

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE
BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“Producción de carotenoides en cultivos de *Phaffia rhodozyma* en
condiciones limitantes de magnesio”**

T E S I S

Que presenta

IRIS ISABEL FLORES MANZANERO

Para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de la Tesis: Dr. Luis Bernardo Flores Cotera

Ciudad de México

MAYO, 2019

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Rodolfo Marsch Moreno

Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Agradecimientos

A mi director de tesis, el Dr. Luis Bernardo Flores Cotera, por todo su apoyo moral y económico brindado para la realización de mi tesis. Así como sus enseñanzas, consejos y críticas constructivas.

Al Dr. Rodolfo Marsch Moreno y al Dr. Sergio Sánchez Esquivel por sus observaciones y consejos para la mejora del trabajo.

Al Q. Fernando Maldonado García, a la Dra. Zoila Flores Bustamante y al técnico de laboratorio Humberto Morales Romero por toda su paciencia, enseñanzas, consejos y amistad brindada.

A Leticia Loera Saucedo y Vania Yamile Muñoz Macías por su apoyo administrativo.

A Cipriano, Yaneth y Anahí por siempre atender mis dudas pero sobre todo por su amistad y paciencia.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Itzel, Lory y Rafael por hacer mi estancia en el laboratorio bonita y amena.

A mis grandes amigos y colegas Ezequiel y José Manuel por vivir a mi lado el estrés, desvelos y alegrías durante nuestro posgrado. Pero sobre todo por su amistad.

Al Cinvestav por el apoyo en infraestructura para la realización de mi maestría.

A la Dirección de Planeación y Operación de Becas del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca de maestría otorgada (CVU:784944).

Dedicatoria

A mi padre (Q.E.P.D.) por inculcarme el amor a la ciencia, a la lectura, a la familia y a la vida. Tus enseñanzas son oro para mi. Siempre te llevo conmigo, te amo.

A mi madre por darme los tres regalos que más atesoro: la oportunidad de estudiar, un hermano y la vida. Gracias por todo, te amo.

A mi hermano por tu apoyo, consejos, ánimos y sobre todo por ser un gran amigo de vida para mi. Te amo.

A Eric por todo tu amor, comprensión y apoyo incondicional. Gracias por siempre estar y confiar en mi. Te amo.

A “B&C” por siempre pintar una sonrisa en mi rostro.

A Marco por todo tu apoyo hacia mi y a mi familia.

Índice

	Pág.
1 . Resumen	7
2 . Abstract	8
3 . Introducción	9
3.1 <i>Phaffia rhodozyma</i>	9
3.2 Astaxantina	10
3.3 Papel biológico de la astaxantina	10
3.4 Regulación de la síntesis de astaxantina	11
3.5 Importancia del magnesio	12
4 . Justificación	14
5 . Hipótesis y Objetivos	15

6 .	Materiales y métodos	16
6.1	Cepa y medio de cultivo utilizado	16
6.1.1	<i>Phaffia rhodozyma</i> NRRL-Y-10922	16
6.1.2	Medio definido	16
6.2	Cultivos en lote de <i>Phaffia rhodozyma</i>	18
6.2.1	Preparación del inóculo	18
6.2.2	Lavado de biomasa	18
6.2.3	Preparación del reactor	19
6.2.4	Tomas de muestra	20
6.3	Análisis de las muestras	20
6.3.1	Determinación de peso seco	20
6.3.2	Determinación de azúcares reductores.....	21
6.3.3	Determinación de proteína total (Gornall, et al., 1948)	22
6.3.4	Determinación de carotenoides totales (Sedmak et al., 1990)	22

7 .	Resultados	24
7.1	Efecto del magnesio en el crecimiento, concentración de proteínas y respiración.....	24
7.2	Efecto del magnesio en el consumo de azúcares	25
7.3	Efecto del magnesio en la producción de carotenoides	25
8 .	Discusión	28
9 .	Conclusiones	33
10 .	Bibliografía	34

1. Resumen

Phaffia rhodozyma tiene la capacidad de sintetizar carotenoides cuando es sometida a estrés oxidativo ocasionado por diversas condiciones ambientales, nutricionales y genéticas. El magnesio es un elemento esencial en diversas funciones bioquímicas importantes en las células, principalmente las relacionadas con la producción de energía. En este trabajo, se evaluó el efecto del magnesio en la síntesis de carotenoides, utilizando cultivos de *P. rhodozyma*. La deficiencia de magnesio tuvo un efecto negativo en el consumo de oxígeno, la velocidad de consumo de azúcares, la concentración máxima de biomasa y la concentración máxima de proteína total. Sin embargo, se obtuvo un mayor contenido celular de carotenoides. Así, la deficiencia de magnesio podría estar relacionada con un bloqueo en la vía metabólica de producción de energía, lo que conlleva a la estimulación de especies reactivas de oxígeno.

2. Abstract

Phaffia rhodozyma has the ability to synthesize carotenoids when is subjected to oxidative stress caused by environmental, nutritional and genetic conditions. Magnesium is an essential element in many important biochemical functions in cells, mainly those related to the production of energy. In this work, the effect of magnesium on the synthesis of carotenoids was evaluated using cultures of *P. rhodozyma*. Magnesium deficiency had a negative effect on oxygen consumption, the rate of sugar consumption, the maximum concentration of biomass and the maximum concentration of total protein. However, a higher cellular content of carotenoids was obtained. Thus, magnesium deficiency could be related to a blockage in the metabolic pathway of energy production, which leads to the stimulation of reactive oxygen species.

3. Introducción

3.1 *Phaffia rhodozyma*

En el periodo de 1967-1968, Herman Jan Phaff aisló levaduras asociadas a exudados de árboles de Japón y Alaska; las cuales resultaban interesantes en esa época debido al color naranja-rojizo que presentaban (Figura 1). En el año 1976 se les atribuyó a las mismas un nuevo género de levaduras con el nombre de *Phaffia*, cuya especie se denominó *Phaffia rhodozyma*. El género pertenece a la división de basidiomicetos, el estado anamórfico de la levadura se conoce como *Phaffia rhodozyma* y el estado teleomorfo como *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Golubev, 1995). En el año 1975, se demostró que la levadura *Phaffia rhodozyma* sintetiza distintos carotenoides, entre ellos en mayor abundancia (83-87% del total de carotenoides) la astaxantina. (Andrewes *et al.*, 1975).

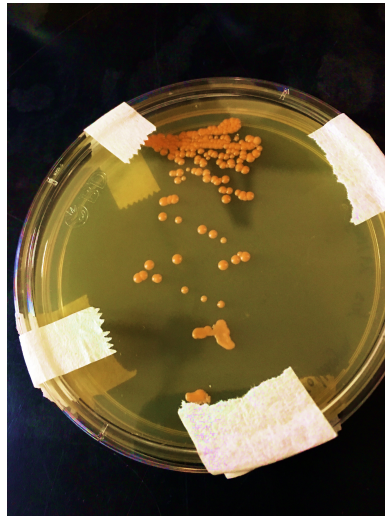


Figura 1. *Phaffia rhodozyma*. Células de *P. rhodozyma* crecidas en agar YM por 96 h (este trabajo)

3.2 Astaxantina

La astaxantina es un carotenoide que posee átomos de oxígeno y dobles enlaces conjugados en su estructura (Figura 2). La molécula tiene la fórmula molecular $C_{40}H_{52}O_4$ y su masa molar es de 596.84 g/mol. Tiene propiedades lipofílicas e hidrofílicas. La astaxantina ha demostrado tener una mejor actividad antioxidante que otras moléculas conocidas, como luteína, zeaxantina, beta-caroteno y tocoferol. (Ambati *et al.*, 2014).

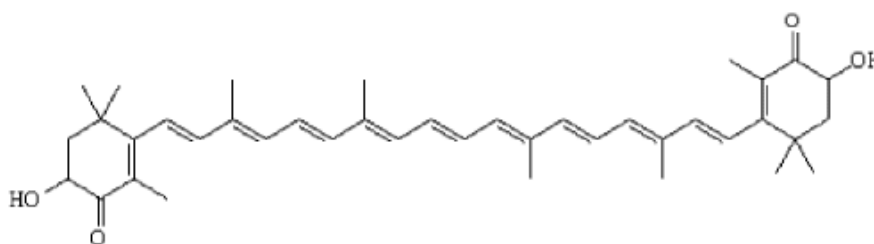


Figura 2. Estructura molecular de la astaxantina (3,3'-dihidroxi-β, β-caroteno-4,4'-diona).

3.3 Papel biológico de la astaxantina

El ambiente natural de donde se aisló *P. rhodozyma* se caracteriza por la presencia de compuestos antimicrobianos que generan concentraciones elevadas de oxígeno singulete, el cual es muy reactivo/oxidante. La levadura se pudo adaptar bien a ese ambiente por su capacidad de producir astaxantina, la cual funge como antioxidante en ese ambiente natural como un mecanismo de defensa contra la oxidación (Shroeder y Johnson, 1995).

Un antioxidante es una molécula que puede inhibir o prevenir la oxidación de otras moléculas. La oxidación es causada por especies reactivas de oxígeno (ROS), las

cuales son moléculas altamente reactivas debido a que poseen electrones desapareados en su capa de valencia. Se producen de manera normal en el metabolismo aeróbico de los organismos. Las ROS pueden oxidar lípidos, ADN y proteínas, cuya oxidación puede estar asociada con varias enfermedades. Los carotenoides son pigmentos liposolubles pertenecientes a los terpenos C₄₀, los cuales actúan en los organismos como protectores de membranas celulares y/o de organelos contra ROS (Mata-Gómez, *et al.*, 2014).

P. rhodozyma carece de las enzimas superóxido dismutasas dependientes de Fe y Cu, y una relativamente baja actividad de la dependiente de Mn. Se ha propuesto que la síntesis de astaxantina es un mecanismo de defensa que protege a la levadura contra un posible daño ocasionado por ROS, el cual probablemente coadyuva con la enzima superóxido dismutasa dependiente de Mn (Shroeder y Johnson, 1993). Posteriormente se afirmó que la síntesis de astaxantina puede ser estimulada por peróxido de hidrógeno y el fenómeno puede representar una respuesta antioxidante de las células de levadura (Liu y Wu, 2006).

3.4 Regulación de la síntesis de astaxantina

Las condiciones ambientales y nutricionales regulan la síntesis de astaxantina en la levadura *Phaffia rhodozyma* (Johnson, 2003).

Diversos estudios han demostrado que cuando *P. rhodozyma* crece en limitación de nitrógeno o de fósforo, se obtiene una mayor concentración intracelular de astaxantina, pero a expensas de un menor crecimiento celular y contenido de

proteínas en las células (Meyer *et al.*, 1993; Flores-Cotera *et al.*, 2001; Chávez-Cabrera *et al.*, 2010). Un estudio reciente demostró que la deficiencia de cobre puede afectar el consumo de oxígeno y el crecimiento de *P. rhodozyma*. La limitación del elemento ocasionó un aumento en la concentración final de carotenoides obtenidos (Martínez-Cárdenas *et al.*, 2018).

Flores-Cotera y colaboradores hicieron un trabajo de revisión de los diferentes factores y regulación de estos que afectan la síntesis de astaxantina en *P. rhodozyma*. “Los estudios realizados hasta ahora coinciden en que la síntesis de astaxantina tiene lugar en condiciones oxidativas al restringirse el crecimiento. El inicio de la síntesis de astaxantina en *P. rhodozyma* puede estimularse por diferentes métodos, pero puede explicarse por un evento común, esto es la inhibición en la oxidación de NADH, debido a un impedimento metabólico” (Flores-Cotera *et al.*, 2010).

3.5 Importancia del magnesio

El magnesio es esencial en diversas funciones bioquímicas importantes en las células. Está involucrado en varias vías metabólicas, incluyendo la producción de energía, la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, el transporte de iones, la señalización celular, y también tiene funciones estructurales. Varias de las enzimas que participan en la síntesis de lípidos y carbohidratos necesitan de magnesio para su actividad (Wolf y Cittadini, 2003). El metabolismo de carbohidratos para producir energía necesita de numerosas reacciones químicas dependientes de magnesio. En la mitocondria, el magnesio es requerido por la proteína sintetizadora de adenosin

trifosfato (ATP). De igual manera, el estado activo de la molécula de ATP se encuentra en un complejo con magnesio (ATPMg). Por lo tanto, todas las reacciones que se relacionan con el ATP requieren de la presencia de iones magnesio (Touyz, 2004). El magnesio es necesario para una serie de pasos durante la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) y proteínas. Más de la mitad del magnesio contenido en el núcleo está asociado a los ácidos nucleicos o a nucleótidos libres, debido a que interacciona con los átomos de oxígeno de los grupos fosfato, dando mayor estabilidad a las estructuras secundaria y terciaria del ADN.

4. Justificación

Phaffia rhodozyma tiene como principal característica la capacidad de sintetizar carotenoides cuando es sometida a estrés oxidativo. Es decir, adquiere una coloración más roja cuando enfrenta diversas condiciones ambientales, nutricionales y genéticas. Esta cualidad la convierte en un interesante modelo de estudio *in vivo* para estudiar y conocer con mayor detalle los factores que producen estrés oxidativo en las células. Uno de los factores nutricionales es el magnesio, del cual se desconocen trabajos publicados que evalúen su efecto en la producción de carotenoides. El presente trabajo evaluó el efecto de su limitación en la síntesis de estos. De esta manera se contribuye con el desarrollo de un modelo integral de los cambios que dan lugar a la iniciación de síntesis de carotenoides en *P. rhodozyma*.

5. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

La deficiencia de magnesio en un cultivo de *Phaffia rhodozyma* promoverá la síntesis de carotenoides.

Objetivo General

Analizar el efecto del magnesio en la síntesis de carotenoides en cultivos en lote de *Phaffia rhodozyma*.

Objetivo específico

Establecer una posible relación de la función del magnesio entre el metabolismo de generación de energía con el de la síntesis de carotenoides.

6. Materiales y métodos

6.1 Cepa y medio de cultivo utilizado

6.1.1 *Phaffia rhodozyma* NRRL-Y-10922

Se tomó un liofilizado de la cepa de levadura *Phaffia rhodozyma* NRRL-Y-10922, el cual se reactivó en 32 ml de medio líquido YM (10 g/L de glucosa, 5 g/L de peptona de caseína, 3 g/L de extracto de malta, 3 g/L de extracto de levadura) contenido en un matraz de 250 ml a 22°C y 120 rpm durante 96 h. Posteriormente se sembró una asada en cajas Petri conteniendo medio sólido YM y se incubaron durante 96 h a 22°C.

Después de ese tiempo las cajas Petri se guardaron en refrigeración a 5°C. Una vez que pasaron 30 días en refrigeración, se tomó una colonia aislada de cada caja y se sembró en una caja nueva. Esto se hizo como máximo tres veces. Las cajas que cumplieron con 30 días en refrigeración se desecharon.

6.1.2 Medio definido

La composición por litro del medio definido utilizado fue la siguiente: 30.3 g sacarosa, 6 g sulfato de amonio (equivalente a 45 mM), 0.5 g NaCl, 2 g Na₂SO₄, 0.005 g FeSO₄·7H₂O, 1.046 g K₂SO₄ (equivalente a 6 mM), 0.150 g MgSO₄·7H₂O (equivalente a 0.6 mM), 0.02 g ZnSO₄·7H₂O, 0.00125 g CuSO₄·5H₂O (equivalente a 5 μM), 0.001 g MnSO₄·H₂O, 0.0005 g CoSO₄·7H₂O, 0.0003 g H₃BO₄, 0.001 g Na₂MoO₄·2H₂O, 0.1 g CaCl₂·2H₂O, 0.71 g Na₂HPO₄ y 6 ml de solución vitamínica.

Para los experimentos con limitación de magnesio, se utilizaron 0.017 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Equivalente a 0.07 mM). Para la solución vitamínica se utilizó la siguiente composición: 0.075 g pantotenato de calcio, 0.038 g tiamina, 0.002 g biotina, 0.0038 g cianocobalamina, 0.00375 g mio-inositol, 0.019 g piridoxina, 0.038 g riboflavina, 0.225 g nicotinamida. Se aforó el contenido a 500 ml con agua milli Q. Una vez preparada la solución, se hicieron alícuotas y se congelaron en recipientes de vidrio color ámbar a -20°C .

Para un mejor manejo de los gramajes y evitar la precipitación de reactivos del medio definido, se prepararon seis soluciones stock: 1) 500 ml de una solución cien veces concentrada de sulfatos sin limitación de magnesio, 2) 500 ml de una solución cien veces concentrada de sulfatos con limitación de magnesio, 3) 500 ml de una solución 100 veces concentrada de H_3BO_4 , 4) 500 ml de una solución 100 veces concentrada de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5) 100 ml de una solución 100 veces concentrada de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 6) 500 ml de una solución 10 veces concentrada de Na_2HPO_4 . Las botellas con las soluciones stock se guardaron a temperatura ambiente, en botellas de vidrio color ámbar.

6.2 Cultivos en lote de *Phaffia rhodozyma*

6.2.1 Preparación del inóculo

Se tomó una caja Petri en refrigeración con colonias de la cepa *Phaffia rhodozyma* NRRL-Y-10922. Se tomó una colonia aislada y se sembró en una caja nueva de medio YM. Se dejó incubando durante 96 h a 22°C.

Una vez pasado el tiempo de incubación, se inocularon cuatro matraces de 250 ml con 32 ml de medio líquido YM, cada uno con una asada del cultivo previamente crecido en caja Petri. Se dejaron incubando durante 20 h a 22°C y 120 rpm.

6.2.2 Lavado de biomasa

Una vez pasado el tiempo de incubación del inóculo, los matraces se pusieron en hielo. Para preparar un inóculo, a los 32 ml de medio líquido de cada matraz con biomasa se les dio el siguiente tratamiento:

- Se vertió el contenido en tubos Falcon estériles e inmediatamente se pusieron en hielo y se llevaron a la centrifuga.
- Se centrifugó el cultivo a 5000 rpm por cinco minutos. Una vez que se centrifugó se puso en hielo.
- Se eliminó el sobrenadante en la campana en condiciones estériles.
- Se resuspendió la biomasa de cada tubo Falcon en 10 ml de solución isotónica al 0.3% estéril y se pusieron en hielo.

6.2.3 Preparación del reactor

Para los experimentos se utilizó un reactor de 3 L de la marca Applikon. Se pesaron las cantidades adecuadas (para un volumen de operación de 2.1 L) de: sacarosa, sulfato de amonio, NaCl, Na_2SO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y K_2SO_4 . Se mezclaron con aproximadamente 1600 ml agua destilada. Posteriormente se agregó 21 ml de la solución de sulfatos (con o sin limitación de magnesio) y 2 ml de antiespumante Mazu DF-1300. Se mezcló el contenido y se esterilizó el reactor junto con los sensores de pH (previamente calibrado) y oxígeno disuelto.

Por separado, se prepararon y esterilizaron en frascos 21 ml de las soluciones stock cien veces concentradas, 210 ml de la solución de Na_2HPO_4 , 250 ml de una solución de NaOH al 20% y agua destilada. Las soluciones stock previamente esterilizadas y una vez a temperatura ambiente, se vertieron en el reactor bajo condiciones estériles (con ayuda de un mechero).

Ya una vez mezclado el contenido, se ajustó el volumen a 2100 ml con agua destilada estéril y se ajustaron los parámetros de operación: 1 vvm, 650 rpm, 22°C. El pH se dejó libre hasta 4.5, posteriormente fue controlado automáticamente con la solución de NaOH al 20%.

Después, se prosiguió a calibrar el sensor de oxígeno disuelto y se añadió con ayuda de un filtro, 12 ml de solución de vitaminas seguida de la biomasa previamente lavada.

6.2.4 Tomas de muestra

Cada cultivo tuvo una duración de 90 h. Las muestras para determinación de peso seco se procesaron en el momento de sacarlas del reactor. El sobrenadante obtenido se guardó en frascos individuales para el posterior análisis de azúcares reductores. Las muestras que se usaron para la determinación de proteína total, azúcares reductores y carotenoides totales se congelaron en frascos individuales a -20°C.

6.3 Análisis de las muestras

6.3.1 Determinación de peso seco

Previamente a cada cultivo en reactor, se lavaron cuidadosamente charolas de aluminio, se puso cada una en una caja Petri de vidrio y se secaron en el horno a 78°C durante tres días. Pasando ese tiempo, se enfriaron en un desecador. Posteriormente se pesaron las charolas en una balanza analítica de cinco cifras.

El volumen de muestra para los análisis de peso seco fue de 5 ml. Los 5 ml de cada muestra se vertieron en un tubo de ensayo y posteriormente se centrifugaron a 3500 r.p.m. durante 10 minutos en una centrifuga clínica. Después se separó el sobrenadante y la biomasa se lavó con 5 ml de agua Milli Q. Se centrifugó nuevamente y se retiró el sobrenadante obtenido.

La biomasa obtenida se suspendió en 3 ml de agua Milli Q y se vació sobre charolas de aluminio previamente puestas a peso constante. Las muestras se secaron a 78 °C durante 48 h, después se enfriaron en desecador y finalmente fueron pesadas en una balanza analítica de cinco cifras.

6.3.2 Determinación de azúcares reductores

Con una anticipación de 2-3 h, se mezcló el reactivo de DNS (10 g/L ácido 3,5 dinitrosalicílico, 10 g/L NaOH, 2 g/L fenol) previamente preparado, con una solución de sulfito de sodio (50 g/L). La proporción fue de 1 ml de solución de sulfito de sodio por cada 100 ml de reactivo.

Para el análisis se pusieron en tubos de ensayo 1 ml de cada muestra conteniendo el sobrenadante previamente diluido (intervalo de concentración de 0.12-0.6 mg/ml sacarosa). Esto se hizo por triplicado para cada muestra. A cada tubo de ensayo se le añadió una gota de ácido clorhídrico concentrado (37%). Se llevó a cabo la hidrólisis durante ocho minutos a 90°C y se dejó enfriar. Una vez frío, se adicionó una gota de una solución NaOH al 40%. Después se añadieron 2 ml de agua destilada (volumen final de 3 ml) a cada tubo de ensayo, seguido de 3 ml de la mezcla de reactivo de DNS con sulfito de sodio. Una vez con la mezcla, se colocaron los tubos de ensayo en agua hirviendo durante 20 minutos. Se pusieron los tubos en un cajón cubierto de la luz, se agregó 1 ml de solución de tartrato de sodio y potasio a cada tubo de ensayo y se dejaron enfriar.

Por último, se añadieron 200 µl de cada muestra en una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 575 nm en un equipo CLARIO STAR. Para cada análisis, se hizo una curva de calibración al momento de analizar las muestras.

6.3.3 Determinación de proteína total (Gornall, et al., 1948)

Los análisis se realizaron por triplicado para cada muestra en un volumen de 3 ml. Se puso cada muestra en un tubo de ensayo y se centrifugó a 3500 rpm durante cinco minutos en una centrífuga clínica. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se añadieron 5 ml de agua destilada para lavar la biomasa, se centrifugó nuevamente y se retiró el sobrenadante. La biomasa obtenida por centrifugación, se resuspendió en 0.5 ml de NaOH 1M y se calentó en baño maría a 90°C durante 20 minutos. Se dejó enfriar. Una vez a temperatura ambiente, las muestras con la proteína disuelta se llevaron a 1 ml con agua destilada (añadiendo 0.5 ml de agua). Posteriormente, a cada tubo se agregaron 4 ml del reactivo de Biuret. La reacción se dejó por 30 minutos a temperatura ambiente para después centrifugar los tubos a 3500 rpm durante cinco minutos para eliminar los restos celulares.

Por último, se añadieron 200 µl de cada muestra en una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 540 nm en un equipo CLARIO STAR. Para cada análisis, se hizo una curva de calibración (con albúmina bovina) al momento de analizar las muestras.

6.3.4 Determinación de carotenoides totales (Sedmak *et al.*, 1990)

En tubos de ensayo, se vertieron muestras conteniendo aproximadamente 3-3.5 mg de células. Después se centrifugaron 10 minutos a 5000 r.p.m. en una centrífuga clínica. El sobrenadante se removió cuidadosamente (inmediatamente después de centrifugar) y a cada tubo se le adicionaron 0.5 ml de perlas de vidrio (0.5 mm).

Después de mezclar las perlas vidrio con las células en vortex durante diez segundos, se agregó a cada tubo de ensayo 1 ml de dimetilsulfóxido precalentado a 57 °C y se calentaron por un minuto a baño María a esta temperatura (57°C). En seguida, las células se rompieron con agitación vigorosa en vortex durante cuarenta segundos. Este paso se hizo tubo por tubo. Posteriormente se agregó a cada tubo 0.1 ml (100 µl) de una solución 0.01 M de fosfato monosódico NaH₂PO₄ y 2.5 ml de una mezcla 50:50 (v/v) de hexano:acetato de etilo. Los tubos se agitaron vigorosamente en vortex durante un minuto adicional para extraer los carotenoides. Las fases orgánica y acuosa se separaron por centrifugación a 5000 r.p.m. durante cinco minutos. La absorbancia de la fase orgánica conteniendo los carotenoides se leyó en un espectrofotómetro de celda de cuarzo a 480 nm. La concentración de carotenoides se calculó usando un coeficiente de extinción de 2100 en la ecuación:

$$\frac{\mu\text{g carotenoides}}{\text{ml}} = \frac{10000 \times A \times V_s}{V_m \times (E_{1\text{cm}}^{1\%})}$$

A absorbancia a 480 nm

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ coeficiente de extinción específico para astaxantina

V_s volumen final de solvente (ml)

V_m volumen de muestra (ml)

7. Resultados

7.1 Efecto del magnesio en el crecimiento, concentración de proteínas y respiración

La concentración máxima de biomasa en el cultivo sin deficiencia de magnesio (+Mg²⁺) fue 37.2% mayor (9.5 mg/ml) comparada con el cultivo con deficiencia de magnesio (-Mg²⁺) (6.9 mg/ml). Como se puede observar en la Figura 3(A, B), las concentraciones más altas de biomasa y de proteína (6.2 mg/ml) en el cultivo +Mg²⁺ se obtuvieron a las 57 h. En el cultivo -Mg²⁺, las concentraciones más altas de biomasa y de proteína (3.3 mg/ml) se alcanzaron a las 90 h. Es decir, la deficiencia del magnesio provocó lento crecimiento y lento aumento de la concentración de proteínas. Además la concentración máxima de proteínas fue 88% más grande en el cultivo +Mg²⁺.

Por otro lado, en el cultivo +Mg²⁺ se observó una caída más pronunciada de la tensión de oxígeno disuelto (pO₂) a casi cero entre las 35-40 h, en comparación con el cultivo -Mg²⁺ donde la pO₂ más baja alcanzada fue de 49.3% a las 24 h (Figura 3A, B). Lo anterior indica una velocidad de consumo más elevada de oxígeno en el cultivo +Mg²⁺ que en -Mg²⁺. En el cultivo +Mg²⁺ poco después que pO₂ presentó un valor cercano a cero a las 40 h, éste incrementó a 38% a las 48 h, para posteriormente volver a disminuir a valores cercanos a cero entre las 55-57 h. Después, el pO₂ volvió a elevarse a un valor de 65.2% a las 61 h para volver a disminuir a un valor de 37.7% a las 63 h. Después de este tiempo, se incrementó el pO₂ a un valor de 100%. En el cultivo -Mg²⁺, una vez que se llegó al valor más bajo de pO₂ a las 24 h, pO₂ aumentó a un valor de 76% a las 39 h, para posteriormente

disminuir ligeramente a un valor de 72.7% a las 48 h. Una vez alcanzado este valor, el pO₂ aumentó hasta un valor máximo de 87.7% a las 90 h. En resumen, la deficiencia de magnesio afectó negativamente la respiración de *P. rhodozyma*.

7.2 Efecto del magnesio en el consumo de azúcares

Como se observa en la Figura 3(C, D), la limitación del magnesio tuvo también un efecto negativo en el consumo de azúcares. En el cultivo +Mg²⁺, los azúcares se agotaron (1mg/ml) a las 42 h, mientras que en -Mg²⁺, se presentó una concentración mínima (2.9 mg/ml) a las 90 h. El cultivo -Mg²⁺ presentó dos intervalos de tiempo (30-36 h y 48-60 h) en donde la velocidad de consumo de azúcares disminuyó en forma significativa, provocando dos caídas en el consumo específico de azúcares (q_s). En estos bajos valores de q_s (0.080mg mg⁻¹ h⁻¹ a las 36 h; 0.014 mg mg⁻¹ h⁻¹ a las 60 h), se puede observar que a pesar de haber suficientes azúcares en el medio (18.9 y 11.47 mg/ml) el consumo de azúcares disminuyó. Por el contrario, el cultivo +Mg²⁺, únicamente presentó únicamente una caída en q_s (0 mg/mg/ml) coincidiendo con la disminución de la concentración de los azúcares en el medio.

7.3 Efecto del magnesio en la producción de carotenoides

La deficiencia de magnesio afectó negativamente la concentración máxima de carotenoides alcanzada, pero en cambio aumentó el contenido máximo de carotenoides en las células. El cultivo +Mg²⁺ presentó una concentración máxima de carotenoides totales de 4.11 µg/ml a las 66 h, en cambio, en el cultivo -Mg²⁺ la máxima concentración de carotenoides fue de 3 µg/ml a las 36 h. Sin embargo, como

puede observarse en la Figura 3 (E, F), el valor más alto de contenido celular de carotenoides totales fue obtenido en el cultivo $-Mg^{2+}$ a las 36 h con un valor de 0.62 $\mu\text{g}/\text{mg}$, en cambio, en el cultivo $+Mg^{2+}$ el valor máximo de contenido celular de carotenoides totales fue de 0.53 $\mu\text{g}/\text{mg}$ a las 90 h.

En la Figura 3 (D, F) se puede observar que el intervalo de 30-36 h, en el que se presentó la primera caída de q_s en el cultivo $-Mg^{2+}$, coincide con un incremento de carotenoides totales de 0.95 a 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$. De igual manera, la segunda caída de q_s en el intervalo de 48-60 h coincide con un incremento notable en la concentración de carotenoides totales de 1.75 a 2.39 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

En la Figura 3E se puede observar un aumento en la concentración de carotenoides de 0.57 a 0.80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ entre las 24-36 h, en el cultivo $+Mg^{2+}$. Posteriormente, a las 36-48 h se presentó un incremento en la concentración de carotenoides de 0.80 a 1.60 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Un último incremento en la concentración de carotenoides (1.60-4.11 $\mu\text{g}/\text{ml}$) se presentó de las 48-66 h. Este último incremento coincide en el intervalo de tiempo en donde se registraron las dos últimas caídas de pO_2 (Figura 3A), al parecer asociadas con el consumo de fuentes de carbono no identificadas (probablemente etanol y ácidos grasos).

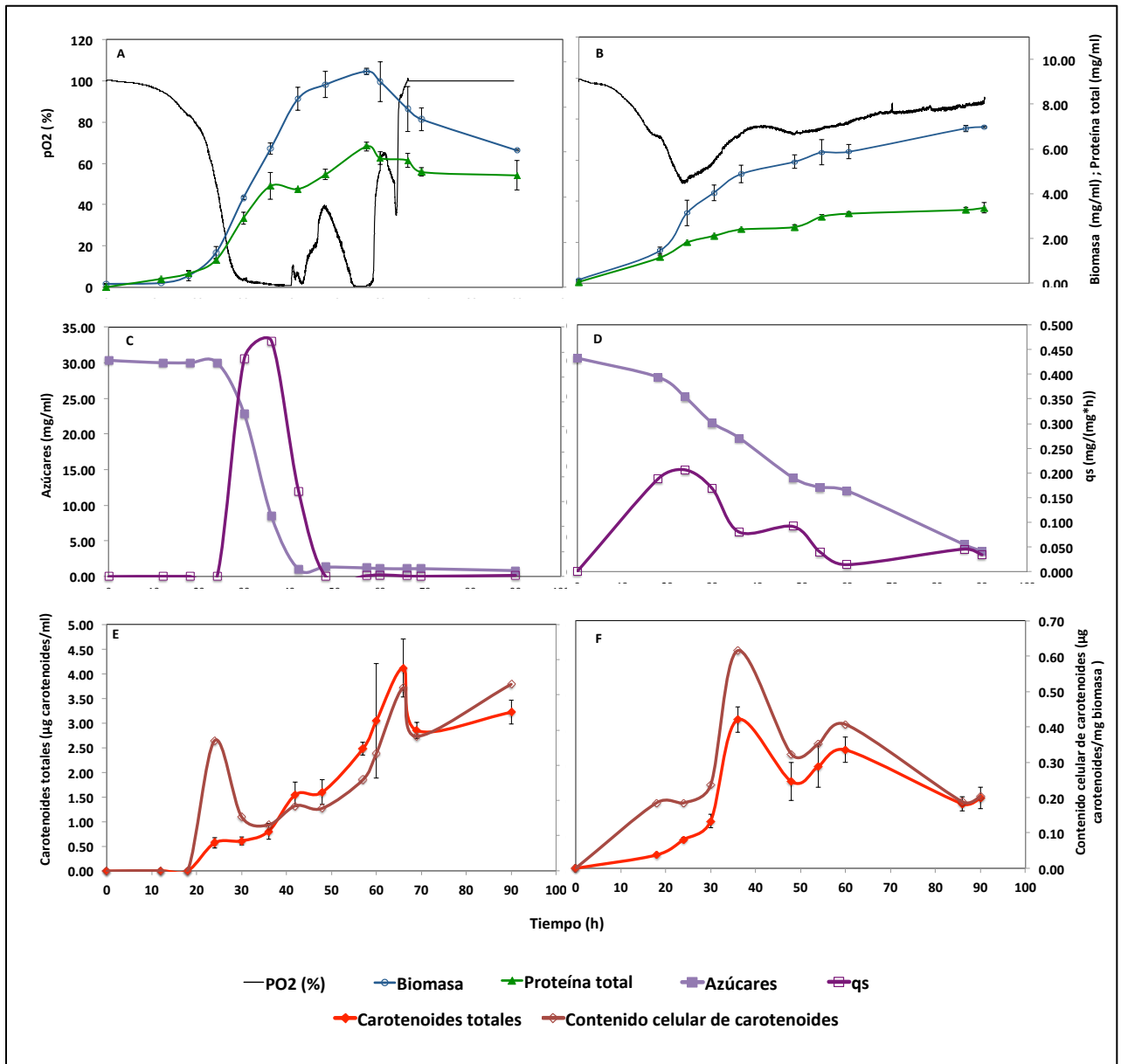


Figura 3. Desarrollo comparativo de los parámetros de cultivo de *Phaffia rhodozyma*. A, C y E corresponden al cultivo sin limitación de magnesio (+Mg²⁺). B, D y F corresponden al cultivo con limitación de magnesio (-Mg²⁺).

8. Discusión

El presente trabajo es el primero en evaluar el efecto que tiene la limitación del magnesio en la producción de carotenoides en *P. rhodozyma*. De forma global, los resultados mostraron que la deficiencia de magnesio tuvo un efecto negativo en la velocidad de consumo de azúcares, en la velocidad de consumo de oxígeno, y en la concentración máxima de biomasa y proteínas. Sin embargo, la limitación de magnesio tuvo un efecto positivo en el contenido celular de carotenoides.

En el cultivo +Mg²⁺ la pO₂ descendió a valores cercanos a cero, mientras que en el cultivo -Mg²⁺ el valor mínimo fue de 49.3%. Es decir, la deficiencia de magnesio afectó la respiración. Hay estudios que revelan que la deficiencia de magnesio tiene un efecto negativo en la actividad catalítica de enzimas que participan en la glucólisis, ciclo del ácido cítrico y fosforilación oxidativa. Las cuales son las principales rutas metabólicas que las células utilizan para la generación de energía en forma de ATP (Pilchova *et al.*, 2017).

Se sabe que el magnesio es esencial para seis enzimas clave de la glucólisis: hexocinasa, fosfofructocinasa, fosfoglicerato cinasa, fosfoglicerato mutasa, enolasa y piruvato cinasa. Estas enzimas necesitan del magnesio para que forme un complejo con el ATP, o en su caso con el ADP, para que se encuentren en su forma activa (Walker, 1994; Pilchova *et al.*, 2017). La glucólisis es una ruta metabólica clave para la síntesis de piruvato, el cual puede ser utilizado como sustrato por la piruvato deshidrogenasa para la obtención de energía vía aerobia por el ciclo del ácido cítrico, o vía anaerobia por la enzima piruvato descarboxilasa para la síntesis de etanol. Una

concentración elevada de magnesio libre en la célula funciona como una señal de activación para la enzima piruvato deshidrogenasa para dar entrada a la respiración a través del ciclo del ácido cítrico. El ATP une magnesio más fuertemente que el ADP, por lo tanto, la concentración de magnesio libre refleja la relación ATP/ADP. Esto es, se acumula magnesio libre a relaciones ATP/ADP bajas. Así pues, la piruvato deshidrogenasa responde a las concentraciones de ATP quedando desactivada cuando éste es abundante y no es necesaria una mayor producción de energía. El complejo se activa cuando las concentraciones bajas de ATP señalan la necesidad de generar más ATP (Mathews *et al.*, 2002). De igual manera, la concentración de magnesio (tanto en el citosol como en la matriz mitocondrial) puede modular la actividad catalítica del complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa y de la ATP sintasa. Como consecuencia, puede afectar el ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa (Rodríguez-Zavala & Moreno-Sánchez, 1998).

Es importante mencionar que en el presente trabajo no se cuantificó etanol, lo cual permitiría evaluar la actividad fermentativa. Sin embargo, en el cultivo +Mg²⁺ puede estimarse que la síntesis de etanol se presentó al ocurrir anaerobiosis, aproximadamente entre las 24-40 h. Posteriormente, el segundo descenso de pO₂ (50-55 h) puede atribuirse a un consumo de etanol debido a la ausencia de azúcares en el medio. En el cultivo -Mg²⁺ es probable que la síntesis de etanol se presentó en el intervalo de tiempo 36-48 h, al acentuarse la primer caída del consumo específico de azúcares (qs). En este tiempo, a pesar de la presencia de azúcares y oxígeno en el medio, qs disminuyó, lo que probablemente propició una fermentación aerobia.

Esta inferencia en primera instancia podría ser similar a la fermentación aerobia observada por Martínez-Cárdenas *et al.*, 2018, con la misma cepa, en condiciones de deficiencia de cobre (Cu^{2+}). Posteriormente, el consumo de etanol posiblemente ocurrió en el intervalo de tiempo 48-60 h que corresponde a la segunda caída de q_s .

En el cultivo $+\text{Mg}^{2+}$, la concentración máxima de biomasa y de proteínas se alcanzó a las 57 h, mientras que en el cultivo $-\text{Mg}^{2+}$ se alcanzó la máxima concentración en la hora 90. El magnesio es un elemento que desempeña un papel clave en el ciclo de división celular. La concentración del catión es una señal que regula la interfase. Cuando se presenta deficiencia de magnesio en las células, esta señal funciona como un control de freno en la fase G1 y se detiene en la fase S. Asimismo, la baja concentración de magnesio influye en el rompimiento del huso mitótico (Walker, 1986). Existen trabajos publicados con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que demuestran una relación en la concentración de iones magnesio con el crecimiento del microorganismo y consumo de glucosa, en las que se ha reportado que concentraciones menores a 0.5 mM se relacionan con una menor densidad óptica y un menor consumo de azúcares (Walker y Maynard, 1997). En resumen, el crecimiento más lento observado en condiciones de limitación de magnesio es consistente con lo reportado para otras levaduras y otros tipos de células.

Por otro lado, la limitación de magnesio provocó una mayor acumulación intracelular de carotenoides (0.62 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Se sabe que *P. rhodozyma* sintetiza carotenoides como mecanismo de defensa, cuando enfrenta condiciones que desencadenan un

estrés oxidativo debido a un desbalance redox en la cadena respiratoria (Chávez-Cabrera *et al.*, 2010; Martínez-Cárdenas *et al.* 2018). Lo anterior sugiere que la deficiencia de magnesio podría asociarse con una mayor generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Probablemente la deficiencia de magnesio ocasionó en *P. rhodozyma* una atenuación en las enzimas de la glucólisis, en el complejo de la piruvato deshidrogenasa, en la actividad del ciclo del ácido cítrico (afectando principalmente a la α -cetoglutarato deshidrogenasa), y por último en la actividad de la ATP sintasa, afectando la fosforilación oxidativa. La glucólisis y el paso previo a la entrada del ciclo del ácido cítrico son los primeros pasos para dar lugar a las vías de liberación de energía, entre ellas, la respiración. La atenuación de estos primeros pasos, pudo haber ocasionado desde ese momento una ralentización en la respiración. De esto se puede inferir que se obtuvo una baja concentración de acetil-CoA, la cual es la molécula que da entrada al ciclo del ácido cítrico, por lo que este paso de la respiración de igual manera se atenuó. La deficiencia de magnesio afecta el correcto funcionamiento de la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa (Rodríguez-Zavala & Moreno-Sánchez, 1998), por lo que se podrían estar acumulando los equivalentes reducidos del ciclo del ácido cítrico: NADH y FADH₂. Existen trabajos publicados que relacionan el mal funcionamiento de la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa con una fuente importante de generación de ROS. Esta enzima favorece la síntesis de ROS cuando en el medio se encuentra NADH (Tretter *et al.*, 2005; McLain *et al.*, 2011). Por otra parte, bajas concentraciones de magnesio afectan negativamente

la actividad de la ATP sintasa (Rodríguez-Zavala & Moreno-Sánchez, 1998). Por lo que una baja actividad de esta pudo haber ocasionado una baja producción de ATP debido a la deficiencia del sustrato ADP-Mg. La atenuación en la fosforilación oxidativa pudo haber ocasionado una acumulación de electrones en la cadena de transporte de electrones, que sumado a que en el medio había oxígeno disponible y equivalentes reducidos (NADH y FADH₂), se pudo haber estado favoreciendo la síntesis de ROS. Existen otros trabajos que demuestran que la deficiencia de magnesio provoca un daño en la función mitocondrial. Esto conduce a un mal funcionamiento en pasos clave del ciclo del ácido cítrico y de la fosforilación oxidativa, lo cual conduce a una pérdida de electrones en la cadena de transporte electrónica, generando una mayor producción de ROS (Tretter & Adam-Vizi, 2005; McLain *et al.*, 2011, Zheltova *et al.*, 2016). Este desbalance redox pudo haber estado relacionado con el resultado del aumento en el contenido celular de carotenoides.

Esto también explicaría el por qué se alcanzó una menor concentración máxima de biomasa y de proteínas (aparte de que la deficiencia de magnesio también afecta la división celular) y por lo tanto, un menor consumo de azúcares. El crecimiento, el consumo de azúcares y la síntesis de proteínas se relacionan con la respiración por la generación y uso de energía en forma de ATP. El segundo aumento que hubo de concentración de carotenoides en el intervalo de tiempo de 48-60 h (segunda caída de qs) podría estar relacionado con el consumo de etanol. Hay trabajos que demuestran que la oxidación del etanol aumenta la relación de equivalentes reducidos por equivalentes reductores (Jones, 1989; Watson *et al.*, 2011). Por lo

tanto, el consumo de etanol podría estar contribuyendo a un desbalance redox en este periodo de acumulación de carotenoides.

9. Conclusiones

El presente trabajo demuestra que la deficiencia de magnesio afecta negativamente el consumo de oxígeno, la velocidad de consumo de azúcares, la concentración máxima de biomasa y la concentración máxima de proteína total alcanzada en un cultivo de *P. rhodozyma*.

Debido a las diversas funciones biológicas atribuidas al magnesio en la célula, sobre todo las que se atribuyen al metabolismo de generación de energía, su deficiencia podría estar relacionada con la estimulación de ROS en *P. rhodozyma*, la cual provoca estrés oxidativo. Lo que conllevó a que en el cultivo con limitación de magnesio se alcanzara un mayor contenido celular de carotenoides.

10. Bibliografía

- Ambati, R., Moi, S., Ravi, S., & Aswathanarayana, R. (2014). Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications A Review. *Marine Drugs*, 12, pp. 128-152.
- Andrewes, A., Phaff, H., & Starr, M. (1975). Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red pigmented fermenting yeast. *Phytochemistry*, 15, pp. 1003-1007.
- Barros, R., Silva, R., Soares, D., Sá Leitao, S., Barros, W., & Morais, M. (2016). Magnesium ions in yeast: setting free the metabolism from glucose catabolite repression. *Metallomics*, 8, pp. 1193-1203.
- Chávez-Cabrera, C., Flores-Bustamante, Z., Marsch, R., Montes, MC., Sánchez, S., Cancino-Díaz, JC., & Flores-Cotera, L. (2010). ATP-citrate lyase activity and carotenoid production in batch cultures of *Phaffia rhodozyma* under nitrogen-limited and nonlimited conditions. *Applied Microbial and Cell Physiology*, 85, pp. 1953-1960.
- Flores-Cotera, LB., Sánchez, S., & Martín, R. (2001). Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, pp. 341-347.
- Golubev, WI. (1995). Perfect State of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Yeast*, 11, pp. 101-110.
- Gornall, A., Bardawill, C., & David, M. (1948). Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 177, pp. 751-766.
- Johnson, EA. (2003). *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. *International Microbiology*, 6, pp.169-74.
- Jones, R. (1989). Biological principles for the effects of ethanol. *Enzyme and Microbial Technology*, 11, pp. 130-153.
- Liu, YS. & Wu, JY. (2006). Hydrogen peroxide-induced astaxanthin biosynthesis and catalase activity in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied Microbial and Cell Physiology*, 73, pp. 663-668.

- Mata-Gómez, L., Montañez, J., & Méndez-Zavala, A. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories*, 13, pp. 1-12.
- Mathews, CK., Van Holde, KE., & Ahern, KG. (2002). Regulación de la piruvato deshidrogenasa y del ciclo del ácido cítrico. *Bioquímica*, pp. 562-564.
- Martínez-Cárdenas, A., Chávez-Cabrera, C., Vasquez-Bahena, J., & Flores Cotera, LB. (2018). A common mechanism explains the induction of aerobic fermentation and adaptive antioxidant response in *Phaffia rhodozyma*. *Microbial Cell Factories*, 17, pp. 1-16.
- McLain, A., Szweda, P., & Szweda, L. (2011). *Free Radical Research*, 45, pp. 29-36.
- Meers, J., & Tempest, D. (1968). The influence of extracellular products on the behaviour of mixed microbial populations in magnesium-limited chemostat cultures. *Journal of General Microbiology*, 52, pp. 309-317.
- Meyer, P., du Preez, J., & Kilian, S. (1993). Selection and evaluation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9, pp. 514–520.
- Pilchova, I., Klacanova, K., Tatarkova, Z., Kaplan, P., & Racay P. (2017). The Involvement of Mg²⁺ in Regulation of Cellular and Mitochondrial Functions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, pp. 1-8.
- Rodríguez-Zavala, JS. & Moreno-Sánchez, R. (1998). Modulation of Oxidative Phosphorylation by Mg²⁺ in Rat Heart Mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, pp. 7850-7855.
- Sedmak, J., Weerasinghe, K., & Jolly, S. (1990). Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnology Techniques*, 4, pp.107–112.
- Shroeder, W. & Johnson, EA. (1993). Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. *Journal of General Microbiology*, 139, pp. 907-912.
- Schroeder, W. & Johnson, EA. (1995). Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. *Journal of Industrial Microbiology*, 14, pp. 502-507.
- Touyz, R. (2004). Magnesium in clinical medicine. *Frontiers in Bioscience*, 9, pp.1278-1293.

- Tretter, L. & Adam-Vizi, V. (2005). Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360, pp. 2335-2345.
- Walker, G., Birch, A., Hamburger, K., & Kramhoft, B. (1982). Magnesium-induced mitochondrial polymorphism and changes in respiratory metabolism in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Carlsberg Research Communications*, 47, pp.205-214.
- Walker, G. (1986). Magnesium and cell cycle control: an update. *Magnesium*, 5, pp. 9-23.
- Walker, G.. (1994). The Roles of Magnesium in Biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*, 14, pp. 311-354.
- Walker, G. & Maynard A. (1997). Accumulation of magnesium ions during fermentative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 18, pp. 1-3.
- Watson, WH., Song, Z., Kirpich, IA., Deaciuc, IV., Chen, T., & McClain, CJ. (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. *Biochimica et Biophysica Acta*, 5, pp. 613-618.
- Wolf, F. & Cittadini A. (2003). Chemistry and biochemistry of magnesium. *Molecular Aspects of Medicine*, 24, pp. 3-9.
- Zheltova, A., Kharitonova, M., Iezhitsa, I., & Spasov, A. (2016). Magnesium deficiency and oxidative stress: an update. *BioMedicine*, 6, pp. 8-14.