



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE

BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

“Efecto del cobre en la producción de carotenoides por *Phaffia rhodozyma*”

T E S I S

Que presenta

ANAHÍ MARTÍNEZ CÁRDENAS

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOTECNOLOGÍA**

Director de Tesis: Dr. Luis Bernardo Flores Cotera

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Luis Bernardo Flores Coterá

Dra. María Eugenia Hidalgo Lara

Dra. Jazmin Vásquez Bahena

Dr. Jaime Ortega López

Dr. Luc Dendooven

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, el Dr. Luis Bernardo Flores Cotera, quién a lo largo de estos años me brindó su apoyo y mantuvo constante su enseñanza durante la dirección y desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Jazmin M. Vásquez Bahena por su apoyo, sus recomendaciones y aportaciones para el desarrollo de este trabajo. Por su confianza y amistad que considero muy valiosas.

A la Dra. Ma. Eugenia Hidalgo Lara, al Dr. Jaime Ortega López y al Dr. Luc Dendooven por los consejos y contribuciones que fueron oportunos para la realización de este trabajo.

Al Q. Fernando Maldonado García, a la Dra. Zoila Flores Bustamante y al C. Humberto Morales por el apoyo técnico, por las enseñanzas compartidas, consejos y sobre todo, por el lazo de amistad formado durante los años de mi permanencia en esta institución.

A mis amigos Cipriano Chávez, Itzel Juárez, Lory Rochin, Jorge Ruíz, Berenice García, Juan M. Jiménez, Noemí Rivera, Ana L. Arámbula, Pablo López. Gracias por hacer de estos años en Cinvestav unos bonitos y gratos años.

Al CINVESTAV por el apoyo en infraestructura para la realización de este proyecto.

A la Dirección de Planeación y Operación de Becas del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca de doctorado con número de registro 46466.

DEDICATORIAS

A mis padres, Aurora Cárdenas y Rodolfo Martínez, quienes han sido el pilar de mi vida y motor fundamental de todos mis logros. Gracias por su amor infinito, por su completa confianza, los amo.

A Ricardo Alonso Castro por su apoyo incondicional, porque no me ha dejado caer y por demostrarme que sólo con esfuerzo se consiguen las metas. Gracias por toda la complicidad.

A mis hermanos, Claudia, Christian y Rodolfo; mis confidentes durante toda la vida, gracias por creer en mí.

A mis tios Josefina y Santiago, mis primos Samuel, Rosendo, Laura y Javier, quienes me abrieron las puertas de su casa el día que decidí iniciar mis estudios en esta ciudad. Gracias por su respaldo, sus consejos y su cariño.

A mi segunda familia, Angeles Salado y Ricardo Castro L., gracias por su apoyo y respaldo éstos últimos años, han significado mucho para mi.

A mis amigas y amigos entrañables, Elina Contreras, Briseida Cámez, Erika López, Julieta Leyva, Nabil Valenzuela, Jennifer Saquelares, Gabriela Martínez, Román Rodríguez, Julio Méndez, Johan Rodríguez; por compartir las alegrías y las penas de todo este proceso.

ÍNDICE

	Pág.
1. RESUMEN	8
2. ABSTRACT	9
3. INTRODUCCIÓN.....	10
3.1 <i>Phaffia rhodozyma</i>	10
3.2 Biosíntesis de astaxantina	11
3.3 Función biológica de la astaxantina	13
3.4 Metabolismo oxidativo	16
4. ANTECEDENTES	17
4.1 Factores que modulan la síntesis de astaxantina en <i>P. rhodozyma</i>	17
4.1.1 Niveles de oxígeno en el medio de cultivo.....	17
4.1.2 Tipo de fuente de carbono	17
4.1.3 Metabolismo de Etanol.....	18
4.1.4 Deficiencia de nitrógeno.....	19
4.1.5 Deficiencia de cobre	20
4.1.6 Inhibidores de la respiración & respiración alternativa.....	21
5. JUSTIFICACIÓN.....	24
6. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	25
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
7.1 <i>Phaffia rhodozyma</i> NRRL-Y-10922.....	26
7.2 Fermentaciones con y sin cobre	27
7.2.1 Toma y almacenamiento de muestras.....	28
7.2.2 Determinaciones analíticas	29
7.2.2.1 Análisis de biomasa	29
7.2.2.2 Análisis de azúcares	29
7.2.2.3 Análisis de etanol	29

7.2.2.4	Análisis de proteína	30
7.2.2.5	Extracción y análisis de carotenoides	30
7.2.2.6	Análisis de carotenoides por HPLC.....	31
7.2.3	Análisis molecular	32
7.2.3.1	Extracción de RNA total y síntesis de DNA complementario (cDNA)	32
7.2.3.2	Obtención de secuencias de <i>aox</i> , <i>asy</i> y <i>adki</i> de <i>P. rhodozyma</i> NRRL-Y-10922	33
7.2.3.2.1	Secuencia parcial de <i>aox</i>	33
7.2.3.2.2	Secuencia parcial de <i>asy</i>	33
7.2.3.2.3	Secuencia parcial de <i>adki</i>	34
7.2.3.3	Análisis secuencias	34
7.2.3.4	Diseño de sondas TaqMan.....	35
7.2.3.5	Ensayos de expresión	35
7.2.4	Análisis estadístico	36
8.	RESULTADOS	37
8.1	Fermentaciones	37
8.1.1	Fermentación con cobre.....	37
8.1.1.1	Perfiles de biomasa, oxígeno disuelto, proteína, azúcares y etanol.....	37
8.1.1.2	Determinación de carotenoides por HPLC	40
8.1.1.3	Expresión de <i>asy</i> y <i>aox</i>	41
8.1.2	Fermentación sin cobre.....	43
8.1.2.1	Perfiles de biomasa, oxígeno disuelto, proteína, azúcares y etanol.....	43
8.1.4.2	Determinación de carotenoides por HPLC	47
8.1.4.3	Expresión de <i>asy</i> y <i>aox</i>	48
9.	DISCUSIÓN.....	50
9.1	Consideraciones generales	50
9.2	Repercusiones del déficit de cobre en el consumo de oxígeno.....	50
9.3	Posible efecto de la deficiencia de cobre en el estado redox del par NADH/NAD ⁺	51
9.4	El efecto del cobre en la síntesis de carotenoides	52

9.5 La deficiencia de cobre induce la fermentación y la expresión de <i>aox</i>	53
9.6 La utilización de etanol junto con la deficiencia de cobre produce desequilibrio redox y estrés oxidativo.....	56
9.7 La deficiencia de cobre y la asimilación de etanol inhiben la síntesis de proteínas y estimula la producción de astaxantina.....	59
10. CONCLUSIONES.....	61
11. BIBLIOGRAFÍA.....	62
12. ANEXOS.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. <i>Phaffia rhodozyma</i>	10
Figura 2. Estructura química de la astaxantina.....	11
Figura 3. Ruta biosintética resumida de carotenoides, ácidos grasos y ergosterol en <i>P. rhodozyma</i>	13
Figura 4. Localización intracelular de una molécula de astaxantina.....	15
Figura 5. Cadena de transporte de electrones que muestra la posición de la oxidasa alterna (AOX).....	23
Figura 6. <i>Phaffia rhodozyma</i> NRRL-Y-10922 en agar YM.....	26
Figura 7. Desarrollo de los parámetros de un cultivo de <i>P. rhodozyma</i> creciendo en +Cu.....	39
Figura 8. Cromatogramas de HPLC en fase reversa que muestran los carotenoides obtenidos del cultivo +Cu de <i>P. rhodozyma</i>	41
Figura 9. Niveles de expresión relativa de <i>asy</i> y <i>aox</i> en células de <i>P. rhodozyma</i> creciendo en +Cu.....	43
Figura 10. Desarrollo de los parámetros de un cultivo de <i>P. rhodozyma</i> creciendo en -Cu.....	46
Figura 11. Cromatogramas de HPLC en fase reversa que muestran los carotenoides obtenidos del cultivo -Cu de <i>P. rhodozyma</i>	48
Figura 12. Niveles de expresión relativa de <i>asy</i> y <i>aox</i> en células de <i>P. rhodozyma</i> creciendo en -Cu.....	49

1. RESUMEN

La síntesis de astaxantina, un carotenoide antioxidante que protege las células contra el daño oxidativo se ve estimulada por condiciones de crecimiento que provocan estrés en células de *Phaffia rhodozyma*. Utilizando cultivos de *P. rhodozyma* con y sin deficiencia de cobre, se estudió la síntesis de astaxantina junto con la expresión de *asy* (*crtS*), el gen clave de la síntesis de astaxantina. También se estudió la expresión de *aox*, gen que codifica para una proteína oxidasa alterna (AOX), generalmente activa cuando la cadena respiratoria principal se ve obstaculizada. La deficiencia de cobre tuvo un efecto negativo en: a) la acumulación y biomasa final, b) el consumo de oxígeno, c) el etanol producido, d) la tasa de consumo de etanol y e) el consumo de azúcar; en cambio, la deficiencia de cobre favoreció: f) la fermentación alcohólica bajo condiciones aeróbicas, g) la reasimilación de etanol a pesar de la presencia de azúcares en el medio de cultivo, h) mayor contenido de carotenoides en las células, i) la concentración final de carotenoides, j) la proporción de astaxantina en los carotenoides producidos y k) la expresión de *aox* con respecto al cultivo sin limitación de cobre. La activación de la producción de astaxantina, el aumento en la expresión de *aox* y el inicio de la fermentación aeróbica, ponen de manifiesto la función crucial que tiene el equilibrio redox para liberar tanto la respuesta antioxidante, como la fermentación, ya sea aeróbica o anaeróbica en *P. rhodozyma*.

2. ABSTRACT

Astaxanthin synthesis, an antioxidant carotenoid that protects cells against oxidative damage is stimulated by growth conditions that origin stress in *Phaffia rhodozyma* cells. Using *P. rhodozyma* cultures with and without copper deficiency, was studied the synthesis of astaxanthin beside with the expression of *asy* (*crtS*), the key gene for astaxanthin synthesis. The expression of *aox* was also studied, *aox* which encodes for an alternative oxidase protein (AOX), commonly active when the main respiratory chain remains hindered. Copper deficiency had a negative effect on: a) the accumulation and final biomass, b) the oxygen consumption, c) the ethanol produced, d) the rate of consumption of ethanol and e) the sugar consumption; On the other hand, copper deficiency supported: f) alcoholic fermentation under aerobic conditions, g) absorption of ethanol despite the presence of sugars in the culture medium, h) higher content of carotenoids in the cells, i) the final concentration of carotenoids, j) the proportion of astaxanthin in the carotenoids produced and k) the expression of *aox* relative to +Cu. The induction of astaxanthin production, the increase in the expression of *aox* and the beginning of aerobic fermentation, highlight the crucial role that the redox imbalance has in releasing both the antioxidant response and the fermentation, either aerobic or anaerobic in *P. rhodozyma*.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 *Phaffia rhodozyma*

Phaffia rhodozyma (estado sexual, *Xanthophyllomyces dendrorhous*) es una levadura basidiomycota aislada por Herman Phaff en la década de 1960, de las heridas de abedules en regiones montañosas frías. Taxonómicamente es la única especie de su género (Phaff *et al.*, 1972; Miller *et al.*, 1976; Golubev 1995). El color rojizo de las colonias de *P. rhodozyma* (Figura 1) deriva de la acumulación de carotenoides como la astaxantina. La astaxantina, un pigmento con alto poder antioxidante (Chi *et al.*, 2015; Schewe *et al.*, 2017), representa la mayoría, 83-87%, de los carotenoides totales producidos por *P. rhodozyma*, seguido de foenicoxantina (5-7%), 3-hidroxi-echinenona (3-4%), equinenona (2-4%) y β -caroteno (2-2.5%) (Schmidt *et al.*, 2011), sin embargo, las proporciones pueden cambiar dependiendo de las condiciones de cultivo (Calo *et al.*, 1995; Cifuentes *et al.*, 1997; Yamane *et al.*, 1997; Flores-Cotera y Sánchez, 2001; Vusti *et al.*, 2004; de la Fuente *et al.*, 2010; Chávez-Cabrera *et al.*, 2010; Miao *et al.*, 2011; Chi *et al.*, 2015).

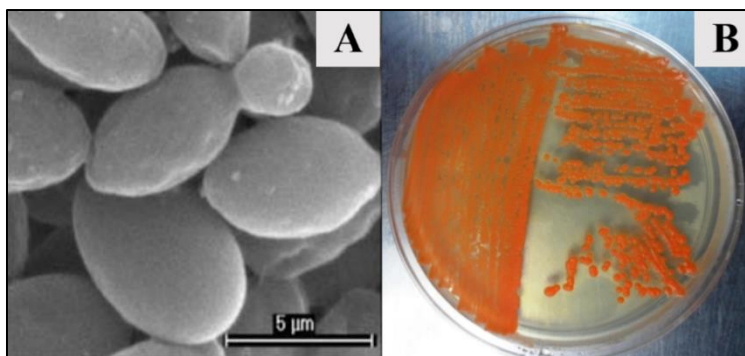


Figura 1. *Phaffia rhodozyma*. **A)** Células de *P. rhodozyma* cultivadas en caldo YM durante 72 h, vistas a través de un microscopio electrónico de barrido (Xiao *et al.*, 2009). **B)** Células de *P. rhodozyma* crecidas en agar YM por 72 h (este trabajo).

3.2 Biosíntesis de astaxantina

La astaxantina (Figura 2) se puede encontrar en las membranas celulares de *P. rhodozyma*, otros carotenoides no oxigenados como el β -caroteno, precursor de la astaxantina, se encuentran en gotas de aceite en el citosol (Johnson y Schroeder, 1996). Esto indica que las primeras etapas de la síntesis de carotenoides en *P. rhodozyma* se producen en el citoplasma, como ocurre con la síntesis de ácidos grasos en levaduras oleaginosas. El citrato mitocondrial es la fuente más importante de acetil-CoA para la síntesis de ácidos grasos en levaduras oleaginosas (Evans *et al.*, 1983). Proveniente de un ciclo de Krebs inhibido, el citrato mitocondrial acumulado, es exportado al citosol y escindido por la ATP citrato liasa, que provee de acetil-CoA citosólico para la síntesis de lípidos (Ratledge y Wynn, 2002). La poza citosólica de acetil-CoA podría ser funcional para la síntesis de astaxantina (Flores-Cotera *et al.*, 2001; Chávez-Cabrera *et al.*, 2010).

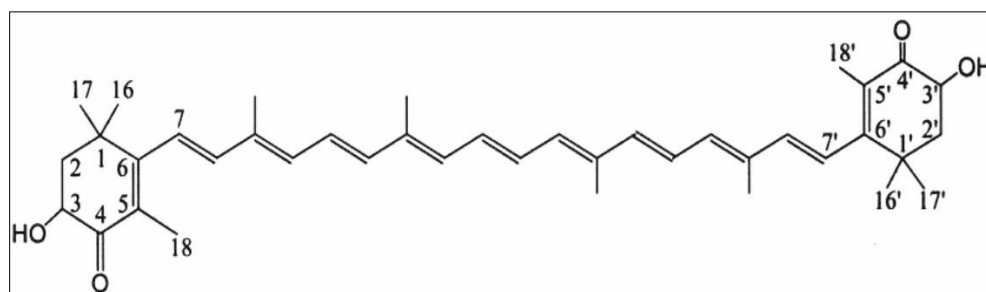


Figura 2. Estructura química de la astaxantina. La astaxantina pertenece al grupo de los tetraterpenos lipofílicos, que están constituidos por ocho unidades de isopreno (C_5). Cada anillo β -ionona de la molécula, presenta un grupo sustituyente característico 3-hidroxil (OH) y un 4-ceto ($C=O$) (Schmidt *et al.*, 2011).

La biosíntesis de astaxantina (Figura 3) en *P. rhodozyma* incluye la vía del mevalonato, donde el acetil-CoA se convierte en hidroximetilglutaril-CoA y mevalonato, después se transforma en isopentenil pirofosfato (Schmidt *et al.*, 2011). En los hongos, el isopentenil pirofosfato (IPP) es un bloque esencial y precursor común para la síntesis endógena de carotenoides, monoterpenos, sesquiterpenos, esteroides y giberelinas, entre otros compuestos (Disch *et al.*, 1998). Una molécula de IPP y otra de su isómero dimetilalil pirofosfato, se condensan para formar geranil pirofosfato. La adición consecutiva de dos unidades de IPP genera farnesil pirofosfato (FPP) y geranil geranil pirofosfato (GGPP). La condensación de dos moléculas de GGPP forma el fitoeno, el primer carotenoide (incoloro). Una serie de 4 pasos de desaturación conduce al licopeno, que por sucesivas reacciones de ciclación en ambos extremos, da γ -caroteno y luego β -caroteno.

La formación biológica de astaxantina requiere la oxidación secuencial del β -caroteno, es decir, se añaden dos grupos oxo a los carbonos C4 y C4' y después se agregan dos grupos hidroxilo a los carbonos C3 y C3' (Ojima *et al.*, 2006). Se requieren cuatro enzimas para la biosíntesis de astaxantina a partir de IPP. Los genes que codifican estas enzimas son GGPP sintasa (*crtE*), fitoeno sintasa/licopeno ciclase (*crtYB*), fitoeno desaturasa (*crtI*) y astaxantina sintasa (*asy* o *CrtS*), una citocromo P450 monooxigenasa que requiere un donante de electrones adicional para su actividad, es decir el producto de *asr*, una citocromo P450 reductasa (Verdoes *et al.*, 1999; Hoshino *et al.*, 2000; Alvarez *et al.*, 2006; Ojima *et al.*, 2006; Alcaíno *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2011).

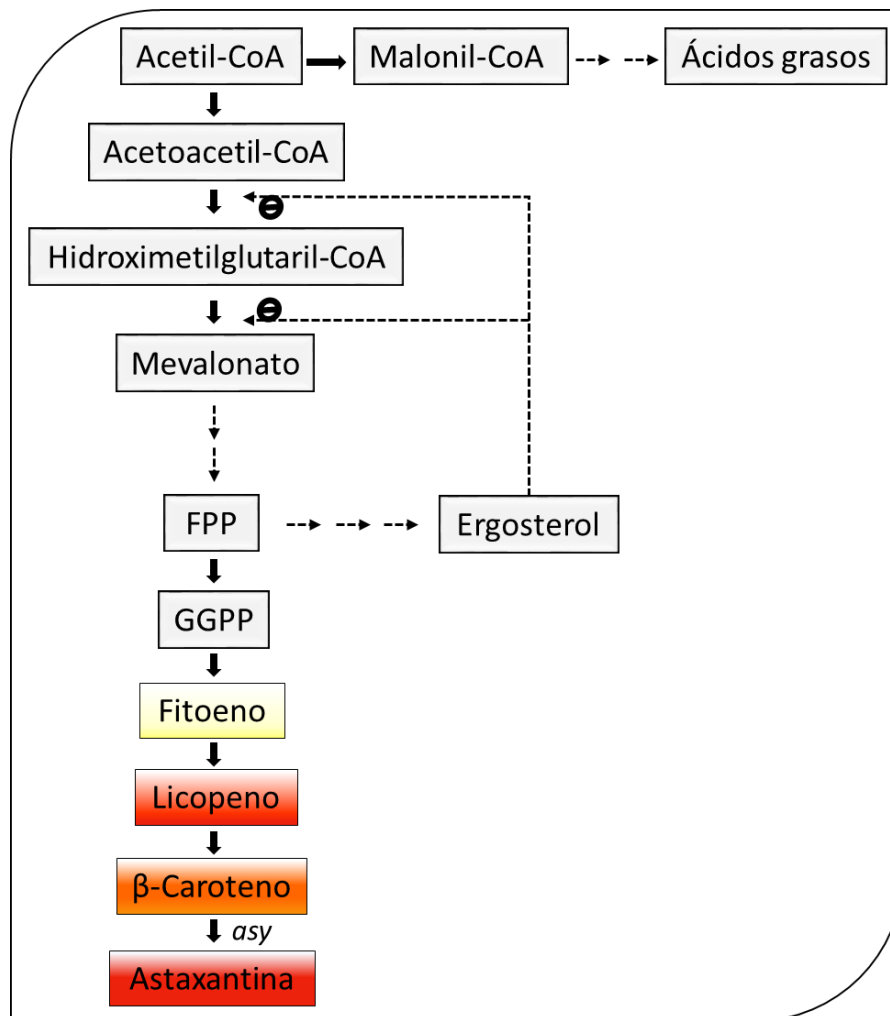


Figura 3. Ruta biosintética resumida de carotenoides, ácidos grasos y ergosterol en *P. rhodozyma*. Los principales carotenoides detectados en *P. rhodozyma* se encuentran en rectángulos en concordancia con su color natural (adaptado de Miao *et al.*, 2011 y Barredo *et al.*, 2017).

3.3 Función biológica de la astaxantina

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- β , β -caroteno-4,4'-diona) se encuentran entre los pigmentos terpenoides naturales más comunes (Tropea *et al.*, 2013). El color de los carotenoides, que varía de amarillo a naranja o rojo, depende en parte del número de dobles enlaces conjugados de la cadena de polieno y de los sustituyentes finales de la misma (grupos cetónicos en el caso de la astaxantina). Estos dobles enlaces determinan también las propiedades

fotoquímicas de los carotenoides y la consecuente acción de captura de la luz y fotoprotección. La cadena de polieno es la característica principal responsable de la reactividad química de los carotenoides hacia los agentes oxidantes y los radicales libres, aunque hasta cierto punto, también depende de la naturaleza de los sustituyentes finales de la cadena (hidroxilos y grupos cetónicos) y, por lo tanto, de cualquier función antioxidante (Britton 1995). Las propiedades antioxidantes de la astaxantina tienen un papel en la protección contra la fotooxidación generada por la luz UV y otras enfermedades degenerativas asociadas al envejecimiento (Guerin, 2003). Los humanos no pueden sintetizar carotenoides por lo que se deben ingerir en la dieta a partir de fuentes como algas, plantas y hongos (Fassett y Coombes, 2012). Se ha reportado que la actividad antioxidante de la astaxantina es diez veces mayor que la de otros carotenoides como la zeaxantina, la luteína y el β -caroteno y cien veces más que el α -tocoferol (Guerin, 2003).

Para mostrar el papel antioxidante, McNulty *et al.* (2007), incorporaron diferentes concentraciones de astaxantina, zeaxantina, luteína, β -caroteno y licopeno dentro de membranas celulares modelos y observaron, mediante difracción de rayos X, el acomodo de los fosfolípidos en las membranas. También estimularon el proceso de peroxidación incrementando la temperatura del sistema. Todos los carotenoides ensayados, con excepción de la astaxantina, desorganizaron el acomodo de los fosfolípidos y agravaron la peroxidación. La astaxantina fue la única en reducir la peroxidación (41%) y mantuvo la estructura de las membranas, con respecto al control.

Por consiguiente, se ha descrito que la alineación transmembrana precisa de la astaxantina en la bicapa lipídica de las membranas celulares (McNulty *et al.*, 2007 y 2008), además de prevenir la peroxidación, le proporciona la capacidad de estar adecuadamente expuesta para interactuar con los electrones de las especies reactivas de oxígeno presentes en

el citoplasma o en la matriz mitocondrial, el espacio intermembrana de las mitocondrias, y el medio acuoso circundante de las células (Figura 4), ofreciendo acciones antioxidantes versátiles como: a) donación de electrones a los electrones desapareados para neutralizar los radicales libres, b) unión con un radical para formar un aducto no reactivo, c) facilitar potencialmente el desplazamiento de los electrones fuera de la membrana a través de los dobles enlaces del esqueleto carbonado de la molécula y d) neutralizar las especies reactivas de nitrógeno, azufre o carbono (Britton, 1995; Goto *et al.*, 2001; Pashkow *et al.*, 2008).

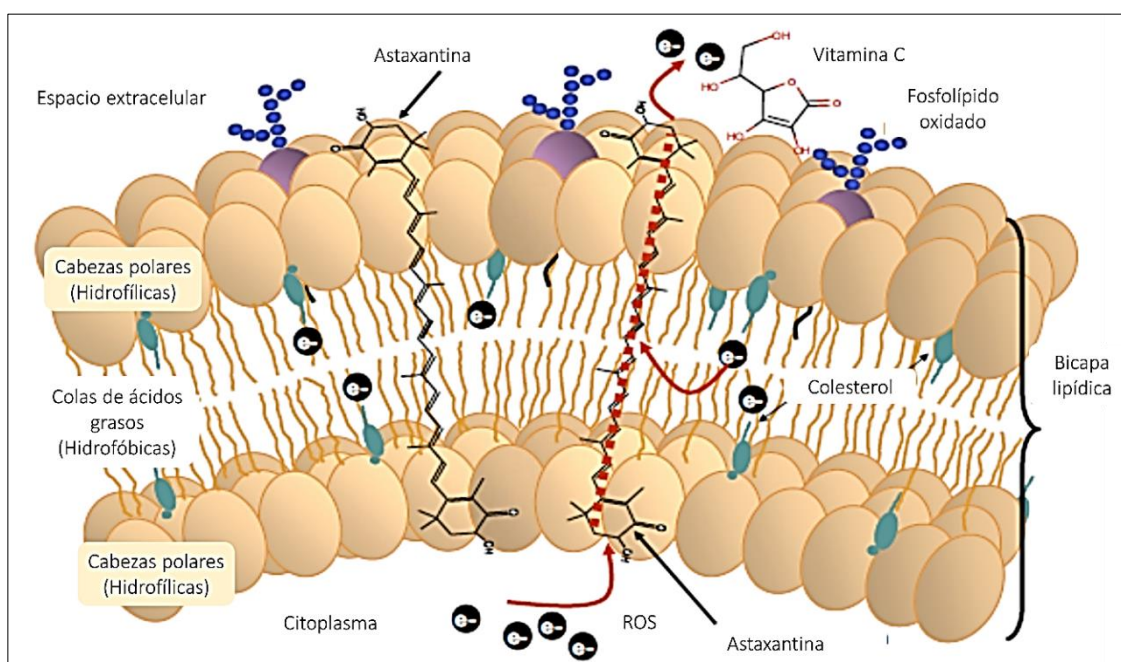


Figura 4. Localización intracelular de una molécula de astaxantina. La alineación transmembranal de compuestos antioxidantes con las membranas celulares, son probablemente, las responsables de sus propiedades antioxidantes y sus beneficios biológicos. La alineación transmembranal proporciona la exposición de los extremos polares de la molécula al citoplasma y al ambiente acuoso externo de la célula (o la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana de las mitocondrias), facilitando la transferencia de electrones a través de los dobles enlaces del esqueleto carbonado del compuesto (Pashkow 2008). La alineación intramembrana de la molécula antioxidante probablemente también proporciona proximidad con compuestos como la vitamina C, que serviría como aceptor de los cationes radicales generados.

3.4 Metabolismo oxidativo

Las mitocondrias son el principal productor de ROS (del inglés, Reactive Oxygen Species), término colectivo que describe a los radicales libres derivados del O₂ tales como el anión superóxido (O₂^{•-}), el hidroxilo (HO[•]), el peroxilo (RO₂[•]) y alcoxilo (RO[•]), así como el no-radical peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Circu and Aw, 2010), durante el metabolismo oxidativo debido a una incompleta reducción del oxígeno molecular (Bazil *et al.*, 2016). Las mitocondrias consumen alrededor del 90% de oxígeno asimilado por la célula, el 10% restante es utilizado por diferentes enzimas, tanto hidroxilasas como oxigenasas. Del total de oxígeno metabolizado, usualmente alrededor del 1-2% se convierte en ROS (Konz *et al.*, 1998; Circu and Aw, 2010). En los organismos eucariotas, puede ocurrir por la producción de radical superóxido desde los complejos I y III, de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (ETC, del inglés Electron Transport Chain), aunque otros sitios también pueden contribuir, por ejemplo, aquellos relacionados con las pozas de NADH (Nicotinamida adenina dinucleótido, reducido) (Quinlan *et al.*, 2012; Murphy 2009; Goncalves *et al.*, 2015). El superóxido puede dismutarse espontáneamente o enzimáticamente para formar peróxido de hidrógeno, en el segundo caso mediante la enzima superóxido dismutasa (Mn-SOD en la matriz, y/o Cu/Zn-SOD en el citosol). El peróxido de hidrógeno formado puede convertirse en agua mediante la enzima catalasa o glutatión peroxidasa. Aunque el peróxido de hidrógeno producido por la SOD es poco reactivo, puede formar radical hidroxilo altamente reactivo en presencia del ion ferroso a través de la reacción de Fenton. El radical hidroxilo puede iniciar cascadas de peroxidación lipídica en las membranas (Brand *et al.*, 2004). También se ha descrito que los ROS juegan un papel importante como moléculas de señalización en muchas rutas metabólicas importantes (Nathan, 2003). *P. rhodozyma* posee un número de genes relacionados con la defensa antioxidante, sin embargo, carece o exhibe baja actividad de la

enzima superóxido dismutasa (SOD1 o Cu/Zn SOD), que ayudaría a eliminar el anión superóxido. Por lo que, la astaxantina se considera un factor antioxidante primario y crítico de protección para esta levadura (Martínez-Moya *et al.*, 2015; Bellora *et al.*, 2016).

4. ANTECEDENTES

4.1 Factores que modulan la síntesis de astaxantina en *P. rhodozyma*

4.1.1 Niveles de oxígeno en el medio de cultivo

El inicio de la síntesis de astaxantina en *P. rhodozyma* ocurre a tensiones de oxígeno disuelto (pO_2) mayores al 20% (Liu y Wu, 2008; Chávez-Cabrera *et al.*, 2010). Se sabe también, que la exposición de las células de *P. rhodozyma* a O_2 o H_2O_2 aumenta el contenido de astaxantina (hasta 83%) y el contenido celular de carotenoides totales (An *et al.*, 1996; Kim y Chang, 2006; Liu y Wu, 2006). Así, los niveles de pO_2 mayores al 20% juegan un papel muy importante en la biosíntesis de astaxantina, pero valores elevados del mismo que provoquen situaciones oxidativas severas pueden detener fácilmente el crecimiento de la levadura (Yamane *et al.*, 1997; An *et al.*, 2001).

4.1.2 Tipo de fuente de carbono

Diversos estudios han reportado que *X. dendrorhous* tiene la capacidad de utilizar diversos compuestos como fuente de carbono, entre ellos se encuentran mono-, di- y polisacáridos, ácidos orgánicos y alcoholes (Meyer *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1994; Vázquez *et al.*, 1997; Yamane *et al.*, 1997; Palágyi *et al.*, 2001; Wozniak *et al.*, 2011). Las fuentes de carbono de lenta asimilación frecuentemente promueven el aumento de la acumulación intracelular de carotenoides, pero en general a expensas del crecimiento o con un crecimiento lento. Se sabe

que la represión catabólica regula la biosíntesis de carotenoides en cepas silvestres de *X. dendrorhous* (Johnson y Schroeder, 1996; Yamane *et al.*, 1997; Kim y Chang, 2006).

Lodato *et al.* (2007) sugirieron que los genes *crtE*, *crtI* y *asy* están regulados por glucosa. En 2011, Wozniak y col., reportaron la presencia de secuencias de unión a Mig1 en las regiones promotoras de los genes *crtYB*, *crtI* y *asy*. En el entendido de que Mig1 se une a secuencias corriente arriba de los genes reprimidos por glucosa. Así mismo, Marcoleta *et al.* (2011) reportaron que la transcripción de todos, *crtYB*, *crtI* y *asy*, disminuyó considerablemente después de adicionar glucosa al medio de cultivo. Esto fue consistente con la disminución progresiva en el contenido celular de carotenoides después de la adición de glucosa, y con la observación recurrente de otros investigadores de que la carotenogénesis ocurre más eficientemente a bajas concentraciones de esta.

4.1.3 Metabolismo de Etanol

P. rhodozyma metaboliza la glucosa hacia la producción de etanol, cuando crece a altas concentraciones de azúcares y/o en condiciones de limitación de oxígeno (Johnson y Schroeder, 1996; Chávez-Cabrera *et al.*, 2010; Wozniak *et al.*, 2011). Sin embargo, cuando se agota la fuente de azúcar fermentable, *P. rhodozyma*, al igual que otras levaduras, consume el etanol producido en presencia de altos pO₂ (Yamane *et al.*, 1997; Liu y Wu, 2008).

El inicio de la síntesis de astaxantina en cepas silvestres de *P. rhodozyma*, ocurre habitualmente enseguida del cambio del consumo de azúcar por etanol, acompañado generalmente con un crecimiento lento, disminución en la acumulación de proteínas, así como en el contenido de proteína intracelular (Lodato *et al.*, 2007; Chávez-Cabrera *et al.*, 2010). Considerando que la síntesis de proteínas no se encuentra completamente operativa

bajo esas circunstancias, la demanda de energía y esqueletos carbonados disminuye. Por lo tanto, el exceso de ambos queda disponible para otras rutas biosintéticas, en concordancia, que el inicio de la síntesis de etanol y ácidos grasos en *P. rhodozyma* ocurra con el inicio de la utilización de etanol, es decir, la asimilación de etanol estimula la acumulación de carotenoides. La formación de acetaldehído a partir de etanol requiere NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido, oxidado) para producir NADH, por lo tanto, el metabolismo de etanol en levaduras, así como en otro tipo de células, incrementa la relación NADH/NAD⁺ (Van Dijken y Scheffers, 1986; Jones, 1989; Bakker *et al.*, 2001; Rigoulet *et al.*, 2004; Hou *et al.*, 2010; Watson *et al.*, 2011). Niveles bajos de NAD⁺ generalmente disminuyen la actividad de las enzimas dependientes de NAD⁺, como aquellas asociadas al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TAC, del inglés Tricarboxylic acid cycle). En consecuencia, el metabolismo primario, que incluye la síntesis de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos; así como la respiración, son inhibidos por el funcionamiento deficiente del ciclo TAC.

4.1.4 Deficiencia de nitrógeno

Se ha reportado que la producción de astaxantina en *P. rhodozyma* tiene una relación inversa con la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo, o con niveles de C/N altos (Meyer y du Preez, 1994; Yamane *et al.*, 1997; Flores-Cotera *et al.*, 2001; Vustin *et al.*, 2004; Chávez-Cabrera *et al.*, 2010). La limitación nutricional por amonio disminuye el crecimiento y reduce seriamente la demanda de carbono para la síntesis de nucleótidos y proteínas, primordialmente de α -cetoglutarato y oxalacetato, los cuales están fuertemente involucrados en la asimilación de amonio. Bajo estas circunstancias, disminuye la demanda de ATP, generando un incremento en la relación ATP/ADP, el cual disminuye el flujo de electrones a través de la ETC y aumenta las relaciones NADH/NAD⁺ y ubiquinol/ubiquinona (Van

Dijken JP y Scheffers, 1986; Arnold y Kadenbach, 1997; Sluse y Jarmuszkiewicz, 1998; Rigoulet *et al.*, 2004).

La enzima isocitrato deshidrogenasa, involucrada en la formación de α -cetoglutarato, se caracteriza por su susceptibilidad a inhibición tanto por NADH como por ATP. Por lo tanto, altas concentraciones de ambos podrían reducir la actividad de la enzima, afectando la función de ciclo TAC. El citrato es considerado la fuente más importante de acetyl-CoA para la síntesis de ácidos grasos en levaduras oleaginosas, creciendo bajo condiciones de limitación de nitrógeno (Ertugay *et al.*, 1997; Ratledge y Wynn, 2000; Davoli *et al.*, 2004; Chávez-Cabrera *et al.*, 2010). *P. rhodozyma*, al igual que otras levaduras oleaginosas, aparentemente posee una lanzadera de citrato-malato para la translocación de citrato de la matriz mitocondrial al citosol. Proveniente de un ciclo TAC inhibido, el citrato mitocondrial acumulado, es exportado al citosol y escindido por la ATP citrato liasa, que provee de acetyl-CoA citosólico para la síntesis de lípidos (Ratledge y Wynn, 2002; Chávez-Cabrera *et al.*, 2015). La poza citosólica de acetyl-CoA podría ser funcional para la síntesis de astaxantina en condiciones de limitación de amonio (Flores-Cotera *et al.*, 2001; Chávez-Cabrera *et al.*, 2010).

4.1.5 Deficiencia de cobre

La deficiencia de nutrientes en el cultivo de *P. rhodozyma* conduce principalmente a una disminución en el crecimiento o en la acumulación de biomasa. En el trabajo realizado por Flores-Cotera y Sánchez (2001), reportaron, en una cepa silvestre de *P. rhodozyma*, que la disminución de la concentración de cobre en el medio de cultivo redujo significativamente la concentración de biomasa y el rendimiento celular. Por el contrario, la concentración de astaxantina, así como la relación de astaxantina/carotenoides totales, todos, incrementaron

sustancialmente a medida que se redujo la concentración de cobre en el medio. Además, fue notable que la producción de pigmentos fue primero en las células creciendo a bajos niveles de cobre, que aquellas crecidas a altas concentraciones.

La enzima citocromo oxidasa (CcO), la oxidasa terminal de la ETC posee dos centros catalíticos de cobre (Cu_A y Cu_B) que están altamente conservados en las células eucariotas desde levaduras hasta organismos superiores (Popovic *et al.*, 2010; Srinivasan y Avadhani, 2012). En particular, la reducción catalítica de oxígeno a agua por la CcO depende del citocromo Cu_B -hemo a₃ (Babcock y Wikström, 1992; Robinson y Winge, 2010). Se sabe que la deficiencia de cobre disminuye el contenido y la actividad de CcO; en consecuencia, la deficiencia de cobre perjudica el flujo de electrones a través de la ETC y ralentiza la respiración (Rossi *et al.*, 1998; Flores *et al.*, 2000; Nittis *et al.*, 2001; Merchant *et al.*, 2006). Dado que la oxidación de NADH ocurre a través de la ETC bajo condiciones oxidativas, la deficiencia de cobre disminuye la oxidación de NADH y muy seguramente incrementa la relación intracelular NADH/NAD⁺, igual que ocurriera en condiciones de limitación de nitrógeno (Nelson y Cox, 2000).

4.1.6 Inhibidores de la respiración & respiración alternativa

P. rhodozyma, al igual que otras levaduras carotenogénicas, como *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y *Sporobolomyces*, así como diversos hongos filamentosos, posee una oxidasa alternativa (AOX) que es insensible a inhibidores comunes de los citocromos como el cianuro y la antimicina A, pero es sensible al ácido salicilhidroxámico (Johnson y Schroeder, 1996; Joseph-Horne *et al.*, 2001; Veiga *et al.*, 2003; Helmerhorst *et al.*, 2005).

Jhonson y colaboradores mostraron que la antimicina A, la cual inhibe el paso de electrones desde el citocromo b al c en la ETC, fue capaz de estimular la síntesis de astaxantina en *X. dendrorhous* (An *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 1994; Schroeder y Johnson, 1995). La síntesis de astaxantina ocurrió en presencia de antimicina A, junto con un cambio en la respiración sensible a cianuro (citocromo) a una respiración insensible al mismo (AOX). En levaduras bajo severa deficiencia de cobre, AOX provee una ruta alternativa para el paso de electrones (Figura 5), permitiendo simultáneamente la reducción de O₂ a H₂O y la continuidad del crecimiento (Downie y Garland, 1973).

An y col., (1989) propusieron que la activación de AOX estaba cercanamente relacionada con la síntesis de astaxantina; sin embargo, un estudio posterior mostró que aún con la delección de *aox*, se incrementó el contenido celular de astaxantina, significando que AOX no era esencial para la síntesis de astaxantina (Hoshino *et al.*, 2005). Más allá de los estudios mencionados, AOX en *P.rhodozyma* no se ha caracterizado en detalle. Las AOX de las plantas muestran una homología considerable con los de los hongos (Helmerhorst *et al.*, 2005). Son proteínas que se encuentran en la membrana mitocondrial interna (Fig. 5). Todas las AOX tienen un centro de hierro binuclear que cataliza la oxidación del ubiquinol (Qred) mientras reduce el O₂ molecular a agua. Por lo tanto el ubiquinol, la forma reducida de ubiquinona, puede donar sus electrones a AOX o, alternativamente, a COX a través del complejo III, es decir, los electrones de ubiquinol podrían dividirse libremente en ambas rutas (Hoefnagel y Wiskich, 1998; Chae y Nargang, 2009; Van Aken *et al.*, 2009; Yoshida *et al.*, 2007).

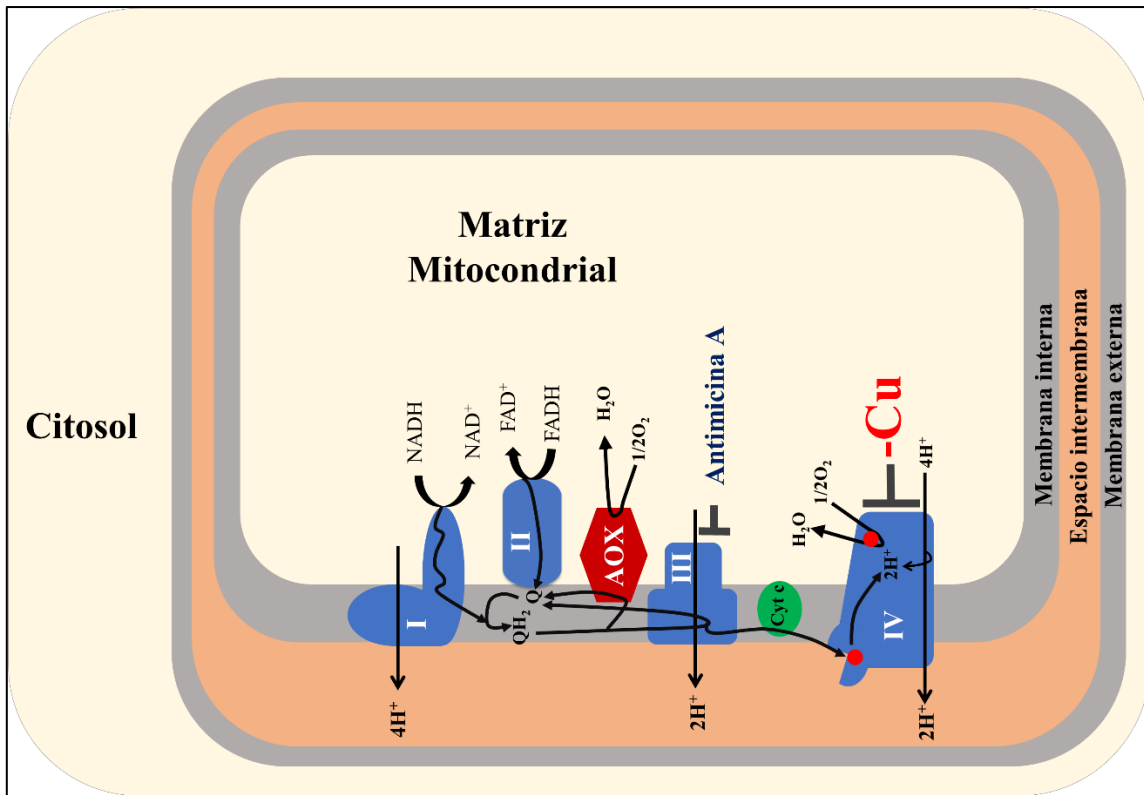


Figura 5. Cadena de transporte de electrones que muestra la posición de la oxidasa alterna (AOX). El complejo IV es inhibido por el cianuro, óxido nítrico, sulfuro, azida, y/o deficiencia de cobre, mientras que AOX es insensible a estos compuestos y en su lugar es inhibido por el ácido salicilhidroxámico y el galato de n-propilo. El complejo III es inhibido por la Antimicina A. **Complejo I**, NADH deshidrogenasa; **Complejo II**, succinato deshidrogenasa; **Complejo III**, complejo citocromo bc1; **Complejo IV**, citocromo c oxidasa; **cyt c**, citocromo c; **líneas negras curvas**, electrones; **círculos rojos en el complejo IV**, centros catalíticos Cu²⁺; **Q/QH₂**, grupo ubiquinol/ubiquinona; **FAD⁺/FADH**, flavín adenín dinucleótido oxidado y reducido respectivamente (Adaptado de McDonald 2008).

5. JUSTIFICACIÓN

Phaffia rhodozyma acumula astaxantina intracelularmente cuando se enfrenta a condiciones estresantes, lo cual hace de esta levadura un modelo ideal para estudios *in vivo* sobre los eventos que conducen al estrés oxidativo. Así, la acumulación intracelular de astaxantina serviría como indicador biológico de tales condiciones estresantes. Es bien conocido que el inicio de la síntesis de astaxantina, o un incremento de su contenido intracelular en *P. rhodozyma*, puede ser provocado mediante deficiencias nutricionales, ambientales, o condiciones genéticas que frenan el metabolismo celular. En este trabajo se seleccionó la deficiencia de cobre para analizar los eventos involucrados en la activación de la síntesis de astaxantina, así como el estudio de las condiciones que inducen la expresión de los genes *asy* y *aox*. Esto podría ayudar a comprender el mecanismo que conduce al estrés oxidativo en esta levadura. Además, podría esperarse que los eventos resultantes logran relacionarse a otros tipos de células eucariotas sometidas a estrés.

6. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La deficiencia de cobre en el cultivo de *P. rhodozyma*, induce la acumulación de astaxantina asociada al crecimiento.

Objetivo General

Analizar los eventos involucrados en la activación de la síntesis de astaxantina, así como la expresión de los genes *asy* y *aox* en condiciones de deficiencia (-Cu) y sin deficiencia (+Cu) de cobre en el cultivo de *P. rhodozyma*.

Objetivos Específicos

- Caracterizar los cultivos de *P. rhodozyma* con base en el crecimiento, el consumo de oxígeno, el metabolismo del etanol y la producción de astaxantina, bajo condiciones de deficiencia y sin deficiencia de cobre.
- Establecer cual es la consecuencia de la deficiencia de cobre sobre el cultivo de *P. rhodozyma* con respecto a la activación de la producción de carotenoides.
- Determinar el efecto de la deficiencia de cobre en la expresión de los genes *asy* y *aox*, y establecer su relación con la producción de carotenoides en la levadura.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 *Phaffia rhodozyma* NRRL-Y-10922

La cepa utilizada en el desarrollo de este trabajo fue mantenida en placas con agar YM (Figura 6), cuya composición fue glucosa (1.0%), extracto de levadura (0.3%), extracto de malta (0.3%), bactopectona (0.5%), agar (1.5%) (Becton, Dickinson & Co., Sparks, MD, USA), a partir de células liofilizadas. El liofilizado se realizó utilizando leche deslactosada libre de grasa como crioprotector.

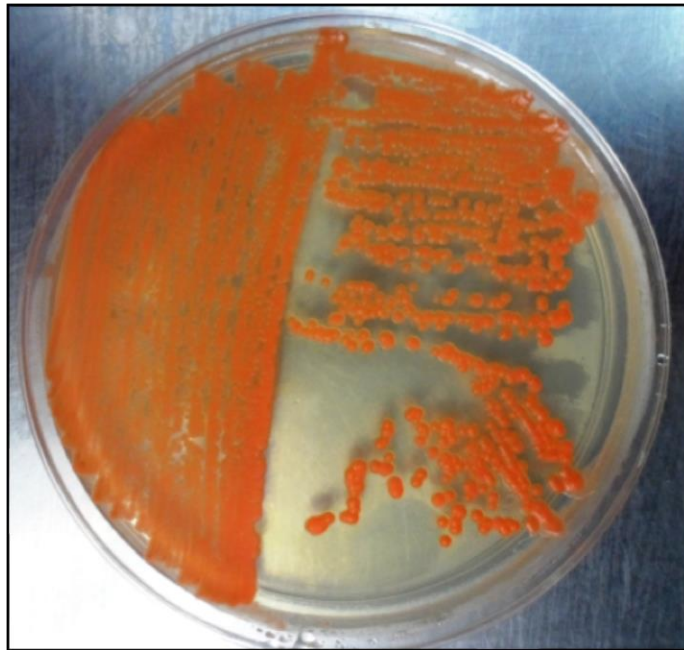


Figura 6. *Phaffia rhodozyma* NRRL-Y-10922 en agar YM. Cultivo de 36 h a 22 °C.

7.2 Fermentaciones con y sin cobre

Posterior a un total de seis experimentos, se establecieron las condiciones en el reactor para el cultivo (-Cu; 0.12 μM estimado por el contenido de cobre en los componentes del medio), estas fueron utilizadas para el cultivo sin deficiencia de cobre (+Cu; 7 μM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Los componentes del medio de cultivo para los siguientes experimentos fueron: (g l^{-1}); 30 sacarosa, 1.6 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.39 Na_2HPO_4 , 0.08 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.18 K_2SO_4 , 0.02 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.002 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.012 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0006 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.002 $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.00013 H_3BO_3 , 0.00053 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.45 NaCl , 0.35 Na_2SO_4 y 12 ml de solución de vitaminas. La solución de vitaminas contenía (mg l^{-1}): 150 pantotenato de calcio, 76 tiamina, 4 biotina, 7.6 cianocobalamina, 7.6 mioinositol, 38 cloruro de piridoxina, 76 riboflavina y 450 nicotinamida (todas de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), disueltas en agua desionizada (se esterilizó en filtros con poro de 22 μm , se adicionó posterior a la esterilización del reactor). Para todos los experimentos, se utilizó agua desionizada con una resistividad de 18.2 $\text{M}\Omega\text{-cm}$ obtenida del equipo Milli-Q Advantage A10 (Merck KGaA, Hesse, Alemania).

El inóculo para cada fermentación se preparó como se menciona a continuación: la levadura liofilizada se resuspendió en 200 μl de caldo YM, se sembró por estría en cajas de Petri con agar YM y se incubó a 22 $^\circ\text{C}$ por 72 h. Posteriormente, se tomó una colonia de la levadura y se resembró en otra caja Petri con agar YM para incubarse de nueva cuenta durante 72 h. Después, tres matraces Erlenmeyer conteniendo medio líquido YM, se inocularon con una asada de células tomada de la última caja. Los matraces se incubaron en una incubadora orbital Innova 43 (New Brunswick, NJ, USA) a 22 $^\circ\text{C}$, 120 rpm y de 18-20 h. El contenido total de los tres matraces se centrifugó, se lavó dos veces con solución de NaCl al 0.9% y fue usado para inocular el reactor.

Todas las fermentaciones se llevaron a cabo en un reactor Applikon Biotechnology (Delft, Holanda) equipado con una jarra de 2.5 l de volumen nominal y un volumen de operación de 2.1 l. Las condiciones de cultivo fueron las siguientes: 700 rpm, 22°C, aeración estándar a 1 vvm; el pH se dejó libre hasta 4.5 y controlado automáticamente a ese valor con una solución de NaOH al 5%. Se adicionó 3 ml de antiespumante Mazu DF-1300; la jarra del reactor, conteniendo el medio de cultivo, se esterilizó por autoclave en condiciones estándar: 15 libras, 121 °C durante 15 min. El electrodo de pH fue calibrado, previo a la esterilización, con soluciones tampón de 4, 7 y 10. Así mismo, el electrodo de O₂ se calibró, primero a 0% de oxígeno con N₂ y posteriormente, a 100% de saturación de oxígeno con aire, después de la esterilización del reactor y una vez que la temperatura del sistema alcanzó los 22 °C.

Se realizaron un total de diez experimentos sin suministro de cobre, cuyos resultados (datos no mostrados) indicaron que el cultivo era en extremo sensible a la presencia de cantidades mínimas del metal, de modo que se requirió una limpieza cuidadosa de todo el material de vidrio y agua para los experimentos.

7.2.1 Toma y almacenamiento de muestras

Las muestras, de 20 a 50 ml según la edad del cultivo, en cada fermentación se tomaron en recipientes de plástico estériles. Inmediatamente después de tomada una muestra, esta se colocó en hielo y se dividió en cuatro porciones para los siguientes análisis: 1) determinación de biomasa y, el sobrenadante de ésta se utilizó para determinación de azúcares residuales y etanol; 2) obtención de RNA total, 3) determinación de carotenoides y 4) determinación de proteína. Las muestras una vez divididas se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -70 °C hasta su procesamiento.

7.2.2 Determinaciones analíticas

7.2.2.1 Análisis de biomasa

El paquete celular obtenido de 1-2 ml (dependiendo de la edad del cultivo) de caldo fermentado, se centrifugó a 1500 g durante 5 minutos, se lavó con agua destilada una vez, y después se resuspendió en aproximadamente 3 ml de agua destilada. La biomasa se determinó por peso seco colocando los 3 ml de la suspensión sobre charolas de aluminio previamente puestas a peso constante dentro de una caja Petri. Los tubos que contenían las muestras se lavaron dos veces más con 1 ml de agua cada vez, para recuperar las células remanentes, los lavados se depositaron en la charola respectiva. Las charolas se secaron a 70 °C durante 48 horas (peso constante). El peso se obtuvo por diferencia de peso entre la charola con muestra y la charola vacía. Cada muestra se analizó por triplicado.

7.2.2.2 Análisis de azúcares

Los azúcares reductores fueron determinados coloriméricamente por el método de DNS (Miller, 1959). Se realizó una curva patrón con sacarosa en un rango de 0.2 a 0.6 mg y se siguió el procedimiento descrito por Chávez-Cabrera, 2009. La reacción colorimétrica resultante se midió por absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro UV/V Biowave II (Biochrom US, Holliston, MA, USA).

7.2.2.3 Análisis de etanol

El etanol se determinó usando cromatografía de gases a partir del sobrenadante obtenido por centrifugación de 0.5 ml de caldo de cultivo, esto para todas las muestras. Se utilizó un cromatógrafo de gases Varian CP-3380 (Palo Alto, CA, USA.) equipado con una columna ZB-FFAP 15 m x 0.53 mm x 1 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) y con un

detector de ionización de flama. Las condiciones de funcionamiento fueron: 200 °C en el detector y un caudal de nitrógeno (99,99%) de 1 ml/min. La curva estándar utilizada para la cuantificación se realizó utilizando etanol absoluto grado HPLC (J.T. Baker, Center Valley, PA, USA).

7.2.2.4 Análisis de proteína

El contenido de proteína se analizó por el método de Biuret (Gornall *et al.*, 1949), utilizando un estándar de albúmina bovina (J.T. Baker). Se tomó 1 ml de caldo de cultivo, se centrifugó a 1600 g durante 5 min, se decantó el sobrenadante. El paquete celular se lavó con agua destilada y se procedió a centrifugar nuevamente. Las células lavadas se suspendieron en 0.5 ml de NaOH 1N y se colocaron en baño maría a 90°C durante 20 min. Los tubos conteniendo las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se les adicionó 0.5 ml de agua destilada. Posteriormente, se adicionaron 4 ml de reactivo de Biuret, se mezcló a homogeneidad y se dejó proceder la reacción durante 30 min a 25 °C. Se centrifugó para precipitar los restos celulares y se determinó absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro Biowave II.

7.2.2.5 Extracción y análisis de carotenoides

La cuantificación de los pigmentos se realizó de acuerdo con el método modificado descrito por Sedmak, (1990). El paquete de células obtenido del caldo de cultivo (~ 2,5 mg de células secas) se liofilizó durante 3 h, las células secas se mezclaron con 0.5 ml de perlas de vidrio (0.5 mm diámetro) y se homogeneizaron con una varilla de vidrio durante 15 segundos, se añadió 0.2 ml de NaH₂PO₄ 0.01M y 1 ml de dimetilsulfóxido previamente calentado a 58°C, y se incubó 1 min a 58°C. A continuación, cada muestra se mezcló en vortex (Scientific

Industries Inc., Bohemia, NY, USA) durante 45 segundos para lograr el rompimiento de la pared celular y se extrajo con 5 ml de la mezcla hexano/acetato de etilo (1:1). Se agitó en vortex nuevamente durante 1 min. La emulsión resultante se centrifugó a 1500 g durante 5 min. La absorbancia de la fase orgánica que contenía los carotenoides se midió a 480 nm, usando un espectrofotómetro Biowave II. La concentración de carotenoides totales se determinó usando un coeficiente de extinción de 2100 en la ecuación:

$$\frac{\mu g}{ml} = \frac{10000 * A * V_s}{V_m * E_{1cm}^{1\%}}$$

Donde:

- A Absorbancia, 480 nm
- V_s Volumen del solvente recuperado (ml)
- V_m Volumen de muestra (ml)

- E^{1%} Coeficiente de extinción específico para astaxantina, 2100

7.2.2.6 Análisis de carotenoides por HPLC

El perfil de carotenoides se determinó por HPLC de fase reversa utilizando un sistema automatizado Ultimate 3000 Basic (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA.) equipado con un detector de arreglo de diodos. La separación cromatografica se realizó en una columna de sílice Beckman Ultrasphere C18 de 250 mm x 4.6 mm x 5 μm. Las eluciones se realizaron con un gradiente de metanol/acetonitrilo (B: 35%, 5 min; B: 35-10%, 10 min; B: 10-35%, 5 min; B: 35%, 10 min) a un flujo de 1 ml/min y la detección de picos se realizó a 480 nm. Los picos procedentes de las muestras se identificaron por comparación con los

espectros y el tiempo de retención de los patrones de astaxantina y β -caroteno (Sigma-Aldrich, MO, USA). Los solventes utilizados fueron grado HPLC de J.T. Baker.

7.2.3 Análisis molecular

7.2.3.1 Extracción de RNA total y síntesis de DNA complementario (cDNA)

La extracción de RNA se realizó, a partir de 50 a 100 mg de liofilizado. Todos los reactivos para síntesis de RNA, cDNA y PCR fueron obtenidos de Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y los solventes grado biología molecular de Sigma-Aldrich. A cada muestra se le adicionó 5 mg de microperlas de vidrio (0.5 mm de diámetro) y se homogenizó con un pistilo de plástico para favorecer el rompimiento celular. Posteriormente, se adicionó 1 ml de TriZol Reagent y se homogenizó 1 min más. Las muestras se incubaron sin agitación durante 5 min a 24°C. En seguida se adicionó 0.2 ml de cloroformo, se agitó en vortex durante 15 seg. y se incubó 3 min a 24°C. Posteriormente se centrifugó a 1600 g durante 15 min a 4°C y la fase acuosa se pasó a un tubo limpio estéril. A la fase acuosa se le agregó 0.5 ml de 2-propanol 100% (Sigma-Aldrich) y se incubó durante 10 min a 24°C. Finalmente se centrifugó a 1600 g durante 10 min a 4°C para obtener una pastilla de RNA. La pastilla de RNA se lavó con 1 ml de etanol (75%), se agitó en vortex suavemente para suspender la pastilla y se centrifugó a 1600 g durante 5 min a 4°C. El RNA contenido en el tubo se secó en una campana de flujo laminar, se solubilizó en 50 μ l de agua estéril libre de RNasa y se cuantificó a 260 nm usando un espectrofotómetro UV-Vis (NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific). Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

La síntesis de cDNA se realizó a partir de RNA total mediante el protocolo SuperScript® III Reverso Transcriptasa, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La mezcla de reacción (20 μ l) contenía: 1 μ l de oligo (dT), 1 μ l de RNA total (5 μ g/ μ l), 1 μ l de

dNTP mix 10 mM, 4 µl de 5X First Strand Buffer, 1 µl de DTT 0.1 M y 1 µl de SuperScript III RT (200 units/µl) y 11 µl de agua libre de nucleasas.

7.2.3.2 Obtención de secuencias de *aox*, *asy* y *adki* de *P. rhodozyma* NRRL-Y-10922

El genoma de la cepa de *P. rhodozyma* NRRL-Y-10922 no ha sido secuenciado. Para obtener las secuencias específicas de *aox*, *asy* y *adki* de esta cepa, a partir de las cuales se diseñaron las sondas, se realizó lo descrito a continuación.

7.2.3.2.1 Secuencia parcial de *aox*

La secuencia parcial de *aox* de *P. rhodozyma* se obtuvo con los oligos Aox-F2 (5'-TCGAGGTAGCCGACGAATTC-3') y Aox-R2 (3'-GATACTGGGAGCTACAGGGTC-5') diseñados a partir de la secuencia AOX reportada por Hoshino *et al.*, (2004) y que amplifican una región de 273 pb. Utilizando el cDNA de *P. rhodozyma* se realizó una PCR punto final con los oligos anteriormente mencionados. Las condiciones de amplificación fueron 3 min a 95 °C, 35 ciclos (95 °C 30 seg, 53 °C 30 seg, 72 °C 30 seg) y 5 min a 72 °C de extensión final. Una vez verificado el fragmento de PCR, se clonó en el vector pDrive (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

7.2.3.2.2 Secuencia parcial de *asy*

A partir de un alineamiento con secuencias del gen astaxantina sintasa (*asy*) de *P. rhodozyma* cepa Gam2 (GenBank No. GU433200) y *Xanthophyllomyces dendrorhous* (GenBank No. DQ002006), se realizó el diseño de oligos. Los oligos resultantes fueron Asy-F (5'-CATCCTCTACGCTCGTACA-3') y Asy-R (3'-ACCATCGACTTAACGGCC-5') que amplifican una región de 484 pb. Utilizando el cDNA de *P. rhodozyma* NRRL-Y-10922 se realizó la amplificación por PCR punto final con los oligos anteriormente mencionados. Las

condiciones de amplificación fueron 3 min a 95 °C, 35 ciclos (95 °C 30 seg, 57 °C 30 seg, 72 °C 30 seg) y 5 min a 72 °C de extensión final. Una vez verificado el fragmento de PCR, se clonó en el vector pDrive de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

7.2.3.2.3 Secuencia parcial de *adki*

A partir de un alineamiento de secuencias del gen adenilato quinasa (*adki*) de *Penicillium expansum* (GenBank No. XM016746662), *Aspergillus clavatus* (GenBank No. XM001269411), *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* JEC21 (GenBank No. XM567926) y *Cryptococcus gattii* WM276 (GenBank No. XM003196473), estos dos últimos altamente relacionados taxonómicamente con *P. rhodozyma*, se realizó el diseño de oligos. Los oligos resultantes fueron Adeki-F (5'-CCAGAGTGYYAAGAACGGITACT-3') y Adeki-R (3'-GGTGGGTTRAATAICTTGTGGTA-5') que amplifican un fragmento de 250 pb. Utilizando el cDNA de *P. rhodozyma* NRRL-Y-10922 se realizó una PCR punto final con los oligos anteriormente mencionados. Las condiciones de amplificación fueron 3 min a 95 °C, 35 ciclos (95 °C 30 seg, 57 °C 30 seg, 68 °C 1 min) y 5 min a 68 °C de extensión final (Chávez-Cabrera, comunicación personal).

7.2.3.3 Análisis secuencias

Todos los productos de PCR y clonas se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Cada producto de PCR y clona se verificó por secuenciación Sanger con el servicio de secuenciación de la empresa Macrogen (Seoul, Corea). Las secuencias sentido y antisentido obtenidas se analizaron como sigue: a) en cada caso, se alinearon para cada gen, con el programa Seaview 4.0 (Gouy *et al.*, 2010) para obtener el ensamble de la secuencia completa, b) la secuencia completa se utilizó para realizar un alineamiento con la herramienta BLAST

(del inglés, Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (del inglés, National Center for Biotechnology Information), con el fin de comparar las secuencias de este estudio con lo reportado en base de datos, c) verificadas las secuencias, se tuvo lista la información de *aox*, *asy* y *adki* para el diseño de sondas TaqMan.

7.2.3.4 Diseño de sondas TaqMan

A partir de las secuencias parciales generadas, depositadas en la base de datos GenBank (Nos. de acceso: *aox*, KY967369; *asy*, KY967370; *adki*, KY967371), de los genes de *P. rhodozyma* NRRL-Y-10922, se solicitó el diseño de las sondas TaqMan® a la empresa Applied Biosystems. Las sondas *aox* y *asy* se marcaron con el fluoróforo FAM y la sonda *adki* con VIC, con el fin de permitir una reacción de qPCR dúplex entre *aox-adki* y *asy-adki*.

7.2.3.5 Ensayos de expresión

Para determinar los niveles de expresión relativa de los genes *asy* y *aox*, se realizaron qPCR dúplex en un sistema de PCR en tiempo real 7500, usando sondas TaqMan® a partir de los respectivos genes de *P. rhodozyma* NRRL-Y-10922. Para cada reacción de 10 µl, se utilizaron 2 µl de cDNA (100 ng), 2 µl de agua libre de nucleasas, 5 µl de 2X TaqMan® Universal PCR Master Mix, 0.5 µl de cada sonda TaqMan® 20X. Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C (10 min), 40 ciclos a 95 °C (15 s) y 60 °C (1 min). El ciclo umbral (CT) se determinó mediante el programa Sequence Detection v1.2.2. Los valores de CT se normalizaron con respecto al valor del gen endógeno *adki* de *P. rhodozyma* y posteriormente, se calcularon los niveles de expresión de los genes *asy* y *aox* en función de la muestra de las 12 h del cultivo +Cu. Este cálculo se hizo utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Cada determinación se realizó por triplicado. Todos los reactivos

y equipo de laboratorio utilizados en este apartado fueron de Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific Inc.). La validación de las sondas para su uso en qPCR dúplex se presenta en Anexos-2.

7.2.4 Análisis estadístico

Un análisis ANOVA ($\alpha = 0.05$) con prueba de Tukey fue realizado a los datos de carotenoides mediante el programa Minitab® versión 17.3.1, 2013 (Minitab, Inc., State College, PA, USA).

8. RESULTADOS

8.1 Fermentaciones

8.1.1 Fermentación con cobre

8.1.1.1 Perfiles de biomasa, oxígeno disuelto, proteína, azúcares y etanol.

P. rhodozyma presentó una acumulación constante en la concentración de biomasa entre las 18-42 h alcanzando un máximo de 9.8 g/l (Figura 7a). Posterior a las 42 h, la concentración de biomasa descendió hasta 8.7 g/l a las 54 h y se mantuvo prácticamente constante hasta 66 h, al final de la fermentación, la biomasa acumulada fue de 6.6 g/l. Es de destacar que, el pO₂ (Figura 7a) descendió hasta 0% a las 28 h, manteniéndose así durante cuatro horas y coincidiendo con el crecimiento exponencial de la levadura. A las 42 h, el pO₂ ascendió hasta 39% y en ese punto se presentó la primera caída en la concentración de biomasa, desde 9.8 a 8.7 g/l a las 54 h. El pO₂ descendió de nuevo después de las 54 h hasta la hora 60, coincidiendo con un detenimiento en la acumulación de biomasa. A partir de las 61 h y hasta el final del cultivo, el pO₂ ascendió para llegar a valores cercanos al 100%.

En la figura 7a también se presentan los perfiles de proteína total y específica. La proteína total alcanzó una concentración de 1.36 g/l a las 30 h y justo en el momento en que la concentración de oxígeno estaba en 0%, la proteína total cayó, alcanzando 1.1 g/l a las 36 h. A las 42 h, la proteína total se observó en 1.44 g/l, aparentemente en relación con el ascenso en la concentración de oxígeno en el medio de cultivo. La caída de proteína total (0.87 g/l) que se observa a las 54 h, estuvo en concordancia con un descenso del pO₂ (desde 65%, 48 h hasta 61%, 54 h) y con la concentración de biomasa (9.3 g/l, 48 h hasta 8.7 g/l, 54 h). Hacia el final de la fermentación, la proteína total fue de 1.2 g/l. Así mismo, la proteína específica fue en ascenso durante las primeras seis horas del cultivo para tener un máximo de 67 g/100

g de levadura a las 18 h. Cabe resaltar, que la proteína específica cayó cerca de un 60% entre las 30-36 h, para después presentar un ascenso de 13% entre las 36-48 h; finalmente entre las 54-72 presentó una recuperación cercana al 55%. Es destacable que en las horas en que la proteína específica presentó los ascensos del 13 y 55%, la concentración de oxígeno también ascendió.

Por otro lado, la figura 7b muestra el perfil de la concentración de azúcares en el medio de cultivo. El descenso en la concentración de azúcares (de 29.6 a 3.7 g/l) entre las 18-36 h, estuvo en coincidencia con la fase de crecimiento exponencial. Después de las 42 h y hasta el final del cultivo, el consumo de azúcares prácticamente cesó para alcanzar 0.4 g/l. En otro orden de ideas, la producción de etanol (Fig. 7b) inició a las 24 h y llegó a un máximo de 5.7 g/l a las 42 h, en el periodo, se presentó un descenso de la concentración de azúcares, desde 95 hasta 5%. Posterior al agotamiento de los azúcares en el medio (42 h), el cultivo utilizó el etanol acumulado en la fase previa del cultivo, como segunda fuente de carbono y aunque no se produjo acumulación de biomasa (Fig. 7a), la reasimilación de etanol se observó ligada a la acumulación de carotenoides (Fig. 7b). La concentración de carotenoides en *P. rhodozyma* creciendo sin deficiencia de cobre, presentó una acumulación continua desde las 12 h, pero un aumento en la concentración fue más evidente entre las 36-48 h, en concordancia con la presencia de bajos niveles de azúcares en el medio, posterior a la fase exponencial de crecimiento y al periodo de microoxigenación que tuvo la levadura entre las 28-32 h. Entre las 48-54 h, se observó un detenimiento en la acumulación de carotenoides, tanto específico como volumétrico, en ese periodo se observó una disminución en la concentración de oxígeno en el medio. Posterior a las 54 h, se observa acumulación de carotenoides para alcanzar un máximo de 3.1 µg/ml y una concentración, al final del cultivo de 2.9 µg/ml y 442 µg/ g de levadura. En el periodo entre las 54-66 h, la acumulación de

carotenoides ocurrió principalmente con, alto % de pO2 en el medio y la utilización del etanol como fuente de carbono.

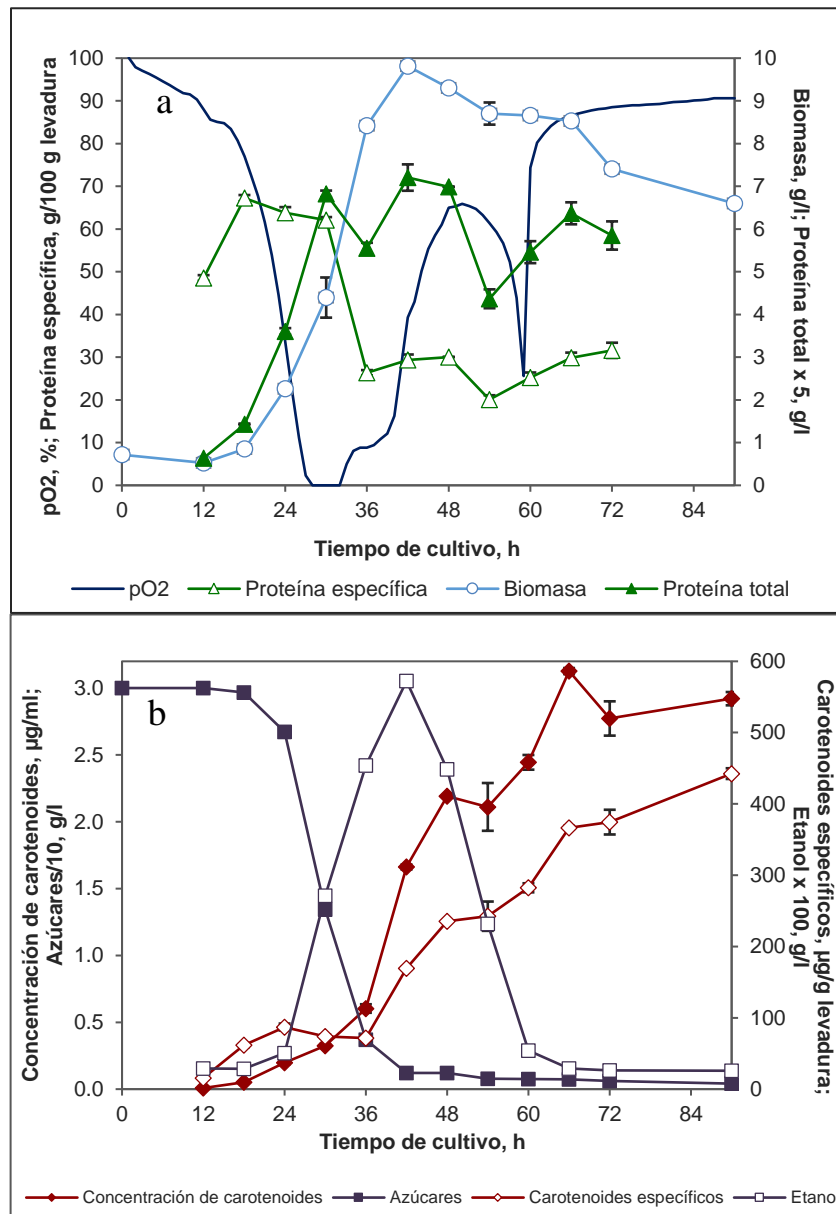


Figura 7. Desarrollo de los parámetros de un cultivo de *P. rhodozyma* creciendo en +Cu. a) Biomasa, oxígeno disuelto, proteína total y proteína específica. b) Concentración de azúcares, concentración de carotenoides, carotenoides específicos y perfil de etanol. Los valores de proteína total, azúcares y etanol fueron ajustados a una escala que permitiera hacer comparación entre los datos dentro de su respectiva gráfica.

8.1.1.2 Determinación de carotenoides por HPLC

La proporción de carotenoides, principalmente astaxantina y β -caroteno, en el cultivo +Cu de *P. rhodozyma* tuvo diferencias a lo largo de la fermentación. En la figura 8 se muestran cuatro cromatogramas que representan diferentes estadios del cultivo: a) a las **30 h** el cultivo estaba en condiciones microaerófilas o prácticamente anóxicas, además, se iniciaba la acumulación de etanol. Aquí la astaxantina y el β -caroteno se presentaron en un 57 y 9% respectivamente, del total de los carotenoides presentes; b) a las **60 h** la levadura había pasado por una fase oxidativa importante con niveles de pO₂ mayores al 25%, además, se había consumido el 91% del etanol acumulado. En el cromatograma se observa que la proporción de astaxantina aumentó, se mantuvo la proporción de β -caroteno y el número de compuestos carotenoides intermediarios fue menor, en relación con las 30 h. También, se pudo observar la desaparición del compuesto retenido a los 17 min (pico 9 en 30 h), con un aumento en la intensidad de los picos 3, 5 y 8; c) a las **66 h** la concentración de biomasa en el cultivo había disminuido, la pO₂ era cercana a 85%, se había consumido cerca del 95% del etanol acumulado y se observó la mayor acumulación en la concentración de carotenoides (Fig. 7b). Sin embargo, en el cromatograma se puede apreciar que la proporción de astaxantina fue menor que a las 60 h, con un aumento del carotenoide intermediario retenido a los 7 min (pico 5). Las proporciones de astaxantina y β -caroteno fueron 50 y 6%, respectivamente; d) a las **72 h** hacia el final de la fermentación la pO₂ era cercana al 90% y prácticamente se había agotado el etanol (Fig. 7b), se redujo la proporción de carotenoides intermediarios y la proporción de astaxantina aumentó a 56%, el β -caroteno se mantuvo igual que a las 66 h.

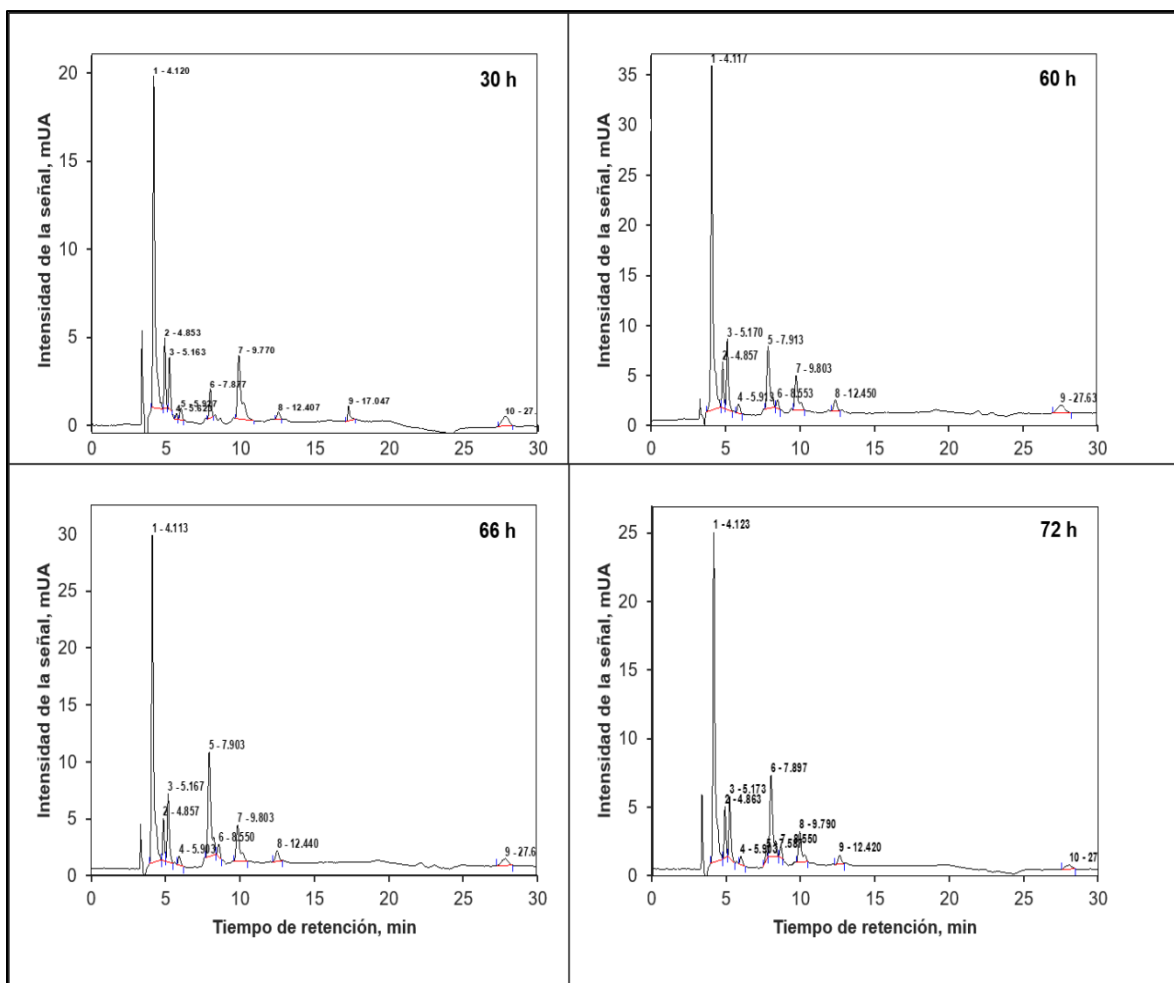


Figura 8. Cromatogramas de HPLC en fase reversa que muestran los carotenoides obtenidos del cultivo +Cu de *P. rhodozyma*. Las células se obtuvieron en cuatro diferentes tiempos del cultivo, el inicial (30 h) y el final (72 h), justo al inicio de la acumulación y al agotamiento de etanol, respectivamente. Pico 1: astaxantina, pico 10, 30 y 72 h; pico 9, 60 y 66 h: β -caroteno. Los otros picos corresponden a carotenoides intermedios no determinados.

8.1.1.3 Expresión de *asy* y *aox*

La astaxantina sintasa es la enzima encargada de transformar el β -caroteno en astaxantina y es codificada por el gen *asy*. En la figura 9 se observa que durante las primeras 24 h del cultivo +Cu, la expresión de *asy* se mantuvo en su nivel basal. Posteriormente, la expresión aumentó entre las 30-36 h coincidiendo con niveles de azúcares menores al 50% de la inicial, el inicio de la acumulación de etanol y de la acumulación de carotenoides (Fig. 7b). Conforme

avanzó la fermentación, la expresión de *asy* presentó fluctuaciones y alcanzó su valor máximo a las 60 h, en concordancia con el agotamiento del etanol en el medio, la segunda fase de acumulación de carotenoides (Fig. 7b) y la mayor proporción de astaxantina (Fig. 8, 60 h). Hacia el final de la fermentación la expresión de *asy* disminuyó cerca de un 47% con respecto a su nivel máximo.

Al mismo tiempo se midió la expresión del gen de la oxidasa alternativa (*aox*), que codifica para la enzima AOX, capaz de funcionar como desfogue de electrones cuando la cadena respiratoria principal se encuentra inhabilitada. La expresión de *aox* (Fig. 9) destacó con un primer máximo a las 18 h en sintonía con valores de pO₂ cercanos al 80% y el inicio de la fase de crecimiento exponencial (Fig. 7a). A continuación, entre las 18-30 h la expresión presentó un descenso para luego ir en aumento hasta las 48 h. Aquí se presentó el primer máximo de 23 veces su nivel basal (12 h), en ese punto el cultivo presentaba un pO₂ del 65%, sumado con el inicio de la asimilación del etanol acumulado por la levadura y el primer máximo en la acumulación de carotenoides específicos (Fig. 7b). Al seguir el curso de la fermentación, se presentaron fluctuaciones en la expresión de *aox*, pero todas con valores menores al de las 48 h. Al final de la fermentación (90 h), se observó un aumento del 26% con respecto al primer máximo (48 h), en correspondencia con la caída de biomasa, el pO₂ de 90% (Fig. 7a) y la mayor acumulación en la concentración de carotenoides y carotenoides específicos (Fig. 7b).

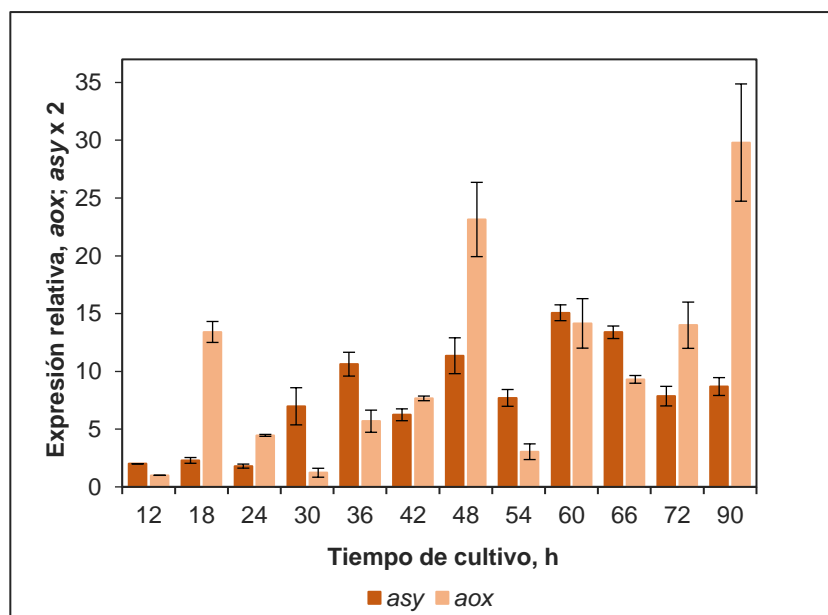


Figura 9. Niveles de expresión relativa de *asy* y *aox* en células de *P. rhodozyma* creciendo en +Cu. Ambos, los valores de expresión de *asy* y *aox*, están dados como valores relativos al valor de las 12 h que fue establecido arbitrariamente como 1. El gen *adki* fue utilizado como control interno para la normalización.

8.1.2 Fermentación sin cobre

8.1.2.1 Perfiles de biomasa, oxígeno disuelto, proteína, azúcares y etanol.

Los resultados de un cultivo representativo de las condiciones -Cu se explican a continuación.

La levadura tuvo una acumulación constante en la concentración de biomasa de las 12-36 h, creciendo a razón de 0.13 g/l h^{-1} . Posterior a este punto, la acumulación de biomasa se aceleró a razón de 0.29 g/l h^{-1} y alcanzó un primer máximo de 7.1 g/l a las 48 h (Fig. 10a). A continuación, entre las 48-54 h se presentó una disminución de la biomasa, llegando a un mínimo de 4.3 g/l y con un ligero aumento a 4.5 g/l a las 60 h. Posteriormente, se observó un aumento de la biomasa hasta un segundo máximo de 7.9 g/l a las 72 h, pero presentó una disminución a 7.0 g/l hacia el final de la fermentación.

Por su parte, la concentración de oxígeno en el medio disminuyó de 100 a sólo 98.4% durante las primeras 18 h (Fig. 10a). Entre las 18-27 h, siendo indicativo de un consumo

ligeramente aumentado, la pO_2 disminuyó hasta 92.6%. A partir de ese punto y hasta las 36 h, la pO_2 cayó hasta 23% (48 h), lo que podría sugerir que el consumo de oxígeno se intensificó de forma pronunciada. Es destacable que lo que parece ser la fase de máximo consumo de oxígeno (36-48 h), estuvo en concordancia con el crecimiento acelerado de la levadura. A partir de las 48 h, la pO_2 en el medio de cultivo fue al alza para tener valores de 96% a las 54 h. En el periodo anterior citado se presentó una caída muy significativa de biomasa (2.9 g/l). Subsecuente a ese periodo, se puede observar una caída en la pO_2 a partir de las 66 h y que duró hasta las 72h, punto en el cual se observó el segundo máximo en la acumulación de biomasa (7.9 g/l). Después de 72 h y hasta el final de la fermentación los niveles de oxígeno fueron cercanos al 100%.

La figura 10a muestra también el perfil de proteína total y específica en el cultivo - Cu. Se observa un incremento rápido a razón de 0.05 g/l h^{-1} de proteína total, para llegar de 0.04 a 0.34 g/l, entre las 12-18 h. Posteriormente, esta acumulación disminuye a razón de 0.015 g/l h^{-1} (18-30 h), en correspondencia con la acumulación de biomasa menor a 1.5 g/l en ese mismo periodo. De las 30-48 h la concentración de proteína aumento a razón de 0.064 g/l h^{-1} para llegar a 1.7 g/l. A las 54 h se observa un descenso en la concentración de proteína total (1.29 g/l) que fue de la mano con la caída en la acumulación de biomasa (de 7.1 a 4.2 g/l) a esa misma hora. Luego, se observó otro aumento para alcanzar un máximo de 2.4 g/l a las 72 h, al final de la fermentación, la proteína total fue de 2.0 g/l.

Por otra parte, la proteína específica también mostró un aumento inmediato entre las 12-18 h, para ir de 9.9 a 27 g/100 g de levadura. Así, durante el transcurso de la fermentación, la proteína específica mostró descensos (18-30 h, 36-48 h y después de las 60 h), alcanzando un máximo de 44 g/100 g de levadura a las 60 h. Cabe resaltar, que en las horas (18, 36 y 60

h) donde existió mayor acumulación de proteína (27, 28 y 44 g/100 g de levadura), correspondió con niveles altos de la pO₂.

En otro orden de ideas, la concentración de azúcares (Fig. 10b) en el medio disminuyó de forma continua durante las primeras 18 h, donde se consumieron 4.1 g/l de azúcares. Posterior a las 18 h, fue aparente que el consumo de azúcares disminuyó ya que la concentración sólo descendió de 25.8 a 24.5 g/l en el periodo de las 18-30 h. Después de las 30 h se observó una pendiente pronunciada en el consumo, habiéndose empleado el 74% de los azúcares, en concurrencia con el primer periodo de mayor acumulación de biomasa (Fig. 10a). La concentración de azúcares se mantuvo prácticamente constante (1.2-1.0 g/l) entre las 42-48 h, pero posterior a las 48 h, descendió hasta 0.5 g/l (54 h) y se mantuvo así por un periodo de 12 h. Podría decirse que las células de levadura tuvieron periodos de menor y mayor consumo de azúcares. Entre las 66-72 h hubo otra disminución de la concentración de azúcares, para finalizar en 1.5 g/l cuando se concluyó la fermentación.

Asimismo, la producción de etanol (Fig. 10b) dio inicio a las 24 h cuando la pO₂ era superior al 94% (Fig. 10a) y el consumo de azúcares estaba prácticamente detenido. Una vez que dio inicio la acumulación de etanol, esta alcanzó su máximo de 1.9 g/l a las 42 h y se mantuvo constante hasta las 48 h, hora en la cual inició su reasimilación. Cabe señalar que, durante el periodo de acumulación de etanol, se produjo el mayor consumo de azúcares. La reasimilación de etanol se produjo entre las 48-66 h, coincidiendo con la caída de biomasa (54 h), la elevación de la pO₂ (Fig. 10a) y muy ligado con el segundo ascenso en la acumulación de carotenoides.

La acumulación constante de carotenoides tanto volumétrica como específica, se presentó prácticamente desde el inicio del cultivo y, hasta las 42 h (1.75 µg/ml) y 36 h (314 µg/g de levadura), respectivamente. Esta acumulación estuvo en estrecha relación con el

crecimiento de la levadura (Fig. 10a). A partir de las 42 h, los carotenoides volumétricos se acumularon poco, siendo sólo 2.1 $\mu\text{g/ml}$ a las 60 h. Por otro lado, los carotenoides específicos presentaron una caída del 20% entre las 36-48 h, en ese periodo la concentración de oxígeno en el medio ascendió un 17.7%. Posterior a las 60 h, la acumulación de carotenoides fue en aumento para alcanzar un máximo de 4.6 $\mu\text{g/ml}$ y 641 $\mu\text{g/g}$ de levadura hacia el final de la fermentación. Este último periodo (48-72 h) de acumulación de carotenoides coincidió principalmente con, un pO_2 superior al 70% y la utilización del etanol como fuente de carbono.

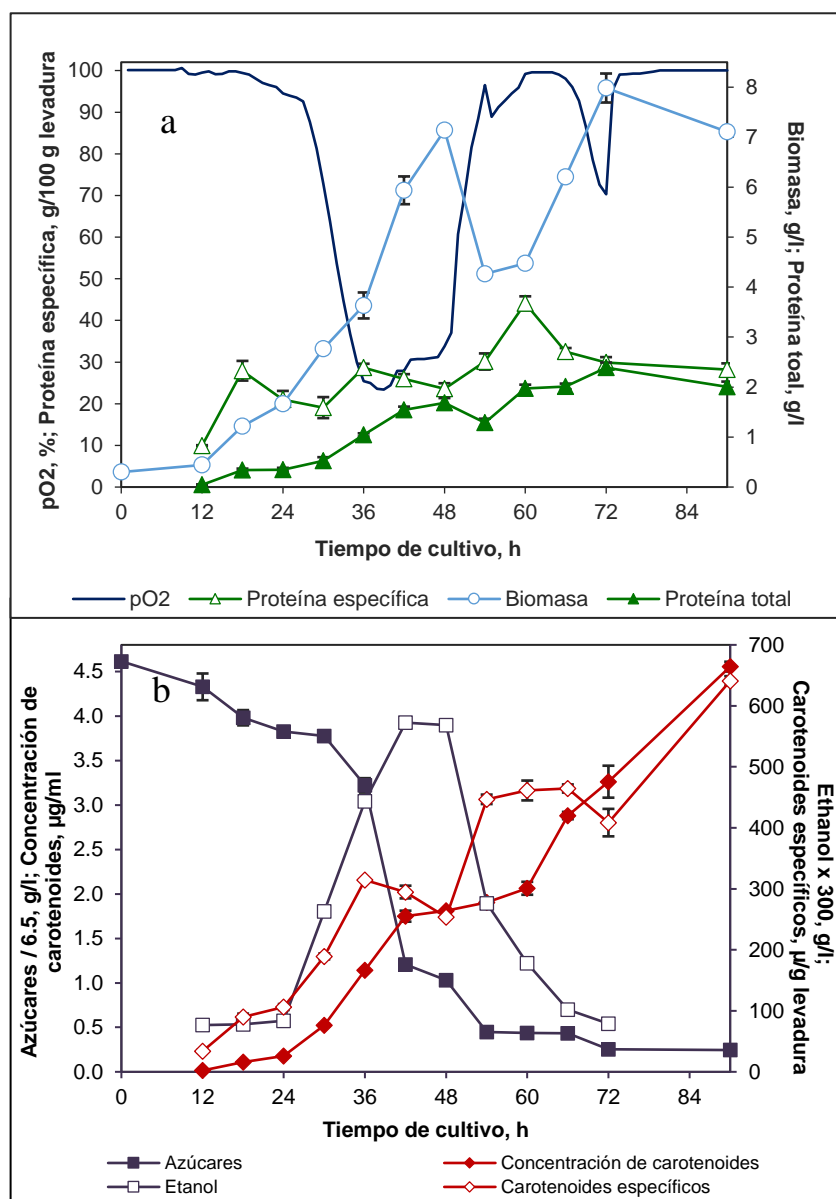


Figura 10. Desarrollo de los parámetros de un cultivo de *P. rhodozyma* creciendo en -Cu. a) Perfiles de biomasa, oxígeno disuelto, proteína total y proteína específica. b) Consumo de azúcares, concentración de carotenoides, carotenoides específicos y perfil de etanol. Los valores de proteína total, azúcares y etanol fueron ajustados a una escala que permitiera hacer comparación entre los datos dentro de su respectiva gráfica.

8.1.4.2 Determinación de carotenoides por HPLC

Se determinó la proporción de astaxantina y β -caroteno, en el cultivo -Cu de *P. rhodozyma*, aquí se observaron cambios a lo largo de la fermentación en la proporción de β -caroteno, pero no tan sustanciales en la de astaxantina. En la figura 11 se muestran cuatro cromatogramas que representan diferentes estadios del cultivo: **30 h**) el cultivo presentó un pO₂ cercano al 72%, además, se iniciaba la acumulación de etanol. Aquí la astaxantina y el β -caroteno se presentaron en un 54 y 17% respectivamente de los carotenoides totales; **60 h**) la levadura pasaba por condiciones oxidantes importantes con una pO₂ del 99% (Fig. 10a) después de haber consumido cerca del 70% del etanol acumulado. Aquí la proporción de astaxantina fue de 78%, mientras que la proporción de β -caroteno se mantuvo y el número de compuestos carotenoides intermediarios fue menor, en relación con las 30 h; **66 h**) aquí el pO₂ fue 98%, se había consumido cerca del 82% del etanol acumulado y se presentaba la segunda fase de mayor acumulación en la concentración de carotenoides (Fig. 12b). Las proporciones de astaxantina y β -caroteno fueron 73 y 5%, respectivamente; **72 h**) al final de la fermentación el pO₂ fue cercano al 99% y prácticamente se había agotado el etanol, la proporción de astaxantina aumentó a 76% y el β -caroteno se redujo al 2%.

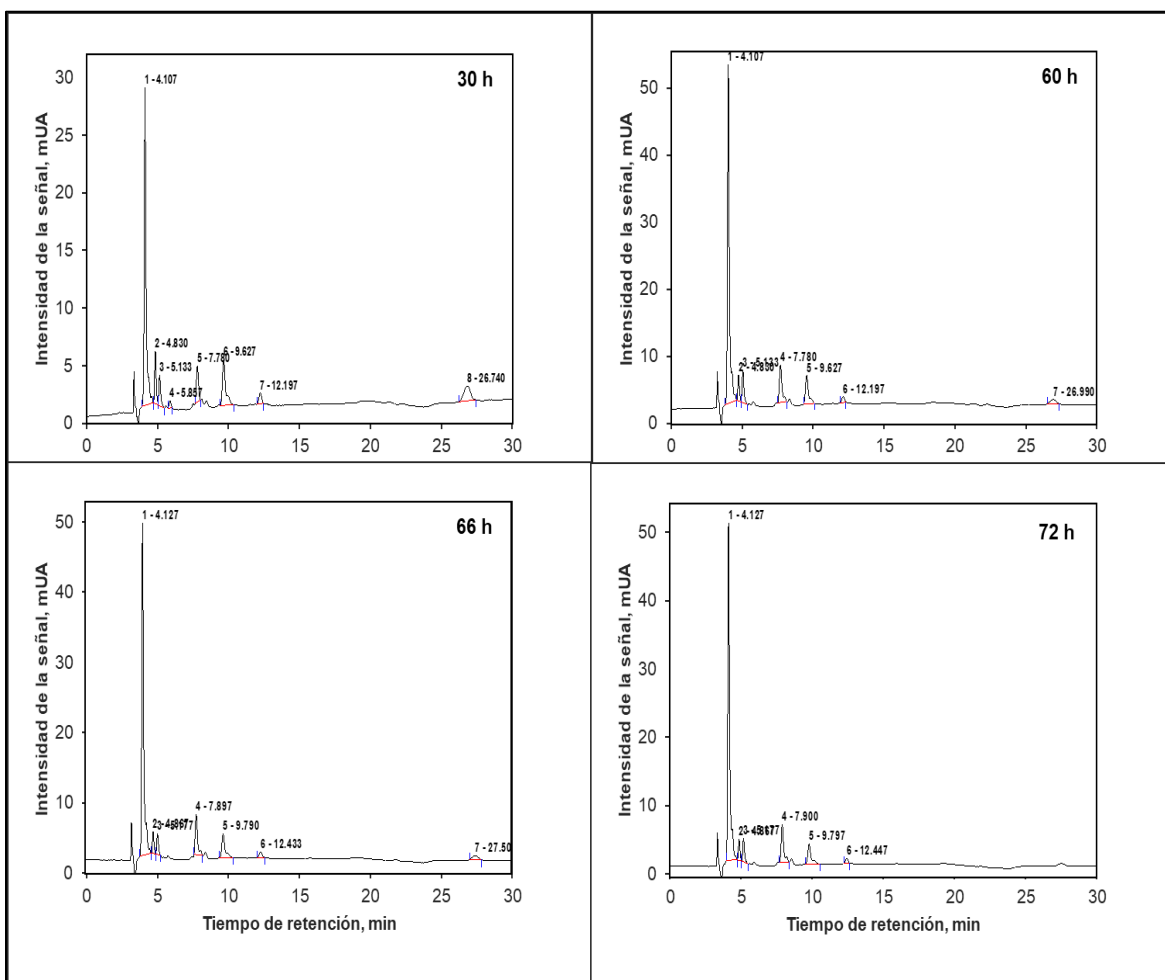


Figura 11. Cromatogramas de HPLC en fase reversa que muestran los carotenoides obtenidos del cultivo -Cu de *P. rhodozyma*. Las células se obtuvieron a tiempos distintos el inicial (30 h) y el final (72 h), justo al inicio de la acumulación y al agotamiento de etanol, respectivamente. Pico 1: astaxantina, pico 8, 30 h; pico 7, 60 y 66 h: β -caroteno. Los otros picos corresponden a carotenoides intermedios no determinados.

8.1.4.3 Expresión de *asy* y *aox*

En la figura 12 se observa que la expresión de *asy* tuvo un aumento del 15% entre las 12-18 h para después disminuir en un 60% a las 24 h. Posteriormente, a las 30 h la expresión aumentó gradualmente para alcanzar su máximo a las 48 h y mantenerse así hasta las 60 h. La etapa de mayor expresión fue coincidente con el lapso de asimilación de etanol, la fase de mayor acumulación de carotenoides, azúcar residual menores al 21% de la inicial (Fig. 10b)

y niveles de pO₂ entre 30 y 99% (Fig. 10a). Por último, la expresión de *asy* disminuyó entre las 60-72 h para aumentar ligeramente al final de la fermentación.

Con respecto a la expresión de *aox* (Fig. 12), destaca un primer máximo a las 18 h en sintonía con valores de pO₂ del 99% (Fig. 10a). Entre las 18 y 54 h, la expresión de *aox* disminuyó. Sin embargo, a las 54 h *aox* presentó 35% más expresión, con respecto de las 18 h. En ese punto el cultivo presentaba un pO₂ del 96%, sumado con el empleo del 50% del etanol acumulado y la segunda fase en la acumulación de carotenoides (Fig. 10b). Posterior a las 54 h, la expresión de *aox* disminuyó para mantenerse prácticamente constante, hacia el final de la fermentación.

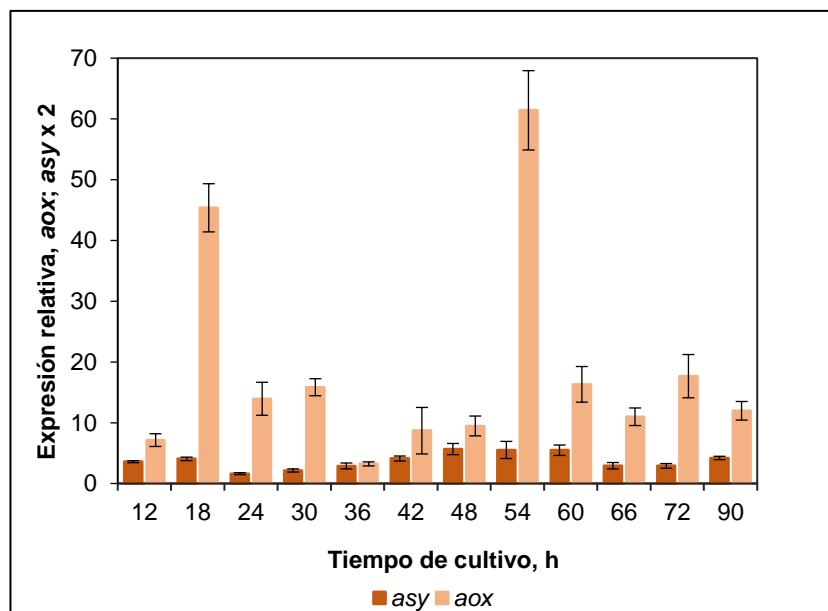


Figura 12. Niveles de expresión relativa de *asy* y *aox* en células de *P. rhodozyma* creciendo en -Cu. Ambos, los valores de expresión de *asy* y *aox*, están dados como valores relativos al valor de las 12 h del cultivo +Cu, que fue establecido arbitrariamente como 1. El gen *adki* fue utilizado como control interno para la normalización.

9. DISCUSIÓN

9.1 Consideraciones generales

El cultivo de *Phaffia rhodozyma* en un medio deficiente de cobre, tuvo un efecto negativo sobre: a) el crecimiento y la biomasa final, b) el consumo de oxígeno, c) la concentración de etanol producido, d) el consumo de etanol y e) el consumo de azúcar; en cambio, la deficiencia de cobre favoreció: f) la fermentación alcohólica bajo condiciones aeróbicas, g) la reasimilación de etanol a pesar de la presencia de azúcares en el medio de cultivo, h) mayor contenido de carotenoides en las células, i) la concentración final de carotenoides, j) la proporción de astaxantina en los carotenoides producidos y k) la expresión de *aox* en relación al cultivo +Cu.

9.2 Repercusiones del déficit de cobre en el consumo de oxígeno

Las mitocondrias son sitios primarios de consumo de oxígeno en células eucariotas. Así, las mitocondrias que respiran activamente oxígeno generan un gradiente de pO_2 con su entorno. Por lo tanto, las mitocondrias de las células en crecimiento activo están habitualmente expuestas a, y funcionan en, muy bajos niveles de pO_2 en comparación con los niveles promedio de saturación (con aire) correspondientes al medio de cultivo (Jamieson, 1998; Sung *et al.*, 2010). Por ejemplo, el fuerte consumo de oxígeno que se produjo entre las 28-32 h en el cultivo +Cu, provocó una caída de pO_2 a niveles cercanos a cero en el medio, a pesar del continuo suministro de aire. En cambio, el cultivo -Cu exhibió en gran medida, mayores niveles de pO_2 como resultado de un consumo de oxígeno más lento, provocado por la ausencia de cobre. Esto es consistente con reportes que muestran que la deficiencia de cobre, en varios tipos de células, disminuye: a) el contenido celular de CcO, b) la actividad de CcO y c) la respiración mitocondrial (Light, 1972; Downie y Garland, 1973; Rossi *et al.*, 1998;

Flores et al., 2000; Nittis *et al.*, 2001). Asimismo, puede esperarse que el nivel de pO_2 mitocondrial es determinado, *in vivo*, por un equilibrio entre el suministro y el consumo de oxígeno dentro de las mitocondrias. El suministro de oxígeno está determinado, en gran medida, por el pO_2 en el aire dentro del biorreactor, la velocidad del flujo de aire y la velocidad de agitación, mientras que el consumo depende principalmente de la actividad mitocondrial respiratoria por la célula. Es decir, el consumo de oxígeno vigoroso (+Cu) disminuye el pO_2 mitocondrial, mientras que el consumo lento de oxígeno (-Cu) invariablemente conduce a un mayor pO_2 . Por consiguiente, y consistente con los niveles de pO_2 medidos en el medio, se puede suponer que las mitocondrias de las células que crecieron en ausencia de cobre fueron expuestas, en promedio, a un mayor pO_2 que aquellas cultivadas en +Cu, y desde allí, expuestas a condiciones oxidativas más severas.

9.3 Posible efecto de la deficiencia de cobre en el estado redox del par NADH/NAD⁺

Durante el crecimiento respiratorio, el NADH citosólico y mitocondrial son reoxidados por el Complejo I de la cadena respiratoria, el cual cataliza la transferencia de dos electrones del NADH intramitocondrial a la ubiquinona (Bakker *et al.*, 2001). Además, se sabe que la actividad respiratoria también modula el estado redox del par NADH/NAD⁺ en muchos tipos de células, *in vivo* (Mayevsky y Chance, 1982; Noda *et al.*, 2002; Mayevsky y Chance, 2007; Mayevsky y Rogatsky, 2007). Es decir, la inhibición de la respiración generalmente conduce a un aumento de la relación NADH/NAD⁺, mientras que una respiración activa la disminuye (Sung *et al.*, 2010; Goncalves *et al.*, 2015). El bajo consumo de oxígeno en el cultivo -Cu, es decir una respiración lenta, con toda probabilidad entorpeció el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria, lo que provocaría una lenta conversión de NADH a NAD⁺. En

consecuencia, la falta de cobre puede provocar un estado más reducido de los portadores de electrones unidos a las proteínas, por ejemplo, NADH y CoQH₂. En resumen, los cambios de la actividad respiratoria pueden causar cambios inversos en el estado de reducción de los electrones unidos a las proteínas. De este modo, se puede inferir que tales portadores de electrones (o grupos prostéticos redox-activos) en las células cultivadas en -Cu estuvieron, en promedio, más reducidos debido a la respiración más lenta, que los de células crecidas en +Cu.

9.4 El efecto del cobre en la síntesis de carotenoides

La mayor (ver análisis estadístico en Anexo 1) acumulación de carotenoides específicos en el cultivo -Cu, así como la mayor concentración de carotenoides al final de la fermentación, indican que las células de *P. rhodozyma* crecidas en -Cu, se enfrentaron a un mayor estrés oxidativo que cuando se cultivaron en +Cu. En consecuencia, puede suponerse que la falta de cobre alentó la formación de O₂^{•-}/H₂O₂, demandando que las células se defendieran a través de la acumulación de carotenoides. Además, fue notable que la pigmentación apareció antes en las células cultivadas en deficiencia de cobre que en aquellas del cultivo +Cu. Por otra parte, como la deficiencia de cobre provocó mayores niveles de pO₂ en comparación con el cultivo +Cu, es comprensible que un mayor nivel de pO₂ esté relacionado con una producción aumentada de O₂^{•-}/H₂O₂, así como de los carotenoides intracelulares. Lo anterior coincide con varios estudios que han demostrado que la exposición de las células de *X. dendrorhous* a O₂^{•-} o H₂O₂ aumenta la proporción de astaxantina (hasta un 83%) y el contenido celular de carotenoides totales (An *et al.*,1996; Kim y Chang, 2006; Liu y Wu, 2006). En relación con esto, existe también evidencia de que altos niveles de pO₂ causados por una disfunción de CcO, usualmente inducen la producción de ROS mitocondrial en otros

tipos de células (Flores *et al.*, 2000; Merchant *et al.*, 2006; Hoffman y Brookes, 2009; Sung *et al.*, 2010; Srinivasan y Avadhani, 2012).

9.5 La deficiencia de cobre induce la fermentación y la expresión de *aox*

La notoria disminución en la tasa específica de consumo de azúcares (datos no mostrados) entre las 12-27 h en el cultivo -Cu (0,6 a 0.025 g/g de células h⁻¹), sugirió un impedimento gradual en las células para metabolizar el azúcar disponible. Sin embargo, las células reactivaron el consumo de azúcares a las 27 h, poco después del comienzo de la acumulación de etanol. Es bien sabido que la fermentación alcohólica promueve la reoxidación de NADH, mientras que la desactivación de la fermentación disminuye la renovación del NAD⁺. En consecuencia, los datos anteriores sugieren fuertemente que la disminución en la tasa específica del consumo de azúcares se debió a desequilibrios redox causados por la falta de cobre, es decir, como resultado se obtuvo la inhibición de la reoxidación de NADH. Durante el crecimiento temprano (18 h), las células cultivadas en -Cu, mostraron una mayor expresión de *aox* (3.4 veces) y de *asy* (2 veces), junto con una mayor acumulación intracelular de carotenoides (1.5 veces) en comparación con los cultivados en +Cu a esa misma hora. La mayor expresión de *aox* y *asy*, y ligeramente a partir de entonces, la mayor acumulación intracelular de carotenoides (por ejemplo, 24-36 h), como se argumentó previamente, concuerdan con la interpretación de que la falta de cobre perjudica la respiración, y de ahí la reoxidación de NADH. Esto también concuerda con el rol generalmente aceptado de AOX; es decir, disipar la energía de equivalentes reducidos en calor para proteger las células contra un severo estrés oxidativo (Downie y Garland, 1973; Veiga *et al.*, 2003; McDonald, 2008; Rogov y Zvyagilskaya, 2015). Cuando la cadena respiratoria principal está obstruida, la actividad de AOX estimula la reoxidación de NADH mitocondrial proporcionando una vía

alternativa para el paso de electrones del QH₂ al oxígeno. Por lo tanto, es evidente que una reoxidación de NADH limitada, junto con un elevado nivel de pO₂, ambos factores alentaron la expresión de *aox*. Asimismo, se sabe que en muchos organismos incluidos hongos y plantas, la activación de *aox* limita la velocidad de producción de ROS. En levaduras, se ha demostrado que AOX afecta directamente la relación NADH/NAD⁺ (Vemuri *et al.*, 2007). Además, en células con una respiración mitocondrial impedida, un desequilibrio redox podría extenderse fácilmente al citoplasma (Noda *et al.*, 2002; Rigoulet *et al.*, 2004). En tales circunstancias, el metabolismo fermentativo se convirtió en una necesidad para las células de levadura del cultivo -Cu, a pesar de las condiciones aeróbicas prevalecientes. Es interesante que incluso después de activarse la fermentación aeróbica, lo que aparentemente disminuyó la tasa de producción de O₂^{•-}/H₂O₂ como lo sugiere la disminución de la expresión de *aox* de las 18-36 h, la deficiencia de cobre todavía ejerció cierto estrés sobre las células de levadura, como sugiere la acumulación significativa de carotenoides intracelulares y volumétricos observados entre las 24-36 h. En resumen, la fermentación aeróbica evidentemente fue desencadenada por un desequilibrio redox del par NADH/NAD⁺ en células de *P. rhodozyma* cultivadas bajo deficiencia de cobre.

Por el contrario, el cultivo +Cu comenzó la producción de etanol (24-30 h) cuando las células estaban a punto de entrar en la fase anaeróbica de crecimiento. Es intrigante, que algo parecido a lo que ocurre cuando *P. rhodozyma* crece bajo la deficiencia de cobre, bajos niveles de oxígeno pueden también entorpecer la respiración para desencadenar la fermentación anaeróbica. El pequeño aumento de pO₂ que sucedió de las 32-36 h en +Cu sugiere que este último evento de hecho ocurrió. Esto podría implicar que la fermentación, independientemente de si es aeróbica o anaeróbica (-Cu o +Cu), así como la expresión de *aox* y la síntesis de astaxantina, todas, son aparentemente desencadenadas por un evento

común, es decir, un desequilibrio redox del par NADH/NAD⁺. El recambio de NADH se produce a velocidades rápidas en el citosol y en la matriz mitocondrial. Por lo tanto, los desequilibrios redox del par NADH/NAD⁺ no solo son relevantes durante las condiciones respiratorias aeróbicas, sino también durante las condiciones anaeróbicas (Bakker *et al.*, 2001). De este modo, la fermentación, la respiración mitocondrial y la función AOX son componentes cruciales para mantener bajo control el equilibrio redox NADH/NAD⁺ celular total, y definitivamente trabajan junto con otros mecanismos de reoxidación de NADH, por ejemplo, producción de glicerol y proteínas de desacoplamiento (UCP, del inglés, Uncoupling proteins) para prevenir desequilibrios redox fuera de control dentro de las células de levadura (Bakker *et al.*, 2001; Uribe Carvajal *et al.*, 2011)

La causa biológica que desencadena la fermentación aeróbica ha sido debatida durante mucho tiempo. Sin embargo, a pesar de muchas investigaciones realizadas, hasta la fecha no se ha llegado a un entendimiento definitivo sobre el mecanismo que desencadena la fermentación. Los resultados de este trabajo muestran que en las células cultivadas en -Cu, un desequilibrio del recambio de NADH a NAD⁺, provoca la fermentación en varias condiciones. Sorprendentemente, estudios recientes con *S. cerevisiae*, también muestran el papel crucial del estado redox del par NADH/NAD⁺ para activar la fermentación aeróbica (Vemuri *et al.*, 2007; Kasperski, 2008 y Aceituno *et al.*, 2012). Dado que la bioquímica del metabolismo intermediario, incluido el par NADH/NAD⁺, se conserva de las levaduras a los humanos (Otterstedt *et al.*, 2004), es discernible que un mecanismo análogo al que desencadena la fermentación en *P. rhodozyma*, podría ser también operativo para desencadenar la fermentación alcohólica bajo las diferentes condiciones expresadas previamente para otras levaduras y tipos de células (De Deken, 1966; Koobs 1972, Kappeli 1986; Van Dijken y Scheffers 1986; Postma y Verduyn, 1989; Van Urk *et al.*, 1990; Larsson

et al., 1997; Otterstedt *et al.*, 2004; Vemuri *et al.*, 2007; Díaz-Ruíz *et al.*, 2008; Huberts *et al.*, 2011; Slavov y Botstein, 2013; Hagman *et al.*, 2014). Entonces, el mecanismo que desencadena la fermentación en *P. rhodozyma* podría ser de amplia aplicación a otros tipos de células. En resumen, este trabajo junto con el trabajo de otros (Vemuri *et al.*, 2007; Kasperski, 2008 y Aceituno *et al.*, 2012) sugieren fuertemente que la reducción de la oxidación de NADH/NAD⁺ desacoplada es un factor crítico para desencadenar la fermentación, independientemente de si se da en condiciones aeróbicas o anaeróbicas.

9.6 La utilización de etanol junto con la deficiencia de cobre produce desequilibrio redox y estrés oxidativo.

El consumo de etanol por *P. rhodozyma* provocó la acumulación intracelular de carotenoides en ambos cultivos (-Cu y +Cu), es decir, mientras el etanol estaba siendo reasimilado, se pudo observar un aumento significativo del contenido de carotenoides intracelulares (48-54 h, -Cu; 36-48 h, +Cu). Además, estos eventos ocurrieron junto con una disminución significativa en la biomasa celular, pero particularmente en el cultivo con deficiencia de cobre (Fig. 12). En conjunto, estos eventos resaltan las notables condiciones de estrés que se desarrollaron mientras se usaba etanol como fuente de carbono, especialmente cuando la actividad respiratoria se veía obstaculizada por la falta de cobre.

Se sabe que la oxidación de etanol a acetaldehído aumenta la relación NADH/NAD⁺ en muchos tipos de células (Jones 1989; Prieto *et al.*, 1992; Hou *et al.*, 2010; Watson *et al.*, 2011), lo que significa que el metabolismo de etanol debe aumentar el suministro de electrones a la cadena respiratoria. Además, dado que la ausencia de cobre deteriora la reducción de oxígeno a agua (Fig. 10a), y presumiblemente la reoxidación de NADH, el inicio del consumo de etanol causaría un desequilibrio redox repentino debido al excedente

de NADH que no puede oxidarse a través de la cadena respiratoria principal. La tasa de consumo de etanol más lenta en el cultivo -Cu (Fig. 12b) en comparación con el cultivo +Cu (Fig. 9b), parece ser indicativo del mayor desequilibrio redox que prevalece bajo la condición anterior. Los niveles relativamente altos de oxígeno junto con una alta relación NADH/NAD⁺, por analogía con lo que sucede en mitocondrias aisladas y varios tipos de células, fomentarían la generación de O₂^{•-}/H₂O₂ (Miñana *et al.*, 2002; Hoffman y Brooks, 2009; Quinlan *et al.*, 2012) y, en consecuencia, la síntesis de astaxantina. Esto está de acuerdo con la mayor acumulación de carotenoides en el cultivo -Cu en comparación con el cultivo +Cu cuando el etanol se agotó a las 66 h (464 frente a 366 µg/g células). La mayor proporción de astaxantina en el cultivo -Cu (76 frente a 56%) también es consistente con la interpretación anterior. Debido a que el cultivo +Cu produjo casi tres veces más etanol en comparación con el cultivo -Cu (5.7 g/l frente a 1.9 g/l), se podría esperar una mayor acumulación de carotenoides en el primer caso, pero esto no sucedió. Es evidente que incluso cantidades mínimas de utilización de etanol por las células, cuando coinciden con una actividad respiratoria alterada por falta de cobre, implican condiciones de estrés notable que compensan con creces las mayores concentraciones de etanol en el cultivo +Cu. Es intrigante que el consumo crónico de etanol en humanos y en ratas se haya asociado al estrés oxidativo (Miñana *et al.*, 2002; Sastre *et al.*, 2007), por lo que los efectos del metabolismo del etanol parecen ser análogos en otros tipos de células más allá de las levaduras.

Además, se pudieron observar aumentos significativos de la expresión de *aox* junto con el consumo de etanol para las dos condiciones. El cultivo -Cu mostró un aumento notable de la expresión de *aox* (6.5 veces) poco después del inicio de la reasimilación de etanol (48-54 h), a pesar de la pequeña cantidad de etanol disponible en comparación con el cultivo +Cu (1.9 g/l vs. 5.7 g/l). Esto también es consistente con la inferencia de que el consumo de etanol

en las células de *P. rhodozyma* crecidas en ausencia de cobre (-Cu), resulta súbitamente en un desequilibrio redox severo y estrés en las células de levadura. De aquí, la necesidad imperiosa de elevar la expresión de *aox* para hacer operativo una vía alternativa para el paso de electrones de NADH a CoQ, y de la resultante CoQH₂ al O₂ a través de AOX (ver también Maxwell *et al.*, 1999). Esto parece ser de vital importancia, especialmente bajo deficiencia de cobre, ya que el aumento de la expresión de *aox* serviría para minimizar el exceso de equivalentes reductores, y al hacerlo, mantendría limitada la tasa de generación intracelular de O₂^{•-}/H₂O₂. En ese sentido, un análisis *in silico* (datos no mostrados) de la secuencia de nucleótidos corriente arriba de *aox* de *X. dendrorhous*, reveló sitios de unión a diversos factores de transcripción, e.g. Oct-1 y c-REL que son inducibles por ROS en diversos tipos de células (Wang *et al.*, 2001; Tantin *et al.*, 2005; Gilmore y Gerondakis, 2011) y en su conjunto sugieren que la expresión de *aox* se favorece bajo condiciones adversas, como a las que se enfrenta el cultivo -Cu.

En otras levaduras, la activación de AOX se considera un mecanismo para la disipación de energía que sirve para protegerlas contra la sobre-reducción de portadores de electrones, y que simultáneamente sirve para mantener la actividad del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Por lo tanto, AOX asegura la continuidad del metabolismo mientras que restringe la generación de ROS, particularmente cuando la cadena respiratoria principal está inhibida (Downie y Garland, 1973; Vanlerberghe y McIntosh, 1997). La fuerte caída de biomasa que ocurrió entre las 48-54 h parece ser consecuencia de lo anterior, y sugiere que el metabolismo del etanol junto con la baja actividad celular respiratoria (-Cu) dio como resultado una muerte celular significativa. De manera similar, en el cultivo + Cu, la expresión de *aox* también se activó (3 veces) durante la reasimilación de etanol (42-48 h). Sin embargo, bajo esta última condición con una respiración más activa, el desequilibrio redox sería menos

pronunciado y se necesitarían menores niveles de expresión de *aox* en contraste con el cultivo -Cu. Es sorprendente que la síntesis de astaxantina junto con la expresión intermitente de *aox* durante el período de consumo de etanol (42-60 h) parezca desempeñar un papel clave para evitar una disminución drástica de la biomasa (o muerte celular) en el cultivo + Cu.

En resumen, la síntesis de astaxantina y la expresión *aox* se activaron en condiciones aeróbicas ($pO_2 > 25\%$), aparentemente como resultado de un evento común, es decir, la existencia de un desequilibrio redox NADH/NAD⁺. Se puede concluir que, un lento flujo de electrones a través de la cadena respiratoria principal, y un aumento en el suministro de electrones (al comienzo del consumo de etanol), ambos eventos promueven desequilibrios redox. La activación de la síntesis de astaxantina y la expresión de *aox*, muy probablemente se produce a través de un mecanismo que implica una mayor generación de O₂^{•-}/ H₂O₂ que se origina a partir de un desequilibrio redox concurrente con altos niveles de pO₂.

9.7 La deficiencia de cobre y la asimilación de etanol inhiben la síntesis de proteínas y estimula la producción de astaxantina.

La evidente caída del contenido de proteína total en ambos cultivos (-Cu y +Cu) a la hora 54, apuntó a un impedimento en las células de *P. rhodozyma* para la síntesis de proteína, justo cuando se reasimiló el etanol producido. Destaca también la caída en la acumulación de biomasa a esa misma hora, pero aún más pronunciada en el cultivo -Cu. Lo anterior es un indicativo de que las células de ambos cultivos sufrieron deficiencia energética bajo dichas condiciones, en especial las del cultivo -Cu, tal como ocurre en células con limitación de fosfatos y nitrógeno (Flores-Cotera *et al.*, 2001; Boer *et al.*, 2010). Dado que la reoxidación de NADH a través de la ETC, regenera NAD⁺ y estimula la producción de ATP mediante la fosforilación oxidativa en organismos aerobios (Bakker *et al.*, 2001). La fosforilación de

ADP a ATP es la vía principal para la asimilación de fosfato. La imposibilidad de fosforilar ADP inhibe la oxidación de NADH, provocando su acumulación, inhibiendo la síntesis de proteínas por deficiencia energética (Brown, 1992) y estimula la producción de ROS (Bakker *et al.*, 2001; Janssen *et al.*, 2002). Así mismo, se ha descrito que los ROS juegan un rol importante en la regulación de genes involucrados en el metabolismo energético (Bazil *et al.*, 2016). En consecuencia, el bajo contenido intracelular de proteína reportado en *X. dendrorhous* creciendo en condiciones de limitación de fosfatos, es muy probable que sea un resultado del agotamiento de ATP o de la disminución de energía para la síntesis de proteínas (Flores-Cotera *et al.*, 2001). De esta forma, la restricción en la síntesis de proteínas sería un suceso común que estimule la síntesis de astaxantina, ya sea bajo condiciones de limitación de fosfatos, nitrógeno o cobre.

10. CONCLUSIONES

Este trabajo muestra que la deficiencia de cobre y el consumo de etanol, ambos, pueden afectar la respiración y retrasar el crecimiento en *P. rhodozyma*. Cada uno de ellos posteriormente puede conducir a una secuencia de eventos: bajo consumo de oxígeno, aumento del nivel de pO₂, disminución de la oxidación de NADH, una mayor reducción del par NADH/NAD⁺, aumentando de la generación de ROS, lo que conlleva a estrés oxidativo, la inducción de la síntesis de astaxantina y aumento de la expresión de *aox*. Esto sugiere que el mecanismo para desencadenar la síntesis de astaxantina y la expresión de *aox* bajo deficiencia de cobre puede ser, en realidad, solo un ejemplo de un mecanismo de señalización desatado por el grado de reducción del par NADH/NAD⁺.

11. BIBLIOGRAFÍA

Aceituno F.F., Orellana M., Torres J., Mendoza S., Slater A.W., Melo F., Agosina E. (2012). Oxygen response of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 grown under carbon-sufficient, nitrogen-limited enological conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(23), 8340–52. DOI: 10.1128/AEM.02305-12.

Alcaíno J., Barahona S., Carmona M., Lozano C., Marcoleta A., Niklitschek M., Sepulveda D., Baeza M., Cifuentes V. (2008). Cloning of the cytochrome p450 reductase (crtR) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiol.* 8(169), 1-13. DOI:10.1186/1471-2180-8-169.

Alvarez V., Rodríguez-Sáiz M., de la Fuente J.L., Gudina D.J., Godio R.Q., Martín J.F., Barredo J.L. (2006). The *crtS* gene of *Xanthophyllomyces dendrorhous* encodes a novel cytochrome-P450 hydroxylase involved in the conversion of beta-carotene into astaxanthin and other xanthophylls. *Fungal Genet. Biol.* 43(4), 261-272. DOI: 10.1016/j.fgb.2005.12.004.

An G., Schuman D.B., Johnson E.A. (1989). Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(1), 116–24.

An G.H., Chang K.W., Johnson E.A. (1996). Effect of oxygen radicals and aeration on carotenogenesis and growth of *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*). *J. Microbiol. Biotechn.* 6(2), 103-109.

An G.H., Jang B.G., Cho M.H. (2001). Cultivation of the carotenoid-hyperproducing mutant 2A2N of the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) with molasses. *J. Biosci. Bioeng.* 92(2), 121-125. DOI: 10.1016/S1389-1723(01)80211-5.

Arnold S., Kadenbach B. (1997). Cell respiration is controlled by ATP, an allosteric inhibitor of cytochrome-c oxidase. *Eur. J. Biochem.* 249(1), 350-354. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00350.x.

Bakker B.M., Overkamp K.M., van Maris A.J.A., Kötter P., Luttik M.A.H., van Dijken J.P., Pronk J.T. (2001). Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25(1):15–37. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2001.tb00570.x.

Barredo J.L., García-Estrada C., Kosalkova K., Barreiro C. (2017). Biosynthesis of Astaxanthin as a main carotenoid in the heterobasidiomycetous yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J. Fungi.* 3(44), 1-17. DOI:10.3390/jof3030044.

Bazil J.N., Beard D.A., Vinnakota K.C. (2016). Catalytic coupling of oxidative phosphorylation, ATP demand, and reactive oxygen species generation. *Biophys J.* 110(4), 962-971. doi: 10.1016/j.bpj.2015.09.036.

- Bellora N., Moliné M., David-Palma M., Coelho M.A., Hittinger C.T., Sampaio J.P., Gonçalves P., Libkind D. (2016). Comparative genomics provides new insights into the diversity, physiology, and sexuality of the only industrially exploited tremellomycete: *Phaffia rhodozyma*. *BMC Genom.* 17, 1–16. DOI: 10.1186/s12864-016-3244-7.
- Boer V.M., Crutchfield C.A., Bradley P.H., Botstein D., Rabinowitz J.D. (2010). Growth-limiting intracellular metabolites in yeast growing under diverse nutrient limitations. *Mol. Biol. Cell.* 21, 198–211.
- Brand M.D., Affourtit C., Esteves T.C., Green K., Lambert A.J., Miwa S., Pakay J.I., Parker N. (2004). Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 37(6), 755-767. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.05.034.
- Britton G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* 9(15), 1551-1558. DOI:10.1096/fasebj.9.15.8529834.
- Brown G. C. (1992). Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochem. J.* 284, 1-13.
- Calo P., Velazquez J.B., Sieiro C., Blanco P., Longo E., Villa T.G. (1995). Analysis of astaxanthin and other carotenoids from several *Phaffia rhodozyma* mutants. *J. Agric. Food Chem.* 43(5), 1396-1399. DOI: 10.1021/jf00053a049.
- Chae M.S., Nargang F.E. (2009). Investigation of regulatory factors required for alternative oxidase production in *Neurospora crassa*. *Physiol. Plant.* 137(4), 407-418. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2009.01239.x.
- Chávez-Cabrera C., Flores-Bustamante Z.R., Marsch R., Montes M.C., Sánchez S., Cancino-Díaz J.C., Flores-Cotera L.B. (2010). ATP-citrate lyase activity and carotenoid production in batch cultures of *Phaffia rhodozyma* under nitrogen-limited and nonlimited conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85(6), 1953-60. DOI: 10.1007/s00253-009-2271-6.
- Chávez-Cabrera C., Marsch R., Bartolo-Aguilar Y., Flores-Bustamante Z.R., Hidalgo-Lara M.E., Martínez-Cárdenas A., Cancino-Díaz J.C., Sánchez S., Flores-Cotera L.B. (2015). Molecular cloning and characterization of the ATP citrate lyase from carotenogenic yeast *Phaffia rhodozyma*. *FEMS Yeast Res.* 15(6). DOI: 10.1093/femsyr/fov054.
- Chi S., He Y., Ren J., Su Q., Liu X., Chen Z., Wang M., Li Y., Li J. (2015) Overexpression of a bifunctional enzyme, *CrtS*, enhances astaxanthin synthesis through two pathways in *Phaffia rhodozyma*. *Microb Cell Fact.* 14 (90), 1-12. DOI 10.1186/s12934-015-0279-4.
- Cifuentes V., Hermosilla G., Martínez C., León R., Pincheira G., Jiménez A. (1997). Genetics and electrophoretic karyotyping of wild-type and astaxanthin mutant strains of *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 72, 111–117. DOI: 10.1023/A:1000200119447.
- Circu ML, Aw TY. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Bio Med.* 48(6), 749-762. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022.

- Dankai W., Pongpom M., Vanittanakom N. (2015). Validation of reference genes for real-time quantitative RT-PCR studies in *Talaromyces marneffi*. *J. Microbiol. Methods*. 118, 42-50. DOI: 10.1016/j.mimet.2015.08.015.
- Davoli P., Mierau V., Weber R.W.S. (2004). Carotenoids and fatty acids in red yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*. *Appl. Biochem. Micro.* 40: 392-397. DOI: 10.1023/B:ABIM.0000033917.57177.f2.
- De Deken R.H. (1966). The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J. Gen Microbiol.* 44(2), 149–56. DOI: 10.1099/00221287-44-2-149.
- de la Fuente J.L., Rodríguez-Sáiz M., Schleissner C., Díez B., Peiro E., Barredo J.L. (2010). High-titer production of astaxanthin by the semi-industrial fermentation of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J Biotech.* 148(2-3), 144-146. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2010.05.004.
- Díaz-Ruiz R., Avéret N., Araiza D., Pinson B., Uribe-Carvajal S., Devin A., Rigoulet M. (2008). Mitochondrial oxidative phosphorylation is regulated by fructose 1,6-bisphosphate: a possible role in Crabtree effect induction? *J Biol Chem.* 283(40), 26948–55. DOI: 10.1074/jbc.M800408200.
- Disch A., Schewender J., Müller C., Lichtenthaler H.K., Rohmer M. (1998). Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the *Cyanobacterium synechocystis* PCC 6714. *Biochem J.* 333(Pt 2):381-388.
- Downie J.A., Garland P.B. (1973). An antimycin A- and cyanide-resistant variant of *Candida utilis* arising during copper-limited growth. *Biochem. J.* 134(4), 1051-1061. DOI: 10.1042/bj1341051.
- Ertugay N., Hamamci H., Bayindirli A. (1997). Fed-batch cultivation of bakers' yeast: effect of nutrient depletion and heat stress on cell composition. *Folia Microbiol.* 42(3), 214-218. DOI: 10.1007/BF02818981.
- Evans C.T., Scragg A.H., Ratledge C. (1983). A comparative study of citrate efflux from mitochondria of oleaginous and non-oleaginous yeast. *Eur J Biochem.* 130(1), 195-204.
- Fassett R.G., Coombes J.S. (2012). Astaxanthin in Cardiovascular Health and Disease. *Molecules.* 17(2), 2030-48. DOI: 10.3390/molecules17022030.
- Flores C.L., Rodríguez C., Petit T., Gancedo C. (2000). Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 24(4), 507-529. DOI: 10.1016/S0168-6445(00)00037-1.

Flores-Cotera L.B., Martín R., Sánchez S. (2001). Citrate a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55(3), 341-347. DOI: 10.1007/s002530000498.

Flores-Cotera L.B., Sánchez S. (2001). Copper but not iron limitation increases astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in a chemically defined medium, *Biotechnol. Lett.* 23(10), 793–7971. DOI: 10.1023/A:1010358517806.

Gilmore T.D., Gerondakis S. (2011). The c-Rel Transcription Factor in Development and Disease. *Genes & Cancer.* 2(7), 695–711. DOI: <http://doi.org/10.1177/1947601911421925>.

Golubev W.I. (1995). Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Yeast.* 11(2), 101-110. DOI: 10.1002/yea.320110202.

Goncalves R.L.S., Quinlan C.L., Perevoshchikova I.V., Hey-Mogensen M., Brand M.D. (2015). Sites of superoxide and hydrogen peroxide production by muscle mitochondria assessed ex vivo under conditions mimicking rest and exercise. *J. Biol. Chem.* 290(1):209-27. DOI: 10.1074/jbc.M114.619072.

Gornall A.G., Bardawill C.J., David M.M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177(2), 751–766.

Goto S., Kogure K., Abe K., Kimata Y., Kitahama K., Yamashita E., Terada H. (2001). Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1512(2), 251-258. DOI: 10.1016/S0005-2736(01)00326-1.

Gouy M., Guindon S., Gascuel O. (2010). SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building, *Molecular Biology and Evolution.* 27(2), 221-224. DOI: 10.1093/molbev/msp259.

Guerin M., Huntley M.E., Olaizola M. (2003). *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol.* 21(5), 210-216. DOI: 10.1016/S0167-7799(03)00078-7.

Hagman A., Säll T., Piškur J. (2014). Analysis of the yeast short-term Crabtree effect and its origin. *FEBS J.* 281(21), 4805–14. DOI: 10.1111/febs.13019.

Helmerhorst E.J., Stan M., Murphy M.P. (2005). The concomitant expression and availability of conventional and alternative, cyanide-insensitive, respiratory pathways in *Candida albicans*. *Mitochondrion.* 5(3), 200–11. DOI: 10.1016/j.mito.2005.04.001

Hoefnagel M.H.N., Wiskich J.T. (1998). Activation of the plant alternative oxidase by high reduction levels of the Q-pool and pyruvate. *Arch Biochem Biophys.* 355(2), 262-270. DOI: 10.1006/abbi.1998.0737.

- Hoffman D.L., Brookes P.S. (2009). Oxygen sensitivity of mitochondrial reactive oxygen species generation depends on metabolic conditions. *J. Biol. Chem.* 284(24), 16236–45. DOI: 10.1074/jbc.M809512200.
- Hoshino T, Ojima K., Setoguchi Y. Astaxanthin synthase. EP 1035206-A3; 2 April 2002.
- Hoshino T., Ojima K., Setoguchi Y. Process for producing carotenoid and biological material useful therefore. US Pat 6,696,293 B2; 24 February 2004.
- Hou J., Scalcinati G., Oldiges M., Vemuri G.N. (2010). Metabolic Impact of Increased NADH Availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(3), 851–9.
- Huberts DHEW, Niebel B., Heinemann M. (2012). A flux-sensing mechanism could regulate the switch between respiration and fermentation. *FEMS Yeast Res.* 12(2), 118–28. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2011.00767.x.
- Jamieson D.J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 14(16), 1511–27. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0061(199812)14:16<1511::AID-YEA356>3.0.CO;2-S.
- Janssen M.J.F., W., de Kruijff B., de Kroon A.I.P.M. (2002). Phosphate is required to maintain the outer membrane integrity and membrane potential of respiring yeast mitochondria. *Anal. Biochem.* 300, 27–33.
- Johnson E.A., Schroeder W.A. (1996). Biotechnology of astaxanthin production in *Phaffia rhodozyma*. In: Takeoka G.R., Teranishi R., Williams P.J., Kobayashi A. (eds) *Biotechnology for improved foods and flavors*, pp 39-50. American Chemical Society, Washington DC.
- Johnson E.A., Yang H.H., Geldiay-Tuncer B., Hall W.T., Schreiber D., Ho K. Process for in vivo production of astaxanthin and *Phaffia rhodozyma* yeast of enhanced astaxanthin content. US Pat 5,356,809. 18 October 1994.
- Jones R.P. (1989). Biological principles for the effects of ethanol. *Enzyme. Microb. Technol.* 11(3), 130–53. DOI: 10.1016/0141-0229(89)90073-2.
- Joseph-Horne T., Hollomon D.W., Wood P.M. (2001). Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1504(2-3), 179–95. 10.1016/S0005-2728(00)00251-6.
- Käppeli O. (1987). Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts. *Adv. Microb. Physiol.* 28, 181–209. DOI: 10.1016/S0065-2911(08)60239-8.
- Kasperski A. (2008). Modelling of cells bioenergetics. *Acta Biotheor.* 56(3), 233–47. DOI: 10.1007/s10441-008-9050-0.

- Kim J.H., Chang H.I. (2006). High-level production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant JH1, using chemical and light induction. *J Microbiol Biotechnol.* 16(3), 381-385.
- Konz J.O., King J., Cooney C.L. (1998). Effects of oxygen on recombinant protein expression. *Biotechnol Progr.* 14(3), 393-409. DOI: 10.1021/bp9800211.
- Koobs D.H. (1972). Phosphate mediation of the Crabtree and Pasteur effects. *Science.* 178(4057), 127–33.
- Larsson C., Nilsson A., Blomberg A., Gustafsson L. (1997). Glycolytic flux is conditionally correlated with ATP concentration in *Saccharomyces cerevisiae*: a chemostat study under carbon- or nitrogen-limiting conditions. *J. Bacteriol.* 179(23), 7243–50.
- Light P.A. (1972). Mitochondrial effects of copper-limited growth on *Torulopsis utilis*. *FEBS Lett.* 19(4), 319–22.
- Liu Y.S., Wu J.Y. (2006). Hydrogen peroxide-induced astaxanthin biosynthesis and catalase activity in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl. Microbiol. Biot.* 73(3), 663-668. DOI: 10.1007/s00253-006-0501-8.
- Liu Y.S., Wu J.Y. (2008). Modeling of *Xanthophyllomyces dendrorhous* growth on glucose and overflow metabolism in batch and fed-batch cultures for astaxanthin production. *Biotechnol. Bioeng.* 101(5), 996-1004. DOI: 10.1002/bit.21978
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods.* 25(4), 402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- 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(1), 73-84. DOI: /S0716-97602007000100008.
- Marcoleta A., Niklitschek M., Wozniak A., Lozano C., Alcaíno J., Baeza M., Cifuentes V. (2011). Glucose and ethanol-dependent transcriptional regulation of the astaxanthin biosynthesis pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiology.* 11:190. DOI: 10.1186/1471-2180-11-190.
- Martínez-Moya P., Niehaus K., Alcaíno J., Baeza M., Cifuentes V. (2015). Proteomic and metabolomic analysis of the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* using different carbon sources. *BMC Genom.* 16(1), 1–18. DOI: 10.1186/s12864-015-1484-6.
- Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L. (1999). The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96(14), 8271–6. DOI: 10.1073/pnas.96.14.8271.

- Mayevsky A, Chance B. (1982). Intracellular oxidation-reduction state measured in situ by a multichannel fiber-optic surface fluorometer. *Science*. 217(4559), 537–40.
- Mayevsky A., Chance B. (2007). Oxidation–reduction states of NADH in vivo: from animals to clinical use. *Mitochondrion*. 7(5), 330–9. DOI: 10.1016/j.mito.2007.05.001.
- Mayevsky A., Rogatsky G. (2007). Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292(2), C615–40. DOI: 10.1152/ajpcell.00249.2006.
- McDonald A.E. (2008). Alternative oxidase: an inter-kingdom perspective on the function and regulation of this broadly distributed ‘cyanide-resistant’ terminal oxidase. *Funct. Plant Biol.* 35(7), 535-552. DOI: 10.1071/FP08025.
- McNulty H., Jacob R.F., Mason R.P. (2008). Biologic activity of carotenoids related to distinct membrane physicochemical interactions. *Am J Cardiol.* 101(10A), 20D-29D. DOI: 10.1016/j.amjcard.2008.02.004.
- McNulty H.P., Byun J., Lockwood S.F., Jacob R.F., Mason R.P. (2007). Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1768(1), 167–74. DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.09.010.
- Merchant S.S., Allen M.D., Kropat J., Moseley J.L., Long J.C., Tottey S., Terauchi A.M. (2006). Between a rock and a hard place: trace element nutrition in *Chlamydomonas*. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell.* 1763(7), 578–94. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.04.007.
- Meyer P.S., du Preez J.C. (1993). Effect of acetic acid on astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Lett.* 15(9), 919-924. DOI: 10.1007/BF00131757.
- Meyer P.S., du Preez J.C. (1994). Astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice. *World J Microb Biot.* 10(2), 178-83. DOI: 10.1007/BF00360882.
- Miao L., Chi S., Tang Y., Su Z., Yin T., Guan G., Li Y. (2011). Astaxanthin biosynthesis is enhanced by high carotenogenic gene expression and decrease of fatty acids and ergosterol in *Phaffia rhodozyma* mutant strain. *FEMS Yeast.* 11(2), 192-201. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2010.00705.x.
- Miller G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31(3), 426–428. DOI: 10.1021/ac60147a030.
- Miller M.W., Yoneyama M., Soneda M. (1976). *Phaffia*, a new yeast genus in Deuteromycotina (Blastomycetes). *Int J Syst Bacteriol.* 26, 286-291. DOI: 10.1099/00207713-26-2-286.
- Miñana J.B., Gómez-Cambronero L., Lloret A., Pallardó F.V., Del Olmo J., Escudero A., Rodrigo J.M., Pellín A., Viña J.R., Viña J., Sastre J. (2002). Mitochondrial oxidative stress

and CD95 ligand: a dual mechanism for hepatocyte apoptosis in chronic alcoholism. *Hepatology*. 35(5), 1205–14. DOI: 10.1053/jhep.2002.32969.

Murphy M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417(1), 1-13. DOI:10.1042/BJ20081386.

Nathan C. (2003). Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *J. Clin. Invest.* 111(6), 769–778. DOI: 10.1172/JCI200318174.

Nelson D., Cox M. (2000). In *Principles of Biochemistry Third Edition*. New York: Worth Publishers, pp. 28-39. ISBN 1-57259-153-6.

Nittis T., George G.N., Winge D.R. (2001). Yeast *sco1*, a protein essential for cytochrome c oxidase function is a Cu(I)-binding protein. *J Biol Chem.* 276(45), 42520–6. DOI: 10.1074/jbc.M107077200.

Noda M., Yamashita S., Takahashi N. (2002). Switch to anaerobic glucose metabolism with NADH accumulation in the β -Cell model of mitochondrial diabetes. *J Biol Chem.* 277(44), 41817–26. DOI: 10.1074/jbc.M207690200.

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 β -carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. *Mol. Genet. Genomics.* 275(2), 148–58. DOI: 10.1007/s00438-005-0072-x.

Otterstedt K., Larsson C., Bill R.M., Stahlberg A., Boles E., Hohmann S., Gustafsson L. (2004). Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Rep.* 5(5), 532–7. DOI: 10.1038/sj.embor.7400132.

Palágyi Z., Ferenczy L., Vágvögyi C. (2001). Carbon-source assimilation pattern of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *World J. Microb. Biot.* 17(1), 95-97. DOI: 10.1023/A:101668951.

Pashkow F.J., Watumull D.J., Campbell C.L. (2008). Astaxanthin: A novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 101(10A), 58D-68D. DOI: 10.1016/j.amjcard.2008.02.010.

Phaff H.J., Miller M.W., Yoneyama M., Soneda M. (1972). A comparative study of the yeast flora associated with trees on the Japanese islands and on the west coast of north America. *Proc IV IFS: Fermentation Technology Today*, Tokyo. Society of Fermentation Technology, Osaka. pp 759-774.

Popovic D.M., Leontyev I.V., Beech D.G., Stuchebrukhov A.A. (2010). Similarity of cytochrome c oxidases in different organisms. *Proteins.* 78(12), 2691-2698. DOI: 10.1002/prot.22783.

- Postma E., Verduyn C., Scheffers W.A., Van Dijken J.P. (1989). Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(2), 468–77.
- Prieto S., Bouillaud F., Ricquier D., Rial E. (1992). Activation by ATP of a proton-conducting pathway in yeast mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 208(2), 487–91. 10.1111/j.1432-1033.1992.tb17212.x.
- Quinlan C.L., Treberg J.R., Perevoshchikova I.V., Orr A.L., Brand M.D. (2012). Native rates of superoxide production from multiple sites in isolated mitochondria
- Ratledge C., Wynn J.P. (2000). Understanding microbial obesity. *SIM* 50: 181-185.
- Ratledge C., Wynn J.P. (2002). The Biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol.* 51, 1-51.
- Rigoulet M, Aguilaniu H, Averet N, Bunoust O, Camougrand N, Grandier-Vazeille X, Larsson C, Pahlman IL, Manon S, Gustafsson L. (2004). Organization and regulation of the cytosolic NADH metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biochem.* 256(1-2), 73–81. DOI: 10.1023/B:MCBI.0000009888.79484.f.
- Rogov A.G., Zvyagilskaya R.A. (2015). Physiological role of alternative oxidase (from yeasts to plants). *Biochemistry (Mosc).* 80(4):400-7. DOI: 10.1134/S0006297915040021.
- Rossi L., Lippe G., Marchese E., De Martino A., Mavelli I., Rotilio G., Ciriolo M.R. (1998). Decrease of cytochrome c oxidase protein in heart mitochondria of copper deficient rats. *Biometals.* 11(3), 207–12. DOI: 10.1023/A:1009274131473.
- Sastre J., Serviddio G., Pereda J., Miñana J.B., Arduini A., Vendemiale G., Poli G., Pallardó F.V., Viña J. (2007). Mitochondrial function in liver disease. *Front. Biosci.* 12, 1200–9.
- Schewe H., Kreutzer A., Schmidt I., Schubert C., Schrader J. (2017). High concentrations of biotechnologically produced astaxanthin by lowering pH in a *Phaffia rhodozyma* bioprocess. *Biotechnol Bioproc E.* 22, 319-326. DOI: 10.1007/s12257-016-0349-4.
- Schmidt I., Schewe H., Gassel S., Jin C., Buckingham J., Hümbelin M., Sandmann G., Schrader J. (2011). Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89(3), 555-71. doi: 10.1007/s00253-010-2976-6.
- Schroeder W.A, Johnson E.A. (1995). Singlet oxygen and peroxyl radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *J. Biol. Chem.* 270, 18374-18379.
- Sedmak J.J., Weerasinghe K., Jolly S.O. (1990). Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol Tech.* 4(2), 107–12. DOI: 10.1007/BF00163282.

Slavov N., Botstein D. (2013). Decoupling nutrient signaling from growth rate causes aerobic glycolysis and deregulation of cell size and gene expression. *Mol Biol Cell*. 24(2), 157–68. DOI: 10.1091/mbc.E12-09-0670.

Sluse F.E., Jarmuszkiewicz W. (1998). Alternative oxidase in the branched mitochondrial respiratory network: an overview on structure, function, regulation, and role. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31(6), 733-747. DOI: 10.1590/S0100-879X1998000600003.

Srinivasan S., Avadhani N.G. (2012). Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 53(6), 1252–63. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.021

Sung H.J., Ma W., Wang P., Hynes J., O’Riordan T.C., Combs C.A., McCoy J.P. Jr., Bunz F., Kang J., Hwang P.M. (2010). Mitochondrial respiration protects against oxygen-associated DNA damage. *Nat. Commun.* 2010;1(5), 1–8. DOI: 10.1038/ncomms1003.

Tantin D., Schild-Poulter C., Wang V., Hache R.J.G., Sharp P.A. (2005). The Octamer Binding Transcription Factor Oct-1 Is a Stress Sensor. *Cancer Res.* 65(23), 10750-8. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2399.

Tropea A., Gervasi T., Melito M.R, Lo Curto A., Lo Curto R. (2013). Does the light influence astaxanthin production in *Xanthophyllomyces dendrorhous*?. *Nat Prod Res.* 27(7), 648-654. DOI: 10.1080/14786419.2012.688045.

Untergasser A., Cutcutache I, Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. (2012). Primer3 new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40(15), e115.
Uribe-Carvajal S., Luévano-Martinez L.A., Guerrero-Castillo S., Cabrera- Orefice A., Corona-de-la-Peña N.A., Gutierrez-Aguilar M. (2011). Mitochondrial unselective channels throughout the eukaryotic domain. *Mitochondrion.* 11(3), 382–90. DOI: 10.1016/j.mito.2011.02.004

Van Aken O., Giraud E., Clifton R., Whelan J. (2009). Alternative oxidase: a target and regulator of stress responses. *Physiol. Plant.* 137(4), 354-61. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2009.01240.x.

Van Dijken J.P., Scheffers W.A. (1986). Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 32(3-4):199-224. DOI: 10.1016/0378-1097(86)90291-0.

Vanlerberghe G.C., McIntosh L. (1997). Alternative oxidase: from gene to function. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Molec. Biol.* 48, 703–34. DOI: 10.1146/annurev.arplant.48.1.703.

Van Urk H., Voll W.S.L., Postma E., Scheffers W.A. (1990). Transient-state analysis of metabolic fluxes in Crabtree-positive and Crabtree-negative Yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(1), 281-287.

Vázquez M., Santos V., Parajó J.C. (1997). Effect of the carbon source on the carotenoid profiles of *Phaffia rhodozyma* strains. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 19(4), 263-268. DOI: 10.1038/sj.jim.29003.

Veiga A., Arrabaça J.D., Loureiro-Dias M.C. (2003). Cyanide-resistant respiration, a very frequent metabolic pathway in yeasts. *FEMS Yeast Res.* 3(3), 239–45. DOI: 10.1016/S1567-1356(03)00036-9.

Vemuri G.N., Eiteman M.A., McEwen J.E. (2007). Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104(7), 2402–7. DOI: 10.1073/pnas.0607469104.

Verdoes J.C., Misawa N., Van Ooyen A.J. (1999). Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnol Bioeng.* 63(6), 750-755. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19990620)63:6<750::AID-BIT13>3.0.CO;2-7.

Vustin M.M., Belykh E.N., Kishilova S.A. (2004). Relationship between Astaxanthin production and the intensity of anabolic processes in the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Microbiology.* 73(6), 643–649. DOI: 10.1007/s11021-005-0004-0.

Wang H., Lakova P., Wilde M., Welm A., Goode T., Roesler W.J., Timchenko N.A. (2001). C/EBP α Arrests Cell Proliferation through Direct Inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Molecular Cell.* 8(4), 817–828. DOI: 10.1016/S1097-2765(01)00366-5.

Watson W.H., Song Z., Kirpich I.A., Deaciuc I.V., Chen T., McClain C.J. (2011). Ethanol exposure modulates hepatic S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine levels in the isolated perfused rat liver through changes in the redox state of the NADH/NAD⁺ system. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1812(5):613-8. DOI: 10.1016/j.bbadis.2011.01.016.
Wozniak A., Lozano C., Barahona S., Niklitschek M., Marcoleta A., Alcaíno J., Sepúlveda D., Baeza M., Cifuentes V. (2011). Differential carotenoid production and gene expression in *Xanthophyllomyces dendrorhous* grown in a nonfermentable carbon source. *FEMS Yeast Res.* 11(3), 252-62. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2010.00711.x.

Yamane Y., Higashida K., Nakashimada Y., Kakizono T., Nishio N. (1997). Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* enhanced in fed-batch culture with glucose and ethanol feeding. *Biotechnol Lett.* 19(11), 1109-1111. DOI:10.1023/A:1018492611011.

Yoshida K., Terashima I., Noguchi K. (2007). Up-regulation of mitochondrial alternative oxidase concomitant with chloroplast over-reduction by excess light. *Plant Cell Physiol.* 48(4), 606-614. DOI: 10.1093/pcp/pcm033.

12. ANEXOS

I. Análisis estadístico

Se realizó un análisis ANOVA de un factor (tipo de cultivo: -Cu o +Cu) en donde se evaluó si existía diferencia significativa entre los carotenoides producidos por la levadura entre los dos cultivos estudiados. Se estableció un valor de $\alpha = 0.05$.

En el cuadro 1 se presentan los datos obtenidos del análisis para los carotenoides específicos y en el cuadro 2, los resultados de la prueba de Tukey para esos datos.

Cuadro 1. Resultados del análisis ANOVA de un factor para carotenoides específicos

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales				
Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente				
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$					
Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.					
Información del factor					
Factor	Niveles	Valores			
Cultivo	<u>24</u>	- Cu12, - Cu18, - Cu24, - Cu30, - Cu36, - Cu42, - Cu48, - Cu54, - Cu60, - Cu66, - Cu72, - Cu90, + Cu12, + Cu18, + Cu24, + Cu30, + Cu36, + Cu42, + Cu48, + Cu54, + Cu60, + Cu66, + Cu72, + Cu90			
Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC	Ajust. MC	Ajust. Valor F	Valor p
Cultivo	23	1991033	86566.7	976.07	<u>0.000</u>
Error	48	4257	88.7		
Total	71	1995290			
Resumen del modelo					
		R-cuad.	R-cuad.		
	S R-cuad. (ajustado)	(pred)			
	9.41747	99.79%	99.68%	99.52%	

Medias			
Cultivo	N	Media	Desv.Est. IC de 95%
- Cu12	3	33.27	1.85(22.33, 44.20)
- Cu18	3	91.20	4.50(80.27, 102.13)
- Cu24	3	100.57	10.50(89.63, 111.50)
- Cu30	3	190.50	3.98(179.57, 201.43)
- Cu36	3	310.13	7.56 (299.20, 321.07)
- Cu42	3	294.77	10.45(283.83, 305.70)
- Cu48	3	253.4	0.0 (242.5, 264.3)
- Cu54	3	446.77	7.74(435.83, 457.70)
- Cu60	3	461.27	16.2(450.33, 472.20)
- Cu66	3	464.53	6.64(453.60, 475.47)
- Cu72	3	408.6	22.6(397.7, 419.5)
- Cu90	3	641.07	7.74(630.13, 652.00)
+ Cu12	3	15.72	2.11(4.78, 26.65)
+ Cu18	3	62.17	2.14(51.23, 73.10)
+ Cu24	3	87.10	4.85(76.17, 98.03)
+ Cu30	3	74.60	2.08(63.67, 85.53)
+ Cu36	3	71.60	3.80(60.67, 82.53)
+ Cu42	3	169.30	1.91(158.37,180.23)
+ Cu48	3	235.48	0.029(224.551, 246.416)
+ Cu54	3	242.6	20.5(231.6, 253.5)
+ Cu60	3	282.35	6.36(271.41,293.28)
+ Cu66	3	365.93	2.14(355.00, 376.87)
+ Cu72	3	374.5	17.3(363.6, 385.4)
+ Cu90	3	442.50	7.49(431.57, 453.44)
Desv.Est. agrupada = 9.41747			
Análisis de los datos:			
El Valor de $p=0.000$ indica que al menos una media es diferente, por lo que se realiza el análisis de Tukey para saber en qué punto (s) durante la cinética existe diferencia en la acumulación de carotenoides específicos, entre ambos cultivos.			

Lo que debe entenderse de lo anterior, es que al menos el valor de una media (columna tres) debe ser diferente del resto para establecer diferencia significativa entre los datos. Aunque hasta aquí no se sabe cuál, el valor de p menor al valor de α nos indica que esto se cumple. Con lo anterior, se procede a realizar la prueba de Tukey para encontrar cuales medias tienen diferencia significativa.

Cuadro 2. Resultados de la prueba de Tukey aplicada a las medias de carotenoides específicos en relación con el tipo de cultivo del que se trata.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%			
Cultivo	N	Media	Agrupación
- Cu90	3	641.07	A
- Cu66	3	464.53	B
- Cu60	3	461.27	B
- Cu54	3	446.77	B
+ Cu90	3	442.50	B
- Cu72	3	408.6	C
+ Cu72	3	374.5	D
+ Cu66	3	365.93	D
- Cu36	3	310.13	E
- Cu42	3	294.77	E
+ Cu60	3	282.35	E F
- Cu48	3	253.4	F G
+ Cu54	3	242.6	G
+ Cu48	3	235.48	G
- Cu30	3	190.50	H
+ Cu42	3	169.30	H
- Cu24	3	100.57	I
- Cu18	3	91.20	I J
+ Cu24	3	87.10	I J
+ Cu30	3	74.60	I J
+ Cu36	3	71.60	I J
+ Cu18	3	62.17	J K
- Cu12	3	33.27	K L
+ Cu12	3	15.72	L

De lo anterior resultó que las medias que NO comparten una letra son significativamente diferentes. Por lo tanto, se puede decir que: Se formaron 14 grupos de medias (cuya letra es diferente) y de ellos se deduce que la acumulación de carotenoides específicos presentó diferencia significativa entre ambos cultivos a las 30 (190 vs 71), 36 (310 vs 74), 42 (294 vs 169), 54 (446 vs 242), 60 (461 vs 282), 66 (464 vs 365) y 90 (641 vs 442) hr. Siendo el mejor cultivo, en estas horas, –Cu con mayor acumulación de carotenoides.

A continuación, en el cuadro 3 se presentan los datos obtenidos del análisis ANOVA para los carotenoides volumétricos y en el cuadro 4, los resultados de la prueba de Tukey para los mismos datos.

Cuadro 3. Resultados del análisis ANOVA de un factor para carotenoides volumétricos

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales				
Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente				
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$					
Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.					
Información del factor					
Factor	Niveles	Valores			
Cultivo	<u>24</u>	- Cu12, - Cu18, - Cu24, - Cu30, - Cu36, - Cu42, - Cu48, - Cu54,-Cu60, - Cu66, - Cu72, - Cu90, + Cu12, + Cu18, + Cu24, + Cu30, + Cu36, + Cu42, + Cu48, + Cu54, + Cu60, + Cu66, + Cu72, + Cu90			
Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Cultivo	23	113.924	4.95321	1141.20	<u>0.000</u>
Error	48	0.208	0.00434		
Total	71	114.132			
Resumen del modelo					
R-cuad.	R-cuad.				
S R-cuad. (ajustado)	(pred)				
0.0658814	99.82%	99.73%	99.59%		
Medias					
Cultivo	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%	
- Cu12	3	0.01333	0.00577	(-0.06314, 0.08981)	
- Cu18	3	0.10667	0.00577	(0.03019, 0.18314)	
- Cu24	3	0.16667	0.01528	(0.09019, 0.24314)	
- Cu30	3	0.52333	0.01155	(0.44686, 0.59981)	
- Cu36	3	1.1267	0.0231	(1.0502, 1.2031)	
- Cu42	3	1.7533	0.0635	(1.6769, 1.8298)	
- Cu48	3	1.810	0.000	(1.734, 1.886)	
- Cu54	3	1.9067	0.0289	(1.8302, 1.9831)	
- Cu60	3	2.0633	0.0709	(1.9869, 2.1398)	
- Cu66	3	2.8833	0.0404	(2.8069, 2.9598)	
- Cu72	3	3.263	0.181	(3.187, 3.340)	
- Cu90	3	4.5533	0.0577	(4.4769, 4.6298)	
+ Cu12	3	0.009200	0.001386	(-0.067278, 0.085678)	

+ Cu18	3	0.05000	0.00000	(-0.02648, 0.12648)
+ Cu24	3	0.19667	0.01155	(0.12019, 0.27314)
+ Cu30	3	0.32333	0.00577	(0.24686, 0.39981)
+ Cu36	3	0.6000	0.0300	(0.5235, 0.6765)
+ Cu42	3	1.6600	0.0173	(1.5835, 1.7365)
+ Cu48	3	2.190	0.000	(2.114, 2.266)
+ Cu54	3	2.107	0.179	(2.030, 2.183)
+ Cu60	3	2.4467	0.0577	(2.3702, 2.5231)
+ Cu66	3	3.1200	0.0173	(3.0435, 3.1965)
+ Cu72	3	2.7733	0.1270	(2.6969, 2.8498)
+ Cu90	3	2.9167	0.0473	(2.8402, 2.9931)

Desv.Est. agrupada = 0.0658814

Análisis de los datos:

El Valor de **$p=0.000$** indica que al menos una media es diferente, por lo que se realiza el análisis de Tukey para saber en qué punto (s) durante la cinética existe diferencia en la acumulación de carotenoides volumétricos, entre ambos cultivos.

Cuadro 4. Resultados de la prueba de Tukey aplicada a las medias de carotenoides volumétricos en relación con el tipo de cultivo del que se trata.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%			
Cultivo	N	Media	Agrupación
- Cu90	3	4.5533	A
- Cu72	3	3.263	B
+ Cu66	3	3.1200	B C
+ Cu90	3	2.9167	C D
- Cu66	3	2.8833	D
+ Cu72	3	2.7733	D
+ Cu60	3	2.4467	E
+ Cu48	3	2.190	F
+ Cu54	3	2.107	F G
- Cu60	3	2.0633	F G
- Cu54	3	1.9067	G H
- Cu48	3	1.810	H I
- Cu42	3	1.7533	H I
+ Cu42	3	1.6600	I
- Cu36	3	1.1267	J
+ Cu36	3	0.6000	K
- Cu30	3	0.52333	K L
+ Cu30	3	0.32333	L M

+ Cu24	3	0.19667	M N
- Cu24	3	0.16667	M N
- Cu18	3	0.10667	N
+ Cu18	3	0.05000	N
- Cu12	3	0.01333	N
+ Cu12	3	0.009200	N

De lo anterior resultó que las medias que NO comparten una letra son significativamente diferentes. Por lo tanto, se puede decir que: se formaron 17 grupos de medias (cuya letra es diferente) y de ellos se deduce que la acumulación de carotenoides volumétricos presentó diferencia significativa y fue mejor en -Cu a las 36 (1.12 vs 0.6), 72 (3.26 vs 2.77) y 90 (4.55 vs 2.91) h; fue mejor en +Cu a las 48 (2.18 vs 1.81), 60 (2.44 vs 2.06) y 66 (3.12 vs 2.88) h. Durante el resto de la fermentación, los carotenoides totales fueron significativamente iguales.

II. Validación de las sondas

La validación de *adki* como gen de referencia se realizó de acuerdo con Dankai *et al.* (2015), utilizando sondas TaqMan para éste, *asy* y *aox*. La validación se evaluó con base en las eficiencias de la reacción ($E \geq 80-100\%$) y la estabilidad de la expresión a lo largo del experimento ($15 < Cq < 30$). Las eficiencias de reacción se llevaron a cabo para cada gen: *adki*, $E = 106.6\%$, *aox*, $E = 105.8\%$ y *asy*, $E = 107.7\%$, lo que garantizó que la evaluación de la expresión relativa podría llevarse a cabo apropiadamente (figuras 1-3). Además, se evaluó el nivel de expresión de *adki* en contraste con los genes de interés (figuras 4 y 5), el ΔC_t máximo fue 0.4.

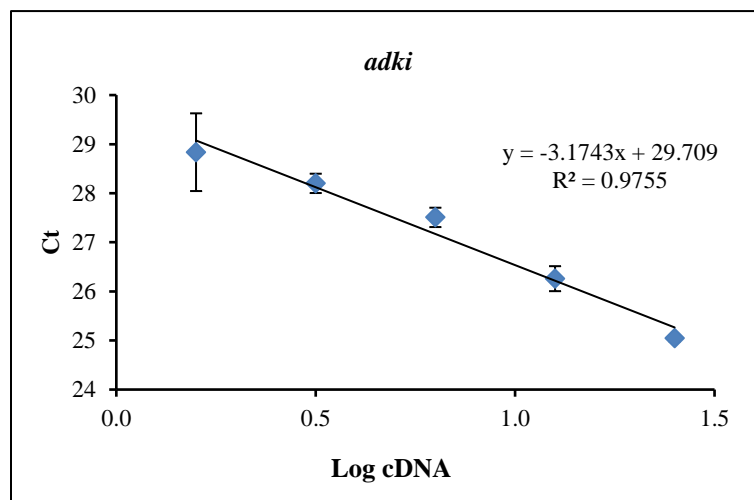


Figura 1. Eficiencia de reacción de la sonda TaqMan *adki*. La pendiente -3.1743 corresponde con la eficiencia de reacción de 106.6%.

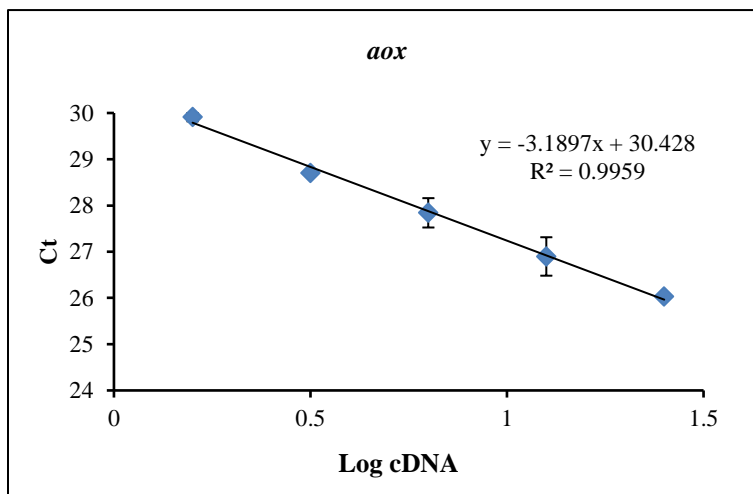


Figura 2. Eficiencia de reacción de la sonda TaqMan *aox*. La pendiente -3.1897 corresponde con la eficiencia de reacción de 105.8%

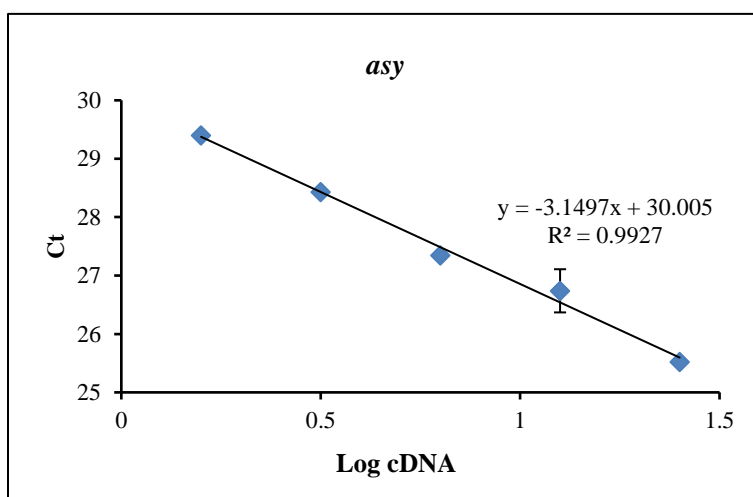


Figura 3. Eficiencia de reacción de la sonda TaqMan *asy*. La pendiente -3.1497 corresponde con la eficiencia de reacción de 107.7%.

Validación pareada

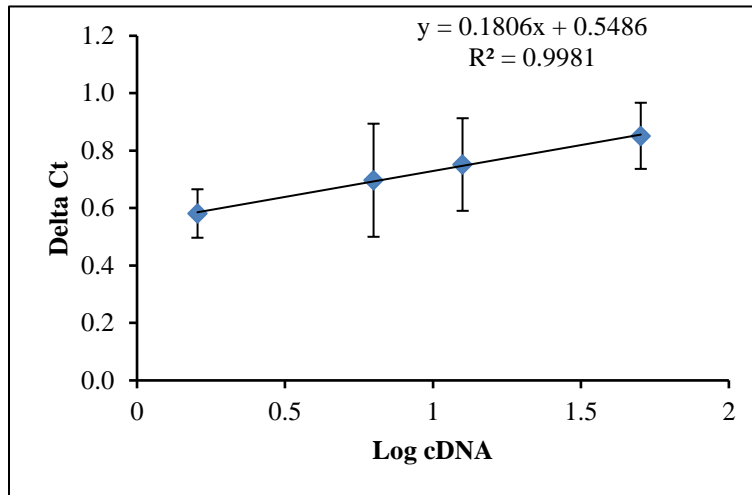


Figura 4. Validación experimental de la sonda TaqMan *adki* vs *aox*. La validación se realizó en reacción dúplex para verificar que *adki* podría utilizarse como control interno para representar la expresión relativa de *aox*.

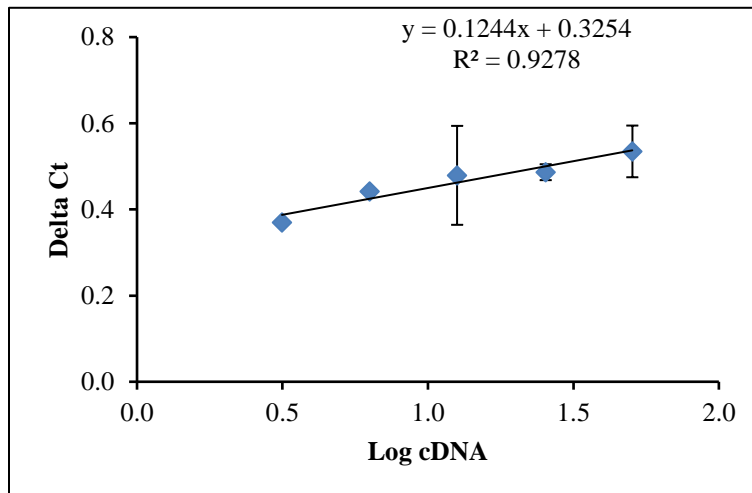


Figura 5. Validación experimental de la sonda TaqMan *adki* vs *asy*. La validación se realizó en reacción dúplex para verificar que *adki* podría utilizarse como control interno para representar la expresión relativa de *asy*.