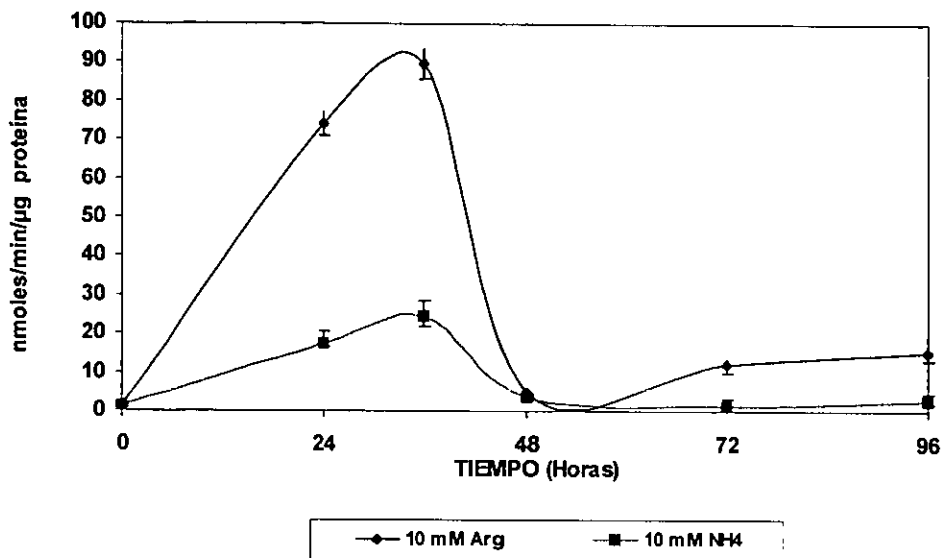


Fig. 7.21 Actividad enzimática de óxido nítrico sintasa producida por *P. rhodozyma* a diferentes tiempos de fermentación.

Sin embargo, estos controles reportan actividades enzimáticas de NOS muy bajas, menores del 15%, con respecto a la condición del efector positivo, lo cual apoya la idea de que la arginina es la responsable de la acumulación de carotenoides en la levadura *P. rhodozyma*.

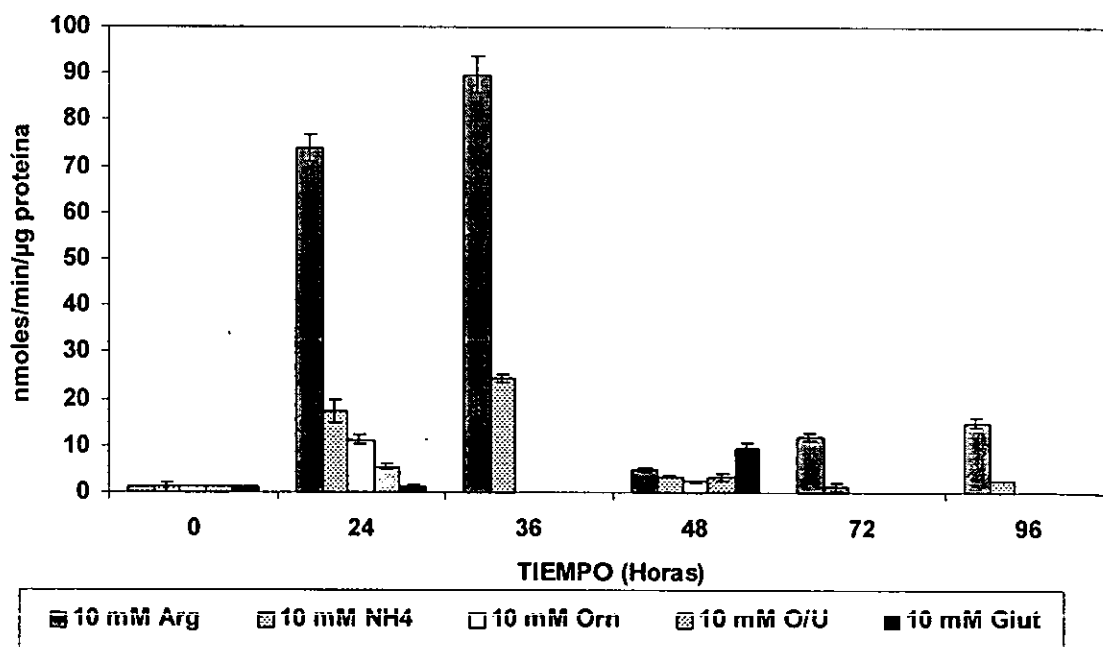


Fig. 7.22 Actividad específica de NOS producida por *P. rhodozyma* a diferentes tiempos de fermentación. Arg = arginina; NH4 = sulfato de amonio; Orn = ornitina; O/U = ornitina + urea; Glut = ácido glutámico

En experimentos anteriores (Fig. 7.11) se había demostrado que si se adicionaba arginina a diferentes tiempos de la fermentación, la producción de carotenoides se disparaba, por lo cual se ensayó la actividad enzimática de NOS en estas condiciones, con el fin de observar si había algún aumento apreciable. Se adicionó arginina a las 24, 36 y 48 horas de cultivo y se prepararon extractos enzimáticos tanto de los tiempos anteriores como posteriores a dichas adiciones, se midió la actividad enzimática de éstos, así como proteína total y con estos datos se construyeron las siguientes curvas de actividad (Fig. 7.23).

En la siguiente gráfica podemos observar que en un inicio la actividad enzimática de NOS es muy baja, de alrededor de 1 nmol/min/μg de proteína.

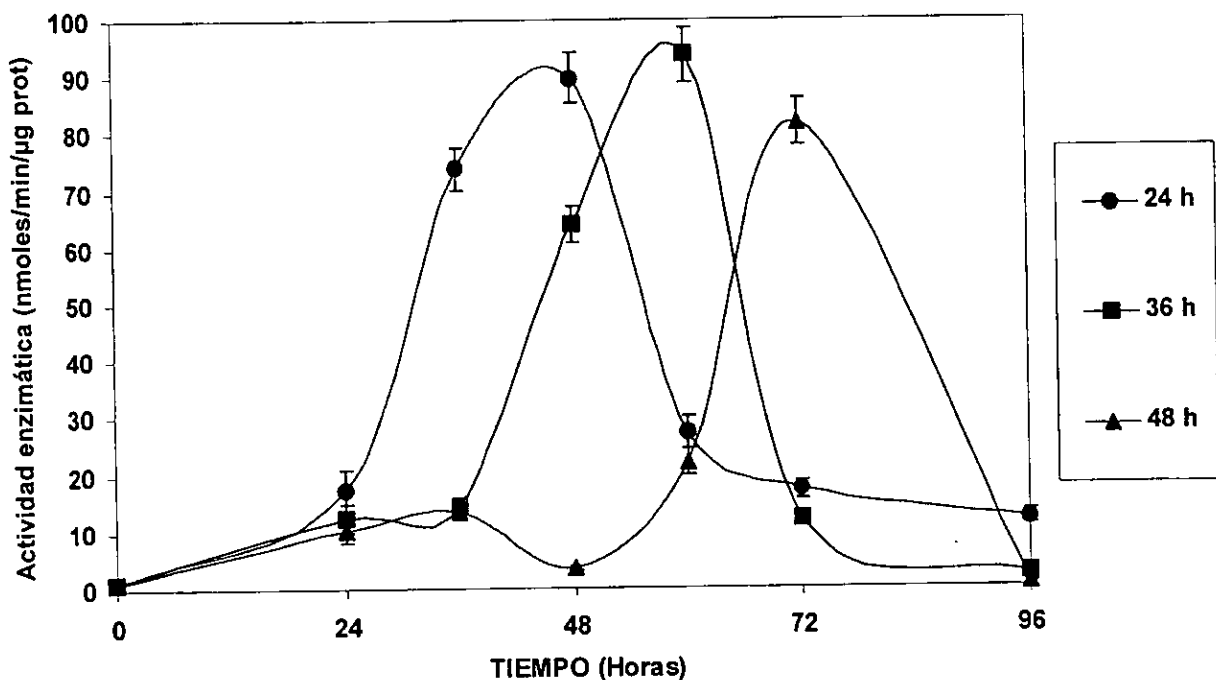


Fig. 7.23 Actividad enzimática de óxido nítrico sintasa producida por *P. rhodozyma* cuando fue cultivada en presencia de arginina, adicionada a diferentes tiempos (24, 36 y 48 h) durante la fermentación.

La primera adición se realizó a las 24 horas, y en esta primera curva observamos que 12 horas después, la actividad es alta, de alrededor de 4 veces más que al momento de la adición, alcanzando un máximo a las 48 horas con una actividad enzimática de 89.83

nmoles/min/ μ g de proteína, después de lo cual cayó bruscamente hasta valores menores de 30 nmol/min/ μ g de proteína. Cuando la adición se hizo a las 36 horas se observa un comportamiento similar al caso anterior, es decir, a las 12 horas aumenta rápidamente la actividad y hasta doce horas después alcanzó su máximo para después caer precipitadamente. Mientras que cuando la adición se hizo hasta las 48 horas la levadura está en franca fase estacionaria observamos que, la actividad enzimática estaba decayendo al momento de la adición y después de ésta se elevó un poco, pero solo hasta después de 24 horas es cuando se alcanzó un valor máximo, el cual es ligeramente más bajo que el de los casos anteriores. además, la caída en la actividad en esta última condición es la más brusca de los 3 casos.

Para apoyar las evidencias que se tenían de la existencia de la enzima óxido nítrico sintasa en *P. rhodozyma* se llevaron a cabo varios experimentos que sugirieran la presencia de la enzima.

7.8 EFECTO DE LA ARGININA EN AUSENCIA DE OXÍGENO.

Se sabe que la óxido nítrico sintasa (NOS) utiliza como sustratos tanto a la arginina como al oxígeno molecular, por lo cual se realizaron experimentos donde se cultivó a la levadura en presencia de Arg pero en ausencia total de O₂, con ello se esperaba que no hubiera producción de NO y por tanto no se observara un aumento en la producción de carotenoides. Estos cultivos se realizaron en botellas de 100 ml con un volumen de llenado del 20%. Se utilizó como medio de cultivo el químicamente definido más la fuente de nitrógeno, es decir 10 mM de sulfato de amonio (control) y 10 mM de arginina adicionados a las 24 h de iniciada la fermentación. Los cultivos se mantuvieron a 150 rpm y 22° C durante 192 h, Se tomaron muestras cada 24 horas. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Debemos considerar que *P. rhodozyma* es una levadura anaerobia facultativa (Miller, 1976), es decir, es capaz crecer en ausencia de oxígeno, fermentando la fuente de carbono para producir etanol, el cual posteriormente puede ser utilizado como segunda fuente de carbono. Es por ello que se observa en la Fig. 7.24 que el nivel máximo de crecimiento de la levadura fue menor comparado con los cultivos aerobios que se muestran en gráficas anteriores.

No obstante la cinética de crecimiento evolucionó de manera normal es decir, se observó una fase log de crecimiento y el inicio de la fase estacionaria.

En cuanto a la producción de carotenoides podemos observar en la Fig. 7.25 que ésta fue similar tanto en presencia como en ausencia de arginina, es decir no hubo tal estimulación en la producción, debido a que, según nuestra hipótesis, el efector NO no se formó.

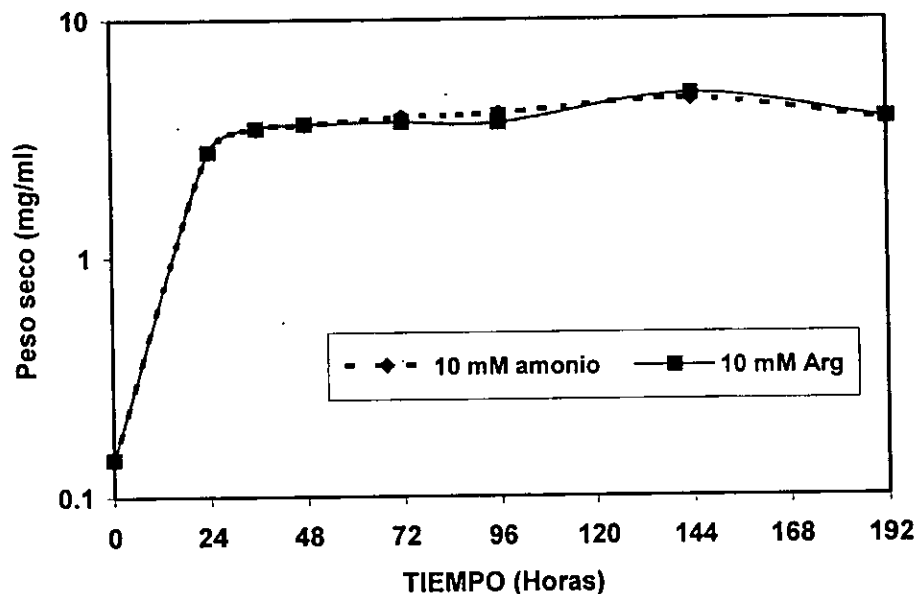


Fig. 7.24 Cinética de crecimiento de *P. rhodozyma* cultivada en condiciones de anaerobiosis, durante 96 horas, 22° C y 150 rpm con la adición de 10 mM de arginina o 10 mM de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

En la producción volumétrica se observa que los niveles fueron muy parecidos en ambas condiciones, en presencia de arginina se observaron valores ligeramente más altos y esto puede ser debido a la presencia de una pequeña cantidad de oxígeno intracelular que pudiera provocar la producción de NO y por tanto la inducción de las enzimas de la vía. En lo que se refiere a la producción específica, también se aprecia una caída en la producción y esto es debido probablemente a que la levadura dirige todo su metabolismo hacia el crecimiento más que a la síntesis de metabolitos secundarios, en este caso, de carotenoides y esto se puede corroborar si se comparan los resultados obtenidos en las gráficas de la Fig. 7.25 con lo obtenidos en fermentaciones cultivadas en presencia de oxígeno, donde la producción volumétrica es al menos cinco veces mayor, en tanto que las producciones específicas son del doble.

Estos resultados sugieren que aun cuando la enzima esté presente no puede llevar acabo su actividad debido a que no cuenta con uno de sus sustratos, el oxígeno el cual juega un papel muy importante en la producción de la especie reactiva NO.

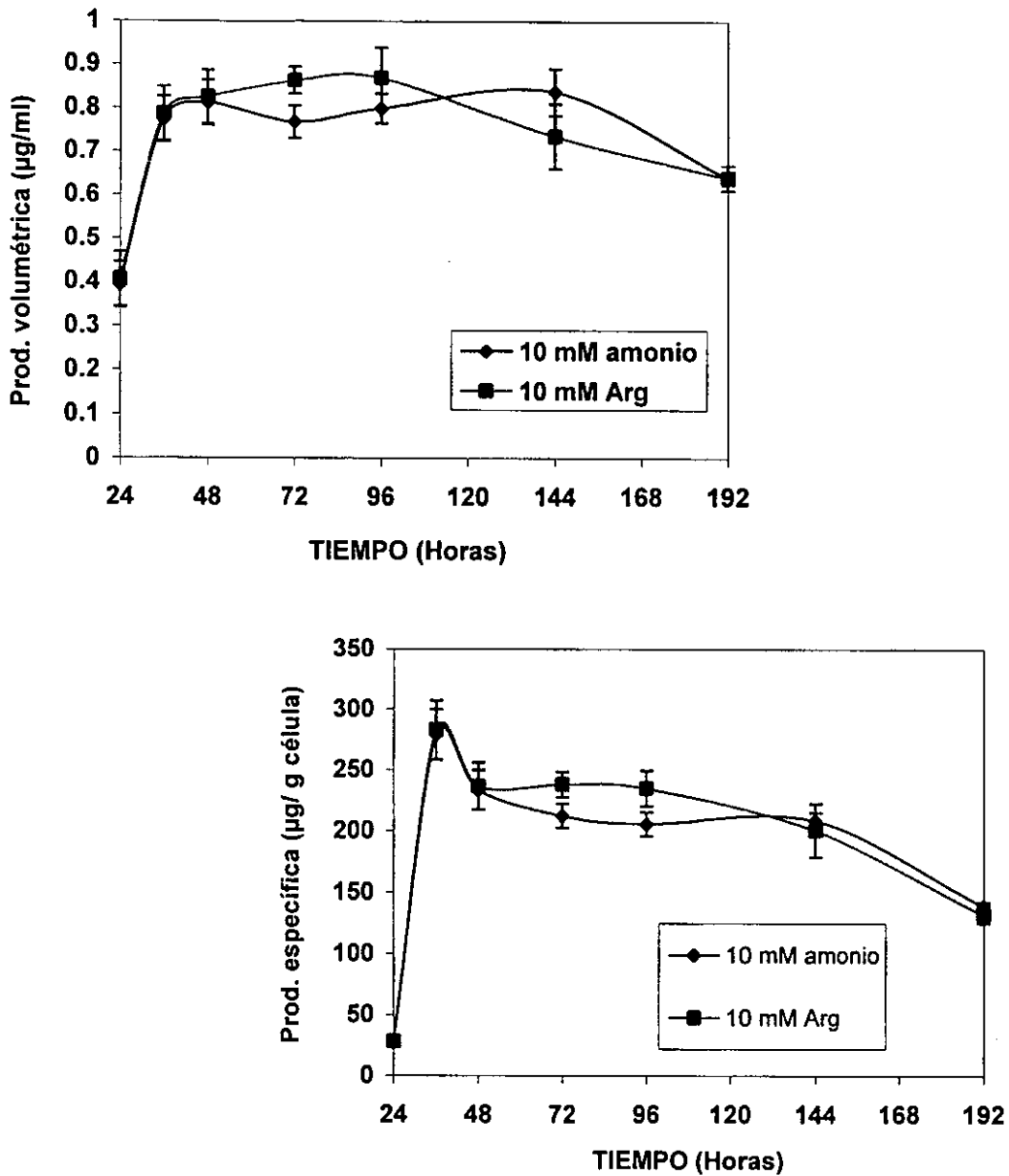


Fig. 7.25 Producciones volumétrica y específica de carotenoides en *P. rhodozyma* cultivada en condiciones de anaerobiosis, durante 96 horas, 22° C y 150 rp m con la adición de 10 mM de arginina o 10 mM de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno

7.9 LA ARGININA ES TÓXICA CUANDO SE USA UN INHIBIDOR DE CAROTENOGÉNESIS.

Se llevaron a cabo experimentos donde se utilizó un inhibidor de la carotenogénesis, un compuesto llamado mevinolin o 6- α -metilcompactin monacolin-K SIGMA (An, et al., 1989) La concentración del mevinolin fue de 20 $\mu\text{g/ml}$. Se probaron diferentes condiciones, la primera con la adición del inhibidor al tiempo cero en presencia y ausencia de arginina y la segunda con la adición del inhibidor a las 24 horas en presencia y ausencia de arginina, la cual también fue adicionada en la hora 24. El ensayo se realizó durante 168 h, por triplicado. Cuando el inhibidor se adicionó al tiempo cero, el crecimiento se abate (Fig. 7.26) y esto es debido a que al actuar el mevinolin al nivel de la hidroximetilglutaril CoA reductasa, está también inhibiendo la producción de muchas otras moléculas vitales para el crecimiento de la levadura, tal es el caso del colesterol, el cual es componente integral de las membranas y su ausencia provoca que éstas pierdan estabilidad y estructura, pueda llegar incluso a existir muerte celular (Nelson, et al., 2001).

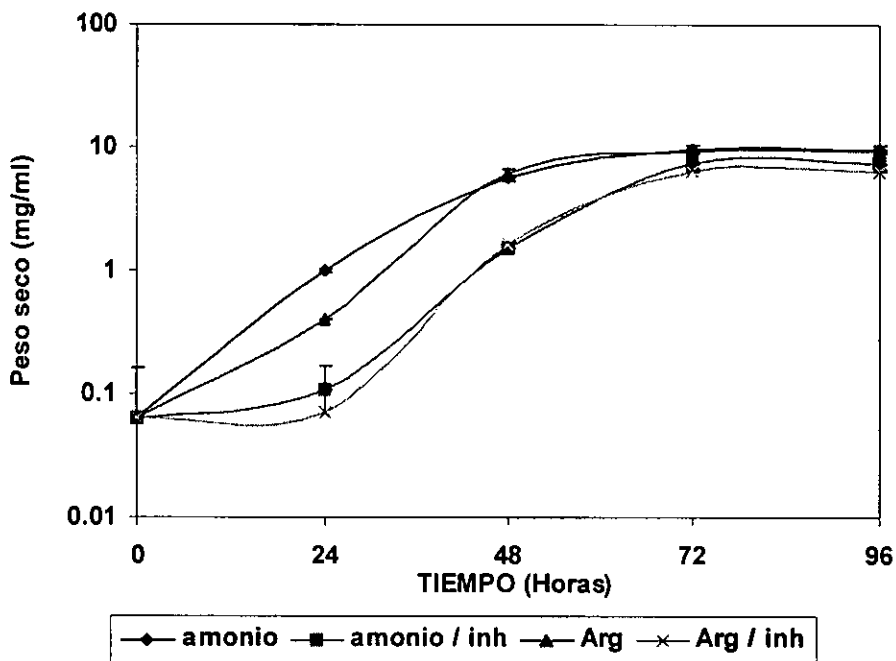


Fig. 7.26 Cinética de crecimiento de *P. rhodozyma* cultivada en presencia y ausencia de un inhibidor de carotenogénesis, en un medio químicamente definido con 10 mM de arginina o 10 mM de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Tanto el inhibidor como las fuentes de nitrógeno fueron adicionadas al inicio de la fermentación.

La producción de carotenoides en presencia de arginina reporta valores más altos con respecto a los valores obtenidos en presencia de amonio (Fig. 7.27), ahora bien, cuando se adicionó el inhibidor podemos ver que en el caso del cultivo con arginina los valores son muy bajos y no es sino hasta después de las 96 horas cuando se observa una mayor acumulación, no obstante no alcanza los mismos niveles de producción del cultivo con amonio.

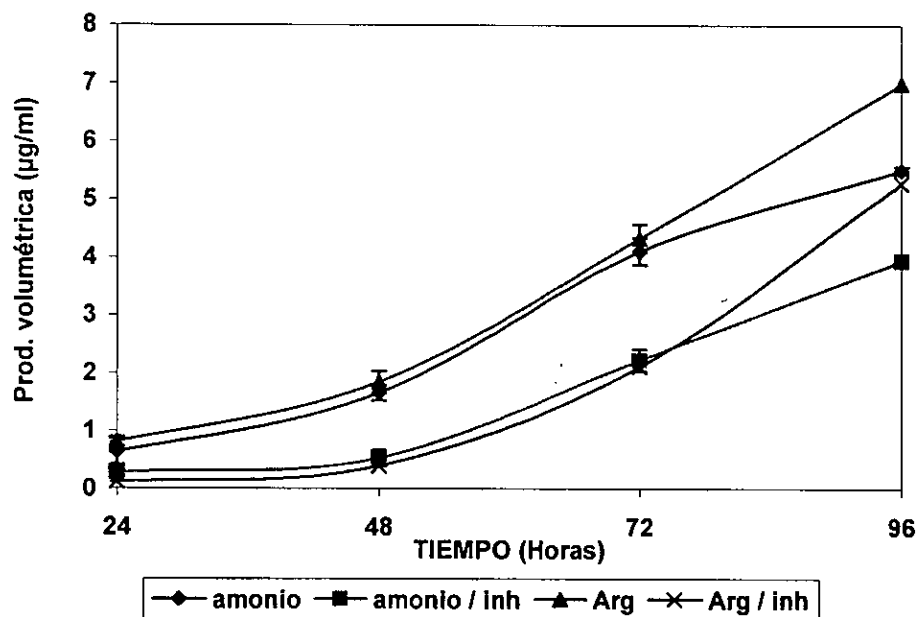


Fig. 7.27 Producción volumétrica de carotenoides por *P. rhodozyma* cultivada en presencia y ausencia de un inhibidor de carotenogénesis, en un medio químicamente definido con 10 mM de arginina o 10 mM de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Tanto el inhibidor como las fuentes de nitrógeno fueron adicionadas al inicio de la fermentación.

Esto se puede analizar mejor si observamos la producción específica (Fig. 7.28). Aun cuando *P. rhodozyma* crece prácticamente igual, a partir de las 72 h la producción es mucho más baja en presencia de Arg + inhibidor. Esto parece deberse a que la arginina no ejerce ninguna estimulación pues en las primeras etapas es metabolizada por la arginasa y en la hora 72, que es cuando parece que el inhibidor ha dejado de ejercer su efecto ya se habría consumido el aminoácido y por tanto no habría producción de NO ni efecto positivo sobre la biosíntesis de carotenoides.

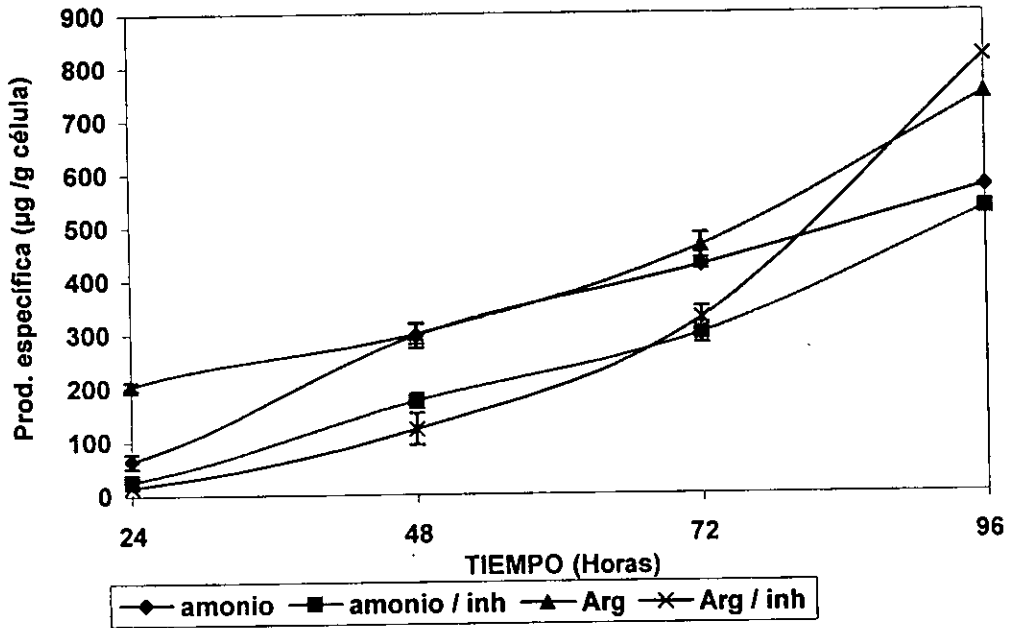


Fig. 7.28 Producción específica de carotenoides por *P. rhodozyma* cultivada en presencia y ausencia de un inhibidor de carotenogénesis, en un medio químicamente definido con 10 mM de arginina o 10 mM de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Tanto el inhibidor como las fuentes de nitrógeno fueron adicionadas al inicio de la fermentación.

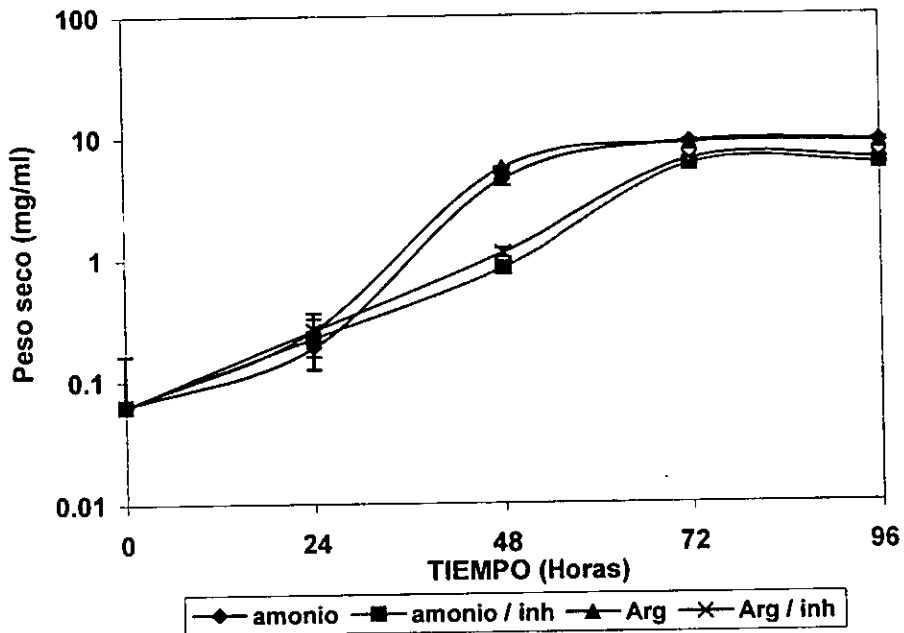


Fig. 7.29 Cinética de crecimiento de *P. rhodozyma* cultivada en presencia y ausencia de un inhibidor de carotenogénesis, adicionado a las 24 h de cultivo, en un medio químicamente definido con 10 mM de arginina o 10 mM de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

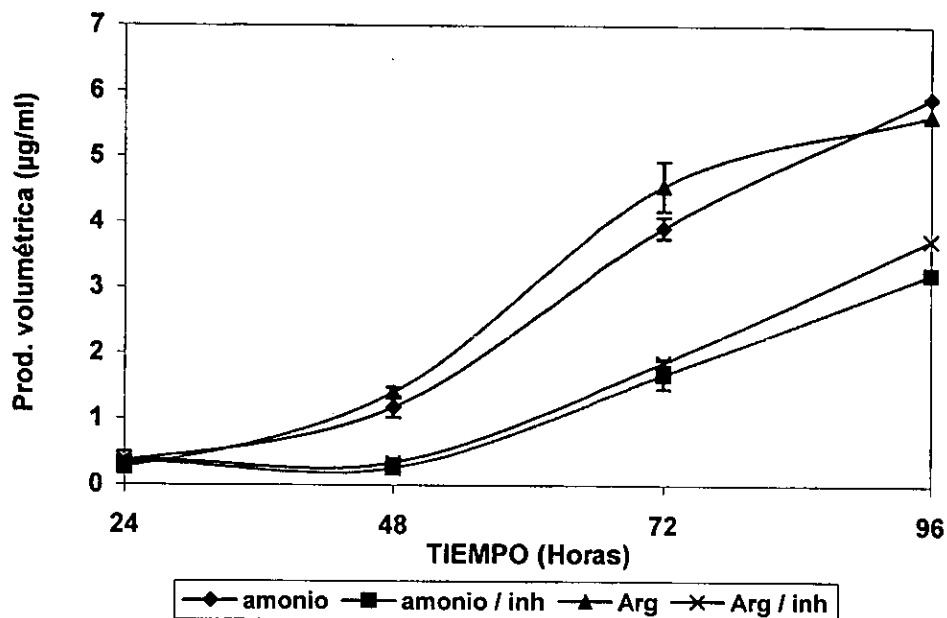


Fig. 7.30 Producción volumétrica de carotenoides por *P. rhodozyma* cultivada en presencia y ausencia de un inhibidor de carotenogénesis, adicionado a las 24 h de cultivo, en un medio químicamente definido con 10 mM de arginina o 10 mM de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

Al mismo tiempo se realizaron otros ensayos, donde se adicionaron tanto las fuentes de nitrógeno, como el inhibidor a las 24 h, donde aseguramos que ya se encuentra la levadura en fase logarítmica de crecimiento y donde inicia la síntesis de carotenoides. Por tanto el crecimiento (Fig. 7.29) aun cuando se abate no está muy por debajo de los máximos de crecimiento de los controles.

Podemos observar que la acumulación de carotenoides en presencia de un inhibidor adicionado a las 24 h (Figs. 7.30 y 7.31), es mayor que cuando se adiciona al inicio (lo que se correlaciona muy bien con el aumento en el crecimiento). Esto es debido a que el inhibidor actúa a nivel de la parte inicial de la vía del mevalonato, por lo cual aun cuando al ser adicionado a la hora 24 ejerce un efecto, éste no es tan marcado ya que las enzimas de la vía carotenogénica ya están preformadas y la levadura puede continuar con la síntesis.

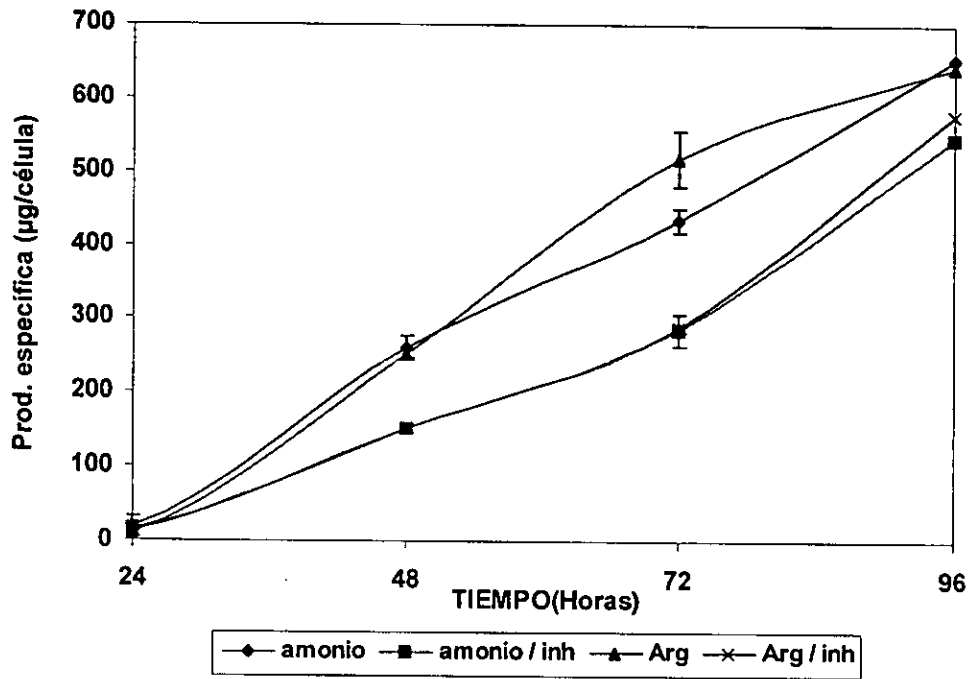


Fig. 7.31 Producción específica de carotenoides por *P. rhodozyma* cultivada en presencia y ausencia de un inhibidor de carotenogénesis, en un medio químicamente definido con 10 mM de arginina o 10 mM de sulfato de amonio.

7. 10 EL SNP: UN DONADOR DE ÓXIDO NÍTRICO.

Existen diferentes sustancias capaces de generar o donar una molécula de óxido nítrico (NO), tal es el caso del nitroprusiato de sodio (SNP, nitrosilcianoferrato (III) de sodio, $C_5FeN_6Na_2O$), una sal de cristales transparentes color rojo rubí prácticamente inodora, soluble en agua.

En el medio de cultivo se permitió el crecimiento de la levadura por 24 h, tiempo en el cual se le adicionó SNP en diferentes concentraciones (0.1, 0.5 y 1.0 mM) de acuerdo con Membrillo et al., (2000) donde describe que estas son las condiciones ideales para ver el efecto de SNP sobre la defensa de *E. coli* al estrés oxidativo. Las células se cultivaron en el medio químicamente definido con una concentración 10 mM de sulfato de amonio, ya que sabemos que bajo estas condiciones la levadura reporta buen crecimiento y producción de carotenoides, por tanto también se incluyó un control a esta concentración de amonio.

Hasta las 24 horas el crecimiento es similar (Fig. 7.32) ya que todos los cultivos habían sido tratados igual. Apartir de esta hora se observan diferencias en el crecimiento, siendo éste menor en las condiciones con SNP.

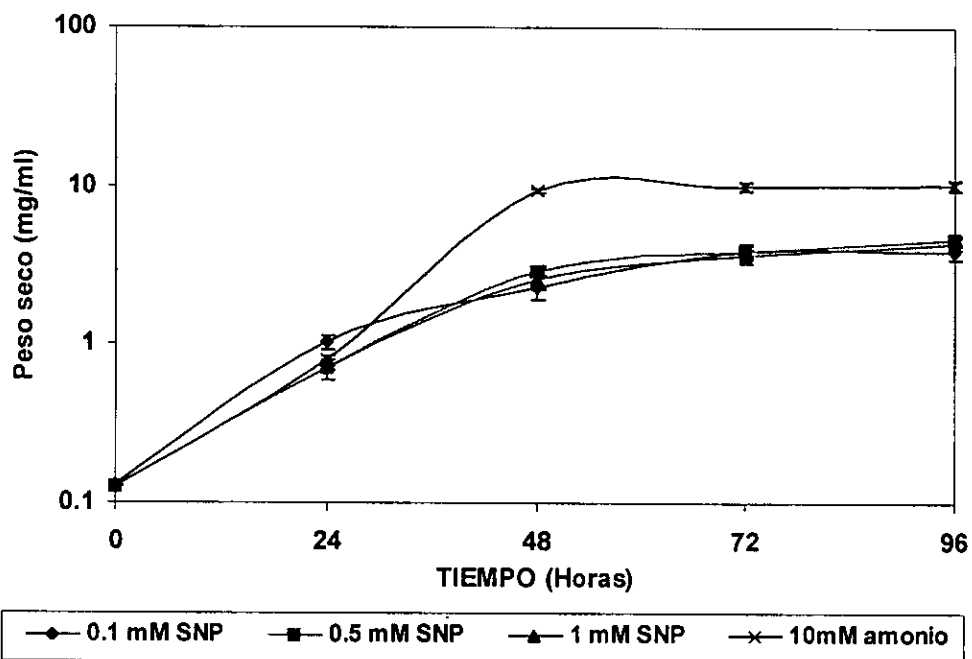


Fig. 7.32 Cinética de crecimiento de *P. rhodozyma* cultivada en un medio químicamente definido con 10 mM de amonio como fuente de nitrógeno y 0.1, 0.5 y 1.0 mM de SNP, un donador de NO, adicionado a las 24 h.

En las tres condiciones con SNP se observa un crecimiento muy similar esto se debe probablemente a que la sal está provocando inhibición en el crecimiento y por tanto éste es un 30% menor con respecto al control.

La producción volumétrica (Fig. 7.33) presenta una acumulación de carotenoides, en el caso de las condiciones que tienen SNP, siendo ligeramente mayor en el caso de 0.1 mM, aun así son mucho menores si se comparan con el control, el cual tiene poco más del doble que éstas.

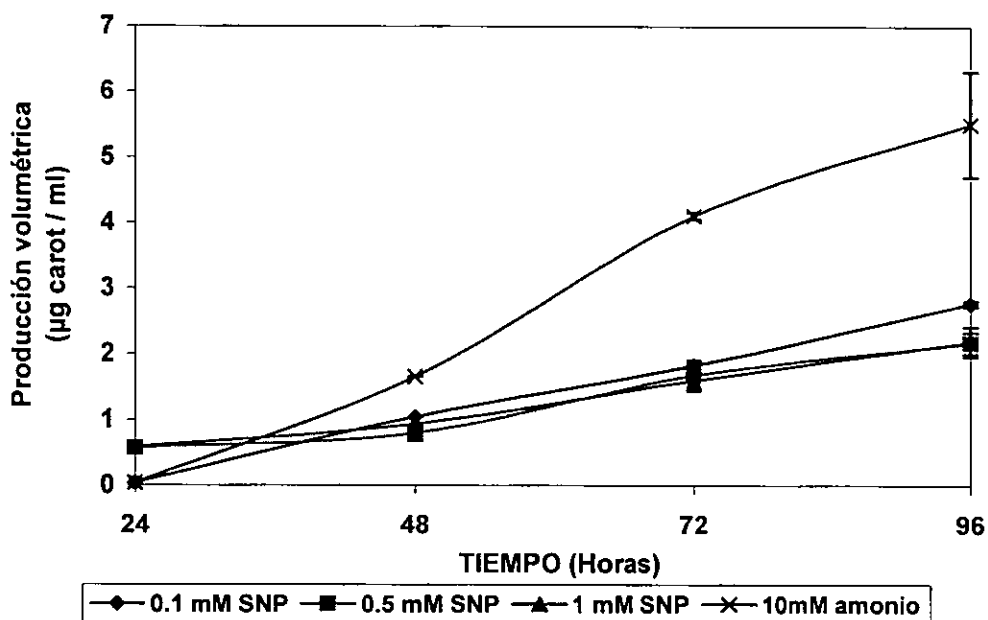


Fig. 7.33 Producción volumétrica de carotenoides en *P. rhodozyma* cultivada en un medio químicamente definido con 10 mM de amonio como fuente de nitrógeno y 0.1, 0.5 y 1.0 mM de SNP, un donador de NO, adicionado a las 24 h.

Ahora bien, si se hace la comparación tomando en cuenta la producción específica (Fig. 7.34) nos damos cuenta que el panorama cambia. Esto es, si comparamos la producción en los cultivos con 0.5 y 10 mM de SNP, con respecto al control 10 mM de amonio, observamos que los valores son muy semejantes (en µg de carotenoides/ g de célula: 474.28 y 500.63 contra 542.82 respectivamente) lo que significa que no hay ninguna inducción sobre la producción de carotenoides o simplemente no se aprecia debido a que como hay muerte celular, la levadura apenas y puede mantenerse, produciendo y acumulando la misma cantidad de carotenoides. En cambio, si comparamos la condición que tiene 0.1 mM de SNP contra el

control, observamos que la producción es mayor en el primer caso, alcanzando una acumulación máxima a las 96 horas con valores de 707.63 μg de carotenoides/g de célula, es decir, aproximadamente un 33% más.

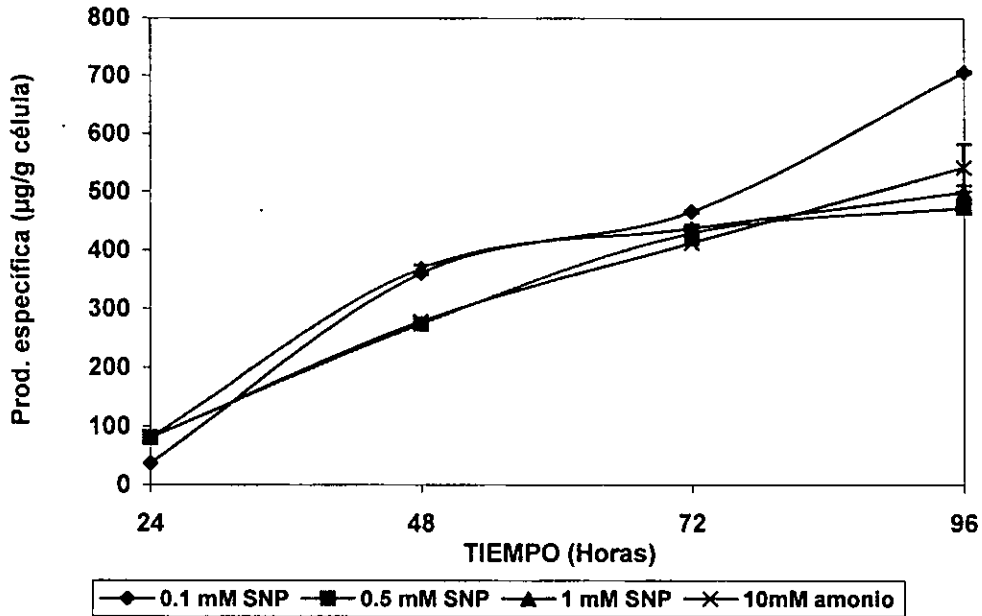


Fig. 7.34 Producción específica de carotenoides en *P. rhodozyma* cultivada en un medio químicamente definido con 10 mM de amonio como fuente de nitrógeno y 0.1, 0.5 y 1.0 mM de SNP, un donador de NO, adicionado a las 24 h.

Los valores arriba mencionados son comparables con la producción de un cultivo que es crecido en presencia de 10 mM de arginina, aun cuando el crecimiento está muy por debajo de esta condición.

Estos resultados sugieren que el SNP, en una concentración 0.1 mM, sirve como generador de NO, el cual provoca estrés oxidativo en la célula y ésta, en respuesta, genera una mayor cantidad de carotenoides.

8. DISCUSIÓN

8.1 CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES DE *P. rhodozyma* CULTIVADA EN UN MEDIO QUÍMICAMENTE DEFINIDO ADICIONADO CON SULFATO DE AMONIO.

A pesar de que el nitrógeno no es un precursor directo en la síntesis de carotenoides, en diversos estudios se ha encontrado que la limitación de este nutriente dispara el metabolismo secundario incluyendo la síntesis de carotenoides. Esto fue observado por Flores-Cotera, (2001) quien demostró que en el medio químicamente definido empleado en este estudio la disminución de nitrógeno de 61 a 18.6 mM aumentó el contenido de astaxantina en las células, a expensas de una baja en la concentración de proteína extracelular. Basados en estos hechos, se establecieron en este trabajo condiciones para el crecimiento de la levadura en una fuente de nitrógeno inorgánica. La concentración óptima de sulfato de amonio para el crecimiento de *P. rhodozyma* es de 20 mM. En cuanto al valor de pH en el medio de cultivo se ha reportado que solo los valores iniciales del pH en el medio de cultivo afectan el crecimiento y la producción de carotenoides, siendo el óptimo: 4.5, mientras que valores superiores a 6.5 o inferiores a 3.5 afectan significativamente estos parámetros (Johnson and Lewis, 1979). En nuestro caso, vemos que el pH inicial es el mismo (5.0) a pesar de usar diferentes concentraciones de sulfato de amonio, excepto en la condición sin amonio. En todos los casos, sin tomar en cuenta la condición 0 mM de amonio, se observa la misma tendencia y en cuanto mayor es la concentración de sulfato de amonio mayor es la caída del valor de pH, hasta ser alrededor de 2, en el caso de 200 mM y esto es debido a la presencia de la base conjugada. Es decir, cuando se tiene una sal como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en solución (como el medio de cultivo), los iones están dispersos y la célula incorporará al citoplasma lo que necesita, ahora, tomando en cuenta que la composición de una célula típica es de C= 48%, N=6%, P=2.5%, S=0.3%, Mg=0.2%, Ca=0.5%, Fe=0.22%, Cu=0.01%, Mn=0.005% (Madigan, et al., 1998) vemos que la célula utilizará más nitrógeno que azufre, por tanto el azufre remanente, que se encuentra en forma de iones SO_4^{2-} , quedará en el medio y podrá interactuar con las moléculas de agua (H_3O^+ , OH^-) formando HSO_4^- que es el responsable de que el pH del medio de cultivo de *P. rhodozyma* caiga.

En cuanto a la producción de pigmentos podemos confirmar lo propuesto por (Johnson and Lewis, 1979) pues los resultados muestran que la carotenogénesis está asociada al crecimiento a pesar de que no coincide exactamente con un incremento en la biomasa, es decir, en cuanto mayor es el crecimiento mayor es la producción hasta llegar a la máxima acumulación en 20 mM de amonio, mientras que en 200 mM la producción no es tan alta debido a que, aun cuando el crecimiento si es mayor ya no puede existir más acumulación, probablemente por el efecto de retrorregulación por producto final encontrado por Johnson and Schroeder (1995).

8.2 ALGUNOS AMINOÁCIDOS ESTIMULAN EL CRECIMIENTO Y LA CAROTENOGÉNESIS EN *P. rhodozyma*.

Encontramos que en una fuente de nitrógeno orgánica, el crecimiento de *P. rhodozyma* es ligeramente mayor que en amonio, lo cual concuerda con lo que se ha reportado en diferentes organismos. En organismos carotenogénicos la presencia de aminoácidos como Met, Val, Gly, Trp, Phe, Tyr y Leu parecen estimular la producción de estos pigmentos (Bramley and Mckenzie, 1988). Así, las producciones volumétrica y específica observadas en las gráficas 7.4 y 7.5 nos muestran que a las 48 h la acumulación de carotenoides es mayor en los controles 8 y 10 mM de amonio que en los tratamientos con aminoácidos, excepto en la condición 5. En cambio a las 96 h todos los tratamientos, con excepción del 3 y 6, superan los valores de producción encontrados en los controles. Al analizar la matriz 5X4 observamos que las combinaciones 3 y 6 tienen un aminoácido en común, la cisteína, aminoácido azufrado que según se reporta es difícil transportar al interior de la célula, por tanto, se podría suponer que esa es la razón por la cual en estos tratamientos se reporten no solo bajas producciones sino también bajos crecimientos, ya que la levadura se encuentra limitada por la fuente de nitrógeno.

Cabe mencionar que estos resultados difieren de lo encontrado por Meyer y du Preez (1994b), quienes utilizaron en sus estudios una cepa mutante de *P. rhodozyma* y encuentran que los coeficientes de rendimiento celular en presencia de 75 mM de alguna fuente de nitrógeno, fueron similares para todas las fuentes, excepto para Val y Leu que reportaron valores muy bajos y citrato de amonio que reportó el valor más alto.

Contrariamente, Nelis and De Leenheer (1989) reportaron que Leu y Val estimulan la producción de carotenoides en hongos. Mientras que nosotros encontramos que estos

aminoácidos también estimulan la producción de astaxantina en *P. rhodozyma* pero sin alcanzar valores tan altos como pudiera haberse esperado si es que una alta proporción o incluso la totalidad del aminoácido adicionado fuera canalizado por la célula para producir el intermediario que finalmente llevaría a la formación de carotenoides.

En estudios más recientes realizados por An (2001) se analiza la producción de carotenoides y la biomasa de una cepa silvestre de *P. rhodozyma* en un medio complejo YTB suplementado con grupos de aminoácidos. Este autor reporta que con la combinación de Asp, Asn, Glu, Gln y Pro se logra incrementar la biomasa pero no así la producción de carotenoides. Ensayando los aminoácidos por separado encuentra el mismo efecto, por lo cual concluye que esta cepa parece ser deficiente en la mitocondria y por tanto, al suplementar el medio con catabolitos relacionados con el ciclo de los ácidos tricarbóxicos se estimula el crecimiento. Es decir, no se encuentra coincidencia con los resultados mostrados en este trabajo, más que con el hecho de que tanto Pro como Glu pueden aumentar la biomasa celular, pero esto probablemente se deba a que se utilizó un medio complejo en los trabajos de An (2001).

Ahora bien, en el presente estudio se probó el efecto individual de los aminoácidos Val, Leu, Pro, Cys, Arg y Glu; sobre la síntesis de carotenoides (Tabla 7.2) seleccionándose al compuesto que presentó mayor efecto positivo (Arg) para caracterizar su efecto y buscar establecer su mecanismo de acción.

8.3 LA ARGININA NO ES UTILIZADA COMO BLOQUE DE CONSTRUCCIÓN DE CAROTENOIDES.

En levaduras oleaginosas, cuando la fuente de nitrógeno de su medio de cultivo se depleta, la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos cesa, pero el exceso de carbono continua su metabolismo y todas las rutas anabólicas se dirigen hacia la síntesis de lípidos. Bajo las mismas condiciones las levaduras no oleaginosas no acumulan lípidos.

Una hipótesis que explica este fenómeno (Botham and Ratledge, 1979) establece que el citrato intramitocondrial, intermediario clave en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, se acumula primariamente debido al decremento de la concentración de AMP intracelular lo que lleva a una disminución en la actividad de la NAD⁺ isocitrato deshidrogenasa dependiente de AMP, en la mitocondria.

El citrato es transportado a través de la membrana mitocondrial intercambiándose por L-malato y se rompe en el citosol por la ATP-citrato liasa para producir acetato y oxalacetato, el acetato se utiliza para la síntesis de acetil coenzimaA, precursor de los ácidos grasos y sus derivados, entre ellos los carotenoides. Además, el citrato está involucrado en la biosíntesis de ácidos grasos como un activador alostérico de la acetil-CoA carboxilasa y en la glicólisis como un efector alostérico de la fosfofructocinasa.

Muchas especies de levaduras y un número grande de hongos pueden acumular hasta 70% de su biomasa como lípidos cuando son cultivados en un exceso de carbono y un déficit de nitrógeno. Bajo esas condiciones, tanto en cultivos batch como continuos, la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos se detiene mientras que la síntesis de lípidos continua a una velocidad normal y por tanto la concentración de lípidos aumenta con respecto a la biomasa total. Bajo las mismas condiciones de crecimiento, los organismos no oleaginosos no acumulan lípidos. Por ejemplo: *Candida utilis* no contiene más del 7- 8% de su biomasa como lípidos aun en las condiciones de crecimiento más propicias (Evans and Ratledge, 1984).

Se ha reportado que en algunas levaduras se producen concentraciones de lípidos más altas cuando crecen con una fuente orgánica de nitrógeno que cuando crecen con una fuente inorgánica. Cuando se cultiva *Rhodospirium toruloides* en tartrato de amonio produce 25% más de lípidos (w/w), mientras que en fuentes orgánicas de nitrógeno produce 40% más (Botham and Ratledge, 1979). Para tratar de explicar este fenómeno Botham and Ratledge midieron la actividad específica de 15 enzimas en la célula de cultivos crecidos en fuente orgánica e inorgánica con el fin de determinar si existía alguna diferencia obvia en las rutas del catabolismo de glucosa y en el metabolismo del citrato lo que podría ser causante de la diferencia del contenido de lípidos en la célula, sin embargo no se vio ninguna variación significativa de la actividad de ninguna enzima. Además se midieron metabolitos intermediarios. La diferencia más significativa entre los dos cultivos fue el contenido de amonio intracelular. Al principio las células que crecieron en cloruro de amonio tenían un alto contenido de amonio pero después disminuyeron, en cambio con ácido glutámico el amonio aumenta hasta después de 30 h, esto se atribuye a un rápido rompimiento de ácido glutámico dentro de la célula debido a que los patrones de acumulación de amonio y α -cetoglutarato en estas células son similares y concuerdan con la desaparición de glutámico. Se pensó entonces que la acumulación de lípidos era debido al glutámico *per se* o a algún intermediario de su catabolismo. Ahora si todo el carbono del glutámico se metabolizara a

lípidos solo alcanzaría para aproximadamente 1 g de lípidos (menos del 20% de los lípidos totales que se han encontrado cuando se cultiva a la levadura en una fuente orgánica de nitrógeno). La adición de U-¹⁴C glutámico mostró que sus carbonos si se metabolizaban a lípidos pero no totalmente (27% del carbono de glutámico se encontró en lípidos). Sin embargo, con solo una incorporación parcial de los átomos de carbono del glutámico a los lípidos, era aparente que el incremento en la concentración de lípidos se debía a la actividad metabólica incrementada causada indirectamente porque el glutámico estaba siendo usado como fuente de nitrógeno más que como precursor directo de lípidos (Botham and Ratledge, 1979).

Basados en estos hechos se cultivó a *P. rhodozyma* en presencia de ¹⁴C-Arginina. El experimento se realizó adicionando ¹⁴C-Arg al medio de cultivo desde el inicio de la fermentación, los primeros resultados demostraron una pobre incorporación de la marca en los carotenoides. En un experimento más detallado se midieron los porcentajes de incorporación no solo a los carotenoides sino a la célula completa, así como el porcentaje que no se incorporó a ésta (remanente en el medio de cultivo) Además se agregaron dos controles de metabolitos marcados (¹⁴C-Glucosa, ¹⁴C-Glutámico) con el fin de establecer si el método que utilizamos era el correcto y en realidad la célula incorporaba eficientemente a la ¹⁴C-Arg. Así nos dimos cuenta que solo alrededor del 1% de los carbonos de arginina sirve como bloque de construcción para las unidades isoprenoides de los carotenoides, aun cuando el 91% de la arginina es incorporada a la célula. Es decir, la Arg no está siendo utilizada como fuente de carbono en la acumulación de carotenoides por *P. rhodozyma*.

Esto se compara con el 8% de carbonos de la glucosa que se incorporan a carotenoides aun cuando solo el 65% de esta glucosa entra a la célula y con el 2% para el caso del glutámico. Esto se correlaciona con lo encontrado por Botham and Ratledge (1979), es decir, en un organismo oleaginoso como *P. rhodozyma* los aminoácidos, y en este caso la arginina, se catabolizan como una fuente de nitrógeno que le permite crecer y realizar sus funciones metabólicas normales tales como la carotenogénesis, pero esto no significa que por tanto deba haber una orientación preferencial de los esqueletos carbonados de los aminoácidos hacia la formación de estos carotenoides, como ya ha quedado demostrado, sino que seguramente entrarían al ciclo del ácido cítrico y de ahí se oxidarían para producir energía química o se canalizarían hacia la gluconeogénesis como generalmente ocurre en la mayoría de los organismos. Aunque en realidad sospechábamos que parte de esa arginina que se

incorporaba podría estar sufriendo otro proceso catabólico y esto fue lo que se intenta explicar en los siguientes apartados de la discusión.

8.4 EL METABOLISMO DE ARGININA, UNA DE LAS RUTAS.

La arginina puede ser catabolizada a ornitina y urea por la actividad de la enzima arginasa: Después de varios pasos enzimáticos la ornitina se convierte en glutamato, mientras que la urea es escindida en dos moléculas de amonio y una de bióxido de carbono (Eddy, 1980); Hofman-Bang, 1999). Como se puede ver ambos metabolitos pueden ser usados como fuentes de nitrógeno individuales.

Por tal motivo se supuso que alguno de estos intermediarios podría ser responsable del efecto estimulador que la Arg presentaba sobre la producción de carotenoides.

En el cultivo de urea se ve que *P. rhodozyma* no crece tan bien en esta fuente de nitrógeno (pero si mejor que en 20 mM de amonio), lo que indica que, a pesar de que está reportado que esta levadura tiene actividad ureasa (Miller, 1976) ésta puede no ser muy alta o tal vez el sistema de transporte no sea muy bueno, ya que incluso se observa que la velocidad de crecimiento de *P. rhodozyma* en presencia de urea es más lenta que las demás condiciones, aunque al final alcanza una buena concentración celular. A pesar de que en esta fuente había crecido mejor, la producción de carotenoides es mayor en 20 mM de amonio.

En presencia tanto de ornitina como de la combinación ornitina/urea, el crecimiento es similar a la condición con Arg, lo que nos haría pensar que la ornitina es la responsable del efecto positivo. En otras palabras esto significaría que la ornitina también estimula la producción de carotenoides como en el caso de los otros aminoácidos: Pro, Val, Leu, Glu y por supuesto Arg. Sin embargo aun cuando esto podría explicar la estimulación de la Arg decidimos buscar una explicación alternativa para dilucidar la acumulación de carotenoides en presencia de este aminoácido.

8.5 EL SISTEMA DE CÉLULAS EN REPOSO, ESTRATEGIA PARA DIFERENCIAR ENTRE UNA INDUCCIÓN Y UNA ACTIVACIÓN.

Un SCR nos permite conocer indirectamente si el efector seleccionado estimula o no la producción del metabolismo de interés a través de una inducción o represión en la síntesis de las proteínas de la vía o de una activación o inhibición de las enzimas biosintéticas.

Ahora bien, para entender y poder analizar los resultados obtenidos con este sistema, es necesario explicar la estrategia que se siguió para dilucidar entre una inducción y una activación. En el siguiente esquema (Fig. 8.1) se muestran las cuatro condiciones que se ensayaron. En el MB (medio base o químicamente definido) al cual le fue adicionada 10 mM de Arg (c/Arg) o 10 mM de amonio (s/Arg), se permitió el crecimiento por 40 h para asegurar que las enzimas carotenogénicas ya estuvieran sintetizadas (pues según experimentos previos a partir de las 24 h se observa producción de carotenoides) y después se lavaron las células y se transfirieron al medio químicamente definido sin fuente de nitrógeno ni carbono y en dos condiciones se añadió Arg al medio. Cada una de las condiciones tenía su control con cicloheximida lo que aseguraba que no hubiera crecimiento ni síntesis de proteínas en el SCR de lo contrario esto nos indicaría que el resultado que observábamos era falso.

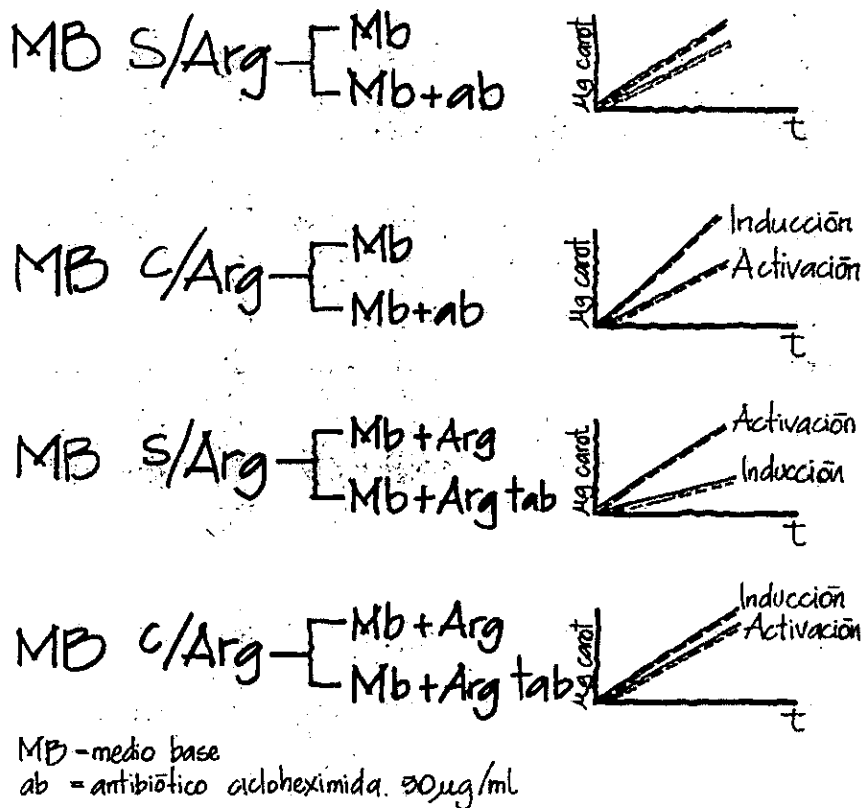


Fig. 8.1 Condiciones utilizadas en el SCR, donde se indica cada una de las posibles respuestas (representadas gráficamente) del efecto de la Arg sobre la carotenogénesis en *P. rhodozyma*. Con este SCR se puede conocer si el efecto es debido a una inducción o una activación.

Para analizar los resultados se deben comparar todas las condiciones. Las condiciones donde no se añadió el efector al inicio (condiciones 1 y 3) no deberían de mostrar ningún efecto si es que se tratase de una inducción y por tanto, la pendiente de la curva de producción de carotenoides sería la misma en ambos casos. Mientras que, si se tratara de una activación, a pesar de que el efector no estuviera presente en un inicio no importaría, porque al compararse ambas condiciones se vería que en la condición 3, a la cual se le añade el efector cuando las células están en el SCR, aumentaría la producción de carotenoides, es decir, tendría una pendiente más pronunciada que en la condición 1 donde no hubo adición, puesto que las enzimas que ya habían sido sintetizadas se activarían en presencia de Arg.

Por otro lado, en las condiciones 2 y 4 se añadió el efector desde el inicio, por lo que, si se tratara de una inducción, al momento de cambiar las células al SCR se esperaría que el valor de producción fuera numéricamente mayor con respecto a las condiciones 1 y 3, pero con la misma tendencia, esto significa que la pendiente no cambiaría porque la Arg no podría ejercer su efecto inductorio pues en el SCR no hay posibilidad de sintetizar nuevas proteínas. Por el contrario, si se tratara de una activación los sistemas donde se adicionó Arg tendrían valores de producción mayores.

Como era de esperarse los controles con cicloheximida fueran muy parecidos, prácticamente iguales, a cada una de sus respectivas condiciones lo que nos aseguró (junto con el nulo crecimiento de la levadura) que el SCR funcionó eficientemente.

En cuanto a la producción se compararon en las gráficas las condiciones sin y con adición de Arg es decir, las condiciones 1 y 2 y 3 y 4. Se observa que las curvas de producción inician con valores diferentes, siendo más alta el de la condición a la cual se le adicionó arginina desde el inicio (cond. 2). En cambio las condiciones a las cuales se les adicionó Arg al SCR se observó la misma pendiente. Incluso los valores son muy similares tanto en las condiciones 1 y 3 como 2 y 4 lo que indica que no se trata de una activación. Con todo esto se pudo inferir que la Arg, a través de un mecanismo todavía no dilucidado (pero que más adelante se propone), influye para que las células de *P. rhodozyma* sinteticen en mayor cantidad las enzimas carotenogénicas y por tanto se aprecie un aumento en la producción de carotenoides.

En otras palabras, los resultados del SCR sugieren que el efecto estimulador de la Arg es debido a una inducción más que a una activación.

8.6 UNA EXPLICACIÓN PARA LA ACUMULACIÓN DE CAROTENOIDES EN *P. rhodozyma* CULTIVADA CON ARG (LA PRESENCIA DE NOS).

Buscando otras posibles explicaciones de como la arginina podía ser metabolizada, encontramos que en células de mamíferos este aminoácido puede ser atacado en su grupo guanidino por el oxígeno molecular, a través de la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), para formar citrulina y óxido nítrico (NO), el cual es considerado como una especie de oxígeno reactiva (EOR), ahora sabemos que diversas EORs poseen un papel muy importante en procesos biológicos, tan fundamentales como la proliferación celular, la diferenciación celular y la muerte celular programada (Buttke, et al., 1994). El NO es sintetizado por un gran número de células para realizar una serie de funciones fisiológicas variadas, entre las que se encuentran: la regulación del tono vascular, la regulación de la neurotransmisión y la participación en la inmunidad no específica, además de ser citotóxico para algunas células tumorales (Hernández, 1996). Las células del sistema inmune (macrófagos) lo producen para combatir a patógenos invasores y/o células tumorales. Debido a que NO posee un electrón desapareado y es un radical libre, es capaz de reaccionar con el O_2 y el H_2O_2 para producir dióxido de nitrógeno (NO_2) y trióxido de dinitrógeno (N_2O_3). Se cree que el primero es responsable de iniciar la peroxidación de lípidos y causar el rompimiento de cadenas de DNA (Tamir, et al., 1996). Las especies nitrosantes como N_2O_3 pueden reaccionar con tioles o aminas para alterar proteínas, formar nitrosaminas cancerígenas o bases de DNA deaminadas (Gorde, 1998). El NO también puede reaccionar con O_2^- y formar peroxinitrito $-OONO$ este es un agente oxidante muy potente de uno o dos electrones que puede reaccionar con un número muy grande de compuestos celulares (tioles, lípidos, cluster Fe-S de proteínas y residuos de proteínas) (Beckman, et al. 1996; Bartosz, 1996).

En microorganismos solo se conocen algunos reportes de la existencia de la enzima NOS y por tanto de la producción de NO. Entre ellos están: la identificación de NOS en *Staphylococcus aureus* a través de un análisis por Western blot y la detección de NO por medición directa (Choi, et al., 1997). En la micobacteria *Nocardia sp.* se purificó parcialmente la NOS encontrándose que era dependiente de NADPH, Ca^{2+} , FAD, FMN, y H_4B , demostrando de esta manera que tiene requerimientos de cofactores similares a la NOS de neutrófilos (Chen, et al., 1994). También se encontró que cultivos de *Helicobacter pylori*, de

pacientes con úlcera duodenal, expresaban inmunorreactividad inducible de NOS *in vivo* e *in vitro*. (Stachura, et al., 1996). Sin embargo, la razón de la existencia de NOS en bacterias se desconoce, aunque se cree que tiene un papel fisiopatogénico importante en la infección en humanos. Recientemente se reportó la existencia de una NOS constitutiva de 60 kDa en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, a través de un Western blot usando un anticuerpo monoclonal de ratón contra NOS anti-neuronal. Tampoco en este caso se conoce exactamente cual es la función del producto de esta enzima [NO] en esta levadura, aunque se sospecha que puede tener un papel de defensa contra los demás habitantes de su nicho ecológico (Kanadia, et al., 1998).

Ahora bien, se sabe que en general las células de levadura tienen varios mecanismos de defensa contra el ataque de EORs. Entre ellas se encuentran la catalasa, la superóxido dismutasa y los niveles de glutatión (Lapshina, et al., 1995) y solo unas cuantas como *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y *Phaffia* (Johnson, et al., 1991) son capaces de producir carotenoides, que inactivan 1O_2 , H_2O_2 , HO· y a otros oxidantes, mediante un proceso en el cual se transfiere la energía de altos niveles de excitación a un triplete del carotenoide. Éste puede regresar a su estado basal liberando calor, generando epóxidos o adicionando grupos hidroxilo a la molécula. En otros casos, los carotenoides pueden generar apocarotenoides o apocarotenales, con la consecuente modificación de la molécula original (Britton, 1985; Dimasio, et al., 1990; Karnaukhov, 1990).

Basados en estos hechos, se sospechó que la arginina podía estar provocando un estrés oxidativo en la célula, debido a la generación de NO y en respuesta ésta produciría una mayor concentración de carotenoides.

Así, se identificó la actividad enzimática de la NOS en los extractos enzimáticos de *P. rhodozyma*, tanto los que se cultivaron en presencia como en ausencia de arginina, esto sugiere que hay ciertos niveles basales y que la enzima puede inducirse, como se demuestra en la Fig. 6.24 donde se observa que los cultivos con arginina presentan un aumento del al rededor de 73% en su actividad (36 h de cultivo). Estos resultados concuerdan con los reportados en células de mamíferos, donde se han caracterizado tanto enzimas constitutivas como inducibles. Además, este efecto solo se observa con la arginina y no con ornitina ni con urea o ac. glutámico, es decir, solo con el inductor reportado.

Con este antecedente se realizó otro experimento más fino, donde se adicionó Arg a diferentes tiempos de la fermentación, ya que en experimentos previos se demostró que la

adición de arginina estimulaba la producción. Las adiciones se realizaron a las 24 h (ya se había establecido que aun cuando la adición se hiciera en tiempos tempranos de la fermentación, la producción iniciaba igualmente a las 24 h, 36 y hasta 48 h, donde todavía se aprecia una estimulación en la producción. En los 3 casos se observa la misma tendencia que en el primer experimento, solo que la curva de actividad se recorre y, en el caso de la adición a las 48 h, la actividad empezaba a decaer, pero se indujo una vez que la arginina estaba presente en el medio. Los valores de actividad son más altos y se alcanzan en tiempos menores que cuando la adición se realiza al inicio, porque en este caso la levadura ya se encuentra en fase exponencial de crecimiento.

Ahora bien, es importante mencionar que cuando *P. rhodozyma* se cultiva en presencia o ausencia de Arg, el aumento en la actividad enzimática de NOS no siempre es proporcional al aumento de la síntesis de carotenoides. Esto es debido a que las levaduras tienen varios mecanismos de defensa contra el ataque de EORs (Lapshina, et al., 1995).

8.7 OTRAS EVIDENCIAS DE LA EXISTENCIA DE NOS EN *P. rhodozyma*.

Ahora bien, sabemos que la enzima NOS requiere O_2 para llevar a cabo su actividad (Buttke, et al., 1994) por tanto se esperaba que en ausencia de este sustrato no existiera estimulación de la producción cuando se cultivara a la levadura en presencia de arginina, ya que esta no podría ser atacada por NOS y por tanto no se produciría el NO, el cual se cree es responsable de la estimulación de la biosíntesis de carotenoides como respuesta al estrés oxidativo generado por esta EOR, tal y como sucede en *E. coli* la cual responde a este tipo de estrés produciendo altos niveles de flavohemoglobina cuando NO está presente en el medio de cultivo (Membrillo, et al., 2000).

Como era de esperarse el crecimiento fue menor al reportado cuando *P. rhodozyma* se cultivó en aerobiosis y esto es debido a que el metabolismo de la glucosa en levaduras puede ocurrir de diferentes maneras:

- 1) Respiración aeróbica en presencia de oxígeno molecular dando como resultado un alto rendimiento celular.
- 2) Fermentación anaeróbica en ausencia de oxígeno dando como resultado un rendimiento bajo de ATP y biomasa, además de la formación de etanol y ácidos orgánicos como productos de fermentación.

- 3) Fermentación aeróbica en presencia de condiciones de cultivo totalmente aeróbicas y en altos niveles de azúcares metabolizables dando como resultado un rendimiento celular bajo y la formación de los productos de fermentación.

En la producción volumétrica observamos que los niveles fueron muy parecidos en ambas condiciones, en presencia de arginina se observaron valores ligeramente más altos, debidos probablemente a la existencia de una cierta cantidad de oxígeno intracelular que estaría provocando la producción de NO y por tanto la inducción de las enzimas de la vía. Sin embargo la producción específica cae abruptamente y esto es debido a que la levadura dirige todo su metabolismo hacia el crecimiento más que a la síntesis de metabolitos secundarios, en este caso, de carotenoides.

Con estos resultados pudimos comprobar la existencia de la enzima NOS en la levadura *P. rhodozyma* y la participación del oxígeno en la producción de NO, ya que no se observó estimulación de la producción de carotenoides en presencia de arginina y ausencia de oxígeno, ambos sustratos de NOS.

También se realizaron estudios con un inhibidor de carotenogénesis, el mevinolin. En el experimento se usó una concentración baja de inhibidor (20 µg/ml) así como dos tiempos de adición (0 y 24 h) con el fin de visualizar resultados que solo pudieran ser causados por la supresión de la carotenogénesis y no por la muerte celular. Cuando el inhibidor se adicionó al tiempo cero el crecimiento, como era de esperarse, se abate, lo que indica que la Arg en realidad resulta tóxica para el crecimiento de la levadura además de que el mevinolin actúa a nivel de la hidroximetilglutaril CoA reductasa, por lo cual también inhibe la producción de muchas moléculas vitales para el crecimiento de *P. rhodozyma*, tal es el caso del colesterol, el cual es componente integral de las membranas y su ausencia provoca que éstas pierdan estabilidad y estructura, con la consiguiente muerte celular. En cambio, el crecimiento de la levadura cuando se adicionó el inhibidor a las 24 h se abate pero no está muy por debajo de los máximos de crecimiento de los controles.

Cuando analizamos las gráficas de producción de carotenoides observamos de manera clara que los cultivos con mevinolin tienen una baja de producción de carotenoides aunque al final se recuperan pues la acción del inhibidor se pierde. Resumiendo, la interpretación de estos resultados señala que al encontrarse la levadura en un medio de cultivo que contiene Arg y un inhibidor de carotenogénesis y si parte de este aminoácido se convirtió en NO y citrulina

esta EOR generaría un estrés oxidativo que la célula no podría anular por medio de la producción de carotenoides, por lo cual se observa un crecimiento menor de *P. rhodozyma* bajo estas condiciones.

8.8 LOS CAROTENOIDES PROTEGEN A *P. rhodozyma* CONTRA EL ESTRÉS OXIDATIVO GENERADO POR ÓXIDO NÍTRICO.

El último estudio que se realizó con el fin de comprobar la hipótesis de la acumulación de carotenoides por el metabolismo de la arginina, a través de la NOS, fue el uso de un donador de NO, la sal de nitroprusiato de sodio (SNP).

Membrillo y colaboradores (2000) encontraron que las condiciones ideales para ver el efecto de SNP sobre la defensa de *E. coli* al estrés oxidativo son la adición de 0.5 y 1.0 mM de esta sal al medio de cultivo. Sin embargo bajo estas condiciones hay una inhibición del crecimiento del 60% y una menor producción de carotenoides, por lo cual se optó por probar una condición con 0.1 mM de SNP. En esta condición observamos también un crecimiento bajo, pero en cambio la producción de carotenoides es 33% mayor que en la condición control. Lo cual sugiere una concentración 0.1 mM de SNP es suficiente para generar NO, y provocar una respuesta al estrés oxidativo a través de una producción incrementada de carotenoides.

Estos resultados concuerdan con el hecho de que la cadena poliénica de los carotenoides tienen la propiedad de ser antioxidante al actuar como *atrapadora* de EOR tales como: el peróxido de hidrógeno, el superóxido, el radical hidroxilo y especialmente el oxígeno en singulete (Hirayama, et al., 1994). Particularmente en *P. rhodozyma* se sabe que al ser deficiente en las enzimas encargadas de la eliminación de las EOR como la catalasa y la superóxido dismutasa, la acumulación de carotenoides compensaría la deficiencia de éstas enzimas (Schroeder and Johnson, 1995). Hasta el momento no se ha propuesto un modelo que indique el mecanismo bioquímico por medio del cual podría ocurrir la eliminación de NO en células de *P. rhodozyma*, por lo que el papel que los carotenoides pudieran jugar en este ámbito surge como una alternativa digna de ser estudiada.

9. CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluó el efecto que varias fuentes de nitrógeno tienen sobre el crecimiento y la carotenogénesis en la levadura *P. rhodozyma*. De los resultados podemos concluir que:

- ♣ La fuente de nitrógeno es un elemento muy importante en el crecimiento y la producción de carotenoides de la levadura *P. rhodozyma*, la cual es capaz de crecer en diferentes fuentes de nitrógeno, tanto inorgánicas como orgánicas.
- ♣ Los aminoácidos valina, leucina, prolina, glutámico y arginina estimulan el crecimiento y la producción de carotenoides en *P. rhodozyma*, mientras que la cisteína tiene un efecto negativo.
- ♣ La arginina es el aminoácido que presentó un mayor efecto estimulador sobre la producción de carotenoides (470 µg/g de células en un medio con 10 mM de arginina), en comparación con el control (230 µg/g de células en un medio con 10 mM de amonio).
- ♣ La adición de arginina entre las 0 y 48 h de fermentación afecta positivamente la producción de carotenoides.
- ♣ El esqueleto carbonado de la arginina no es utilizado como bloque de construcción para la síntesis de carotenoides en *P. rhodozyma*
- ♣ La ornitina tiene un efecto estimulador sobre la producción de carotenoides, sin embargo parece no ser la causa principal por la cual aumenta la síntesis de estos pigmentos en *P. rhodozyma* cuando la arginina está presente.
- ♣ Los resultados del sistema de células en reposo sugieren que la arginina actúa induciendo la formación de las enzimas de la vía de síntesis de carotenoides.

- ♣ Se sugiere que el aumento en la acumulación de carotenoides en células de *P. rhodozyma*, cultivadas en un medio con arginina como única fuente de nitrógeno, es debido a que este aminoácido provoca un estrés oxidativo en la célula, ya que su grupo guanidino puede ser atacado por una enzima llamada óxido nítrico sintasa, produciendo óxido nítrico y en respuesta, la célula activa la ruta biosintética de carotenoides como forma de defensa al medio ambiente oxidativo de su citoplasma.

10. REFERENCIAS

- Adrio, J.L., M. Veiga, J. Casqueiro, M. López and C. Fernández (1993) Isolation of *Phaffia rhodozyma* auxotrophic mutants by enrichment methods. *J Gen App Microbiol* , 39: 303-312
- An, G-H. (2001) Improved growth of the red yeast, *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*), in the presence of TCA intermediates. *Biotechnol Lett*, 23: 1005-1009
- An, G.-H., H. Bielich, R. Auerbach and E.A. Johnson (1991) Isolation and characterization of carotenoid hyperproducing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting. *Biotechnology* 9, 70-73
- An, G.-H. and E.A. Johnson (1990) Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 57:191-203
- An, G.-H., D.B. Schuman and E.A. Johnson (1989) Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increase astaxanthin content. *App Env Microbiol*, 55(1): 116-124
- Andrews, A., H. Phaff and M. Starr (1976) Carotenoids of *Phaffia rhodozyma* a red-pigment fermenting yeast. *Phytochemistry*. 15: 1003-1007
- Armstrong, G.A. (1994) Eubacteria show their true colors: genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *J Bacteriol* 176 (16): 4795-4802
- Armstrong, G.A. and John E. Hearst. (1996) Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J.* 10: 228-237
- Bartosz, G. (1996) Peroxynitrite: mediator of the toxic action of nitric oxide. *Acta Biochim Pol.* 43(4): 645-59

- Beckman J.S. and W.H. Koppenol (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad and ugly. *Am. J. Physiol.* Nov; 271 (5 Pt 1): C1424-37
- Bon, J.A., T.D. Leathers and R.K. Jayaswal (1997) Isolation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol Lett*, 19(2): 109-112
- Botham and Ratledge, (1979) A biochemical explanation for lipid accumulation in *Candida* 107 and other oleaginous microorganisms. *J Gen Microbiol* 114, 461-375.
- Boucher, J.L., C. Moaili, and J.P. Tenu (1999) Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 55:1015-1028
- Bramley, P.M. A. Mackenzie (1988) Regulation of carotenoids biosynthesis. In: B.L. Horecker and E.R. Stadtman Ed. *Curr Top Cell Regul* Vol. 29 Academic Press, San Diego Ca.
- Britton, G. (1985). General carotenoids methods. *Meth Enzymol* 111: 113-149
- Britton, G., S. Liaen-Jensen, H. Pfander (1996) Carotenoids today and challenges for the future. En: Britton, G., S. Liaen-Jensen, H. Pfander (eds). *Carotenoids* Vol. 1A. Isolation and analysis. pp. 13-26 Birkhauser Verlag, Basel
- Buttke, T.M. and P.A. Sandstrom (1994) Oxidative Stress as a mediator of apoptosis. *Inmunol Today*. 15:7-10
- Calo P., T. de Miguel, JB Velázquez, TG Villa (1995a) Mevalonic acid increases trans-astaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol Lett* 17: 575-578
- Chen, Y. and Rosazza, J.P.N. (1994) A bacterial oxide nitric synthase from a *Nocardia* species. *Biochem Biophys. Res Commun.* 203 (2):1251-58

- Choi, W., M. Chang, J. Han, S. Hong and H. Lee (1997) Identification of nitric oxide synthase in *Saphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237:554-558
- Cifuentes, V., R. León y C. Gómez (1993) Efecto de ketoconazol, clotrimazol, nistatina y cicloheximida sobre el crecimiento de *Phaffia rhodozyma*. *Boletín Micológico*, 8 (1-2): 13-17
- DiMasio, P., TPA Devasagayam, S. Kaiser, H. Sies (1990) Carotenoids, tocopherols and tiols as biological singlet molecular quenchers. *Bioquim. Soc Trans* 18:1054-56
- Eddy, A. (1980) Some aspects of amino acid transport in yeast. In: Payne, J. *Microorganisms and nitrogen sources*. John Wiley and Sons. pp. 35-38
- Evans, C. and C. Ratledge (1984) Effect of nitrogen source on lipid accumulation in oleaginous yeasts. *J Gen Microbiol* 130, 1693-1704
- Fang, TJ, Y. Chen (1993) Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. *J Ferm Bioeng* 75:466-469
- Fang, TJ and Chiou T-Y (1996) Batch cultivation and astaxanthin production by a mutant of the red yeast, *Phaffia rhodozyma* NCHU-FS501. *J Ind Microbiol*, 16: 175-181
- Fell JW, GM Blatt (1999) Separation of strains of the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Phaffia rhodozyma* based on rDNA, IGS and ITS sequence analysis. *J Ind Microbiol Biotechnol* 23: 677-681
- Fleno, B., Y. Christensen, R Larsen (1988) Astaxanthin producing yeast cells, methods for their preparation and their use. WO 88/ 08025
- Fleno, B., Y. Christensen, R Larsen, SR Johansen and EA Johnson (1994) Astaxanthin producing yeast cells, methods for their preparation and their use. US Pat 5,356,810

- Flores-Cotera, L.B., (2001) Influencia de factores ambientales en la producción de astaxantina por *Phaffia rhodozyma*. Tesis de Doctorado, Facultad de Química, UNAM pp 100
- Flores-Cotera, L.B. and S. Sánchez (2001) Copper but not iron limitation increases astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in a chemically defined medium. *Biotechnol Lett* 23: 793-797
- Flores-Cotera, L.B., R. Martín (2001) Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55:3441-3472
- Girard, P., B. Falconnier, J. Bricout, B. Vladescu (1994) β -carotene producing mutants of *Phaffia rhodozyma*. *App Microbiol Biotechnol* 41: 183-191
- Golubev, WI (1995) Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) *Yeast* 11: 101-110
- Gorde, M.P. (1998) How cytotoxic is nitric oxide? *Exp. Nephrol.* Jan-Feb; (1):12-6
- Gu, W-L., G-H An and E.A. Johnson (1997) Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 19: 114-117
- Haard, N.F. (1988) Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. *Biotechnol Lett*, 10(9): 609-614
- Hansberg, W. (1999) La biología del oxígeno en singulete. *TIP Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 2(2): 47-55
- Hansberg, W., B. Halliwell, and J.M.C. Gutteridge (1989) *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford, 48-55

- Hayman, G.T., B.M. Mannarelli, T.D. Leathers (1995) Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* grown on media composed of corn wet-milling co-products. *J Ind Microbiol*, 14: 389-395
- Hernández, R. (1996) El óxido nítrico. Radical libre con efecto pro y antitumoral. *Rev. Inst. Nal. Cancerol. (Mex)* 42 (1): 31-36
- Hirayama, O., K. Nakamura, S. Hamada and Y. Kobayashi (1994) Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids. *Lipids* 29: 149-150
- Hofman-Bang, J. (1999) Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biotechnol.* 12 (2): 35-73
- Johnson, E.A. and G.H. An (1991) Astaxanthin from microbial sources. *Critical rev. Biotechnol.* 11(4):297-326
- Johnson, E.A., and M.J. Lewis (1979) Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *J Gen Microbiol*, 115:173-183
- Johnson, E.A., and W.A. Schroeder (1995) Microbial carotenoids. *Adv. Biochem. Eng.* 53: 119-178
- Johnson, E.A., and W.A. Schroeder (1996) Biotechnology of astaxanthin production in *Phaffia rhodozyma*. pp. 39-50 In: G.R. Takeoka; R. Teranishi; P.J. Williams and A. Kobayashi (Ed.). *Biotechnology for improved foods and flavors*, Symposium series 637, American Chemical Society, Washington D.C.
- Johnson, E.A., T.G. Villa and M.J. Lewis (1980) *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets. *Aquaculture* 20, 123-134
- Kanadia, R.N., W.N. Kuo, M. McNabb and A. Botchway (1998) Constitutive nitric oxide synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Mol Biol Int.* 45(6): 1081-7

- Karnaikhov, V.N. (1990) Carotenoids:Recent progress,problemms and prospects. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol 95B, 1:1-20
- Lapshina E.A., E. Jaruga, T. Bilinski and G. Bartosz (1995) What determines the antioxidant potential of yeast cells? *Biochem Mol Biol Int.* 37(5):903-8
- Lewis, M.J., N. Ragot, M.C. Berlant and M. Miranda (1990) Selection of astaxanthin overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma* with β -ionone. *App Env Microbiol*, 59(9): 2944-2945
- Liaaen-Jensen and K. Schiedt, (1995). Carotenoids Vol. 1^a: Chapter 5 Isolation and analysis, pp 81-103
- Lott, J.A. and K. Turner (1975) Evaluation of Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. *Clin, Chem*, 21:1754-1760
- Madigan, M., J. Martinko, J. Parker (1998) Brock Biology of microorganisms. Prentice Hall. UK. p 111
- Membrillo-Hernández, J. M. Coopamah, A. Channa, M. Hughes and R. K (1998) A novel mechanism for upregulation of the *Escherichia coli* K-12 hmp (flavo-hemoglobin) gene by the 'NO releaser', S-nitrosoglutathione: nitrosation of homocysteine and modulation of MetR binding to the *glyA-hmp* intergenic region. *Mol. Microbiol.* 29(4): 1101-1112
- Meyer, P.S, J.C. du Preez (1993) Efect of acetic acid on astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol Lett*, 15(9): 919-924
- Meyer, P.S, J.C. du Preez (1994a) Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice. *W J Microbiol Biotechnol*, 10: 178-183

- Meyer, P.S, J.C. du Preez (1994b) Effect of culture conditions on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma* in batch and chemostat culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 40: 780-785
- Meyer, P.S, J.C. du Preez and S.G. Kilian (1993) Selection and evaluation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. *W J Microbiol Biotechnol.* 9, 514-520
- Meyer, P.S, J.C. du Preez and M.S. van Dyk (1994c) The effect of monoterpenes on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol Lett*, 16(2): 125-128
- Miller, N.J., J. Sampson, LP Candeias, PM Bramley and CA Rice-Evans (1996) Antioxidant activities of carotenoids and xanthophylls *FEBS Lett* 384: 240-242
- Miller, M.W., M. Yonoyama, M. Soneda (1976) *Phaffia*, a new yeast genus in the Deuteromycotina (Blastomycetes). *Intl J System Bacteriol* 26:286-291
- Moncada, S. (1992) The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol. Scand.* 145,201-227
- Nelis, H.J. and A.P. De Leenheer (1989) Microbial production of carotenoids other than β -carotene. In *Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors*, ed Vandamme E.J. 43-48 Elsevier Applied Science
- Nelson, D.L. and M.M. Cox (2001) *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers pp 201
- Nims, R. W., J. Cook, M. C: Krishna, D. Christodoulou, C. Poore, A. Miles, M. Grisham and D. Wink (1995) Colorimetric assays for nitric oxide and nitrogen oxide species form from nitric oxide stock solutions and donor compounds. *Methods Enzymol.* Vol. 268 pp 93-105
- Olson, J.A., N.I. Krinsky (1995) The colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators. *FASEB J* 9: 1547-1550

- Palozza, P., N.I. Krinsky (1992) Antioxidant effects of carotenoids *in vivo* and *in vitro*: an overview. *Methods Enzimol* 213:403-421
- Parajó, J.C., V. Santos and M. Vázquez (1997) Co-production of carotenoids and xilitol by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) *Biotechnol Lett*, 19(2): 139-141
- Parajó, J.C., V. Santos and M. Vázquez (1998a) Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xilose. *Proc Biotechnol*, 33(2): 181-187
- Parajó, J.C., V. Santos and M. Vázquez (1998b) Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* growing on media made from hemicellulosic hidrolysates of *Eucalyptus globulus* wood. *Biotechnol Bioeng*, 59 (4): 501-506
- Reynders, M.B., D.E. Rawlings and S.T.L. Harrison (1996) Studies on the growth, modeling and pigment production by the red yeast *Phaffia rhodozyma* during fed-batch cultivation. *Biotechnol Lett*, 18(6): 649-654
- Reynders, M.B., D.E. Rawlings and S.T.L. Harrison (1997) Demostration of the Crabtree effect in *Phaffia rhodozyma* during continuous and fed-batch cultivation. *Biotechnol Lett*. 19 (6): 549-552
- Sánchez A., LB Flores Cotera, E. Langley, R. Martín, G. Maldonado S. Sánchez (1999) Carotenoides. Estructura, función, biosíntesis, regulación y aplicaciones. *Rev Lat Microbiol* 41: 175-191
- Schroeder, W. and E. Johnson (1995) Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. *J Ind Microbiol* 14:502-507
- Sedmak, J.J., K. Weerasinghe, S. Jolly (1990) Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol Tech* 4:107-12

- Sherman, F; Fink, RG and Lawrence, WC. (1971) *Methods in yeast genetics*. Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York. pp: 1-6
- Stachura, J., J.W. Konturek, A. Karczewska, W. Domschke, T. Popiela and S. Konturek (1996) *Helicobacter pylori* from duodenal ulcer patients expresses inducible NOS immunoreactivity *in vivo* and *in vitro* J. *Physiol. Pharmacol.* 47(1) 131-135
- Tamir, S., S. Burney and S. Tannerbaum (1996) DNA damage by nitric oxide. *Chem. Res. Toxicol.* 9:821-27
- ter Schure, E.G., H. W. Silljé, A.J. Verkleij, J. Boonstra and T. Verrips (1995) The concentration of ammonia regulates nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 177 (22): 6672-6675
- ter Schure, E.G., N. A.W. van Riel, C. T. Verrips (2000) The role of ammonium metabolism in the nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* *FEMS Microbiol Rev* 24: 67-83
- Vázquez, M. and A.M. Martín. (1998) Optimization of *Phaffia rhodozyma* continuous culture through response surface methodology. *Biotechnol Bioeng*, 57 (3): 314-320
- Vázquez, M. V. Santos and J.C. Parajó (1997) Effect of carbon source on the carotenoid profiles of *Phaffia rhodozyma* strains. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 19: 263-268
- Velázquez Mejía, E. (1995) Producción de astaxantina por fermentación sumergida de *Phaffia rhodozyma*. Tesis de maestría, UACPyP del CCH, UNAM
- Voet, D. and J. Voet (1990) *Biochemistry*. John Wiley and sons N.Y. pp 81-94
- Yamane, Y., K. Higashida, Y. Nakashimada, T. Kasizono and N. Nishio (1997a) Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* enhanced in fed-batch culture with glucose and ethanol feeding. *Biotechnol Lett*, 19 (11) 1109-1111

Yamane, Y., K. Higashida, Y. Nakashimada, T. Kasizono and N. Nishio (1997b) Influence on oxygen and glucose in primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis. *App Env Microbiol*, 63 (11) 4471-4478

ANEXO I

Especificaciones del equipo

EQUIPO	ESPECIFICACIONES
Analizador de líquido de centelleo	Tri-Carb model 1500 Packard Instruments Company
Balanza analítica	Ohaus E400
Centrífuga de ángulo fijo	Modelo Lourdes, Vernitron Medical Products, Inc
Densitómetro	CAMAG TLC Scanner ii
Espectrofotómetro	Spectronic Instruments 21 D
Incubadora	Tipo orbital, Gallenkamp
Liofilizadora	Freeze dryer 5 Labconco
Potenciómetro	Beckman model 3500 digital
Ultracentrífuga	
Analizador de placas de ELISA	BIO-RAD Model 3550 Microplate reader

ANEXO II

Cálculo de la concentración de astaxantina

Después de extraer carotenoides por el método de Sedmak se aplicaron las muestras en placas de silica gel 60 de 10 x 20 cm (E. Merck AG, Darmstad, Alemania) y se permitió su corrimiento en una mezcla de elución acetona/éter de petróleo (20:80). Para posteriormente leer en un densitómetro CAMAG TLC Scanner ii.

Para calcular la concentración se tomó en cuenta el volumen tanto de estandar como de muestra que fue aplicado en la placa y se relacionó directamente con los valores encontrados en el área bajo la curva de los picos del cromatograma.

MUESTRA	COMPUESTO	µg de carotenoide/ml
2 mM de amonio	Astaxantina	1.75
	Carotenoide no identificado	0.22
10 mM de amonio	Astaxantina	1.94
	Carotenoide no identificado	0.41
20 mM de amonio	Astaxantina	2.31
	Carotenoide no identificado	0.10
2 mM de arginina	Astaxantina	2.43
	Carotenoide no identificado	1.19
10 mM de arginina	Astaxantina	3.22
	Carotenoide no identificado	1.94
20 mM de arginina	Astaxantina	4.27
	Carotenoide no identificado	2.53

Las concentraciones de arginina y amonio aquí señaladas se refieren a la fuente de nitrógeno empleada en el medio de cultivo para el crecimiento de *P. rhodozyma* y la consiguiente extracción de carotenoides que se aplicaron en cada carril de la placa cromatográfica.

Las siguientes gráficas muestran el perfil de carotenoides encontrados en cada muestra.

Calibration :M: EXPEARG1

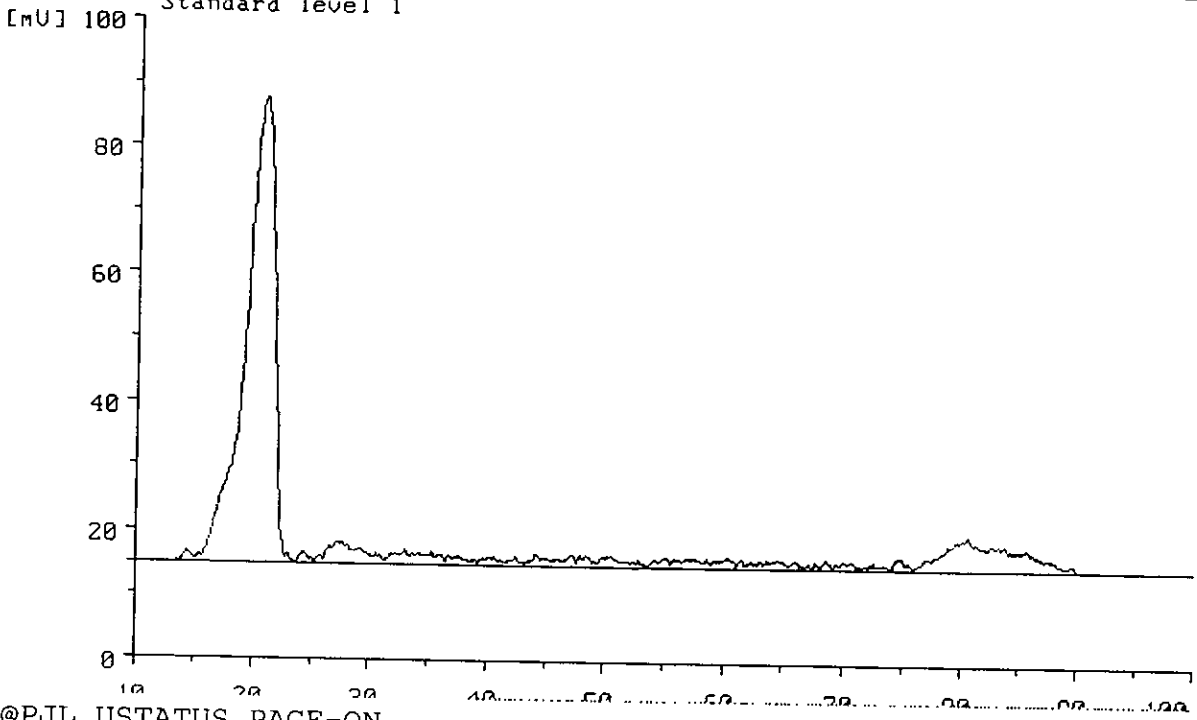
ERIKAGE

8/DEC/1999 17:13

Method Scan **Integration** Calibration Data END

HELP

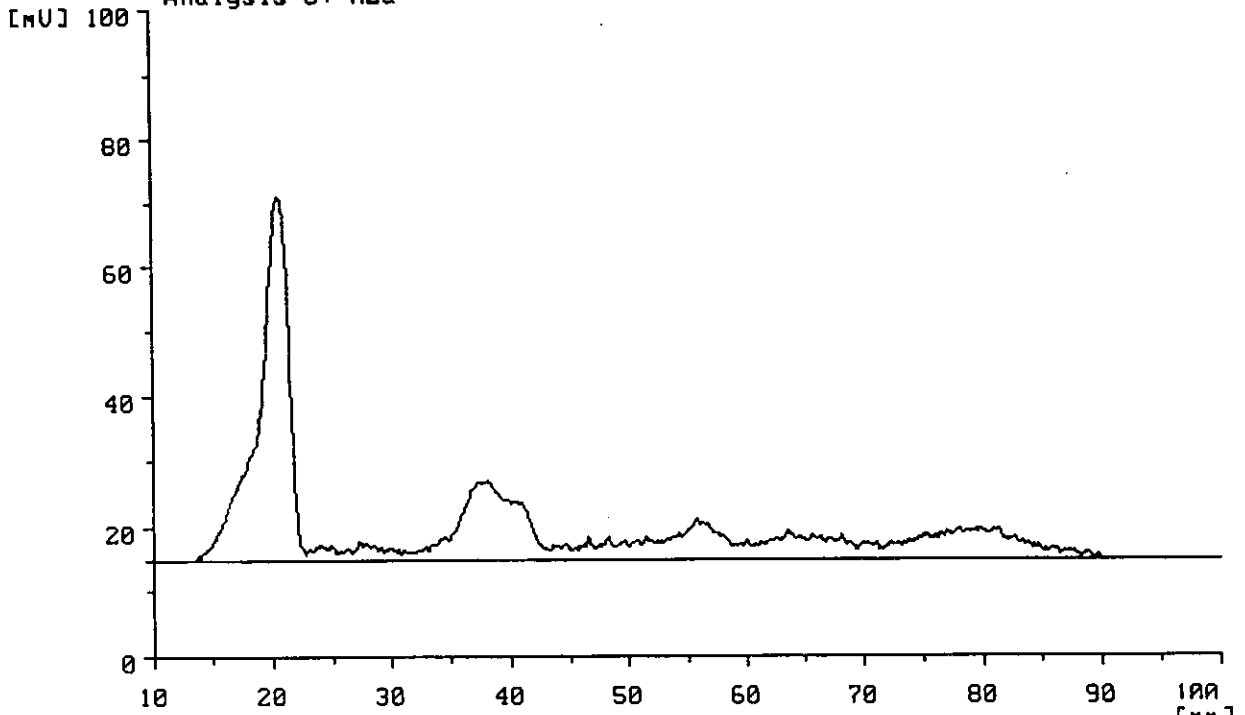
Standard level 1



@PJL USTATUS PAGE=ON

@PJL USTATUS TIMED=30

Analysis e: N2a



Wavelength: 472 nm

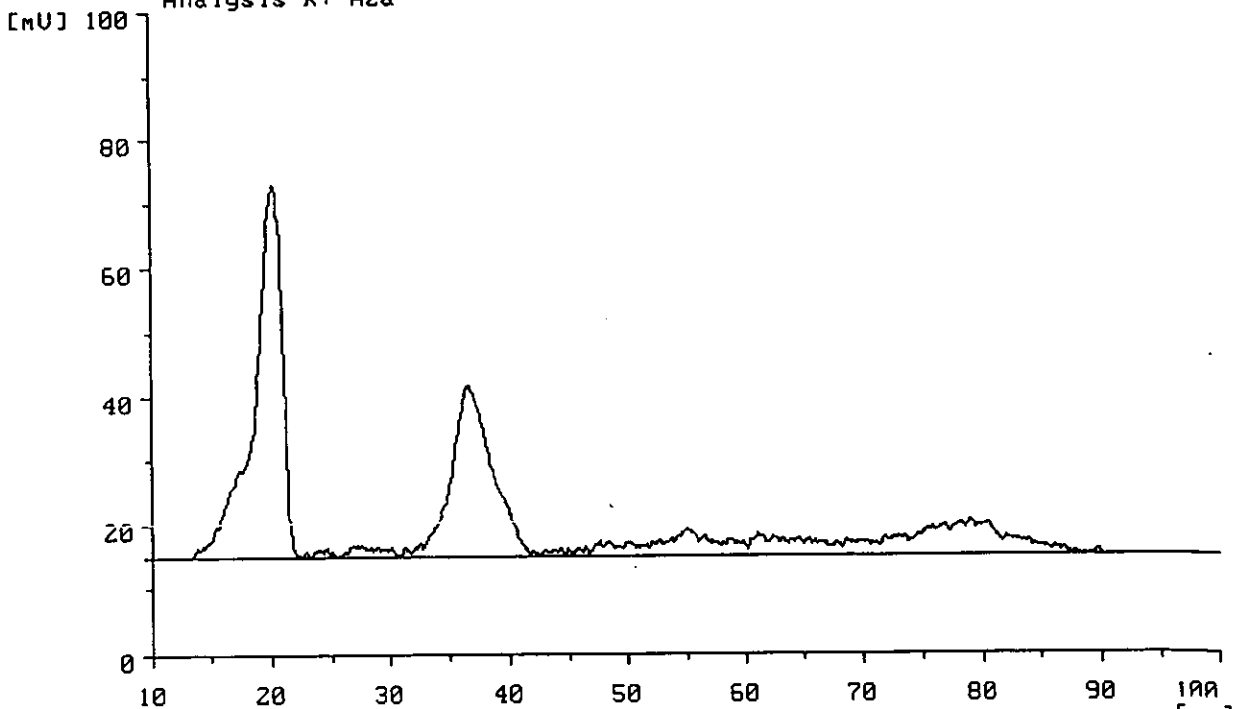
Track: 5, noise level: 0.448mU, raw data file: EXPARG1

CATS3.16 S/N:0105A013

CAMAG SOFTWARE (c) 1994

SCANNER II: INACTIVE

Analysis k: A2a



Wavelength: 472 nm

Track: 11, noise level: 0.448mU, raw data file: EXPARG1

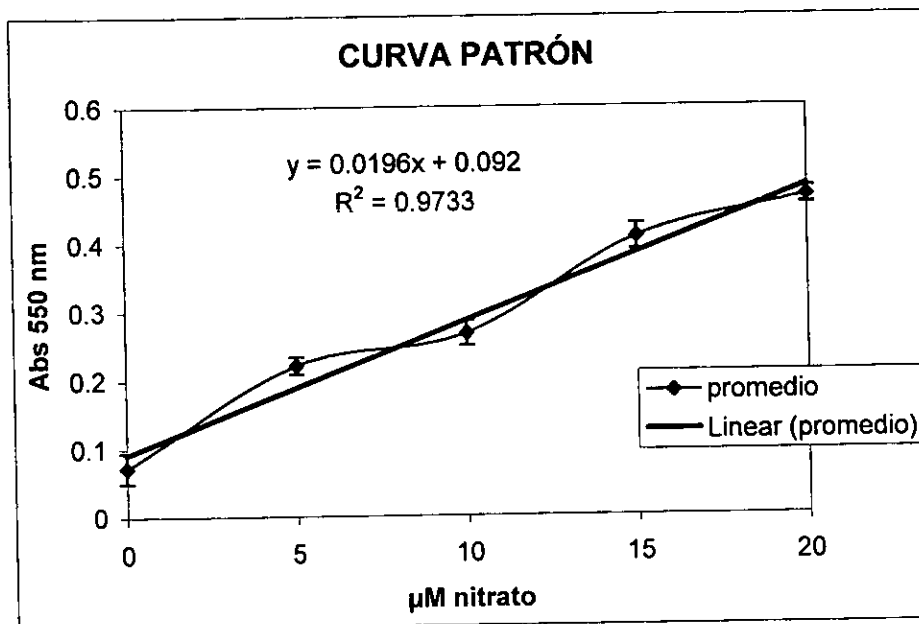
CATS3.16 S/N:0105A013

CAMAG SOFTWARE (c) 1994

SCANNER II: INACTIVE

ANEXO III

Cálculo de la actividad específica de NOS



Para calcular la actividad de NOS se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad} = \frac{((\Delta_{540} - \text{ordenada al origen}) / \text{pendiente}) (0.2 \text{ ml} / \text{vol. de muestra})}{\text{Tiempo de reacción (min)}}$$

$$\text{Actividad} = \text{nomoles} / \text{min} / \text{ml}$$

Para el cálculo de la actividad específica se tomaron en cuenta la concentración de proteína de los extractos enzimáticos determinada por el método de Lowry.