



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
Dirección General de Estudios de Posgrado  
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas  
**Facultad de Química**

00591 7  
  
UNAM  
DIRECCIÓN GENERAL DE  
ESTUDIOS DE POSGRADO

294473

**Influencia de Factores Nutricionales en la Producción de  
Astaxantina por *Phaffia rhodozyma***

**Tesis que para Obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Bioquímicas**

**PRESENTA**

**Luis Bernardo Flores Cotera**



México D. F.

Junio de 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.

## **Influencia de Factores Nutricionales en la Producción de Astaxantina por *P. rhodozyma*.**

Por: Luis Bernardo Flores Cotera. Facultad de Química, UNAM.

### **RESUMEN**

En este trabajo se estudió el efecto de diferentes factores nutricionales en la producción de carotenoides por *P. rhodozyma*. En cultivos en lote alimentado se estudiaron los efectos de la velocidad de alimentación de sacarosa, la relación carbono/nitrógeno y dos fuentes de nitrógeno. La alimentación de sacarosa fue el factor más importante. Una alimentación lenta aumentó la concentración de carotenoides y el contenido de carotenoides en la levadura con relación a una alimentación rápida. Los efectos de los otros factores fueron menos importantes. Las cinéticas de los cultivos sugieren que la limitación de azúcar, oxígeno disuelto por arriba de 20%, el recambio de proteínas y la reasimilación de etanol son factores estrechamente vinculados con la síntesis de carotenoides.

En medios químicamente definidos, se estudiaron los efectos del nitrógeno, fosfatos, magnesio, cobre, hierro, potasio y citrato sobre la producción de astaxantina (matraces). La concentración de carotenoides y el contenido de astaxantina en la levadura se incrementaron en bajas concentraciones de nitrógeno (15 mM) o de fosfatos (1 mM). Bajos niveles de cobre (0 a 1  $\mu$ M) estimularon la concentración de carotenoides y la proporción de astaxantina en el pigmento. Los resultados en fermentador y matraces convergen en que la síntesis de carotenoides se estimula al surgir una restricción del metabolismo. Además, un aumento en la relación  $\text{NADH/NAD}^+$  parece ser un evento común y fundamental. El análisis de los resultados sugiere al citrato como posible precursor de carotenoides. Esto puede ser de gran importancia práctica, puesto que el citrato podría usarse en el medio de cultivo para incrementar la producción de astaxantina.

## **ABSTRACT**

The purpose of this study was to investigate the effects of nutrients on carotenoid and astaxanthin production by *P. rhodozyma*. Using fed-batch cultures, we studied the effects of rate of sugar addition, carbon/nitrogen ratio and two nitrogen sources on carotenoid production by *P. rhodozyma*. The rate of sugar addition was the most influential factor. In comparison to fast addition rate, a slow addition rate increased both total carotenoid concentration and specific carotenoid content in the cells. The other two variables had only minor effects. Kinetic data from cultures suggest that sugar limitation, oxygen concentrations above 20%, ethanol re-assimilation and protein turnover are closely related events to carotenoid synthesis.

Using chemically defined media, the effects of phosphates, ammonium, potassium, magnesium, copper, iron and citrate on astaxanthin production (flasks experiments) were studied. Carotenoid concentrations, as well as astaxanthin contents in cells increased at low nitrogen (15 mM) or low phosphate levels (1 mM). On the other hand, limiting amounts of copper (0 to 1  $\mu$ M) increased carotenoid concentrations and the proportion of astaxanthin in the pigment. Results from fermentor and flasks indicate that carotenoid synthesis occurs as an outcome of a metabolic impairment. In all cases, increased NADH/NAD<sup>+</sup> ratios might be common and fundamental events. In addition, data analysis suggests that citrate may be a precursor of carotenoids. This possibility can be of considerable practical value, because citrate a cheap raw material, might be added to culture media to enhance production of a high value product like astaxanthin.

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

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis culmina el esfuerzo de muchas personas, a todas ellas les estoy agradecido.

En primer lugar quiero dedicar esta tesis a mis padres, Luis en su memoria, y a Guadalupe, quienes han sido para mi un soporte continuo, aún en la añoranza, en todos los aspectos de mi vida.

A mis hijos Elisa, Francisco y Luis por ser uno de los motivos más importantes de mis esfuerzos, y a Nora.

A mis hermanos Manuel, Patricia, Fidel, Carlos, Salvador, Margarita y Laura con cariño, por integrar una gran familia.

Mientras desarrollé mi trabajo en el Laboratorio de Microbiología Industrial del Instituto de Investigaciones Biomédicas, tuve el placer de trabajar con un grupo numeroso de personas, y contado con la colaboración de otros grupos. Entre mis compañeros y amigos debo mencionar a Elia Velázquez, Silvia Guzmán, Erika Grajales, Elizabeth Langley, Ruth Martín, Alejandra Masetto, Claudia Coronel, Romina Rodríguez, Itzel Ramos, Angeles Martínez, Israel Pichardo, Gabriela Maldonado, Marco A. Ortiz, Lenin, Rosalba González y Joaquín Villanueva, cada uno de ellos (as) ha tenido alguna contribución en este trabajo, aún cuando pequeña en algunos casos, la aprecio enormemente. La colaboración de los miembros de la Planta Piloto, Abel Blancas, Román González y Leopoldo Mora en la realización de parte del trabajo experimental debo destacarla con afecto.

Durante mi estancia en el Instituto de Investigaciones Biomédicas tuve la fortuna de conocer a Iveta Imriskova y Angeles Sánchez, mis compañeras del Doctorado, con quienes pude compartir charlas e intercambiar ideas que enriquecieron mi trabajo y mi persona. El apoyo que recibí de ellas, su compañerismo y su entusiasmo han sido invaluable.

El derrotero de esta tesis, en tiempo y alcance, hubiera sido uno muy distinto sin la colaboración de Laura Escalante, Beatriz Ruiz y Magdalena Contreras. Quiero dejar constancia de mi reconocimiento por su ayuda ininterrumpida.

Una nota especial de gratitud a Verónica Noverón quién con su encanto, su amabilidad y sus deseos de cooperación, facilitó considerablemente mi estancia en el Departamento de Biotecnología.

La ayuda y las facilidades que me dispensaron Amelia Farrés y Leticia García para realizar trámites administrativos las reconozco asimismo con sincero agradecimiento.

De igual forma, quiero expresarles mi agradecimiento a los miembros de mi comité tutorial y a los miembros del jurado: Sergio Sánchez, Tonatiuh Ramírez, Socorro Durán, Jorge Calderón (q.p.d.), Guillermo Aguilar, Eduardo Bárzana, Amelia Farrés, Gerardo Saucedo, Susana Saval, Edgardo Escamilla y Leobardo Serrano, cada uno de los cuales merece un reconocimiento distintivo por el tiempo que destinaron a este trabajo, por sus críticas y sus sugerencias. Particularmente deseo agradecer al Dr. Sergio Sánchez Esquivel por su asesoría y apoyo irrestricto, y por permitirme trabajar en un agradable grupo, crítico y al mismo tiempo unido por una gran amistad.

Por último pero no menos, mi gratitud a las autoridades del CINVESTAV – IPN, en particular al Director Adolfo Martínez, a Manuel Méndez y a Frédéric Thalasso, por permitirme disponer del tiempo necesario para concluir este trabajo. Mi gratitud la hago extensiva a mis compañeros del CINVESTAV-IPN, en especial a Elvira Ríos, Cirino Rojas y David Flores y a todos los integrantes de la Planta Piloto del Departamento de Biotecnología del CINVESTAV – IPN por su valiosa asistencia.

Jurado de examen del M. C. Luis Bernardo Flores Cotera para optar por el grado de Doctor en Ciencias (Bioquímicas), con la réplica de la tesis “Influencia de factores nutricionales en la producción de astaxantina por *Phaffia rhodozyma*.” Nombrado en reunión ordinaria por los miembros Subcomité Académico el día 16 de mayo de 2000.

Presidente	Dr. Eduardo Bárzana García
Vocal	Dr. Leobardo Serrano Carreón
Vocal	Dr. Gerardo Saucedo Castañeda
Vocal	Dr. Tonatiuh Ramírez Reivich
Secretario	Dr. Edgardo Escamilla Marván
Suplente	Dra. Amelia Farrés González-Saravia
Suplente	Dra. Susana Saval Bohórquez

# CONTENIDO

<b>1 RESUMEN-ABSTRACT</b>	<b>5</b>
<b>2 ANTECEDENTES</b>	<b>11</b>
2.1 Función de los carotenoides	11
2.2 Fuentes de moléculas oxidantes	13
2.3 <i>Phaffia rhodozyma</i>	14
2.4 Astaxantina	15
2.5 Biosíntesis de carotenoides y astaxantina	15
2.6 Regulación de la síntesis de carotenoides y de astaxantina	18
2.7 Usos y producción de la astaxantina	22
2.8 Producción y reasimilación de etanol en levaduras.	23
2.9 Justificación	25
2.10 Hipótesis	27
2.11 Objetivos	28
<b>3 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	<b>29</b>
<b>4 MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>30</b>
4.1 Microorganismo	30
4.2 Obtención de muestras	30
4.3 Determinación de proteína	30
4.4 Determinación de peso seco	31
4.5 Extracción de carotenoides.	31
4.6 Separación de carotenoides por cromatografía en capa fina	32
4.7 Preparación del estándar de astaxantina	32
4.8 Determinación de azúcares reductores	33
4.9 Determinación de amonio residual	33
4.10 Determinación de fosfato residual	33
4.11 Medición de pH	34
4.12 Determinación de alcoholes	34
4.13 Cálculo de rendimiento ( $Y_{x/s}$ )	34
4.14 Medios para conservación, y preparación de inóculo	34
4.15 Experimentos para establecer las condiciones de cultivo en lote alimentado	35
4.16 Experimentos en fermentador para estudiar 3 factores en un diseño factorial $2^{3-1}$ .	36
4.17 Experimento en fermentador con adición de sales minerales	40
4.18 Experimentos en matraz en medios químicamente definidos	40
4.19 Experimentos con concentraciones variables de P, N, K, Mg, Cu y Fe	40
4.20 Experimento con concentraciones variables de citrato.	41



<b>5</b>	<b>RESULTADOS.</b>	43
5.1	Experimentos para establecer las condiciones de cultivo en fermentador	43
5.2	Experimentos en fermentador para estudiar 3 factores en un diseño factorial $2^{3-1}$ .	44
5.3	Análisis de respuestas del diseño factorial $2^{3-1}$	47
5.4	Experimento en fermentador con adición de minerales	49
5.5	Experimentos con concentraciones variables de N, P y K	50
5.6	Experimentos con concentraciones variables de nitrógeno	50
5.7	Experimentos con concentraciones variables de fosfatos	52
5.8	Experimento con concentraciones variables de potasio	53
5.9	Experimento con concentraciones variables de magnesio	53
5.10	Experimento con concentraciones variables de cobre	54
5.11	Experimento con concentraciones variables de hierro	54
5.12	Experimento con concentraciones variables de citrato	55
<b>6</b>	<b>DISCUSION</b>	56
6.1	Experimentos en fermentador.	56
6.2	Efecto de la concentración de oxígeno disuelto (OD)	56
6.3	Efectos del metabolismo de etanol	58
6.4	Otros probables efectos debidos a un desbalance redox	59
6.5	Experimentos con concentraciones variables de N, P, Mg, Cu, Fe y K	61
6.6	Efectos de concentraciones variables de nitrógeno.	61
6.7	Efectos de concentraciones variables de fosfatos.	62
6.8	Experimento con concentraciones variables de magnesio.	63
6.9	Citrato, posible precursor de carotenoides en <i>P. rhodozyma</i> .	64
6.10	Efectos de concentraciones variables de cobre y hierro.	65
6.11	Una compilación de los efectos más relevantes.	69
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	73
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	75
<b>9</b>	<b>ANEXO:</b> "Citrate, a possible precursor of astaxanthin in <i>Phaffia rhodozyma</i> : influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium" (artículo publicado en " <i>Applied Microbiology and Biotechnology</i> ")	101

## ***ABREVIATURAS***

azúcar alim tot	azúcares totales alimentadas al fermentador (Kg)
azúcares red.	azúcares reductores (mg/ml)
carot tot	concentración de carotenoides en el caldo de cultivo ( $\mu\text{g/ml}$ )
cont carot	contenido de carotenoides en la levadura ( $\mu\text{g}$ carotenoides/g levadura)
cont proteína	contenido de proteína en la levadura (g proteína/g levadura)
EL	extracto de levadura
G6PD	glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
HMGR	hidroximetilglutaril-CoA reductasa
MOR	moléculas oxigenadas reactivas
OD	concentración de oxígeno disuelto (% de saturación).
proteína tot	concentración de proteína (paquete celular) en el caldo de cultivo (mg/ml)
SOD	superóxido dismutasa
UQ	ubiquinona
vía RA	vía respiratoria alternativa
Y <sub>x/s</sub>	rendimiento de biomasa sobre la base de sustrato consumido (g levadura/g sacarosa)

# INFLUENCIA DE FACTORES NUTRICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA POR *Phaffia Rhodozyma*.

por

**Luis Bernardo Flores Cotera**

Tesis presentada como uno de los requisitos para  
obtener el grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas

## 1 RESUMEN

La proporción de los diferentes carotenoides producidos por la levadura *P. rhodozyma* y la cantidad de astaxantina en las células pueden alterarse por cambios en la composición del medio de cultivo y por otros factores ambientales. En este trabajo se estudiaron los efectos de nutrientes sobre el crecimiento y producción de carotenoides en cultivos en lote alimentado (estudios en fermentador). Así mismo, en medios de cultivo químicamente definidos se estudiaron los efectos de la concentración de nitrógeno, fosfato, magnesio, cobre, hierro, potasio y citrato sobre el crecimiento y la producción de astaxantina por *P. rhodozyma* (estudios en matraces).

Aplicando un diseño factorial  $2^{3-1}$ , en cultivos en lote alimentado se estudiaron los efectos de la velocidad de alimentación de sacarosa, la relación carbono/nitrógeno y dos fuentes de nitrógeno (extracto de levadura (EL) o una mezcla de sulfato de amonio/EL) sobre el crecimiento y la producción de carotenoides en *P. rhodozyma*. La velocidad de alimentación de sacarosa fue el factor más importante. Una alimentación lenta (4.7 g/h) produjo una mayor concentración de carotenoides totales ( $\mu\text{g/ml}$ ) y un mayor contenido de carotenoides en la levadura ( $\mu\text{g/g}$ ) en comparación con una alimentación rápida (7.2 g/h). Los efectos de los otros dos factores fueron de menor importancia. En fermentador se logró cultivar *P. rhodozyma* a densidades celulares de hasta 100 mg/ml y se alcanzaron concentraciones de carotenoides totales de hasta 33  $\mu\text{g/ml}$ , lo que representa un incremento de 300% en carotenoides, con relación a trabajos previos realizados en nuestro laboratorio con la misma cepa (Velázquez, 1995). Por otro lado, las cinéticas obtenidas en fermentador sugieren que la limitación de azúcar, concentraciones de OD por arriba de 15-20%, el recambio de proteínas intracelulares y la reasimilación de etanol son factores importantes que estimulan la síntesis de carotenoides en *P. rhodozyma*.

En matraces se logró cultivar *P. rhodozyma* en medios químicamente definidos. Se encontró que altas concentraciones de algunos componentes del medio de cultivo como fosfatos, sulfato de amonio, magnesio y cobre tienen un efecto negativo sobre la producción de carotenoides. La concentración de carotenoides totales, así como los contenidos de astaxantina y lípidos en la levadura se incrementaron a bajas concentraciones de nitrógeno (10-20 mM) o de fosfatos (~1 mM), pero a costa de una menor síntesis de proteína. La mayor producción de carotenoides al parecer es una respuesta para canalizar el exceso de carbono, ATP y NADH debidos a una limitada síntesis de proteínas.

Por otro lado, en medios deficientes en cobre (<1  $\mu$ M) se observó una mayor proporción de astaxantina en el pigmento, lo cual indica una mejor hidroxilación de los carotenoides. La mayor producción de astaxantina y carotenoides observada en estas condiciones, parece estar asociada con la activación de una vía respiratoria alterna (RA) que participa en la formación de los grupos oxigenados de la astaxantina. Es factible entonces que la activación de la vía RA funcione como un mecanismo para reducir el excedente de NADH causado por un rápido catabolismo cuando la cadena respiratoria principal se encuentra inhibida.

Los resultados obtenidos en las diversas condiciones estudiadas, tanto en fermentador como en matraces, convergen en que la síntesis de carotenoides tiene lugar al surgir una restricción en el metabolismo, por lo siguiente: a) La deficiencia de nitrógeno, fosfato y posiblemente magnesio restringen la síntesis de proteínas b) La reasimilación de etanol produce un desbalance NADH/NAD<sup>+</sup> y la inhibición del ciclo de Krebs c) La deficiencia de cobre inhibe la cadena respiratoria d) La pigmentación de mutantes generalmente aumenta con un lento crecimiento (Schroeder y Johnson, 1995a).

La limitación de nitrógeno y posiblemente la de fosfato producen un excedente de energía debido a la baja demanda de ATP para síntesis de proteínas y nucleótidos. Puesto que la fosforilación oxidativa es la principal vía de oxidación de NADH, la relación NADH/NAD<sup>+</sup> debe necesariamente elevarse. De forma similar, debido a que el etanol es un sustrato muy energético, su metabolismo eleva la relación NADH/NAD<sup>+</sup>. En contraste, en condiciones de deficiencia de cobre la síntesis de proteínas podría estar supeditada a la disponibilidad de ATP. Pero un rápido catabolismo junto con una cadena respiratoria inhibida conduciría también a elevar la relación NADH/NAD<sup>+</sup>. Todo esto indica que la elevación de la relación NADH/NAD<sup>+</sup> y/o la acumulación de NADH podrían ser eventos comunes y fundamentales que estimulan la síntesis de carotenoides. Esto es especialmente interesante si se considera que la enzima isocitrato deshidrogenasa, una enzima clave

en la operación del ciclo de Krebs de levaduras lipogénicas, requiere de  $\text{NAD}^+$  para su actividad. La falta de  $\text{NAD}^+$  reduce la actividad de la enzima, lo que da lugar a la acumulación de citrato. Como ocurre en la síntesis de lípidos en levaduras lipogénicas, el citrato podría ser el precursor del acetyl-CoA requerido no solo para la síntesis de lípidos, sino también para la de carotenoides y otros isoprenoides. La mayor concentración de carotenoides totales y el mayor contenido de carotenoides en las células obtenidas al adicionar citrato (28 mM ó más) al medio de cultivo, sugieren también que el citrato es el precursor de carotenoides en *P. rhodozyma*.

Hasta donde sabemos, actualmente no existe una visión integrada de los cambios asociados con la iniciación de la síntesis de carotenoides ni en *P. rhodozyma*, ni en otros microorganismos. Este trabajo hace una contribución en este sentido al sugerir que los efectos observados al limitar un cultivo de *P. rhodozyma* por diferentes nutrientes, pueden explicarse por eventos con un origen común. Es decir, un impedimento metabólico que se traduce en la inhibición del ciclo de Krebs y en particular de la enzima isocitrato deshidrogenasa. Otra aportación de este trabajo es que, por primera vez, se sugiere al citrato como posible precursor de carotenoides en microorganismos y en particular en *P. rhodozyma*. Esta posibilidad puede ser de una considerable importancia práctica, puesto que el citrato, una materia prima de bajo costo, podría adicionarse al medio de cultivo para incrementar la producción de un producto de alto valor como la astaxantina.

Tutor de tesis: Dr. Sergio Sánchez Esquivel

# INFLUENCE OF NUTRITIONAL FACTORS ON ASTAXANTHIN PRODUCTION BY *Phaffia Rhodozyma*.

by

**Luis Bernardo Flores Cotera**

Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements  
for the degree of "Doctor en Ciencias Bioquímicas"

## ABSTRACT

The amount and specific type of carotenoids produced by *P. rhodozyma* are very responsive to availability of nutrients and other environmental factors. A purpose of this study was to investigate the influence of nutrients on growth and carotenoid production in fed-batch cultures (fermentor experiments). On the other hand, chemically defined media were developed for *P. rhodozyma*. So, another purpose was to investigate the influence of phosphates, ammonium, potassium, magnesium, copper, iron and citrate, on growth and astaxanthin production by *P. rhodozyma* in chemically defined media (flask experiments).

Using a factorial design  $2^{3-1}$ , we studied in fed-batch cultures the effects of rate of sugar addition, carbon/nitrogen ratio and two nitrogen sources (yeast extract or a mix of yeast extract/ammonium sulfate) on growth and carotenoid production by *P. rhodozyma*. The rate of sugar addition was the most influential factor. In comparison to fast sugar addition (7.2 g/l), slow sugar addition (4.7 g/h) increased both the total carotenoid concentration (mg/ml) and specific carotenoid content in the cells ( $\mu\text{g/g}$  yeast). The other two variables had only minor effects. Fed-batch culture was useful to achieve very high cell densities, up to 100 mg/ml, with total carotenoid titers up to 33  $\mu\text{g/ml}$ . The carotenoid production achieved was about 300% greater in comparison to values given in a previous work made in our own laboratory with the same yeast strain (Velázquez, 1995). On the other hand, kinetic data from fermentor experiments suggest that sugar limitation, oxygen concentrations above 15-20%, ethanol re-assimilation and protein turnover are closely related events to carotenoid synthesis in *P. rhodozyma*.

Flask experiments using chemically defined media revealed that high levels of phosphate, ammonium sulfate, magnesium and copper markedly decrease carotenoid production. Total carotenoid concentration, as well as the astaxanthin and lipid contents in cells increased at low nitrogen (~10-20 mM) or low phosphate levels (~1 mM) but at the expense of decreased protein synthesis. Thus, carotenoid and lipid production may be joint responses for diverting the excess of carbon, ATP and NADH originated by restricted protein synthesis.

On the other hand, limiting amounts of copper increased the proportion of astaxanthin in the pigment, indicating a better hydroxylation of carotenoids. As well, deficiency of copper causes specific inhibition of the main respiratory chain. Hence, the activation of an alternative respiratory pathway which participates in introducing oxygenated groups to carotenoids might be connected with the increased astaxanthin and carotenoid productions seen at low copper levels (1  $\mu$ M). Activation of this alternative pathway may serve as a means to reduce the excess of NADH caused by a fast catabolism occurring with a restricted main respiratory chain

The results obtained both in fermentor and flasks, under widely varying conditions, indicate that carotenoid synthesis occurs as an outcome of a metabolic impairment, for instance: a). Deficit of nitrogen, phosphate and probably magnesium restrict protein synthesis b). Ethanol consumption increases the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio and inhibits the Krebs cycle c). Copper limitation causes inhibition of the main respiratory chain d) highly pigmented mutants of *P. rhodozyma* grow slower in relation to less pigmented strains (Schroeder y Johnson, 1995a).

Yeast cells growing in media containing limited amounts of ammonium or phosphate are confronted with an excess of carbon and ATP as a result of a low demand for protein and nucleotide synthesis. Since oxidative phosphorylation is a main pathway for NADH oxidation, the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio shall increase. Likewise, because ethanol is a very energetic carbon source, its metabolism promotes increased NADH/NAD<sup>+</sup> ratios. In contrast, protein synthesis should be restricted by ATP availability in copper limited cultures. Nevertheless, a fast catabolism along with an inhibited respiratory chain will result in increased NADH/NAD<sup>+</sup> ratios too. All the above events taken together suggest that increased NADH/NAD<sup>+</sup> ratios can be a common and fundamental factor for triggering carotenoid synthesis in *P. rhodozyma*. This is an interesting finding, since isocitrate dehydrogenase, a key enzyme for operation of the Krebs cycle in oleaginous yeast, requires NAD<sup>+</sup> for activity. Low NAD<sup>+</sup> availability reduce the enzyme activity, which may induce citrate accumulation. As occurs in lipid synthesis in other oleaginous yeast, citrate exported from the mitochondrion into the cytoplasm can be the precursor of acetyl-CoA not only for synthesis of lipids

but also for carotenoids and other isoprenoids. The increased total carotenoid titers and total carotenoid contents seen when citrate was included in the medium (>28 mM) provide further evidence that citrate may be the precursor of carotenoids in *P. rhodozyma*.

To our knowledge, an integrated view has not been given of changes associated with initiation of carotenoid synthesis, neither in *P. rhodozyma* or in other microorganisms. Our work is a contribution in that direction because it traces to a common origin, the observed effects on *P. rhodozyma* cultured in media limited with different nutrients: a metabolic impairment leading to inhibition of the Krebs cycle or in particular of the enzyme isocitrate dehydrogenase. Furthermore, these studies have yielded evidence, for the first time, that citrate can be a precursor of carotenoids in *P. rhodozyma*. This possibility can be of considerable practical value, because citrate a cheap raw material, might be added to culture media to enhance production of a high value product like astaxanthin.

Thesis supervisor: Dr. Sergio Sánchez Esquivel



## 2 ANTECEDENTES

Los carotenoides son los pigmentos más ampliamente distribuidos en la naturaleza. Tienen importantes funciones biológicas en animales como precursores de vitamina A, como estimulantes de la respuesta inmune y en la prevención de cáncer y otras enfermedades degenerativas. La astaxantina (3, 3' dihidroxi- $\beta$ -caroteno 4,4' diona) es el carotenoide más abundante en el mundo acuático y responsable de la atractiva pigmentación de animales como el salmón, camarón, langosta, trucha y flamings (Shahaidi y col., 1998). Sin embargo, los animales no son capaces de producir ni astaxantina ni otros carotenoides, de manera que su presencia en ellos se debe a los alimentos que consumen. Aunque no es común encontrar astaxantina en plantas superiores, se ha aislado de las flores rojas de *Adonis annua* y *Adonis aestivalis* (Britton, 1991). La astaxantina puede ser sintetizada por unos pocos microorganismos entre los que se encuentran el alga verde *Haematococcus pluvialis* (Lotan y Hirschberg, 1995), la levadura *Phaffia rhodozyma* (Miller y col., 1976; Phaff y col., 1972) y las bacterias *Brevibacterium*, *Micobacterium lacticola* (Nelis y deLeenheer, 1991), *Agrobacterium aurantiacum* y *Alcaligenes sp.* (Yokoyama y col., 1994, 1996; Yokoyama y Miki, 1995). *P. rhodozyma* es uno de los mejores candidatos para la producción comercial de astaxantina, debido a que crece rápido y a que puede cultivarse económicamente a altas densidades celulares (Johnson y Lewis, 1979; Haard, 1988; Hayman y col., 1995). Por ello varias compañías han impulsado en los últimos años el desarrollo de procesos de producción basados en esta levadura.

### 2.1 FUNCIÓN DE LOS CAROTENOIDES

Una de las funciones más importantes de los carotenoides en organismos fotosintéticos es proteger los tejidos celulares contra radicales libres oxigenados que se producen mediante la interacción del oxígeno con la luz visible o UV, y moléculas fotosensibles como bacterioclorofila o clorofila. El oxígeno singulete ( $^1O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) son moléculas sumamente reactivas que se cree son los principales agentes oxidantes en sistemas biológicos (King y col., 1995). Estas y otras moléculas oxigenadas reactivas (MOR) como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el superóxido ( $O_2^-$ ) son capaces de iniciar la peroxidación de lípidos, oxidar proteínas, o causar daño a moléculas de ADN o ARN. En las plantas la ausencia de carotenoides induce la muerte celular por daño fotoxidativo, de manera que son indispensables para la función fotosintética (Armstrong y Hearst, 1996; Armstrong, 1994). En los microorganismos no fotosintéticos, los carotenoides también

protegen a las células contra daño fotooxidativo, en este caso mediado por radicales libres producidos con la participación de otras moléculas fotosensibles como protoporfirina IX y hemo. Es decir, la presencia de estos pigmentos en todos los organismos fotosintéticos y su amplia distribución entre las bacterias y hongos no fotosintéticos, se puede explicar por su capacidad para desactivar eficientemente los radicales libres que se producen durante el metabolismo normal de las células (Armstrong, 1997; Britton, 1995). Sin embargo, la síntesis de carotenoides es solo una de las múltiples estrategias que las células han desarrollado para protegerse de los efectos nocivos de moléculas oxigenadas reactivas (MOR), otros mecanismos de defensa incluyen: a). Desactivar o eliminar MOR b). Reparar los componentes celulares oxidados cuando es posible y c). Degradar las moléculas oxidadas que no pueden repararse. Las levaduras poseen una gama de defensas antioxidantes similares a las de los eucariotes superiores (Jamieson, 1995; Pahl y Baeuerle, 1994; Tamai y col., 1993) incluyendo los carotenoides y otras moléculas antioxidantes como, glutatión y ascorbato entre otras, o enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasas, tiorredoxinas, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa entre otras (Cimino, y col., 1997; Grant y Dawes, 1996; Grant y col., 1997; Tamai y col., 1993). La regulación de la capacidad antioxidante en las células es de vital importancia, de hecho la presencia de moléculas y enzimas antioxidantes en niveles apropiados, determinan el desarrollo normal y la longevidad de las células (Sies, 1993; Munkres, 1990).

La cadena poliénica de los carotenoides es altamente reactiva y rica en electrones, por consiguiente, algunas MOR como el  $^1O_2$ , pueden transferir energía al carotenoide formando un triplete de vida corta que puede regresar después a su estado basal liberando calor. En la reacción de carotenoides con otras moléculas oxidantes es posible la adición de grupos hidroxilo al triplete o la formación de epóxidos, apocarotenos o apocarotenales, con la consecuente modificación de la molécula original (Schmidt, 1997; Krinsky, 1977; Britton, 1995). Los carotenoides y otros antioxidantes biológicos tienen diferente capacidad para neutralizar MOR, la astaxantina y el licopeno se encuentran entre las moléculas más eficaces para desactivar  $^1O_2$  (DiMascio y col., 1990). En *P. rhodozyma* se ha sugerido que la astaxantina inactiva al  $^1O_2$  y radicales peroxilo generados en su hábitat natural (flujo mucoide de abedules) o debido al metabolismo oxidativo intracelular propio (Schroeder y Johnson, 1995a y b; Johnson y Schroeder, 1996).

## 2.2 FUENTES DE MOLÉCULAS OXIDANTES

Existen muchas vías metabólicas que producen moléculas oxigenadas reactivas (MOR) durante el crecimiento aeróbico de las levaduras. El superóxido ( $O_2^-$ ) y el  $H_2O_2$  son intermediarios en la reducción de oxígeno molecular a agua, por ello se ha sugerido que la respiración mitocondrial es la fuente principal de MOR (Longo y col., 1996; Ames y col. 1993). Así mismo, se ha reportado que las mitocondrias producen  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  a velocidades linealmente dependientes de la concentración de oxígeno (Konz y col., 1998). En la generación de MOR también están implicados componentes de la cadena respiratoria, como la ubiquinona y flavoenzimas, que primero se reducen y después transfieren electrones de NADH al oxígeno formando superóxido (Konz y col., 1998; Turrens y col., 1985). La presencia en el medio de cultivo de inhibidores de la respiración como la antimicina, también produce MOR. En virtud de que la inhibición de la respiración favorece la acumulación de flavoproteínas reducidas, es probable que en el mecanismo estén implicadas la autooxidación de éstas con la producción simultánea de  $H_2O_2$  y superóxido (Konz y col., 1998; Stadtman, 1992). Por otro lado, muchas oxidasas producen  $H_2O_2$ , se pueden mencionar las que oxidan alcoholes y aldehídos primarios, y enzimas como citocromo P450 que muchas veces están implicadas en la destrucción de compuestos xenobióticos (Corbucci y col., 1986; Konz y col., 1998; Rosner y Storz, 1997; Ames y col. 1993). Considerando que *P. rhodozyma* es capaz de consumir etanol y otros alcoholes al agotarse los azúcares, es probable que este mecanismo generador de MOR pudiera contribuir en la inducción de la síntesis de carotenoides al ocurrir el cambio en el sustrato utilizado. Otra enzima, la glutatión reductasa, un componente esencial de la defensa antioxidante de levaduras, de igual forma puede reducir al oxígeno a superóxido usando NADH como fuente de electrones.

Aún cuando el  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  son moléculas relativamente poco reactivas con componentes biológicos, pueden convertirse intracelularmente en moléculas extremadamente reactivas como  $^1O_2$  y radicales  $\cdot OH$  (Khan y Kasha, 1994; Konz y col., 1998; Gutteridge, 1994; Liu y Thiele, 1997; Ames y col., 1993). En consecuencia, una excesiva producción de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  invariablemente producirá otras moléculas oxidantes y daño celular a través de mutación, inactivación de enzimas y daño a membranas (Khan y Kasha, 1994; Konz y col., 1998). Una forma común de daño celular es la causada por el  $^1O_2$  formado en presencia de moléculas fotosensibles como protoporfirina IX y hemo (Armstrong, 1997, 1994; Krinsky, 1977). Aunque no se ha descrito en la literatura, este mecanismo

podría ser relevante cuando hay una restricción del flujo de electrones en la cadena respiratoria, ya que podría promover la autooxidación de componentes de la cadena respiratoria y la liberación de sus fragmentos tales como protoporfirina IX y hemo. Estos en presencia de luz y oxígeno podrían producir estrés oxidativo, vía la generación de  $^1\text{O}_2$ .

### 2.3 *Phaffia rhodozyma*

*P. rhodozyma* es el estado asexual del microorganismo. Recientemente Golubev (1995) reportó el estado sexual y lo nombró *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Posteriormente los estudios moleculares de Fell y Blatt (1999) señalaron la existencia de más de una especie de *P. rhodozyma*, por lo que no todas son *X. dendrorhous* (ver también Kucsera y col., 1998; Medwid, 1998). Los estudios de Fell y Blatt no incluyeron la cepa NRRL Y-10922 usada en este trabajo, de manera que esta cepa puede o no ser la misma especie que *P. rhodozyma*. Puesto que el problema no puede resolverse rápidamente, el Dr. Cletus P. Kurtzman (comunicación personal al Dr. S. Sánchez) del Agricultural Research Service Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, IL ha sugerido nombrar la cepa empleada como: *Phaffia rhodozyma* (estado sexual *Xanthophyllomyces dendrorhous*).

*P. rhodozyma* es un basidiomiceto que está filogénicamente relacionado con otras levaduras productoras de carotenoides como *Rhodotorula* y *Cryptococcus*, pero se distingue de éstas por su capacidad de fermentar azúcares como la glucosa, maltosa, sacarosa y rafinosa (Johnson y An, 1991). En medios líquidos las células son esféricas u ovoides de 3.5-10.0  $\mu\text{m}$  de ancho por 5.0 a 13.5  $\mu\text{m}$  de largo, pero ocasionalmente forma pequeñas cadenas (Miller y col., 1976). Se conoce que las cepas silvestres de *P. rhodozyma* contienen de 300 a 500  $\mu\text{g}$  de carotenoides/g lev, constituyendo la astaxantina hasta el 85% de éstos. Sin embargo, la proporción puede variar dependiendo de la cepa y de las condiciones de cultivo (An y col., 1989; Calo y col., 1995b; Vázquez y col., 1997). Además de la astaxantina otros carotenoides presentes en la levadura incluyen a la equinenona, 3-hidroxi equinenona y foenicoxantina (Andrewes y col., 1976; Andrewes y Starr, 1981). Se han aislado mutantes de *P. rhodozyma* que producen en 6 días de crecimiento más de 3000  $\mu\text{g}$  astaxantina/g de levadura, sin embargo, determinaciones de carotenoides por fluorescencia en células individuales indican que niveles de 10000 a 15000  $\mu\text{g}$  astaxantina/g pueden obtenerse (Johnson y An, 1991). Las cepas altamente productoras crecen más lentamente que las cepas nativas y con frecuencia son inestables, por lo que todavía es necesario desarrollar mejores cepas de *P.*

*rhodomyza* para una eventual producción comercial. *P. rhodomyza* crece a una temperatura máxima de 22 a 25°C. en medios con concentraciones de NaCl de hasta 9% y requiere de biotina para su crecimiento. Presenta actividad de ureasa, produce polisacáridos similares al almidón, licúa la gelatina y no tiene actividad lipolítica (Miller y col., 1976; Golubev, 1995). Es capaz de asimilar una gran variedad de fuentes de carbono incluyendo la D-glucosa, maltosa, sacarosa, celobiosa, trehalosa, rafinosa, almidón soluble (latente o negativo), etanol (latente o negativo), D-manitol, salicina (débil),  $\alpha$  metil glicósido, 2-cetogluconato, lactato (latente), succinato y glicerol (débil). No crece en lactosa, galactosa, glucosamina, D-ribosa ni en D-arabinosa. En succinato y en glucono  $\delta$  lactona el crecimiento es lento pero se obtienen altas concentraciones de astaxantina. Aparentemente las fuentes de carbono de lenta asimilación promueven una mayor pigmentación de las células, pero a costa de un menor crecimiento.

## 2.4 ASTAXANTINA

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- $\beta,\beta$ -caroten-4,4'-diona) es un oxicarotenoide con un peso molecular de 596.86. Sus cristales son de color violeta oscuro, con un punto de fusión y de descomposición a 217-219 °C (Britton, 1991; Johnson y An, 1991). Es insoluble en soluciones acuosas y soluble en solventes orgánicos como diclorometano, cloroformo, acetona y dimetilsulfóxido entre otros (Britton, 1991; Johnson y An, 1991; Britton, 1995b). Como todos los carotenoides, la molécula de astaxantina es muy sensible al oxígeno, luz, calor, ácidos y álcalis. En consecuencia, durante su análisis se debe proteger contra estos agentes (Eugster, 1995; Britton, 1967; Johnson y An, 1991; Krinsky, 1979; Johnson y col., 1978; Schiedt y Liaaen-Jensen, 1995; Yuan y Chen, 1998).

## 2.5 BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES Y ASTAXANTINA

Extensos estudios durante los últimos 50 años han establecido que los rasgos generales de la formación de carotenoides son similares en plantas superiores, algas, hongos y bacterias (Bramley, 1985; Cerdá-Olmedo, 1989; Sánchez y col., 1999; Britton y Goodwing, 1971). Los carotenoides comparten las etapas iniciales de síntesis con las vías biosintéticas de una gran variedad de isoprenoides incluyendo monoterpenos, sesquiterpenos, giberelinas y esteroides. El isopentenil pirofosfato (IPP) es el precursor de todos ellos (Disch y col., 1998). La vía más conocida para su producción es la del mevalonato, que a partir de acetil-CoA produce IPP, teniendo como

intermediarios la hidroximetilglutaril CoA (HMG-CoA) y el mevalonato (Fig. 2.1). La formación de IPP por esta ruta se consideró hasta hace poco una vía universal en animales, plantas, hongos y bacterias (Disch y col., 1998). Sin embargo, recientemente se descubrió una vía alternativa que parte de piruvato y gliceraldehído-3-fosfato teniendo como intermediarios la hidroximetiltiamina y la D-1-desoxixilulosa. Esta vía se ha descrito en eubacterias (Rohmer y col., 1993), en el alga verde *Scenedesmus obliquus* y otras algas unicelulares (Schewender y col., 1996), en las plantas superiores (Lichtenthaler y col., 1997) y en cianobacterias, pero no en levaduras (Disch y col., 1998). El IPP puede isomerizarse a dimetilalil pirofosfato (DMAPP), y mediante la adición secuencial de tres moléculas más de IPP se convierte en geranil-geranil pirofosfato (GGPP). Los intermediarios formados durante estas adiciones son precursores de una gran variedad de isoprenoides entre los que se encuentran los esteroides y la ubiquinona (Armstrong, 1997; Armstrong, 1994; Bach, 1995; Goodwin, 1993). A partir de GGPP hay una gran variedad de rutas para la formación de carotenoides y xantofilas, dependiendo de cada organismo. Sin embargo, en muchos organismos la condensación de dos moléculas de GGPP produce el fitoeno que es el primer precursor de los carotenoides. En organismos no fotosintéticos, una sola enzima lleva a cabo las desaturaciones para transformar el fitoeno en neurosporeno. Después una ciclasa actúa sobre los extremos de ésta molécula para producir en varios pasos  $\beta$ -caroteno. Las reacciones para introducir los grupos oxigenados en los carotenoides tienen las características típicas de las reacciones mediadas por monooxigenasas, es decir, requieren de oxígeno, hierro como centro catalítico, dos electrones y dos protones (Sandmann, 1994).

En *P. rhodozyma* la astaxantina y sus precursores oxigenados se forman por la oxidación enzimática del  $\beta$ -caroteno (Fig. 2.1). La síntesis de astaxantina es inhibida por metirapone y piperonil butóxido, compuestos que inhiben reacciones de monoxidación mediadas por citocromo P450 (Johnson y An 1991). En otras levaduras, como *S. cerevisiae*, se ha demostrado que el citocromo P450 participa en la desaturación, hidroxilación y formación de anillos de intermediarios de la síntesis de esteroides (Jefcoate, 1986). Considerando estos antecedentes y por analogía, An y col. (1989) han propuesto que el citocromo P450 o alguna oxigenasa tal como una flavoenzima o peroxidasa podría participar en la desaturación y oxigenación de los carotenoides en *P. rhodozyma*. No obstante, un análisis de los genes *crt Z* y *crt W* responsables de introducir los grupos oxigenados de la astaxantina en bacterias marinas, ha revelado motivos característicos de enzimas que contienen Fe no-hemo semejantes a los de las desaturasas de ácidos grasos (Fraser y col. 1997). Es interesante que las



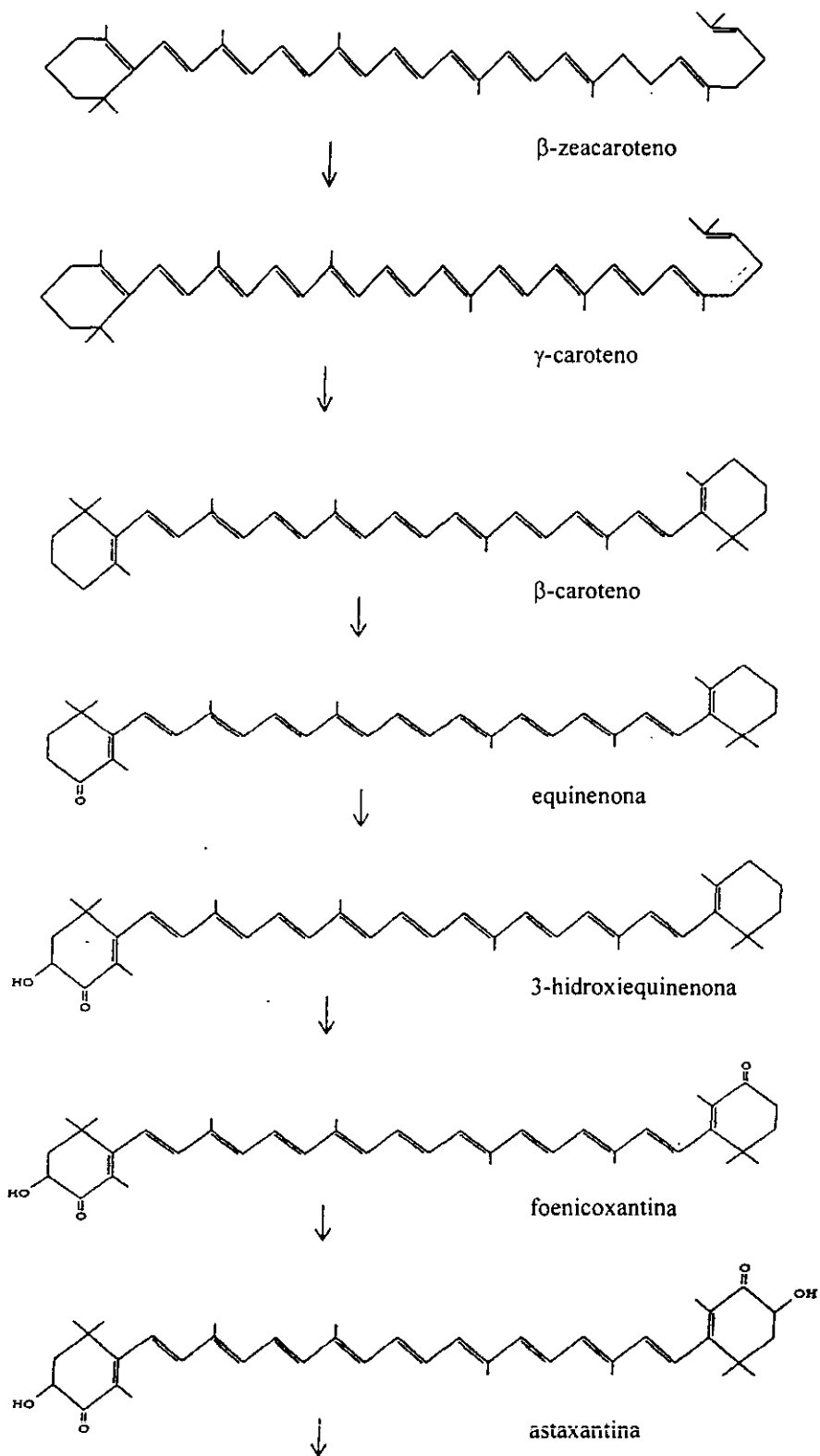


Fig. 2.1 cont.....Ruta biosintética de astaxantina en *P. rhodozyma*



desaturasas de ácidos grasos y las hidroxilasas de hidrocarburos tienen un plegamiento similar, posiblemente debido que se originaron de un ancestro común (Shanklin y col., 1994).

La biosíntesis de astaxantina se ha estudiado en los principales microorganismos productores: *P. rhodozyma*, *H. pluvialis*, *Agrobacterium aurantiacum*, *Alcaligenes sp.* En la tabla 2.1 se muestran los genes que participan en la biosíntesis de carotenoides en bacterias. Recientemente se han aislado de la bacteria marina *A. aurantiacum*, los genes *crtE*, *crtW*, *crtZ*, *crtY*, *crtI* y *crtB* involucrados en la formación de astaxantina y sus intermediarios (Misawa et al, 1995). El gen equivalente a *crtW* también ha sido aislado del alga *H. pluvialis* y se le ha llamado *bkt* (Kajiwara y col., 1997). Las funciones de estos genes fueron determinadas mediante la complementación in vivo en *Escherichia coli*, manteniendo los genes epíficos de la carotenogénesis (presentes en un plásmido) de *Erwinia uredovora* (Sandmann y col., 1990).

Tabla 2.1. Genes que participan en la biosíntesis de carotenoides en bacterias

<b>Función enzimática</b>	<b>Gen</b>
<i>Formación de fitoeno y sus precursores</i>	
GGPP sintasa	<i>crtE</i>
Fitoeno sintasa	<i>crtB</i>
<i>Formación de licopeno</i>	
Fitoeno desaturasa	<i>crtI</i>
<i>Formación de β-caroteno</i>	
Licopeno ciclasa	<i>crtY</i>
<i>Formación de xantofilas</i>	
β-caroteno hidroxilasa	<i>crtZ</i>
β-C-4-oxigenasa	<i>crtW</i>

Los productos de los genes *crtZ* (3.3'-hidroxilasa) y *crtW* (4,4'-oxigenasa) que participan en la inserción de los grupos oxigenados al β-caroteno se han caracterizado en las bacterias *A. aurantiacum*, *Alcaligenes sp.* cepa PC-1 y *E. uredovora* (Misawa et al, 1995). Estas enzimas requieren de oxígeno y la presencia de Fe<sup>2+</sup> como cofactor (Fraser y col., 1997). Además, son

bifuncionales en su actividad y se han descrito las diferentes alternativas posibles de oxidación de  $\beta$ -caroteno a astaxantina. La enzima 3,3'-hidroxilasa, por ejemplo, puede introducir grupos hidroxilo en las posiciones 3,3' en el anillo de la  $\beta$ -ionona a pesar de la formación previa del grupo ceto en la posición 4,4'. La enzima 4,4'-oxigenasa posee la capacidad de introducir grupos ceto en las posiciones 4,4' a pesar de la hidroxilación previa. Sin embargo, la formación de un grupo ceto es más favorable después de la hidroxilación (Fraser y col., 1997). En ensayos in vitro las enzimas transformaron carotenoides adicionados directamente a una solución acuosa. La 3,3'-hidroxilasa (de *A. aurantiacum* y *Alcaligenes sp.* cepa PC-1), convirtió foenicoxantina (adonirrubina) a astaxantina, la 3,3'-hidroxiequinenona a 4-cetozeaxantina (adonixantina), la 3'-hidroxiequinenona a 4-cetozeaxantina y también la equinenona a 4-cetozeaxantina vía 3- y 3'-hidroxiequinenona. Por su parte, la 4,4'-oxigenasa (de *A. aurantiacum*, *Alcaligenes sp.* cepa PC-1 y *H. pluvialis*) convirtió la 4-cetozeaxantina a astaxantina, la 3-hidroxiequinenona a foenicoxantina, la 3'-hidroxiequinenona a foenicoxantina, y la equinenona a cantaxantina (Fraser y col., 1998). Los seis genes descritos anteriormente se han introducido en una cepa de *C. utilis* que acumula ergosterol. Las cepas resultantes acumulan licopeno,  $\beta$ -caroteno y astaxantina. La cantidad de astaxantina producida por una de las cepas fue semejante a la obtenida con cepas silvestres de *P. rhodozyma*, presumiblemente al recanalizarse el carbono de la síntesis de ergosterol hacia la síntesis de carotenoides. El mismo sistema de transformación se utilizó para *P. rhodozyma* (Miura y col., 1998, 1998b), aunque los genes de biosíntesis de esta levadura son aún desconocidos (Wery y col., 1997).

Por analogía con la síntesis de otros isoprenoides, es de esperar que al menos algunas de las etapas de la síntesis de los carotenoides se lleve a cabo en el retículo endoplasmático liso. Los productos podrían también ser transportados al citoplasma en vesículas lipídicas o en complejos con lipoproteínas. Los carotenoides generalmente se depositan en la proximidad de los sistemas enzimáticos que generan formas tóxicas de oxígeno tales como las mitocondrias y otros microcuerpos (peroxisomas, glioxisomas, glioxiperxisomas).

## **2.6 REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE CAROTENOIDES Y DE ASTAXANTINA**

En varios organismos productores de carotenoides se han identificado algunos de los genes cuyos productos participan en la regulación por luz, producto final y compuestos químicos entre otros (Bramley y Mackenzie, 1988). La fotorregulación de la síntesis de carotenoides ha sido reportada en

al menos 15 hongos y en varias algas. Se cree que la traducción de la señal luminosa es mediada por radicales libres formados intracelularmente al interactuar la luz, el oxígeno y moléculas fotosensibles como la protoporfirina IX, hemo y otras (Bramley y MacKenzie, 1988; Johnson y An, 1991). Hodgson y Murillo, 1993 han propuesto un interesante modelo de regulación de la síntesis de carotenoides en *Myxococcus xanthus*, en el que el  $^1\text{O}_2$  producido en la membrana celular por la interacción entre el  $\text{O}_2$ , la luz azul y la protoporphyrina IX induce la síntesis. Al aumentar la concentración de carotenoides, el  $^1\text{O}_2$  es desactivado y en consecuencia la expresión de los genes implicados es reprimida, completándose así el ciclo regulatorio.

En plantas y en *S. cerevisiae*, el control global de la vía del mevalonato ocurre en las etapas iniciales de la síntesis de isoprenoides (Goldstein y Brown, 1990), particularmente en la enzima hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMGR). La formación de mevalonato en *S. cerevisiae* es regulada al menos parcialmente por represión catabólica y por la concentración de oxígeno. Debido a que esta enzima requiere de NADPH como cofactor, se ha sugerido que la actividad de la enzima es regulada también por la relación NADPH/NADP<sup>+</sup> (Gray, 1987).

La regulación por producto final o bien por algún intermediario de la biosíntesis es otro mecanismo regulatorio común en varios organismos. En las levaduras, la HMGR es retroregulada por intermediarios tempranos y por intermediarios tardíos (regulación cruzada) de la vía de los isoprenoides (Hampton y col., 1996; Brown y Goldstein, 1980). En preparaciones complejas de membranas (in vitro), la desaturación de fitoeno es inducida por la luz y  $\text{O}_2$ , requiriendo de NADP<sup>+</sup> o FAD como cofactores (Sandmann, 1994; Armstrong, 1994, 1997). Además, la actividad de las enzimas fitoendosaturasas de *Phycomyces blakesleeanus* y de *Synechococcus* es modulada por los carotenos subsiguientes de la vía. La mayor inhibición ocurre con el producto más desaturado, el licopeno. Una menor desaturación o la presencia de anillos  $\beta$ -ionona dan lugar a una menor inhibición (Sandmann, 1994; Armstrong, 1997). En *P. blakesleeanus* un mecanismo principal de regulación de la síntesis de  $\beta$ -caroteno es por producto final, el cual parece operar a nivel de síntesis de proteínas y es mediada por un complejo de  $\beta$ -caroteno y los productos de los genes *carS* y *carA* (Bejarano y col., 1988; Bramley y Mackenzie, 1988). En *P. rhodozyma*, la producción de astaxantina es inhibida por  $\beta$ -ionona, que posee un anillo análogo a los del  $\beta$ -caroteno (Lewis y col., 1990). Además, varias líneas de evidencia indican que la vía de síntesis de astaxantina es retroregulada también por producto final (Johnson y Schroeder, 1996; Schroeder y Johnson, 1995b).

La síntesis de astaxantina en *P. rhodozyma* se reduce drásticamente en condiciones microaerofílicas, acumulándose principalmente  $\beta$ -caroteno y  $\beta$ -Zeaxantina (Johnson y Lewis, 1979). Esto sugiere que los grupos oxigenados de la astaxantina sólo se forman en presencia de ciertos niveles de oxígeno. Johnson y Lewis han sugerido mantener una tensión de oxígeno mayor de 30% para una adecuada producción de astaxantina. La presencia de  $^1\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  fotogenerados artificialmente o de inhibidores de la cadena respiratoria como la antimicina, en presencia de luz, inducen la síntesis de astaxantina en *P. rhodozyma* (Schroeder y Johnson, 1995a y b). En virtud de que la antimicina puede estimular la producción de especies de oxígeno reactivas, la inducción por antimicina también podría ser mediada por estrés oxidativo (An y Johnson, 1990). La estimulación de la carotenogénesis por estrés se ha observado en otros microorganismos. En el alga verde *H. pluvialis* la biosíntesis de astaxantina está asociada con la formación del quiste celular que ocurre en presencia de  $\text{O}_2$  y de luz (Chumpolkulwong et al, 1997). Ambos procesos, la carotenogénesis y el enquistamiento son estimulados en condiciones de estrés por sal (Kobayashi et al, 1997; Cordero y col., 1996). La síntesis de ubiquinona, que al igual que los carotenoides, tiene como precursor al geranilgeranilpifosfato, es regulada también por luz, aparentemente en coordinación con la síntesis de carotenoides (Johnson y An, 1991).

Otro mecanismo regulador de la síntesis de carotenoides es la represión catabólica por glucosa. En algunas cepas de *E. herbicola* (Eho10), así como en *Escherichia coli* transformada con los genes *crt* de la primera, la biosíntesis es reprimida por glucosa mediante un mecanismo dependiente de AMPc. Sin embargo, este efecto no se observa en todas las cepas de *E. herbicola* (Armstrong, 1994, 1997). En cepas nativas de *P. rhodozyma* y en *M. xanthus*, también existen evidencias de que la represión catabólica por carbono es un mecanismo regulatorio (Johnson y Schroeder, 1996; Armstrong, 1997). En *P. rhodozyma* concentraciones altas de glucosa promueven además un metabolismo fermentativo (Johnson y Lewis, 1979; Fang y Cheng, 1993). Entre 11 fuentes de carbono, la celobiosa produce la mayor pigmentación, pero otros disacáridos como la maltosa y sacarosa también dan buenos resultados de pigmentación. Aparentemente las fuentes de carbono de asimilación lenta promueven una mayor pigmentación de las células, pero a expensas de un menor crecimiento. Es interesante mencionar que otras moléculas implicadas en la defensa antioxidante de levaduras también son reprimidas por glucosa. La síntesis de MnSOD es reprimida por glucosa al igual que los componentes de la cadena respiratoria. Los niveles de MnSOD y CuZnSOD aumentan

significativamente al aumentar la tensión de oxígeno disuelto, lo que podría indicar una regulación coordinada con otros componentes al elevarse la concentración de oxígeno (Westerbeek y col., 1998).

Otros factores como los cambios en la velocidad de crecimiento, la edad del cultivo, algunos agentes químicos, la limitación de algún nutriente etc. afectan la síntesis de carotenoides en hongos. En la mayor parte de los estudios realizados con *P. rhodozyma*, la formación de astaxantina está asociada al crecimiento, en especial en cepas mutantes (Johnson y Lewis, 1979; Fang y Chiou, 1996; Meyer y du Preez, 1994a). En contraste, en cepas nativas es común un aumento del contenido de astaxantina de las células en la fase estacionaria temprana (Velázquez, 1995). En *Rhodotorula* y *Sporobolomyces roseus* la síntesis ocurre después de que el crecimiento ha cesado, lo que sugiere que el agotamiento de nutrientes o un cambio en la fisiología del microorganismo disparan en estos casos la carotenogénesis. Esto también es común en hongos como *P. blakesleeanus* y *Epicoccum nigrum*, en los que la síntesis de pigmentos no empieza hasta que el crecimiento ha cesado. En estos casos la formación de carotenoides es estimulada por exceso de carbohidratos y deficiencia de nitrógeno (Bramley y Mackenzie, 1988). Los carotenoides específicos producidos por *P. rhodozyma* y el contenido celular, puede también ser alterado por cambios en la composición del medio de cultivo y por la influencia de otros factores ambientales (Meyer y du Preez, 1994b; Calo y col. 1995a; Meyer y du Preez, 1993; Johnson y An, 1991). Algunos grupos de compuestos químicos que se sabe afectan la carotenogénesis en diversos microorganismos incluyen terpenos, iononas, aminas, alcaloides y antibióticos como la penicilina (Bramley y Mackenzie, 1988; Calo y col. 1995a; Meyer y du Preez, 1993). Sin embargo, poco o nada se conoce de los mecanismos implicados en la estimulación. Otros factores que se han reportado como estimuladores de la formación de carotenoides incluyen: alimentación incrementada de fuente de carbono (Fleno y col., 1988; Yamane y col., 1997; Reynders y col., 1996, 1997), presencia de aminoácidos como metionina, valina, glicina, triptófano, fenilalanina, tirosina, y leucina (Meyer y col., 1993; Meyer y du Preez, 1994b), uso de fuentes de carbono como glicerol (Johnson y col. 1994; Fleno y col. 1994), etanol (Yamane y col., 1997, 1997b), acetato (Meyer y du Preez, 1993), xilosa (Parajó y col., 1997,1998), succinato, adición de piridoxina, residuos de jitomate, altos o bajos niveles de fosfatos, limitación de hierro, cobre, cinc o manganeso, pH, inhibidores de fosfatasas como fluoruro de sodio (Bramley y Mackenzie, 1988; Johnson y An, 1991),  $\alpha$ -pineno y limoneno (Meyer y col., 1994) entre otros

factores (Okagbue y Lewis, 1984b; Hsu y col., 1990; Kakizono y col., 1992; Kobayashi y col., 1991; Acheampong y Martin, 1995; Martin y col., 1993, 1993b).

## 2.7 USOS Y PRODUCCIÓN DE LA ASTAXANTINA

En los últimos diez años se han considerado muy seriamente a la levadura *P. rhodozyma* y al alga *Haematococcus pluvialis* como posibles fuentes comerciales de astaxantina. Sin embargo, las cepas silvestres de *P. rhodozyma* producen astaxantina a concentraciones de solo 500 µg/g o menos (Johnson y Lewis, 1979). Para hacer económicamente factible la producción comercial fue necesario obtener mutantes con un contenido mínimo de 3000 µg/g. Por ello, se ha dedicado un considerable esfuerzo de investigación a la obtención de cepas hiperproductoras (Soon y col., 1992; Adrio y Veiga, 1995; Adrio y col., 1993, 1995; An y col., 1991; Armstrong y Hearst, 1996; Bon y col., 1997; Cifuentes y col., 1997; Girard y col., 1994; Herrera y col., 1997; Jacobson y col., 1995; Lewis y col., 1990; An y col., 1996; Misawa y col., 1990, 1991; Nagy y col., 1997; Palagyi y col., 1995; Perry y col., 1986; Prevatt y col., 1991; Santopietro y col., 1995; Chapman y col., 1991; Hunter y col., 1994; Wery y col., 1996, 1997). En esta década varias compañías como Phillips Petroleum, Ingene, Universal Foods y Gist Brocades han iniciado o anunciado la producción comercial de astaxantina utilizando esta levadura (Johnson y Schroeder, 1995). Por otra parte, la compañía Microbio Resources Inc. ha desarrollado un proceso que emplea el alga *Haematococcus pluvialis*. El producto se comercializa con el nombre de Algaxan Red,<sup>®</sup> con un contenido de astaxantina del 1%, que compite favorablemente con la astaxantina producida sintéticamente (Johnson y Schroeder, 1995).

Las compañías Roche y BASF son las mayores productoras de carotenoides sintéticos en el mundo (Nonomura, 1990; Paust, 1996; Pfander y col., 1996). Estas compañías producen los carotenoides siguientes: β,β-caroteno, cantaxantina y astaxantina, y los apocarotenoides citranaxantina, β-apo-8'-carotenal y el éster etílico del ácido β-apo-8-carotenoico. Roche comercializa un producto denominado Carophyll pink que contiene 5% de astaxantina (Bernhard, 1990). Una parte esencial del proceso industrial, aunque costosa, es la transformación del compuesto puro y cristalino en formulaciones apropiadas para diferentes aplicaciones comerciales (Britton y col., 1996). La astaxantina se comercializa a un precio de más de \$2000 USD por kilogramo.

La astaxantina y otros carotenoides se han usado tradicionalmente como pigmentos en dietas de salmón, trucha, gamba y camarón criados en cautiverio (Nakano y col., 1995, 1999; Simpson y col., 1981; Nelis y De Leenheer, 1991; Johnson y col., 1980; Klaui y Bauernfeind, 1981; Fletcher, 1992; Gobantes y col., 1998; Marusich y Bauernfeind, 1981; Spencer, 1989; Feofilova, 1994; Okagbue y Lewis, 1984). Durante los últimos 5 años, en México se han producido notables aumentos en el cultivo de camarón y en la demanda de productos ricos en astaxantina para su pigmentación. Por otro lado, la astaxantina es también un potente antioxidante, con una actividad que podría ser superior a la del  $\beta$ -caroteno y otros carotenoides presentes en plantas tales como la luteína, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina y cantaxantina (DiMascio, 1990; Schroeder y Johnson, 1995a y 1995b). Por ello en los últimos 10 años, se ha generado un interés considerable en la astaxantina y otros carotenoides al considerárseles posibles preventivos de cáncer (Block y col., 1992; Olson y Krinsky, 1995; Johnson y Schroeder, 1995b; Mobarhan y col., 1994; Peng y col., 1998), arteriosclerosis (Gaziano, 1994; Fuhrman, 1997; Gey, 1998), cataratas (Tso y Lam, 1996; Seddon y col., 1994) y otras enfermedades degenerativas producidas por daño fotooxidativo (Mathews-Roth, 1993; Palozza y Krinsky, 1992; Schroeder y Johnson, 1993; Ying y Cheng, 1997; Parker, 1996). Otro motivo de interés de los carotenoides en la prevención de enfermedades se debe a su capacidad de estimular la respuesta inmune en mamíferos (Mayne 1996; Schmidt, 1997).

## 2.8 PRODUCCIÓN Y REASIMILACIÓN DE ETANOL EN LEVADURAS.

Una peculiaridad de *P. rhodozyma* entre las levaduras carotenogénicas es su capacidad de fermentar a la glucosa (Johnson y Lewis, 1979). Concentraciones iniciales de glucosa mayores de 10-15 mg/ml y/o bajas tensiones de oxígeno promueven el metabolismo fermentativo en *Phaffia rhodozyma*. En estas condiciones la producción de astaxantina se reduce notablemente en paralelo con el rendimiento celular ( $Y_{x/s}$ ) y  $\mu_{max}$  (Johnson y Lewis, 1979; Fang y Cheng, 1993). Durante la fermentación, el piruvato procedente de la glucólisis es convertido a etanol y en menor grado a ácido acético. Esto se debe principalmente a los ampliamente conocidos efectos represivos de la glucosa sobre enzimas respiratorias y del ciclo de Krebs (Heinisch y Hollenberg, 1993; Vries y Marres, 1987). En contraste, al disminuir la concentración de glucosa y aumentar la de oxígeno muchas levaduras incluyendo *P. rhodozyma*, son capaces de utilizar fuentes de carbono no fermentables como el etanol (Pons y col., 1986; Yamane y col., 1997b). El etanol generalmente es oxidado vía acetaldehído-acetato-acetil-CoA para alimentar el ciclo de Krebs. (Vries y Marres, 1987; Heinisch y

Hollenberg, 1993). Los efectos producidos por el etanol en cerca de 60 tipos diferentes de células incluyendo bacterias, levaduras, hongos, animales y plantas han sido estudiados por Jones. (1989). En las levaduras los efectos directos del etanol sobre vías metabólicas parecen ser mínimos comparados con los producidos por su metabolismo. Efectos que son comunes en todos los tipos de células incluyen: 1). Aumento de la relación NADH/NAD<sup>+</sup> y la consecuente inhibición del ciclo de Krebs 2). Bloqueo de la división celular y de la replicación 3). Afecta negativamente la viabilidad (>5-15 mg etanol/ml) 4). Acumulación de acetaldehído y de acetato.

En muchos tipos de células incluyendo a las levaduras, la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) depende de NAD<sup>+</sup> como cofactor (Jones, 1989). Por esta razón, el metabolismo de etanol eleva la relación NADH/NAD<sup>+</sup> en las células, ocasionando importantes consecuencias como: a) Inhibición de la conversión de piruvato a acetyl-CoA. b) Inhibición de la descarboxilación oxidativa en el ciclo de Krebs c) Disminución de la respiración y de la gluconeogénesis (>10 mg etanol/ml). En condiciones oxidativas el ciclo de Krebs es la única fuente de esqueletos carbonados y ATP para la síntesis de aminoácidos, ácidos nucleicos y para la gluconeogénesis. En consecuencia, la inhibición controla el crecimiento por deficiencia de precursores para la síntesis. Se ha postulado que la tolerancia de las levaduras a etanol en condiciones oxidativas se debe a la mutación en enzimas ADH, lo que reduce la velocidad de oxidación de etanol y en consecuencia la inhibición del ciclo de Krebs.

La vía más universal del metabolismo de acetaldehído es catalizada por la enzima aldehído deshidrogenasa (Jones, 1989):  $\text{acetaldehído} + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD(P)}^+ \longrightarrow \text{acetato} + \text{NAD(P)H} + \text{H}^+$

La producción de NAD(P)H amplifica el desbalance redox y la inhibición del ciclo de Krebs. Además, el acetato producido por esta reacción inhibe las enzimas del ciclo del glioxilato, alterando el metabolismo de lípidos y causando la acumulación de acetyl-CoA. Este último evento regula a su vez las etapas metabólicas sensibles a la disponibilidad de acetyl-CoA (Jones, 1989). *Phaffia* es muy sensible a inhibición por ácido acético, sin embargo, este efecto es menos severo en presencia de glucosa. El crecimiento se inhibe por completo a concentraciones tan bajas como 2 mg/ml (Meyer y du Preez, 1993). El acetaldehído es también un potente inhibidor de las funciones celulares a concentraciones por arriba de 500 μM. Puesto que el desbalance de NADH/NAD<sup>+</sup> inhibe enzimas que consumen acetaldehído, la posibilidad de acumulación es real (Jones, 1989). Los siguientes son algunos efectos documentados del acetaldehído: 1) La síntesis de RNA in vitro se inhibe a 10 mM 2)



Ocurre ruptura de DNA a concentraciones tan bajas como 20  $\mu\text{M}$ , la síntesis se bloquea in vitro a 250 mM. 3) A mayores concentraciones el DNA se entrecruza y puede ocurrir también entrecruzamiento de DNA-proteína 4). La síntesis de proteína es inhibida 50% in vivo a 60 mM 5). Otras enzimas membranales pueden inhibirse son la ATPase, succinato deshidrogenasa, cytochromo oxidasa. Todo esto se ha sugerido como posibles causas que bloquean el metabolismo funcional de levaduras que utilizan etanol.

## 2.9 JUSTIFICACIÓN

Varios trabajos en la literatura han mostrado que diversos factores ambientales, incluyendo los constituyentes del medio de cultivo, afectan la síntesis de astaxantina en *P. rhodozyma* (Johnson y An 1991). Es decir, la producción de astaxantina puede alterarse mediante la manipulación de las condiciones de cultivo. El cultivo en lote alimentado es un sistema que permite una gran flexibilidad para controlar las condiciones de cultivo en virtud de que en este sistema pueden adicionarse nutrientes (sustrato limitante por ejemplo) o precursores de productos del metabolismo. Otras ventajas en comparación con otros sistemas de cultivo incluyen: a). La concentración celular puede incrementarse por un factor de 5-10 comparado con un cultivo en lote b). Las condiciones de cultivo pueden controlarse inicialmente para producir una alta concentración celular y después para una óptima síntesis del producto c). Es posible adicionar la fuente de carbono de acuerdo a la demanda para mantener concentraciones relativamente bajas en el medio de cultivo y así eliminar o minimizar efectos de represión catabólica por fuente de carbono d). Permite utilizar precursores u otras sustancias que inhiben el crecimiento a concentraciones moderadas. En levaduras, los azúcares tienen efectos regulatorios sobre muchas enzimas. En particular, altas concentraciones de glucosa promueven la formación de etanol y reducen el rendimiento de biomasa ( $Y_{x/s}$ ), aún en presencia de oxígeno. Para obtener altos rendimientos de levadura se ha sugerido que el crecimiento debe llevarse a cabo en condiciones de limitación de sustrato. De aquí que durante décadas se haya reconocido la necesidad de una cuidadosa dosificación de sustrato en cultivos en lote alimentado. Por otra parte, la biosíntesis de muchos productos del metabolismo secundario de los microorganismos parece estar estrechamente ligada al metabolismo de nitrógeno (Grafe, 1982). Esto se debe a lo siguiente: a). Se sospecha que la limitación de nitrógeno dispara la expresión del metabolismo secundario b). Un exceso de nitrógeno amoniacal o amínico puede suprimir la síntesis c). La adición de fuentes de nitrógeno poco después de iniciada la producción puede suprimir la síntesis de metabolitos d).

Algunos aminoácidos y compuestos nitrogenados estimulan el metabolismo secundario, al parecer participando como disparadores de la diferenciación e). Altos niveles de amonio pueden suprimir el metabolismo secundario y también la diferenciación morfológica. Las causas de estos fenómenos parecen ser muy complejas y se entienden pobremente hasta ahora, sin embargo, reflejan la importancia del metabolismo de nitrógeno en el metabolismo secundario de muchos microorganismos. Considerando que se han realizado muy pocos estudios en lote alimentado con *P. rhodozyma*, así como la importancia de la dosificación de sustrato y del metabolismo de nitrógeno en la síntesis de metabolitos secundarios, se decidió llevar a cabo un diseño factorial fraccionado  $2^{3-1}$  para estudiar los efectos de la velocidad de alimentación de sustrato, la concentración de la fuente de nitrógeno y el uso de dos fuentes de nitrógeno, extracto de levadura (EL) o una mezcla de extracto de levadura/sulfato de amonio, sobre la producción de carotenoides en este sistema de cultivo. Para esto se tomó como base el medio optimizado por Velázquez (1995) en el que se logró, usando un fermentador de 4 L, una producción máxima de carotenoides de 11.3  $\mu\text{g}/\text{m}$  en cultivos en lote.

En experimentos con diseños factoriales, en muchos casos no es necesario realizar todos los experimentos del factorial completo para obtener una idea clara de los efectos de los factores estudiados (Box y col. 1989). Esto se debe a que la importancia de los efectos principales tiende a ser mayor que los de las interacciones de dos factores, que a su vez tienden a ser mayores que las interacciones de 3 factores y así sucesivamente. Sí se puede prescindir de las interacciones entre los factores, la información sobre los efectos principales puede obtenerse con frecuencia realizando sólo una fracción del diseño factorial completo. Para estudiar 3 factores a dos concentraciones diferentes designadas + para valor alto y - para el valor bajo, se requieren de  $2^3 = 8$  experimentos (factorial completo). Considerando que cada experimento en fermentador requiere de aproximadamente un mes de trabajo, se decidió realizar inicialmente solo la mitad de los experimentos de diseño factorial completo. Después de analizar los resultados y en especial las cinéticas de los experimentos realizados, se tomó la decisión de no realizar los experimentos restantes. En su lugar, se plantearon experimentos para estudiar el efecto de diferentes nutrientes en medios químicamente definidos como se describe a continuación.

Durante el curso de la evolución los microorganismos necesariamente debieron adquirir una gran flexibilidad para adaptarse a cambios ambientales como la disponibilidad de nutrientes, temperatura,

pH etc.. La limitación de nutrientes produce un gran número de respuestas adaptativas, una de las cuales es la producción de metabolitos secundarios. En muchos casos la producción de metabolitos secundarios es parte de una estrategia de supervivencia en ciertos ambientes y por ello es una propiedad estable en los microorganismos. Varios investigadores han estudiado los efectos de diferentes ingredientes sobre *P. rhodozyma* en medios que contienen fuentes complejas de nutrientes como la peptona, extracto de malta, extracto de levadura y jugo de uva entre otros (Schroeder y Johnson, 1995a; Meyer y du Preez, 1994a; Fang y Cheng, 1993; Parajó y col., 1998b; Acheampong y Martin, 1995; Vázquez y Martin, 1998). Aunque estos medios son útiles porque contienen todos los nutrientes, tienen la desventaja de no tener una composición química definida y, además, en muchos casos la composición puede ser variable. Debido a que no es posible identificar al nutriente limitante, los resultados obtenidos en éstos medios son muchas veces difíciles de interpretar y fácilmente se pueden pasar por alto efectos regulatorios importantes. Por ello, para estudiar los efectos de los diferentes componentes del medio de cultivo siempre es deseable hacerlo en medios químicamente definidos. En un experimento preliminar (en fermentador), se observó un efecto negativo en la producción de carotenoides al adicionar un cóctel de sales minerales. Con estos antecedentes y considerando que se conoce muy poco o nada sobre la producción de astaxantina con *P. rhodozyma* en medios mínimos, la segunda parte de este trabajo se dedicó a investigar los efectos de diferentes componentes del medio sobre la producción del pigmento. Considerando lo anterior se plantearon las siguientes:

## 2.10 HIPÓTESIS

- La producción de carotenoides puede mejorarse mediante el establecimiento de cultivos en lote alimentado a alta densidad celular (>50 mg/ml).
- La velocidad de adición de sustrato, la concentración de nitrógeno y la fuente de nitrógeno son factores que afectan substancialmente la producción de carotenoides en cultivos por lote alimentado de *P. rhodozyma*.
- Las condiciones óptimas para la producción de astaxantina no necesariamente coinciden con las condiciones óptimas para el crecimiento de *P. rhodozyma*.

- El estudio de los efectos del amonio, fosfatos, magnesio, potasio, cobre y hierro en medios químicamente definidos, permitirá un mejor entendimiento del metabolismo y de la regulación de la síntesis de carotenoides en *P. rhodozyma*.

Considerando éstas hipótesis se plantearon los siguientes:

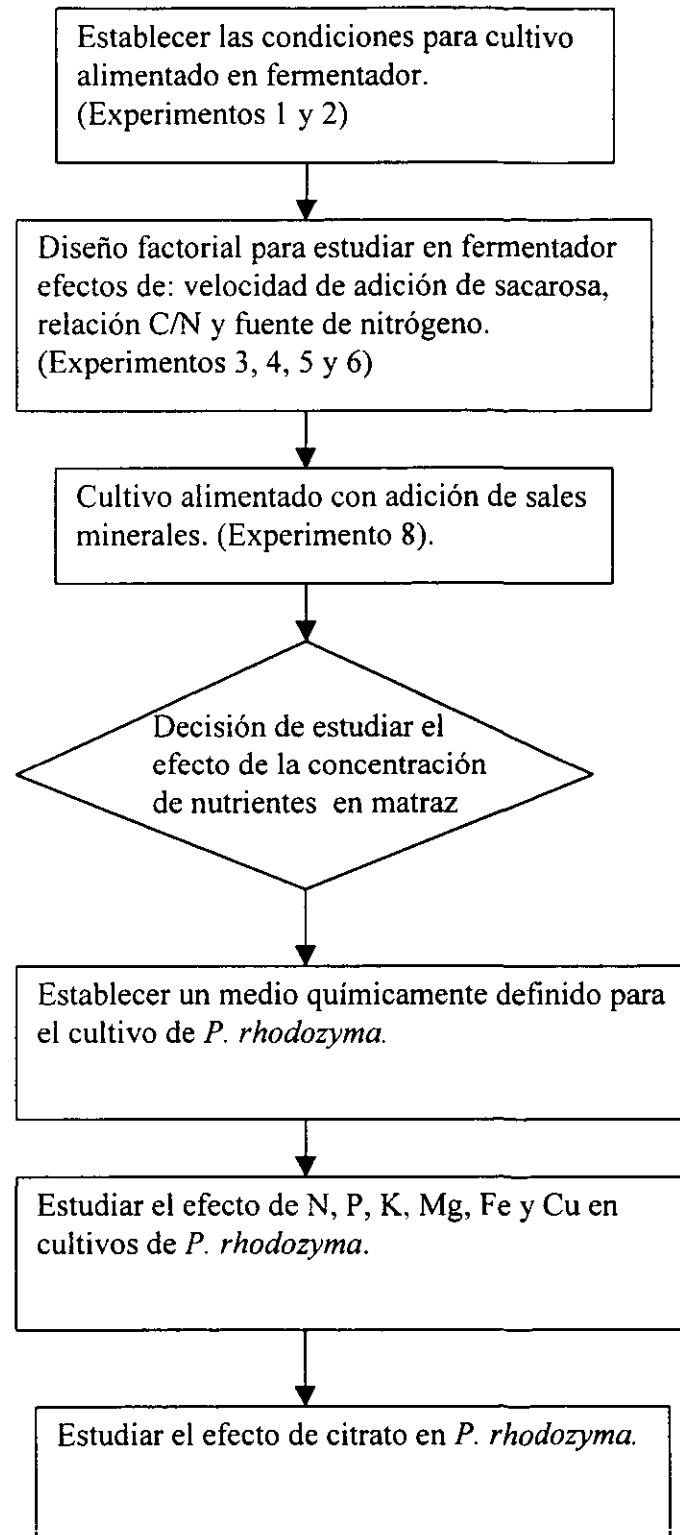
### 2.11 OBJETIVOS

- 1.- Establecer en fermentador cultivos por lote alimentado de *P. rhodozyma* a densidades celulares de al menos 50 mg/ml.
- 2.- Estudiar los efectos de la velocidad de alimentación de fuente de carbono, la relación carbono/nitrógeno y el uso de dos fuentes de nitrógeno en cultivos por lote alimentado para establecer las mejores condiciones para la producción de carotenoides en este sistema de cultivo.
- 3.- Investigar el efecto de la concentración de nitrógeno, fosfato, magnesio, cobre, hierro y potasio en la producción de carotenoides y astaxantina por *P. rhodozyma* en medios químicamente definidos.

De los objetivos anteriores se derivaron los siguientes objetivos particulares:

- Alcanzar una concentración superior a 25  $\mu\text{g/ml}$  de carotenoides totales en un cultivo con una densidad celular de al menos 50 mg/ml de *P. rhodozyma*.
- Analizar la regulación de la síntesis de carotenoides a partir de los efectos observados en medios químicamente definidos con diferentes concentraciones de nitrógeno, fosfato, magnesio, cobre, hierro y potasio.

### 3 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 4 MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 MICROORGANISMO

Se utilizó una cepa silvestre de *Phaffia rhodozyma* NRRL-Y-10922 (estado sexual *Xanthophyllomyces dendrorhous*) la cual fue proporcionada por el Agricultural Research Service Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, IL.

### 4.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de los experimentos en fermentador (50 ml aprox.) se mantuvieron congeladas a  $-20$  °C hasta su análisis. En los experimentos en matraz, al concluir la incubación se retiraron los matraces de la incubadora, se tomaron en tubos de ensaye las muestras requeridas para peso seco (6 mL) y proteína (2 ml). Estas muestras se centrifugaron a 3500 r.p.m. durante 10 minutos en una centrifuga clínica. Después de separar el sobrenadante, el paquete celular lavado con 5 ml de agua destilada, se centrifugó nuevamente y se usó para los análisis respectivos. Los sobrenadantes y los restantes de las muestras el medio fermentado se conservaron por separado en congelación a  $-20$  °C hasta que se realizaron los análisis restantes.

### 4.3 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

Se usó el método de Biuret como se describe en Gornall y col., 1949. Este método se basa en la formación de complejos de color púrpura por la reacción de sustancias que contienen enlaces peptídicos con soluciones alcalinas de sales de cobre. Para disolver la proteína contenida en el paquete celular obtenido por centrifugación de 2-3 ml de caldo fermentado (1 a 10 mg de proteína), las células se resuspendieron en 0.5 ml de NaOH 1N y calentaron en baño María (90 °C) durante 20 minutos. Después de enfriar, las muestras con la proteína disuelta se llevaron a 1 ml con agua destilada y se les agregaron 4 ml del reactivo de Biuret. El desarrollo de color se determinó a 550 nm en un espectrofotómetro (Spectronic Instruments 21D) después de 30 minutos de reacción y de centrifugar a 3500 r.p.m. durante 5 minutos para separar los restos celulares. El blanco se preparó mezclando 4 ml de reactivo de Biuret con 1 ml de agua. La curva de calibración se preparó usando albúmina bovina.

#### 4.4 DETERMINACIÓN DE PESO SECO

El paquete celular obtenido de 5-6 ml de caldo fermentado se lavó una vez y después se suspendió en aproximadamente 3 ml de agua bidestilada. La suspensión se vació sobre charolas de aluminio previamente puestas a peso constante. Las muestras se secaron a 95 °C durante 48 horas, después se enfriaron en desecador y finalmente fueron pesadas.

#### 4.5 EXTRACCIÓN DE CAROTENOIDES.

Se realizó de acuerdo a Sedmak, 1990. En tubos de ensaye de 20-ml se tomaron muestras de caldo fermentado conteniendo aproximadamente 2.5 mg de células (0.3 ml). Las muestras se centrifugaron por 10 minutos a 5000 r.p.m. en una centrífuga de ángulo fijo modelo Lourdes (Vernitron Medical Products, Inc). El sobrenadante se removió cuidadosamente y a cada tubo se le adicionó 0.5-1 ml de perlas de vidrio (0.5 mm) y 1 ml de dimetilsulfóxido precalentado a 57 °C. Después de 1 minuto en baño María a esta temperatura las células se rompieron agitando vigorosamente en vortex durante 40 segundos. Después de agregar a cada tubo 0.1 ml de una solución de fosfato de sodio (0.01 M) y 2.5 ml de una mezcla 50:50 (v/v) de hexano:acetato de etilo los tubos se agitaron vigorosamente en vortex durante 1 minuto adicional para extraer los carotenoides. Las fases orgánica y acuosa se separaron por centrifugación a 5000 r.p.m. durante 5 minutos; la fase orgánica conteniendo los carotenoides se leyó en un espectrofotómetro Spectronic 21D a 480 nm. La concentración de carotenoides se calculó usando un coeficiente de extinción de 2100 en la ecuación:

$$\frac{\mu\text{g carotenoides}}{\text{ml}} = \frac{10000 \times A \times V_s}{V_m \times (E_{1\text{cm}}^{1\%})}$$

$A$                     absorbencia a 480 nm

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$                 coeficiente de extinción específico para astaxantina

$V_s$                     volumen final de solvente (ml)

$V_m$                     volumen de muestra (ml)

#### *4.6 SEPARACIÓN DE CAROTENOIDES POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA*

Los pigmentos que se aplicaron a placas de cromatografía se extrajeron de forma similar a como se describió arriba, con la excepción de que la extracción se hizo dos veces con 3 ml de hexano en lugar de usar la mezcla hexano:acetato de etilo (se tomaron muestras de caldo fermentado de 0.4-0.5 ml). Esta modificación permitió obtener un pigmento más seco luego de evaporar el hexano en una corriente de nitrógeno. Tras ello, los tubos conteniendo el pigmento seco se sellaron con parafilm y se guardaron en congelación y protegidos de la luz hasta su análisis. Las cromatografías se realizaron sobre placas de sílica gel 60 de 10 x 20 cm (E. Merck AG, Darmstad, Alemania). El pigmento de cada muestra se disolvió en 30-50  $\mu\text{l}$  de hexano de los que se tomaron 8  $\mu\text{l}$  para su aplicación en la placa. En cada placa se hizo al menos una aplicación de 2  $\mu\text{l}$  del estándar de astaxantina (ver abajo). La elución de las muestras aplicadas se hizo en una cámara saturada (protegida de la luz) conteniendo 60 ml de una mezcla de éter de petróleo/acetona 80:20. La identificación de la astaxantina se llevó a cabo por comparación de  $R_f$  de los pigmentos separados y el del estándar. La cuantificación de astaxantina se realizó por medio de un densitómetro marca CAMAG TLC scanner ii.

#### *4.7 PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR DE ASTAXANTINA*

Se pesaron 21 mg de astaxantina pura (obtenido de Roche por E. Velázquez) y se disolvieron en 25 ml de diclorometano frío. En viales ámbar de 2 ml se colocaron alíquotas de 0.1 ml de la solución. Después de evaporar el solvente en una corriente de nitrógeno los viales se sellaron con parafilm y se conservaron en refrigeración a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para aplicar a las placas de cromatografía, el contenido de un vial (84  $\mu\text{g}$  de astaxantina pura) se disolvió en 1.5 ml de diclorometano, de esta solución se aplicaron 2  $\mu\text{l}$ . Para checar la concentración de astaxantina se agrega a un vial: 0.5 ml de diclorometano, 0.1 ml de etanol y 1 ml de hexano. De esta solución se toma 0.5 ml y se lleva a 25 ml con hexano. Se lee la absorbencia a 472 nm y se cuantifica con la siguiente ecuación:

$$\mu\text{g de astaxantina/vial} = (A \times 1.6 \times 25) / (0.210 \times 0.5)$$



#### *4.8 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES*

Muestras conteniendo 0.2 a 0.6 mg de azúcares reductores se colocaron en tubos de ensaye y se llevaron a 1 ml con agua destilada. Para hidrolizar la sacarosa se adicionaron 30  $\mu$ L de ácido clorhídrico concentrado (37%) a cada muestra. Después, las muestras se mantienen en baño María durante 8 minutos a 90 °C. En virtud de que el desarrollo de color solo ocurre a pH alcalino, el ácido se neutralizó adicionando 30  $\mu$ L de una solución al 40% de NaOH. A continuación se llevaron las muestras a 3 ml con agua destilada, se adicionaron 3 ml de reactivo DNS y se siguió el procedimiento descrito por Miller, 1959. La curva estándar se preparó con sacarosa pura que se hidrolizó en las mismas condiciones.

#### *4.9 DETERMINACIÓN DE AMONIO RESIDUAL*

El amonio fue analizado en los sobrenadantes mediante el método de Berthelot que se basa en la reacción colorida de fenol-hipoclorito como se describe en Weatherburn (1967). A una alícuota del medio de cultivo se le agregan 2.5 ml de una solución conteniendo fenol (1%) y  $\text{Na}_2(\text{Fe}(\text{CN})_5 \text{NO}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.005%). Después de agitar se agregaron 2.5 ml de una solución que contenía NaClO (0.05%) y sosa (0.5%) manteniendo la agitación. La absorbancia se mide después de 30 minutos a 625 nm. La curva estándar se preparó con cloruro de amonio (Baker®).

#### *4.10 DETERMINACIÓN DE FOSFATO RESIDUAL*

El fosfato fue determinado por el método colorimétrico de Jones que se basa en la reacción entre los fosfatos del medio con  $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7 \text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  en presencia de ácido sulfúrico y sulfato ferroso como se describe en Sumner (1944). Una alícuota del medio de cultivo se diluyó con agua libre de fosfatos, a esta se le adicionaron 0.5 ml de una solución de molibdato de amonio al 6%. Después se adicionó un volumen igual de ácido sulfúrico 7.5 N y finalmente 0.4 ml de una solución recién preparada de sulfato ferroso (9.8% en ácido sulfúrico 0.15 N). Luego de 10 minutos se determinó la absorbancia a 595 nm. La curva estándar de fosfatos se preparó con fosfato monobásico de sodio (Baker®).

#### *4.11 MEDICIÓN DE pH*

El pH se determinó con un potenciómetro digital marca Beckman (modelo 350) precalibrado con soluciones de pH de 4.0 y 7.0 respectivamente.

#### *4.12 DETERMINACIÓN DE ALCOHOLES*

El etanol y otros alcoholes presentes en el medio de cultivo se determinaron por cromatografía de gases a partir de los sobrenadantes. Se usó una columna Carbowax 1540 (20%), Porapak Q de 2 m de largo a una temperatura de 175 °C. Se usó nitrógeno a un flujo de 28 ml/min como gas de arrastre y un detector de ionización de flama a una temperatura de 250 °C.

#### *4.13 CÁLCULO DE RENDIMIENTO (Y<sub>x/s</sub>)*

El rendimiento puntual se calculó considerando intervalos de 30 horas:

$Y_{x/s} \text{ c}/30 \text{ h} = \text{g levadura producidos en las últimas 30 h} / \text{g azúcar consumidos en las últimas 30 h}$

El rendimiento acumulado se calculó a diferentes tiempos durante la fermentación:

$Y_{x/s} = \text{g totales de células producidas} / \text{g totales de azúcares consumidos}$

#### *4.14 MEDIOS PARA CONSERVACIÓN, Y PREPARACIÓN DE INÓCULO*

Para conservación por períodos prolongados, la cepa se liofilizó en leche descremada al 10%. Después de recuperarla de la ampolleta de liofilizado, se conservó en placas de agar YM a 4°C realizando resiembras cada mes por un máximo de tres meses. El medio para conservación contenía (agar-YM): extracto de levadura 0.3%, extracto de malta 0.3%, glucosa 1.0%, bactopectona 0.5% y agar 1.5%. La propagación de los inóculos se llevó a cabo en matraces de 250 ml conteniendo 32 ml de medio líquido YM, que contenía los mismos componentes con excepción del agar. Después de esterilizar los matraces a 1.05 kg/cm<sup>2</sup> durante 20 minutos, éstos se enfriaron y se sembraron con una asada de la levadura raspada de una caja conservada en refrigeración por menos de un mes. Después

los matraces se incubaron a 21-22 °C durante 36 horas en una agitadora Gallenkamp a 160 r.p.m.. Cualquier diferencia con relación a este procedimiento se indica donde aplica.

#### *4.15 EXPERIMENTOS PARA ESTABLECER LAS CONDICIONES DE CULTIVO EN LOTE ALIMENTADO*

Todos los experimentos en fermentador se realizaron en un sistema New Brunswick de 4 l de capacidad nominal que se muestra esquemáticamente en la fig. 4.1. En todos los casos la aireación fue 5.6 l/minuto (Std) y la temperatura 21-22 °C.

Experimento 1. Para alcanzar una densidad celular mayor de 40 mg/ml y una concentración de carotenoides totales superior a los 11.3 µg/ml obtenidos previamente por Velázquez, 1995, se usó un medio para el lote alimentado con las mismas proporciones de nutrientes que el medio optimizado en el trabajo citado.

Inicio del cultivo. Para iniciar el cultivo se emplearon (g): sacarosa, 90; fosfato monobásico de potasio, 16; antiespumante (ml), 3.0; sulfato de amonio 18; extracto de levadura, 40 y agua de la llave hasta 3000 ml. Este medio de cultivo se esterilizó en el fermentador durante 15 minutos a 1.5 kg/cm<sup>2</sup> (120 °C), junto con mangueras y electrodos. Después de adicionar al fermentador un inóculo de 26 h de edad (4 matraces con 32 ml de medio c/u) las condiciones del cultivo se ajustaron como sigue: agitación 500 r.p.m.; pH 4.5-6.1.

Cultivo en lote alimentado. El medio para el cultivo alimentado se preparó con (g): sacarosa, 850; extracto de levadura 36 y agua de la llave. Previamente la sacarosa se disolvió en 1750 ml de agua de la llave y el extracto de levadura en 250 ml y se esterilizaron por separado. Ya frías se mezclaron las soluciones para hacer un volumen total de 2000 ml aproximadamente. El flujo de alimentación fue 15 ml/h. La alimentación de medio fresco se inició 28 horas después de inocular el fermentador. Las condiciones durante el cultivo por lote alimentado fueron las mismas que se describieron arriba con la excepción de la agitación y pH que se ajustaron a 650 r.p.m. y 4.8 respectivamente. Las muestras de caldo de fermentación se tomaron después de drenar aproximadamente 40 ml. El control de pH se llevó a cabo automáticamente con una solución de hidróxido de amonio (5.3 N).

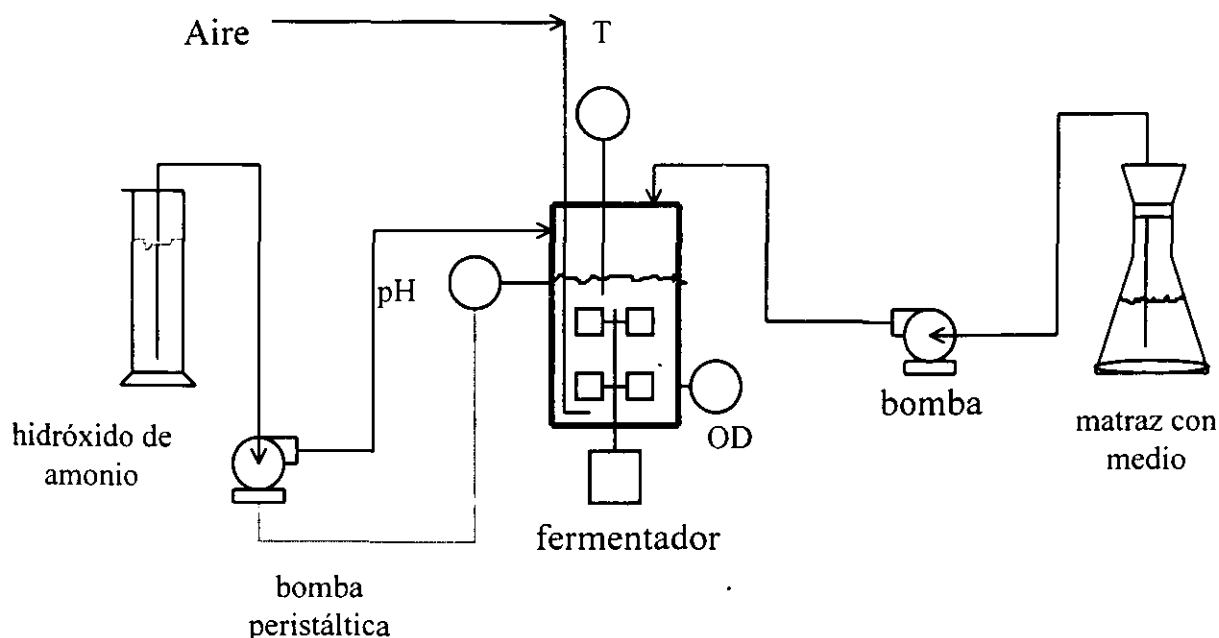


Fig. 4.1. Esquema del sistema de fermentación utilizado.

Experimento 2. Se llevó a cabo en las mismas condiciones del experimento 3 que se describe enseguida. Sin embargo, a diferencia de este último el experimento 2 ilustra como una excesiva alimentación de sustrato durante las primeras 24 horas del cultivo alimentado, suprime prácticamente por completo la síntesis de carotenoides (por falla de la bomba dosificadora se alimentó a un flujo de 25 ml/h).

#### 4.16 EXPERIMENTOS EN FERMENTADOR PARA ESTUDIAR 3 FACTORES EN UN DISEÑO FACTORIAL $2^{3-1}$ .

Se llevaron a cabo una serie de 4 experimentos en fermentador para estudiar el efecto de la velocidad de alimentación de medio (sacarosa), la relación carbono/nitrógeno y dos fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento, el rendimiento ( $Y_{x/s}$ ) y la producción de carotenoides en *P. rhodozyma*. Los experimentos realizados fueron los correspondientes al diseño factorial  $2^{3-1}$  que se muestra en la tabla 4.1.

Tabla 4.1: Diseño factorial  $2^{3-1}$  para estudiar el efecto de la velocidad de adición de sacarosa, la relación C/N y dos fuentes de nitrógeno sobre la producción de carotenoides por *P. rhodozyma*.

**Experimento No.** **Factor variable**

	<b>Vel. adición sacarosa</b> g/h	<b>Fuente de nitrógeno</b>	<b>Relación C/N</b>
Experimento 3	+	+	-
	7.2	Amonio/extracto	21
Experimento 4	-	-	-
	4.7	Extracto	21
Experimento 5	-	+	+
	4.7	Amonio/extracto	24
Experimento 6	+	-	+
	7.2	Extracto	24

En los 4 experimentos (3-6) se siguió un procedimiento similar, como se describe a continuación. Inóculo. Los matraces conteniendo medio líquido YM (32 ml c/u) una vez esterilizados y fríos se inocularon raspando una asada de una caja de 48 a 72 horas de edad, sembrada a partir otra caja de igual edad, proveniente de un glicerol conservado a - 20 °C. Después de inocular los matraces se incubaron por 24 h a 150 r.p.m.

Para iniciar cada experimento se cargó al fermentador (g): sacarosa, 90; fosfato monobásico de potasio, 4.5; antiespumante (ml), 2.0; sulfato de amonio 3 (experimentos 4 y 6) o 15 (experimentos 3 y 5); extracto de levadura 20 y agua de la llave hasta 2800 ml. El medio para el cultivo alimentado se preparó con: sacarosa, 650; extracto de levadura 87 (experimentos 3 y 5) o 150 (experimento 4) o 130 (experimento 6) y fosfato monobásico de potasio 20 y agua de la llave. El fermentador limpio conteniendo la sacarosa se esterilizó junto con mangueras, electrodos y probeta de 1000 ml para medio. El extracto de levadura se esterilizó por separado junto con el fosfato de potasio y el sulfato de amonio en un matraz conteniendo 250 ml de agua. Esta solución se incorporó al fermentador poco antes de inocularlo con el contenido de 3 o 4 matraces de inóculo. Las condiciones iniciales de

cultivo fueron las mismas que se describen en el experimento 1 y se mantuvieron así hasta iniciar la alimentación, después de 24-26 h de incubación.

Cultivo en lote alimentado. En cada uno de los experimentos del diseño factorial se adicionaron al fermentador 650 g de sacarosa durante el cultivo alimentado. La sacarosa fue disuelta previamente junto con el fosfato de potasio y el extracto de levadura en agua de la llave, para hacer un volumen total de 1650 ml o alternativamente de 2400 ml. En todos los experimentos el flujo de alimentación fue 17.8 ml/h. Es decir, la velocidad de adición de sacarosa se controló con base en la concentración de la solución a alimentar. La alimentación se realizó en alrededor de 5.9 días cuando el volumen a alimentar fue de 2400 ml (experimentos 4 y 5) y en aproximadamente 3.9 días cuando el volumen alimentado fue de 1650 ml (experimentos 3 y 6). El flujo de medio se determinó a partir de los volúmenes contenidos en la probeta de alimentación durante el transcurso del cultivo. Después de iniciar la alimentación de medio la agitación se ajustó a 600 r.p.m. En todos los experimentos el pH se mantuvo en 4.5. En los experimentos 4 y 6 el pH se controló con una solución de sosa 2.8 N o ácido sulfúrico (30 ml de ácido concentrado/80 ml agua) según se requirió. En el experimentos 3 se controló con una solución de hidróxido de amonio (0.17 g/ml) mientras que en el experimento 5 el control de pH se realizó con una mezcla sosa/amonio. Se disolvieron 22 g de sosa en 60 ml de agua, esta se mezcló con 91 ml de hidróxido de amonio para hacer un volumen final de 151 ml. En todos los experimentos en fermentador, el oxígeno disuelto se midió con un electrodo de tipo galvánico.

Los efectos principales de los factores estudiados se calcularon como lo describe Box y col., 1989:

Efecto de velocidad de adición =  $1/2 (E3 + E6 - E4 - E5)$

Efecto de fuente de nitrógeno =  $1/2 (E3 + E5 - E4 - E6)$

Efecto de la relación C/N =  $1/2 (E5 + E6 - E3 - E4)$

En donde E3, E4, E5 y E6 son los resultados obtenidos en los experimentos 3, 4, 5 y 6 respectivamente para una variable de respuesta dada. Para calcular cada efecto principal los signos que se aplican a cada resultado están en concordancia con los indicados en el diseño factorial de la tabla 4.1.

La velocidad específica de crecimiento al inicio y al final del periodo de crecimiento lineal se determinaron mediante un balance de biomasa en el fermentador, como sigue:

$$\mu x V = \frac{d(Vx)}{dt} = V \frac{dx}{dt} + x \frac{dV}{dt}$$

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} + \frac{1}{V} \frac{dV}{dt}$$

Los valores de  $dx/dt$  en cada fermentación se calcularon mediante una regresión lineal de los datos  $x$  vs.  $t$ . Los valores de  $x$  y  $V$  fueron los valores medidos al inicio y al final del periodo de crecimiento lineal.

#### *4.17 EXPERIMENTO EN FERMENTADOR CON ADICIÓN DE SALES MINERALES*

En virtud de que se observaron cantidades significativas de azúcares residuales y relativamente bajos rendimientos ( $Y_{x/s}$ ) en todos los experimentos anteriores, se llevó a cabo un experimento para investigar si la limitación de algún mineral era la causa de esto. Para iniciar se cargó al fermentador (g): sacarosa, 90; fosfato monobásico de potasio, 4.5; antiespumante (ml), 2.0; sulfato de amonio 12; extracto de levadura 20 y agua de la llave hasta 2800 ml (igual que en los 4 experimentos anteriores, con la excepción de la cantidad de sulfato de amonio). El experimento se realizó en condiciones similares a las del experimento 5, pero al medio usado en el cultivo alimentado se le adicionaron sales minerales en las cantidades siguientes (g):  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.75;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.9; NaCl, 16.2;  $\text{ZnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 6.7;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3.8;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.46;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.246 y  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 0.150. Adicionalmente el medio para el cultivo alimentado contenía los nutrientes usuales (g): sacarosa, 550; extracto de levadura, 75 y fosfato monobásico de potasio, 17 y agua de la llave (los componentes del medio se mantuvieron en la misma proporción que en el experimento 5). Las sales que contenían el cinc, hierro, manganeso y cobre se disolvieron en 100 ml de agua de la llave a la que se le adicionó 0.4 ml de ácido sulfúrico concentrado (solución A). El cloruro de calcio se disolvió en 30 ml de agua (solución B). Las sales que contenían el Co y Na se disolvieron en 50 ml de agua bidestilada (solución C) y el sulfato de magnesio se disolvió en 50 ml de agua bidestilada acidificada con 0.2 ml de ácido sulfúrico concentrado (solución D). Las soluciones A-D se esterilizaron por separado y después de enfriarse se agregaron a la solución de sacarosa, fosfatos y

extracto. Después de mezclar todos los componentes la solución se mantuvo clara, sin embargo al día siguiente después de iniciada la alimentación estaba ligeramente turbia, aunque sin precipitación aparente de sólidos. El volumen de la solución de sacarosa, junto con el fosfato de potasio, el extracto de levadura y las sales minerales fue de 2200 ml. La alimentación de esta solución se hizo a un flujo de 19.2 ml/h. El control de pH se hizo con una solución de hidróxido de amonio.

#### **4.18 EXPERIMENTOS EN MATRAZ EN MEDIOS QUÍMICAMENTE DEFINIDOS**

En los experimentos en fermentador se observó un mayor crecimiento y rendimiento ( $Y_{x/s}$ ) cuando se adicionaron sales minerales al cultivo en comparación con cultivos sin suplementación de minerales. Sin embargo, las células tenían un menor contenido de carotenoides. Como esto sugería que algún o algunos de los minerales adicionados tienen influencia en el crecimiento y producción de carotenoides, se decidió estudiar en medios de cultivo químicamente definidos el efecto de los componentes individuales en la producción de carotenoides por *P. rhodozyma*. Tomando como base la composición de minerales en levaduras reportada por Hitzman (1986) se diseñaron medios químicamente definidos en los que se logró cultivar *P. rhodozyma*. Posteriormente en experimentos preliminares empleando diseños factoriales fraccionados (no mostrados) se estudiaron un número de diferentes componentes del medio de cultivo para establecer con cuales se llevarían a cabo los estudios sistemáticos del efecto de la concentración como se indica a continuación.

#### **4.19 EXPERIMENTOS CON CONCENTRACIONES VARIABLES DE P, N, K, Mg, Cu y Fe**

Se llevaron a cabo un total de 9 experimentos en matraces, en los que se variaron sistemáticamente las concentraciones de nitrógeno (experimentos 1M y 4M), fosfatos (experimentos 2M y 5M), potasio (experimentos 3M y 6M), magnesio (experimento 7M), cobre (experimento 8M) y hierro (experimento 9M) respectivamente. En la numeración de los experimentos se incluyó la letra "M" después del número para designar que se llevaron a cabo en matraces y distinguirlos de los realizados en fermentador. En los experimentos 1M, 2M y 3M en el que se estudiaron los efectos del nitrógeno, fosfatos y potasio respectivamente, no se adicionó citrato de sodio. En cambio en los experimentos 4M, 5M y 6M en los que se estudiaron los mismos factores, se adicionó 2.5 mg/ml de citrato de sodio para elevar el pH final en los matraces. En los experimentos con magnesio, cobre y hierro (7M, 8M y 9M) se adicionó solo 1 mg/ml de citrato de sodio con el mismo propósito. Con excepción



del experimento con citratos, cada experimento consistió de 8 o 9 matraces cada uno con diferentes concentraciones del elemento a estudiar, de cada matraz se hizo una réplica. Los medios de cultivo empleados en cada uno de los experimentos 1M a 9M se muestran en la tabla 4.2. A todos los matraces se les adicionó 0.5 ml de la solución de vitaminas que contenía (mg/l): pantotenato, 150; tiamina, 75; biotina, 4; cianocobalamina, 7.5; inositol, 7500; piridoxina, 37.5; riboflavina, 75 y nicotinamida, 450. El pH de esta solución se ajustó a 4 con HCl, se esterilizó por filtración y se conservó en congelación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Los matraces de cada experimento se incubaron durante 160 horas a  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 160 r.p.m. en la incubadora de tipo orbital marca Gallenkamp.

Inóculo. Se preparó de manera similar en todos los experimentos, seis matraces conteniendo 30 ml del medio usual (YM), una vez estériles y fríos se inocularon raspando una asada de una caja mantenida en refrigeración por menos de un mes. Los matraces se mantuvieron en incubación a  $21\text{-}22\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 150 r.p.m. durante 36 h. Después el contenido de los matraces se colocó en tubos de centrifuga estériles y se centrifugó por 5 minutos a 5000 r.p.m.. El sobrenadante se desechó y el paquete celular fue resuspendido en 100 ml de solución salina estéril al 0.3%. Cada matraz se inoculó con 1 ml de esta suspensión. En los experimentos con nitrógeno, fosfato y potasio para preparar el medio en el que se propagó el inóculo se usaron 170 ml de agua destilada más 10 ml de agua de la llave. Para preparar los matraces con concentraciones variables de nitrógeno, fosfato y potasio, y las soluciones de sales se usó agua desionizada obtenida de un equipo Milli Q (Millipore). Para preparar todas las soluciones en los experimentos con cobre, hierro y magnesio se usó agua megapura obtenida de un equipo de destilación Corning Mega-pure system MP-3A equipado con una unidad desionizadora. En este caso, todo el material de vidrio empleado se remojó en HCl 1N durante la noche y después se enjuagó tres veces con agua megapura. El citrato y la urea se esterilizaron por filtración.

#### *4.20 EXPERIMENTO CON CONCENTRACIONES VARIABLES DE CITRATO.*

En los experimentos con diferentes concentraciones de fosfato, nitrógeno y potasio se observó que el citrato de sodio tenía un efecto positivo en la producción de carotenoides. Por ello, se llevó a cabo un experimento adicional en el que se estudió el efecto de diferentes niveles de citratos. En el experimento con citratos, los matraces con 6 y 12 mg/ml de citratos se prepararon a partir de una solución 4:1 de citrato de sodio/ácido cítrico, en el matraz con 0.6 mg/ml se usó solo citrato de

sodio. El medio de cultivo empleado se muestra en la tabla 4.2. Este experimento se realizó junto con los experimentos de magnesio, cobre y hierro variables, de modo que el inóculo y otras condiciones fueron idénticas a las que se mencionaron en estos casos.

**Tabla 4.2 Medios usados en experimentos con niveles variables de nitrógeno, fosfatos y potasio**

VARIABLE: EXPERIMENTO No.	Nitrógeno 1M mg/mL		Fosfatos 2M mg/ mL		Potasio 3M mg/ mL		Nitrógeno 4M mg/ mL		Fosfatos 5M mg/ mL		Potasio 6M mg/ mL	
(NH4)2 SO4	3,32	var (max)	0,75		1,29		4,03	var (max)	0,32		0,47	
Mg SO4 7H2O	0,51		0,51		0,51		0,08		0,08		0,08	
K2 SO4	-		-		0,89	var (max)	0		0		1,35	var (max)
Fe SO4 7H2O	0,0020		0,0020		0,0020		0,0020		0,0020		0,0020	
Cu SO4 5H2O	0,00084		0,00084		0,00084		0,00064		0,00064		0,00064	
Mn SO4 H2O	0,00097		0,00097		0,00097		0,00063		0,00063		0,00063	
Zn SO4 7H2O	0,012		0,012		0,012		0,012		0,012		0,012	
Co SO4 7H2O	0,00019		0,00019		0,00019		0,00019		0,00019		0,00019	
Na2SO4	1,76		1,12		0,54		1,94		1,83		1,66	
NH4 Cl	-		0,38		0,26		0		0,13		0,13	
CaCl2 2H2O	0,044		0,044		0,044		0,022		0,022		0,022	
KCl	0,026		0,23		0		0,068		0,068		0,00	
NaCl	0,92	var (max)	0,86	var (max)	0		0,29		0,29		0,36	
K2 HPO4	0,24	var (max)										
Na2 HPO4	1,30	var (max)	0,64	var (max)	1,30		0,39		0,30	var (max)	0,39	
Na H2PO4 H2O	0,00		1,53	var (max)	0,00		0		2,23	var (max)	0	
citrato de sodio	-		-		-		2,5		2,5		2,5	
H3 BO4	0,00013		0,00013		0,00013		0,00013		0,00013		0,00013	
Na2 MoO4 2H2O	0,00053		0,00053		0,00053		0,00053		0,00053		0,00053	
Urea	-		0,63	var (max)	0,24		0,00		0,50	var (max)	0,43	
vitaminas	0,4 mL		0,4 mL		0,4 mL		0,4 mL		0,4 mL		0,4 mL	
Sacarosa	30,3		30,3		30,3		30,3		30,3		30,3	

continúa....



## 5 RESULTADOS.

### 5.1 EXPERIMENTOS PARA ESTABLECER LAS CONDICIONES DE CULTIVO EN FERMENTADOR

**Alta densidad celular** (Experimento 1). En la mayor parte del experimento el crecimiento fue lineal (peso seco). A pesar de que en este experimento se suspendió la alimentación varias veces, por la ruptura de la manguera de alimentación, se alcanzó al final de la fermentación una alta densidad celular de 100.3 mg/ml (Fig. 5.1). La concentración final de carotenoides totales fue de poco más de 30  $\mu\text{g/ml}$ , sin embargo, esta concentración fue baja con relación al crecimiento obtenido. A las 24 horas de cultivo, al iniciarse el ascenso de la concentración de oxígeno disuelto se inició la alimentación de medio al fermentador. Después de esto, la concentración de OD se mantuvo por encima de 20% de saturación durante el resto de la fermentación. Los datos de concentración de carotenoides totales y contenido de carotenoides en la levadura muestran que la síntesis se inició poco después de iniciarse el ascenso de la concentración de OD. Es interesante notar que mientras la concentración de carotenoides totales ( $\mu\text{g/ml}$ ) aumentó durante todo el experimento, el contenido de carotenoides en las células ( $\mu\text{g/g lev}$ ) solo aumentó rápidamente durante un lapso de aproximadamente 30 horas, poco después de aumentar la concentración de OD. Durante el resto de la fermentación el contenido de carotenoides se mantuvo relativamente constante. Los datos de proteína total y el contenido de proteína en las células muestran un ligero descenso de la tasa de síntesis proteínas durante el período de rápida acumulación de carotenoides en las células (horas 42-54). Este ligero descenso se consideró inicialmente dentro del error experimental, sin embargo, se observó también en la gran mayoría de los otros experimentos realizados en fermentador, lo que sugiere que no es este el caso y que se trata de un evento real.

**Efecto de la sobredosificación de azúcares** (Experimento 2). En la fig. 5.2 se observa que el crecimiento de la levadura (peso seco) y la producción de proteína cesaron a las 78 y 89 horas de cultivo respectivamente, antes de concluir la alimentación de medio al fermentador (hora 113). El peso seco alcanzó un máximo de 53 mg/ml, y poco después de detenerse el crecimiento se acumularon azúcares hasta alcanzar alrededor de 120 mg/ml. Durante la mayor parte de las primeras 90 horas de cultivo, hasta poco después de cesar el crecimiento de la levadura, los niveles de oxígeno disuelto fueron inferiores a 10% de saturación. Como lo ilustra la fig. 5.2a, la acumulación de carotenoides totales fue muy pobre (2.6  $\mu\text{g/ml}$ ) y ocurrió durante las primeras horas mientras el

## Experimento para establecer las condiciones de cultivo (experimento 1).

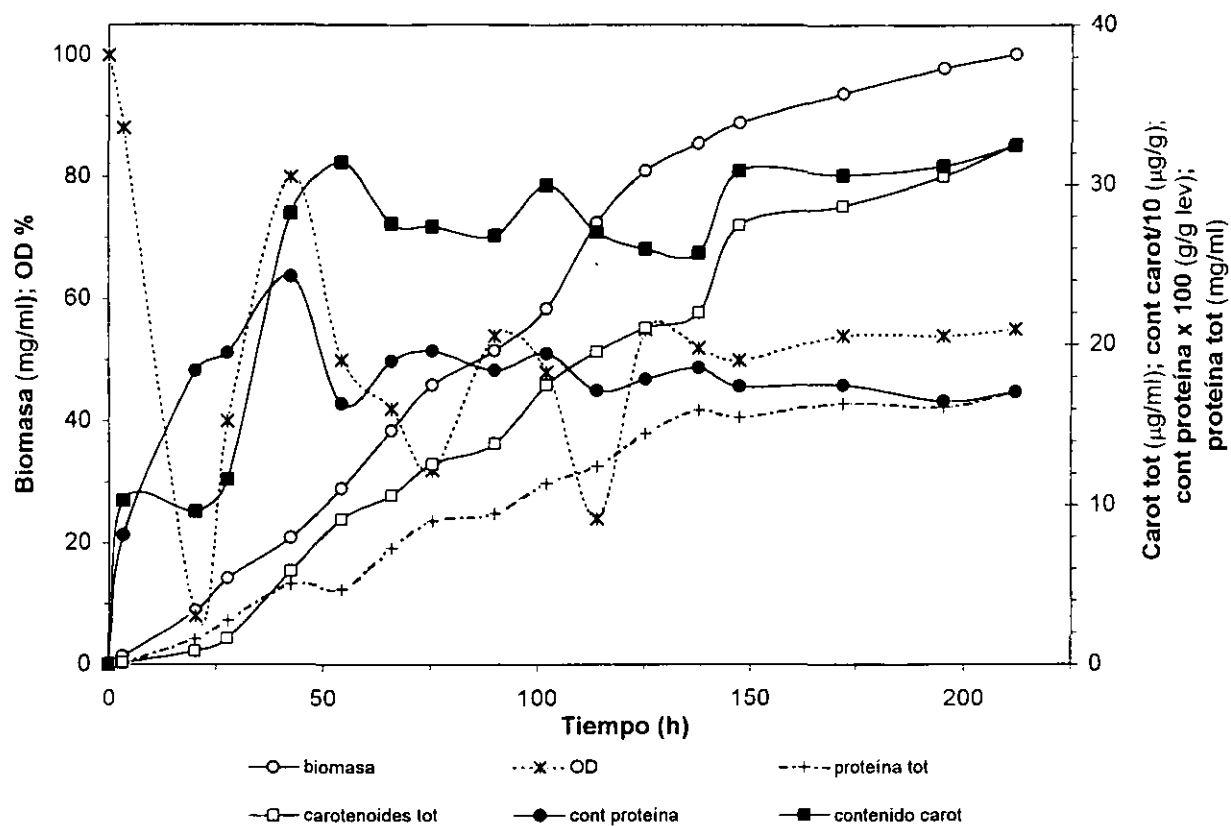


Fig. 5.1. Cultivo en lote alimentado de *P. rhodozyma* a alta densidad celular (100 mg/ml). Las primeras 24 h corresponden a cultivo en lote.

Experimento para establecer las condiciones de cultivo (experimento 2).

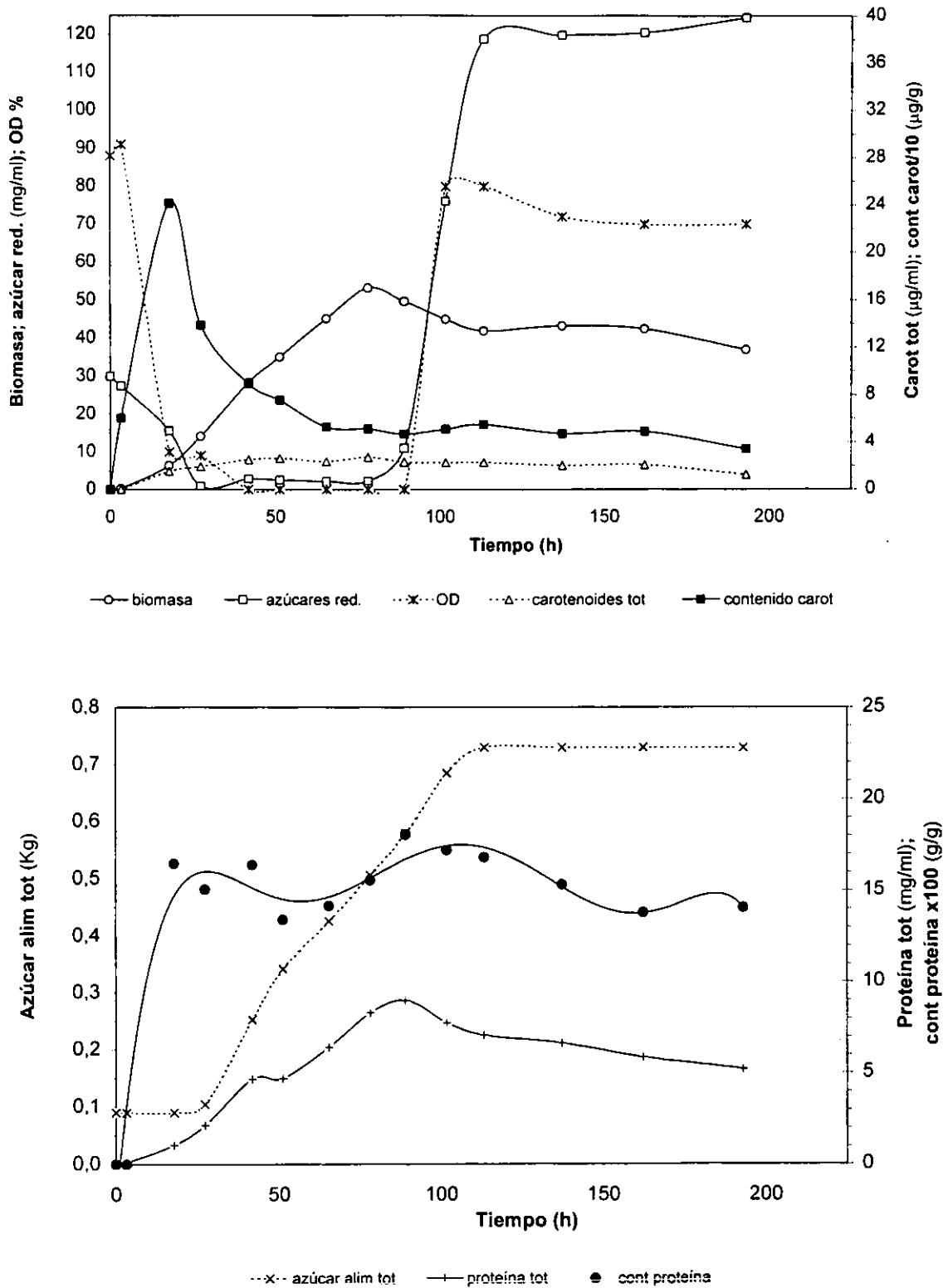


Fig. 5.2. Cultivo en lote alimentado de *P. rhodozyma*. Las primeras 24 h corresponden a cultivo en lote.

OD no se aproximó a cero. En este experimento, el control de velocidad de la bomba dosificadora de medio falló dos veces, originando durante las horas 24 a 50 y 90 a 105, una alimentación de medio mayor a la prevista. Esto puede apreciarse en la fig. 5.2b por la mayor pendiente de la sacarosa alimentada en estos lapsos de tiempo. En virtud de que *P. rhodozyma* es capaz de fermentar azúcares, es probable que la sobredosificación de azúcares junto con bajos niveles de oxígeno disuelto haya provocado la producción de etanol y otros alcoholes, que al acumularse causaron la inhibición del crecimiento de la levadura.

## 5.2 EXPERIMENTOS EN FERMENTADOR PARA ESTUDIAR 3 FACTORES EN UN DISEÑO FACTORIAL $2^{3-1}$ .

Se llevaron a cabo 4 experimentos en fermentador para estudiar los efectos de dos valores de velocidad de alimentación de medio (sacarosa), dos valores de la relación carbono/nitrógeno y dos fuentes de nitrógeno, sobre el crecimiento y la producción de carotenoides en *P. rhodozyma* (tabla 4.1). Los resultados de los experimentos 3 a 6 se muestran gráficamente en las figs. 5.3 a 5.6 respectivamente.

Experimento 3. En este experimento la velocidad específica de crecimiento disminuyó durante el periodo de crecimiento lineal (20-92 h) de 0.18 a 0.02 h<sup>-1</sup>. El crecimiento cesó poco antes de concluir la alimentación de medio al fermentador (Fig. 5.3). Se alcanzó un peso seco máximo de 73 mg/ml a las 103 horas de edad, pero descendió a 59.3 mg/ml hacia el final de la fermentación. Al cesar el crecimiento, los azúcares alimentados se acumularon un poco hasta 10 mg/ml a las 127 horas de cultivo. La concentración de carotenoides totales aumentó en el período comprendido de la hora 20 a 103 hasta un máximo de 11.7 µg/ml (Fig. 5.3a). En contraste, las células aumentaron rápidamente su contenido de carotenoides de la hora 20 a 44 hasta 282 µg/g lev, descendiendo después lentamente a alrededor de 160 µg/g lev al descender el OD en el medio. Puede observarse que la mayor parte de los carotenoides se acumularon en presencia de bajos niveles de azúcares y con niveles apreciables de OD (15 a 30%). A partir de la hora 77 y hasta concluir la alimentación de medio, el OD se mantuvo en niveles cercanos a cero. Aparentemente, esto fue un factor determinante para que la producción de carotenoides fuera muy limitada a partir de esta hora y después cesara por completo. En la fig. 5.3b se puede observar también que durante el período de rápido aumento del contenido de carotenoides (20-44 horas), el contenido de proteína en las células disminuyó significativamente,



Experimento 3 (Diseño factorial  $2^{3-1}$ ).

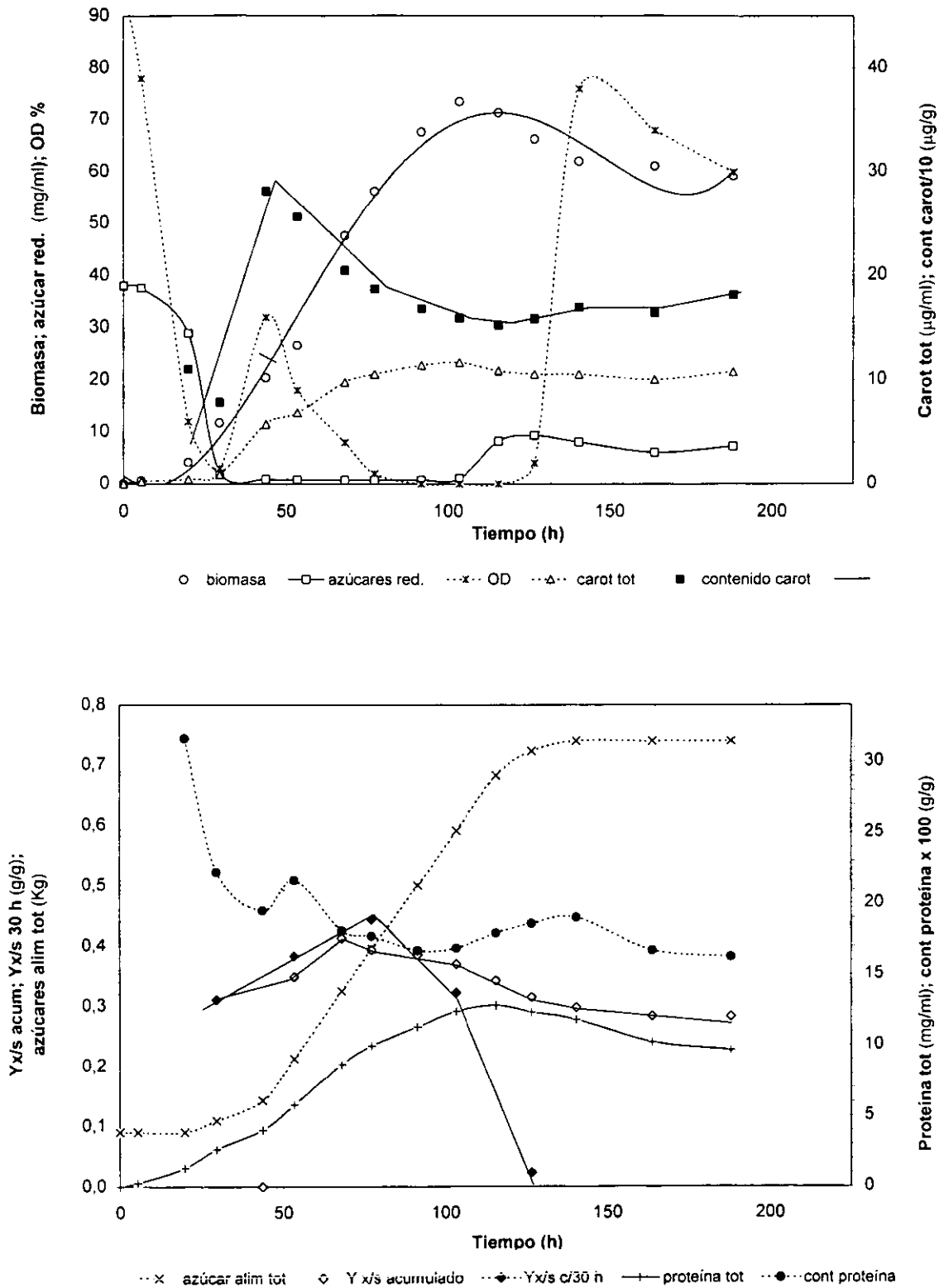


Fig. 5.3. Cultivo alimentado. Parte del diseño factorial realizado para estudiar los efectos de la rapidez de adición de sacarosa, la relación C/N y 2 fuentes de nitrógeno (7.2 g/h, C/N=34, amonio/extracto).

pero el rendimiento acumulado y puntual ( $Y_{x/s}$  c/30 h) aumentaron. El rendimiento puntual alcanzó un valor máximo de 0.44 g lev/g sacarosa alrededor de la hora 80, descendiendo después aparentemente debido a la baja disponibilidad de oxígeno que prevaleció a partir de esta hora. El aumento de los rendimientos acumulado y puntual de la hora 29 a 77 sugiere que además de los azúcares alimentados, la levadura estaba consumiendo el etanol producido durante la etapa de cultivo en lote. Como se describe adelante esto se confirmó en el experimento 4. El descenso del rendimiento puntual después de la hora 77 también era de esperarse, ya que en presencia de bajos niveles de OD, *P. rhodozyma* fermenta los azúcares a etanol. La acumulación de etanol y otros metabolitos en estas condiciones podrían ser las causas de la inhibición del crecimiento subsecuente.

Experimento 4. En este experimento la velocidad específica de crecimiento disminuyó durante el periodo de crecimiento lineal (20-148 h) de 0.09 a 0.013 h<sup>-1</sup>. El peso seco y la concentración de carotenoides totales aumentaron prácticamente durante todo el experimento hasta alcanzar máximos de 69.4 mg/ml y 24.2 µg/ml respectivamente hacia el final de la fermentación (Fig. 5.4a). Puede observarse que de forma similar a como ocurrió en los experimentos previos, la síntesis de carotenoides se inició después de aumentar la concentración de oxígeno disuelto (hora 20). A partir de entonces y hasta concluir la fermentación, el oxígeno disuelto se mantuvo siempre por arriba de 20 % y la concentración de azúcares por debajo de 12 mg/ml. En contraste, las células aumentaron rápidamente su contenido de carotenoides de la hora 20 a la 78, pero después disminuyó ligeramente. El rendimiento acumulado y el rendimiento puntual ( $Y_{x/s}$  c/30 h) aumentaron en las primeras horas de cultivo, alcanzando éste último 0.37 g lev/g azúcar en la hora 103. Este comportamiento se debió principalmente al consumo del etanol producido durante las primeras horas de cultivo y a las condiciones más aeróbicas presentes después de la hora 20. Otros alcoholes como isoamílico y isobutanol, que se encontraron en concentraciones menores de 1 mg/ml, se consumieron también junto con el etanol (no mostrado). Después de la hora 103 el rendimiento disminuyó, pero al concluir la alimentación de medio al fermentador aumentó notablemente debido al consumo de etanol y otros alcoholes como isoamílico, isobutanol, butanol y propanol presentes en pequeñas cantidades. El período de rápido aumento del contenido de carotenoides en las células coincidió con el aumento del nivel de OD, con un rápido consumo de etanol y con un descenso del contenido de proteína en las células. Sin embargo, el descenso del contenido de proteína no fue tan pronunciado como el observado en los experimentos 2 y 3. En la fig. 5.4b se puede observar que el contenido de proteína y la proteína total fueron relativamente bajas durante las primeras 140 horas

Experimento 4 (Diseño factorial  $2^{3-1}$ ).

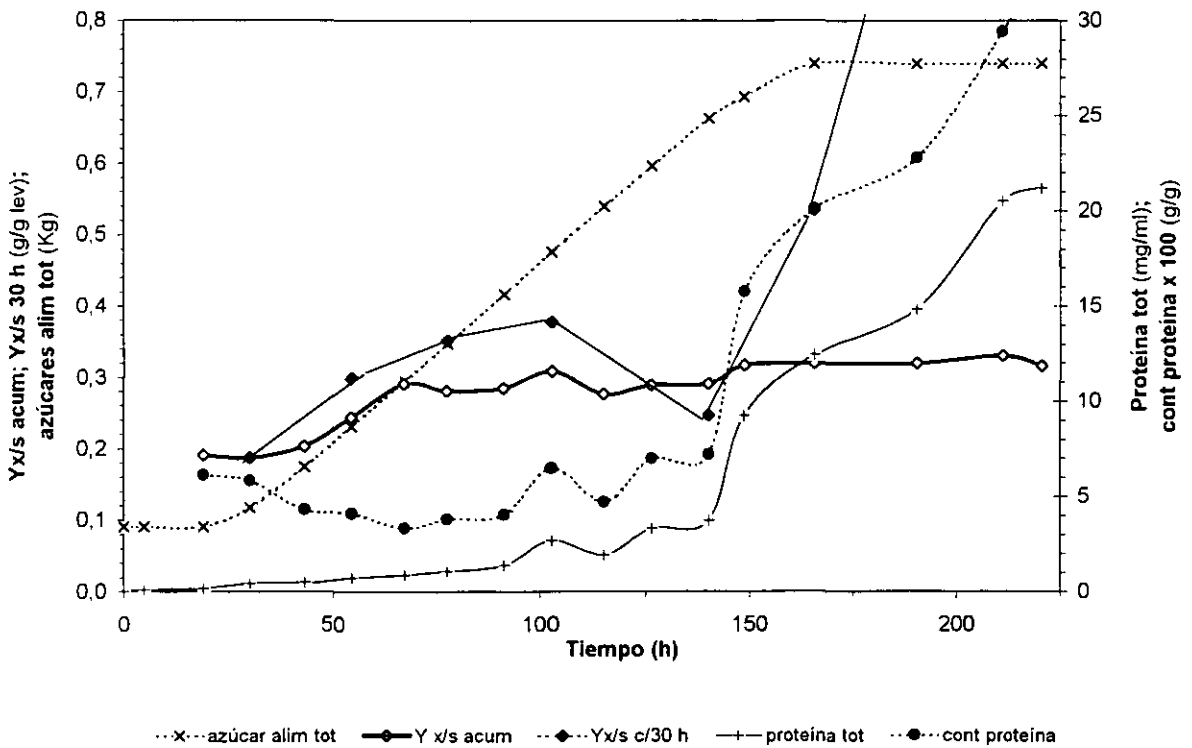
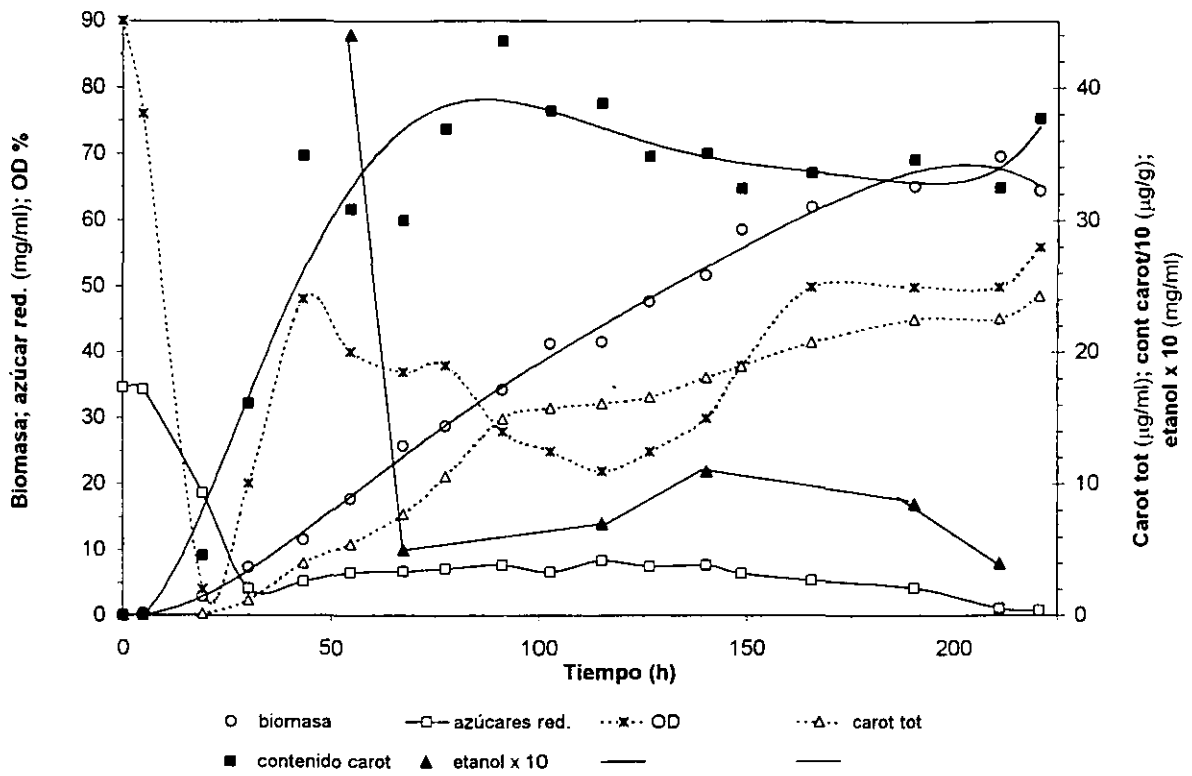


Fig. 5.4. Cultivo alimentado. Parte del diseño factorial realizado para estudiar los efectos de la rapidez de adición de sacarosa, la relación C/N y 2 fuentes de nitrógeno (4.7 g/h, C/N=58, extracto).

de cultivo, pero aumentaron significativamente junto con el rendimiento hacia el final de la fermentación. Se desconocen las causas de este comportamiento, pero podría estar asociado con la reutilización de alcoholes u otros metabolitos por la levadura.

Experimento 5. En este experimento la velocidad específica de crecimiento disminuyó durante el periodo de crecimiento lineal (20-141 h) de 0.09 a 0.013 h<sup>-1</sup>. Al igual que en el experimento 4, el peso seco y la concentración de carotenoides totales aumentaron prácticamente durante todo el cultivo hasta un máximo de 71.3 mg/ml y 33.1 µg/ml respectivamente al final de la fermentación (Fig. 5.5a). A partir de la hora 20 y hasta concluir la fermentación, el OD se mantuvo por encima de 20 % y la concentración de azúcares por debajo de 10 mg/ml. Como puede apreciarse en la fig. 5.5, otras similitudes con el experimento 4 fueron que el contenido de carotenoides en la levadura aumentó rápidamente entre las 20 a 68 horas de cultivo, poco después de aumentar el OD. Durante este período el contenido de proteína en la levadura y la velocidad de acumulación de proteína total disminuyeron significativamente. Además, los rendimientos acumulado y puntual aumentaron en este lapso sugiriendo como sucedió en experimento anterior, que en el lapso de rápida acumulación de carotenoides la levadura consumió etanol como fuente de carbono. Por otro lado, puede observarse que el rendimiento puntual aumentó muy significativamente después de concluir la alimentación de medio (hora 155). El rendimiento relativamente bajo durante las primeras 140 horas de crecimiento y su tendencia ascendente al terminar la alimentación de medio sugiere, por una parte, que *P. rhodozyma* tiene activo su metabolismo fermentativo aún en concentraciones relativamente bajas de azúcares y altas de OD (aprox. de 40 %) y, por otra, como en el experimento anterior, que es capaz de consumir el etanol al agotarse los azúcares del medio.

Experimento 6. En este experimento la velocidad específica de crecimiento disminuyó durante el periodo de crecimiento lineal (20-78 h) de 0.12 a 0.02 h<sup>-1</sup>. Una alimentación rápida de medio (experimentos 3 y 6) produjo un crecimiento más rápido con relación a una alimentación lenta (experimentos 4 y 5). En éste experimento se alcanzó un peso seco máximo de solo 49.8 mg/ml. A partir de la hora 100 el crecimiento fue poco significativo, a pesar de que todavía no se concluía la alimentación de medio al fermentador (Fig. 5.6). Poco después de iniciar la alimentación de medio al fermentador se puede observar acumulación de azúcares en el medio de cultivo hasta alcanzar concentraciones ligeramente por encima 20 mg/ml al finalizar la alimentación (128 h). Como en todos los experimentos anteriores, el oxígeno disuelto aumentó a partir de la hora 20 hasta alcanzar

Experimento 5 (Diseño factorial  $2^{3-1}$ ).

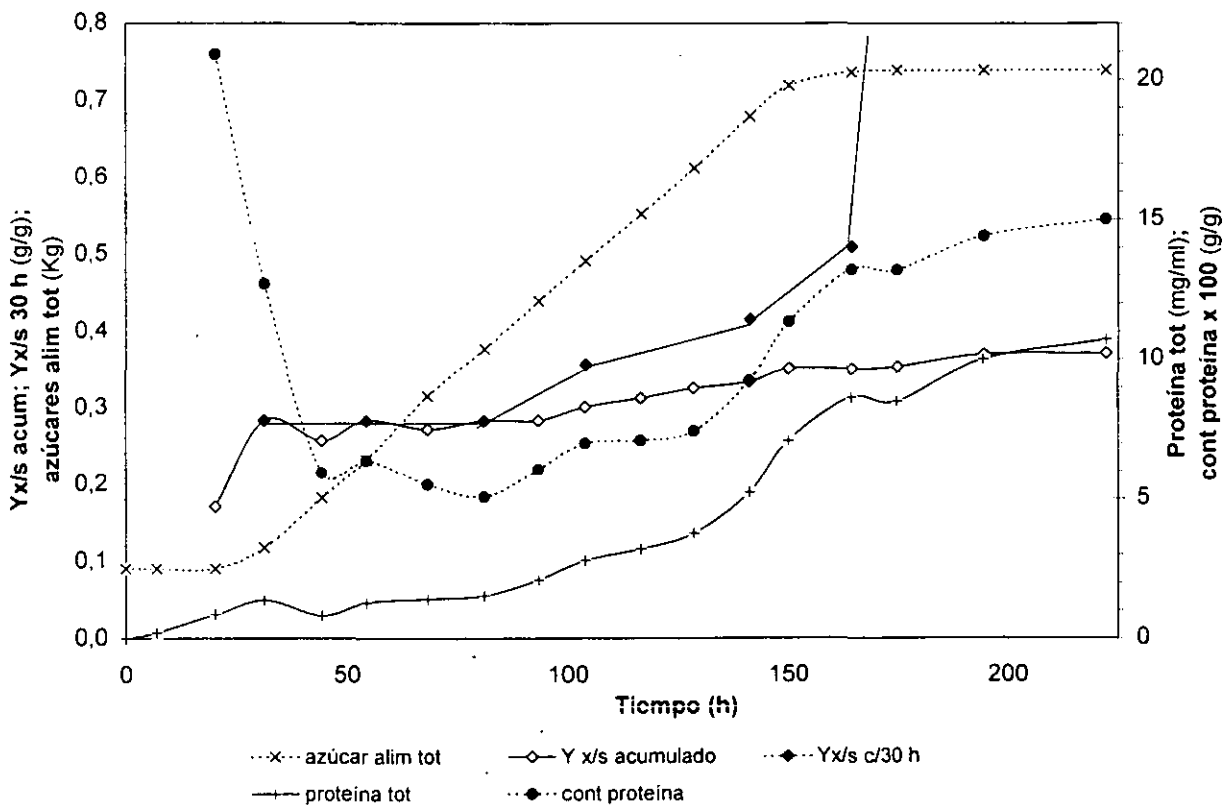
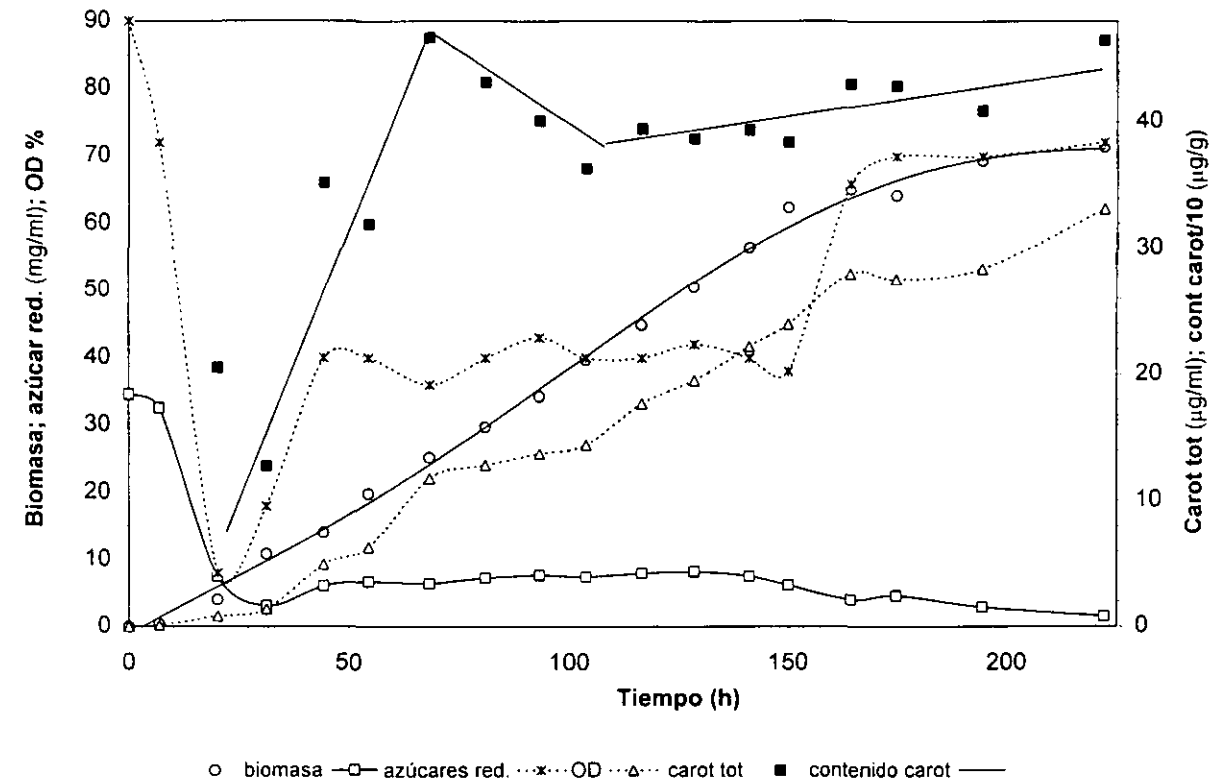


Fig. 5.5. Cultivo alimentado. Parte del diseño factorial realizado para estudiar los efectos de la rapidez de adición de sacarosa, la relación C/N y 2 fuentes de nitrógeno (4.7 g/h, C/N=34, amonio/extracto).

Experimento 6 (Diseño factorial  $2^{3-1}$ ).

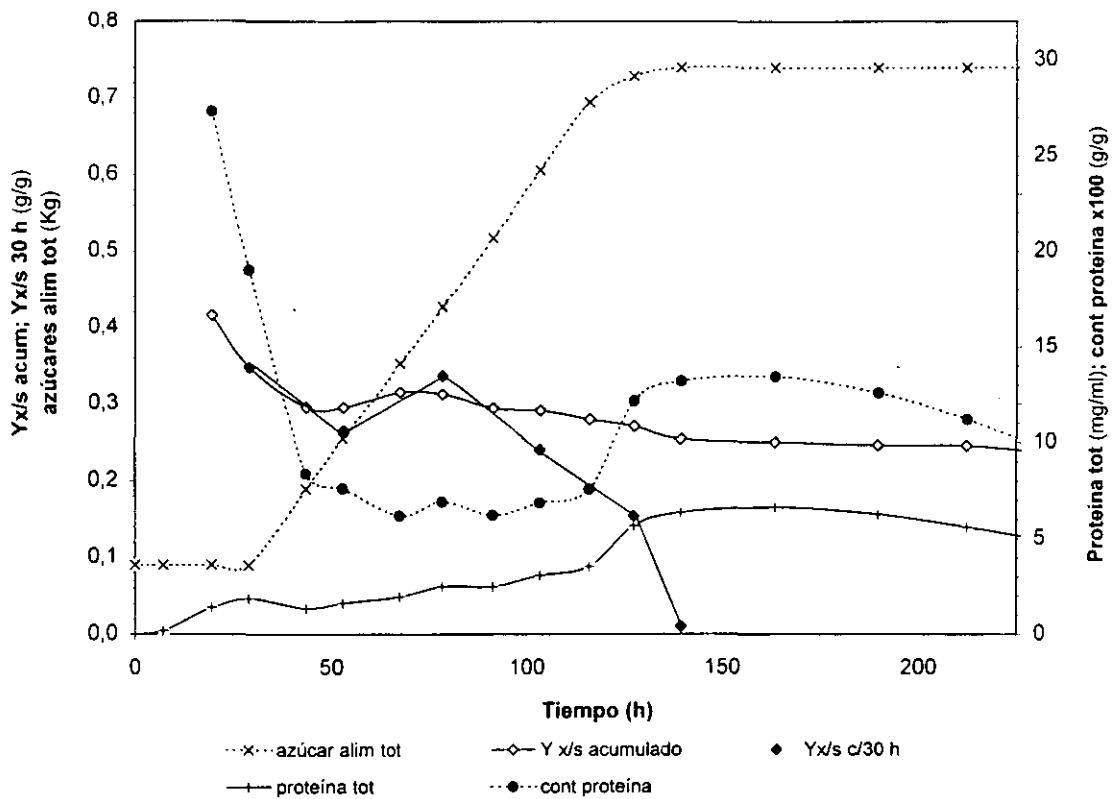
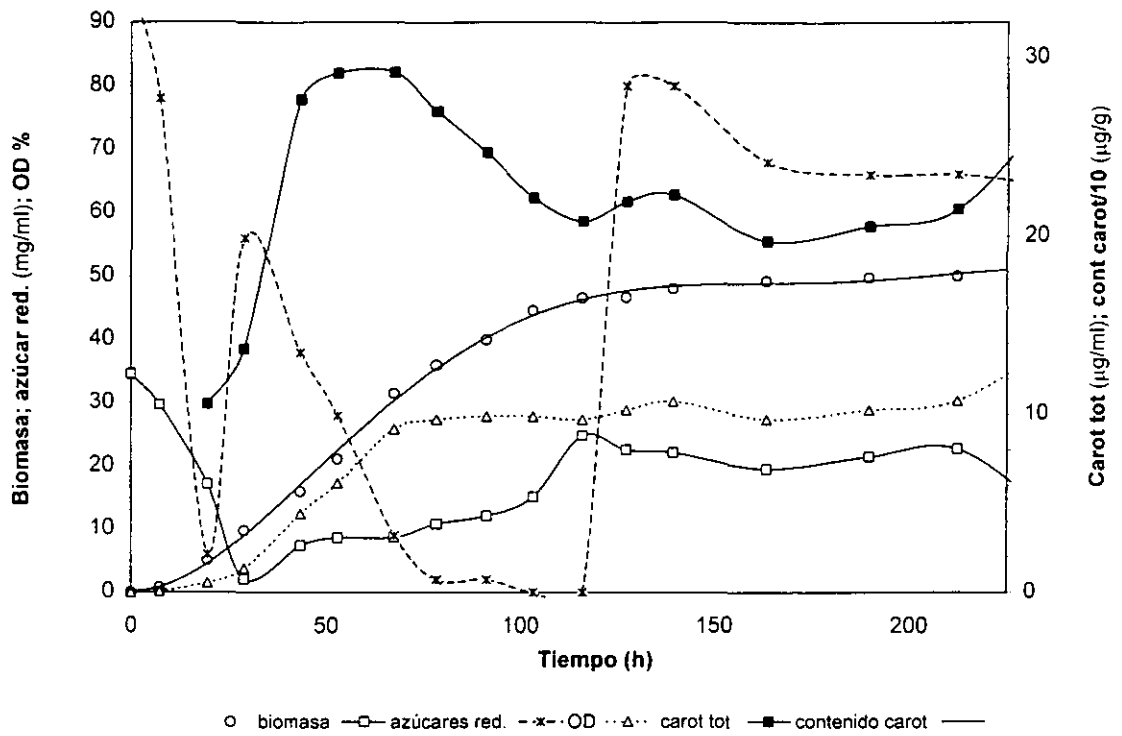


Fig. 5.6. Cultivo alimentado. Parte del diseño factorial realizado para estudiar los efectos de la rapidez de adición de sacarosa, la relación C/N y 2 fuentes de nitrógeno (7.2 g/h, C/N=58, extracto).

niveles de 50 %. Después descendió gradualmente a cero a las 80 h y permaneció así hasta concluir la alimentación de medio (hora 128). La concentración de carotenoides totales aumentó únicamente en el lapso de tiempo de 20-75 h. en presencia de niveles de OD mayores de 10%, pero la acumulación cesó al aproximarse el OD a cero. La concentración final de carotenoides totales fue de sólo 10.4 µg/ml. Como en los experimentos anteriores, el rápido aumento del contenido de carotenoides en las células en el período 20-53 h ocurrió simultáneamente con un descenso considerable del contenido de proteína y con una reducción en la tasa de acumulación de proteína total. En este caso, sin embargo, no se observó durante este período un aumento de rendimiento como el ocurrido en los experimentos anteriores. De manera similar al experimento 3, el rendimiento alcanzó un máximo a las 78 h y después descendió continuamente aparentemente debido a la baja concentración de OD en el medio (Fig. 5.6b).

### *5.3 ANÁLISIS DE RESPUESTAS DEL DISEÑO FACTORIAL $2^{3-1}$*

En la tabla 5.1 se muestra un resumen de los resultados de los experimentos 3, 4, 5 y 6 después de 190 h de fermentación. La tabla 5.2 muestra los efectos principales de los factores, calculados como lo describen Box y col., 1989 a partir de los resultados de la tabla 5.1. Un efecto principal se define como el cambio en la respuesta producido al cambiar el nivel del factor estudiado de - a +. Como se puede observar, la velocidad de alimentación de sacarosa fue el factor que más influyó en el peso seco, la producción total de carotenoides y el contenido de carotenoides en la levadura. Una alimentación lenta (4.7 g/h) aumentó la concentración de carotenoides totales, contenido de carotenoides en la levadura y rendimiento ( $Y_x/s$ ) en comparación con una alimentación rápida de sacarosa ((7.2 g/h). En los experimentos con alimentación rápida de medio (experimentos 3 y 6), la acumulación de carotenoides cesó cuando los niveles de OD descendieron a niveles inferiores a 10-15%. En cambio, en los experimentos con alimentación lenta (experimentos 4 y 5) se observa una mayor concentración de carotenoides totales durante todo el tiempo de duración de los experimentos, en éstos casos el nivel de OD se mantuvo siempre por arriba de 20%. La mezcla de extracto de levadura-sulfato de amonio como fuente de nitrógeno fue ligeramente superior en términos de rendimiento ( $Y_x/s$ ), concentración de carotenoides totales, contenido de carotenoides y peso seco, en comparación con el uso de extracto de levadura solo. Sin embargo, los efectos fueron de menor importancia comparados con los de la velocidad de adición de sacarosa. No se observó un efecto importante de la relación C/N sobre ninguna de las variables analizadas. Sin embargo, éstas

conclusiones deben de considerarse provisionales en virtud de que por una parte se decidió no llevar a cabo los experimentos restantes (la otra mitad) del diseño factorial completo y por otra debido a que no se llevaron a cabo réplicas de los experimentos realizados. A pesar de esto, es claro que la velocidad de adición de medio fue un factor determinante en la fermentación, posiblemente indirectamente a través de su efecto sobre el perfil de oxígeno disuelto.

Tabla 5.1. Resultados de experimentos del diseño factorial  $2^{3-1}$  (190 h de cultivo). (las condiciones de los experimentos 3-6 se indican en la tabla 4.1)

	<b>Peso seco</b>	<b>carot total</b>	<b>contenido carot</b>	<b>contenido proteína</b>	<b>proteína total</b>	<b>Y x/s.</b>	<b>S</b>
	<b>mg/ml</b>	<b>µg/ ml</b>	<b>µg/ g lev</b>	<b>(g/g) x 100</b>	<b>mg/ ml</b>	<b>(g/ g)</b>	<b>mg/ml</b>
Experimento 3	59.3	10.8	182	16.3	9.6	0.28	7.3
Experimento 4	65.2	22.5	346	22.8	14.8	0.32	4.2
Experimento 5	69.4	28.4	409	14.9	10.0	0.37	2.9
Experimento 6	49.8	10.3	206	12.6	6.3	0.25	21.4
Experimento 7	74.0	22.9	310	16.7	12.3	0.45	0.5

Tabla 5.2. Efectos principales de los factores estudiados en el diseño factorial  $2^{3-1}$  (estimados a partir de los resultados de la tabla 5.1)

	<b>Peso seco</b>	<b>carotenoides totales</b>	<b>contenido carotenoides</b>	<b>contenido proteína</b>	<b>proteína total</b>	<b>Y x/s.</b>
<b>Respuesta promedio (4 experimentos)</b>	60.9	18.0	285.7	16.6	10.2	0.305
<b>Velocidad de adición</b>	-12.7	-14.9	-183.7	-4.4	-4.4	-0.080
<b>Relación C/N</b>	-2.6	2.7	43.6	-5.8	-4.1	0.01
<b>extracto/amonio</b>	6.9	3.2	19.3	-2.1	-0.7	0.040



#### 5.4 EXPERIMENTO EN FERMENTADOR CON ADICIÓN DE MINERALES

En la fig. 5.7a se muestran los resultados del experimento 7 que se realizó en un medio de cultivo adicionado con sales minerales. En este experimento la velocidad específica de crecimiento disminuyó durante el periodo de crecimiento lineal (20-163 h) de 0.10 a 0.013 h<sup>-1</sup>. El peso seco y la concentración de carotenoides totales aumentaron prácticamente durante todo el experimento, hasta alcanzar 74 mg/ml y 22.9 µg/ml respectivamente a las 190 horas de edad. Como se esperaba, el rendimiento Y<sub>x/s</sub> (0.45 g lev/g azúcar) fue 22 % más alto que en el experimento 5 que se realizó en condiciones similares pero sin adicionar la solución de minerales y fue también más alto que en cualquiera de los experimentos realizados anteriormente (tabla 5.1). Por consiguiente, esto podría ser un indicador de deficiencia de minerales en los experimentos anteriores a éste. Otro efecto de la adición de minerales fue un menor contenido de carotenoides en la levadura, 310 µg/g comparado con 409 µg/g en el experimento 5 (Fig. 5.5a). Lo que sugiere que alguno o algunos de los minerales adicionados tienen un efecto negativo sobre el contenido de carotenoides de la levadura. Como en los experimentos anteriores, la levadura aumentó rápidamente su contenido de carotenoides de la hora 20 a 67 y posteriormente se mantuvo relativamente constante. El inicio de la síntesis de carotenoides también coincidió con el aumento de la concentración de OD de 0 a 50% (Fig. 5.7a). Otros eventos que ocurrieron simultáneamente con el aumento de carotenoides en las células fueron el descenso del contenido de proteína en las células, un ligero descenso de la tasa de acumulación de proteínas totales y un aumento del rendimiento. Es interesante notar que durante el periodo de rápida acumulación de carotenoides ya se había iniciado el cultivo alimentado. Sin embargo, la alimentación del extracto de levadura contenido en el medio alimentado al fermentador no evitó que el contenido de proteína en las células descendiera sustancialmente. Por otro lado, se puede observar en la fig. 5.7b que en el periodo comprendido de la hora 114 a 163, el rendimiento aumentó considerablemente, mientras descendía la concentración de azúcares de 10 a 1.2 mg/ml. En el experimento 4 se encontró que *P. rhodozyma* es capaz de producir cantidades apreciables de etanol, butanol, isobutanol, propanol y alcohol isoamílico y también de consumirlos en condiciones aeróbicas con limitación de azúcares. El aumento del rendimiento podría entonces deberse al menos en parte al consumo de los alcoholes producidos durante las primeras horas de la fermentación. Durante este periodo, el contenido de proteína de las células y la tasa de producción de proteínas

Experimento adicionando sales minerales (experimento 7).

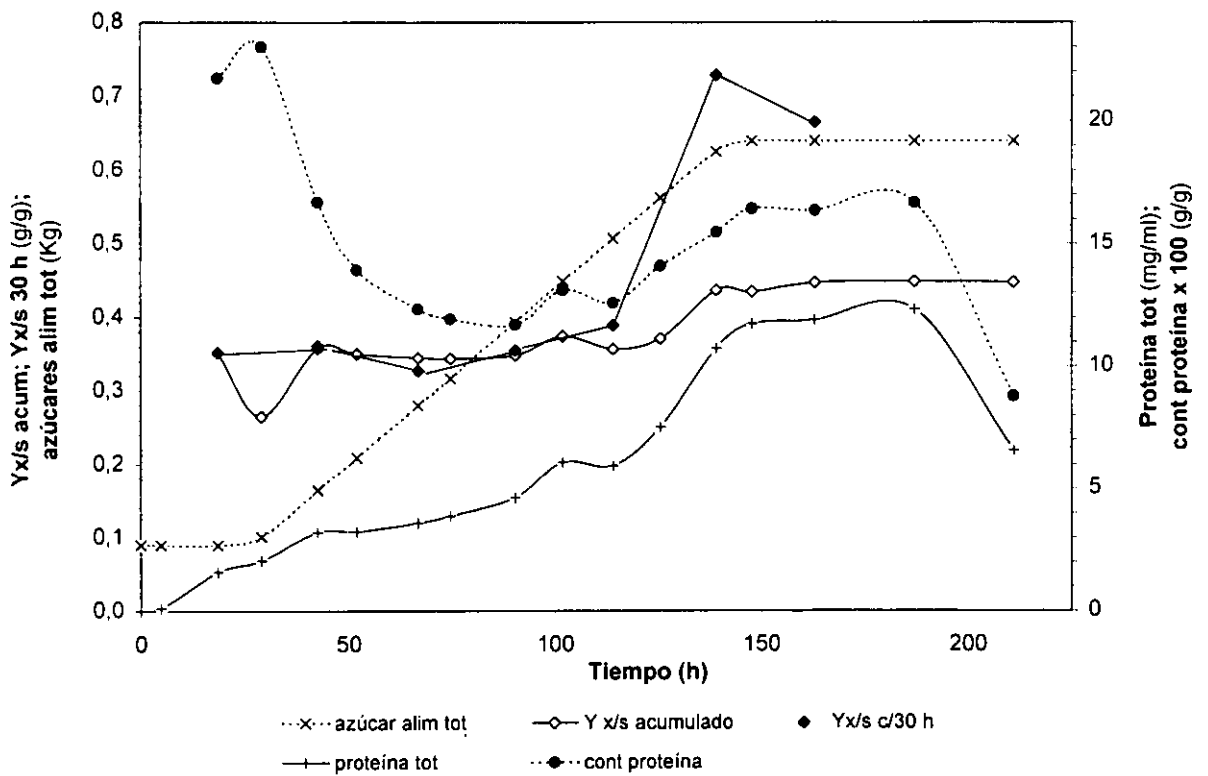
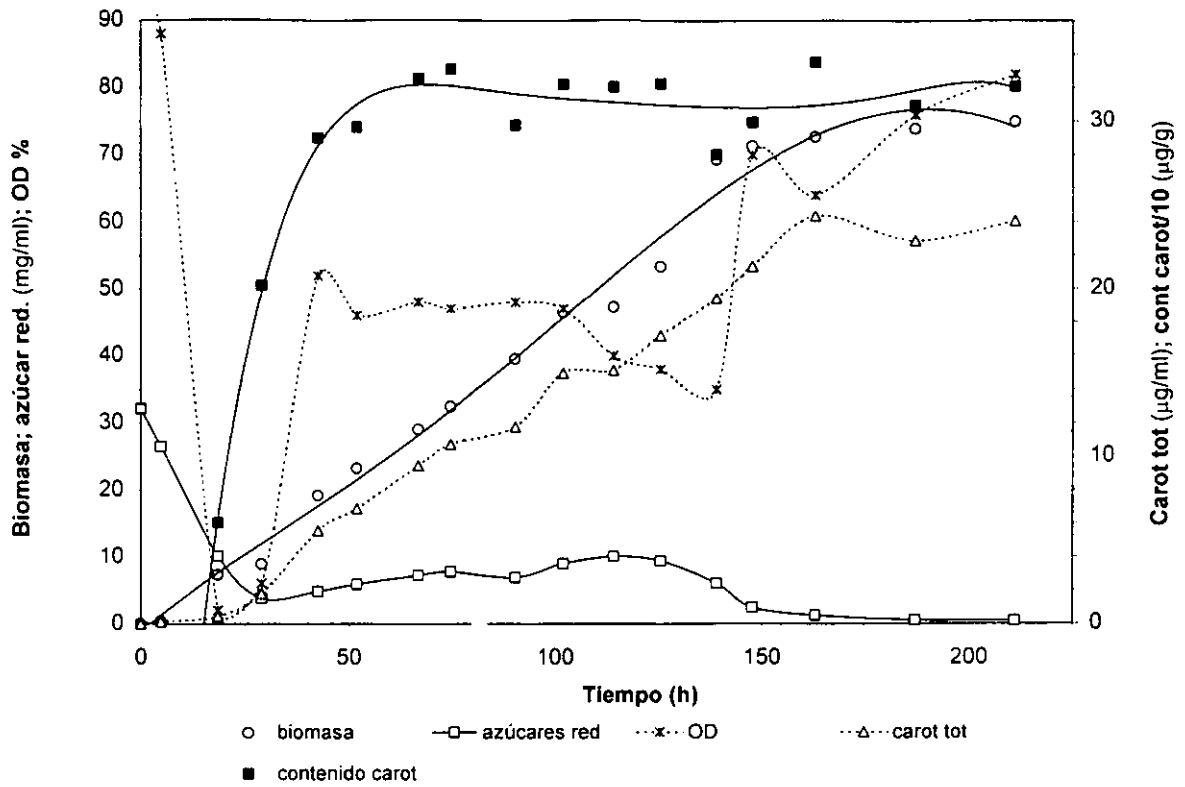


Fig. 5.7. Cultivo en lote alimentado de *P. rhodospirillum* con adición de sales minerales. Las primeras 24 h corresponden a cultivo en lote.

totales se incrementaron también significativamente, posiblemente para adaptarse a cambios en las condiciones ambientales en el medio de cultivo.

### 5.5 EXPERIMENTOS CON CONCENTRACIONES VARIABLES DE N, P y K

Se llevaron a cabo 6 experimentos en matraces, en los que se variaron sistemáticamente las concentraciones de nitrógeno (experimentos 1M y 4M), fosfatos (experimentos 2M y 5M) y potasio (experimentos 3M y 6M). Los resultados de los experimentos 4M con nitrógeno y 5M con fosfato, además de mencionarlos brevemente aquí, se reportan y analizan con el experimento con citratos (experimento 10M) en el artículo incluido en el anexo: "Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium", que se publicó recientemente en la revista Applied Microbiology and Biotechnology (Flores-Cotera y col., 2001). Las diferencias más importantes entre los experimentos reportados en el artículo y los experimentos 1M, 2M fueron: a). En los experimentos del artículo se adicionó citrato de sodio (2.5 mg/ml) para elevar el pH b). En los experimentos del artículo se estudiaron un rango de concentraciones más amplio en el rango de bajas concentraciones c). En los experimentos 1M y 2M no se analizaron: astaxantina, lípidos, fosfato residual ni amonio residual. En todos los casos, al igual que en los experimentos con magnesio, cobre, hierro y citratos los valores reportados fueron determinados después de 156 h de cultivo.

### 5.6 EXPERIMENTOS CON CONCENTRACIONES VARIABLES DE NITRÓGENO

Experimento 1M (en matraz). Para estudiar el efecto de la concentración de amonio en *P. rhodozyma* se llevaron a cabo experimentos en los que se varió sistemáticamente la concentración de sulfato de amonio en un medio químicamente definido (10.7 a 50 mM). En la fig. 5.8a se observa un ligero aumento del peso seco así como de la concentración de carotenoides totales al reducirse la concentración de sulfato de amonio en el medio de cultivo. En cambio, la levadura no cambió apreciablemente su contenido de carotenoides en diferentes concentraciones de amonio. Como era de esperarse el contenido de proteínas en la levadura y la concentración de proteína total aumentaron al aumentar la concentración de amonio en el medio, pero a valores mayores de 50 mM los niveles tienden a estabilizarse (Fig. 5.8b). También puede observarse un aumento de  $Y_{x/s}$  a bajas concentraciones de sulfato de amonio, lo que sugiere acumulación de lípidos o carbohidratos de

## Experimento 1M

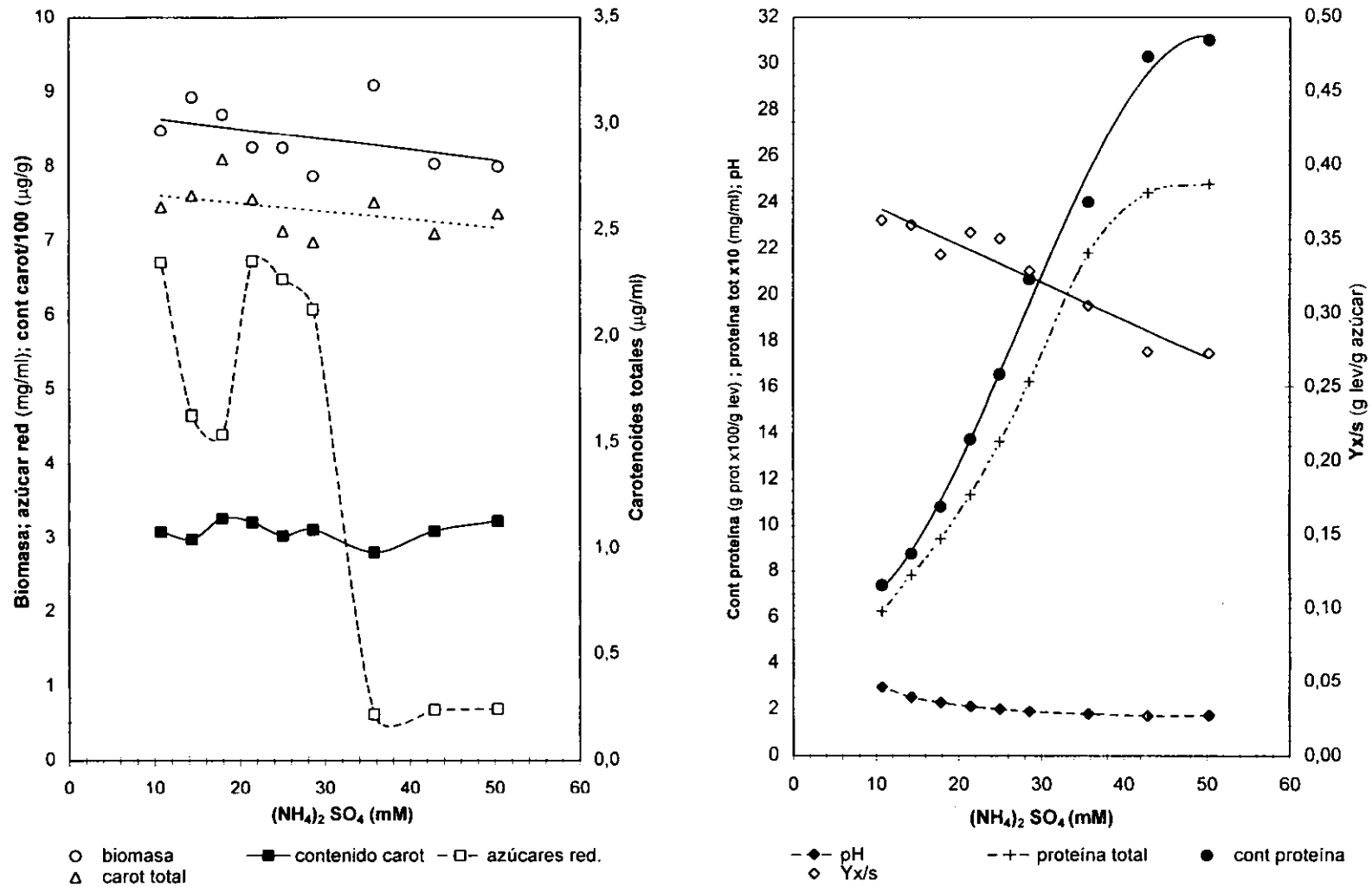


Fig. 5.8. Efectos de concentraciones variables de amonio en *P. rhodozyma* cultivada en matraz (sin citrato). Valores determinados a las 156 h de cultivo.

reserva en estas condiciones. Por otro lado, en el experimento del artículo (4M en presencia de citrato), los valores de peso seco, concentración final de carotenoides totales y contenido de carotenoides fueron apreciablemente mayores que los obtenidos en este experimento. En cambio, el contenido de proteína en las células fue menor y la proteína total ligeramente menor, con relación a este experimento. Estos datos sugieren la acumulación de lípidos o carbohidratos de reserva en presencia de citrato (4M). La comparación de las figuras 5.8a y 1A (anexo) sugiere un efecto estimulante de citrato sobre el peso seco, carotenoides totales y contenido de carotenoides, pero un efecto ligeramente inhibitorio sobre el contenido de proteína en las células y sobre la proteína total.

Experimento 4M. Las figuras de este experimento se muestran en el anexo. A concentraciones de amonio en el rango de 12.9 a 22.9 mM se alcanzaron las concentraciones máximas de astaxantina y pigmento total, 2.4 y 3.9  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente (Fig. 1A). Se puede apreciar una ligera tendencia decreciente de las concentraciones de astaxantina (2.4 a 1.2  $\mu\text{g/ml}$ ) y pigmento total (3.9 a 3.3  $\mu\text{g/ml}$ ) a concentraciones de amonio por arriba de 22.9 mM, pero una importante caída a concentraciones de amonio por debajo de 13 mM. De manera similar, las células disminuyeron su contenido de astaxantina de 302 a 140  $\mu\text{g/g}$  al aumentar la concentración de amonio de 2.1 a 61 mM. En contraste y posiblemente debido al descenso simultáneo del peso seco (Fig. 1B), no se apreció una tendencia definida en el contenido total de pigmento en las células. Sin embargo, la relación astaxantina/pigmento total aumentó significativamente a bajas concentraciones de amonio. La Fig. 1B muestra que el peso seco alcanzó un máximo de 10.9 mg/ml a 28.6 mM de amonio pero disminuyó notablemente a concentraciones por debajo y por arriba de este nivel. El rendimiento ( $Y_x/s$ ) presentó una tendencia similar a la de peso seco con un máximo de 0.37 g cel/g azúcar. Cantidades apreciables de amonio residual se detectaron solo a concentraciones iniciales de amonio por arriba de 34 mM (Fig. 1C). Como se esperaba, el contenido de proteína en las células aumentó (0.06 a 0.24 g/g cel) paralelamente con la concentración de amonio hasta aproximadamente 43 mM pero se mantuvo constante por arriba de este nivel (Fig. 1C). Como lo sugiere la drástica caída de peso seco en la Fig. 1B, la replicación celular probablemente fue afectada a concentraciones de amonio por debajo de 22.9 mM. A concentraciones de amonio por debajo de 12.9 mM, el efecto de la deficiencia de nitrógeno es evidenciado también por la presencia de azúcares, aún después de 6.5 días de cultivo (Fig 1B). Sin embargo, aún en estas condiciones adversas los contenidos de astaxantina y ácidos grasos en las células aumentaron y el contenido de pigmento total no disminuyó apreciablemente (Fig. 1A y 1C).

## 5.7 EXPERIMENTOS CON CONCENTRACIONES VARIABLES DE FOSFATOS

Experimento 2M (en matraz). Para estudiar el efecto del fosfato en *P. rhodozyma* se usaron concentraciones variables de fosfato (2.1 a 11 mM) en un medio químicamente definido. En las figs. 5.9a y 5.9b podemos observar que el peso seco, la concentración de carotenoides totales y el rendimiento ( $Y_{x/s}$ ) aumentaron al reducir la concentración de fosfatos en el medio de cultivo. La levadura aumentó ligeramente su contenido de carotenoides al reducirse la concentración de fosfato, sin embargo, este último efecto no se observó en el experimento 5M que se describe enseguida. El contenido de proteínas de la levadura aumentó al aumentar la concentración de fosfatos, pero la concentración de proteína se mantuvo relativamente constante (Fig. 5.9b). Aún cuando las tendencias de la mayoría de los parámetros fueron similares a las del experimento 5M, los valores de peso seco,  $Y_{x/s}$ , concentración de carotenoides totales y el contenido de carotenoides fueron apreciablemente menores. En contraste, la concentración de proteína total no fue sensiblemente diferente, pero el contenido de proteína en las células fue un poco mayor en este experimento (2M). Estos datos, junto con el menor peso seco, sugieren que en ausencia de citrato hay una menor acumulación de lípidos o carbohidratos de reserva.

Experimento 5M. Las figuras de este experimento se muestran en el anexo. La Fig. 2A nos indica una tendencia decreciente de la concentración de astaxantina (2.3 a 1.7  $\mu\text{g/ml}$ ) y pigmento total (4.6 a 4.0  $\mu\text{g/ml}$ ) al aumentar la concentración de fosfato de 1.3 a 4.7 mM. Sin embargo, el contenido de pigmento total fue relativamente constante. Un hecho notable fue que la relación astaxantina/pigmento total aumentó gradualmente al reducirse la concentración de fosfatos. El peso seco alcanzó un máximo de 11.1 mg/ml a 0.65 mM de fosfato y disminuyó ligeramente al aumentar la concentración de fosfato (Fig. 2B). El rendimiento ( $Y_{x/s}$ ) exhibió una tendencia similar al peso seco con un máximo de 0.38 g levadura/g azúcar. El pH fue relativamente constante (Fig. 2B). Por otro lado, la concentración de proteína (0.8-1.9 mg/ml) y el contenido de proteína en las células aumentó (0.08-0.19 g/g células) al aumentar la concentración de fosfato (Fig. 2C). Sin embargo, el aumento de proteína estuvo asociado con un menor peso seco (Fig. 2B). Las concentraciones más altas de astaxantina y pigmento total (2.4 y 4.5  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente) ocurrieron junto con un relativamente alto peso seco a concentraciones de fosfato entre 0.65 y 1.3 mM. El mayor peso seco observado a bajas concentraciones de fosfato se debió al menos en parte a la acumulación de ácidos

## Experimento 2M

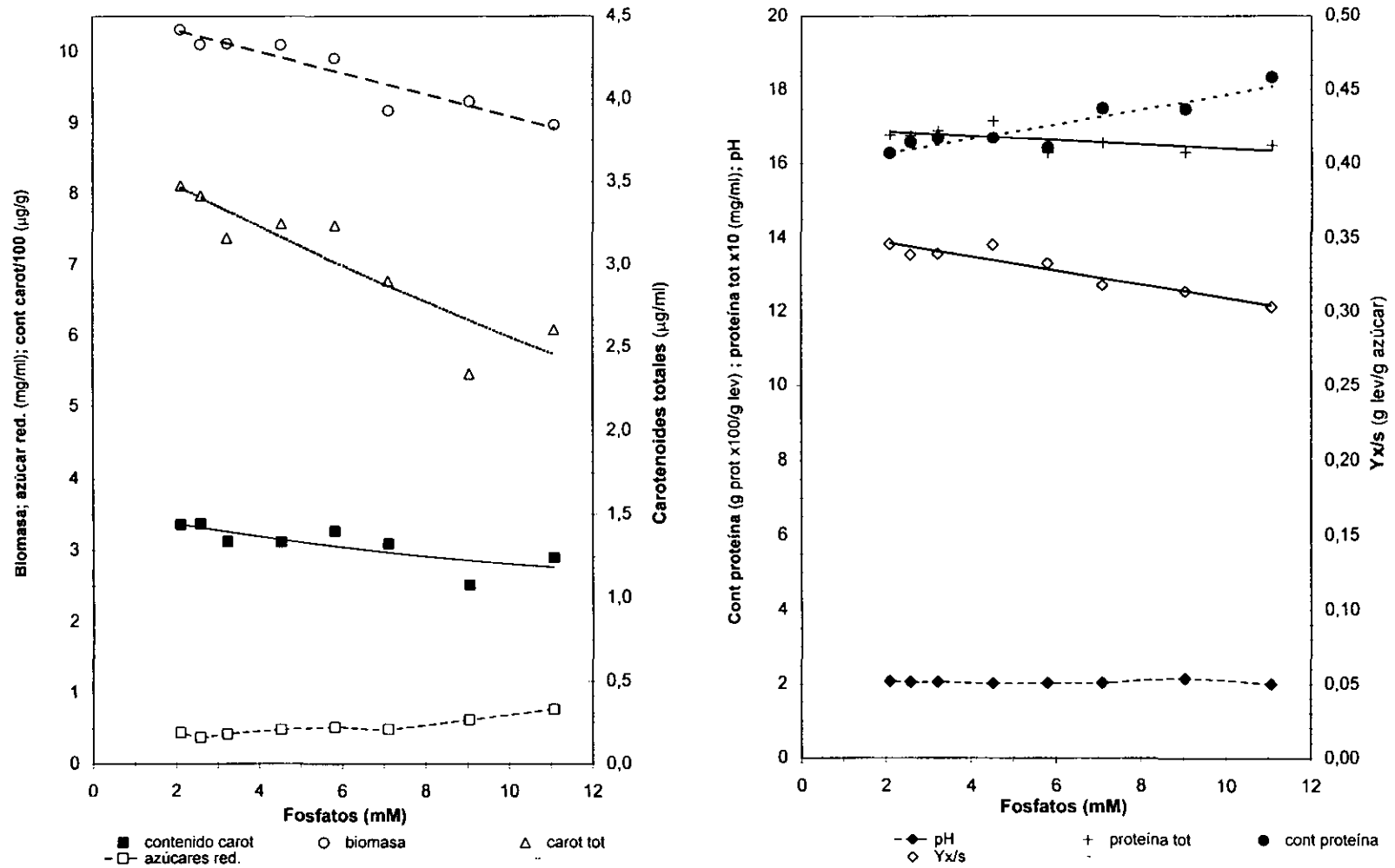


Fig 5.9. Efectos de concentraciones variables de fosfatos en *P. rhodozyma* cultivada en matraz (sin citrato). Valores determinados a las 156 h de cultivo.

grasos (Fig. 2C). Es de resaltar que cantidades apreciables de fosfato residual solo se detectaron a concentraciones de fosfato inicial por arriba de 7.1 mM (Fig. 2C).

### ***5.8 EXPERIMENTO CON CONCENTRACIONES VARIABLES DE POTASIO***

Experimentos 3M y 6M (en matraz). En las figs. 5.10a, 5.10b, 5.11a y 5.11b se muestran los resultados de los dos experimentos en los que se varió la concentración de potasio. En el experimento 6M se usó una concentración de 2.5 mg/ml de citrato de sodio. En ambos casos se observa que el peso seco, la concentración de carotenoides totales, contenido de carotenoides y  $Y_{x/s}$  no variaron sensiblemente a concentraciones de potasio mayores de 1 mM. A concentraciones menores a 1 mM, se observa un descenso pronunciado de todos los parámetros anteriores. El contenido de proteína y la proteína total tuvieron variación, sin embargo, esto aparentemente no afectó la producción de carotenoides. Todo esto sugiere que el potasio se requiere a una concentración de al menos 1 a 2 mM para el cultivo de *P. rhodozyma*. En el experimento 6M, el peso seco, la concentración de carotenoides totales y el contenido de carotenoides en las células fueron apreciablemente mayores que en el experimento 3M, lo que sugiere como en los experimentos anteriores una estimulación de estos parámetros por citrato.

### ***5.9 EXPERIMENTO CON CONCENTRACIONES VARIABLES DE MAGNESIO***

Experimento 7M (en matraz). A concentraciones menores de 0.3 mM de magnesio (Mg), se observa un descenso pronunciado de peso seco,  $Y_{x/s}$  y proteína total (Figs. 5.12a y 5.12b). Por otro lado, concentraciones por debajo de 0.3 mM, estimularon el contenido de carotenoides en la levadura. A una concentración de 0.2 mM se observó la mayor concentración de carotenoides totales. Concentraciones por debajo de 0.1 mM inhibieron fuertemente el consumo de azúcares, pero esto fue acompañado por un aumento del contenido de proteína en las células. La astaxantina total y el contenido de astaxantina en las células descendieron rápidamente por debajo de 0.2 mM, pero permanecieron sin variación apreciable en el rango de 0.2 a 6.2 mM. Concentraciones de magnesio por arriba de 0.2 mM tampoco tuvieron un efecto apreciable en peso seco, carotenoides totales, contenido de carotenoides,  $Y_{x/s}$ , proteína total ni en la proteína contenida en la levadura.



## Experimento 3M

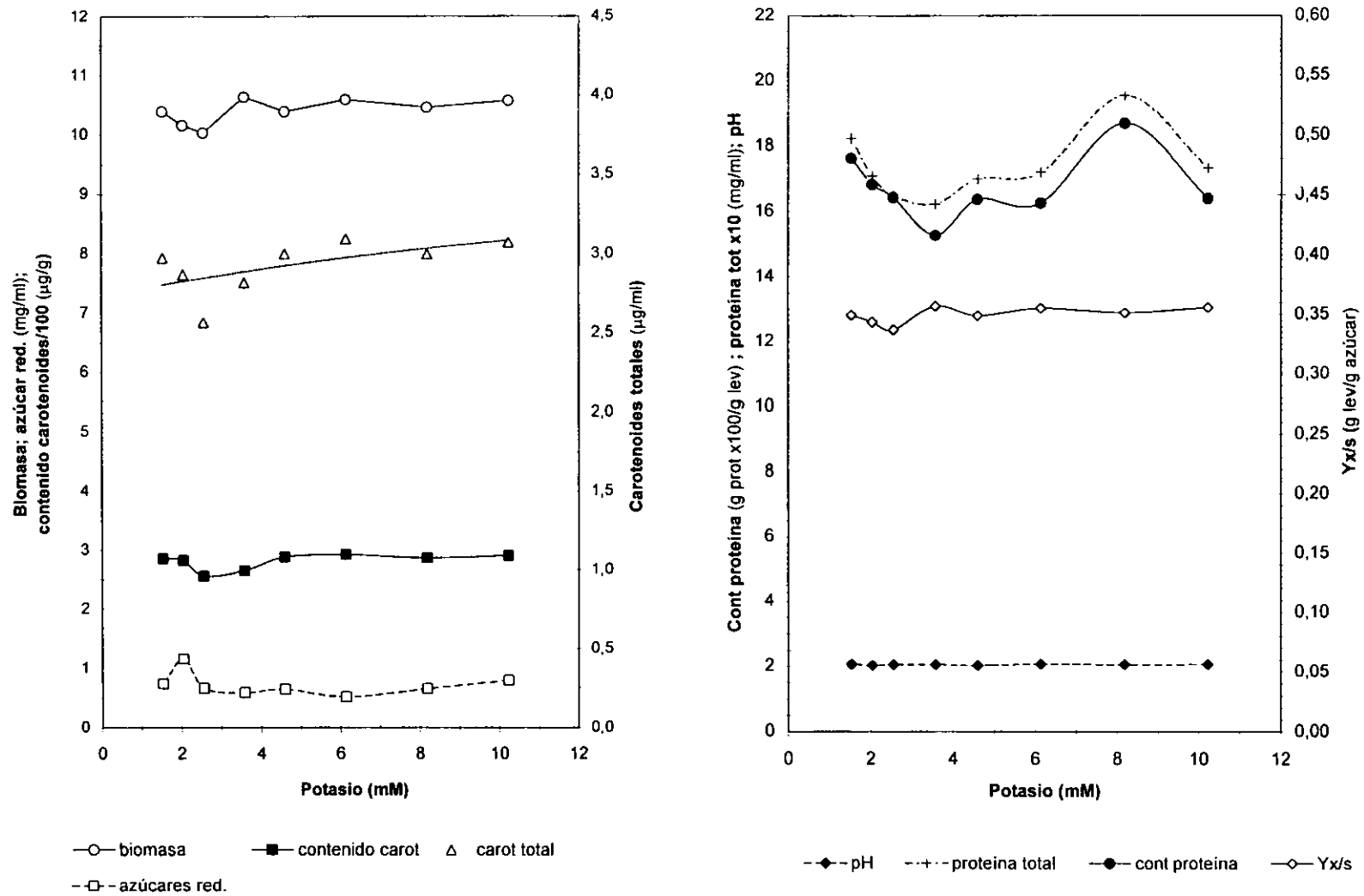


Fig. 5.10. Efectos de concentraciones variables de potasio en *P. rhodozyma* cultivada en matraz (sin citrato). Valores determinados a las 156 h de cultivo.

## Experimento 6M

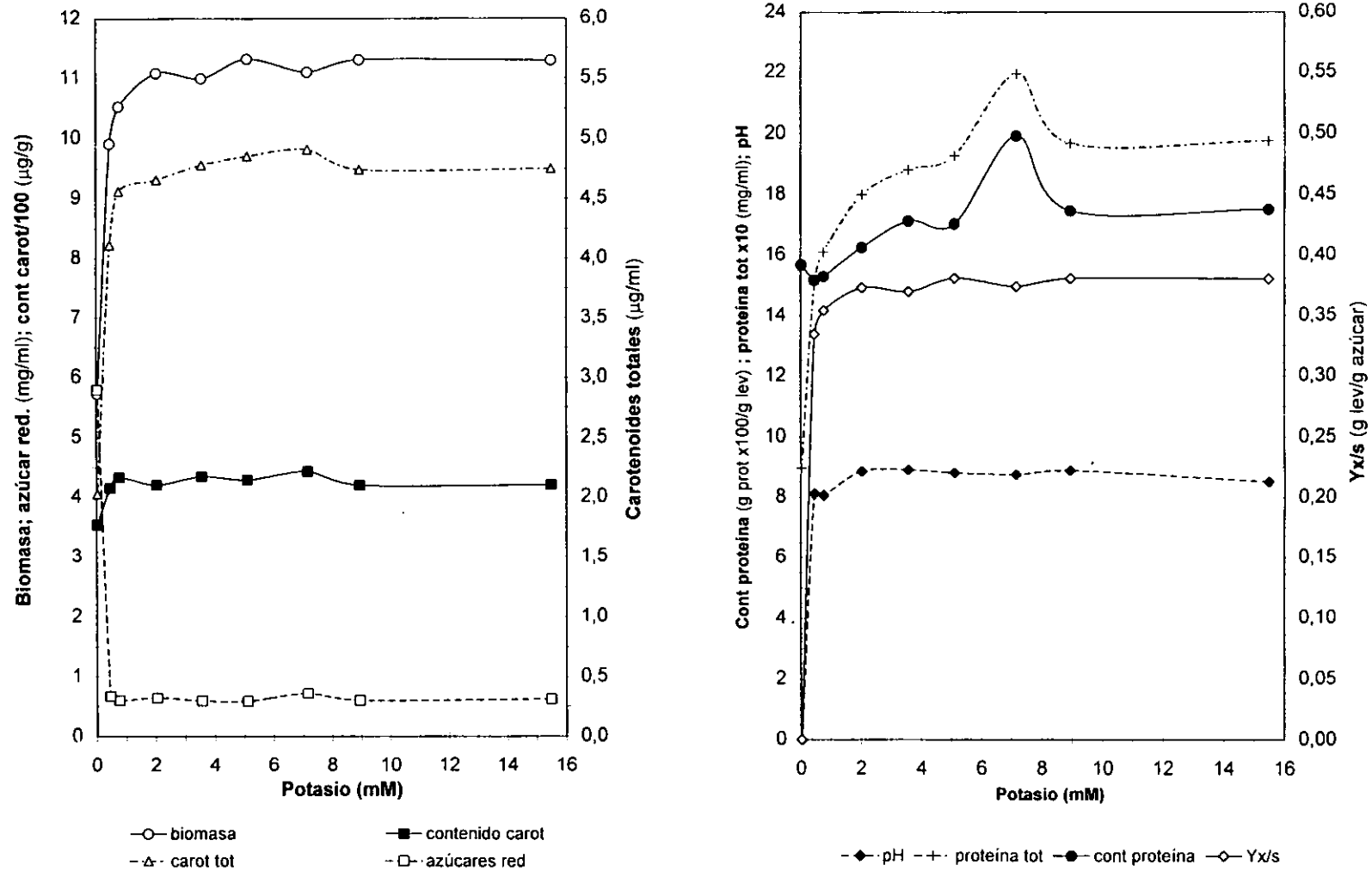


Fig. 5.11. Efectos de concentraciones variables de potasio en *P. rhodozyma* cultivada en matraz (en presencia de citrato). Valores determinados a las 156 h de cultivo.

## Experimento 7M

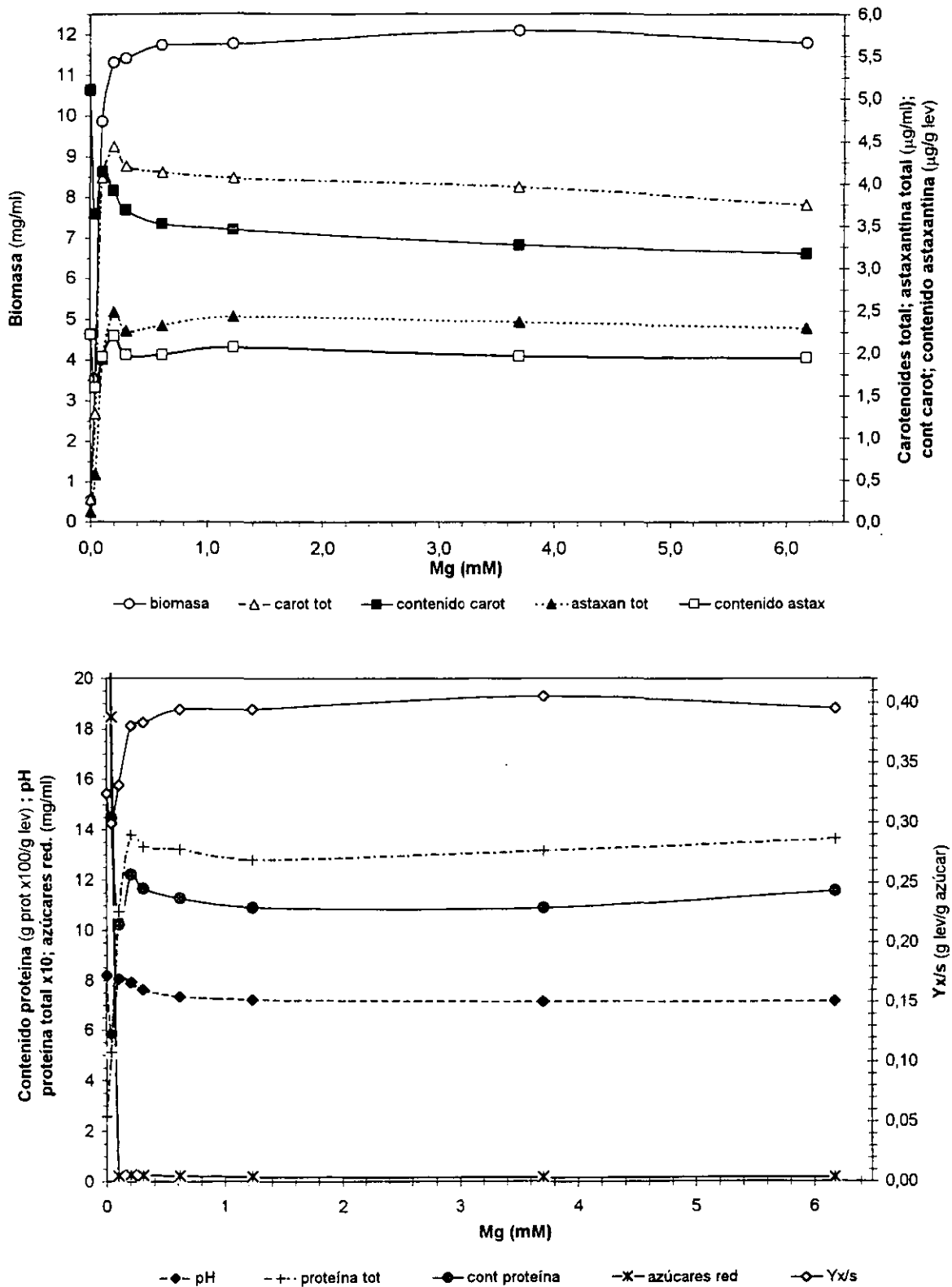


Fig. 5.12. Efectos de concentraciones variables de magnesio en *P. rhodozyma* cultivada en matraz. Valores determinados a las 156 h de cultivo.

### 5.10 EXPERIMENTO CON CONCENTRACIONES VARIABLES DE COBRE

Experimento 8M (en matraz). Las tendencias observadas al variar la concentración de cobre (0-32  $\mu\text{M}$ ) fueron semejantes a los observados con el magnesio, aunque en un rango de concentraciones diferente (Figs. 13a y 13b). A concentraciones menores de 0.5  $\mu\text{M}$ , se observa un descenso pronunciado de peso seco,  $Y_x/s$  y proteína total. A menor concentración de cobre en el rango por debajo de 1.5  $\mu\text{M}$  se puede observar un aumento de la concentración de carotenoides totales, concentración de astaxantina, contenido de carotenoides, contenido de astaxantina y contenido de proteína. Es decir, bajas concentraciones de cobre estimulan la síntesis de carotenoides. Por otro lado, en el rango de concentraciones de 2 a 31  $\mu\text{M}$  no se apreció un cambio importante en ninguna de las variables estudiadas.

### 5.11 EXPERIMENTO CON CONCENTRACIONES VARIABLES DE HIERRO

Experimento 9M (en matraz). Las figs. 5.14a y 5.14b muestran los resultados obtenidos cuando se varió la concentración de hierro (Fe). A concentraciones menores de 1  $\mu\text{M}$  se observa un descenso pronunciado en el peso seco, concentración de carotenoides totales, contenido de carotenoides,  $Y_x/s$  y proteína total pero a concentraciones mayores de hierro mayores de 1 a 2  $\mu\text{M}$ , estos parámetros no variaron sensiblemente. Por otra parte, concentraciones menores de 1  $\mu\text{M}$  aumentaron sensiblemente el contenido de proteína y la concentración de azúcares residuales, pero concentraciones mayores no afectaron estos parámetros (Fig. 5.15b). Esto sugiere que la presencia de hierro a concentraciones de 1  $\mu\text{M}$  o más, son necesarias para el crecimiento y producción de carotenoides por *P. rhodozyma*.

En las figs. 5.15a y 5.15b se han graficado los datos de peso seco vs. contenido de carotenoides en la levadura y rendimiento vs. contenido de carotenoides de los experimentos con niveles variables de cobre, magnesio y hierro. Puede observarse que el contenido de carotenoides tiene en general una relación inversa con el peso seco y rendimiento. Es decir, el mayor contenido de carotenoides se obtiene cuando es menor el crecimiento o el rendimiento.

## Experimento 8M

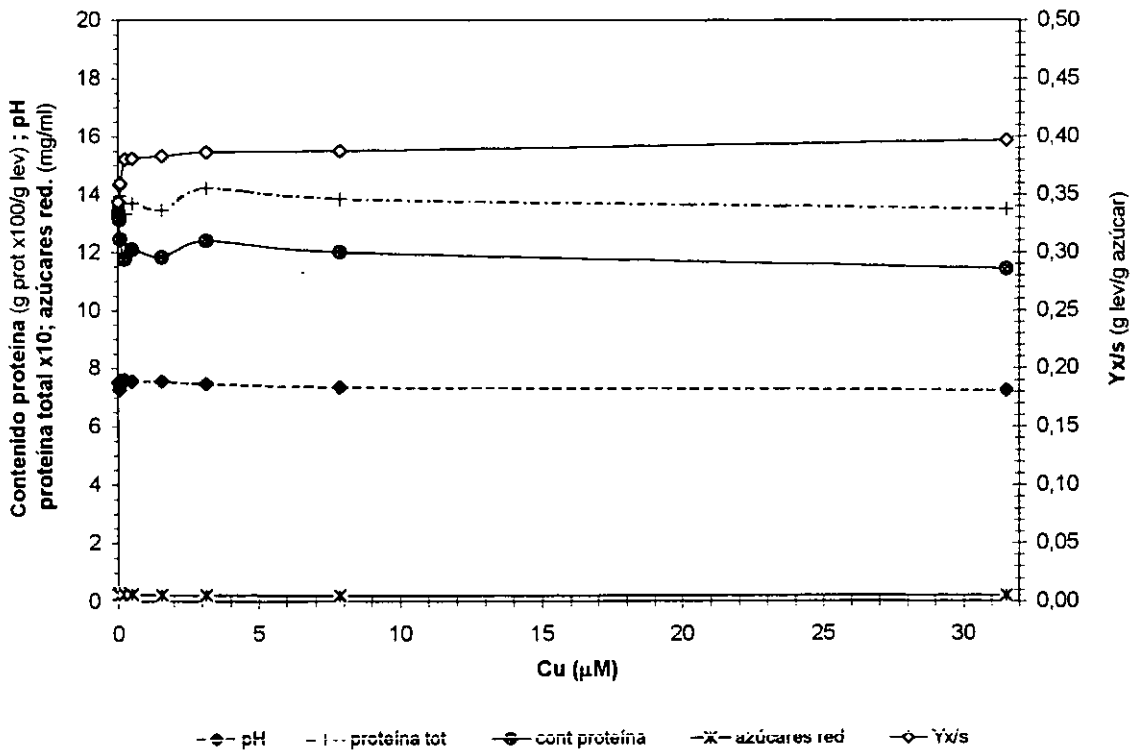
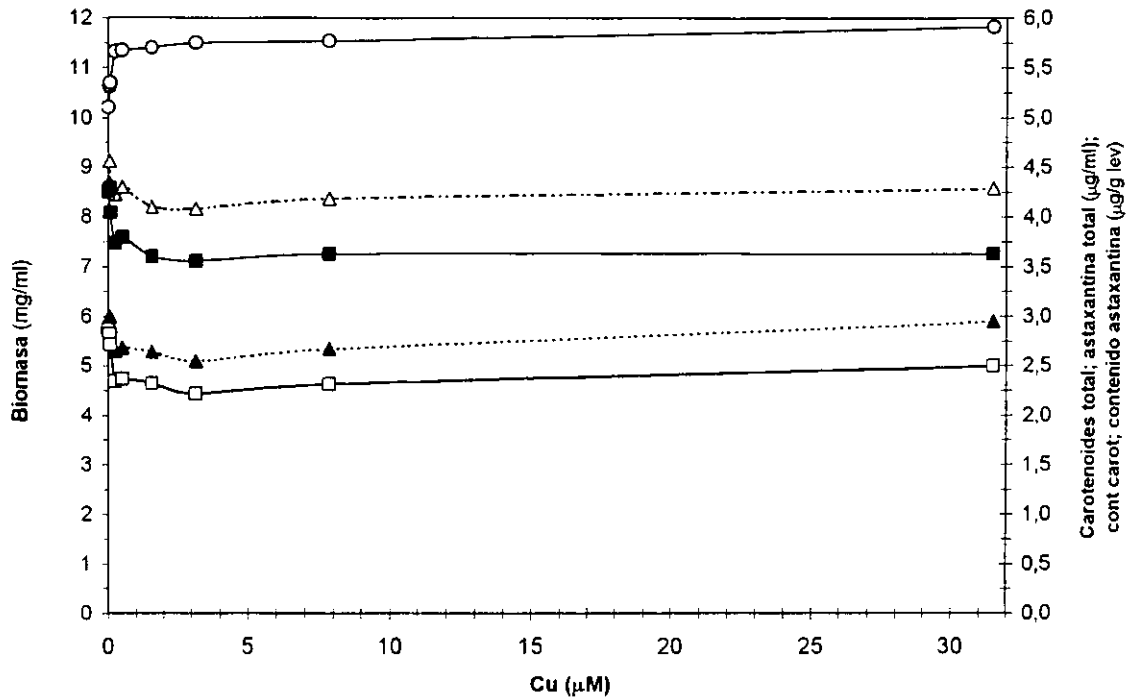


Fig. 5.13. Efectos de concentraciones variables de cobre en *P. rhodozyma* cultivada en matraz. Valores determinados a las 156 h de cultivo.

Experimento 8M: Efecto de la concentración de cobre (0-8  $\mu\text{M}$ )

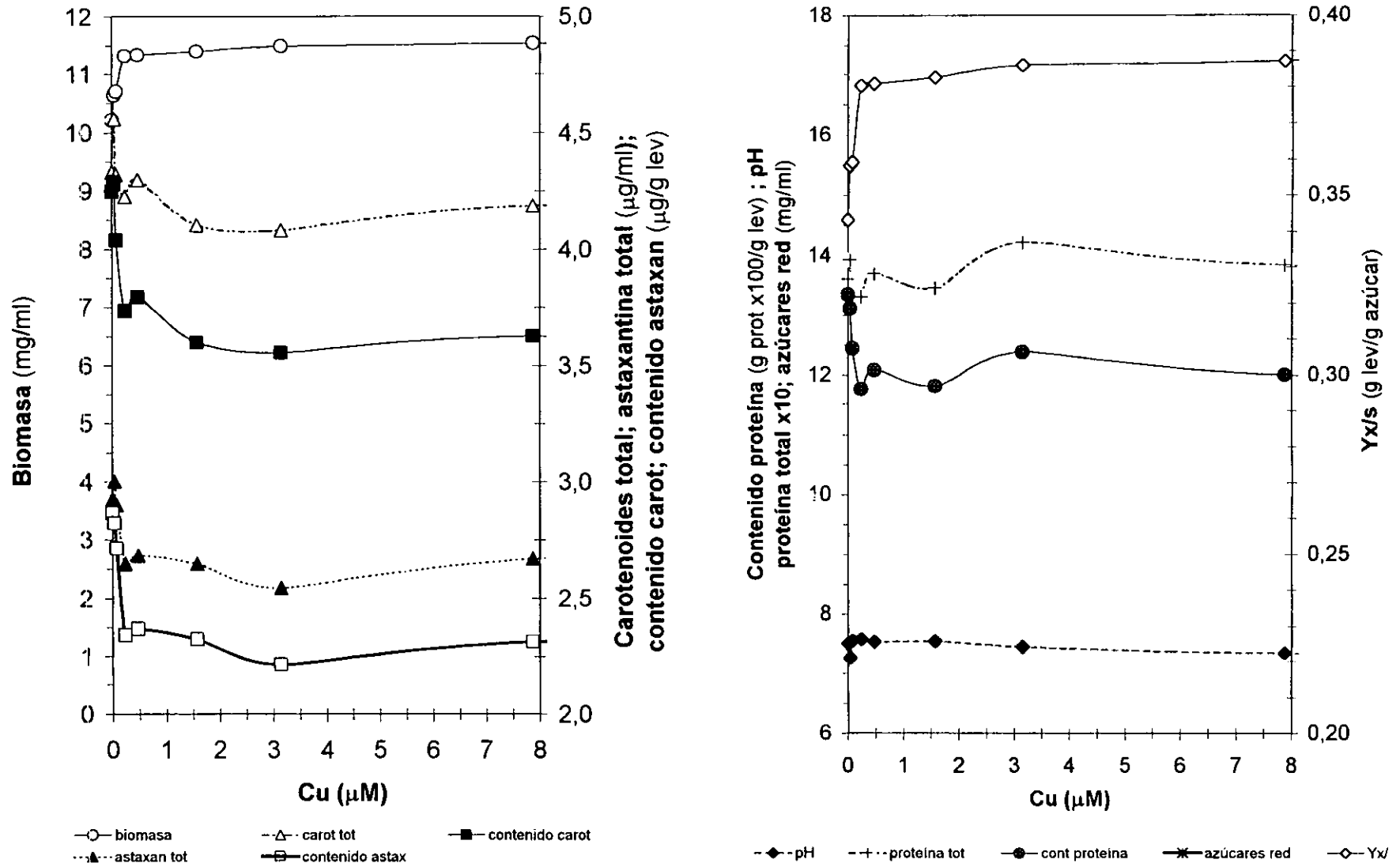


Fig. 5.13. Efectos de concentraciones variables de cobre en *P. rhodozyma* cultivada en matraz (Rango de 0 a 8  $\mu\text{M}$ ).

## Experimento 9M

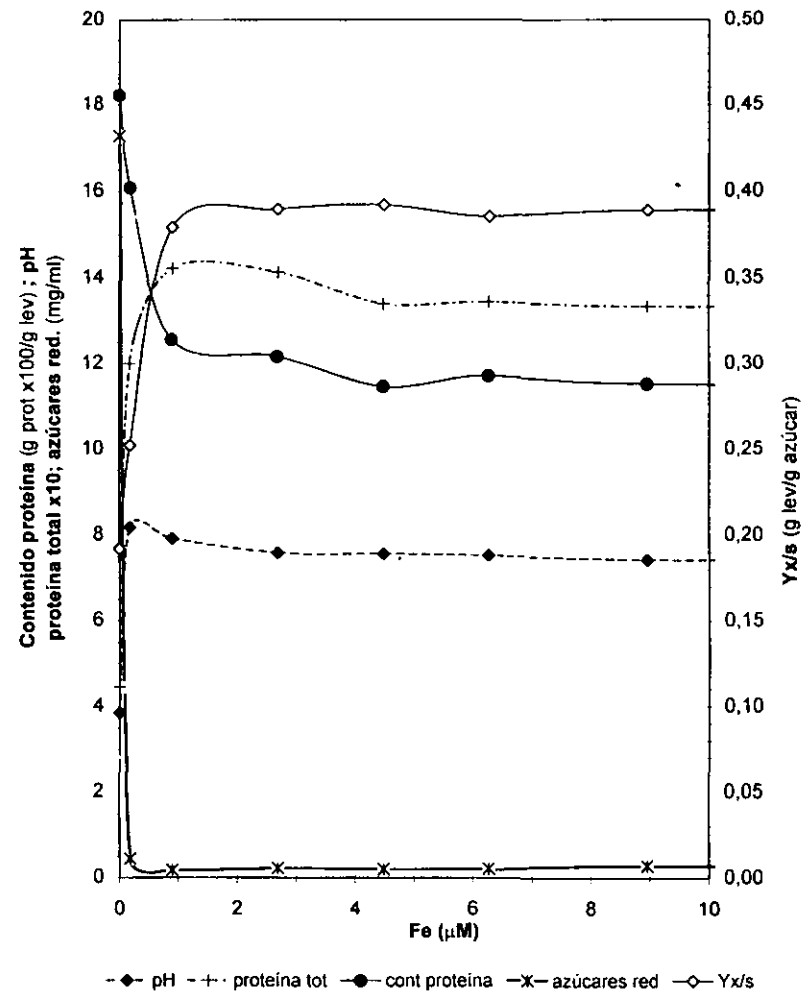
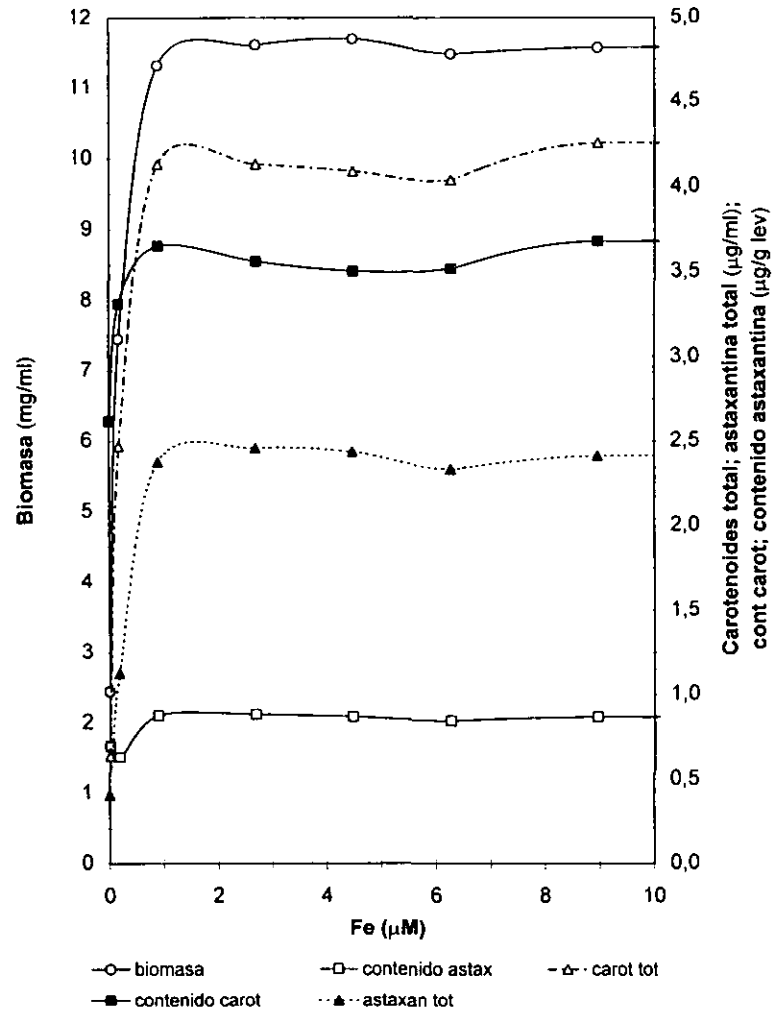


Fig. 5.14. Efectos de concentraciones variables de hierro en *P. rhodozyma* cultivada en matraz. Valores determinados a las 156 h de cultivo.

## Experimentos 7M a 9M

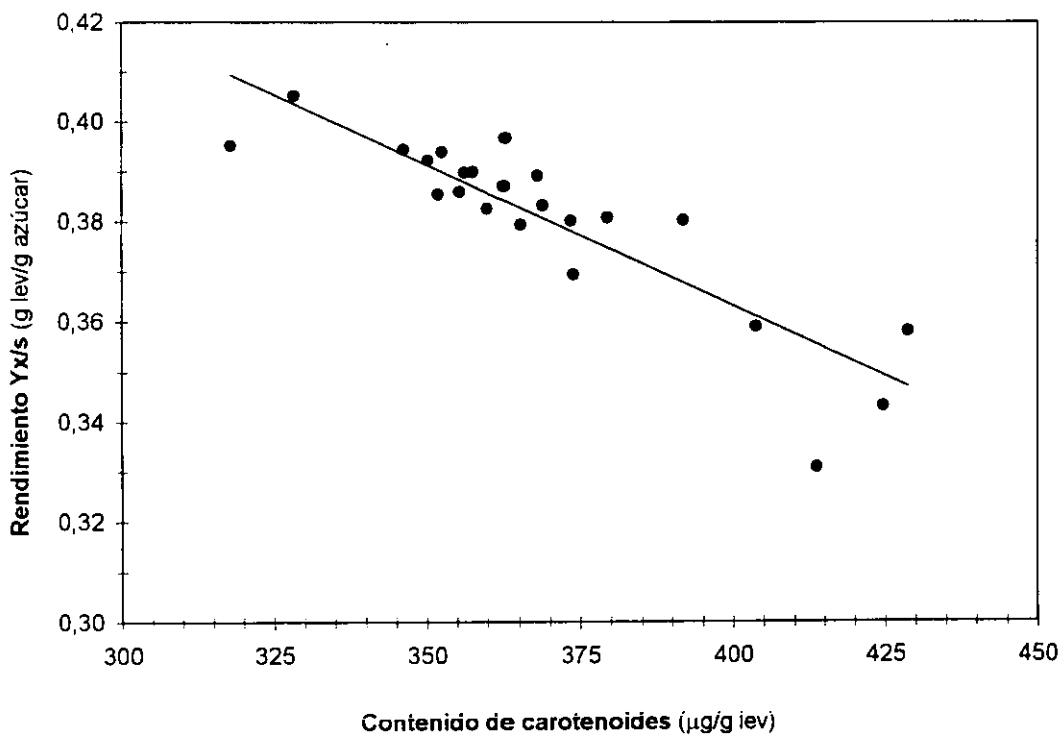
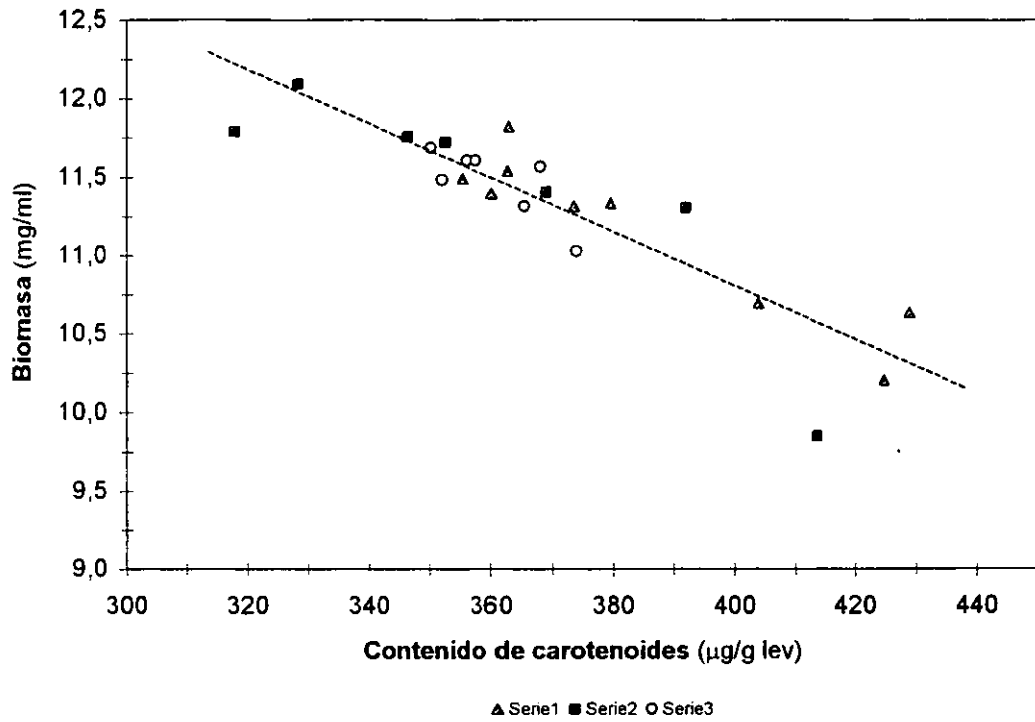


Fig. 5.15. Biomasa y rendimiento ( $Y_{x/s}$ ) en función del contenido de carotenoides. Serie 1: datos de Fe variable, Serie 2: datos de Mg variable, Serie 3: datos de Cu variable.



### 5.12 EXPERIMENTO CON CONCENTRACIONES VARIABLES DE CITRATO

Experimento 10M (en matraz). Se llevó a cabo un experimento con concentraciones variables de citrato (0-58 mM) en el medio. Las figuras de este experimento se muestran en el anexo. La fig. 3A muestra una concentración de pigmento y un contenido en las células similar en cultivos crecidos en ausencia de citrato o en presencia de 1.2 mM de citrato. En contraste una concentración por arriba de 28.9 mM de citrato estimuló la concentración total de pigmento y el contenido de pigmento en las células. Sin embargo, ni la concentración de astaxantina ni el contenido de astaxantina en las células aumentó apreciablemente. Es decir, la proporción de astaxantina en el pigmento extraído se redujo al aumentar la concentración de citrato. Por otro lado, el peso seco y el rendimiento disminuyeron al aumentar la concentración de citrato (Fig. 3B). De forma similar, como lo sugieren las tendencias de concentración de proteína y contenido de proteína en las células, la síntesis de proteína fue afectada negativamente por el citrato. Es interesante que en los experimentos con amonio, fosfato y citrato variables la concentración de proteína y el contenido en las células presentó una tendencia opuesta a la de pigmento. En conjunto esto sugiere que la restricción en la síntesis de proteína estimula la síntesis de carotenoides en *P. rhodozyma*.

## 6 DISCUSION

### 6.1 EXPERIMENTOS EN FERMENTADOR.

En todos los experimentos realizados en fermentador se observó que la transición de cultivo en lote a cultivo alimentado es especialmente importante desde el punto de vista de la síntesis de carotenoides y del metabolismo de la levadura. En prácticamente todos los experimentos se observaron durante este período de transición (20-60 horas) un rápido aumento del contenido de carotenoides en las células acompañado por una disminución del contenido de proteína. Estos eventos ocurrieron en presencia de concentraciones de azúcares por debajo de 10 mg/ml y fueron acompañados invariablemente por incrementos en la concentración de OD y del rendimiento ( $Yx/s$ ). Adicionalmente, en el único experimento en el que se midió etanol (exp. 4), se pudo observar un rápido consumo de etanol durante este período. La reasimilación del etanol producido en las primeras horas de cultivo es un comportamiento común de levaduras en la fase exponencial tardía al reducirse la concentración de azúcares y aumentar la de oxígeno, de manera que también habría que esperar este comportamiento en los otros experimentos realizados. De hecho el aumento de rendimiento en este período sugiere que este es el caso.

### 6.2 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO DISUELTO (OD)

El aumento de la concentración de OD que ocurre en la transición de cultivo en lote a cultivo alimentado, podría ser un factor determinante en la inducción de la síntesis de carotenoides en *P. rhodozyma*. Esto es sugerido por lo siguiente: a). En todos los experimentos la concentración de carotenoides totales solo aumentó cuando la concentración de OD fue superior a 15-20% b). La acumulación de carotenoides ( $\mu\text{g/ml}$ ) se detuvo al aproximarse el nivel de OD a cero (experimentos 2, 3 y 6), c). El contenido de carotenoides en la levadura fue considerablemente mayor en los experimentos en los que prevalecieron condiciones aeróbicas durante toda la fermentación ( $378 \mu\text{g/g}$ , prom. exp. 4 y 5) en comparación con aquéllos en los que ocurrieron períodos prolongados de limitación por oxígeno ( $194 \mu\text{g/g}$ , prom. exp. 3 y 6), d). Cuando la concentración de OD es menor de 15-20%, ocurre generalmente un descenso pronunciado del contenido de carotenoides en las células (experimentos 2, 3 y 6). En ausencia de una síntesis apreciable, esto podría deberse a una redistribución de los carotenoides presentes a las hijas conforme la levadura crece o a una

degradación de los mismos. Por otro lado, datos publicados en la literatura también señalan la importante función de oxígeno en la síntesis de carotenoides, a). La síntesis de astaxantina en *P. rhodozyma* se reduce drásticamente en condiciones microaerofílicas (Johnson y Lewis, 1979), b). Hasta donde se sabe todos los grupos oxigenados de los carotenoides oxigenados se forman a partir de oxígeno molecular (Fraser y col. 1997), c). Las enzimas implicadas en la formación de astaxantina y otros carotenoides oxigenados del alga *H. pluvialis* y de las bacterias *A. aurantiacum*, *Alcaligenes sp.* y *E. uredovora* requieren estrictamente de oxígeno d). En experimentos realizados en fermentador por Velázquez (1995), también se observó que el inicio de la síntesis de carotenoides coincide con el agotamiento de la fuente de carbono y con el aumento en la concentración de OD e). En *Haematococcus pluvialis* el contenido de astaxantina es proporcional a la tensión de oxígeno disuelto en el rango (0-50%). Sin embargo, al introducir oxígeno puro, concentraciones por arriba de 100% disminuyen considerablemente la densidad celular y la fracción de células inmóviles aumenta (Lee y Ding, 1995).

Adicionalmente, todas las células producen moléculas oxigenadas reactivas (MOR) tales como superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), oxígeno singulete ( $^1O_2$ ) y radicales hidroxilo ( $\cdot OH$ ) como subproductos del metabolismo aeróbico normal. Por ello, un rápido incremento de la concentración de OD o altos niveles de OD en el medio de cultivo deben producir estrés oxidativo en las células. Como se mencionó anteriormente, en organismos no fotosintéticos los carotenoides ofrecen protección contra daño fotooxidativo mediado por radicales libres (Armstrong, 1997, 1994; Krinsky, 1977; Johnson y An, 1991). Por consiguiente, el que la síntesis de carotenoides se inicie al elevarse la concentración de OD (en todos los experimentos en fermentador) sugiere que la síntesis es una respuesta natural de *P. rhodozyma* al ser sometida a estrés oxidativo. Otras actividades antioxidantes que posee *P. rhodozyma* son la superóxido dismutasa mitocondrial dependiente de manganeso (MnSOD) y una baja actividad de catalasa en comparación con otras levaduras, pero aparentemente no posee las formas citosólicas dependientes de hierro y cobre, FeSOD y CuSOD respectivamente (Johnson y Schroeder, 1996). La producción de carotenoides entonces parece compensar su capacidad disminuida para desactivar superóxido y otros radicales (Johnson y An, 1991).

### 6.3 EFECTOS DEL METABOLISMO DE ETANOL

En las levaduras, el ascenso de la concentración de OD al agotarse los azúcares en el medio de cultivo, generalmente va acompañado con un drástico cambio en el patrón global de expresión de genes de procesos celulares fundamentales del metabolismo de carbono, síntesis de proteínas y almacenamiento de carbohidratos (DeRisi y col. 1997; Davies, y col., 1995; Boucherie, 1985; Pahl y Beuerle, 1994). En *S. cerevisiae*, DeRisi y col. 1997 han demostrado que el cambio de condiciones anaerobias a aeróbicas induce por un factor de al menos 2, los niveles de mRNA de más de 700 genes, mientras que los niveles de mRNA de más de 1000 genes disminuyen por un factor de al menos 3. De forma similar, es fácil imaginar que la síntesis de carotenoides es sólo uno de los numerosos efectos inducidos en *P. rhodozyma* por el cambio de condiciones anaerobias a aeróbicas. Como sucede en otras levaduras, la reasimilación de etanol por *P. rhodozyma* es uno de los procesos que se inician poco después de elevarse la concentración de OD al disminuir la concentración de azúcares (experimento 4). Se sabe que la inducción de las enzimas requeridas para el metabolismo de etanol ocurre pocos minutos después del cambio de condiciones anaerobias a aeróbicas, simultáneamente con la inducción de componentes de la cadena respiratoria y de la mayoría de las enzimas del ciclo de Krebs (Heinisch y Hollenberg, 1993; Konz y col., 1998; Franco y col., 1984). Las actividades anteriores son en cierto grado co-reguladas y se inducen al liberarse la represión por glucosa (Vries y Marres, 1987). El metabolismo de etanol podría contribuir a la inducción de la síntesis de carotenoides en *P. rhodozyma*, por lo siguiente: la oxidación de etanol produce un aumento de la relación NADH/NAD<sup>+</sup>, por consiguiente, la actividad del ciclo de Krebs y la respiración se inhiben (Fig. 6.1). Previamente An y Johnson, 1990, han mostrado que la inhibición de la cadena respiratoria principal (con antimicina), estimula la producción de carotenoides en *P. rhodozyma* por un mecanismo en el que posiblemente está implicado una mayor formación de MOR y la activación de una vía respiratoria alterna. Además, considerando que muchas oxidasas de alcoholes y aldehídos primarios producen peróxido de hidrógeno (Corbucci y col., 1986; Konz y col., 1998; Rosner y Storz, 1997; Ames y col. 1993), el metabolismo de etanol podría provocar estrés oxidativo en la levadura. En suma, la inhibición del ciclo de Krebs y el aumento de la producción de MOR ocasionadas por el metabolismo de etanol podrían ser factores que contribuyen a inducir la síntesis de carotenoides en *P. rhodozyma*. Otros autores han hecho observaciones que concuerdan con esto. En cultivos de *P. rhodozyma* alimentados con etanol, Yamane y col., 1997b

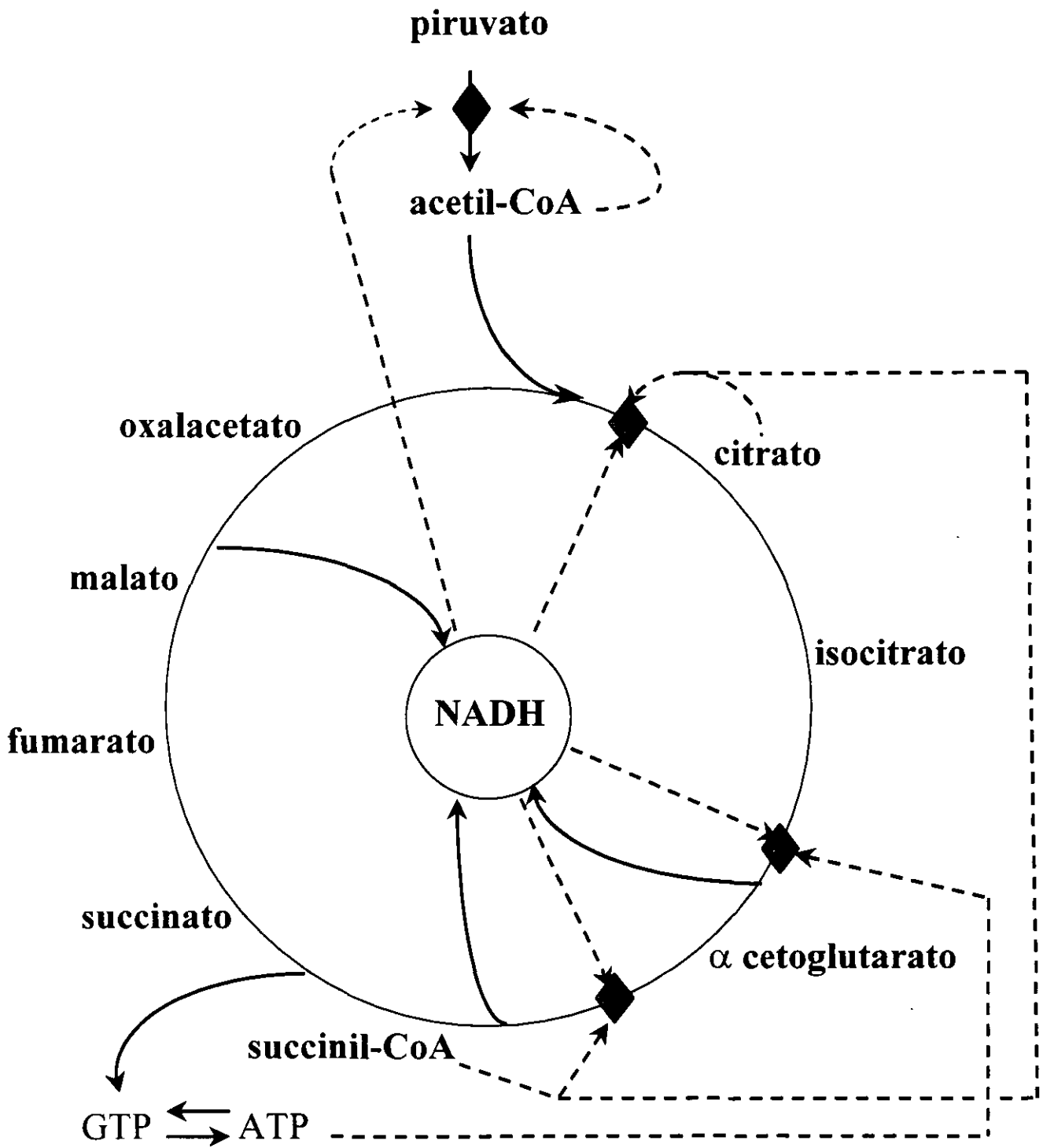


Fig. 6.1. Regulación por NADH y ATP del ciclo de los ácidos tricarboxílicos en eucariotes (♦ indica las enzimas reguladas)

observaron un aumento de la síntesis de astaxantina, pero a costa de un crecimiento pobre en relación con la alimentación de glucosa. Por otro lado, en presencia de 0.2% de etanol en el medio de cultivo, mutantes de *P. rhodozyma* han aumentado la producción de carotenoides y astaxantina (Gu y col., 1997).

En condiciones oxidativas el ciclo de Krebs es la única fuente de esqueletos carbonados para la síntesis de aminoácidos y ácidos nucleicos. Debido a su secuela inhibitoria sobre el ciclo de Krebs, el metabolismo de etanol puede desacelerar el crecimiento y desactivar la replicación por deficiencia de precursores para la biosíntesis (Jones, 1989). La disminución del contenido de proteína en las células y de la velocidad de síntesis de proteína total, observadas en la mayoría de los experimentos en fermentador durante las horas 20-60, sugieren un intenso recambio de proteínas. Puede inferirse que cuando el ciclo de Krebs está inhibido, el recambio de proteínas sería un recurso que le permitiría a *P. rhodozyma* disponer de precursores para la síntesis de proteínas, para la inaplazable necesidad de adaptarse a las condiciones oxidativas predominantes. Es significativo que antes del agotamiento de azúcares, otras levaduras también muestran una fase de transición caracterizada por disminución de la velocidad de crecimiento, reducción del contenido de proteína y aumento de RNA (Boucherie, 1985). En estas condiciones, la proteína y RNA son degradados extensamente, sugiriendo que las moléculas intracelulares suministran la mayoría de los precursores de biosíntesis. Otro hecho peculiar es que la oxidación de proteínas es en muchos casos un marcador para su degradación. Muchas proteasas comunes degradan más rápidamente las formas oxidadas en comparación con las no oxidadas (Stadtman, 1992). Por lo tanto, es de esperar una mayor actividad de estos procesos al elevarse el OD en el medio. La vital importancia de estos procesos es algo que debe enfatizarse ya que la deficiencia de peptidasas vacuolares (en mutantes) puede afectar negativamente la esporulación y ocasionar una rápida muerte celular (Teichert y col., 1989).

#### ***6.4 OTROS PROBABLES EFECTOS DEBIDOS A UN DESBALANCE REDOX***

Obviamente, la activación de una vía metabólica como la síntesis de carotenoides solo permite redirigir una parte pequeña del flujo de carbono que no puede canalizarse a través del ciclo de Krebs o de la cadena respiratoria. Por si sola la actividad de esta vía no es suficiente para corregir un desbalance redox causado por una rápida asimilación de etanol. Puesto que es una necesidad mantener el balance redox, en levaduras se ha propuesto que la reoxidación de NADH aumenta al

activarse vías disipadoras de energía (Prieto y col., 1992). De forma similar, otras vías biosintéticas consumidoras de ATP y NAD(P)H podrían activarse en estas condiciones para contribuir a que el metabolismo no se interrumpa. Entre estas vías podríamos mencionar:

1. La síntesis de ácidos grasos, glicógeno y el disacárido trehalosa requieren de ATP y NADPH. Estas vías biosintéticas requieren oxígeno molecular, por lo que solo se activan en condiciones aeróbicas en las etapas tempranas de la fase estacionaria (Vries y Marres 1987; Lillie y Pringle 1980; Parrou y col. 1999 Franco y col. 1984; Yang y col., 1998; Ni y LaPorte, 1995; Evans y Ratledge, 1983; Park y col., 1990).

2. La síntesis de esteroides se induce únicamente en condiciones aeróbicas. Con los carotenoides comparten los primeros pasos de su síntesis (Vries y Marres 1987; Arnezeder y Hampel, 1990, 1991). La biosíntesis de ergosterol aumenta en presencia de etanol en *S. cerevisiae* y en *S. carlsbergensis* (Gu y col. 1997).

3. En *P. rhodozyma*, la actividad de la primera enzima de la vía del mevalonato (HMG-CoA reductasa), una enzima clave en la síntesis de carotenoides, esteroides y otros isoprenoides aumenta en presencia de etanol (Gu y col. 1997). En hongos, se ha sugerido que esta enzima es regulada por la relación NADPH/NADP<sup>+</sup> (Gray, 1987).

4. La vía de las pentosas es estimulada por el metabolismo oxidativo de etanol a expensas del ciclo de Krebs (Juhnke y col., 1996; Jones, 1989). La actividad de G6PD que produce la mayor parte del NADPH en levaduras, es dispensable en la síntesis de pentosas pero es esencial para proteger las células contra un mediano estrés oxidativo (Pandolfi y col., 1995; Vries y Marres 1987). Esta respuesta parece deberse a una mayor demanda de poder reductor para la activación de moléculas y enzimas antioxidantes, la activación de nuevas vías biosintéticas y para la reparación de moléculas oxidadas

Todos estos datos en conjunto sugieren que al entrar a la fase estacionaria, la inhibición del ciclo de Krebs tiene un papel fundamental, no solo en la inducción de la síntesis de carotenoides, sino también en un gran número de respuestas adaptativas para ajustar del metabolismo global a condiciones oxidativas.

## 6.5 EXPERIMENTOS CON CONCENTRACIONES VARIABLES DE N, P, Mg, Cu, Fe y K

Los elementos estudiados en los experimentos en matraz pueden dividirse en dos grupos:

a). Los que estimularon la producción de carotenoides a bajas concentraciones (P, N, Mg, Cu). b). Los que no estimularon a bajas concentraciones (Fe y K). La producción de astaxantina total y el contenido de astaxantina en las células aumentaron significativamente en presencia de bajas concentraciones de fosfatos, nitrógeno (en presencia de citrato), magnesio o cobre. Además, en la mayoría de estos casos se observó un incremento de la fracción de astaxantina en los carotenoides y una menor proporción de intermediarios de la síntesis. En el caso de fosfatos y nitrógeno el rango de concentración en el que se observa esto fue relativamente amplio en comparación con magnesio y cobre. Sin embargo, una diferencia importante es que al reducir los fosfatos o el nitrógeno, el peso seco aumenta, mientras que al reducir la concentración de cobre o magnesio, la estimulación de la síntesis de carotenoides coincide con el inicio de un pronunciado descenso de peso seco. No se conocen las razones de este diferente comportamiento.

A concentraciones de potasio menores de 1 mM disminuyeron sensiblemente la concentración final de carotenoides totales y el contenido de carotenoides en la levadura. En cambio concentraciones de potasio por encima de 1 mM tuvieron poco o ningún efecto sobre la producción de carotenoides o sobre el peso seco. El hierro mostró tendencias similares al potasio pero en un rango de concentraciones más bajo. A concentraciones de hierro menores de 1  $\mu$ M disminuyeron sensiblemente la concentración de carotenoides totales y el contenido de carotenoides en la levadura, mientras que concentraciones mayores de 1  $\mu$ M tuvieron poco o ningún efecto sobre los parámetros estudiados.

## 6.6 EFECTOS DE CONCENTRACIONES VARIABLES DE NITRÓGENO.

En el experimento con concentraciones variables de nitrógeno en presencia de citrato (experimento 4M), se observó que la concentración de carotenoides totales y de astaxantina aumentan paralelamente con el contenido de astaxantina al reducir la concentración de sulfato de amonio de 61 a 18.6 mM. (Fig 1A del anexo). En cambio, la concentración de proteína disminuyó en el mismo rango de concentraciones (Fig. 1C del anexo). Empleando diferentes cepas de *P. rhodozyma* en



medios complejos, varios investigadores han encontrado una mayor producción de pigmento al disminuir la concentración de amonio en el medio. En cultivos en lote alimentado, Yamane y col. (1997) han reportado una mejor producción de astaxantina a una alta relación C/N. En cultivos de *P. rhodozyma* crecida en jugo de uva, Meyer y du Preez (1994a) han reportado una mayor contenido de pigmento y de astaxantina al reducir la concentración de amonio residual en el medio. En el alga *H. pluvialis* la limitación de nitrógeno también es un factor clave para la acumulación de carotenoides (Kakizono y col. 1992). Juntos, estos datos sugieren que una limitada síntesis de proteínas pudiera ser un mecanismo común que estimula la síntesis de carotenoides en diferentes microorganismos. El comportamiento metabólico puede ser diferente en diferentes levaduras, sin embargo, varios conceptos generales son aplicables a la mayoría de ellas. Cuando una levadura se cultiva en un medio que contiene amonio como única fuente de nitrógeno, la disponibilidad de esta fuente tiene un efecto considerable en la cantidad de esqueletos de carbono, ATP y NADPH que son canalizados a la síntesis de proteína (Larsson y col. 1993). Al disminuir la disponibilidad de amonio, la demanda de carbono para la síntesis de proteína y nucleótidos disminuye, particularmente de  $\alpha$ -cetoglutarato y oxaloacetato, y como resultado la fuente de carbono canalizada al ciclo de Krebs es excesiva. La acumulación de lípidos en estas condiciones es un fenómeno común en un número de levaduras (Ertugay y col., 1997). La acumulación de ácidos grasos y astaxantina observadas en *P. rhodozyma* a bajas concentraciones de amonio (Fig. 1A y C del anexo) podría ser entonces un mecanismo para encauzar el excedente de carbono, energía (ATP) y NAD(P)H originado por la imposibilidad de sintetizar proteínas. La interpretación de que la síntesis de carotenoides es estimulada por un impedimento de síntesis de proteínas concuerda también con otros datos publicados. An y col. (1989) han sugerido que la velocidad o la eficiencia de utilización de nitrógeno es progresivamente impedida en una serie de mutantes con mayor contenido de carotenoides. Asimismo, el estudio de diferentes fuentes de nitrógeno para la producción de astaxantina frecuentemente ha conducido a la elección de aminoácidos que son metabolizados lentamente, posiblemente debido a que su uso produce una limitación de nitrógeno (Meyer y col., 1993).

### **6.7 EFECTOS DE CONCENTRACIONES VARIABLES DE FOSFATOS.**

En muchas levaduras, el crecimiento y la síntesis de proteína son impedidas también en medios deficientes en fosfato (Callieri y col., 1984). Puesto que en condiciones de deficiencia de fosfato este se encuentra asociado principalmente con el RNA, la relativamente baja síntesis de proteína

observada a bajas concentraciones de fosfato en *P. rhodozyma* podría ser ocasionada por una reducida síntesis de los mensajeros requeridos. Por lo tanto la mayor producción de astaxantina a bajas concentraciones de fosfato parece también estar ligada a un impedimento de la síntesis de proteína. La limitación de fosfato puede afectar por supuesto otras reacciones que requieren fosfato. Una importante vía de asimilación de fosfato es la fosforilación de nucleótidos de adenina (AMP, ADP), de manera que la ATPasa ligada a membrana puede ser un objetivo primario de esta limitación. An y Johnson (1990) han mostrado que el bloqueo de la cadena respiratoria principal con antimicina A, o por otros inhibidores de la respiración también estimula la producción de astaxantina en esta levadura. La superior producción de carotenoides a bajas concentraciones de fosfatos podría ser entonces el resultado de una baja actividad respiratoria inducida por limitación de fosfato (Manon y col. 1989). El nivel de fosfatos podría también afectar la producción de carotenoides en *P. rhodozyma* de otras formas más específicas. La síntesis de carotenoides requiere de fosfatasa debido a que varios precursores de los carotenoides son fosforilados mientras que los carotenoides no lo son. En muchos organismos la limitación de fosfato desreprime las fosfatasa microbianas que intervienen en la ruptura de los intermediarios fosforilados (Arnezeder y Hampel 1991).

#### **6.8 EXPERIMENTO CON CONCENTRACIONES VARIABLES DE MAGNESIO.**

La evidencia actual desde bacterias hasta células humanas indica que el magnesio tiene un papel universal en el control del ciclo celular (Walker, 1986; Walker y Duffus, 1980). En levaduras, el magnesio tiene funciones esenciales en la síntesis de DNA, purinas y en la función de tRNA (Kockova, 1990). En consecuencia, la deficiencia de magnesio en levaduras conduce al bloqueo del crecimiento en la fase G1 o al final de la gemación (Ivanov y Pindrus, 1989; Hirimburegama, y col., 1992). En los párrafos precedentes hemos sugerido que la restricción de la síntesis de proteínas causada por el metabolismo de etanol, o por limitación de nitrógeno o fosfato, es un mecanismo común que induce la síntesis de carotenoides en *P. rhodozyma*. Es interesante que los aminoácidos responsables de la unión del isocitrato,  $Mg^{+2}$ ,  $NAD^{+}$ , ATP y ADP en la enzima isocitrato deshidrogenasa estén muy conservados en diferentes especies (Kim y col., 1995). La deficiencia de  $Mg^{+2}$  podría reducir la actividad de la enzima, y reducir así la actividad del ciclo de Krebs, promoviendo un efecto similar. De manera alternativa, la limitación de  $Mg^{+2}$  podría causar una lenta incorporación de aminoácidos a proteínas y en consecuencia una baja tasa de síntesis de las mismas. Además, debido a que la deficiencia también podría afectar la velocidad de síntesis de DNA y de

purinas, la velocidad de replicación debe reducirse considerablemente o incluso cesar. Otro posible mecanismo que podría mediar en la estimulación de la síntesis de carotenoides a bajas concentraciones de magnesio es la inhibición de la cadena respiratoria. Se sabe que el  $Mg^{+2}$  está asociado con la enzima citocromo-c-oxidasa, sin embargo, su función en la enzima es todavía desconocida (Ortega-López, 1995). Otro aspecto que vale la pena mencionar es que en hongos y en otros organismos el magnesio es esencial en varias etapas de la incorporación de mevalonato a fitoeno y en algunos casos en la transformación de fitoeno a licopeno (Gray, 1987; Bramley, 1985; Johnson y An, 1991). Si este fuera el caso en *P. rhodozyma*, la estimulación de la síntesis de carotenoides observada a niveles de magnesio menores de 0.5 mM, sugeriría que el crecimiento es más sensible a la deficiencia de magnesio en comparación con la síntesis de carotenoides.

#### **6.9 CITRATO, POSIBLE PRECURSOR DE CAROTENOIDES EN *P. rhodozyma*.**

La síntesis de carotenoides requiere de acetil-CoA como fuente de carbono, y de ATP y NADPH como cofactores (Bramley y MacKenzie, 1988). Debido a que el acetil-CoA es un intermediario clave para el metabolismo primario y secundario, su entrada a uno o al otro debe estar regulada de alguna manera. Cuando la síntesis de proteína es restringida en *P. rhodozyma*, la disponibilidad de acetil-CoA y ATP podían ser factores clave para cambiar el flux de carbono del ciclo de Krebs-respiración hacia la síntesis de ácidos grasos y carotenoides. La mayor parte del  $\beta$ -caroteno en *P. rhodozyma* se encuentra localizado en gotitas de aceite que flotan en el citoplasma, al cual se cree están asociadas las actividades de desaturasas y ciclasas (Johnson y Schroeder 1996). Esto indica que las etapas tempranas de la síntesis de carotenoides en *P. rhodozyma*, como ocurre con la síntesis de ácidos grasos en otras levaduras oleaginosas, se lleva a cabo en el citoplasma. No obstante, la enzima piruvato deshidrogenasa se encuentra exclusivamente en la mitocondria, que curiosamente es relativamente impermeable al acetil-CoA (Evans y col. 1983). Es interesante que el citrato mitocondrial es considerado la fuente más importante de acetil-CoA para la síntesis de ácidos grasos en levaduras oleaginosas. La acumulación de citrato en la mitocondria y su transporte al citoplasma se ha explicado ampliamente por la inactivación alostérica de la enzima  $NAD^+$ -isocitrato deshidrogenasa debido a una disminución de la concentración intracelular de AMP (Boulton y Ratledge 1981; Evans y col. 1983). Puesto que la demanda de energía es satisfecha en *P. rhodozyma* en condiciones de limitación de nitrógeno o fosfatos, altas relaciones de  $NADH/NAD^+$  y  $ATP/AMP$  deben reducir la actividad de la enzima. El citrato acumulado podría ser transportado al citoplasma y

partido por la enzima citosólica ATP:citrato liasa produciendo acetil-CoA y oxaloacetato (Evans y col., 1983). Puesto que tanto los ácidos grasos como los carotenoides son estimulados por la deficiencia de nitrógeno y de fosfato, y considerando que ambos requieren de acetil-CoA para la síntesis, se puede inferir que el citrato podría ser la fuente de unidades de acetilo para ambos procesos biosintéticos. Otro factor que sugiere esta posibilidad es que la ATP: citrato liasa se encuentra solo consistentemente en levaduras oleaginosas, de manera que la ausencia o presencia de la enzima marca una diferencia significativa entre las levaduras oleaginosas y otras levaduras (Boulton y Ratledge 1981). En nuestro laboratorio, recientemente se ha detectado la actividad de esta enzima en la cepa empleada en este trabajo (comunicación personal de Ángeles Martínez). La enzima también se ha encontrado en *Rhodotorula gracilis*, una levadura carotenogénica que esta filogenéticamente emparentada con *P. rhodozyma* (Shashi y col., 1990). La estimulación del contenido total de pigmento en la levadura y de la concentración de pigmento al adicionar citrato al medio de cultivo (Fig. 3A, anexo), también sugieren que el citrato podría ser la fuente de acetil-CoA para la síntesis de carotenoides. Esta posibilidad podría tener una considerable importancia industrial puesto que la adición de citrato al medio de cultivo, una materia prima de bajo costo, podría mejorar sustancialmente la producción de astaxantina en *P. rhodozyma*. Curiosamente, los ácidos grasos y los carotenoides comparten varios rasgos comunes con la síntesis de esteroides incluyendo el requerimiento de ATP, NADPH, oxígeno molecular y acetil-CoA como fuente de acetilos para la construcción de la cadena. Considerando que el inicio de la síntesis de carotenoides y ácidos grasos es según parece debida en gran parte a alteraciones del metabolismo primario, parece factible que la síntesis de todos estos compuestos esté coordinada en *P. rhodozyma*.

#### **6.10 EFECTOS DE CONCENTRACIONES VARIABLES DE COBRE Y HIERRO.**

En *P. rhodozyma*, los carotenoides y en particular la astaxantina se sintetizan a la máxima velocidad durante la fase estacionaria o en presencia de inhibidores de la respiración como cianuro, antimicina, tunicamicina, nistatina y azida (Schroeder y Johnson, 1995a y b; Johnson y col., 1994; An y Johnson, 1990). En presencia de estos compuestos, la síntesis de astaxantina ocurre paralelamente con un cambio casi completo de respiración sensible a cianuro, a respiración insensible a cianuro. Debido a esto se ha propuesto que la activación de una vía respiratoria alternativa (RA) está estrechamente ligada a la síntesis de astaxantina. Por analogía y debido a que el hierro y el cobre son importantes cofactores de la cadena respiratoria de levaduras, podría esperarse una mejor producción

de carotenoides en condiciones de deficiencia de estos elementos. Sin embargo, en los experimentos realizados sólo las concentraciones de cobre menores de 1.5  $\mu\text{M}$  aumentaron la producción de astaxantina total y el contenido de astaxantina en *P. rhodozyma*. Considerando que la estimulación de la síntesis de carotenoides por deficiencia de cobre tiene peculiaridades diferentes a las observadas con deficiencia de nitrógeno, fosfato y magnesio a continuación se discuten algunos posibles mecanismos que podrían estar implicados en la respuesta.

En las levaduras al menos 3 grupos de enzimas requieren de cobre para su actividad: a). La citocromo-c-oxidasa, b). La superóxido dismutasa citosólica y otras enzimas antioxidantes, c). Factores de transcripción que controlan la homeostasis de cobre (Culotta y col., 1999). La citocromo-c-oxidasa es una enzima que parece estar conservada en todos los eucariotes (Capaldi, 1990). Esta enzima que funciona como oxidasa terminal de la cadena respiratoria tiene dos centros catalíticos hemo-cobre ( $\text{Cu}_B$ ,  $\text{Cu}_A$ ), uno de los cuales es el sitio de la reducción del oxígeno y el otro es mediador en la transferencia de electrones del citocromo c al primer sitio (Babcock y Wikstrom, 1992; Nicholls y Ferguson, 1992). La limitación de cobre reduce específicamente la concentración de citocromo-c-oxidasa, sin afectar la concentración de otros citocromos (Fig. 6.2). Por ello, la respiración de células o de mitocondrias aisladas de células crecidas en medios deficientes en cobre se reduce significativamente (Light, 1972). A partir de cultivos continuos con deficiencia de cobre se han aislado variantes de *C. utilis* que dependen poco de este elemento para su crecimiento. Estas variantes poseen una vía respiratoria alternativa (RA) que se comunica con la cadena respiratoria principal (Fig. 6.2) cerca del citocromo b o de la ubiquinona (Downie y Garland, 1973). Considerando todo lo anterior, la estimulación de la síntesis de carotenoides y astaxantina en *P. rhodozyma* cultivada en medios deficientes de cobre podría estar vinculada a la activación de una vía RA como resultado de la inhibición de la cadena respiratoria principal en estas condiciones. Es interesante notar que en otras levaduras, la inhibición de la cadena respiratoria por agentes externos o por mutación induce la formación de  $\text{O}_2^-$ , estrés oxidativo y la activación de vías RA (Zhao y col., 1996; Minagawa y col., 1992; Sakajo y col., 1993, 1997; Guerin y col., 1989). En *P. rhodozyma* el hecho de que la inducción de RA sea inhibida por atrapadores de radicales libres, sugiere que la vía RA es inducida por MOR (Johnson y Schroeder, 1996; An y Johnson, 1990; Armstrong, 1997; 1994). Muchas plantas superiores, hongos y levaduras que incluyen especies pigmentadas de *Rhodotorula*, *Cryptococcus* y *Sporobolomyces* poseen también vías RA insensibles a antimicina y a cianuro (Goffeau y Crosby, 1978; Johnson y Schroeder, 1996; Shiraishi y Fujii, 1986). En algunos

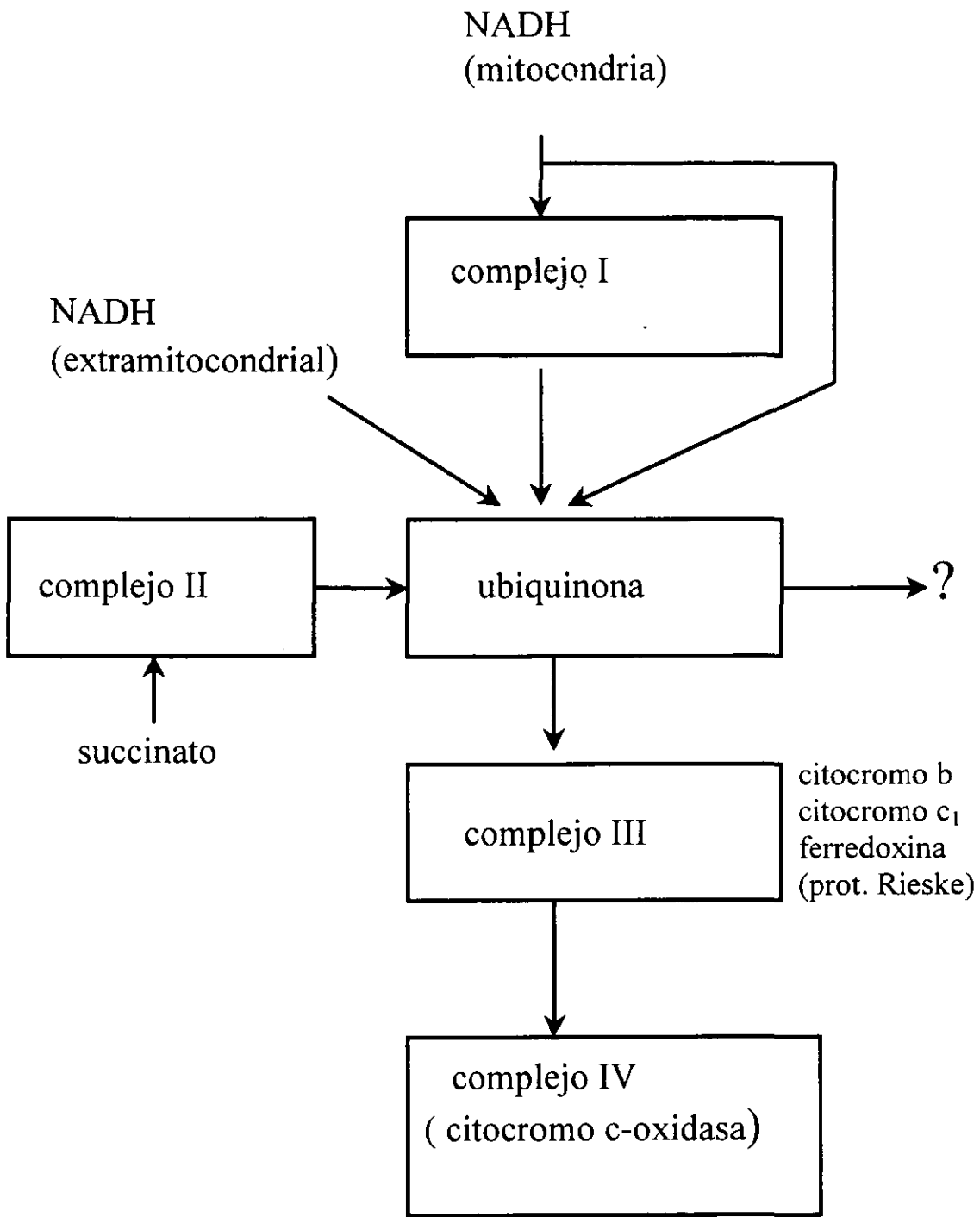


Fig. 6.2. Cadena respiratoria en levaduras (Vries y Marres, 1987).

organismos la expresión de un solo polipéptido es suficiente para activar la respiración alterna (Albury y col., 1996). Estas vías RA generalmente se activan para permitir el crecimiento en condiciones en las que la cadena respiratoria principal ha sido inhibida ya sea por mutación o por inhibidores de la respiración. En *P. rhodozyma* la activación de una vía RA, podría tener varias funciones: a). Catalizar la inserción de átomos de oxígeno en carotenoides, esteroides u otras moléculas. b). Producir ATP para la biosíntesis cuando la cadena respiratoria está inhabilitada c). Reducir el excedente de NADH causado por un rápido catabolismo cuando la cadena respiratoria principal se encuentra inhibida. Como se mencionó arriba, un excedente de NADH también parece estar implicado con el inicio de la síntesis de carotenoides durante el metabolismo de etanol. De igual modo, los datos con nitrógeno variable, así como los de mutantes con el metabolismo de nitrógeno alterado (An y col., 1989), sugieren también que un exceso de NADH, en este caso causado por una restricción en la síntesis de proteínas y nucleótidos, es un factor que desencadena la síntesis de astaxantina en *P. rhodozyma*. En todos estos casos, la canalización del NADH a través de la vía RA ayudaría a reducir el desbalance.

Valdría la pena revisar algunos conceptos adicionales que nos ayudarán a comprender mejor las características de la vía RA. Una característica especial de *P. rhodozyma* y de otros microorganismos carotenogénicos es que poseen la coenzima Q10 de ubiquinona (UQ10) en su cadena respiratoria (Golubev, 1995; Sugiyama, 1985; Laskin y White, 1999). La UQ10 es una benzoquinona con una cadena lateral de 10 unidades isoprenílicas de 5 carbonos cada una. Debido a su pequeño tamaño y características hidrofóbicas es el único acarreador que puede difundirse libremente en la bicapa lipídica de la membrana mitocondrial interna, acarreador de electrones hacia componentes menos móviles localizados en la membrana. La UQ es un colector de electrones de varias fuentes, pero puede donarlos a vías alternativas diferentes de la cadena respiratoria principal (Nicholls y Ferguson, 1992; Babcock y Wikstrom, 1992; Sun y col., 1990). Debido a esto, la UQ pudiera ser un acarreador lógico para el transporte de electrones a través de la membrana plasmática. La cadena isoprenoide de la coenzima Q10 funciona como un elemento de anclaje a la membrana. Sin embargo, considerando que varios si no es que todos los microorganismos carotenogénicos la poseen y que es una coenzima poco usual en levaduras (excepto en las carotenogénicas), bien podría tener alguna función en la transferencia de equivalentes reductores al complejo  $\beta$ -caroteno-oxidasa. En plantas y levaduras, otros posibles donadores de equivalentes reductores en sistemas RA insensibles a cianuro y antimicina son: NAD(P)H, FMN<sub>2</sub> o FADH<sub>2</sub> (Van den Bergen y col., 1994;

Guerin y col., 1989). Sin embargo, la presencia de NADPH aumentó muy poco la actividad de las hidroxilasas y oxigenasas (*crtW* y *crtZ*) de bacterias marinas (Fraser y col. 1997). En varios organismos, se sabe que las oxidasas de vías RA son generalmente activas en su forma reducida. El mecanismo que determina la distribución de electrones entre la cadena respiratoria principal y la vía RA no se conoce, pero se sabe que la actividad de la segunda responde al nivel de reducción de la poza metabólica de UQ (Hoefnagel y Wiskich, 1998; Leach y col., 1996; Day y Wiskich, 1995). En *Rhodobacter capsulatus* la RA se activa cuando el nivel de reducción de la poza de UQ alcanza 25% aproximadamente. (Zannoni y Moore, 1990). En *P. rhodozyma*, un efecto de la deficiencia de cobre debe incluir una mayor reducción de todos los componentes de la cadena respiratoria, incluyendo la UQ10. La mayor reducción de la UQ10 podría entonces promover una mayor reducción de la(s) oxidasa(s) responsable(s) de la vía RA, la consecuente activación y una mayor desaturación e hidroxilación de carotenoides. Esto es congruente con el hecho de que en los matraces con más baja concentración de cobre la pigmentación aparece antes que en los matraces con una mayor concentración. Además, la relación astaxantina/carotenoides totales aumenta significativamente en condiciones de deficiencia de cobre, lo cual indica una mejor hidroxilación de los carotenoides. Por otro lado, en condiciones oxidativas el rendimiento ( $Y_{x/s}$ ) está determinado en gran parte por el número de sitios de fosforilación en la cadena respiratoria (Verduyn, 1991). En virtud de que el flujo de electrones por la vía RA solo permite la síntesis de ATP en el sitio 1 de fosforilación, el rendimiento celular debe reducirse considerablemente (Light, 1972; Downie y Garland, 1973). No obstante, la operación de un solo sitio de fosforilación podría ser suficiente para un lento crecimiento cuando por cualquier causa la cadena respiratoria se encuentra inactiva (Vries y Marres, 1987). La fig. 5.15 nos muestra un mayor contenido de carotenoides a menor peso seco y a menor rendimiento, lo cual concuerda bien con lo expresado arriba. También en concordancia con esto es el hecho que en comparación con las cepas parentales, las mutantes de *P. rhodozyma* aisladas en antimicina generalmente crecen más lento y el rendimiento ( $Y_{x/s}$ ) es menor en diferentes fuentes de carbono. Esto sugiere por una parte que las mutantes obtienen menos energía de la fuente de carbono y por otra, una lesión (es) en las primeras etapas de la cadena respiratoria, probablemente cerca del citocromo b, el sitio donde actúa la antimicina (An y col., 1989; Meyer y col., 1993).

Otro factor que podría contribuir a una mayor producción de carotenoides es que el cobre tiene un efecto inductor generalizado de enzimas relacionadas con el metabolismo de oxígeno (Galiazzo y col., 1988). Aún en ausencia de oxígeno la deficiencia de cobre reduce la actividad de enzimas



antioxidantes que dependen de cobre para su actividad como: glutatión peroxidasa (GSH-Px), metalotioneinas, CuZn SOD, catalasa entre otras (Lee y Hassan, 1985; Fields y Lewis, 1995; Tamai y col., 1993). La mayor producción de astaxantina en *P. rhodozyma* cultivada en bajas concentraciones de cobre, podría entonces deberse a que una limitada capacidad de síntesis de enzimas antioxidantes podría inducir estrés oxidativo en la levadura.

El cobre es un metal esencial en muchos organismos pero por su naturaleza extremadamente tóxica requiere de una estrecha regulación (transporte, acumulación y excreción), para asegurar un suministro suficiente para funciones esenciales, pero evitar su acumulación en niveles tóxicos (Peña y col., 1998; Presta y Stillman, 1997). La homeostásis de iones cobre en levaduras se mantiene a través de la regulación de la expresión de genes implicados con el transporte, secuestro (Cu-metalotioneinas) y defensa contra especies de oxígeno reactivas. Los efectos son mediados por factores de transcripción dependientes de cobre (Winge, 1998). Sin embargo, es poco probable que estas actividades tengan una relación importante con la mayor síntesis de carotenoides en condiciones de deficiencia de cobre.

El hierro es cofactor de muchas enzimas como citocromos, catalasas, flavoproteínas y ferredoxinas. La limitación de hierro disminuye fuertemente la concentración de citocromo b, citocromo c+c1 y citocromo a+a3 (Light y Garland, 1971). De forma similar, la limitación de hierro puede suprimir la síntesis de otros cofactores y alterar su actividad en la célula. Las hidroxilasas y oxidasas de varios microorganismos productores de astaxantina requieren de oxígeno y hierro para su actividad (Fraser y col., 1998), quizá debido a esto no se observó una mejor producción de carotenoides en bajas concentraciones de hierro.

### ***6.11 UNA COMPILACIÓN DE LOS EFECTOS MÁS RELEVANTES.***

Los experimentos realizados en fermentador sugieren que el agotamiento de azúcares, el consiguiente aumento de la concentración de OD, la reasimilación de etanol y la inhibición del ciclo de Krebs, son eventos estrechamente vinculados con la inducción de la síntesis de carotenoides en *P. rhodozyma*. La producción de carotenoides parece obedecer al menos a dos propósitos: a). Reducir el desbalance NADH/NAD<sup>+</sup> causado por el metabolismo de etanol y b). Proteger a la levadura contra el estrés oxidativo derivado del aumento de la concentración de OD.

Debido al relativamente pequeño flujo de carbono que es canalizado a carotenoides, es claro que la activación de esta vía por sí sola, no es suficiente para corregir el desbalance redox causado por un rápido metabolismo de etanol. Puesto que la continuación del metabolismo exige mantener un balance redox, otras vías biosintéticas como las de ácidos grasos, esteroides, carbohidratos de reserva y otras, podrían inducirse coordinadamente al elevarse la concentración de OD. En consecuencia, la levadura debe sintetizar un número importante de nuevas enzimas y moléculas. Sin embargo, debido a su secuela inhibitoria sobre el ciclo de Krebs, el metabolismo de etanol limita la síntesis de proteínas por deficiencia de esqueletos carbonados. En estas condiciones, el recambio de proteínas parece ser un recurso de *P. rhodozyma* para disponer de los precursores carbonados, para la inaplazable necesidad de adaptarse a las condiciones oxidativas prevaecientes.

En los experimentos en matraz la deficiencia de nitrógeno o de fosfatos produjo un aumento del contenido de carotenoides y de lípidos en la levadura, pero a costa de un menor contenido de proteína. Estos resultados indican también que la restricción de la síntesis de proteínas es un factor que estimula la producción de carotenoides en *P. rhodozyma*. La estimulación aparentemente es una respuesta para canalizar el exceso de carbono, ATP y NADH ocasionado por la restricción de la síntesis de proteínas.

En medios deficientes en cobre, la inhibición de la cadena respiratoria y la activación de una vía RA que participa en la formación de los grupos oxigenados de la astaxantina, parecen estar vinculadas a la producción superior de astaxantina y carotenoides en estas condiciones. La activación de una vía RA es factible que funcione como un mecanismo para reducir el excedente de NADH causado por un rápido catabolismo cuando la cadena respiratoria principal se encuentra inhibida. La activación de esta vía RA permitiría la continuación del catabolismo y el anabolismo.

En este trabajo se estudió el comportamiento de *P. rhodozyma* en una amplia gama de condiciones experimentales. Los resultados indican que tanto el metabolismo de etanol, como la deficiencia de nitrógeno, fosfato, magnesio y cobre son eventos que estimulan la producción de carotenoides. El hecho de que en condiciones tan diversas se estimule la síntesis de carotenoides sugiere que los efectos al menos en parte, no son específicos, sino más bien debidos a la alteración del metabolismo celular en general. Los resultados convergen en que la inducción de la síntesis de carotenoides se origina en una restricción en el metabolismo, por lo siguiente: a). El metabolismo de etanol produce

un desbalance de NADH/NAD<sup>+</sup> y la inhibición del ciclo de Krebs b). La deficiencia de nitrógeno, fosfatos y posiblemente magnesio restringen la síntesis de proteínas c). La deficiencia de cobre inhibe la cadena respiratoria d) La pigmentación generalmente aumenta con un lento crecimiento (Schroeder y Johnson, 1995a). Cualquiera de estos eventos debe contribuir a elevar la concentración de OD en el medio de cultivo debido a que un lento crecimiento requiere una reducida demanda de oxígeno. Es decir, cualquiera de los eventos anteriores produciría estrés oxidativo en la levadura, lo que podría ser un factor favorable para inducir la síntesis de moléculas antioxidantes como los carotenoides. En condiciones de limitación de nitrógeno o fósforo los requerimientos de energía de la levadura son cubiertos debido a la baja demanda de ATP para la síntesis de proteínas y de nucleótidos. La respiración generalmente se reduce al acumularse el ATP. Puesto que la fosforilación oxidativa es la vía principal de oxidación de NADH, la relación NADH/NAD<sup>+</sup> debe elevarse también. De forma similar, debido a que el etanol es un sustrato muy energético, su metabolismo eleva la relación NADH/NAD<sup>+</sup>. En contraste, en condiciones de deficiencia de cobre la síntesis de proteínas estaría supeditada a la disponibilidad de ATP, pero un rápido catabolismo junto con una cadena respiratoria inhibida necesariamente conduciría a una mayor relación NADH/NAD<sup>+</sup>. Todos estos datos sugieren que un incremento de la relación NADH/NAD<sup>+</sup> puede ser un evento común y fundamental en la inducción de la síntesis de carotenoides en cualquiera de estas situaciones. Este análisis es interesante si recordamos que la enzima isocitrato deshidrogenasa de levaduras lipogénicas y no lipogénicas requiere de NAD<sup>+</sup> para su actividad (Evans y col., 1983a y b; Przybyla y col., 1999). La falta de NAD<sup>+</sup> reduce la actividad de la enzima causando la acumulación de citrato en la mitocondria. Como se mencionó antes, en la síntesis de lípidos en levaduras lipogénicas, el citrato es transportado al citosol, y allí partido a acetil-CoA y oxaloacetato por la enzima ATP:citrato liasa. El acetil-CoA citosólico podría ser usado entonces no solo en la síntesis de ácidos grasos, sino también en la de carotenoides y esteroides. La mayor concentración de carotenoides totales y el mayor contenido de carotenoides en las células obtenidos al adicionar citrato al medio de cultivo, parecen apuntar igualmente en este sentido, sin embargo, esto debe confirmarse en investigaciones futuras. En virtud de que la isocitrato deshidrogenasa también depende de la activación alostérica por AMP, y de que la inhibición de esta enzima por ATP es un rasgo general en muchas levaduras, es concebible que en algunas condiciones la acumulación de ATP (bajos de AMP) pudiera también tener un papel regulatorio.

En los experimentos con concentraciones variables de cobre y magnesio, las condiciones que estimulan un buen crecimiento generalmente originan un bajo contenido de carotenoides en las células. Además, en los experimentos en fermentador, la producción de carotenoides generalmente no ocurrió durante la fase de crecimiento balanceado en condiciones ambientales óptimas. En concordancia con otros autores, esto sugiere que la producción de astaxantina compite con el crecimiento por sustratos de carbono, ATP y NADH. De forma similar, el menor rendimiento observado en medios deficientes en cobre indica que las células obtienen menos energía de la fuente de carbono en estas condiciones. Considerando que en condiciones oxidativas el rendimiento ( $Y_{x/s}$ ) está determinado en gran parte por el número de sitios de fosforilación en la cadena respiratoria y que el flujo de electrones por la vía RA solo permite la síntesis de ATP en el sitio 1 de fosforilación, el menor rendimiento celular al reducirse la concentración de cobre sugiere una mayor actividad de la vía RA. Esta explicación concuerda también con la observación experimental de que la mayor proporción de astaxantina ocurre a bajos niveles de cobre.

A pesar de la amplia gama de condiciones experimentales probadas, en ningún caso el contenido de carotenoides sobrepasó los 500  $\mu\text{g/g}$  de levadura. Se puede concluir entonces que la dificultad para alcanzar altos contenidos de carotenoides en la levadura, no se debe a una limitación en la cinética de síntesis, ni a falta de sustratos. Otros mecanismos regulatorios deben jugar también un papel, incluyendo la regulación por producto final de las sintetasas (Johnson and Schroeder 1995). Por lo tanto la sola disponibilidad de precursores del metabolismo primario como acetyl-CoA o citrato podrían no ser suficientes para aumentar significativamente la producción de astaxantina en cepas nativas de *P. rhodozyma* (por arriba de 600  $\mu\text{g/g}$ ). Para lograr este objetivo, los mecanismos regulatorios de las enzimas relevantes deben necesariamente alterarse o eliminarse.

## 7 CONCLUSIONES

Empleando un diseño factorial  $2^{3-1}$ , se estudió en fermentador el efecto de la velocidad de alimentación de sacarosa, la relación carbono/nitrógeno y dos fuentes de nitrógeno (extracto de levadura (EL) o una mezcla de sulfato de amonio-EL). La velocidad de alimentación de sacarosa fue el factor más importante: una lenta alimentación (4.7 g/h) fue favorable desde el punto de vista de producción de carotenoides totales y contenido de carotenoides en la levadura en comparación con una rápida alimentación (7.2 g/h). Los efectos de los otros dos factores fueron de menor importancia.

En fermentador se logró cultivar *P. rhodozyma* a densidades celulares de hasta 100 mg/ml y se alcanzaron concentraciones de carotenoides finales de hasta 33  $\mu\text{g/ml}$ , lo que representa un incremento de 300% con relación a trabajos previos realizados en nuestro laboratorio con la misma cepa.

Las cinéticas de los experimentos en fermentador sugieren que la limitación de azúcares, concentraciones de OD por arriba de 15-20%, el recambio de proteínas intracelulares y la reasimilación de etanol son factores importantes en la inducción de la síntesis de carotenoides en *P. rhodozyma*.

La síntesis de carotenoides es estimulada, en condiciones aeróbicas, por una restricción del metabolismo de la levadura: a). La inhibición del ciclo de los ácidos tricarboxílicos b). La restricción de la síntesis de proteínas c). La inhibición de la respiración.

La reasimilación de etanol parece ser un factor clave en la inducción de la síntesis de carotenoides en *P. rhodozyma*. La inhibición del ciclo de Krebs podría ser el mediador de este efecto.

De forma similar, la limitación de amonio o de fosfatos estimuló la acumulación de astaxantina en *P. rhodozyma*. El efecto posiblemente esté vinculado con la menor síntesis de proteínas observada en estas condiciones.

El uso de medios de cultivo con bajos niveles de cobre ( $<1 \mu\text{M}$ ) produjo una mayor concentración de astaxantina y un mayor contenido de astaxantina en las células. Es factible que la inhibición de la cadena respiratoria principal por deficiencia de cobre y la activación de una vía respiratoria alterna, estén implicadas con los efectos observados.

Los datos obtenidos para concentraciones variables de amonio, fosfato, cobre y magnesio, sugieren que un aumento en la relación  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  y la subsecuente acumulación de citrato en la mitocondria son eventos comunes y fundamentales en la inducción de la síntesis de carotenoides. Entonces, la enzima  $\text{NAD}^+$ :isocitrato deshidrogenasa, una enzima clave en la operación del ciclo de Krebs de levaduras, podría tener un papel trascendental en la inducción. Como ocurre en la síntesis de lípidos en levaduras lipogénicas, la inhibición de la enzima causaría la acumulación de citrato. Después de ser exportado al citosol éste podría ser el precursor del acetyl-CoA requerido no solo para la síntesis de lípidos, sino también para la de carotenoides y otros isoprenoides.

La mayor concentración de carotenoides totales y el mayor contenido de carotenoides en células obtenidos al adicionar citrato ( $>28 \text{ mM}$  ó más) al medio de cultivo, sugieren que el citrato podría ser verdaderamente el precursor de carotenoides en *P. rhodozyma*.

En concordancia con otros autores, los resultados de nuestro trabajo coinciden en que la producción de astaxantina compete con el crecimiento por sustratos de carbono, ATP y  $\text{NAD(P)H}$ , es decir, un crecimiento balanceado generalmente está asociado con un contenido relativamente bajo carotenoides en la levadura.

## 8 BIBLIOGRAFIA

- Acheampong EA, Martin AM (1995) Kinetic studies on the yeast *Phaffia rhodozyma*. **J Basic Microbiol** 35:147-155
- Adrio JL, Veiga M (1995) Transformation of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnol Techniques** 9:509-512
- Adrio JL, López M, Casqueiro J, Fernández C, Veiga, M (1995) Electrophoretic karyotype of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. **Curr Gen** 27:447-450
- Adrio JL, Veiga M, Casqueiro J, López M, Fernández C (1993) Isolation of *Phaffia rhodozyma* auxotrophic mutants by enrichment methods. **J Gen Appl Microbiol** 39:303-312
- Albury MS, Dudley P, Watts FZ, Moore AL (1996) Targeting the plant alternative oxidase protein to *Schizosaccharomyces pombe* mitochondria confers cyanide-insensitive respiration. **J Biol Chem** 271:17062-17066
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proc Natl Acad Sci USA** 90:7915-7922
- An G, Johnson EA (1990) Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Antonie van Leeuwenhoek** 57:191-203
- An GH, Kim CH, Choi ES, Rhee SK (1996) Medium optimization for cultivation of carotenoid hyperproducing *Phaffia rhodozyma* mutant HT-5FO1C. **J Ferm Bioeng** 82:515-518
- An GH, Schuman DB, Johnson EA (1989). Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. **Appl Environ Microbiol** 55:116-124

An GH, Bielich J, Auerbach R, Johnson EA (1991) Isolation and characterization of carotenoid hyperproducing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting. **Biotechnology** 9:70-73

Andrewes AG, Starr MP (1981) 3R,3'R- astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Phytochemistry** 20:2561-1266

Andrewes AG, Phaff HJ, Starr MP (1976) Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red pigmented fermenting yeast. **Phytochemistry** 15:10003- 10007

Armstrong GA (1994) Eubacteria show their true colors: genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. **J Bacteriol** 176: 4795-4802

Armstrong GA (1997) Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale. **Ann Rev Microbiol** 51:629-659

Armstrong GA, Hearst JE (1996) Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. **FASEB J** 10:228-237

Arnezeder C, Hampel WA (1990) Influence of growth rate on the accumulation of ergosterol in yeast-cells. **Biotechnol Lett** 12:277-282

Arnezeder C, Hampel WA (1991) Influence of growth rate on the accumulation of ergosterol in yeast-cells in a phosphate limited continuous culture. **Biotechnol Lett** 13:7-100

Babcock GT, Wikstrom M (1992) Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. **Nature** 356:301-308

Bach TJ (1995) Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants a review. **Lipids** 30:191-202

Bejarano ER, Parra F, Murillo FJ, Cerdá-Olmedo E (1988) End-product regulation of carotenogenesis in *Phycomyces*. **Arch Microbiol** 150:209-214



Bernhard K (1990). Synthetic astaxanthin, the route of a carotenoid from research to commercialization. En: Kinsky N, Mathews-Roth M, Taylor R (eds). **Carotenoids: Chemistry and biology**. Pp 337-363, Plenum Press, New York

Block G, Patterson B, Subar A (1992) Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. **Nutr Cancer** 18:1-20

Bon JA, Leathers TD, Jayaswal RK (1997) Isolation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnol Lett** 19:109-112

Boucherie H (1985) Protein synthesis during transition and stationary phases under glucose limitation in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Bacteriol** 161:385-392

Boulton CA, Ratledge C (1981) Correlation of lipid accumulation in yeast with possession of ATP:citrate lyase. **J Gen Microbiol** 127:169-176

Box GE, Hunter W, Hunter SJ (1989) **Estadística para Investigadores**. Ed. Reverte, México.

Bramley PM, Mackenzie A (1988) Regulation of carotenoid biosynthesis. **Curr Top Cell Reg** 29:291-343

Bramley PM (1985) The in vitro biosynthesis of carotenoids. **Adv Lipid Res** 21:234-279

Britton G (1991) Carotenoids. **Methods Plant Biochem** 7:473-517

Britton G (1995b) Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: an overview. **FASEB J** 9:1551-1558

Britton G (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function. **FASEB J** 9:1551-1558

Britton G (1967) General carotenoid methods. **J Chem Soc Chem Commun** 3:49-

Britton G, Goodwing TW (1971) Biosynthesis of carotenoids. **Methods Enzymol** 18:654-701

Britton G, Liaen-Jensen S, Pfander H (1996) Carotenoids today and challenges for the future. En: Britton G, Liaen-Jensen S, Pfander H (eds). **Carotenoids Vol. 1A. Isolation and analysis**. pp. 13-26. Birkhauser Verlag, Basel

Brown MS, Goldstein KL (1980) Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. **J Lipid Res** 21:505-517

Callieri DAS, Nuñez CG, Diaz Ricci JC, Scida L (1984) Batch culture of *Candida utilis* in a medium deprived of a phosphorous source. **Appl Microbiol Biotechnol** 19:267-271

Calo P, de Miguel T, Velázquez JB, Villa TG (1995a) Mevalonic acid increases trans-astaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnol Lett** 17:575-578

Calo P, Velázquez JB, Sierio C, Blanco P, Longo E, Villa TG (1995b) Analysis of astaxanthin and other carotenoids from several *Phaffia rhodozyma* mutants. **J Agric Food Chem** 43:1396-1399

Capaldi RA (1990) Structure and function of cytochrome c oxidase. **Annu Rev Biochem** 59:569-596

Cerdá-Olmedo E (1989) Production of carotenoids with fungi. En: Vandame EJ (ed), **Biotechnology of Vitamins Pigments and Growth Factors**. pp 27-41, Elsevier Applied Science, London-New York

Cifuentes V, Hermosilla G, Martínez C, León R, Pincheira G, Jiménez A (1997) Genetics and electrophoretic karyotyping of wild-type and astaxanthin mutant strains of *Phaffia rhodozyma*. **Antonie van Leeuwenhoek** 72:111-117

Cimino F, Esposito F, Ammendola R, Russo T (1997) Gene regulation by reactive oxygen species. **Curr Top Cell Reg** 35:123-148

Corbucci GG, Gasparetto A, Antanelli M, Bufi M, De Blasi RA (1986) Changes in the levels of coenzyme Q homologues, alpha-tocopherol and molondialdehyde in human tissue during the course of circulatory shock. **Intl J Tissue React** 8:421-430

Cordero B, Otero A, Patiño M, Arredondo BO, Fabregas J (1996) Astaxanthin production from the green alga *Haematococcus pluvialis* with different stress conditions. **Biotechnol. Lett** 18: 213- 218

Culotta VC, Lin SJ, Schmidt P, Klomp LW, Casareno RL, Gitlin J (1999) Intracellular pathways of copper trafficking in yeast and humans. **Adv Exp Med Biol** 448:247-254

Chapman JW, Hakkart MJ, Maume K (1991) Astaxanthin generating yeast cells. **European Pat Appl 0474, 347 A1**

Chumpolkulwong N, Kakizono T, Ishii H, Nishio N (1997) Enzymatic conversion of  $\beta$ -carotene to astaxanthin by cells-extracts of a green alga *Haematococcus pluvialis*. **Biotechnol Lett** 19:443-446

Davies JM, Lowry CV, Davies KJ (1995) Transient adaptation to oxidative stress in yeast. **Arch Biochem Biophys** 317:1-6

Day DA, Wiskich JT (1995) Regulation of alternative oxidase activity in higher plants. **J Bioenerg Biomembr** 27:379-385

DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. **Science** 278:680-686

Di Mascio P, Devasagayam TPA, Kaiser S, Sies H (1990) Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular quenchers. **Biochim Soc Trans** 18:1054-1056

Disch A, Schewender J, Müller C, Lichtenthaler HK, Rohmer M (1998) Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. **Biochem J** 333: 381-388

Downie JA, Garland PB (1973) An antimycinA- and cyanide-resistant variant of *Candida utilis* arising during cooper-limited growth. **Biochem J** 134:1051-1061

Ertugay N, Hamamci H, Bayindirli A (1997) Fed-batch cultivation of bakers' yeast: effect of nutrient depletion and heat stress on cell composition. **Folia Microbiol** 42:214-218

Evans CT, Ratledge C (1983) Biochemical activities during lipid accumulation in *Candida curvata*. **Lipids** 18:630-635

Evans CT, Scragg AH, Ratledge C (1983a) A comparative study of citrate efflux from mitochondria of oleaginous and non-oleaginous yeast. **Eur J Biochem** 130:195-204

Evans CT, Scragg AH, Ratledge C (1983b) Regulation of citrate efflux from mitochondria of oleaginous and non-oleaginous yeast by adenine nucleotides. **Eur J Biochem** 132:609-615

Eugster CH (1995) History: 175 years of carotenoid chemistry. En Britton G, Liaen-Jensen S, Pfander H (eds.). **Carotenoids Vol. 1A: Isolation and analysis** p. 1-11. Birkhauser Verlag, Basel

Fang TJ, Chiou TY (1996) Batch cultivation and astaxanthin production by a mutant of the red yeast, *Phaffia rhodozyma* NCHU-FS501. **J Ind Microbiol** 16:175-181

Fang TJ, Cheng Y (1993) Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. **J Ferm Bioeng** 75:466-469

Fell JW, Blatt GM (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

Feofilova EP (1994) Fungal carotenoids: their biological functions and practical use (review). **Appl Biochem Microbiol** 30:143-153

Fields M, Lewis CG (1995) Antioxidant defense mechanisms in the female rat: interactions with alcohol, cooper, and the type of dietary carbohydrate. **Alcohol** 12:227-231

Fleno B, Christensen Y, Larsen R (1988) Astaxanthin producing yeast cells, methods for their preparation and their use. **WO 88/ 08025**

Fleno B, Christensen Y, Larsen R, Johansen SR, Johnson EA (1994) Astaxanthin producing yeast cells, methods for their preparation and their use. **US Pat 5,356,810**

Fletcher DL (1992) Methodology for achieving pigment specifications. **Poultry Sci** 71: 773-743

Flores-Cotera LB, Martín R, Sánchez S (2001) Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium. **Appl Microbiol Biotechnol** 55:341-347

Franco MM, Smith JE, Bery DR (1984) Effect of nitrogen and phosphate on the levels of intermediates in bakers' yeast grown in continuous culture. **J Gen Microbiol** 130:2465-2472

Fraser PD, Miura Y, Misawa N (1997) In vitro characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes. **J Biol Chem** 272:6128-6135

Fraser PD, Shimada H, Misawa N (1998) Enzymic confirmation of reactions involved in routes to astaxanthin formation, elucidated using a direct substrate in vitro assay. **Eur J Biochem** 252:229-236

Fuhrman B, Elis A, Aviram M (1997). Hypocholesterolemic effect of lycopene and  $\beta$ -carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages. **Biochim Biophys Res Comm** 233: 658-662

Galiazzo F, Schiesser A, Rotilio G (1988) Oxygen-independent induction of enzyme activities related to oxygen metabolism in yeast by copper. **Biochim Biophys Acta** 965:46-51

- Gaziano JM (1994) Antioxidant vitamins and coronary artery disease risk. **Am J Med** 97:18s-21s
- Gey, KF (1998) Vitamins E plus C and interacting co-nutrients required for optimal health. A critical and constructive review of epidemiology and supplementation data regarding cardiovascular disease and cancer. **Biofactors** 7(1-2): 113–174.
- Girard P, Falconnier B, Bricout J, Vladescu B (1994)  $\beta$ -carotene producing mutants of *Phaffia rhodozyma*. **Appl Microbiol Biotechnol** 41:183-191
- Gobantes I, Choubert G, Gómez R (1998) Quality of pigmented (astaxanthin and canthaxanthin) rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets stored under vacuum packaging chilled storage. **J Agric Food Chem** 46:4258-4362
- Goffeau A, Crosby B (1978) A new type of cyanide-insensitive, azide-sensitive respiration in the yeast *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. En **Biochemistry and Genetics of Yeast**, Academic Press, N.Y.
- Goldstein JL, Brown MS (1990) Regulation of the mevalonate pathway. **Nature** 343: 425-430
- Golubev WI (1995) Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). **Yeast** 11:101-110
- Goodwin TW (1993) Biosynthesis of carotenoids: an overview. **Methods Enzymol** 214: 330-340
- Gornall AG, Bardawill CJ, David MM (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J Biol Chem** 177:751-766
- Grafe U (1982) Relevance of microbial nitrogen metabolism to production of secondary metabolites. En: Overproduction of microbial products, Krumphanzl V, Sikyta B, Vanek Z (eds), Academic Press London.

Grant CM, Dawes IW (1996) Synthesis and role of glutathione in protection against oxidative stress in yeast. **Redox Report** 2:223-229

Grant CM, MacIver FH, Dawes IW (1997) Mitochondrial function is required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett** 410:219-222

Gray JC (1987) Control of isoprenoid biosynthesis in higher plants. **Adv Bot Res** 14: 25-91

Gu WL, An GH, Johnson EA (1997) Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*. **J Ind Microbiol Biotechnol** 19:114-117

Guerin M, Camougrand N, Caubet R, Zniber S, Velours G, Manon S, Guelin E, Cheyrou A (1989) The second respiratory chain of *Candida parapsilosis*: a comprehensive study. **Biochimie** 71:887-902

Gutteridge JM (1994) Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. **Chem Biol Interac** 91:133-140

Haard NF (1988) Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. **Biotechnol Lett** 10:609-614

Hampton R, Dimster-Denk D, Rine J (1996) The biology of HMG-CoA reductase: the pros of contra-regulation. **TIBS** 21:140-145

Hayman GT, Mannarelli BM, Leathers TD (1995) Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* grown on media of corn wet milling co-products. **J Ind Microbiol** 14: 389- 395

Heinisch JJ, Hollenberg CP (1993) Yeast. In: Rehm HJ, Reed G, Puhler A, Stadler P (eds), **Biotechnology vol 1, Biological fundamentals**, pp 469-514. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany

Heinisch JJ, Hollenberg CP (1993) Yeast. En: Rehm HJ, Reed G, Puhler A, Stadler P (eds), **Biotechnology vol 1, Biological fundamentals**, pp 469-514. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany

Herrera N, Núñez L, Gutiérrez F, Gschaedler A, Alvarez de la Cuadra J, Ramírez J (1997) Incremento de la producción de astaxantina mediante mutagénesis y fusión de protoplastos en *Phaffia rhodozyma*. En Memorias del VII Congreso de Biotecnología y Bioingeniería y II Simposio Internacional sobre Ingeniería de Bioprocesos, pp 476. Mazatlán, Sinaloa, México

Hirimburegama K, Durnez P, Keleman J, Oris E, Vergauwen R, Mergelsberg H, Thevelein JM (1992) Nutrient-induced activation of trehalase in nutrient starved cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: cAMP is not involved as a second messenger. **J Gen Microbiol** 138:2035-2043

Hitzman DO (1986) The Provesten process-an ultra high cell density fermentation. **Microbial Biomass Protein**, Young MM y Gregory KF (eds), Elsevier Applied Science, Gran Bretaña

Hodgson DA, Murillo FJ (1993) En **Myxobacteria II**, Dworkin M, Kaiser D (eds) American Society of Microbiology, Washington DC

Hoefnagel MHN, Wiskich JT (1998) Activation of the plant alternative oxidase by high reduction levels of the Q-pool and pyruvate. **Arch Biochem Biophys** 355:262-270

Hsu WJ, Yokoyama H, DeBenedict C (1990) Chemical bioregulation of carotenogenesis in *Phycomyces blakesleanus*. **Phytochemistry** 29:2447-2450

Hunter CN, Hundle BS, Hearst JE, Lang HP, Gardiner AT, Takaichi S, Cogdell RJ (1994) Introduction of new carotenoids into the bacterial photosynthetic apparatus by combining the carotenoid biosynthetic pathways of *Erwinia herbicola* and *Rhodobacter sphaeroides*. **J Bacteriol** 176:3692-3697

Ivanov VN, Pindrus AA (1989) Effect of cultivation conditions on the age structure of a yeast population. **Abstract Mikrobiologiia** 58:66-70



Jacobson GK, Jolly SO, Sedmak JJ, Skatrud, Wasileski JM (1995) Astaxantin over-producing strains of *Phaffia rhodozyma*. **US Pat 5,466,599**

Jamieson DJ (1995) The effect of oxidative stress on *Saccharomyces cerevisiae*. **Redox Report** 1:89-95

Jefcoate CR (1986) Cytochrome P-450 enzymes in sterol biosynthesis and metabolism. En: de Montellano O (ed). **Cytochrome P-450, Structure, mechanism and biochemistry**, pp. 387-428. Plenum Publishing Corp, New York

Johnson EA, Villa TG, Lewis MJ, Phaff HJ (1978) Simple method for the isolation of astaxanthin from the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma*. **Appl Environ Microbiol** 35:1155-1159

Johnson EA, An G (1991) Astaxanthin from microbial sources. **Crit Rev Biotechnol** 11:297-326

Johnson EA, Lewis MJ (1979) Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. **J Gen Microbiol** 115:173-183

Johnson EA, Schroeder W (1995) Microbial carotenoids. **Adv Biochem Eng Biotechnol** 53:119-178

Johnson EA, Schroeder W (1995b) Astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma* **Studies Mycology** 38:81-90

Johnson EA, Schroeder WA (1996) Biotechnology of astaxanthin production in *Phaffia rhodozyma*. En: Takeoka GR, Teranishi R, Williams PJ, Kobayashi A (eds) **Biotechnology for improved foods and flavors**, pp 39-50. American Chemical Society, Washington DC

Johnson EA, Yang HH, Geldiay- Tuncer B, Hall WT, Schreiber D, Ho K (1994) Process for in vivo production of astaxanthin and *Phaffia rhodozyma* yeast of enhanced astaxanthin content. **US Pat 5,356,809**

Johnson EA, Villa TG, Lewis MJ (1980) *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets. **Aquaculture** 20: 123- 134

Jones RP (1989) Biological principles for the effects of ethanol. **Enz Microbiol Biotechnol** 11:130-153

Juhnke H, Krems B, Kotter P, Entian KD (1996) Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of the yeast against oxidative stress. **Mol Gen Genet** 252:456-464

Kajiwara S, Fraser PD, Kondo K, Misawa N (1997) Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. **Biochemical J** 324:421-426

Kakizono T, Kobayashi M, Nagai S (1992) Effect of carbon/nitrogen ratio on the encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. **J Ferment Bioeng** 74:403-405

Khan AU, Kasha M (1994) Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. **Proc Natl Acad Sci USA** 91:12365-12367

Kim YO, Oh IU, Park HS, Jeng J, Song BJ, Huh TL (1995) Characterization of a cDNA clone for human NAD<sup>+</sup>-specific isocitrate dehydrogenase alpha-subunit and structural comparison with its isoenzymes from different species. **Biochem J** 15;308 ( Pt 1):63-8

King AJ, Uijttenboogaart TG, De Vries AW (1995)  $\alpha$ -Tocopherol,  $\beta$ -carotene and ascorbic acid as antioxidants in stored poultry muscle. **J Food Sci** 60:1009-1012

Klauri H, Bauernfeind JC (1981) Carotenoids as food color. En: Bauernfeind JC (ed) **Carotenoids as colorants and vitamin A precursors**, pp 48-319. Academic Press, New York

Kobayashi M, Kakizono T, Nagai S (1991) Astaxanthin production by a green algae. **J Ferm Bioeng**, 5:335-339

Kobayashi M, Kirimura Y, Tsuji Y (1997) Light-independent, astaxanthin production by the green microalga *Haematococcus pluvialis* under salt stress. **Biotechnol Lett** 19:507-509

Kockova-Kratochvilova A (1990) **Yeast and yeast-like microorganisms**, pp 45-46. VCH Verlagsgesellschaft, Germany

Konz JO, King J, Cooney CL (1998) Effects of oxygen on recombinant protein expression. **Biotechnol Prog** 14:393-409

Krinsky NI (1979) Carotenoid protection against oxidation. *Pure Appl Chem* 51:649-652

Krinsky NI (1977) Singlet oxygen in biological systems. **TIBS** 2:35-38

Kucsera J, Pfeiffer I, Ferenczy L (1998) Homothallic life cycle in the diploid red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). **Antoine van Leeuwenhoek** 73:163-168

Larsson C, Stockar UV, Marison I, Gustafsson L (1993) Growth and metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in chemostat cultures under carbon-, nitrogen-, or carbon and nitrogen-limiting conditions. **J Bacteriol** 175:4809-4816

Laskin AI, White DC (1999) Preface to special issue on *Sphingomonas*. **J Ind Microbiol Biotechnol** 23: 231

Leach GR, Krab K, Whitehouse DG, Moore AL (1996) Kinetic analysis of the mitochondrial quinol-oxidizing enzymes during development of thermogenesis in *Arum maculatum* L. **Biochem J** 317:313-319

Lee FJ, Hassan HM (1985) Biosynthesis of superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae*: effects of paraquat and cooper. **J Free Radic Biol Med** 1:319-325

Lee YK, Ding SY (1995) Of dissolved oxygen partial pressure on the accumulation of astaxanthin in chemostat cultures of *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). **J Physiology** 31:922-924

Lewis MJ, Ragot N, Berlant MC, Miranda M (1990) Selection of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma* with  $\beta$ -ionone. **Appl Environ Microbiol** 59:2944-2945

Lichtenthaler HK, Schwender J, Disch A, Rohmer M (1997) Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. **FEBS Lett** 40:271-274

Light PA (1972) Mitochondrial effects of copper-limited growth on *Torulopsis utilis*. **FEBS Lett** 19:319-322

Light PA, Garland PB (1971) A comparison of mitochondria from *Torulopsis utilis* grown in continuous culture with glycerol, iron, ammonium, magnesium or phosphate as the growth-limiting nutrient. **Biochem J** 124:123-134

Lillie SH, Pringle JR (1980) Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. **J Bacteriol** 143:1384-1394

Liu XD, Thiele DJ (1997) Yeast metallothionein gene expression in response to metals and oxidative stress. **A Companion to Methods Enzymol** 11:289-299

Longo VD, Gralla EB, Valentine JS (1996) Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. **J Chem Biol** 271:12275-12280

Lotan T, Hirschberg J (1995) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding  $\beta$ -C-4-oxygenase, that converts  $\beta$ -carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. **FEBS Lett** 364:125-128

Martin AM, Acheampong E, Patel TR (1993) Production of astaxanthin by *Phaffia rhodozyma* using peat hydrolysates as substrate. **J Chem Tech Biotechnol** 58:223-230

Martin AM, Acheampong E, Patel TR, Chornet E (1993b). Study of growth parameters for *Phaffia rhodozyma* cultivated in peat hydrolysates. **Appl Biochem Biotechnol** 37:235-241

Marusich WL, Bauernfeind JC (1981) Oxycarotenoids in poultry feeds. En: Bauernfeind JC (ed.) **Carotenoids as colorants and vitamin A precursors**. p. 319-462. Academic Press, New York y Londres

Mathews-Roth MM (1993) Carotenoids in erythropoietic protoporphyria and other photosensitivity diseases. **Ann NY Acad Sci** 691: 148-155

Mayne ST (1996) Beta-carotene, carotenoids and disease prevention in humans. **FASEB J** 10: 690-701

Medwid RD (1998) *Phaffia rhodozyma* is polyploid. **J Ind Microbiol Biotechnol** 21:228-232

Meyer PS, du Preez JC (1993) Effect of acetic acid on astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnol Lett** 15:919-924

Meyer PS, du Preez JC (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 PS, du Preez JC, Kilian SG (1993) Selection and evaluation of astaxanthin-overproducing mutant of *Phaffia rhodozyma*. **World J Microbiol Biotechnol** 9:514-520

Meyer PS, du Preez JC (1994a) Astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice. **World J Microbiol Biotechnol** 10:178-183

Meyer PS, du Preez JC, vanDyk MS (1994) The effect of monoterpenes on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnol Lett** 16: 125-128

Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal Chem** 31:426-428

Miller MW, Yoneyama M, Soneda M (1976) *Phaffia*, a new yeast in the Deuteromycotina (Blastomycetes). **Intl J System Bacteriol** 26:286-291

Minagawa N, Koga S, Nakano, Sakajo S, Yashimoto A (1992) Possible involvement of superoxide anion in the induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. **FEBS Lett** 302:217-219

Misawa N, Satomi Y, Kondo K, Yokoyama A, Kajiwarra S, Saito T, Ohtani A (1995) Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. **J Bacteriol** 177:6575-6584

Misawa N, Nakagawa M, Kobayashi K, Yamano S, Izawa Y, Nakamura K, Harashima K (1990) Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. **J Bacteriol** 172: 6704-6712

Misawa N, Yamano S, Ikenaga H (1991) Production of beta-carotene in *Zymomonas mobilis* and *Agrobacterium tumefaciens* by introduction of the biosynthetic genes from *Erwinia uredovora*. **Appl Environ Microbiol** 57: 1847-1849

Miura Y, Kondo K, Shimada H, Fraser PD, Misawa H (1998) Production of the carotenoids lycopene,  $\beta$ -carotene, and astaxanthin in the food yeast *Candida utilis*. **Appl Environ Microbiol** 64:1226-1229

Miura Y, Kondo K, Shimada H, Saito T, Nakamura K, Misawa N (1998b) Production of lycopene by the food yeast, *Candida utilis* that does not naturally synthesize carotenoid. **Biotechnol Bioeng** 58:306-308

Mobarhan S, Shiau A, Grande A, Kolli S, Stacewics-Sapuntzakis S, Oldham T, Liao Y, Bowen P, Dyavanapalli P, Kazi N, MCNeal K, Frommel T (1994)  $\beta$ -carotene supplementation results in an

increased serum and colonic mucosal concentration of  $\beta$ -carotene and a decrease in alpha-tocopherol concentration in patients with colonic neoplasia. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 3:501-505

Munkres KD (1990) Pharmacogenetics of cyclic guanylate, antioxidants, and antioxidant enzymes in *Neurospora*. **Free Radic Biol Med** 9:29-38

Nagy A, Palágyi Z, Ferenczy L, Vágvölgyi C (1997). Radiation-induced chromosomal rearrangement as an aid to analysis of the genetic constitution of *Phaffia rhodozyma*. **FEMS Microbiol Lett** 152:249-254

Nakano T, Tosa M, Takeuchi M (1995) Improvement of biochemical features in fish health by red yeast and synthetic astaxanthin. **J Agric Food Chem** 43:1570-1573

Nakano T, Kanmuri T, Sato M, Takeuchi M (1999) Effect of astaxanthin rich red yeast (*Phaffia rhodozyma*) on oxidative stress in rainbow trout. **Biochim Biophys Acta** 1426:119-125

Nelis HJ, De Leenheer AP (1991) Microbial sources of carotenoid pigments use in foods and feeds. **J Appl Bacteriol** 70:181-191

Ni HT, LaPorte DC (1995) Response of a yeast glycogen synthase gene to stress. **Mol Microbiol** 16:1197-1205

Nicholls DG, Ferguson SJ (1992) **Bioenergetics** 2. Capitulo 5, Academic Press, New York

Nonomura AM (1990) Industrial biosynthesis of carotenoids. En: Krinsky NI, y col., (eds). **Carotenoids: Chemistry and Biology**, pp 365-375. Plenum Press, New York

Okagbue RN, Lewis MJ (1984) Autolysis of the red yeast *Phaffia rhodozyma*: a potential tool to facilitate extraction of astaxanthin. **Biotechnol Lett** 6: 247-250

Okagbue RN, Lewis MJ (1984b) Use of alfalfa juice as a substrate for propagation of the red yeast *Phaffia rhodozyma*. **Appl Microbiol Biotechnol** 20:33-39

Olson JA, Krinsky NI (1995) The colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators. **FASEB J** 9:1547-1550

Ortega-López J (1995) The role of amphiphilic environment upon cytochrome c oxidase activity. **PhD Thesis, Universidad de Texas, San Antonio.**

Pahl HL, Beuerle PA (1994) Oxygen and the control of gene expression. **Bioessays** 16:497-502

Palagyi Z, Nagy A, Vagvolgyi C, Ferenczy L (1995) A new mutation protocol for obtaining auxotrophic mutants of the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnol Techniques** 9: 401-402

Palozza P, Krinsky N.I. (1992) Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: an overview". **Methods Enzimol** 213:403-421

Pandolfi PP, Sonati F, Rivi R, Mason P, Grosveld F, Luzzatto L (1995) Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. **EMBO J** 14:5209-5215

Parajó JC, Santos V, Vázquez M (1997) Co-production of carotenoids and xylitol by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). **Biotechnol Lett** 19:139-141

Parajó JC, Santos V, Vázquez M (1998) Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose. **Process Biochem** 33:181-187

Parajó JC, Santos V, Vázquez M (1998b) Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* growing on media made from hemicellulosic hydrolysates of Eucalyptus globulus wood. **Biotechnol Bioeng** 59:501-506

Park WS, Murphy PA, Glatz BA (1990) Lipid metabolism and cell composition of the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* grown at different carbon to nitrogen ratios. **Can J Microbiol** 36:318-326



- Parker RS (1996) Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. **FASEB J** 10:542-551
- Parrou JL, Enjalbert B, Plourd L, Bauche A, Gonzalez B, Francois J (1999) Dynamic responses of the reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast** 15:191-203
- Paust J (1996) Technical synthesis. En: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (eds). **Carotenoids Vol. 2. Synthesis**, pp 259-291. Birkhauser Verlag, Basel
- Peng YM, Peng YS, Childers JM, Hatch KD, Roe DJ, Lin Y, Lin P (1998) Concentrations of carotenoids, tocopherols, and retinol in paired plasma and cervical tissue of patients with cervical cancer, precancer, and noncancerous diseases. **Cancer Epidemiol Biomark Prev** 7: 347-350
- Peña MM, Koch KA, Thiele DJ (1998) Dynamic regulation of copper uptake and detoxification genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol** 18:2514-2523
- Perry KL, Simonitch A, Harrison-Lavoie KJ, Liu S (1986) Cloning and regulation of *Erwinia herbicola* pigment genes. **J Bacteriol** 168: 607-612
- Pfander H, Liaaen-Jensen S, Britton G (1996) Synthesis in perspective. En Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (eds.). **Carotenoids Vol. 2: Synthesis**, p. 1-6. Birkhauser Verlag, Basel
- Phaff HJ, Miller MW, Yoneyama M, Soneda M (1972) A comparative study of the yeast flora associated with trees on the Japanese islands and on the west coast of north America. **Proc. IV IFS: Fermentation Technology Today**, Tokyo. Society of Fermentation Technology, Osaka. pp 759-774
- Pons MN, Rajab A, Engasser JM (1986) Influence of acetate on growth kinetics and production control of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose and ethanol. **Appl Microbiol Biotechnol** 24:193-198

- Presta A, Stillman MJ (1997) Incorporation of copper into the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of Cu(I)-metallothionein in intact yeast cells. **J Inorg Biochem** 66:231-240
- Prevatt WD, Dickson TD, Harris RL (1991) Novel strains of *P. rhodozyma* containing high levels of astaxanthin. **Eur Pat Appl** 438, 182
- Prieto S, Bouillaud F, Ricquier D, Rial E (1992) Activation by ATP of a proton-conducting pathway in yeast mitochondria. **Eur J Biochem** 208:487-491
- Przybyla-Zawislak B, Gadde DM, Ducharme K, McCammon MT (1999) Genetic and biochemical interactions involving tricarboxylic acid cycle (TCA) function using a collection of mutants defective in all TCA cycle genes. **Genetics** 152:153-166
- Reynders MB, Rawlings DE, Harrison STL (1997) Demonstration of the Crabtree effect in *Phaffia rhodozyma* during continuous and fed-batch cultivation. **Biotechnol Lett** 19:549-552
- Reynders MB, Rawlings DE, Harrison STL (1996) Studies on the growth, modeling and pigment production by the yeast *Phaffia rhodozyma* during fed-batch cultivation. **Biotechnol Lett** 18:649-654
- Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahn H (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps winding to isopentenyl diphosphate. **Biochem. J** 295:517-524
- Rosner JL, Storz G (1997) Regulation of bacterial responses to oxidative stress. **Curr Top Cell Reg** 35:163-177
- Sakajo S, Minagawa N, Komiyama T, Yashimoto A (1993) Molecular cloning of cDNA for antimycin inducible mRNA and its role in cyanide resistant respiration in *Hansenula anomala*. **Biochim Biophys Acta** 1090:102-108

Sakajo S, Minagawa N, Komiyama T, Yashimoto A (1997) Effects of nucleotides on cyanide-resistant respiratory activity in mitochondria isolated from antimycin treated yeast *Hansenula anomala*. **Biosci Biotechnol Biochem** 61:396-399

Sánchez A, Flores-Cotera LB, Langley E, Martín R, Maldonado G, Sánchez S (1999) Carotenoides: estructura, función, biosíntesis, regulación y aplicaciones. **Rev Lat Microbiol** 41:175-191

Sandmann G (1994) Carotenoids biosynthesis in microorganisms and plants. **Eur J Biochem** 223: 7-24

Sandmann G, Woods WS, Tuveson RW (1990) Identification of carotenoids in *Erwinia herbicola* and in a transformed *Escherichia coli* strain. **FEMS Microbiol** 71:77-82

Santopietro LMD, Spencer JFT, Spencer DM, Sineriz F (1995) Formation of protoplasts from *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnol Techniques** 9:339-344

Schewender J, Seemann M, Lichtenthaler HK, Rohmer M (1996) Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. **Biochem J** 316:73-80

Schiedt K, Liaaen-Jensen S (1995) Isolation and analysis. En: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (eds.). **Carotenoids Vol 1A: Isolation and analysis**, p. 81-103. Birkhauser Verlag, Basel

Schmidt K (1997) Interaction of antioxidative micronutrients with host defense mechanisms. **Int J Vit Nutr Res** 67: 307-311

Schroeder WA, Johnson EA (1995a) Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. **J Ind Microbiol** 14:502-507

Schroeder WA, Johnson EA (1995b) Singlet oxygen and peroxil radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. **J Biol Chem** 270:18374-18379

Schroeder WA, Johnson EA (1993). Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. **J Gen Microbiol** 139:907-912

Seddon JM, Ajani UA, Sperduto RD, Hiller R, Blair N, Burton T, Farber MD, Gragoudos ES, Haller J, Miller DT, Yannuzzi LA, Willett W (1994) Dietary carotenoids, vitamins A, C and E, and advanced age-related macular degeneration. **J Am Med Assn** 272:1413-1420

Sedmak JJ, Weerasinghe K, Jolly SO (1990) Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnol Techniques** 4:107-112

Shahaidi F, Metusalach S, Brown JA (1998) Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. **Crit Rev Food Sci Nutr** 38: 1-67

Shanklin J, Whittle E, Fox BG (1994) Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. **Biochemistry** 33:12787-12794

Shashi K, Bachhawat AK, Joseph R (1990) ATP:citrate lyase of *Rhodotorula gracilis*: purification and properties. **Biochim Biophys Acta** 1033:23-30

Shiraishi A, Fujii H (1986) Alternative cyanide- and antimycin A- insensitive respiratory system in *Sporobolomyces* red yeast. **Agric Biol Chem** 50:447-452

Sies H (1993) Strategies of antioxidant defense. **Eur J Biochem** 215:213-219

Simpson KL, Katayama T, Chichester CO (1981) Carotenoids in fish feeds. En: Bauernfend JC (ed) **Carotenoids as colorants and vitamin A precursors**, pp 463-538. Academic Press, New York

Soon, BC, Jong EC, Gill HA (1992) Strain improvement of *Phaffia rhodozyma* by protoplast fusion. **FEMS Microbiol Lett** 93:221-226

Spencer KG (1989) Pigmentation supplements for animal feed compositions. **US Pat 4,871,551**

Stadtman ER (1992) Protein oxidation and aging. **Science** 257: 220-1224

Sugiyama J, Fukagawa M, Chui SW, Komagata K (1985) Cellular carbohydrate composition, DNA base composition, ubiquinone systems. and diazonium blue. B color test in the genera *Rhodospiridium*, *Leucosporidium*, *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeast. **J Gen Appl Microbiol** 31:519-550

Sumner JB (1944) A method for the colorimetric determination of phosphorous. **Science**100:413-414

Sun IL, Sun EE, Crane FL, Morre DJ (1990) Evidence for coenzyme Q function in transplasma membrane electron transport. **Biochem Biophys Res Commun** 172:979-984

Tamai KT, Gralla EB, Ellerby LM, Valentine JS, Thiele DJ (1993) Yeast and mammalian metallothioneins functionally substitute for yeast cooper-zinc superoxide dismutase. **Proc Natl Acad Sci USA** 90:8013-8017

Teichert U, Mechler B, Muller H, Wolf DH (1989) Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalyst for protein degradation, differentiation, and cell survival. **J Biol Chem** 264:16037-45

Tso MOM, Lam TT (1996) Method of retarding and ameliorating central nervous system and eye damage. **US Pat. 5,527,533**

Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL (1985) Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of hearth mitochondria. **Arch Biochem Biophys** 237:408-414

Van den Bergen CW, Wagner AM, Krab K, Moore AL (1994) The relationship between electron flux and the redox poise of the quinone pool in plant mitochondria. Interplay between quinol-oxidizing and quinone reducing pathways. **Eur J Biochem** 226:1071-1078

Vázquez M, Martín AM (1998) Optimization of *Phaffia rhodozyma* continuous culture through response surface methodology. **Biotechnol Bioeng** 57:314-320

Vázquez M, Santos V, Parajó JC (1997). Effect of the 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, UACP y P del CCH, UNAM.**

Verduyn C (1991) Physiology of yeast in relation to biomass yields. **Antoine van Leeuwenhoek** 60:325-353

Vries SD, Marres CAM (1987) The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis the role in cellular metabolism. **Biochim Biophys Acta** 895:205-239

Walker GM (1986) Magnesium and the cell cycle control: an update. **Magnesium** 5:9-23

Walker GM, Duffus JH (1980) Magnesium ions and the control of the cell cycle in yeast. **J Cell Sci** 4 2:329-56

Weatherburn MW (1967) Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Anal Chem** 39:971-973

Wery J, Dalderup MJ, Linde JT, Boekhout T, Van Ooyen AJ (1996) Structural and phylogenetic analysis of the actin gene from the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Yeast** 12:641-651

Wery J, Gutker D, Renniers ACHM, Verdoes JC, Van Ooyen AJ (1997) High copy number integration into the ribosomal DNA of the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Gene** 184:89-97

Westerbeek-Marres CA, Moore MM, Autor AP (1988) Regulation of MnSOD in *Sacharomyces cerevisiae*. The role of the respiratory chain activity **Eur J Biochem** 174:611-620

Winge DR, Jensen LT, Srinivasan C (1998) Metal-ion regulation of gene expression in yeast. **Curr Opin Chem Biol** 2:216-221

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

Yamane Y, Higashida K, Nakashimada Y, Kakizono T, Nishio N (1997b) Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* enhanced in fed-batch culture with glucose and ethanol feeding. **Biotechnol Lett** 19:1109-1111

Yang R, Chun KT, Wek RC (1998) Mitochondrial respiratory mutants in yeast inhibit glycogen accumulation by blocking activation of glycogen synthase. **J Biol Chem** 273:31337-31344

Ying MC, Cheng WS (1997) Oxymyoglobin and lipid oxidation in phosphatidylcholine liposomes retarded by  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene. **J Food Sci** 62(6): 1095-1097.

Yokoyama A, Izumida H, Miki W (1994) Production of astaxanthin and 4-ketozeaxanthin by the marine bacterium, *Agrobacterium aurantiacum*. **Biosci Biotechnol Biochem** 58:1842-1844

Yokoyama A, Miki W (1995) Composition and presumed biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin-producing bacterium *Agrobacterium aurantiacum*. **FEMS Microbiol Lett** 128:139-144

Yokoyama A, Miki W, Izumida H, Shizuri Y (1996) New trihydroxy-keto-carotenoids isolates from an astaxanthin-producing marine bacterium. **Biosci Biotechnol Biochem** 60:200-203

Yuan JP, Chen F (1998) Chromatographic separation and purification from the extracts of *Haematococcus pluvialis*. **J Agric Food Chem** 46:3371-3375

Zannoni D, Moore AL (1990) Measurement of the redox state of the ubiquinone pool in *Rhodobacter capsulatus* membrane fragments. **FEBS Lett** 271:123-127

Zhao XJ, Raitt D, Burke PV, Crewell AS, Kwast KE, Poyton RO (1996) Function and expression of flavohemoglobin in *Saccharomyces cerevisiae*- evidence for a role in the oxidative stress response. **J Biol Chem** 271:25131-25138



- 9 **ANEXO:** "Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium" (artículo aceptado para su publicación en Appl. Microbiol Biotechnol 55:341-347)

*Applied*  
*and Microbiology*  
*Biotechnology*

Dr. S. Sánchez  
Departamento de Biotechnología  
Instituto de Investigaciones Biomedicas,  
Universidad Nacional Autónoma de México  
México D.F. 04510  
México

Professor Dr. A. Steinbüchel  
Institut für Mikrobiologie  
Universität Münster  
Corrensstrasse 3  
D-48149 Münster  
Germany  
Tel.: + 49-251-8339821  
Fax: + 49-251-8338388  
e-mail: amb@uni-muenster.de

Date: 16.08.00

Dear Colleague,

I am pleased to inform you that your paper

"Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma* ..."  
has been accepted for the above journal and is being sent to the publishers.

As you know, each article is limited to six (6) printed pages (i.e., approximately 18 manuscript pages including figures and tables). DM 500,00 will be charged for each page exceeding this limit.

In case you have not included your e-mail (if available) and fax number on the title page of your manuscript, please send this information to:

Sabine Heine  
Springer-Verlag  
Journal Production Dept.  
Heidelberger Platz 3  
D-14197 Berlin  
Germany

Fax: +49-30-34005-350  
e-mail: s.heine@springer.de

In all correspondence, please quote the following manuscript number: 9230

Yours sincerely



Editor-in-Chief



**Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium.**

L. B. Flores-Cotera, R. Martín and S. Sánchez

Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 04510, México.

**Tel.: +525 622 3867**

**Fax: +525 6223855**

**e-mail: [sersan@servidor.unam.mx](mailto:sersan@servidor.unam.mx)**

**Abstract.** The influence of ammonium, phosphate and citrate on astaxanthin production by the yeast *Phaffia rhodozyma* was investigated. The astaxanthin content in cells and astaxanthin concentration increased upon reduction of ammonium from 61 to 12.9 mM (140 to 230  $\mu\text{g/g}$  and 1.2 to 2.3  $\mu\text{g/ml}$ , respectively). Similarly, both the astaxanthin content and astaxanthin concentration increased by reducing phosphate from 4.8 to 0.65 mM (160 to 215  $\mu\text{g/g}$  and 1.7 to 2.4  $\mu\text{g/ml}$ , respectively). Low concentrations of ammonium or phosphate also increased the fatty acid content in cells. By analogy with lipid synthesis in other oleaginous yeast, examination of data at varying nitrogen and phosphate, suggest that citrate can be the source of carbon for fatty acids and carotenoid synthesis. Supporting this possibility is the fact that supplementation of citrate in the medium at levels of 28 mM or higher notably increased the final pigment concentration and pigment content in cells. The increased carotenoid syntheses at low ammonium or phosphate levels, as well as the stimulation by citrate, were all paralleled by decreased protein synthesis. This suggests that restriction of protein synthesis could play an important role in carotenoid synthesis by *P. rhodozyma*.

## **Introduction.**

Astaxanthin (3,3'-dihydroxi- $\beta,\beta$ -carotene-4,4'-dione) is a commonly found carotenoid pigment in marine animals. Salmonids and crustaceans obtain the pigment through their diet to acquire distinctive red/pink coloration. Carotenoids containing oxygen functional groups (xanthophylls) are found in all photosynthetic plant tissues. However, astaxanthin biosynthesis is limited only to a few species of microorganisms including the yeast *P. rhodozyma* (Johnson and An 1991), the microalga *Haematococcus pluvialis* (Kakizono et al. 1992), and the marine bacteria *Agrobacterium aurantiacum* and *Alcaligenes* sp strain PC-1 (Yokoyama et al. 1994). In the last decade, there has been significant commercial interest in developing *P. rhodozyma* as an astaxanthin source for cultured fish and shellfish (Nakano et al. 1995). Thus, several companies have seriously promoted the yeast as an industrial pigment source (Johnson and Schroeder 1995a, 1996). In addition to its role as a pigment, astaxanthin is a powerful scavenger of singlet oxygen and peroxy radicals. In fact, a superior singlet oxygen quenching ability has been reported for astaxanthin in relation to other carotenoids present in vegetables like  $\beta$ -carotene, cantaxanthin, lutein and zeaxanthin (Di Mascio et al. 1990). Their antioxidant property has associated astaxanthin and other carotenoids with a reduced incidence of cancer and other degenerative diseases and an enhanced immune response (Schroeder and Johnson 1995b).

Several reports in the literature have shown that media constituents, among other environmental factors, affect astaxanthin production in *P. rhodozyma* (Johnson and An 1991). The effects of different nutrients on *P. rhodozyma* have generally been studied in media containing complex sources of nutrients such as peptone, malt and yeast extracts and grape juice (Schroeder and Johnson 1995a; Meyer and duPreez 1994a). Although such media are often convenient because they contain all nutrients, they suffer from the disadvantage of being undefined and sometimes variable in composition, which may mask important nutritional effects. For this reason, several previous studies are difficult to interpret in detail because of inadequate characterization of

growth limiting factors in the media. Thus, in order to elucidate the nature of nutritional effects, as far as possible, chemically defined or synthetic media must be used. Since few if any studies have been carried out with *P. rhodozyma* in minimal media, the purpose of this work was to investigate the influence of ammonium, phosphates, and citrate, on growth and astaxanthin production by the yeast in a chemically defined medium.

## Materials and methods

### Yeast strain and cultivation.

The strain type of *P. rhodozyma* NRRL Y-10922 (sexual state *Xanthophyllomyces dendrorhous*) was obtained from the ARS culture collection, USDA, Peoria, IL, USA. The yeast was maintained on YM agar plates containing (per liter): 10 g glucose, 5.0 g Bacto-peptone, 3.0 g malt extract, 3.0 g yeast extract and 15 g agar. Single colonies were transferred to a fresh plate every month, incubated for 3 days and thereafter kept under refrigeration. Inoculum was prepared in liquid YM medium as above but without agar. Six 250-ml baffled flasks, each containing 32 ml of YM medium, were inoculated with a loopful of yeast from an agar plate. The flasks were incubated for 36 hours on an orbital shaker (Gallenkamp), at 150 rpm and 21-22 °C. Subsequently, the cells were harvested by centrifugation at 3500 × g for 10 minutes and re-suspended in 100 ml of 0.3% saline solution. One ml of this suspension was inoculated into each flask containing 32 ml of defined medium with varying amounts of ammonia, phosphate or citrate.

### Experiments.

Two experiments, each consisting of a series of nine or eight 250-ml baffled flasks in duplicate, were carried out using defined media with varying concentrations of ammonium sulfate or phosphates, respectively. We performed an additional experiment consisting of four flasks in duplicate, with varying concentrations of citrate. Citrate concentrations up to 2.7 mM were supplied as sodium citrate, whereas higher concentrations were supplied as a mixture of sodium citrate/citric acid (1:3). *P. rhodozyma* was grown for 6.5 days at 150 rpm and 21°C on the orbital shaker. The initial pH was 5.5- 6.0.

From preliminary work carried out in our laboratory (unpublished), we developed chemically defined media containing non-limiting amounts of nutrients. In the experiment with varying ammonium concentrations the medium contained (g/l): 30.3 sucrose, 0.39 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.08 MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.07 KCl, 0.02 CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O, 0.002 FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.0006 CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O, 0.012 ZnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.0006 MnSO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O, 0.0002 CoSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.00013 H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, 0.00053 Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O, 0.3 NaCl, 1.8 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.5 sodium citrate, 0.4 ml vitamin solution and varying amounts of

ammonium sulfate. The sulfur contained in this medium was well in excess of the requirements of the yeast. So, in the experiment with varying phosphates, to reduce the amount of sulfur and to avoid an excessive drop of pH, the medium was supplied with a mixture of nitrogen sources (g/l): 0.32 (NH<sub>4</sub>) SO<sub>4</sub>, 0.13 NH<sub>4</sub>Cl, 0.5 urea. To keep the final pH relatively constant in the different flasks, phosphates were supplied as Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> to the four flasks (1-4) with lower phosphate concentrations and as NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O to the three flasks (6-8) with the higher phosphate concentrations. Flask 5 was provided with a 50:50 (M) mixture of each phosphate. Other nutrients were supplied as above. In the experiment with citrate, the medium was similar to that employed with varying nitrogen except that K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.18 g/l) was used instead of KCl, the amount of other components was slightly adjusted as follows (g/l): 0.4 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.4 NaCl, 0.63 (NH<sub>4</sub>) SO<sub>4</sub>, 0.43 urea. The vitamin solution contained: 75 mg calcium pantothenate; 38 mg thiamine; 2 mg biotin; 3.8 mg cyanocobalamin; 3.75 g myo-inositol; 19 mg pyridoxin chloride; 38 mg riboflavine; 225 mg nicotinamide; 500 ml deionized water. Flasks containing medium with sugar, sulfates, sodium chloride and ammonium chloride were autoclaved together for 15 minutes at 120 °C and 1.25 kg/cm<sup>2</sup>g. Phosphates, calcium chloride, boric acid and sodium molybdate were autoclaved separately, cooled, and added to the sterilized flasks. Stock solutions of urea, vitamins and citrate were filter sterilized and added just before inoculation.

#### Analytical procedures

For dry weight determinations, broth samples of 5 or 6 ml each were centrifuged for 10 minutes at 3500 × g and washed once with distilled water. The washed cells were dried for 48 h at 95° C over aluminum pads allowed to cool in a desiccator and weighed. For protein analyses, washed cells (two or three ml samples) were resuspended in 0.5 ml of 1 N NaOH and disrupted for 15 minutes in a bath at 92 °C . Once cooled, the samples were diluted to 3 ml with distilled water and analyzed by the biuret method (Gornall et al. 1949). Bovine serum albumin (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) was used as standard. Reducing sugars were assayed colorimetrically in the supernatant by the 3,5-dinitrosalicylic acid method (Miller 1959). Growth yield on substrate was calculated as  $Y_{x/s} = (x_f - x_o) / (S_o - S_f)$ , where  $x_f$ ,  $x_o$  denote the final and initial cell concentrations respectively and  $S_o$ ,  $S_f$  denote the initial and final sugar concentrations. Lipids were extracted from the cells (pelleted from 6 ml samples) at 70 °C for two hours with KOH in ethanol (2.14 M KOH in 12% ethanol v/v) as described by Andlid et al. (1995). The liberated fatty acids were extracted three times with 3 ml hexane and dried under a stream of nitrogen. The fatty acids were subsequently converted to methyl esters using 2.5% HCl in methanol and analyzed on a Perkin-Elmer (USA) gas chromatograph with flame ionization detector. The chromatograph was equipped with a column (FFAP 15%; 3.2 mm diameter x 1.8 m long) and a Perkin-Nelson integrator mod. 1020. The nitrogen flow rate was 24 ml/min. Residual ammonia was assayed colorimetrically by the Berthelot method (Weatherburn 1967) and phosphate by the Jones method (Sumner

1944). Carotenoids were extracted into hexane: ethyl acetate (50:50) following disruption of yeast cells with dimethylsulfoxide (DMSO), as described by Sedmak et al. (1990). Total pigments were calculated using  $E_{480\text{ nm}} = 2150$ . Thin-layer chromatography (TLC) analyses.

To allow complete drying of the extracts, yeast cells (about 2 mg) were ruptured with DMSO and pigments extracted twice with 2 ml hexane each. Hexane extracts were collected and dried by evaporation in a stream of nitrogen. Subsequently, the pigments were chromatographed together with standards of astaxanthin (Hoffman-LaRoche) on silica gel plates (Silica gel 60, 10 × 20 cm; E. Merck AG, Darmstad, Germany), and developed in a mixture of 20% acetone-80% petroleum ether. Quantitative analysis of astaxanthin was made by comparison of standard and sample spots by means of a CAMAG densitometer.

## Results

Effects of varying ammonium concentrations.

To determine the effect of ammonium on growth and astaxanthin production by *P. rhodozyma*, a defined medium was supplemented with different amounts of ammonium sulfate (2.1 to 61 mM). Fig. 1A shows that astaxanthin and total pigment concentrations in the broth reached a maximum of 2.4 and 3.9 µg/ml respectively within the range from 12.9 to 22.9 mM ammonium. A slowly decreasing trend of astaxanthin (2.4 to 1.2 µg/ml) and total pigment concentrations (3.9 to 3.3 µg/ml) can be seen above 22.9 mM and sharply reduced concentrations below 13 mM ammonium. Similarly, the astaxanthin content in the cells decreased from 302 to 140 µg/g while increasing ammonium from 2.1 to 61 mM. In contrast, and probably because of the simultaneous decrease in dry weight (Fig. 1B), no clear tendency can be seen in the total pigment content in cells. The carotenoids extracted from the cells were the same irrespective of the ammonium concentration (not shown). However, the astaxanthin/total pigment ratio increased significantly at low ammonium concentrations. Fig. 1B shows that the final dry weight reached a maximum of 10.9 mg/ml at 28.6 mM ammonium but decreased notably at higher and lower values. The growth yield ( $Y_{x/s}$ ) showed a trend similar to dry weight, with a maximum of 0.37 g cells/g sugar. The final pH was about 2.3 in the range from 34 to 61 mM ammonium, but higher (5-7.4) at ammonium



concentrations below this range. Significant amounts of residual ammonium were only detected at initial ammonium concentrations above 34 mM (Fig. 1C). As expected, the protein content in cells increased (0.06 to 0.24 g/g cell) with increasing ammonium up to 43 mM, but tended to level off at higher values (Fig. 1C). As evidenced by the sharp fall of biomass in Fig. 1B, cell replication was probably affected at ammonium levels below 22.9 mM. At ammonium concentrations below 12.9 mM, the effect of nitrogen deprivation is further evidenced by the incomplete consumption of sugars after 6.5 days cultivation (Fig 1B). However, even under these adverse conditions the astaxanthin and fatty acid contents in the cells increased and the total pigment content was not diminished (Fig. 1A and 1C).

Effects of varying phosphate concentration.

*P. rhodozyma* was cultured in a chemically defined medium with varying concentrations of phosphate (0.3- 9.7 mM). Fig. 2A shows a decreasing trend of astaxanthin (2.3 to 1.7  $\mu\text{g/ml}$ ) and total pigment concentrations (4.6 to 4.0  $\mu\text{g/ml}$ ) as phosphate increases from 1.3 to 4.8 mM, but the total pigment content was relatively constant. Notably, the astaxanthin/total pigment ratio increased progressively with lower phosphate concentration (not shown). The final dry weight reached a maximum of 11.1 mg/ml at 0.65 mM and slightly decreased as phosphate concentration increased (Fig. 2B). The growth yield ( $Y_{x/s}$ ) exhibited a similar trend to dry weight, with a maximum of 0.38 g yeast/g sugar, whereas the final pH was relatively constant (Fig. 2B). On the other hand, the total protein (0.8-1.9 mg/ml) and the protein content in cells (0.08-0.19 g/g cell) increased with increasing phosphate (Fig. 2C) even though associated with a lower biomass (Fig. 2B). The maximum concentrations of astaxanthin and total pigment (2.4 and 4.5  $\mu\text{g/ml}$ ) occurred with a high biomass between 0.65-1.3 mM phosphate. The increased biomass at low phosphate was at least partly caused by an increased fatty acid accumulation (Fig. 2C). It is noteworthy that

significant amounts of residual phosphate were only detected at initial phosphate concentrations above 7.1 mM (Fig. 2C).

Effects of varying citrate concentration.

An experiment with varying amounts of citrate (0-58 mM) in the medium was carried out. Figure 3A shows similar pigment concentration and pigment content in cells grown with no citrate or with 1.2 mM of citrate in the medium. In contrast, citrate concentration at 28.9 mM or above stimulated total pigment concentration and total pigment content in the cells. However, the astaxanthin concentration and astaxanthin content in cells were not appreciably increased. That is, the proportion of astaxanthin in the extracted pigment was reduced noticeably with higher citrate concentration. On the other hand, dry weight and growth yield decreased with increasing citrate (Fig. 3B). The pH was higher at 29 and 58 mM in relation to lower citrate concentrations. Similarly, as suggested by the trends in total protein and protein content in cells, protein synthesis was also negatively affected by citrate (Fig. 3C). In all three experiments (varying ammonium, phosphate or citrate), the total protein and total pigment concentrations showed opposite trends with varying concentrations of the specific nutrient. This may imply that protein restriction is a common factor that stimulates carotenoid synthesis in *P. rhodozyma*.

## Discussion

The astaxanthin and total pigment concentrations, as well as the astaxanthin content in cells increased when ammonium sulfate was reduced from 61 to 18.6 mM (Fig 1A), but at the expense of reduced protein synthesis (Fig. 1C). Working with different strains of *P. rhodozyma* in complex media, several authors have also found increased pigment production as nitrogen concentration decreases. Yamane et al. (1997) reported that astaxanthin production in feed batch cultures was improved by a high initial C/N ratio. Meyer and duPreez (1994a) reported that decreasing residual ammonia in cultures of *P. rhodozyma* grown in grape juice increased astaxanthin and total pigment

contents. In the alga *H. pluvialis*, nitrogen limitation has also been a key factor for accumulation of carotenoids (Kakizono et al. 1992). All these data suggest that reduced protein synthesis might be a common mechanism that stimulates carotenoid biosynthesis. The particular metabolic behavior may be different in different yeast strains. However, some general statements can be put forth which apply to most if not all yeast. When yeast are grown in media containing ammonium as sole nitrogen source, the protein content in the cells has a considerable effect on the quantity of carbon, ATP and NADPH channeled into protein synthesis (Larsson et al. 1993). As ammonium availability decreases, the carbon demands for protein and nucleotide synthesis drop, particularly for  $\alpha$ -ketoglutarate and oxaloacetate. As a result, the carbon source becomes in excess. Accordingly, the larger accumulation of fatty acids and astaxanthin at low ammonium concentrations (Fig. 1A and C) may serve as a means for accommodating the surplus of carbon, energy (ATP) and NADPH arising from a limited protein synthesis. The interpretation that carotenoid biosynthesis is stimulated by limited protein synthesis agrees well with other published data. An et al. (1989) have suggested that the rate or efficiency of nitrogen utilization was progressively impaired in a series of mutant strains with increasing carotenoid content. On the other hand, screening of nitrogen sources for astaxanthin production has frequently resulted in the selection of slowly metabolized amino acids, the use of which probably resulted in nitrogen limitation (Meyer et al. 1993).

In many yeast, the overall rates of protein synthesis and growth are restricted also by phosphate deficit (Callieri et al. 1984). Since phosphate is mainly associated with RNA under phosphate limitation, the limited protein synthesis seen at low phosphate with *P. rhodozyma*, may be due to slow replication caused by insufficient phosphate for DNA and RNA synthesis. Therefore, the increased astaxanthin production at low phosphate concentrations is very likely connected to a restricted protein synthesis. However, An and Johnson (1990) have shown that blockage of the main respiratory chain by antimycin A, or other inhibitors of the respiratory chain,

results in an increased production of astaxanthin in *P. rhodozyma*. So, limited yeast growth and increased carotenoid formation might occur as a result of a low respiratory activity induced by phosphate limitation (Manon et al. 1989). Apart, phosphate may affect carotenoid production in *P. rhodozyma* in other more specific ways. Phosphatases are required for carotenoid synthesis because several of the early biosynthetic precursors of carotenoids are phosphorylated (mevalonate pathway) whereas carotenoids are not. In many microorganisms, limiting phosphate often derepresses microbial phosphatases that cleave phosphorylated intermediates (Arnezeder and Hampel 1991).

On the other hand, carotenoid biosynthesis requires acetyl-CoA as a building block, and ATP plus NADPH as co-factors (Bramley and MacKenzie 1988). Because acetyl-CoA is a key intermediate used in both primary and secondary metabolic pathways, its entry into these alternative pathways must be somehow regulated. When protein synthesis is restricted in *P. rhodozyma*, the availability of acetyl-CoA and ATP may be key factors for switching the carbon flux from TCA-respiratory to carotenoid/fatty acid biosyntheses. In *P. rhodozyma* about 70% of  $\beta$ -carotene is located in lipid globules in the cytoplasm, where desaturase and cyclase activities are believed to be associated (Johnson and Schroeder 1996). This suggests that earlier steps of carotenoid biosynthesis in *P. rhodozyma*, as occurs with fatty acid synthesis in other lipid rich yeast, take place in the cytoplasm. However, the pyruvate dehydrogenase enzyme has been found exclusively in mitochondria, which are considered to be relatively impermeable to acetyl-CoA (Evans et al. 1983). Accordingly, it is interesting that mitochondrial citrate is considered the most important source of cytoplasmic acetyl-CoA for fatty acid synthesis in lipid rich yeast. Accumulation of citrate in mitochondria and its transport into the cytosol has been widely explained by allosteric inactivation of NAD<sup>+</sup>-isocitrate dehydrogenase due to a decrease in the intracellular AMP concentration (Boulton and Ratledge 1981; Evans et al. 1983). Inhibition of the enzyme by ATP has also been shown to be a general feature in many yeast. Since demand for

energy is satisfied under nitrogen or phosphate limiting conditions in *P. rhodozyma*, the high ATP/AMP and NADH/NAD<sup>+</sup> ratios must reduce the activity of the enzyme. The accumulating citrate may be subsequently transported and cleaved by the cytosolic enzyme ATP:citrate lyase to give acetyl-CoA and oxaloacetate (Evans et al. 1983). Since both fatty acids and total pigment are enhanced by nitrogen as well as by phosphate deficit and both processes require building blocks of acetyl-CoA, it is tempting to suggest citrate as the source of acetyl units not only for fatty acids but also for carotenoids. Another fact in favor of this possibility is that ATP: citrate lyase is consistently found only in lipid rich yeast, consequently the presence or absence of the enzyme marks a significant difference between lipid rich yeast and other yeast (Boulton and Ratledge 1981). Furthermore, the enzyme has been reported in *Rhodotorula gracilis* that is phylogenetically related to *P. rhodozyma* (Shashi et al. 1990). The stimulation of total pigment content in cells and total pigment concentration observed when citrate was supplemented (Fig. 3A), also suggest that citrate uptake to the cytoplasm could be indeed the source of acetyl-CoA for carotenoids. This possibility may be of considerable practical importance since citrate, a low cost raw material, could be used to supplement industrial media to enhance astaxanthin production by *P. rhodozyma*.

Interestingly, fatty acid and carotenoid syntheses share several common features with sterol synthesis including the requirement of ATP, NADPH, molecular oxygen and acetyl-CoA as initial building block. The coupled synthesis of all these compounds in *P. rhodozyma* is likely, considering that the onset of carotenoid and fatty acid synthesis is presumably, to a great extent, due to alterations of primary cellular metabolism. However, other more specific regulatory control mechanisms may have a role as well, including feedback regulation of synthetases or the effects of environmental factors such as levels of sugars and dissolved oxygen (Johnson and Schroeder 1995). Therefore, the availability of precursors from primary metabolism such as acetyl-CoA or citrate may not be sufficient to induce a significant increase in astaxanthin content in native strains

of *P. rhodozyma* (beyond 600  $\mu\text{g/g}$ ). For substantially increased production, the regulatory mechanisms of synthesis of relevant enzymes have to be removed or eliminated.

### **Acknowledgements**

The authors are indebted to MS. Beatriz Ruiz and Laura Escalante for their expert technical assistance, E. Ríos and C. Rojas, Department of Biotechnology CINVESTAV-IPN, for assistance with the fatty acid analyses, MS. E. Velázquez, Dr. T. Ramírez and Dr. S. Durán for helpful discussions, Dr. E Langley for critically reading the manuscript and Dr. Carlos Díaz from IIMAS for his help in the statistical analysis. LB Flores-Cotera is indebted to CINVESTAV-IPN for a research fellowship and support given during the course of this work. This work was supported partially by a doctoral grant by DGAPA- PADEP, UNAM, México.

## References

- Andlid T, Larsson C, Liljenberg C, Marison I, Gustafsson L (1995) Enthalpy content as a function of lipid accumulation in *Rhodotorula glutinis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 42:818-825
- An GH, SchumanDB, Johnson EA (1989) Isolation of *P. rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl Environ Microbiol* 55:116-121
- An GH, Johnson EA (1990) Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 57:191-203
- Arnezeder C, Hampel WA (1991) Influence of growth rate on the accumulation of ergosterol in yeast-cells in a phosphate limited continuous culture. *Biotechnol Lett* 13: 97-100
- Boulton CA, Ratledge C (1981) Correlation of lipid accumulation in yeast with possession of ATP:citrate lyase. *J Gen Microbiol* 127:169-176
- Bramley PM, Mackenzie A (1988) Regulation of carotenoid biosynthesis. *Curr Top Cell Reg* 29:291-343
- Callieri DAS, Nuñez CG, Diaz Ricci JC, Scida L (1984) Batch culture of *Candida utilis* in a medium deprived of a phosphorous source. *Appl Microbiol Biotechnol* 19:267-271
- Di Mascio P, Devasagayam TPA, Kaiser S, Sies H (1990) Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular quenchers. *Biochim Soc Trans* 18:1054-1056
- Evans CT, Scragg AH, Ratledge C (1983) Regulation of citrate efflux from mitochondria of oleaginous and non-oleaginous yeast by adenine nucleotides. *Eur J Biochem* 132:609-615
- Gornall AG, Bardawill CJ, David MM (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177:751-766
- Johnson EA, An G (1991) Astaxanthin from microbial sources. *Crit Rev Biotechnol* 11(4):297-326

- Johnson EA, Schroeder W (1995) Microbial carotenoids. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 53:119-178
- Johnson EA, Schroeder WA (1996) Biotechnology of astaxanthin production in *Phaffia rhodozyma*. In: Takeoka GR, Teranishi R, Williams PJ, Kobayashi A (eds) *Biotechnology for improved foods and flavors*, American Chemical Society, Washington DC, pp 39-50.
- Kakizono T, Kobayashi M, Nagai S (1992) Effect of carbon/nitrogen ratio on the encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *J Ferment Bioeng* 74:403-405
- Larsson C, Stockar UV, Marison I, Gustafsson L (1993) Growth and metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in chemostat cultures under carbon-, nitrogen-, or carbon and nitrogen-limiting conditions. *J Bacteriol* 175:4809-4816
- Manon S, Camougrand N, Guerin M (1989) Inhibition of the phosphate-stimulated cytochrome c oxidase activity by thiophosphate. *Bioenerg Biomembr* 21:387-401
- Meyer PS, du Preez JC, Kilian SG (1993) Selection and evaluation of astaxanthin-overproducing mutant of *Phaffia rhodozyma*. *World J Microbiol Biotechnol* 9:514-520
- Meyer PS, duPreez JC (1994a) Astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice. *World J Microbiol Biotechnol* 10:178-183
- Meyer PS, du Preez JC (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
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426-428
- Nakano T, Tosa M, Takeuchi M (1995) Improvement of biochemical features in fish health by red yeast and synthetic astaxanthin. *J Agric Food Chem* 43:1570-1573



- Schroeder WA, Johnson EA (1995a) Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. *J Ind Microbiol* 14:502-507
- Schroeder WA, Johnson EA (1995b) Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *J Biol Chem* 270:18374-18379
- Sedmak JJ, Weerasinghe K, Jolly SO (1990) Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol Tech* 4:107-112
- Shashi K, Bachhawat AK, Joseph R (1990) ATP:citrate lyase of *Rhodotorula gracilis*: purification and properties. *Biochim Biophys Acta* 1033:23-30
- Sumner JB (1944) A method for the colorimetric determination of phosphorous. *Science* 100:413-414
- Weatherburn MW (1967) Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal Chem* 39:971-973
- Yamane Y, Higashida K, Nakashimada Y, Kakizono T, Nishio N (1997) Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis. *Appl Environ Microbiol* 63:4471-4478
- Yokoyama A, Izumida H, Miki W (1994) Production of astaxanthin and 4-ketozeaxanthin by the marine bacterium, *Agrobacterium aurantiacum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 58:1842-1844

## Figure legends

**Fig. 1.** Effects of varying concentrations of ammonium sulfate on *P. rhodozyma* after 156 hour culturing in a chemically defined media. Symbols (A).- astaxanthin content in cells ( $\blacklozenge$ ), total pigment content in cells ( $\diamond$ ), astaxanthin concentration ( $\square$ ), total pigment concentration ( $\Delta$ ). (B).- dry weight (o),  $Y_{x/s}$  ( $\blacksquare$ ), final pH ( $\times$ ), reducing sugars ( $\square$ ). (C).- protein content in cells ( $\bullet$ ), total protein (+), residual ammonia ( $\times$ ), fatty acids (-). Linear regressions and trend tests were performed for dependent variables using ammonium data points above 18.6 mM. The slope was negative and significant for dry weight, total pigment concentration, astaxanthin concentration and fatty acids with p-values in all cases  $<10^{-4}$ . Astaxanthin content and  $Y_{x/s}$  displayed significant and negative slopes with p-values of  $7 \times 10^{-4}$  and 0.0416, respectively. Total protein and protein content in cells (all data) displayed positive slopes with p-values below  $10^{-4}$ .

**Fig. 2.** Effects of varying concentrations of phosphate on *P. rhodozyma* after 156 hour culturing in a chemically defined media. Symbols (A).- astaxanthin content in cells( $\blacklozenge$ ), total pigment content in cells ( $\diamond$ ), astaxanthin concentration ( $\square$ ), total pigment concentration ( $\Delta$ ). (B).- dry weight (o),  $Y_{x/s}$  ( $\blacksquare$ ), final pH ( $\times$ ), reducing sugars ( $\square$ ). (C).- protein content in cells ( $\bullet$ ), total protein (+), residual phosphate ( $\times$ ), fatty acids (-). Linear regressions and trend tests were performed for dependent variables using phosphate data points above 0.65 mM. The slope was negative and significant for dry weight, astaxanthin content in cells, astaxanthin concentration and fatty acids with p-values in all cases below  $10^{-4}$ .  $Y_{x/s}$  showed a significant and negative slope with a p-value of 0.017. Total protein and protein content in cells showed a positive slope with p-values below  $10^{-4}$ . No significant slope was found for pigment content in cells nor total pigment concentration. However, we found a significant and negative slope for total pigment concentration between 1.3-4.8 mM phosphate (p-value  $<10^{-4}$ ).

**Fig. 3.** Effect of varying concentrations of citrate on *P. rhodozyma* after 156 hour culturing in a chemically defined media. Symbols (A).- astaxanthin content in cells(♦), total pigment content in cells (◇), astaxanthin concentration ( ), total pigment concentration (Δ), astaxanthin/total pigment ratio (×). (B).- dry weight (○), Y<sub>x/s</sub> (■), final pH (×), reducing sugars ( ). (C).- protein content in cells (●), total protein (+). Linear regressions and trend tests were performed for dependent variables (all citrate concentrations). The slope was negative and significant for dry weight, astaxanthin/ total pigment ratio, total protein and protein content in cells with p-values in all cases below  $3 \times 10^{-3}$ . Total pigment concentration and pigment content in cells showed a positive slope with p-values below  $10^{-4}$ . No significant slope was found for astaxanthin concentration nor astaxanthin content in cells.

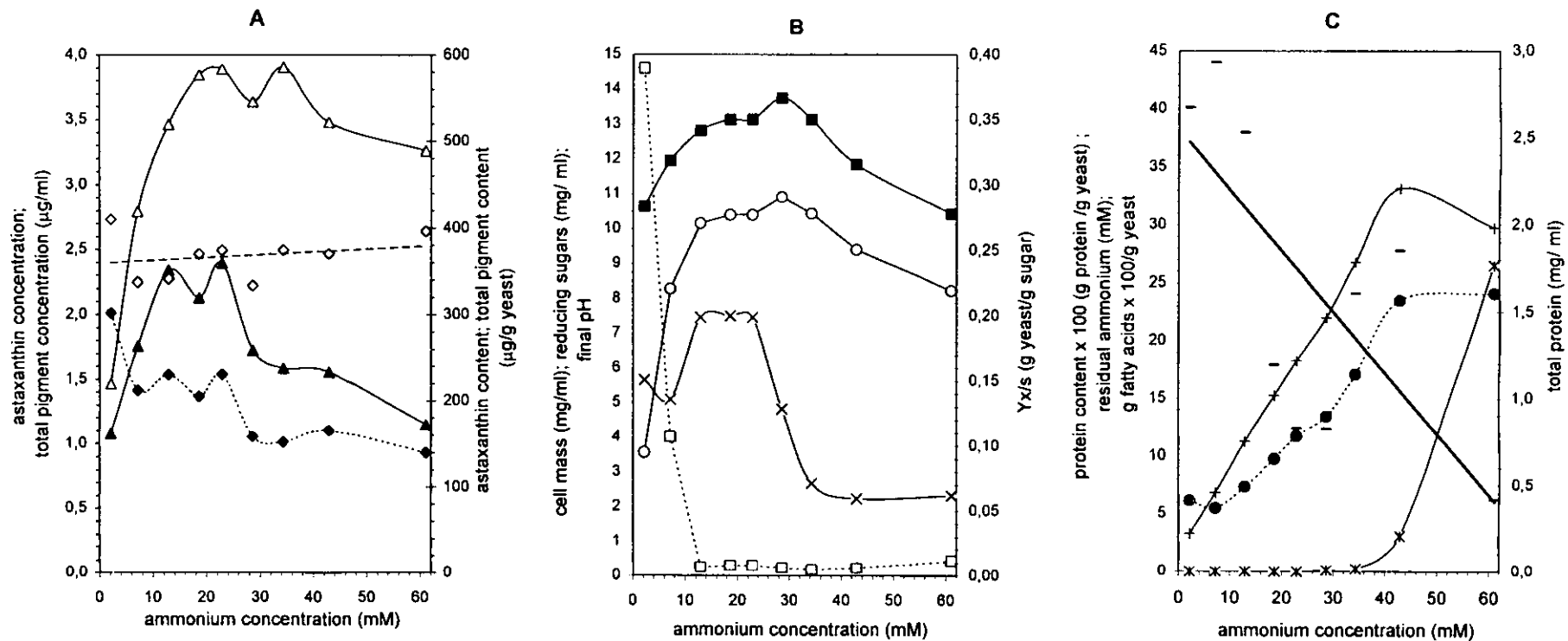


Fig. 1

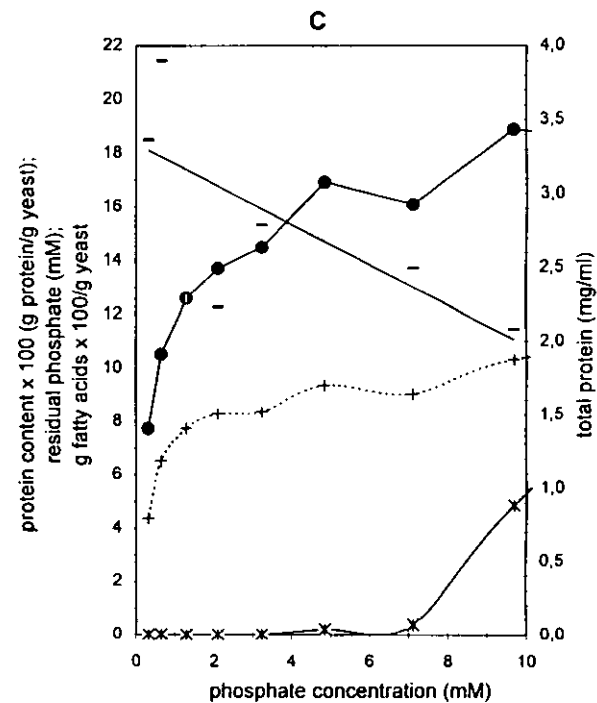
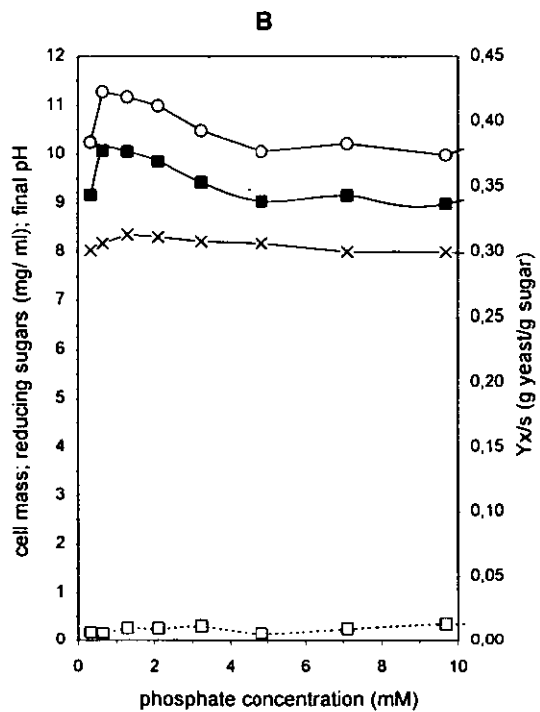
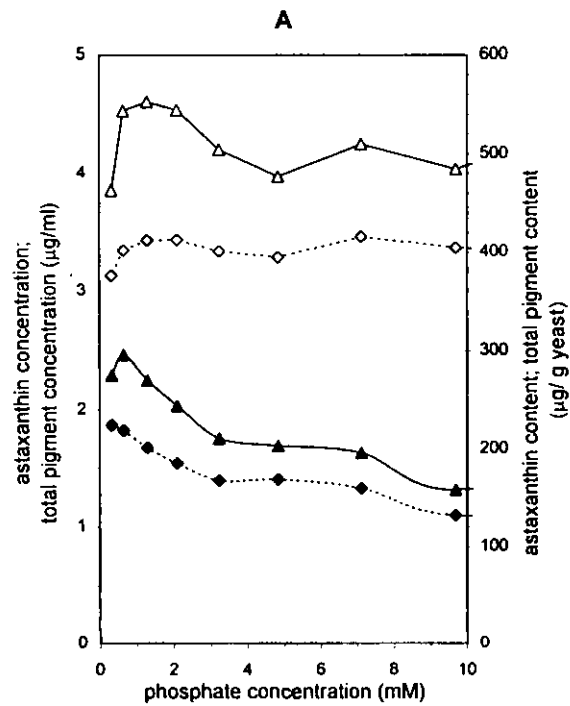


Fig. 2

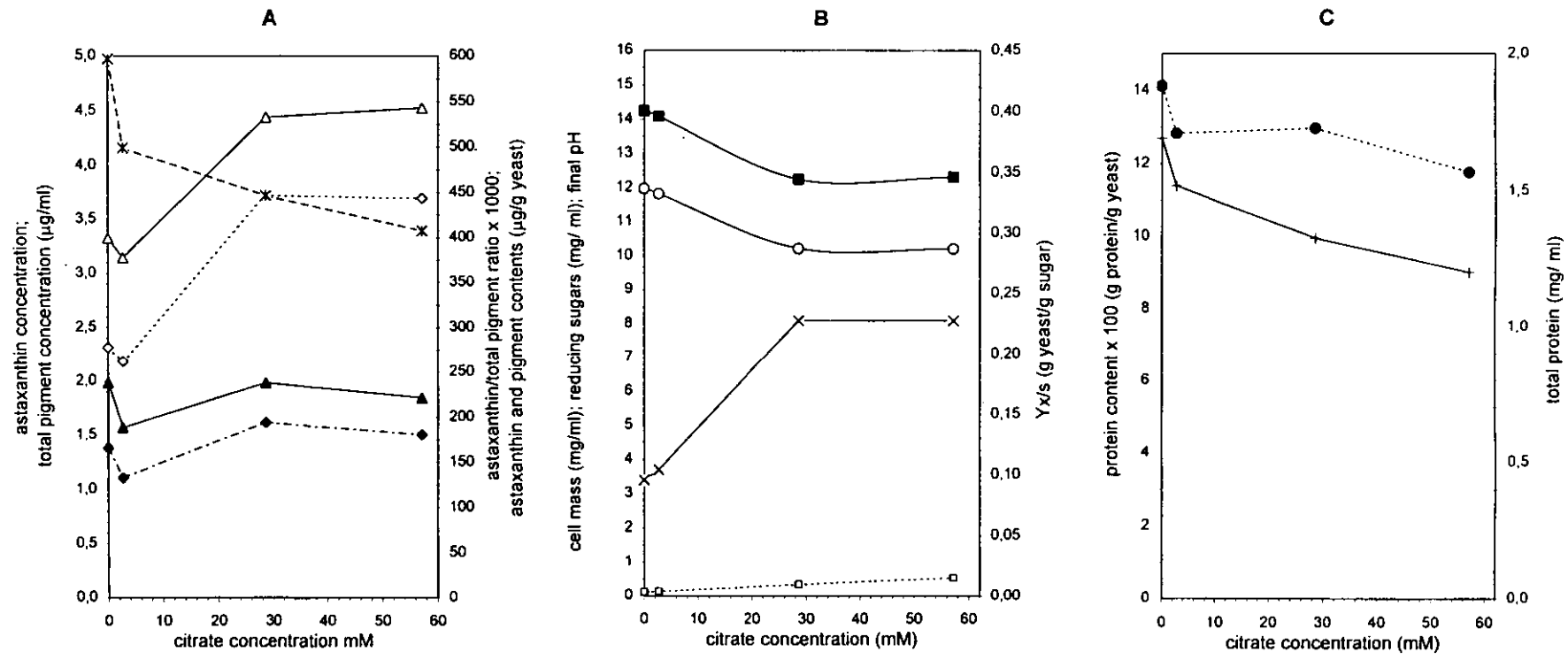


Fig. 3