

UCH-FC
Doc - Microb
M. 385
C. 1



Estudio de proteómica y metabolómica en la levadura
***Xanthophyllomyces dendrorhous* en diferentes fuentes de carbono**

Tesis
Entregada a La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado de
Doctor en Ciencias con Mención en Microbiología

Facultad De Ciencias

Por

Consuelo del Pilar Martínez Moya

Abril, 2014

Director de Tesis Dr:

Víctor Cifuentes Guzmán

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

Consuelo del Pilar Martínez Moya

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 20 de Noviembre de 2013.

Director de Tesis:

Dr. Victor Cifuentes Guzmán

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Romilio Espejo

Dr. Claudio Martínez

Dr. Davor Cotoras



A circular stamp from the Faculty of Sciences Central Library of the University of Chile is located in the upper right quadrant. The stamp contains the text "FACULTAD DE CIENCIAS", "BIBLIOTECA CENTRAL", and "U. DE CHILE". Below the stamp, there are four sets of horizontal dotted lines, each with a handwritten signature in green, blue, and black ink.

A Mario y Vale.

RESUMEN BIOGRÁFICO



Consuelo del Pilar, nace en Bogotá, Colombia, el 27 de Abril de 1974. El año 1999 obtiene el título de Bacteriologo de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Durante el año 2000 realiza el servicio social obligatorio en el Instituto de Inmunología del Hospital San Juan de Dios en Bogotá. El año 2004 recibe el título de Magister en Ciencias c/m en Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia. Durante 6 años trabaja como investigador en Biología Molecular Malaria de FIDIC en Bogotá. El año 2005 recibe una Beca DAAD e ingresa al Doctorado en Ciencias c/m en Microbiología de la Universidad de Chile, participando en congresos, proyectos de investigación y una pasantía en la Universidad de Bielefeld, Alemania, en el Departamento de Proteómica y Metabólica.

Agradecimientos:

Al Profesor Víctor Cifuentes por por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, su valiosa colaboración en la Dirección de esta Tesis.

A los miembros de la comisión, los profesores Romilio Espejo, Claudio Martínez y Davor Cotorás. Por sus valiosas observaciones y aportes para la conclusión de este trabajo.

Al equipo humano del Centro de Biotecnología de la Universidad de Chile, en especial a Dony, Oriana, Salvador, Iris, Marcelo, Yenny, Carla, Gaby, Sole, Rafa y todos los demás por su apoyo incondicional y energía positiva.

Al Profesor Kerstn Niehaus, por su amabilidad y disponibilidad ante mis interrogantes. Por recibirme en su laboratorio y guiarme en la parte experimental.

Al grupo de Laboratorio de Proteómica y Metabólica de la Universidad de Bielefeld, por permitirme trabajar y elaborar gran parte del diseño experimental de mi tesis. Así como permitirme compartir una de las mejores etapas que he tenido en mi vida.

A mis amigos de la Confe, con quienes compartimos muy buenos momentos y establecimos raíces muy profundas. Die, Feli, Cecy, Tefy, Ale, Hugo, Sergio, Nils, Kerstin, Carla, Yare, Ana, Celes, Alvaro, Cata, Vicky.

A mi madre, Johanna, Diana, mi Frede, quienes en la distancia también aportaron para la culminación de este trabajo con amor y apoyo.

A mi amor Mario y mi hermosa Valeria, quienes se convirtieron en el pilar de mis esfuerzos y testigos de este largo proceso.

Al DAAD por otorgarme la beca para mis estudios de doctorado y al Proyecto Fondecyt 11—324, quienes contribuyeron al financiamiento del trabajo.

INDICE DE MATERIAS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Generalidades de los Carotenoides	1
1.2 <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>.....	3
1.3 Síntesis de carotenoides y astaxantina en <i>X. dendrorhous</i>	4
1.4 Regulación de la síntesis de carotenoides en <i>X. dendrorhous</i>	7
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
2.1 Condiciones de cultivo y determinación de la biomasa.....	12
2.2 Determinación de carotenoides	12
2.3 Extracción de proteínas	13
2.3.1 Tampones y soluciones para la extracción de proteínas	14
2.4 Electroforesis en dos dimensiones.....	14
2.5 Análisis de imágenes.....	15
2.6 Espectrometría de masas	18
2.6.1 Tampones y soluciones para la digestión con tripsina	18
2.6.2 Digestión con tripsina.....	18
2.6.3 MS.....	19
2.6.4 Identificación de proteínas por MALDI-TOF	19
2.7 Perfil metabólico.....	20
2.7.1 Preparación de la muestra.....	20
2.7.2 Extracción y derivatización de metabolitos.....	21
2.7.3 GC-MS.....	22
2.7.4 Identificación de metabolitos.....	22
2.7.5 Análisis estadístico y bioinformático	23

3.	RESULTADOS.....	24
3.1	Diseño experimental.....	24
3.2	Establecimiento del proteoma de <i>X. dendrorhous</i> empleando 2DE.....	28
3.3	Construcción del mapa de referencia de proteínas de <i>X. dendrorhous</i>	32
3.4	Análisis del proteoma de <i>X. dendrorhous</i>	33
3.4.1	Evaluación de las proteínas con migración diferenciada y spots múltiples. .	35
3.4.2	Identificación y clasificación de las proteínas.....	39
3.4.3	Comparación relativa de la intensidad de las proteínas identificadas.....	40
3.4.3.1	Proteínas con abundancia diferencial en glucosa.....	40
3.4.3.2	Proteínas con abundancia diferencial en succinato.....	48
3.4.3.3	Proteínas con abundancia diferencial en succinato/glucosa.....	54
3.5	Determinación del perfil de metabolitos de <i>X. dendrorhous</i>	60
3.5.1	Normalización de los datos.....	61
3.5.2	Identificación de los metabolitos.....	63
3.5.3	Diferencias en los niveles de metabolitos en glucosa y succinato.....	65
3.6	Correlación de los resultados obtenidos de proteómica y metabolómica.....	67
3.6.1	Vías de metabolismo de carbohidratos.....	69
3.6.2	Vías de metabolismo de lípidos.....	78
3.6.3	Metabolismo del glutatión.....	79
3.6.4	Vías de metabolismo de aminoácidos.....	80
3.6.5	Vía de síntesis de carotenoides y relacionadas.....	82
4.	DISCUSIÓN.....	85
4.1	Establecimiento de técnicas OMICS en la levadura <i>X. dendrorhous</i>	85
4.2	Influencia de la fuente de carbono en el metabolismo de la levadura y su relación con la carotenogénesis.....	87
4.3	Disponibilidad de sustrato acetil-CoA y su relación con la carotenogénesis.....	94
4.4	Estrés oxidativo y su relación con la síntesis de astaxantina en <i>X. dendrorhous</i> ..	99
4.5	Carotenogénesis y vías comunes en la levadura.....	107
5.	CONCLUSIONES.....	11111
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	113

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Abundancia diferencial de las proteínas de <i>X. dendrorhous</i> en glucosa.....	41
Tabla 2.	Abundancia diferencial de las proteínas de <i>X. dendrorhous</i> en succinato.....	50
Tabla 3.	Abundancia diferencial de las proteínas de <i>X. dendrorhous</i> en succinato/glucosa.....	55
Tabla 4.	Concentración diferencial de los metabolitos de <i>X. dendrorhous</i> en succinato/glucosa.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Biosíntesis de carotenoides en <i>X. dendrorhous</i>	5
Figura 2.	Parámetros para el análisis de imágenes de los geles 2DE.....	16
Figura 3.	Diagrama de flujo del diseño experimental.....	24
Figura 4.	Crecimiento y producción de carotenoides en <i>X. dendrorhous</i>	26
Figura 5.	Distribución porcentual de los carotenoides producidos por <i>X. dendrorhous</i>	27
Figura 6.	Extractos de proteínas totales de <i>X. dendrorhous</i> empleando diversos métodos de disrupción celular.....	29
Figura 7.	SDS-PAGE de proteínas de <i>X. dendrorhous</i> obtenidas con diferentes tampones de lisis.....	30
Figura 8.	SDS-PAGE de proteínas de <i>X. dendrorhous</i> obtenidas con diferentes tratamientos de precipitación.....	31
Figura 9.	Información de las proteínas en el mapa de referencia de <i>X. dendrorhous</i>	33
Figura 10.	Gel 2D de referencia de <i>X. dendrorhous</i>	34
Figura 11.	Intensidades relativas de proteínas en spots múltiples de <i>X. dendrorhous</i>	38
Figura 12.	Clasificación de las proteínas identificadas.....	39
Figura 13.	Magnitud de cambio en la abundancia de las proteínas en glucosa.....	45

Figura 14.	Magnitud de cambio en la abundancia de las proteínas en succinato.....	53
Figura 15.	Magnitud de cambio en la abundancia de las proteínas en succinato/glucosa.....	58
Figura 16.	Transformación de los datos del perfil metabólico.....	62
Figura 17.	Perfil de metabolitos de <i>X. dendrorhous</i>	64
Figura 18.	Convenciones empleadas en el análisis de correlación.....	68
Figura 19.	Metabolismo de azúcares.....	70
Figura 20.	Glicólisis y gluconeogénesis.....	72
Figura 21.	Vía Pentosa Fosfato.....	73
Figura 22.	Metabolismo de Piruvato.....	74
Figura 23.	TCA y glioxilato.....	76
Figura 24.	Fosforilación oxidativa.....	77
Figura 25.	Metabolismo de lípidos.....	79
Figura 26.	Metabolismo del glutatión.....	80
Figura 27.	Metabolismo de los aminoácidos.....	81
Figura 28.	Enzimas de carotenogénesis y vías afines identificadas.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS

2DE	Electroforesis bidimensional
ADN/ARN	Ácido desoxirribonucleico/ Ácido ribonucleico
APS	Persulfato de amonio
ATC	Ácido tricloroacético
ATCC	American Type Culture Collection (Colección Americana cultivos tipo)
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio] propanosulfonato
Da/KDa	Dalton/KiloDalton
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
g/ μ g	Gramo/ Microgramo
g	Gravedades
GC-MS	Cromatografía de gases-Espectrometría de masas
HCCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinamínico
h/min/s	Horas/minuto/segundo
IEF	Isoelectric focusing (Isoelectroenfoque)
IPG	Immobilized pH gradient (Gradiente de pH inmovilizado)
LC	Liquid chromatography (Cromatografía líquida)
L/ μ l	Litro/ Microlitro
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization- Time of Flight (Ionization/desorpción por láser asistida por matriz-Tiempo de vuelo)
MASCOT	Multiple-Access Space-Time Coding Testbed
MM	Medio mínimo

MOWSE	Molecular Weight Search
Mr/pI	Masa molecular/ Punto Isoeléctrico
mRNA	mensajero del ácido ribonucleico
MS	(Mass spectrometry) Espectrometría de masas
m/z	Masa/carga
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCBI	National center for biotechnology information
nm	Nanómetro
ORF	Open Reading frame (Marco abiertos de lectura)
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
Pb	Pares de bases
PMF	Peptide mass fingerprinting (Huella peptídica)
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)
SDS	Dodecilsulfato de sodio
RP-HPLC	Reverse Phase (Fase reversa)-High performance liquid chromatography (Cromatografía líquida de alta presión)
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
TEMED	N,N,N',N'tetrametiletilen-diamina
TFA	Trifluoroacetic acid (Ácido trifluoroacético)
Tris	N-tris-(hydroxymetil)-amino metano
V/W	voltio/vatio
v/v	Volumen a volumen

RESUMEN

En este trabajo se realizó un análisis detallado del proteoma y perfil metabólico de *X. dendrorhous* durante su crecimiento en glucosa o succinato como fuente de carbono. Inicialmente se estableció un protocolo optimizado para la obtención de las proteínas y metabolitos. Para la identificación de estos extractos se emplearon las técnicas de MALDI-TOF y GC-MS, respectivamente. Se construyó un mapa 2DE del proteoma de la levadura. Luego se determinó la abundancia diferencial de las proteínas y metabolitos durante el crecimiento en las dos fuentes de carbono y se correlacionaron los resultados en las vías centrales del metabolismo de la levadura.

Se identificaron 329 proteínas, gran parte de ellas relacionadas con la carotenogénesis, metabolismo de lípidos, carbohidratos, redox y respuesta a estrés. En el perfil metabólico se identificaron 109 metabolitos principalmente relacionados con la glicólisis, ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), aminoácidos y azúcares fosfato.

Los resultados obtenidos permitieron correlacionar la carotenogénesis con la fuente de carbono y su influencia en el metabolismo central. Nuestros hallazgos indican que enzimas del metabolismo de carbohidratos, lípidos, redox, carotenogénesis y de respuesta a estrés presentan regulación a través de la modulación de su abundancia.

Adicionalmente, nuestros resultados sugieren una posible asociación entre el estrés oxidativo con la carotenogénesis en la levadura. Muestra de esta asociación se observó en la abundancia diferencial de algunas proteínas de respuesta a estrés y redox

previamente identificadas como marcadoras de estrés, la acumulación del carbohidrato trehalosa, la abundancia de metabolitos de la vía pentosa fosfato (PP) y la ausencia de las principales enzimas de respuesta a ROS.

Las enzimas citocromo P450, monooxigenasa, HSPs, fosfoglucomutasa y GAPDH se identificaron como el core de proteínas relacionadas con la inducción de la carotenogénesis, dado que presentan regulación positiva en las dos fuentes de carbono y promueven el ambiente de oxidoreducción necesario para la síntesis de astaxantina.

Observamos que el succinato como fuente de carbono parece asegurar mayor disponibilidad de acetyl-CoA para la producción de astaxantina. Esto ocurre a través de la activación de vías metabólicas alternas para su generación. Adicionalmente, la presencia de regulación positiva de algunas proteínas de respuesta a estrés y del metabolismo de carbohidratos aumentaría el flujo metabólico celular. Este último podría incrementar la tasa respiratoria celular generando especies reactivas de oxígeno (ROS), los que pueden inducir la síntesis carotenoides y/o pueden tener un papel regulador sobre las enzimas de la ruta de biosíntesis de astaxantina.

SUMMARY

In this work a comprehensive proteome and metabolic profile analysis of *X. dendrorhous* during growth on glucose or succinate as carbon source were performed. Initially a protocol to obtain the protein extract and the metabolites was optimized. To extracts identification MALDI-TOF and GC-MS were employed. 2DE map was constructed with the yeast proteome. Then were compared the protein and metabolite differential abundance during growth in both carbon sources. Finally the results were correlated in the central pathways of the yeast metabolism.

329 proteins were identified, most of them related to carotenogenesis, lipids, carbohydrates metabolism, redox and stress response. In the metabolic profile 109 metabolites were identified related primarily with glycolysis, TCA, amino acids and sugar phosphate.

The results allowed correlate carotenogenesis with the carbon source and its influence on central metabolism. The main findings showed evidence of regulation by abundance modulation of some enzymes of carbohydrate, lipid and redox stress response.

Additionally, our results suggest the association between oxidative stress and carotenogenesis in the yeast. This association was showed by the differential abundance of certain redox proteins and stress response previously identified as stress marker, the trehalose carbohydrate accumulation, metabolite abundance in PP pathway and the absence of the key enzymes to ROS response.

The cytochrome P450, monooxygenase, HSPs, phosphoglucomutase and GAPDH enzyme were identified as the yeast protein-core associated with the carotenogenesis induction, since upregulation present in both carbon sources and promote redox environment for astaxanthin synthesis.

We observed that the succinate as carbon source ensures major availability of acetyl-CoA to astaxanthin production. This occurs through activation of the alternative metabolic pathways as glyoxylate. Additionally, positive regulation of stress proteins, lipids, carbohydrates that provide a higher metabolic flux that could increase cellular respiration rate with the ROS production, which could induce carotenogenesis and/or regulate the carotenogenic enzymes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de los Carotenoides

Los carotenoides, pigmentos naturales con amplia distribución en la naturaleza, son sintetizados por organismos fotosintéticos y no fotosintéticos, tanto procariontes como eucariontes (Britton, 1998). Aunque se han descrito más de 600 compuestos diferentes, todos presentan características químicas comunes: una estructura lineal poli-isoprenoide simétrica, con una larga cadena alifática con dobles enlaces conjugados. Los carotenoides son tetraterpenos (40 carbonos) formados por 8 unidades isoprenoides de 5 carbonos unidos de tal manera que el orden se revierte en el centro. Son clasificados como carotenos (aquellas moléculas que carecen de O₂) y xantofilas (que poseen 1 o más moléculas de O₂). Los grupos oxigenados pueden ser hidroxilos, ceto y epoxi, entre otros. La presencia de dobles enlaces conjugados les confiere la capacidad de absorber la luz entre los 400 y 500 nm, generando los colores amarillo, rojo y naranja. Además, pueden formar esteroisómeros *cis* y *trans*, por lo tanto se pueden reorganizar molecularmente formando variados derivados (Britton, 1998).

Se han descrito varias funciones para los carotenoides, entre ellas su rol fundamental en la polinización gracias a la coloración que confieren a flores y frutos. En organismos fotosintéticos colaboran con la captación de luz mediada por la clorofila, y tienen la capacidad de disipar formas tóxicas del oxígeno como el singlete o singulete

($^1\text{O}_2$). También tienen la capacidad de eliminar las especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales producen daño oxidativo en el DNA y proteínas (Yuan y col., 2011). Debido a su estructura y naturaleza hidrofóbica los carotenoides tienen un profundo efecto en la fluidez, permeabilidad y protección contra estrés oxidativo en las membranas celulares. Adicionalmente, pueden ser precursores de otros metabolitos como vitamina A y ácido retinoico (Britton, 1998).

La astaxantina (3, 3'-dihidroxi- β , β -caroteno-4, 4'-diona) es un carotenoide del grupo de las xantófilas de interés biotecnológico ya que se emplea como suplemento en la alimentación de salmónidos criados en cautiverio (Schmidt y col., 2011) y además presenta propiedades antioxidantes (Yuan y col., 2011). Este pigmento se produce comercialmente a través de síntesis química (Schmidt y col., 2011). Las dos principales fuentes naturales de astaxantina son el alga *Haematococcus pluvialis* (Lorenz y Cysewski, 2000) y la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Andrewes y col., 1976). Se ha determinado que la productividad de astaxantina ($\mu\text{g} / \text{g}$ de biomasa) es mayor en *H. pluvialis* comparada con *X. dendrorhous* (Domínguez-Bocanegra y col., 2007). Sin embargo, *H. pluvialis* requiere exigentes condiciones de cultivo, crece más lento y se contamina fácilmente. Por estas razones, *X. dendrorhous* es un candidato ideal para la producción industrial de astaxantina a partir de una fuente natural.

1.2 *Xanthophyllomyces dendrorhous*

X. dendrorhous es una levadura basidiomicete que se aisló inicialmente de exudados de árboles de regiones montañosas del hemisferio norte (Andrewes y col., 1976). En la actualidad se ha identificado en la Patagonia Argentina (Libkind y col., 2008) y en el sur de Chile (Weber y col., 2008). Esta levadura es capaz de fermentar la glucosa con producción de etanol (Andrewes y col., 1976); produce compuestos que absorben los rayos UV conocidos como micosporinas (Libkind y col., 2011) y sintetiza astaxantina como su principal carotenoide, el cual cumpliría un rol de protección contra estrés oxidativo (Schroeder y Johnson, 1995). Reforzando esta última función, la levadura carece o presenta baja actividad de algunos de los mecanismos de defensa frente a estrés oxidativo presentes en otros organismos como las enzimas superóxido dismutasa Fe-SOD, Cu/Zn-SOD y el sistema glutatión peroxidasa (Schroeder y Johnson, 1993).

El uso de *X. dendrorhous* como fuente natural para la producción de astaxantina ha sido explorado hace varias décadas. Las estrategias empleadas para optimizar su producción se basan en la selección de mutantes sobreproductoras (An y col., 1989; Lodato y col., 2004; Liu y col., 2008), optimización de las metodologías de fermentación (de la Fuente y col., 2010), uso de estimulantes químicos (Calo y col., 1995; Gu y col., 1997), ingeniería genética y metabólica (Verdoes y col., 2003; Niklitschek y col., 2008; Schmidt y col., 2011) y producción de astaxantina en cultivos mixtos con *H. pluvialis* (Dong y col., 2006; Rodríguez-Saiz y col., 2010).

Si bien los trabajos mencionados han aportado información en cuanto a la fisiología de la levadura, la aplicación de técnicas tradicionales para el mejoramiento de las cepas

silvestres de *X. dendrorhous* no ha conducido a resultados escalables a nivel comercial. Por ejemplo, la mutación al azar ha generado inestabilidad genética, falta de reproducibilidad en fermentaciones industriales y una menor producción de biomasa de las cepas sobreproductoras (Johnson y Schroeder, 1995). Sin embargo, el aislamiento de los genes que codifican las enzimas de la carotenogénesis ha permitido una nueva aproximación al problema a través de la ingeniería genética (Schmidt y col., 2011).

1.3 Síntesis de carotenoides y astaxantina en *X. dendrorhous*

En la levadura la síntesis de carotenoides se inicia con la vía del mevalonato, donde 3 moléculas del precursor acetil-CoA se condensan para formar la hidroximetilglutaril Coenzima A (HMG-CoA) por la acción de la enzima HMG-CoA sintasa. Luego en una reacción irreversible que requiere NADPH, la enzima HMG-CoA reductasa cataliza la formación del mevalonato, el cual da lugar a la formación del metabolito precursor de todos los isoprenoides, el isopentenil pirofosfato (IPP) (Visser y col., 2003) (Figura 1). La formación de IPP requiere la presencia de ATP, Mg^{+2} y la acción de 3 enzimas que actúan secuencialmente: la mevalonato quinasa, la fosfomevalonato quinasa y la fosfomevalonato decarboxilasa. Una vez generado el IPP es isomerizado a dimetilalil pirofosfato (DMAPP), paso reversible catalizado por la enzima IPP isomerasa, codificada por el gen *idi* (Visser y col., 2003) (Figura 1).

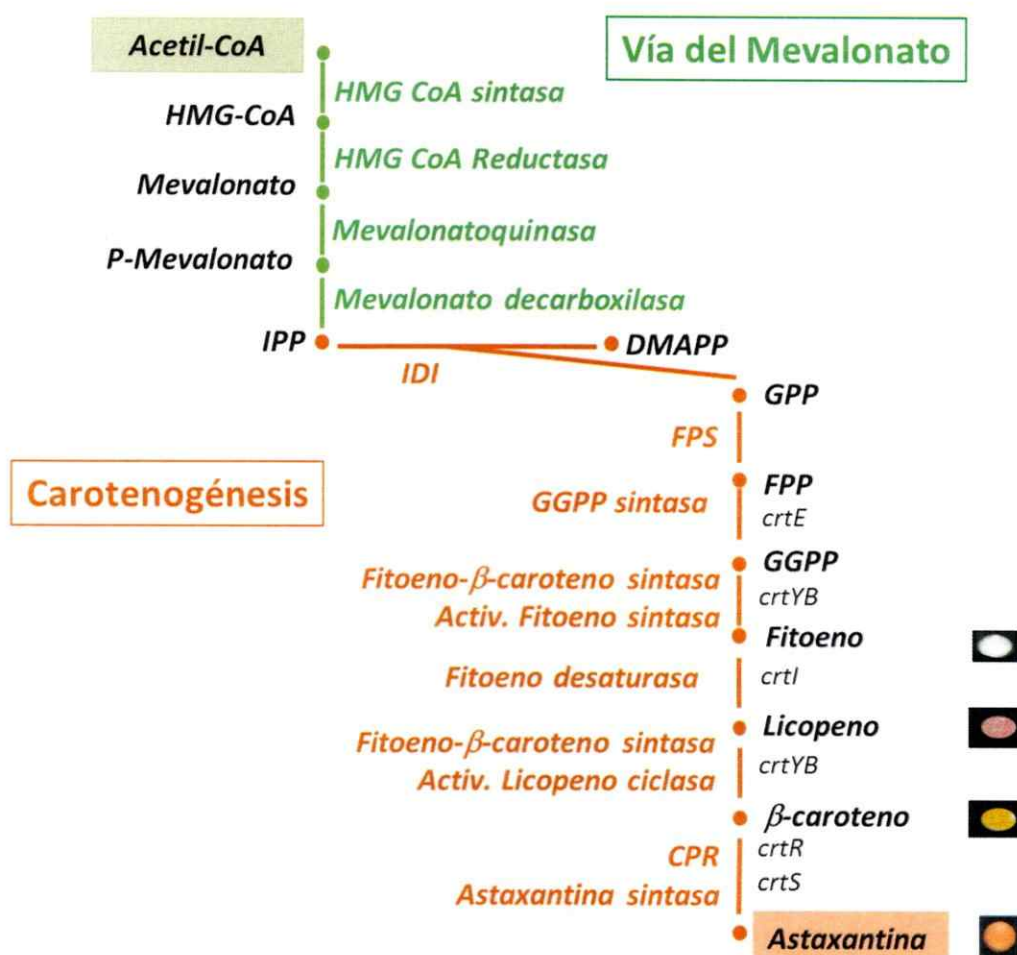


Figura 1. Biosíntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*. HMG-CoA, Hidroximetilglutaril Coenzima A. P- Mevalonato, fosfomevalonato. IPP, isopentenil-pirofosfato. IDI, isopentenil difosfato isomerasa. DMAPP, dimetil-alil pirofosfato. GPP, geranil-pirofosfato. FPP, farnesil pirofosfato. GGPP, geranilgeranil-pirofosfato. FPS, farnesil pirofosfato sintasa. CPR, citocromo P450 reductasa. Las enzimas de la ruta del mevalonato y carotenogénesis se presentan en color verde y naranja respectivamente. Los intermediarios y carotenoides están señalados en negro. En minúscula e itálica se indica el nombre del gen correspondiente.

Posteriormente, la elongación a través de sucesivas reacciones de condensación cabeza-cola es catalizada por enzimas farniltransferasas con diferente especificidad para generar los precursores de carotenoides (Ogura y Koyama, 1998). Así, farnesil pirofosfato FPP (C15) y geranilgeranil pirofosfato GGPP (C20) son precursores intermediarios de carotenoides de C30 y C40 respectivamente. La síntesis del GGPP es

catalizado por la enzima GGPP sintasa (gen *crtE*). Luego procede la primera etapa específica de la síntesis de carotenoides, en donde dos moléculas de GGPP se condensan para formar fitoeno (sin color), este paso está catalizado por la actividad fitoeno sintasa de la enzima bifuncional fitoeno β -caroteno sintasa (gen *crtYB*). Esta enzima posee dos dominios, uno con actividad fitoeno sintasa ubicado en la región carboxilo terminal y un dominio licopeno ciclasa ubicado en la región amino terminal (Verdoes y col., 2003).

Luego el fitoeno sufre cuatro reacciones de desaturación, paso catalizado por la enzima fitoeno desaturasa (producto del gen *crtI*) (Verdoes y col., 2003), que lleva a la formación del licopeno. El β -caroteno es generado por la ciclación de ambos extremos del licopeno, proceso mediado por la enzima bifuncional, con su actividad licopeno ciclasa (gen *crtYB*). Finalmente, el β -caroteno sufre 2 hidroxilaciones en las posiciones 3 y 3' y se agregan 2 grupos ceto en las posiciones 4 y 4' produciendo astaxantina. Como consecuencia, se forman 3 intermediarios: equinenona, 3-hidroxi equinenona y fenicoxantina. Las reacciones de la etapa final son catalizadas por la enzima astaxantina sintasa (tipo citocromo P450 monooxigenasa), codificada por el gen *crtS* (Ojima y col., 2006). En nuestro laboratorio se ha identificado una enzima citocromo P450 reductasa (gen *crtR*) que tiene un papel auxiliar a la astaxantina sintasa, donando los electrones necesarios para la oxigenación del sustrato (Alcaino y col., 2008) (Figura 1).

1.4 Regulación de la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*

La carotenogénesis es un proceso complejo que presenta varios niveles de regulación. En plantas, se ha descrito regulación a nivel transcripcional, donde se observa una expresión diferencial de los genes, de acuerdo a su localización y estado de desarrollo en los diferentes tejidos (Hirschberg, 1998). En el alga *H. pluvialis*, la síntesis de astaxantina se induce bajo condiciones de estrés (exceso de iluminación, estrés salino y deficiencia de nitrógeno) que generan un cambio morfológico y un aumento del nivel del mRNA y proteínas de carotenogénesis (Vidhyavathi y col., 2008; Gao y col., 2012). En los hongos se ha descrito la fotoregulación como un factor que aumenta el nivel de expresión de los genes de carotenogénesis (Almeida y Cerdá-Olmedo, 2008).

En *X. dendrorhous* se ha determinado la existencia de diversos mecanismos que regulan la síntesis de carotenoides, tales como; fuente de carbono, regulación por producto final, niveles de oxígeno e intensidad de la luz (Verdoes y col., 2003; de la Fuente y col., 2010). Además, se ha reportado que la producción de astaxantina tanto en *H. pluvialis* como en *X. dendrorhous* es potenciada por la presencia de ROS en la célula. Ello sugiere un rol de protección frente al daño oxidativo (Schroeder y Johnson, 1995). Así, el singulete de oxígeno (1O_2) aumentaría la producción de pigmentos y el H_2O_2 aumentaría la síntesis de astaxantina (Schroeder y Johnson, 1995).

Por otra parte, nuestro grupo observó que en *X. dendrorhous* los niveles de mRNA de los genes de carotenogénesis alcanzan su máxima expresión al finalizar la fase exponencial de crecimiento, coincidiendo con el agotamiento de glucosa (Lodato y

col., 2004). Al estudiar la expresión de los genes *idi*, *crtE*, *crtYB* y *crtI* no se encontró una relación lineal entre los niveles de transcritos carotenogénicos y las síntesis de carotenoides (Lodato y col., 2007). Además se encontró evidencia que sugiere una posible regulación de la expresión de los genes *crtI* y *crtYB* a través de procesamiento alternativo (Lodato y col., 2004). En cuanto a las enzimas carotenogénicas, se ha observado que un aumento de las enzimas CRTE y CRTI puede afectar el perfil de los carotenoides sintetizados aumentando los carotenoides monocíclicos (Visser y col., 2003).

En la levadura, se ha descrito a nivel fisiológico que durante el metabolismo fermentativo la tasa de producción de astaxantina disminuye y durante el metabolismo aerobio aumenta (Yamane y col., 1997). Asimismo, frente a un exceso de glucosa se disminuye la producción de carotenoides (Johnson y Schroeder, 1995). Se conoce además, que la levadura presenta el efecto Crabtree (Walker, 1998) y por tanto se ha observado que fermenta glucosa produciendo etanol, el cual se oxida a acetaldehído que finalmente es convertido en acetil-CoA precursor de la vía del mevalonato (Flores y col., 2000). Este último antecedente se evaluó con la adición de etanol al medio de cultivo, observándose un aumento de la síntesis de carotenoides. Dicho incremento ha sido asociado a la inducción de la enzima hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa y posiblemente a la activación del metabolismo oxidativo (Gu y col., 1997; Marcoleta y col., 2011). Por lo tanto, la síntesis de carotenoides en medio con glucosa se induciría cuando ésta se agota en el medio y se empieza a consumir el etanol producido

previamente (Lodato y col., 2007), generando así los precursores de la vía del mevalonato.

Por otra parte, se ha descrito que *X. dendrorhous* puede utilizar compuestos no fermentables como fuente de carbono. Por ejemplo con succinato, se observa una mayor producción de carotenoides totales respecto al medio con glucosa (Wozniak y col., 2011). Este compuesto es incorporado en la vía de los ácidos tricarbóxicos (TCA), donde puede servir de sustrato para formar piruvato, el cual permite posteriormente la formación de acetil-CoA. Previamente observamos que cuando se agrega succinato al medio de cultivo, la producción de carotenoides inicia en las primeras horas de crecimiento y esta se prolonga hasta fase estacionaria. Lo que indica que en succinato la mayor cantidad de carotenoides se produce durante las primeras horas de la fase exponencial de crecimiento (Wozniak y col., 2011). Adicionalmente, con esta fuente de carbono no se observó correlación entre la expresión de los genes de carotenogénesis y la actividad enzimática. Esto debido a la inducción temprana de la síntesis de astaxantina en presencia de bajos niveles de los transcritos de los genes carotenogénicos. Con lo anterior se sugiere que además de la regulación transcripcional, probablemente deben existir mecanismos adicionales de regulación de las enzimas específicas de la carotenogénesis (Wozniak y col., 2011).

Con los antecedentes anteriores es posible identificar en *X. dendrorhous* varios niveles de regulación para la síntesis de carotenoides. En primer lugar, durante las etapas tempranas del ciclo de crecimiento se presentaría regulación a nivel transcripcional de

los genes que codifican a las enzimas carotenogénicas, en respuesta a las condiciones metabólicas como presencia de oxígeno, ROS y la naturaleza de la fuente de carbono. En segundo lugar, posiblemente actuarían mecanismos de regulación postranscripcional como el procesamiento alternativo. En tercer lugar, se presentarían mecanismos de regulación postraduccional como control de la actividad, degradación y modificación enzimática entre otras. Es importante resaltar que respecto a este último nivel de regulación no se conoce información acerca de la abundancia de las proteínas relacionadas directa o indirectamente con la carotenogénesis en *X. dendrorhous*.

Antecedentes de estudios de proteómica en diversos microorganismos bajo condiciones de estrés muestran que además del aumento en la abundancia de las proteínas relacionadas con procesos de oxidoreducción y respuesta a estrés, también son abundantes algunas proteínas del metabolismo de carbohidratos, señalización y transporte celular (Kolkman y col., 2005; Weeks y col., 2006; Kusch y col., 2008; Braconi y col., 2009; Yin y col., 2009). En el alga *H. pluvialis*, se observó que además de aumentar las proteínas de respuesta a estrés, algunas enzimas carotenogénicas presentan mayor abundancia durante o al final de la inducción de estrés (Wang y col., 2004). Por ejemplo la enzima IDI y fitoeno desaturasa se regulan positivamente 24 horas después de la inducción de estrés y luego regresan a su nivel basal (Wang y col., 2004). En general se postula que las enzimas de carotenogénesis presentan baja tasa de recambio (Wang y col., 2004), es probable que este comportamiento se presente en *X. dendrorhous*, acompañado de una abundancia diferencial de proteínas y metabolitos dependiente de las condiciones de crecimiento.

Hipótesis

El crecimiento de la levadura *X. dendrorhous* en un medio suplementado con succinato, genera un aumento en los niveles de las proteínas del metabolismo de carbohidratos y oxidoreducción, que va acompañado de una expresión temprana de los genes que codifican las proteínas de la carotenogénesis produciendo un mayor contenido celular de carotenoides en relación a la producción en un medio suplementado con glucosa.

Objetivo General

Establecer el perfil proteico y metabólico de *X. dendrorhous* durante el crecimiento en medio suplementado con succinato o glucosa como fuente de carbono.

Objetivos Específicos

1. Establecer el mapa de referencia de las proteínas solubles de *X. dendrorhous* empleando 2DE y MALDI-TOF.
2. Determinar la abundancia de las proteínas durante el crecimiento de *X. dendrorhous* en medio mínimo glucosa y succinato.
3. Determinar el perfil de metabolitos durante el crecimiento de *X. dendrorhous* en medio mínimo glucosa y succinato.
4. Integrar los datos de proteómica y metabolómica y determinar su relación con la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Condiciones de cultivo y determinación de la biomasa

La cepa silvestre de *X. dendrorhous* UCD 67-385 se cultivó en medio mínimo (MM) (Retamales y col., 2002) suplementado con 2 % de glucosa o succinato como fuente de carbono. En cada condición, un precultivo de 10 ml fue crecido hasta fase exponencial a 22 °C y agitación constante de 120 rpm. Para el cultivo principal, 250 ml de medio fueron inoculados con 2,5 ml del precultivo y cultivados a 22 °C y 120 rpm. En el análisis de datos, triplicados de los cultivos durante la fase de crecimiento lag, exponencial inicial, exponencial final y estacionaria fueron recolectados. Las muestras se centrifugaron a 5000 x g durante 10 min a 4 °C. El concentrado de células se lavó dos veces y luego se almacenó a -80 °C. Finalmente la densidad celular se determinó con la medición de la densidad óptica (560 nm) y el peso seco.

2.2 Determinación de carotenoides

Se empleó el método de An (An y col., 1989) modificado. En breve, se agregó 1 ml de acetona (Merck) al pellet celular, más un volumen de perlas de vidrio (500 µm). La ruptura celular se realizó por agitación en vórtex a máxima velocidad durante 10 min. Luego se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min a 4 °C. Después se extrajeron los pigmentos con éter de petróleo y se determinó la absorbancia del extracto a 465 nm.

Para la cuantificación del contenido celular de carotenoides (μg de carotenoides / g de peso seco) se utilizó el coeficiente de extinción $1\% = 2100$ (An y col., 1989).

Los extractos obtenidos fueron separados por HPLC utilizando una columna RP-18 Lichrocart 125-4 de 15 cm (Merck). La fase móvil fue acetonitrilo: metanol: isopropanol (85: 10: 5, v/v) en condiciones isocráticas. Los espectros de cada pico fueron recuperados utilizando un detector con arreglo de diodos. La identificación de los carotenoides se realizó en base a sus espectros de absorción, tiempos de retención y a su comparación con estándares específicos.

2.3 Extracción de proteínas

El protocolo empleado fue estandarizado para el enriquecimiento del extracto con proteínas de membrana (Martínez-Moya y col., 2011). En resumen, las muestras liofilizadas se trataron con un tampón de lisis y perlas de vidrio ($500\ \mu\text{m}$). Se realizaron 5 ciclos de disrupción durante 30 s empleando un RiboLyzer (Hybaid-AGS, Alemania), entre cada ciclo las muestras fueron incubadas durante 1 min a $4\ ^\circ\text{C}$. Luego se realizó un proceso de centrifugación a $4\ ^\circ\text{C}$ durante 20 min a 10.000 rpm. Posteriormente se incubaron las muestras 1 hora a $4\ ^\circ\text{C}$ en una solución de DNAsa y RNAsa al 10 % v/v.

A la muestra se le adicionaron $600\ \mu\text{l}$ fenol saturado en agua y se incubó 30 min en agitación. Luego se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min. Se tomó la fase de fenol y se adicionaron $20\ \mu\text{l}$ de ditioneitol (DTT) 1M y $30\ \mu\text{l}$ de acetato de amonio 8M. Se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras fueron precipitadas



toda la noche con 2 ml metanol a una temperatura de -20°C , posteriormente se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 min a 4°C . Luego se realizaron dos lavados con etanol al 70 % y el pellet obtenido se resuspendió en el tampón de isoelectroenfoque.

Los extractos de proteína fueron cuantificados por el método de Bradford (Bio-Rad) empleando una curva de calibración con albúmina bovina. Adicionalmente, para determinar su integridad las muestras de proteínas fueron analizadas en geles de SDS-PAGE al 10 % y teñidas con azul de Coomassie.

2.3.1 Tampones y soluciones para la extracción de proteínas

Tampón de lisis	Bicarbonato de sodio	100 mM
	Tritón X100	0.5%
	PMSF	1 mM
	Inhibidores de proteasa (Sigma):	1%
	(AEBSF 2 mM, Aprotinina 0,3 μM , Bestatina 130 μM , EDTA 1 mM, E-64 μM , Leupeptina 1 μM)	
Solución DNAsa-RNAsa	Tris 0,5 M pH 7.0	500 μl
	MgCl_2	50 μl
	RNAsa A 100 $\mu\text{g/ml}$	250 μl
	DNAsa I	5 μl

2.4 Electroforesis en dos dimensiones

Para la primera dimensión se realizó isoelectroenfoque (IEF) en gradientes inmovilizados de acrilamida y la segunda dimensión en geles SDS-PAGE al 10% (Martínez-Moya y col., 2011).

En breve, para el IEF se cargaron 500 µg de proteína en 340 µl de tampón de rehidratación (urea 8M, tiourea 2M, CHAPS 2 %, anfolitos pH 3-10 al 2%, DTT 1 % y trazas de azul de bromofenol) en las tiras de acrilamida de pH 3-10 NL de 17 cm (Immobiline DryStrip, Amersham). El EIF se realizó en una cámara IPGphor™ (Amersham) empleando el siguiente programa: 10 h a 20 ° C, 12 h a 30 V, 1 h a 500 V, 8 h a 1000 V y 10 h a 8000 V.

Posteriormente, las tiras se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente en tampón 1 (Tris-HCl 50 mM pH 8.8, urea 6M, glicerol 20 % v/v, SDS 2% w/v, azul de bromofenol 0,01 %, DTT 2 %) para la reducción de la muestra y luego fueron incubadas en tampón 2 (Tris-HCl 50 mM pH 8.8, urea 6M, glicerol 20 % v/v, SDS 2% w/v, azul de bromofenol 0,01 %, iodoacetamida 2,5 %) para la alquilación. Las tiras fueron cargadas en un gel SDS-PAGE al 10 % y la electroforesis se realizó en una cámara BioRad con 30 mA por gel hasta que el frente azul de bromofenol alcanzó la parte inferior del gel.

Después de la electroforesis los geles fueron mantenidos en solución de fijación (metanol 20 ml, ácido fosfórico 1 ml, H₂O destilada 79 ml) durante 2 h, luego fueron teñidos con azul de Coomassie (H₂O destilada 60 ml, metanol 20 ml, Roti-Blue 20 ml) durante 3 h y finalmente desteñidos en solución de metanol al 20 % o agua destilada.

2.5 Análisis de imágenes

Las imágenes de los geles escaneados en formato .tif fueron importadas en el software PDQuest versión 7.1.1 (Bio-Rad) y para su análisis se emplearon 3 replicados

biológicos de cada una de las condiciones en los diferentes tiempos de extracción (Martínez-Moya y col., 2011).

En breve, luego de realizar la identificación automática de los spots fue necesario realizar una inspección manual para eliminar el ruido de fondo y las rayas en los geles. Con la herramienta de empalme del software se seleccionó el gel que presentó el mayor número de spots, este se identificó como el gel “maestro” del análisis, a partir del cual se construyó el mapa 2DE.

Para el tratamiento de los datos (Figura 2), se empleó el valor de densidad total en los spots válidos, con el fin de normalizar los valores de intensidad de los spots y compensar las diferencias experimentales. Se aplicó la siguiente ecuación:

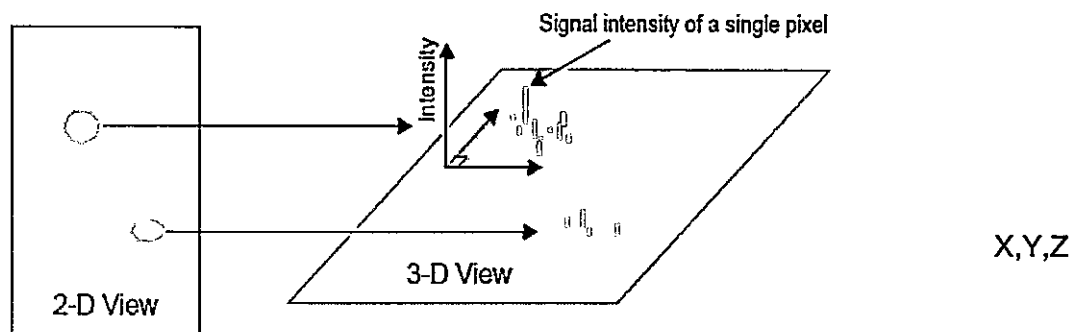


Figura 2. Parámetros para el análisis de imágenes de los geles 2DE.

$$\text{Intensidad de spot} = (\text{altura de spot } (Z) * \pi * \sigma X * \sigma Y)$$

$$\text{Normalización de spot} = \frac{\text{intensidad de spot} * \text{factor de escala}^a}{\text{Factor de normalización}^b}$$

^a 10^6

^b Densidad total en los spots válidos.

Los valores de intensidad obtenidos para cada spot luego de la normalización, corresponden entonces a la intensidad relativa al valor de intensidad total de los spots válidos.

Con los valores de triplicado de cada spot se empleó la herramienta MatchSets para comparar el grupo total de geles y calcular los datos de promedio y desviación estándar de cada grupo de réplicas en los datos de intensidad relativa normalizados.

Para realizar el análisis comparativo de la intensidad relativa de los spots normalizados se analizaron dos variables, la fase de crecimiento y la fuente de carbono. En la primera se compararon los valores de intensidad de los spots normalizados con respecto a la fase de crecimiento lag. Este fue calculado dividiendo el valor promedio de intensidad de las réplicas de cada spot por el valor promedio del mismo spot en fase lag.

$$\text{Abundancia relativa a la fase de crecimiento} = \frac{\text{valor promedio de spot normalizado en fase de crecimiento } X}{\text{valor promedio de spot normalizado en fase de crecimiento lag}}$$

X, se calcula para cada una de las fases exponencial inicial, exponencial final y estacionaria

En el análisis comparativo por fuente de carbono, se dividió el valor promedio de intensidad de las réplicas de cada spot en succinato por el valor promedio de intensidad de las réplicas de cada spot en glucosa. Así:

$$\text{Abundancia relativa fuente de carbono} = \frac{\text{valor promedio de spot normalizado en fase de crecimiento } X \text{ succinato}}{\text{valor promedio de spot normalizado en fase de crecimiento } X \text{ glucosa}}$$

X, se calcula para cada una de las fases exponencial inicial, exponencial final y estacionaria

El análisis de comparación de la abundancia relativa fue validado con una prueba T-Student ($p < 0.05$) para determinar si el cambio relativo en la intensidad de las proteínas era estadísticamente significativo.

2.6 Espectrometría de masas

2.6.1 Tampones y soluciones para la digestión con tripsina

Solución de lavado	Ácido trifluoroacético (TFA)	0.1 %
	Acetonitrilo (CH_3CN)	60 %
Solución A	CH_3CN	50 %
	H_2O	50 %
Solución B	CH_3CN	50 %
	NH_4HCO_3 (Bicarbonato de amonio)	50 mM
Solución C	CH_3CN	50 %
	NH_4HCO_3	10 mM
Solución D	NH_4HCO_3	10 mM
Solución de tripsina (Promega)	HCl (1mM)	100 μl
	NH_4HCO_3 (10mM)	900 μl

2.6.2 Digestión con tripsina

Los spots seleccionados fueron cortados y colocados dentro de una placa de 96 pozos. Cada spot fue lavado sucesivamente con 150 μl de solución A durante 5 min, luego con 150 μl de solución B, C y D durante 30 min cada uno. Luego las placas se secaron a temperatura ambiente durante toda la noche. Posteriormente los spots fueron rehidratados con 10 μl de solución de Tripsina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Promega) y se incubó a 37 ° C

durante 24 h. La solución que contenía los péptidos liberados dentro del tampón fue analizada por MALDI-TOF.

2.6.3 MS

Las muestras fueron transferidas, lavadas y recristalizadas en la placa AnchorChip 600/384 para el espectrómetro de masa Ultraflex (Martínez-Moya y col., 2011). En breve, las muestras que contenían los péptidos trípticos se mezclaron 1:1 con una solución de agua: acetonitrilo: TFA 67:33:0,1 v/v y luego fueron saturadas con 1 μ l de ácido hidroxiamínico. Los análisis se realizaron en el espectrómetro de masa Ultraflex MALDI-TOF el cual fue operado en el modo de reflector positivo con los siguientes parámetros: voltaje de aceleración, 25 kV, tiempo de retardo de extracción, 120 ns. La masa recolectada entre 500 y 3600 Da. Para la calibración externa se empleó un péptido de masa estándar (Sigma), para la calibración interna de masa se usaron picos de autólisis de tripsina (monoisotópico MH+ 842.51 y 2211.10).

2.6.4 Identificación de proteínas por MALDI-TOF

Los datos de MS se analizaron con los programas Flex Control, Flex Analysis y Biotoools de Bruker. Se empleó el software MASCOT (Matrix Science) para identificar las proteínas. En un servidor local se realizó la comparación de los datos m/z de las proteínas analizadas experimentalmente con los datos de proteínas en las bases de datos. Se emplearon las bases de datos públicas NCBI, Swiss-Prot y MSDB, además una base

local con información parcial de secuencias contigs de *X. dendrorhous*. Los siguientes fueron los parámetros que se tuvieron en cuenta en la búsqueda: Categoría taxonómica, hongo y *S. cerevisiae*; sin restricciones de MW/pI; enzima, tripsina; cortes equívocos, 1; tolerancia de masa, 150 ppm y modificaciones como carbamidometilación de cisteína y oxidación de metionina.

Las proteínas identificadas fueron ranqueadas de acuerdo a su score (puntaje) en MASCOT, el margen de error y el porcentaje de cobertura de secuencia de los péptidos identificados. Se consideraba una identificación positiva si la proteína era identificada por lo menos dos veces en geles independientes, si tenía un score de MASCOT ≥ 50 ($P < 0.05$) y además si la identificación era la misma en dos de las tres bases de datos consultadas. Las proteínas se clasificaron de acuerdo a la base de datos KEEG (<http://www.genome.ad.jp/kegg/>) y Swiss-Prot (<http://www.expasy.org/uniprot>). Adicionalmente, para las proteínas hipotéticas o putativas se realizó análisis de BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y se buscaron dominios conservados CCD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CDD/cdd.shtml>).

2.7 Perfil metabólico

2.7.1 Preparación de la muestra

Para cada extracción de metabolitos se realizaron 3 réplicas biológicas en cada una de las condiciones. Teniendo en cuenta que el nivel de metabolitos sufre un constante recambio en orden de milisegundos fue necesario realizar un tratamiento

previo de la muestra. Para ello se siguió el siguiente protocolo (Koning y van Dam, 1992), con algunas modificaciones:

Se mezcló en hielo 2 ml de metanol al 60 % v/v a -20°C con 2 ml de cultivo. Se incubó a -20°C durante 15 min. Posteriormente, se centrifugó a -15°C durante 15 min a 5.500 rpm. Luego se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido se lavó con 5 ml de metanol al 60 % v/v a -20°C . Nuevamente se centrifugó a -15°C durante 5 min a 5.500 rpm. Se decantó, luego se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C . La muestra se liofilizó y se determinó su peso previo a la extracción de metabolitos.

2.7.2 Extracción y derivatización de metabolitos

Para la extracción, a la muestra liofilizada en tubo Eppendorf de 2 ml se le añadieron 1 ml de metanol al 80 % que contenía $1\ \mu\text{M}$ de patrón interno ribitol y 0,5 g de perlas de vidrio (Sigma-Aldrich). Inmediatamente después de la adición de metanol, las células se sometieron a disrupción tres veces en el FastPrepTM (Qbiogene) a 6,5 m/s durante 45 s. Para mejorar la extracción las muestras fueron posteriormente incubadas a 70°C durante 15 min a 1,400 rpm en un Thermomixer (Eppendorf). Luego la muestra se centrifugó a $18.500\ \times\ g$ durante 20 min a temperatura ambiente y finalmente el sobrenadante se evaporó completamente con flujo de nitrógeno.

La metoximación de restos carbonilo se realizó a 37°C durante 90 min con agitación en una solución de cloruro de metoxiamonio ($\text{CH}_3\text{ONH}_2\cdot\text{HCl}$) en piridina (20

mg/ml). Los protones ácidos se protegieron con grupos trimetilsilil por el tratamiento con 50 μ l de N-metil-N-[trimetilsilil]-trifluoroacetamida a 37 ° C durante 30 min.

2.7.3 GC-MS

El análisis de GC-MS se realizó con el cromatógrafo de gases TraceGC y el espectrómetro PolarisQ ion trap equipado con un auto sampler AS2000 (Thermo Finnigan). Volúmenes de muestra de 1 μ l fueron inyectados a 250 ° C. El cromatógrafo de gases estaba equipado con una columna Equity-5 de 30 m x 0,25 mm (Supelco). La temperatura de la interfase fue de 250 ° C y la fuente de iones a 200 ° C. El helio se mantuvo en flujo de 1 ml/min. Luego de 3 min de calentamiento a 80 ° C, la temperatura del horno se aumentó en pasos de 5 ° C / min hasta 325 ° C. Con el fin de equilibrar el sistema para la siguiente inyección, la temperatura fue fijada a 80 ° C durante 5 min. Los espectros de masas se registraron a 2 lecturas/s con un análisis rango de 50-550 m / z.

2.7.4 Identificación de metabolitos

Los cromatogramas se evaluaron con el software Xcalibur 2.0 (Thermo Finnigan), donde se determinaron los niveles relativos de los metabolitos a través de la integración del área del pico de los iones seleccionados (Fiehn y col, 2000). Los radios de respuesta relativos se calcularon normalizando las respectivas áreas del pico con el estándar interno y dividiendo el valor obtenido por el peso de la muestra extraída. Así:

$$\text{Radio de respuesta relativo} = \frac{\left(\frac{100 * \text{área del pico identificado}}{\text{área del pico de ribitol}} \right)}{\text{peso seco muestra mg/ml}}$$

Finalmente, los metabolitos se identificaron por comparación con la base de datos NIST 98 (NIST) y estándares purificados.

2.7.5 Análisis estadístico y bioinformático

Debido a las grandes diferencias encontradas en los radios respuesta de los metabolitos fue necesario normalizar los datos. Para ello, se evaluaron varios métodos de ajuste y transformación en el software Metaboanalist, en donde se eligió la transformación en logaritmo en base 2.

Los metabolitos fueron clasificados de acuerdo a la base de datos KEGG (<http://www.genome.ad.jp/kegg/>) y se construyó un mapa de color para evidenciar los cambios más representativos. Luego, se graficó la concentración (normalizada a 100%) de cada metabolito identificado dentro de las principales vías metabólicas en que estaban relacionados. Finalmente se realizó la integración de los datos de los metabolitos con las proteínas identificados en las diferentes vías metabólicas.

3. RESULTADOS

3.1 Diseño experimental

El acercamiento metodológico empleado para el desarrollo de este trabajo se presenta en la Figura 3, en donde se enumeran los principales métodos experimentales y los programas bioinformáticos empleados en el análisis de los resultados.

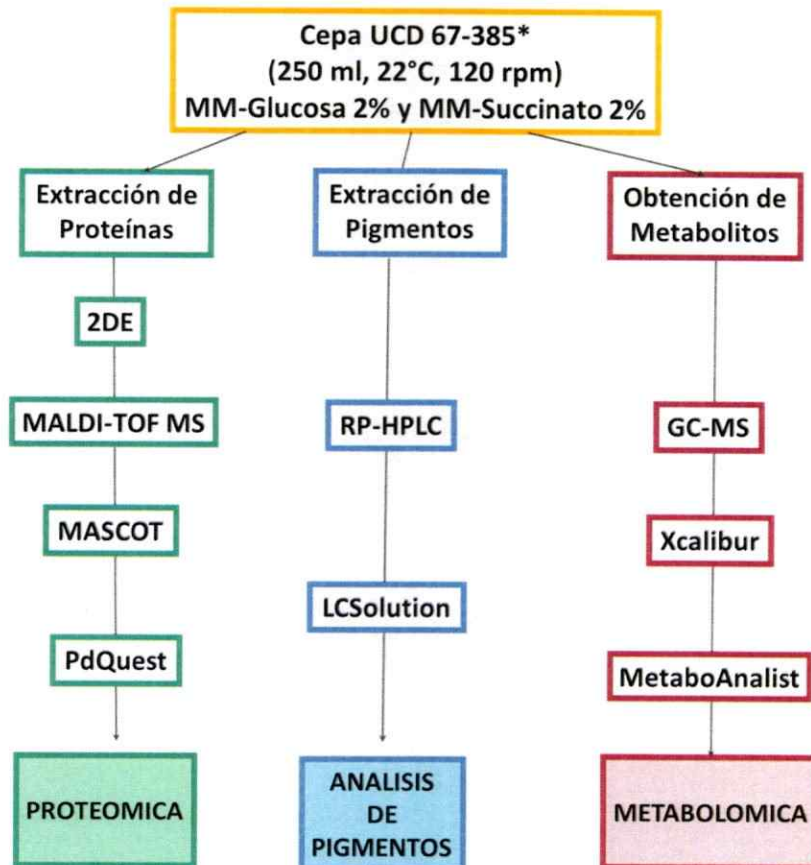


Figura 3. Diagrama de flujo del diseño experimental. *Obtención de muestras en fase de crecimiento lag, exponencial temprana, exponencial tardía y estacionaria, según corresponda. Cada determinación fue realizada en tres replicados biológicos.

Se cultivó la levadura en MM suplementado con glucosa o succinato al 2% durante 5 días en las condiciones descritas en materiales y métodos.

Previamente habíamos observado que al evaluar diferentes fuentes de carbono el mayor contenido celular de carotenoides (μg de carotenoides / g de peso seco) se obtenía cultivando la levadura en medio con succinato (Wozniak y col., 2011).

La figura 4 muestra el crecimiento y producción de carotenoides de la cepa silvestre en MM con glucosa y succinato. Se observa que en succinato el contenido celular de carotenoides es de $350 \mu\text{g/g}$, el cual es más del doble del obtenido en glucosa ($167 \mu\text{g/g}$). Los valores obtenidos presentan la tendencia descrita previamente para la cepa silvestre (Wozniak y col., 2011).

Posteriormente los carotenoides producidos en las dos condiciones de crecimiento se analizaron por RP-HPLC. En la Figura 5, se observa que la astaxantina es el carotenoides mayoritario (65 – 90 %) en cada una de las condiciones de cultivo. Adicionalmente, no hay presencia de diferencias significativas en el porcentaje de los otros carotenoides identificados, incluidos los carotenoides monocíclicos (Figura 5).

En la Figura 4 se observa que a diferencia de lo que ocurre en glucosa, donde la carotenogénesis se induce durante de la fase exponencial aproximadamente a las 72 h de crecimiento, en succinato se observa una inducción más temprana a las 48 h periodo que corresponde a la fase inicial del crecimiento exponencial (Figura 4).

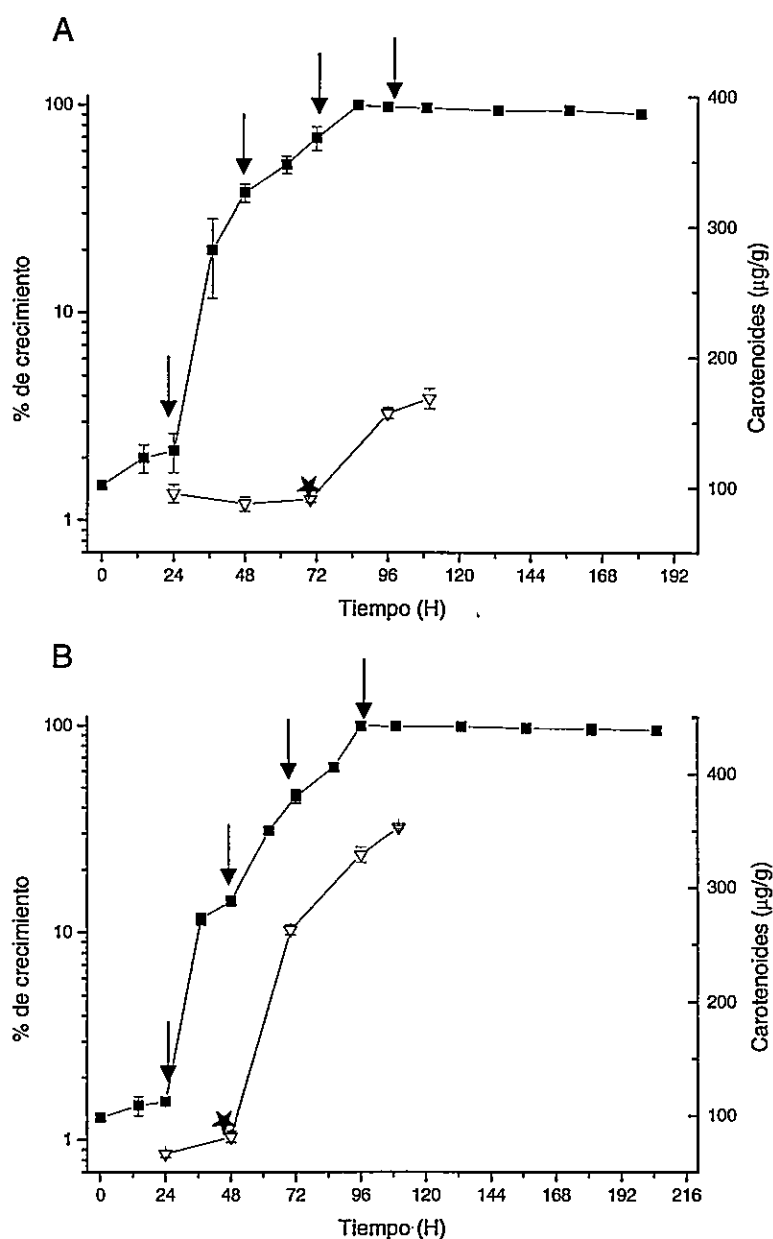


Figura 4. Crecimiento y producción de carotenoides en *X. dendrorhous*. (A) Cultivo en MM glucosa, (B) en MM succinato. (■), corresponde al porcentaje de crecimiento determinado por la densidad óptica a 560 nm (escala logarítmica). El promedio y la desviación estándar se obtuvieron de 4 cultivos independientes. Las flechas verticales indican los puntos donde se recolectaron muestras para el análisis de proteómica y metabólica (24, 48, 70, 96 h) las cuales corresponden a las fases de crecimiento lag, exponencial temprana, exponencial tardía y estacionaria, respectivamente. A las 110 h se tomó una muestra adicional para determinar los carotenoides producidos. (∇), carotenoides totales. (*), indica el tiempo de inducción de la biosíntesis de carotenoides.

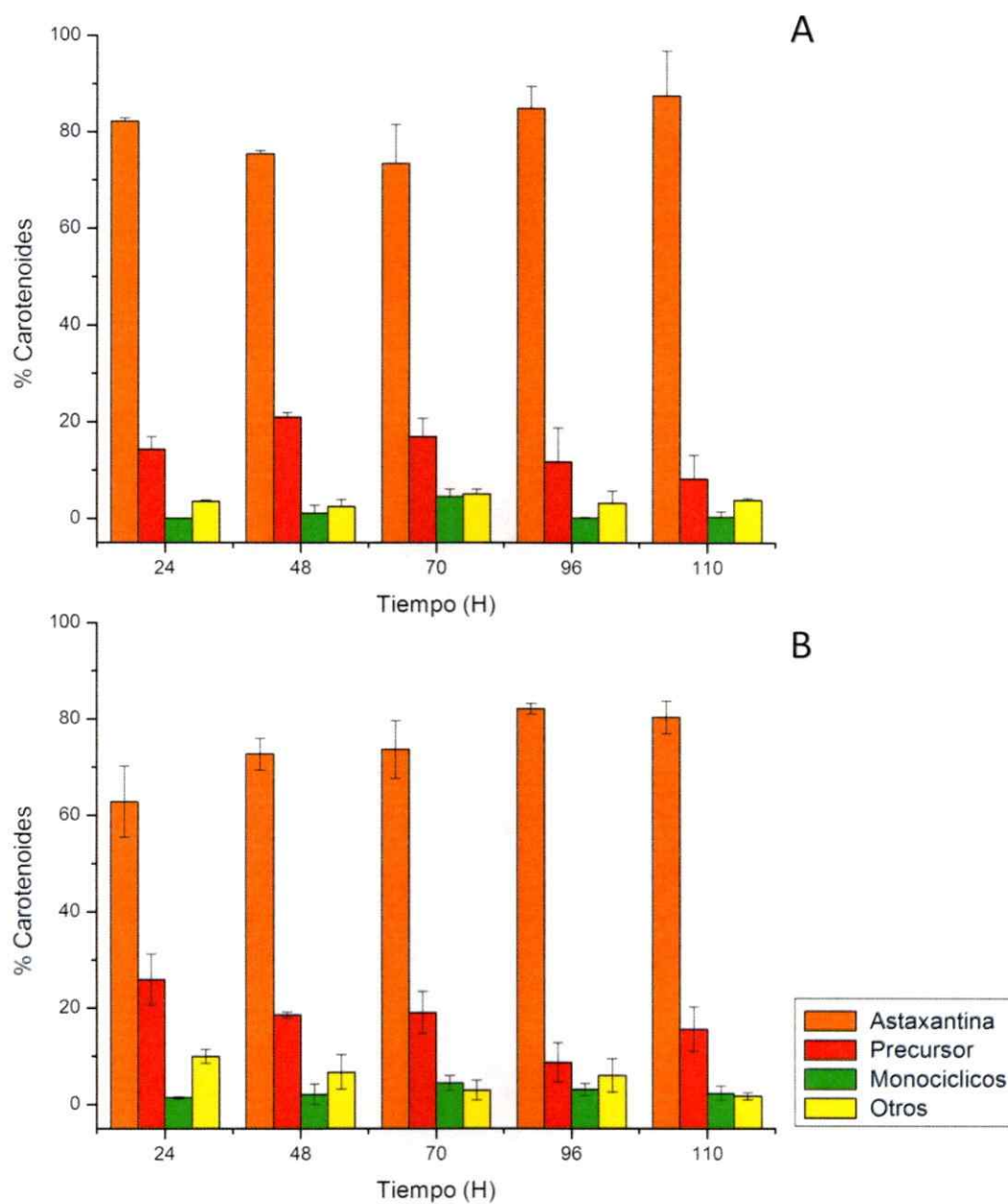


Figura 5. Distribución porcentual de los carotenoides producidos por *X. dendrorhous*. (A) en MM glucosa, (B) en MM succinato. El contenido de carotenoides fue determinado por RP-HPLC. Los valores de los cromatogramas fueron expresados en porcentaje. El promedio de la desviación estándar se obtuvo de 4 cultivos independientes. Precursor: Fenicoxantina, cantaxantina, OH-equinenona y equinenona. Monocíclicos: OH-ceto-toruleno (HDCO). Otros: β -caroteno y otros carotenoides no identificados.

3.2 Establecimiento del proteoma de *X. dendrorhous* empleando 2DE

El análisis de proteómica empleando 2DE es ampliamente utilizado, debido a que es una técnica que permite determinar el patrón de focalización de las proteínas en una condición determinada (Kolkman y col., 2005). Teniendo en cuenta la complejidad del proteoma y su susceptibilidad ante agentes externos, fue necesario garantizar las condiciones óptimas para la aplicación de esta tecnología. Por lo tanto, el establecimiento de un protocolo para la extracción de las proteínas solubles de *X. dendrorhous* fue prerequisite para la obtención de geles 2DE de alta reproducibilidad.

En línea con lo anterior, para determinar las proteínas solubles de *X. dendrorhous* fue necesario evaluar varios procedimientos para obtener extractos de concentración adecuada. Además, teniendo en cuenta que las enzimas de las reacciones finales de la carotenogénesis se encuentran ancladas a membrana se enriqueció el extracto con proteínas de membrana empleando en la extracción el detergente Tritón X-100 y en la solubilización de la muestra la tiourea.

Para identificar cuál método era el más idóneo se evaluaron diferentes técnicas de extracción de proteínas. Los extractos proteicos se cuantificaron por el método de Bradford y se visualizaron en geles SDS-PAGE al 10%.

Para determinar el mejor método de lisis celular, inicialmente se evaluó el uso de un tampón que contenía una solución de NaOH (Doud y col., 2004), el efecto de la temperatura y varios tipos de ruptura celular (ultrasonicación, sonicación en agua y tratamiento con perlas de vidrio). Como resultado se determinó que la ruptura con perlas

de vidrio durante cortos periodos a baja temperatura permitía obtener mayor concentración y una menor degradación de las proteínas (Figura 6, carril 1).

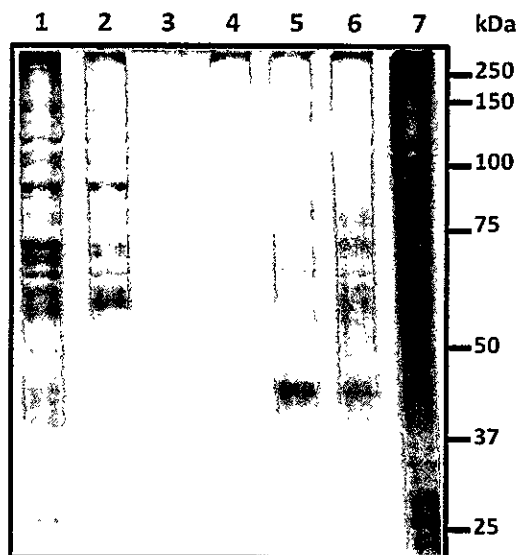


Figura 6. Extractos de proteínas totales de *X. dendrorhous* empleando diversos métodos de disrupción celular. La suspensión celular fue obtenida a partir de un cultivo en fase exponencial en glucosa. En todos los extractos se empleó una solución tampón de Tris-HCl 50 mM pH 6,8 e inhibidores de proteasa al 10%, excepto en el carril 3. (1) Extracción con perlas de vidrio, 4 ciclos de 1 min a baja temperatura; (2) Extracción con perlas de vidrio, 4 ciclos de 1 min a temperatura ambiente; (3) Lisis directa con NaOH 0,2 M; (4) Sonicación en agua 6 ciclos de 1 min al 90% de potencia; (5) Ultrasonificación 4 ciclos de 30 s al 80% de potencia; (6) Ultrasonificación 5 ciclos de 1 min al 80% de potencia; (7) Extracción con perlas de vidrio a baja temperatura y tratamiento final a 95°C.

Entre las principales condiciones que debe presentar el extracto proteico en la 2DE se encuentran: un bajo contenido de sales, que la solubilización se realice en presencia de detergentes no iónicos o iónicos en baja concentración y la ausencia de proteasas (Kolkman y col., 2005). Para cumplir con estas condiciones se evaluaron diferentes combinaciones de tampones de lisis y la precipitación de la muestra.

En la Figura 7, se muestran el análisis de los extractos proteicos obtenidos luego de realizar ruptura celular con perlas de vidrio empleando diferentes tampones de lisis.

Se observó mayor integridad y concentración de las proteínas con una solución compuesta de bicarbonato de sodio 100 mM a pH 8,8, inhibidores de proteasa al 10 %, PMSF 1 mM y el detergente no iónico Tritón X-100 al 0,5 % (Figura 7, carriles 6 y 7).

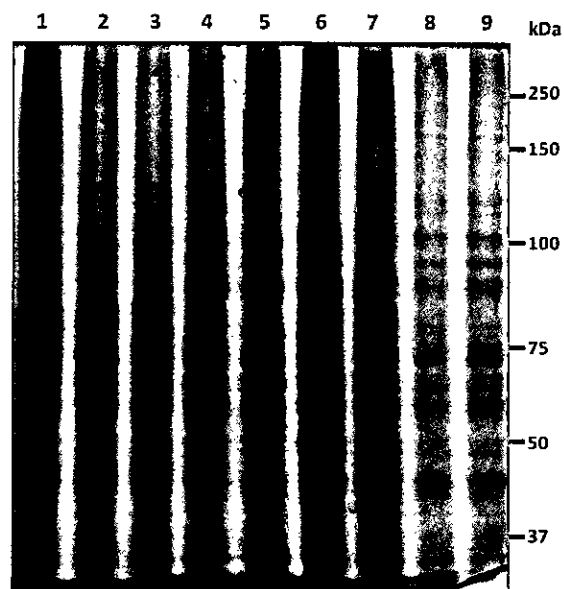


Figura 7. SDS-PAGE de proteínas de *X. dendrorhous* obtenidas con diferentes tampones de lisis. (1) Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 10%, DTT 0,1 M; (2 y 3) Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, SDS 0,30%; (4 y 5) Tris-HCl 0,1 M pH 7,0, SDS 1 %; (6 y 7) NaHCO₃ 100 mM pH 8,8, tritón X-100 al 0,5 %; (8 y 9) Tris-HCl 20 mM pH 7,9, EDTA 1 mM, DTT 1 mM. En todos los extractos se adicionó una solución de inhibidores de proteasa al 10%.

Durante la extracción de proteínas normalmente es necesario realizar varios ciclos de ruptura con perlas de vidrio y recolectar sus respectivos sobrenadantes, lo que conduce a una dilución de las proteínas obtenidas. Para resolver este problema, se evaluó precipitar los extractos para concentrar las muestras y eliminar sustancias interferentes. Para ello se realizaron cuatro tratamientos diferentes: precipitación con acetona, metanol o con ácido tricloroacético (ATC), extracción con fenol y posterior precipitación con acetato de amonio. Estos métodos remueven los contaminantes y permiten concentrar las

proteínas. Como resultado, se obtuvo mayor concentración y fácil resuspensión del extracto empleando el tratamiento con fenol, acetato de amonio y metanol (Figura 8, Carril 3).

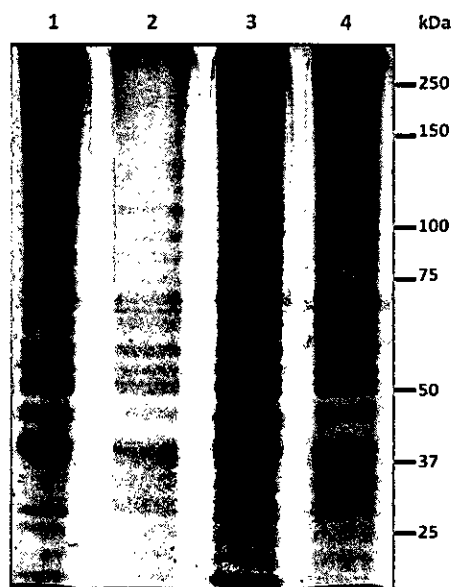


Figura 8. SDS-PAGE de proteínas de *X. dendrorhous* obtenidas con diferentes tratamientos de precipitación. (1) Acetona a -20°C ; (2) ATC al 10%; (3) Acetato de amonio 8M, DTT 1M, fenol saturado en agua y metanol -20°C ; (4) DTT 1M, fenol saturado en agua y acetona a -20°C . Los extractos se obtuvieron de una suspensión celular en fase exponencial de crecimiento en MM glucosa, carril 1 y 3; y MM succinato, carril 2 y 4.

Después de optimizar el protocolo de extracción se realizó la electroforesis 2D en las diferentes condiciones seleccionadas. Posterior al análisis de los geles en el software PDQuest, se seleccionaron los spots para ser identificados por MALDI-TOF MS empleando las bases de datos descritas previamente.

3.3 Construcción del mapa de referencia de proteínas de *X. dendrorhous*

Para facilitar la realización de futuros estudios de proteómica y para obtener una base de datos local se construyó un mapa de referencia con la focalización de las proteínas de *X. dendrorhous* en los geles 2DE empleando el software PDQUEST.

Para la construcción del mapa fue necesario alinear todos los geles teniendo en cuenta el rango de pH en que fueron generados y su orientación. Posteriormente se procedió a discriminar en cada uno de ellos el ruido de base de los spots verdaderos. Finalmente se generó un gel virtual en el cual se incluyeron todos los spots identificados por el software y se editó la información para cada spot empleando la herramienta Annotation manager. Allí se consignó información relevante de la proteína identificada como el número de acceso en la base de datos uniprot, función de la proteína, entre otras. Así, al seleccionar el spot de interés desde el archivo del gel se consigue desplegar esta información. Además se genera una página en formato HTML (Figura 9) en donde se encuentra información más específica como masa molecular, punto isoeléctrico, secuencia aminoacídica, entre otros y se conecta directamente con el link correspondiente a la proteína en las bases de datos NCBI y Uniprot.

Spot information: SSP 4312			
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. ; Mr = 36.3 kDa ; pI = 5.8			
Category	Description	Annotation Entry	Link
NCBI Database			NCBI Database
Uniprot Database Link			Uniprot Database Link
accession		3122121	
Protname		Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.	
Q. Short name		GAPDH	
R. Uniprot Entry name		G3P_PHARH	
S. Number	Manual added no redundant spot	117	
T. KEGG Pathway	Functional classification	Metabolism	
U. ProtFunci	KEGG Uniprot	Carbohydrate	
V. Enzimatic activity		EC=1.2.1.12	
W. Specie	From protein matched	Phaffia rhodozyma	
X. Mr (Theoretical)	From protein matched	36331	
Y. PI (Theoretical)	From protein matched	5.79	
Z. Score	Mascot score > o = 50	90	
ZC. Queries matched	Number of peptides matched	11	
ZD. Covered	Sequence covered	35	
ZE. Info	Notes	*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. [CATALYTIC ACTIVITY] D-glyceraldehyde 3-phosphate + phosphate -	

Figura 9. Información de las proteínas en el mapa de referencia de *X. dendrorhous*. Página generada por el software PDQuest con link directo a las bases de datos NCBI y Uniprot.

3.4 Análisis del proteoma de *X. dendrorhous*

Para seleccionar un gel “maestro” o gel de referencia las imágenes de los geles 2D se digitalizaron y alinearon en el software PDQuest (Figura 10). En promedio se detectó en cada gel alrededor de 600 spots ubicados en un rango de pH de 3 a 10 y una masa molecular de 10 a 100 KDa. En general, no se observó cambio en la focalización de los perfiles de las proteínas durante el crecimiento o por causa de la fuente de carbono empleada. La variación encontrada se limita a cierto grupo de proteínas que presentaron abundancia diferencial.

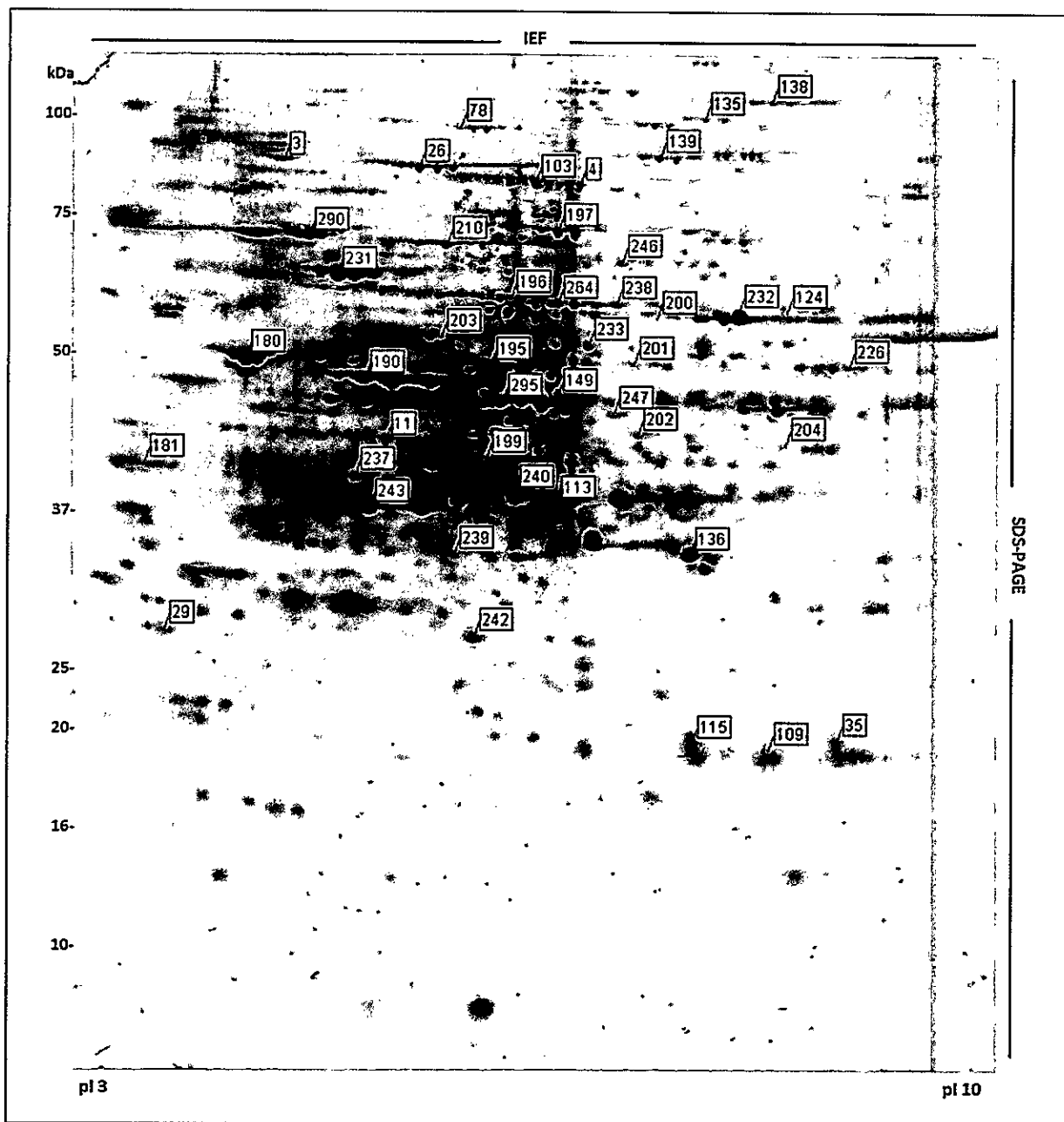
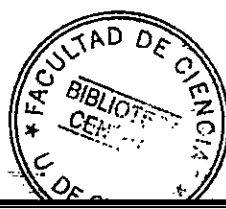


Figura 10. Gel 2D de referencia de *X. dendrorhous*. Perfil de proteínas de un cultivo en fase exponencial final de crecimiento en glucosa. La imagen fue editada en el software PDQuest. Los números (Apéndice 1) corresponden a las proteínas identificadas por MALDI-TOF MS.



En los geles estudiados se escindieron en total 1224 spots, los cuales fueron digeridos con tripsina y analizados por MALDI-TOF MS para su posterior identificación. De estos el 72 % (886 spots) fueron identificados, 25% (308 spots) no se lograron identificar y sólo el 2% (30 spots) no presentó un buen espectro de masa para analizar. Estos resultados indican que el 98% de las muestras analizadas presentaron un buen espectro de masas, lo cual sugiere que el porcentaje de spots no identificados se debe probablemente a la baja correspondencia de las proteínas de levaduras disponibles en las bases de datos consultadas o presencia de modificaciones postraduccionales.

En este estudio los 886 spots identificados durante el crecimiento incluyen aquellos de los diferentes replicados biológicos en ambas fuentes de carbono. Así en el análisis final estos spots corresponden a 329 proteínas diferentes (Apéndice 1). Adicionalmente, se encontraron 10 spots sobrelapados, donde se identificaron 23 proteínas diferentes, estas no se cuantificaron ni se incluyeron en el análisis de abundancia relativa debido a que es imposible determinar su intensidad de forma diferenciada.

3.4.1 Evaluación de las proteínas con migración diferenciada y spots múltiples.

En otras levaduras, las proteínas expresadas a partir de un solo gen pueden migrar en los geles 2D en spots múltiples debido a la presencia de modificaciones postraduccionales o procesamiento proteolítico, entre otras (Weeks y col., 2006; Kusch y col., 2008). En este trabajo, se identificaron en total 24 proteínas en spots múltiples, en

un rango de 2 a 6 spots. Ello sugiere que cerca del 7% de las proteínas identificadas podría presentar modificaciones postraduccionales.

Similar a lo observado en otros trabajos de proteómica encontramos que las proteínas de respuesta a estrés HSP70 (proteína N° 210) y ATP sintasa β (proteína N°180) fueron identificadas en spots múltiples (Hernández y col., 2004; Weeks y col., 2006).

La Figura 10 muestra que la mayoría de las proteínas en spots múltiples presentaron variaciones en su punto isoelectrico (patrones horizontales de los spots). Esto es usualmente ocasionado por modificaciones postraduccionales, como la fosforilación (Renzone y col., 2005). Interesantemente, la metionil-tRNA formiltransferasa (proteína N° 136) se focalizó en dos spots diagonales (Figura 10) patrón menos frecuente en los geles 2D (Weeks y col., 2006; Kusch y col., 2008).

Se estudió la intensidad de las proteínas con múltiples spots en las dos fuentes de carbono. Se observó que algunas de estas proteínas presentaron un patrón de intensidad similar durante el crecimiento tanto en glucosa como en succinato (Figura 11 A). Por ejemplo, la proteína metionil-tRNA formiltransferasa y la proteína asociada a miosina presentaron su máxima intensidad en succinato durante la fase lag de crecimiento. En contraste, la acetil-Coa carboxilasa presentó mayor intensidad en la fase lag de crecimiento en glucosa. Las proteínas monooxigenasa y kinurenina 3-monooxigenasa muestran un perfil de intensidad que aumenta durante el crecimiento en los dos medios. Contrariamente, en la figura 11 B, se observan algunas proteínas que no presentan un patrón de intensidad similar. Ello sugiere que estos spots múltiples (isoformas) se

regulan de diferente manera o mediarían diversos procesos biológicos. Esta forma de regulación diferencial ya ha sido observada en algunas proteínas del metabolismo de carbohidratos (Kolkman y col., 2005), como por ejemplo en una isoforma de GAPDH relacionada con la respuesta a estrés (Magherini y col., 2007).

En la focalización de las proteínas, observamos correspondencia entre los valores experimentales y teóricos de Mr / pI cuando de disponía de la secuencia completa de *X. dendrorhous*. Sin embargo, en la proteína acetil-CoA carboxilasa (proteína N° 190) la Mr experimental observada fue mucho menor que la teórica. Esta discrepancia pudo ser causada por una degradación in vivo o in vitro. De hecho, esta proteína fue identificada con péptidos que abarcan la región media y carboxilo terminal de la secuencia aminoacídica reportada. Por otra parte, cuando la identificación se realizó con proteínas ortólogas se encontró correspondencia moderada entre la migración teórica y la experimental (Apéndice 1). La mayor parte de las discrepancias corresponden a menor valor de Mr/pI comparado con el valor teórico. Por ejemplo, la fosfatidil serina decarboxilasa (proteína N° 191) se detectó en un rango de pH ácido. Este cambio de migración ha sido observado previamente y se ha sugerido que sería posiblemente ocasionado por modificaciones postraduccionales (Eymann y col., 2004).

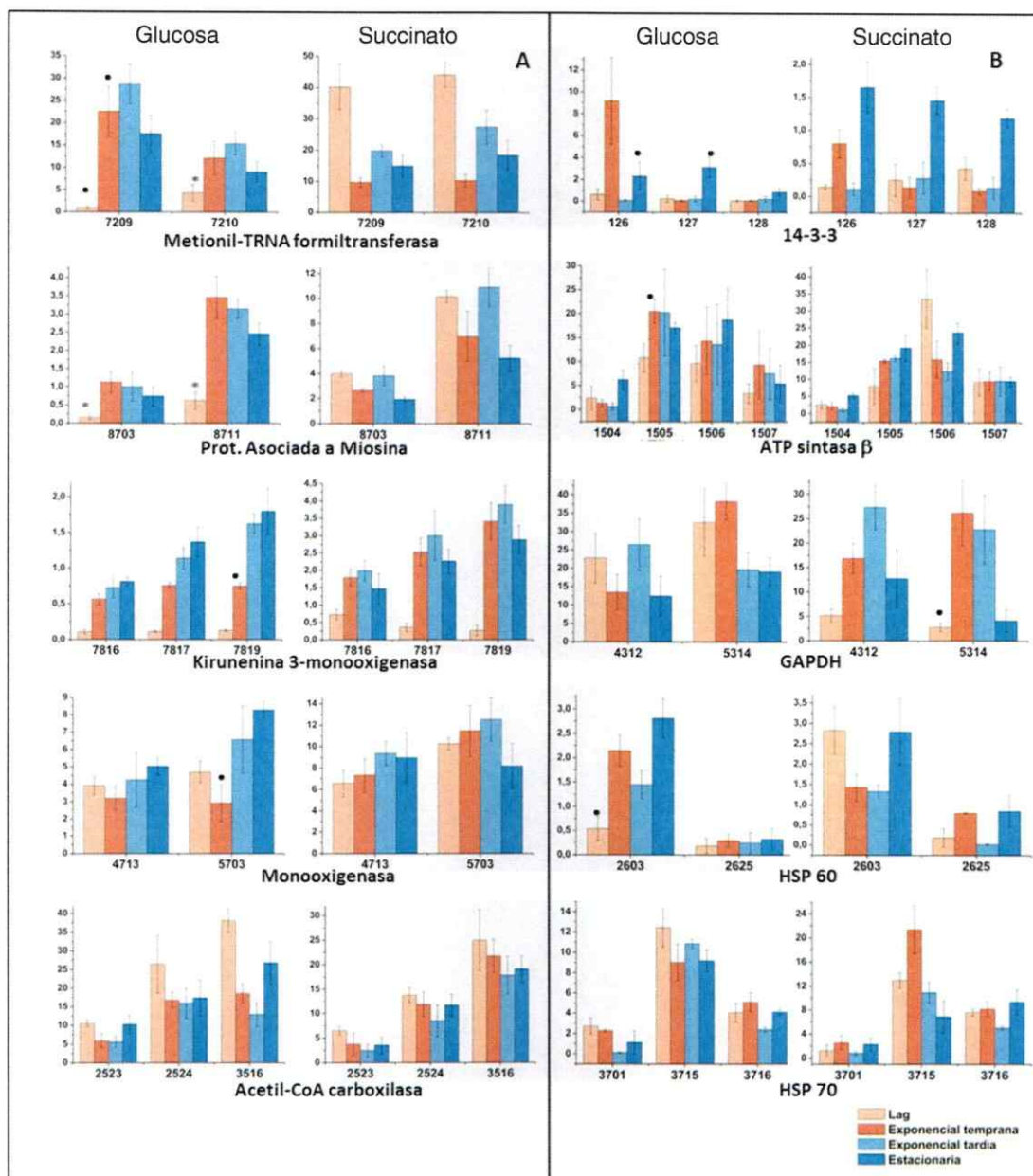


Figura 11. Intensidades relativas de proteínas en spots múltiples de *X. dendrorhous*. Las fases de crecimiento están representadas por diferentes colores. **A.** Proteínas múltiples que presentan similitud en el patrón de variación. **B.** Proteínas múltiples que no presentan similar patrón de variación. El número en el eje x, corresponde a la identificación SSP generada por el software PDQuest. El valor de la escala y ($\times 10^3$) corresponde al valor de la intensidad del spot normalizada. Para normalizar, las intensidades de los spots fueron divididas por la densidad total de los spots válidos y luego multiplicada por 10^6 . Finalmente, los valores normalizados de los diferentes replicados fueron promediados. Los asteriscos representan $p < 0,01$ y los círculos $p < 0,05$ respectivamente.

3.4.2 Identificación y clasificación de las proteínas

En total se identificaron 329 proteínas en las dos condiciones, con mayor presencia de proteínas del metabolismo (Apéndice 1, Figura 12A), en este grupo de proteínas gran parte corresponde a proteínas de síntesis de carbohidratos y aminoácidos. Además se identificaron proteínas del metabolismo de carotenoides (11 proteínas) y oxidoreducción (28 proteínas) (Figura 12B).

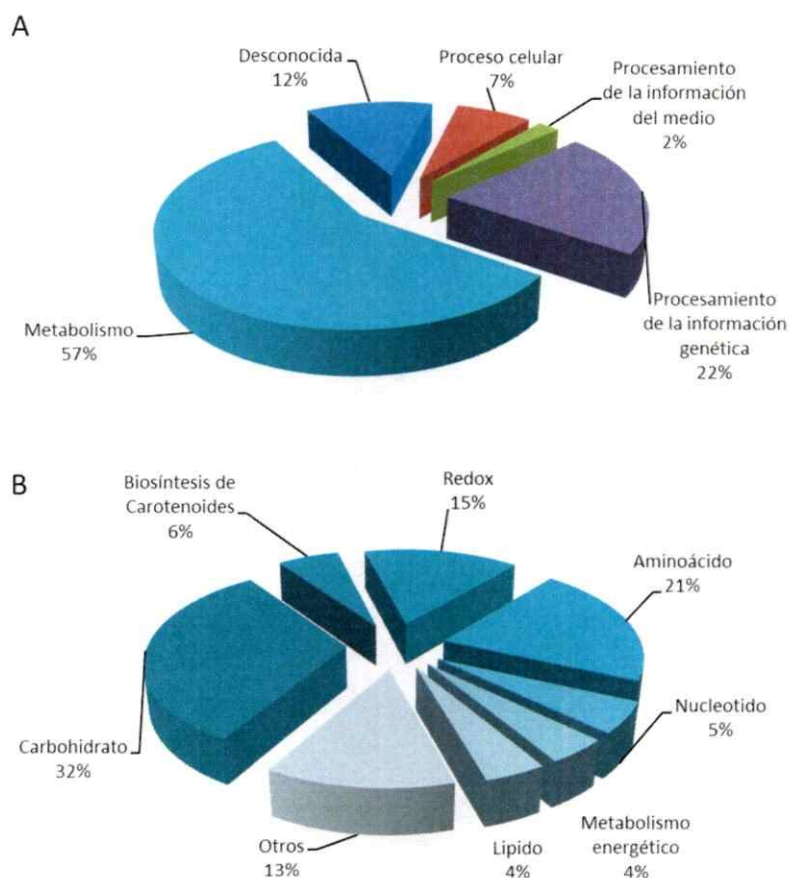


Figura 12. Clasificación de las proteínas identificadas. A. Proteínas clasificadas por función conforme a las bases de datos KEGG y Swiss-Prot/TrEMBL. **B.** Proteínas del metabolismo se agrupan de acuerdo a la base de datos KEGG.

Gran parte de las proteínas presentan un patrón de abundancia similar, indicando que las fuentes de carbono empleadas no generan un cambio drástico en el perfil de proteínas, sino que se observan respuestas específicas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, respuesta a estrés y carotenogénesis. Adicionalmente, los spots con mayor intensidad correspondían a proteínas del metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y redox (Figura 10).

3.4.3 Comparación relativa de la intensidad de las proteínas identificadas

Para identificar los spots con diferencias significativas en su intensidad, se aplicó la prueba de T-student con niveles de confianza de 95-99 % ($p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente). Para ello se compararon las intensidades de los spots con respecto a la fase de crecimiento (relativo a fase lag) y el medio de cultivo empleado (succinato/glucosa).

3.4.3.1 Proteínas con abundancia diferencial en glucosa

Un total de 88 spots (correspondientes a 73 proteínas) presentaron cambios significativos (Tabla 1). Gran parte de las proteínas reguladas diferencialmente pertenecían a tres grupos funcionales (metabolismo, procesamiento de la información genética y procesos celulares), mientras que un 12 % correspondía a proteínas sin función conocida (Tabla 1). Además, observamos patrones similares en la intensidad de

las proteínas en spots múltiples, tales como, la proteína asociada a miosina y la proteína de transporte de golgi (Tabla 1, Figura 13).

Tabla 1. Abundancia diferencial de las proteínas de *X. dendrorhous* en glucosa

^a SSP	^b Descripción	^c Veces de cambio		
		E.TE/L	E.TA/L	EST/L
Proceso Celular: Transporte y proteínas motoras				
6818	Cotamero subunidad alfa, putativa	7,41	5,65	<u>8,30</u>
8703	Proteína asociada a miosina	7,45	6,55	4,84
8711	Proteína asociada a miosina	5,56	5,05	3,95
5719	Proteína de transporte de Golgi	2,12	<u>-3,12</u>	-1,03
5728	Proteína de transporte de Golgi	1,02	-3,12	-1,24
6703	Proteína de transporte de Golgi	-1,00	-2,16	-1,17
2712	SS1G_01912	-1,81	-3,43	-2,45
7403	KIP1 proteína relacionada a quinesina	3,44	3,51	2,24
7804	Proteína vacuolar 25	1,54	3,57	<u>5,03</u>
Procesamiento de la información y transducción de señales				
3814	Serina/treonina fosfatasa PP1-1	-1,01	-1,74	4,81
3815	Serina/treonina fosfatasa PP1-1	-4,39	<u>-5,54</u>	1,66
3816	Serina/treonina fosfatasa PP1-1	-2,45	-1,56	3,58
5724	Nucleótido fosfodiesterasa	4,23	2,72	1,71
0126	14-3-3	14,46	-6,48	3,68
0127	14-3-3	-3,16	-1,11	12,09
0128	14-3-3	1,00	2,98	10,63
Procesamiento de la información genética				
9206	Proteína ribosomal L15	-2,40	-3,14	-1,94
7815	Mediador transcripción RNA polimerasa II	2,13	1,73	2,64
6707	DNA helicasa	1,42	<u>-2,12</u>	1,41
3228	G4P04 (Fragmento)	-1,28	-1,53	-5,51
7711	Proteína 25-control division celular	2,98	2,30	2,97
7515	Histona acetiltransferasa	1,43	3,47	2,98
4803	Proteasa palB/RIM13 similar a Calpaína	1,01	1,13	-3,33
7528	Serina/treonina quinasa Kin28	<u>1,75</u>	1,76	2,40
7112	Proteína ribosomal L31 Sub. 60S	-5,26	-7,45	-1,06
4614	Aspartato-tRNA ligasa	-1,20	<u>2,56</u>	1,33
4005	Proteína de unión a SsrA	-13,25	-2,48	-1,93
2603	HSP 60	2,41	4,78	3,27
5723	HSP hipotética	<u>-1,61</u>	-2,14	-2,79

8208	Homólogo DnaJ Subflia A	-1,43	<u>-6,96</u>	1,51
6401	Peptidasa M16	-1,91	-1,90	-2,66
Metabolismo				
7407	UDP-xilosa sintasa	1,20	1,11	<u>2,16</u>
7306	Defosfo-CoA quinasa	1,02	<u>-3,34</u>	1,35
7801	HSP	-1,09	3,97	<u>2,24</u>
8507	ATP sintasa subunidad alfa	-1,29	-1,22	-3,34
4710	ATP sintasa vacuolar	-1,70	1,82	<u>-2,65</u>
Metabolismo:Metabolismo de lípidos y Carbohidratos				
2523	Acetil-CoA carboxilasa citosólica	-1,76	-1,91	-1,03
2524	Acetil-CoA carboxilasa citosólica	-2,25	-1,66	-1,53
3516	Acetil-CoA carboxilasa citosólica	-1,33	-2,96	-1,42
6604	Sintasa de ácidos grasos	1,04	-4,24	1,53
2319	Acetil-CoA sintasa	-1,88	-1,27	-3,40
7519	Fosfoglucomutasa-1	1,20	3,23	1,30
4413	ATP-citrato liasa subunit 1(Acl)	1,24	-1,39	-1,11
4104	ATP-citrato sintasa subunit 1	<u>-1,96</u>	-1,26	-1,69
7719	Acetato CoA ligasa ADP, putativa	1,03	<u>-4,54</u>	1,26
6516	Acil-CoA carboxilato CoA-transferasa	-3,02	-4,19	-1,68
6109	Endo-1,3(4)-beta-glucanasa	-4,18	-21,30	-1,32
7110	Ribosa-5-fosfato isomerasa	4,27	-2,69	4,46
1610	Fumarato hidratasa	2,04	1,16	4,57
Metabolismo:Metabolismo secundario/ síntesis de carotenoides				
4515	Fitoeno/escualeno sintasa	1,48	2,50	1,44
4609	Mevalonato quinasa	9,53	-1,50	2,93
6308	Difosfomevalonato decarboxilasa	-1,16	2,16	<u>2,61</u>
3517	Fosfomevalonato quinasa	-3,76	-3,72	-2,73
Metabolismo: REDOX				
4713	Monooxigenasa	-1,22	1,09	1,28
5703	Monooxigenasa	-1,60	1,40	1,76
4401	Oxidoreductasa	1,80	-6,10	-4,40
3606	Cu-oxidasa	<u>2,01</u>	-4,03	1,30
5208	Alcohol deshidrogenasa	-2,98	-2,54	-1,60
5202	Dehidrogenasa SDR	-1,26	-7,59	1,36
2210	Dehidrogenasa/reductasa SDR	-1,65	<u>-31,87</u>	-1,87
7108	Mn superóxido dismutasa (MnSOD)	-2,54	1,52	1,09
5315	Proteína citocromo P450	-1,14	1,50	-1,64
2601	Probable NADPH ₂ deshidrogenasa	3,41	1,47	3,45
Metabolismo:Aminoácidos				
8604	Seril-tRNA sintasa mitocondrial	3,18	3,21	<u>4,93</u>
7209	Metionil-tRNA formiltransferasa	24,73	<u>31,44</u>	19,27

7210	Metionil-tRNA formiltransferasa	2,80	<u>3,54</u>	2,09
7816	Kinurenina 3-monooxigenasa	<u>5,10</u>	6,55	<u>7,32</u>
7817	Kinurenina 3-monooxigenasa	6,64	10,01	<u>12,01</u>
7819	Kinurenina 3-monooxigenasa	5,75	12,49	<u>13,81</u>
6821	Aspartil-tRNA sintasa citoplasmática	3,22	2,54	9,86
6828	Aspartil-tRNA sintasa citoplasmática	1,18	3,45	3,79
5410	Acetilornitina aminotransferasa mitocondrial	-1,07	-2,66	-1,82
2517	Fenilalanina-tRNA ligasa	-1,90	<u>-4,09</u>	-1,58
5409	Glutamato deshidrogenasa	1,73	1,25	3,14
4703	Metionina- Cobalamina independiente	1,29	<u>-4,16</u>	1,52
2606	Chorismato sintasa, putativa	<u>-2,69</u>	-14,28	-1,08
2605	Aspartato aminotransferasa, mitocondrial	-1,01	-7,30	-1,15
6607	Lisil-tRNA sintasa	<u>1,75</u>	-2,51	-2,36
4502	Argininosuccinato liasa, putativa	1,39	-2,31	-2,66
Desconocida				
2709	Proteína hipotética conservada	-3,44	-4,57	-1,20
2710	Proteína hipotética conservada	-1,14	-2,23	-1,76
6110	YALIOD17292p	-4,06	<u>-8,59</u>	-1,24
3503	Proteína putativa	1,15	-2,95	-3,63
2005	Proteína hipotética	-1,39	-3,28	-1,48
6111	Proteína hipotética	-5,15	<u>-13,28</u>	-2,64
5107	Proteína hipotética	-10,97	<u>-7,57</u>	-3,78
3111	Proteína hipotética	-3,26	-13,57	<u>-27,15</u>
8209	Proteína hipotética	<u>-4,69</u>	-5,35	-2,70

^aNúmero del software PDQuest. ^bIdentificaciones obtenidas de las bases de datos Swiss Prot y KEGG. ^cPromedio de veces de cambio comparado con el valor de fase Lag. En negrita valor $p < 0.01$, en itálica valor $p < 0.02$ y subrayado valor $p < 0.05$. E.TE, exponencial temprana. E.TA, exponencial tardía. EST, estacionaria. L, lag.

En general, los datos de cambio en la intensidad de los spots indicaron que más de la mitad de las proteínas en la fase exponencial tardía disminuyeron su abundancia (Figura 13). Particularmente, durante el crecimiento se observó un aumento en la intensidad en las proteínas de transporte y síntesis de aminoácidos. Por otra parte, varias proteínas de traducción de señales y síntesis de carotenoides se encontraron aumentadas durante la fase exponencial tardía y estacionaria (Figura 13).

Cuando se realiza el análisis de intensidad diferencial de las proteínas por grupo funcional, observamos que proteínas del metabolismo de carbohidratos y lípidos presentan alta abundancia durante el crecimiento, lo cual es consistente con reportes previos (Kolkman y col., 2005). Por otra parte, como se observa en la Tabla 1, algunas proteínas dentro de este grupo funcional presentan abundancia diferencial, por ejemplo las enzimas fosfoglucomutasa y la acetil-CoA carboxilasa. Este resultado es significativo teniendo en cuenta el papel que cumplen estas proteínas en el metabolismo central de la levadura y su relación con la carotenogénesis.

Así, durante la fase exponencial final, etapa que coincide con la inducción de la carotenogénesis en glucosa, la fosfoglucomutasa (SSP 7519), una enzima de la vía PP, incrementó tres veces su intensidad (Tabla 1, Figura 13). Debido a que la PP es una fuente principal de NADPH, cofactor necesario para las reacciones enzimáticas de la carotenogénesis, se sugiere alta actividad de esta vía para la generación de poder reductor necesario en la síntesis de astaxantina (Lee y col., 2002).

La proteína presente en spot múltiple acetil-CoA carboxilasa (SSP 3516) es más abundante durante la fase lag comparado con las otras fases estudiadas. Cabe anotar que aunque un solo spot presenta cambio significativo en su intensidad, los otros dos spots presentan una tendencia similar (Tabla 1). Observamos baja intensidad de esta proteína durante el crecimiento, incluso durante la etapa de inducción de la carotenogénesis al final de la fase de crecimiento exponencial. Teniendo en cuenta que esta enzima regula la síntesis de ácidos grasos (Lee y col., 2011), su disminución podría indicar un incremento en la disponibilidad de acetil-CoA, precursor de la síntesis de carotenoides.

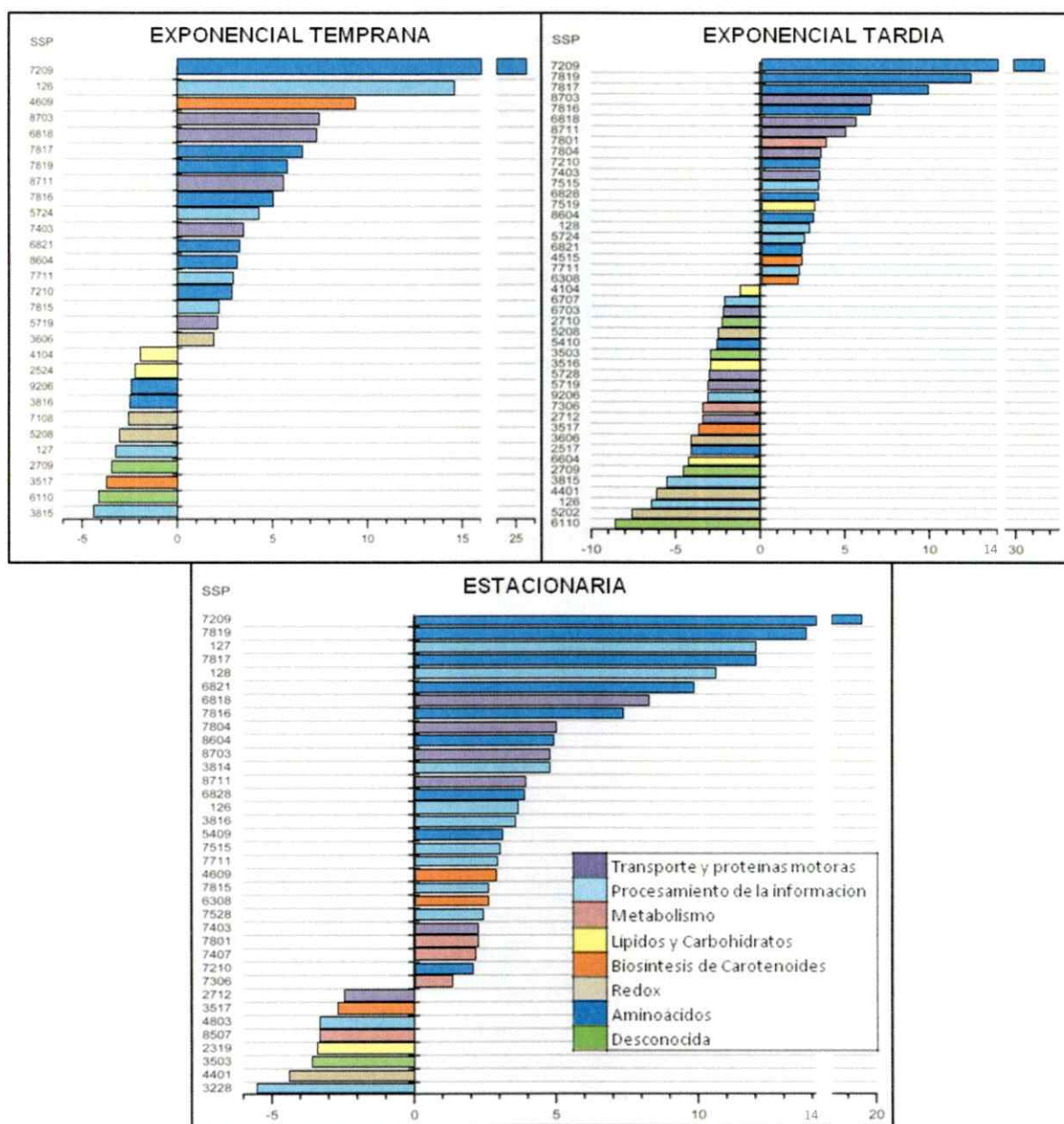


Figura 13. Magnitud de cambio en la abundancia de las proteínas en glucosa. Las proteínas que aumentaron o disminuyeron en más de 1,5 veces su intensidad relativa a la fase lag (ver Tabla 1) se graficaron de acuerdo a la fase de crecimiento. Los colores representan la clasificación en grupos funcionales de las proteínas. El valor de cambio en la intensidad del spot corresponde al eje-x de cada gráfica. SSP, es el número de identificación asignado en el software PDQuest.

En línea con lo anterior, aunque la mayoría de las proteínas del metabolismo de lípidos y carbohidratos presentan niveles similares durante el crecimiento, observamos que varias proteínas del metabolismo del acetil-CoA (acetil-CoA sintasa, alcohol deshidrogenasa, acil-CoA carboxilato CoA-transferasa y ATP-citrato liasa) y la síntesis de ácidos grasos (acetil-CoA carboxilasa y sintasa de ácido graso) presentan su máxima abundancia en la fase lag, anterior a la inducción de la carotenogénesis (Tabla 1). Este resultado nos da cuenta de la estricta regulación del flujo de carbono en el metabolismo celular.

Las proteínas redox y proteínas relacionadas con respuesta al estrés presentaron una abundancia diferencial. En la literatura se han reportado varias enzimas SOD en levaduras, la CuSOD y ZnSOD citosólicas y la MnSOD mitocondrial. En este trabajo identificamos solamente la SOD mitocondrial (MnSOD), esta proteína presentó mayor abundancia en la fase exponencial final y continuó su disminución en fase estacionaria (Tabla 1). Según lo observado en nuestros resultados un nivel elevado de esta enzima (MnSOD) coincide con el tiempo de inducción de la carotenogénesis, con lo que se refuerza la función como antioxidante de la astaxantina (Shroeder y Johnson, 1993).

Dentro del grupo de proteínas redox observamos patrones de abundancia diferencial antes o durante la inducción de la carotenogénesis. Específicamente 5 proteínas redox (SSP 4401, 3606, 5208, 5202, 2210) fueron reguladas negativamente durante la fase exponencial final (Tabla 1, Figura 13) y además presentaron su mayor intensidad durante la fase lag o exponencial temprana. Interesantemente, observamos que junto con la MnSOD, las proteínas monooxigenasa y citocromo P450 fueron reguladas positivamente durante la inducción de la carotenogénesis, e incluso en el caso

de la monooxigenasa continuó su aumento durante la fase estacionaria (Tabla 1). Debido a su papel en procesos de oxidoreducción estas proteínas podrían estar relacionadas con las reacciones de carotenogénesis.

En el grupo de proteínas de metabolismo secundario encontramos 11 enzimas relacionadas con la carotenogénesis (Apéndice 1). En glucosa, 4 de estas proteínas presentaron cambios significativos en su abundancia. La mevalonato quinasa (MK) (Figura 1), la cual realiza los pasos preliminares para la formación de IPP, presentó mayor abundancia durante la fase exponencial temprana y luego fue regulada negativamente en la fase exponencial tardía (Tabla 1, Figura 13). Esta regulación temprana se relaciona con la función que cumple esta enzima en los pasos preliminares de síntesis de isoprenoides y ergosterol.

La enzima fosfomevalonato quinasa fue más abundante durante la fase lag, mientras la difosfomevalonato descarboxilasa aumentó a su máximo nivel durante la fase exponencial final y estacionaria (Tabla 1, Figura 13). Debido a que estas dos proteínas realizan transformaciones secuenciales en la ruta del mevalonato, los resultados indican que esta vía es fuertemente regulada para asegurar la disponibilidad de sustratos.

La proteína fitoeno/escualeno sintasa fue más abundante en la fase exponencial final, coincidente con la síntesis activa de carotenoides (Tabla 1, Figura 13). Este resultado es acorde con nuestras observaciones en donde el análisis del mRNA para los genes específicos de la carotenogénesis presenta un nivel máximo al final de la fase de crecimiento exponencial (Lodato y col., 2004; Lodato y col., 2007).

3.4.3.2 Proteínas con abundancia diferencial en succinato

En succinato un total de 76 spots correspondientes a 71 proteínas presentaron cambios significativos (Tabla 2). Similar a lo observado en glucosa los spots con mayor intensidad pertenecían a proteínas del metabolismo de carbohidratos y aminoácidos. El 30 % del total de las proteínas diferencialmente cuantificadas corresponden a proteínas del metabolismo de carbohidratos y síntesis de carotenoides.

Dentro de los grupos funcionales, las proteínas del metabolismo de carbohidratos y procesamiento de la información fueron las más abundantes, en donde se observó un aumento de 3 a 70 veces en su intensidad. Durante el crecimiento las proteínas del metabolismo de carotenoides, aumentaron cerca de 5 veces el valor de la intensidad comparada con la fase lag (Figura 14).

Las proteínas del metabolismo de carbohidratos que presentaron abundancia diferencial pertenecen a la ruta PP, glucólisis-gluconeogénesis y el TCA (Tabla 2, Figura 14). En la ruta PP la enzima 6-fosfogluconato dehidrogenasa presentó su máxima intensidad durante la fase lag. La enzima fosfoglucomutasa mostró un aumento de su intensidad durante el crecimiento, similar a lo observado en glucosa sugiriendo la generación de poder reductor asociado a la carotenogénesis.

Pertencientes a la vía de la glicólisis, las enzimas fosfoglicerato mutasa y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) presentaron alta abundancia durante el crecimiento (Tabla 2, Figura 14). Sugiriendo que en succinato se aumentaría la cantidad de enzimas intermediarias de vías comunes a glicólisis y gluconeogénesis.

La piruvato deshidrogenasa, aumentó su intensidad cerca de 35 veces durante el crecimiento (Tabla 2, Figura 14). Este resultado sugiere que el acetil-CoA se produce activamente por esta vía, hecho que coincide con la acumulación de astaxantina durante la fase exponencial de crecimiento.

Teniendo en cuenta que el succinato se metaboliza directamente en el TCA observamos que varias enzimas de esta vía como la citrato sintasa, succinil CoA sintasa y succinato dehidrogenasa se encuentran aumentadas con respecto a la fase lag (Tabla 2, Figura 14), lo que nos indicaría que esta ruta está activa durante todo el crecimiento de la levadura con esta fuente de carbono.

De otro lado, la enzima isocitrato liasa, que pertenece a la ruta denominada bypass del glioxilato, presenta su máxima intensidad en la fase lag de crecimiento (Tabla 2, Figura 14). Este comportamiento se explicaría debido a que frente una mayor disponibilidad de succinato es probable que la enzima presente sus niveles basales en fase lag y posteriormente sea regulada negativamente durante el crecimiento, garantizando una actividad suficiente para generar sustratos para la gluconeogénesis. De forma similar la enzima trehalasa, presentaría niveles basales durante la fase de crecimiento exponencial. Posteriormente aumentaría su intensidad en fase estacionaria, donde la célula requiere la formación de glucosa a partir de los carbohidratos de reserva como la trehalosa (Tabla 2, Figura 14).

Tabla 2. Abundancia diferencial de las proteínas de *X. dendrorhous* en succinato

^a SSP	^b Descripción	^c Veces de cambio		
		E.TE/L	E.TA/L	EST/L
Proceso Celular: Transporte y proteínas motoras				
6813	Cotamero subunidad alfa, putativa	13,41	4,45	5,76
6818	Cotamero subunidad alfa, putativa	8,82	1,32	4,96
7403	KIP1 proteína relacionada a quinesina	-1,62	<u>-1,32</u>	-1,47
7408	KIP1 proteína relacionada a quinesina	-4,05	-2,01	-2,90
5201	Fimbrina	-3,02	-1,59	-1,28
Procesamiento de la información genética y transducción de señales				
5515	Regulador negativo del sistema PHO	3,29	<u>3,60</u>	2,64
5417	Iniciador de la traducción factor 3 sub. H	24,79	77,54	10,13
4411	Pre-mRNA-factor de splicing	11,08	21,80	27,26
6707	DNA helicasa	7,66	2,27	2,84
3613	RNA helicasa dbp9 ATP-dependiente	<u>15,33</u>	6,55	5,12
5602	ATP-Chaperona	4,58	2,26	2,23
2107	Proteína quinasa	<u>-5,12</u>	-6,41	-3,34
2310	Proteína 1 similar a DnaJ	1,27	-5,75	-1,23
3229	Proteína complejo-T subunidad gamma	-3,30	-2,88	-2,30
7308	Proteína ribosomal S5 dominio 2	1,38	-5,29	-2,06
2716	Proteína de reparación de DNA, flia SNF2	6,46	2,13	5,99
6401	Peptidasa M16	<u>6,94</u>	6,10	10,15
4112	Nucleosido trifosfato hidrolasa	<u>8,46</u>	3,84	18,73
Metabolismo				
3715	HSP70	<u>1,65</u>	-1,19	-1,20
3716	HSP70	1,08	-1,52	1,22
2611	Arginina N-metiltransferasa	-3,11	-2,40	-2,62
4710	ATP sintasa vacuolar	-1,46	-1,92	1,02
Metabolismo: Carbohidratos				
6503	Citrato sintasa	4,80	<u>2,80</u>	2,29
7519	Fosfoglucomutasa-1	2,02	-1,05	2,45
2309	Neutral trehalasa	-1,85	-1,21	4,66
4312	GAPDH	3,25	5,26	2,45
5314	GAPDH	9,37	<u>10,65</u>	2,92
8202	Isocitrato liasa	-4,00	-2,15	-2,87
6610	Succinato dehidrogenasa (ubiquinona)	<u>4,49</u>	5,12	6,39
6403	Piruvato dehidrogenasa	12,23	35,34	11,61
5509	Succinil-CoA sintasa subunidad beta	11,49	11,37	10,06
3331	Enolasa	-2,97	-1,98	-2,62

4605	Piruvato decarboxilasa	-1,37	-2,44	-1,10
0604	6-fosfogluconato dehidrogenasa	<u>-4,19</u>	-4,57	-4,10
8113	UDP-glucosa/GDP-manosa dehidrogenasa	-1,45	<u>-1,34</u>	3,00
4520	Fosfoglicerato mutasa	1,27	2,59	9,49
Metabolismo: Metabolismo secundario/ síntesis de carotenoides				
4609	Mevalonato quinasa	2,53	3,59	2,23
5717	Escualeno sintasa	2,67	2,23	2,18
5303	Preniltransferasa	-3,13	-5,88	-1,38
4304	GGPS/Poliprenil sintasa	3,55	2,10	<u>4,57</u>
7601	Fitoeno desaturasa	-1,25	-5,48	3,55
7501	Astaxantina sintasa	3,68	1,55	3,12
6308	Difosfomevalonato decarboxilasa	-1,50	-1,63	-1,37
3517	Fosfomevalonato quinasa	1,03	<u>-9,89</u>	-1,25
Metabolismo: REDOX				
4713	Monooxigenasa	1,11	1,43	1,36
4401	Oxidoreductasa	-1,57	-3,00	-1,37
5202	Dehidrogenasa SDR	-2,75	-16,08	-2,11
8101	Flavoproteína que transfiere electrones	2,39	4,06	-1,68
8310	NADPH:quinona oxidoreductasa	-2,39	<u>-1,48</u>	1,08
5315	Proteína citocromo P450	2,54	1,41	1,40
4513	Formato dehidrogenasa NAP+	1,57	4,94	1,97
5320	Monooxigenasa, putativa	<u>-2,18</u>	-1,36	-1,28
6207	ADH (fragmento)	-2,24	-1,78	-2,84
2601	Probable NADPH ₂ deshidrogenasa	2,73	3,56	4,90
9127	Próbable tioredoxina	<u>20,65</u>	-1,47	3,28
Metabolismo: Aminoácidos y nucleótidos				
8604	Seril-tRNA sintasa mitocondrial	-5,80	-1,89	-3,72
1819	Carbamoilfosfato sintasa	-1,69	-2,14	-4,17
7209	Metionil-tRNA formiltransferasa	<u>-4,11</u>	<u>-2,02</u>	-2,01
7210	Metionil-tRNA formiltransferasa	-4,26	-1,61	-2,39
7307	Aspartato aminotransferasa	<u>-5,20</u>	-2,19	-5,48
5410	Acetilornitina aminotransferasa mitocondrial	2,31	1,89	1,82
5409	Glutamato dehidrogenasa	2,50	3,86	1,72
3225	Fosfo-2-dehidro-3-deoxiheptonato aldolasa	-2,41	-3,67	-3,53
7305	ADK2 adenilato quinasa	-2,66	-6,43	-1,98
2605	Aspartato aminotransferasa mitocondrial	-1,93	-1,88	-2,15
4502	Argininosuccinato liasa, putativa	3,71	<u>2,69</u>	1,38
3508	Aminotransferasa 2	-1,25	-2,16	1,33
9126	Similar a SAICAR sintasa	2,86	2,89	4,28
3724	GMP sintasa	<u>4,09</u>	2,35	1,99
Desconocida				

0310	Proteína putativa	2,06	8,03	1,16
8712	Proteína putativa	-1,03	-1,36	-1,88
3002	Proteína hipotética	1,88	1,87	<u>6,50</u>
6111	Proteína hipotética	3,14	4,51	5,07
7705	Proteína putativa	1,28	<u>-1,67</u>	1,85
7830	Proteína hipotética	-11,50	1,54	2,71
5107	Proteína hipotética	-2,04	-2,05	-2,94

^aNúmero del software PDQuest. ^bIdentificaciones obtenidas de las bases de datos Swiss Prot y KEGG. ^cPromedio de veces de cambio comparado con el valor de fase Lag. En negrita valor $p < 0.01$, en itálica valor $p < 0.02$ y subrayado valor $p < 0.05$. E.TE, exponencial temprana. E.TA, exponencial tardía. EST, estacionaria. L, lag.

Similar a lo observado en glucosa, en medio con succinato encontramos diferentes patrones de abundancia en el grupo de las proteínas redox (Tabla 2). Por ejemplo, durante la fase de crecimiento lag varias proteínas (SSP 4401, 5202, 8310, 5320, 6207) presentaron mayor intensidad. Por otra parte, la proteína tipo citocromo P450 aumentó durante la fase exponencial temprana y la monooxigenasa (SSP 4713) fue regulada positivamente durante la fase exponencial final. La abundancia que presentaron estas dos últimas enzimas en succinato coincide con el tiempo de inducción de la carotenogénesis y acumulación de astaxantina.

Dentro del grupo de proteínas de metabolismo secundario encontramos que la enzima escualeno sintasa, aumentó su intensidad durante la fase exponencial temprana y esta se conservó a lo largo del crecimiento (Tabla 2, Figura 14). Varias enzimas relacionadas directamente con la síntesis de carotenoides presentaron el mismo comportamiento. Entre ellas la MK, astaxantina sintasa y geranil geranil pirofosfato sintasa (Tabla 2, Figura 14). Lo anterior nos indicaría que se está generando el sustrato (acetil-CoA) para la síntesis de carotenoides y para la formación de ergosterol.

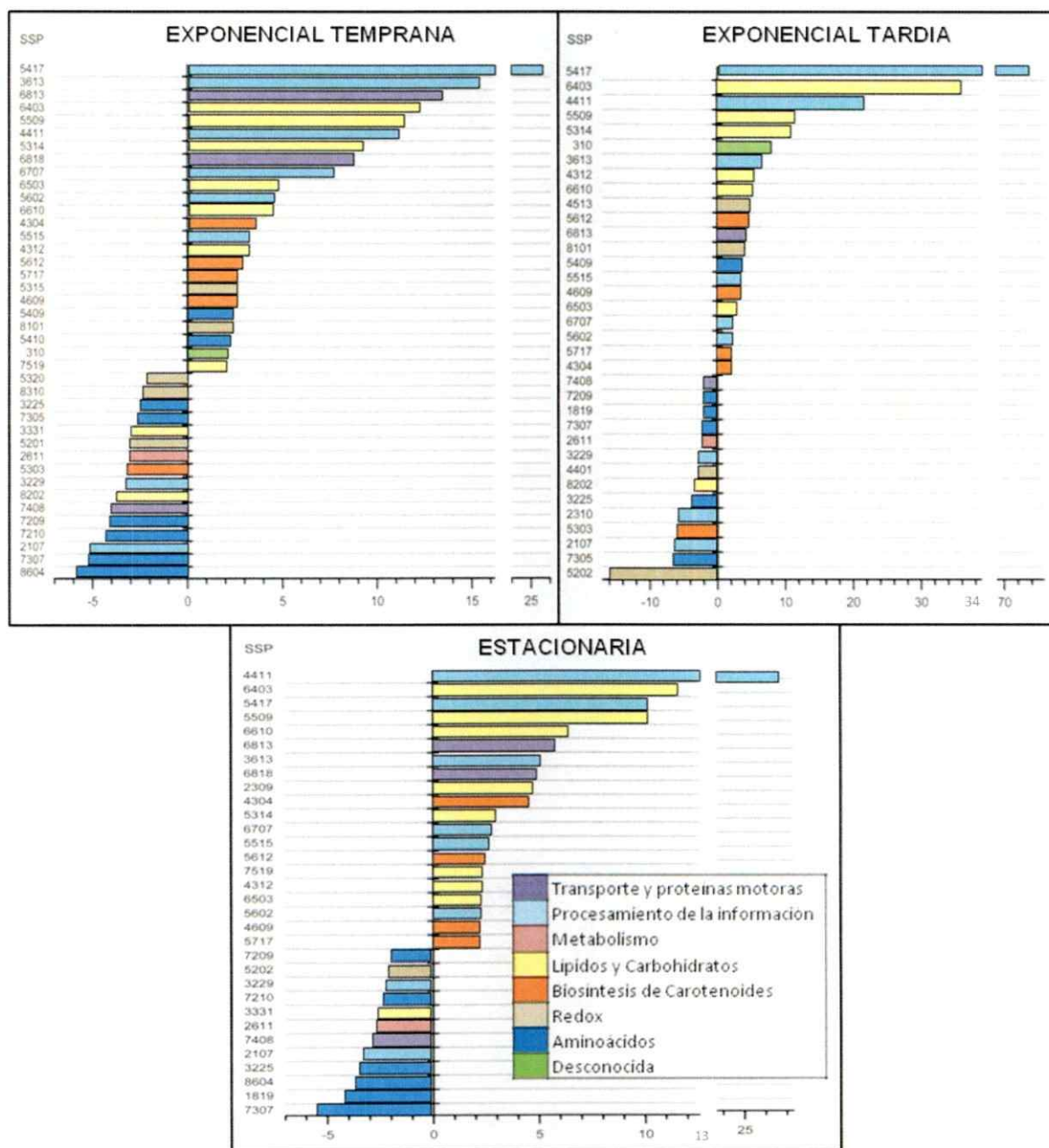


Figura 14. Magnitud de cambio en la abundancia de las proteínas en succinato. Las proteínas que aumentaron o disminuyeron en más de 1,5 veces su intensidad relativa a la fase lag (ver Tabla 2) se graficaron de acuerdo a la fase de crecimiento. Los colores representan la clasificación en grupos funcionales de las proteínas. El valor de cambio en la intensidad del spot corresponde al eje-x de cada gráfica. SSP, es el número de identificación asignado en el software PDQuest.

3.4.3.3 Proteínas con abundancia diferencial en succinato/glucosa

Cuando se estableció la comparación entre la intensidad de las proteínas en succinato/glucosa observamos un total de 106 spots correspondientes a 100 proteínas que presentaron cambios significativos (Tabla 3). Las proteínas del metabolismo de carbohidratos, redox y metabolismo secundario corresponden a 45% del total de las proteínas diferencialmente cuantificadas.

Al determinar la magnitud del cambio en la abundancia de las proteínas en las dos fuentes de carbono, observamos que la mayoría de las proteínas presentaron una mayor abundancia en succinato comparado con glucosa (Figura 15).

En el análisis de la abundancia de las proteínas por grupo funcional en los dos medios encontramos claras diferencias. En succinato durante todo el crecimiento observamos mayor intensidad de las proteínas de transporte, síntesis de aminoácidos y carbohidratos. De otro lado, en glucosa las proteínas de procesamiento de la información presentaron mayor intensidad (Figura 15).

De forma particular observamos que las proteínas acetil-CoA carboxilasa y acetil-CoA sintasa presentaron mayor intensidad en glucosa (Tabla 3, Figura 15), este resultado sugiere una regulación de la síntesis de ácidos grasos y la necesidad de activar una ruta alterna para la síntesis de acetil-CoA, probablemente relacionada con los requerimientos de la carotenogénesis y las necesidades metabólicas de la levadura.



Tabla 3. Abundancia diferencial de las proteínas de *X. dendrorhous* en succinato/glucosa

^a SSP	^b Descripción	^c Veces de cambio MS/MG			
		L	E.TE	E.TA	EST
Proceso Celular: Transporte y proteínas motoras					
6813	Cotamero subunidad alfa, putativa	2,22	3,53	<u>2,99</u>	2,32
8703	Miosina o proteína asociada a endosoma	26,33	2,34	3,83	2,58
8711	Miosina o proteína asociada a endosoma	16,31	2,01	3,47	2,13
5719	Componente del transporte de Golgi	-1,76	-1,82	<u>3,10</u>	2,09
7403	KIP1 proteína relacionada a quinesina	4,68	-1,20	1,01	1,42
7408	KIP1 proteína relacionada a quinesina	<u>4,35</u>	-1,25	-1,33	1,72
7804	Proteína vacuolar 25	1,13	1,18	-6,79	-3,51
2503	Alfa-tubulina	<u>3,92</u>	-3,12	2,70	<u>2,38</u>
Procesamiento y transducción de señales					
5515	Regulador negativo del sistema PHO	-5,15	-1,20	-2,03	-1,04
3808	Serina/treonina fosfatasa PP1-1	1,09	<u>5,86</u>	1,48	1,49
3814	Serina/treonina fosfatasa PP1-1	2,38	3,97	2,19	-1,18
9206	Ribosomal L15	<u>-9,72</u>	-10,86	-6,31	-30,40
8104	Proteína PXR1	-18,08	-21,03	-22,68	-24,75
5417	Iniciador de la traducción factor 3 subunidad H	-18,02	-1,63	2,41	-3,29
4411	Pre-mRNA-factor de splicing	-49,64	-5,13	-3,64	1,09
7815	Mediador transcripción RNA polimerasa II	3,62	3,10	2,24	2,05
8304	DNA helicasa (replicación)	<u>2,66</u>	2,10	1,85	-1,05
3228	G4P04 (Fragmento)	-28,29	-54,94	-19,11	2,29
7515	Histona acetiltransferasa	1,13	-1,48	-10,08	-7,31
5602	ATP-Chaperona	-5,05	1,17	-2,18	-1,25
2310	Proteína 1 similar a DnaJ	-2,92	-1,76	-1,28	-1,59
2603	HSP60	<u>5,25</u>	-1,50	-1,09	-1,01
7112	Proteína ribosomal L31 Sub. 60S	-8,71	2,49	-1,84	1,31
7308	Proteína ribosomal S5 dominio 2	<u>32,46</u>	3,39	2,90	4,11
4005	Proteína de unión a SsrA	-23,25	3,85	-11,43	1,68
6411	Factor de transcripción RfeF, putativo	22,00	3,95	2,84	3,20
7109	Proteína nuclear RAN de unión a GTP	-2,19	-1,69	-1,26	-1,07
Metabolismo					
3715	HSP 70	1,04	2,37	1,00	1,18
7812	ATPasa membrana vacuolar subunidad alfa	2,66	2,61	4,24	1,83
5408	Proteína de unión a NAD(P)	-15,36	1,45	2,92	-1,58
6729	Fumarato reductasa	1,53	3,41	1,97	<u>2,59</u>
8504	Glutatión S-transferasa Gst3	5,43	-1,65	1,88	3,71
Metabolismo:Metabolismo de lípidos y Carbohidratos					

2523	Acetil-CoA carboxilasa citosólica	-4,12	-1,57	-2,23	-2,88
4603	Acil-CoA sintasa	<u>3,96</u>	3,75	3,98	7,02
6604	Sintasa de ácidos grasos	<u>14,69</u>	2,32	19,30	2,64
2319	Acetil-CoA sintasa	<u>-6,54</u>	-2,51	-19,85	-1,18
6503	Citrato sintasa	1,07	6,07	<u>3,12</u>	2,24
7519	Fosfoglucomutasa-1	1,02	1,72	<u>-3,34</u>	1,92
6609	Glucoquinasa	-5,48	-3,12	<u>-4,63</u>	-8,47
4201	Fosfoglicerato quinasa	3,02	-2,30	-1,04	1,74
5314	GAPDH	<u>11,61</u>	-1,46	1,51	-2,33
4413	ATP-citrato liasa subunit 1(Acl)	-1,12	-1,34	1,38	1,07
2213	Transaldolasa	1,03	-2,83	<u>-2,42</u>	-2,21
6610	Succinato dehidrogenasa (ubiquinona)	-4,25	1,55	<u>3,22</u>	<u>1,74</u>
6403	Piruvato dehidrogenasa	-27,44	-1,20	2,54	-1,55
5509	Succinil-CoA sintasa subunidad beta	-1,15	16,26	<u>17,02</u>	6,02
3206	NAD-malato dehidrogenasa	36,04	1,90	<u>38,06</u>	3,81
8202	Isocitrato liasa	7,47	-1,47	4,27	1,05
4605	Piruvato decarboxilasa	5,43	3,29	3,21	<u>2,90</u>
4519	Glucosa-6-P isomerasa	-5,39	-26,97	-1,06	3,10
0604	6-fosfogluconato dehidrogenasa	6,28	-1,42	1,76	2,69
6511	Fosfatidilserina decarboxilasa	1,99	1,00	<u>1,95</u>	2,01
7532	Oxoglutarato dehidrogenasa	<u>-4,97</u>	<u>2,10</u>	-2,14	1,51
3331	Enolasa	1,07	<u>-3,59</u>	-1,64	-1,75
4717	Aldehido dehidrogenasa [NAD(P)+]	4,27	2,02	-1,93	<u>6,80</u>
7728	Dihidrolipoamida dehidrogenasa	26,60	<u>14,59</u>	1,60	-1,04
7719	Acetato CoA ligasa ADP	<u>1,98</u>	1,00	5,40	2,09
3218	6-fosfogluconolactonasa	<u>-41,90</u>	1,05	9,40	1,65
7110	Ribosa-5-fosfato isomerasa	1,42	-2,02	<u>9,29</u>	-2,32
5617	Glucosa-6-P dehidrogenasa	<u>-5,94</u>	-5,64	-10,98	-2,08
7206	Malato dehidrogenasa	7,82	1,70	3,24	4,74
3209	Triosa fosfato isomerasa	1,77	-30,71	-2,25	-2,62
4706	Relacionada con enzima málica NADP	1,40	2,27	1,77	-1,29
6516	Acil-CoA carboxilato CoA-transferasa	6,07	7,73	8,02	4,43
2308	Fosfomanomutasa	<u>-1,85</u>	1,04	1,88	1,46
6109	Endo-1,3(4)-beta-glucanasa	<u>-4,62</u>	-1,23	-2,28	-2,36
Metabolismo:Metabolismo secundario/ síntesis de carotenoides					
4609	Mevalonato quinasa	13,23	3,51	71,38	10,07
5717	Escualeno sintasa	-2,19	1,28	1,01	-1,26
5303	Preniltransferasa	<u>1,46</u>	-1,17	-5,57	-1,11
6308	Difosfomevalonato decarboxilasa	1,62	1,25	-1,27	-1,30
3517	Fosfomevalonato quinasa	1,14	4,42	1,99	2,43
7501	Astaxantina sintasa	-1,15	<u>1,50</u>	3,62	2,30

7311	Citocromo P450 reductasa (crtR)	1,62	1,40	-1,11	-2,87
Metabolismo: REDOX					
4713	Monooxigenasa	<u>1,68</u>	2,28	2,20	1,78
5703	Monooxigenasa	2,18	3,91	1,45	2,05
3606	Cu-oxidasa	1,22	-1,78	1,99	2,53
5208	Alcohol deshidrogenasa	-3,91	-2,74	<u>-5,20</u>	-8,99
5202	Dehidrogenasa SDR	3,53	1,62	1,67	1,24
7108	Mn superóxido dismutasa (MnSOD)	<u>-27,58</u>	-6,57	-40,12	-1,10
7105	Peroxiredoxina TSA2	<u>-41,82</u>	-18,13	-57,80	-2,93
4310	Oxidoreductasa	1,10	3,09	3,60	1,57
5320	Monooxigenasa, putativa	19,98	1,81	26,11	<u>22,52</u>
7618	Glutation-disulfido reductasa	33,21	3,49	1,86	1,42
2210	Deshidrogenasa/reductasa SDR	<u>-10,14</u>	-2,70	21,55	1,26
5313	Probable tioredoxina peroxidasa	-8,84	1,07	<u>-4,86</u>	<u>-4,04</u>
Metabolismo:Aminoácidos					
7805	Isoleucil-tRNA sintasa mitocondrial	1,11	2,08	1,18	2,68
7811	Isoleucil-tRNA sintasa mitocondrial	<u>1,94</u>	2,25	-1,13	1,66
7209	Metionil-tRNA formiltransferasa	44,02	-2,31	-1,45	1,14
7210	Metionil-tRNA formiltransferasa	10,14	-1,18	1,78	2,03
7816	Kinurenina 3-monooxigenasa	6,59	4,93	2,74	2,80
7307	Aspartato aminotransferasa	4,58	1,60	1,03	-2,50
4003	Biosíntesis de histidina trifuncional proteína	-29,12	-29,59	-46,46	-14,64
2606	Chorismato sintasa, putativa	-2,19	-1,13	<u>11,85</u>	-3,90
2407	Aspartato-semialdehído deshidrogenasa	-1,04	-2,60	2,55	-1,35
2628	Adenosilhomocisteinasa	<u>-27,35</u>	1,36	-3,14	-2,53
3515	Delta-1-pirrolina-5-carboxilato	-2,66	-2,32	<u>5,77</u>	1,93
7604	Dihidroxi-ácido deshidratasa	3,73	1,14	-1,07	4,73
Desconocida					
7715	Proteína SPAC589,05c	5,54	4,35	1,38	-1,51
4422	AFL122Wp	<u>-2,07</u>	-1,81	-1,98	-1,39
5304	Proteína hipotética	-6,74	-1,43	-2,32	-2,82
3615	YALIOF00616p	-5,60	1,39	32,23	2,13
0310	Proteína putativa	<u>3,56</u>	-4,53	-4,39	-1,57
1001	Proteína hipotética	-6,84	-2,82	-1,37	2,45
7006	Proteína hipotética	1,55	3,87	1,80	4,95
3002	Proteína hipotética	-2,89	-2,51	3,24	2,19
6111	Proteína hipotética	<u>-14,03</u>	1,15	4,27	-1,05

^aNúmero del software PDQuest. ^bIdentificaciones obtenidas de las bases de datos Swiss Prot y KEGG. ^cPromedio de veces de cambio en succinato comparado con el valor obtenido en glucosa. En negrita valor $p < 0.01$, en itálica valor $p < 0.02$ y subrayado valor $p < 0.05$. E.TE, exponencial temprana. E.TA, exponencial tardía. EST, estacionaria. L, lag.

Respecto a la síntesis de ácidos grasos, la proteína acil-CoA sintasa y una sintasa de ácidos grasos presentaron mayor intensidad en succinato, este resultado sugiere que existe una mayor disponibilidad de acetil-CoA con esa fuente de carbono (Tabla 3, Figura 15).

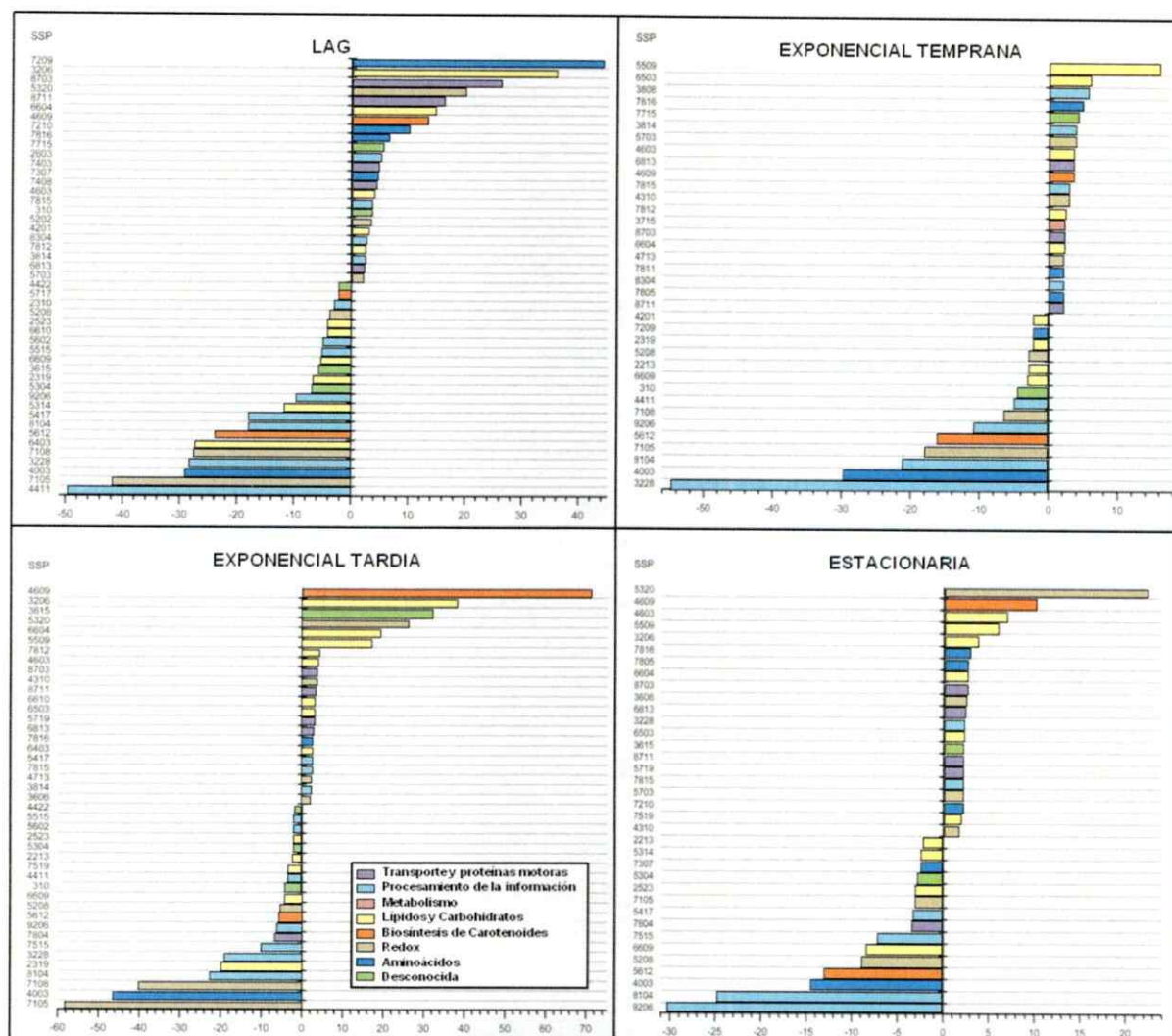


Figura 15. Magnitud de cambio en la abundancia de las proteínas en succinato/glucosa. Las proteínas en succinato que aumentaron o disminuyeron en más de 1,5 veces su intensidad relativa a glucosa (ver Tabla 3) se graficaron de acuerdo a la fase de crecimiento. Los colores representan la clasificación en grupos funcionales de las proteínas. El valor de cambio en la intensidad del spot corresponde al eje-x de cada gráfica. SSP, es el número de identificación asignado en el software PDQuest.

Dependiente de la fuente de carbono empleada, observamos que en succinato las enzimas del TCA (6503, 6610, 5509, 3206, 7206) presentaron mayor abundancia (Tabla 3, Figura 15). Del mismo modo, enzimas de la glicolisis (6609, 4201, 5314, 3209) fueron más abundantes en glucosa (Tabla 3, Figura 15). Con respecto al efecto de la glucosa como fuente de carbono se observó mayor abundancia de la enzima piruvato dehidrogenasa, sugiriendo que esta es una ruta importante para la generación de acetil-CoA en esta condición de crecimiento.

En la ruta PP observamos que la enzima glucosa 6-P dehidrogenasa, que cataliza la primera reacción de la vía oxidativa, presentó mayor abundancia en glucosa. En la vía no oxidativa, en donde se generan sustratos para la gluconeogénesis y se produce NADPH encontramos tendencias opuestas. Las enzimas transaldolasa y transcetolasa presentaron mayor abundancia en glucosa y opuestamente la enzima fosfoglucomutasa fue más abundante en succinato (Tabla 3, Figura 15). Este comportamiento contrario se relaciona con la fuente de carbono y la necesidad de activar la glicólisis o gluconeogénesis según las necesidades metabólicas de la célula.

En las fases lag y exponencial temprana la enzima ATP citrato liasa está en mayor cantidad en glucosa. Sin embargo, durante la fase exponencial tardía y estacionaria es más abundante en succinato. Esta tendencia se explicaría de acuerdo al requerimiento celular de acetyl-CoA durante las diferentes fases del crecimiento dependiente de la fuente de carbono (Tabla 3, Figura 15).

Para el grupo de proteínas redox observamos que en glucosa se encuentran con mayor abundancia las enzimas Mn SOD, tioredoxina y peroxiredoxina TSA2. En succinato presentaron mayor intensidad la oxidoreductasa, glutatión-disulfido reductasa, las deshidrogenasas SDR y las monooxigenasas identificadas (Tabla 3, Figura 15). Esta tendencia parece relacionarse con el tiempo de acumulación de la astaxantina. Por una parte, en glucosa se encuentra mayor abundancia de proteínas antioxidantes dado que es más tardía la acumulación del pigmento. De otro lado, en succinato se aumentarían las proteínas que probablemente intervienen en reacciones auxiliares en la síntesis de carotenoides.

En el grupo de proteínas de metabolismo secundario, observamos que la escualeno sintasa está aumentada en glucosa durante la fase lag y estacionaria. Sin embargo, en succinato es más abundante en la fase exponencial. Este resultado indicaría que la enzima independiente de la fuente de carbono asegura la formación de ergosterol para la levadura. Con relación a las enzimas de carotenogénesis, la MK es más abundante en succinato, probablemente por la existencia de una mayor disponibilidad de sustrato (acetil-CoA).

3.5 Determinación del perfil de metabolitos de *X. dendrorhous*

Al igual que en el análisis de proteómica, se seleccionaron muestras de la levadura durante las fases lag, exponencial temprana, exponencial tardía y estacionaria durante el crecimiento en MM suplementado con glucosa o succinato como fuente de carbono.

Las muestras fueron recolectadas rápidamente y a baja temperatura para evitar cambios en el pool de los metabolitos. Las células liofilizadas de *X. dendrorhous* fueron tratadas con metanol al 80% y posterior a un proceso de disrupción con perlas de vidrio se extrajeron los metabolitos hidrofílicos. Los extractos obtenidos se analizaron por GC-MS y los cromatogramas fueron evaluados en el software Xcalibur.

3.5.1 Normalización de los datos

Posterior a la identificación de los metabolitos en el software Xcalibur teniendo en cuenta el tiempo de retención y la comparación con estándares purificados se procedió a realizar la cuantificación. Para ello se determinó el radio de respuesta relativo, el cual corresponde a la concentración del metabolito. Este radio se calcula teniendo en cuenta el área del pico de cada cromatograma normalizado con el estándar interno (ribitol), posteriormente el valor obtenido es dividido por el peso seco (mg/ml) de la muestra extraída.

Debido a la alta variación que presenta la concentración de los metabolitos a nivel celular, fue necesario transformar los valores de los radios de respuesta para realizar un análisis adecuado de los resultados, que refleje la importancia biológica de los hallazgos. Por esto, se evaluaron varios métodos de ajuste y transformación de los datos disponibles en el software Metaboanalist (van den Berg, y col., 2006).

En la figura 16, se presenta en gráficos de caja el efecto de la normalización de los datos. En la izquierda se observan los datos sin normalizar, donde la trehalosa, succinato y algunos ácidos orgánicos presentan los mayores valores de concentración.

En la derecha se presentan los valores normalizados en logaritmo en base 2. En las gráficas de caja se pueden apreciar los valores promedio y dispersión de los datos. Como se puede detallar, con esta normalización es posible establecer comparaciones directas entre los diferentes metabolitos y evitar el sesgo por la diferencia en magnitud de los valores obtenidos inicialmente.

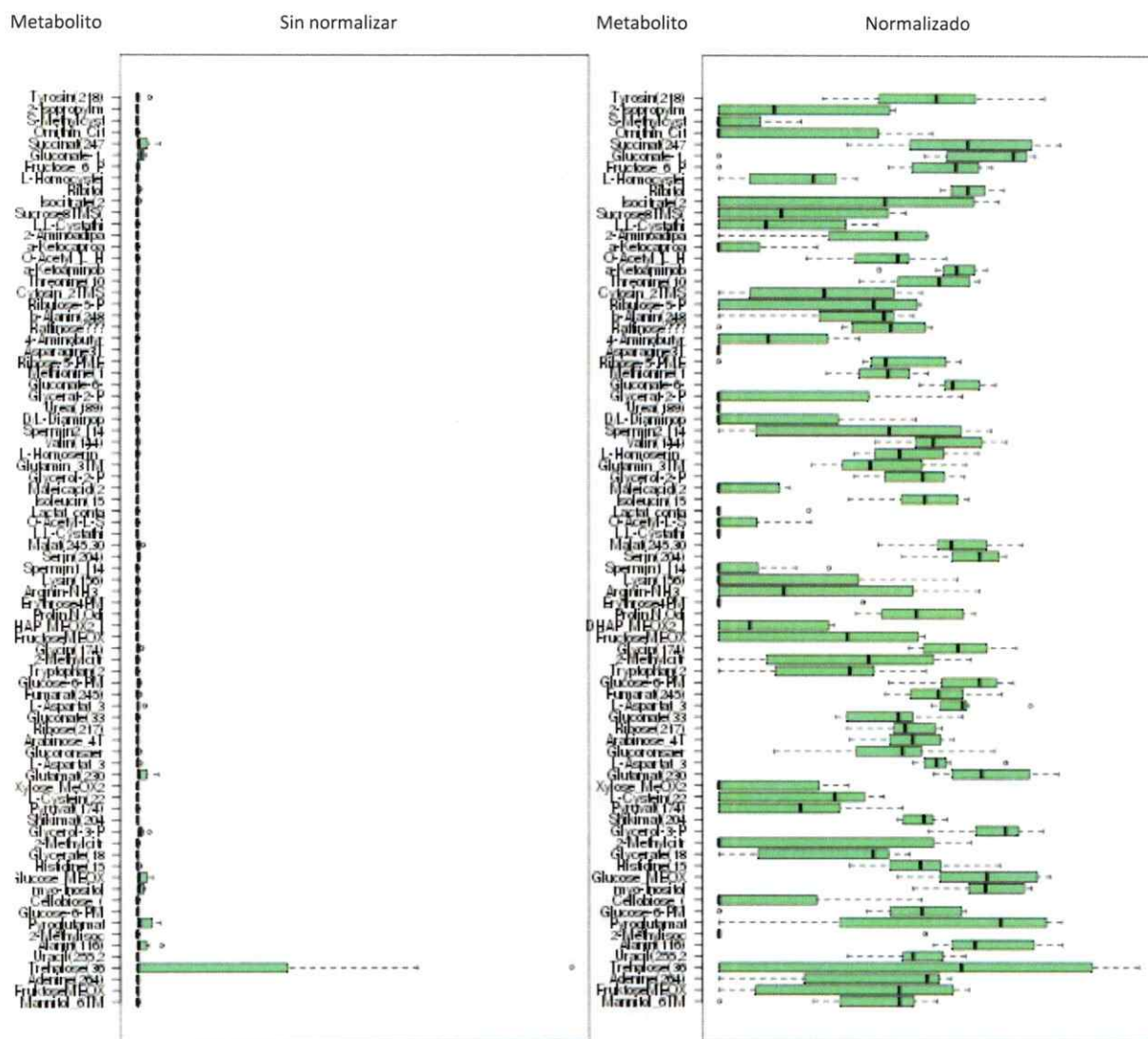


Figura 16. Transformación de los datos del perfil metabólico. Los valores de radio de respuesta para cada metabolito fueron transformados en log₂ en el software Metaboanalyst. En cada diagrama de caja se observa el valor promedio y dispersión de los datos de concentración.

3.5.2 Identificación de los metabolitos

Empleando el software Excalibur donde se compararon los datos obtenidos con la base de datos NIST 98 y estándares purificados se identificaron 92 metabolitos (109 redundantes). En la figura 17, se presentan los metabolitos clasificados funcionalmente conforme a la base de datos KEGG. La mayor parte de los metabolitos identificados corresponden a los aminoácidos y sus intermediarios, ácidos orgánicos, fosfatos y azúcares. El mapa de color presenta los valores normalizados y transformados en logaritmo en base dos de los metabolitos identificados, valores bajo cero se identifican con color rojo y valores mayores de cero con color azul.

En las dos condiciones estudiadas se observa una baja concentración de ácidos orgánicos, algunos fosfatos, intermediarios de algunos aminoácidos y poliaminas. Por el contrario la trehalosa, alanina y mio inositol son los metabolitos más abundantes durante el crecimiento en los dos medios estudiados.

Observando los resultados por fuente de carbono, en medio con glucosa se encontraron bajos niveles de algunos aminoácidos (lisina, asparagina, triptófano), algunos ácidos orgánicos y metabolitos del TCA.

En medio con succinato se encontraron bajos niveles de algunos fosfatos y xilosa. Además, se encontró mayor concentración de los metabolitos del TCA, evidenciando la influencia de la fuente de carbono empleada.

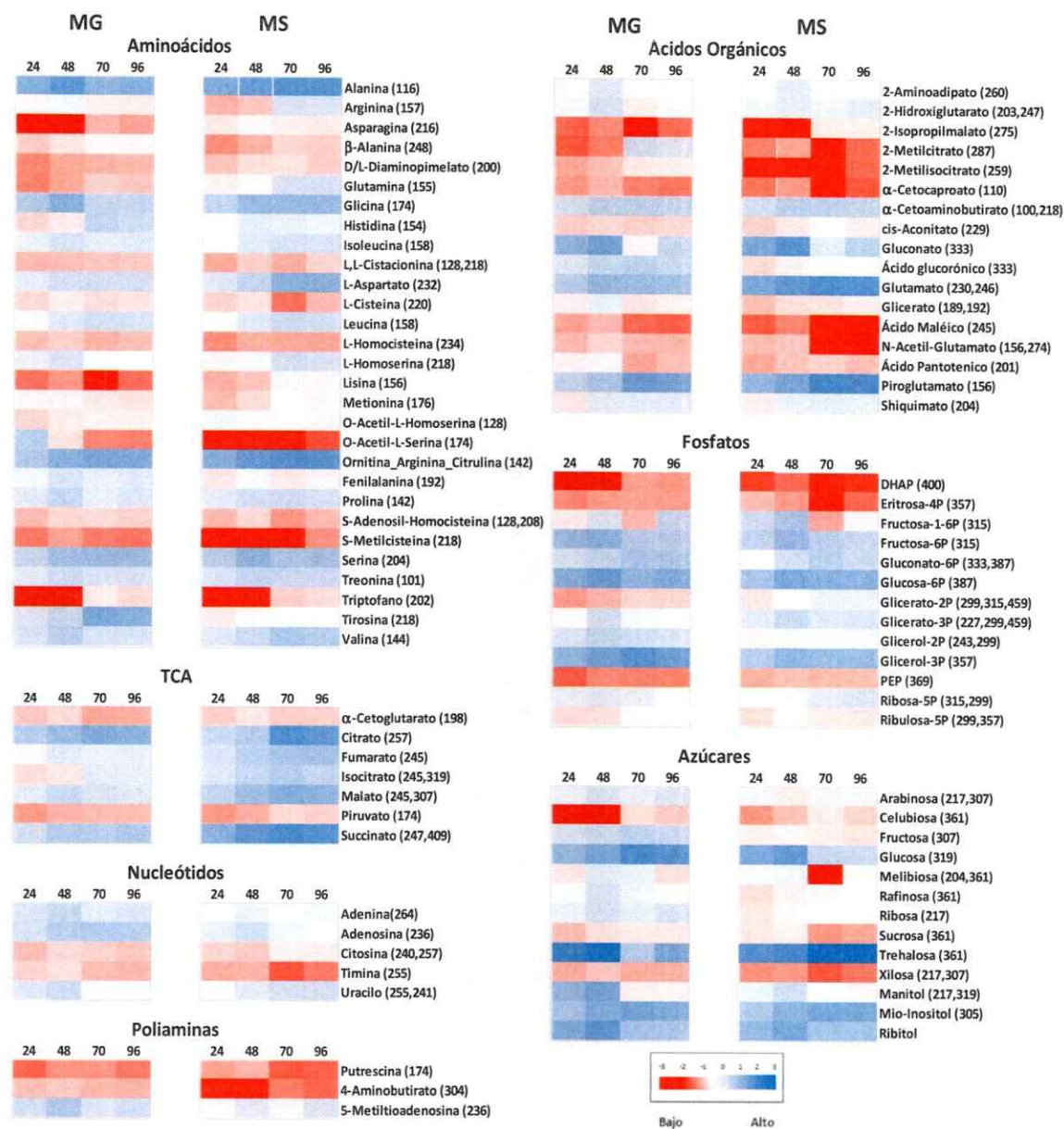


Figura 17. Perfil de metabolitos de *X. dendrorhous*. Para construir el mapa se empleó el valor de \log_2 del promedio de los valores de radio de respuesta previamente normalizados (con el control interno y el peso seco). En paréntesis, se indica el ion selectivo para cada metabolito de la relación m/z usado para la cuantificación. Color rojo o azul, representan concentraciones bajo o sobre cero respectivamente. Los metabolitos se agruparon de acuerdo a la base datos KEGG. TCA, ciclo de los ácidos tricarbóxicos. DHAP, dihidroxiacetona fosfato. PEP, fosfoenolpiruvato.

3.5.3 Diferencias en los niveles de metabolitos en glucosa y succinato

Para determinar las diferencias significativas en los metabolitos identificados se aplicó la prueba T. En la tabla 4, se presenta la relación de veces de cambio de los metabolitos seleccionados en succinato con respecto a glucosa en cada fase de crecimiento estudiada.

Durante el crecimiento se observó mayor concentración de azúcares y nucleótidos en glucosa. Con excepción de la trehalosa que aumentó considerablemente durante la fase exponencial tardía y estacionaria en medio con succinato (Tabla 4).

Los metabolitos de la vía PP se encontraron aumentados en glucosa, excepto el gluconato y la ribosa-5-P que fueron más abundantes en succinato durante la fase exponencial tardía y estacionaria. Esto se observa probablemente porque estos metabolitos se generan como parte de la vía de gluconeogénesis en medio con succinato.

Para la glicólisis se observó que los metabolitos que se generan en las primeras reacciones se encuentran aumentados en glucosa y los de reacciones tardías se aumentan en succinato (Tabla 4). Este resultado se explica por el efecto de la fuente de carbono, en glucosa la glicólisis es activa y en succinato se aumentan los sustratos de la gluconeogénesis para generar energía y metabolitos principales para el funcionamiento de otras rutas metabólicas.

En succinato se observó alta concentración de los metabolitos del TCA, dado que la levadura incorpora esta fuente de carbono directamente a la vía (Walker, 1998).

Tabla 4. Concentración diferencial de los metabolitos de *X. dendrorhous* en succinato/glucosa

Metabolito	Veces de cambio MS/MG				Metabolito	Veces de cambio MS/MG			
	Lag	E.TE	E.TA	Estac		Lag	E.TE	E.TA	Estac
Azúcar					Aminoácido				
Manitol	-11,42	<i>-10,39</i>	1,69	1,10	Fenilalanina	-5,04	-3,13	-5,08	-3,93
Sucrosa	3,91	<u>1,31</u>	-20,81	<i>-11,06</i>	Triptófano	1,00	1,00	<u>-3,43</u>	1,04
Fructosa	-6,43	-8,10	<u>-18,20</u>	<u>-19,05</u>	Tirosina	-7,96	-6,09	-45,91	-35,68
Arabinosa	1,01	<u>-7,72</u>	-1,07	<u>-1,77</u>	β-Alanina	-10,96	-7,62	-3,43	<u>-4,44</u>
Xilosa	-2,89	-4,60	-18,22	<i>-7,06</i>	Histidina	<u>6,16</u>	5,94	-4,05	-3,56
Glucosa	<u>2,15</u>	1,99	-18,12	-13,51	Glicina	-1,55	-1,63	2,40	2,38
Trehalosa	-2,64	-4,91	<i>686,30</i>	<i>62,94</i>	Serina	<u>1,40</u>	<u>1,40</u>	-1,54	-1,24
Vía Pentosa Fosfato					Treonina	1,19	1,24	1,56	<u>1,57</u>
Gluconato	2,23	2,15	3,46	1,48	Cisteína	-1,19	-1,36	-40,99	<i>-4,01</i>
Glicerato	<u>-8,10</u>	<u>-6,05</u>	-1,42	-1,16	Valina	-1,42	-1,81	3,66	3,01
Gluconato-1,5-lactona	-1,28	-1,58	-3,10	-2,88	Leucina	-1,24	-1,17	1,05	-1,09
Gluconato-6-P	-2,73	-1,30	-1,20	<i>-2,04</i>	Isoleucina	-1,94	-1,60	1,49	1,13
Ribulosa-5-P	-1,28	1,97	<u>-2,14</u>	-2,86	Alanina	-1,02	-1,31	4,22	2,91
Eritrosa-4-P	<i>4,90</i>	-1,19	-15,84	-5,62	Asparagina	127,91	255,43	8,22	<i>18,94</i>
Ribosa-5-P	-1,56	-1,45	1,38	3,25	Aspartato	1,03	1,39	5,55	5,49
Ribosa	<u>-4,43</u>	-4,98	-2,29	-3,69	Metionina	<u>-9,25</u>	-2,89	<i>2,10</i>	1,91
Glicólisis o Gluconeogénesis					Lisina	<u>-9,37</u>	-4,40	<u>-596,18</u>	-159,78
Glucosa-6-P	-1,86	-1,26	1,38	-1,13	D/L-D	9,39	7,31	7,45	2,80
Fructosa-6-P	-2,14	-1,09	-1,05	-1,45	O-Acetil-L-H	10,83	1,99	2,54	1,37
Fructosa-1-6-P	7,38	<u>5,19</u>	-2,03	-7,58	Glutamina	62,61	25,17	<u>28,33</u>	<u>39,78</u>
DHAP	-1,98	2,02	<i>-14,79</i>	<u>-31,58</u>	Glutamato	5,35	4,67	8,33	8,67
Glicerato-3-P	2,79	1,71	2,42	3,01	Prolina	-1,16	-1,66	2,24	1,13
Glicerato-2-P	9,57	<u>13,59</u>	8,72	<u>10,56</u>	Arginina	-12,86	-14,99	7,26	7,00
PEP	14,13	<i>5,91</i>	5,95	<u>7,63</u>	Ornitina	2,31	<u>2,26</u>	2,46	2,46
Piruvato	-1,10	-1,13	<u>3,08</u>	2,89	Piroglutamato	4,21	4,09	3,24	<u>3,77</u>
TCA					Nucleótido				
Citrato	-1,98	-1,83	<u>3,57</u>	2,40	Adenosina	-2,01	<u>-2,48</u>	-6,28	-8,19
cis-Aconitato	-1,37	1,48	5,11	2,51	Adenina	<u>-5,03</u>	-3,81	-2,20	-2,22
Isocitrato	<u>17,26</u>	22,76	3,83	2,72	Timina	-3,48	-4,80	-30,93	-6,93
α-Cetoglutarato	1,56	1,76	4,70	<u>4,54</u>	Uracilo	-3,25	-2,51	3,49	5,39
Succinato	6,40	6,95	<u>13,43</u>	8,68					
Fumarato	2,40	2,73	6,16	6,64					
Malato	2,43	2,47	7,91	<u>7,84</u>					

En negrita valor $p < 0.01$, en itálica valor $p < 0.02$ y subrayado valor $p < 0.05$. E.TE, fase de crecimiento exponencial temprana. E.TA, fase exponencial tardía. Estac, estacionaria. TCA, ciclo de los ácidos tricarbóxicos. DHAP, dihidroxiacetona fosfato. PEP, fosfoenolpiruvato. D/L-D, D/L-Diaminopimelato. O-Acetil-L-H, O-Acetil-L-Homoserina.

Observamos correspondencia entre las concentraciones de los aminoácidos y la fuente de carbono empleada. Por ejemplo, aminoácidos derivados de metabolitos de la vía PP como fenilalanina, tirosina, β -alanina se encontraron aumentados en glucosa, (Tabla 4). Aquellos que se derivan del TCA como asparagina, aspartato, glutamato, e incluso metabolitos intermediarios de las vías como D/L-Diaminopimelato y O-Acetil_L_Homoserina se encontraron aumentados en succinato (Tabla 4).

Los aminoácidos que se derivan de la glicolisis como glicina, serina, leucina e isoleucina presentaron niveles muy similares en los dos medios estudiados. Debido a que tanto la glicolisis como la gluconeogénesis se encuentran activas en las condiciones de crecimiento con glucosa o succinato.

3.6 Correlación de los resultados obtenidos de proteómica y metabolómica

Para correlacionar los resultados obtenidos en este estudio, se organizaron los metabolitos y proteínas identificadas en las principales vías metabólicas de la levadura para la asimilación y metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, lípidos y carotenoides.

Como se presenta en la figura 18, para permitir la comparación directa de los resultados obtenidos, los valores promedio (previamente normalizados) de la abundancia relativa de las proteínas y los radios de respuesta de los metabolitos fueron normalizados a 100 agrupando las fases de crecimiento estudiadas y las dos fuentes de carbono. Estos datos fueron graficados en columnas con el correspondiente error estándar. Las vías

estudiadas fueron editadas de acuerdo a los metabolitos y enzimas identificados según la base de datos KEGG.

Para validar estadísticamente la comparación se realizó una prueba T-Student de los datos de proteínas y metabolitos que correspondían a la misma fase de crecimiento en las dos fuentes de carbono.

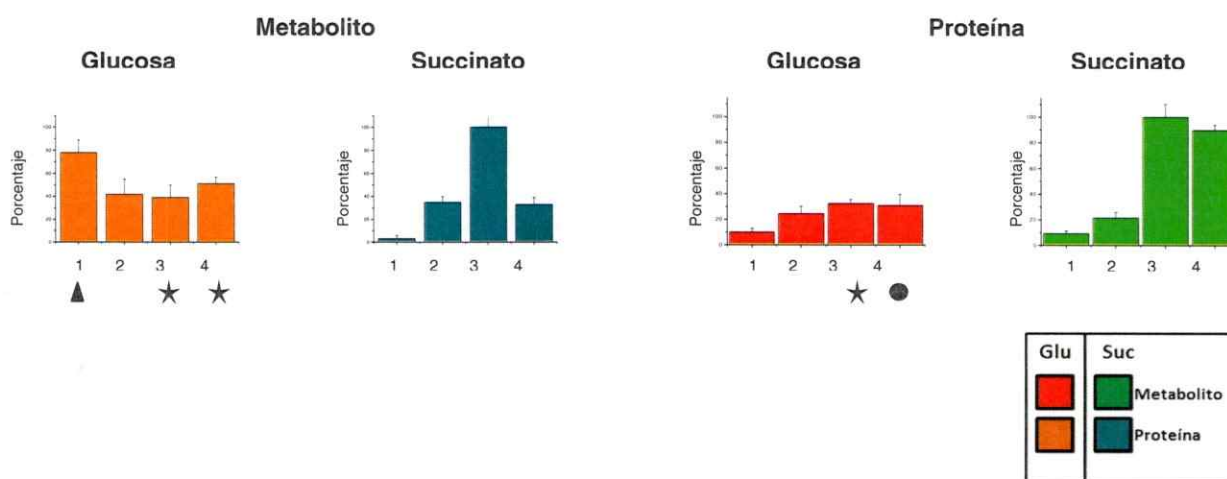


Figura 18. Convenciones empleadas en el análisis de correlación. Los valores normalizados de proteínas y metabolitos expresados en porcentaje se presentan en columnas con su error estándar. Los números identifican las fases de crecimiento: 1, fase lag; 2, fase exponencial inicial; 3, fase exponencial final; 4, fase estacionaria. Triángulo valor $p < 0.01$, estrella valor $p < 0.02$ y círculo valor $p < 0.05$. En la parte inferior se presentan los colores correspondientes que identifican metabolito, proteína y la fuente de carbono glucosa o succinato.

3.6.1 Vías de metabolismo de carbohidratos

En la figura 19 se presentan los metabolitos y proteínas identificadas en el metabolismo de azúcares. Se observa que las enzimas UDP xilosa sintasa y melibiasa no presentan diferencia significativa en su abundancia durante el crecimiento en las dos fuentes de carbono. Lo que nos indica que independiente de la fuente de carbono las vías de generación de azúcares de 5 y 6 carbonos están activas durante el crecimiento de la levadura. Cuando se cuantifican los azúcares generados por estas enzimas (xilosa, melibiosa y rafinosa) se obtuvo una mayor concentración en glucosa. Con esto, observamos que la diferencia en la concentración de los metabolitos no se debe a una mayor concentración de las proteínas sino probablemente existe una mayor actividad enzimática, o como se ha postulado existe un mecanismo de regulación dependiente de la fuente de carbono a nivel postraducciona (Broach, 2012).

En glucosa observamos mayor abundancia en las enzimas α -glucosidasa y glucoquinasa y mayor concentración de metabolitos (D-glucosa, fructosa, D-manitol), resultado esperable teniendo en cuenta la mayor disponibilidad de esta fuente de carbono en este medio de cultivo.

Aunque la enzima trehalasa presentó un aumento no significativo en su abundancia durante la fase estacionaria en succinato, el azúcar trehalosa sí aumentó de manera significativa durante la fase exponencial tardía y estacionaria. Interesantemente, la

acumulación de este azúcar se ha identificado como respuesta celular ante el estrés oxidativo (Weeks y col., 2006).

Como resumen en el metabolismo de azúcares encontramos correspondencia entre los niveles de enzimas y los metabolitos que se producen. De forma general se observa mayor concentración de azúcares en glucosa.

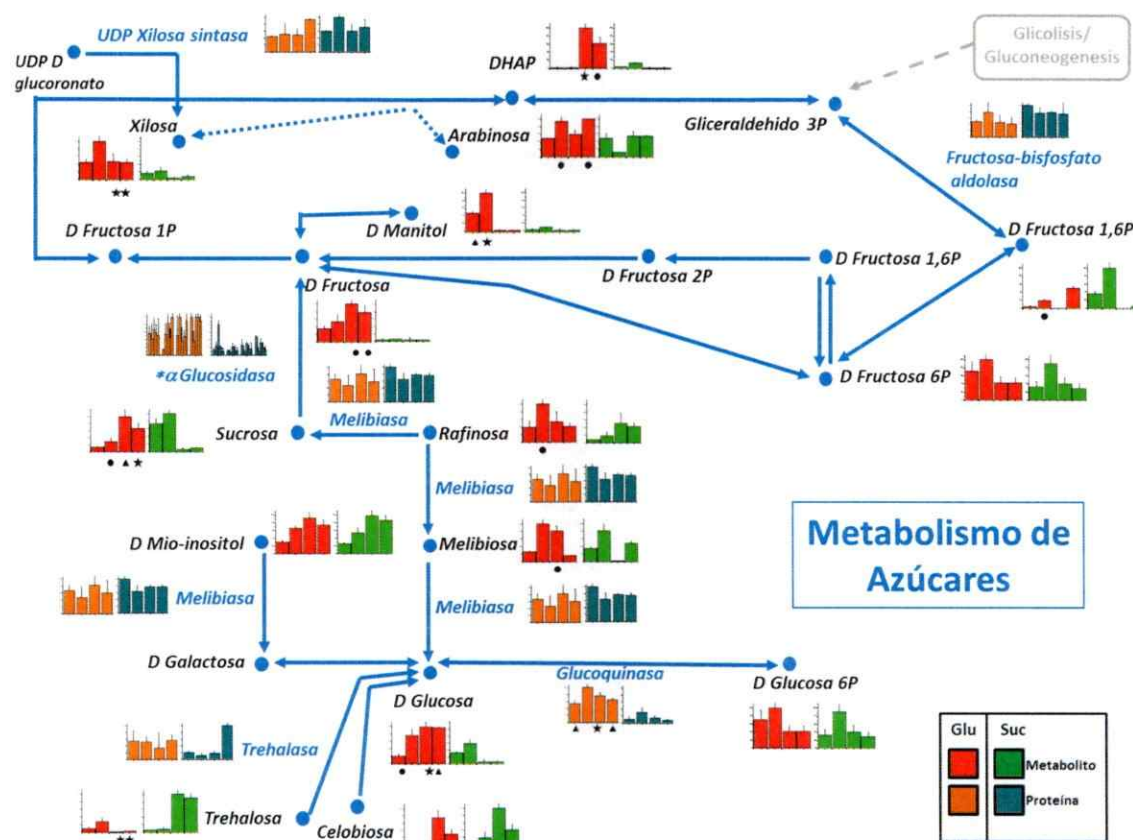


Figura 19. Metabolismo de azúcares. En diagrama de columnas se presenta el valor promedio normalizado a 100 de cada enzima y metabolito en las dos fuentes de carbono durante el crecimiento. Cada columna representa las fases de crecimiento estudiadas, en orden de izquierda a derecha fase lag, exponencial inicial, exponencial tardía y estacionaria correspondientemente. Triángulo valor $p < 0.01$, estrella valor $p < 0.02$ y círculo valor $p < 0.05$. Glu, MM glucosa. Suc, MM succinato. DHAP, dihidroxiacetona fosfato. UDP, uridina difosfato. P, fosfato. *, proteína en múltiple spot. Los nombres de los metabolitos y enzimas se presentan en letra negra y azul correspondientemente. Adaptado de la base de datos KEGG.

En general, observamos que la abundancia de las enzimas que median reacciones de glicólisis y gluconeogénesis son similares durante el crecimiento de la levadura en las dos fuentes de carbono (Figura 20). Con excepción de las enzimas enolasa, GAPDH y glucoquinasa que presentaron mayor concentración en glucosa. Esta tendencia fue previamente descrita en *S. cerevisiae* durante el crecimiento en glucosa o etanol (Kolkman y col., 2005). En cuanto a los metabolitos, observamos que aquellos que son generados en las reacciones iniciales de la glicólisis (de glucosa 6-P a fructosa 6-P) no presentan diferencias significativas. De otro lado, los metabolitos que se producen en las reacciones finales de la glicólisis (de glicerato 3-P a piruvato) aumentaron en succinato.

Es notable como la fructosa 1-6 difosfato presenta menor concentración durante el crecimiento en glucosa y los metabolitos que se generan corriente abajo en la vía también presentan bajos niveles en ese medio. Este metabolito tiene un papel dentro de la regulación de la fosforilación oxidativa, dado que su acumulación (junto con otros eventos como el cambio de pH o el potencial de fosfato) induce la disminución del flujo respiratorio durante la transición al metabolismo fermentativo (Díaz-Ruiz y col., 2008).

En resumen, en la glicólisis y gluconeogénesis encontramos correspondencia entre los niveles de metabolitos y la fuente de carbono empleada. Respecto a las enzimas, en general observamos abundancia similar en las dos fuentes de carbono, indicando alta regulación teniendo en cuenta su importancia como vía central del metabolismo celular en la producción de metabolitos precursores de carbono y energía.

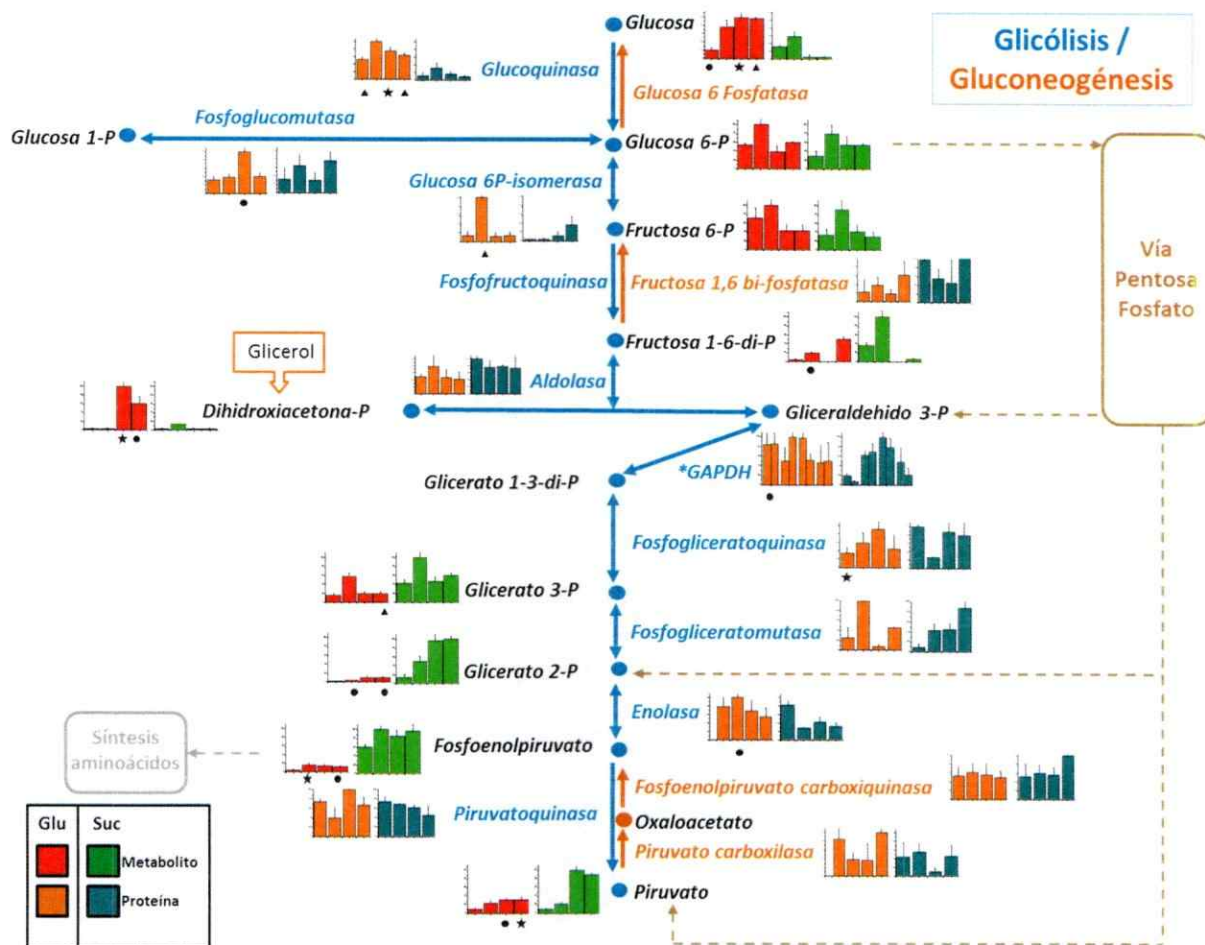


Figura 20. Glicólisis y gluconeogénesis. En diagrama de columnas se presenta el valor promedio normalizado a 100 de cada enzima y metabolito en las dos fuentes de carbono durante el crecimiento. Cada columna representa las fases de crecimiento estudiadas, en orden de izquierda a derecha fase lag, exponencial inicial, exponencial tardía y estacionaria correspondientemente. Triángulo valor $p < 0.01$, estrella valor $p < 0.02$ y círculo valor $p < 0.05$. Glu, MM glucosa. Suc, MM succinato. P, fosfato. TCA, ciclo de los ácidos tricarboxílicos. *, proteína en múltiple spot. Los nombres de los metabolitos y enzimas se presentan en letra negra y azul correspondientemente. Adaptado de la base de datos KEGG.

Una vía central del metabolismo de carbohidratos es la PP en donde se producen poder reductor (NADPH) y pentosas. En general, observamos que los metabolitos generados en esta vía están notoriamente aumentados en glucosa (Figura 21). Para las proteínas no existe una tendencia muy clara, ya que algunas enzimas como la

transaldolasa y glucosa 6-P dehidrogenasa fueron más abundantes en glucosa. De otro lado enzimas de la vía oxidativa (6-fosfogluconato dehidrogenasa y ribosa 5-fosfato isomerasa) presentaron abundancia significativa en succinato (Figura 21). Por lo tanto, observamos mayor cantidad de metabolitos en glucosa y similar a lo reportado previamente encontramos evidencia de regulación a nivel de la abundancia de las proteínas en esta vía (Wang y col., 2004; Braconi y col., 2009).

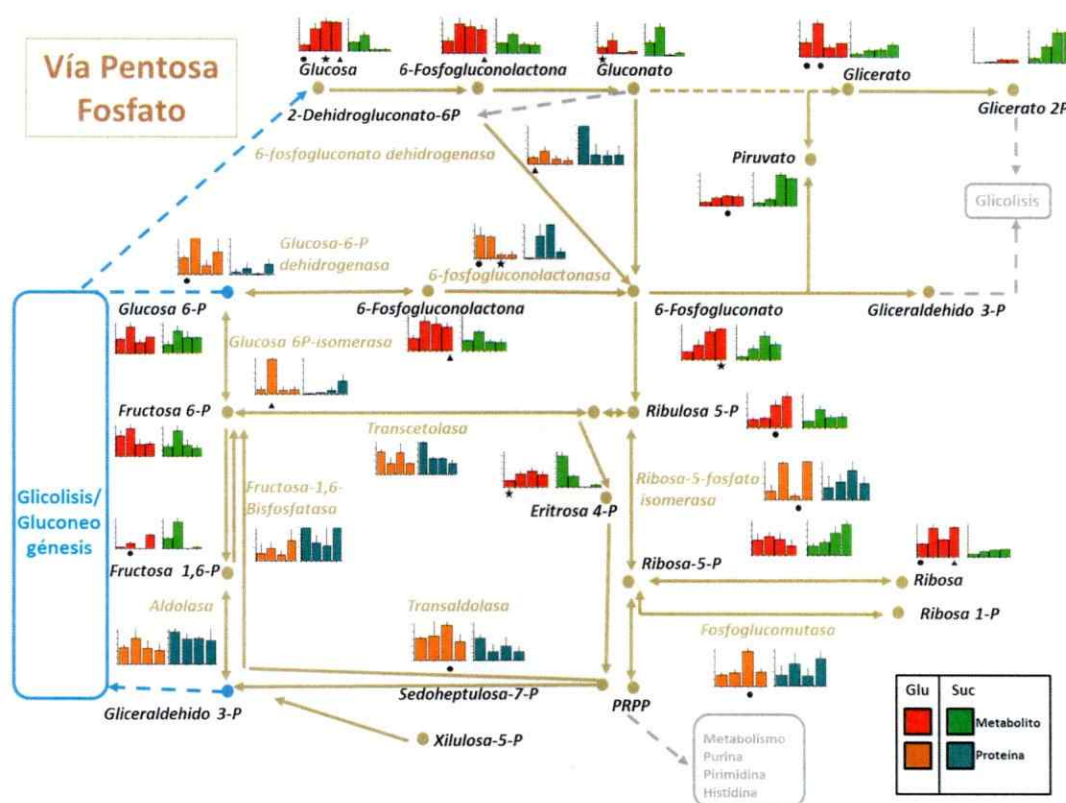


Figura 21. Vía Pentosa Fosfato. En diagrama de columnas se presenta el valor promedio normalizado a 100 de cada enzima y metabolito en las dos fuentes de carbono durante el crecimiento. Cada columna representa las fases de crecimiento estudiadas, en orden de izquierda a derecha fase lag, exponencial inicial, exponencial tardía y estacionaria correspondientemente. Triángulo valor $p < 0.01$, estrella valor $p < 0.02$ y círculo valor $p < 0.05$. Glu, MM glucosa. Suc, MM succinato. P, fosfato. PRPP, 5-fosforibosil difosfato. Los nombres de los metabolitos y enzimas se presentan en letra negra y marrón correspondientemente. Adaptado de la base de datos KEGG.

En el metabolismo de piruvato (Figura 22), la enzima piruvato dehidrogenasa, que permite la formación de acetil-CoA, presentó mayor abundancia en glucosa durante el crecimiento, excepto durante la fase exponencial final donde se observó un aumento significativo en succinato. Este comportamiento probablemente se relaciona con la mayor generación de acetil-CoA a través de la glicólisis en glucosa, y de otro lado la generación de piruvato a través de gluconeogénesis en succinato.

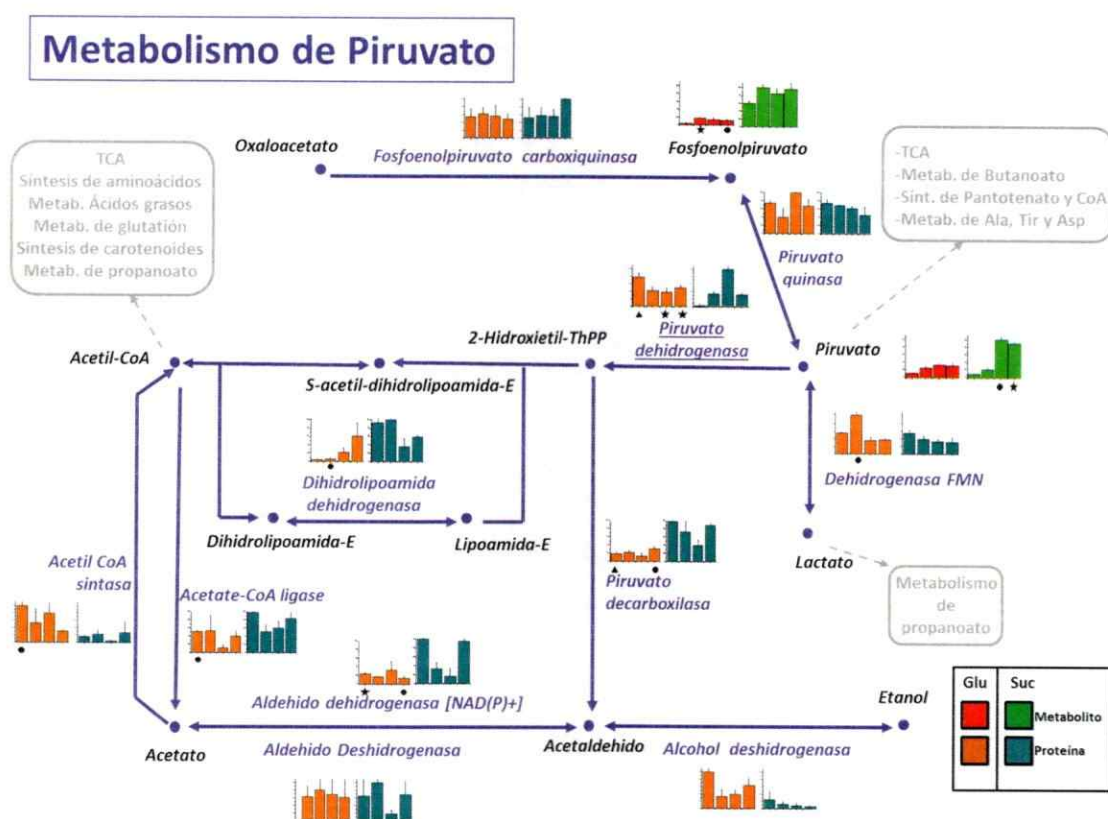


Figura 22. Metabolismo de Piruvato. En diagrama de columnas se presenta el valor promedio normalizado a 100 de cada enzima y metabolito en las dos fuentes de carbono durante el crecimiento. Cada columna representa las fases de crecimiento estudiadas, en orden de izquierda a derecha fase lag, exponencial inicial, exponencial tardía y estacionaria correspondientemente. Triángulo valor $p < 0.01$, estrella valor $p < 0.02$ y círculo valor $p < 0.05$. Glu, MM glucosa. Suc, MM succinato. TCA, ciclo de los ácidos tricarbóxicos. FMN, flavina mononucleótido. ThPP, tiamina difosfato. Los nombres de los metabolitos y enzimas se presentan en letra negra y violeta correspondientemente. Subrayado, localizado en mitocondria. Adaptado de la base de datos KEGG.

Otras enzimas del metabolismo de piruvato como la acetil-CoA sintasa y ADH fueron más abundantes en glucosa (Figura 22), debido probablemente a la influencia de la fuente de carbono y su rol en las reacciones de fermentación (Walker, 1998).

Una vez se genera el acetil-CoA, este es incorporado al TCA cuando la levadura crece en glucosa. Sin embargo, cuando la levadura crece en succinato este metabolito se incorpora directamente al TCA.

Se postula que los intermediarios del TCA están presentes en baja concentración durante la respiración aerobia, debido al rápido flujo a través del ciclo y su papel en rutas biosintéticas alternativas (Lin y col., 2011). Este flujo requiere enzimas anapleróticas (por ejemplo, piruvato carboxilasa para producir oxaloacetato) o de las vías anexas (como la vía de glioxilato en la levadura donde se produce succinato) para reponer estos intermediarios. En este estudio observamos que las enzimas del glioxilato fueron significativamente más abundantes en succinato comparado con glucosa, evidenciando el efecto de la fuente de carbono (Figura 23).

Se ha descrito que un incremento de las concentraciones celulares de los sustratos del TCA pueden ser causados por variación en los niveles de sus enzimas (Lin y col., 2011). En *S. cerevisiae*, existe evidencia de que altos niveles de succinato pueden promover el aumento de la enzima citrato sintasa citosólica (Lin y col., 2011). En nuestros resultados observamos aumento significativo en 6 de las enzimas del TCA en succinato (Figura 23), lo cual nos indica una razón del aumento de los metabolitos en este medio.

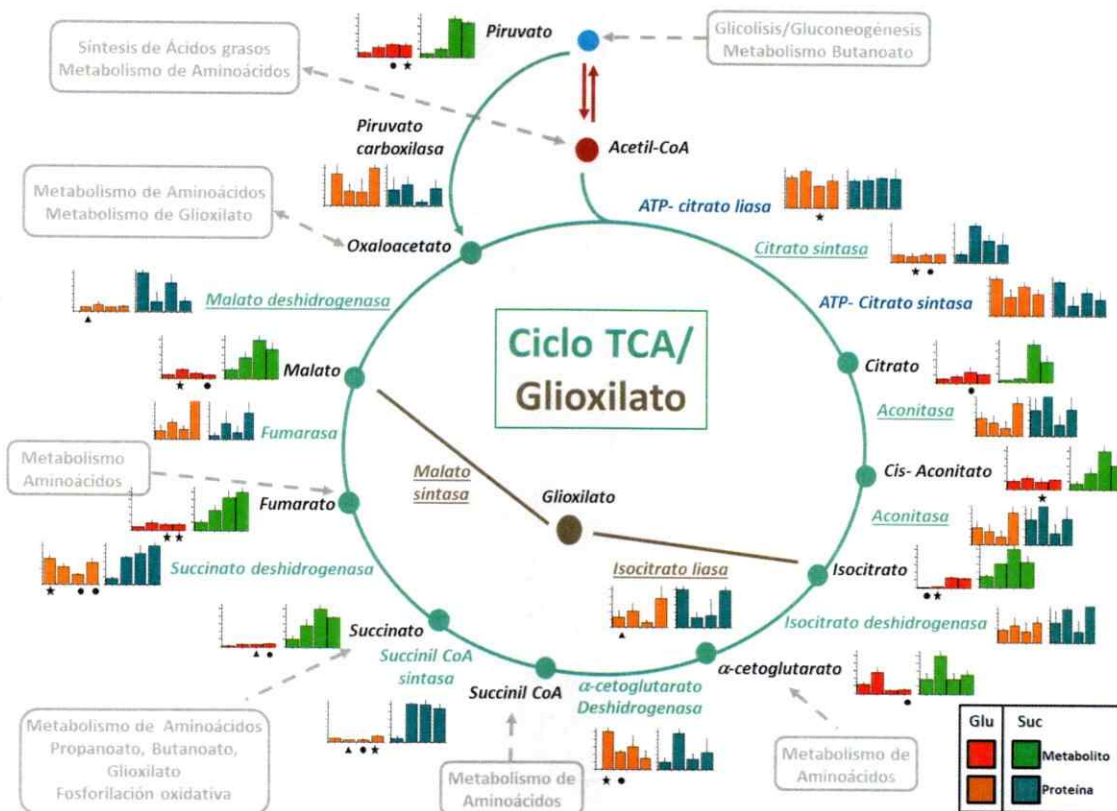


Figura 23. TCA y glioxilato. En diagrama de columnas se presenta el valor promedio normalizado a 100 de cada enzima y metabolito en las dos fuentes de carbono durante el crecimiento. Cada columna representa las fases de crecimiento estudiadas, en orden de izquierda a derecha fase lag, exponencial inicial, exponencial tardía y estacionaria correspondientemente. Triángulo valor $p < 0.01$, estrella valor $p < 0.02$ y círculo valor $p < 0.05$. Glu, MM glucosa. Suc, MM succinato. TCA, ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Los nombres de los metabolitos y enzimas del TCA se presentan en letra negra y verde correspondientemente. En azul aparecen las enzimas con localización en el citoplasma; en plomo y subrayado las enzimas del ciclo del glioxilato Adaptado de la base de datos KEGG.

En el ciclo del glioxilato se genera energía y se sintetizan precursores biológicos cuando hay baja disponibilidad de carbono. Se ha descrito regulación alostérica, transcripcional (Griffin y col., 2002; Kolkman y col., 2005) y regulación positiva durante la fase estacionaria de crecimiento (Kusch y col., 2008). Identificamos tres de las 5 enzimas de este ciclo con abundancia significativa en succinato. Interesantemente, la isocitrato liasa presentó máxima abundancia durante la fase lag y estacionaria en

succinato (Figura 23), indicando que este ciclo es activo para la generación de sustratos a través de la gluconeogénesis.

Identificamos algunas enzimas y metabolitos de la fosforilación oxidativa. El succinato y fumarato provenientes del TCA están aumentados en succinato al igual que las enzimas identificadas (Figura 24). Lo que nos indicaría que debido a una mayor disponibilidad de sustrato en succinato, se observa un aumento de los metabolitos de las vías relacionadas.

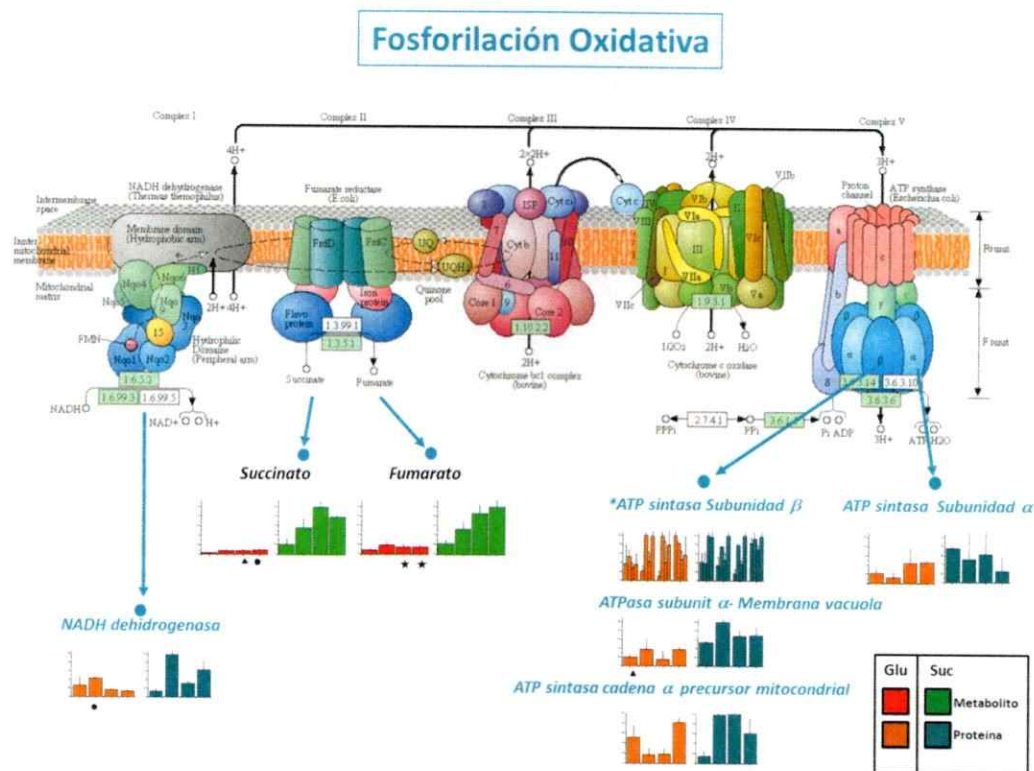


Figura 24. Fosforilación oxidativa. En diagrama de columnas se presenta el valor promedio normalizado a 100 de cada enzima y metabolito en las dos fuentes de carbono durante el crecimiento. Cada columna representa las fases de crecimiento estudiadas, en orden de izquierda a derecha fase lag, exponencial inicial, exponencial tardía y estacionaria correspondientemente. Triángulo valor $p < 0.01$, estrella valor $p < 0.02$ y círculo valor $p < 0.05$. Glu, MM glucosa. Suc, MM succinato. *, proteína en spot múltiple. Los nombres de los metabolitos y enzimas se presentan en letra negra y azul correspondientemente. Adaptado de la base de datos KEGG.

En resumen para el metabolismo de carbohidratos encontramos correspondencia entre los niveles de metabolitos y enzimas identificadas, y estos son producidos con influencia directa de la fuente de carbono empleada. Por esto en las reacciones iniciales de glicólisis, la vía PP, metabolismo de azúcares y fermentación observamos aumento de los metabolitos en glucosa. Para el TCA, las reacciones finales de la glicólisis y la fosforilación oxidativa encontramos que los metabolitos están aumentados en succinato.

3.6.2 Vías de metabolismo de lípidos

Para el análisis del metabolismo de lípidos tenemos información de algunas enzimas relacionadas con el metabolismo de ácidos grasos y glicerofosfolípidos. Teniendo en cuenta que en la técnica de extracción de los metabolitos se emplea metanol, no fue posible obtener metabolitos hidrofóbicos.

Observamos un aumento significativo en la abundancia de las enzimas FAS (sintasa de ácidos grasos) y acil-CoA sintasa en succinato (Figura 25). Resultado que coincide con la tendencia observada en el TCA y sus vías relacionadas, y que se explica porque existe una mayor disponibilidad de acetil-CoA en este medio, el cual se emplearía en la vía de síntesis de ácidos grasos y carotenogénesis.

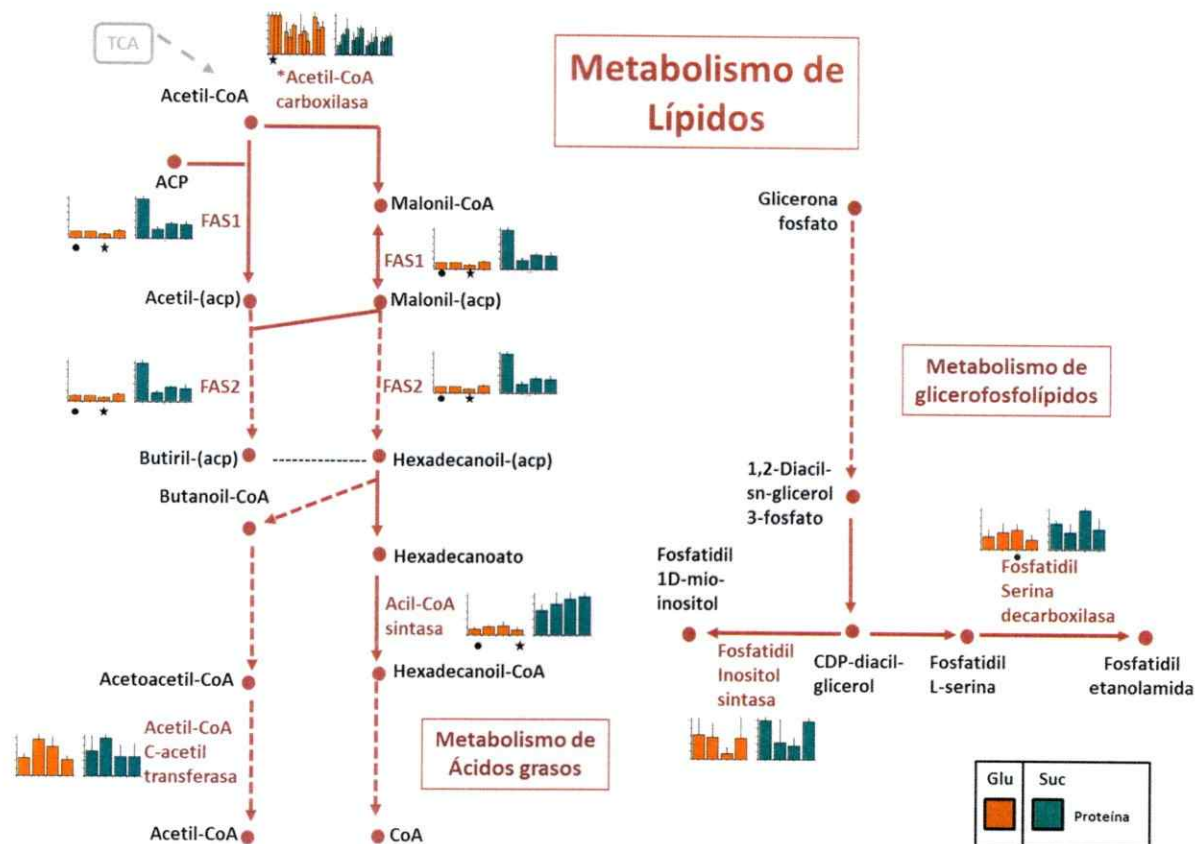


Figura 25. Metabolismo de lípidos. En diagrama de columnas se presenta el valor promedio normalizado a 100 de cada enzima y metabolito en las dos fuentes de carbono durante el crecimiento. Cada columna representa las fases de crecimiento estudiadas, en orden de izquierda a derecha fase lag, exponencial inicial, exponencial tardía y estacionaria correspondientemente. Triángulo valor $p < 0.01$, estrella valor $p < 0.02$ y círculo valor $p < 0.05$. Glu, MM glucosa. Suc, MM succinato. ACP, proteína portadora de acil. CDP, difosfato de citidina. FAS, sintasa de ácidos grasos. TCA, ciclo de los ácidos tricarboxílicos. *, proteína en múltiple spot. Los nombres de los metabolitos y enzimas se presentan en letra negra y café correspondientemente. Adaptado de la base de datos KEGG.

3.6.3 Metabolismo del glutatión

El glutatión (GSH) es un tripéptido no proteínico con función antioxidante. Luego de donar electrones a moléculas inestables se une con otra molécula de glutatión para formar el disulfuro de glutatión (GSSG). El glutatión GSH se puede regenerar por la acción de la glutatión reductasa, enzima principal de la ruta. En nuestros resultados

encontramos mayor abundancia en succinato de la mayoría de las enzimas y metabolitos del glutatión (Figura 26). Lo que sugiere que en esta condición probablemente se aumenta la tasa respiratoria celular, con la generación de ROS que inducirían sistemas de defensa celular como el glutatión y la síntesis de carotenoides (Figura 26).

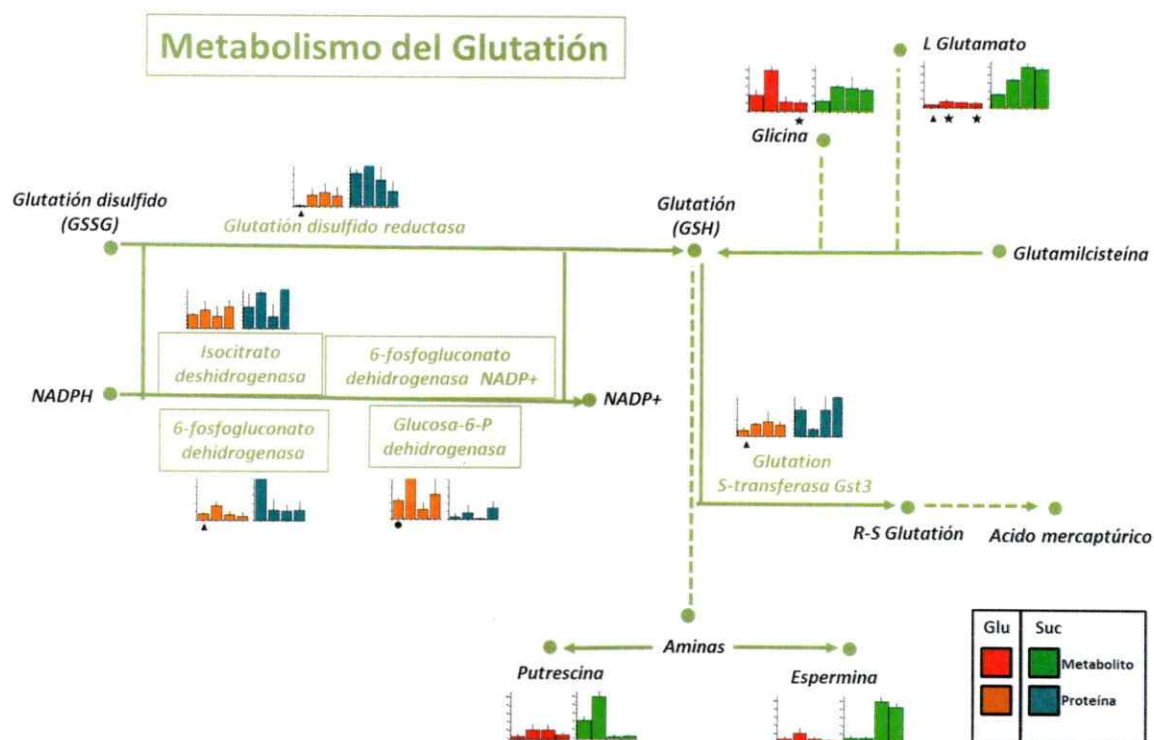


Figura 26. Metabolismo del glutatión. En diagrama de columnas se presenta el valor promedio normalizado a 100 de cada enzima y metabolito en las dos fuentes de carbono durante el crecimiento. Cada columna representa las fases de crecimiento estudiadas, en orden de izquierda a derecha fase lag, exponencial inicial, exponencial tardía y estacionaria correspondientemente. Triángulo valor $p < 0.01$, estrella valor $p < 0.02$ y círculo valor $p < 0.05$. Glu, MM glucosa. Suc, MM succinato. Los nombres de los metabolitos y enzimas se presentan en letra negra y verde correspondientemente. Adaptado de la base de datos KEGG.

3.6.4 Vías de metabolismo de aminoácidos

Observamos que los aminoácidos generados de sustratos provenientes de la vía PP y la glicólisis como β -alanina, cisteína, tirosina, fenilalanina y triptófano (Figura 27) fueron

más abundantes en glucosa, resultado acorde con la mayor abundancia de los metabolitos de esas vías precursoras en medio con glucosa.

Los aminoácidos que son producidos a partir del piruvato como leucina e isoleucina (Figura 27) presentaron similar abundancia en las dos condiciones estudiadas, indicando probablemente la influencia de las vías de glicólisis y gluconeogénesis en la generación de estos aminoácidos.

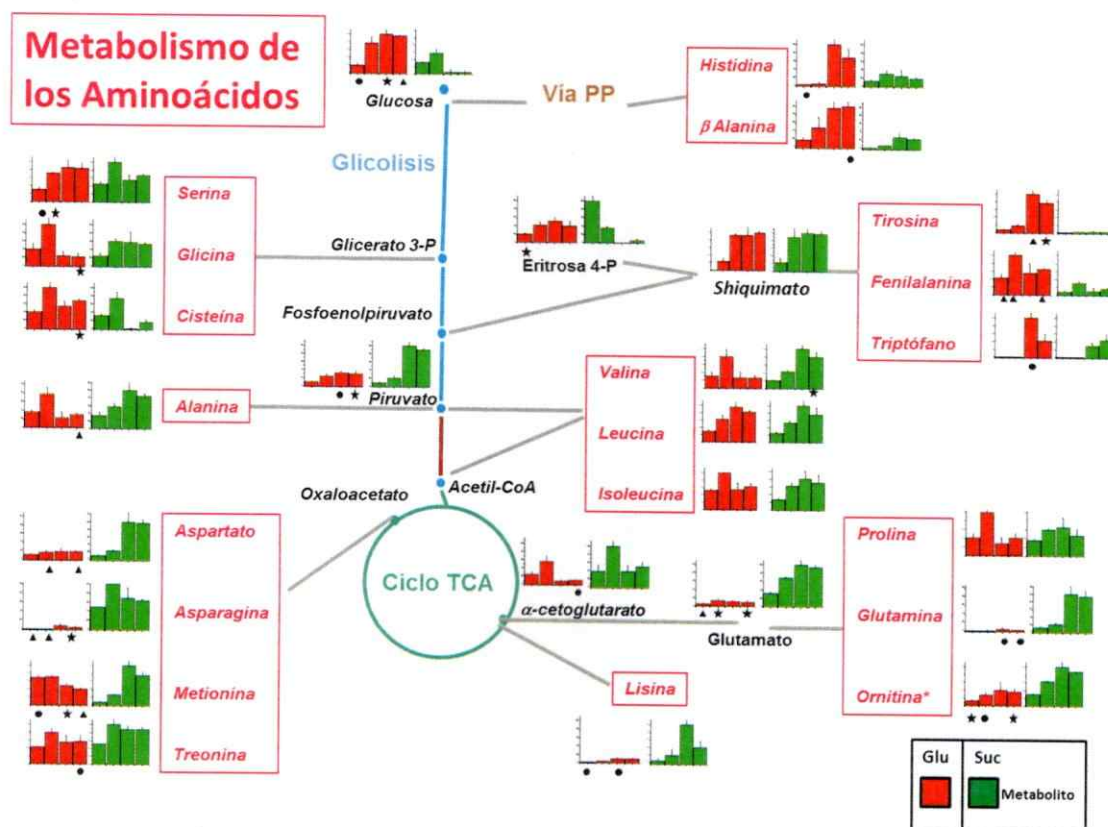


Figura 27. Metabolismo de los aminoácidos. En diagrama de columnas se presenta el valor promedio normalizado a 100 de cada enzima y metabolito en las dos fuentes de carbono durante el crecimiento. Cada columna representa las fases de crecimiento estudiadas, en orden de izquierda a derecha fase lag, exponencial inicial, exponencial tardía y estacionaria correspondientemente. Triángulo valor $p < 0.01$, estrella valor $p < 0.02$ y círculo valor $p < 0.05$. Glu, MM glucosa. Suc, MM succinato. PP, vía de pentosa fosfato. Los nombres de los metabolitos y enzimas se presentan en letra negra y rosa correspondientemente. Adaptado de la base de datos KEGG.

El TCA es fuente importante de sustratos principales para la generación de varios aminoácidos como lisina, aspartato, asparagina, treonina, glutamato, glutamina y arginina. Observamos que acorde con la fuente de carbono empleada, estos aminoácidos presentaron mayor concentración en succinato (Figura 27).

Como resumen respecto al metabolismo de los aminoácidos encontramos que existe una correspondencia entre la abundancia de los aminoácidos identificados y la abundancia de los sustratos necesarios para su síntesis, los cuales fueron previamente detallados en las vías de glicolisis, PP y TCA.

3.6.5 Vía de síntesis de carotenoides y relacionadas

En la síntesis de carotenoides para la levadura se distinguen dos vías, la primera inespecífica denominada del mevalonato que se inicia desde la transformación de acetil-CoA hasta la generación de IPP y la otra específica de la carotenogénesis que se inicia desde GPP hasta la formación de la astaxantina (Figura 28).

Probablemente por la presencia de una mayor cantidad de sustrato acetil-CoA observamos que la MK presentó un aumento notable en succinato. En la vía del mevalonato también identificamos dos enzimas que realizan pasos secuenciales en la formación del IPP, la fosfomevalonato quinasa y la difosfomevalonato decarboxilasa. Analizando la abundancia observada, las dos enzimas son más abundantes en succinato, con datos significativos en la fase exponencial inicial y la fase lag respectivamente (Figura 28).

La enzima escualeno sintasa presentó abundancia significativa durante la fase lag en medio con glucosa. De igual manera las enzimas preniltransferasa y FPS, que realizan reacciones previas a la carotenogénesis presentaron mayor abundancia en glucosa (Figura 28). En la vía específica de la carotenogénesis las enzimas fitoeno escualeno sintasa y fitoeno desaturasa fueron más abundantes en glucosa, sin embargo, la enzima astaxantina sintasa y CPR presentaron mayor concentración en succinato.

En resumen observamos que enzimas de la vía del mevalonato presentaron mayor abundancia en succinato. De otro lado, enzimas que realizan reacciones iniciales para la generación de ergosterol y enzimas que realizan reacciones tempranas específicas de la carotenogénesis se observaron con mayor abundancia en glucosa. Lo que nos lleva a postular que estas enzimas podrían presentar regulación a nivel transcripcional o postraducciona, dado que es en medio con succinato donde se producen más carotenoides. Es decir que la abundancia observada de las enzimas de carotenogénesis no se relaciona directamente con una mayor producción de pigmentos en glucosa.

De acuerdo a nuestros resultados, la mayor cantidad de astaxantina producida en succinato parece depender entre otras de la disponibilidad de sustrato (acetil-CoA) y la abundancia de las enzimas astaxantina sintasa y CPR.

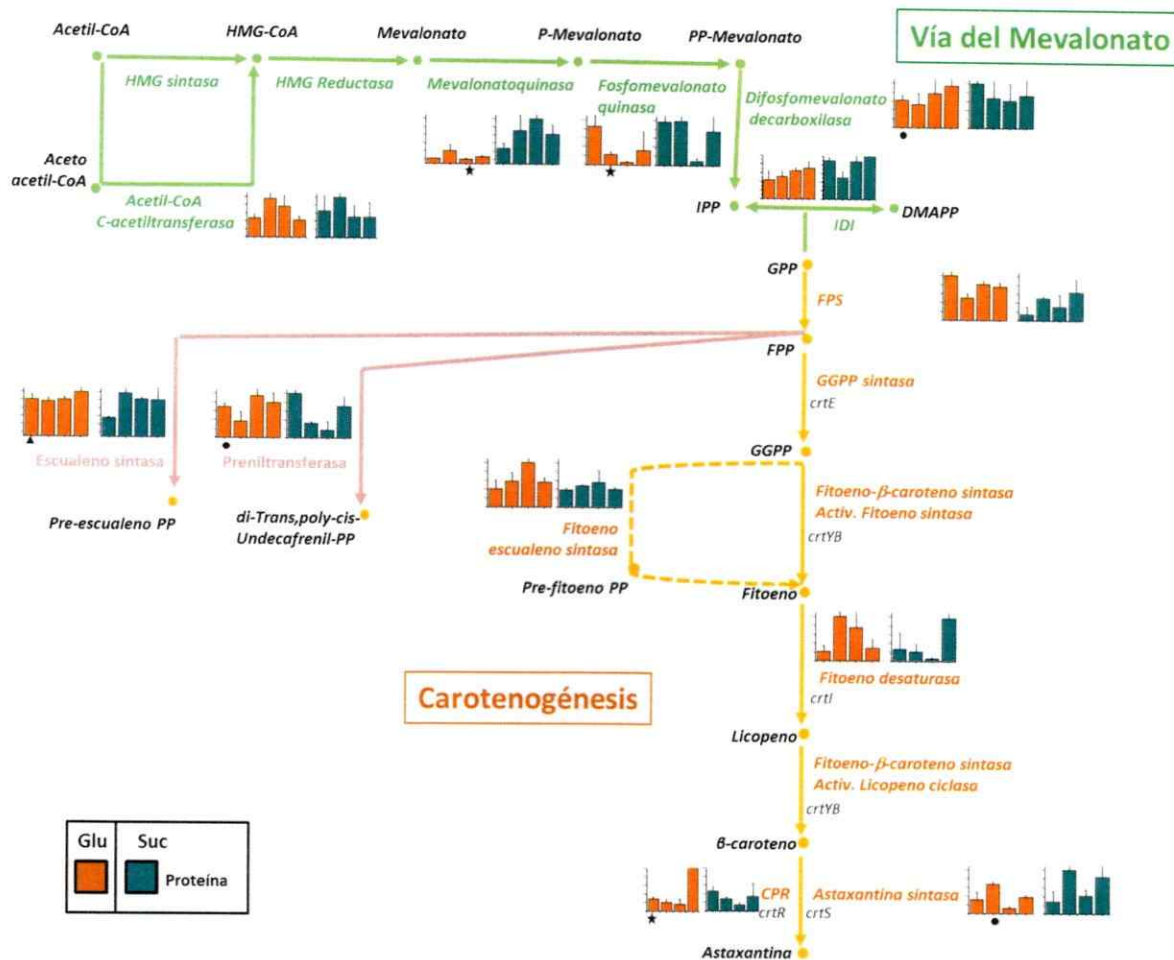


Figura 28. Enzimas de carotenogénesis y vías afines identificadas. En diagrama de columnas se presenta el valor promedio normalizado a 100 de cada enzima y metabolito en las dos fuentes de carbono durante el crecimiento. Cada columna representa las fases de crecimiento estudiadas, en orden de izquierda a derecha fase lag, exponencial inicial, exponencial tardía y estacionaria correspondientemente. Triángulo valor $p < 0.01$, estrella valor $p < 0.02$ y círculo valor $p < 0.05$. Glu, MM glucosa. Suc, MM succinato. HMG, hidroximetilgluratil. CoA, coenzima A. P, fosfato. IPP, isopentenil-pirofosfato. IDI, isopentenil difosfato isomerasa. DMAPP, dimetil-alil pirofosfato. GPP, geranil-pirofosfato. FPP, farnesil pirofosfato. GGPP, geranilgeranil-pirofosfato. CPR, citocromo P450 reductasa. Las enzimas de la ruta del mevalonato y carotenogénesis se presentan en color verde y naranja respectivamente. Los intermediarios y carotenoides están señalados en negro. En cursiva se indica el nombre del gen correspondiente.



4. DISCUSIÓN

4.1 Establecimiento de técnicas OMICS en la levadura *X. dendrorhous*

Teniendo en cuenta el limitado conocimiento del que se dispone en la actualidad acerca de la relación de los principales procesos metabólicos y la carotenogénesis en *X. dendrorhous*, en este estudio se aplicaron algunas de las metodologías denominadas OMICS para tratar de identificar elementos que permitan en un futuro mejorar la producción de astaxantina empleando esta levadura.

Estas metodologías denominadas OMICS se aplican para obtener una visión global de los niveles de expresión de genes, proteínas y metabolitos bajo diversas condiciones de crecimiento en variados organismos (Zhang y col., 2010).

En este trabajo se determinó el perfil de proteínas y metabolitos que se generan durante el crecimiento de la levadura con una fuente de carbono fermentable (glucosa) y una no fermentable (succinato). Para la identificación de las proteínas se empleó 2DE-MALDI TOF y para el perfil de metabolitos GC-MS, dos técnicas comúnmente utilizadas (Kolkman y col., 2005; Hollywood y col., 2006).

Un aspecto fundamental para garantizar resultados representativos y comparables tanto para el análisis de proteómica como el de metabolómica es la integridad del extracto celular (Kolkman y col., 2005). Por esto la ruptura celular fue el primer proceso que se estandarizó, se evaluaron diferentes métodos de disrupción y composición del tampón de lisis. Para las proteínas, logramos determinar que se obtiene menor

degradación y mayor solubilidad partiendo de un extracto celular liofilizado y posteriormente realizando disrupción con perlas de vidrio a bajas temperaturas. En el tampón de lisis empleamos el detergente tritón X-100 y para concentrar el extracto proteico se empleó metanol. Para los metabolitos también empleamos disrupción celular del pellet liofilizado a bajas temperaturas para evitar alta variabilidad en los diferentes replicados de las muestras.

El segundo aspecto fundamental que se evalúa cuando se aplican estas técnicas OMICS es el tratamiento y análisis de datos, debido a que se obtiene mucha información la cual debe ser analizada y clasificada de acuerdo a los objetivos del estudio (Kolkman y col., 2005; Hollywood y col., 2006).

En el caso de proteómica para facilitar el análisis y obtener una base de datos local se realizó un mapa de referencia en el software PDQUEST y además se realizó el análisis de abundancia diferencial de las proteínas. En el caso de los metabolitos, se empleó el software metaboanalist en donde se realizó transformación de los datos para poder establecer comparaciones directas y además se realizó un mapa de color para evidenciar los cambios por grupo funcional.

Con el uso de las herramientas informáticas fue posible tener una visión global del metabolismo de la levadura en las condiciones estudiadas, así como identificar puntos claves donde se pueden aplicar técnicas de ingeniería genética para optimizar la producción del pigmento a nivel industrial.

4.2 Influencia de la fuente de carbono en el metabolismo de la levadura y su relación con la carotenogénesis

En general, cuando se comparan los niveles de metabolitos y proteínas teniendo en cuenta la fase de crecimiento y la fuente de carbono se observa mayor abundancia de las proteínas del metabolismo de carbohidratos y aminoácidos en succinato (Figura 15).

Las levaduras presentan una predilección jerárquica en el consumo de carbohidratos, donde la glucosa o cualquier fuente de carbono fermentable son preferidas frente a otras fuentes como glicerol, etanol, acetato u otros azúcares (Broach, 2012). Acorde con lo anterior, encontramos correspondencia entre el nivel de los metabolitos y las enzimas del metabolismo de azúcares, por ejemplo observamos alta abundancia de las enzimas melibiosa y glucoquinasa y de los metabolitos (D-glucosa, xilosa, fructosa) en glucosa (Figura 19). Excepcionalmente, encontramos que la abundancia de las enzimas xilosa sintasa y melibiasa fue similar en las dos fuentes de carbono (Figura 19). Este resultado indica que en algunas enzimas del metabolismo de azúcares no existe una relación directa entre la cantidad de enzima y el metabolito generado. Debido probablemente al aumento en la actividad enzimática asociada a una mayor disponibilidad de sustrato o por regulación a nivel postraducciona (Broach, 2012).

Además de la predilección en el consumo de carbohidratos, las levaduras presentan las vías oxidativa (respirativa) y fermentativa para metabolizar carbohidratos específicos (Walker, 1998). Dependiendo de la fuente de carbono, se pueden presentar varios escenarios. Con el succinato una fuente de carbono no fermentable, se genera un

crecimiento oxidativo dado que este metabolito es incorporado directamente en el TCA. Comúnmente en presencia de glucosa durante el crecimiento oxidativo, el piruvato producido entra a la mitocondria para ser oxidado a CO_2 y H_2O . Por otra parte, durante el crecimiento fermentativo en glucosa, la glicólisis es la principal fuente de ATP y el piruvato producido se convierte en etanol y CO_2 . Dado que *X. dendrorhous* presenta el fenómeno de Crabtree se observa crecimiento fermentativo en presencia de glucosa y posterior consumo del etanol por la vía aerobia.

Para determinar el efecto de la fuente de carbono en el metabolismo de la levadura se compararon los perfiles de proteínas y metabolitos durante el crecimiento en las vías de glicólisis, PP, TCA, ciclo del glioxilato y metabolismo de lípidos.

En general, encontramos correspondencia entre la fuente de carbono y los metabolitos identificados. En glucosa los metabolitos que participan en las primeras reacciones de la glicólisis y PP fueron más abundantes, mientras que la tendencia opuesta se observó con metabolitos y proteínas del TCA y glioxilato (Figura 20 y 21).

Los aminoácidos que se generan a partir de intermediarios de la glicólisis como isoleucina y leucina presentaron concentraciones muy similares en los dos medios (Figura 27), indicando que tanto la glicólisis como la gluconeogénesis fueron activas en el crecimiento con glucosa y succinato, respectivamente. Consecuentemente, los metabolitos de las reacciones iniciales de la glicólisis aumentaron en glucosa y los metabolitos generados en las reacciones finales aumentaron en succinato, tendencia que

podría reflejar regulación a través de los niveles de la fructosa 1-6 difosfato (Díaz-Ruiz y col., 2008) o la ubiquitinación de las enzimas de gluconeogénesis (Santt y col., 2008).

Las levaduras presentan una regulación compleja de la glicólisis-gluconeogénesis a través del control de la actividad (alosterismo o modificación covalente reversible por la fructosa 2,6-bifosfato), de la cantidad de algunas enzimas (inactivación, represión, desrepresión) o la inducción de genes (Peretó y col., 2007). Además, dependiendo de la fuente de carbono empleada se han observado diferentes patrones de fosforilación en las enzimas de la glicólisis, como un mecanismo de regulación postraduccional (Salusjärvi y col., 2008)

En nuestro estudio encontramos evidencia de algunas de las formas de regulación descritas anteriormente. Las enzimas glucoquinasa, GAPDH y enolasa presentaron mayor abundancia en glucosa (Figura 20), en otras levaduras se había observado una tendencia similar de regulación (Griffin y col., 2002; Kolkman y col., 2005). Adicionalmente, la enzima GAPDH fue identificada en spots múltiples en las dos fuentes de carbono, pero los spots no presentaron un patrón de variación similar (Figura 11), sugiriendo regulación diferencial a través de la fosforilación. En trabajos previos se han identificado otras proteínas del metabolismo de carbohidratos con esta forma de regulación (Kolkman y col., 2005; Weeks y col., 2006; Kusch y col., 2008).

Otra vía fundamental en el metabolismo de carbohidratos, la PP es controlada principalmente por inhibición competitiva de las enzimas a través de los niveles de NADPH y ATP (Celton y col., 2012). También se ha reportado regulación genética en

condiciones de estrés oxidativo (Celton y col., 2012) y regulación postraducciona por fosforilación (Wang y col., 2004; Missall y col., 2006; Braconi y col., 2009). En relación a esta asociación, se ha descrito que la actividad de la vía oxidativa de la PP puede ser usada como una medida sensible del estrés oxidativo en función del porcentaje de O₂ (Cash y col., 2007). En nuestros resultados observamos que varias de las enzimas de la vía oxidativa fueron más abundantes en succinato (Figura 21). Notoriamente los metabolitos y aminoácidos derivados de la PP fueron más abundantes en glucosa (Figura 21 y 27), lo que nos indica el rol de la glucosa 6-P dehidrogenasa en la regulación en la vía y la presencia de mayor concentración de los metabolitos de esta vía durante el crecimiento en glucosa.

Notablemente, la vía PP se constituye como la fuente principal de NADPH para la eliminación de ROS en respuesta al estrés oxidativo (Pandolfi y col., 1995). Incluso las enzimas transcetolasa y transaldolasa se sobreexpresaron para superar la deficiencia de SOD en una mutante de *S. cerevisiae* (Slekar y col., 1996). En nuestros resultados observamos que la fosfoglucomutasa, enzima que además de participar en la vía PP se encuentra en la glicólisis y la síntesis de trehalosa, fue regulada positivamente durante la inducción de la carotenogénesis en los dos medios (Tabla 1 y 2). Interesantemente, se ha observado el aumento de esta enzima relacionado con la generación de NADPH en respuesta al tratamiento con H₂O₂ (Weeks y col., 2006). Teniendo en cuenta que *X. dendrorhous* requiere oxígeno y NADPH durante la carotenogénesis (Lee y col., 2002), nuestros resultados sugieren que el NADPH producido en esta vía metabólica puede ser

requerido para eliminar los ROS en ausencia o bajos niveles de otros mecanismos enzimáticos de defensa.

En las levaduras crabtree-positivo se reprime la vía de respiración y sobre regula la fermentación glucolítica en la presencia de un exceso de glucosa aún bajo condiciones aeróbicas (Askew y col, 2009). Además, se reprimen las vías de asimilación de fuentes de carbono alternativas, se aumenta la formación de ribosomas y se regula el crecimiento celular a través de la regulación post-transcripcional y traduccional (Yin y col., 2003). Interesantemente, en nuestro laboratorio se observó que varios genes de la carotenogénesis *crtl*, *crtYB* y *crtS* son reprimidos por glucosa (Marcoleta y col., 2011).

En general, el fenómeno de represión por glucosa se produce dentro de las primeras horas de crecimiento, en *X. dendrorhous* este efecto se evidencia de 2 a 4 h posteriores a la adición de glucosa y se estimó que a las 8 h los niveles de los genes de respiración regresan a su nivel basal (Marcoleta y col., 2011). Por lo tanto, en este estudio no pudimos observar el cambio diaúxico directamente debido al tiempo de muestreo, pero logramos obtener evidencia del efecto a largo plazo de esa represión, en donde, la glicolisis y la vía PP presentan mayor concentración de metabolitos en glucosa comparado con el TCA o la vía de glioxilato.

El cambio diaúxico presenta una compleja regulación a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional (Griffin y col., 2002; Ohlmeier y col., 2004). Recientemente se identificó la regulación a través de la fosforilación de las enzimas glicolíticas, del TCA y proteínas mitocondriales en respuesta a estrés oxidativo (Missall

y col., 2006; Ohlmeier y col., 2010). En este estudio identificamos varias proteínas en spots múltiples que presentan una movilidad electroforética compatible con la fosforilación, entre las que se destacan la GAPDH (N° 240), α -glucosidasa (N° 231), HSP70 (N° 210), acetil-CoA carboxilasa (N° 190), ATPasa cadena β (N° 180) entre otras (Apéndice 1, Figura 10), indicando un posible rol regulador. Sería recomendable realizar estudios de fosfoproteoma para identificar con una metodología más sensible, las proteínas fosforiladas para establecer una relación entre el efecto de la fuente de carbono en el proteoma a nivel postraduccional y la carotenogénesis.

De otro lado, durante el crecimiento de la levadura con succinato como fuente de carbono se observó el aumento en la concentración de los metabolitos, enzimas y aminoácidos derivados del TCA y glioxilato (Figura 23, 27) y la fosforilación oxidativa (Figura 24). Como se planteó anteriormente el succinato se incorpora directamente en el TCA, por tanto es de esperar que esta vía y las vías relacionadas presenten aumento en los niveles de las enzimas y los metabolitos comparado con lo observado en glucosa.

En *X. dendrorhous* el etanol, una fuente de carbono no fermentable que aumenta la producción de carotenoides. Se postulan varios mecanismos para explicar esta inducción: primero, el etanol se metaboliza generando ROS que probablemente inducen la síntesis de carotenoides; segundo, el acetato producido se transforma en acetil-CoA sustrato para la síntesis de carotenoides (Gu y col., 1997), tercero, el etanol induce la expresión de los genes carotenogénicos *crtYB* y *crtS* (Marcoleta y col., 2011).

En nuestro estudio, empleamos succinato como fuente de carbono no fermentable y observamos que existe mayor abundancia de enzimas y metabolitos en el TCA, las vías relacionadas y además hay mayor producción de carotenoides. Previamente se ha reportado que la adición de succinato aumenta la emisión de H_2O_2 en las mitocondrias generando un aumento en la tasa de respiración (Zoccarato y col., 2007; Starkov, 2008). Por lo tanto, varios mecanismos podrían explicar porque *X. dendrorhous* produce más carotenoides en succinato. Debido a una mayor disponibilidad de sustratos provenientes del TCA en este medio, se aumentaría la tasa respiratoria en la célula lo que conlleva a la generación de mayor cantidad de ROS, los cuales influirían en la síntesis de carotenoides. De un lado, podrían inducir la síntesis de astaxantina para que ejerza su acción antioxidante y/o podrían tener un rol regulador sobre algunas de las enzimas de la ruta de carotenogénesis.

Con respecto al metabolismo de lípidos, se considera que *X. dendrorhous* es una levadura oleaginosa porque tiene la capacidad de acumular lípidos intracelulares hasta en un 40% de su biomasa (Flores-Cotera y col., 2001). Las levaduras oleaginosas se caracterizan por presentar alto flujo de la vía PP y actividad de las enzimas citrato liasa y fosfoacetolasa (Cannizzaro y col., 2004). Adicionalmente, la acumulación de citrato se asocia a la acumulación de lípidos, debido a una baja o ausente actividad de la enzima isocitrato deshidrogenasa en mitocondria. Así el citrato acumulado se transporta al citosol para producir acetil-CoA por la acción de la enzima ATP-citrato liasa (Ratledge, 2002; Beopoulos y col., 2009). En nuestro estudio, observamos similar concentración de las enzimas isocitrato deshidrogenasa y de la ATP-citrato liasa en las dos fuentes de

carbono (Figura 23), pero en cuando a los metabolitos observamos que existe una mayor concentración en succinato (Tabla 4, Figura 23)). Adicionalmente, las enzimas FAS (sintasa de ácido graso) y acil CoA sintasa presentan mayor abundancia en succinato (Figura 25), debido probablemente a una mayor disponibilidad de sustrato acetil-CoA, infortunadamente en esta vía no identificamos intermediarios ya que nuestra metodología sólo determina metabolitos hidrofílicos.

Recientemente, se asoció la alta expresión de los genes carotenogénicos con el bajo contenido de ergosterol y ácidos grasos en una mutante de *X. dendrorhous* (Miao y col., 2011). Se postula que el fenómeno es generado por la acumulación y flujo de acetil-CoA hacia la producción de astaxantina. Correlacionando los resultados observados, se podría inferir que se genera acetil-CoA citosólico con las dos fuentes de carbono por la acción de la ATP-citrato liasa. Sin embargo, existiría mayor disponibilidad de este sustrato en succinato y esto se evidencia por la mayor producción de astaxantina en este medio. En cuanto a la influencia directa en la generación de ergosterol y ácidos grasos en *X. dendrorhous*, solamente tenemos información de la abundancia de las enzimas, por lo tanto sería necesario determinar los niveles de metabolitos hidrofóbicos a través de HPLC o GC-MS bidimensional (Doebbe y col., 2010).

4.3 Disponibilidad de sustrato acetil-CoA y su relación con la carotenogénesis

El Acetil-CoA es un intermediario clave en los procesos celulares, se metaboliza en el núcleo, las mitocondrias, citosol y los peroxisomas. Regula la cromatina a través de

la acetilación de histonas, es precursor de la biosíntesis de ácidos grasos y esteroides (Hynes y Murray, 2010). También es un sustrato esencial para la producción de energía en el TCA, se utiliza en la síntesis de metabolitos C4 por la vía del glioxilato y es el producto final de degradación de lípidos por la β -oxidación. Además, es un elemento importante para la biosíntesis otros metabolitos, biotecnológicamente relevantes, tales como ceras, flavonoides, carotenoides, butanol e isoprenoides (Chen y col., 2012).

Durante el crecimiento en fuentes de carbono glicolíticas, en la mitocondria el piruvato producido se transforma en acetil-CoA por la acción del complejo piruvato deshidrogenasa (PDA). En este estudio, la subunidad α del PDA presenta mayor abundancia en glucosa, con un aumento notable durante la fase lag de crecimiento. De otro lado, en succinato esta enzima presenta una menor abundancia durante el crecimiento comparado con glucosa, sólo presenta un pick durante la fase exponencial final indicando que en esa fase se debe aumentar la síntesis de acetil CoA derivado de sustratos generados en la gluconeogénesis (Figura 22). Dada la importancia de esta enzima en el control del metabolismo energético para la célula se sabe que presenta diversos niveles de regulación, no sólo por abundancia sino también por modificaciones postraduccionales, como fosforilación de la subunidad α (Gey y col., 2008).

En el citoplasma el acetil-CoA se produce en varios microorganismos por la vía piruvato-acetaldehído-acetato, con la acción de las enzimas piruvato decarboxilasa (PDC), acetaldehído dehidrogenasa (ALD) y acetil-CoA sintasa (ACS) (Strijbis y Distel., 2010; Lee y col., 2011). El acetaldehído también puede ser generado a partir de etanol por acción de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH). Esta vía es la principal

fuelle de acetyl-CoA citoplasmático en *S. cerevisiae* (Hynes y Murray, 2010). En hongos la enzima PDC se induce en condiciones aeróbicas (Lee y col., 2011) y en presencia de glucosa en *X. dendrorhous* (Marcoleta y col., 2011). De esta vía en *X. dendrorhous* identificamos la PDC notablemente más abundante en succinato, sin embargo, las enzimas ACS y ADH tuvieron un pick de inducción durante la fase lag y presentaron mayor abundancia durante el crecimiento en glucosa (Figura 22), lo que nos indicaría que al igual que en *S. cerevisiae* durante el crecimiento en glucosa una fuente importante de acetyl-CoA se genera por esta vía.

Otra fuente de acetyl-CoA citoplasmático exclusiva de levaduras oleaginosas, se produce por la enzima ATP-citrato-liasa (ACL) en ausencia de etanol, acetato o ácidos grasos como fuente de carbono (Hynes y Murray, 2010). Este metabolito se emplea en la síntesis de ácidos grasos, en la síntesis de ergosterol y para acetilar histonas en el núcleo (Chypre y col., 2012). En varios hongos es diverso el destino del acetyl-CoA producido por la ACL (Hynes y Murray, 2010; Lee y col., 2011). En *X. dendrorhous* no es clara aún la fuente de acetyl-CoA para la producción de carotenoides aunque se postuló que este se genera principalmente por la ACL, dado que se observó una acumulación de los carotenoides unido a un aumento de la actividad de ACL en presencia de O₂ (Chávez-Cabrera y col., 2010). En nuestro estudio no encontramos cambios significativos en el contenido de la ACL en los dos medios de cultivo (Figura 23). Por lo tanto, según nuestros resultados en las dos fuentes de carbono empleadas hay presencia de la enzima ACL la cual estaría asociada probablemente a una mayor producción de citrato en

mitocondria. Este último sería exportado al citoplasma y allí clivado en acetil-CoA para ser empleado en diferentes vías metabólicas incluida la síntesis de astaxantina.

Como se describió anteriormente uno de los destinos del acetil-CoA citoplasmático es la síntesis de ácidos grasos por la vía malonil-CoA, en donde la enzima acetil-CoA carboxilasa realiza un paso limitante (Lee y col., 2011). La regulación de esta enzima es compleja, ya que se deben controlar los procesos de inhibición de la β -oxidación y la activación de la biosíntesis de lípidos (Hynes y Murray, 2010). En este trabajo encontramos mayor abundancia de esta enzima durante el crecimiento en glucosa comparado con succinato (Figura 25). En un trabajo reciente, se asoció la acumulación de carotenoides con la disminución del contenido de ácidos grasos en *P. rhodozyma* (Miao y col., 2011). Así, según nuestros datos la baja abundancia de esta enzima, observada durante el crecimiento en succinato, podría estar relacionada con un incremento en la disponibilidad de acetil-CoA para la síntesis de carotenoides.

Adicionalmente, identificamos la enzima citoplasmática ATP-citrato sintasa que cataliza la formación del acetil-CoA que se emplea principalmente en la síntesis de ácidos grasos y esteroides. De acuerdo a la base de datos KEGG esta enzima se encuentra en Basidiomicetes y la levadura oleaginosa *Yarrowia lipolytica*. Según nuestros resultados la enzima no presenta cambios significativos de su abundancia en los dos medios de crecimiento (Figura 23). Interesantemente, en un trabajo reciente se encontró que altos niveles de succinato pueden promover el aumento de la actividad de la enzima

citrato sintasa citosólica sin inhibir el crecimiento de la levadura (Lin y col., 2011). Por lo tanto se podría postular que en succinato existe un aumento de las concentraciones de citrato en las mitocondrias, el cual se transporta hacia el citoplasma para la generación de acetil-CoA, sustrato en la síntesis de ácidos grasos y carotenoides.

Finalmente cabe anotar que un aspecto importante en el metabolismo celular es el transporte de sustratos entre diferentes compartimientos subcelulares. Por ejemplo, durante el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables el acetil-CoA generado en el citoplasma debe ser transportado a la mitocondria para incorporarse al TCA; a su vez, es necesaria la presencia del acetil-CoA en el citoplasma para reacciones de biosíntesis de ácidos grasos y la acetilación de proteínas. Existen diferentes vías para la transferencia de las unidades de acetil-CoA a la mitocondria, ya sea mediante la producción de citrato por la citrato sintasa o mediante la lanzadera de acetil-carnitina (Hynes y Murray, 2010). Además, se conoce la lanzadera de citrato-malato o citrato-piruvato para el transporte del acetil-CoA de la mitocondria hacia el citoplasma (Hynes y Murray, 2010). Teniendo en cuenta lo anterior y de acuerdo a nuestros resultados postulamos que en succinato existe mayor disponibilidad de acetil-CoA en el citoplasma. El cual es empleado en la síntesis de carotenoides y la síntesis de ácidos grasos y ergosterol.

En resumen, teniendo en cuenta los resultados anteriormente descritos en *X. dendrorhous* observamos que es importante la producción citosólica de acetil-CoA por diversas vías y esta producción depende de la fuente de carbono empleada, así en glucosa observamos mayor abundancia de enzimas y metabolitos de la vía piruvato-

acetaldehído-acetato producto de la glicolisis y generación de etanol. En succinato, la baja abundancia de la enzima acetil-CoA carboxilasa favorece la síntesis de astaxantina al parecer con una disminución del contenido de los ácidos grasos. Niveles similares de las enzimas ATP-citrato-liasa y ATP-citrato sintasa encontradas durante el crecimiento en las dos fuentes de carbono, corroboran la importancia de la fuente citoplasmática de acetil-CoA para la generación de ácidos grasos y astaxantina.

Interesantemente, en *A. niger* se ha descrito que la actividad de la enzima ACL es mayor que la ACS (Hynes y Murray, 2010). En trabajos futuros en *X. dendrorhous*, sería ideal observar si la abundancia de las enzimas identificadas también da cuenta de su actividad, para poder determinar los blancos de acción en el desarrollo de ingeniería genética a nivel del TCA y rutas alternativas.

4.4 Estrés oxidativo y su relación con la síntesis de astaxantina en *X. dendrorhous*

La acumulación de carotenoides como molécula antioxidante es una estrategia de supervivencia de varios microorganismos (Schroeder y Johnson, 1995). Se ha determinado que el estrés oxidativo estimula la síntesis de carotenoides (Gessler y col., 2007). Se conoce que los ROS degradan membranas celulares, lípidos y actúan como moléculas de señalización intracelular que activan los sistemas de defensa celular, mejorando así la resistencia y adaptación de los microorganismos en ambientes desfavorables (Folch-Mallol., 2004; Gessler y col., 2007; Cáp y col., 2012).

La producción metabólica de ROS es dependiente de la concentración de O₂ (Cash y col., 2007), por lo tanto, se generan endógenamente en las células durante la respiración, la β -oxidación y por la exposición a radiación o metales pesados (Folch-Mallol, 2004).

Se ha observado la producción de ROS en el retículo endoplásmico, la membrana plasmática y peroxisomas (Cash y col., 2007). Sin embargo, en condiciones fisiológicas la fuga de electrones en la cadena respiratoria de la mitocondria es la fuente más importante de ROS en la célula. Así, se ha reportado incluso que un bajo flujo de electrones como 0,15% conduce a la producción de ROS (Cash y col., 2007). En eucariotas superiores, el complejo I y III se han identificado como los principales sitios de generación de superóxido en la mitocondria (Starkov, 2008). *S. cerevisiae* carece de complejo I, pero tiene tres NADH: ubiquinona oxidoreductasa (Herrero y col., 2008). En levaduras la mayor cantidad de H₂O₂ se genera en los peroxisomas durante la β -oxidación, por lo tanto se observan altos niveles de catalasa (Herrero y col., 2008). Contrariamente, en *X. dendrorhous* se ha reportado una ausente o muy baja actividad de esta enzima (Shroeder y Johnson, 1993), por esto se refuerza la idea de que la generación de carotenoides se desarrolla como un mecanismo de detoxificación celular.

Los mecanismos antioxidantes celulares incluyen moléculas no enzimáticas como el glutatión y un sistema enzimático como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (Finkel y Holbrook, 2000). Aparentemente, *X. dendrorhous* presenta bajos niveles de este sistema enzimático de defensa (Schroeder y

Johnson, 1993), de hecho en este trabajo solamente se identificó la enzima MnSOD mitocondrial y algunas enzimas del metabolismo del glutatión (Figura 26).

En medio con glucosa la enzima MnSOD presentó mayor abundancia en la fase exponencial final y continuó disminuyendo durante el crecimiento (Tabla 1). En succinato la enzima fue más abundante durante la fase estacionaria (Tabla 2). Sin embargo, cuando se determinó la relación de esta enzima en succinato/glucosa se observó aumento significativo en glucosa de 30 veces en fase lag y 40 veces en la fase exponencial tardía con respecto a succinato (Tabla 3). Este comportamiento parece relacionarse con la generación de la astaxantina, ya que en glucosa la inducción de la carotenogénesis es un poco más tardía comparada con succinato.

Con respecto a la inducción de las enzimas SOD, en *H. pluvialis* se observó un incremento en la cantidad de CuSOD y modulación de la MnSOD en respuesta al estrés (Wang y col., 2004). Por otra parte, en *Candida albicans* en medio con glucosa la enzima Sod21p (citósólica manganeso dependiente) se detectó sólo en fase estacionaria, mientras que la Sod1p (Cu y Zn- SOD) fue presente sólo en fase exponencial de crecimiento (Kusch y col., 2008). En *S. cerevisiae*, las enzimas Cu, Zn-SOD y Mn-SOD son necesarias durante la fase estacionaria de crecimiento como protección frente al estrés oxidativo. Además, la ausencia de Cu, Zn-SOD en *Blakeslea trispora*, *Phaffia rodozyma* y *N. crassa* apoyan la importancia de los carotenoides como compuestos oxidantes (Gessler y col., 2007). Teniendo en cuenta los antecedentes y los resultados obtenidos se puede sugerir que la regulación de SOD es especie específica y depende de

la fase de crecimiento. En *X. dendrorhous* se relaciona con la inducción de la carotenogénesis y protección de la célula frente a ROS derivados del metabolismo.

En el grupo de proteínas redox y de respuesta a estrés, observamos diferentes patrones de abundancia que se generan antes o durante la inducción de la carotenogénesis. Así, previo a la inducción de la carotenogénesis en las dos fuentes de carbono, encontramos a la deshidrogenasa SDR (spot 5202) y una oxidoreductasa (spot 4401) con mayor abundancia durante la fase lag comparada con la fase exponencial (inicial o final) (tabla 1 y tabla 2). La misma tendencia fue observada en las proteínas NADPH: quinona oxidoreductasa y monooxigenasa putativa (spots 8310 y 5320) en succinato y la Cu-oxidasa, ADH (spots 3606 y 5208) en glucosa (Tabla 2 y 1). Lo que nos indica la necesidad de altos niveles basales de estas enzimas y posteriormente una regulación negativa una vez se induce la carotenogénesis.

Reguladas de forma positiva durante la inducción de la carotenogénesis en glucosa encontramos las proteínas: monooxigenasa (spots 4713 y 5703), la MnSOD (7108) y citocromo P450 (spot 5315) (Tabla 1); igualmente, en succinato durante la fase exponencial temprana se observaron las proteínas: monooxigenasa (spot 4713), citocromo P450 (spot 5315), flavoproteína (spot 8101) y formato dehidrogenasa (spot 4513) (Tabla 2). Dentro de este grupo de proteínas, específicamente la monooxigenasa y la citocromo P450 podrían tener un rol en la inducción de la carotenogénesis independiente de la fuente de carbono. Estas dos proteínas están fuertemente ligadas con la biosíntesis de metabolitos secundarios, incluidos los carotenoides (Lodato y col., 2004; Lodato y col., 2007). Consecuentemente, la enzima CrtS (astaxantina sintasa)

pertenece a la familia de proteínas citocromo P450 (Ojima y col., 2006), y la enzima CPR es una enzima auxiliar para la CrtS durante la síntesis de astaxantina (Alcaíno y col., 2008). Así, tanto la citocromo P450 y la monooxigenasa, podrían realizar reacciones auxiliares durante la síntesis de astaxantina.

En general, cuando se analiza la relación de las proteínas redox y de respuesta a estrés en succinato /glucosa, observamos que las monooxigenasas (spot 4713, 5703 y 5320), Cu-oxidasa (spot 3606), dehidrogenasa SDR (spot 5202) y oxidoreductasa (spot 4310) fueron significativamente más abundantes en succinato (Tabla 3). Este incremento estaría relacionado probablemente con mayor generación de ROS producto del metabolismo celular y la rápida producción de astaxantina en este medio.

En resumen de lo anterior, en este trabajo encontramos evidencia probable de la relación entre el estrés oxidativo y la carotenogénesis en la levadura *X. dendrorhous*. Por una parte, encontramos proteínas previamente identificadas como marcadoras de estrés, reguladas positivamente: la HSP70, NADH dehidrogenasa, tioredoxina peroxidasa TSA2, ATP sintasa α y β , oxidoreductasas, proteína 14-3-3, GADPH y transaldolasa (Wang y col., 2004; Renzone y col., 2005; Weeks y col., 2006; Magherini y col., 2007; Kusch y col., 2008; Braconi y col., 2009). Además, similar a lo observado en trabajos previos, en nuestros resultados (Apéndice 1) algunas de estas proteínas se encontraron en spots múltiples, lo que nos sugiere la presencia de modificación postraducciona asociada a la respuesta a estrés (Weeks y col., 2006; Kusch y col., 2008).

Otro indicador de estrés que encontramos en este trabajo fue la acumulación de trehalosa. Su síntesis se considera como un mecanismo de defensa frente a variadas de condiciones de estrés, como el calor, choque osmótico y presencia de ROS (Weeks y col., 2006; Kusch y col., 2008; Salvadó y col., 2008). El ciclo de trehalosa se ha identificado en diversos organismos incluidos *S. cerevisiae* (Voit, 2003), *S. pombe* (Weeks y col., 2006) y *C. albicans* (Alvarez-Peral y col., 2002). La primera reacción del ciclo es catalizada por la enzima glicolítica fosfoglucomutasa. Interesantemente, en nuestro trabajo esta enzima presentó tanto en glucosa como succinato un aumento en su abundancia que coincide con la inducción de la carotenogénesis (Tabla 1 y 2). Coincidentemente, la trehalosa fue el metabolito más abundante en este estudio. Así, cuando se compara su cantidad (Figuras 16 y 17) en las dos fuentes de carbono, se observa un aumento significativo en succinato durante la fase exponencial tardía y la fase estacionaria. Previamente se ha descrito que además de ser un carbohidrato de reserva, la trehalosa se acumula en respuesta a estrés (Weeks y col., 2006). Su rol de protección frente a ROS se ha demostrado por su capacidad de reducir modificaciones en las proteínas (Nery y col., 2008), estabilizar membranas celulares (Parrou y col., 2005) y reducir la oxidación intracelular cuando la célula es deficiente de SOD (Pereira y col., 2003). Por lo anterior, en este estudio encontramos el aumento significativo de la trehalosa y de las enzimas que median su metabolismo en succinato, como un probable indicativo de estrés.

Por otra parte, un aspecto relacionado con la respuesta a estrés, es el aumento de varias enzimas del metabolismo de carbohidratos. De esta manera se logra redireccionar

el flujo de carbono e inducir la generación de sustratos que instauren la respuesta antioxidante o que activen la producción de sustancias protectoras para la célula. Por ejemplo en *H. pluvialis*, cuando se induce el estrés se aumenta la expresión de forma transiente de varias proteínas de la glicolisis y PP (Wang y col., 2004). Esto muestra que la respuesta temprana a estrés incluye procesos enzimáticos de defensa y además tiene efecto en las vías del metabolismo central, lo que conlleva a la acumulación celular de astaxantina. Para *X. dendrorhous* observamos que la fosfoglucomutasa y la GAPDH se regularon de forma positiva durante la inducción de la carotenogénesis (Tabla 1 y 2).

En *S. pombe*, en respuesta al estrés se observó aumento de las enzimas que catalizan los primeros pasos de la glucólisis incluida la GAPDH, junto con un aumento del flujo de la PP para generar NADPH (Weeks y col., 2006; Ralser y col., 2007). En *S. cerevisiae* existen tres isoformas de GAPDH asociadas a la glicólisis, gluconeogénesis y respuesta a estrés (Valadi y col., 2004). Sin embargo, *C. albicans* solamente posee una GAPDH, lo que sugiere una función dual como enzima glucolítica y gluconeogénica (Kusch y col., 2008). En este trabajo identificamos la GAPDH en spots múltiples, la cual podría estar regulada de forma diferencial dependiente de la fuente de carbono (Tabla 1 y 3).

En *S. cerevisiae* se ha observado la presencia de una respuesta cruzada al estrés, es decir una respuesta común frente a distintas condiciones de estrés (Folch-Mallol y col., 2004). Este fenómeno sugiere que las diversas situaciones de estrés generan conjuntamente una condición hiperoxidante que conduce a la célula a desarrollar un núcleo o core de respuestas a estrés. Este core se ha identificado en *S. cerevisiae*, *S.*

pombe y *C. albicans* (Causton y col., 2001; Chen y col., 2003; Yin y col., 2009). Por ejemplo para *C. albicans* el core está conformado por Adh1, Atp2, Cip1, Eft2, Ssa1 and Ssb1 (Yin y col., 2009). Según nuestros resultados el core para *X. dendrorhous* durante la inducción de la carotenogénesis en glucosa y succinato incluye una monooxigenasa, la enzima citocromo P450, HSPs, fosfoglucomutasa y GAPDH.

Al realizar un paralelo entre los microorganismos carotenogénicos *H. pluvialis* y *X. dendrorhous*, observamos que existen claras diferencias en la inducción de la síntesis de astaxantina. Después de 24 - 48 h de estrés inducido por luz y /o altas concentraciones de sal el alga sufre una serie de transformaciones morfológicas y acumula astaxantina por 12 días (Wang y col., 2004; Vidhyavathi y col., 2008). En *X. dendrorhous*, frente a altas concentraciones de oxígeno la síntesis de astaxantina es inducida en el segundo o tercer día de cultivo (dependiendo la fuente de carbono) y ésta se acumula durante 5 días (Lodato y col., 2004; Lodato y col., 2007). Por lo anterior, es fácil establecer una asociación directa entre el estrés y la carotenogénesis en *H. pluvialis*. Según nuestros resultados, planteamos que es posible establecer una relación entre la síntesis de astaxantina y la respuesta a estrés en *X. dendrorhous*.

Primero, identificamos y determinamos la modulación de los patrones de abundancia de proteínas redox y proteínas relacionadas con estrés antes o durante la inducción de la carotenogénesis. Estas proteínas habían sido previamente identificadas en otros estudios de proteómica relacionados con la respuesta a diferentes tipos de estrés en variados microorganismos. Segundo, la inducción de la síntesis de carotenoides coincidió con la regulación positiva de la enzima fosfoglucomutasa, la cual inicia la síntesis de trehalosa,

carbohidrato que se presentó en gran cantidad en las dos fuentes de carbono y es un indicador de estrés. Tercero, solamente identificamos como sistema enzimático antioxidante clásico la enzima MnSOD. Por esto, postulamos que durante el crecimiento aeróbico con un bajo nivel o en la ausencia de enzimas antioxidantes y una expresión concertada de proteínas relacionadas con el estrés, la carotenogénesis puede ser inducida en *X. dendrorhous* como un mecanismo de protección. Así la astaxantina podría realizar su rol como antioxidante de ROS generados durante el metabolismo celular.

4.5 Carotenogénesis y vías comunes en la levadura

Uno de los objetivos de este trabajo se dirigió a la identificación y determinación de la abundancia de las enzimas de la carotenogénesis en las dos fuentes de carbono, para observar si existía diferencia significativa en su abundancia o la presencia de alguna modificación postraducciona visible en los geles 2D

En total identificamos once proteínas relacionadas con pasos generales o específicos de la carotenogénesis (Apéndice 1). Como se observa en la Figura 1, en la ruta de síntesis de astaxantina podemos identificar dos vías principales: la vía del mevalonato y la vía de carotenogénesis. La primera vía también es precursora para la formación de ergosterol e isoprenoides. Estas moléculas son necesarias para el funcionamiento de la célula en procesos de señalización, mantenimiento de la integridad de las membranas, prenilación y glicosilación de proteínas (Rauthan y Pilon, 2011). La

segunda, es específica de la carotenogénesis y se compone de enzimas solubles y otras ancladas a membrana.

En este trabajo identificamos 4 enzimas de la vía del mevalonato (Figura 28). Se ha descrito en levaduras, que la función de las enzimas de la vía se modula por los niveles de esteroides, además se conoce regulación a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional (Goldstein y Brown, 1990). La principal enzima reguladora de la vía es la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMGR), que cataliza la formación de mevalonato a partir de HMG-CoA (Figura 1). Debido a su importancia, la enzima presenta regulación a nivel transcripcional, traduccional y su concentración es controlada a través de la degradación proteolítica (Rauthan y Pilon, 2011). Recientemente en nuestro laboratorio observamos que el ergosterol regula la expresión del gen *HMGR* en *X. dendrorhous* a través de retroalimentación negativa y de esta manera contribuye en la regulación de la biosíntesis de carotenoides (Loto y col., 2012).

La segunda enzima en importancia en la vía es la mevalonato quinasa (MK), que transforma al mevalonato en fosfomevalonato, su actividad está regulada por retroalimentación negativa por los niveles de geranil pirofosfato, FPP y GGPP (Hinson y col., 1997). En nuestro estudio observamos que en succinato la cantidad de MK es significativamente mayor que en glucosa (Tabla 3). Teniendo en cuenta que esta enzima desempeña un papel preliminar en vías metabólicas comunes (la síntesis de isoprenoides y de ergosterol) no es de extrañar su alta concentración en succinato relacionado con la presencia de una mayor cantidad de sustrato (acetil-CoA).

Según nuestros resultados, la abundancia de la enzima fosfomevalonato quinasa es variable, pero la enzima difosfomevalonato decarboxilasa encargada de generar el precursor IPP mantiene sus niveles relativamente constantes en las dos fuentes de carbono (Figura 28). Esto sugiere que para asegurar la disponibilidad de los diferentes sustratos y mantener la homeostasis celular, esta vía es fuertemente regulada en varios niveles.

En cuanto a la regulación de la carotenogénesis, en *X. dendrorhous* una vez se agota la glucosa se observan máximos niveles de los mRNA de los genes de carotenogénesis (Lodato y col., 2004), opuestamente en succinato no se observó regulación a nivel transcripcional, manteniendo una expresión aparentemente constitutiva (Wozniak y col., 2011). En este estudio observamos que en glucosa la enzima fitoeno / escualeno sintasa presentó mayor abundancia en la fase exponencial final (Tabla 1) durante el tiempo de inducción de la carotenogénesis. Este resultado concuerda con lo observado en glucosa para los genes carotenogénicos (Lodato y col., 2004; Lodato y col., 2007).

También observamos que las enzimas que realizan reacciones tempranas previas a la formación de licopeno presentan mayor concentración en glucosa. Sin embargo, las dos últimas enzimas de la vía, astaxantina sintasa y CPR presentaron abundancia significativa en succinato. Hecho que podría estar relacionado con un mecanismo de regulación transcripcional (Grünwald y col., 2000) o postraducciona.

En resumen, observamos que enzimas de la vía del mevalonato presentan mayor abundancia en succinato hecho relacionado con una mayor disponibilidad de sustrato acetil-CoA en este medio. En cuanto a las enzimas de carotenogénesis encontramos que aquellas que realizan reacciones tempranas en la vía están significativamente aumentadas en glucosa, sin embargo, las dos últimas enzimas de la vía presentaron una abundancia significativa en succinato. Probablemente esta es una de las razones por las que se genera mayor cantidad de astaxantina en esta condición de crecimiento.

5. CONCLUSIONES

- Existe correspondencia entre la abundancia de los metabolitos y las enzimas identificadas dentro de las diferentes vías metabólicas estudiadas. Así, en succinato se encontró mayor abundancia de metabolitos y proteínas del metabolismo de aminoácidos, TCA, fosforilación oxidativa y ciclo del glioxilato. En glucosa, se encontró mayor abundancia de metabolitos y proteínas del metabolismo de azúcares, glicólisis y PP.
- Varias proteínas del metabolismo de carbohidratos y respuesta a estrés (GAPDH, α -glucosidasa, HSP70, acetil-CoA carboxilasa, ATPasa cadena β y una monooxigenasa) se encontraron en spots múltiples en las dos fuentes de carbono.
- En medio con succinato se observó mayor concentración de metabolitos en el TCA, los cuales probablemente aumentan la tasa respiratoria en la célula y correspondientemente generarían ROS. Estos podrían inducir la síntesis de carotenoides como respuesta al estrés celular generado y/o pueden tener un papel regulador sobre las enzimas de la ruta de biosíntesis de astaxantina.
- La relación entre la carotenogénesis y la respuesta a estrés en la levadura se evidencia por la modulación de la abundancia de proteínas redox y de respuesta al estrés durante la inducción de la carotenogénesis. También por la síntesis de trehalosa y su

acumulación que coincidió con la inducción y acumulación de astaxantina. Además, no se identificaron los sistemas enzimáticos clásicos de defensa celular frente al estrés.

- Se identificó un core de proteínas (monooxigenasa, la enzima citocromo P450, HSPs, fosfoglucomutasa y GAPDH) durante la inducción de la carotenogénesis en los dos medios, proteínas que en trabajos previos se regularon positivamente en respuesta al estrés.
- En la síntesis de astaxantina, observamos que las enzimas de la vía del mevalonato fueron más abundantes en succinato. Las enzimas de reacciones iniciales de carotenogénesis fueron más abundantes en glucosa y las de las reacciones finales fueron más abundantes en succinato. Condición que muy probablemente influyó en la generación de una mayor cantidad de astaxantina en succinato.

6. BIBLIOGRAFÍA

Alcaino, J., Barahona, S., Carmona, M., Lozano, C., Marcoleta, A., Niklitschek, M., Sepulveda, D., Baeza, M. y Cifuentes, V. 2008. Cloning of the cytochrome p450 reductase (crtR) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. BMC Microbiol. 8: 169.

Almeida, E.R. y Cerdá-Olmedo, E. 2008. Gene expression in the regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. Curr Genet. 53: 129-37.

Alvarez-Peral, F.J., Zaragoza, O., Pedreno, Y y Argüelles, J.C. 2002. Protective role of trehalose during severe oxidative stress caused by hydrogen peroxide and the adaptive oxidative stress response in *Candida albicans*. Microbiology. 148: 2599-606.

An, G-H., Schuman, D.B. y Johnson, E. 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. Appl. Environ. Microbiol. 55: 116-124.

Andrewes, A., Phaff, J. y Starr, M. 1976. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*. A red-pigmented fermenting yeast. Phytochemistry. 15: 1003-1007.

Askew, C., Sellam, A., Epp, E., Hogues, H., Mullick, A., Nantel, A. y Whiteway, M. 2009. Transcriptional regulation of carbohydrate metabolism in the human pathogen *Candida albicans*. PLoS Pathog. 5: e1000612.

Beopoulos, A., Chardot, T y Nicaud, J.M. 2009. *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. Biochimie. 91: 692-696.

Braconi, D., Bernardini, G., Possenti, S., Laschi, M., Arena, S., Scaloni, A., Geminiani, M., Sotgiu, M y Santucci, A. 2009. Proteomics and redox-proteomics of the effects of herbicides on a wild-type wine *Saccharomyces cerevisiae* strain. J Proteome Res. 8: 256-67.

Britton, G. 1998. Overview of carotenoid biosynthesis. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism. pp 13-147. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlín.

Broach, J.R. 2012. Nutritional control of growth and development in yeast. Genetics. 192: 73-105.

Calo, P., De Miguel, T., Jorge, B. y Vila, T.G. 1995. Mevalonic acid increases transastaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. Biotech Lett. 17: 575-578.

Cannizzaro, C., Christensen, B., Nielsen, J y Stockar. U. 2004. Metabolic network analysis on *Phaffia rhodozyma* yeast using ¹³C-labeled glucose and gas chromatography-mass spectrometry. Metab Eng. 6: 340-51.

Cáp, M., Váchová, L y Palková, Z. 2012. Reactive oxygen species in the signaling and adaptation of multicellular microbial communities. Oxid Med Cell Longev. 2012: 976753.

Cash, T.P., Pan, Y y Simon, M.C. 2007. Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. Free Radic Biol Med. 43: 1219-25.

Causton, H.C., Ren, B., Koh, S.S., Harbison, C.T., Kanin, E., Jennings, E.G., Lee, T.I., True, H.L., Lander, E.S y Young, R.A. 2001. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell.* 12: 323-337.

Celton, M., Sanchez, I., Goelzer, A., Fromion, V., Camarasa, C y Dequin, S. 2012. A comparative transcriptomic, fluxomic and metabolomic analysis of the response of *Saccharomyces cerevisiae* to increases in NADPH oxidation. *BMC Genomics.* 13: 317.

Chávez-Cabrera, C., Flores-Bustamante, Z.R., Marsch, R., Montes, M. del C., Sánchez, S., Cancino-Díaz, J.C. y Flores-Cotera, L.B. 2010. ATP-citrate lyase activity and carotenoid production in batch cultures of *Phaffia rhodozyma* under nitrogen-limited and nonlimited conditions. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85: 1953-60.

Chen, D., Toone, W.M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N y Bähler, J. 2003. Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol. Biol. Cell.* 14: 214-229.

Chen, Y., Siewers, V y Nielsen, J. 2012. Profiling of cytosolic and peroxisomal acetyl-CoA metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One.* 7: e42475.

Chypre, M., Zaidi, N y Smans, K. 2012. ATP-citrate lyase: a mini-review. *Biochem Biophys Res Commun.* 422: 1-4.

de la Fuente, J.L., Rodríguez-Saiz, M., Schleissner, C., Diez, B., Peiro, E. y Barredo, J.L. 2010. High-titer production of astaxanthin by the semi-industrial fermentation of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J Biotechnol.* 148: 144-146.

Díaz-Ruiz, R., Avéret, N., Araiza, D., Pinson, B., Uribe-Carvajal, S., Devin, A y Rigoulet, M. 2008. Mitochondrial oxidative phosphorylation is regulated by fructose 1,6-bisphosphate. A possible role in Crabtree effect induction? *J Biol Chem.* 283: 26948-55.

Domínguez-Bocanegra, A.R., Ponce-Noyola, T. y Torres-Muñoz, J.A. 2007. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 783-791.

Dong, Q.L., Zhao, X.M., Ma, H.W., Xing, X.Y. y Sun, N.X. 2006. Metabolic flux analysis of the two astaxanthin-producing microorganisms *Haematococcus pluvialis* and *Phaffia rhodozyma* in the pure and mixed cultures. *Biotechnol J.1:* 1283-92.

Doebbe, A., Keck, M., La Russa, M., Mussgnug, J.H., Hankamer, B., Tekçe, E., Niehaus, K y Kruse, O. 2010. The interplay of proton, electron, and metabolite supply for photosynthetic H₂ production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem.* 285: 30247-60.

Doud, M.K., Schmidt, M.W., Hines, D., Naumann, C., Kocourek, A., Kashani-Poor, N., Zeidler, R. y Wolf, D.A. 2004. Rapid prefractionation of complex protein lysates with centrifugal membrane adsorber units improves the resolving power of 2D-PAGE-based proteome analysis. *BMC Genomics.*5: 1-7.

Eymann, C., Dreisbach, A., Albrecht, D., Bernhardt, J., Becher, D., Gentner, S., Tam Le, T., Buttner, K., Buurman, G., Scharf, C., Venz, S., Völker, U. y Hecker, M. 2004. A comprehensive proteome map of growing *Bacillus subtilis* cells. *Proteomics.*4: 2849-2876.

Fiehn, O., Kopka, J., Dormann, P., Altmann, T., Trethewey, R.N. y Willmitzer, L. 2000. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat. Biotechnol.* 18: 1157-1161.

Finkel, T y Holbrook, N.J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 408: 239-247.

Flores, C.L., Rodríguez, C., Petit, T. y Gancedo, C. 2000. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 507-529.

Flores-Cotera, L.B., Martín, R. y 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.

Folch-Mallol, J.L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F y Covarrubias Robles, A.A. 2004. The stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev Latinoam Microbiol.* 46: 24-46.

Gao, Z., Meng, C., Zhang, X., Xu, D., Zhao, Y., Wang, Y., Lv, H., Liming, Yang., Chen, L y Ye, N. 2012. Differential expression of carotenogenic genes, associated changes on astaxanthin production and photosynthesis features induced by JA in *H. pluvialis*. *PLoS One.* 7: e42243.

Gessler, N.N., Aver'yanov, A.A y Belozerskaya, T.A. 2007. Reactive oxygen species in regulation of fungal development. *Biochemistry (Mosc).* 72: 1091-109.

Gey, U., Czupalla, C., Hoflack, B., Rödel, G. y Krause-Buchholz, U. 2008. Yeast pyruvate dehydrogenase complex is regulated by a concerted activity of two kinases and two phosphatases. *J Biol Chem.* 283: 9759-67.

Goldstein, J.L y Brown, M.S. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* 343: 425-430.

Griffin, T.J., Gygi, S.P., Ideker, T., Rist, B., Eng, J., Hood, L y Aebersold, R. 2002. Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics.* 1: 323-33.

Grünwald, K., Eckert, M., Hirschberg, J. y Hagen, C. 2000. Phytoene desaturase is localized exclusively in the chloroplast and up-regulated at the mRNA level during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyceae). *Plant Physiol.* 122: 1261-1268.

Gu, W.L., An, G.H. y Johnson, E.A. 1997. Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 19: 114-117.

Hernández, R., Nombela, C., Diez-Orejas, R. y Gil, C. 2004. Two-dimensional reference map of *Candida albicans* hyphal forms. *Proteomics.* 4: 374-382.

Herrero, E., Ros, J., Bellí, G y Cabisco, E. 2008. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta.* 1780: 1217-35.

Hinson, D.D., Chambliss, K.L., Toth, M.J., Tanaka, R.D. y Gibson, K.M. 1997. Posttranslational regulation of mevalonate kinase by intermediates of the cholesterol and nonsterol isoprene biosynthetic pathways. *J Lipid Res.* 38: 2216-2223.

Hirschberg, J. 1998. Molecular biology of carotenoid biosynthesis. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.), *Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism*. pp 149-194. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlín.

Hollywood, K., Brison, D.R. y Goodacre, R. 2006. Metabolomics: current technologies and future trends. *Proteomics*. 6: 4716-23.

Hynes, M.J y Murray, S.L. 2010. ATP-citrate lyase is required for production of cytosolic acetyl coenzyme A and development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell*. 9: 1039-48.

Johnson, E.A. y Schroeder, W. 1995. Astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Stud. Mycol.* 38: 81-90.

Kolkman, A., Olsthoorn, M.M., Heeremans, C.E., Heck, A.J y Slijper, M. 2005. Comparative proteome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* grown in chemostat cultures limited for glucose or ethanol. *Mol Cell Proteom* 4: 1-11.

Koning, W. y van Dam, K. 1992. A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. *Anal. Biochem.* 204: 118-123.

Kusch, H., Engelmann, S., Bode, R., Albrecht, D., Morschhauser, J. y Hecker, M. 2008. A proteomic view of *Candida albicans* yeast cell metabolism in exponential and stationary growth phases. *Int J Med Microbiol.* 298: 291-318.

Lee, S., Son, H., Lee, J., Min, K., Choi, G.J., Kim, J.C y Lee, Y.W. 2011. Functional analyses of two acetyl coenzyme A synthetases in the ascomycete *Gibberella zeae*. *Eukaryot Cell*. 10: 1043-52.

Liaaen-Jensen, S. 1998. Carotenoids in chemosystematics. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.), *Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism*. pp: 217-247. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlín.

Libkind, D., Moliné, M., de García, V., Fontenla, S. y van Broock, M. 2008. Characterization of a novel South American population of the astaxanthin producing yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *J Ind Microbiol Biotechnol.* 35: 151-8.

Libkind, D., Moline, M. y van Broock, M. 2011. Production of the UVB-absorbing compound mycosporine-glutaminol-glucoside by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *FEMS Yeast Res.* 11: 52-9.

Lin, A.P., Anderson, S.L., Minard, K.I y McAlister-Henn, L. 2011. Effects of excess succinate and retrograde control of metabolite accumulation in yeast tricarboxylic cycle mutants. *J Biol Chem.* 286: 33737-46.

Liu, Z.Q., Zhang, J.F., Zheng, Y.G. y Shen, Y.C. 2008. Improvement of astaxanthin production by a newly isolated *Phaffia rhodozyma* mutant with low energy ion beam implantation. *J Appl Microbiol.* 104: 861-872.

Lodato, P., Alcaíno, J., Barahona, S., Retamales, P., Jiménez, A. y Cifuentes, V. 2004. Study of the expression of carotenoid biosynthesis genes in wild type and deregulated strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Ex:*Phaffia rhodozyma*). *Biol Res.* 37: 83-93.

Lodato, P., Alcaíno, J., Barahona, S., Niklitschek, M., Carmona, M., Wozniak, A. Baeza, M., Jiménez, A. y Cifuentes, V. 2007. Expression of the carotenoid biosynthesis genes in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biol. Res.* 40: 73-84.

Lorenz, R.T. y Cysewski, G.R. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *TIBTECH.* 18: 160-167.

Loto, I., Gutiérrez, M.S., Barahona, S., Sepúlveda, D., Martínez-Moya, P., Baeza, M., Cifuentes, V y Alcaíno, J. 2012. Enhancement of carotenoid production by disrupting the C22-sterol desaturase gene (CYP61) in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiol.* 12: 235.

Magherini, F., Tani, C., Gamberi, T., Caselli, A., Bianchi, L., Bini, L. y Modesti, A. 2007. Protein expression profiles in *Saccharomyces cerevisiae* during apoptosis induced by H₂O₂. *Proteomics.* 7: 1434-1445.

Marcoleta A, Niklitschek M, Wozniak A, Lozano C, Alcaíno J, Baeza M, Cifuentes V. 2011. Glucose and ethanol-dependent transcriptional regulation of the astaxanthin biosynthesis pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiol.* 11: 190.

Martínez-Moya, P., Watt, S.A., Niehaus, K., Alcaíno, J., Baeza, M y Cifuentes, V. 2011. Proteomic analysis of the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiol.* 11:131.

Miao, L., Chi, S., Tang, Y., Su, Z., Yin, T., Guan, G y Li, Y. 2011. Astaxanthin biosynthesis is enhanced by high carotenogenic gene expression and decrease of fatty acids and ergosterol in a *Phaffia rhodozyma* mutant strain. *FEMS Yeast Res.* 11: 192-201.

Missall, T.A., Pusateri, M.E., Donlin, M.J., Chambers, K.T., Corbett, J.A y Lodge, J.K. 2006. Posttranslational, translational, and transcriptional responses to nitric oxide stress in *Cryptococcus neoformans*: implications for virulence. *Eukaryot Cell.* 5: 518-29.

Nery, D.C.M., da Silva, C.G., Mariani, D., Fernandes, P.N., Pereira, M.D., Panek, A.D y Eleutherio, E.C.A. 2008 The role of trehalose and its transporter in protection against reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta.* 1780: 1408-1411.

Niklitschek, M., Alcaíno, J., Barahona, S., Sepúlveda, D., Lozano, C., Carmona, M., Marcoleta, A., Martínez, C., Lodato, P., Baeza, M. y Cifuentes, V. 2008. Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biol Res.* 41:93-108.

Ogura, K., Koyama, T. 1998. Enzymatic Aspects of Isoprenoid Chain Elongation. *Chem Rev.* 98: 1263-1276.

Ohlmeier, S., Kastaniotis, A.J., Hiltunen, J.K y Bergmann, U. 2004. The yeast mitochondrial proteome, a study of fermentative and respiratory growth. *J Biol Chem.* 279: 3956-79.

- Ohlmeier, S., Hiltunen, J.K y Bergmann, U. 2010. Protein phosphorylation in mitochondria a study on fermentative and respiratory growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Electrophoresis*. 31: 2869-81.
- Ojima, K., Breitenbach, J., Visser, H., Setoguchi, Y., Tabata, K., Hoshino, T., van den Berg, J. y Sandmann, G. 2006. Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a β -carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. *Mol. Gen. Genomics*. 275: 148-158.
- Pandolfi, P.P., Sonati, F., Rivi, R., Mason, P., Grosveld, F. y 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.
- Parrou, J.L., Jules, M., Beltran, G y François, J. 2005. Acid trehalase in yeasts and filamentous fungi: localization, regulation and physiological function. *FEMS Yeast Res*. 5: 503.
- Pereira, E.J., Panek, A.D y Eleutherio, E.C.A. 2003. Protection against oxidation during dehydration of yeast. *Cell Stress Chaperones*. 8: 120-124.
- Peretó, J., Sendra, R., Pamblanco, M y Bañó, C. 2007. Fundamentos de bioquímica. Coral Barrachina. Universidad de Valencia. Education Serie. 96, pp 376 pág. Valencia, España.
- Ralser, M., Walmelink, M.M., Kowald, A., Gerisch, B., Heeren, G., Struys, E.A., Klipp, E., Jakobs, C., Breitenbach, M., Lehrach, H y Krobitsch, S. 2007. Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *J Biol*. 6:10.
- Ratledge, C. 2002. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochem Soc Trans*. 30: 1047-50.
- Rauthan, M y Pilon, M. 2011. The mevalonate pathway in *C. elegans*. *Lipids Health Dis*. 10: 243-54.
- Renzone, G., D'Ambrosio, C., Arena, S., Rullo, R., Ledda, L., Ferrara, L. y Scaloni, A. 2005. Differential proteomic analysis in the study of prokaryotes stress resistance. *Ann Ist Super Sanita*. 41: 459-468.
- Retamales, P., Hermosilla, G., Leon, R., Martinez, C., Jimenez, A y Cifuentes, V. 2002. Development of the sexual reproductive cycle of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J Microbiol Methods*. 48: 87-93.
- Rodriguez-Saiz, M., de la Fuente, J.L. y Barredo, J.L. 2010. *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. *Appl Microbiol Biotechnol*. 88: 645-658.
- Salusjärvi, L., Kankainen, M., Soliymani, R., Pitkänen, J.P., Penttilä, M y Ruohonen, L. 2008. Regulation of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact*. 7: 18.

- Salvadó, Z., Chiva, R., Rodríguez-Vargas, S., Rández-Gil, F., Mas, A y Guillamón, J.M. 2008. Proteomic evolution of a wine yeast during the first hours of fermentation. *FEMS Yeast Res.* 8: 1137-46.
- Santt, O., Pfirrmann, T., Braun, B., Juretschke, J., Kimmig, P., Scheel, H., Hofmann, K., Thumm, M y Wolf, D.H. 2008. The yeast GID complex, a novel ubiquitin ligase involved in the regulation of carbohydrate metabolism. *Mol Biol Cell.* 19: 3323-33.
- Schmidt, I., Schewe, H., Gassel, S., Jin, C., Buckingham, J., Hümbelin, M., Sandmann, G y Schrader, J. 2011. Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 89: 555-71.
- Schroeder, W.A. y Johnson, E.A. 1993. Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* 139: 907-912.
- Schroeder, W.A. y Johnson, E.A. 1995. Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. *J. Ind. Microbiol.* 14: 502-517.
- Slekar, K.H., Kosman, D.J y Culotta, V.C. 1996. The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. *J Biol Chem.* 271: 28831-6.
- Starkov, A.A. 2008. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann N Y Acad Sci.* 1147: 37-52.
- Strijbis, K y Distel, B. 2010. Intracellular acetyl unit transport in fungal carbon metabolism. *Eukaryot Cell.* 9: 1809-15.
- Valadi, H., Valadi, A., Ansell, R., Gustafsson, L., Adler, L., Norbeck, J., Blomberg, A., 2004. NADH-reductive stress in *Saccharomyces cerevisiae* induces the expression of the minor isoform of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (TDH1). *Curr. Genet.* 45: 90-95.
- van den Berg, R.A., Hoefsloot, H.C., Westerhuis, J.A., Smilde, A.K., van der Werf, M.J. 2006. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics.* 7: 142.
- Verdoes, J., Sandmann, G., Visser, H., Díaz, M., Van Mossel, M. y Van Ooyen, A. 2003. Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3278-3738.
- Vidhyavathi, R., Venkatachalam, L., Sarada, R. y Ravishankar, G.A. 2008. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *J Exp Bot.* 59: 1409-18.
- Visser, H., van Ooyen, A.J. y Verdoes, J.C. 2003. Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *FEMS Yeast Res.* 4: 221-231.
- Voit, E.O. 2003. Biochemical and genomic regulation of the trehalose cycle in yeast: review of observations and canonical model analysis. *J Theor Biol.* 223: 55-78.

Walker, G.M. 1998. Yeast Metabolism. In *Yeast Physiology and Biotechnology*. 5, pp.202-264. John Wiley & Sons, Inc., NY.Ch.

Wang, S.B., Chen, F., Sommerfeld, M. y Hu, Q. 2004. Proteomic analysis of molecular response to oxidative stress by the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Planta*.220: 17-29.

Weber, R.W., Becerra, J., Silva, M.J. y Davoli, P. 2008. An unusual *Xanthophyllomyces* strain from leaves of *Eucalyptus globulus* in Chile. *Mycol Res*. 112:861-7.

Weeks, M. E., Sinclair, J., Butt, A., Chung, Y.L., Worthington, J.L., Wilkinson, C.R., Griffiths, J., Jones, N., Waterfield, M.D y Timms, J.F. 2006. A parallel proteomic and metabolomic analysis of the hydrogen peroxide- and Sty1p-dependent stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proteomics*.6: 2772-2796.

Werck-Reichhart, D y Feyereisen, R. 2000. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol*. 1: 1-9.

Wozniak, A., Lozano, C., Barahona, S., Niklitschek, M., Marcoleta, A., Alcaíno, J., Sepulveda, D., Baeza, M. y Cifuentes, V. 2011. Differential carotenoid production and gene expression in *Xanthophyllomyces dendrorhous* grown in a nonfermentable carbon source. *FEMS Yeast Res*. 11: 252-62.

Yamane, Y.I., Higashida, K., Nakashimada, Y., Kakizono, T. y 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.

Yin, Z., Wilson, S., Hauser, N.C., Tournu, H., Hoheisel, J.D y Brown, A.J. 2003. Glucose triggers different global responses in yeast, depending on the strength of the signal, and transiently stabilizes ribosomal protein mRNAs. *Mol Microbiol*. 48: 713-24.

Yin, Z., Stead, D., Walker, J., Selway, L., Smith, D.A., Brown, A.J y Quinn, J. 2009. A proteomic analysis of the salt, cadmium and peroxide stress responses in *Candida albicans* and the role of the Hog1 stress-activated MAPK in regulating the stress-induced proteome. *Proteomics*. 9: 4686-703.

Yuan, J.P., Peng, J., Yin, K y Wang, J.H. 2011. Potential health-promoting effects of astaxanthin: a high-value carotenoid mostly from microalgae. *Mol Nutr Food Res*. 55: 150-65.

Zhang, W., Li, F., y Nie, L. 2010. Integrating multiple 'omics' analysis for microbial biology: application and methodologies. *Microbiology* 156: 287-301.

Zoccarato, F., Cavallini, L., Bortolami, S y Alexandre, A. 2007. Succinate modulation of H₂O₂ release at NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) in brain mitochondria. *Biochem. J*. 406: 125-129.

APÉNDICE 1. Proteínas of *X. dendrorhous* identificadas por MALDI-TOF MS

Nº	ID	V	P	%	Nombre	L	Especie	SSP	Mr/pi	
									Teórico	Exp.
Transporte y proteínas motoras										
1	19112071	60	5	5	Cotamero subunidad alfa, putativa	M	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	6806	137.42/5.76	122.57/6.15
		57	5	5				6813		122.55/6.23
		46	4	3				6818		122.54/6.24
2	121792722	65	8	9	Proteína asociada a miosina	-	<i>Chaetomium globosum</i>	8703	107.26/8.01	107.21/7.70
		64	9	10				8711		107.26/8.30
3	46099667	67	8	10	Proteína de transporte de Golgi	M	<i>Ustilago maydis</i>	5719	124.27/6.17	101.09/6.07
		52	5	7				5728		101.94/5.92
		73	8	10				6703		100.63/6.14
4	151941363	52	12	9	Miosina V	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1815	169.94/7.31	109.52/5.32
		62	12	11				1816		109.41/5.31
		56	11	11				1817		109.40/5.31
5	70997653	90	7	12	Proteína Sec1	-	<i>Aspergillus fumigatus</i>	6722	76.29/8.03	86.39/6.23
6	156063588	57	12	16	SS1G_01912	-	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	2703	97.47/9.14	76.08/5.34
		55	11	15				2707		76.53/5.33
		64	13	17				2712		76.27/5.35
7	190407814	68	14	15	Transportador ABC (ácidos grasos)	M	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6613	100.39/9.53	61.94/6.25
8	49650784	56	6	7	KIP1 proteína relacionada a quinesina	-	<i>Yarrowia lipolytica</i>	7403	109.59/8.16	45.58/6.39
		51	7	10				7408		45.36/6.46
9	85110027	56	4	16	Proteína carrier ADP,ATP	M	<i>Neurospora crassa</i>	8412	33.98/9.84	45.89/7.59
10	50547781	54	6	12	Componente deGolgi	-	<i>Yarrowia lipolytica</i>	5520	78.90/5.68	52.33/6.03
11	1703157	145	10	46	Actina	-	<i>Phaffia rhodozyma</i>	3305	41.93/5.38	41.94/5.38
12	164426677	64	20	10	Fimbrina	-	<i>Neurospora crassa</i>	5201	61.50/5.77	34.00/5.81
13	83770850	68	5	19	Carrier oxodicarboxilato mitocondrial	M	<i>Aspergillus oryzae</i>	3330 ^a	31.32/9.96	40.42/5.40
14	116191247	68	8	25	Transportador transmembrana (sideroforo)	-	<i>Chaetomium globosum</i>	5519	45.70/8.96	52.53/5.85
15	74582611	65	8	43	Proteína vacuolar 25	-	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	7804	20.83/7.71	108.56/6.27
16	74585578	74	13	9	Proteína NUM1	-	<i>Candida albicans</i>	8301	173.08/5.42	41.34/6.84

17	74693759	52	3	11	Transportador transmembrana de metales	M	<i>Ashbya gossypii</i>	3330 ^b	43.60/5.78	40.42/5.40
18	s6_c1087_p2	77	6	25	Porina 3, putativa	M	<i>X. dendrorhous</i>	9210	30.78/9.13	34.40/9.70
19	'6934202	52	5	14	Beta-tubulina 1	-	<i>Spiromyces minutus</i> .	6603 ^a	43.17/5.37	67.15/6.15
20	cDNA6_c9170	70	6	14	Alfa-tubulina	-	<i>X. dendrorhous</i>	2503	45.45/4.89	63.80/5.30
21	cDNA5_c9584	53	9	19	Proteína de membrana vacuolar	M	<i>X. dendrorhous</i>	6413	61.71/9.31	45.50/6.30
22	cDNA5_c8096	51	4	61	Chaperona de quitin sintasa	M	<i>X. dendrorhous</i>	1004	8.80/9.99	10.60/5.30
23	cDNA5_c9597	59	11	23	Transportador de Coenzima A	-	<i>X. dendrorhous</i>	4405	49.55/10.19	49.00/5.60
24	cDNA5_c2239	94	8	10	Permeasa neutral de aminoácidos	M	<i>X. dendrorhous</i>	7807	100.9/10.05	109.30/6.30

Procesamiento y transducción de señales

25	226287371	50	6	15	Regulador negativo del sistema PHO	-	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	5515	53.42/7.03	53.61/6.10
26	130710	60	5	12	Serina/treonina fosfatasa PP1-1	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3717	35.53/5.23	107.99/5.42
		63	4	10				3718		108.00/5.39
		65	4	15				3808		108.15/5.49
		49	5	19				3814		108.14/5.52
		58	8	26				3815		108.11/5.45
		54	6	14				3816		108.19/5.38
27	74626964	68	7	14	Nucleótido fosfodiesterasa	-	<i>Candida albicans</i>	5724	66.07/5.87	79.30/6.10
28	6324708	66	7	23	Proteína BAG7 Rho-GTPasa	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8605	46.30/6.66	57.74/8.21
29	cDNA5_c7972	100	8	45	14-3-3	-	<i>X. dendrorhous</i>	0126	21.03/5.45	29.20/4.65
		66	5	30		-		0127		29.10/4.56
		51	4	23		-		0128		29.00/4.30
30	74670489	76	15	10	Proteína GTPasa	-	<i>Aspergillus fumigatus</i>	8502	142.88/7.38	59.96/6.90
31	74683137	58	10	17	Proteína quinasa	-	<i>Cryptococcus neoformans</i>	2321 ^a	64.11/5.40	40.04/5.35

Traducción y regulación de la traducción

32	121787153	62	6	28	Proteína ribosomal L15	-	<i>Chaetomium globosum</i>	9206	32.84/10.21	35.60/10.10
33	70989247	55	4	27	Serina proteasa alcalina	-	<i>Aspergillus fumigatus</i>	5207	13.60/9.72	34.96/6.05
34	68469184	73	9	19	Proteína ribosomal L5 (60S)	-	<i>Candida albicans</i>	7304	34.48/7.08	40.18/6.38
35	50419303	73	8	26	Proteína PXR1	-	<i>Debaryomyces hansenii</i>	8104	37.01/9.87	22.46/7.28
36	119397404	64	6	16	Iniciador de la traducción factor 3 sub. H	-	<i>Aspergillus clavatus</i>	5417	41.26/5.96	47.08/5.81
37	156057585	51	4	24	Proteína nuclear GSP1/Ran	-	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	5105	24.72/6.53	29.04/6.04

38	cDNA5_c9778	169	18	45	Factor de elongación gamma 1	-	<i>X. dendrorhous</i>	2406	55.24/5.60	49.70/5.40
39	cDNA5_c7663	51	4	40	Proteína ribosomal L31 Sub. 60S	-	<i>X. dendrorhous</i>	7112	20.70/10.20	20.30/6.40
40	cDNA5_c1969	57	8	22	Proteína ribosomal S5 dominio 2	-	<i>X. dendrorhous</i>	7308	38.50/9.22	40.30/6.40
41	cDNA6_c7649	61	7	12	Aspartato-tRNA ligasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	4614	68.81/5.38	66.90/5.70
42	cDNA6_c6437	57	4	65	Proteína de unión a SsrA	-	<i>X. dendrorhous</i>	4005	9.49/10.45	19.50/5.80
43	cDNA6_c8616	53	9	23	tRNA adenililtransferasa, putativa	-	<i>X. dendrorhous</i>	6412	49.17/9.46	47.00/6.20

Transcripción y regulación de la transcrip.

44	74702348	60	4	32	RNasa H	-	<i>Ustilago maydis</i>	2215	13.00/10.18	32.26/5.33
45	73918962	60	6	26	Pre-mRNA-factor de splicing	-	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	4411	21.41/6.85	44.66/5.76
46	417834	52	5	8	Complejo SWI/SNF subunidad SWI3	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4810	92.87/4.78	111.94/5.72
47	731707	53	8	9	Histona H3 lisina-4	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6812	124.57/9.06	124.80/6.20
48	158564282	62	10	11	Mediador transcripción RNA polimerasa II	-	<i>Aspergillus oryzae</i>	7815	123.92/9.01	109.01/6.40
49	160380613	56	9	17	RNA helicasa dbp3 ATP-dependiente	-	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	4606	65.50/8.96	61.28/5.64
50	88185298	77	8	18	DNA helicasa	-	<i>Chaetomium globosum</i>	6701	67.64/5.88	76.77/6.07
		65	7	17				6707		76.24/6.12
51	160380696	52	4	8	RNA helicasa dbp9 ATP-dependiente	-	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	3613	67.51/9.16	64.04/5.50
52	74692018	55	7	11	AGL075Cp	-	<i>Ashbya gossypii</i>	4608	67.50/8.17	66.05/5.75
53	s5_c2133_p	44	8	7	Factor de transcripción RNA polimerasa II	-	<i>X. dendrorhous</i>	4812	133.93/5.88	118.50/5.60
54	cDNA5_c7935	76	8	32	Proteína de unión a poliadenilato	-	<i>X. dendrorhous</i>	4117	37.50/5.72	31.80/5.70
55	cDNA6_c7939	61	8	33	Factor de transcripción RfeF, putativo	-	<i>X. dendrorhous</i>	6411	48.25/6.10	48.70/6.20

Replicación y reparación

56	189041663	55	8	14	Proteína ZIP2	-	<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>	4708	85.60/7.77	78.68/5.65
57	48474713	50	7	13	Proteína MUG 72	-	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	4408 ^a	62.80/8.92	43.63/5.68
58	74676175	69	12	24	DNA polimerasa alfa	-	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	8503	75.35/6.74	52.83/7.11
59	74630069	70	8	11	DNA helicasa (replicación)	-	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	8304	108.05/5.87	41.38/7.19
60	74583120	51	7	36	G4P04 (Fragmento)	-	<i>Emericella nidulans</i>	3228	24.32/8.97	34.64/5.44
61	61214661	50	3	20	Proteína PSF3	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1213	21.99/5.13	39.22/5.31
62	88181130	87	12	17	Exonucleasa V, subunidad alfa	-	<i>Chaetomium globosum</i>	9209	43.71/9.62	35.39/9.44
63	58258539	74	6	24	Ribonucleasa H	-	<i>Cryptococcus neoformans</i>	8001	35.55/5.85	17.80/6.60
64	s6_c1236_p	43	12	12	DNA topoisomerasa II	-	<i>X. dendrorhous</i>	6811	166.80/8.09	118.80/6.27

65	s6_c1477_p1	41	6	15	Proteína 25-control division celular	M	<i>X. dendrorhous</i>	7711	75.20/9.43	72.30/6.38
66	s6_c7188_p1	43	10	14	Proteína Ku80	-	<i>X. dendrorhous</i>	4725	94.60/5.10	105.50/5.70
67	s5_c9012_p	41	9	8	DNA helicasa ATP-dependiente	-	<i>X. dendrorhous</i>	5607	127.47/6.61	67.20/6.10
68	s5_c863_p	48	14	10	RNA polimerasa I	-	<i>X. dendrorhous</i>	7810	182.28/6.26	129.50/6.30
69	s5_c6133_p	47	12	12	DNA polimerasa gamma	-	<i>X. dendrorhous</i>	8506	61.88/9.51	57.70/8.20
70	s6_c11128_p	41	13	9	Histona acetiltransferasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	7515	164.57/6.71	61.00/6.40
71	cDNA6_c7912	55	9	14	Subunidad del complejo histona acetilasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	6728	84.29/9.58	86.00/6.30
72	cDNA6_c3599	54	7	25	Proteína de reparación de DNA	-	<i>X. dendrorhous</i>	8210	39.27/9.73	35.60/7.50
73	xa5_c2079_p	50	7	13	Proteína de reparación de DNA, flia SNF2	-	<i>X. dendrorhous</i>	2716	86.14/8.50	79.30/5.40
74	s5_c6133_p	47	12	8	DNA polimerasa gamma	-	<i>X. dendrorhous</i>	7211	164.78/8.79	36.9/6.40
75	cDNA5_c5428	50	4	51	Proteína DNA polimerasa putativa	-	<i>X. dendrorhous</i>	1107	9.86/4.87	29.40/5.30
76	cDNA6_c335	49	5	52	Probable proteína de la flia ftsK/SpoIIIE	M	<i>X. dendrorhous</i>	8045	9.40/12.27	16.00/8.00
77	cDNA5_c8002	52	4	29	Proteína nuclear RAN de union a GTP	-	<i>X. dendrorhous</i>	7109	24.41/8.99	31.20/6.50

Procesamiento de la información genética

78	73921582	51	5	11	Proteasa palB/RIM13 similar a Calpaína	-	<i>Aspergillus oryzae</i>	4803	96.09/5.93	106.07/5.62
		51	5	11				4806		105.94/5.91
79	187978707	85	12	8	Metalopeptidasa	-	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	4712	118.87/4.99	78.36/5.76
80	169850970	83	8	11	Endopeptidasa Cisteina-tipo	-	<i>Coprinopsis cinerea okayama</i>	7602	81.31/5.46	63.49/6.28
81	74700737	51	6	13	ATP-Chaperona	-	<i>Ustilago maydis</i>	5602	60.13/5.71	61.65/5.91
82	74668029	51	5	8	Aspartil aminopeptidasa	-	<i>Aspergillus fumigatus</i>	5322	56.33/6.61	40.04/5.90
83	52000792	63	8	14	Proteína T-complejo 1 subunidad delta	-	<i>Candida glabrata</i>	4516	57.60/6.51	57.50/5.68
84	70987446	61	4	18	Serina/treonina quinasa Kin28	-	<i>Aspergillus fumigatus</i>	7528	45.22/6.03	58.74/6.53
85	74589431	56	5	10	26S proteasoma subunidad Rpn6p	-	<i>Candida albicans</i>	5601 ^a	49.52/5.85	62.80/5.89
86	58262290	60	16	19	Ubiquitina-proteína ligasa	-	<i>Cryptococcus neoformans</i>	7510 ^a	88.93/7.92	61.20/6.30
87	240275849	54	4	15	Proteína quinasa	-	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	2107	47.44/5.98	31.32/5.37
88	s6_c1168_p	47	11	13	Proteína de polaridad celular	M	<i>X. dendrorhous</i>	3805	172.79/5.93	115.10/5.40
89	731907	60	4	15	Proteína 1 similar a DnaJ	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2310	48.65/5.12	42.33/5.36
90	145233309	77	6	17	Proteína complejo-T subunidad gamma	-	<i>Aspergillus niger</i>	3229	59.00/5.81	39.27/5.46
91	cDNA5_c7067	146	16	45	HSP 60	-	<i>X. dendrorhous</i>	2603	44.15/8.410	47.90/7.90
		102	9	23		-		2625		47.86/7.87

92	cDNA6_c8249	56	6	10	Proteína 1 del complejo T	-	<i>X. dendrorhous</i>	4604	73.50/9.13	66.20/5.60
93	xa5_c9457_p1	213	25	30	HSP, putativa	-	<i>X. dendrorhous</i>	2813	85.86/5.13	109.70/5.40
94	cDNA5_c7020	103	16	27	HSP hipotética	-	<i>X. dendrorhous</i>	5723	84.96/6.31	86.70/6.10
95	xa5_c1685_p	47	4	5	Serina/treonina-proteína quinasa nrc-2	-	<i>X. dendrorhous</i>	7624	83.49/9.31	65.30/6.30
96	cDNA5_c7855	117	4	26	Peptidasa de procesamiento mitocondrial	-	<i>X. dendrorhous</i>	4115	51.97/8.89	26.90/5.50
97	cDNA5_c3491	49	4	21	Homólogo DnaJ Subflia A	-	<i>X. dendrorhous</i>	8208	30.96/9.64	33.90/7.20
98	cDNA5_c7066	172	15	41	Peptidasa M16	-	<i>X. dendrorhous</i>	6401	46.65/7.79	44.50/6.20
99	cDNA6_c9119	50	4	40	HSP90 co-chaperona Cdc37		<i>X. dendrorhous</i>	9031	16.69/11.67	19.90/9.60
100	cDNA6_c4724	51	5	30	Nucleosido trifosfato hidrolasa		<i>X. dendrorhous</i>	4112	14.04/10.50	21.40/5.60
101	cDNA6_c6161	49	6	9	Proteína quinasa Fuz7		<i>X. dendrorhous</i>	6727	80.49/5.23	85.30/6.20
Metabolismo redox										
102	302416885	53	6	19	Disulfido-isomerasa erp38	-	<i>Verticillium albo-atrum</i>	7310	39.88/6.86	39.74/6.28
103	119413925	68	9	23	Monooxigenasa	-	<i>Neosartorya fischeri</i>	4713	49.01/6.32	87.24/5.80
		73	9	23		-		5703		87.14/5.91
104	121928042	64	8	24	Coenzima N5 F420-dependiente	-	<i>Aspergillus oryzae</i>	7530	52.08/5.58	51.37/6.59
105	121792603	60	7	23	Oxidoreductasa	-	<i>Chaetomium globosum</i>	4401	35.99/9.41	43.95/5.54
106	74680537	58	5	8	Cu-oxidasa	-	<i>Emericella nidulans</i>	3606	76.11/5.4	67.83/5.39
107	33313426	135	11	41	Alcohol deshidrogenasa	-	<i>Phaffia rhodozyma</i>	5208	39.06/6.07	39.06/6.07
108	121797391	58	6	23	Dehidrogenasa SDR	-	<i>Aspergillus oryzae</i>	5202	27.70/5.57	37.47/5.87
109	14134949	50	4	15	Mn superóxido dismutasa (MnSOD)	-	<i>Phaffia rhodozyma</i>	7108	22.12/6.43	22.12/6.43
110	121800584	52	5	21	Flavoproteína que transfiere electrones	-	<i>Aspergillus oryzae</i>	8101	28.23/8.98	30.32/5.49
111	154313430	77	9	22	Oxidoreductasa	-	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	6515	46.56/6.34	53.45/6.25
112	156053626	65	5	25	NADPH:quinona oxidoreductasa	-	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	8310	36.99/8.82	41.36/7.66
113	74680498	68	6	18	Proteína citocromo P450	M	<i>Emericella nidulans</i>	5315	52.86/8.61	39.80/6.07
114	261197676	62	7	23	Oxidoreductasa (NAD)	-	<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	3403	39.81/6.51	44.96/5.46
115	2499475	53	4	28	Peroxiredoxina TSA2	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7105	21.71/6.74	30.37/7.91
116	146415847	59	5	22	Formato dehidrogenasa NAP+	-	<i>Pichia guilliermondii</i>	4513	42.16/6.08	56.99/5.54
117	74632761	56	5	16	YAL10F09097p	-	<i>Yarrowia lipolytica</i>	4310	38.16/5.36	40.06/5.54
118	303316063	56	4	16	Hidrolasa NUDIX	-	<i>Coccidioides posadasii</i>	5205	40.83/5.46	36.93/6.12
119	238489279	59	5	19	Monooxigenasa, putativa	-	<i>Aspergillus flavus</i>	5320	45.84/5.93	40.58/6.08

120	70826274	58	4	23	Lipoxigenasa (Fragmento)	-	<i>Aspergillus ochraceus</i>	8102	23.97/8.28	29.96/6.96
121	cDNA5_c8120	57	9	21	Oxidoreductasa putativa	-	<i>X. dendrorhous</i>	1424	47.41/5.11	51.40/5.30
122	cDNA6_c6268	59	4	41	ADH (fragmento)	-	<i>X. dendrorhous</i>	6207	18.08/7.92	33.60/6.20
123	cDNA6_c8412	56	6	19	Proteína disulfido isomerasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	5324	43.58/4.64	41.40/6.10
124	cDNA5_c3418	70	4	5	Glutation-disulfido reductasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	7618	65.91/9.31	61.80/6.50
125	cDNA5_c6845	51	7	15	Probable NADPH2 deshidrogenasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	2601	51.68/6.12	64.60/5.30
126	cDNA5_c8220	66	7	43	Dehidrogenasa/reductasa SDR	-	<i>X. dendrorhous</i>	2210	26.31/5.81	34.50/5.40
127	cDNA6_c5838	50	4	63	Probable tioredoxina	-	<i>X. dendrorhous</i>	9127	11.60/9.62	19.70/9.40
128	cDNA5_c7178	55	5	25	Probable tioredoxina peroxidasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	5313	30.66/7.63	40.90/6.10
129	cDNA5_c7176	59	5	12	Oxidoreductasa de unión a Zinc	-	<i>X. dendrorhous</i>	7533	48.44/8.28	51.40/6.40
Metabolismo de aminoácidos										
130	74625934	59	6	12	Seril-tRNA sintasa mitocondrial	-	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	8604	51.69/8.68	59.52/7.06
131	2492964	56	6	18	Sintasa DAHP	-	<i>Candida albicans</i>	6616	40.65/6.20	61.94/6.26
132	74585221	62	8	15	Tirosil-tRNA sintasa mitocondrial	-	<i>Candida albicans</i>	4512	56.21/6.34	52.14/5.75
133	170945133	65	11	12	Carbamoilfosfato sintasa	-	<i>Podospora anserina</i>	1819	130.71/5.99	123.07/5.31
134	154300018	51	3	19	Acetiltransferasa	-	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	3112 ^a	21.89/5.92	30.32/5.49
135	151942753	52	12	12	Isoleucil-tRNA sintasa mitocondrial	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7805	116.57/8.43	116.89/6.28
		56	11	10				7808		116.65/6.30
		53	9	9				7811		116.57/6.37
136	121928306	73	4	30	Metionil-tRNA formiltransferasa	-	<i>Aspergillus oryzae</i>	7209	28.83/9.59	36.14/6.28
		52	4	30				7210		36.36/6.30
137	302684253	58	9	20	Oxidasa ácida glicina/D-amino	-	<i>Schizophyllum commune</i>	4004	47.95/5.77	27.36/5.69
138	223635247	60	7	15	Kínurenina 3-monooxigenasa	M	<i>Pichia stipitis</i>	7816	54.63/6.95	120.07/6.41
		59	6	12				7817		120.06/6.43
		50	6	12				7819		120.08/6.53
139	119413553	70	6	8	Aspartil-tRNA sintasa citoplasmática	-	<i>Neosartorya fischeri</i>	6821	108.47/6.46	108.74/6.23
		62	5	8				6828		108.62/6.25
140	302896292	57	4	15	Aspartato aminotransferasa	-	<i>Nectria haematococca</i>	7307	45.31/7.72	40.78/6.42
141	30913511	51	6	16	Metiltransferasa ncl1	-	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	3511 ^a	45.21/6.47	56.97/5.48
142	30912640	60	5	13	Acetilomitina aminotransferasa mitocondrial	-	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	5410	48.29/8.75	45.45/6.09

143	12229964	57	7	12	Fenilalanina-tRNA sintasa	-	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	2517	67.71/5.29	57.05/5.36
144	74624697	50	2	66	Biosíntesis de histidina proteína trifuncional	-	<i>Saccharomyces bayanus</i>	4003	5.72/4.29	10.60/5.60
145	74696766	61	6	20	Metiltransferasa	-	<i>Neurospora crassa</i>	6106	31.78/5.56	25.68/6.25
146	121814778	52	3	9	Acetilglutamato quinasa	-	<i>Gibberella zeae</i>	3330 ^c	44.36/8.74	40.42/5.40
147	164423080	83	12	23	Indoleamina dioxigenasa	-	<i>Neurospora crassa</i>	7510 ^b	74.42/6.99	61.20/6.30
148	306531020	57	6	15	Biosíntesis de arginina proteína bifuncional	-	<i>Ustilago maydis</i>	4607	53.72/6.22	63.42/5.69
149	209406130	98	10	34	Glutamato deshidrogenasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	5409	48.98/5.99	46.79/6.07
150	119480461	61	6	14	Glutamato semialdehído dehidrogenasa	-	<i>Neosartorya fischeri</i>	2204	48.89/5.37	37.98/5.34
151	cDNA5_c7206	218	16	31	Metionina- Cobalamina independiente	-	<i>X. dendrorhous</i>	4703	76.36/5.53	77.60/5.60
152	cDNA5_c8132	66	7	13	Chorismato sintasa, putativa	-	<i>X. dendrorhous</i>	2606	46.26/7.30	68.50/5.30
153	cDNA5_c7266	115	10	34	Aspartato-semialdehído dehidrogenasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	2407	46.25/6.25	46.50/5.30
154	cDNA6_c11418	132	15	24	Proteína Arg-6, parcial	-	<i>X. dendrorhous</i>	4615	69.46/6.94	66.20/5.50
155	cDNA5_c7471	166	12	31	Probable S-adenosilmetionina sintasa 2	-	<i>X. dendrorhous</i>	4521	50.971	58.40/5.80
156	cDNA5_c7970	141	15	28	Adenosilhomocisteinasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	2628	55.29/6.11	66.60/5.40
157	cDNA5_c2467	62	10	12	Succinato-semialdehído dehidrogenasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	7529	69.43/8.59	60.00/6.60
158	cDNA6_c11760	57	7	16	Aspartato aminotransferasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	4612	48.33/8.89	66.90/5.80
159	cDNA6_c8352	106	10	23	Aspartato aminotransferasa, mitocondrial	-	<i>X. dendrorhous</i>	2605	59.13/7.98	64.40/5.30
160	cDNA5_c9724	67	10	13	Lisil-tRNA sintasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	6607	84.34/7.70	68.00/6.20
161	cDNA6_c2201	168	16	36	Glicina hidroximetiltransferasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	8409	66.59/8.21	48.00/7.60
162	cDNA5_c3506	49	8	21	Homocitrato sintasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	7531	66.08/6.09	52.90/6.40
163	cDNA6_c3151	99	10	23	Argininosuccinato liasa, putativa	-	<i>X. dendrorhous</i>	4502	59.63/6.01	52.30/5.60
164	cDNA5_c1711	54	8	18	Delta-1-pirrolina-5-carboxilato	M	<i>X. dendrorhous</i>	3515	59.49/8.49	52.30/5.50
165	cDNA5_c9734	50	7	21	Aminotransferasa 2	-	<i>X. dendrorhous</i>	3508	53.80/9.01	51.10/5.40
166	cDNA5_c9075	112	11	19	2-isopropilmalato sintasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	3723	74.77/5.62	77.20/5.40
167	cDNA5_c9421	66	7	10	Dihidroxi-ácido dehidratasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	7604	75.61/8.53	66.80/6.30
168	cDNA5_c3415	52	6	19	3-isopropilmalato dehidrogenasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	2505	52.72/5.73	53.30/5.30
Metabolismo de nucleótidos										
169	308191552	65	7	17	Adenosilsuccinato sintasa	-	<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>	4408 ^b	48.20/6.4	43.63/5.68
170	19171028	70	9	20	Helicasa ATP-dependiente	-	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	2218	69.02/6.07	37.12/5.36
171	121712429	56	6	15	GMP sintasa	-	<i>Aspergillus clavatus</i>	3404	59.88/5.89	46.59/5.39

172	242214200	61	9	27	SAICAR sintasa	-	<i>Postia placenta</i>	5209	34.69/5.93	33.50/6.09
173	s6_c1090_p2	52	8	20	Fosfo-2-dehidro-3-deoxiheptonato aldolasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	3225	41.29/6.42	35.70/5.40
174	50557006	61	7	17	ADK2 adenilato quinasa	-	<i>Yarrowia lipolytica</i>	7305	25.53/6.36	39.68/6.39
175	cDNA6_c725	63	5	38	Similar a proteína SAICAR sintasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	9126	14.17/10.09	22.00/9.60
176	cDNA5_c3432	62	5	16	Uricasa (Urato oxidasa)	-	<i>X. dendrorhous</i>	5318	44.26/6.49	41.90/6.00
177	cDNA5_c6598	105	13	21	GMP sintasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	3724	69.66/5.89	100.60/5.50
178	cDNA5_c9922	44	7	12	Proteína bifuncional de síntesis de purina	-	<i>X. dendrorhous</i>	7631	76.31/7.59	71.50/6.40
Metabolismo energético										
179	74684619	73	7	13	ATP sintasa subunidad alfa	M	<i>Cryptococcus neoformans</i>	8507	58.17/9.01	58.20/9.01
180	74701945	156	18	46	ATP sintasa subunidad beta	M	<i>Ustilago maydis</i>	1504	55.69/5.28	55.66/5.31
		132	15	43				1505		55.03/5.30
		121	13	36				1506		55.33/5.29
		114	13	34				1507		55.72/5.28
181	74634773	52	6	37	NADH dehidrogenasa 1 (ubiquinona)	M	<i>Yarrowia lipolytica</i>	0310 ^a	22.87/6.91	41.40/4.20
182	BAC66640	74	10	11	ATPasa vacuolar subunidad alfa	M	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7812	113.58/6.15	109.14/6.38
183	cDNA6_c8286	118	13	24	ATPasa V	M	<i>X. dendrorhous</i>	3722	72.99/5.32	77.50/5.40
184	cDNA6_c9791	56	5	51	ATP sintasa cadena alfa, mitocondrial	M	<i>X. dendrorhous</i>	5108	9.16/6.18	26.00/6.10
185	cDNA6_c9422	60	5	27	Difosfatasa inorgánica	-	<i>X. dendrorhous</i>	5105	28.30/5.53	29.00/6.00
186	cDNA5_c7092	85	8	14	ATP sintasa vacuolar	M	<i>X. dendrorhous</i>	4710	68.22/5.54	73.30/5.70
Metabolismo de lípidos										
187	121803722	50	3	18	Fosfatidilinositol sintasa	M	<i>Aspergillus oryzae</i>	7111	30.81/8.49	41.40/5.49
188	169596590	67	8	20	Desaturasa de ácidos grasos	M	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	6314	48.84/7.79	39.66/6.17
189	14861255	68	3	64	Poliquetido sintasa (Fragmento)	-	<i>Polycephalomyces formosus</i>	1105	8.61/5.15	29.82/5.28
190	46426876	57	14	8	Acetil-CoA carboxilasa citosólica	-	<i>Phaffia rhodozyma</i>	2524	245.73/5.82	52.04/5.37
		53	13	8				2523		52.73/5.35
		65	14	8				3516		51.28/5.41
191	74672173	53	7	16	Fosfatidilserina decarboxilasa	-	<i>Aspergillus fumigatus</i>	6511	61.26/9.45	57.10/6.24
192	74694301	68	10	17	Acil-CoA sintasa	M	<i>Ashbya gossypii</i>	4603	84.26/7.49	63.56/5.60
193	s6_c1131_p	83	7	23	Acetil-CoA C-acetiltransferasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	6304	45.54/8.38	41.30/6.20
194	s6_c7358_p	47	11	8	Sintasa de ácidos grasos	-	<i>X. dendrorhous</i>	6604	223.28/6.15	63.60/6.20

Metabolismo secundario/carotenoides

195	46111687	56	4	14	Fitoeno/escualeno sintasa	-	<i>Gibberella zeae</i>	4515	52.28/9.11	52.82/5.66
196	125407	64	6	24	Mevalonato quinasa	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4609	48.94/5.36	63.47/5.77
197	9955387	63	6	17	Escualeno sintasa	M	<i>Candida glabrata</i>	5717	51.82/5.54	74.59/6.07
198	70993694	72	6	12	Preniltransferasa	-	<i>Aspergillus fumigatus</i>	5303	44.86/5.66	40.47/5.91
199	68489506	69	5	14	GGPS/Polifrenil sintasa	-	<i>Candida albicans</i>	4304	38.28/5.48	41.28/5.62
200	33465817	53	5	10	Fitoeno desaturasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	7601	65.06/6.17	61.30/6.3
201	323710252	41	5	10	Astaxantina sintasa	M	<i>X. dendrorhous</i>	7501	62.61/6.29	53.3/6.30
202	PM1619_p	49	11	20	Difosfomevalonato decarboxilasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	6308	43.41/5.75	41.80/6.20
203	PM41-401_p	43	4	9	Fosfomevalonato quinasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	3517	57.59/6.03	59.4/5.50
204	ix6_c2447_p1	51	6	18	Citocromo P450 reductasa (crtR)	-	<i>X. dendrorhous</i>	7311	48.29/9.92	41.40/6.60
205	cDNA5_c3282	43	4	19	IPP isomerasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	6408	41.87/9.93	48.00/6.30

Metabolismo

206	254580523	73	6	30	ZYRO0C13970p	-	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	4408 ^c	22.69/6.38	43.63/5.68
207	238054304	68	14	16	Nitrito reductasa	-	<i>Emericella nidulans</i>	3603	123.99/5.81	66.24/5.38
208	74695317	53	4	15	Glutamina amido transferasa	-	<i>Ashbya gossypii</i>	7534	30.84/7.70	52.04/6.33
209	1945628	56	8	17	HSP70	-	<i>Cryptococcus curvatus</i>	0711	70.22/4.98	74.69/4.42
210	cDNA6_c12037	85	10	27	HSP70	-	<i>X. dendrorhous</i>	3701	58.18/8.97	59.3/7.8
		75	9	25		-		3715		59.3/8.3
		72	8	25		-		3716		69.5/5.5
211	cDNA6_c6240	153	9	19	UDP-xilosa sintasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	7407	55.72/6.12	58.2/5.4
212	241948381	72	10	30	Proteína de biosíntesis de piridoxina	-	<i>Candida dubliniensis</i>	5603 ^a	32.09/6.96	63.90/5.98
213	74680295	80	9	25	SNZ99	-	<i>Candida albicans</i>	5603 ^b	32.15/5.76	63.90/5.98
214	70984990	72	6	19	1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa	-	<i>Aspergillus fumigatus</i>	5604	42.12/8.65	61.62/6.05
		60	6	21				6608		61.49/6.18
215	74666885	55	4	9	Dehidrogenasa FMN-dependiente	-	<i>Aspergillus fumigatus</i>	3330 ^d	41.31/7.03	40.42/5.40
216	71021639	60	5	25	Defosfo-CoA quinasa	-	<i>Ustilago maydis</i>	7306	31.64/8.67	39.91/6.51
217	39970739	63	7	17	Metilcitrato desidratasa	-	<i>Magnaporthe oryzae</i>	3607	62.56/7.94	64.40/5.42
218	s6_c1356_p	41	9	11	HSP	-	<i>X. dendrorhous</i>	7801	108.35/6.48	115.00/6.30
219	225563143	67	6	15	Arginina N-metiltransferasa	-	<i>Ajellomyces capsulata</i>	2611	47.94/4.54	68.35/5.36

220	cDNA5_c7828	89	16	17	Probable mio-inositol 1-fosfato sintasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	6832	120.86/9.91	111.80/6.30
221	cDNA6_c11985	50	7	21	Proteína de unión a NAD(P)	-	<i>X. dendrorhous</i>	5408	96.87/10.11	45.00/6.01
222	cDNA5_c7159	69	10	16	Fumarato reductasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	6729	68.27/6.33	74.20/6.20
223	cDNA5_c7431	68	7	17	Putative HSP 70	-	<i>X. dendrorhous</i>	7722	31.66/7.18	104.40/6.40
224	cDNA6_c7862	58	6	20	ATPasa translocación de fosfolípido	M	<i>X. dendrorhous</i>	5616	53.56/9.57	65.40/5.90
225	cDNA5_c7162	114	12	29	Cetol-acida reductoisomerasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	8516	58.07/9.11	57.30/7.50
226	cDNA5_c9973	48	4	14	Glutación S-transferasa Gst3	-	<i>X. dendrorhous</i>	8504	48.76/10.70	52.90/7.30
227	cDNA5_c3757	51	4	21	Ubiquinona biosíntesis monooxigenasa Coq6	-	<i>X. dendrorhous</i>	6101	21.29/6.40	29.00/6.10
228	cDNA6_c8354	64	6	20	Hidrolasa fosfórica monoéster	-	<i>X. dendrorhous</i>	7404	40.85/11.43	43.90/6.40
229	cDNA5_c7493	56	7	15	Putative HSP STI1	-	<i>X. dendrorhous</i>	4514	59.56/5.91	53.00/5.50
Metabolismo de carbohidratos										
230	116199163	74	10	26	Acetil-CoA sintasa	-	<i>Chaetomium globosum</i>	2319	60.08/6.33	39.71/5.37
231	74702395	57	6	7	Alfa-glucosidasa	-	<i>Ustilago maydis</i>	2614	116.71/5.68	66.94/5.36
		54	5	5				2619		67.14/5.33
		53	5	4				2621		66.82/5.35
		49	4	3				2622		67.05/5.34
		47	3	3				2623		67.16/5.34
232	119409891	60	7	15	Melibiasa	-	<i>Neosartorya fischeri</i>	7625	80.84/5.84	63.12/6.39
233	169853382	59	8	17	Citrato sintasa	-	<i>Coprinopsis cinerea</i>	6503	51.79/7.70	56.86/6.17
234	464368	53	7	14	Fosfoglucomutasa-1	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7519	63.47/6.82	56.03/6.39
235	74692484	75	9	12	Fosforilasa	-	<i>Ashbya gossypii</i>	4602	102.84/5.44	62.63/6.08
236	74606559	58	6	18	Carbohidrato quinasa	-	<i>Kluyveromyces lactis</i>	5517	36.81/5.80	56.28/5.84
237	74637885	66	6	12	Neutral trehalasa	-	<i>Candida glabrata</i>	2309	86.80/6.54	40.53/5.36
238	74705139	65	6	12	Glucocinasa	-	<i>Trichoderma reesei</i>	6609	59.94/5.26	62.39/6.21
239	121807791	55	3	13	Fosfoglicerato quinasa	-	<i>Rhizopus oryzae</i>	4201	44.75/6.29	34.09/5.53
240	3122121	90	11	35	GAPDH	-	<i>Phaffia rhodozyma</i>	4312	36.33/5.79	40.10/5.79
		79	8	25				5314		40.00/6.10
241	74670647	64	6	14	ATP-citrato liasa subunit 1(Acl)	-	<i>Aspergillus fumigatus</i>	4413	52.99/5.88	48.76/5.77
242	30912748	65	6	14	ATP-citrato sintasa subunit 1	-	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	4104	67.84/8.11	29.12/5.58
243	302689959	76	8	21	Transaldolasa	-	<i>Schizophyllum commune</i>	2213	35.99/5.23	39.33/5.37

244	cDNA5_c7133	110	11	20	Isocitrato liasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	8202	66.28/8.73	39.54/6.67
245	121808353	51	5	12	Beta-fructosidasa (Fragmento)	-	<i>Saccharomyces cariocanus</i>	5601 ^b	58.64/4.56	62.80/5.89
246	cDNA6_c8483	86	10	17	Succinato dehidrogenasa (ubiquinona)	M	<i>X. dendrorhous</i>	6610	70.94/6.46	67.09/6.21
247	70991192	57	5	22	Piruvato dehidrogenasa	-	<i>Aspergillus fumigatus</i>	6403	41.68/6.36	45.34/6.24
248	242794316	62	8	19	Succinil-CoA sintasa subunidad beta	-	<i>Talaromyces stipitatus</i>	5509	48.59/5.70	57.09/6.06
249	156836648	55	5	12	Fructosa-bisfosfato aldolasa	-	<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>	3511 ^b	39.45/5.69	56.97/5.48
250	s5_c1234_p2	41	5	12	Formato dehidrogenasa NAD-dependiente	-	<i>X. dendrorhous</i>	7312	40.22/6.38	39.80/6.40
251	s6_c1550_p2	112	11	45	NADP+ malato dehidrogenasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	3206	34.83/5.18	36.10/5.4
252	s6_c11170_p	56	8	7	Piruvato carboxilasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	6809	130.84/5.93	124.80/6.20
253	254568772	54	5	10	Isocitrato dehidrogenasa [NADP]	-	<i>Pichia pastoris</i>	6611	48.83/5.56	64.77/6.25
254	s6_c1090_p1	42	4	10	Oxoglutarato dehidrogenasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	7532	56.40/6.11	52.50/6.30
255	156848406	73	9	19	Enolasa	-	<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>	3331	46.87/5.55	40.97/5.49
256	170087368	54	5	14	Arilformamidasa	-	<i>Laccaria bicolor</i>	6210	47.27/6.50	39.27/6.23
257	255731576	58	4	14	Aldehído dehidrogenasa	-	<i>Candida tropicalis</i>	7629	74.48/6.78	63.12/6.36
258	cDNA6_c1144	124	15	23	Aconitasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	7725	94.56/6.37	82.80/6.30
259	cDNA5_c3341	73	10	18	Glucosa-6-fosfato isomerasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	4519	69.01/5.95	59.80/5.60
260	qi_344324259	170	4	13	Piruvato decarboxilasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	4605	66.23/5.21	68.00/5.60
261	cDNA6_c12055	139	17	34	Transcetolasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	5701	82.31/5.95	73.20/5.80
262	cDNA5_c7706	129	14	38	6-fosfogluconato dehidrogenasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	0604	54.70/5.67	62.80/4.60
263	cDNA6_c5077	181	18	37	Aldehído dehidrogenasa [NAD(P)+]	-	<i>X. dendrorhous</i>	4717	69.43/6.90	70.90/5.80
264	cDNA5_c2197	107	7	13	Piruvato quinasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	5605	69.76/8.50	62.60/6.10
265	cDNA5_c9792	114	13	22	Glucosa-6-P dehidrogenasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	5617	70.83/6.14	62.50/6.0
266	cDNA5_c9917	90	10	18	Dihidrolipoamida dehidrogenasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	7728	80.24/9.18	85.00/6.40
267	cDNA6_c9017	58	6	30	UDP-glucosa/GDP-manosa dehidrogenasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	8113	28.38/6.19	30.80/6.80
268	cDNA5_c7877	140	8	41	Malato dehidrogenasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	7206	35.35/6.17	38.40/6.40
269	cDNA6_c9294	87	8	34	Fructosa-1,6-bisfosfatasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	7204	33.81/5.50	39.60/6.40
270	cDNA5_c7940	91	7	26	Triosa fosfato isomerasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	3209	36.08/6.77	34.90/5.50
271	xa5_c9071_p1	58	8	16	Acetato CoA ligasa ADP, putativa	-	<i>X. dendrorhous</i>	7719	73.83/6.23	68.80/6.30
272	xa5_c5628_p	55	6	6	2-oxoglutarato dehidrogenasa complejo E1	-	<i>X. dendrorhous</i>	7829	113.84/6.28	111.70/6.30
273	cDNA5_c6982	83	7	25	Isocitrato dehidrogenasa NAD+ putativa	-	<i>X. dendrorhous</i>	7301	47.75/9.23	41.80/6.30

274	cDNA6_c7605	155	18	38	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	4613	69.50/6.50	65.60/5.70
275	cDNA6_c5022	100	11	14	Relacionada con enzima málica (NADP)	-	<i>X. dendrorhous</i>	4706	80.73/9.30	74.60/5.60
276	cDNA6_c9127	155	14	32	Fosfoglicerato mutasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	3601	53.86/4.97	64.60/5.40
277	cDNA6_c9105	90	9	27	Dihidrolipoillisine-residuo acetiltransferasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	2620	51.18/8.68	62.90/5.40
278	xa5_c9262_p	246	25	47	Acil-CoA carboxilato CoA-transferasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	6516	58.38/6.15	59.20/6.20
279	cDNA5_c10331	54	6	14	Fosfomanomutasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	2308	45.69/6.84	40.00/5.40
280	cDNA5_c800	53	3	43	Endo-1,3(4)-beta-glucanasa	-	<i>Phaffia rhodozyma</i>	6109	7.29/6.73	20.20/6.30
281	cDNA5_c10048	91	10	22	Fosfoglicerato mutasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	4520	67.85/6.34	59.80/5.60
282	cDNA5_c8065	112	10	50	6-fosfogluconolactonasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	3218	35.40/5.17	34.80/5.40
283	cDNA6_c7055	50	3	40	Ribosa-5-fosfato isomerasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	7110	8.97/9.51	30.00/6.50
284	cDNA5_c7218	133	14	39	Fumarato hidratasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	1610	53.72/5.65	6.70/5.30
285	cDNA5_c10078	57	7	23	Dihidrolipoamida succiniltransferasa, putativa	-	<i>X. dendrorhous</i>	6318	38.51/5.81	41.90/6.20
286	cDNA5_c7144	77	8	21	Piruvato dehidrogenasa E1 beta, mitocondrial	-	<i>X. dendrorhous</i>	2624	45.76/5.29	62.00/5.30
287	cDNA5_c8099	58	4	19	Hexoquinasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	5206	28.46/6.42	32.60/6.60
288	cDNA6_c8159	65	7	19	UDP-glucosa epimerasa	-	<i>X. dendrorhous</i>	3618	53.13/6.14	67.60/5.40
289	cDNA5_c7302	58	9	22	Piruvato dehidrogenasa E1 alfa, mitocondrial	-	<i>X. dendrorhous</i>	2514	46.13/7.66	59.90/5.40
Desconocidas										
290	74669512	65	9	14	Proteína hipotética conservada	-	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2709	90.26/9.33	73.18/5.33
		61	8	12				2710		74.25/5.33
		54	6	9				2711		73.10/5.34
291	150866465	87	14	23	PICST_33329	-	<i>Pichia stipitis</i>	8714	61.40/5.66	75.87/7.39
292	74624477	72	5	18	Proteína SPAC589,05c	-	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	7715	40.33/6.34	71.42/6.40
293	121778823	70	9	21	Proteína hipotética	-	<i>Chaetomium globosum</i>	6603 ^b	48.78/9.74	67.15/6.15
294	121779248	68	10	18	Proteína hipotética	-	<i>Chaetomium globosum</i>	6601	69.86/7.23	65.31/6.12
295	299790662	68	7	8	AFL122Wp	-	<i>Ashbya gossypii</i>	4422	57.74/10.06	47.08/5.71
		68	7	8				5416 ^a		46.90/5.98
296	303321790	70	8	16	CPC735_040080	-	<i>Coccidioides posadasii</i>	5316	44.93/6.84	40.00/6.00
297	74676312	62	5	40	Quinasa putativa	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6102	27.45/6.45	28.17/6.16
298	74634458	50	6	36	YALI0D17292p	-	<i>Yarrowia lipolytica</i>	6110	16.90/7.00	22.36/6.16
299	74624918	67	7	26	B24M22.220	-	<i>Neurospora crassa</i>	1316	46.95/5.64	40.18/5.32

300	121800089	52	4	17	Proteína putativa	-	<i>Aspergillus oryzae</i>	3503	43.71/4.46	60.54/5.40
301	146323476	66	4	23	Proteína hipotética	-	<i>Aspergillus fumigatus</i>	8205	38.46/9.08	30.37/7.91
302	85083936	54	5	5	NCU00091	-	<i>Neurospora crassa</i>	2821	122.60/6.69	122.18/5.34
303	261195963	64	6	30	Proteína hipotética	-	<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	5304	32.94/7.08	41.42/5.94
304	12043549	72	5	18	SPAC589.05c	-	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	8501	40.33/6.34	52.78/6.63
305	50554837	56	5	16	YALIOF00616p	-	<i>Yarrowia lipolytica</i>	3615	41.13/5.92	61.38/5.49
306	115388093	71	10	22	Proteína hipotética	-	<i>Aspergillus terreus</i>	2404	39.70/4.54	44.46/5.34
307	242820978	70	6	15	Proteína hipotética TSTA_000120	-	<i>Talaromyces stipitatus</i>	2321 ^b	47.77/5.07	40.04/5.35
308	303322178	71	7	33	Proteína putativa	-	<i>Coccidioides posadasii</i>	3112 ^b	23.70/4.61	30.32/5.49
309	119484962	67	6	12	C6 zinc putativa	-	<i>Neosartorya fischeri</i>	5416 ^b	50.36/8.95	46.90/5.98
310	169766802	54	5	35	Proteína putativa	-	<i>Aspergillus oryzae</i>	0310 ^b	21.41/5.23	41.40/4.20
311	s6_c1795_p1	62	12	18	Proteína hipotética	-	<i>X. dendrorhous</i>	7508	56.60/6.30	65.45/5.09
312	cDNA6_c10494	57	4	54	Proteína hipotética	-	<i>X. dendrorhous</i>	1001	10.63/4.36	18.10/5.30
313	cDNA5_c5906	51	4	54	Proteína hipotética	-	<i>X. dendrorhous</i>	7006	10.84/9.68	11.20/6.30
314	x6_c11342_p	49	8	10	Proteína putativa	-	<i>X. dendrorhous</i>	8712	101.00/9.93	98.90/8.30
315	cDNA6_c13352	50	4	51	Proteína hipotética	-	<i>X. dendrorhous</i>	3002	7.31/11.74	17.80/5.40
316	cDNA6_c4369	68	8	28	Proteína hipotética	-	<i>X. dendrorhous</i>	3230	34.04/8.13	32.20/5.40
317	cDNA6_c7911	148	20	27	Proteína hipotética	-	<i>X. dendrorhous</i>	4724	97.05/6.05	105.40/5.60
318	x6_c3491_p	85	10	20	Proteína hipotética	-	<i>X. dendrorhous</i>	7723	85.31/5.07	104.60/6.40
319	cDNA5_c8273	49	4	52	Proteína hipotética	-	<i>X. dendrorhous</i>	2005	12.71/5.36	10.60/5.40
320	cDNA5_c3491	49	4	21	Proteína putativa	-	<i>X. dendrorhous</i>	8116	30.96/9.64	30.80/7.30
321	cDNA6_c7998	55	9	30	MT-A70-dominio	-	<i>X. dendrorhous</i>	6103	31.22/9.37	26.50/6.20
322	cDNA6_c5197	51	4	26	Proteína hipotética	-	<i>X. dendrorhous</i>	6111	19.19/9.69	23.80/6.20
323	cDNA5_c3909	48	4	30	Proteína hipotética	-	<i>X. dendrorhous</i>	4113	23.60/9.93	23.60/5.60
324	x6_c11675_p	49	5	11	Proteína putativa	-	<i>X. dendrorhous</i>	7705	68.27/8.43	72.50/6.30
325	cDNA6_c7197	60	12	9	Proteína hipotética	-	<i>X. dendrorhous</i>	7830	191.46/11.7	111.3/6.30
326	cDNA5_c7952	54	5	34	Proteína hipotética	-	<i>X. dendrorhous</i>	5107	19.90/6.11	22.70/5.90
327	cDNA6_c4369	68	8	28	Proteína hipotética	-	<i>X. dendrorhous</i>	3111	34.04/8.13	29.20/5.40
328	cDNA5_c10414	110	10	48	Proteína hipotética	-	<i>X. dendrorhous</i>	8209	26.13/5.82	32.50/7.00
329	cDNA6_c2511	51	9	15	Proteína hipotética	-	<i>X. dendrorhous</i>	5618	64.36/10.71	65.40/6.00

Nº, número de proteína. ID, número de acceso a la base de datos NCBI. V, valor; P, péptido y % cobertura, corresponden a resultados obtenidos con el software MASCOT. Nombre, de acuerdo a las bases de datos Swiss-Prot y KEEG. L, localización celular. SSP, número de spot obtenido con el software PDQuest. Teórico Mr/pI, obtenido de los resultados de identificación en el software MASCOT. Experimental Mr/pI, dato calculado con el software PDQuest. Mr, masa molecular. pI, punto isoeléctrico. Superíndice en el número de spot identifica los spots superpuestos.