



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**Caracterización metabólica y genética de la carotenogénesis en cepas  
mutantes de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*)**

Tesis que presenta

**Lina María Castelblanco Matiz**

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Directora de la tesis:

**Dra. María Teresa Ponce Noyola**

México, D.F.

Octubre de 2015

“El desarrollo de esta tesis de Doctorado tuvo el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca número 219320.”

## AGRADECIMIENTOS

A la **Doctora María Teresa Ponce Noyola** directora de esta tesis por su incondicional apoyo e invaluable ayuda y dirección en el desarrollo del presente trabajo.

A los miembros del Comité Tutorial **Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia, Dr. Carlos Cerda García Rojas, Dr. César Flores Ortíz y Dr. Fernando José Esparza García** por sus valiosas y atinadas observaciones a lo largo del proyecto.

A la **M en C. Odilia Pérez Ávalos** por el entrenamiento y apoyo en el montaje de técnicas de laboratorio.

**Al Dr. Víctor Cifuentes Guzmán** y a su **equipo de trabajo** del Centro de Biotecnología, Departamento de Ciencias Ecológicas- Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile por permitir y facilitar la estancia de investigación en su laboratorio. **Al M. en C. Salvador Barahona Crisóstomo** por el entrenamiento y ayuda en el desarrollo de técnicas de biología molecular y trabajo de laboratorio.

A mis amigos y a mis compañeros de laboratorio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la Beca 219320 otorgada para estudios de doctorado.

## ÍNDICE

ÍNDICE .....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VII
ÍNDICE DE TABLAS .....	IX
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	3
1.1. Carotenoides.....	3
1.1.1. Astaxantina.....	5
1.2. <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> .....	7
1.2.1. Biosíntesis de carotenoides en <i>X. dendrorhous</i> .....	9
1.2.2. Ingeniería metabólica y regulación de la ruta de biosíntesis de pigmentos de <i>X. dendrorhous</i> .....	11
2. JUSTIFICACIÓN .....	13
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	14
4. OBJETIVOS .....	15
4.1. Objetivo general.....	15
4.2. Objetivos particulares.....	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	17
5.1. ETAPA I: Cinéticas en reactor .....	17
5.1.1. Microorganismo.....	17
5.1.2. Cinéticas de crecimiento .....	18
5.1.3. Técnicas analíticas .....	19
5.1.3.1. Determinación del crecimiento .....	19
5.1.3.2. Determinación de azúcares totales .....	20
5.1.3.3. Determinación de carotenoides totales .....	20
5.2. ETAPA II: Perfil de carotenoides.....	21
5.2.1. Extracción de carotenoides .....	21
5.2.2. Identificación de carotenoides (TLC).....	21
5.2.3. Identificación y cuantificación de carotenoides (HPLC).....	22

5.3.	ETAPA III: Obtención del extracto crudo.....	22
5.3.1.	Enzimas líticas.....	23
5.3.2.	Sonicador .....	23
5.4.	ETAPA IV: Perfil de proteínas.....	24
5.4.1.	Electroforesis en gel de una dimensión.....	24
5.4.1.1.	Purificación parcial por centrifugación diferencial .....	24
5.4.2.	Electroforesis en gel de dos dimensiones .....	25
5.4.3.	Determinación de actividades enzimáticas.....	26
5.4.3.1.	Actividad enzimática crtYB licopeno ciclasa.....	26
5.4.3.2.	Actividad enzimática crtI fitoeno desaturasa .....	26
5.5.	ETAPA V: Análisis de la expresión diferencial de los genes <i>idi</i> , <i>crtE</i> , <i>crtYB</i> , <i>crtI</i> , <i>crtS</i> y <i>crtR</i> relacionados con la carotenogénesis durante cinéticas de crecimiento de las cepas silvestre y mutante XR de <i>X. dendrorhous</i> .....	27
5.6.	ETAPA VI: Amplificación y secuenciación de los genes <i>idi</i> , <i>crtE</i> , <i>crtYB</i> , <i>crtI</i> , <i>crtS</i> y <i>crtR</i> e identificación de sus mutaciones entre la cepa silvestre y mutante XR de <i>X. dendrorhous</i> .....	28
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
6.1.	ETAPA I: Cinéticas en reactor .....	29
6.1.1.	Producción de biomasa y consumo de sustrato .....	29
6.1.2.	Producción de carotenoides .....	32
6.1.2.1.	Cuantificación de carotenoides totales.....	32
6.2.	ETAPA II: Perfil de carotenoides.....	37
6.2.1.	Identificación de carotenoides por TLC .....	37
6.2.2.	Identificación y cuantificación de carotenoides por HPLC .....	39
6.3.	ETAPA III: Obtención del extracto crudo.....	46
6.3.1.	Enzimas líticas de <i>T. harzianum</i> .....	47
6.3.2.	Sonicador .....	48
6.4.	ETAPA IV: Perfil de proteínas.....	48
6.4.1.	Electroforesis en una dimensión.....	48
6.4.1.1.	Enzimas líticas de <i>T. harzianum</i> .....	48
6.4.1.2.	Sonicador.....	50

6.4.1.3. Proteínas obtenidas por centrifugación diferencial.....	51
6.4.2. Electroforesis en dos dimensiones .....	53
6.5. ETAPA V: Análisis de la expresión diferencial de los genes <i>idi</i> , <i>crtE</i> , <i>crtYB</i> , <i>crtl</i> , <i>crtS</i> y <i>crtR</i> relacionados con la carotenogénesis durante cinéticas de crecimiento de las cepas silvestre y mutante XR de <i>X. dendrorhous</i> .....	57
6.6. ETAPA VI: Amplificación y secuenciación de los genes <i>idi</i> , <i>crtE</i> , <i>crtYB</i> , <i>crtl</i> , <i>crtS</i> y <i>crtR</i> e identificación de sus mutaciones entre la cepa silvestre y mutante XR de <i>X. dendrorhous</i> .....	57
7. CONCLUSIONES .....	58
8. PERSPECTIVAS.....	60
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
10. ANEXO 1.....	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estereoisómeros de la astaxantina (Higuera <i>et al.</i> , 2006).....	7
Figura 2. Ruta biosintética de la astaxantina en <i>X. dendrorhous</i> (Tomado de Contreras <i>et al.</i> , 2013). .....	10
Figura 3. Estrategia Experimental.....	17
Figura 4. Cinéticas de crecimiento y de consumo de sustrato de las cepas Cs, XR y XP de <i>X. dendrorhous</i> .....	30
Figura 5. Producción de carotenoides totales en las cepas Cs, XR y XP de <i>X. dendrorhous</i> . .....	33
Figura 6. Perfil de carotenoides en TLC de las cepas Cs, XR, XP, XY y XW de <i>X. dendrorhous</i> , a partir de extracciones de biomasa de 87 h de cultivo y observado bajo luz visible y UV. ....	38
Figura 7. Perfiles representativos de carotenoides de las cepas: a) Cs, b) XR, c) XP de <i>X. dendrorhous</i> (474 nm), obtenidos a partir de extracciones de biomasa de 87 h de cultivo. ....	41
Figura 8. Perfiles representativos de carotenoides de las cepas: a) XY, b) XW (474 nm), c) XW (287 nm) de <i>X. dendrorhous</i> a), obtenidos a partir de extracciones de biomasa de 87 h de cultivo. ....	43
Figura 9. SDS-PAGE. Perfil de proteínas de la cepa Cs de <i>X. dendrorhous</i> obtenido por ruptura celular con enzimas líticas de <i>T. harzianum</i> 64 mg mL <sup>-1</sup> . M: marcador de masa molecular de amplio intervalo (BioRad); 1: blanco de enzima 33 µg; 2: proteínas en la fracción 0.6 M de sacarosa; 3: proteínas en la fracción 0.6 M de sacarosa + H <sub>2</sub> O. Se cargaron 40 µg de proteína en cada carril. ....	49
Figura 10. SDS-PAGE. Perfil de proteínas del extracto celular de las cepas Cs, XR y XP de <i>X. dendrorhous</i> obtenido a diferentes ciclos de ruptura celular empleando sonicador, perlas de vidrio, nitrógeno líquido y regulador de extracción. M: marcador de masa molecular de amplio intervalo (BioRad). a: 20; b: 35 y c: 50 ciclos de sonicación. ....	50
Figura 11. SDS-PAGE. Proteínas de membrana de <i>X. dendrorhous</i> obtenidas a través de centrifugación diferencial. M: marcador de masa molecular Kaleidoscope	

prestained standards (BioRad), carriles 1 y 2 correspondientes a las dos primeras fracciones.....	52
Figura 12. Perfil representativo de proteínas de la cepa Cs de <i>X. dendrorhous</i> obtenido a través de 20 ciclos en sonicador, perlas de vidrio, nitrógeno líquido y regulador de extracción. M: marcador de peso molecular de amplio intervalo (BioRad).....	53



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la producción de biomasa en las cepas Cs, XR y XP de <i>X. dendrorhous</i> *. ....	31
Tabla 2. Parámetros cinéticos de la producción de carotenoides en las cepas Cs, XR y XP de <i>X. dendrorhous</i> *.....	36
Tabla 3. Valores de $R_f$ de diferentes pigmentos obtenidos a través de TLC, empleando placas de sílica gel. ....	39
Tabla 4. Carotenoides identificados en las cepas Cs, XR, XP, XY y XW de <i>X. dendrorhous</i> en la fase estacionaria*.....	44

## RESUMEN

El presente proyecto consistió en analizar y correlacionar los cambios del perfil de carotenoides con los fenotipos respecto a color de las cepas silvestre (Cs) y las mutantes XR, XP, XY y XW (obtenidas con nitrosoguanidina) de *X. dendrorhous*. Así mismo en identificar los cambios en las secuencias y expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de pigmentos en las cepas Cs y mutante XR sobreproductora de astaxantina. Las cepas XR, XY y XW acumularon astaxantina,  $\beta$ -caroteno y fitoeno como compuestos mayoritarios respectivamente, mientras que las cepas Cs y XP produjeron astaxantina y diversos compuestos intermediarios en diferentes concentraciones. Tanto en la cepa Cs como en las mutantes, el perfil característico de pigmentos fue el responsable de los fenotipos observados. La cepa XR con el mayor contenido de carotenoides totales, presentó también la mayor concentración de astaxantina, siendo ésta, 5 y 11 veces superior a la alcanzada por las cepas Cs y XP respectivamente. Durante la cinética de crecimiento la cepa XR presentó una mayor expresión de los genes *crtE* (geranilgeranil pirofosfato sintasa, que actúa en los primeros pasos de la ruta del mevalonato (MVA)) y *crtS* (astaxantina sintasa, cuya proteína cataliza la formación de astaxantina a partir de  $\beta$ -caroteno), siendo tres veces superiores a los alcanzados por la cepa Cs en la fase estacionaria tardía. Así mismo presentó mutaciones en los genes *crtI* (fitoeno desaturasa, cuya proteína incrementa la cantidad de precursores de astaxantina) y *crtR* (que codifica para una P450 reductasa indispensable en la biosíntesis de astaxantina). Estas modificaciones en conjunto sugieren ser las responsables del mayor contenido de carotenoides totales y astaxantina (1.7 y 6.3 veces, respectivamente) en la cepa XR.

## ABSTRACT

In this work, it was analyzed and correlated carotenoid profile changes among XR, XP, XY and XW (NTG mutant strains) and wild-type (wt) phenotypes. It was also identified the changes in sequence and expression of the carotenoid biosynthesis genes in the wt and XR astaxanthin overproducing mutant strain. Astaxanthin,  $\beta$ -carotene and phytoene were the main carotenoids synthesized by XR, XY and XW strains, whereas astaxanthin and intermediates in different ratios were synthesized by wt and XP. Both wt and mutant strains phenotypes were due to their characteristic carotenoid profiles. XR strain had the highest total carotenoid content, and 5 and 11 fold higher astaxanthin content compared to wt and XP strains, respectively. Additionally, the mRNA levels of *crtE* (acting in the first steps of the pathway) and *crtS* (whose protein catalyzes astaxanthin formation from  $\beta$ -carotene) increased during the XR strain growth and were three times higher than the wt strain in the late stationary phase. Moreover, the nucleotide sequences of *crtI* (whose protein increases astaxanthin precursors) and *crtR* (encoding a P450 reductase necessary in astaxanthin biosynthesis) exhibited differences between the strains. Both the higher *crtE* and *crtS* transcript levels and the *crtI* and *crtR* mutations can, at least in part, act to up-regulate the carotenoid biosynthesis pathway in the XR strain.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos naturales que conforman un grupo de más de 750 moléculas hidrofóbicas sintetizadas por plantas, hongos, bacterias y algas (McNulty, 2008). La mayoría son hidrocarburos que están compuestos por 40 átomos de carbono y dos anillos terminales. Dichos anillos se encuentran unidos por una cadena de dobles enlaces conjugados o sistema de polienos, que además de contribuir a su color, ayudan en la captura de radicales libres altamente reactivos y que pueden originarse como subproducto del metabolismo celular (Schroeder y Johnson 1995; Pashkow, 2008).

Por su estructura química los carotenoides se han clasificado en dos grupos: los carotenos, que no presentan átomos de oxígeno en su estructura y las xantofilas que sí poseen átomos de oxígeno. Algunos carotenoides son acíclicos, aunque la mayoría contienen anillos en uno o ambos extremos de la molécula (Breithaupt, 2007). Debido a la existencia de dobles enlaces conjugados, todos los carotenoides presentan el fenómeno de isomerización *cis-trans*, siendo en general, los isómeros *trans*, la forma predominante en la naturaleza. Aproximadamente la mitad de los carotenoides naturales poseen al menos un carbono asimétrico, dando lugar a isómeros ópticos entre los distintos compuestos (Britton, 1995; Meléndez *et al.*, 2007).

Los carotenoides resultan de gran interés en diversos campos de la biotecnología por su amplia aplicación y diversas funciones (Bhosale, 2004). Debido a sus propiedades benéficas sobre la salud humana, éstos se utilizan en la formulación de suplementos vitamínicos y en la elaboración de productos funcionales (Higuera, 2006). Algunos poseen actividad provitamínica A, (Fraser y Bramley, 2004) y diversos estudios han asociado también su consumo elevado con un aumento en las defensas del sistema inmune y con una disminución en el riesgo de padecer enfermedades degenerativas tales como cáncer y enfermedades cardiovasculares (Certik *et al.*, 2009). Dichos efectos biológicos se han atribuido a su capacidad antioxidante a través de la cual desactivan radicales libres, y a su capacidad fotoprotectora directa de la piel frente a radiaciones UV (Sies y Stahl, 2004; Cardozo *et al.*, 2007).

Existen diversos carotenoides con propiedades biológicas, sin embargo el  $\beta$ -caroteno y las xantofilas astaxantina y luteína son los de mayor interés comercial (Breithaupt, 2007). Estos carotenoides se emplean principalmente como pigmentos naturales en alimentos y como complementos alimenticios para animales con el fin de enriquecer el color de los productos (yema de huevo, pollo y pescado) (Becker, 2004).

Debido a que el hombre y los animales no pueden sintetizar carotenoides endógenamente, deben obtenerlos a partir de la dieta ya que su requerimiento es esencial para una nutrición adecuada (Guerin *et al.*, 2003). Su mercado global tuvo un valor cercano a los \$1.2 billones de dólares en 2010, y se estima que para el 2018 alcance los \$1.4 billones de dólares (BCC Research 2015).

### 1.1.1. Astaxantina

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- $\beta,\beta'$ -caroteno-4,4'-diona), a diferencia del  $\beta$ -caroteno, no posee actividad provitamina A y es uno de los carotenoides de mayor interés científico y comercial (Alcaíno *et al.*, 2014). Tiene aplicación en la industria farmacéutica como agente antitumoral, en la industria de cosméticos como antioxidante, en la industria alimentaria como suplemento para la coloración de diversos productos y en la dieta de las aves de corral con la finalidad de incrementar la coloración en la yema de huevo (Higuera *et al.*, 2006). Además, presenta un gran interés biotecnológico principalmente en la industria de la acuicultura, ya que es uno de los pigmentos más distribuidos en animales acuáticos y es la responsable del color rojo de la carne del salmón y la trucha (Lodato *et al.*, 2007), representando cerca del 99% del total de carotenoides en salmónidos silvestres. Bajo condiciones de cultivo los peces no acumulan dicho pigmento, ya que es incorporado en los entornos naturales a través de la dieta a base de crustáceos y otros organismos que lo contienen (Lorenz y Cysewski, 2000, Chimsung *et al.*, 2014).

Desde el punto de vista económico, la astaxantina es el segundo carotenoide de mayor importancia con un mercado de \$260 millones de dólares en 2010 (29% de la venta total de carotenoides) y un estimado que alcanza los \$315 millones de dólares en 2016 (BCC Research 2015). En la actualidad, cerca del 97% de la producción de astaxantina se realiza mediante síntesis química (Schmidt *et al.*, 2011). Sin embargo, los altos costos de venta (2500 dólares  $\text{kg}^{-1}$ ) y la demanda de los consumidores hacia pigmentos de origen natural, por no estar sujetos a las restricciones que la FDA

impone a los colorantes sintéticos, ha generado interés en la extracción a partir de fuentes naturales. Dentro de estas fuentes se encuentran microorganismos como la microalga *Haematococcus pluvialis* y la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Lorenz y Cysewski, 2000; Rodríguez-Saiz *et al.*, 2010; Schmidt *et al.*, 2011).

*Haematococcus pluvialis* es el microorganismo que acumula las concentraciones más altas de astaxantina, entre 15 y 30 g kg<sup>-1</sup> (1.5% y 3% en peso seco) (Margalith, 1999; Lorenz y Cysewski, 2000), sin embargo, el pigmento obtenido es de calidad inferior a la requerida comercialmente, dado su elevado porcentaje de esterificación (80% monoéster, 15% diéster) (Goswami *et al.*, 2010). En este sentido, la astaxantina producida por la levadura *X. dendrorhous* (100% libre, al igual que la proveniente de síntesis química) presenta una gran ventaja sobre la producida por la microalga, al ser de fácil absorción porque no necesita ser hidrolizada en el tracto digestivo de los peces. Además, a pesar de que las microalgas son la fuente natural con el contenido más alto de astaxantina conocido, la explotación comercial de estos organismos no ha generado los resultados esperados, debido a los altos índices de contaminación con protozoarios y a un menor desarrollo de las tecnologías de cultivo, en comparación con organismos heterotróficos como las levaduras (Olaizola, 2000; Cifuentes y Alcaíno, 2009).

La astaxantina obtenida de *X. dendrorhous* está compuesta por el isómero óptico 3*R*,3'*R* en contraste con las fuentes sintéticas y bacterianas y constituye una fuente de origen natural importante (Figura 1). Así mismo, el alto porcentaje de isómeros geométricos *trans* que presenta, comparado con las fuentes sintéticas, contribuye a

una mayor eficacia del pigmento, debido a que el isómero *trans* presenta mayor estabilidad y biodisponibilidad que el isómero *cis* (Higuera *et al.*, 2006; Naturxan, 2015).

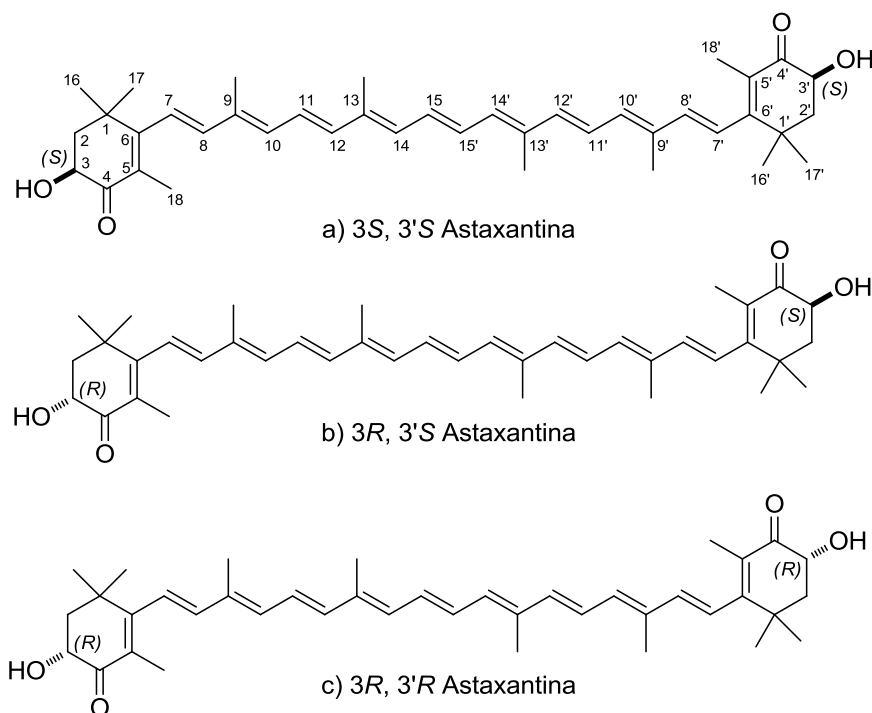


Figura 1. Estereoisómeros de la astaxantina (Higuera *et al.*, 2006).

## 1.2. *Xanthophyllomyces dendrorhous*

*Xanthophyllomyces dendrorhous* es una levadura basidiomiceta conocida en su estado asexual como *Phaffia rhodozyma* (Golubev, 1995). Se aisló por primera vez a principios de la década de los setenta a partir de exudados de árboles en regiones montañosas de Japón y Alaska. Su característica principal es la formación de



colonias rojas o naranjas debido a la presencia de pigmentos carotenoides que la protegen del daño oxidativo generado por especies reactivas de oxígeno como el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno (An *et al.*, 1989; Visser *et al.*, 2003).

Las cepas silvestres de *X. dendrorhous* aisladas a la fecha, contienen cantidades de carotenoides totales cercanas a 200  $\mu\text{g g}^{-1}$  (biomasa en peso celular seco (PCS)) (Alcaíno *et al.*, 2008; Contreras *et al.*, 2013) de los cuales, del 83 al 87% corresponde a astaxantina (Schmidt *et al.*, 2011). Sin embargo, la producción específica del pigmento es muy baja para ser empleada a nivel industrial (Lodato *et al.*, 2007). Por lo anterior, una de las estrategias más empleadas para obtener concentraciones altas de astaxantina ha sido la mutagénesis clásica con luz ultravioleta (Retamales *et al.*, 1998) o con agentes químicos como nitrosoguanidina (NTG) y metanosulfonato de etilo (EMS) (De Boer *et al.*, 1998; Cifuentes *et al.*, 2010; Barbachano *et al.*, 2014), que ha permitido llevar a cabo procesos de fermentación económicamente viables a escala comercial (Goswami *et al.*, 2010; Schmidt *et al.*, 2011).

En el laboratorio de Genética Microbiana del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN se cuenta con la cepa silvestre de *X. dendrorhous* CDBB-L-685, la cual fue sometida a mutagénesis empleando NTG, con el fin de dilucidar pasos importantes en la biosíntesis de astaxantina (Barbachano *et al.*, 2014). Se emplearon concentraciones de 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$  del mutágeno y de  $5 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ . La selección de las cepas se realizó por escrutinio visual con base en el color, de fenotipos distintos al silvestre. Se aislaron diferentes mutantes de acuerdo al fenotipo (color) que presentaron y éstas fueron designadas como XR por su

intenso color rojo; XP es una colonia rosa, la XY es amarilla y la XW es blanca. La designación corresponde a la letra inicial del nombre del color en inglés.

### **1.2.1. Biosíntesis de carotenoides en *X. dendrorhous***

La biosíntesis de carotenoides en *Xanthophyllomyces dendrorhous* inicia a partir de acetil-CoA, a través de la ruta del mevalonato (MVA) (Barbachano, 2008; Berthelot *et al.*, 2012). El acetil-CoA se transforma a isopentil pirofosfato (IPP) que es el precursor de todos los isoprenoides y la IPP isomerasa (gen *idi*) cataliza la conversión de IPP a su isómero pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP). El siguiente paso es catalizado por la geranil geranil pirofosfato (GGPP) sintasa (gen *crtE*) que añade tres moléculas de IPP para generar GGPP. La fitoeno sintasa (enzima bifuncional codificada por el gen *crtYB*) condensa dos moléculas de GGPP para dar lugar al compuesto denominado fitoeno, que tras tres reacciones de desaturación catalizadas por la enzima fitoeno desaturasa (gen *ctrI*) conduce a la formación de neurosporeno, y tras otra reacción de desaturación catalizada por la misma enzima, conduce a la formación de licopeno (Verdoes *et al.*, 1999). La licopeno ciclasa (enzima bifuncional codificada por el gen *crtYB*) cicla el licopeno para dar lugar sucesivamente  $\gamma$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno (Verdoes *et al.*, 2003).

Finalmente la astaxantina sintasa (codificada por el gen *ctrS*) cataliza la formación de astaxantina a partir de  $\beta$ -caroteno tras la adición de dos grupos ceto en las posiciones 4 y 4' de la molécula y de dos grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 3' (Ojima *et al.*, 2006). Esta enzima perteneciente a la familia de las proteínas citocromo

P450 requiere de un donador de electrones que para las proteínas P450 microsomales, generalmente es una citocromo P450 reductasa (CPR), codificada en *X. dendrorhous* por el gen *crtR* (Alcaíno *et al.*, 2008; Alcaíno *et al.*, 2012). (Figura 2).

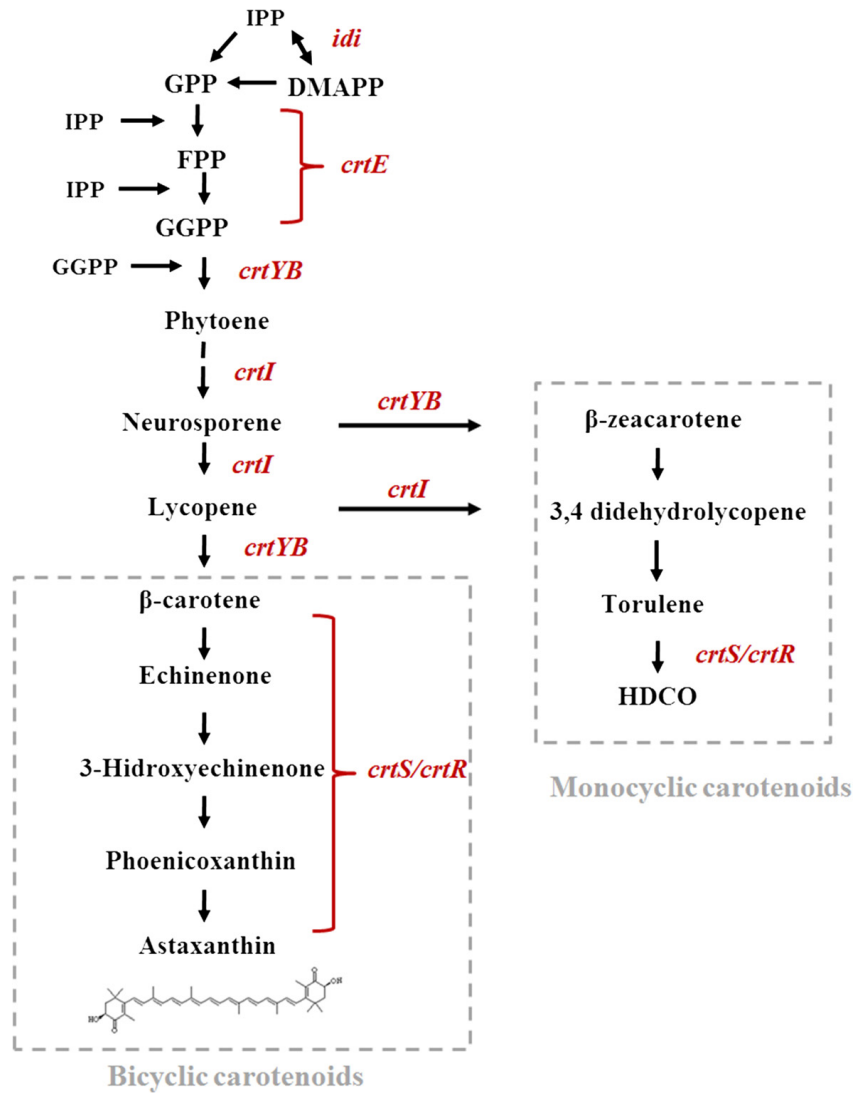


Figura 2. Ruta biosintética de la astaxantina en *X. dendrorhous* (Tomado de Contreras *et al.*, 2013).

En *X. dendrorhous* el principal producto de carotenogénesis es la astaxantina y uno de los subproductos minoritarios formado es el carotenoide monocíclico 3-HO-4-cetotoruleno (HKT) también conocido como HDCO (Vázquez y Santos, 1998; Breitenbach *et al.*, 2010). La desviación en la ruta que da lugar a la síntesis de este compuesto, involucra dos enzimas: CrtYB y CrtI, y la delección o sobreexpresión de los genes que las codifican ha demostrado la acumulación de ciertos intermediarios y cambios en el nivel de producción de carotenoides.

La sobreexpresión del gen *crtYB* genera un contenido más alto de carotenoides totales (principalmente  $\beta$ -caroteno) y una disminución en el contenido de astaxantina, toruleno y HDCO. Por otra parte, la sobreexpresión del gen *crtI* genera un incremento en el contenido de carotenoides monocíclicos y una reducción en el contenido de astaxantina. De esta forma, la competencia entre CrtI y CrtYB dirige el flujo metabólico bien sea (I) vía  $\beta$ -caroteno hacia astaxantina, o bien (II) vía 3,4-didehidrolicopeno hasta HDCO (Verdoes *et al.*, 2003).

### **1.2.2. Ingeniería metabólica y regulación de la ruta de biosíntesis de pigmentos de *X. dendrorhous***

La combinación de técnicas de mutagénesis convencional e ingeniería genética, ha incrementado el flujo de precursores hacia la producción de astaxantina en *X. dendrorhous* (Schmidt *et al.*, 2011; Gassel *et al.*, 2013). No obstante, los mecanismos de regulación no han sido completamente dilucidados dada la complejidad de la ruta.

Así mismo, las actividades enzimáticas no han sido determinadas debido a la localización subcelular de las principales proteínas involucradas (Schmidt *et al.*, 2011; Alcaíno *et al.*, 2012).

Las proteínas CrtYB, CrtS y CrtR son de localización transmembranal. Particularmente, CrtS y CrtR poseen una región hidrofóbica en el *N*-terminal (residuos 1-35 en crtS y 1-63 en crtR), que ancla las proteínas a la membrana del retículo endoplásmico (Alcaíno *et al.*, 2012), lo que dificulta la obtención de las proteínas con actividad enzimática.

En este sentido, un buen acercamiento al estudio de la biosíntesis de carotenoides en las cepas mutantes, consiste en la identificación de los cambios en los genes de la ruta (que pueden modificar la estructura de las proteínas) así como en el análisis de la expresión de cada uno de ellos. Las diferencias presentes en los genes de las distintas cepas así como la mayor o menor expresión de cada uno de ellos, pueden brindar una explicación acerca de los fenotipos obtenidos tras el proceso de mutagénesis, producto de la acumulación diferencial de los pigmentos.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El producto principal de la carotenogénesis en *X. dendrorhous* es la astaxantina y en cepas sometidas a mutagénesis el perfil de carotenoides se modifica. La regulación de la ruta no se conoce en su totalidad y las actividades enzimáticas de las principales proteínas no han sido determinadas. Sin embargo existen enzimas clave en la ruta de producción de pigmentos, cuya competencia por diversos sustratos, regula el flujo metabólico hacia la síntesis de carotenoides bicíclicos (astaxantina), monocíclicos (HDCO) o compuestos intermediarios.

El análisis del perfil metabólico referente a pigmentos de las cepas mutantes XR, XP, XY y XW de *X. dendrorhous* obtenidas por mutagénesis clásica con NTG, permitirá explicar sus diferencias fenotípicas respecto a la cepa silvestre. Así mismo, la correlación de cambios en el perfil carotenogénico, con las secuencias y niveles de expresión de los genes involucrados en síntesis de carotenoides de la mutante XR y la cepa silvestre de *X. dendrorhous*, permitirá dilucidar modificaciones en la ruta biosintética que favorecen la acumulación de astaxantina en la cepa XR.

### 3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El análisis del perfil metabólico referente a pigmentos de las mutantes XR, XP, XY y XW de *Xanthophyllomyces dendrorhous* permitirá explicar sus diferencias fenotípicas respecto a la cepa parental CDBB-L-685.

La correlación entre los perfiles de carotenoides con los cambios en la expresión y en las secuencias de los genes de la biosíntesis de estos pigmentos, permitirá explicar las diferencias entre la cepa silvestre y la cepa XR de *X. dendrorhous*.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

Analizar y correlacionar los cambios del perfil de carotenoides con los fenotipos de las cepas mutantes XR, XP, XY, XW y la cepa silvestre de *X. dendrorhous*. Así mismo identificar los cambios en las secuencias y expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de pigmentos, en las cepas silvestre y mutante XR de *X. dendrorhous*.

### **4.2. Objetivos particulares**

- 4.2.1. Caracterizar cinéticamente las cepas silvestre y mutantes de *X. dendrorhous* y relacionar su perfil metabólico referente a pigmentos con sus diferencias fenotípicas
- 4.2.2. Identificar los cambios en el perfil de carotenoides asociados a la producción de pigmentos durante la cinética de crecimiento de las cepas silvestre y mutante XR de *X. dendrorhous*
- 4.2.3. Evaluar los niveles de expresión de los genes de la carotenogénesis durante la acumulación de pigmentos en las cepas silvestre y mutante XR de *X. dendrorhous*



4.2.4. Correlacionar los cambios en el perfil de carotenoides, con las diferencias en la expresión y en las secuencias de los genes de esta ruta biosintética entre las cepas silvestre y XR de *X. dendrorhous*

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia experimental del proyecto se dividió en etapas tal como se presenta en la Figura 3.

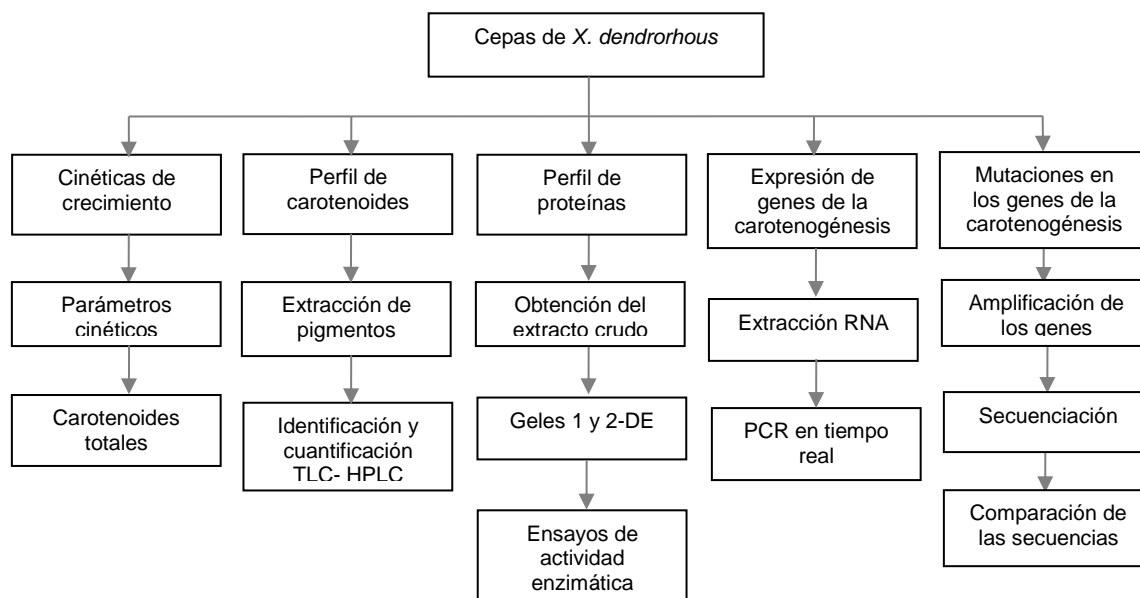


Figura 3. Estrategia Experimental.

### 5.1. ETAPA I: Cinéticas en reactor

#### 5.1.1. Microorganismo

*Xanthophyllomyces dendrorhous* cepa silvestre CDBB-L-685 fue obtenida de la Colección Mexicana de Cultivos Microbianos del CINVESTAV y las cepas XR, XP,

XY y XW fueron obtenidas mediante mutagénesis con *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (NTG) 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Sigma-Aldrich) (Barbachano *et al.*, 2014).

Las cepas se conservaron resuspendiendo  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  en glicerol al 50%. El mantenimiento se realizó mediante siembra en superficie en medio YM sólido (0.3% extracto de levadura, 0.3% extracto de malta y 0.5% peptona suplementado con 1% de glucosa y agar bacteriológico 1.8%, disueltos en agua destilada) a partir de la suspensión de células en glicerol. Las placas se incubaron a  $20\pm 2$  °C durante siete días, posteriormente se almacenaron a 4 °C y se realizaron resiembras bimestrales.

### **5.1.2. Cinéticas de crecimiento**

Los inóculos se obtuvieron a partir de una asada de cada una de las cepas en matraces bafleados de 250 mL conteniendo 50 mL de medio YM. Los cultivos crecieron a  $20\pm 2$  °C, 150 rpm (Gyrotory Water Bath Shaker mod. G67) durante 48 h. Se resembraron en un segundo matraz con medio YM en una relación al 10% v/v, conservando las condiciones de temperatura y agitación durante 24 h. El crecimiento celular obtenido se empleó como inóculo para las cinéticas en reactor manteniendo la relación de 10% v/v.

Las cinéticas se llevaron a cabo en un reactor Applikon<sup>®</sup> de 3.0 L, con un volumen de operación de 1.5 L. El seguimiento y control de los parámetros de crecimiento se realizó con la consola Applikon<sup>®</sup> Bio Controller ADI 1010:  $20\pm 1$  °C, 500 rpm, 1 vvm y pH ( $5.0\pm 0.3$ ). Se empleó  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1.5 M y NaOH 3 M para el control de pH y MAZU

7911 a una concentración máxima de  $100 \mu\text{L L}^{-1}$  para el control de la formación de espuma. El seguimiento de la cinética se realizó durante 144 h, y se tomó muestra cada 4 h durante las primeras 24 h, cada 6 h durante las siguientes 18 h, y cada 12 h hasta las 144 h. Las muestras se guardaron a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

### **5.1.3. Técnicas analíticas**

Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min. La pastilla celular se empleó para determinar el contenido de carotenoides totales y para seguir el crecimiento del cultivo, mientras que el sobrenadante se empleó para determinar el sustrato residual. Se realizaron tres corridas independientes en reactor para cada cepa y cada muestra fue analizada por triplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo empleando t de Student ( $p \leq 0.05$ ).

#### **5.1.3.1. Determinación del crecimiento**

El crecimiento del cultivo se siguió mediante la correlación de valores de absorbancia medida a 600 nm (espectrofotómetro Jenway® 6320D), con valores de PCS obtenidos a través de una curva patrón. La velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación, se calcularon a partir del análisis de la fase exponencial de la curva de crecimiento.

### **5.1.3.2. Determinación de azúcares totales**

Los azúcares residuales se determinaron por el método de Dubois (1956) con las siguientes modificaciones: a un tubo con 200  $\mu\text{L}$  de fenol al 5% se le agregaron 200  $\mu\text{L}$  de muestra propiamente diluida; se agregó de golpe 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, se agitó en el vórtex y se esperó por 30 minutos antes de leer en el espectrofotómetro a 490 nm. La concentración de azúcares se determinó con una curva tipo en un intervalo de concentración de 0 a 20  $\mu\text{g}$  de glucosa.

### **5.1.3.3. Determinación de carotenoides totales**

Se empleó el método reportado por Sedmak (1990) con las siguientes modificaciones. A la pastilla celular lavada de 1 mL de muestra, se le agregaron 2 g de perlas de vidrio (425-600  $\mu\text{m}$  de diámetro) y 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) (precalentado a 55  $^{\circ}\text{C}$ ) en dos partes: se agregaron 0.5 mL, las muestras se llevaron al vórtex por 30 s, se agregaron los 0.5 mL restantes y nuevamente se agitaron en vórtex por 30 s. A cada una se le adicionó 1 mL de una solución de NaCl 20%, 1 mL de acetona y 1 mL de hexanos. Se agitaron en el vórtex 30 s más y se centrifugaron durante 5 min a 5000 rpm y 4  $^{\circ}\text{C}$ . Se tomó la fase orgánica que contenía el pigmento y se leyó en el espectrofotómetro a 480 nm. La determinación de carotenoides totales se realizó empleando el coeficiente de extinción de la astaxantina  $E_{1\%} = 2100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y la fórmula reportada por An *et al.* (1989).

## **5.2. ETAPA II: Perfil de carotenoides**

### **5.2.1. Extracción de carotenoides**

A la pastilla celular lavada de 5 mL de muestra, se le agregaron 1 mL de agua y 500  $\mu$ L de perlas de vidrio. Se llevó al homogenizador (Minibeadbeater BioSpec<sup>®</sup>) 3 min, se agregó 1 mL de acetona, se llevó nuevamente al homogenizador 3 min y se centrifugó 5 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se realizó una segunda y tercera extracción a la pastilla celular. Los sobrenadantes obtenidos se recuperaron en un mismo tubo, se aforó a 3 mL con acetona y se agregaron 0.6 mL de éter de petróleo. El tubo se agitó en vórtex 10 s y se centrifugó 5 min, se recuperó el sobrenadante y se le agregó 1 mL de agua. El tubo se agitó y se centrifugó nuevamente, se eliminó la fase acuosa conteniendo las trazas de acetona, se recuperó el sobrenadante y se midió la absorbancia a 474 nm.

### **5.2.2. Identificación de carotenoides (TLC)**

El extracto de carotenoides totales obtenido para cada una de las cepas se analizó en placas de sílica gel con indicador de fluorescencia a 254 nm. Se empleó como fase móvil una mezcla de acetona y éter de petróleo (20:80) y como estándares astaxantina y  $\beta$ -caroteno (Sigma<sup>®</sup>). La presencia de astaxantina y  $\beta$ -caroteno fue identificada de forma directa con luz visible y la de fitoeno por fluorescencia bajo luz UV.

### **5.2.3. Identificación y cuantificación de carotenoides (HPLC)**

El sobrenadante en el que se cuantificaron los carotenoides totales se evaporó a sequedad a 37 °C. El contenido se resuspendió en acetona (50- 200 µL) y se inyectó en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución, empleando una columna de fase reversa LichroCART125-4 RP-18 (Merck) y como fase móvil acetonitrilo: metanol: isopropanol (85:10:5 v v<sup>-1</sup>) a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. El espectro de elución se identificó empleando detector de arreglo de diodos (DAD), los carotenoides se identificaron además por su tiempo de retención y se cuantificaron de acuerdo al área presente bajo la curva (Britton *et al.*, 2008).

### **5.3. ETAPA III: Obtención del extracto crudo**

Se llevaron a cabo diversas técnicas de ruptura celular:

- 1) Perlas de vidrio Thomas Scientific® 400-600 µm
- 2) Perlas de vidrio Sigma® 425- 600 µm
- 3) Licuadora
- 4) Acetato de litio y polietilenglicol
- 5) Lisis alcalina
- 6) Mortero con arena
- 7) Homogenizador Fast-Prep
- 8) Miniprensa francesa
- 9) Homogenizador tipo Potter

- 10) Tolueno
- 11) Enzimas líticas
- 12) Sonicador
- 13) Centrifugación diferencial

Debido a que sólo fueron obtenidos resultados positivos empleando las técnicas 11, 12 y 13, éstas son las metodologías que a continuación se describen.

### **5.3.1. Enzimas líticas**

Se pesó 1 g de biomasa en peso fresco de un cultivo de 15 h y se lavó con NaCl 0.9%, se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min y se añadieron 5 mL de regulador Tris-HCl 100 mM pH 7.4, conteniendo sorbitol 0.6 M, EDTA 10 Mm y DTT 5 mM. Se incubó a 28 °C a 150 rpm durante 10 min, y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min. La pastilla se lavó con regulador Tris- HCl 100 mM pH 7.4, conteniendo sorbitol 0.6 M, y se resuspendió en una solución de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (6 mg mL<sup>-1</sup>) (Sigma®). La mezcla de reacción se incubó a 28 °C y 150 rpm, siguiendo la formación de protoplastos a través de observaciones al microscopio a las 0.5, 1, 2 y 24 h.

### **5.3.2. Sonicador**

Se centrifugaron 10 mL de cultivo de 15 h de edad y cada pastilla se resuspendió en 2 mL de regulador de extracción [EDTA 1 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), DTT 1 mM,



sorbitol 0.3 M e inhibidor de proteasas Complete<sup>®</sup> Boehringer Mannheim]. Las células resuspendidas se sonicaron durante 20, 35 y 50 ciclos de 20 s con adición de perlas de vidrio de 500  $\mu\text{m}$  (BioSpec<sup>®</sup>) e inmersión en nitrógeno líquido. El extracto obtenido se centrifugó a 14000 rpm por 10 min y se recuperó el sobrenadante.

## **5.4. ETAPA IV: Perfil de proteínas**

### **5.4.1. Electroforesis en gel de una dimensión**

Para verificar la calidad de las muestras y corroborar visualmente la concentración de proteína, se realizaron geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes como lo describe Laemmli (1970). Se aplicaron 40  $\mu\text{g}$  de proteína y los geles se tiñeron empleando las técnicas de SYPRO Ruby y Silver blue.

#### **5.4.1.1. Purificación parcial por centrifugación diferencial**

Se pesaron 8 g de biomasa en peso fresco y se maceró con arena. La muestra se homogenizó en un regulador con sacarosa 0.25 M, EDTA 3 mM, BSA 0.5%, mercaptoetanol 15 mM y Tris- HCl 70 mM pH 7.8 y se centrifugó a 1500 x *g* durante 15 min con el fin de eliminar la arena. Se recuperó el sobrenadante conteniendo la biomasa y se centrifugó a 13000 x *g* durante 15 min para separar las membranas fraccionadas de restos de organelos. Se recuperó nuevamente el sobrenadante obtenido y se centrifugó a 80000 x *g* durante 30 min para obtener las fracciones de membrana. La pastilla se resuspendió en regulador Tris- MES 1 mM, DTT 1 mM pH

7.2 y se centrifugó en un gradiente discontinuo de sacarosa al 35 y 25% a 115000 x g durante 3 h. Finalmente, se recuperaron las fracciones obtenidas (Packer *et al.*, 1987).

#### **5.4.2. Electroforesis en gel de dos dimensiones**

La electroforesis en dos dimensiones (2-DE) se llevó a cabo usando tiras de 7 cm, con gradiente de pH inmovilizado en un intervalo de pH de 4-7 y 3-10 (Bio-Rad®). Las tiras fueron rehidratadas con la aplicación de la muestra (100 µg de extracto proteico) previamente solubilizada en regulador de muestra-rehidratación (Bio-Rad®). Se llevó a cabo el isoelectroenfoque bajo las condiciones preestablecidas del programa y posteriormente las tiras se llevaron a una solución de equilibrio por 30 min. Para la separación en dos dimensiones, las tiras se pusieron en la parte superior de geles de acrilamida al 10% y se sellaron con agarosa. El amortiguador de corrida (Tris-base 0.025 M, glicina 0.192 M y SDS 0.1% pH 8.8) fue usado 1X a 120 V hasta el final de la corrida.

Los geles se tiñeron empleando las técnicas de SYPRO Ruby y Silver blue. Las manchas proteicas fueron manualmente escindidas y enviadas a Arizona Proteomics Consortium College of Pharmacy, Tucson USA para su secuenciación.

### **5.4.3. Determinación de actividades enzimáticas**

#### **5.4.3.1. Actividad enzimática crtYB licopeno ciclasa**

La mezcla de reacción consistió en: 150  $\mu\text{L}$  de una suspensión de deoxicolato de sodio ( $0.1 \text{ g mL}^{-1}$  de Tris- HCl pH 7.4 50 mM), 5  $\mu\text{g}$  de licopeno en 10  $\mu\text{L}$  de acetona, 250  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático, NADPH 1 mM, todo en regulador Tris- HCl pH 7.4 50 mM, en un volumen final de 410  $\mu\text{L}$ . La incubación se llevó a cabo a 30 °C y durante 4 h a 200 rpm y la reacción se detuvo con 1 mL de metanol conteniendo 6% (p v<sup>-1</sup>) de KOH y calentando a 60 °C durante 20 min. Para visualizar los productos de reacción:

1) Por HPLC: los productos se extrajeron con 1 mL de una solución al 30% de NaCl, 1 mL de acetona, 1 mL de éter de petróleo, la mezcla se agitó en vórtex durante 30 s, se centrifugó y se recuperó el solvente. El solvente recuperado conteniendo los carotenoides, se evaporó en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente, se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de hexano y se inyectó al HPLC. 2) Por TLC: los productos se extrajeron con éter dietílico/éter de petróleo (1:9 v v<sup>-1</sup>). El solvente se evaporó con nitrógeno, los pigmentos se resuspendieron en 10  $\mu\text{L}$  de acetona y se corrieron en la placa de TLC.

#### **5.4.3.2. Actividad enzimática crtI fitoeno desaturasa**

La mezcla de reacción consistió en: 150  $\mu\text{L}$  de una suspensión de deoxicolato de sodio ( $0.1 \text{ g mL}^{-1}$  de Tris- HCl pH 7.4 50 mM), 2  $\mu\text{g}$  de fitoeno en 10  $\mu\text{L}$  de metanol, 250  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático, FAD 0.5 mM, Mn Cl<sub>2</sub> 1 mM y MgCl<sub>2</sub> 1 mM, todo en

regulador Tris- HCl pH 7.4 50 mM conteniendo 1 mM de DTT, en un volumen final de 410  $\mu$ L. La incubación se llevó a cabo a 30 °C y durante 4 h a 200 rpm y la reacción se detuvo con 1 mL de metanol (Raisig *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 2007). Para visualizar los productos de reacción: 1) Por HPLC: los productos se extrajeron con 1 mL de una solución al 30% de NaCl, 1 mL de acetona, 1 mL de éter de petróleo, la mezcla se agitó en vórtex durante 30 s, se centrifugó y se recuperó el solvente. El solvente recuperado conteniendo los carotenoides, se evaporó en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente, se resuspendió en 100  $\mu$ L de hexano y se inyectó al HPLC. 2) Por TLC: los productos se extrajeron con éter dietílico/éter de petróleo (1:9 v v<sup>-1</sup>). El solvente se evaporó con nitrógeno, los pigmentos se resuspendieron en 10  $\mu$ l de acetona y se corrieron en la placa de TLC.

**5.5. ETAPA V: Análisis de la expresión diferencial de los genes *idi*, *crtE*, *crtYB*, *crtl*, *crtS* y *crtR* relacionados con la carotenogénesis durante cinéticas de crecimiento de las cepas silvestre y mutante XR de *X. dendrorhous***

La metodología de PCR en tiempo real para los genes *idi*, *crtE*, *crtYB*, *crtl*, *crtS* y *crtR*, se describe en el artículo “Carotenoid production and gene expression in an astaxanthin overproducing *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant strain” (Anexo 1 del presente trabajo).

**5.6. ETAPA VI: Amplificación y secuenciación de los genes *idi*, *crtE*, *crtYB*, *crtl*, *crtS* y *crtR* e identificación de sus mutaciones entre la cepa silvestre y mutante XR de *X. dendrorhous***

La metodología de amplificación y secuenciación de los genes *idi*, *crtE*, *crtYB*, *crtl*, *crtS* y *crtR*, se describe en el artículo “Carotenoid production and gene expression in an astaxanthin overproducing *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant strain” (Anexo 1 del presente trabajo).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. ETAPA I: Cinéticas en reactor

#### 6.1.1. Producción de biomasa y consumo de sustrato

El crecimiento en reactor de las cepas Cs, XR y XP de *X. dendrorhous* fue seguido durante 144 h en cultivo por lote. La fase de crecimiento exponencial presentó una duración similar en los tres cultivos, finalizó alrededor de las 30 h (Figura 4) y alcanzó valores de concentración máxima de biomasa ( $x_{max}$ ) de  $3.79 \pm 0.27$  (Cs),  $4.22 \pm 0.29$  (XR) y  $3.91 \pm 0.25$  g L<sup>-1</sup> (XP), sin diferencia significativa entre las cepas ( $p \geq 0.05$ ). Así mismo, las tres cepas presentaron valores similares de biomasa durante la fase estacionaria.

En cepas mutantes de *X. dendrorhous* se han reportado valores bajos de crecimiento celular respecto a las cepas parentales (Schmidt *et al.*, 2011), atribuyéndolo a posibles desviaciones en el flujo de carbono hacia la ruta de carotenogénesis (Lodato *et al.*, 2007). Sin embargo, los valores de biomasa ligeramente superiores obtenidos en la cepa XR ( $p \geq 0.05$ ) pueden deberse a la optimización de los parámetros de crecimiento establecidos durante las cinéticas en reactor, tales como el pH y el volumen de aire suministrado.

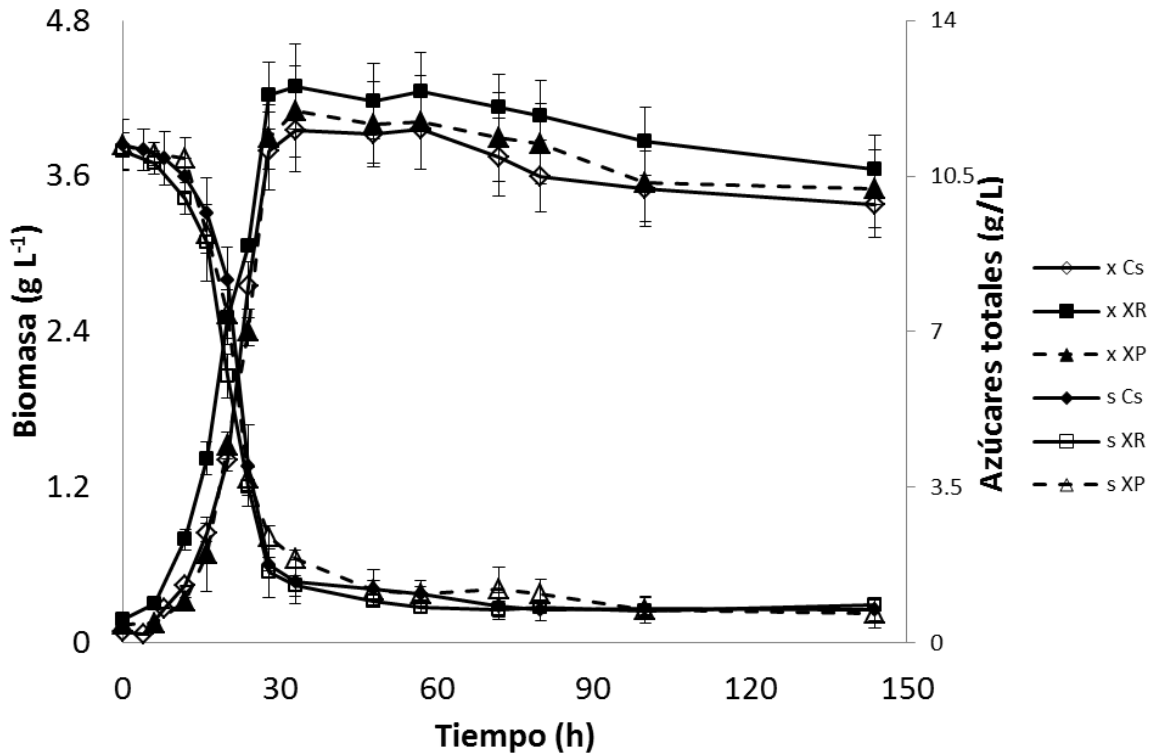


Figura 4. Cinéticas de crecimiento y de consumo de sustrato de las cepas Cs, XR y XP de *X. dendrorhous*.

El valor inicial de azúcares totales en el medio de cultivo YM fue de  $11.15 \pm 0.09 \text{ g L}^{-1}$ . Las cepas Cs, XR y XP presentaron un comportamiento similar en el consumo de sustrato ( $p \geq 0.05$ ) (Figura 4). Se observó una disminución de cerca del 50% en el contenido de glucosa alrededor de la mitad de la fase de crecimiento exponencial. Lo anterior es acorde a lo descrito por Lodato *et al.*, 2007, quienes reportan como necesario un valor de glucosa equivalente a la mitad de la concentración inicial para mantener el crecimiento de *X. dendrorhous* en fase exponencial. El máximo consumo de la fuente de carbono coincidió con el fin de la fase de crecimiento exponencial en cada una de las cepas y alcanzó un valor cercano al 90% a las 30 h de cultivo (Figura 4).

Las cepas presentaron entre sí valores similares de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), tiempo de duplicación ( $t_d$ ) y de productividad ( $P_x$ ) y rendimiento ( $Y_{x/s}$ ) de biomasa (Tabla 1). No obstante, la cepa XR presentó valores ligeramente superiores para la mayoría de los parámetros. Lo anterior representa una gran ventaja debido a que esta es la cepa mutante que se caracteriza por presentar un color rojo más intenso, un rasgo indicativo de mayor producción de carotenoides.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la producción de biomasa en las cepas Cs, XR y XP de *X. dendrorhous*\*.

<b>Cepa</b>	<b><math>\mu</math> (<math>h^{-1}</math>)</b>	<b><math>t_d</math> (h)</b>	<b><math>P_x</math> (<math>g</math> células <math>L^{-1} h</math>)</b>	<b><math>Y_{x/s}</math> (<math>g</math> células <math>g^{-1}</math> sustrato)</b>
<b>Cs</b>	0.137	5.048	0.136	0.395
<b>XR</b>	0.147	4.708	0.151	0.424
<b>XP</b>	0.136	5.112	0.139	0.428

\*Los valores de desviación estándar para cada uno de los parámetros fueron inferiores al 10%.

Los parámetros  $\mu$ ,  $t_d$ ,  $P_x$  y  $Y_{x/s}$  obtenidos para las cepas Cs, XR y XP, estuvieron en el intervalo de lo descrito previamente para esta levadura. Yamane *et al.* (1997) determinaron valores de  $\mu = 0.19 h^{-1}$  y  $Y_{x/s} = 0.46 g$  de células  $g^{-1}$  sustrato al evaluar el crecimiento de *X. dendrorhous* cepa silvestre ATCC 24202, en medio YM y pH 5.0. Dichos valores, son ligeramente superiores a los obtenidos en el presente trabajo para la cepa Cs. Por otra parte, Liu y Wu (2007) obtuvieron una productividad de  $0.173 g L^{-1} h$  y  $Y_{x/s} = 0.31 g$  de células  $g^{-1}$  sustrato para la cepa hiperproductora de



carotenoides *X. dendrorhous* ENM 5, obtenida a partir de la cepa parental ATCC 24230 a través de mutagénesis con NTG. El rendimiento reportado por estos autores fue ligeramente inferior a lo encontrado para las cepas Cs, XR y XP, de nuestro trabajo.

## **6.1.2. Producción de carotenoides**

### **6.1.2.1. Cuantificación de carotenoides totales**

La concentración de carotenoides totales fue evaluada en las cepas Cs, XR y XP de *X. dendrorhous* durante su crecimiento en reactor en cultivo por lote.

Se emplearon distintas técnicas de ruptura celular debido a que en levaduras, la presencia de la pared celular rígida dificulta la extracción de los pigmentos (Kaiser *et al.*, 2007). Tras el empleo de sonicación, perlas de vidrio y nitrógeno líquido, la membrana celular permaneció intacta, haciendo imposible la extracción de la astaxantina que se caracteriza por actuar inmersa en la membrana citoplasmática (Yamashita 2013; Ambati *et al.*, 2014) y por acumularse en el citosol, en glóbulos de naturaleza lipídica asociados a membrana (Johnson y An, 1991; Storebakken *et al.*, 2004).

El uso de dimetilsulfóxido ampliamente reportado (DMSO) a 55 °C (Sedmak *et al.*, 1990), permitió la ruptura de las células y el empleo conjunto de disolventes llevó a una extracción considerable de los pigmentos hacia la fase orgánica.

El incremento del contenido específico de carotenoides en las cepas Cs, XR y XP se presentó simultáneamente con el inicio del crecimiento celular (Figuras 4 y 5). La cepa Cs alcanzó, con el fin de la fase exponencial de crecimiento,  $156.32 \pm 10.59 \mu\text{g g}^{-1}$  y las cepas XR y XP  $330.98 \pm 16.27$  y  $41.03 \pm 2.66 \mu\text{g g}^{-1}$ , presentando frente a Cs un valor 111.7 y 73.7% más alto y más bajo, respectivamente. No obstante, el incremento en la concentración de carotenoides totales continuó en las tres cepas después de que el crecimiento cesó y la glucosa fue prácticamente consumida. Las cepas Cs, XR y XP incrementaron su contenido específico de carotenoides respecto a si mismas un 87.7, 53.8 y 177.5% respectivamente, durante la fase exponencial.

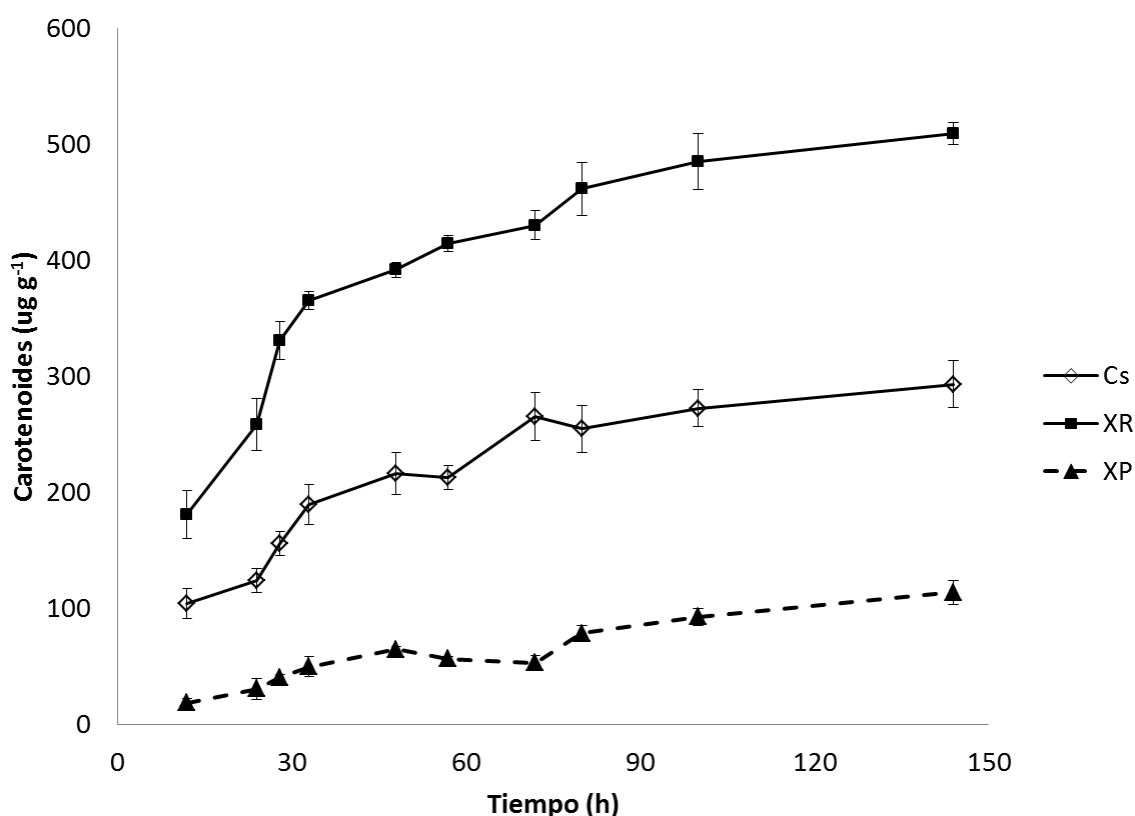


Figura 5. Producción de carotenoides totales en las cepas Cs, XR y XP de *X. dendrorhous*.

Al final de la cinética, las cepas alcanzaron un contenido específico de carotenoides de  $293.45 \pm 20.06$  (Cs),  $509.07 \pm 9.32$  (XR) y  $114.10 \pm 10.61$  (XP) g carotenoides  $g^{-1}$  células (Figura 5). La cepa XR presentó el contenido más alto de carotenoides totales a lo largo de la cinética, siendo éste 73% superior al alcanzado por la cepa Cs al final del cultivo. La producción de carotenoides se ha asociado directamente con la edad del cultivo y una baja velocidad de crecimiento del mismo, (Lodato *et al.* 2007; Gassel *et al.* 2013), sin embargo en el presente trabajo, el comportamiento en la síntesis de carotenoides por parte de las tres cepas creciendo en reactor en cultivo por lote fue muy similar y puede considerarse como parcialmente asociado al crecimiento. Este comportamiento también ha sido reportado por Liu y Wu (2007) durante el crecimiento de de *X. dendrorhous* ENM 5, cepa hiperproductora de carotenoides, así como por Frengova y Beshkova (2009) para distintas cepas silvestres y mutantes de *X. dendrorhous* bajo condiciones análogas a las del presente trabajo. Por otro lado Aksu y Eren (2005) reportan la producción de  $\beta$ -caroteno, toruleno y torularodina asociada parcialmente a crecimiento en *Rhodotorula mucilaginosa* NRRL-2502, al crecerla en cultivo por lote.

Los carotenoides actúan previniendo la oxidación celular generada por radicales libres (Yamane *et al.*, 1997; Liu y Wu, 2006; Barbachano 2008). Por lo que el incremento en el contenido de carotenoides para las cepas Cs, XR y XP durante la fase estacionaria del cultivo, puede explicarse como un mecanismo de protección frente a la oxidación generada por especies reactivas. Los radicales libres están presentes en la célula, ya que se producen de forma natural durante las reacciones enzimáticas propias del metabolismo celular y pueden incrementarse en el tiempo

por condiciones de cultivo tales como la aireación y la limitación de nutrientes (Schroeder y Johnson, 1995; Nomura y Takagi, 2004; Ukibe *et al.*, 2009).

Las cepas Cs, XR y XP presentaron valores de productividad ( $P_p$ ); y rendimiento de carotenoides ( $Y_{p/x}$  y  $Y_{p/s}$ ) diferentes entre sí (Tabla 2). La cepa XR presentó los valores más altos para dichos parámetros, siendo éstos 128, 73 y 108% superiores a los obtenidos por la cepa Cs. Mientras que la cepa XP presentó los valores más bajos, siendo éstos 85, 61 y 62% inferiores a los de la cepa Cs, respectivamente. De acuerdo a lo anterior, los resultados de  $P_x$ ,  $Y_{p/x}$  y  $Y_{p/s}$  de las cepas XR y XP eran en parte esperados, si se tiene en cuenta que después del tratamiento con NTG, se obtuvo la cepa XR de color rojo con el indicio de mayor producción de carotenoides y la cepa XP de color rosa probablemente con una menor producción de éstos.

La mutagénesis de cepas de *X. dendrorhous* con agentes como la NTG, ha permitido obtener mutantes con diferentes fenotipos. Así, Schmidt *et al.* (2011) reporta la selección visual de mutantes de esta levadura con coloración roja intensa, producto del incremento en el contenido de astaxantina, similar a lo observado en la cepa XR del presente trabajo. Por otro lado, también han sido obtenidas mutantes de *X. dendrorhous* con una menor producción de carotenoides. Johnson (2003) reporta la mutante albina AF-1 y la mutante de licopeno YAN-1-OP (de color blanco y rosa, respectivamente) ambas procedentes de la cepa parental de *X. dendrorhous* UCD 67-385.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de la producción de carotenoides en las cepas Cs, XR y XP de *X. dendrorhous*\*.

<b>Cepa</b>	<b>P<sub>p</sub></b> <b>(μg carotenoides L<sup>-1</sup> h)</b>	<b>Y<sub>p/x</sub></b> <b>(μg carotenoides g<sup>-1</sup> células)</b>	<b>Y<sub>p/s</sub></b> <b>(μg carotenoides g<sup>-1</sup> sustrato)</b>
<b>Cs</b>	21.880	293.454	88.410
<b>XR</b>	50.064	509.071	184.214
<b>XP</b>	3.332	114.098	33.980

\*Los valores de desviación estándar para cada uno de los parámetros fueron inferiores al 10%.

Respecto a productividad de pigmentos (P<sub>p</sub>), Yamane *et al.* (1997) reportaron un valor de 56 μg L<sup>-1</sup> h para la cepa silvestre de *X. dendrorhous* ATCC 24202 creciendo en medio YM a pH 5.0 y Liu y Wu (2007) reportaron un valor de 79 μg L<sup>-1</sup> h para la cepa mutante de *X. dendrorhous* ENM 5 hiperproductora de carotenoides.

Loto *et al.* (2012) obtuvieron para cepas de *X. dendrorhous* valores de Y<sub>p/x</sub> similares a los de Cs y XR. En la cepa silvestre UCD 67-385 y en su mutante 385- *cyp61* reportaron un Y<sub>p/x</sub> de 290.1 y 555.1 μg g<sup>-1</sup>, respectivamente. El mayor rendimiento de carotenoides en la cepa mutante, en la que fue silenciado el gen codificante para una C22-esterol desaturasa *CYP61*, ha justificado la relación entre la baja producción de esteroides y la alta producción de carotenoides en *X. dendrorhous*. Yamane *et al.* (1997) reportaron un valor de Y<sub>p/s</sub> = 130 μg g<sup>-1</sup> para la cepa silvestre de *X. dendrorhous* ATCC 24202 en condiciones similares a las del presente trabajo: medio

YM y pH 5.0. Dicho valor se encuentra en el intervalo de lo obtenido para las cepas Cs, XR y XP.

## **6.2. ETAPA II: Perfil de carotenoides**

El perfil de carotenoides de las cepas Cs, XR y XP y adicionalmente de las cepas XY (de color amarillo) y XW (de color blanco) de *X. dendrorhous* fue evaluado en la fase estacionaria.

### **6.2.1. Identificación de carotenoides por TLC**

La técnica de TLC permitió la identificación de algunos de los carotenoides presentes en las cepas Cs, XR, XP, XY y XW de *X. dendrorhous*. Bajo luz visible se observó la presencia de astaxantina en la cepas Cs y XR, así como la presencia de  $\beta$ -caroteno en la cepa XY (Figura 6 a y b) con  $R_f$  de 0.34 y 0.88 respectivamente. Dichos valores fueron similares a los reportados por diversos autores bajo condiciones análogas de experimentación (Tabla 3).

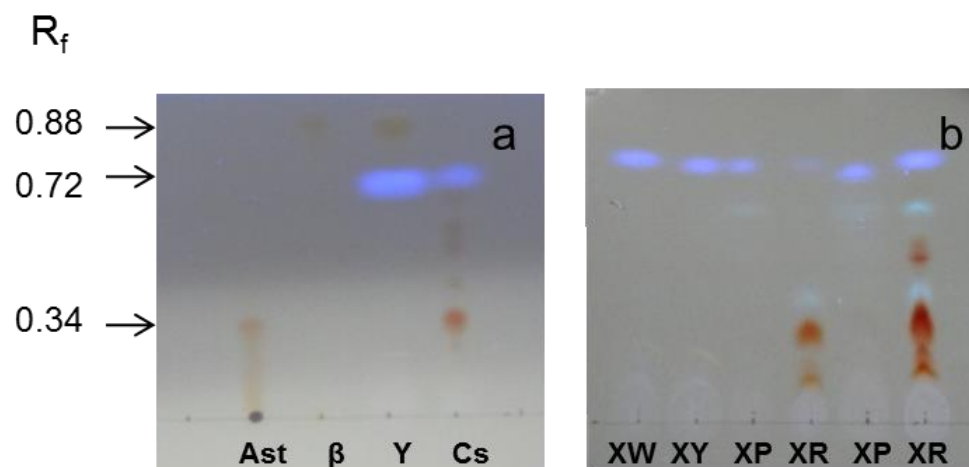


Figura 6. Perfil de carotenoides en TLC de las cepas Cs, XR, XP, XY y XW de *X. dendrorhous*, a partir de extracciones de biomasa de 87 h de cultivo y observado bajo luz visible y UV.

Los demás compuestos coloreados presentes en la placa, no fueron identificados debido a la falta de estándares para cada pigmento. Sin embargo, el fitoeno (precursor de la ruta de biosíntesis de carotenoides que no presenta coloración en luz visible) fue identificado en todas las cepas evaluadas, siendo el único compuesto presente en la cepa XW. Dicho precursor emitió fluorescencia bajo luz UV (254 nm) y tuvo un R<sub>f</sub> de 0.72 comparable al descrito en la literatura (Tabla 3).

Tabla 3. Valores de R<sub>f</sub> de diferentes pigmentos obtenidos a través de TLC, empleando placas de sílica gel.

<b>Sistema de solventes</b>	<b>β-caroteno</b>	<b>Fitoeno</b>	<b>Astaxantina</b>	<b>Referencia</b>
Acetona: éter de petróleo 20:80	0.88	0.72	0.34	Este trabajo
Acetona: éter de petróleo 15:85	0.86			(Hsieh <i>et al.</i> , 1974)
Acetona: éter de petróleo 30:70	0.91		0.35	(Matsui <i>et al.</i> , 2002)
Acetona: éter de petróleo 25:75	0.94			(Jaime <i>et al.</i> , 2005)
Acetona:hexano 25:75	0.96		0.5	(Sachindra <i>et al.</i> , 2005)
Éter etílico: hexano 20:80		0.7		(Schofield <i>et al.</i> , 2005)

### 6.2.2. Identificación y cuantificación de carotenoides por HPLC

Los carotenoides en las cepas Cs, XR, XP, XY y XW se identificaron teniendo en cuenta parámetros cromatográficos como tiempo de retención, espectro y máximos de absorción (Britton *et al.*, 2008) y se cuantificaron de acuerdo al área presente bajo la curva.



La astaxantina (producto final de la carotenogénesis en *X. dendrorhous*) y la foenicoxantina fueron los principales pigmentos identificados en las cepas XR y XP. Adicional a éstos, el  $\beta$ -caroteno fue el compuesto mayoritario en la cepa Cs. Los pigmentos, cantaxantina, hidroxietotoruleno, hidroxiceto- $\gamma$ -caroteno, ceto- $\gamma$ -caroteno, hidroxiequinenona, licopeno y  $\beta$ -caroteno (éste último, en el caso de las cepas XR y XP) estuvieron presentes como compuestos minoritarios. La Figura 7 muestra un cromatograma representativo para cada uno de los extractos de las cepas Cs, XR y XP en la fase estacionaria de crecimiento.

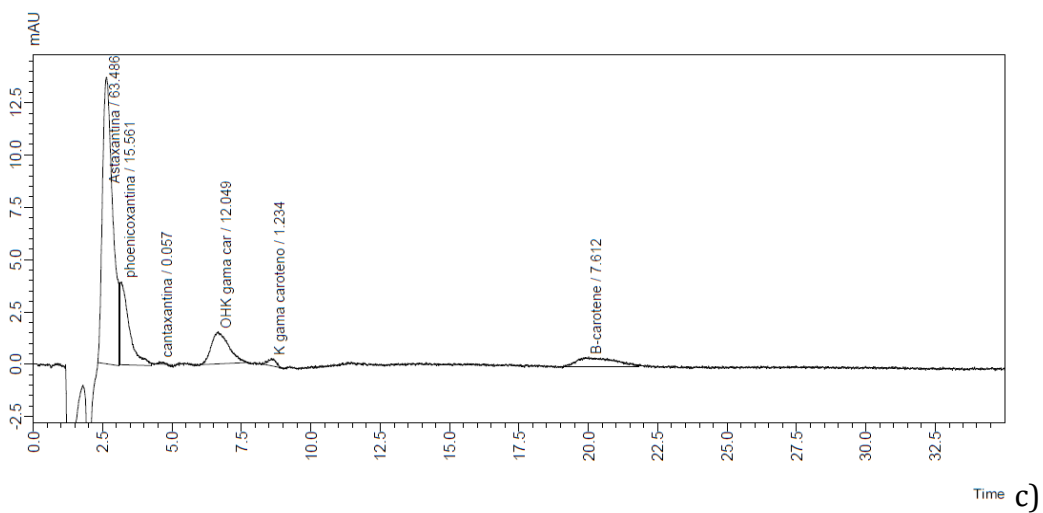
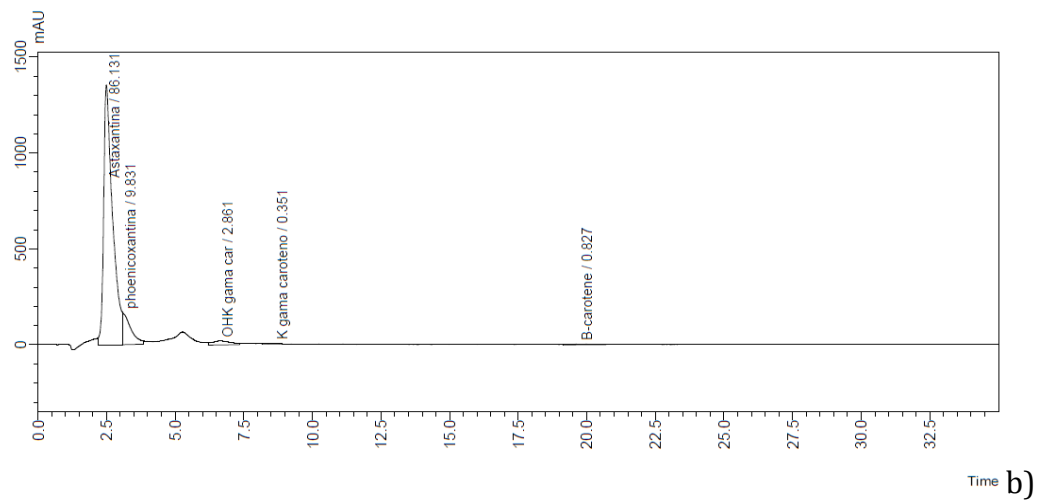
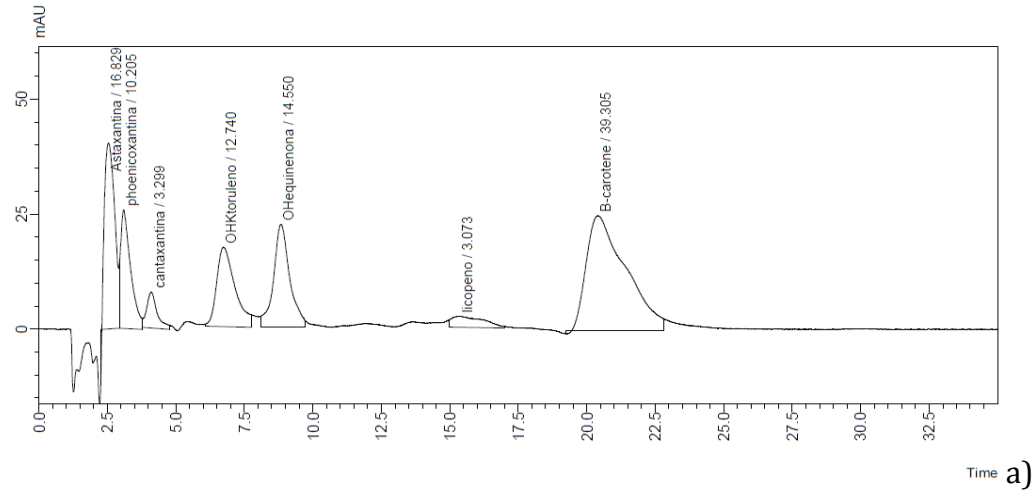


Figura 7. Perfiles representativos de carotenoides de las cepas: a) Cs, b) XR, c) XP de *X. dendrorhous* (474 nm), obtenidos a partir de extracciones de biomasa de 87 h de cultivo.

El  $\beta$ -caroteno fue el pigmento que se identificó en mayor concentración en la cepa XY, mientras que el hidroxiceto- $\gamma$ -caroteno, hidroxiequinenona y equinenona, estuvieron presentes como compuestos minoritarios.

Ningún compuesto coloreado fue identificado en la cepa XW, siendo el fitoeno (precursor incoloro de la biosíntesis de pigmentos e identificado bajo luz UV) el compuesto mayoritario (Figura 8).

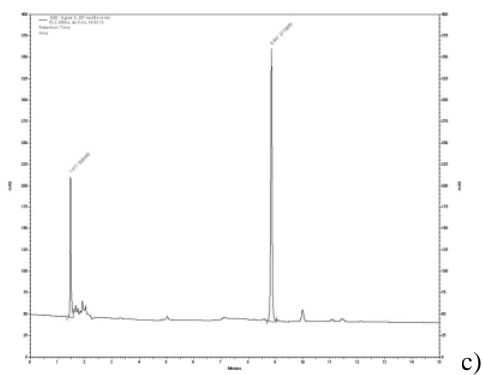
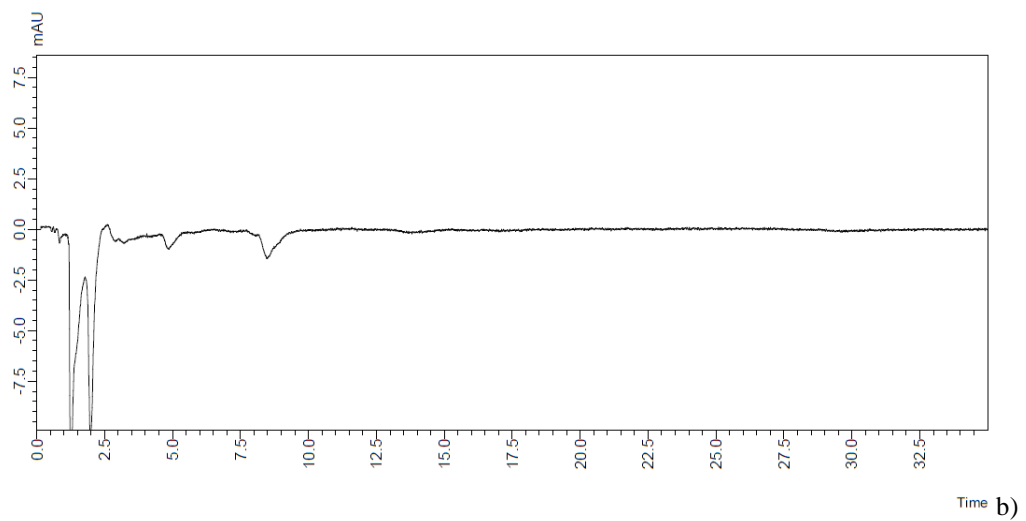
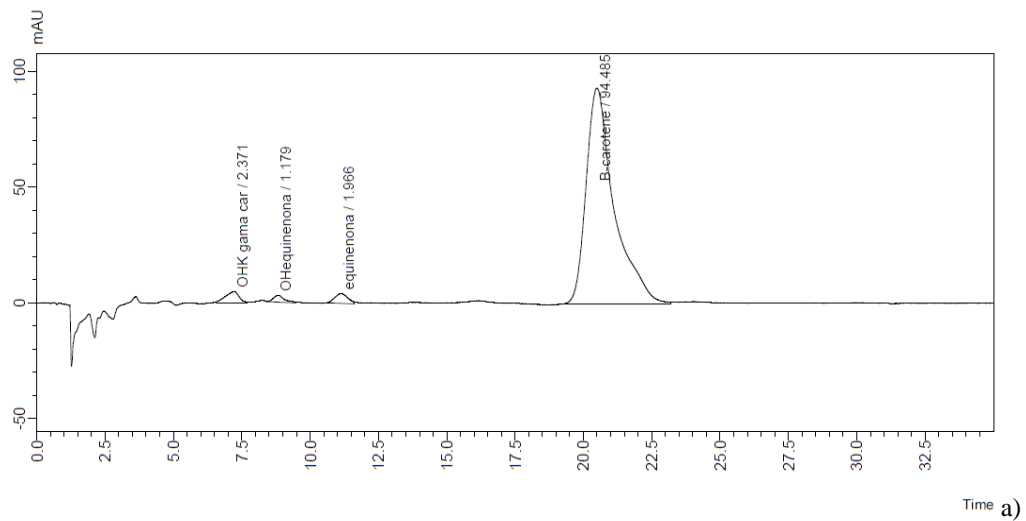


Figura 8. Perfiles representativos de carotenoides de las cepas: a) XY, b) XW (474 nm), c) XW (287 nm) de *X. dendrorhous* a), obtenidos a partir de extracciones de biomasa de 87 h de cultivo.

La cepa XR con el mayor contenido de carotenoides totales, presentó también la mayor concentración de astaxantina, siendo ésta, 5 y 11 veces superior a la alcanzada por las cepas Cs y XP respectivamente. La concentración de este pigmento correspondió al 86% del contenido de carotenoides totales en la cepa XR mientras que en las cepas Cs y XP correspondió al 24 y 41% (Tabla 4).

Tabla 4. Carotenoides identificados en las cepas Cs, XR, XP, XY y XW de *X. dendrorhous* en la fase estacionaria\*.

<b>Cepa</b>	<b>Cs</b>	<b>R</b>	<b>P</b>	<b>Y</b>	<b>W</b>
<b>Carot <math>\mu\text{g g}^{-1}</math></b>					
<b>Astaxantina</b>	69.385	438.468	48.436		
<b>Foenicoxantina</b>	39.947	50.047	27.755		
<b>Cantaxantina</b>	9.681		0.065		
<b>Hidroxietotoruleno</b>	37.386				
<b>Hidroxiceto-<math>\gamma</math>-caroteno</b>		14.564	24.560	2.226	
<b>Ceto-<math>\gamma</math>-caroteno</b>		1.787	1.408		
<b>Hidroxi equinenona</b>	32.698			1.107	
<b>Equinenona</b>				1.864	
<b>Licopeno</b>	9.0178				
<b><math>\beta</math>-caroteno</b>	95.342	0.712	8.685	88.702	
<b>Fitoeno</b>					203.953
<b>Carotenoides totales</b>	293.454	509.071	114.098	93.899	

\*Los valores de desviación estándar para cada uno de los parámetros fueron inferiores al 10%.

En la cepa Cs el  $\beta$ -caroteno fue el precursor de astaxantina presente en mayor proporción, representando el 32% de los carotenoides totales. En XR y XP constituyó el equivalente a 0.8 y 8% de este valor, respectivamente, mientras que en la cepa XY fue el pigmento mayoritario, equivalente al 89% del total de carotenoides (Tabla 4). La acumulación de  $\beta$ -caroteno en la cepa XY, puede estar indicando una afectación en el paso final de su ruta de biosíntesis de carotenoides, particularmente en la actividad de las enzimas CrtS (astaxantina sintasa) o CrtR (citocromo P450 reductasa), encargadas de la conversión de  $\beta$ -caroteno a astaxantina (Alcaíno *et al.*, 2008). En este sentido, Barbachano *et al.* (2014) reportaron para esta cepa una transición G  $\rightarrow$  A en la posición 1,649 de la secuencia del gen *crtS*. Dicha mutación se encuentra en una secuencia cercana al sitio de splicing del intrón 9 por lo que puede estar causando un procesamiento inadecuado del mRNA y alteraciones en la actividad de la proteína.

La foenicoxantina (intermediario último anterior a la astaxantina) fue identificada en las cepas Cs, XR y XP, siendo la cepa XR la que presentó la menor proporción respecto a astaxantina, 11% en relación con el 57% identificado para las cepas Cs y XP. Así mismo, en la cepa XR los compuestos intermediarios restantes constituyeron un menor porcentaje respecto a astaxantina que en las otras dos cepas (14% en relación con el 76 y 57% para las cepas Cs y XP respectivamente). Estos valores, así como la ausencia de subproductos de la ruta en la cepa XR (cantaxantina, hidroxicetotoruleno), puede estar indicando una mayor eficiencia en la biosíntesis de astaxantina en esta cepa, producto de la mayor conversión hacia el producto final.

Al observar con luz visible, en la cepa XW no se identificaron carotenoides, lo que coincide con los resultados obtenidos en TLC (Figura 6). Sin embargo, bajo luz UV, el fitoeno fue el compuesto presente en mayor proporción. Los 203.95  $\mu\text{g}$  de fitoeno  $\text{g}^{-1}$  de células cuantificados, fueron equivalentes al 70 y 40% de la concentración de carotenoides totales en las cepas Cs y XR respectivamente, mientras que respecto al contenido de carotenoides de la cepa XP, el valor de fitoeno en XW fue 79% superior. La acumulación de fitoeno en esta cepa, puede estar relacionada con el bloqueo de la ruta en la actividad de la enzima CrtI (fitoeno desaturasa), que da lugar a la formación de los primeros compuestos coloreados, neurosporeno y licopeno (Verdoes *et al.*, 1999).

Los pigmentos identificados y cuantificados en las cinco cepas, han sido previamente descritos en diferentes cepas silvestres y mutantes de *X. dendrorhous* (Schmidt *et al.*, 2011). Sin embargo la cantidad y proporción de cada uno de ellos, varía de acuerdo a la técnica de mutagénesis empleada (en procesos de mutagénesis al azar) (Contreras *et al.*, 2015) y a los genes que han sido sobreexpresados o silenciados en la búsqueda por dilucidar pasos clave en la ruta de biosíntesis de carotenoides (Alcaíno *et al.*, 2008; Breitenbach *et al.*, 2010; Loto *et al.*, 2012; Alcaíno *et al.*, 2014).

### **6.3. ETAPA III: Obtención del extracto crudo**

Se probaron diferentes metodologías para romper las células y obtener un extracto crudo. Se probó de manera independiente rompimiento con perlas de vidrio; licuadora; lisis alcalina; acetato de litio y polietilenglicol. Sin embargo en todos los

casos se logró una ruptura celular de *X. dendrorhous* cercana al 5% que se evaluó por observación y conteo directo al microscopio. Lo anterior, corroboró la dificultad para el rompimiento de la levadura, previamente reportada en literatura. *X. dendrorhous* se caracteriza por poseer una pared celular altamente resistente, compuesta principalmente de  $\beta$ -glucosa (1,3- $\beta$ -D-glucana, 1,6- $\beta$ -D-glucana),  $\alpha$ -glucosa (1,3- $\alpha$ -D-glucana) y un complejo de heteropolisacáridos (L- arabinosa, D-xilosa, D-ácido glucurónico, D-galactosa) (Gomes, 2004), lo que impidió tener un buen rompimiento celular y así obtener un perfil de proteínas confiable.

De las técnicas evaluadas, el empleo de enzimas líticas de *T. harzianum* y el empleo del sonicador junto con perlas de vidrio, nitrógeno líquido y un regulador de extracción, permitieron el porcentaje más alto de ruptura celular.

### **6.3.1. Enzimas líticas de *T. harzianum***

El empleo de estas enzimas permitió una ruptura celular aproximada del 50% en la cepa Cs, usando células en la fase de crecimiento exponencial. En el caso de las demás cepas y de los demás estadios de crecimiento, el porcentaje de ruptura continuó siendo bajo (5-10%), lo que podría estar relacionado con algunas modificaciones en la pared celular, producto del proceso mutagénico al que fueron sometidas las células y con la edad misma de los cultivos, respectivamente.



### **6.3.2. Sonicador**

En esta técnica se empleó de forma conjunta el sonicador, perlas de vidrio, nitrógeno líquido y un regulador de extracción. Se evaluó diferente número de ciclos de sonicación y se obtuvo una ruptura cercana al 50% tanto en la cepa Cs como en las mutantes XR y XP. Igual que la técnica anterior, la ruptura celular se vio favorecida cuando el cultivo se encontró en su fase de crecimiento exponencial.

## **6.4. ETAPA IV: Perfil de proteínas**

Con el fin de obtener un perfil de proteínas de *X. dendrorhous* en el que se pudiera identificar alguna de las proteínas de la ruta de la carotenogénesis, se plantearon dos estrategias. I) la obtención de un extracto crudo y II) la purificación parcial del mismo a través de centrifugación diferencial, que permitiera la obtención de una fracción rica en proteínas de membrana que es en donde se localizan las principales proteínas relacionadas con la biosíntesis de carotenoides (Alcaíno *et al.*, 2012).

### **6.4.1. Electroforesis en una dimensión**

#### **6.4.1.1. Enzimas líticas de *T. harzianum***

El extracto crudo de la cepa Cs obtenido con por lisis enzimática, se recuperó a partir de la fase 0.6 M de un gradiente de sacarosa y se sometió a electroforesis en condiciones desnaturizantes con el fin de conocer en que intervalo de masa

molecular se encontraban las proteínas del extracto crudo. Se corrió la fracción obtenida directamente de la fase 0.6 M de sacarosa y además, dicha fracción adicionada con agua para facilitar el rompimiento de protoplastos y la liberación de proteínas (Figura 9).

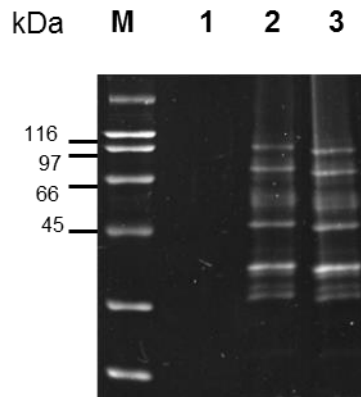


Figura 9. SDS-PAGE. Perfil de proteínas de la cepa Cs de *X. dendrorhous* obtenido por ruptura celular con enzimas líticas de *T. harzianum* 64 mg mL<sup>-1</sup>. M: marcador de masa molecular de amplio intervalo (BioRad); 1: blanco de enzima 33 µg; 2: proteínas en la fracción 0.6 M de sacarosa; 3: proteínas en la fracción 0.6 M de sacarosa + H<sub>2</sub>O. Se cargaron 40 µg de proteína en cada carril.

Las proteínas de los carriles señaladas con los números 2 y 3 presentan un patrón similar, por lo que la adición de agua para facilitar el rompimiento de protoplastos (generados tras el tratamiento con enzimas las enzimas líticas) y la posterior liberación de proteínas, no presentó un efecto significativo.

### 6.4.1.2. Sonicador

Los extractos crudos de cada una de las tres cepas obtenidos a 20, 35 y 50 ciclos de sonicación, también fueron sometidos a electroforesis en condiciones desnaturalizantes (Figura 10).

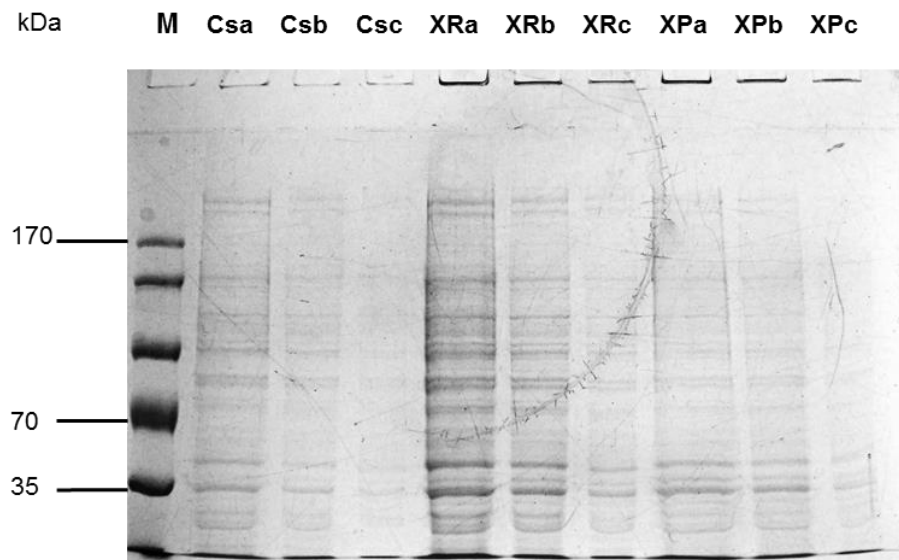


Figura 10. SDS-PAGE. Perfil de proteínas del extracto celular de las cepas Cs, XR y XP de *X. dendrorhous* obtenido a diferentes ciclos de ruptura celular empleando sonicador, perlas de vidrio, nitrógeno líquido y regulador de extracción. M: marcador de masa molecular de amplio intervalo (BioRad). a: 20; b: 35 y c: 50 ciclos de sonicación.

El número de ciclos en el sonicador empleado para la ruptura celular, influyó en el perfil de bandas obtenido. Para todas las cepas, un tratamiento con 20 ciclos de sonicación permitió obtener una mejor calidad en el perfil de proteínas (Figura 10).

Con el empleo de enzimas líticas y tratamiento con sonicador (Figura 9 y 10) se observó la presencia de bandas proteicas a lo largo de los valores de masa molecular de los marcadores empleados. Es importante resaltar las bandas localizadas entre 30 y 80 kDa, ya que es el intervalo de masa molecular teórico para las proteínas de la ruta de carotenogénesis. Idi: 28.8; CrtE: 42.2; CrtYB: 74.7; CrtI: 65.1; CrtS: 62.6 y CrtR: 81.9 kDa. Con base en lo anterior se decidió usar estos extractos para el análisis del perfil proteico mediante la separación en 2D-PAGE.

#### **6.4.1.3. Proteínas obtenidas por centrifugación diferencial**

Con el fin de obtener una fracción rica en proteínas de membrana que es en donde se localizan las principales proteínas relacionadas con la carotenogénesis (Alcaíno *et al.*, 2012), se llevó a cabo el proceso de purificación parcial de un extracto crudo a través de centrifugación diferencial.

Para la obtención del extracto crudo se emplearon de manera independiente: el equipo de Fast-Prep, la mini prensa francesa, el homogenizador tipo Potter y el tolueno (que generaron una ruptura cercana al 5%) así como la molienda en mortero con arena, que permitió el porcentaje más alto de ruptura celular, de aproximadamente 50%.

El extracto crudo obtenido a partir de la molienda en mortero con arena, fue el que se sometió a centrifugación diferencial, con lo que se logró la separación de organelos y membranas. La aplicación de un gradiente de sacarosa, permitió la obtención de tres

fracciones que fueron recolectadas y corridas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (Figura 11).

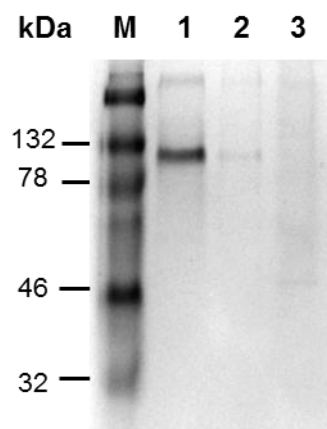


Figura 11. SDS-PAGE. Proteínas de membrana de *X. dendrorhous* obtenidas a través de centrifugación diferencial. M: marcador de masa molecular Kaleidoscope prestained standards (BioRad), carriles 1 y 2 correspondientes a las dos primeras fracciones.

En los carriles 1 y 2 correspondientes a las dos primeras fracciones de proteínas de membrana, se observó una banda que corrió a la misma altura y que se localizó entre los 78 y 132 kDa. Debido a que los datos de masa molecular de enzimas como la CrtYB y CrtR se encuentran dentro de este intervalo, la banda de mayor intensidad, obtenida en el carril 1, se envió a secuenciar y correspondió a una ATP sintasa mitocondrial. Contrario a lo que se esperaba, a pesar de que la ultracentrifugación permitió la separación de esta proteína transmembranal, no permitió la separación de otras, también localizadas en membrana, como es el caso de las proteínas de interés.

### 6.4.2. Electroforesis en dos dimensiones

La separación de proteínas a través de geles en dos dimensiones permite la identificación de las mismas por su masa molecular así como por su punto isoeléctrico. De los dos extractos proteicos obtenidos, a través de enzimas líticas de *T. harzianum* y tratamiento con sonicador, sólo se tuvieron resultados reproducibles con el extracto crudo de proteínas obtenido con sonicador en la cepa Cs (Figura 12).

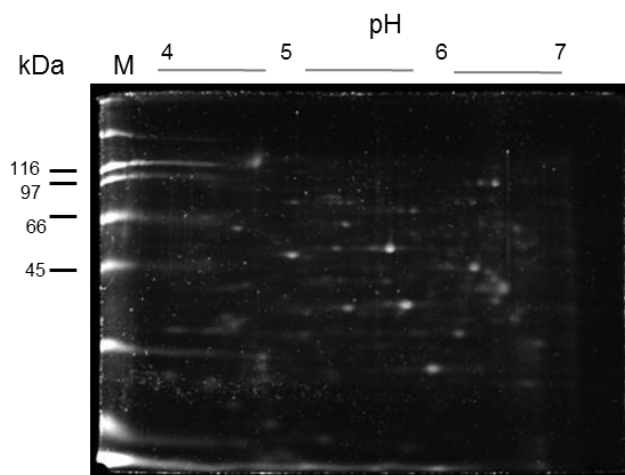


Figura 12. Perfil representativo de proteínas de la cepa Cs de *X. dendrorhous* obtenido a través de 20 ciclos en sonicador, perlas de vidrio, nitrógeno líquido y regulador de extracción. M: marcador de peso molecular de amplio intervalo (BioRad).

El patrón obtenido, permitió la identificación de manchas definidas dentro de los valores de punto isoeléctrico reportados para las proteínas de interés: Idi: 4.92, CrtE: 5.09; CrtYB: 6.17; CrtI: 6.17; CrtS: 5.59 y CrtR: 5.35 ([web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)). Sin embargo, al correlacionar dichos valores con la masa molecular de cada una de éstas, sólo se identificaron manchas cercanas a las coordenadas teóricas de las proteínas CrtI y CrtYB.

Se seleccionó una de las manchas con coordenadas cercanas a las descritas para CrtI y CrtYB y se envió a secuenciar, dando como resultado una proteína hipotética conservada. Este tipo de proteínas con función no determinada ha sido reportado para *X. dendrorhous* en geles 2-DE donde constituyen el 13% de las proteínas analizadas durante diferentes etapas del crecimiento de la levadura (Martínez *et al.*, 2011). Es importante tener en cuenta que la extracción de proteínas empleada para los geles 2-DE se llevó a cabo durante la fase de crecimiento exponencial, debido a la dificultad de la ruptura celular.

La ausencia de proteínas relacionadas con la carotenogénesis en las manchas seleccionadas, podría deberse a que en la célula ocurren modificaciones postraduccionales de algunas proteínas como la fosforilación, glicosilación, etc., que pueden modificar su punto isoeléctrico y masa molecular. Así mismo pueden ocurrir modificaciones como la carboximetilación o la oxidación de la metionina, generadas por compuestos como el DTT y la yodometilamina que se emplean para mantener la desnaturación de las proteínas durante el lavado de las tiras tras el isoelectroenfoque. Martínez *et al.* (2011), identificaron proteínas de *X. dendrorhous* (entre éstas CrtYB) en sitios distintos del intervalo teórico descrito para su ubicación en geles 2-DE, reportando como posibles causas las modificaciones mencionadas anteriormente.

Debido a que la obtención del perfil de proteínas en una dimensión (incluido el aislamiento de la fracción correspondiente a proteínas de membrana) y dos dimensiones no permitió la identificación de proteínas relacionadas con la

carotenogénesis, se optó por realizar pruebas de actividad para dos de las enzimas (CrtI y CrtYB en su actividad de licopeno ciclasa) Se emplearon los extractos crudos provenientes de ruptura con sonicador, que fue una de las metodologías con la que se alcanzó mayor porcentaje de ruptura celular ( $\approx 50\%$ ) y con la que se logró una relativa reproducibilidad en geles de proteínas 2-DE.

El fitoeno (sustrato para la enzima CrtI) no se encuentra disponible comercialmente y se obtuvo a partir de la cepa XW que lo produce como compuesto mayoritario ( $\approx 85\%$ ). La cepa mutante se cultivó en reactor, la biomasa obtenida se liofilizó y se realizaron extracciones para ser inyectadas en el HPLC. Se recolectaron las inyecciones y se obtuvieron  $\approx 75 \mu\text{g}$  de fitoeno puro que fueron alicuotados para su posterior uso.

La evaluación de la actividad enzimática CrtI y CrtYB no arrojó resultados positivos. Los sustratos fueron identificados a través de TLC y HPLC pero no se observó la formación de producto.

Algunos de los inconvenientes que se presentaron durante la determinación de la actividad fueron: (1) La adherencia de la suspensión de lípidos de lecitina a la columna de HPLC (empleada para facilitar el contacto de la enzima con el sustrato (Raisig *et al.*, 1996; Schnurr *et al.*, 1996; Breitenbach *et al.*, 2001)), (2) la disminución en la concentración de los sustratos tras el tiempo de incubación, sin la aparición consiguiente de producto y (3) la naturaleza e inestabilidad de cofactores como el



FAD y el NAD, así como la concentración de diversas sales empleadas durante las reacciones de actividad.

Es importante tener en cuenta que a la fecha no existen reportes de actividad para ninguna de las enzimas relacionadas con la carotenogénesis en *X. dendrorhous* y que quizá, además de los inconvenientes ya mencionados, uno de los principales cuellos de botella siga siendo la obtención y purificación de este tipo de enzimas debido a su localización transmembranal.

Ahora bien, con el fin de lograr un acercamiento genético al funcionamiento de la ruta de formación de carotenoides en *X. dendrorhous* y de identificar posibles explicaciones a la acumulación diferencial de pigmentos entre la cepa silvestre y mutantes, se llevó a cabo la secuenciación de genes, identificación de mutaciones y análisis de la expresión de los genes involucrados en la ruta. En este sentido, la cepa R fue la mutante seleccionada, debido a que es la mutante con mayor producción de astaxantina, el carotenoide de mayor interés biotecnológico e industrial acumulado por la levadura.

**6.5. ETAPA V: Análisis de la expresión diferencial de los genes *idi*, *crtE*, *crtYB*, *crtl*, *crtS* y *crtR* relacionados con la carotenogénesis durante cinéticas de crecimiento de las cepas silvestre y mutante XR de *X. dendrorhous***

Los resultados y discusión del análisis de la expresión diferencial de los genes *idi*, *crtE*, *crtYB*, *crtl*, *crtS* y *crtR*, se describen en el artículo “Carotenoid production and gene expression in an astaxanthin overproducing *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant strain” (Anexo 1 del presente trabajo).

**6.6. ETAPA VI: Amplificación y secuenciación de los genes *idi*, *crtE*, *crtYB*, *crtl*, *crtS* y *crtR* e identificación de sus mutaciones entre la cepa silvestre y mutante XR de *X. dendrorhous***

Los resultados y discusión de la ampificación y secuenciación de los genes *idi*, *crtE*, *crtYB*, *crtl*, *crtS* y *crtR*, así como la identificación de sus mutaciones entre cepas, se describen en el artículo “Carotenoid production and gene expression in an astaxanthin overproducing *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant strain” (Anexo 1 del presente trabajo).

## 7. CONCLUSIONES

El comportamiento cinético de las cepas mutantes XR y XP de *X. dendrorhous* es muy similar al de la cepa silvestre. La producción de carotenoides totales está parcialmente asociada al crecimiento cuando las cepas crecen en reactor y no está asociada al crecimiento cuando se cultivan en matraz.

La producción diferencial de pigmentos en cada cepa está directamente relacionada con los fenotipos observados. Las cepas XR, XY y XW sintetizan astaxantina,  $\beta$ -caroteno y fitoeno como compuestos mayoritarios, respectivamente, mientras que las cepas Cs y XP producen astaxantina y diversos compuestos intermediarios en diferentes concentraciones.

La mayor acumulación de astaxantina y carotenoides totales de la cepa XR respecto a la cepa Cs se relaciona con el incremento en la expresión del gen *crtE*, cuya enzima geranilgeranil pirofosfato sintasa es la encargada de la generación de precursores de la ruta y *crtS*, cuya enzima astaxantina sintasa actúa en el último paso de la biosíntesis de pigmentos catalizando la formación de astaxantina a partir de  $\beta$ -caroteno.

Los cambios en la secuencia de la región promotora de los genes *crtYB* y *crtR* (que codifican para las enzimas fitoeno sintasa-licopeno ciclasa y citocromo P450 reductasa) así como en el ORF de los genes *crtI* y *crtR* (que codifican para las

enzimas fitoeno desaturasa y citocromo P450 reductasa) de la cepa XR, sugieren ser los responsables del mayor contenido de carotenoides totales y astaxantina.

## **8. PERSPECTIVAS**

Realizar una segunda ronda de mutagénesis de la cepa XR de *X. dendrorhous* y evaluar la estabilidad, crecimiento y producción de carotenoides de las mutantes obtenidas.

Combinar técnicas de mutagénesis convencional con técnicas de ingeniería genética dirigidas al silenciamiento o sobreexpresión de genes específicos de la ruta de carotenoides en *X. dendrorhous* para lograr una conversión eficiente de compuestos intermediarios y el direccionamiento de la ruta hacia una mayor producción de astaxantina.

Identificar las proteínas Idi, CrtE, CrtYB, CrtI, CrtS y CrtR relacionadas con la ruta de biosíntesis de carotenoides en *X. dendrorhous* y comparar su expresión entre las cepas mutantes y silvestres.

Determinar la actividad enzimática de las proteínas de la carotenogénesis y su relación con los niveles de transcrito en las cepas de *X. dendrorhous*.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aksu Z., Eren A. T. (2005) Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochem.* **40**:2985-2991.

Alcaíno J., Barahona S., Carmona M., Lozano C., Marcoleta A., Niklitschek M., Sepúlveda D., Baeza M., Cifuentes V. (2008) Cloning of the cytochrome P450 reductase (*crtR*) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *X. dendrorhous*. *BMC Microbiol* **8**:169.

Alcaíno J., Fuentealba M., Cabrera R., Baeza M., Cifuentes V. (2012) Modeling the interfacial interactions between CrtS and CrtR from *Xanthophyllomyces dendrorhous*, a P450 system involved in astaxanthin production. *J. Agric. Food Chem.* **60**:8640-8647.

Alcaíno J., Romero I., Niklitschek M., Sepúlveda D., Rojas M. C., Baeza M., Cifuentes V. (2014) Functional Characterization of the *Xanthophyllomyces dendrorhous* farnesyl pyrophosphate synthase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoding genes that are involved in the synthesis of isoprenoid precursors. *PLoS ONE* **9**:e96626.

Alcaíno J., Baeza M., Cifuentes V. (2014) Astaxanthin and Related Xanthophylls. In: Martín J. F. *et al.* (eds) *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites*, Fungal Biology, 1st ed. Springer Science and Business Media, pp 187-208.

An G., Schuman D., Johnson E. (1989) Isolation of *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutants with increased astaxanthin content. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:116-124.

Barbachano A. (2008) Estimulación de la carotenogénesis para la producción de astaxantina en una mutante de *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*). Tesis de Maestría, Dpto. de Biotecnología CINVESTAV-IPN, México, D.F.

Barbachano-Torres A., Castelblanco-Matiz L. M., Ramos-Valdivia A.C., Cerda-García-Rojas C.M., Salgado-Rodríguez L.M., Flores-Ortiz C., Ponce-Noyola T. (2014) Analysis of proteomic changes in colored mutants of *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). Arch. Microbiol. **196**:411-421.

BCC Research (2015) The global market for carotenoids (FOD025C). <http://www.bccresearch.com>. Fecha de acceso 20 junio 2015.

Becker E. W. (2004) Microalgae in human and animal nutrition. In: Richmond A. (ed) Handbook of microalgal culture, biotechnology and applied phycology, 1st ed. Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom, pp 39.

Berthelot K., Estevez Y., Deffieux A., Peruch F. (2012) Isopentenyl diphosphate isomerase: A checkpoint to isoprenoid biosynthesis. Biochimie **94**:1621-1634.

Bhosale P. (2004) Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. **63**:351-361.

Breitenbach J., Visser H., Verdoes J., van Ooyen A., Sandmann G. (2010) Engineering of geranylgeranyl pyrophosphate synthase levels and physiological conditions for enhanced carotenoid and astaxanthin synthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Biotechnol. Lett. **33**:755-761.

Breitenbach J., Zhu C., Sandmann G. (2001) Bleaching herbicide norflurazon inhibits phytoene desaturase by competition with the cofactors. J. Agric. Food Chem. **49**:5270-5272.

Breithaupt D. (2007) Modern application of xanthophylls in animal feeding-a review. Trends Food Sci. Technol. **18**:501-506.

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

Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (2008) Carotenoids Handbook. 2nd ed. Birkhäuser Verlag, Switzerland pp 1-270.

Cardozo K., Guaratini T., Barros M., Falcao V., Tonon A., Lopes N., Campos S., Torres M., Souza A., Colepicolo P. (2007) Metabolites from algae with economical impact. Comp. Biochem. Physiol. **146**:60-78.

Certík M., Hanusová V., Breierová E., Márová I., Rapta P. (2009) Biotechnological production and properties of carotenoid pigments. In: Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. Taylor & Francis Group pp 355-375.

Chimsung N., Tantikitti C., Milley J. E., Verlhac-Trichet V., Lall S.P. (2014) Effects of various dietary factors on astaxanthin absorption in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquac. Res. **45**:1611-1620.

Cifuentes V., Alcaíno J. (2009) Uso de gen en la síntesis de astaxantina. Patente. Organización mundial de la propiedad intelectual, número de publicación internacional WO 2009/149578 A1. 59 p.

Cifuentes V., Niklitschek M., Marcoleta A. (2010) Gen de *X. dendrorhous*, método y estructura nucleotídica que permiten generar transformantes de manera específica y selectiva, útil para la evaluación y modificación genética de organismos. Patente. Organización mundial de la propiedad intelectual, número de publicación internacional WO 2010/012118 A1. 60 p.



Contreras G., Barahona S., Rojas M., Baeza M., Cifuentes V., Alcaíno J. (2013) Increase in the astaxanthin synthase gene (*crtS*) dose by in vivo DNA fragment assembly in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Biotechnol.* **13**:84-94.

Contreras G., Barahona S., Sepúlveda D., Baeza M., Cifuentes V., Alcaíno J. (2015) Identification and analysis of metabolite production with biotechnological potential in *Xanthophyllomyces dendrorhous* isolates. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **31**:517-526.

De Boer L., Van Hell B., Krouwer A. (1998) Cepas de *Xanthophyllomyces dendrorhous* que tienen una alta concentración intracelular de astaxantina y una baja concentración intracelular de HDCO. Traducción de patente europea, número de publicación 2 115 637. 11 p.

Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P., Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**:350-356.

Fraser P., Bramley P. (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid Res.* **43**:228-265.

Frengova G., Beshkova D. (2009) Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeast of biotechnological importance. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**:163-180.

Gassel S., Schewe H., Schmidt I., Schrader J., Sandmann G. (2013) Multiple improvement of astaxanthin biosynthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous* by a combination of conventional mutagenesis and metabolic pathway engineering. *Biotechnol. Lett.* **35**:565-569.

Golubev W. I. (1995) Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Yeast* **11**:101-110.

Gomes D. (2004) Otimização da produção de biomassa e astaxantina pela levedura *Phaffia Rhodozyma*, utilizando processo descontínuo alimentado. Tesis de Maestría. Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

Goswami G., Chaudhuri S., Dutta D. (2010) The present perspective of astaxanthin with reference to biosynthesis and pharmacologic importance. World J. Microbiol. Biotechnol. **26**:1925-1939.

Guerin M., Huntley M., Olaizola M. (2003) *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. Trends Biotechnol. **21**:210-216.

Higuera I., Félix L., Goycoolea F. (2006) Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. **46**:185-196.

Johnson E. A. (2003) *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. Int. Microbiol. **6**:169-174.

Kaiser P., Surmann P., Vallentin G., Fuhrmann H. (2007) A small-scale method for quantitation of carotenoids in bacteria and yeasts. J. Microbiol. Methods **70**:142-149.

Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**:680-685.

Liu Y., Wu J. (2006) Hydrogen peroxide-induced astaxanthin biosynthesis and catalase activity in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **73**:663-668.

Liu Y., Wu J. (2007) Optimization of cell growth and carotenoid production of *Xanthophyllomyces dendrorhous* through statistical experiment design. Biochem. Eng. J. **36**:182-189.

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

Lorenz R., Cysewski G. (2000) Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.* **18**:160-167.

Loto I., Gutiérrez M. S., Barahona S., Sepúlveda D., Martínez-Moya P., Baeza M., Cifuentes V., Alcaíno J. (2012) Enhancement of carotenoid production by disrupting the C22-sterol desaturase gene (CYP61) in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiol.* **12**:235-251.

Margalith P. (1999) Production of ketocarotenoids by microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**:431-438.

Martínez P., Watt S., Niehaus K., Alcaíno J., Baeza M., Cifuentes V. (2011) Proteomic analysis of the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiol.* **11**:131-144.

Meléndez A., Vicario I., Heredia F. (2007) Pigmentos carotenoides: Consideraciones estructurales y fisicoquímicas. *Arch. Latinoam. Nutr.* **57**:109-117.

McNulty H., Jacob R. F., Mason P. (2008) Biologic activity of carotenoids related to distinct membrane physicochemical interactions. *Am. J. Cardiol.* **101**: 20-29.

Naturxan (2015) Naturxan products Aquasta. <http://www.naturxan.com/products/aquasta.html> Fecha de acceso 27 Marzo 2015.

Nomura M. Takagi H. (2004) Role of the yeast acetyltransferase Mpr1 in oxidative stress: Regulation of oxygen reactive species caused by a toxic proline catabolism intermediate. *PNAS* **101**:12616-12121.

Ojima K., Breitenbach J., Visser H., Setoguchi Y., Tabata K., Hoshino T., Berg J., 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. Genet. Genomics* **275**:148-158.

Olaizola M. (2000) Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25000 liter outdoor photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* **12**:499-506.

Packer L., Douce R. (1987) Plant cell membranes. *Methods in Enzymology*. Vol 148. Academic Press, New York pp 106-111.

Pashkow F. J., Watumull D. G., Campbell C. L. (2008) Astaxanthin: A novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.* **101**:58-68.

Raisig A., Bartley G., Scolnik P., Sandmann, G. (1996) Purification in an active state and properties of the 3-step phytoene desaturase from *Rhodobacter capsulatus* overexpressed in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **119**:559-564.

Retamales P., León R., Martínez C., Hermosilla G., Pincheira G., Cifuentes V. (1998) Complementation analysis with new genetic markers in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Antonie van Leeuwenhoek.* **73**:229-236.

Rodríguez-Sáiz M., de la Fuente J., Barredo J. (2010) *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88**:645-658.

Schmidt I., Schewe H., Gassel S., Jin Ch., Buckingham J., Hümbelin M., Sandmann G., Schrader J. (2011) Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma*/*Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**:555-571.

Schnurr G., Misawa N., Sandmann G. (1996) Expression, purification and properties of lycopene cyclase from *Erwinia uredovora*. *Biochem. J.* **315**:869-874.

Schroeder W., Johnson E. (1995) Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *J. Biol. Chem.* **31**:18374-18379.

Sedmak J., Weerasinghe D., Jolly S. (1990) Extraction and quantification of astaxanthin from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnology Techniques* **4**:107-112.

Sies H., Stahl W. (2004) Carotenoids and UV protection. *Photochem. Photobiol. Sci.* **3**:749-752.

Storebakken T., Sorensen M., Bjerkgeng B., Hiu S. (2004) Utilization of astaxanthin from red yeast, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects of enzymatic cell wall disruption and feed extrusion temperature. *Aquaculture*. **236**:391-403.

Ukibe K., Hashida K., Yoshida N., Takagi H. (2009) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for astaxanthin production and oxidative stress tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:7205-7211.

Vázquez M., Santos V. (1998) 3-Hydroxy-3', 4'-didehydro-beta-psicarten-4-one (HDCO) from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) cultivated on xylose media. *Biotechnol. Lett.* **20**:181-182.

Verdoes J. C., Misawa N., van Ooyen A. J. J. (1999) 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., van Ooyen A. (2003) Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:3728-3738.

Visser H., van Ooyen A., Verdoes J. (2003) Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *FEMS Yeast Research* **4**:221-231.

Xu Z., Tian B., Sun Z., Lin J., Hua Y. (2007) Identification and functional analysis of a phytoene desaturase gene from the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology.* **153**:1642-1652.

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

## 10. ANEXO 1

---