

UCH-FC  
JAC-M  
W837  
C.1

**Influencia del metabolismo aerobio en la expresión de los genes  
de carotenogénesis y la biosíntesis de pigmentos en  
*Xanthophyllomyces dendrorhous*.**

**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**

**Aniela Wozniak**

**Enero 2008**

**Director de Tesis: Dr. Víctor Cifuentes**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION**

**TESIS DE DOCTORADO**

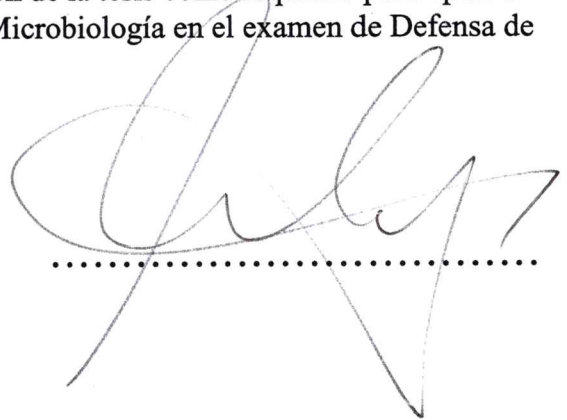
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

**ANIELA WOZNIAK**

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 de Tesis rendido el día 26 de noviembre de 2007.

**Director de Tesis:**

**Dr. Víctor Cifuentes**



.....

**Comisión de Evaluación de la Tesis:**

**Dra. Rosalba Lagos**



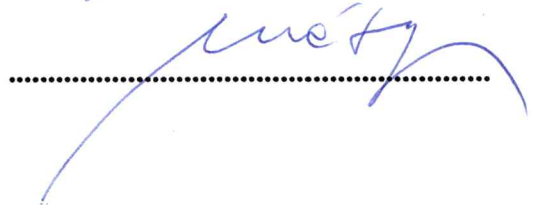
.....

**Dra. Margarita Carú**



.....

**Dr. Claudio Vázquez**



.....



Nací en la ciudad de Montevideo, Uruguay, el 4 de diciembre de 1972. Mis padres son Ana María Banchemo y Eduardo Wozniak. Tengo una hermana y un hermano, Joanna y Erik. Desde niña manifesté un interés muy especial por los seres vivos y por saber como se comportaban. Fue en mi adolescencia que decidí estudiar Ciencias Biológicas en la Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay. En el cuarto y último año de la carrera opté por la orientación microbiológica, razón por la cual realicé mi Tesis de pregrado en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química, en el área de producción de micotoxinas en hongos filamentosos. Egresé en 1999 con el Título de Licenciada en Ciencias Biológicas. Posteriormente, comencé a interesarme por la ciencia aplicada y realicé el Magíster en Biotecnología en la misma Facultad. Cuando egresé del Magíster, surgió la posibilidad de realizar un Doctorado en Microbiología en Chile. Tomé la oportunidad, con un poco de temor por el gran cambio que significaba, y resultó ser una excelente experiencia. Realicé mi Tesis doctoral en el laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, bajo la supervisión del Dr. Víctor Cifuentes, investigando la fisiología de la levadura carotenogénica *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Durante mi Tesis, realicé una estadía de investigación de 6 meses en la Universidad J.W. Goethe, Frankfurt, Alemania, bajo la supervisión del Dr. Gerhard Sandmann, en donde aprendí la técnica de HPLC de carotenoides, entre otros temas.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas e instituciones que han hecho posible el desarrollo de esta Tesis. Agradezco a mi tutor el Dr. Víctor Cifuentes, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por las facilidades brindadas para la realización de esta Tesis. Por la formación científica impartida. Por darme su apoyo, su preocupación y su confianza, especialmente en aquellos momentos en los que yo la necesitaba.

A la Universidad de Chile y a los profesores del Programa de Microbiología, en especial a la Dra. Margarita Carú, a la Dra. Rosalba Lagos y al Dr. Claudio Vázquez, por sus valiosos comentarios y críticas de este trabajo.

Al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) por el otorgamiento de la beca que me permitió realizar estudios de Doctorado.

A la Dra. Cecilia Rojas por su apoyo y estímulo.

Al Dr. Gerhard Sandmann por facilitarme los medios para la estadía en su laboratorio, por la buena disposición para enseñar y por la preocupación en que yo aprendiera. A Andreas Lück por su ayuda, por lo mucho que me enseñó y por su excelente compañía.

A todos mis compañeros de laboratorio de Genética, Dony, Mauricio, Andrés, Rafael, Mario, Jennifer, Oriana, Vicente, Pilar, Salvador, por ayudarme siempre, por sus sugerencias, por la compañía. A Marcelo Baeza por sus críticas y por ayudarme con este trabajo. A Marisela por compartir conmigo su cariño. A Carla por su amistad, por ayudarme con los experimentos, por haberme enseñado variadas cosas, desde compartir hasta como manipular RNA.

A mis compañeros y amigos del Programa de Doctorado, Felipe Gordillo, Jae Yen Shin, José Pérez, Alba Ricardo y Verónica García, por los buenos momentos vividos, por el apoyo mutuo en los no tan buenos momentos, por el enriquecedor intercambio de puntos de vista científicos y personales, por su amistad.

A Patricia Banhero y Osvaldo Arén por su apoyo, a Santiago por su alegría. A María Inés Cabrera, por sus valiosísimos consejos, por estar siempre ahí. A Gisel Rodiño por haberme alentado a venir a Chile, por su apoyo en las buenas y en las malas. A Sergio Hidalgo y a Diana Villares, por su preocupación, por su apoyo en los difíciles últimos momentos de esta larga odisea, por su cariño. A todos ellos, gracias por su amistad, por tratar de entender que es un carotenoide, o el porqué de sacar una muestra de un cultivo a las 12 de la noche.

A mis Padres Ana María y Eduardo, a mi hermana Joanna, a mi hermano Erik y a mi Tía Raquel, por la fuerza, la motivación y el amor que me transmitieron permanente e incondicionalmente desde la distancia.

A todas aquellas personas que durante estos años en este país que me ha tratado muy bien, de una u otra manera me ayudaron a lograr mis objetivos. Gracias.

## INDICE DE MATERIAS

Agradecimientos	iii
Índice de materias	iv
Lista de Figuras	viii
Lista de Tablas	xi
Lista de Abreviaturas	xii
Resumen	xii
Abstract	xiv
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Carotenoides: estructura, propiedades y funciones.	1
1.2. <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> y producción de carotenoides.	3
1.3. Genética molecular de la síntesis de carotenoides.	5
1.4. Regulación de la biosíntesis de carotenoides.	8
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>15</b>
2.1. Cepa utilizada y condiciones de cultivo.	15
2.1.1. Cultivo en matraces.	15
2.1.2. Cultivo en fermentador.	15
2.2. Técnicas de biología molecular.	16
2.2.1. Extracción de RNA total de <i>X. dendrorhous</i> .	16
2.2.2. Transcripción reversa (RT).	17
2.2.3. Amplificación por PCR para determinar los niveles relativos de los mensajeros de carotenogénesis.	17
2.2.4. Electroforesis de DNA.	20
2.2.5. Análisis bioinformático de secuencias promotoras.	20
2.3. Técnicas bioquímicas.	20
2.3.1. Determinación de glucosa.	20
2.3.2. Determinación de etanol.	21

2.3.3. Extracción de carotenoides.	21
2.3.4. Análisis de carotenoides por HPLC.	22
2.3.5. Determinación de biomasa.	22
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>23</b>
3.1. Estudio del efecto de distintas fuentes de carbono en la carotenogénesis.	23
3.2. Crecimiento de <i>X. dendrorhous</i> en fermentador en medio YM con succinato.	26
3.2.1. Análisis de la producción de biomasa y carotenoides a lo largo del ciclo de vida.	26
3.2.2. Análisis de la expresión de los genes de carotenogénesis en YM succinato.	29
3.2.2.1. Gen <i>idi</i> (isopentenil pirofosfato isomerasa) y gen <i>crtE</i> (geranilgeranil pirofosfato sintasa).	29
3.2.2.2. Gen <i>crtYB</i> (fitoeno- $\beta$ -caroteno sintasa).	32
3.2.2.3. Gen <i>crtI</i> (fitoeno desaturasa).	32
3.2.2.4. Gen <i>crtS</i> (astaxantina sintasa).	35
3.2.3. Análisis de la producción de carotenoides y su relación con la expresión de los genes de carotenogénesis.	35
3.2.3.1. Determinación de los carotenoides de la ruta central (dicíclica) de biosíntesis de astaxantina.	35
3.2.3.2. Determinación de carotenoides monocíclicos.	39
3.2.3.3. Análisis global de la carotenogénesis en base a los porcentajes de los carotenoides.	40
3.3. Efecto de la utilización de una fuente de carbono no fermentable y una fermentable sobre la carotenogénesis y sobre la expresión de los genes de carotenogénesis.	42

3.3.1. Análisis del crecimiento y la producción de carotenoides a lo largo del ciclo de vida.	42
3.3.2. Análisis de la expresión de los genes de carotenogénesis en MM glucosa y MM succinato.	46
3.3.2.1 Gen <i>idi</i> (isopentenil pirofosfato isomerasa) y gen <i>crtE</i> (geranilgeranil pirofosfato sintasa).	46
3.3.2.2. Gen <i>crtYB</i> (fitoeno- $\beta$ -caroteno sintasa).	48
3.3.2.3. Gen <i>crtI</i> (fitoeno desaturasa).	52
3.3.2.4. Gen <i>crtS</i> (astaxantina sintasa).	55
3.3.3. Análisis de la producción de carotenoides y su relación con la expresión de los genes de carotenogénesis.	55
3.4. Efecto de la intensidad del flujo de aire en la carotenogénesis de <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> .	62
3.5. Estudio de la inducción de la carotenogénesis utilizando etanol como agente inductor.	64
3.5.1. Análisis de la expresión de los genes de carotenogénesis durante la inducción con etanol.	68
3.5.1.1 Gen <i>idi</i> (isopentenil pirofosfato isomerasa).	68
3.5.1.2 Gen <i>crtE</i> (geranilgeranil pirofosfato sintasa).	68
3.5.1.3 Gen <i>crtYB</i> (fitoeno- $\beta$ -caroteno sintasa).	71
3.5.1.4. Gen <i>crtI</i> (fitoeno desaturasa).	71
3.5.1.5. Gen <i>crtS</i> (astaxantina sintasa).	74
3.5.2. Estudio de la producción de astaxantina y de carotenoides intermediarios.	74
3.6. Análisis bioinformático de la región promotora de los genes de carotenogénesis.	77
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>83</b>

4.1. Análisis del efecto de distintas fuentes de carbono en la carotenogénesis.	83
4.2. Análisis del crecimiento de la levadura en una fuente de carbono fermentable (glucosa) y una no fermentable (succinato).	85
4.3. Análisis de la expresión de genes de carotenogénesis y producción de carotenoides en YM succinato.	88
4.4. Análisis del efecto del flujo de aire en la carotenogénesis.	91
4.5. Análisis de la inducción de la carotenogénesis utilizando etanol como agente inductor.	93
4.6. Análisis de las secuencias reguladoras encontradas en las regiones promotoras de los genes de carotenogénesis.	96
4.7. Modelo de la síntesis de carotenoides en base a los resultados obtenidos.	98
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>103</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>105</b>



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ruta de biosíntesis de carotenoides dicíclica y monocíclica.	6
Figura 2. Utilización de la glucosa, etanol y succinato esquematizadas en base a lo que sucede en <i>S. cerevisiae</i> .	10
Figura 3. Contenido celular de carotenoides, carotenoides totales y biomasa en medio YM suplementado con glucosa, glicerol, succinato y xilosa al cabo de 5 y 7 días de cultivo.	25
Figura 4. Producción de carotenoides por <i>X. dendrorhous</i> UCD 67-385 en YM succinato y en YM glucosa en un fermentador en operado en forma 'batch'.	28
Figura 5. Cinética de expresión de los genes <i>idi</i> y <i>crtE</i> en YM succinato.	31
Figura 6. Cinética de expresión del gen <i>crtYB</i> en YM succinato.	33
Figura 7. Cinética de expresión del gen <i>crtI</i> en YM succinato.	34
Figura 8. Cinética de expresión del gen <i>crtS</i> en YM succinato.	36
Figura 9. Carotenoides intermediarios y astaxantina producidos a lo largo del ciclo de crecimiento en YM succinato.	38
Figura 10. Producción de carotenoides por <i>X. dendrorhous</i> UCD 67-385 en MM glucosa y en MM succinato en un fermentador operado en forma 'batch'	43
Figura 11. Cinética de expresión de los genes <i>idi</i> y <i>crtE</i> en MM glucosa y en MM succinato.	47
Figura 12. Cinética de expresión del gen <i>crtYB</i> en MM glucosa y en MM succinato.	49
Figura 13. Cinética de relación de la expresión del mensajero maduro del gen <i>crtYB</i> (mmRNA) y del mensajero alternativo (amRNA) del mismo gen, en MM glucosa y MM succinato.	51
Figura 14. Cinética de expresión del gen <i>crtI</i> en MM glucosa y en MM succinato.	53
Figura 15. Cinética de relación de la expresión del mensajero maduro del gen <i>crtI</i> (mmRNA) y del mensajero alternativo (amRNA) del mismo gen, en MM glucosa y MM succinato.	54

Figura 16. Cinética de expresión del gen <i>crtS</i> en MM glucosa y MM succinato.	56
Figura 17. Astaxantina y carotenoides intermediarios producidos durante el crecimiento en MM glucosa y MM succinato.	57
Figura 18. Crecimiento y contenido celular de carotenoides en YM sin glucosa con y sin etanol.	66
Figura 19. Crecimiento y cinética de expresión del gen <i>idi</i> en YM sin glucosa con y sin etanol.	69
Figura 20. Crecimiento y cinética de expresión del gen <i>crtE</i> en YM sin glucosa con y sin etanol.	70
Figura 21. Crecimiento y cinética de expresión del gen <i>crtYB</i> maduro y alternativo en YM sin glucosa con y sin adición de etanol.	72
Figura 22. Crecimiento y cinética de expresión del gen <i>crtI</i> maduro y alternativo en YM sin glucosa con y sin adición de etanol.	73
Figura 23. Crecimiento y cinética de expresión del gen <i>crtS</i> en YM sin glucosa con y sin adición de etanol.	75
Figura 24. Astaxantina y carotenoides intermediarios producidos en el cultivo con y sin etanol.	76
Figura 25. Esquema de las secuencias reguladoras encontradas con herramientas bioinformáticas en los genes estudiados.	81
Figura 26. Esquema de lo que ocurriría a nivel de la expresión de los genes de carotenogénesis y de los carotenoides en un cultivo en MM glucosa y en MM succinato.	99
Figura 27. Esquema de lo que ocurriría a nivel de la expresión de los genes de carotenogénesis y de los carotenoides en un cultivo en YM succinato y en MM succinato.	101
Figura 28. Esquema de lo que ocurriría a nivel de la expresión de los genes de carotenogénesis y de los carotenoides al agregar etanol al 0,2 % a un cultivo en fase estacionaria.	102

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Partidores utilizados.	18
Tabla 2. Pigmentación de la cepa silvestre de <i>X. dendrorhous</i> en medio sólido suplementado con distintas fuentes de carbono al 1 % p/p.	24
Tabla 3. Distribución porcentual de los carotenoides producidos por la cepa silvestre en distintas fuentes de carbono.	27
Tabla 4. Producción máxima de biomasa y carotenoides en la fermentación en YM succinato.	30
Tabla 5. Distribución porcentual de los carotenoides producidos por la cepa silvestre en la fermentación en YM succinato.	41
Tabla 6. Producción máxima de biomasa, carotenoides y etanol en las fermentaciones en MM glucosa y MM succinato.	45
Tabla 7. Distribución porcentual de los carotenoides producidos por la cepa silvestre en la fermentación en MM glucosa.	60
Tabla 8. Distribución porcentual de los carotenoides producidos por la cepa silvestre en la fermentación en MM succinato.	61
Tabla 9. Carotenoides totales y porcentaje de intermediarios de la cepa silvestre al cabo de 5 días de crecimiento en YM succinato con distintos flujos de aire.	63
Tabla 10. Parámetros de crecimiento determinados al finalizar el ciclo en medio YM sin glucosa con y sin etanol.	67
Tabla 11. Alineamiento de las secuencias de las regiones promotoras promotoras de los genes <i>idi</i> , <i>crtE</i> , <i>crtYB</i> , <i>crtI</i> , y <i>crtS</i> .	80

## LISTA DE ABREVIATURAS

- cDNA**, DNA complementario al mRNA
- DEPC**, Dietil pirocarbonato
- DMAPP**, Dimetil alil pirofosfato
- GGPP**, geranilgeranil pirofosfato
- HDCO**, hidroxil - ceto toruleno
- HPLC**, Cromatografía líquida de alta presión
- IPP**, isopentenil pirofosfato
- MM**, medio mínimo
- PCR**, Reacción en cadena de la polimerasa
- ROS**, especies reactivas de oxígeno
- RT**, transcripción reversa
- YM**, yeast medium (medio completo para levaduras)
- TAE**, Tris-acetato EDTA

## RESUMEN

La astaxantina (3, 3'-dihidroxi- $\beta$ ,  $\beta$  caroteno-4, 4'-diona) es un pigmento carotenoide sintetizado por la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*, y su rol sería el de proteger a la levadura contra el estrés oxidativo. En este microorganismo, las cinco enzimas involucradas en la biosíntesis de astaxantina a partir de IPP están codificadas por los genes *idi* (isopentenil pirofosfato isomerasa), *crtE* (geranil pirofosfato sintasa), *crtYB* (fitoeno -  $\beta$  - caroteno sintasa), *crtI* (fitoeno desaturasa) y *crtS* (astaxantina sintasa). No obstante, se conoce poco acerca de la regulación de la carotenogénesis en *X. dendrorhous*. En esta Tesis se estudió la expresión de los genes de carotenogénesis a nivel de sus mRNAs y su correlación con la producción de astaxantina y sus intermediarios, utilizando dos fuentes de carbono, una fermentable (glucosa) y otra no fermentable (succinato). Se determinó que en succinato la producción de pigmentos es aproximadamente el doble que en glucosa y se inicia al principio de la fase exponencial, mientras que en glucosa comienza en la fase estacionaria. Los genes *idi*, *crtE* y *crtS* tienen un patrón de expresión similar en ambos medios de cultivo. En cambio, el patrón de expresión de los genes *crtI* y *crtYB* durante la fase estacionaria, es diferente en ambas condiciones: en succinato, el nivel de los mensajeros alternativos de estos dos genes son mayores que sus respectivos mensajeros maduros, mientras que en glucosa la situación es a la inversa.

La identificación y cuantificación por HPLC de los carotenoides producidos en fermentaciones en medio completo (YM) y medio mínimo con succinato (MM)

revelaron que el porcentaje de astaxantina es menor en YM que en MM (28 % y 87 %, respectivamente) lo que sugiere una menor actividad astaxantina sintasa en YM. Sin embargo, el gen de dicha enzima (*crtS*) se expresa en forma similar en ambos medios. La diferencia mas notoria en cuanto a la expresión de los genes de carotenogénesis en YM y MM es en el mensajero alternativo del gen *crtI*, la cual es menor en YM que en MM. No es posible establecer una correlación cuantitativa entre el nivel de expresión de los genes de las enzimas carotenogénicas y el nivel de los carotenoides producto de su actividad, así como tampoco una correlación temporal entre los mismos. Esto sugiere que podría existir algún mecanismo de regulación post-transcripcional.

En este trabajo se demostró que al agregar etanol al 0,2 % v/v a un cultivo en fase estacionaria, los carotenoides aumentan un 31 % respecto al cultivo sin etanol y se induce selectivamente la expresión de los genes exclusivos de la carotenogénesis *crtI*, *crtYB* y *crtS*, mientras que los genes *idi* y *crtE*, que además participan en otras vías metabólicas, no aumentan su expresión luego de la adición de este alcohol.

Por otra parte, los datos experimentales acerca de la expresión de los genes de carotenogénesis contrastan con los datos del análisis bioinformático de las secuencias promotoras de tales genes. No se encontraron secuencias de regulación por oxígeno ni por fuentes de carbono no fermentables. Sin embargo, se encontraron secuencias de unión al factor Mig1, el cual reprime la expresión de los genes blanco en presencia de glucosa. El hallazgo de secuencias de unión al factor Mig1 en los genes *crtI* y *crtYB* en ubicaciones similares respecto al codón de inicio de la traducción, así como la expresión diferencial de los mensajeros alternativo y maduro de los mismos, sugieren que estos genes podrían tener un rol regulatorio en la vía carotenogénica.

## ABSTRACT

Astaxanthin (3, 3' - dihydroxy-,  $\beta$  carotene-4, 4' - dione) is a carotenoid pigment synthesized by *Xanthophyllomyces dendrorhous*, with a possible role in protecting the yeast against oxidative stress. The genes that encode for the enzymes involved in the biosynthesis of astaxanthin in this yeast include *idi* (isopentenyl pyrophosphate isomerase), *crtE* (geranyl pyrophosphate synthase), *crtYB* (phytoene -  $\beta$  - carotene synthase), *crtI* (phytoene desaturase) and *crtS* (astaxanthin synthase). However, there is a lack of information about how carotenogenesis is regulated in *X. dendrorhous*. In this thesis, the process of carotenogenesis concerning the mRNAs of these genes and their correlation with astaxanthin and intermediate carotenoids was studied using a fermentable carbon source (glucose) and a non-fermentable one (succinate). Previously, it was determined that in succinate, carotenoid production is approximately two-fold that in glucose and starts at the beginning of the exponential phase whereas in glucose it starts later, at the stationary phase. The genes *idi*, *crtE* and *crtS* have a similar pattern of expression in both media. However, the expression pattern of the genes *crtI* and *crtYB* is different in both conditions: in succinate, the level of the alternative mRNAs of these genes is higher than their respective mature mRNAs, whereas in glucose the level of mature mRNAs is higher.

The identification and quantification by HPLC of the carotenoids produced in fermentations in complete culture medium (YM) and in minimal medium (MM) with succinate, revealed that the percentage of astaxanthin is lower in YM than in MM (28 % and 87 %, respectively), suggesting a lower astaxanthin synthase activity in YM.

Nevertheless, the *crtS* gene is expressed in a similar way in both culture media. The most evident difference in the expression of the carotenogenesis genes in YM and MM lies in the alternative messenger of the gene *crtI*, which is lower in YM than in MM. It was not possible to establish a quantitative correlation between the level of expression of carotenogenic enzymes and the level of carotenoids, which are the product of their activity, as well as a temporal correlation between them, suggesting that some post-transcriptional regulatory mechanism could exist.

In this work it was demonstrated that the addition of 0,2 % (v/v) ethanol to a culture in stationary phase increased carotenoid production up to 31 % with respect to the culture without ethanol, and the expression of the exclusive carotenogenic genes *crtI*, *crtYB* and *crtS* is selectively induced, whereas the genes *idi* and *crtE* that participate in other metabolic pathways, do not increase their expression after ethanol addition.

On the other hand, the experimental data on the expression of carotenogenic genes contrasts with the data obtained by bioinformatic analysis of promoter sequences of such genes. Regulating sequences by oxygen or by non-fermentable carbon sources were not found. Nevertheless, sequences which bind the Mig1 factor, which represses the expression of target genes in the presence of glucose were found. This finding in genes *crtI* and *crtYB* in similar locations regarding the translation start-codon, as well as the differential expression of the mature and alternative mRNAs of these genes, suggests that they could have an important regulatory role in the carotenogenic pathway.



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Carotenoides: estructura, propiedades y funciones.

Los carotenoides son un grupo de pigmentos naturales que cumplen una gran diversidad de funciones biológicas en prácticamente todos los organismos (Britton, 1995). Son sintetizados por organismos fotosintéticos y no fotosintéticos, tanto procariontes como eucariontes, mientras que los animales deben incorporarlos con la dieta (Armstrong, 1994; Armstrong, 1997; Britton, 1998). Si bien se ha descrito una gran variedad de compuestos (más de 600), todos ellos presentan características químicas comunes: estructura simétrica poli-isoprenoide, con una larga cadena alifática con dobles enlaces conjugados. Esta estructura básica puede ser modificada de diversas formas, tal como la adición de grupos oxigenados, entre otras. Los carotenoides cuya estructura es una cadena hidrocarbonada con extremos cíclicos o no cíclicos se denominan carotenos, mientras que aquellos que tienen grupos oxigenados se denominan xantófilas.

Los intensos colores amarillo, rojo y naranja de estos pigmentos se originan por su capacidad de absorber la luz entre los 400 y 500 nm, que les otorga funciones esenciales en organismos fotosintéticos. Por un lado, colaboran en los sistemas antena en la captación de luz mediada por la clorofila, pero aún más importante es su capacidad de disipar el exceso de radiación que puede pasar al oxígeno, produciendo una forma tóxica denominada estado singlete o singulete ( $^1\text{O}_2$ ) (Armstrong, 1997; Britton, 1995). Otra característica de los carotenoides, que ha despertado gran interés por su repercusión en

la salud humana, es su capacidad de reaccionar con radicales derivados del oxígeno los cuales producen daño oxidativo en el DNA y proteínas (Valko y cols., 2006).

La naturaleza hidrofóbica y la estructura de los carotenoides determinan su localización en membranas y su orientación, respectivamente. De esta forma, los carotenos hidrocarbonados como el  $\beta$ -caroteno o el licopeno, permanecen totalmente dentro de la bicapa lipídica, mientras que los que tienen sustituyentes polares (como por ejemplo la zeaxantina) se encuentra atravesando la bicapa lipídica con sus grupos polares hacia el exterior de la membrana, confiriéndole mayor rigidez y resistencia mecánica (Gruszecki, 1999; Young y Lowe, 2001). Así, la presencia de carotenoides en membranas biológicas tiene un profundo efecto en la fluidez, permeabilidad y protección contra estrés oxidativo de las mismas (Britton, 1995). Finalmente, dentro de sus funciones biológicas, los carotenoides pueden ser precursores de otros metabolitos como vitamina A, ácido retinoico (regulador del crecimiento celular), retinal (cromóforo de pigmentos visuales) y ácido absícico (hormona vegetal) (Armstrong, 1994; Rock and Zeevaart, 1991; Britton, 1998).

La astaxantina (3, 3'-dihidroxi- $\beta$ ,  $\beta$ -caroteno-4, 4'-diona) es un carotenoide del grupo de las xantófilas de gran interés biotecnológico ya que debe suministrarse en el alimento de salmónidos criados en cautiverio. Esto se debe básicamente a que el salmón, así como otros animales, no sintetiza astaxantina *de novo*, razón por la cual debe ingerirla en la dieta para que su carne adquiera la coloración adecuada requerida por los consumidores (Higuera-Ciapara y cols., 2006). La astaxantina es sintetizada por unos pocos microorganismos tales como bacterias marinas (*Agrobacterium aurantiacum*,

*Pseudomonas* sp. y *Flavobacterium* sp) (Liaaen-Jensen, 1998), el alga *Haematococcus pluvialis* (Lorenz y Cysewski, 2000) y la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Andrewes y cols., 1976). Las únicas potenciales fuentes naturales de astaxantina son la levadura *X. dendrorhous* y el alga unicelular *H. pluvialis*. Estudios recientes mostraron que la productividad de astaxantina ( $\mu\text{g} / \text{g}$  de biomasa) es mayor en *H. pluvialis* que en *X. dendrorhous* (Domínguez – Bocanegra y cols., 2007). Además, a diferencia de *X. dendrorhous*, *H. pluvialis*, es un organismo muy exigente en cuanto a las condiciones de cultivo para alcanzar una elevada pigmentación, los sustratos para su crecimiento son más costosos, crece más lento y se contamina fácilmente con protozoos. Por estas razones, la levadura *X. dendrorhous* resulta atractiva como modelo de estudio de la carotenogénesis para la producción de astaxantina natural.

## 1.2. *Xanthophyllomyces dendrorhous* y producción de carotenoides.

*X. dendrorhous* (Golubev, 1995) es una levadura basidiomicete que fue inicialmente aislada de exudados de árboles de regiones montañosas y frías del hemisferio norte (Johnson, 2003). Recientemente fue aislada también de hongos de la Patagonia Argentina (Libkind y cols., 2007). *X. dendrorhous* sintetiza astaxantina como principal carotenoide (Andrewes y cols., 1976) y es la única entre las levaduras carotenogénicas, capaz de fermentar la glucosa con producción de etanol.

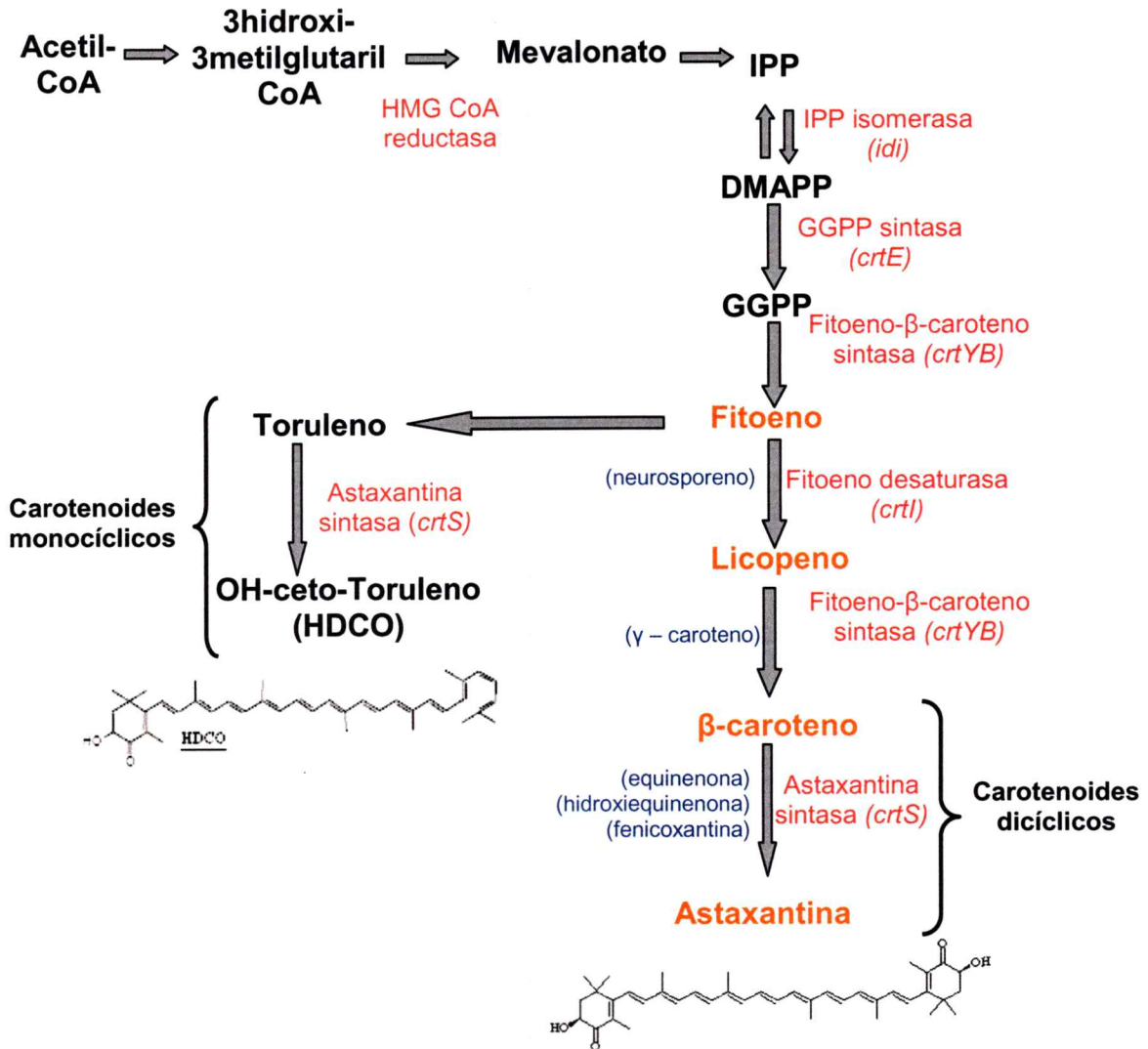
El desarrollo comercial de *X. dendrorhous* como fuente natural de astaxantina es aún inviable debido a la baja producción de pigmento en las cepas silvestres. Este hecho, ha motivado el desarrollo de nuevas variedades que puedan producir un mayor

contenido de astaxantina mediante mutagénesis con luz ultravioleta (Retamales y cols., 1998) o agentes químicos como nitrosoguanidina y etil-metano-sulfonato (An y cols., 1989; Lewis y cols., 1990; An, 1997; Bon y cols., 1997; Retamales y cols., 1998). Sin embargo, la mutación al azar ha generado efectos no deseados como inestabilidad genética, falta de reproducibilidad en fermentaciones industriales, y una disminución en la producción de biomasa de las cepas sobreproductoras en comparación con las cepas silvestres (Johnson y Schroeder, 1995). Por otra parte, se han estudiado las condiciones de cultivo que permiten una mayor velocidad de crecimiento y producción de astaxantina tanto en cepas silvestres como mutantes. De esta forma, se ha determinado el efecto del pH (Hu y cols., 2006), concentración de glucosa (Hu y cols., 2005; Yamane y cols., 1997), concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno (Flores-Cotera y cols., 2001), aireación del cultivo y transferencia de oxígeno (Yamane y cols., 1997; Liu y cols., 2006) y de la luz (An y Johnson, 1990). No obstante que los trabajos mencionados han aportado información útil en cuanto a la fisiología de la levadura, la aplicación de técnicas tradicionales como mutagénesis al azar y optimización de las condiciones de cultivo no han conducido a resultados satisfactorios desde el punto de vista biotecnológico o industrial. Sin embargo, el reciente aislamiento de los genes que codifican las enzimas de la ruta de biosíntesis de astaxantina permite una nueva aproximación al problema. El conocimiento de los mecanismos de regulación de la vía carotenogénica será un aporte fundamental, aplicable a la producción de astaxantina a partir de fuentes naturales como *X. dendrorhous*.

### 1.3. Genética molecular de la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*.

La Figura 1 muestra la ruta de biosíntesis de carotenoides, estrechamente vinculada a la ruta de síntesis de isoprenoides. Esta comienza tempranamente con la vía del mevalonato: 3 moléculas de acetil-CoA se condensan para formar mevalonato. Luego el mevalonato da lugar a la formación del metabolito central de 5 carbonos denominado isopentenil pirofosfato (IPP) que es el precursor general de todos los isoprenoides (Visser y cols., 2003). La biosíntesis temprana y no específica de los carotenoides comienza con la isomerización del IPP a dimetilalil pirofosfato (DMAPP), paso reversible catalizado por la enzima IPP isomerasa. En *X. dendrorhous*, se ha aislado un gen (*idi*) y el cDNA correspondiente que codifica para esta enzima (Kajiwara y cols., 1997).

El siguiente paso de la ruta es la síntesis del precursor de 20 átomos de carbono geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), por la adición secuencial de tres moléculas de IPP al DMAPP (Figura 1). Este paso está catalizado por la enzima GGPP sintasa. En *X. dendrorhous*, se ha aislado el cDNA del gen *crtE* que codifica para esta enzima (Patente WO9723633 y en nuestro laboratorio se dispone de su versión genómica y de su cDNA). La síntesis de fitoeno a partir de la condensación de dos moléculas de GGPP, es el primer paso específico en la síntesis de carotenoides, controlado por el gen *crtYB* cuyo producto es la enzima bifuncional fitoeno- $\beta$ -caroteno sintasa (Verdoes y cols., 1999a; Alcaño, 2002) (Figura 1). El gen que codifica esta novedosa clase de enzima carotenogénica es propio de hongos y ha sido también aislado en ascomicetes como



**Figura 1:** Ruta de biosíntesis de carotenoides de *X. dendrorhous* dicíclica y monocíclica. IPP, isopentenil-pirofosfato. DMAPP, dimetil-alil pirofosfato. GGPP, geranylgeranyl-pirofosfato. Los carotenoides están señalados en anaranjado. Los intermediarios de las reacciones de carotenogénesis están señalados en azul. Las enzimas de la vía están señaladas en rojo y entre paréntesis se indica el nombre del gen correspondiente. Adaptado de Verdoes y cols. (2003).

*Neurospora crassa* (Arrach y cols., 2002), y zigomicetes como *Phycomyces blakesleeanus* (Arrach y cols., 2001) y *Mucor circinelloides* (Velayos y cols., 2000).

El siguiente paso en la ruta de síntesis consiste en 4 desaturaciones sucesivas del fitoeno para dar licopeno, paso catalizado por la enzima fitoeno desaturasa (Figura 1). En *X. dendrorhous*, se ha aislado el gen *crtI* que codifica para esta enzima y también su cDNA (Verdoes y cols., 1999 b; León, 2000). En hongos, la enzima fitoeno desaturasa cataliza las 4 reacciones de desaturación. En plantas, las desaturaciones están catalizadas por dos enzimas: fitoeno desaturasa y  $\zeta$ -caroteno desaturasa (Hirschberg, 1998). A partir de la síntesis de neurosporeno o licopeno, se genera la enorme diversidad de estructuras químicas que caracterizan a los carotenoides, y por consiguiente, existe una gran diversidad de enzimas que modifican la estructura básica (Hirschberg, 1998).

En el caso de *X. dendrorhous*, la ruta de biosíntesis continúa con la ciclación de los extremos del licopeno para dar  $\beta$ -caroteno, reacción catalizada por la enzima bifuncional fitoeno- $\beta$ -caroteno sintasa, producto del 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 (Sieiro y cols., 2003). En eubacterias, algas y plantas esta reacción es llevada a cabo por una enzima monofuncional llamada licopeno- $\beta$ -ciclasa codificada por los genes *crtL* o *crtY*, dependiendo del organismo. La información obtenida hasta el momento permite postular que la clase única de enzima fitoeno- $\beta$ -caroteno sintasa fue adquirida en forma temprana en la evolución de los hongos, antes de la separación de los tres grupos taxonómicos zigomicetes, ascomicetes y basidiomicetes.

Finalmente, al  $\beta$ -caroteno se adicionan grupos ceto en las posiciones 4 y 4', y además es hidroxilado en las posiciones 3 y 3', dando lugar a la astaxantina (Figura 1). Como consecuencia de estas reacciones, se forman 3 intermediarios: equinenona, hidroxiequinenona y fenicoxantina. Todas estas reacciones son catalizadas por la enzima astaxantina sintasa la cual es codificada por el gen *crtS* (Ojima y cols., 2006). Este gen codifica para una enzima tipo citocromo P450 hidroxilasa que cataliza la adición de grupos ceto e hidroxilo al  $\beta$ -caroteno para convertirlo en astaxantina. En *H. pluvialis*, se han aislado dos genes distintos que codifican las actividades hidroxilasa y oxigenasa respectivamente (Cunningham y Gantt, 1998; Linden, 1999). Paralelamente, la levadura produce cantidades menores de carotenoides monocíclicos como toruleno e hidroxil-ceto-toruleno (HDCO) (An y cols., 1999). El HDCO es un carotenoide monocíclico que se produce por desaturación del gama caroteno por la enzima fitoeno desaturasa (*crtI*) para formar toruleno y la posterior adición de grupos ceto e hidroxilo al toruleno por la enzima astaxantina sintasa. La competencia por el licopeno entre la desaturasa (*crtI*) y la ciclase (*crtYB*) regularía el flujo metabólico hacia HDCO o hacia astaxantina.

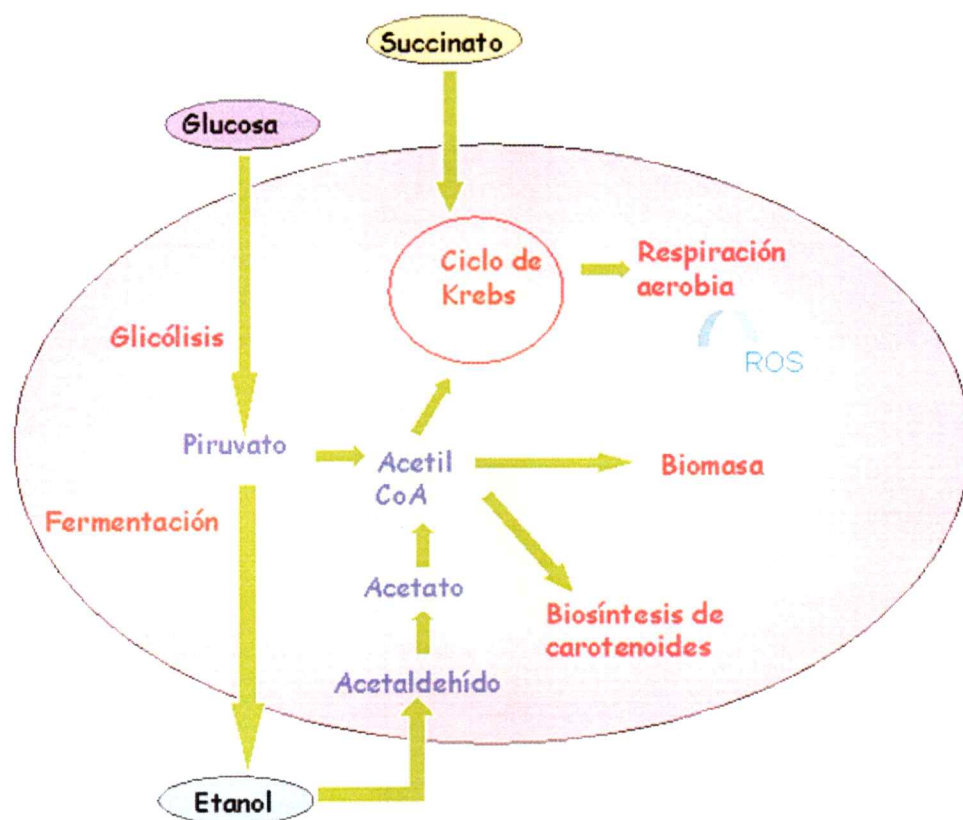
#### **1.4. Regulación de la biosíntesis de carotenoides.**

Se conoce poco acerca de la regulación de la expresión de los genes de carotenogénesis en *X. dendrorhous*. Se ha sugerido que el rol de la astaxantina en esta levadura podría ser el de proteger a la célula del daño oxidativo producido por especies reactivas de oxígeno (ROS) o por radicales peróxido ( $R-O_2$ ) (Schroeder y Johnson, 1993; Schroeder y Johnson, 1995 b). Estos compuestos alteran la cantidad de pigmentos en la célula (Liu y Wu, 2006) pero no se sabe si la expresión de los genes que controlan



a las enzimas carotenogénicas se ve afectada por dichos compuestos. Uno de ellos, conocido como oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) aumenta la producción de pigmentos, mientras que el radical peróxido la disminuye por degradación oxidativa de los carotenoides (Schroeder y Johnson, 1995 a). Estas observaciones sugieren una regulación de la vía carotenogénica de tipo inhibición por el producto final astaxantina. Otro posible mecanismo de regulación de la carotenogénesis fue descrito en nuestro laboratorio y se relaciona con un tipo de procesamiento de los transcritos de los genes *crtI* y *crtYB* conducente a la formación de mRNAs alternativos, que poseen codones de término prematuros de la traducción y por lo tanto no producirían proteína activa (Lodato y cols., 2003). La relación mRNA maduro/mRNA alternativo del gen *crtI* disminuye con la edad de los cultivos, al igual que el contenido celular de carotenoides.

Por otra parte, *X. dendrorhous* es la única levadura carotenogénica capaz de fermentar glucosa y producir etanol, el resto de las levaduras pigmentadas son estrictamente aerobias. Luego que la fermentación ha terminado, los compuestos no fermentables producidos durante la fermentación son metabolizados (Kruckeberg y Dickinson, 2004). Adicionalmente, *X. dendrorhous* puede utilizar ciertos compuestos no fermentables como succinato, como única fuente de carbono y energía (Golubev, 1995). En la Figura 2 se muestra un esquema del metabolismo de la fuente de carbono y su relación con la producción de carotenoides. Muchos de estos compuestos como etanol, glicerol o acetato, son producidos y excretados al medio durante el metabolismo fermentativo. Para poder crecer con este tipo de compuestos, como única fuente de carbono y energía, las células deben obtener NADPH y varios intermediarios para la



**Figura 2:** Utilización de la glucosa, etanol y succinato esquematizadas en base a lo que sucede en *S. cerevisiae*.

biosíntesis reductora, entre ellos piruvato, por medio de la ruta gluconeogénica (Walker, 1998). El piruvato puede ser transformado en acetil-CoA, el cual alimenta la ruta de biosíntesis de carotenoides. Uno de los productos más comunes de la fermentación es el etanol, que es metabolizado en la vía gluconeogénica. En primer lugar el etanol es oxidado a acetaldehído y luego este es transformado en acetato. Posteriormente el acetato es convertido en acetil-CoA, el cual puede ser utilizado para producir mevalonato y posteriormente carotenoides (Flores y cols., 2000). Muchos ácidos orgánicos como el succinato son metabolizados por medio del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). La utilización de este tipo de compuestos también conduce a la formación de piruvato, y posteriormente a acetil Co-A (Kruckeberg y Dickinson, 2004). Yamane y cols. (1997) establecieron que durante el metabolismo fermentativo la tasa de producción de astaxantina disminuye y que durante el metabolismo aerobio, aumenta. Johnson y Lewis (1979) también observaron que un exceso de glucosa y una reducida disponibilidad de oxígeno, disminuyen la producción de carotenoides.

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que la producción de carotenoides se induce cuando la glucosa se agota en el medio de cultivo y cuando comienza a utilizarse el etanol (no fermentable) que se produce por fermentación de la glucosa en la fase exponencial de crecimiento (Lodato y cols., 2007). Gu y cols. (1997) demostraron que la adición de etanol a cultivos de *X. dendrorhous* en medio YM aumentaba la producción de pigmentos en cepas mutantes. En nuestro laboratorio hemos determinado que los niveles de etanol alcanzados en medio YM suplementado con glucosa fueron de aproximadamente 2 g/l mientras que en medio YM sin glucosa, en los

cuales la pigmentación es muy baja, los niveles de etanol fueron de solamente 0,2 g/l. Estos resultados sugieren que el etanol podría estar relacionado con la carotenogénesis.

La regulación de la carotenogénesis ha sido más intensamente estudiada en *H. pluvialis*. La síntesis de astaxantina en dicho organismo se induce bajo condiciones de estrés como un exceso de iluminación, deficiencia de nitrógeno y estrés salino. En estas condiciones aumenta el nivel de los mensajeros para IPP isomerasa (Sun y cols., 1998), fitoeno sintasa (Steinbrenner y Linden, 2001), fitoeno desaturasa (Grunewald y cols., 2000),  $\beta$ -caroteno hidroxilasa (Linden, 1999; Steinbrenner y Linden, 2001) y  $\beta$ -caroteno oxigenasa (Sun y cols., 1998). Con respecto a *X. dendrorhous*, se observó que la expresión de los mRNAs de los genes de carotenogénesis se induce cuando se agota la glucosa y comienza a aparecer etanol en el medio de cultivo.

En base a lo anteriormente expuesto, se puede decir que la síntesis de carotenoides es un proceso complejo que estaría regulado a varios niveles. En primer lugar, la expresión de los genes que codifican a las enzimas carotenogénicas estaría regulada a nivel transcripcional en etapas tempranas del ciclo de crecimiento, en respuesta a factores definidos por las condiciones metabólicas. Posteriormente, actuarían mecanismos de regulación post-transcripcional como el procesamiento alternativo y post-traducciona, posiblemente en respuesta a niveles de estrés oxidativo y/o inhibición por producto, lo cual daría lugar a la síntesis de carotenoides.

## HIPÓTESIS

El metabolismo aerobio favorece la producción de carotenoides. Puesto que la inducción de la expresión de los genes de carotenogénesis coincide con el agotamiento de la glucosa y con la aparición de etanol en el medio de cultivo, y que bajo condiciones de metabolismo aerobio se observa un perfil de carotenoides intermediarios de la vía biosintética diferente al observado durante el metabolismo fermentativo se postula que: En *X. dendrorhous* la expresión de los genes de carotenogénesis y la coordinación funcional de sus enzimas ocurriría antes de la inducción de la síntesis de pigmentos y dependería del tipo de metabolismo y de la fase del ciclo de crecimiento en que se encuentran las células.

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar la organización genómica funcional de los genes estructurales de la carotenogénesis y los mecanismos de regulación que operan en la síntesis de astaxantina, a nivel de los mRNAs de dichos genes y pigmentos producidos durante el ciclo de crecimiento de *X. dendrorhous*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1- Estudiar el proceso de carotenogénesis a nivel de los mRNAs de los genes estructurales de la carotenogénesis y su correlación con los pigmentos producidos utilizando una fuente de carbono fermentable y una no fermentable en un medio químicamente definido.
  
- 2- Estudiar las condiciones de cultivo en que ocurre la inducción de la biosíntesis de carotenoides.
  
- 3- Analizar, mediante herramientas bioinformáticas, la región promotora de los genes estructurales de carotenogénesis con el objetivo de encontrar secuencias comunes que sugieran un posible mecanismo de regulación de los mismos.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Cepa utilizada y condiciones de cultivo.

La cepa de *X. dendrorhous* utilizada en este trabajo fue la cepa silvestre UCD 67-385 (ATCC 24230) la cual fue obtenida del American Type Culture Collection (ATCC).

#### 2.1.1. Cultivo en matraces.

*X. dendrorhous* se cultivó en matraces de 250 ml con 50 ml de medio YM con la siguiente composición: 0,3 % de extracto de malta, 0,5 % de bactopectona, 0,3 % de extracto de levadura y glucosa al 1 % (An y cols., 1989). En los cultivos realizados con las otras fuentes de carbono se sustituyó la glucosa por glicerol al 1 %, succinato o xilosa. Los cultivos se mantuvieron por 5-7 días a 200 rpm y 22 °C. Los cultivos descritos en el punto 3.4 fueron realizados en matraces con 200 ml de medio YM succinato y con suministro de aire directamente al medio de cultivo de 1; 7,4 y 18,4 l/min.

#### 2.1.2. Cultivo en fermentador.

La cepa silvestre de *X. dendrorhous* se creció en un fermentador (New Brunswick) y se colectaron muestras a distintos tiempos para extraer carotenoides, determinar biomasa y extraer RNA total. Se preparó un pre-cultivo en un matraz de 1 l con hendiduras conteniendo 400 ml de medio el cual fue inoculado con 4 ml de un cultivo de 2 días. El fermentador con 9,5 l de medio y 450 µl de antiespumante de silicona (1520 EU, Dow Corning) se inoculó con 500 ml del pre-cultivo. La temperatura se controló a

22 °C ± 1 °C y la agitación fue de 300 rpm. Se inyectó aire estéril a una velocidad de 13 l/min. Las muestras para extracción de carotenoides y RNA se centrifugaron a 1.300 x g durante 10 min para obtener los sedimentos celulares, los cuales fueron inmediatamente congelados en nitrógeno líquido y almacenados a - 70 °C hasta su procesamiento. Para la fermentación en YM sin glucosa, el fermentador fue inoculado con 500 ml de medio de cultivo y el aire fue mantenido en un flujo de 13 l/ min. Luego de comprobar que la densidad óptica se mantiene constante por al menos 3 determinaciones seguidas a intervalos de entre 6 y 10 h (aproximadamente 19 h), se adicionó etanol al cultivo.

## **2.2. Técnicas de biología molecular.**

### **2.2.1. Extracción de RNA total de *X. dendrorhous*.**

Se realizó de acuerdo al método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987), modificado para *X. dendrorhous*. Se adicionaron al sedimento celular proveniente de 12-40 ml de cultivo, 5 ml de solución de Chomczynski con fenol (solución Ch-P) (Chomczynski y Sacchi, 1987) junto con 3 ml de perlas de vidrio (Sigma, 425-600 µm). La ruptura de las células se realizó por agitación en vórtex a máxima velocidad por 5 min. La mezcla se incubó por 10 min a temperatura ambiente y luego se agregaron 0,2 ml de cloroformo por cada ml de solución Ch-P. Se agitó manualmente y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Luego se centrifugó a 12.100 x g y la fase acuosa se pasó a un tubo estéril. Esta fase acuosa fue lavada 2 veces con fenol-cloroformo para eliminar posibles restos celulares y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo estéril donde se agregó un volumen de isopropanol. Se incubó durante toda la noche a - 20 °C y



luego el RNA se precipitó por centrifugación a 12.100 x g durante 10 min a 4 °C. El precipitado de RNA se lavó con 1 ml de etanol 75 %. El RNA se resuspendió en agua (tratada con DEPC) y luego se almacenó a - 70 °C. La concentración de RNA se determinó espectrofotométricamente a 260 nm y la integridad del RNA se analizó por electroforesis en geles de agarosa desnaturantes (Sambrook y Russell, 2001).

### **2.2.2. Transcripción reversa (RT).**

La reacción RT se efectuó en un volumen de 20 µl con 3 o 4 µg de RNA total, 75 pmol de oligodT<sub>15-18</sub>, 0,5 mM de dNTPs y 200 U de transcriptasa reversa M-MLV (Fermentas). La mezcla de reacción se incubó por 60 min a 42 °C y luego se calentó 10 min a 65 °C.

### **2.2.3. Amplificación por PCR para determinar los niveles relativos de los mensajeros de carotenogénesis.**

Los partidores que se diseñaron para la detección de los cDNAs de los distintos genes se muestran en la Tabla 1. Las secuencias de los partidores se diseñaron según las secuencias publicadas de la cepa CBS 6938 y las de la cepa UCD 67-385 (Alcaíno, 2002; León, 2000). Los números de acceso de la base de datos GenBank de los genes cuya expresión se analizó en esta Tesis son: *act*, X89898; *crtE* DQ012943; *idi*, Y15811; *crtI*, DQ028748; *crtYB*, DQ016503; *crtS*, DQ002006.

Tabla 1. Partidores utilizados

Gen	Partidor	Secuencia 5'→3' (1)	Localización (2)
<i>act</i>	ACT3	F actcctacgttggtgacgag	Entre exón 4-5 (1345)
	ACT4	R tcaagtctcgcaccggccaag	Exon 5 (1801)
<i>crtI</i>	CRTI2	F agctatcatcgtgggatgtgg (específico para mRNA maduro)	Entre exón 1-2 (764)
	CRTI4	F agctatcatcgtgggtttaatcc (específico para mRNA alternativo)	Entre exón 1 e intrón 1 (764)
	CRTI8	R tgtccagatagactcgaagg	Entre exón 8-9 (1991)
<i>crtYB</i>	CRTYB11	F gcatattaccagatccatctg (específico para mRNA maduro)	Entre exón 1-2 (1603)
	CRTYB12	F gtgtgcatatgtgttgcaacc (específico mRNA alternativo)	Entre intron 1 y exón 2 (1658)
	CRTYB16	R ttgaccgacagcaacataatc	Exon 3 (2405)
<i>crtE</i>	CRTE21	F ttcagtcttctgagtatgccc	Entre exones 7-8 (6280)
	CRTE22	R cattgcgagaagacgaagact	(7136)
<i>idi</i>	IDI31	F tacgatgaggagcaggtcag	Exón 1-2 (1044)
	IDI32	R ccgagagatcctccaacgat	Exón 5 (2232)
<i>ast</i>	AST1	F catcctctcagctcgtacagg	Entre exones 2-3 (775)
	AST2	R gtctccgtttcatagtccgg	Entre exones 7-8 (1857)

(1) F, directo; R, reverso

(2) Los números entre paréntesis indican la posición del partidor en pares de bases dentro de las secuencias publicadas en la base de datos GenBank.

Las reacciones de PCR se realizaron con 2 U de *Taq* pol (Genlab) en un volumen final de 25  $\mu$ l con los siguientes componentes: 2,5  $\mu$ l de 10 x *Taq* buffer; 0,5  $\mu$ l de dNTPs 10 mM, 1  $\mu$ l de cada partidor 25  $\mu$ M, 2  $\mu$ l de reacción RT con cDNA de hebra simple y agua. Las reacciones de PCR se efectuaron en un termociclador DNA Thermal Cycler 2400 (Perkin-Elmer) con el siguiente programa: 95 °C por 3 min, 28 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 3 min, y una extensión final de 72 °C por 10 min. Se corrieron en geles de agarosa volúmenes iguales de las reacciones de PCR y los productos se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. La cantidad de producto de amplificación se cuantificó con el programa Kodak Digital Science 1 D Analysis Software y con el programa Image J (Wayne Rasband, National Institute of Health (NIH), 1997). En ambos programas se empleó como referencia un marcador de PM de concentración conocida (100 bp DNA Ladder, Fermentas). Para normalizar la cantidad de producto amplificado debido a las variaciones entre muestras producidas por la eficiencia de las reacciones RT y PCR, se amplificó el cDNA del mensajero de actina (*act*). El mensajero de actina se ha utilizado en *Aspergillus niger* para normalizar la expresión de mensajeros en distintos momentos de cultivo (Ngiam y cols., 2000). En nuestros experimentos, se observó que los niveles del mensajero de actina se mantienen aproximadamente constante a lo largo del ciclo de crecimiento. Los partidores para la amplificación del cDNA *act* se diseñaron según la secuencia publicada para *X. dendrorhous* (Wery y cols., 1996).

#### **2.2.4. Electroforesis de DNA.**

Para visualizar los productos de PCR, se utilizaron geles de agarosa preparados en amortiguador TAE 0,5 X con una concentración de agarosa entre 1,5 y 3 %. Como estándar de peso molecular se utilizó 100 bp DNA Ladder (Winkler o Fermentas).

#### **2.2.5. Análisis bioinformático de secuencias promotoras.**

Los sitios de unión a factores de transcripción fueron buscados con el programa Promo 2.0 (Messeguer y cols., 2002; Farré y cols., 2003). La base de datos utilizada para elegir los factores de transcripción y sus respectivas secuencias regulatorias fue TRANSFAC (BIOBASE: Biological Databases / Biologische Datenbanken GMBH). Las secuencias de nucleótidos se alinearon con el programa CLUSTAL W, versión 1.8. Las secuencias fueron aleatorizadas con el programa disponible en *Biotechnology Computing Facility* desarrollado por *Arizona Research Laboratories*.

### **2.3. Técnicas bioquímicas.**

#### **2.3.1. Determinación de glucosa.**

La determinación de glucosa se realizó por el método UV de Boehringer Mannheim. Este método se basa en la oxidación de la glucosa a D-gluconato-6-fosfato con las enzimas hexoquinasa y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, con formación de NADP reducido el cual se determina a 340 nm. Las reacciones se hicieron según las instrucciones del proveedor utilizando como sustrato diluciones adecuadas de las muestras.

### **2.3.2. Determinación de etanol.**

La determinación de etanol se realizó por el método UV de Boehringer Mannheim. Este método se basa en la oxidación del etanol a acetato con las enzimas alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa. La formación de NAD reducido se sigue a 340 nm. Las reacciones se hicieron según las instrucciones del proveedor utilizando como sustrato diluciones adecuadas de las muestras. También fue utilizado el kit para la determinación de etanol Quantichrom (DIET-500). Este método se basa en la reducción de dicromato por etanol a un producto crómico ( $\text{Cr}^{3+}$ ) azulado el cual se mide a 580 nm.

### **2.3.3. Extracción de carotenoides.**

Para la extracción de carotenoides se utilizó el método de An y cols. (1989) con algunas modificaciones. Se centrifugaron entre 5 y 20 ml de cultivo y al sedimento celular se agregó entre 1 y 3 ml de acetona (Merck) según la biomasa obtenida, más un volumen de perlas de vidrio (Sigma, 425-600  $\mu\text{m}$ ). La ruptura celular se realizó por agitación en vórtex a máxima velocidad durante 1 min. Luego se recuperó la fase orgánica por centrifugación a 12.100 x g a 4°C. Este procedimiento se repitió hasta que los restos celulares se volvieron blancos. Los extractos de acetona se combinaron y se centrifugaron nuevamente a 12.100 x g para eliminar restos celulares. Luego, todo el pigmento en acetona se extrajo con éter de petróleo (Mallinckrodt) y se midió el volumen recuperado de éter de petróleo. Se determinó la absorbancia del extracto a 474 nm, que es el máximo de absorbancia de astaxantina en éter de petróleo. Para la cuantificación del contenido celular de carotenoides ( $\mu\text{g}$  de carotenoides / g de peso

seco) se utilizó el coeficiente de extinción  $1\% = 2100$  (la absorbancia medida a 474 nm de longitud de onda de una solución de astaxantina al 1 % en éter de petróleo tiene un valor de 2100) (An y cols., 1989).

#### **2.3.4. Análisis de carotenoides por HPLC.**

Los extractos de los carotenoides fueron separados por HPLC utilizando una columna HYPERSYL C18 de 25 cm o una columna Lichrocart RP-18 (5  $\mu\text{m}$ ) de 15 cm (Merck). La fase móvil fue acetonitrilo : metanol : isopropanol (85 : 10 : 5, v/v), con un flujo de 1 ml/min 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. Los estándares de astaxantina y beta caroteno fueron obtenidos comercialmente. Los restantes fueron obtenidos por transformación de *E. coli* con plásmidos portadores de genes de carotenogénesis provenientes de diversos organismos.

#### **2.3.5. Determinación de biomasa.**

La concentración celular se determinó por medición de densidad óptica a 560 nm o por recuento del número total de células en una cámara de Neubauer por triplicado. En los gráficos se presenta el promedio para cada punto. Para la determinación de peso seco, se centrifugaron 3 ml de cultivo en tubos Eppendorf y luego los sedimentos celulares se secaron a 80 °C durante 12 h.

### 3. RESULTADOS

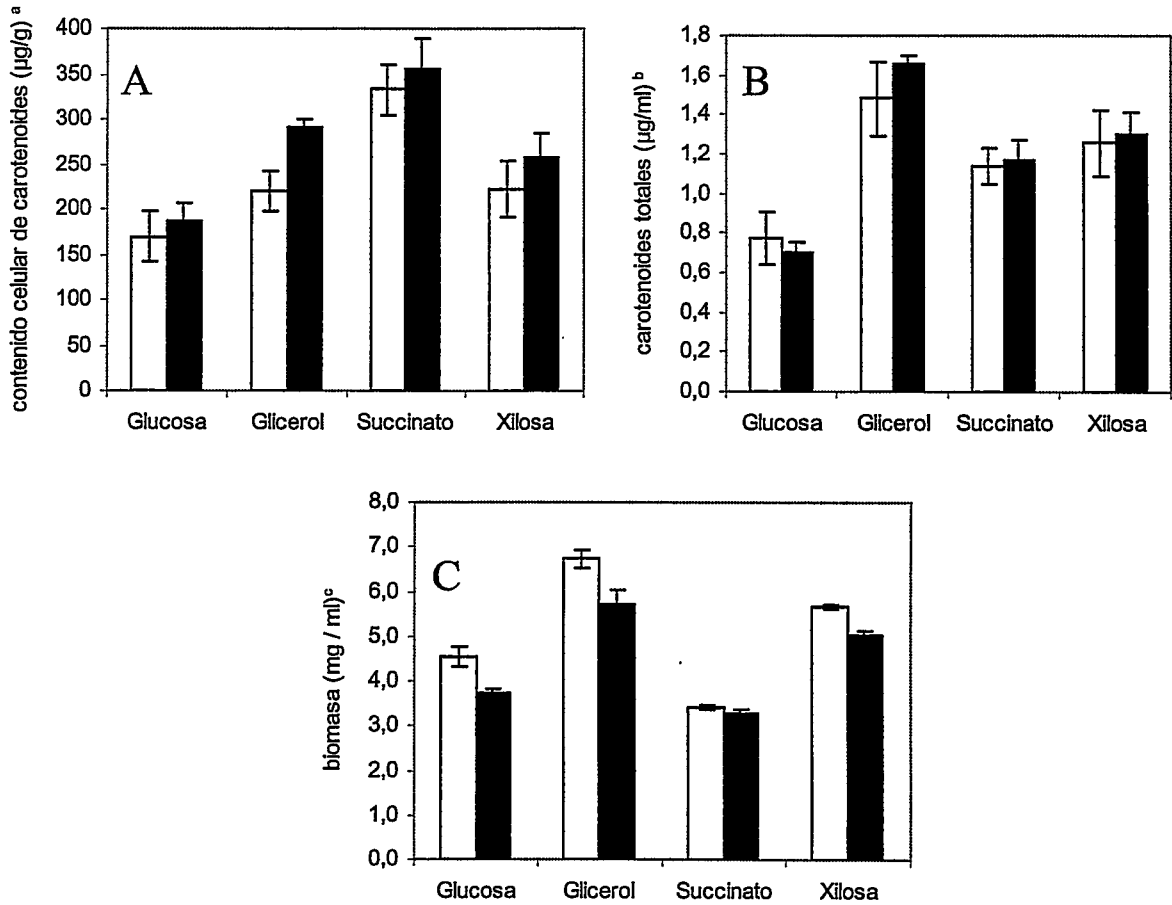
#### 3.1. Estudio del efecto de distintas fuentes de carbono en la carotenogénesis.

Para estudiar en forma preliminar el efecto de la fuente de carbono en la producción de carotenoides, se determinó cuales eran las fuentes de carbono en las cuales la cepa silvestre de *X. dendrorhous* (UCD 67 - 385) tenía una mayor pigmentación que en glucosa. Para ello se creció la cepa mencionada en medio YM (medio completo) sólido, suplementado con distintas fuentes de carbono al 1% p/v (Tabla 2). En base a los resultados mostrados en la Tabla 2, se cuantificaron los carotenoides producidos en YM líquido suplementado con glucosa, glicerol, succinato y xilosa respectivamente al cabo de 5 y 7 días de cultivo. La Figura 3A muestra que el mayor contenido celular de carotenoides ( $\mu\text{g}$  de carotenoides / g de peso seco) se obtiene en succinato, en tanto que en glucosa se obtiene el menor. Además, en todas las fuentes de carbono no fermentables el contenido celular de carotenoides es mayor que en glucosa. Los carotenoides no tienen un aumento significativo a los 7 días de cultivo con respecto a los 5 días, excepto para el caso del glicerol. Probablemente debido a que este compuesto estimula la producción de carotenoides en la etapa de maduración, es decir durante la fase estacionaria. El mayor rendimiento de biomasa fue observado en glicerol y el menor en succinato (Figura 3C). En la Figura 3B se muestra la producción total de carotenoides ( $\mu\text{g}$  de carotenoides / ml de medio de cultivo) en distintas fuentes de carbono y se observa que es mayor en glicerol lo cual se debe a que la producción de biomasa es elevada (Figura 3C). Si bien en succinato la biomasa es baja, la producción

**Tabla 2:** Pigmentación de la cepa silvestre de *X. dendrorhous* en medio sólido suplementado con distintas fuentes de carbono al 1 % p/v.

<i>Fuente de carbono</i>	<b>Fermentable</b>	<b>Pigmentación</b>
Acetato de potasio	No	+
Acido cítrico	No	+
Sacarosa	Si	+
Glucosa	Si	+
Maltosa	Si	+
Almidón	No	+
Succinato	No	++++
Glicerol	No	+++
Xilosa	No	+++





**Figura 3:** Contenido celular de carotenoides (A), carotenoides totales (B) y biomasa (C) en medio YM suplementado con glucosa, glicerol, succinato y xilosa al cabo de 5 ( $\square$ ) y 7 días ( $\blacksquare$ ) de cultivo.  
<sup>a</sup>,  $\mu\text{g}$  de carotenoides / g de peso seco; <sup>b</sup>,  $\mu\text{g}$  de carotenoides / ml de medio de cultivo;  
<sup>c</sup>, mg de peso seco / ml de medio de cultivo

total de carotenoides no lo es, dado que el contenido celular de carotenoides es mayor (Figura 3A).

Posteriormente los carotenoides producidos en los distintos medios al cabo de 5 días fueron analizados por HPLC. La Tabla 3 muestra que la astaxantina es el carotenoide principal en todas las condiciones de cultivo. Además, se observa que en xilosa los carotenoides monocíclicos se acumulan en mayor cantidad que en el resto de las fuentes de carbono estudiadas.

### **3.2. Crecimiento de *X. dendrorhous* en fermentador en medio YM con succinato.**

Con el objetivo de estudiar la expresión de los genes de carotenogénesis y la producción de carotenoides en presencia de una fuente de carbono no fermentable, se cultivó la cepa silvestre en un fermentador con medio YM suplementado con succinato.

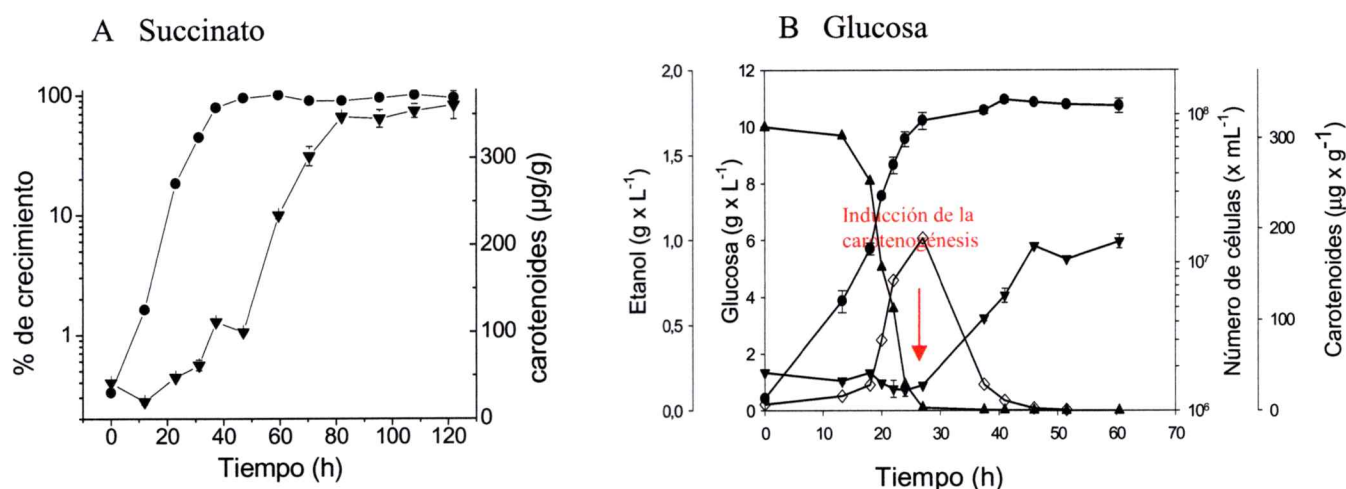
#### **3.2.1. Análisis de la producción de biomasa y carotenoides a lo largo del ciclo de vida.**

La Figura 4 muestra el crecimiento y producción de carotenoides de la cepa silvestre en YM succinato (A) y en YM glucosa (B) (Lodato y cols., 2003). Se observa que el contenido celular de carotenoides alcanza un valor de 360  $\mu\text{g/g}$  en succinato, el cual es mayor que el alcanzado en YM glucosa (186  $\mu\text{g/g}$ ) (Lodato y cols., 2003). Además, a diferencia de lo que ocurre en glucosa, donde la carotenogénesis se induce en la fase estacionaria, la síntesis de carotenoides comienza al principio de la fase exponencial (Figura 4A).

**Tabla 3:** Distribución porcentual de los carotenoides producidos por la cepa silvestre en distintas fuentes de carbono.

	Astaxantina	precursores de astaxantina	$\beta$ y $\gamma$ caroteno	monocíclicos
Glucosa	90	3,2	0,7	6,0
Glicerol	92	1,8	0,7	5,8
Succinato	89	2,0	1,0	7,4
Xilosa	87	1,1	0,7	10,6

Los carotenoides de la cepa silvestre crecida durante 5 días en la fuente de carbono indicada (1 % p/p), fueron extraídos y analizados mediante HPLC. Los valores de carotenoides para cada fuente de carbono se expresan en porcentaje. Precursores de astaxantina incluyen: equinenona, hidroxiequinenona y fenicoxantina. Monocíclicos incluyen: hidroxí-ceto-toruleno (HDCO) y toruleno.



**Figura 4.** Producción de carotenoides por *X. dendrorhous* UCD 67-385 en YM succinato (A) y en YM glucosa (B) en un fermentador en 'batch'. Símbolos: (●), crecimiento; (▼), carotenoides; (◇), etanol; (▲), glucosa. El 100 % del porcentaje de crecimiento corresponde a  $1,92 \times 10^8$  células/ml en YM succinato. Figura 4B tomada de Lodato y cols. (2003).

En la Tabla 4 se muestran los parámetros de crecimiento analizados en YM succinato. La biomasa alcanzada en YM succinato fue menor que la alcanzada en glucosa (Lodato y cols., 2003). El rendimiento de carotenoides por unidad de sustrato en YM succinato fue de 165  $\mu\text{g}$  de carotenoides por g de sustrato, mientras que en YM glucosa de acuerdo a los datos de Lodato y cols. (2003) fue de 123  $\mu\text{g}$  por g de sustrato. Esto indica que el succinato sustenta un mayor rendimiento de carotenoides que la glucosa. Por lo tanto, cuando la levadura crece con succinato como fuente de carbono los recursos son utilizados en mayor grado para la carotenogénesis que para el crecimiento.

### **3.2.2. Análisis de la expresión de los genes de carotenogénesis en YM succinato.**

Con el objetivo de comprender la carotenogénesis, se estudió en forma semicuantitativa la expresión de los genes de carotenogénesis a nivel de los mRNA mediante RT-PCR.

#### **3.2.2.1. Gen *idi* (isopentenil pirofosfato isomerasa) y gen *crtE* (geranilgeranil pirofosfato sintasa).**

En la Figura 5 se muestra el nivel de expresión de los genes *idi* y *crtE* a lo largo del ciclo de crecimiento. El gen *idi* se expresa en forma relativamente constante y luego su expresión disminuye al comenzar la fase estacionaria. El nivel de expresión del gen *crtE* aumenta durante la fase exponencial hasta alcanzar un máximo al principio de la fase estacionaria. Posteriormente su expresión disminuye (Figura 5).

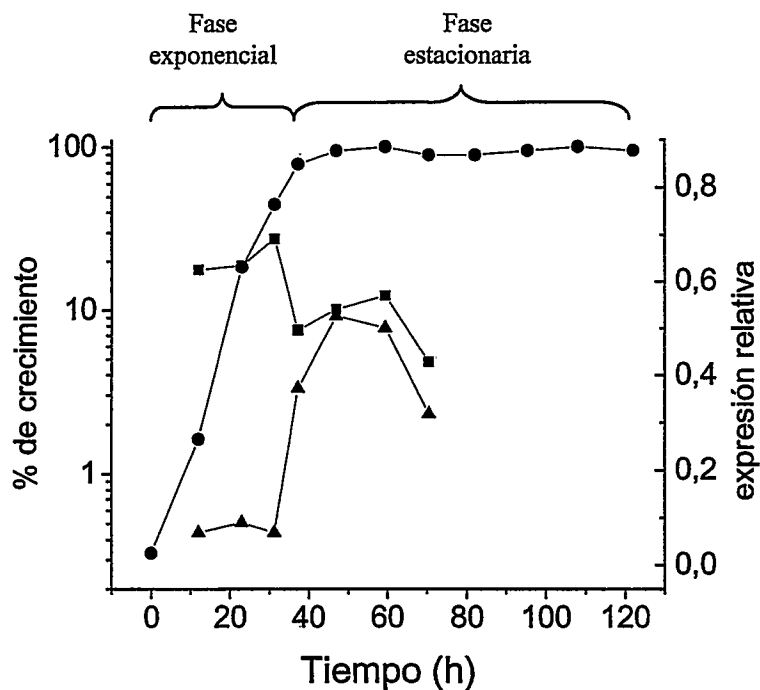
**Tabla 4:** Producción máxima de biomasa y carotenoides en la fermentación en YM succinato.

---

Biomasa	$3,16 \pm 0,14$ mg / ml
Contenido celular de carotenoides	$360,6 \pm 9,3$ $\mu$ g / g peso seco
Rendimiento <sup>a</sup>	165 $\mu$ g / g sustrato
Producción total de carotenoides	1,65 $\mu$ g / ml de medio de cultivo

---

<sup>a</sup>, Rendimiento de carotenoides por unidad de sustrato



**Figura 5:** Cinética de expresión de los genes *idi* y *crtE* en YM succinato. Los niveles de mensajero se normalizaron con el nivel de mensajero de actina en cada punto. Fue considerada fase exponencial el período de tiempo hasta las 37 h, y en adelante fue considerada fase estacionaria. Símbolos: (●), porcentaje de crecimiento; (■) nivel de expresión relativa del gen *idi*; (▲) nivel de expresión relativa del gen *crtE*.

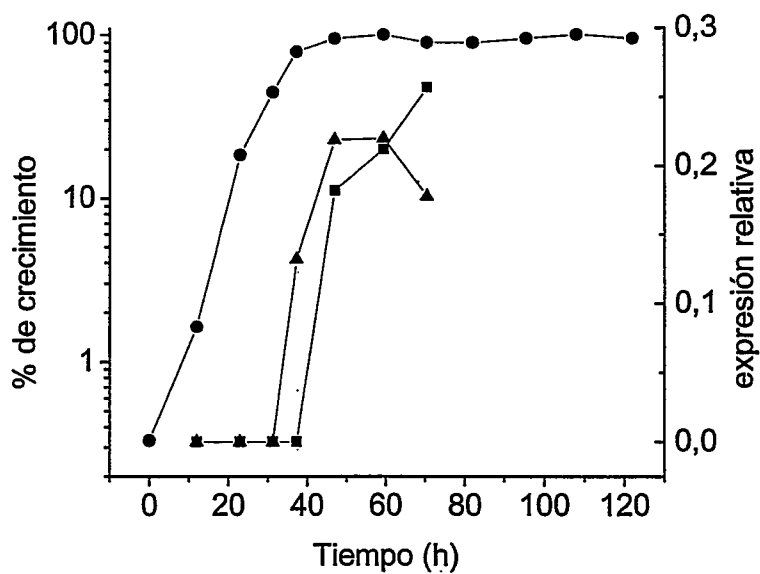
### 3.2.2.2. Gen *crtYB* (fitoeno- $\beta$ -caroteno sintasa).

En atención a que el gen *crtYB* produce dos tipos de mRNAs (maduro (mmRNA *crtYB*) y alternativo (amRNA *crtYB*)) por procesamiento alternativo, se estudiaron los niveles de los mismos. Para ello se diseñaron partidores específicos que amplifican los mensajeros maduro y alternativo respectivamente (Tabla 1). La expresión del mensajero maduro del gen *crtYB* aumenta durante la fase exponencial y el alternativo muestra un retardo con respecto al mensajero maduro (Figura 6).

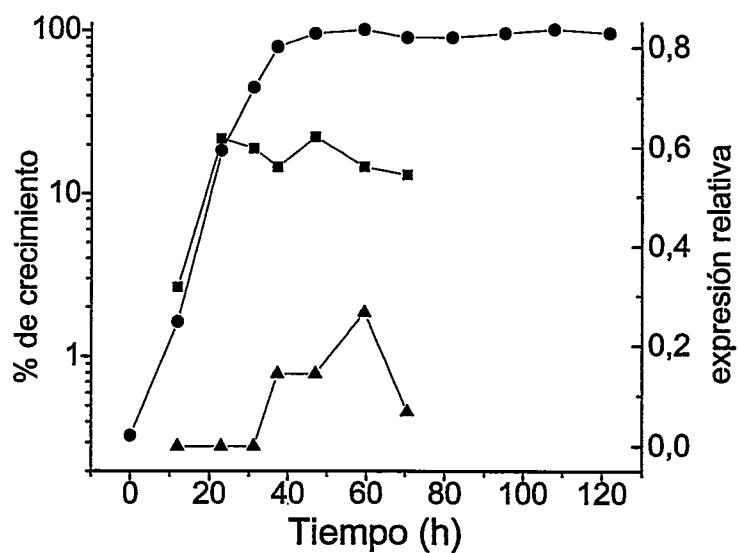
### 3.2.2.3. Gen *crtI* (fitoeno desaturasa).

El gen *crtI* también está sujeto a procesamiento alternativo y produce dos tipos de mensajero (maduro y alternativo). Por esta razón se estudiaron los niveles de ambos por RT-PCR. Para ello se diseñaron partidores específicos que amplifican los mensajeros maduro y alternativo respectivamente (Tabla 1). La expresión del mmRNA *crtI* alcanza su nivel máximo en la fase exponencial y luego se mantiene relativamente constante (Figura 7). Sin embargo, el amRNA *crtI* aumenta durante la fase exponencial tardía, después que el mmRNA *crtI* y alcanza su máximo durante la fase estacionaria. Durante todo el ciclo de crecimiento el mensajero maduro es el mayoritario, por consiguiente, hay una mayor proporción de mensajero del gen *crtI* procesado hacia la forma madura y que puede traducirse a la proteína fitoeno desaturasa. Es improbable que el mensajero alternativo pueda traducirse ya que la proteína carecería del dominio de unión a NADPH, y que es fundamental para su función.





**Figura 6:** Cinética de expresión del gen *crtYB* en YM succinato. Los niveles de mensajero se normalizaron con el nivel de mensajero de actina en cada punto. Símbolos: (●), porcentaje de crecimiento; (■) nivel de expresión relativa del mRNA maduro; (▲) nivel de expresión relativa del mRNA alternativo.



**Figura 7.** Cinética de expresión del gen *crtI* en YM succinato. Los niveles de mensajero se normalizaron con el nivel de mensajero de actina en cada punto. Símbolos: (●), porcentaje de crecimiento; (■) nivel de expresión relativa del mRNA maduro; (▲) nivel de expresión relativa del mRNA alternativo.

#### **3.2.2.4. Gen *crtS* (astaxantina sintasa).**

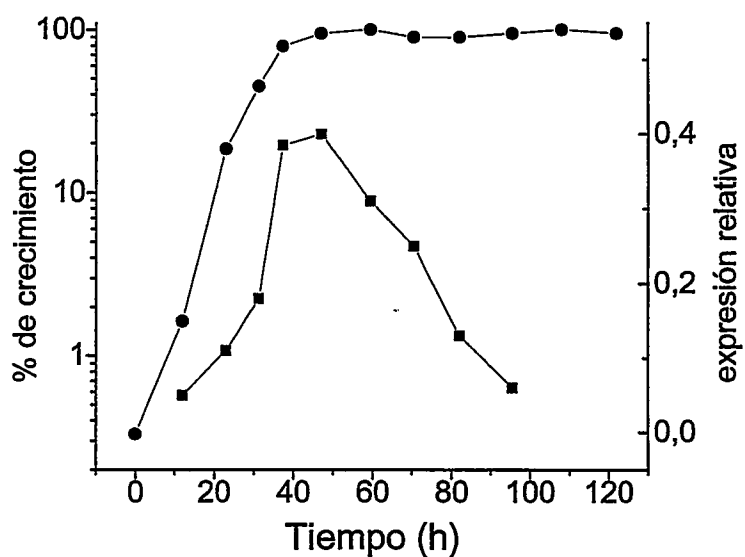
La expresión del gen *crtS* aumenta durante la fase exponencial alcanzando su máximo de expresión al principio de la fase estacionaria (Figura 8). Sin embargo, a partir de las 47 h de cultivo el nivel baja paulatinamente. Se observa que la expresión del gen *crtS* comienza a disminuir a partir de la fase estacionaria, mientras que los carotenoides aumentan a partir de ese momento (Figura 4A).

#### **3.2.3. Análisis de la producción de carotenoides y su relación con la expresión de los genes de carotenogénesis.**

La determinación del contenido y composición de los carotenoides durante el ciclo de crecimiento aportan información sobre las distintas etapas de dicha vía metabólica.

##### **3.2.3.1. Determinación de los carotenoides de la ruta central (dicíclica) de biosíntesis de astaxantina.**

En general, en YM succinato se observa una mayor proporción de carotenoides intermediarios de la vía carotenogénica. Por ejemplo, se detecta licopeno y gama caroteno en cantidades apreciables, así como otros carotenoides monocíclicos oxigenados que no se observan en otras condiciones de cultivo.

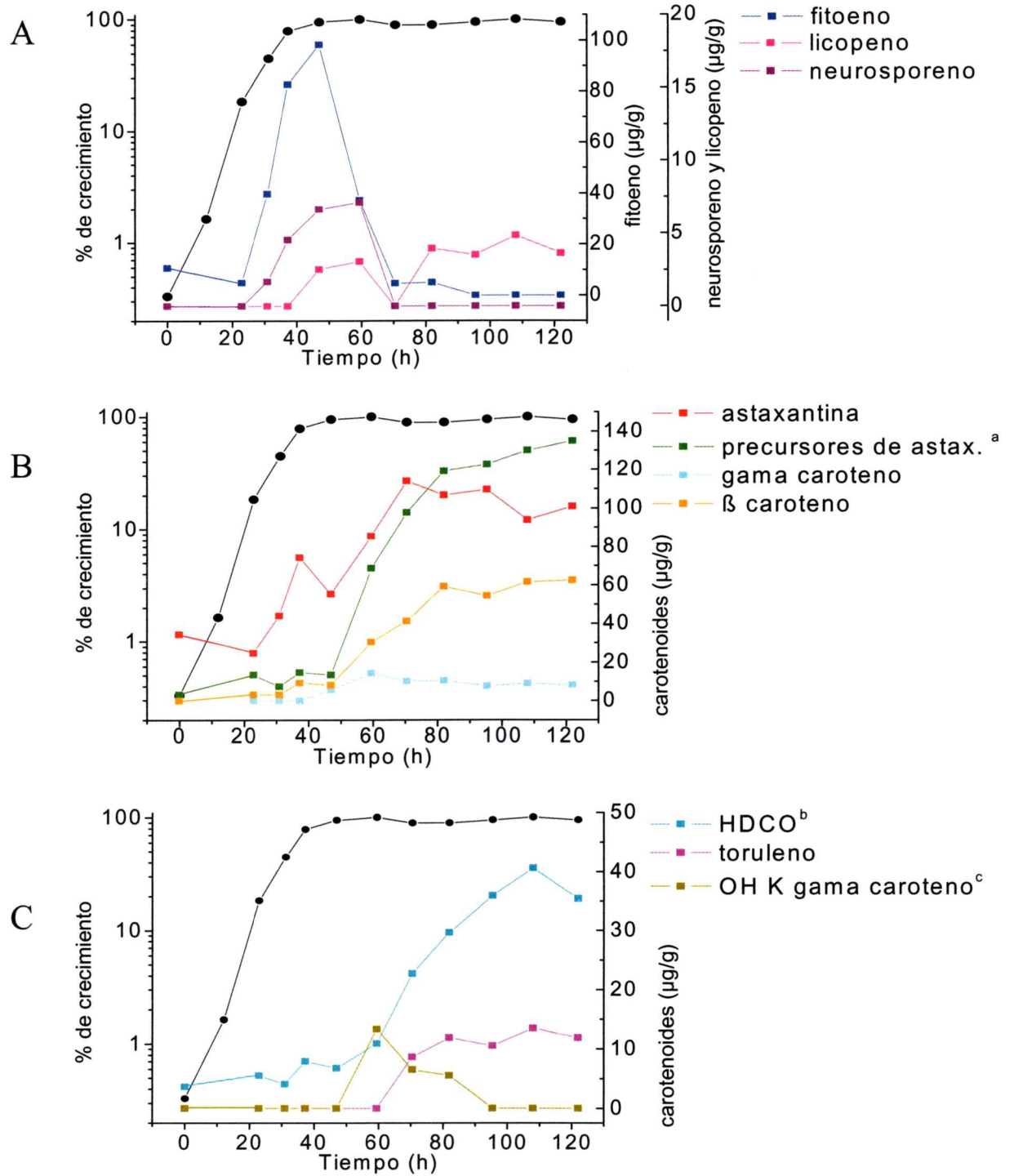


**Figura 8.** Cinética de expresión del gen *crtS* en YM succinato. Los niveles de mensajero se normalizaron con el nivel de mensajero de actina en cada punto. Símbolos: (●), porcentaje de crecimiento; (■) nivel de expresión relativa.

El fitoeno es el primer carotenoide de la vía y es el producto de la enzima codificada por el gen *crtYB*. Se observa que dicho carotenoide es el primero que comienza a aumentar sus niveles (Figura 9A) y esto ocurre antes que el gen *crtYB* induzca su expresión (Figura 6). El fitoeno es el sustrato de la enzima codificada por el gen *crtI* y entre los productos de la misma están el neurosporeno y el licopeno. Se observa que primero aparece el neurosporeno y luego el licopeno. Posteriormente el neurosporeno desaparece, aunque se sigue detectando licopeno hasta el final del ciclo. Ambos carotenoides aumentan su concentración celular después de la inducción de la expresión del gen *crtI*.

El siguiente paso en la vía es la ciclación de ambos extremos del licopeno para dar gama caroteno (monocíclico) y posteriormente  $\beta$ -caroteno (dicíclico). Esta reacción está catalizada nuevamente por el producto del gen *crtYB*. El gama caroteno disminuye gradualmente a medida que el  $\beta$ -caroteno aumenta (Figura 9B). En este caso el aumento de estos carotenoides ocurre al mismo tiempo que la inducción de la expresión del gen *crtYB*.

El siguiente paso en la vía es la conversión del  $\beta$ -caroteno en astaxantina llevado a cabo por la enzima astaxantina sintasa. Tanto los intermediarios de dicha enzima (precursores de astaxantina), como su producto final (astaxantina), aumentan durante la fase exponencial hasta el principio de la fase estacionaria (Figura 9B) y este aumento es posterior a la inducción de la expresión del gen *crtS* (Figura 8). Se observa una conversión secuencial de un carotenoide en otro, es decir los mismos van aumentando su concentración celular en el orden en que se van produciendo en la vía biosintética.



**Figura 9 A-C:** Carotenoides intermediarios y astaxantina producidos a lo largo del ciclo de crecimiento en YM succinato. Símbolos: (●), porcentaje de crecimiento. <sup>a</sup>, equinenona + hidroxiequinenona + fenicoxantina; <sup>b</sup>, hidroxi ceto toruleno; <sup>c</sup>, hidroxi ceto gama caroteno

En algunos casos la expresión del gen precede al aumento del producto de la actividad de la enzima codificada por dicho gen como ocurre con los precursores de astaxantina. Sin embargo en otros casos no sucede de esta manera, como por ejemplo en el caso del fitoeno, el cual comienza a aumentar sus niveles antes que se induzca la expresión del gen *crtYB*.

### 3.2.3.2. Determinación de carotenoides monocíclicos.

La enzima fitoeno desaturasa, codificada por el gen *crtI* es clave en la regulación de la vía carotenogénica (Verdoes y cols., 2003). No sólo regula el paso de fitoeno a licopeno, sino que además cataliza las desaturaciones responsables de la producción de los carotenoides monocíclicos como toruleno. Si bien el gama caroteno es monocíclico, no forma parte de la vía de carotenoides monocíclicos descrita por An y cols. (1999), ya que el mismo es un intermediario entre licopeno y  $\beta$ -caroteno (Figura 1). En la vía dicíclica el gama caroteno es ciclado nuevamente por la enzima codificada por el gen *crtYB* para dar  $\beta$ -caroteno. Sin embargo el gama caroteno puede ser desaturado por el producto del gen *crtI* para formar toruleno y también puede ser hidroxilado por la enzima astaxantina sintasa para formar ceto gama caroteno e hidroxilado por la enzima astaxantina sintasa para formar ceto gama caroteno e hidroxilado por la enzima astaxantina sintasa para formar ceto gama caroteno e hidroxilado por la enzima astaxantina sintasa para formar ceto gama caroteno. Las condiciones de cultivo en este caso son propicias para la formación de este tipo de carotenoides que no se detectan en otras condiciones, como se verá mas adelante. La Figura 9C muestra que al principio del ciclo de crecimiento solo se detecta HDCO, luego en la fase estacionaria temprana se detecta gama caroteno y posteriormente hidroxilado ceto gama caroteno. Posteriormente éste desaparece, comienza a aparecer toruleno, ceto toruleno y el HDCO continúa aumentando hasta el final del ciclo. La

aparición del toruleno es posterior a la inducción de la expresión del gen *crtI*. Asimismo, el aumento del HDCO es posterior a la inducción del gen *crtS*. Estos resultados indican que los carotenoides monocíclicos comienzan a aparecer al final del ciclo de crecimiento y su formación es posterior a la inducción de la expresión de los genes de las enzimas responsables de su síntesis.

### **3.2.3.3. Análisis global de la carotenogénesis en base a los porcentajes de carotenoides.**

La Tabla 5 muestra la distribución porcentual de los distintos carotenoides a lo largo del ciclo de crecimiento de la cepa silvestre de *X. dendrorhous* en YM succinato. Con respecto al fitoeno, cabe destacar que el mismo llega a ser casi el 50 % de los carotenoides a las 47 h de cultivo. Luego a las 60 h comienza a disminuir y eso coincide con un aumento de los porcentajes de  $\beta$ -caroteno y de los precursores de astaxantina, pero no de astaxantina. Al principio de la fase de crecimiento, cuando los carotenoides totales son bajos, el porcentaje de astaxantina es aproximadamente 50 %. Sin embargo, a medida que avanza el crecimiento la proporción de astaxantina va disminuyendo hasta llegar a un valor de sólo 28 %. La relación astaxantina / precursores de astaxantina es una medida de la eficiencia de conversión de los precursores de astaxantina en astaxantina. Se observa que al principio del ciclo de crecimiento esta relación es aproximadamente 2. Pero luego dicha relación comienza a disminuir hasta alcanzar un valor de 0,7. La cantidad absoluta de astaxantina no aumenta a partir de la fase estacionaria, pero sí los precursores de astaxantina y el  $\beta$ -caroteno, los cuales comienzan a acumularse, sugiriendo una disminución en la actividad astaxantina sintasa.



**Tabla 5:** Distribución porcentual de los carotenoides producidos por la cepa silvestre en la fermentación en YM succinato.

Tiempo (h)	Contenido celular de carotenoides ( $\mu\text{g/g}$ de peso seco)	Distribución porcentual de carotenoides (%)				
		Astaxantina	Precusores de astax. <sup>a</sup>	Astaxantina / precusores de astax. <sup>b</sup>	Fitoeno	$\beta$ -caroteno
23	47,5	47,7	25,9	1,8	9,5	6,3
31	61,7	43,8	7,5	5,8	39,4	3,3
37	111,5	38,4	7,7	5,0	42,6	4,9
47	99,6	28,1	6,9	4,1	49,7	4,2
59	234,0	31,5	25,4	1,2	13,8	11,3
70	302,1	37,2	31,9	1,2	1,6	13,5
82	347,2	30,3	33,9	0,9	1,5	16,9
95	345,0	31,8	35,6	0,9	0	15,8
108	353,8	26,5	36,8	0,7	0	17,5
122	360,5	28	37,5	0,7	0	17,4

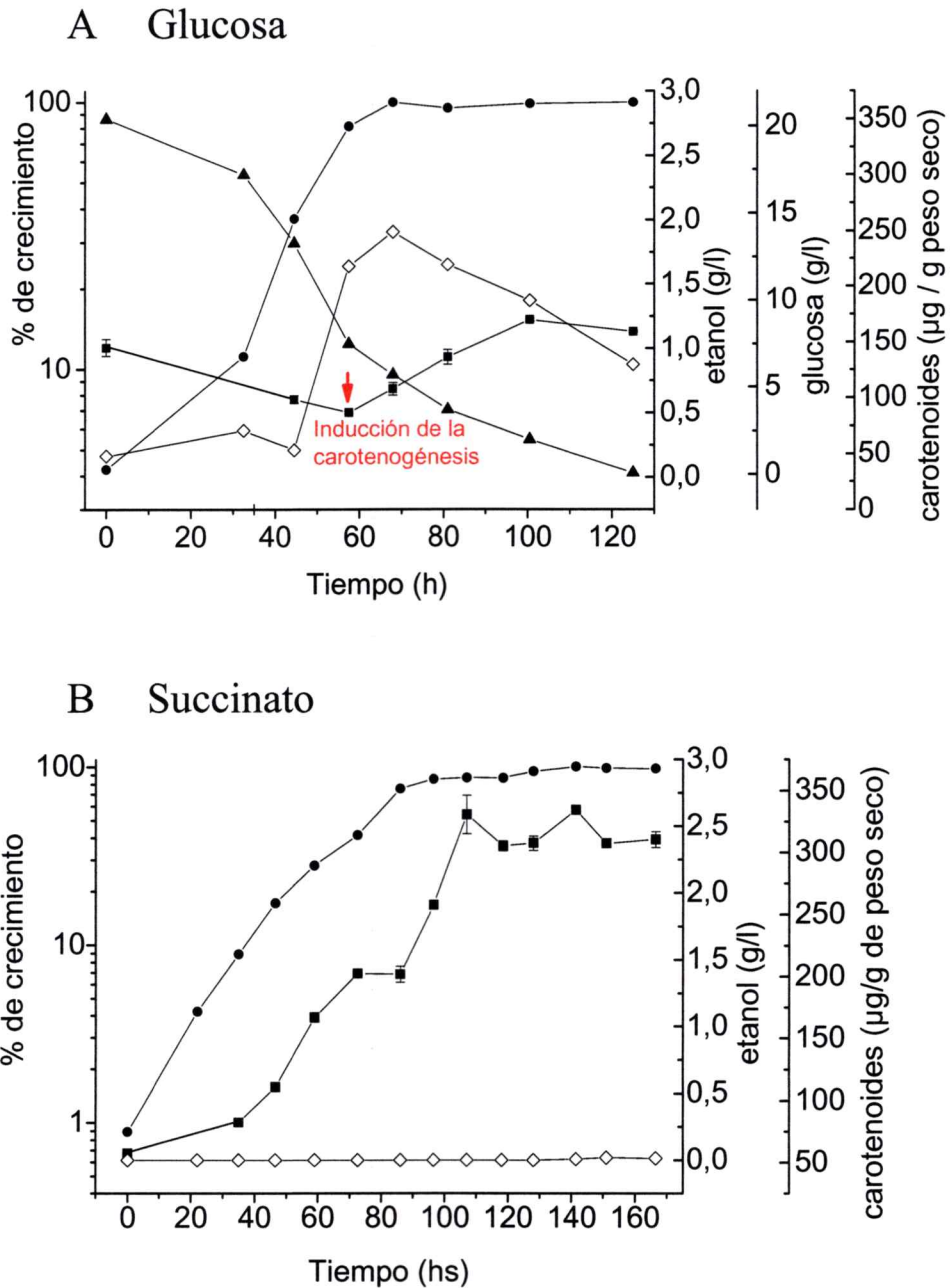
<sup>a</sup>, incluye equinenona, hidroxiequinenona y fenicoxantina; <sup>b</sup>, relación entre el porcentaje de astaxantina y el de precusores de astaxantina.

### **3.3. Efecto de la utilización de una fuente de carbono no fermentable y una fermentable sobre la carotenogénesis y sobre la expresión de los genes de carotenogénesis.**

Como se dijo anteriormente, el medio YM contiene nutrientes que pueden ser utilizados como fuente de carbono, por ejemplo azúcares como maltosa. El succinato es una fuente de carbono no fermentable y la única forma de metabolizarlo es por medio de la respiración aerobia. Para evaluar la utilización de succinato como única fuente de carbono y compararlo con lo que sucede en una fuente de carbono fermentable como la glucosa, se cultivó la cepa silvestre UCD 67-385 en un fermentador en medio mínimo con succinato (MM succinato) y con glucosa (MM glucosa) como fuente de carbono. Para ello se analizaron distintos parámetros a lo largo del ciclo de crecimiento tales como producción de carotenoides totales, intermediarios, biomasa (como peso seco), consumo de glucosa, producción de etanol y nivel de expresión relativa de los genes de carotenogénesis.

#### **3.3.1. Análisis del crecimiento y la producción de carotenoides a lo largo del ciclo de vida.**

En la Figura 10A se muestra el crecimiento de la cepa silvestre en MM glucosa. Este comienza con una fase lag. Posteriormente, el crecimiento del cultivo durante la fase exponencial está acompañado por el consumo de glucosa y la producción de etanol como resultado del metabolismo fermentativo de la glucosa. Durante este período se observa una activa producción de biomasa y síntesis de etanol. No obstante, la



**Figura 10:** Producción de carotenoides por *X. dendrorhous* UCD 67-385 en MM glucosa (A) y en MM succinato (B) en un fermentador en 'batch'. Símbolos: (●), % de crecimiento; (■), carotenoides; (◊), etanol; (▲), glucosa. El 100 % en A corresponde a  $2,59 \times 10^7$  células / ml. El 100 % en B corresponde a  $1,67 \times 10^8$  células / ml.

producción de carotenoides por unidad de biomasa es baja e incluso tiende a disminuir. La síntesis de carotenoides se induce al final de la fase exponencial de crecimiento y coincide con el inicio del consumo de etanol. Además, el etanol comienza a consumirse antes de que se agote completamente la glucosa, y coincide con el inicio de la fase estacionaria. En estas condiciones la carotenogénesis no está asociada al crecimiento.

Con respecto a lo que sucede en MM succinato (Figura 10B), el crecimiento no tiene una fase lag inicial y no hay producción de etanol. También se observa que no existe un momento de inducción de la carotenogénesis como en MM glucosa, sino que aumenta desde que se inicia el crecimiento del cultivo. Durante la fase exponencial del crecimiento en MM glucosa prácticamente no hay aumento neto de los carotenoides; el aumento de los mismos es durante la fase estacionaria. En cambio, en MM succinato es durante la fase exponencial que se producen la mayoría de los carotenoides. Esto indica que en este caso, la carotenogénesis estaría asociada al crecimiento. La producción de carotenoides es 1,9 veces mayor en MM succinato con respecto a la producción en MM glucosa (334 y 170  $\mu\text{g/g}$  respectivamente) (Figura 10 A y B).

En la Tabla 6 se muestran los parámetros de crecimiento en MM glucosa y MM succinato. La biomasa que alcanzó el cultivo en MM succinato fue mas del doble con respecto a la alcanzada en MM glucosa. En MM succinato el rendimiento de carotenoides por unidad de sustrato fue más de 4 veces mayor que el obtenido en MM glucosa. La producción de carotenoides por unidad de volumen de medio de cultivo en MM succinato también fue mas de 4 veces mayor que la obtenida en MM glucosa.

**Tabla 6:** Producción máxima de biomasa, carotenoides y etanol en las fermentaciones en MM glucosa y MM succinato.

	Glucosa	Succinato
Peso seco (mg / ml)	2,46 ± 0,01	5,58 ± 0,07
Contenido celular de carotenoides (µg / g de peso seco)	170,1 ± 3,9	334,5 ± 6,5
Rendimiento de carotenoides por unidad de sustrato (µg / g)	19	86
Producción total de carotenoides (µg / ml de medio de cultivo )	0,39	1,73
Producción de etanol (g / l)	1,91	0,02

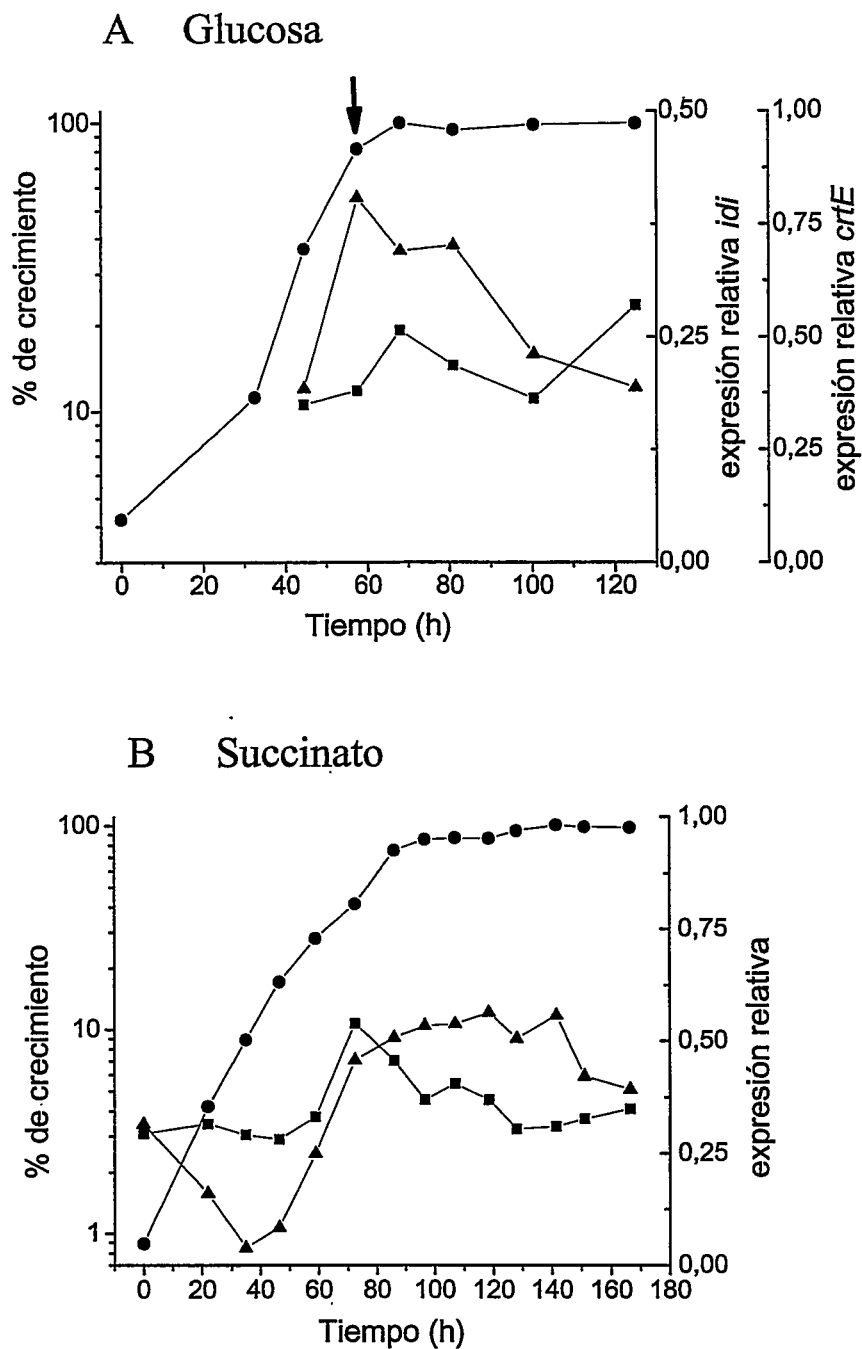
Esto se debe a que tanto el contenido celular de carotenoides como la producción de biomasa son mayores en MM succinato respecto a glucosa. La producción de etanol en MM glucosa fue de 1,9 g/l mientras que en MM succinato fue despreciable. Estos resultados muestran que la producción de carotenoides comienza antes en el ciclo de crecimiento y es mayor cuando se utiliza una fuente de carbono no fermentable como succinato. Esto confirma resultados anteriores acerca de la mayor producción de carotenoides en fuentes de carbono no fermentables. Se ha descrito que la carotenogénesis no estaría asociada al crecimiento. Sin embargo, de acuerdo a estos resultados, el hecho que la carotenogénesis esté asociada o no al crecimiento dependería de las condiciones de cultivo.

### **3.3.2. Análisis de la expresión de los genes de carotenogénesis en MM glucosa y MM succinato.**

#### **3.3.2.1 Gen *idi* (isopentenil pirofosfato isomerasa) y gen *crtE* (geranilgeranil pirofosfato sintasa).**

En la Figura 11 se muestra el nivel de expresión de los genes *idi* y *crtE* a lo largo del ciclo de crecimiento tanto en MM glucosa (A) como en MM succinato (B).

En MM glucosa se observa que el gen *idi* tiene dos máximos de expresión, al final de la fase exponencial y en la fase estacionaria tardía. El primer máximo ocurre antes de la inducción de la síntesis de carotenoides (Figura 10A). En MM succinato su máxima expresión es en la fase exponencial de crecimiento y luego disminuye gradualmente



**Figura 11.** Cinética de expresión de los genes *idi* y *crtE* en MM glucosa (A) y en MM succinato (B). Los niveles de mensajero se normalizaron con el nivel de mensajero de actina en cada punto. Símbolos: (●), porcentaje de crecimiento; (■) nivel de expresión relativa del gen *idi*; (▲) nivel de expresión relativa del gen *crtE*. La flecha indica el momento de inducción de la carotenogénesis en MM glucosa. Los niveles de todos los mensajeros en succinato fueron realizadas por triplicado y en glucosa por duplicado.

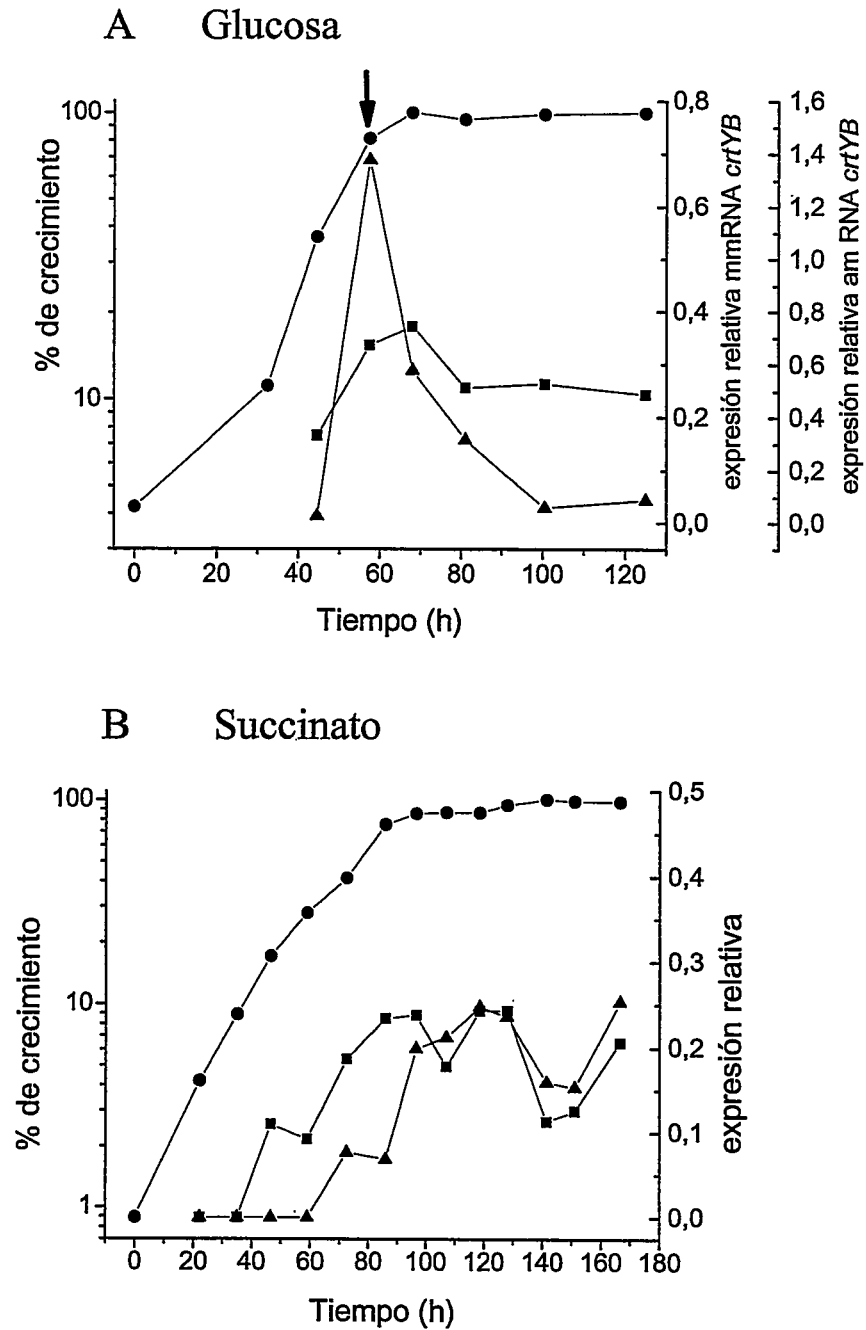
durante la fase estacionaria. Dicho máximo ocurre después del aumento de los carotenoides al principio de la fase exponencial (Figura 10B).

En MM glucosa el nivel de expresión del gen *crtE* aumenta y alcanza su máximo durante la fase exponencial y luego disminuye durante la fase estacionaria. Dicho máximo es anterior a la inducción de la carotenogénesis (Figura 11A). En MM succinato la expresión del gen *crtE* aumenta durante la fase exponencial y se mantiene en niveles elevados de expresión durante la fase estacionaria. Finalmente disminuye en la fase estacionaria tardía. Este aumento es posterior al aumento de los carotenoides. Estos resultados muestran que el hecho de que la carotenogénesis comience tempranamente como ocurre en MM succinato, no está asociado a una expresión mas temprana de los genes *idi* y *crtE*. Ambos genes tienen patrones de expresión similares en glucosa y succinato. Además, la expresión de estos genes, que también participan en otras vías metabólicas, continúa en la fase estacionaria, mientras que los genes exclusivos de carotenogénesis se expresan durante un período mas corto de tiempo como se verá mas adelante.

### 3.3.2.2. Gen *crtYB* (fitoeno- $\beta$ -caroteno sintasa).

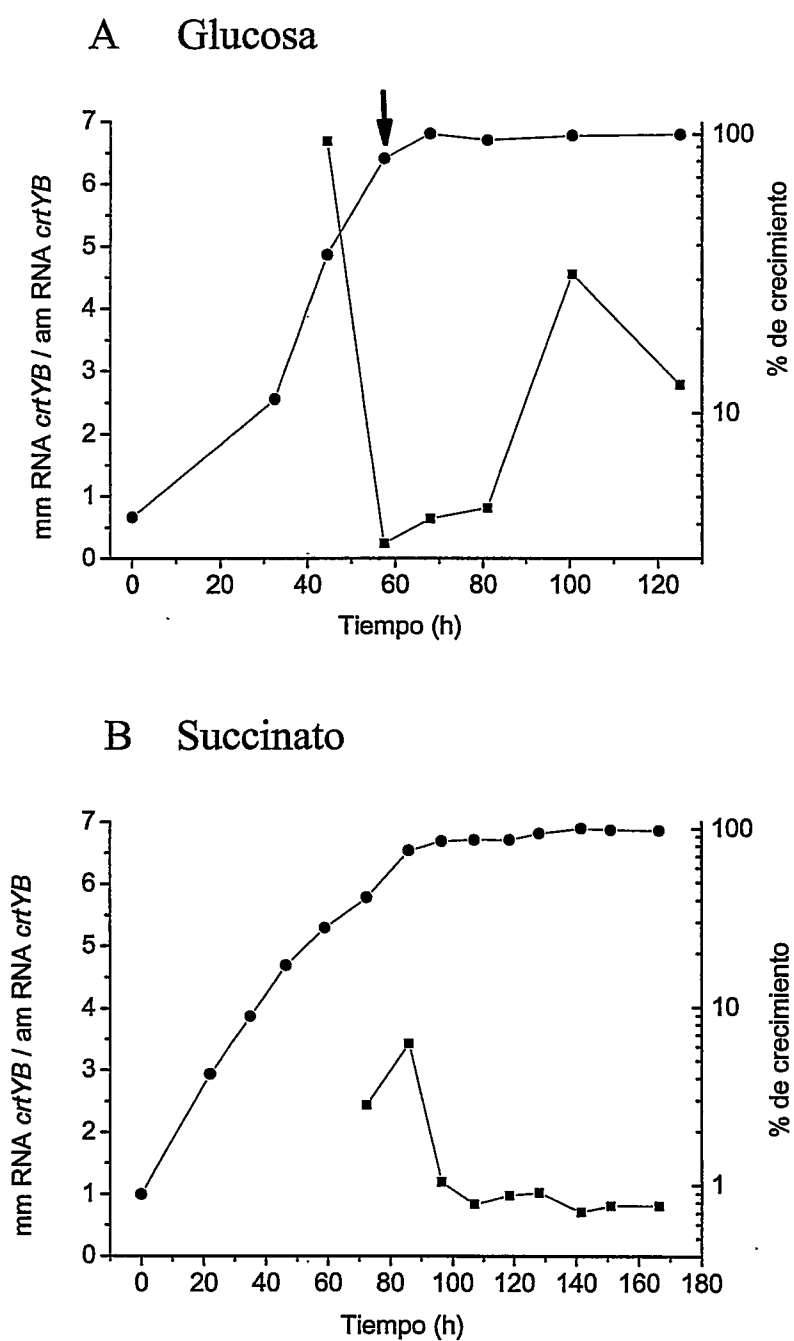
En MM glucosa, los niveles de expresión del mensajero maduro y alternativo del gen *crtYB* se inducen al mismo tiempo durante la fase exponencial y son máximos durante la misma (Figura 12A). Sus niveles decaen rápidamente durante la fase estacionaria. Este patrón de expresión es similar al observado en YM glucosa (Lodato y cols., 2007), sin embargo en MM glucosa el nivel de expresión del mensajero alternativo





**Figura 12.** Cinética de expresión del gen *crtYB* en MM glucosa (A) y en MM succinato (B). Los niveles de mensajero se normalizaron con el nivel de mensajero de actina en cada punto. Símbolos: (●), porcentaje de crecimiento; (■) nivel de expresión relativa del mRNA maduro; (▲) nivel de expresión relativa del mRNA alternativo.

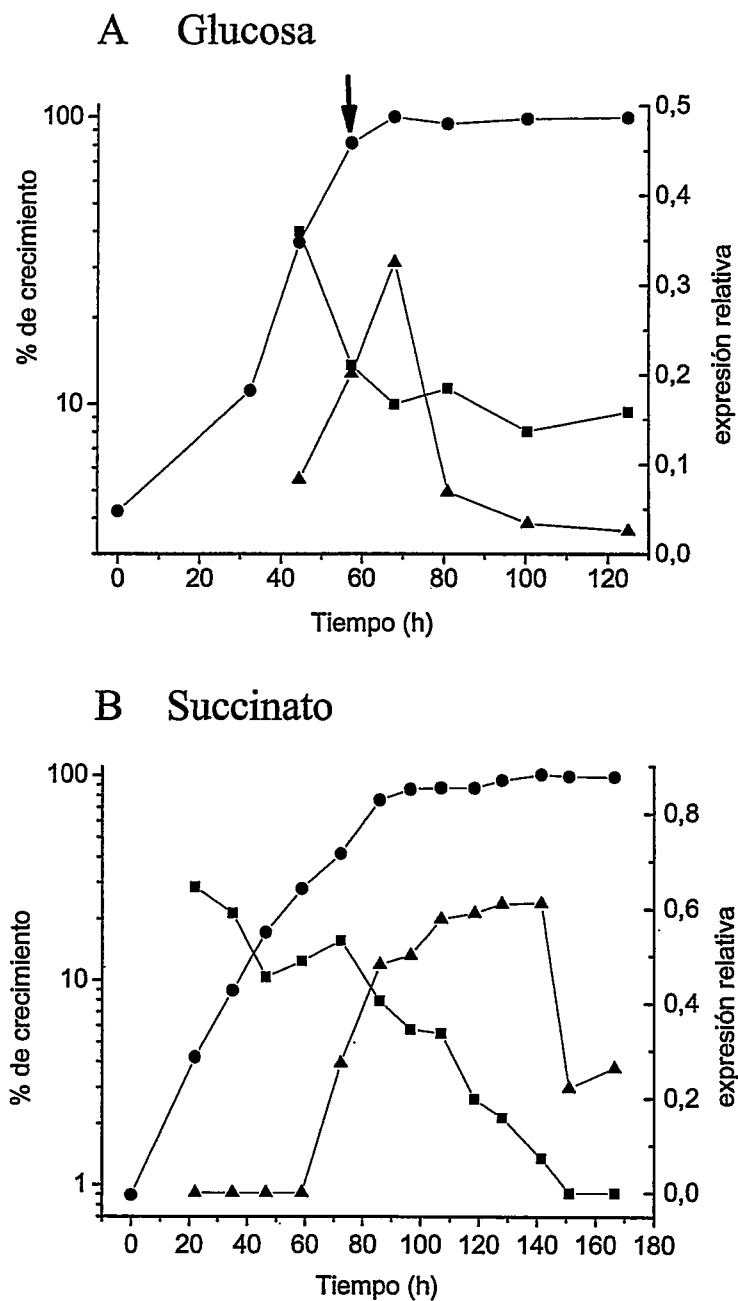
es mayor que el del mensajero maduro. En MM glucosa los niveles de mmRNA *crtYB* fueron siempre mayores que los de amRNA *crtYB*, excepto en el período de máxima expresión de este último. En MM succinato la expresión del mensajero maduro muestra un nivel y un patrón de expresión similar al observado en MM glucosa. En cambio, la expresión del mensajero alternativo del gen *crtYB*, comienza después que el maduro, y alcanza un nivel similar a éste (Figura 12B). De acuerdo a estos resultados la diferencia más notoria en cuanto a expresión del gen *crtYB* en glucosa y succinato está en el mensajero alternativo. Las diferencias de expresión de los mensajeros maduro y alternativo del gen *crtYB* se hacen más notorias en la Figura 13, donde se muestra la cinética del nivel de mensajero maduro en relación al nivel del mensajero alternativo (M/A). En la Figura 13, cada punto de las curvas representa la siguiente relación:  $(\text{mmRNA } crtYB / \text{mRNA } act) / (\text{amRNA } crtYB / \text{mRNA } act)$ . Se observa que la relación M/A disminuye durante la fase exponencial en MM glucosa, y al comienzo de la fase estacionaria en succinato. Sin embargo, en la fase estacionaria en glucosa esta relación comienza a aumentar a diferencia de lo que ocurre en MM succinato donde la misma no vuelve a aumentar durante la fase estacionaria. En MM glucosa durante la fase estacionaria el nivel de mmRNA *crtYB* es mayor que el de amRNA *crtYB*, mientras que en MM succinato ocurre a la inversa. Por lo tanto, durante la fase estacionaria en glucosa hay una mayor proporción de mensajero que puede ser traducido en enzima activa, respecto a lo que ocurre en succinato. Estos resultados sugieren que la expresión del mensajero alternativo y la relación mmRNA *crtYB* / amRNA *crtYB* podrían estar jugando un papel importante en la regulación de la carotenogénesis en distintas fuentes de carbono.



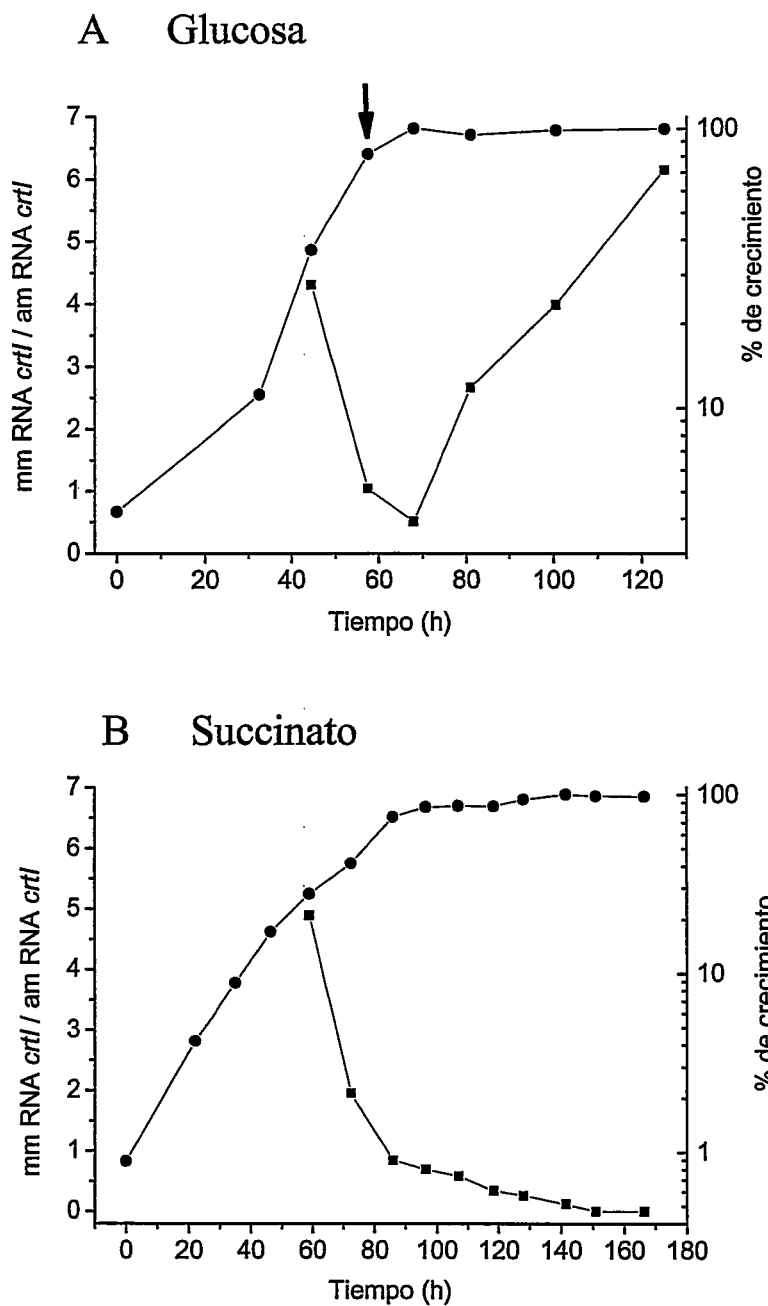
**Figura 13.** Cinética de la relación de la expresión del mensajero maduro (mmRNA) y del mensajero alternativo (amRNA) del gen *crtYB*, en MM glucosa (A) y MM succinato (B). Los niveles de mensajero se normalizaron con el nivel de mensajero de actina en cada punto. Símbolos: (●), porcentaje de crecimiento; (■), relación mmRNA/amRNA.

### 3.3.2.3. Gen *crtI* (fitoeno desaturasa).

En MM glucosa la expresión del mmRNA *crtI* se encuentra en un nivel elevado en la fase exponencial y disminuye hasta que comienza la fase estacionaria (Figura 14A). El nivel del amRNA *crtI* aumenta durante la fase exponencial y alcanza su máximo al inicio de la fase estacionaria y luego cae bajo los niveles del mmRNA *crtI*. En MM succinato el mmRNA *crtI* se encuentra en un nivel elevado desde el principio de la fase exponencial y disminuye gradualmente (Figura 14B). El amRNA *crtI* comienza a aumentar al final de la fase exponencial tal que durante la fase estacionaria el nivel de éste es mayor que el de mmRNA *crtI*. Por lo tanto, el mmRNA *crtI* tiene patrones de expresión similares en ambas condiciones de cultivo; las diferencias en la expresión de este gen se encuentran en el amRNA *crtI* durante la fase estacionaria. Estas diferencias quedan de manifiesto en la Figura 15, donde se muestra la cinética del nivel de mensajero maduro en relación al nivel del mensajero alternativo (M/A). Se observa que en MM glucosa (Figura 15A) la relación M/A disminuye durante la fase exponencial, recuperándose durante la fase estacionaria, mientras que en MM succinato no se observa dicha recuperación (Figura 15B). Por consiguiente, en tiempos tempranos de cultivo en MM succinato hay una mayor proporción de RNA del gen *crtI* que es procesado hacia la forma madura y que puede traducirse a la proteína fitoeno desaturasa. Sin embargo, la proporción del mensajero maduro procesado en forma 'adecuada' disminuye con la edad del cultivo. En cambio en MM glucosa durante la fase estacionaria, dicha relación no disminuye sino que aumenta, por lo cual la proporción de mensajero capaz de generar proteína activa es mayor que en succinato.



**Figura 14.** Cinética de expresión del gen *crtI* en MM glucosa (A) y en MM succinato (B). Los niveles de mensajero se normalizaron con el nivel de mensajero de actina en cada punto. Símbolos: (●), porcentaje de crecimiento; (■) nivel de expresión relativa del mRNA maduro; (▲) nivel de expresión relativa del mRNA alternativo.



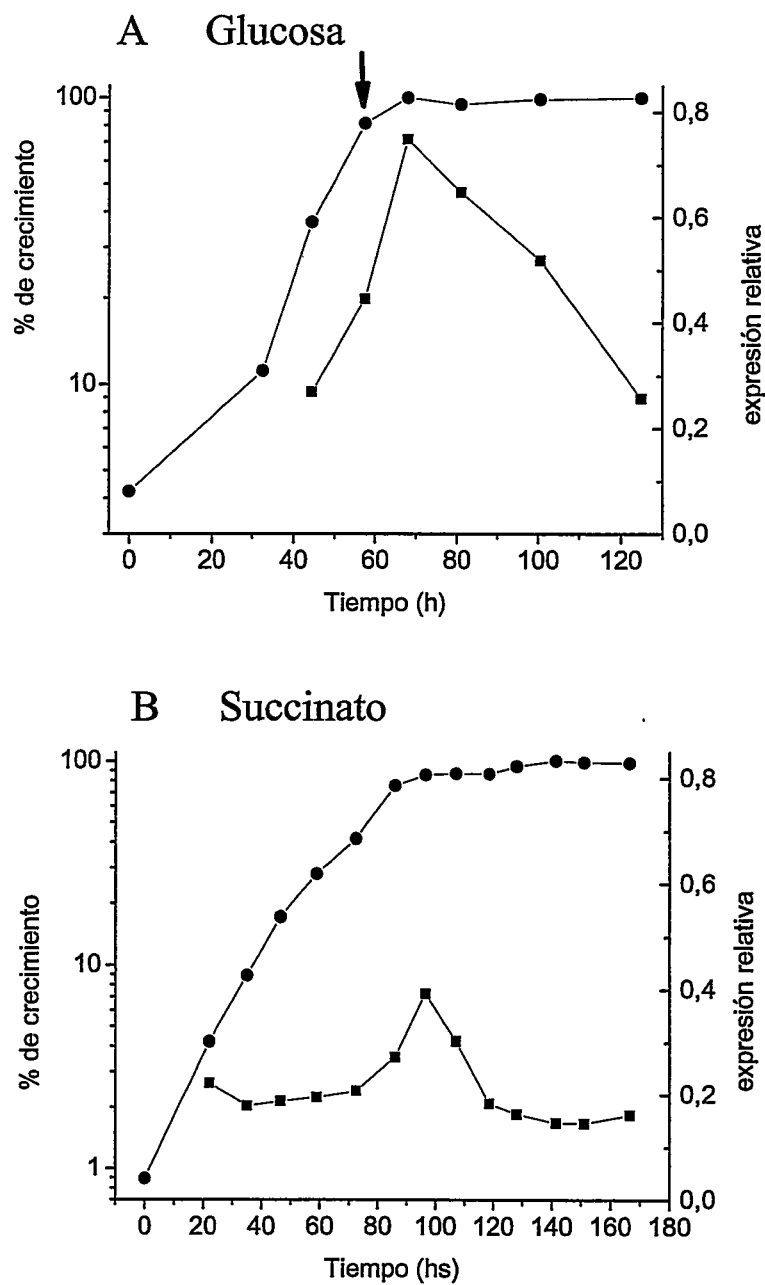
**Figura 15.** Cinética de la relación de la expresión del mensajero maduro (mmRNA) y del mensajero alternativo (amRNA) del gen *crtI*, en MM glucosa (A) y MM succinato (B). Los niveles de mensajero se normalizaron con el nivel de mensajero de actina en cada punto. Símbolos: (●), porcentaje de crecimiento; (■), proporción mmRNA/amRNA.

#### 3.3.2.4. Gen *crtS* (astaxantina sintasa).

El gen de la astaxantina sintasa (*crtS*) tiene su máximo de expresión al principio de la fase estacionaria en MM glucosa y MM succinato, y el comportamiento es similar en ambos casos. Sin embargo el nivel de expresión en MM glucosa es aproximadamente el doble que en MM succinato (Figura 16 A y B). Esto contrasta con la cantidad de carotenoides producida, ya que la misma es aproximadamente el doble en succinato que en glucosa. La expresión del gen *crtS* en MM glucosa comienza a aumentar cuando se induce la síntesis de carotenoides (Figura 16A). En cambio en MM succinato, la expresión de dicho gen alcanza su máximo al inicio de la fase estacionaria, mientras que la síntesis de carotenoides ocurre desde el inicio del ciclo de crecimiento (Figura 16B).

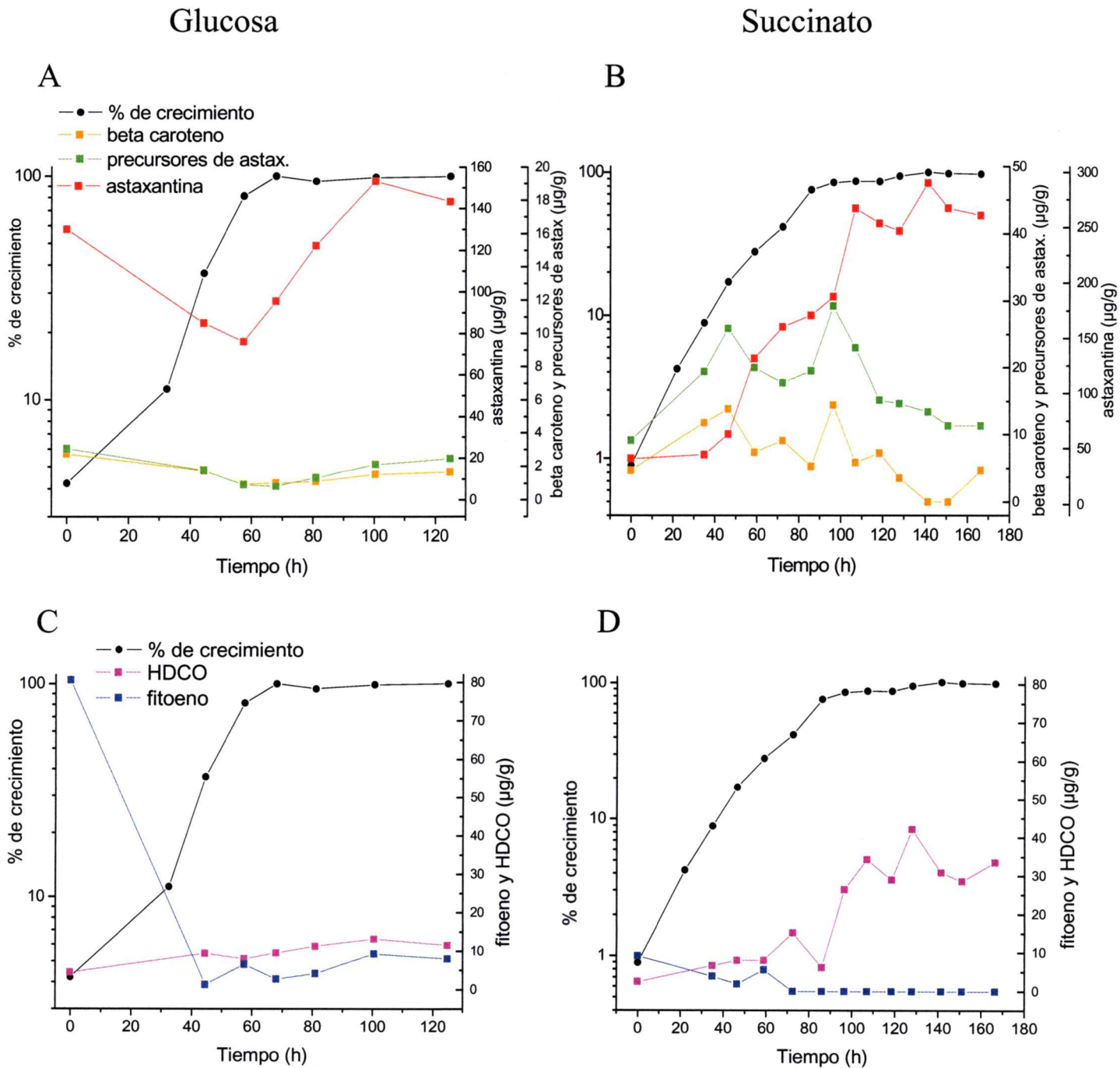
#### 3.3.3. Análisis de la producción de carotenoides y su relación con la expresión de los genes de carotenogénesis.

La Figura 17 muestra el perfil de producción de carotenoides durante el crecimiento en MM glucosa (A y C) y MM succinato (B y D), siendo la cantidad de carotenoides en este último medio el doble con respecto a glucosa. En MM glucosa se observa que durante las primeras 58 h de cultivo la astaxantina disminuye al igual que el  $\beta$ -caroteno, los precursores de astaxantina y el fitoeno (Figuras 17 A y C). Esta disminución coincide con el consumo de glucosa (metabolismo fermentativo). A partir de las 68 h la astaxantina comienza a aumentar, y esto coincide con el consumo del etanol producido previamente por fermentación de la glucosa (metabolismo aerobio) (Figura 10A).



**Figura 16.** Cinética de expresión del gen *crtS* en MM glucosa (A) y MM succinato (B). Los niveles de mensajero se normalizaron con el nivel de mensajero de actina en cada punto. Símbolos: (●), porcentaje de crecimiento; (■) nivel de expresión relativa.





**Figura 17:** Astaxantina y carotenoides intermediarios producidos durante el crecimiento en MM glucosa (A y C) y MM succinato (B y D).

En MM succinato no se observa una disminución inicial de los carotenoides; la astaxantina, sus precursores y el  $\beta$ -caroteno comienzan a aumentar en la fase exponencial (Figura 17B). En MM succinato la levadura se encuentra bajo un metabolismo respiratorio durante todo el ciclo de crecimiento. Probablemente la utilización de succinato produzca un cambio en algún paso regulatorio clave de forma tal que aumenta el flujo de acetyl-CoA hacia la ruta de biosíntesis de carotenoides desde el inicio del crecimiento.

La astaxantina es el producto de la actividad de la enzima astaxantina sintasa, codificada por el gen *crtS*. Puede observarse que en MM glucosa la expresión del gen *crtS* comienza a aumentar antes que la astaxantina (Figuras 16A y 17A), mientras que en MM succinato la expresión de dicho gen comienza a aumentar después que la astaxantina (Figuras 16B y 17B). Además, el nivel de expresión del gen *crtS* alcanzado en MM glucosa es el doble respecto a MM succinato. Sin embargo, el contenido celular de astaxantina es el doble en MM succinato respecto a MM glucosa. Estos resultados demuestran que no hay correlación entre el nivel de expresión del gen *crtS* y la cantidad de producto de la enzima codificada por dicho gen. A priori se esperaría que la inducción de la expresión de un gen preceda el aumento del producto de la enzima codificada por dicho gen. Esto no se observa para el gen *crtS*. Es posible que estén actuando mecanismos post-transcripcionales en la regulación de las enzimas carotenogénicas.

Se observa que los niveles de HDCO son mayores en MM succinato respecto a MM glucosa (Figura 17 C y D). El HDCO es el producto de las enzimas fitoeno desaturasa (codificada por el gen *crtI*) y astaxantina sintasa (codificada por el gen *crtS*).

El aumento de HDCO en MM succinato coincide con el momento en que el nivel de amRNA *crtI* pasa a ser mayor que el de mmRNA *crtI*. En MM glucosa la relación mmRNA *crtI* / amRNA *crtI* es diferente y la misma podría ser la responsable de las diferencias en la cantidad de HDCO.

La evolución de la distribución porcentual de los distintos carotenoides a lo largo del ciclo de crecimiento en MM glucosa y MM succinato se muestra en las Tablas 7 y 8, respectivamente. Debido a que la relación astaxantina / precursores de astaxantina es una medida de la conversión de los precursores en astaxantina, se determinó dicha relación en ambas condiciones de cultivo. En MM glucosa, la relación astaxantina / precursores de astaxantina es de 48 en la fase exponencial temprana y de 57 al final del ciclo de crecimiento. No obstante que en MM succinato es 2,4 en la fase exponencial temprana y 23 al final del ciclo de crecimiento. En ambas condiciones el porcentaje de astaxantina alcanzado es el mismo. Sin embargo en MM succinato, la relación se incrementa cerca de 10 veces, lo cual indica que aumenta la actividad astaxantina sintasa. En MM glucosa se observa un menor porcentaje de HDCO respecto a MM succinato al final del ciclo de crecimiento. Además en MM glucosa hay acumulación de fitoeno, lo cual no se observa en MM succinato. Estos resultados sugieren una menor actividad fitoeno desaturasa en MM glucosa respecto a MM succinato.

**Tabla 7:** Distribución porcentual de los carotenoides producidos por la cepa silvestre en la fermentación en MM glucosa.

Tiempo (h)	Contenido celular de carotenoides ( $\mu\text{g}$ / g de peso seco)	Distribución porcentual de carotenoides (%)				
		Astaxantina	Precursores de astax. <sup>a</sup>	Astaxantina / precursores de astax. <sup>b</sup>	Fitoeno	HDCO
44	98	85,7	1,8	47,6	1,3	9,5
57	86	82,3	1	82,3	7,1	8,6
68	107	87,1	0,8	108,9	2,5	8,7
81	136	87,3	1	87,3	3	8,0
100	170	85,5	1,2	71,3	5,2	7,3
125	159	85,8	1,5	57,2	4,8	6,9

<sup>a</sup>, incluye equinenona, hidroxiequinenona y fenicoxantina; <sup>b</sup>, relación entre el porcentaje de astaxantina y el de precursores de astaxantina;

**Tabla 8:** Distribución porcentual de los carotenoides producidos por la cepa silvestre en la fermentación en MM succinato.

Tiempo (h)	Contenido celular de carotenoides ( $\mu\text{g}$ / g de peso seco)	Distribución porcentual de carotenoides (%)				
		Astaxantina	Precursores de astax. <sup>a</sup>	Astaxantina / precursores de astax. <sup>b</sup>	Fitoeno	HDCO
35	82	51,7	22,5	2,3	4,5	7,6
46	110	55,9	23,0	2,4	1,7	7,1
59	166	76,2	11,6	6,6	3,2	4,6
72	202	79,2	8,8	9,0	0,0	7,5
86	201	84,6	9,7	8,7	0,0	3,0
96	257	72,8	11,4	6,4	0,0	10,3
107	330	80,8	7,0	11,5	0,0	10,4
118	305	83,1	5,0	16,6	0,0	9,5
128	307	80,3	4,8	16,7	0,0	13,7
141	334	86,7	4,0	21,7	0,0	9,2
151	307	87,0	3,7	23,5	0,0	9,3
166	310	84,0	3,7	22,7	0,0	10,8

<sup>a</sup>, incluye equinenona, hidroxiequinenona y fenicoxantina; <sup>b</sup>, relación entre el porcentaje de astaxantina y el de precursores de astaxantina:

### 3.4. Efecto de la intensidad del flujo de aire en la carotenogénesis de *X. dendrorhous*.

Se sabe que el estrés oxidativo generado durante el metabolismo aerobio favorece la producción de carotenoides. Los resultados de la fermentación en YM con succinato sugieren que las reacciones de adición de grupos ceto e hidroxilo, que requieren de oxígeno molecular están limitadas en esas condiciones ya que la relación astaxantina / precursores de astaxantina es baja y la expresión del gen *crtS* es similar a la determinada en otros experimentos en los cuales dicha relación es elevada. Podría ocurrir que un aumento en el flujo de aire produjera un aumento en dicha relación. Para comprobar esto se realizó el crecimiento de la cepa silvestre en medio YM succinato, en matraces con distintos flujos de aire: 1,0; 7,4 y 18,4 l/min. A los 5 días de cultivo se identificaron y cuantificaron los carotenoides producidos. Se observa que el contenido celular de carotenoides aumenta cuando el flujo de aire aumenta de 1 a 7,4 l/min. Sin embargo con 18,4 l/min no se observa un cambio significativo en el contenido celular de carotenoides, probablemente porque se satura la capacidad carotenogénica de la levadura (Tabla 9). Sin embargo, el mayor porcentaje de astaxantina se observa con un flujo de aire de 18,4 l/min. Además, los precursores de astaxantina como  $\beta$ -caroteno, equinenona e hidroxiequinenona, disminuyen y la astaxantina aumenta a medida que aumenta el flujo de aire lo cual concuerda con la hipótesis planteada. Por otro lado, el carotenoide monocíclico toruleno también disminuye, no así la forma ceto e hidroxilada del mismo OH-ceto-toruleno (HDCO) la cual se mantiene en niveles elevados. La formación de HDCO a partir de toruleno es llevada a cabo por la enzima astaxantina sintasa y también requiere oxígeno.

**Tabla 9:** Carotenoides totales y porcentaje de intermediarios de la cepa silvestre al cabo de 5 días de crecimiento en YM succinato con distintos flujos de aire.

	1 l/min	7,4 l/min	18,4 l/min
Contenido celular de carotenoides ( $\mu\text{g/g}$ )	$315 \pm 5,2$	$376 \pm 19,7$	$353 \pm 5,5$
Astaxantina	$45,3 \pm 3,9$	$66,2 \pm 0,8$	$73,9 \pm 0,7$
HDCO	$17,7 \pm 0,9$	$20,2 \pm 2,1$	$17,7 \pm 0,7$
OH Equinenona	$14,5 \pm 1,5$	$5,7 \pm 0,7$	$3,3 \pm 0,09$
Equinenona	$8,0 \pm 1,0$	$2,1 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,06$
Licopeno	$0,6 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,03$	$0,70 \pm 0,02$
Toruleno	$2,0 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,07$	$0,9 \pm 0,03$
$\beta$ -caroteno	$11,4 \pm 1,9$	$3,5 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,20$

Las determinaciones fueron realizadas por triplicado (n=3)

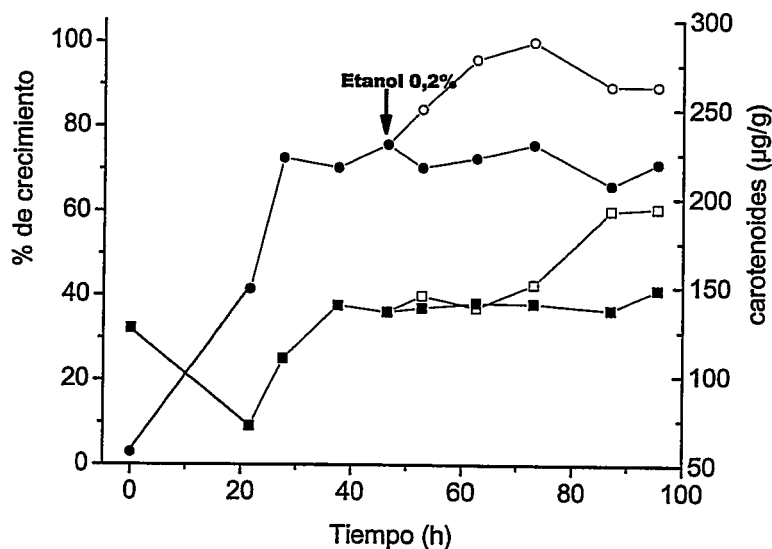
### 3.5. Estudio de la inducción de la carotenogénesis utilizando etanol como agente inductor.

Se sabe que cuando la levadura crece en glucosa se produce etanol como producto de fermentación (Figura 10A) y que la inducción de la carotenogénesis ocurre cuando comienza a utilizarse el etanol producido (Lodato y cols., 2007). También se sabe que el etanol estimula la producción de carotenoides (Gu y cols., 1997; Yamane y cols., 1997). Además, el análisis de los componentes del medio YM indica que dispone de una pequeña cantidad de compuestos (extracto de malta, extracto de levadura, peptona) que son un aporte como fuente de carbono para soportar el crecimiento de la levadura. Así, es posible que al cultivar *X. dendrorhous* en YM sin glucosa se logre su crecimiento y no se produzca suficiente etanol como para gatillar la producción de carotenoides. Para probar esto se estudió el crecimiento, la producción de etanol y carotenoides en medio YM con o sin glucosa. Como resultado se observó que en YM sin glucosa la levadura puede crecer sólo 1/3 que en YM con glucosa y produce una cantidad reducida o casi nula de etanol (6 veces menos) y 1,6 veces menos carotenoides sugiriendo que el etanol podría gatillar la síntesis de carotenoides. Posteriormente, para estudiar el efecto del etanol en la inducción de la carotenogénesis, se cultivó la levadura en medio YM sin glucosa en un fermentador de 9 l y una vez alcanzada la fase estacionaria se agregó etanol 0,2 % (v/v). Se determinó que el aumento promedio de carotenoides fue de  $49,3 \pm 5,7$  %. Este resultado, aporta elementos para estudiar la inducción de la carotenogénesis en *X. dendrorhous* ya que la adición de etanol al cultivo constituiría una estrategia para inducir la carotenogénesis en forma controlada.



Para poder evaluar la inducción de la carotenogénesis en las distintas etapas de crecimiento, se repitió el experimento anterior en un fermentador con 9 l de YM sin glucosa. A las 16 h de alcanzada la fase estacionaria, el cultivo fue dividido en 2 matraces, a uno de ellos se adicionó etanol 0,2 % (v/v) mientras que al otro no se agregó etanol. Se determinó el crecimiento, producción específica de carotenoides y su composición cuantitativa mediante HPLC. Además, se estudió la expresión de los genes de carotenogénesis, a nivel de sus mRNAs, semicuantitativamente por RT-PCR. La Figura 18 muestra los resultados del crecimiento y producción de carotenoides e indica que al agregar etanol, el contenido celular de carotenoides aumenta a partir del punto de adición de etanol, un 31 % con respecto al cultivo sin etanol. Se observa que hay un aumento de la biomasa luego de la adición de etanol lo cual indica que este alcohol es utilizado como fuente de carbono.

En la Tabla 10 se muestran los parámetros de crecimiento en YM sin glucosa con y sin etanol. El aumento del contenido celular de carotenoides con respecto al cultivo sin etanol fue de 31 %. Sin embargo la cantidad de carotenoides por unidad de volumen de medio de cultivo aumentó 64 %. Esto se debe no sólo a que aumenta la biomasa sino también a la inducción de la carotenogénesis, la cual aumenta el contenido celular de carotenoides.



**Figura 18:** Crecimiento y contenido celular de carotenoides en YM sin glucosa con y sin etanol. A las 46 h de crecimiento, el cultivo fue dividido y a uno de ellos se agregó etanol 0,2 % (v/v). La flecha indica el momento en que fue agregado el etanol. Símbolos: % de crecimiento sin etanol (●) y con etanol (○); contenido celular de carotenoides sin etanol (■) y con etanol (□). El 100 % corresponde a una biomasa de 3,13 mg/ml.

**Tabla 10:** Parámetros de crecimiento determinados al finalizar el ciclo (a las 100 h de crecimiento) en medio YM sin glucosa con y sin etanol.

	Sin etanol	Con etanol	% de aumento
Biomasa (g / ml)	2,3	3,1	35 %
Contenido celular de carotenoides ( $\mu\text{g}$ / g de peso seco)	148,6	194,5	31 %
Producción total de carotenoides ( $\mu\text{g}$ / ml de medio de cultivo )	0,33	0,54	64 %

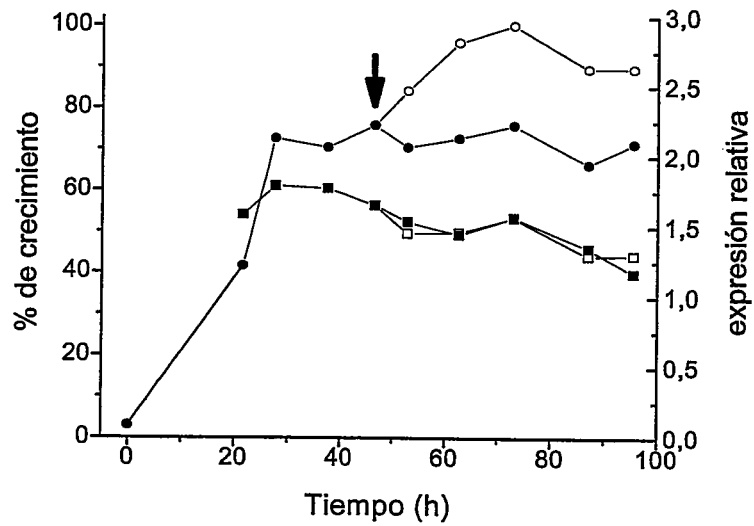
### **3.5.1. Análisis de la expresión de los genes de carotenogénesis durante la inducción con etanol.**

#### **3.5.1.1 Gen *idi* (isopentenil pirofosfato isomerasa).**

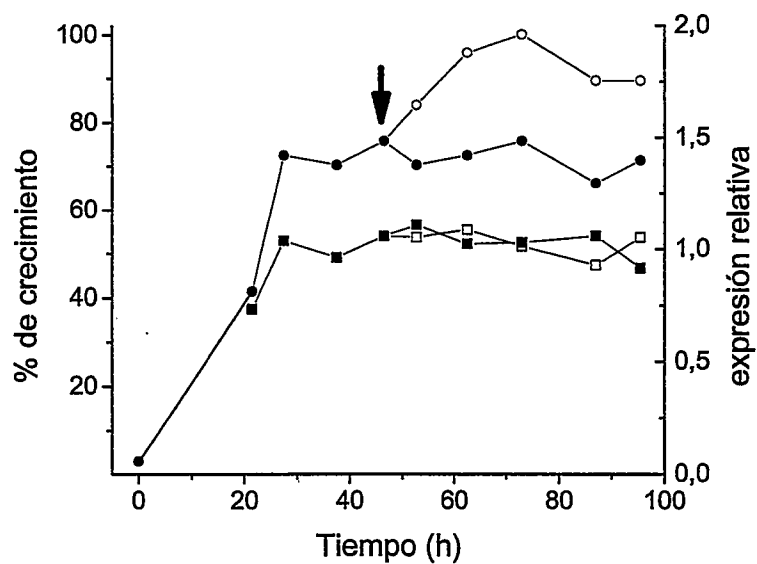
En la Figura 19 se muestra el nivel de expresión del gen *idi* a lo largo del ciclo de crecimiento en YM sin glucosa con y sin adición de etanol. Se observa que el mensajero del gen *idi* alcanza su máximo al principio de la fase estacionaria en YM sin glucosa. Luego de la adición de etanol, el nivel del mismo no aumenta y se mantiene similar al mensajero del cultivo sin etanol. En ambas condiciones el nivel de este gen tiende a disminuir lentamente a medida que avanza la fase estacionaria. Los resultados sugieren que el etanol no tiene efecto en la expresión del gen *idi*.

#### **3.5.1.2 Gen *crtE* (geranilgeranil pirofosfato sintasa).**

En la Figura 20 se muestra el nivel de expresión del gen *crtE* a lo largo del ciclo de crecimiento en YM sin glucosa con y sin etanol. Se observa que el nivel del gen *crtE* aumenta durante la fase exponencial y se mantiene constante durante la fase estacionaria, tanto previa como posteriormente a la adición del etanol como inductor de la carotenogénesis. Los resultados sugieren que, similarmente a lo ocurrido en la expresión del gen *idi*, el etanol no tiene efecto en la expresión del gen *crtE*.



**Figura 19:** Crecimiento y cinética de expresión del gen *idi* en YM sin glucosa con y sin etanol. Los niveles de mensajero se normalizaron con el nivel de mensajero de actina en cada punto. Símbolos: % de crecimiento sin etanol (●) y con etanol (○); nivel de expresión relativa del gen *idi* sin etanol (■) y con etanol (□).



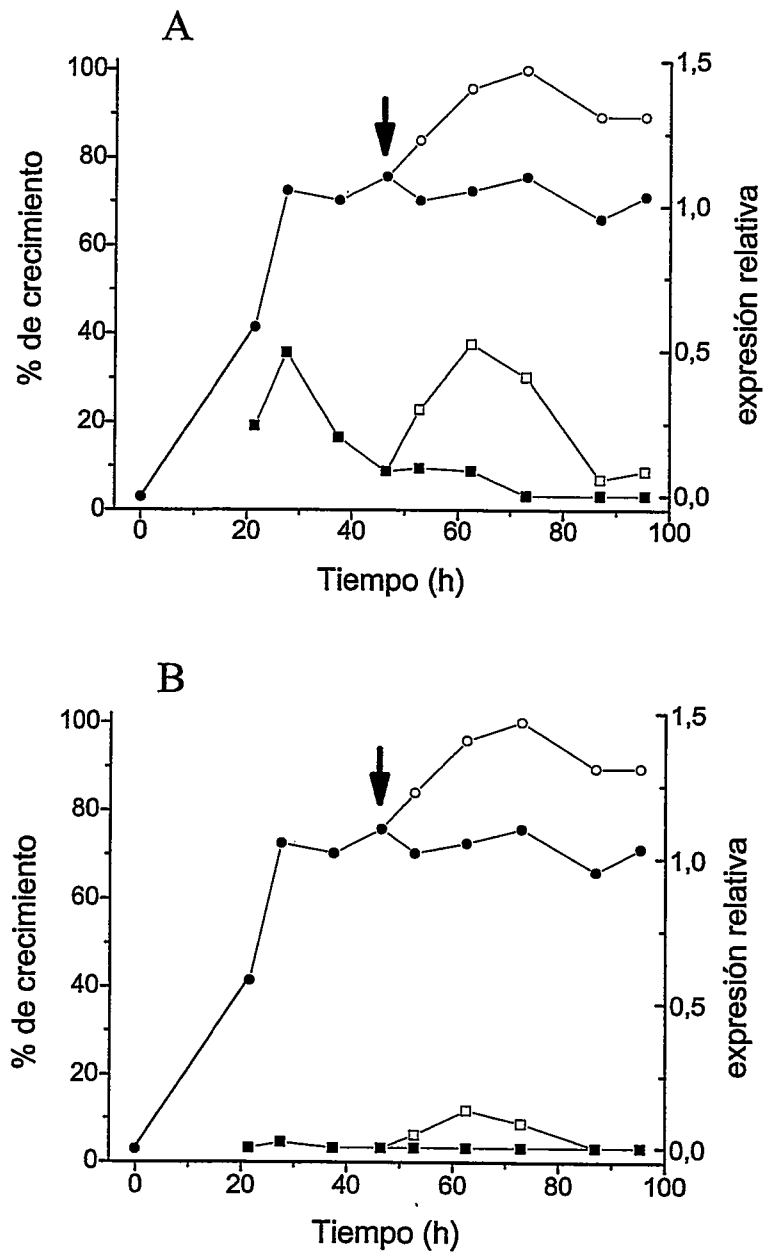
**Figura 20:** Crecimiento y cinética de expresión del gen *crtE* en YM sin glucosa con y sin etanol. Los niveles de mensajero se normalizaron con el nivel de mensajero de actina en cada punto. Símbolos: % de crecimiento sin etanol (●) y con etanol (○); nivel de expresión relativa del gen *crtE* sin etanol (■) y con etanol (□).

### 3.5.1.3 Gen *crtYB* (fitoeno- $\beta$ -caroteno sintasa).

En la Figura 21A se observa que el patrón de expresión del mmRNA *crtYB* (mensajero maduro) en el cultivo sin inducir tiene un máximo de expresión al principio de la fase estacionaria y luego disminuye gradualmente. Este patrón es similar al observado por Lodato y cols. (2007). Sin embargo al agregar etanol se produce un nuevo aumento en la expresión del gen el cual alcanza una expresión relativa más de 6 veces mayor que la del control sin etanol. En la Figura 21 B se observa que el amRNA *crtYB* (mensajero alternativo) también aumenta su expresión luego de la adición de etanol con respecto al control sin etanol, pero en menor grado que el mmRNA *crtYB*. El etanol afecta la expresión del gen *crtYB*.

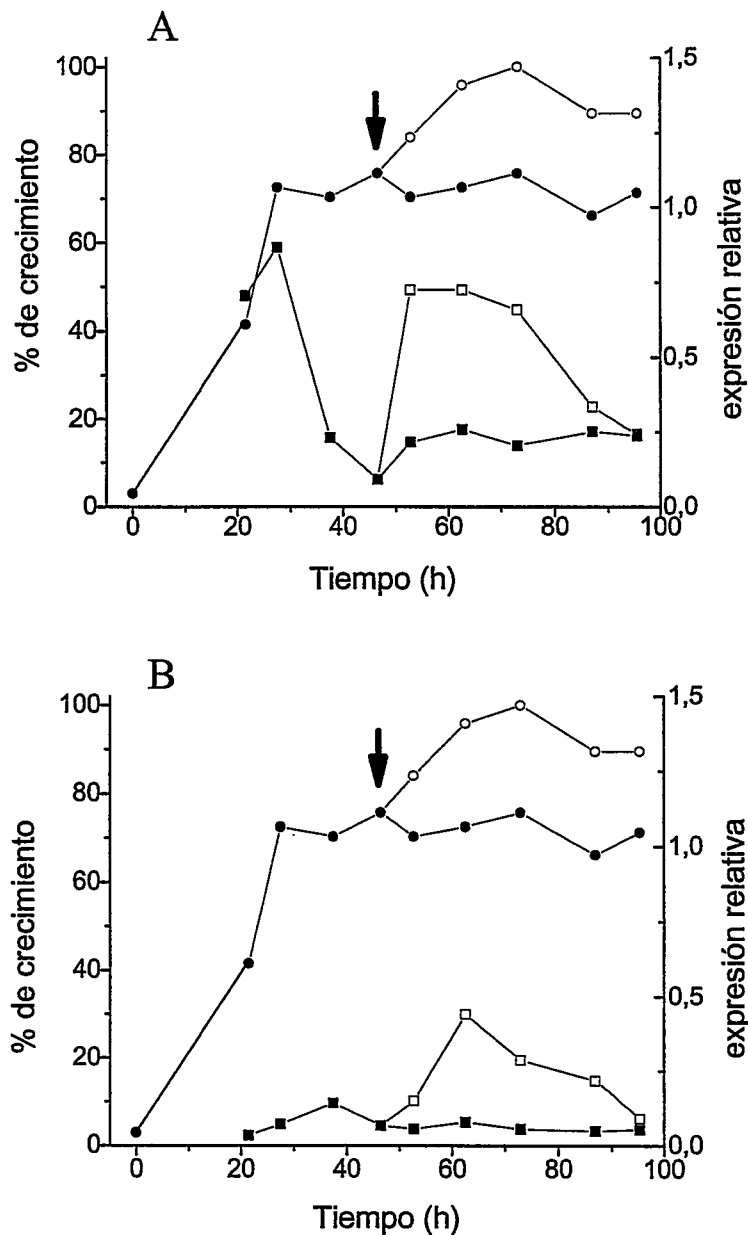
### 3.5.1.4. Gen *crtI* (fitoeno desaturasa).

En la Figura 22 se observa el crecimiento y el nivel de expresión relativa del gen *crtI* en los cultivos con y sin etanol. En la Figura 22A se observa que la expresión del mmRNA *crtI* alcanza su máximo de expresión al final de la fase exponencial y luego disminuye y se mantiene en bajos niveles durante la fase estacionaria en el cultivo no inducido con etanol. Cuando se agrega etanol, el nivel de expresión relativa de este gen aumenta nuevamente llegando a ser más de 3 veces el nivel del cultivo control a las 6 h de agregado el etanol. En la Figura 22B se observa que el amRNA *crtI* comienza a aumentar su nivel de expresión después que el maduro y es similar a lo que ocurre en YM con glucosa (Lodato y cols., 2007). El aumento de expresión del amRNA *crtI* luego de la adición de etanol es menor que el aumento del mmRNA *crtI*. Se observa que el



**Figura 21:** Crecimiento y cinética de expresión del gen *crtYB* maduro (A) y alternativo (B) en YM sin glucosa con y sin etanol. Los niveles de mensajero se normalizaron con el nivel de mensajero de actina en cada punto. Símbolos: % de crecimiento sin etanol (●) y con etanol (○); nivel de expresión relativa del gen *crtYB* sin etanol (■) y con etanol (□).





**Figura 22:** Crecimiento y cinética de expresión del gen *crtI* maduro (A) y alternativo (B) en YM sin glucosa con y sin etanol. Los niveles de mensajero se normalizaron con el nivel de mensajero de actina en cada punto. Símbolos: % de crecimiento sin etanol (●) y con etanol (○); nivel de expresión relativa del gen *crtI* sin etanol (■) y con etanol (□).

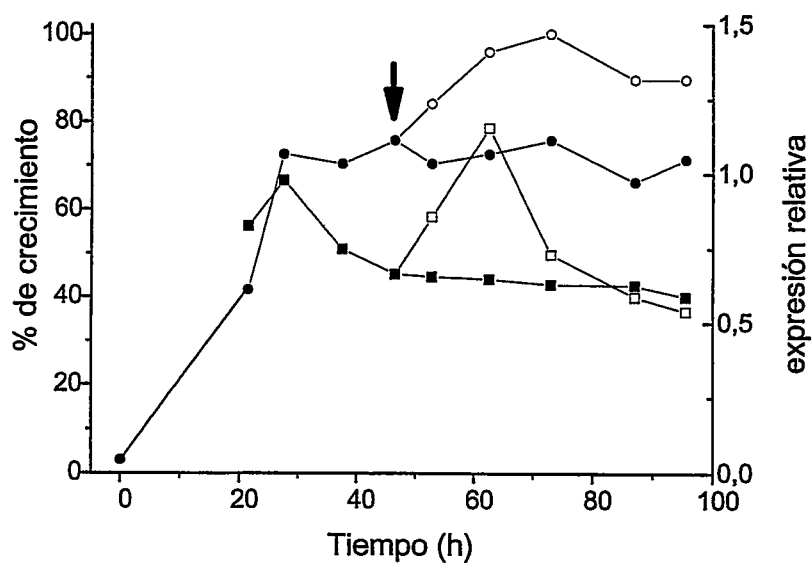
etanol también afecta la expresión del gen *crtI* y que los patrones de expresión de los genes *crtI* y *crtYB* son similares.

#### **3.5.1.5. Gen *crtS* (astaxantina sintasa).**

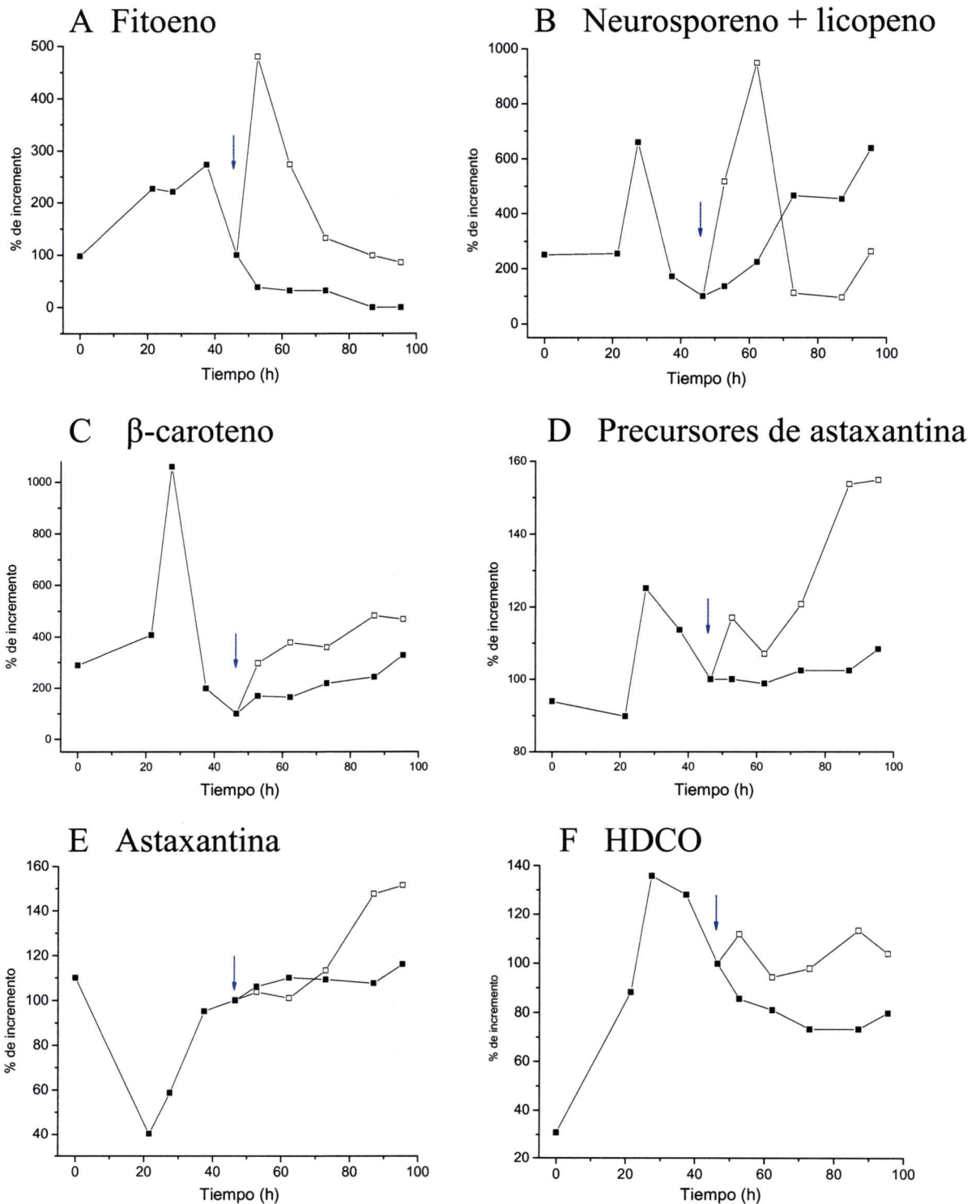
La Figura 23 muestra el crecimiento y la expresión del gen *crtS* en los cultivos con y sin etanol. Se observa que en el cultivo sin etanol la expresión de dicho gen aumenta al final de la fase exponencial y luego disminuye y se mantiene en bajos niveles durante la fase estacionaria. Sin embargo, a las 16 h de agregado el etanol, el nivel de expresión de este gen aumenta 1,8 veces respecto a la expresión del gen en el cultivo sin etanol.

#### **3.5.2. Estudio de la producción de astaxantina y de carotenoides intermediarios.**

En la Figura 24 se muestra la producción de carotenoides durante el crecimiento en YM sin glucosa con y sin etanol. Se observa que en las etapas iniciales del crecimiento, durante las primeras 20 h de la fase exponencial, el nivel de todos los intermediarios de carotenogénesis va en aumento mientras que el de astaxantina y de los precursores de la misma disminuyen. A medida que avanza el crecimiento estos intermediarios disminuyen al tiempo que la astaxantina se mantiene constante. Además, se observa que entre 6 y 16 h luego de agregado el etanol los carotenoides intermediarios como fitoeno,  $\beta$ -caroteno, neurosporeno, y licopeno aumentan sus niveles, al tiempo que la astaxantina disminuye. El aumento de HDCO, de precursores de astaxantina y de astaxantina es posterior al de  $\beta$ -caroteno y sus intermediarios mencionados anteriormente.



**Figura. 23:** Crecimiento y cinética de expresión del gen *crtS* en YM sin glucosa con y sin etanol. Los niveles de mensajero se normalizaron con el nivel de mensajero de actina en cada punto. Símbolos: % de crecimiento sin etanol (●) y con etanol (○); nivel de expresión relativa del gen *crtS* sin etanol (■) y con etanol (□).



**Figura 24:** Astaxantina y carotenoides intermedarios producidos en el cultivo con (□) y sin (■) etanol. El eje Y representa el porcentaje de aumento de los carotenoides con respecto a los carotenoides encontrados al momento de la inducción (46 h). La flecha indica el momento en que fue agregado el etanol.

Luego de la adición de etanol los intermediarios más tempranos de la ruta carotenogénica aumentan en mayor grado que los más tardíos y que la astaxantina. Si consideramos el aumento de carotenoides a las 16 h de agregado el etanol con respecto al cultivo control, se observa que el aumento de fitoeno es de 8,6 veces, el de neurosporeno + licopeno de 4,3 veces, y el de  $\beta$ -caroteno de 2,3 veces. En cambio la astaxantina, los precursores de la misma y el HDCO aumentan notoriamente a las 40 h luego de la adición de etanol y lo hacen en menor grado que los intermediarios más tempranos. Si consideramos el aumento de la expresión de los genes de las enzimas, se observa que la expresión de los genes *crtYB*, *crtI* y *crtS* aumenta 6; 3 y 1,8 veces respecto al control, respectivamente. Por lo tanto, la expresión de los genes más tempranos en la ruta aumenta en mayor grado que los más tardíos y lo mismo ocurre con sus productos.

### **3.6. Análisis bioinformático de la región promotora de los genes de carotenogénesis.**

Con el objetivo de conocer si existen zonas reguladoras en la región promotora de los genes estructurales de carotenogénesis, *idi*, *crtE*, *crtI*, *crtYB* y *crtS*, las secuencias río arriba del sitio de inicio de la traducción fueron analizadas mediante el programa Promo (Messeguer y cols., 2002; Farré y cols., 2003). Entre las secuencias reguladoras que se buscaron están aquellas que unen factores que responden a la presencia de oxígeno (Hap1p) y a fuentes de carbono no fermentables (Hap 2/3/4/5p), así como también secuencias involucradas en la represión por glucosa (Mig1).

En *X. dendrorhous* se ha observado que un aumento en la oxigenación de los cultivos induce una mayor concentración celular de carotenoides (Yamane y cols., 1997). Al respecto, en *S. cerevisiae* la presencia de oxígeno induce a nivel transcripcional genes que codifican enzimas para la respiración mitocondrial y fosforilación oxidativa, y enzimas involucradas en la protección contra estrés oxidativo (Kwast y cols., 1998). A este grupo de genes que se expresan en aerobiosis se les llama genes aerobios, y a los que se expresan en condiciones de hipoxia o anaerobiosis se les llama genes hipóxicos. En *S. cerevisiae*, muchos de los genes aerobios se inducen por el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables y están regulados por dos activadores transcripcionales, el factor Hap1 y el complejo Hap2/3/4/5p, que responden a la presencia de oxígeno y a fuentes de carbono no fermentables en el medio de cultivo, respectivamente (Kwast y cols., 1998).

El factor transcripcional Rox1p reprime la transcripción de casi todos los genes hipóxicos en condiciones de aerobiosis; estos genes se expresan en condiciones de hipoxia. Rox1p tiene una corta vida media y permite una rápida respuesta a la hipoxia. En *S. cerevisiae* se han encontrado secuencias de unión para este factor en genes como citocromo c oxidasa, NADP-citocromo P450 reductasa, HMG Co-A reductasa, etc. El sitio de unión para este factor se encuentra entre -180 y -400 pb respecto al sitio de inicio de la transcripción (Base de datos TRANSFAC).

Las fuentes de carbono fermentables como la glucosa son metabolizadas por la vía glicolítica y el piruvato formado es decarboxilado para formar etanol. El piruvato podría ingresar al ciclo de Krebs, pero eso no sucede ya que las funciones mitocondriales se encuentran reprimidas por la glucosa (represión por glucosa o

catabólica). Se han identificado dos efectores específicos de la represión por glucosa: el represor Mig1 en levaduras y el represor CreA en *Aspergillus*. Ambos represores se unen a cajas GC que se encuentran en los genes reprimidos por glucosa bloqueando de esa manera su transcripción en presencia de glucosa. En *S. cerevisiae* el factor Mig1 se une a genes que reprimen su expresión en presencia de glucosa como fructosa 1,6 bisfosfatasa (Mercado y cols., 1991), galactokinasa, maltasa, piruvato descarboxilasa, invertasa (Lundin y cols., 1994). Los sitios de unión para Mig1 en estos genes se encuentran entre 200 y 700 pb río arriba del codón de inicio de la traducción (ATG).

Con el objetivo de conocer si existen secuencias comunes en las regiones promotoras de los genes de carotenogénesis, *idi*, *crtE*, *crtI*, *crtYB* y *crtS* que sugieran un mecanismo común de regulación, se tomaron 1590 pb río arriba del codón de inicio de la traducción de cada una de ellas y se alinearon con el programa Clustal W. Los resultados del alineamiento indican que no hay similitud significativa entre las regiones promotoras de los genes, ya que el porcentaje de identidad es similar al obtenido a partir del alineamiento de las mismas secuencias aleatorizadas (Tabla 11).

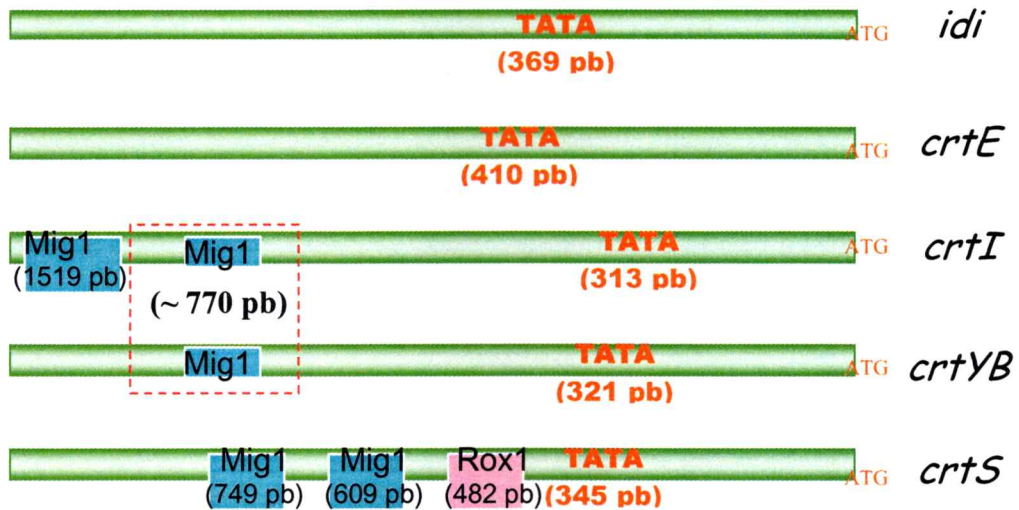
En la Figura 25 se muestran esquemáticamente las secuencias promotoras de los genes de carotenogénesis *idi*, *crtE*, *crtYB*, *crtI* y *crtS* con las secuencias regulatorias encontradas, así como las potenciales cajas TATA. Los resultados de la búsqueda de secuencias reguladoras demostraron que ninguno de los genes estudiados posee secuencias para la unión de los activadores transcripcionales Hap1 y el complejo Hap2/3/4/5. En los genes *idi* y *crtE* no se encontraron secuencias regulatorias de unión al factor Mig1 en una posición adecuada respecto al ATG.

**Tabla 11:** Alineamiento de las secuencias de las regiones promotoras de los genes *idi*, *crtE*, *crtYB*, *crtI*, y *crtS*.

alineamientos	<i>idi</i> y <i>crtE</i>	<i>idi</i> y <i>crtE</i> (aleatorizadas)	<i>crtI</i> , <i>crtYB</i> y <i>crtS</i>	<i>crtI</i> , <i>crtYB</i> y <i>crtS</i> (aleatorizadas)
% identidad	42.7	43.8	17.4	17.8

Para el análisis se tomaron 1590 pb río arriba del codón de inicio de la traducción. Por un lado se alinearon las secuencias de los genes tempranos *idi* y *crtE* y por otro lado las secuencias de los genes exclusivos de la carotenogénesis *crtYB*, *crtI*, y *crtS*. Las secuencias fueron aleatorizadas con el programa disponible en *Biotechnology Computing Facility* desarrollado por *Arizona Research Laboratories*.





**Figura 25:** Esquema de las secuencias reguladoras encontradas con herramientas bioinformáticas en los genes estudiados. Los números de pares de bases entre paréntesis indican la distancia de las secuencias al sitio de inicio de la traducción (ATG, en anaranjado). El recuadro rojo señala la ubicación equivalente del sitio de unión al factor Mig1 (cajas celestes) en los genes *crtI* y *crtYB*. Las potenciales cajas TATA están señaladas en rojo. La secuencia de unión a Rox1p está señalada en rosado.

Se encontró una secuencia de unión al factor Mig1 en cada uno de los genes *crtI* y *crtYB*, la cual se ubica 774 pb río arriba del codón de inicio de la traducción (ATG), coincidiendo en el alineamiento (Figura 25). Además fue encontrada otra secuencia similar 1519 pb río arriba del ATG en el gen *crtI*. En la región promotora del gen *crtS* fueron encontradas 2 secuencias de unión a Mig1 en una ubicación que no coincide con las de los 2 genes mencionados anteriormente. Además, se encontró una secuencia reguladora de unión al factor Rox1 482 pb río arriba del ATG del gen *crtS*. Esta secuencia no se observa en el resto de los genes. Podría ocurrir que los genes *crtI* y *crtYB* estuviesen sujetos a regulación transcripcional por glucosa y además, por splicing alternativo (Lodato y cols., 2003) y el gen *crtS* estuviese sujeto a regulación por glucosa e hipoxia, y adicionalmente a algún tipo de regulación post-transcripcional, específicamente a nivel de la actividad de la enzima, como lo sugieren los resultados experimentales obtenidos en esta Tesis.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Análisis del efecto de distintas fuentes de carbono en la carotenogénesis.

Como se muestra en la Fig. 3A la mayor concentración celular de carotenoides fue alcanzada en succinato y la menor en glucosa. Los valores obtenidos se encuentran dentro del rango de valores registrado previamente para la cepa silvestre (Cifuentes y cols., 1997). En glicerol se observa una mayor producción de carotenoides que en glucosa; sin embargo, el glicerol utilizado como única fuente de carbono permite un crecimiento pobre o nulo. El YM es un medio completo, que contiene extracto de levadura, extracto de malta y peptona y estos compuestos podrían ser un aporte de fuente de carbono. El glicerol podría estar siendo co-utilizado con otros nutrientes. Esto fue observado en experimentos en los cuales los carotenoides seguían aumentando incluso después que se había agotado el glicerol (Kusdiyantini y cols., 1998). En fermentaciones realizadas en glucosa más glicerol se vió que el glicerol era utilizado una vez que se había agotado la glucosa y que aumentaba notoriamente la producción de carotenoides (Jacobson y cols., 2002). Probablemente el glicerol tiene una participación indirecta en el aumento de la producción de carotenoides; por ejemplo podría estimular la producción de triacilglicerol y lípidos que forman membranas las cuales capturan los carotenoides lo cual podría desplazar el equilibrio de la reacción hacia la formación de más producto. Un mecanismo de este tipo es el que ocurre en el alga unicelular *Dunaliella bardawil* (Rabbani y cols., 1998). Por otra parte, la xilosa es utilizada en la vía de las pentosas fosfato y se ha demostrado que esta vía es muy utilizada por *X. dendrohous* (Dong y cols., 2006). La vía de las pentosas fosfato produce poder reductor

para los procesos de biosíntesis a expensas de la pérdida de carbono en forma de CO<sub>2</sub>, lo que favorecería la biosíntesis de carotenoides, la que requiere de una gran cantidad de poder reductor. Así, el crecimiento en xilosa podría estimular la carotenogénesis, lo que se confirma a través de los resultados de esta tesis y que están de acuerdo con aquellos que previamente demuestran que xilosa aumenta la producción de carotenoides (Vázquez y cols., 1997; Parajó y cols., 1997).

La mayor producción de carotenoides durante el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables podría deberse a que su utilización genera radicales libres y que los mismos estimulan la producción de carotenoides (Shroeder y Johnson, 1993; 1995 a). El succinato es metabolizado aeróbicamente por medio del ciclo de Krebs a través de la enzima succinato deshidrogenasa y la misma podría ser la responsable de la producción de aniones superóxido. Guo y Lemire (2003) han demostrado que el dominio de unión a quinona de dicha enzima es en sí una fuente de aniones superóxido. En experimentos *in vitro* para determinar la actividad de la enzima, se demostró que cuanto mayor es la concentración de succinato, mayor es la producción de aniones superóxido. Por otro lado, el succinato es un intermediario central en la síntesis del anillo de porfirina de los grupos hemo que sirven por ejemplo como transportadores de oxígeno en la hemoglobina y de electrones en los citocromos. La enzima astaxantina sintasa es una enzima del tipo citocromo P450 y su síntesis podría estar estimulada en presencia de succinato (Nelson y Cox, 2000).

Con respecto al perfil de carotenoides obtenido se puede decir que en todos los sustratos estudiados el porcentaje de astaxantina es elevado. Probablemente, debido a

que a los 5 días de crecimiento ya se ha completado la carotenogénesis y los intermediarios se han transformado en astaxantina.

#### **4.2. Análisis del crecimiento de la levadura en una fuente de carbono fermentable (glucosa) y una no fermentable (succinato).**

La producción de carotenoides es mayor y comienza antes en el ciclo de crecimiento cuando la levadura crece en MM succinato con respecto a MM glucosa. Estos resultados sugieren que el tipo de metabolismo y la fuente de carbono afectan la síntesis de carotenoides y concuerda con la hipótesis que la carotenogénesis en *X. dendrorhous* estaría reprimida por glucosa. Así, al no haber glucosa en el medio de cultivo no habría represión y la síntesis de carotenoides comenzaría antes. De esta manera, la represión catabólica, efecto mediante el cual la glucosa reprime los genes que codifican las enzimas que catalizan etapas irreversibles de la vía gluconeogénica, del ciclo de Krebs, de la respiración, y enzimas para metabolizar otras fuentes de carbono como maltosa, etanol, glicerol, etc. (Gancedo, 1998) estaría operando en *X. dendrorhous*. Durante las primeras horas de crecimiento en MM glucosa, durante su fermentación, la producción de carotenoides tiende a disminuir. Luego, cuando la concentración de glucosa ha disminuído de 20 a 5,7 g/l (0,57 %) los pigmentos aumentan, sugiriendo que el umbral donde la concentración de glucosa actúa como represor es un orden de magnitud mayor que en *S. cerevisiae*. De hecho, en *S. cerevisiae* la concentración de glucosa mínima que es capaz de producir represión catabólica es 0,05 %. Es probable que exista represión catabólica de los genes de carotenogénesis en *X. dendrorhous* ya que se han encontrado secuencias de unión al regulador Mig1 (factor

transcripcional que se une a los genes reprimidos por glucosa). De ser así, la mínima concentración de glucosa capaz de producir represión catabólica sería más de 10 veces mayor que en *S. cerevisiae*.

El patrón de expresión de los genes de carotenogénesis difiere entre glucosa y succinato. Para realizar esta comparación debe tenerse en cuenta que los tiempos absolutos no son comparables ya que el ciclo de crecimiento en MM succinato es más prolongado que el crecimiento en MM glucosa. Los genes *idi* y *crtE* no son genes exclusivos de la carotenogénesis ya que las enzimas que codifican participan en otros procesos celulares. Se observó que los mismos tienen un comportamiento similar en glucosa y succinato. El gen *crtS*, que codifica la enzima astaxantina sintasa tiene su máximo de expresión al principio de la fase estacionaria y el comportamiento es similar en ambas fuentes de carbono. Sin embargo, la expresión de los mensajeros alternativos de los genes *crtI* y *crtYB* durante la fase estacionaria presenta diferencias en ambos medios de cultivo. Este hecho apoya la hipótesis acerca del potencial rol regulatorio de los mensajeros alternativos de estos genes (Lodato y cols., 2003).

El patrón de síntesis de carotenoides a lo largo del ciclo de crecimiento en MM succinato y MM glucosa muestra que los intermediarios de la ruta carotenogénica se van formando secuencialmente según el orden en que son producidos en la ruta. Este patrón se repite en el cultivo en YM succinato y en YM sin glucosa con adición de etanol.

Como se mencionó en la parte 3.3.3 (página 53), sería esperable que la inducción de la expresión de un gen preceda el aumento del producto de la enzima codificada por dicho gen. Sin embargo, en MM succinato el nivel de astaxantina comienza a aumentar por encima del nivel detectado a tiempo cero antes que se induzca el gen *crtS*

(astaxantina sintasa) aunque su mRNA es claramente detectable desde el inicio del crecimiento. En cambio, en MM glucosa el nivel de astaxantina comienza a aumentar después que se induce la expresión del gen *crtS* y el mismo comportamiento se observa en YM succinato. Por lo tanto, comparando los patrones de síntesis de carotenoides intermediarios con los de expresión de genes, no es posible establecer una correlación temporal entre ambos. Dado que los niveles de mRNA *crtS* se detectan desde el inicio del cultivo, estos podrían traducirse y formar enzima suficiente como para que ocurra carotenogénesis. A su vez, podría estar ocurriendo que parte de los carotenoides detectados al principio del ciclo de crecimiento provienen del inóculo y que perduran un cierto tiempo en el cultivo. De la misma manera, las células podrían traer consigo las enzimas carotenogénicas y el aumento de astaxantina antes de la inducción de la expresión del gen *crtS* podría deberse a un aumento en la actividad de la enzima ya presente en la célula. En este sentido, en *H. pluvialis* existe evidencia de la activación de la carotenogénesis independientemente de la transcripción y de la traducción. Kobayashi y cols. (1993) demostraron que la síntesis de pigmentos en *H. pluvialis* se inducía con  $Fe^{2+}$  (compuesto generador de ROS) aún en presencia de inhibidores de la transcripción y de la traducción. Estos resultados sugieren que la síntesis de enzimas ocurre antes de la inducción con  $Fe^{2+}$  y que el  $Fe^{2+}$  estaría mediando un mecanismo de activación post-traducciona l de la síntesis de carotenoides, que podría ser a nivel de la actividad de la enzima. Adicionalmente, se observó que el efecto inductor del  $Fe^{2+}$  podía ser reemplazado por otros compuestos generadores de ROS. Por otro lado, existe evidencia que la adición de compuestos generadores de ROS no afecta el nivel de los mensajeros de los genes fitoeno sintasa y  $\beta$ -caroteno hidroxilasa en *H. pluvialis* (Steinbrenner y

Linden, 2001). En este sentido, una forma de regulación post-traducciona fue descrita en el alga unicelular *Dunaliella bardawil*, en la cual un aumento en la concentración de  $\beta$ -caroteno estaría regulada por un efecto de inhibición por producto final de la vía, y no por un aumento de los niveles de mensajero ni de proteína de las enzimas fitoeno sintasa y fitoeno desaturasa (Rabbani y cols., 1998).

#### **4.3. Análisis de la expresión de genes de carotenogénesis y producción de carotenoides en YM succinato.**

En YM succinato la carotenogénesis ocurre desde el principio de la fase de crecimiento y no se observa una fase lag seguida por la inducción de la misma como la observada en YM glucosa (Lodato y cols., 2007) probablemente porque no hay glucosa en el medio y por lo tanto no habría represión catabólica. Así, el hecho que la carotenogénesis esté asociada o no al crecimiento dependería de las condiciones fisiológicas en que se encuentre creciendo la levadura.

Comparando el patrón de expresión del gen *crtS* (astaxantina sintasa) y la producción de astaxantina en YM succinato y MM succinato, no es posible establecer una correlación cuantitativa entre los niveles de los mRNAs de las enzimas y los niveles de los carotenoides sintetizados por dichas enzimas. El valor máximo de expresión del gen *crtS* en YM succinato (0,40) es comparable al máximo en MM succinato (0,39). Sin embargo la cantidad de astaxantina producida es notoriamente menor en YM succinato que en MM succinato. La cinética de la expresión de los genes de carotenogénesis durante el crecimiento de la cepa silvestre en YM glucosa mostraron que sus niveles son máximos en el período de inducción de la biosíntesis de carotenoides y disminuyen



posteriormente a partir de la fase exponencial tardía (Lodato y cols., 2007). Sin embargo, a partir de ese momento la concentración celular de carotenoides comienza a aumentar. Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que no existe una relación lineal entre los niveles de mRNA de genes de carotenogénesis y los niveles de carotenoides. En YM succinato se observa acumulación de precursores de astaxantina y de  $\beta$ -caroteno a partir de la fase estacionaria y sugiere una insuficiencia en la actividad astaxantina sintasa. Sin embargo, el mensajero del gen *crtS* alcanza niveles de expresión similares a los alcanzados en MM succinato, en donde la actividad astaxantina sintasa es elevada y no hay acumulación de precursores. Esto sugiere que no habría regulación transcripcional del mRNA que codifica dicha enzima en las condiciones del experimento. La limitación podría estar en algún paso posterior a la transcripción, como puede ser eficiencia de traducción del mensajero o regulación de la actividad de la enzima.

La competencia por el licopeno entre las enzimas fitoeno desaturasa (*crtI*) y licopeno ciclasa (*crtYB*) gobierna el flujo metabólico hacia astaxantina o hacia HDCO. El equilibrio entre desaturasa y ciclasa es muy importante en esta reacción. De acuerdo al perfil de carotenoides monocíclicos observado en YM succinato, lo más probable es que estén ocurriendo dos tipos de reacciones a partir del gama caroteno. Primero, la adición al gama caroteno de grupos ceto e hidroxilo por la enzima astaxantina sintasa para formar OH ceto gama caroteno. Segundo, la desaturación del gama caroteno por la enzima fitoeno desaturasa para formar toruleno (Figura 1). Luego la adición de un grupo ceto al toruleno por la enzima astaxantina sintasa para formar ceto toruleno y finalmente la adición de un grupo hidroxilo por la misma enzima para formar HDCO. Estos

carotenoides monocíclicos, excepto el HDCO, no se detectan en MM succinato. El paso catalizado por la fitoeno desaturasa es de gran relevancia para la diversidad de los carotenoides que se forman (García-Asua y cols., 1998). Se observa una gran acumulación de fitoeno hasta las 47 h. Los carotenoides monocíclicos comienzan a aparecer después que empieza a disminuir el fitoeno, a partir de las 60 h, probablemente porque el mismo comienza a ser consumido. Por lo tanto, es probable que la acumulación de fitoeno observada antes se deba a un defecto en su consumo más que a un exceso de su producción. Dicho defecto podría correlacionarse con el nivel de expresión de mmRNA *crtI* y de amRNA *crtI* cuyos valores máximos de expresión relativa son 0,622 y 0,267, respectivamente. En cambio en MM succinato ambos mensajeros alcanzan niveles similares de expresión, 0,64 y 0,61 respectivamente (Figura 5B). Esto indica que la expresión del amRNA *crtI* es menor en YM que en MM succinato, por lo que la relación mmRNA *crtI* / amRNA *crtI* es mayor en YM. Considerando el posible rol regulatorio del amRNA *crtI* y teniendo en cuenta que es el mensajero maduro del gen *crtI* es el que puede traducirse para formar proteína activa, entonces en YM habría mayor proporción de la enzima fitoeno desaturasa, lo cual marcaría un desbalance favoreciendo las reacciones de desaturación con la consiguiente formación de carotenoides monocíclicos en detrimento de la formación de astaxantina.

Por otra parte, los genes de carotenogénesis parecen tener siempre el mismo patrón de expresión aunque con pequeñas variaciones, y en los mismos tiempos del ciclo de crecimiento. Sin embargo, los carotenoides muestran patrones de producción muy distintos entre sí. Estos resultados globalmente, sugieren la existencia de algún mecanismo de regulación post-transcripcional, como por ejemplo la estabilidad del

mRNA. En este sentido, en *S. cerevisiae* se ha demostrado que la región 5'UTR del mRNA del gen SDH2, el cual codifica para la subunidad de la succinato deshidrogenasa que une hierro, es capaz de conferir inestabilidad a dicho mensajero cuando la levadura crece en glucosa (de la Cruz y cols., 2002). Los mismos autores demostraron que estos cambios en la estabilidad del mRNA están correlacionados con cambios en la eficiencia de traducción de dicho mensajero. Estudios de proteómica realizados en *H. pluvialis* demostraron que las enzimas isopentenil pirofosfato isomerasa (gen *idi*) y licopeno ciclasa (gen *crtYB*) aumentaban sus niveles después de ser inducidas con luz (Kim, J-D y cols., 2006), lo cual demuestra la existencia de regulación traduccional en la ruta carotenogénica. No obstante, la regulación también podría ocurrir a nivel de la actividad de la enzima, por ejemplo, por disponibilidad de oxígeno debido a que las reacciones de oxigenación (adición de grupos ceto e hidroxilo) consumen gran cantidad de oxígeno (Ojima y cols., 2006) y parecen ser las limitantes en YM succinato.

De esta manera podríamos hipotetizar que la ruta de carotenogénesis estaría regulada transcripcionalmente a nivel de los genes *crtI*, *crtYB* y *crtS*, y post-transcripcionalmente a nivel de la astaxantina sintasa (regulación de la actividad de la enzima por estrés oxidativo). Los mecanismos de regulación post-transcripcional son muchos y variados y para aclarar este punto es fundamental cuantificar las enzimas de carotenogénesis, así como también determinar su actividad.

#### **4.4. Análisis del efecto del flujo de aire en la carotenogénesis.**

El hecho que el contenido celular de carotenoides no continúe aumentando cuando el flujo de aire aumenta por encima de 7,4 l/min, podría estar relacionado con el

hecho de que la solubilidad del oxígeno en medio acuoso está limitada (Liu y cols., 2006).

Los resultados obtenidos respecto al bajo porcentaje de astaxantina en YM succinato sugieren una limitación relacionada con la reacción de biosíntesis de astaxantina, como podría ser la falta de oxígeno para completar dicha reacción; la enzima astaxantina sintasa podría estar regulada a nivel de su actividad por oxigenación del medio de cultivo. El aumento del porcentaje de astaxantina observado al aumentar el flujo de aire apoya esta hipótesis. Es probable que debido a este tipo de regulación, la astaxantina sintasa no tenga un mensajero alternativo como lo tienen las enzimas fitoeno desaturasa y fitoeno- $\beta$ -caroteno sintasa. Así, la carotenogénesis podría estar regulada transcripcionalmente por esas dos enzimas, y la astaxantina sintasa podría responder a estímulos relacionados con el estrés oxidativo, por ejemplo, aireación, crecimiento en fuentes de carbono no fermentables como etanol, succinato y glicerol. La idea que las reacciones de oxigenación de la astaxantina sintasa son las limitantes en la vía está apoyada por el hecho que aumentando la dosis génica para dicha enzima, las reacciones de hidroxilación y cetolación también funcionan en mayor grado (Sandmann, 2006; datos no publicados). Cuando una cepa de *X. dendrorhous* portadora de una copia extra del gen *crtYB* fue transformada con el gen de la astaxantina sintasa, el nivel de intermediarios bajó notoriamente y el porcentaje de astaxantina aumentó de 60 a 90 %. Por lo tanto, pueden plantearse 2 hipótesis con respecto al rol del oxígeno en las reacciones de carotenogénesis: 1) el oxígeno es un factor limitante para las reacciones finales de la carotenogénesis debido a su baja solubilidad en medio acuoso (Liu y cols., 2006); 2) el oxígeno podría ser el responsable del estrés oxidativo generado, y como la

astaxantina es el carotenoide que tiene mayor capacidad de captación de ROS, su producción aumentaría la capacidad de detoxificación de la célula. Para comprobar la segunda hipótesis podría cuantificarse el contenido de carbonilos en las proteínas celulares, los cuales se forman como producto del estrés oxidativo por ROS.

#### **4.5. Análisis de la inducción de la carotenogénesis utilizando etanol como agente inductor.**

Resultados anteriores de nuestro laboratorio mostraron que cuando la cepa silvestre es cultivada en medio YM con glucosa se produce etanol como producto de la fermentación de la glucosa y que la carotenogénesis se induce cuando comienza a consumirse dicho etanol. Luego se observó que la levadura era capaz de crecer en medio YM sin glucosa y que la producción de carotenoides en esas condiciones era escasa, lo cual sugirió que el etanol podría estar involucrado en la inducción de la carotenogénesis. En base a estas observaciones, surgió la idea de agregar etanol a un cultivo en YM sin glucosa, durante la fase estacionaria del mismo, momento en el cual el etanol hubiese aparecido en un cultivo en YM con glucosa. Resultaba interesante estudiar la inducción de la carotenogénesis en un sistema como éste, en el cual la misma se encuentra parcialmente reprimida. En efecto, al agregar etanol a un cultivo de las características mencionadas, la producción de carotenoides aumentó en 31 %. En *X. dendrorhous*, se ha demostrado el aumento de la producción de carotenoides por fuentes de carbono no fermentables como etanol (Gu y cols., 1997; Yamane y cols., 1997) y por compuestos liberadores de ROS (Igusa y cols., 2005). Sin embargo, hasta el momento no se ha correlacionado el aumento de la producción de carotenoides con la inducción de los

genes de carotenogénesis por agentes agregados externamente. Con el objetivo de determinar si los genes de carotenogénesis se inducían luego de la adición del etanol, se determinó la expresión de los mismos. Se observó que los genes exclusivos de la carotenogénesis *crtI*, *crtYB* y *crtS* aumentaban su expresión con respecto a la expresión en un cultivo sin etanol, mientras que los genes tempranos de la ruta, *idi* y *crtE*, que además participan en otras rutas metabólicas, no aumentan su expresión luego de la adición de etanol. Si el aumento de la expresión de los genes se debiese a un efecto del crecimiento de la levadura, entonces sería esperable que todos los genes aumentaran su expresión luego de adicionar etanol, pero claramente esto no ocurre. Sin embargo, para separar definitivamente el efecto sobre el crecimiento del efecto puramente inductor del etanol sobre la carotenogénesis, sería necesario impedir el crecimiento con un agente inhibidor de la síntesis proteica como por ejemplo la cicloheximida. El hecho que solamente los genes exclusivos de carotenogénesis induzcan su expresión en presencia de etanol confirma la vinculación de la carotenogénesis con los procesos celulares responsables de la defensa contra el estrés oxidativo. Los antecedentes con respecto a la regulación de los genes de carotenogénesis apuntan hacia un efecto inductor del estrés oxidativo sobre la carotenogénesis. En este sentido se ha visto que las especies reactivas de oxígeno (ROS) regulan la expresión de genes de la carotenogénesis a nivel transcripcional en plantas (Bouvier y cols., 1998) y en *N. crassa* (Igusa y cols., 2005). En *H. pluvialis* se ha demostrado que los genes de carotenogénesis aumentan su expresión en condiciones de elevada iluminación (Steinbrenner y Linden, 2003) y que la misma depende del estado redox de la célula, el cual es detectado por el sistema fotosintético de transporte de electrones. En *Schizosaccharomyces pombe* el gen *pbh1*

participa en la respuesta contra estrés oxidativo y su transcripción aumenta por óxido nítrico y carencia de nitrógeno (Cho y cols., 2006) y además por etanol (Kim S. J. y cols., 2006). En lesiones de la mucosa gástrica de ratas tratadas con etanol, se sabe que el etanol produce ROS, disminuye la actividad de los enzimas que protegen a la célula de las ROS y aumentan la peroxidación de los lípidos. La administración de astaxantina extraída de *X. dendrorhous* a estas ratas captura las ROS, aumenta la actividad de las enzimas protectoras contra ROS y disminuye la peroxidación de lípidos (Kim y cols., 2005). El efecto del etanol sobre la carotenogénesis podría explicarse en parte por los efectos biológicos directos que tiene el etanol sobre las vías metabólicas. Los efectos observados son más bien una consecuencia del metabolismo del etanol, mas que del etanol en sí (Jones, 1989). La utilización oxidativa del etanol produce en primera instancia elevados niveles de acetaldehído y acetato. Además, la reacción consume  $\text{NAD}^+$  y produce NADH. El NADH producido anteriormente va a ir a la cadena respiratoria y al aumentar el flujo de electrones, habrá más electrones para ser transferidos al oxígeno formando así el anión superóxido (Bailey y Cunningham, 2002). El acetato producido va a provocar un aumento de acetyl-CoA. Considerando estas condiciones, podría decirse que las mismas son propicias para el aumento de producción de carotenoides: aumento de ROS y de acetyl-CoA. La producción de astaxantina en estas condiciones no sólo consumiría el exceso de acetyl-CoA, sino que además ayudaría en la detoxificación de las ROS. Adicionalmente, Gu y cols. (1997) demostraron que el etanol aumenta 3 veces la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa (HMGR) en los cultivos cuya producción de carotenoides estaba incrementada. Dicha enzima cataliza la síntesis de mevalonato, el cual es un paso muy temprano en la biosíntesis de carotenoides

(Walker, 1998). Probablemente la utilización de etanol con el consiguiente aumento del flujo de acetil-CoA requiera de un aumento en la expresión de la enzima HMGR.

#### **4.6. Análisis de las secuencias reguladoras encontradas en las regiones promotoras de los genes de carotenogénesis.**

Los resultados obtenidos respecto al comportamiento de los mensajeros de los genes de carotenogénesis y respecto a los carotenoides de la ruta en las distintas condiciones metabólicas, llevaron a pensar que los genes de carotenogénesis podrían estar regulados a nivel transcripcional por reguladores que respondieran a diferentes tipos de metabolismo y/o a la concentración de oxígeno en el medio de cultivo. Estas observaciones motivaron la búsqueda de secuencias regulatorias en las regiones promotoras de los genes de carotenogénesis.

El hecho que ninguno de los genes estudiados posea secuencias para la unión de los activadores transcripcionales Hap1 y el complejo Hap2/3/4/5, sugiere que los genes de carotenogénesis no estarían regulados a nivel transcripcional por oxígeno. Las secuencias de unión al factor Mig1 encontradas en los genes de carotenogénesis sugieren que estos genes podrían estar regulados por glucosa a nivel transcripcional. De hecho son los genes *crtI* y *crtYB* los que muestran diferencias en la expresión en glucosa con respecto a succinato. La secuencia de unión a Mig1 situada 1.519 pb río arriba del ATG del gen *crtI*, no está en la ubicación frecuentemente encontrada para este tipo de secuencias en *S. cerevisiae*. Esto podría significar que quizás la misma no es funcional o quizás se trata de una ubicación atípica de las mismas en el genoma de *X. dendrorhous*. Los resultados experimentales obtenidos muestran que el patrón de expresión del gen



*crtS* es similar en succinato y glucosa, mientras que el nivel de expresión es mayor en glucosa. Sin embargo de acuerdo a este estudio, dicho gen posee 2 secuencias de unión al factor Mig1. Por otro lado Álvarez y cols. (2006) encontraron 4 secuencias de unión al factor CreA río arriba del sitio potencial de inicio de la transcripción del gen *crtS* y dos de ellas coinciden con las dos cajas Mig1 encontradas en este trabajo. Probablemente, el factor Mig1 y la represión catabólica estén actuando en la regulación de este gen pero, coordinadamente con otros mecanismos de regulación, los cuales conjuntamente podrían explicar los resultados obtenidos.

El significado biológico de la presencia de un sitio de unión al represor Rox1 en el gen *crtS* es difícil de explicar. La secuencia de unión a Rox1p encontrada en este trabajo, posee algunas sustituciones con respecto a la secuencia consenso, y las mismas podrían explicar la expresión de este gen en aerobiosis. Existe evidencia de que Rox1p puede unirse a sus secuencias reguladoras con diferente afinidad, lo cual podría explicar los diferentes niveles de transcritos en idénticas condiciones de disponibilidad de oxígeno (Zitomer y cols., 1997). Muchos de los genes hipóxicos que son inducidos en carencia de oxígeno codifican proteínas que funcionan en vías que utilizan oxígeno, como por ejemplo, reductasas y desaturasas involucradas en la biosíntesis de grupos hemo, esteroides y ácidos grasos insaturados. Esto podría deberse a que estas proteínas aumentarían la eficiencia de la utilización de oxígeno en condiciones en que el mismo es escaso, o porque esas enzimas son limitantes en sus respectivas vías (Kwast y cols., 1998).

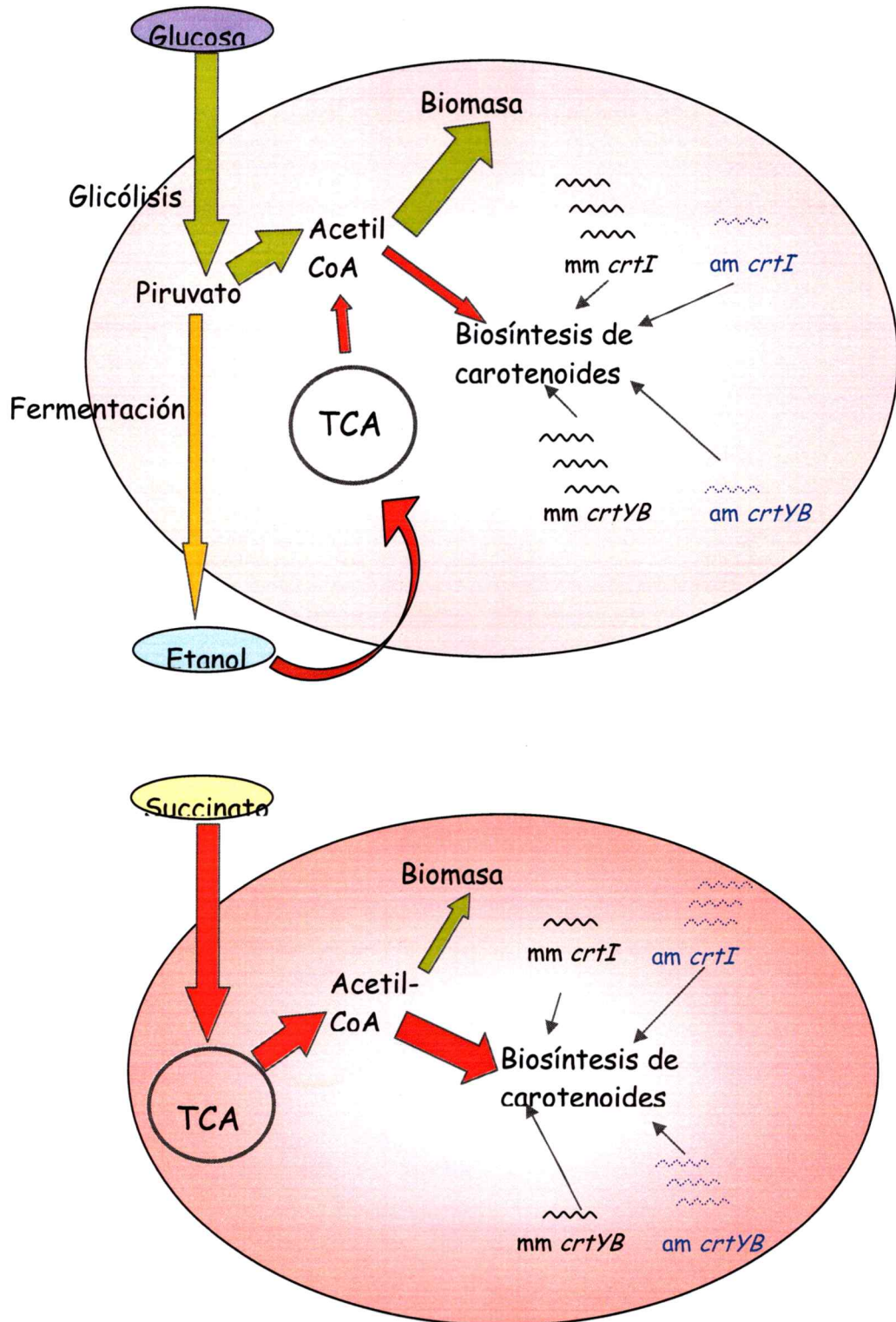
La diferente combinación de secuencias de unión a factores reguladores en las secuencias promotoras de los genes de carotenogénesis, así como su ubicación podrían

dar cuenta de mecanismos de regulación diferentes entre estos genes. Los genes *crtI* y *crtYB* podrían tener un mecanismo de regulación común y diferente al del gen *crtS* en base a las siguientes observaciones:

- a) Los genes *crtI* y *crtYB* poseen secuencias de regulación por glucosa en la misma posición respecto al ATG, mientras que el gen *crtS* las tiene en una ubicación diferente y posee además una secuencia de unión al factor Rox1p.
- b) Los genes *crtI* y *crtYB* poseen mensajeros alternativos, mientras que el gen *crtS* no posee mensajeros alternativos.
- c) El patrón de expresión de los mensajeros alternativos de los genes *crtI* y *crtYB* varía cuando la levadura crece en glucosa y en succinato, en cambio el del gen *crtS* no varía en ambas condiciones.

#### **4.7. Modelo de la síntesis de carotenoides en base a los resultados obtenidos.**

En la Figura 26 se presenta un modelo de los procesos metabólicos relacionados con la carotenogénesis cuando *X. dendrorhous* crece en un medio mínimo con glucosa o con succinato como única fuente de carbono. Así, cuando la levadura crece en glucosa, la primera fase del crecimiento ocurre bajo un metabolismo fermentativo y eso favorece la producción de biomasa en lugar de carotenoides. Luego el etanol, producto de la fermentación, es metabolizado aeróbicamente en el ciclo de Krebs. Sin embargo, en succinato el metabolismo es aerobio durante todo el ciclo de crecimiento y eso favorece la síntesis de carotenoides en lugar de la de biomasa. En la figura se muestra esquemáticamente que en glucosa la expresión de los mensajeros alternativos de los

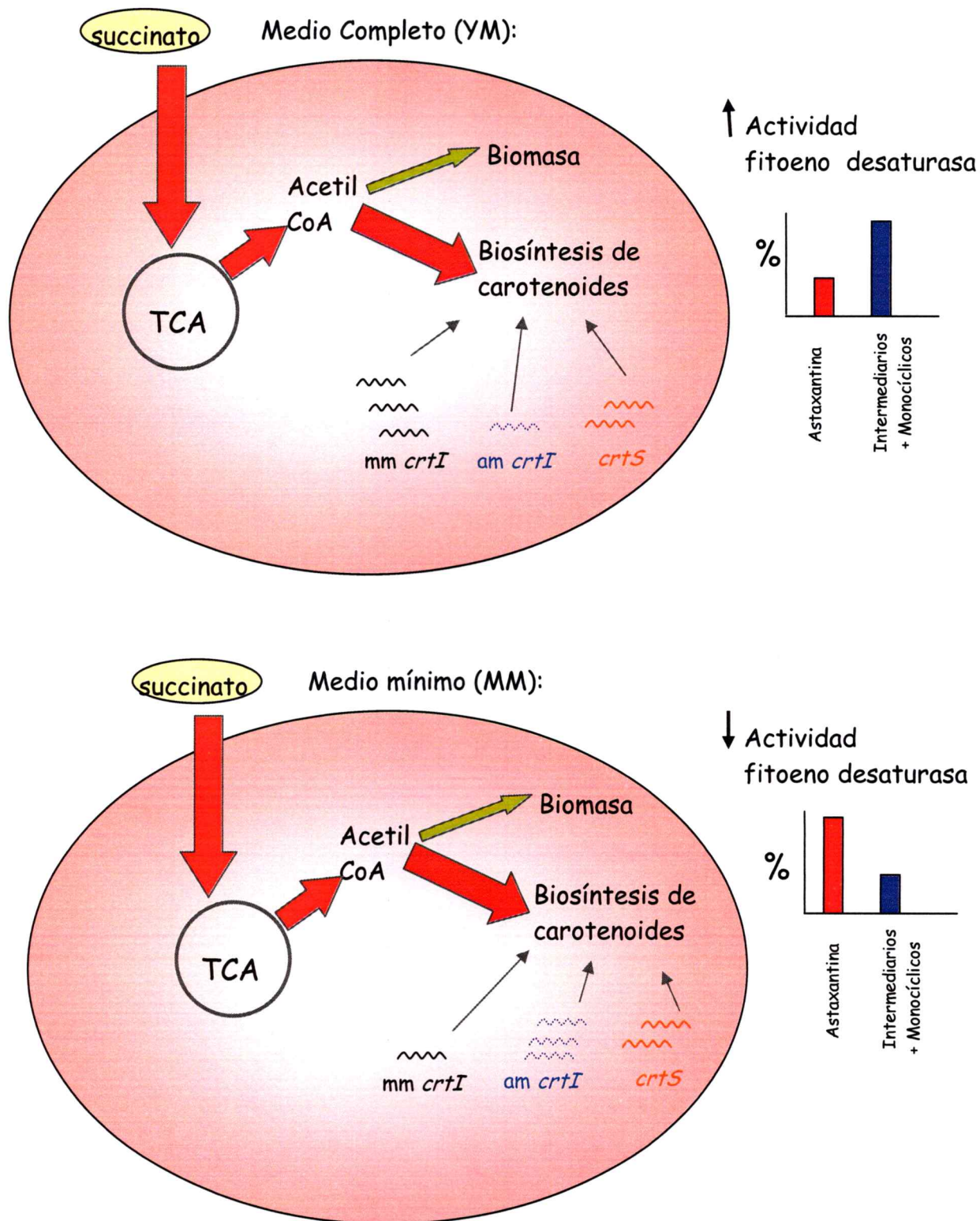


**Figura 26:** Esquema de lo que ocurriría a nivel de la expresión de los genes de carotenogénesis y de los carotenoides en un cultivo en MM glucosa (arriba) y uno en MM succinato (abajo). Los niveles de expresión relativa de los mensajeros de los genes *crtI* y *crtYB* están representados con una línea ondulada y corresponden a los niveles encontrados durante la fase estacionaria de crecimiento. TCA: Ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

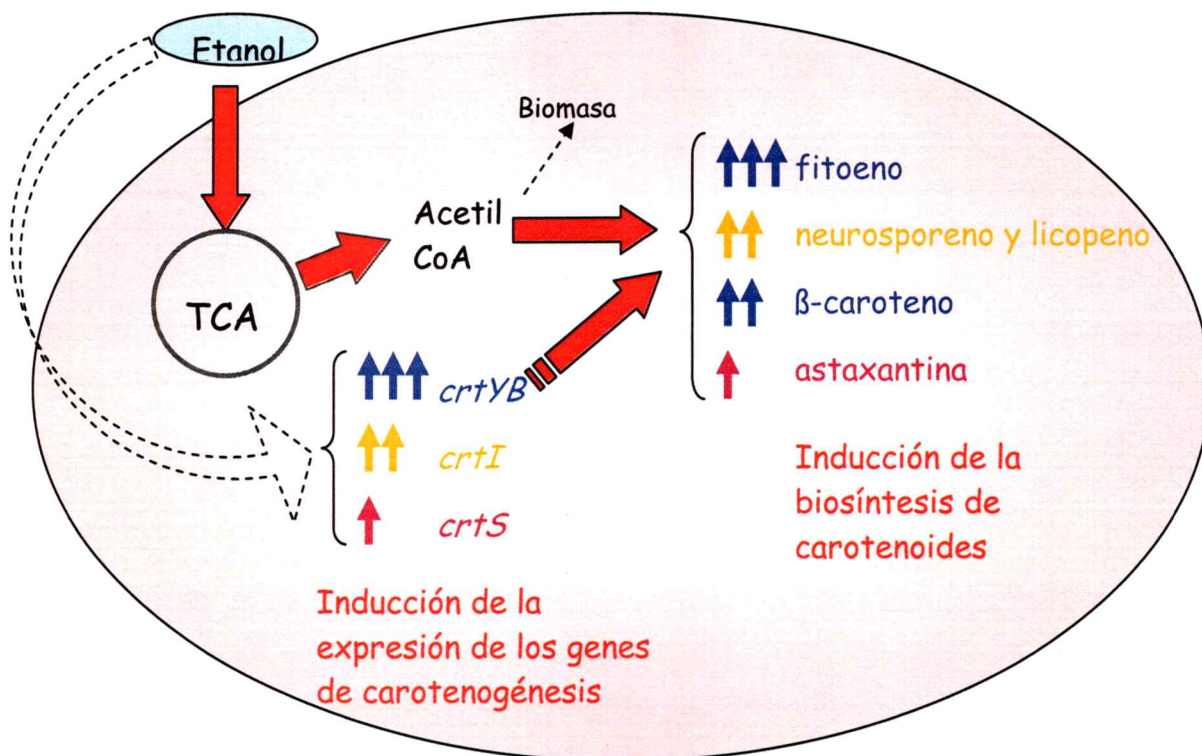
genes *crtI* y *crtYB* durante la fase estacionaria, es menor que la de los respectivos mensajeros maduros, mientras que en succinato ocurre a la inversa.

Por otra parte, en la Figura 27 se propone un modelo de lo que ocurriría en un medio completo versus en medio mínimo, ambos con succinato. La producción de carotenoides totales es similar en ambos medios, sin embargo el porcentaje de astaxantina alcanzado en el medio completo es mucho menor que en medio mínimo. La expresión de los genes de carotenogénesis tiene patrones similares, incluso para el gen de la astaxantina sintasa. Sin embargo se observa una notoria diferencia a nivel de la expresión relativa del mensajero alternativo del gen *crtI*. El nivel del mismo en medio completo es menor que en medio mínimo, lo cual podría explicar el mayor flujo de la vía carotenogénica hacia los carotenoides monocíclicos, en lugar de hacia astaxantina en medio completo.

En la Figura 28 se esquematiza el aumento de la expresión de los genes de carotenogénesis al adicionar etanol, así como también el aumento de los carotenoides. Se puede observar que los genes así como los carotenoides más tempranos de la vía aumentan en mayor nivel que los genes y carotenoides más tardíos de la vía.



**Figura 27:** Esquema de lo que ocurriría a nivel de la expresión de los genes de carotenogénesis y de los carotenoides en un cultivo en YM succinato (arriba) y uno en MM succinato (abajo). Los niveles de expresión relativa de los mensajeros de los genes *crtI* y *crtYB* están representados con una línea ondulada. TCA: Ciclo de los ácidos tricarbóxicos.



**Figura 28:** Esquema de lo que ocurriría a nivel de la expresión de los genes de carotenogénesis y de los carotenoides al agregar etanol 0,2 % a un cultivo realizado en YM que se encuentra en fase estacionaria.

## 5. CONCLUSIONES

- El tipo de metabolismo y la fuente de carbono afectan la cantidad de carotenoides y el momento en que se sintetizan en el ciclo de crecimiento.
- La asociación de la carotenogénesis con el crecimiento depende de las condiciones de cultivo
- El patrón de expresión de genes de la carotenogénesis *crtYB* y *crtI* es diferente en estas dos condiciones estudiadas, sin embargo el gen *crtS* presenta patrones de expresión similares.
- No es posible establecer una correlación cuantitativa entre el nivel de expresión de los genes de las enzimas carotenogénicas y el nivel de los carotenoides producto de su actividad.
- La inducción de la expresión de los genes de carotenogénesis no siempre precede el aumento de los carotenoides que son producto de la actividad de la enzima codificada por dichos genes.
- La producción de carotenoides a lo largo del ciclo de crecimiento muestra un patrón común de aparición de los distintos intermediarios, tal que los más tempranos aumentan sus niveles antes que los más tardíos. Este patrón es independiente de las condiciones de crecimiento y del medio de cultivo que se emplee.
- El aumento del flujo de aire en cultivos de *X. dendrorhous* aumenta la actividad astaxantina sintasa.

- La adición de etanol a cultivos de *X. dendrorhous* estimula la síntesis de carotenoides y aumenta selectivamente la expresión de los genes exclusivos de la carotenogénesis, pero no la de los genes tempranos de la vía que participan en otras vías metabólicas.
- El análisis bioinformático de las regiones promotoras de los genes sugiere que los genes exclusivos de la carotenogénesis podrían estar regulados por glucosa. En particular, el gen *crtS* podría además estar regulado por oxígeno.
- Los resultados de este trabajo en su conjunto sugieren la existencia de mecanismos de regulación post-transcripcionales en la carotenogénesis de *X. dendrorhous*.
- Estos resultados demuestran que modificando la composición del medio de cultivo y las condiciones de crecimiento, no solo es posible aumentar la producción de carotenoides, sino además, la proporción de astaxantina. Esta información es aplicable desde el punto de vista biotecnológico ya que el aumento del flujo de aire y la adición de etanol son agentes estimulantes de la producción de carotenoides y además son de bajo costo.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Alcaíno, J.** 2002. Organización estructural del gen de la fitoeno sintasa en el genoma de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex *Phaffia rhodozyma*). Tesis para optar al grado de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile.
- Alvarez, V.; Rodríguez-Sáiz, M.; de la Fuente J. L.; Gudiña E. J.; Godio R. P.; Martín, J. F. y Barredo, J. L.** 2006. The *crtS* gene of *Xanthophyllomyces dendrorhous* encodes a novel cytochrome-P450 hydroxylase involved in the conversion of  $\beta$ -carotene into astaxanthin and other xanthophylls. *Fungal Genet. Biol.* 43: 261-272.
- 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.
- An, G-H. y Johnson, E. A.** 1990. Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 57: 191-203.
- An, G-H.** 1997. Photosensitization of the yeast *Phaffia rhodozyma* at a low temperature for screening carotenoid hyperproducing mutants. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 66: 263-268.
- An, G-H.; Cho, M. y Johnson, E.** 1999. Monocyclic carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*). *J. Biosci. Bioeng.* 88: 189-193.
- Andrewes, A. ; Phaff, J. y Starr, M.** 1976. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*. A red-pigmented fermenting yeast. *Phytochemistry* 15: 1003-1007.
- Armstrong, G. A.** 1994. Eubacteria show their true colors: Genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *J. Bacteriol.* 176: 4795-4802.
- Armstrong, G. A.** 1997. Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: A colorful tale. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 629-659.

- Arrach, N.; Fernández-Martín, R.; Cerdá-Olmedo, E. y Avalos, J.** 2001. A single gene for lycopene cyclase, phytoene synthase, and regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 1687-1692.
- Arrach, N.; Schmidhauser, T. J. y Avalos, J.** 2002. Mutants of the carotene cyclase domain of *al-2* from *Neurospora crassa*. Mol. Genet. Genomics 266: 914-921.
- Bailey, S. M. y Cunningham, C. C.** 2001. Contribution of mitochondria to oxidative stress associated with alcoholic liver disease. Free Radic. Biol. Med. 32: 11-16.
- Bon, J. A.; Leathers, T. D. y Jayaswal R. K.** 1997. Isolation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. Biotechnol. Lett. 19: 109-112.
- Bouvier, F.; Backhaus, A. y Camara, B.** 1998. Induction and control of chromoplast – specific carotenoid genes by oxidative stress. J. Biol. Chem. 273: 30651–30659.
- Britton, G.** 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. FASEB J. 9: 1351-1358.
- 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, Berlin.
- Cho, N. C.; Kang, H. J.; Lim, H. I.; Kim, B. C.; Park, E. H. y Lim, C. J.** 2006. Stress-dependent regulation of *Pbhl*, a BIR domain-containing protein in the fission yeast. Can. J. Microbiol. 52: 1261-1265.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162: 156-159.
- Cifuentes, V.; Hermosilla, G.; Martínez, C.; León, R.; Pincheira, G. y Jiménez, A.** 1997. Genetics and electrophoretic karyotyping of wild-type and astaxanthin mutant strains of *Phaffia rhodozyma*. Antonie van Leeuwenhoek 72: 111-117.
- Cunningham, F. X. y Gantt, E.** 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49: 557-583.

- De la Cruz, B. J.; Prieto, S. y Scheffler, I. E.** 2002. The role of the 5' untranslated region (UTR) in glucose-dependent mRNA decay. *Yeast* 19: 887-902.
- 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: 1283-1292.
- Farré, D.; Roset, R.; Huerta, M.; Adsuara, J.; Roselló, L.; Albà, M. y Messeguer, X.** 2003. Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucl. Acids Res.* 31: 3651-3653.
- 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.
- Flores, C.; Rodríguez, C.; Petit, T. y Gancedo, C.** 2000. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 507-529.
- Gancedo, J.** 1998. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 334-361.
- García-Asua, G.; Lang, H.; Cogdell, J. y Hunter, N.** 1998. Carotenoid diversity: a modular role for the phytoene desaturase step. *Trends Plant Sci.* 3: 445-449.
- Golubev, W. I.** 1995. Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Yeast* 11: 101-110.
- 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.

- Gruszecki, W. I.** 1999. Carotenoids in membranes. *En* H. A. Frank, A. J. Young, G. Britton y R. G. Cogdell (eds.). The photochemistry of carotenoids. pp 363-379. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- 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.
- Guo, J. y Lemire, B. D.** 2003. The ubiquinone-binding site of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate-ubiquinone oxidoreductase is a source of superoxide. *J. Biol. Chem.* 278: 47629-47635.
- Higuera-Ciapara, I.; Valenzuela, F. y Goycoolea, F.** 2006. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46: 185-196.
- 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.
- Hu, Z-C.; Zheng, Y-G.; Wang, Z. y Shen, Y-C.** 2005. Effect of sugar-feeding strategies on astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 771-775.
- Hu, Z-C.; Zheng, Y-G.; Wang, Z. y Shen, Y-C.** 2006. pH Control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enzyme Microb. Technol.* 39: 586-590.
- Igusa, H.; Yoshida, Y. y Hasnuma, K.** 2005. Oxygen and hydrogen peroxide enhance light – induced carotenoid synthesis in *Neurospora crassa*. *FEBS Lett.* 579: 4012-4016.
- Jacobson, G.; Jolly, S.; Sedmak, J.; Skatrud, T. y Wasileski, J.** 2002. Astaxanthin over-producing strains of *Phaffia rhodozyma*, methods for their cultivation, and their use in animal feeds. Patente N° 6413736. Decatur. Estados Unidos.
- Johnson, E. A. y Lewis, M.** 1979. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* 115: 173-183.
- Johnson, E. A. y Schroeder, W.** 1995. Astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Stud. Mycol.* 38: 81-90.
- Johnson, E. A.** 2003. *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. *Int. Microbiol.* 6: 169-174.

- Jones, R.P.** 1989. Biological principles for the effects of ethanol. *Enzyme Microb. Technol.* 11: 130-153.
- Kajiwara, P.; Fraser, P.; Kondo, K. y Misawa, N.** 1997. Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 324: 421-426.
- Kim, J. H.; Choi, S. K.; Choi, S. Y.; Kim, H. K. y Chang, H. I.** 2005. Suppressive effect of astaxanthin isolated from the *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant on ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 1300-1305.
- Kim, S. J.; Cho, N. C.; Ryu, I. W.; Kim, K.; Park, E. H. y Lim, C. J.** 2006. Carbon source-dependent regulation of the *Schizosaccharomyces pombe pbh1* gene. *J. Microbiol.* 44: 689-693.
- Kim, J-D.; Lee, W-S.; Kim, B. y Lee, C-G.** 2006. Proteomic analysis of protein expression patterns associated with astaxanthin accumulation by green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under high light stress. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16: 1222-1228.
- Kobayashi, M.; Kakizono, T. y Nagai, S.** 1993. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 867-873.
- Kruckeberg, A. y Dickinson, R.** 2004. Carbon Metabolism. En: Dickinson, R. y Schweizer, M. (eds). *The metabolism and molecular physiology of *Sacharomyces cerevisiae**. pp. 42-103. Boca Raton, Londres, Nueva York, Washington D.C.
- Kusdiyantini, E.; Gaudin, P.; Goma, G. y Blanc, P.** 1998. Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. *Biotechnol. Lett.* 20: 929-934.
- Kwast, K. E.; Burke, P. y Poyton, R. O.** 1998. Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen-responsive genes in yeast. *J. Exp. Biol.* 201: 1177-1195.

- León, R.** 2000. Caracterización de determinantes genéticos de la síntesis de astaxantina en *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex *Phaffia rhodozyma*). Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias c/m en Biología. Universidad de Chile.
- Lewis, M. J.; Ragot, N.; Berlant, M. C. y Miranda, M.** 1990. Selection of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma* with  $\beta$ -ionone. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2944-2945.
- 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.; Ruffini, A.; van Broock, A.; Alves, L. y Sampaio, J.** 2007. Biogeography, host-specificity and molecular phylogeny of the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma* and its sexual state *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1120-1125.
- Linden, H.** 1999. Carotenoid hydroxylase from *Haematococcus pluvialis*: cDNA sequence, regulation and functional complementation. *Biochim. Biophys. Acta* 1446: 203-212.
- Liu, Y. S.; Wu, J. Y. y Ho, K. P.** 2006. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. *Biochem. Eng. J.* 27: 331-335.
- Liu, Y. y Wu, J.** 2006. Hydrogen peroxide-induced astaxanthin biosynthesis and catalase activity in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73: 663-668.
- Lodato, P.; Alcaíno, J.; Barahona, S.; Retamales, P. y Cifuentes, V.** 2003. Alternative splicing of transcripts from *crtI* and *crtYB* genes of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4676-4682.
- 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.

- Lundin, M.; Nehlin, J. y Ronne, H.** 1994. Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the GC box-binding zinc finger protein MIG1. *Mol. Cell. Biol.* 14: 1979-1985.
- Mercado J.; Vincent, O. y Gancedo J.** 1991. Regions in the promoter of the yeast FBP1 gene implicated in catabolite repression may bind the product of the regulatory gene MIG1. *FEBS Lett.* 291: 97-100.
- Messeguer, X.; Escudero, R.; Farré, D.; Nuñez, O.; Martínez, J. y Albà, M.** 2002. PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics* 18: 333-334.
- Nelson, D.L. y Cox, M.** 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3rd ed. New York.
- Ngiam, C.; Jeenes, D. J.; Punt, P. J.; Van Den Hondel, C. A. y Archer, D. B.** 2000. Characterization of a foldase, protein disulfide isomerase A, in the protein secretory pathway of *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 775-782.
- 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. *Mol. Gen. Genomics* 275: 148-158.
- Parajó, J. C.; Santos, V. y Vázquez, M.** 1997. Co-production of carotenoids and xilitol by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Biotechnol. Lett.* 19: 139-141.
- Rabbani, S.; Beyer, P.; Lintig, J. V.; Hugueney, P. y Kleinig, H.** 1998. Induced  $\beta$ -carotene synthesis driven by triacylglycerol deposition in the unicellular alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* 116: 1239-1248.
- Retamales, P.; León, R.; Martínez, C.; Hermosilla, G.; Pincheira, G. y Cifuentes, V.** 1998. Complementation analysis with new genetics markers in *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 229-236.
- Rock, C. D. y Zeevaart, J. D.** 1991. The *aba* mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 7496-7499.

- Sambrook, J. y Russell, D. W.** 2001. Molecular cloning. A laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- 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 a. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. J. Biol. Chem. 270: 18374-18379.
- Schroeder, W. A. y Johnson, E. A.** 1995 b. Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. J. Ind. Microbiol. 14: 502-517.
- Sieiro, C.; Poza, M.; de Miguel, T. y Villa, T. G.** 2003. Genetic basis of microbial carotenogenesis. Int. Microbiol. 6: 11-16.
- Steinbrenner, J. y Linden, H.** 2001. Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. Plant Physiol. 125: 810-817.
- Steinbrenner, J. y Linden, H.** 2003. Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: regulation by photosynthetic redox control. Plant Mol. Biol. 52: 343-356.
- Sun, Z.; Cunningham, F. y Gantt, E.** 1998. Differential expression of two isopentenyl pyrophosphate isomerases and enhanced carotenoid accumulation in a unicellular chlorophyte. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 11482-11488.
- Valko, M.; Rhodes, C.; Moncol, J.; Izakovic, M. y Mazur, M.** 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induced cancer. Chem. Biol. Interact. 160: 1-40.
- Vázquez, M.; Santos, V. y Parajó, J. C.** 1997. Effect of the carbon source on the carotenoid profiles of *Phaffia rhodozyma* strains. J. Ind. Microbiol. 19: 263-268.



- Velayos, A.; Eslava, A. P. y Iturriaga, E. A. 2000. A bifunctional enzyme with lycopene cyclase and phytoene synthase activities is encoded by the *carRP* gene of *Mucor circinelloides*. Eur. J. Biochem. 267: 5509-5519.
- Verdoes, J. C.; Krubasik, P.; Sandmann, G. y van Ooyen, A. J. J. 1999 a. Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Mol. Gen. Genet. 262: 453-461.
- Verdoes, J. C.; Misawa, N. y van Ooyen, A. J. J. 1999 b. Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Biotechnol. Bioeng. 63: 750-755.
- 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.
- Visser, H.; van Ooyen, A. y Verdoes, J. 2003. Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. FEMS Yeast Res. 4: 221-231.
- Walker, M. 1998. Yeast metabolism. En: Yeast physiology and biotechnology. pp. 203-264. John Wiley & Sons. Chichester, Nueva York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto.
- Wery, J.; Dalderup, M. J.; Ter Linde, J.; Boekhout, T. y Van Ooyen, A. J. 1996. Structural and phylogenetic analysis of the actin gene from the yeast *Phaffia rhodozyma*. Yeast 12: 641-651.
- 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.
- Young, A. J. y Lowe, G. M. 2001. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. Arch. Biochem. Biophys. 385: 20-27.
- Zitomer, R. S.; Limbach, M. P.; Rodriguez-Torres, A. M.; Balasubramanian, B.; Deckert, J. y Snow, P. M. 1997. Approaches to the study of *Rox1* repression

of the hypoxic genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Methods 11:279-288.