

UCH-FC
Biotecnología
G 129
C 1



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

“Efectos del antimicótico ketoconazol sobre las rutas metabólicas de producción de carotenoides y ergosterol en *Xanthophyllomyces dendrorhous*”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

MARCO ANDRÉS GAETE PIULATS



Director del Seminario de Título: Víctor Cifuentes Guzmán.

Co-directora de tesis: Jennifer Alcaíno Gorman

13 de Mayo, 2016

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por el candidato:

MARCO ANDRÉS GAETE PIULATS

“Efectos del antimicótico Ketoconazol sobre las rutas metabólicas de producción de carotenoides y ergosterol en *Xanthophyllomyces dendrorhous*”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial para optar al título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán
Director Seminario de Título

Dra. Jennifer Alcaino Gorman
Co-Directora Seminario de título

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Julieta Orlando
Presidenta

Dra. Claudia Stange Kein
Evaluador



Nací el 16 de Enero de 1991 en la comuna de Las Condes, Santiago. Crecí y viví en la comuna de La Reina durante toda mi vida, estudiando en el Liceo Experimental Manuel de Salas hasta 6° básico y de allí en adelante en el Colegio Las Américas. En éste conocí mi gran pasión por las ciencias, siendo influenciado en las áreas de la Biología, la Química y hasta la Genética por mis profesores lo cual me motivó a realizar mis estudios en estas áreas.

El 2009 ingresé a la Universidad de Chile a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular fascinado desde el primer minuto por la carrera, lo cual me motivó a trabajar en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile desde temprano en la carrera y luego mi pasión por la genética me llevó a trabajar en el laboratorio de Genética de la misma unidad académica, en la cual me acogió el profesor Víctor Cifuentes con el cual desarrollé mi seminario de título.

A quienes viven aún, en nuestros corazones

AGRADECIMIENTOS

El proceso que me ha llevado a culminar mi seminario de título ha sido bastante largo y complejo, por lo cual debo agradecer a todos aquellos que me han ayudado a poder llevarlo a cabo.

En primer lugar, agradezco a COOPEUCH y al proyecto Fondecyt 1140504 del Dr. Víctor Cifuentes, el doctor me acogió en su laboratorio y fue un gran apoyo, mentor y consejero en todo el proceso que he vivido para desarrollar mi seminario. Del mismo modo agradezco a la Dra. Jennifer Alcaíno quien siempre estuvo dispuesta a ayudarme y cuyos comentarios y dedicación fueron trascendentales para salir adelante en el proyecto.

También debo agradecer al resto del equipo del laboratorio de genética, al Dr. Marcelo Baeza, a todos mis compañeros tesisistas de pre y post-grado, quienes cada uno fue un aporte en cosas desde lo más pequeñas hasta importantes discusiones teóricas y agradecer especialmente a Salva, Rafa y la Dony, quienes de verdad me salvaron la vida en más de una oportunidad.

Agradezco también a todos mis compañeros y amigos de la vida, a aquellos que tengo desde el colegio, a aquellos que he conocido en el camino de mi carrera y se han mantenido conmigo. A todo BioBronce y todos con quienes he pasado gratos momentos estos últimos años.

Por último, quiero agradecer a mis amigos y compañeros del alma, a Javier, Darío y Sebastián quienes compartieron mi corazón. Por sobre todos los demás, agradezco a mi familia, mi hermana Martina y mi madre Ingrid, quienes siempre están conmigo y mi padre Alden, el cual se que estaría lleno de orgullo en estos momentos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS.....	10
OBJETIVOS	10
Objetivo general.....	10
Objetivos específicos	10
2. MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1 Cultivos y determinación de la EC ₅₀	11
2.2 Determinación de la biomasa, extracción de carotenoides y de ergosterol.....	11
2.3 Crecimiento en distintas fuentes de carbono.....	13
2.4 Extracción de RNA y RT-qPCR.....	14
2.5 Análisis estadísticos.....	15
3. RESULTADOS	16
3.1 Concentración efectiva media (EC ₅₀)	16
3.2 Efecto de la dosis en la formación de productos.....	18
3.3 Efecto de la fuente de carbono	24
3.4 Efecto de la fuente de carbono y el ketoconazol sobre la expresión génica.....	27
4. DISCUSIÓN	30
5. CONCLUSIONES	36
6. BIBLIOGRAFÍA	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis de cantidad y composición de carotenoides en cultivos de <i>X. dendrorhous</i> suplementados con ketoconazol (KC).....	21
Tabla 2. Análisis de cantidad y composición de esteroides en cultivos de <i>X. dendrorhous</i> suplementados con ketoconazol (KC).....	22
Tabla 3: Cantidad y composición de carotenoides en cultivos de <i>X. dendrorhous</i> en presencia de distintas fuentes de carbono y del antimicótico ketoconazol.....	25
Tabla 4: Cantidad y composición de esteroides en cultivos de <i>X. dendrorhous</i> en presencia de distintas fuentes de carbono y del antimicótico ketoconazol.....	27
Tabla 5: Expresión relativa a nivel de transcrito de genes involucrados en las rutas de carotenogénesis y producción de ergosterol en presencia de diferentes fuentes de carbono y de ketoconazol.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ruta de biosíntesis de carotenoides y esteroides en <i>X. dendrorhous</i>	4
Figura 2: Curvas de crecimiento de <i>X. dendrorhous</i> en presencia de ketoconazol.....	17
Figura 3: Curva de EC50 de ketoconazol para <i>X. dendrorhous</i>	18
Figura 4: Cromatogramas de carotenoides extraídos desde cultivos de <i>X. dendrorhous</i> cultivados en presencia y ausencia de ketoconazol (EC ₅₀).....	20
Figura 5: Cromatogramas de esteroides extraídos desde cultivos de <i>X. dendrorhous</i> cultivados en presencia y ausencia de ketoconazol (EC ₅₀).....	23

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA	DNA complementario
CPRs	Citocromos P450 reductasas
DO	Densidad óptica
EC50	Concentración efectiva media
EDTA	Tetra acetato disódico de etilendiamina
FPP	Farnesil pirofosfato
GGPP	Geranilgeranil pirofosfato
glu	Glucosa
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
HMGR	Hidroxi-metilglutaril-coenzima A reductasa
IPP	Isopentenil pirofosfato
KC	Ketoconazol
KOH	Hidróxido de potasio
mal	Maltosa
mRNA	RNA mensajero
MVA	Mevalonato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ppm	Partes por millón
RP-HPLC	Cromatografía líquida en fase reversa
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo con transcriptasa inversa
s/g	Sin glucosa
SDS	Dodecilsulfato sódico
YM	Medio completo de cultivo para levadura

RESUMEN

La astaxantina es un carotenoide de interés industrial y uno de los productos característicos de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Entre los estudios de la carotenogénesis en esta levadura, se ha encontrado una relación entre las rutas de producción de carotenoides y de esteroides, siendo el ergosterol el esteroide principal en levaduras. Cepas mutantes que no producen ergosterol, sobreproducen astaxantina, sugiriendo un mecanismo de regulación por ergosterol sobre la síntesis de carotenoides. Además, previamente era conocida la inhibición de la carotenogénesis por el consumo de glucosa. Por otra parte, ambas vías de síntesis comparten los mismos precursores y en ambas participan enzimas citocromo P450. Debido a esto, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del antimicótico ketoconazol, un inhibidor de enzimas P450, sobre la síntesis de astaxantina y ergosterol, analizando el efecto sobre la cantidad de producto obtenido y relacionándose con la regulación por el efecto de la fuente de carbono.

Para ello, se determinó la EC_{50} del antimicótico sobre una cepa silvestre, siendo de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ para cultivos crecidos a 22 °C en medio YM, al cual se le extrajeron carotenoides y esteroides observando que los carotenoides totales aumentaban aproximadamente un 13% y la proporción de astaxantina un 20%; a su vez, la cantidad de esteroides disminuyó alrededor de un 40% junto con una disminución de un 27% de la fracción de ergosterol.

Luego, la levadura se cultivó en medio YM sin glucosa hasta alcanzar la fase estacionaria y se separó en 6 matraces a los que se les adicionó: i) sin tratamiento

(control), ii) ketoconazol a una concentración final de 0,25 µg/ml, iii) glucosa a una concentración final de 10 g/l, iv) maltosa a una concentración final de 15 g/l, v) ketoconazol y glucosa a concentraciones finales de 0,25 µg/ml y 10 g/l, respectivamente y vi) ketoconazol y maltosa a concentraciones finales de 0,25 µg/ml y 15 g/l, respectivamente. Los matraces se incubaron por 24 h a 22 °C con agitación constante y luego se extrajeron los carotenoides y esteroides. Respecto al efecto de la fuente de carbono, se encontró que la adición de maltosa y ketoconazol incrementó en alrededor de un 23% la producción de carotenoides respecto al control, a diferencia de los cultivos a los que se agregó sólo glucosa donde la producción de carotenoides sólo alcanzó aproximadamente un 67% respecto al control.

Además, se observó que genes participantes en las rutas de formación de astaxantina y ergosterol aumentaron su expresión al utilizar una fuente de carbono, el máximo aumento de expresión de *crtS* se encontró al utilizar maltosa y ketoconazol siendo 88,2 veces por sobre el control. En las mismas condiciones, la expresión del gen *HMGR* aumentó en 24,3 veces y el de *Cyp51* en 17,8 veces.

Se concluye que existe una relación entre los niveles de ergosterol y de carotenoides en la levadura, donde la disminución de ergosterol favorece la síntesis de astaxantina. Además, utilizar maltosa en un medio con ketoconazol aumenta los niveles de enzimas carotenogénicas, aumentando el porcentaje de astaxantina producido.

ABSTRACT

Astaxanthin is a carotenoid of industrial importance and one of the characteristic products of *Xanthophyllomyces dendrorhous* yeast. Among the studies about carotenogenesis in this yeast, a relation has been found between carotenoid and sterol routes, being ergosterol the main sterol in yeasts. Mutant strains which do not produce ergosterol, overproduce astaxanthin, suggesting a regulation mechanism driven by ergosterol over carotenoid synthesis. Also, it was previously known the carotenogenesis inhibition mediated by glucose consumption. Moreover, both synthetic pathways share the same precursors and in both participate cytochrome P450 enzymes. Because of this, the objective of this work was to study the effects of the ketoconazole antifungal, an inhibitor of P450 enzymes, over the synthesis of both astaxanthin and ergosterol, analyzing the effects over the amount of obtained products and relating it to regulation driven by the effect of the carbon source.

For this purpose, the EC₅₀ of the antifungal was determined on a wild strain, being 0.25 µg/ml for cultures grown in YM broth at 22 °C, to which the carotenoids and sterols were extracted observing that total carotenoids increased about 13% and the astaxanthin proportion a 20%; in turn, the amount of sterols decreased around 40% with a reduction of 27% in the fraction of ergosterol.

Then, the yeast was growth in YM broth without glucose until it reached stationary phase and was split into 6 flasks to which were added: i) no treatment (control), ii) ketoconazole at final concentration of 0.25 µg/ml, iii) glucose at final concentration of 10 g/l, iv) maltose at final concentration of 15 g/l, v) ketoconazole

and glucose at final concentrations of 0.25 µg/ml and 10 g/l, respectively and vi) ketoconazole and maltose at final concentrations of 0.25 µg/ml and 15 g/l, respectively. The flasks were incubated at 22 °C for 24 h with constant stirring and then carotenoids and sterols were extracted. Regarding the effect of the carbon source, it was found that the addition of maltose and ketoconazol increased carotenoid production by about 23% relative to control, unlike cultures where only glucose was added where carotenoid production only reached approximately 67% compared to control.

It was also noted that genes participating in astaxanthin and ergosterol pathways increased their expression when a carbon source was used, the maximum increase in the expression of crtS was found when using maltose and ketoconazole, being 88.2 fold above control. Under the same conditions, the expression of HMGR gene increased 24.3 fold and CYP51 gene in 17.8 fold.

It's concluded that a relation exists between carotenoids and ergosterol levels in the yeast, where lower levels of ergosterol promotes the astaxanthin synthesis. Also, using maltose in addition to ketoconazole increases the levels of carotenogenic enzymes, increasing the percentage of astaxanthin produced.

1. INTRODUCCIÓN

La levadura basidiomicete *Xanthophyllomyces dendrorhous* es un organismo de gran potencial biotecnológico (Rodríguez-Sáiz y col., 2010) y de particular interés para Chile debido a que se han aislado cepas autóctonas en el sur del país y en el territorio sub-antártico chileno, además de otras regiones del mundo (Weber y col., 2008; Contreras, 2014). El principal interés que se ha generado en torno a esta levadura es por su producción de agentes antioxidantes y su coloración anaranjada debido a los pigmentos del tipo carotenoides que ella produce (Andrewes y col., 1976).

Los carotenoides son pigmentos que presentan una máxima absorbancia en longitudes de onda de la luz visible, observándose colores que van desde tonalidades amarillas hasta el rojo intenso (Armstrong y Hearst, 1996). Se ha descrito que estos pigmentos tendrían un efecto fotoprotector y antioxidante, por lo cual no es de extrañar que se encuentren ampliamente distribuidos en el árbol de la vida, desde microalgas hasta plantas terrestres (Britton, 1995) cumpliendo importantes roles biológicos. Por otra parte, por su atractiva coloración y propiedades químicas, los carotenoides también son considerados como un producto de gran interés para la industria farmacológica, cosmética, de alimentos y otras (Mata-Gómez y col., 2014). Es así como en el año 2010 el mercado de los carotenoides alcanzó los 1,2 billones de dólares y se estima que las ventas alcanzarán los 1,8 billones de dólares en el año 2018 (www.bccresearch.com) siendo los más importantes en ventas el β -caroteno, la luteína y la astaxantina.

La astaxantina pertenece al grupo de las xantófilas (carotenoides que contienen grupos funcionales oxigenados), se encuentra presente en algas rojas y da la coloración rojiza y amarillenta a diversos organismos marinos, en particular pequeños crustáceos, que a su vez son el alimento de organismos mayores como el salmón. El color característico de la carne de salmón viene justamente de su dieta y se debe a la presencia de astaxantina en los organismos que naturalmente éste consume (Shearer, 1992). Sin embargo, en cautiverio los peces no tienen acceso a una fuente natural del carotenoide por lo que es necesario suplementar dicho compuesto que no sólo le otorga el color a la carne sino que también se ha demostrado que mejora el sistema inmune tanto en los salmónidos como en humanos (Higuera-Ciapara y col., 2006). Por estos motivos, las salmoneras tienen que incurrir en altos gastos para comprar astaxantina (Sanderson y Jolly, 1994), representando hasta aproximadamente un 25% de los costos de alimentación (Webbster y Lim, 2002).

La astaxantina disponible comercialmente es producida mayoritariamente mediante métodos químicos (Surmatis y Thommen, 1967); sin embargo, por estos métodos se produce como una mezcla racémica de distintos isómeros de astaxantina y entre ellos sólo uno es biológicamente activo y, por lo tanto, útil para su consumo por parte de los salmones y finalmente para los beneficios que aportarían a la salud humana (Higuera-Ciapara, 2006). Además, actualmente por parte de los consumidores existe una mayor demanda por productos de origen natural sobre las fuentes sintéticas (Boussiba y col., 2000). Lo anterior, junto con la creciente preocupación por tener fuentes autosustentables de producción, han impulsado la búsqueda de organismos capaces de sintetizar naturalmente el compuesto dentro de los cuales destacan el alga

verde de agua dulce *Haematococcus pluvialis* y la levadura basidiomicete *X. dendrorhous* (Lorenz y Cysewski, 2000) en la cual hemos centrado nuestros estudios.

La astaxantina corresponde al producto final de la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*, representando aproximadamente un 60-70% de los carotenoides totales acumulados (Johnson y Lewis, 1979). Sin embargo, la producción de astaxantina en cepas silvestres de la levadura es de aproximadamente 300-400 $\mu\text{g/g}$ de peso seco, lo cual resulta en una baja productividad para competir en el mercado con la síntesis química del producto (Rodríguez-Sáiz y col., 2010). Por este motivo, se han realizado diferentes estrategias para favorecer la síntesis de este compuesto en la levadura incluyendo optimización de su cultivo, mutagénesis al azar y sitio dirigida, entre otros (Rodríguez-Sáiz y col., 2010). Además, existen diversos estudios que buscan conocer y comprender la regulación de la ruta de síntesis de carotenoides para buscar nuevas alternativas para sobre-producir astaxantina mediante ingeniería genética y/o ingeniería metabólica (Schroeder y Johnson, 1995; Johnson y An, 1991).

La producción de astaxantina en *X. dendrorhous* ocurre mediante una compleja ruta metabólica que comienza con el precursor común a diversas rutas metabólicas, el acetil CoA, el cual es transformado en 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) y posteriormente en mevalonato (MVA) donde participa la enzima hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa (HMGR) (figura 1), un paso clave en la regulación del flujo metabólico. Posteriormente, el MVA es transformado a un compuesto de 5 carbonos (C_5), el isopentenil pirofosfato (IPP), compuesto que sirve de bloque de construcción en la síntesis de una gran familia de compuestos naturales que se conocen como isoprenoides. Condensaciones de distintas unidades de IPP y posteriores

oxidaciones y ciclaciones de las moléculas generadas, dan origen a una diversidad de productos incluyendo carotenoides y esteroides (Choi y Koo, 2005).

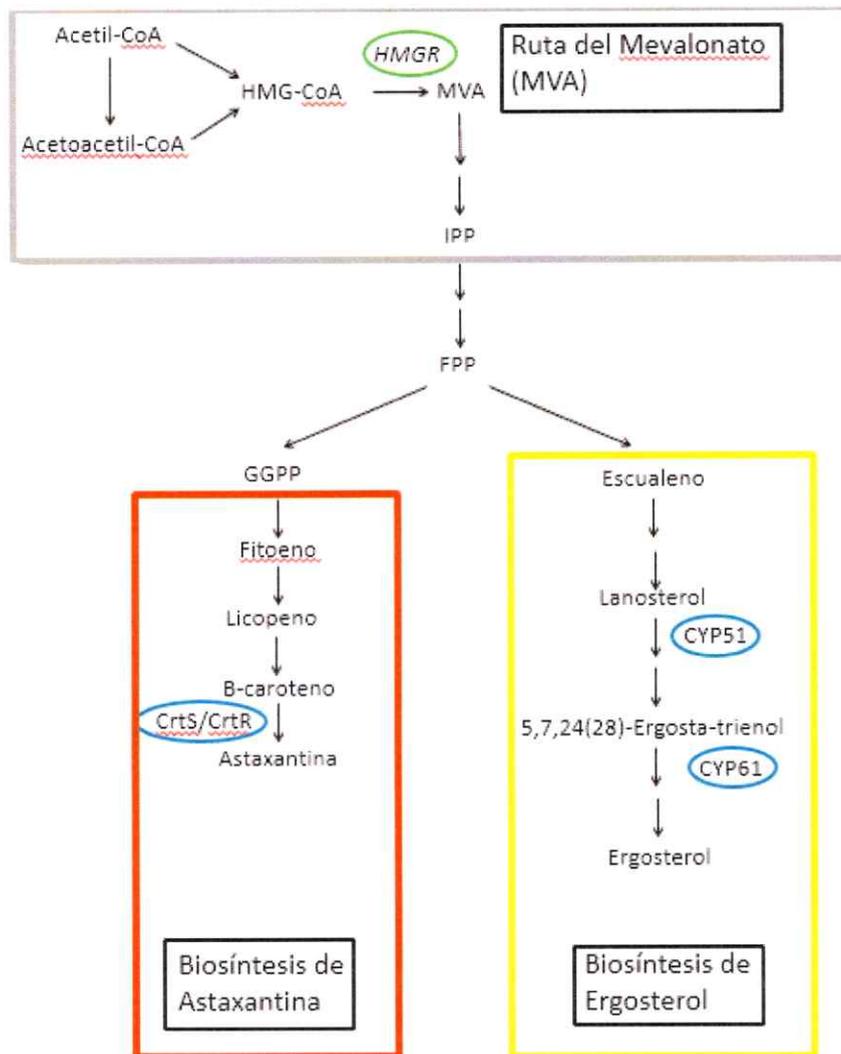


Figura 1: Ruta de biosíntesis de carotenoides y esteroides en *X. dendrorhous*. En *X. dendrorhous*, los metabolitos precusores de las rutas de síntesis de astaxantina (cuadro anaranjado) y de ergosterol (cuadro amarillo) derivan de la ruta del mevalonato (cuadro gris). En el círculo verde se destaca el gen *HMGR* que corresponde a uno de los principales puntos de regulación y cuya expresión es regulada negativamente por ergosterol afectando tanto a la síntesis de esteroides como la de carotenoides. En círculos azules se destacan las enzimas citocromo P450 involucrados en las rutas de síntesis de astaxantina (CrtS) y de ergosterol (CYP51 y CYP61), además de la enzima CrtR que corresponde a una enzima del tipo citocromo P450 reductasa, CPR. Las enzimas citocromo P450, corresponden a los blancos de los compuestos azólicos como el ketaconazol.

En la ruta de síntesis de isoprenoides, el MVA es transformado en farnesil pirofosfato (FPP, C₁₅) por una serie de reacciones, siendo el FPP el último precursor común entre las rutas de síntesis de carotenoides y esteroides. Tal como muestra la figura 1, al FPP se le adiciona una molécula de IPP formando geranilgeranil pirofosfato (GGPP, C₂₀) por el producto génico del gen *crtE* que da paso a la síntesis de carotenoides; en cambio mediante la enzima escualeno sintasa, dos moléculas de FPP se condensan por acción de la enzima FPP sintasa (gen *FPS*) para dar origen al escualeno (C₃₀) dando inicio a la síntesis de esteroides propiamente tal (Alcaíno y col., 2014; Shumskaya y Wurtzel, 2013). En hongos, el producto final de la síntesis de esteroides es el ergosterol, el cual es un importante componente estructural y regulador de la membrana lipídica de éstos, teniendo efecto en la fluidez de la membrana, el grosor y la permeabilidad de ésta (Loto y col., 2012); mientras que en *X. dendrorhous*, el producto final de la síntesis de carotenoides corresponde a la astaxantina.

Como se mencionó anteriormente, el MVA es un precursor común para la ruta de síntesis de carotenoides y esteroides, y se ha demostrado que una mayor producción de éste favorece la producción de dichos compuestos debido a una mayor disponibilidad de sustrato y por consiguiente un flujo metabólico aumentado (Miao y col., 2010; Breitenbach y col., 2011). Además, previamente se ha reportado que en *X. dendrorhous* existe una relación entre los niveles de ergosterol celular y la producción de carotenoides, ya que en experimentos de mutagénesis al azar se observó que mutantes que presentaban una menor producción de ergosterol mostraban mayor cantidad de carotenoides debido a un cambio de los flujos metabólicos que favorecen la producción de carotenoides en detrimento de la producción de esteroides, lo que

estaría asociado a una mayor actividad de la enzima HMGR, la encargada de producir MVA (Miao y col., 2011).

En un estudio reciente (Loto y col., 2012) se generaron mutantes de *X. dendrorhous* del gen *CYP61*, el cual controla uno de los últimos pasos de la vía de síntesis de ergosterol. Los mutantes no producen ergosterol, pero acumulan otros esteroides que probablemente permiten la supervivencia de las células. Interesantemente, en los mutantes además se observó una mayor producción de carotenoides, lo que podría estar relacionado con los niveles mayores encontrados del transcrito *HMGR*. Estos resultados sugieren fuertemente que la manipulación de la síntesis de ergosterol podría ser una estrategia relevante para favorecer la síntesis de astaxantina en *X. dendrorhous*.

Por otra parte, el gen *CYP61* codifica a una enzima que pertenece a la familia de citocromos P450 (Loto y col., 2012) lo que es muy interesante ya que representa otro punto en común que tienen las rutas de síntesis de carotenoides y esteroides en *X. dendrorhous*. A diferencia de otros organismos que producen astaxantina, solo en *X. dendrorhous* se ha descrito un sistema P450 que participa en el último paso de la vía, la síntesis de astaxantina a partir de β -caroteno, paso que es catalizado por la enzima astaxantina sintasa o CrtS (Ojima y col., 2006). Por otra parte, en la síntesis de ergosterol, existe otra enzima P450 involucrada, CYP51, cuyo gen ha sido identificado en el genoma de *X. dendrorhous* y su función ha sido confirmada (Leiva, 2015).

La familia de enzimas P450 monooxigenasas cuenta con diversos representantes que participan en distintos procesos celulares y es ubicua dentro de los organismos eucariontes (Lepesheva y Waterman, 2007). Su mecanismo de acción está

ligado con la acción de citocromos P450 reductasas (CPRs) las cuales proveen del poder reductor a las monooxigenasas para que puedan hidroxilar a sus sustratos en la mayoría de los organismos (Van den Brink y col., 1998). En el caso de *X. dendrorhous* se ha identificado un gen que codifica una enzima del tipo CPR el cual se ha denominado *crtR*, cuyo producto está involucrado en la formación de astaxantina (Alcaíno y col., 2008). Además, en la gran mayoría de organismos existe un solo gen que codifica una CPR y se ha demostrado que el gen *crtR* también está involucrado en la biosíntesis de ergosterol en *X. dendrorhous* (Gutiérrez, 2014)

En el caso particular de las levaduras, la enzima CYP51 es la encargada de la transformación del lanosterol en uno de los primeros pasos de la síntesis de ergosterol. En particular, esta enzima es el blanco de muchos antifúngicos del tipo azólico, debido a que la acumulación de lanosterol lleva a la formación de subproductos de degradación que son tóxicos para el organismo (Sheehan y col., 1999). Sin embargo, en concentraciones sub-letales actúan como inhibidores competitivos de enzimas de la familia P450 debido a que afectan la reacción de oxidación llevada a cabo por éstas (Lamb y col., 1999). Uno de los azoles más utilizados comercialmente debido a su alta efectividad, bajo precio y facilidad de manipulación es el antimicótico ketoconazol (Walsh, 1996).

Como se había mencionado anteriormente, existen dos enzimas P450 en la ruta de síntesis de ergosterol: CYP51 y CYP61, por lo cual es esperable que en cultivos de la levadura en presencia de ketoconazol, disminuyan los niveles de ergosterol, lo que a su vez conllevaría a mayores niveles de transcritos del gen *HMGR* (cuya expresión estaría regulada negativamente por un mecanismo dependiente de ergosterol) favoreciendo la producción de carotenoides en *X. dendrorhous*. Por otro lado, debido

a que en el paso final de la síntesis de astaxantina también actúa una enzima P450 monooxigenasa, *CrtS*, es posible que la síntesis de astaxantina se vea afectada por la presencia de un agente azólico como el ketoconazol, lo que permitiría estudiar con detalle la regulación de ambas rutas metabólicas y determinar el efecto de la producción de carotenoides en presencia o ausencia de ketoconazol.

Además, cabe mencionar que existe un proceso inhibitorio de la carotenogénesis dependiente de la glucosa presente en el medio de cultivo, ya que la presencia del azúcar conlleva a la fermentación de éste hasta etanol y la carotenogénesis comienza cuando se agota la glucosa del medio y comienza el consumo de etanol (Lodato y col., 2007). La presencia de glucosa afecta la expresión de genes involucrados en la ruta metabólica de los carotenoides por mecanismos regulatorios que actúan a nivel transcripcional (Lodato y col., 2007). En particular, algunos genes carotenogénicos como el gen *crtS* presentan en su región promotora posibles sitios de unión al regulador transcripcional Mig 1, el cual es una proteína del tipo dedos de zinc (Wozniak y col., 2011) que media la represión por glucosa en diversos organismos (Papamichos-Chronakis y col., 2004). En *Saccharomyces cerevisiae* se ha observado que la proteína Mig 1 en presencia de glucosa cambia su localización subcelular desde el citoplasma hacia el núcleo, formando en éste complejos proteicos con represores como Cyc8 y Tup 1/Cyc8 que inhiben los genes *GAL*, *SUC* y *MAL* involucrados en la conversión de otras fuentes de carbono, entre otros genes (De Vit y col., 1997). En *X. dendrorhous* se ha observado además que la formación del complejo Mig 1/Cyc8/Tup 1 estaría involucrado en la represión de diversos genes carotenogénicos, como se indicó anteriormente (Wozniak y col., 2011), y que cuando la glucosa se agota en el medio de cultivo comenzaría recién la síntesis

de carotenoides *de novo*, aproximadamente 24 h después de inoculado un cultivo en medio YM con glucosa al 1%, momento en el cual la levadura comenzaría a utilizar el etanol como principal fuente de carbono (Marcoleta y col., 2011).

El estudio de los mecanismos de regulación de la carotenogénesis permitirá diseñar estrategias para la sobreproducción de astaxantina en *X. dendrorhous* para el uso industrial y farmacológico de ésta

Hipótesis del trabajo

Dado que el antimicótico ketoconazol inhibe enzimas de la familia citocromo P450 monooxigenasas, entonces afectará las rutas de síntesis de ergosterol y de astaxantina, ya que en ambas rutas hay enzimas P450 involucradas. Además, el analizar los mecanismos de regulación por presencia del represor catabólico glucosa, en conjunto al uso de ketoconazol, permitirá estudiar diferencialmente las rutas de síntesis de astaxantina y de ergosterol en *X. dendrorhous*.

Objetivo general

Estudiar el efecto del antimicótico ketoconazol y de la fuente de carbono sobre las rutas de síntesis de esteroides y carotenoides en *X. dendrorhous*.

Objetivos específicos

- 1.- Determinar la concentración del antimicótico ketoconazol a la cual se produce un 50% de inhibición de crecimiento (EC_{50} , concentración efectiva media) en *X. dendrorhous*.
- 2.- Cuantificar y analizar la composición de carotenoides y esteroides producidos al cultivar la levadura en presencia de ketoconazol a la concentración EC_{50} .
- 3.- Cuantificar y analizar la composición de carotenoides y esteroides producidos al cultivar la levadura en presencia de glucosa y en presencia o ausencia de ketoconazol.
- 4.- Determinar el efecto de la glucosa y el ketoconazol sobre la expresión a nivel transcripcional de genes estructurales de enzimas citocromo P450 monooxigenasas de las rutas de biosíntesis de ergosterol y astaxantina.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cultivos y determinación de la EC₅₀

En este seminario de título se utilizó la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* (ATCC 24230) cultivada a 22°C en medio YM (3 g/l extracto de levadura, 3 g/l extracto de malta y 5 g/l peptona, además de 10 g/l de glucosa como fuente de carbono principal) con agitación constante. Los cultivos en medio semi-sólido se realizaron en medio YM con agar al 1,5%.

Para la determinación de la EC₅₀ del ketoconazol se utilizaron distintas concentraciones de éste: 0,1 µg/ml; 0,2 µg/ml; 0,25 µg/ml y 0,3 µg/ml. Para ello, a partir de un cultivo en fase exponencial (DO₆₀₀ = 6-7 UA) se inoculó un matraz con 100 ml de medio YM y una concentración determinada de ketoconazol, de manera tal de tener una DO₆₀₀ inicial de 0,1 UA. Los cultivos se realizaron por triplicado. Se recogieron alícuotas de 1 ml cada 12 h hasta las 96 h, a las cuales se les determinó la densidad óptica del cultivo utilizando un espectrofotómetro de doble haz Jasco V-630; además se utilizó la DO₆₀₀ de los cultivos en fase estacionaria (96 h) para determinar la EC₅₀ (Alexander y col., 1999).

2.2 Determinación de la biomasa, extracción de carotenoides y de ergosterol

La determinación de la biomasa se realizó por el método de peso seco (Stone y col., 1992). Para ello se tomó 1 ml de cultivo por triplicado y se dejó secar a 80°C en tubos Eppendorf de 1,5 ml previamente masados durante 12 h, luego se masó el contenido en una balanza analítica (Shimadzu, AV220) para determinar el peso seco de levadura por diferencia.

Los carotenoides se extrajeron mediante el método de extracción con acetona (An y col., 1989) a partir de pellets celulares. Para ello, se centrifugaron 40 ml de cultivo y el pellet se suspendió en 1 ml de agua y 0,5 ml de perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro lo cual se molió en un molidor Mini-Breadbeater-16 (Biospec) a máxima velocidad durante 3 min. Luego de centrifugar a máxima velocidad (12.000 g) durante 5 min y eliminar el sobrenadante, se agregó 1 ml de acetona y nuevamente se llevó al molidor durante 3 min y posterior centrifugación por 5 min, recuperando el sobrenadante en un tubo limpio; el proceso se realizó hasta que el pellet celular quedó de color blanco. Una vez que los compuestos fueron concentrados en acetona, se agregó la quinta parte de volumen de éter de petróleo de manera de obtener los carotenoides en la fase superior, la cual se recuperó para cuantificar los carotenoides espectroscópicamente midiendo la absorbancia a 465 nm. Para ello se utilizó un espectrofotómetro de doble haz Jasco V-630 y los carotenoides se cuantificaron según la siguiente fórmula:

$$\text{Carotenoides totales } (\mu\text{g de pigmentos/g de muestra}) = \frac{\text{Abs} * V_{\text{éter}} * 10^4}{\text{cem} * g \text{ de células}}$$

Donde Abs: Absorbancia medida a 465 nm, 10^4 : Constante de conversión de unidades $\mu\text{g} / \text{g}$, cem: Coeficiente de extinción molar de astaxantina = 2.100 (An y col., 1989).

Luego, se analizó la composición de carotenoides mediante RP-HPLC (Shimadzu, LC-10AT) con una columna de fase reversa RP-18 Lichrocart 125-4 (Merck) y utilizando acetonitrilo: metanol: isopropanol (85: 10: 5, v/v/v) como fase móvil con un flujo de 1 ml/min durante 40 min. Los espectros de elusión se registraron con un detector de arreglo de diodos (Shimadzu, SPD-M10A) y los carotenoides se

reconocieron con base en sus tiempos de retención y espectros de absorción respecto a estándares (Britton y col., 2012).

La extracción de esteroides se realizó mediante el protocolo propuesto previamente por Shang y col. (2006), utilizando 4 g de KOH y 16 ml de una solución etanol/ agua al 60% (v/v) por cada pellet celular. La mezcla se incubó por 2 h a 80°C y los esteroides se extrajeron con éter de petróleo. Luego, los esteroides se cuantificaron midiendo la absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción molar del ergosterol de $11.900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Shang y col., 2006) de manera análoga a la cuantificación de carotenoides.

La identificación de ergosterol se realizó por RP-HPLC en una columna de fase reversa RP-18 Lichrocart 125-4, con una fase líquida de metanol: agua (97: 3, v/v) y un flujo de 1 ml/min durante 25 min, comparando los espectros obtenidos respecto a ergosterol estándar (Sigma).

2.3 Crecimiento en distintas fuentes de carbono

Para el experimento de crecimiento en distintas fuentes de carbono se realizó primero un cultivo en un matraz de 2 l con 700 ml de medio YM sin la adición de una fuente de carbono adicional por triplicado y se creció hasta alcanzar la fase estacionaria ($\text{DO}_{600} \approx 3,6$, UA 60 h de cultivo). Luego, se tomaron 100 ml para realizar la extracción de carotenoides y esteroides; los 600 ml de cultivo restantes se separaron en 6 nuevos matraces, cada uno con 100 ml del cultivo, que recibieron los siguientes tratamientos: i) sin tratamiento adicional (control), ii) adición de ketoconazol a una concentración final de $0,25 \mu\text{g/ml}$, iii) adición de glucosa a una concentración final de 10 g/l , iv) adición de maltosa a una concentración final de 15 g/l , v) adición de ketoconazol y



glucosa a concentraciones finales de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ y 10 g/l , respectivamente y vi) adición de ketoconazol y maltosa a concentraciones finales de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ y 15 g/l , respectivamente.

Luego, los matraces se incubaron a 22°C con agitación constante durante 24 h y se colectaron alícuotas para extraer carotenoides y esteroides.

2.4 Extracción de RNA y RT-qPCR

La extracción de RNA se realizó mediante un método modificado (Loto y col., 2010). Se realizó un proceso de ruptura mecánica utilizando pellet celular suspendido en 200 μl de buffer de diálisis (Acetato de Sodio 0,02 M, SDS 0,5%, EDTA 1mM, pH 5,5) y adicionando 100 μl de perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro (BioSpec) para luego molerlas por 1 min. Posteriormente, se adicionaron 800 μl de Tri-Reagent (Ambion) y se molió durante 1 min más, luego se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Al lisado se le agregaron 200 μl de cloroformo, se agitó manualmente y se centrifugó durante 15 min a 14.000 g a 4°C. Se tomaron 400 μl de sobrenadante y se le adicionaron 250 μl de agua libre de RNAsas y 550 μl de isopropanol frío para precipitar el RNA, se incubó a temperatura ambiente durante 15 min y se centrifugó bajo las mismas condiciones antes descritas. Por último, el pellet se lavó con 1 ml de etanol al 75%, se centrifugó en frío por 5 min, se eliminó el sobrenadante y el RNA se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seco, el RNA se suspendió en 30 μl de agua libre de RNAsas, se cuantificó espectrofotométricamente y su pureza se evaluó determinando la relación de la absorbancia de 280/260 nm y 260/220 nm (Sambrook y Russell, 2001). El RNA se almacenó a -80°C hasta su posterior uso.

La síntesis de cDNA se llevó a cabo utilizando transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) de acuerdo al protocolo del fabricante utilizando 5 μ l de RNA total en un volumen final de 20 μ l. La expresión relativa de los genes se determinó a nivel de mRNAs con un sistema de PCR cuantitativo Mx3000P (Stratagene) utilizando 1 μ l de la reacción de transcripción reversa, 0,25 μ M de cada partidor y 10 μ l del kit SensiMix SYBR Green I (Quantace) en un volumen final de 20 μ l. Los valores de Ct obtenidos se normalizaron utilizando el valor correspondiente del gen de la β -actina [Genbank: X89898.1] (Lodato y col., 2007) y luego se expresaron como función de las condiciones control usando el algoritmo de $\Delta\Delta$ Ct (Livak y Schmittgen, 2001).

2.5 Análisis estadísticos

El tratamiento de datos y análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prism 5 y las muestras se compararon mediante un análisis no paramétrico del tipo ANOVA de una vía utilizando un test de Kruskal-Wallis y un test de comparación múltiple de Dunn con valores de significancia de $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Concentración efectiva media (EC₅₀)

En primera instancia se buscó determinar la concentración efectiva media del ketoconazol para la levadura *X. dendrorhous* crecida en medio YM a 22°C con agitación constante de manera de poder determinar el efecto del antimicótico sobre las rutas metabólicas de los carotenoides y esteroides en concentraciones óptimas que permitan el crecimiento celular, pero que se pueda observar el posible efecto a nivel metabólico (Benkwitz y col., 2007). Por ello se definió la EC₅₀ como la concentración de ketoconazol a trabajar en experimentos posteriores y ésta se determinó una vez que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria, alrededor de las 96 h de cultivo.

Para ello se cultivó *X. dendrorhous* con distintas concentraciones de antimicótico en el medio de manera de tener un rango de concentraciones mínimas y máximas según lo descrito en la literatura como procedimiento estándar (Hammer y col., 2001). Lo primero que se realizó fue un estudio en placas en el cual se pudo establecer que a concentraciones de 0,1 µg/ml de ketoconazol ya se observaba inhibición aparente; del mismo modo se observó que a concentraciones mayores a 0,3 µg/ml de antimicótico la inhibición del crecimiento era cercana al 99%.

Luego, se realizaron las curvas de crecimiento (figura 2) midiendo la DO₆₀₀ de los cultivos cada 12 h hasta las 96 h de cultivo en medio líquido, punto en el cual se colectaron muestras para la extracción de carotenoides, esteroides y peso seco. Con los datos de DO₆₀₀ luego de 96 h de cultivo, se construyó la curva para determinar la EC₅₀ del ketoconazol sobre *X. dendrorhous* (figura 3), cuyo valor medio corresponde

aproximadamente a $0,25 \mu\text{g/ml}$ de ketoconazol, siendo éste el valor de EC_{50} para las condiciones antes descritas.

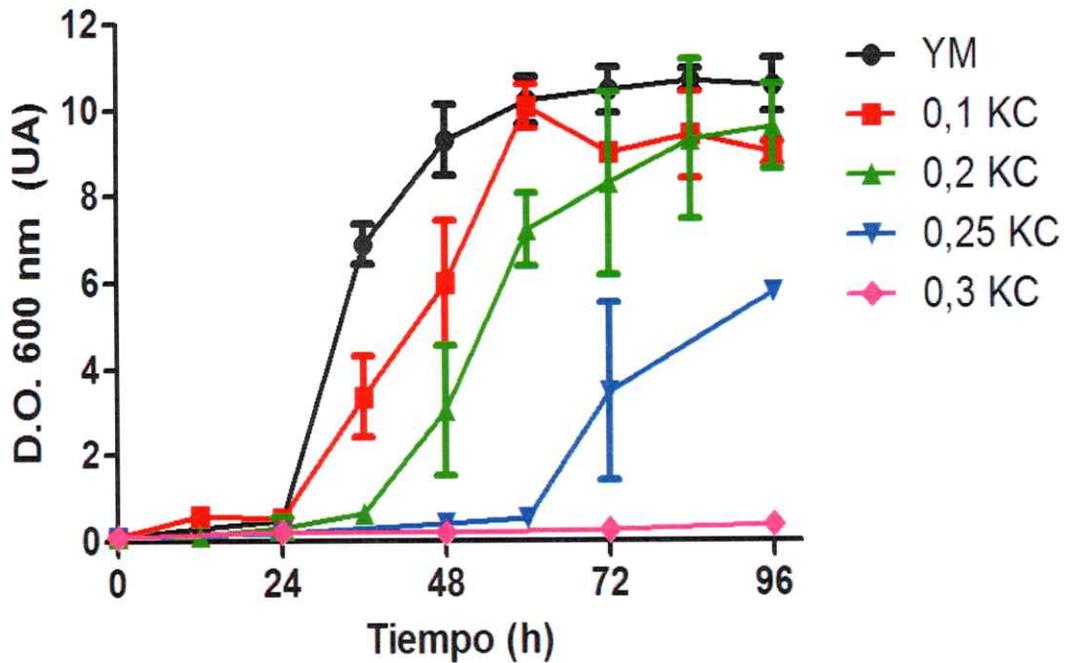


Figura 2: Curvas de crecimiento de *X. dendrorhous* en presencia de ketoconazol. Se cultivó *X. dendrorhous* en medio YM con glucosa al 1% en distintas concentraciones de ketoconazol (KC, en $\mu\text{g/ml}$) y agitación constante a 22°C . Cada punto corresponde al valor promedio de la DO_{600} de tres cultivos independientes para cada tratamiento con su respectiva desviación estándar.

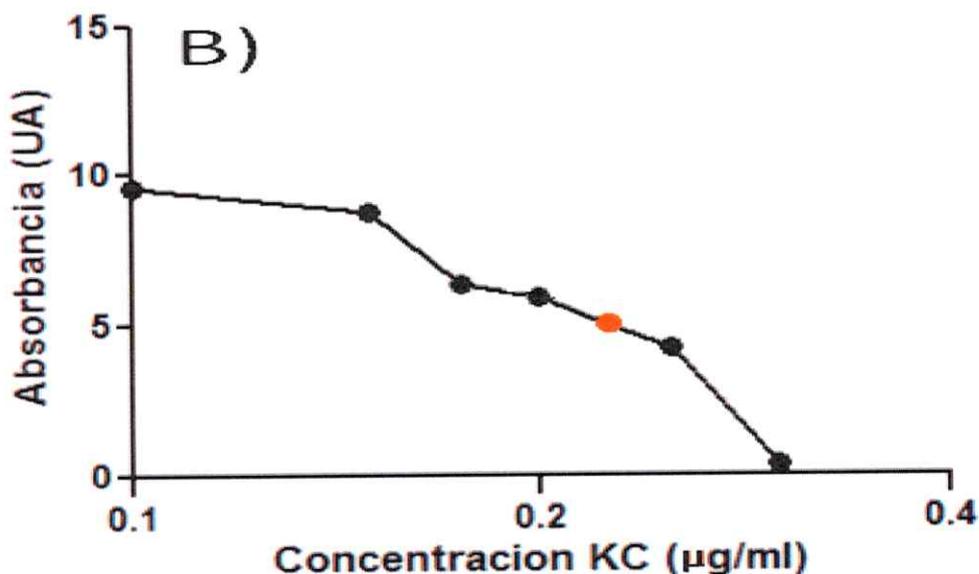


Figura 3: Curva de EC₅₀ de ketoconazol para *X. dendrorhous*. Se muestran los valores promedios de DO₆₀₀ alcanzado luego de 96 h de cultivos de *X. dendrorhous* en presencia de distintas concentraciones de ketoconazol (KC). La concentración de antimicótico se encuentra en escala logarítmica y el punto en naranja indica la concentración de KC a la cual se observa alrededor de un 50% del crecimiento máximo (en ausencia del compuesto) y ésta corresponde aproximadamente a 0,25 µg/ml.

3.2 Efecto de la dosis de ketoconazol en la formación de productos

Debido a la relación entre las rutas de producción de carotenoides y esteroides mediada por la regulación de la enzima HMGR, se evaluó el efecto dosis dependiente del antimicótico de manera tal de poder comparar la inhibición en la producción de ergosterol con la sobreproducción de carotenoides de manera cuantitativa. Para ello, una vez crecidos los cultivos por 96 h en presencia de las distintas concentraciones de ketoconazol indicadas en la figura 2, se extrajeron alícuotas para determinar la cantidad y composición de los carotenoides y esteroides presentes en el cultivo. Además, se tomaron muestras para medir el peso seco por triplicado y así calcular la producción de compuesto por masa de levadura.

Se extrajeron los carotenoides y esteroides, los que se cuantificaron en éter de petróleo de acuerdo a la absorbancia a 465 o 280 nm, respectivamente. Luego se secaron y suspendieron en acetona para ser analizados por RP-HPLC y así poder analizar diferencias en la composición de este tipo de compuestos. En la figura 4 se observan los cromatogramas de los carotenoides obtenidos desde donde se puede determinar el porcentaje de cada uno (análisis de la composición), lo cual se encuentra resumido en la tabla 1. En ambos casos el carotenoide producido en mayor proporción es astaxantina y no se observan cambios mayores en los espectros en presencia o ausencia de ketoconazol lo cual se observa en la figura 4.

Cabe destacar que la cantidad total de carotenoides por peso seco de levadura aumenta en todos los cultivos que fueron tratados con el antimicótico a concentraciones inhibitorias (tabla 1); además, el porcentaje total de astaxantina aumenta significativamente, a diferencia de lo que se esperaba ya que la enzima astaxantina sintasa CrtS es una citocromo P450 que podría ser inhibida por ketoconazol (Figura 4).

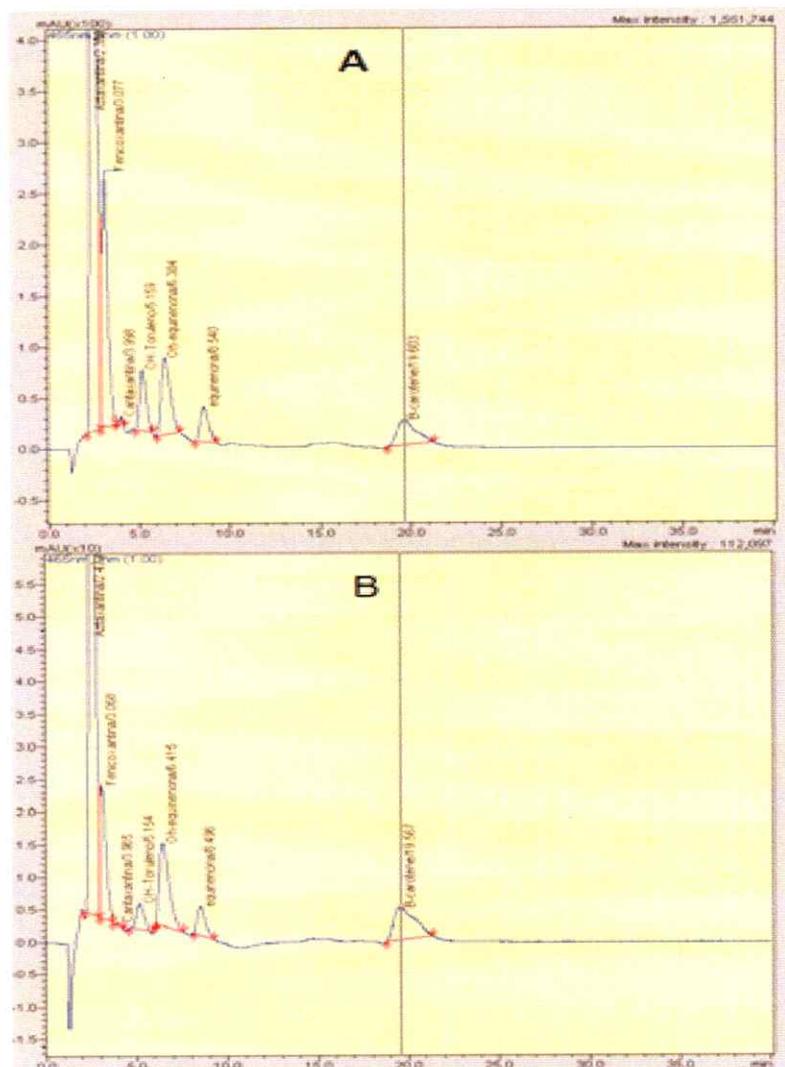


Figura 4: Cromatogramas de carotenoides extraídos desde cultivos de *X. dendrorhous* cultivados en presencia y ausencia de ketoconazol (EC_{50}). En la figura se muestra la absorbancia de los carotenoides en función del tiempo de retención de éstos en un análisis de RP-HPLC. En A se observan los carotenoides de la levadura cultivada en medio YM suplementado con glucosa. En B se observan los carotenoides de la levadura cultivada en medio YM suplementado con glucosa y 0,25 $\mu\text{g/ml}$ de ketoconazol. Los ejes de magnitud de la absorbancia no se encuentran en la misma escala.

Tabla 1: Análisis de cantidad y composición de carotenoides en cultivos de *X. dendrorhous* suplementados con ketoconazol ($\mu\text{g/ml}$ KC). En la tabla se muestran las ppm producidas en las distintas condiciones establecidas anteriormente y el porcentaje de carotenoides al cual corresponde determinado por RP-HPLC.

Medio de cultivo	Carotenoides totales (ppm)	Astaxantina (%)	β -caroteno (%)	Otros carotenoides (%)
YM	168 \pm 9 a	71 \pm 2 a	8,9 \pm 0,9 a	20,3 \pm 3,5 a
YM + 0,1 KC	239 \pm 23,7 b	88 \pm 1,8 b	3,3 \pm 0,6 b	8,5 \pm 0,7 b
YM + 0,2 KC	207 \pm 26 b	85 \pm 0,4 b	4,9 \pm 0,1 c	9,1 \pm 0,4 b
YM + 0,25 KC	190 \pm 12 b	86 \pm 0,7 b	4,2 \pm 0,3 c	10 \pm 1 b
YM + 0,3 KC	200 \pm 30 b	88 \pm 0,0 b	3,7 \pm 0,3 b	8,1 \pm 0,1 b

Los valores corresponden a los promedios de tres muestras \pm la desviación estándar de éstas. Letras iguales en una misma columna indican la ausencia de diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al test de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn. En rojo se destacan los datos correspondientes a la EC_{50} .

De modo análogo, en la figura 5 se muestran los cromatogramas de los esteroides extraídos y en la tabla 2 se observa el análisis de la composición de los esteroides.

Como se observa en la tabla 2, la cantidad de esteroides producidos tiende a decaer al aumentar la concentración de ketoconazol; sin embargo, el cambio es estadísticamente significativo a partir de la concentración de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ de ketoconazol, pero aún más importante es el cambio en su composición, donde el porcentaje de ergosterol disminuye a un 73% del total. En la figura 5 se observa el espectro en el cual se pueden apreciar claramente dos picos correspondientes a esteroides que no se encuentran cuando la levadura es cultivada en ausencia del antimicótico, lo cual da cuenta de la inhibición de enzimas del tipo P450 en ésta ruta lo cual resultaría en la acumulación de otros esteroides que no fueron identificados.

Tabla 2: Análisis de cantidad y composición de esteroides en cultivos de *X. dendrorhous* suplementados con ketoconazol ($\mu\text{g/ml}$ KC). En la tabla se muestran las ppm producidas en las distintas condiciones establecidas anteriormente y el porcentaje de ergosterol al cual corresponde determinado por RP-HPLC.

Medio de cultivo	Esteroides totales (ppm)	Ergosterol (%)
YM	2.649 \pm 996 a	100 \pm 0,0 a
YM + 0,1 KC	3.989 \pm 158 b	95,9 \pm 1,5 b
YM + 0,2 KC	2.429 \pm 440 a	78,4 \pm 1,6 c
YM + 0,25 KC	1.605 \pm 287 c	73,3 \pm 2,4 c
YM + 0,3 KC	1.458 \pm 221 c	65,7 \pm 2,3 d

Los valores corresponden a los promedios de tres muestras \pm la desviación estándar de éstas. Letras iguales en una misma columna indican la ausencia de diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al test de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn. En rojo se destacan los datos correspondientes a la EC₅₀.

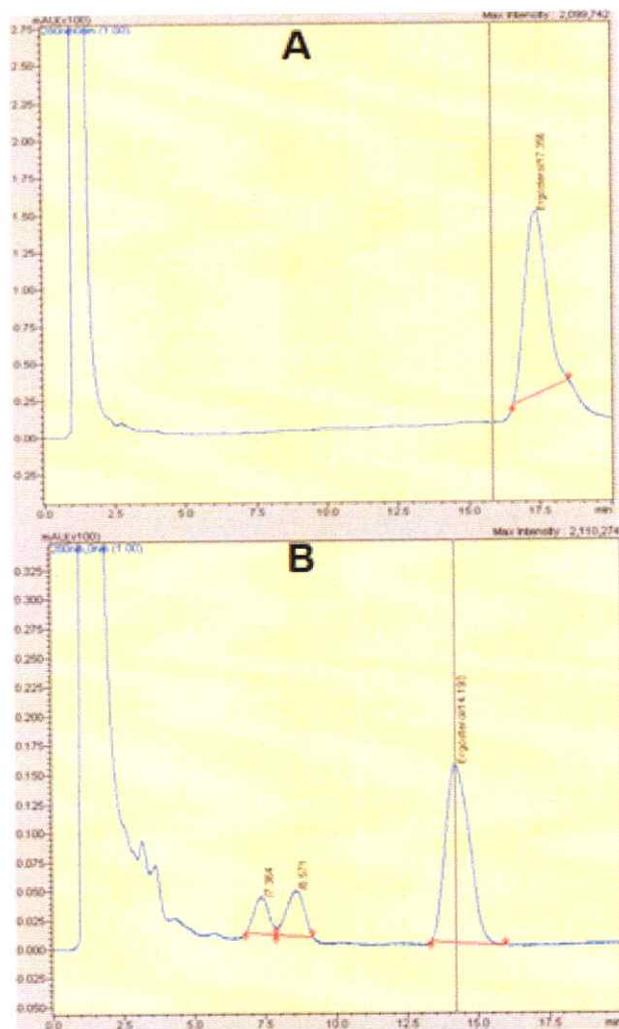


Figura 5: Cromatogramas de esteroides extraídos desde cultivos de *X. dendrorhous* cultivados en presencia y ausencia de ketoconazol (EC_{50}). En la figura se muestra la absorbancia de los esteroides en función del tiempo de retención de éstos en un análisis de RP-HPLC. En A se tienen los esteroides de la levadura crecida en medio YM glucosa y en B se observan los esteroides de un cultivo crecido además en presencia de $0,25 \mu\text{g/ml}$ de ketoconazol. En ambos casos el mayor pico corresponde a ergosterol. Los ejes de magnitud de la absorbancia no se encuentran en la misma escala.

3.3 Efecto de la fuente de carbono en la formación de productos

Es conocido que existe una inhibición en la producción de carotenoides por la glucosa presente en el medio de cultivo, por tal motivo se buscó estudiar el efecto de la fuente de carbono en conjunto con el efecto sobreproductor provocado por el ketoconazol. Para ello se cultivó a la levadura en medios sin glucosa, con glucosa o con maltosa (fuente de carbono que no provoca represión). De esta manera, se crecieron cultivos en medio YM sin la suplementación de fuente de carbono adicional de manera de poder comparar el efecto de ésta en los metabolismos de los carotenoides y esteroides en presencia de ketoconazol. Una vez alcanzada la fase estacionaria (60 h aproximadamente), el cultivo se dividió en 6 para realizar distintos tratamientos como se indica en la sección de métodos: i) sin tratamiento adicional (control), ii) adición de ketoconazol a una concentración final de 0,25 $\mu\text{g/ml}$, iii) adición de glucosa a una concentración final de 10 g/l, iv) adición de maltosa a una concentración final de 15 g/l, v) adición de ketoconazol y glucosa a concentraciones finales de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ y 10 g/l, respectivamente y vi) adición de ketoconazol y maltosa a concentraciones finales de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ y 15 g/l, respectivamente. Además, se extrajo una alícuota previo a los tratamientos para ver las condiciones iniciales del cultivo de manera de poder comparar como control de tiempo cero.

Los cultivos fueron procesados 24 h post-tratamiento y se analizaron los productos (carotenoides y esteroides). En la tabla 3 se observa que todos aquellos cultivos en los cuales se adicionó una fuente de carbono, en presencia o ausencia de ketoconazol, aumentaron su biomasa total de manera estadísticamente significativa; sin embargo, la cantidad de carotenoides totales producidos por peso seco de levadura (ppm) disminuyó en éstos, observándose una mayor disminución en el caso del cultivo



al cual se le agregó glucosa (disminución de alrededor de un 67% respecto a la condición inicial).

Tabla 3: Cantidad y composición de carotenoides en cultivos de *X. dendrorhous* en presencia de distintas fuentes de carbono y del antimicótico ketaconazol. En la tabla se observan los parámetros de producción de carotenoides y la composición de éstos separados en sus principales productos.

Muestra*	Peso Seco (mg/ml)	Producción		Astaxantina (%)	Otros	
		neta de carotenoides (mg/ml)	Cantidad de carotenoides (ppm)		β-caroteno (%)	carotenoides (%)
YM s/g	1,6 ± 0,0 a	0,5 ± 0,0 a	236,7 ± 3,8 a	95,3 ± 1,0 a	2,5 ± 1,0 a	2,2 ± 0,0 a
KC	2,1 ± 0,0 a	0,4 ± 0,0 a	186,3 ± 10,1 b	95,4 ± 0,1 a	0,7 ± 0,7 b	3,9 ± 0,0 b
mal	5,6 ± 0,2 b	0,6 ± 0,1 b	132,7 ± 5,1 c	84,2 ± 2,7 b	4,9 ± 0,2 c	10,9 ± 0,4 c
mal + KC	4,9 ± 0,1 b	0,8 ± 0,2 c	163,3 ± 19,9 b	93,7 ± 1,3 a	1,8 ± 0,7 b	4,5 ± 0,7 b
glu	5,1 ± 0,0 b	0,5 ± 0,0 a	77,1 ± 12,6 d	82,5 ± 0,5 b	5,8 ± 0,6 c	11,8 ± 1,6 c
glu + KC	5,2 ± 0,2 b	0,4 ± 0,1 a	70,2 ± 13,5 d	77,7 ± 2,3 b	8,3 ± 1,9 d	13,9 ± 0,8 d

Los valores corresponden a los promedios de tres muestras ± la desviación estándar de éstas. Letras iguales en una misma columna indican la ausencia de diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al test de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn. * Sin glucosa (s/g), maltosa (mal) o glucosa (glu) suplementados o no con ketoconazol (KC).

Lo anterior sugiere que, si bien con glucosa la levadura reinicia su crecimiento, ésta no es capaz de sintetizar carotenoides *de novo* en esta etapa. En cambio, los cultivos en los que se añadió maltosa como fuente de carbono, presentaron una mayor producción de carotenoides respecto a aquellos a los que se les añadió glucosa, lo cual se observa al comparar la producción de carotenoides por volumen de cultivo, siendo

de 0,5 (mg/ml) en el caso tanto del control como en el cultivo con glucosa, mientras en el caso del cultivo con maltosa aumenta a 0,6 (mg/ml). Por otra parte, la adición de ketoconazol mostró un efecto diferente en combinación con las distintas fuentes de carbono. En el caso del cultivo en presencia de maltosa y ketoconazol, la producción neta de carotenoides respecto al cultivo que no contenía ketoconazol aumentó significativamente, lo cual sugiere que en presencia de maltosa ocurre la síntesis de carotenoides en conjunto con el crecimiento, aumentando la producción de carotenoides de 0,6 (mg/ml) en el caso de solo maltosa a 0,8 (mg/ml) en el caso de maltosa con ketoconazol, por lo que al incluir un inhibidor de la síntesis de esteroides, se favorece la síntesis de carotenoides. En cambio, los cultivos crecidos con glucosa como fuente de carbono no tuvieron cambios significativos en su cantidad ni composición de carotenoides al ser crecidos en presencia o ausencia de ketoconazol, lo cual se podría explicar por la inhibición de la carotenogénesis en presencia de glucosa lo que impediría que se observe el efecto del ketoconazol.

En la tabla 4 se observa la cantidad de esteroides producidos en las condiciones previamente mencionadas. Se puede observar que la cantidad total de esteroides no varía significativamente en las distintas condiciones con la excepción de que en presencia de una fuente de carbono esta siempre disminuye respecto a los controles debido al efecto del crecimiento celular. También se observa que la proporción de ergosterol disminuye en estos casos, en particular en aquellos medios a los cuales se les agregó ketoconazol como se había demostrado en experimentos previos.

Tabla 4: Cantidad y composición de esteroides en cultivos de *X. dendrorhous* en presencia de distintas fuentes de carbono y del antimicótico ketoconazol. En la tabla se observan los parámetros de producción y proporción de ergosterol.

Muestra*	Peso Seco (mg/ml)	Cantidad de esteroides (mg/ml)	Ergosterol (%)
YM s/g	1,6 ± 0,0 a	26,9 ± 3,8 a	100 ± 0,0 a
KC	2,1 ± 0,0 a	18,5 ± 2,1 b	100 ± 0,0 a
mal	5,6 ± 0,2 b	10,6 ± 0,4 c	97,1 ± 0,2 b
mal + KC	4,9 ± 0,1 b	11,2 ± 0,8 c	95,8 ± 0,3 b
glu	5,1 ± 0,0 b	10,9 ± 0,0 c	98,0 ± 1,0 a
glu + KC	5,2 ± 0,2 b	9,4 ± 0,2 c	96,2 ± 0,6 b

Los valores corresponden a los promedios de tres muestras ± la desviación estándar de éstas. Letras iguales en una misma columna indican la ausencia de diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al test de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn. * Sin glucosa (s/g), maltosa (mal) o glucosa (glu) suplementados o no con ketoconazol (KC)

3.4 Efecto de la fuente de carbono y el ketoconazol sobre la expresión génica

Para poder comprender el proceso desde el punto de vista genético y establecer la relación existente con la regulación del proceso es que se realizó la medición de transcrito de distintos genes de *X. dendrorhous*, entre ellos el gen *HMGR* y los genes de las enzimas P450 involucradas en ambas vías de síntesis, *CYP51* y *crtS*. Los valores de expresión relativa se observan en la tabla 5, para todos los análisis se utilizó un cultivo estándar sin fuente de carbono y sin ketoconazol en forma de control de forma de poder comparar éste con las condiciones antes descritas además de utilizar la β -actina [Genbank: X89898.1] como gen de referencia, debido a que es un gen que no varía su expresión en las condiciones antes descritas (Lodato y col., 2007).

Se puede apreciar que al utilizar una fuente de carbono la producción de transcritos aumenta en todos los casos analizados, en especial al utilizar la glucosa debido al aumento del metabolismo. En particular, cabe destacar que el transcrito de *crtS* en la condición de maltosa en presencia de ketoconazol aumenta significativamente (88,2 veces por sobre el control), lo cual podría estar dando cuenta de la alta producción de astaxantina, el producto final de la carotenogénesis, en estas condiciones particulares. Diferente es el caso en cultivos en ausencia del antimicótico o en aquellos que contienen glucosa como fuente de carbono, en los cuales no se observan un aumento considerable del producto génico. Además, al utilizar el ketoconazol en presencia de un azúcar se observa un leve aumento en los niveles del transcrito del gen *HMGR* y una leve disminución en aquellos del gen *CYP51* respecto a utilizar una fuente de carbono sin antimicótico, lo cual se condice con los menores niveles de ergosterol celular en estas condiciones.

Tabla 5: Expresión relativa a nivel de transcrito de genes involucrados en las rutas de carotenogénesis y producción de ergosterol en presencia de diferentes fuentes de carbono y de ketoconazol. La expresión relativa se midió utilizando el método de Lívak (Livak y Schmittgen, 2001) usando un cultivo sin fuente de carbono ni ketoconazol como control y el gen de la Actina como gen de referencia.

Ensayo*	$\Delta\Delta CT_{HMGR}$	$\Delta\Delta Ct_{crtS}$	$\Delta\Delta Ct_{CYP51}$
KC	0,6 ± 0,1 a	1,8 ± 0,2 a	69,5 ± 8,9 a
mal	18,4 ± 3,4 b	3,1 ± 0,6 b	18,9 ± 4,6 b
mal + KC	24,3 ± 3,4 b	88,2 ± 31,0 c	17,8 ± 5,2 b
glu	30,9 ± 6,3 c	6,8 ± 1,1 d	41,9 ± 9,3 c
glu + KC	33,7 ± 5,6 c	2,2 ± 0,5 b	33,4 ± 5,7 c

Los valores corresponden a los promedios de tres muestras ± la desviación estándar de éstas. Letras iguales en una misma columna indican la ausencia de diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al test de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn. * Maltosa (mal) o glucosa (glu) suplementados o no con ketoconazol (KC).

4. DISCUSIÓN

El uso de agentes azólicos ha sido ampliamente empleado tanto en el área clínica en forma de antibiótico (Walsh, 1996) como para investigación (Ghannoum y Rice, 1999), permitiendo establecer el rol de enzimas que participan de la carotenogénesis como la *crtS* en *X. dendrorhous* (Ojima y col., 2006) y para el estudio del proceso de formación de esteroides en distintas levaduras (Henry y col., 2000; Lamb y col., 1999), incluso existe una patente asociada al uso de antimicóticos, entre otros, para la sobreproducción de astaxantina, sin embargo no existen los estudios moleculares respectivos (Johnson y col., 1993).

Para poder realizar el estudio correctamente se tuvo que establecer un rango de concentraciones sub-letales en las cuales se observara una inhibición del crecimiento de la levadura pero que hubiese un crecimiento de al menos el 10% de las colonias totales de manera de obtener resultados representativos. Se observó que el rango a analizar se encontraba entre los 0,1 µg/ml y 0,3 µg/ml de ketoconazol, lo cual difiere con estudios previos que empleaban 2,5 µg/ml de antimicótico (An y col. 1989) y es bastante menor a las dosis empleadas farmacológicamente de alrededor de 1 mg (Fainstein y col. 1987) lo cual da a entender que las concentraciones sub-letales se encuentran en un margen estrecho y es altamente variable entre organismos incluso de la misma familia o especie (Lamb y col., 1999).

Una vez determinado el rango óptimo de concentraciones a trabajar, se pudo establecer que la concentración efectiva media del compuesto para el modelo de estudio empleado fue de 0,25 µg/ml lo cual fue corroborado al hacer la curva de EC_{50} , en la cual se observa un decaimiento característico para un compuesto inhibitorio

(Alexander y col., 1999), observándose que pequeños incrementos en la dosis conllevan a grandes cambios en el crecimiento. Ello se condice con el efecto de los compuestos azólicos en las levaduras, ya sea inhibiendo un producto estructural importante como el ergosterol o acumulando subproductos letales para el organismo (Bossche y col., 1980).

Se pudo observar que al realizar un cultivo de *X. dendrorhous* en medio YM con glucosa añadiendo ketoconazol, dentro del rango de concentraciones establecido, aumentaba la cantidad total de carotenoides presentes en los cultivos de manera considerable y más aún, aumentaba hasta en un 17,5% la proporción de astaxantina presente en la composición. Si bien el aumento en la cantidad total de carotenoides era esperable, debido a la disminución del porcentaje de ergosterol de los cultivos (Loto y col., 2012) llegando hasta un 65,7% de los esteroides totales, no había indicio alguno que aumentara el porcentaje de astaxantina, siendo que la enzima encargada de catalizar la formación del compuesto es de la familia P450 y por lo tanto podría verse inhibida por la presencia del ketoconazol (Yuri y col., 1992). Sin embargo, es posible que el ketoconazol, al ser un inhibidor del tipo competitivo, tenga distintas constantes de afinidad para distintas enzimas del tipo P450 (Yuri y col., 1992). En estas condiciones sería mayormente inhibida la enzima *CYP51*, como se había reportado previamente en la proteína homóloga Erg11 en *S. cerevisiae* (Yoshida y Aoyama, 1991). Lo anterior daría a entender que el efecto que tiene la disminución de la cantidad de ergosterol sobre la regulación de la expresión del gen *HMGGR* conduciría a una sobreproducción de carotenoides. Sin embargo, el aumento en el porcentaje total de astaxantina daría cuenta de una mayor eficiencia de la ruta, acumulando el producto final y no sus intermediarios, sugiriendo que debiese existir algún mecanismo de

control que incrementara la producción de las enzimas de la carotenogénesis. Para conocer si lo recién descrito se debe a un cambio en la expresión de los genes, se estudió los niveles de los RNA mensajeros de estas enzimas.

Una vez establecido el nexo entre la disminución de la concentración de ergosterol y el aumento en la cantidad de carotenoides, se observó la conexión que existe en la regulación metabólica alterando la fuente de carbono en el crecimiento. El diseño experimental utilizado permitió comparar dos fuentes de carbono distintas, la glucosa que actúa reprimiendo la carotenogénesis y la maltosa que no produce tal efecto. Del experimento se observó que la producción específica de pigmentos (μg carotenoides/biomasa de levadura) disminuye cuando se agrega una fuente de carbono. Ello es esperable ya que al agregar más nutrientes la levadura reinicia su crecimiento exponencial hasta alcanzar una nueva fase estacionaria y en esta última etapa no continúa el aumento de la densidad celular, pero sí aumenta considerablemente la producción de metabolitos secundarios, en particular carotenoides (Galdieri y col., 2010). Entre los carotenoides se debe destacar la aparición de intermediarios de la síntesis de astaxantina, como cantaxantina y derivados del toruleno (anotados como "otros carotenoides") lo que da cuenta de que efectivamente existe una síntesis *de novo* de carotenoides.

Por otro lado, al observar la cantidad de carotenoides totales, ésta también aumenta; sin embargo, en cultivos en presencia de maltosa y ketoconazol la cantidad total de pigmentos aumenta considerablemente, pero la proporción de astaxantina se mantiene similar al control (presenta una diferencia menor al 2%). Ello indicaría que la levadura, en estas condiciones no solo podría crecer, sino que además produce carotenoides a lo largo de su crecimiento, lo cual conllevaría a una mayor producción

de astaxantina sobre todo cuando alcanza la fase estacionaria donde se produce el mayor aumento en la proporción de astaxantina (Lodato y col., 2007).

De manera similar, la cantidad de esteroides disminuye cuando a los cultivos se les suplementa una fuente de carbono, debido a que las células entran en una etapa de crecimiento y división celular en la cual la cantidad media de esteroides celulares disminuye antes de alcanzar la fase estacionaria (Johnson y Lewis, 1979). Además, la proporción de ergosterol disminuye respecto a los controles, en particular en los cultivos en los cuales se suplementa ketoconazol.

En atención a que el efecto de estos cambios metabólicos podría estar asociado a cambios de la expresión génica, se realizó un estudio de los niveles de expresión de los genes relacionados a la carotenogénesis, *HMGR* y *crtS*, y de la biosíntesis de ergosterol, *CYP51*, a nivel de sus RNA mensajeros mediante RT-qPCR.

El análisis de los datos indica que los niveles de los mensajeros de los genes aumentan con cualquiera de las fuentes de carbono. Sin embargo, la cantidad relativa de cada mensajero fue distinta dependiendo de la fuente de carbono y también de la presencia o ausencia de ketoconazol, siendo estos factores fundamentales en la productividad de ergosterol y carotenoides. Se observó a grandes rasgos que los niveles de los transcritos de *HMGR* y *CYP51* son mayores en presencia de glucosa por sobre maltosa, lo cual está dentro de lo esperable debido a que la glucosa es metabolizada más eficientemente por la levadura que la maltosa, obteniendo mayor cantidad de energía de ésta (Karenlampi y col., 1981). Sin embargo, en el caso del transcrito del gen *crtS* se observó que en presencia de maltosa y ketoconazol sus niveles aumentan alrededor de 88 veces por sobre el control. Esto podría explicar el

aumento en la proporción de astaxantina, bajo esta condición, ya que la astaxantina es el producto final de la carotenogénesis y su síntesis desde beta-caroteno es controlada por el gen *crtS*, el cual incrementa su expresión.

Este descubrimiento sugiere que podría ocurrir una inhibición preferente en las enzimas P450 por parte del ketoconazol, siendo su principal blanco la enzima CYP51 por sobre otras monooxigenasas. Sin embargo, se necesitan mayores estudios a nivel genético y bioquímico en otras enzimas P450 para poder corroborar la aseveración.

No está del todo claro el motivo por el cual los niveles de *crtS* aumentan considerablemente en la condición específica de presencia de una fuente de carbono distinta a glucosa, sin embargo, es importante notar que los niveles varían considerablemente respecto a la condición en la cual el gen *crtS* se encuentra reprimido por glucosa, en particular 24 h post-tratamiento, cuando su efecto es mayor (Marcoleta y col., 2011). Además, la adición de ketoconazol, que inhibe a la enzima CYP51, es otro factor influyente, ya que no se han reportado previamente los efectos del antimicótico sobre organismos carotenogénicos a nivel genético o molecular. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que existe un proceso de regulación metabólico en las rutas de síntesis de ergosterol y carotenoides que permite un aumento en la expresión de la enzima HMGR, debido a los bajos niveles de ergosterol y la presencia de otros esteroides que inducen a la vía regulatoria mediada por la *sterol-regulatory element binding protein* (SREBP), lo cual aumenta la producción de precursores comunes de ambas vías (Bengoechea-Alonso y Ericsson, 2007). Esta condición que permitiría no solo mayores cantidades de carotenos totales, sino además una sobreproducción de las enzimas participantes en la carotenogénesis, conllevaría a la formación del producto final de la ruta por elementos regulatorios aún desconocidos.

Conocer la regulación a nivel génico de esta vía permitirá diseñar estrategias para poder optimizar la producción de astaxantina en *X. dendrorhous* y así aumentar su valor económico en las distintas industrias relacionadas al pigmento.

5. CONCLUSIONES

- La utilización de ketoconazol a su EC_{50} , conduce a un aumento de la producción total de carotenoides y a un incremento de la proporción de astaxantina respecto de los otros pigmentos; a la vez disminuye la producción de esteroides totales y además la proporción de ergosterol. Bajo estas condiciones, se producen otros dos esteroides no identificados en menor cantidad que el ergosterol.
- En fuentes de carbono distintas a glucosa, como maltosa, y en presencia de ketoconazol, aumenta la producción total de carotenoides y cambia su composición. Principalmente incrementa la proporción de astaxantina, lo cual sugiere que el aumento de la tasa metabólica, en conjunto con la inhibición de la ruta de los esteroides, permite direccionar el metabolismo secundario a una vía particular, en este caso, la carotenogénica.
- El efecto conjunto de ketoconazol y una fuente de carbono, aumenta los niveles de RNA mensajero del gen *HMGR*, del gen carotenogénico *crtS* y del gen relacionado a ergosterol *CYP51*, lo que refuerza la idea de que se puede direccionar el metabolismo celular a la producción de metabolitos secundarios incluso mientras la célula se encuentra en crecimiento.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alcaíno, J., Barahona, S., Carmona, M., Lozano, C., Marcoleta, A., Niklitschek, M., Sepúlveda, D., Beaza, M. y Cifuentes, V. (2008). Cloning of the cytochrome p450 reductase (*crtR*) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiology*. 8: 169.
- Alcaíno, J., Romero, I., Niklitschek, M., Sepúlveda, D., Rojas, M. C., Baeza, M. y Cifuentes, V. (2014). Functional characterization of the *Xanthophyllomyces dendrorhous* farnesyl pyrophosphate synthase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoding genes that are involved in the synthesis of isoprenoid precursors. *PLoS ONE*. 9(5): e96626.
- Alexander, B., Browse, D.J., Reading, S.J. y Benjamin, I. S. (1999). A simple and accurate mathematical method for calculation of the EC 50. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 41: 55-58.
- An, G., Schuman, D.B. y Johnson, E.A. (1989). Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Applied and Environmental Microbiology*. 55(1): 116-124.
- Andrewes, A.G., Phaff, H.J. y Starr, M.P. (1976). Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast. *Phytochemistry*. 15(6): 1003-1007
- Armstrong, G.A. y Hearst, J.E. (1996). Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *The FASEB Journal*. 10(2): 228-237.
- Bengoechea-Alonso, M. T. y Ericsson, J. (2007). SREBP in signal transduction: cholesterol metabolism and beyond. *Current Opinion in Cell Biology*. 19(2): 215-222.
- Benkwitz, C., Liao, M., Laster, M.J., Sonner, J.M., Eger, E.I. y Pearce, R.A. (2007). Determination of the EC50 amnesic concentration of etomidate and its diffusion profile in brain tissue. *Anesthesiology*. 106: 114-123.
- Bossche, H.V.D., Willemsens, G., Cools, W., Cornelissen, F., Lauwers, W.F. y Van Cutsem, J.M. (1980). In vitro and in vivo effects of the antimycotic drug ketoconazole on sterol synthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 17(6): 922-928.
- Boussiba S., Vonshak A., Cohen Z. y Richmond A. (2000). Procedure for large-scale production of astaxanthin from *Haematococcus*. US Patent 6022701
- Breitenbach, J., Visser, H., Verdoes, J.C., van Oojen, A.J.J. y Sandmann, G. (2011). Engineering of geranylgeranyl pyrophosphate synthase levels and physiological conditions for enhanced carotenoid and astaxanthin synthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnology Letters*. 33(4): 755-761.

- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. The FASEB Journal. 9(15): 1551
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., Mercadante, A. Z. y Egeland, E. S. (2012). Carotenoids. Birkhäuser Publishing, Basel.
- Choi, S. y Koo, S. (2005). Efficient syntheses of the keto-carotenoids canthaxanthin, astaxanthin, and astacene. Journal of Organic Chemistry. 70(8): 3328-3331.
- Contreras, G. (2014). Caracterización molecular de posibles cepas de *Xanthophyllomyces dendrorhous* aisladas desde la Antártica chilena y análisis de la producción de metabolitos con potencial biotecnológico. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- De Vit, M. J., Waddle, J. A. y Johnston, M. (1997). Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. Molecular Biology of the Cell. 8: 1603-1618.
- Fainstein, V., Bodey, G.P., Elting, L., Maksymiuk, A., Keating, M. y McCreddie, K.B. (1987). Ketoconazole therapy of fungal infections in neutropenic cancer patients. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 31(1): 11-15.
- Galdieri, L., Mehrotra, S., Yu, S. y Vancura, A. (2010). Transcriptional regulation in yeast during diauxic shift and stationary phase. Omics: a journal of integrative biology. 14(6): 629-638.
- Ghannoum, M.A. y Rice, L.B. (1999). Antifungal Agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. Clinical Microbiology Reviews. 12(4): 501.
- Gutierrez, M.S. (2014). Estudio de posibles donadores de electrones alternativos en sistemas P450 de la levadura carotenogénica *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Hammer, G.B., Litalian, C., Wellis, V. y Drover D.R. (2001). Determination of the median effective concentration (EC50) of propofol during oesophagogastroduodenoscopy in children. Pediatric Anesthesia, 11(5): 549-553.
- Henry, K.W., Nickels, J.T. y Edlind, T.D. (2000). Upregulation of ERG genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 44(10): 2693-2700.
- Higuera-Ciapara, I., Félix-Valenzuela, L. y Goycoolea, F.M. (2006). Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 46(2): 185-196.
- Johnson, E.A. y Lewis, M.J. (1979). Astaxanthin Formation by the Yeast *Phafia rhodozyma*. Journal of General Microbiology. 115: 173-183.

- Johnson E y Gil-Hwan An. (1991) Astaxanthin from microbial sources. *Critical Reviews in Biotechnology*. 11: 297-326
- Johnson, E.A., Schreiber, D., Ho, K.P., Hall, W.T., Yang, H.H. y Geldiay-Tuncer, B. (1993). Processes for in vivo production of astaxanthin and *Phaffia rhodozyma* yeast of enhanced astaxanthin content. Patent 5182208.
- Karenlampi, S.O., Marin, E. y Hanninen, O.O. (1981). Effect of carbon source on the accumulation of cytochrome P-450 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry. Journal*. 194: 407-413.
- Lamb, D., Kelly, D. y Kelly, S. (1999). Molecular aspects of azole antifungal action and resistance. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*. 2(6): 390-402.
- Leiva, K. (2015). Caracterización y funcionalidad del gen *CYP51* de *Xanthophyllomyces dendrorhous* involucrado en la biosíntesis de ergosterol. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Lepesheva, G.I. y Waterman, M.R. (2007). Sterol 14 α -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1770(3): 467-477.
- Livak K.J. y Schmittgen T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25: 402-408.
- 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*. *Biological. Research*. 40: 73-84.
- Lorenz, R.T. y Cysewski, G.R. (2000). Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*. 18(4): 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 Microbiology*. 12(1): 235.
- Marcoleta, A., Niklitschek, M., Wozniak, A., Lozano, C., Alcaíno, J., Baeza, M. y Cifuentes, V. (2011). Glucose and ethanol-dependent transcriptional regulation of the astaxanthin biosynthesis pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiology*. 11(1): 190.

- Mata-Gómez, L.C., Montañez, J.C., Méndez-Zavala, A. y Aguilar, C.N. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories*. 13: 12.
- Miao L., Wang Y., Chi S., Yan J., Guan G., Hui B. y Li Y. (2010). Reduction of fatty acid flux results in enhancement of astaxanthin synthesis in a mutant strain of *Phaffia rhodozyma*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 37: 595-602.
- Miao, L., Chi, S., Tang, Y., Su, Z., Yin, T., Guan, G., & 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 Research*. 11(2): 192-201.
- 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 beta-carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*. 275(2): 148-58.
- Papamichos-Chronakis, M., Gligoris, T. y Tzamarias, D. (2004). The Snf1 kinase controls glucose repression in yeast by modulating interactions between the Mig1 repressor and the Cyc8-Tup1 co-repressor. *EMBO reports*. 5(4): 368-372.
- Rodríguez-Sáiz, M., de la Fuente, J.L. y Barredo, J.L. (2010). *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 88(3): 645-658.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning. A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.
- Sanderson, G.W. y Jolly, S.O. (1994). The value of *Phaffia* yeast as a feed ingredient for salmonid fish. *Aquaculture*. 124(1-4): 193-200
- Schroeder, W.A. y Johnson, E.A. (1995). Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 14(6): 502-507
- Shang, F., Wen, S., Wang, X. y Tan, T. (2006). Effect of nitrogen limitation on the ergosterol production by fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*. 122(3): 285-292
- Shearer, W.M. (1992). *The Atlantic salmon. Natural history, exploitation and future management*. New York, NY: Halstead Press.
- Sheehan, D.J., Hitchcock, C.A. y Carol, M. (1999). Current and emerging azole antifungal. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(1): 40

- Shumskaya, M. y Wurtzel, E.T. (2013). The carotenoid biosynthetic pathway: thinking in all dimensions. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*. 208: 58-63.
- Stone, K.M., Thornhill, N.F., Roche, F.W. y Fish, N.M. (1992). A method of using off-line measurements in an on-line estimator of biomass concentration for a penicillin fermentation, and its effects on the quality of the estimates. In IFAC symposia series (pp. 101-101). Pergamon press.
- Surmatis, J.D. y Thommen, R. (1967). A total synthesis of astaxanthin dimethyl ether. *The Journal of organic chemistry*. 32(1): 180-184.
- van den Brink, H., van Gorcom, R.F.M., van den Hondel, C.A. y Punt P.J. (1998). Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 23: 1-17.
- Walsh, T.J. (1996). Minireview. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40(2): 279-291.
- Weber, R.W.S., Becerra, J., Silva, M.J. y Davoli, P. (2008). An unusual *Xanthophyllomyces* strain from leaves of *Eucalyptus globulus* in Chile. *Mycological research*. 112(7): 861-867
- Webbster, C.D. y Lim, C. (2002). Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. Centre for Agriculture and Biosciences International.
- Wozniak, A., Lozano, C., Barahona, S., Niklitschek, M., Marcoleta, A., Alcaíno, J., Sepúlveda, D., Baeza, M. y Cifuentes, V. (2011). Differential carotenoid production and gene expression in *Xanthophyllomyces dendrorhous* grown in a nonfermentable carbon source. *FEMS Yeast Research*. 11(3): 252-62.
- Yoshida, Y. y Aoyama, Y. (1991). Sterol 14 α -demethylase and its inhibition: structural considerations on interaction of azole antifungal agents with lanosterol 14 α -demethylase (P-45014DM) of yeast. *Biochemical Society Transactions*. 19(1): 778-782.
- Yuri, A., Koichi, I., Kimihiko, H., Akira, S., Michinari, K. y Yuzo, Y. (1992). Inhibition by a novel azole antifungal agent with a geranyl group on lanosterol 14 α -demethylase of yeast. *Biochemical pharmacology*. 44(9): 1701-1705.

