



UNIVERSIDAD DE LEÓN

Departamento de Biología Molecular



INBIOTEC

Instituto de Biotecnología de León

**Estudio de la producción de  
astaxantina por  
*Xanthophyllomyces dendrorhous***

**Study of astaxanthin production  
by  
*Xanthophyllomyces dendrorhous***

Ana García Guerra

León, 2012



**Dedicado a mis padres,  
y a todos aquellos que recorren este camino**



## Agradecimientos

Hay un proverbio hebreo que dice “El que da, no debe volver a acordarse; pero el que recibe nunca debe olvidar”. A lo largo del desarrollo de este trabajo han sido muchas las personas que me han dado algo de sí mismas.

En primer lugar quiero agradecer a la Diputación de León por haberme concedido durante 3 años una beca de formación de personal investigador sin la cual no podría haber iniciado mi carrera en el mundo de la investigación.

También quiero agradecer al Dr. Juan Francisco Martín director de esta tesis la oportunidad que me dio de realizar la tesis doctoral en el laboratorio, los consejos que me regaló y el apoyo que me brindó a lo largo de estos años.

Por supuesto tengo que acordarme del Dr. Ramiro Godio, co-director de esta tesis. Gracias por su infinita paciencia, por su ayuda en los momentos más complicados y por exigirme lo máximo para que pudiera dar lo mejor de mí misma.

Quiero agradecer especialmente a mis padres y mi familia el apoyo y cariño que me han brindado a lo largo de estos años, porque sin ellos no sería nada. Todo lo que tengo y lo que soy se lo debo a ellos.

A mis compañeras de piso: a Montxe, Esther, Cris, Mai, Sara. Gracias por poner un flish-flish en mi vida, porque habéis conseguido que estos años en el hogar hayan sido inolvidables.

A mis chicas y chicos Simus: a Danita, Pilar, Vera, Eli, Vicky, Concha, Alian y por supuesto a Fede, César, Bruno y Antonio. Gracias porque aunque físicamente estemos separados, siempre tendréis un huequito en mi corazón. Pero sobre todo gracias por recordarme que merece la pena luchar por lo que se cree.

No puedo olvidar a mis compañeros de Inbiotec: a Jose, Rebeca, Kata, Tamara, Claudia, Javi, Alcira, Nuria, Elena... y un largo etcétera. Tanta gente, tantos momentos compartidos, tantas alegrías y tantas penas que es imposible resumirlo en unas simples líneas. Gracias por haberme permitido aprender tanto de tantas cosas. Y por supuesto a Josefina y Berna, porque sin ellos todo hubiera sido mucho más difícil.

Y finalmente gracias a todos esos amigos que han sabido ponerme una sonrisa en mi corazón cuando más la necesitaba. Gracias Cristina, César, Paula, Leti, Rober, JoseRa, Rubén... Gracias por todo.



# ÍNDICE

---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. CARACTERÍSTICAS DE <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	3
1.1.1. Aislamiento	3
1.1.2. Características generales	5
1.1.2.1. Fuentes de carbono	5
1.1.2.2. Fase sexual	7
1.1.2.3. Fase asexual	8
1.1.2.4. Nivel de ploidía	9
1.1.2.5. Elementos extracromosomales	10
1.1.2.6. Pigmentos	11
1.1.3. Interacciones con el medio ambiente	12
1.1.4. Otras características de interés de <i>X. dendrorhous</i>	13
1.1.4.1. Producción de micosporinas	13
1.1.4.2. Producción de neo-fructo-oligosacáridos	14
1.1.4.3. Producción de antifúngico	15
1.2. CAROTENOIDES	15
1.2.1. Estructura, propiedades y funciones de los carotenoides	15
1.2.2. Astaxantina	17
1.2.2.1. Producción de astaxantina	18
1.2.2.2. Función de la astaxantina en <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	19
1.2.2.3. Aplicaciones: uso de la astaxantina en la acuicultura	22
1.2.2.4. Aplicaciones: utilización de la astaxantina como antioxidante	22
1.2.2.5. Aplicaciones: astaxantina como suplemento de la dieta humana	23
1.2.2.6. Aplicaciones: la astaxantina como suplemento dietético en mamíferos y pollos	24
1.3. BIOSÍNTESIS DE ASTAXANTINA	24
1.3.1. Ruta de biosíntesis: etapas tempranas	24
1.3.2. Etapas tardías: conversión de $\beta$ -caroteno en astaxantina	27
1.3.3. Etapas enzimáticas limitantes	28
1.3.4. Regulación de la biosíntesis de carotenoides	30
1.3.4.1. Regulación por la luz	31
1.3.4.2. Efecto de la temperatura	31
1.3.4.3. Efecto de la fuente de carbono	32
1.3.4.4. Efecto de la fuente de nitrógeno	32
1.3.4.5. Regulación por fosfato	33
1.3.4.6. Efecto de la aireación	33
1.3.4.7. Otros factores	33
1.3.5. El gen <i>crtS</i> y la biosíntesis de astaxantina	34
1.3.6. El gen <i>crtR</i>	38

1.4. BIOTECNOLOGÍA EN <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	40
1.4.1. Adición al medio de precursores y compuestos que estimulan la producción	40
1.4.2. Optimización de las condiciones de fermentación	41
1.4.3. Uso de medios de cultivo de bajo coste	43
1.4.4. Obtención de cepas mejoradas	46
1.4.5. Uso de la tecnología del ADN recombinante en <i>X. dendrorhous</i>	47
1.4.6. Extracción de la astaxantina	48
1.5. OBJETIVOS	51
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>53</b>
2.1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS	55
2.1.1. Cepas de <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	55
2.1.2. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	55
2.2. VECTORES DE CLONACIÓN	55
2.2.1. Vectores plasmídicos utilizados	55
2.3. PRODUCTOS Y REACTIVOS	58
2.3.1. Enzimas	58
2.3.2. Ácidos nucleicos	59
2.3.3. Conjuntos (kits) de sistemas comerciales	59
2.3.4. Pigmentos	60
2.4. MEDIOS DE CULTIVO	60
2.4.1. Medios de cultivo para <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	60
2.4.2. Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	61
2.4.3. Suplementos de los medios de cultivo	62
2.5. CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS	62
2.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ADN	63
2.6.1. Aislamiento de ADN	63
2.6.1.1. Aislamiento de ADN total de <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	63
2.6.1.2. Aislamiento de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	65
2.6.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	67
2.6.2.1. Cuantificación y análisis de la pureza del ADN	68
2.6.2.2. Recuperación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	68
2.6.3. Modificación del ADN	68
2.6.3.1. Digestión con endonucleasas de restricción	68
2.6.3.2. Modificación de los extremos de ADN	69
2.6.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	70
2.6.4. Hibridación de ADN (método de <i>Southern</i> )	71
2.6.4.1. Transferencia de ADN a membranas de nylon	71
2.6.4.2. Marcaje de las sondas de hibridación	72

2.6.4.3. Hibridación y detección	73
2.6.4.4. Análisis bioinformático de las hibridaciones tipo <i>Southern</i>	75
2.6.5. Secuenciación de ADN	75
<b>2.7. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ARN</b>	<b>76</b>
2.7.1. Aislamiento de ARN	76
2.7.2. Retrotranscripción de ARN y amplificación por PCR (RT-PCR)	77
2.7.2.1. Eliminación de contaminación por ADN	77
2.7.2.2. RT-PCR	77
<b>2.8. TRANSFORMACIÓN DE MICROORGANISMOS</b>	<b>78</b>
2.8.1. Transformación de <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	78
2.8.2. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	79
2.8.2.1. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	79
2.8.2.2. Procedimiento de transformación de <i>E. coli</i>	80
<b>2.9. ANÁLISIS DE PIGMENTOS</b>	<b>80</b>
2.9.1. Extracción de pigmentos de <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	80
2.9.2. Análisis de pigmentos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	81
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>83</b>
3.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES <i>KU70</i> Y <i>KU80</i> EN <i>X. dendrorhous</i>	85
3.2. SOBREENPRESIÓN DEL GEN <i>crtS</i> DE <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> CON SU PROMOTOR NATIVO	89
3.2.1. Construcción de los plásmidos pG5- <i>hph-crtS</i> -ADNr (+/-)	89
3.2.2. Verificación de los transformantes mediante hibridación del tipo “ <i>Southern</i> ”	91
3.2.3. Análisis transcripcional de la expresión del gen <i>crtS</i>	92
3.2.4. Producción de pigmentos	94
3.3. SOBREENPRESIÓN DEL GEN <i>crtS</i> DE <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> CON OTROS PROMOTORES	97
3.3.1. Sustitución del promotor nativo del gen <i>crtS</i> por el de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa ( <i>gpd</i> )	98
3.3.2. Sustitución del promotor nativo del gen <i>crtS</i> por el de la glutamato deshidrogenasa ( <i>gdh</i> )	99
3.3.3. Clonación del gen <i>crtS</i> con el promotor sustituido en el locus del ADN ribosomal	100
3.3.4. Verificación de los transformantes mediante hibridación del tipo “ <i>Southern</i> ”	102
3.3.5. Análisis de los transformantes pIM-Pgpd/ <i>crtS</i>	103
3.3.5.1. Expresión del gen <i>crtS</i> en transformantes con pIM-Pgpd/ <i>crtS</i>	103
3.3.5.2. Producción de pigmentos en transformantes con pIM-Pgpd/ <i>crtS</i>	105
3.3.6. Análisis de los transformantes pIM-Pgdh/ <i>crtS</i>	108
3.3.6.1. Expresión del gen <i>crtS</i> en transformantes con pIM-Pgdh/ <i>crtS</i>	108

3.3.6.2. Producción de pigmentos en transformantes con pIM-Pgdh/crtS	111
<b>3.4. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DEL GEN <i>crtS</i>: complementación de la cepa ATCC 96815</b>	<b>120</b>
3.4.1. Sustitución de los promotores y terminadores de los genes <i>crtW</i> y <i>crtZ</i> de <i>Paracoccus sp.</i> N81106	120
3.4.2. Complementación de la cepa ATCC 96815 con los genes <i>crtW</i> y <i>crtZ</i> de <i>Paracoccus sp.</i> N81108	122
3.4.3. Complementación de la cepa ATCC 96815 con el gen <i>crtHI</i> de <i>Adonis aestivalis</i>	124
<b>3.5. DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>127</b>
<b>4. CONCLUSIONES</b>	<b>131</b>
<b>5. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>135</b>

## ***ABREVIATURAS***

---

<b>Abs:</b> absorbancia	<b>p/v:</b> Relación peso/volumen
<b>ADN:</b> ácido desoxirribonucleico	<b>rpm:</b> revoluciones por minuto
<b>ADNasa:</b> desoxirribonucleasa	<b>seg:</b> segundo
<b>ADNc:</b> ADN complementario	<b>SSC:</b> citrato de sodio salino
<b>ADNr:</b> ADN que codifica para ARN ribosomal	<b>SDS:</b> dodecilsulfato sódico
<b>Amp:</b> ampicilina	<b>Tr:</b> transformante
<b>ARN:</b> ácido ribonucleico	<b>Tris:</b> tris (hidroximetil) aminometano
<b>ARNm:</b> ARN mensajero	<b>U:</b> unidad de actividad enzimática
<b>ARNasa:</b> ribonucleasa A	<b>UV:</b> ultravioleta
<b>ATP:</b> adenosina-5'-trifosfato	<b>v/v:</b> relación volumen/volumen
<b>CIA:</b> cloroformo-alcohol isoamílico	<b>X-Gal:</b> 5-Br-4-Cl-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido
<b>Da:</b> dalton	
<b>DCD:</b> 3,3'-dihidroxi-3',4'- $\beta,\psi$ -caroteno-4,4'-diona	
<b>DMAPP:</b> dimetilalil pirofosfato	
<b>DMSO:</b> dimetilsulfóxido	
<b>dNTP:</b> desoxinucleótidos trifosfato	
<b>DO:</b> densidad óptica	
<b>DTT:</b> ditioneitol	
<b>EDTA:</b> ácido etilendiaminotetraacético	
<b>et al.:</b> y colaboradores	
<b>FAD:</b> flavín adenín dinucleótido	
<b>FMN:</b> flavín mononucleótido	
<b>FPP:</b> farnesil pirofosfato	
<b>GGPP:</b> geranilgeranil pirofosfato	
<b>GPP:</b> geranil pirofosfato	
<b>HDCO:</b> 3-hidroxi-3',4'-didehidro- $\beta,\psi$ -caroteno-4-ona	
<b>hyg:</b> higromicina	
<b>IPP:</b> isopentenil pirofosfato	
<b>IPTG:</b> 1-isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido	
<b>Kb:</b> kilobase	
<b>KDa:</b> kilodalton	
<b>min:</b> minuto	
<b>MQ:</b> agua de tipo 1	
<b>NAD:</b> dinucleótido de adenina y nicotinamida	
<b>NADP:</b> fosfato del dinucleótido de adenina y nicotinamida	
<b>NTG:</b> 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina	
<b>ORF:</b> marco de lectura abierto	
<b>pb:</b> par de bases	



# **Introducción**

---



## 1.1. CARACTERÍSTICAS DE *Xanthophyllomyces dendrorhous*

### 1.1.1. Aislamiento

A finales de los años 60 Herman Jan Phaff, que trabajaba en la bioquímica de la pared celular de levaduras, pasó a dedicarle más tiempo al estudio de la ecología de las levaduras. Junto a Martin W. Miller, Minoru Yoneyama y Masumi Soneda comenzó a estudiar la flora de hongos levaduriformes asociada con árboles en las islas de Japón y en la costa Oeste de Norte América (Phaff *et al.*, 1972). El objetivo de este trabajo era ampliar los conocimientos sobre las levaduras asociadas a exudados de árboles de hoja caduca o a excrementos de insectos presentes en los árboles. Entre todos los hongos levaduriformes encontrados destacaba un grupo de levaduras imperfectas, en concreto una inusual levadura que formaba colonias de un color rojo-anaranjado característico la cual resultó ser una nueva especie. Se aislaron inicialmente diez cepas de esta levadura: nueve de ellas procedían de árboles de hoja caduca en Japón, que crecían sobre especies de los géneros *Alnus* (1), *Betula* (3), *Cornus* (3), *Fagus* (1) y *Ulmus* (1), y una cepa aislada posteriormente en Alaska (*Betula*). Phaff y sus colaboradores encontraron que este organismo representaba un nuevo género de levaduras: debido a su pigmentación y a que fue aislado en regiones montañosas inicialmente se designó como *Rhodozyma montanae*.

La característica más llamativa de la levadura era el color rojo-anaranjado de sus colonias, cuya intensidad variaba dependiendo de la cepa. Posteriormente se determinó que era debido a la presencia de pigmentos de tipo carotenoide, principalmente astaxantina (Andrewes *et al.*, 1976a). Además, esta levadura fermentaba gran variedad de azúcares, incluyendo glucosa, maltosa, sacarosa y rafinosa: las levaduras pigmentadas no fermentativas no son algo inusual especialmente entre los basidiomicetos (filo Basidiomycota, ejemplos: *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Rhodospodium*, *Sporobolomyces* y *Sporidiobolus*), por lo que era la primera levadura productora de carotenoides descrita capaz de fermentar azúcares. Debido a que el binomio *Rhodozyma montanae* no aportaba un “diagnóstico en latín” positivo requerido por el Código Internacional de Nomenclatura Botánica, se llevó a cabo un cambio de género pasándose a llamar *Phaffia rhodozyma* en reconocimiento a la labor de Herman J. Phaff y señalando las características inusuales de esta levadura (Miller *et al.*, 1976).

Miller y colaboradores (1976) definieron a *P. rhodozyma* como una levadura anamórfica, y designaron a la cepa UCD 67-210 como la cepa tipo. Basándose en su morfología, las propiedades de la pared celular, el modo de formación de la yema, la pigmentación, el análisis de la secuencia y la estructura del gen de la actina (Wery *et al.*, 1996), y sus características metabólicas (Sugiyama *et al.*, 1985; An *et al.*, 1989; Varga *et al.*, 1995), se concluyó que se trataba de un basidiomiceto, pero no se observó un ciclo de reproducción sexual en ninguna de las cepas aisladas. Una de las características más concluyentes para determinar su origen filogenético fue la presencia de una pared celular con múltiples capas cerca del área de gemación, lo que es característico de las levaduras pertenecientes al grupo de los heterobasidiomicetos (Miller *et al.*, 1976).

La búsqueda del ciclo sexual de *P. rhodozyma* usando los diez aislados originales fue en un principio infructuosa. Puesto que era imposible encontrar la fase sexual del hongo, y muchas de las levaduras pertenecientes a los basidiomicetos son heterotálicas, se pensó que la actividad sexual requería el acoplamiento de cepas compatibles. Mientras tanto, entre los años 70 y 90 se fueron recolectando más aislados de esta especie en Finlandia, Rusia y otras regiones geográficas (Golubev, 1995; 1998). Golubev encontró un ciclo sexual en ciertas cepas aisladas cerca de Moscú, así como en la cepa tipo CBS 5905 (=UCD 67-210) (Golubev, 1995). La actividad sexual implicaba el acoplamiento homotálico entre una célula madre y su yema (proceso denominado pedogamia) bajo condiciones especiales, y eventualmente se observaba la formación de largos holobasidios con basidiosporas terminales. Golubev designó a la forma teleomórfica como una especie nueva, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, dentro de la familia Filobasidiaceae (orden Ustilaginales), de la que la cepa VKM Y-2786 se designó como cepa tipo (Golubev, 1995). La cepa tipo de *P. rhodozyma* (CBS 5905) fue considerada como la forma anamórfica de *X. dendrorhous* (Golubev, 1995; Miller y Phaff, 1998).

Aunque normalmente se ha asumido que todas las cepas deberían designarse como *X. dendrorhous*, el debate no está cerrado y existe la hipótesis de que pueden existir dos especies diferentes: la anamórfica, *P. rhodozyma*, y la teleomórfica, *X. dendrorhous*. Esta teoría se apoya en los estudios realizados por Kucsera y colaboradores (1998 y 2000), los cuales se basan en el polimorfismo en longitud de los cromosomas observado en el cariotipado electroforético y la habilidad de producir espontáneamente mutantes *petite* deficientes en la respiración. Para corroborar esto, en otro trabajo (Pfeiffer *et al.*, 1996) analizaron los elementos genéticos extracromosomales de seis cepas de *P. rhodozyma* y demostraron que con excepción de la cepa tipo, todas las cepas contenían ADN plasmídico de doble cadena. El estudio realizado por Fell y Blatt (1999) en el que se analiza las secuencias ITS e IGS del ADN ribosomal de cinco cepas (incluyendo la cepa tipo CBS 5909) sugieren también que *P. rhodozyma* es un taxón distinto que no representa el estado anamórfico de *X. dendrorhous*. Sin embargo, cuando se contrastan estos resultados con los basados en el análisis con isoenzimas (Varga *et al.*, 1995), los patrones de RFLP y RAPD llevan a la conclusión de que todas las cepas estudiadas pertenecen a una única especie. Libkind y colaboradores (Libkind *et al.*, 2007b; Fell *et al.*, 2007) al analizar diversas cepas mediante la técnica de MSP-PCR para fingerprinting (*Micro/mini satellite-primed Polymerase Chain Reaction*), así como la secuenciación de la región completa de los ITS (ITS, ADNr 5,8S e ITS 2) llegaron a la conclusión de que son la misma especie, y que las diferencias encontradas se deben a una variación intraespecífica asociada a la especificidad de huésped. Además de todo lo anteriormente dicho, Golubev (Golubev, 1995) sí que observó reproducción sexual en la cepa tipo de *P. rhodozyma*. En conjunto, los datos parecen indicar que todas las cepas incluida la cepa tipo *P. rhodozyma* CBS 5905 podrían incluirse dentro de la especie *X. dendrorhous*.

### 1.1.2. Características generales

*X. dendrorhous* es una levadura ligeramente psicrófila, con una temperatura óptima de crecimiento de 21° C hasta un máximo de 26° C. La clasificación taxonómica de este hongo es:

Reino Fungi

Filo Basidiomycota

Subfilo Agaromicotina

Clase Tremellomicetes

Orden Cistofilobasidiales

Familia Cistobasidiaceae

Género *Xanthophyllomyces*

Especie *Xanthophyllomyces dendrorhous*

Desde que fue descubierta hasta ahora se han encontrado distintos aislados de esta levadura en distintos puntos del planeta con climas fríos: Alaska, Japón, Finlandia, Rusia, Italia, Alemania, Chile y la Patagonia argentina. Se encuentra en sustratos ricos en azúcar como son los exudados primaverales de los árboles de hoja caduca (como son los géneros *Fagus*, *Betula*, *Alnus* o *Cornus*) o en los cuerpos fructíferos (estroma) del hongo ascomiceto *Cyttaria hariotti* (parásito endémico de *Nothophagus* spp. de la Patagonia). La cepa encontrada en Chile ha sido aislada creciendo sobre las hojas de *Eucalyptus globulus*, medio completamente distinto a los anteriormente nombrados. Esto se corresponde con el hecho de que esta cepa no se agrupa filogenéticamente bien con el resto de cepas encontradas (Weber *et al.*, 2008): la especificidad de hospedador habría hecho que se separaran al ser las distintas cepas huéspedes en sustratos completamente distintos.

Entre otras características a señalar aparece su contenido en G+C de un 48,3% (cepa tipo UCD 67-210; Miller *et al.*, 1976). Es capaz de hidrolizar urea y de formar compuestos de almidón, independientemente del pH del medio. Es incapaz de utilizar el nitrato potásico y la etilamina como fuentes de nitrógeno, además de no tener actividad lipolítica ni de hidrólisis de caseína. La formación de ácido es débil, al igual que la licuefacción de la gelatina. Puede asimilar D-glucoronato pero no myo-inositol. Las reacciones de diazonium blue B y de la ureasa son positivas. Forma coenzima Q-10 y presenta xilosa en los hidrolizados celulares.

#### 1.1.2.1. Fuentes de carbono

Una de las características más destacables de este hongo es su gran capacidad para fermentar azúcares. El Dr. Palágyi y sus colaboradores (2001) estudiaron la asimilación de 99 fuentes de carbono por 11 cepas distintas de *X. dendrorhous* creciéndolas en medio mínimo (Tabla 1.1.).

Algunos compuestos son utilizados por todas las cepas, mientras que otros no son utilizados por ninguna de las estudiadas. Además existe un tercer grupo en el que se encuentran aquellos compuestos que son utilizados solamente por algunas de las cepas. De aquellos compuestos que son consumidos, sólo algunos alteran la coloración normal de las

## INTRODUCCIÓN

colonias. Se ha observado que siete de ellos modifican la producción en una o más cepas. Entre ellos se encuentran dos que incrementan la formación de pigmentos: mientras que la trehalosa tiene efecto en todas las cepas, la D-manosa aumenta la coloración en aproximadamente la mitad de las cepas. Por el contrario el ácido acético y el ácido succínico provocan una inhibición de la pigmentación.

Por todas las cepas	D-xilosa	D-melecitosa	lactona	ác. L-malico
	D-glucosa	citidina	D-maltosa	etanol
	<b>D-manosa</b>	2-ceto-D-glucónico	D-celobiosa	$\beta$ -metil-D-glucosido
	D-fructosa	arbutina	D-rafinosa	arbutina
	L-arabinosa	salicina	<b>ácido acético</b>	ác. D-glucónico-lactona
	L-xilosa	ác. oxalacético	<b>trehalosa</b>	
Por ninguna de las cepas	sacarosa		almidón	
	D-ribosa	L-alanina	ác. ascórbico	L-asparagina
	D-galactosa	L-valina	D-glucosamina	L-cisteína
	L-ramnosa	L-leucina	ác.o fumárico	L-tirosina
	lactosa	L-isoleucina	ác. gentísico	L-lisina
	D-melibiosa	$\gamma$ -butirolactona	ác. isocítrico	L-arginina
	xilano	vanillina	metanol	L-histidina
	dextrano	ác. gálico	ác. orótico	$\beta$ -alanina
	inulina	ác.	pectina	L-ornitina
	<b>glicerol</b>	L-hidroxibutírico	ác. tartárico	L-citrulina
	i-eritritol	$\beta$ -metil-D-galactósido	$\alpha$ -cetoglutarato	uracilo
	galactitol	metil-D-xilósido	L-metionina	citocina
	ribitol	metil- $\alpha$ -D-	L-fenilalanina	timina
	mioinositol	manopiranósido	L-triptófano	adenosina
	xilitol	ác. cetoisovalérico	L-serina	dihidroxiacetona
	glicina	ác. protocatecuico	L-treonina	
	Por alguna cepa	D-arabinosa		ác. D-glucorónico
L-aspartico		$\alpha$ -metil-D-glucósido	D-xilosa	
ác. glucónico		glicerol-1-monoacetato	L-prolina	
ác. L-glutámico		ác. pirúvico	D-sorbitol	
L-glutamina		<b>ác. succínico</b>	L-sorbosa	
Inosina		ác. 5-ceto-D-glucónico	uridina	
ác. L-láctico			D-manitol	

Tabla 1.1. Asimilación de 99 fuentes de carbono según la capacidad de 11 cepas de *X. dendrorhous* para fermentarlas (Palágyi *et al.*, 2001). En el texto se hace referencia a los nombres marcados en **negrita**.

La suplementación de fuentes de carbono al medio de cultivo afecta sustancialmente al crecimiento y la pigmentación, siendo dependiente de la cepa estudiada. Sin embargo, esta relación de fuentes de carbono asimilables puede ser dependiente del medio en el que se realice el experimento. Un ejemplo de esto puede ser el glicerol: según el estudio del Dr. Palágyi (Palágyi *et al.*, 2001) *X. dendrorhous* es incapaz de utilizarlo en un medio mínimo. Sin embargo, en el estudio realizado por Kusdiyantini y colaboradores (1998) se observa que si

crecemos el hongo en un medio complejo con extracto de levadura y peptona es capaz de consumir totalmente el glicerol (co-metabolización).

### 1.1.2.2. Fase sexual

El estado teleomórfico se caracteriza por la formación de un fino holobasidio con basidiosporas terminales que se forma tras una conjugación del tipo pedogamia (figura 1.1.). La conjugación entre célula madre e hija posiblemente comienza con la detención de la fase G1 del ciclo celular, como ocurre en otras levaduras. El ciclo de vida presenta rasgos homotáticos, teniéndose además evidencias de cariogamia, meiosis e incluso recombinación.

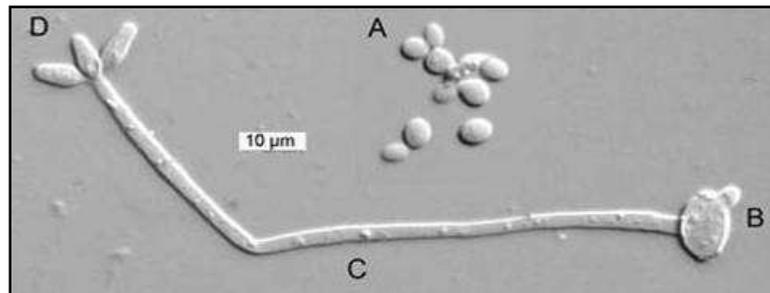


Figura 1.1. Imagen de las estructuras de *Xanthophyllomyces dendrorhous*. A: células vegetativas. B: conjugación entre la célula madre (pedogamia). C: holobasidio. D: basidiosporas terminales.

Este estado necesita de unas condiciones especiales como son un medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono a unas concentraciones de entre 80 y 120 mM, y nitrato amónico a una concentración de 28 mM. Los estudios realizados por Kucsera y colaboradores (1998) demuestran que la presencia en el medio de cultivo de una fuente de nitrógeno asimilable a baja concentración inhibe la esporulación, mientras que la privación de nitrógeno la favorece como se ha visto en otros microorganismos como *Schizosaccharomyces pombe*, cuyas células de distinto tipo sexual dejan de dividirse y comienzan a conjugarse y esporular cuando se ven privadas de fuente de nitrógeno (Klar, 1992); o como *Saccharomyces cerevisiae* en la que la esporulación es consecuencia de la privación nutricional y de la presencia de fuentes de carbono no fermentables como el acetato (Herskowitz *et al.*, 1992). También se ve favorecida por la presencia de polioles o polialcoholes (carbohidrato que contiene más grupos hidroxilo que el azúcar al que está asociado: tienen reemplazado el grupo cetona o aldehído por un grupo alcohol; tales como ribitol, D-glucitol, L-arabitol, o D-xilitol), pentosas (D-ribosa, D-xilosa o D-arabinosa) o D-lixosa; excepto para D-manitol y L-arabinosa. Estos polioles simularían el hábitat natural cuando los exudados de savia primaverales terminan y se secan. En respuesta al estrés hídrico, los microorganismos eucariotas acumulan altas concentraciones de alcoholes polihídricos y este cambio fisiológico parece que provoca la reproducción sexual. Además de las condiciones nutricionales, hay que tener en cuenta que requiere de unas temperaturas bajas en torno a los 9° C (una temperatura por encima de los 12° C inhibe totalmente la formación de holobasidios), y un tiempo de incubación de 20 días o más.

Además de los procesos de pedogamia entre una célula madre y su yema, también se han observado cruzamientos entre dos células distintas (Kucsera *et al.*, 1995a). Este proceso

requiere que ambas células estén en las mismas condiciones nutricionales restrictivas: la transferencia desde un medio complejo a un medio mínimo sin sales de amonio hace que la mayoría de las células dejen de gemar y se transformen en células alargadas rodeadas por paredes celulares refráctiles con numerosos acúmulos lipídicos. Se observan agrupamientos celulares: algunas células forman tubos de conjugación pequeños y aparecen algunos pares de células conjugadas. El septum desaparece y posteriormente un fino holobasidio se forma en el ápice con 2-7 basidiosporas. Las esporas aisladas de las tétradas tienen la capacidad de esporular de nuevo lo que significa que *X. dendrorhous* es una especie homotática, un fenómeno bastante raro entre las levaduras pertenecientes a los basidiomicetos.

### 1.1.2.3. Fase asexual

En su estado asexual las células son elipsoidales y se encuentran individualmente, en parejas o de vez en cuando en pequeñas cadenas. Se divide por gemación frecuentemente por el mismo sitio, siendo la manera de formación de las yemas característica de las levaduras heterobasidiomicetas (Kreger-van Rij, 1998; Johnson y An, 1991). Sin embargo, bajo condiciones de estrés hídrico y de escasez de nitrógeno puede llegar a formarse células con múltiples yemas (figura 1.2.).

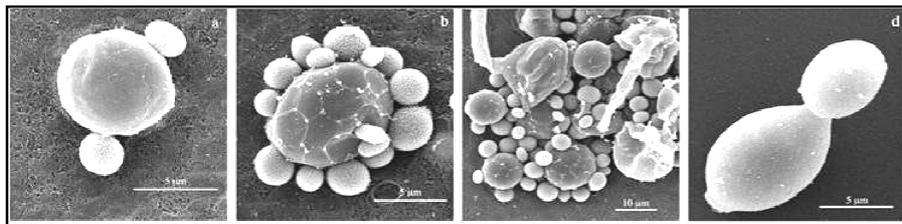


Figura 1.2. Imágenes al microscopio electrónico de *X. dendrorhous*. A, B y C corresponden a células con múltiples yemas. D corresponde con la división habitual de *X. dendrorhous*. (Echavarrí-Erasun, 2005).

Su ultraestructura celular también indica un origen basidiomiceto: la pared celular tiene múltiples capas y se rompe formando un cuello donde emerge las yemas (figura 1.3.; Miller *et al.*, 1976). Los polisacáridos de la pared celular contienen principalmente  $\beta(1\rightarrow3)$  y  $\beta(1\rightarrow6)$ glucano y también  $\alpha(1\rightarrow3)$ glucano, además de pequeñas cantidades o nada de quitina (Johnson *et al.*, 1979; Kucsera y Takeo, 1998). Las células están rodeadas por una cápsula de polisacáridos ácidos con D-xilosa.

Un estudio con microscopía de fluorescencia de los cambios asociados a la gemación en los microtúbulos y la actina reveló que la dinámica de la colocación de los microtúbulos es más parecida a la de las levaduras de fisión que a *Saccharomyces cerevisiae* (Slaninova *et al.*, 1999). En la interfase, las células tienen el núcleo posicionado centralmente y haces de tubos citoplásmicos que no están conectados al núcleo. Durante la mitosis, el núcleo completo se mueve hacia la yema y se divide allí. Posteriormente los microtúbulos citoplásmicos desaparecen y son reemplazados por un huso. El núcleo se alarga y los polos del huso se alejan, separando los “núcleos hijo” mientras permanecen en la yema. Luego uno de ellos vuelve a la célula madre. Al final de la telofase y durante la citocinesis, el huso se disocia y los microtúbulos citoplásmicos reaparecen tanto en la célula madre como en la hija. En las células que no se dividen en el citoplasma solamente se observan parches de microfilamentos

de actina y no-actina. Están diseminados regularmente por todo el citoplasma excepto en el área nuclear. En las células en gemación estos parches de actina se encuentran tanto en la yema como en la célula madre.

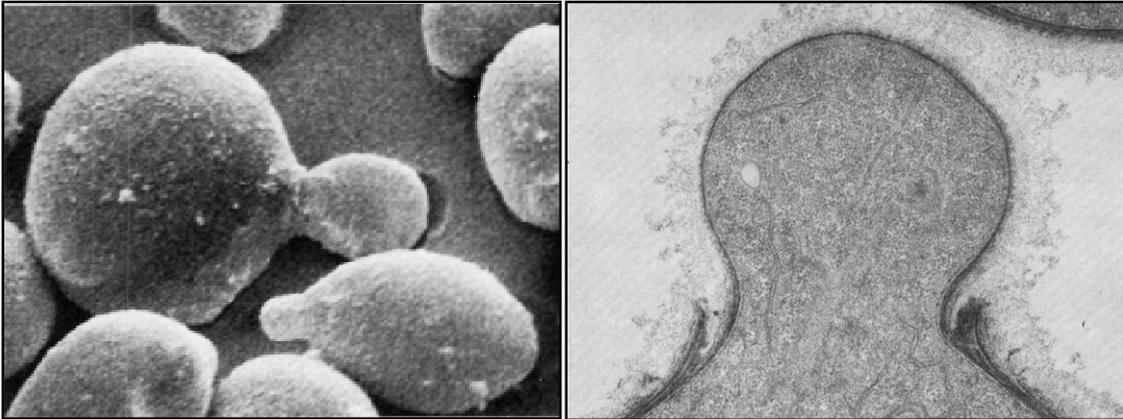


Imagen 1.3. **A:** Fotografía de microscopio electrónico de barrido de *X. dendrorhous* UCD-67-210 en la que se aprecia células vegetativas en gemación (x65000). La apariencia granular de la superficie celular es debido a la presencia de la cápsula. **B:** Fotografía de microscopio electrónico de transmisión de *X. dendrorhous* UCD 67-210 en la que se observa la naturaleza multicapas de la pared celular. Los restos de las capas de la pared exterior forman un cuello a la vez que la yema emerge, mientras que la capa inferior es continua. También se puede observar el material capsular (zona transparente de electrones) que rodea a la célula (x41000).

Se ha tratado de estudiar la organización del genoma, utilizándose para ello las técnicas de CHEF (*Contour Clamped Homogeneous Electric Field*) y OFAGE (*Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis*). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la existencia de un elevado polimorfismo en la longitud y en el número de cromosomas entre las diferentes cepas de la levadura, al igual que ocurre en muchos otros géneros de levaduras (todas las cepas estudiadas presentaron diferentes cariotipos electroforéticos). De acuerdo con estos estudios, el número de cromosomas varía entre 8 y 13 en las diferentes cepas, y el tamaño total del genoma oscila entre 15.4 y 23.2 Mb (si bien existen discrepancias entre los resultados obtenidos por los diferentes investigadores en cuanto al número de cromosomas y al tamaño del genoma en algunas cepas), lo que se encuentra dentro del mismo orden de magnitud que el tamaño del genoma de otras levaduras estudiadas (Nagy *et al.*, 1994; Adrio *et al.*, 1995; Varga *et al.*, 1995; Cifuentes *et al.*, 1997; Nagy *et al.*, 1997).

#### 1.1.2.4. Nivel de ploidía

No está muy claro cuál es el nivel de ploidía de *X. dendrorhous*, puesto que diferentes estudios conducen a distintas conclusiones. Algunos autores se basan en el contenido en ADN por célula para determinar que es diploide (Chun *et al.*, 1992), o en la necesidad de utilizar la 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina seguida del uso de técnicas de enriquecimiento como única forma de obtener mutantes auxótrofos, lo que conduce a pensar que el nivel de ploidía debe ser mayor que haploide (Adrio *et al.*, 1993). También los estudios realizados por Medwid (Medwid, 1998) sugieren que *X. dendrorhous* no es haploide, en base a la incapacidad de aislar mutantes auxótrofos a partir de poblaciones mutagenizadas con la misma frecuencia con que aparecen en poblaciones haploides. Los análisis de células mediante FACS (*Fluorescent Activated Cell Sorting analyses*) indican que el contenido de ADN por célula en *X.*

*dendrorhous* ATCC 24202 es ligeramente superior que el de una cepa diploide de *Saccharomyces cerevisiae*, lo que podría indicar que o bien que *Xanthophyllomyces* es poliploide o que la complejidad del ADN por cada célula de esta levadura es superior a la de *Saccharomyces*. Sin embargo las cinéticas de inactivación de mutágenos para un agente físico (radiación ultravioleta) y un agente químico (nitrosoguanidina) no apoyan esta última posibilidad: si asumimos que *Xanthophyllomyces* es haploide con una sola copia de un gen determinado y el doble de contenido en ADN por célula (el doble de sitios potenciales en los que un evento letal podría ocurrir), *Xanthophyllomyces* debería ser más susceptible a mutágenos físicos y químicos de lo que son los haploides de *S. cerevisiae*. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos por Cifuentes y colaboradores (1997) quienes se basan en el cariotipado electroforético y el contenido de ADN celular derivado de una determinación química para sugerir que *Xanthophyllomyces* es diploide. Hermosilla y colaboradores (2003) también llegaron a la conclusión de que *X. dendrorhous* ATCC 24230 es diploide, en base a estudios de complementación génica y recombinación mitótica.

Por otro lado, la obtención de un alto número de mutantes de color que acumulan diferentes carotenoides mediante tratamiento con luz ultravioleta o con etil-metano sulfonato, está de acuerdo con un estado de haploidía (Girard *et al.*, 1994). Así mismo los resultados obtenidos por Wery y colaboradores (1997) en relación al aumento del tamaño de los cromosomas por fenómenos de integración múltiple en la región de los genes ribosomales, y la pérdida de las bandas correspondientes a los cromosomas originales, les llevaron a concluir que *X. dendrorhous* CBS 6938 es haploide (Wery *et al.*, 1997). Sin embargo, la segregación obtenida en un proceso de reproducción sexual al enfrentar mutantes auxótrofos y de color, apunta a que las células vegetativas de *Xanthophyllomyces* son diploides, y que forman cigotos tetraploides tras la conjugación (Roman *et al.*, 1995). Esta fase tetraploide es transitoria, ya que el cigoto entra inmediatamente en división meiótica, dando lugar a células diploides de nuevo. A pesar de que los resultados obtenidos apuntan a que la población está formada por células vegetativas diploides, no se puede excluir totalmente la presencia de aneuploides (Kucsera *et al.*, 1998).

El conocimiento del nivel de ploidía de *X. dendrorhous* es necesario para el desarrollo de estrategias de selección, a la hora de obtener cepas con el contenido en astaxantina incrementado, así como para establecer su filogenia (Medwid, 1998).

### 1.1.2.5. Elementos extracromosomales

Además del ADN genómico, *Xanthophyllomyces* presenta elementos genéticos extracromosomales como son el ADN mitocondrial, ADN plasmídico (Pfeiffer *et al.*, 1995) y virus ARN de doble cadena (Castillo y Cifuentes, 1994):

- Aunque el ADN mitocondrial es esencial para el metabolismo respiratorio, no es estrictamente requerido para la viabilidad de las células (Kucsera *et al.*, 1995b). Esta levadura es basidiomiceto “petite”-positiva: pueden aparecer pequeñas colonias que no tienen mitocondrias funcionales. El inductor “petite” más ampliamente usado (bromuro de etidio) es tan efectivo como en *S. cerevisiae* (Kucsera *et al.*, 1996).

- Salvo la cepa CBS 5909 (cepa tipo), todas las cepas examinadas presentan numerosos plásmidos lineales de ADN. Aunque no se han estudiado específicamente, estos plásmidos parecen estar localizados en el citoplasma y tener una organización genética específica (Fukuhara, 1995). Algunos fragmentos secuenciados y comparados con las bases de datos no muestran homología significativa (Pfeiffer *et al.*, 1996). La única función conocida de los plásmidos lineales es la de conferir carácter “killer” a las células huésped, aunque no se ha detectado actividad alguna en *X. dendrorhous*.
- Varias cepas de *Xanthophyllomyces* albergan virus de ARN de doble cadena (Castillo y Cifuentes, 1994; Pfeiffer *et al.*, 1994a), mientras que otras cepas están libres de ellos. Su estudio revela la existencia de tres patrones diferentes de ARN de doble cadena (figura 1.2.). Se han encontrado cepas con uno, tres y cuatro tipos de moléculas de ARN. Las partículas víricas (icosaédricas alargadas, con un tamaño de 34x26 nm) se detectan en aquellas cepas que presentan tres o cuatro tipos de moléculas de ARN. Se ha visto que una molécula de 3,7 Kb no forma parte del genoma de los virus. La presencia de las partículas víricas tiene un efecto poco perceptible sobre la reproducción y la “salud” del huésped.

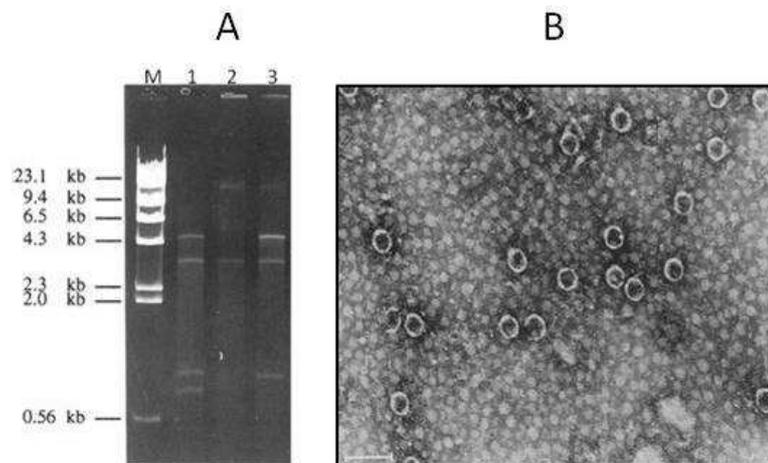


Figura 1.4. **A:** Patrones de ARN de doble cadena en distintas cepas de *X. dendrorhous*; M → marcador  $\lambda$  HindIII; 1 → ATCC 24261 (4 moléculas de ARN); 2 → ATCC 24229 (1 molécula); 3 → ATCC 24203 (3 moléculas); (Kucsera *et al.*, 2000). **B:** Micrografía electrónica de partículas víricas de la cepa UCD 67-385. Tinción negativa con 2% (w/v) fosfotungstato potásico. La barra representa 100 nm (Castillo y Cifuentes, 1994).

#### 1.1.2.6. Pigmentos

El color de las cepas silvestres de *X. dendrorhous* es rojo-anaranjado debido a la presencia de carotenoides en su citoplasma (concretamente se localizan en glóbulos lipídicos en el citoplasma [Johnson y An, 1991]), de los que la astaxantina representa aproximadamente el 85% (Andrewes *et al.*, 1976). Es la única especie de levadura conocida que produce astaxantina en cantidad considerable (200-300 microgramos de astaxantina por gramo de peso seco) (Johnson y An, 1991). Esta xantofila es común en ambientes marinos, y proporciona una pigmentación vívida y característica a ciertos animales, incluyendo salmónidos, crustáceos y algunas aves como los flamencos. En la naturaleza, el origen de la astaxantina probablemente se encuentre en ciertas algas, hongos y pequeños crustáceos: estos organismos

se encuentran al principio de la cadena alimentaria, y ello conduce a la pigmentación de los animales superiores que se alimentan de ellos.

La astaxantina aislada de *X. dendrorhous* presenta configuración 3*R*, 3'*R*, al contrario de lo que ocurre con la procedente de otros organismos estudiados, que sintetizan el isómero 3*S*, 3'*S* (Andrewes y Starr, 1976). Éste fue el primer ejemplo de un carotenoide sintetizado de forma natural con diferentes configuraciones ópticas, lo que plantea interesantes cuestiones sobre las propiedades de las enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de *R*-astaxantina en *X. dendrorhous* en comparación con los organismos que sintetizan *S*-astaxantina, o sobre el orden de introducción de los grupos ceto e hidroxilo en la molécula de β-caroteno (Andrewes y Starr, 1976).

Aunque la astaxantina es el carotenoide mayoritario, no es el único que produce este hongo. En 1975, Andrewes y colaboradores (1976) estudiaron por primera vez la composición de carotenoides de *Xanthophyllomyces* mediante HPLC y TLC de la cepa tipo UCD 67-210. Como se muestra en la tabla 1.2., además de astaxantina también existen otros compuestos como son el β-caroteno, foenicoxantina, 3-hidroxi-3',4'-didehidro-β-ψ-caroteno-4-ona. Después de este estudio se han encontrado otros compuestos como la criptoxantina (β-caroteno monohidroxilado), zeaxantina (β-caroteno dihidroxilado), cantaxantina (β-caroteno dicetolado), y el toruleno (compuesto monocíclico).

Carotenoide	Porcentaje
Astaxantina	83-87 %
Foenicoxantina	5-7 %
3-hidroxi-3',4'-didehidro-β-ψ-caroteno-4-ona	3-4 %
β-caroteno	2-2,5 %
Equinona	2-4 %
HDCO	0,3-0,5 %
γ-caroteno	≤ 0,01 %
neurosporeno	
licopeno	

Tabla 1.2. Relación de carotenoides encontrados en *X. dendrorhous* y la cantidad media en la que están presentes (Andrewes *et al.*, 1976).

### 1.1.3. Interacciones con el medio ambiente

Se cree que algunos árboles de hoja caduca pueden contener sustancias que resultan letales para la mayoría de las levaduras, pero que pueden ser toleradas por *Xanthophyllomyces dendrorhous* debido a su fisiología única y a su contenido en carotenoides (Schroeder y Johnson, 1993; 1995a; 1995b). Además, la producción de astaxantina protege a la levadura de las especies reactivas de oxígeno generadas por la reacción del ozono con determinados componentes de la planta (Schroeder *et al.*, 1996). Se ha visto que en las especies del género

*Betula* existen compuestos que generan especies reactivas de oxígeno cuando son activados por luz ultravioleta, y que los carotenoides proporcionan una ventaja selectiva a las cepas más pigmentadas en esas condiciones (Schroeder y Johnson, 1995a).

Otros estudios han puesto de manifiesto que la producción de astaxantina por *X. dendrorhous* se incrementa cerca del 40% con la presencia en sus inmediaciones del hongo *Epicoccum nigrum*: extractos de este hongo han demostrado incrementar la formación de carotenoides en varias cepas de *Xanthophyllomyces* crecidas en medio líquido, incluyendo mutantes albinos y productores de  $\beta$ -caroteno (Echavarrí-Erasun y Johnson, 2004). Aunque no se han aislado ni caracterizado ni los compuestos ni el mecanismo responsable de este incremento, hoy en día se conoce que *E. nigrum* es un patógeno de plantas que produce metabolitos secundarios que incluyen flavonoides y carotenoides ( $\beta$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno, rodoxantina y torularrodina), los cuales podrían afectar a la formación de carotenoides en *X. dendrorhous*: ya se había visto que compuestos precursores de la síntesis de carotenoides, así como el mevalonato (precursor de los isoprenoides) incrementan la producción de astaxantina (Calo *et al.*, 1995).

Los hongos patógenos de plantas y los hongos que provocan podredumbre de la madera producen enzimas oxidativas que provocan la degradación de las paredes celulares de los tejidos de las plantas, generando especies reactivas de oxígeno (entre ellas radicales peróxido y oxígeno singlete) que pueden incrementar la producción de astaxantina (Schroeder y Johnson, 1995a; 1995b). Esto sugiere que la síntesis de carotenoides (y más concretamente de astaxantina) en *X. dendrorhous* puede tener como finalidad la defensa ante los compuestos nocivos producidos por los patógenos como *E. nigrum* (Echavarrí-Erasun y Johnson, 2004).

### **1.1.4. Otras características de interés de *X. dendrorhous***

#### **1.1.4.1. Producción de micosporinas**

Las micosporinas son compuestos hidrosolubles que absorben en el rango de la luz ultravioleta (UV), principalmente en torno a una longitud de onda de 310 nm. Está compuestas por una unidad de aminociclohexenona unida a un aminoácido o a un grupo amino alcohol. Inicialmente se localizaron en micelios en esporulación.

Al analizar distintas cepas de *X. dendrorhous* Libkind y colaboradores (2010) detectaron la presencia de una única micosporina, conocida como micosporina-glutaminol-glucósido (MGG, figura 1.5). Aunque este compuesto es sintetizado de forma constitutiva, el crecimiento bajo exposición a luz visible y en mayor medida a radiación UVA estimula su producción.

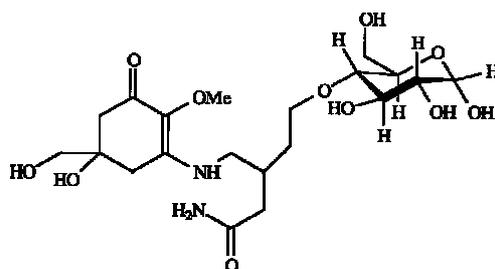


Figura 1.5. Estructura química de la micosporina-glutaminol-glucósido (Sommaruga *et al.*, 2004).

Así mismo al comparar la producción de MGG entre distintas cepas, se ha visto que existe una mayor cantidad de compuesto en aquellas cepas aisladas en zonas con una elevada radiación ultravioleta. Puesto que se ha demostrado que la MGG presenta actividad antioxidante frente al oxígeno singlete (Moliné *et al.*, 2011), todo esto nos indica que la MGG forma parte del mecanismo de protección de *X. dendrorhous* para la colonización de ambientes extremos.

#### 1.1.4.2. Producción de neo-fructo-oligosacáridos

Los fructo-oligosacáridos (FOS) son un tipo de fibra soluble que se está convirtiendo rápidamente en un importante ingrediente dentro de la industria alimentaria, debido a sus propiedades funcionales, tales como estimular la microflora intestinal, aliviar el estreñimiento (Stewart *et al.*, 2008), disminución del nivel de colesterol sérico (Zhang *et al.*, 2007) y promover la absorción del hierro (Kruger *et al.*, 2003). Convencionalmente, los FOS son producidos industrialmente por procesos microbianos, incluyendo un proceso de dos etapas o un proceso de un solo paso.

El primero de los procedimientos que requiere de dos etapas consiste en la producción de enzimas por fermentación microbiana, seguido de la reacción enzimática con el sustrato para producir los FOS. Los FOS son principalmente sintetizados a partir de sacarosa por la acción de fructosiltransferasas (E.C. 2.4.1.9) producidas a partir de diversos microorganismos, tales como *Aspergillus japonicus* (Mussatto *et al.*, 2009a, b), *Aureobasidium* (Salinas y Perotti, 2009), *Schwanniomyces occidentalis* (Alvaro-Benito *et al.*, 2007). También se utilizan  $\beta$ -fructofuranosidasas (E.C. 3.2.1.26) de *Saccharomyces cerevisiae* ([Taussig y Carlson, 1983], [Reddy y Maley, 1990] y [Reddy y Maley, 1996]), *Schizosaccharomyces pombe* (Moreno *et al.*, 1990), *Pichia anomala* (Rodríguez *et al.*, 1995), *Candida utilis* (Chávez *et al.*, 1998) y *Arxula adenivorans* (Böer *et al.*, 2004). La levadura *X. dendrorhous* sintetiza varias enzimas potencialmente útiles para la síntesis de neo-FOS como son una  $\beta$ -fructofuranosidasa extracelular (Linde *et al.*, 2009), y una 6G-fructofuranosidasa intracelular (endo-6G-FFasa, Chen *et al.*, 2011).

El segundo de las dos estrategias consta de una única etapa puesto que se basa en la biotransformación con células enteras como único biocatalizador para la síntesis de los FOS, lo que evita el paso de purificación de las enzimas. De esta forma se pueden emplear cultivos celulares de *X. dendrorhous* para la síntesis de estos neo-FOS (Ning *et al.*, 2010).

### 1.1.4.3. Producción de antifúngico

Se ha comprobado que *X. dendrorhous* tiene actividad antifúngica frente a *Kloeckera apiculata* (levadura ascomiceta responsable de la podredumbre ácida de la vid), *Rhodotorula slooffiae*, y *R. minuta* (levaduras basidiomicetas productoras de carotenoides, responsables de algunas micosis oportunistas), (Baeza *et al.*, 2010).

Esta actividad antifúngica es mayor en los medios de cultivo ricos con un pH 4,6 a 5,0. Se caracterizaron los extractos extracelulares proteicos con actividad fungicida, identificándose como responsable una proteasa aspártica de 33kDa.

## 1.2. CAROTENOIDES

### 1.2.1. Estructura, propiedades y funciones de los carotenoides

Tradicionalmente asociados a pigmentos vegetales, los carotenoides presentan una distribución mucho más amplia apareciendo también en animales y microorganismos. Además de la llamativa coloración que producen y que es familiar a todo el mundo, tiene un papel esencial en organismos fotosintéticos aerobios. Sin carotenoides, la fotosíntesis y toda la vida en una atmósfera con oxígeno sería imposible. Asimismo, se han visto que están implicados en la prevención o protección contra desordenes de la salud como el cáncer y enfermedades cardíacas.

Las funciones y acciones de los carotenoides están determinadas por sus propiedades físicas y químicas, y estas a su vez están definidas por su estructura molecular (Britton, 1995). Debido a la modificación de la estructura básica, se han descubierto y descrito más de 600 compuestos de este tipo. Los carotenoides son compuestos isoprenoides de 10 átomos de carbono sintetizados a partir de 2 moléculas de geranilgeranilpirofosfato (C<sub>20</sub>). Este esqueleto polieno (o cromóforo) puede ser modificado por ciclación de uno o ambos extremos, por cambios en el nivel de hidrogenación o por adición de grupos funcionales que contienen oxígeno (figura 1.6.). De esta forma los carotenoides se dividen en carotenos (compuestos hidrocarbonados) y xantofilas (compuestos derivados de los carotenos que contienen uno o más oxígenos).

El rasgo más destacado y característico de la estructura carotenoide es el largo sistema de enlaces alternantes dobles y simples que conforman la parte central de la molécula. Estos enlaces constituyen un sistema conjugado en el que los electrones  $\pi$  están deslocalizados a lo largo de toda la cadena poliénica. Es ésta la característica que le da a los carotenoides su forma molecular distintiva, así como su reactividad química y las propiedades para absorber luz. En principio cada doble enlace de la cadena puede existir en dos configuraciones distintas (*cis* o *trans*), que depende de la disposición de los grupos sustituyentes. Esto originaría un elevado número de isómeros. Sin embargo, en la naturaleza solamente se encuentra una pequeña cantidad de estos isómeros. La mayoría de los carotenoides se encuentran predominantemente en su forma *trans*, siendo algo más estables termodinámicamente que los

isómeros *cis*. Además, hay que tener en cuenta que cada molécula tiene dos centros quirales en C-3 y C-3': por ejemplo la astaxantina tiene dos enantiómeros (3*R*, 3'*R* y 3*S*, 3'*S*) y una forma meso (3*R*, 3'*S*), siendo la forma más común la 3*S*, 3'*S*.

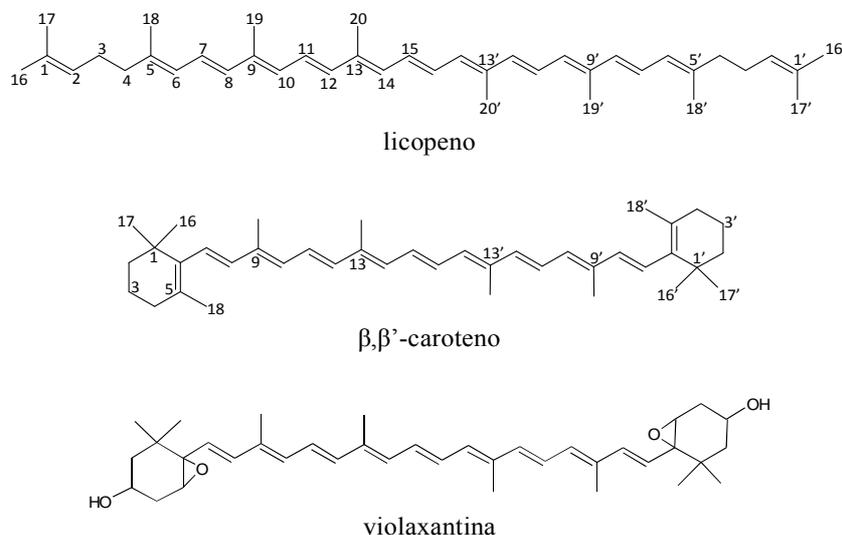


Figura 1.6. Estructura básica y esquema numerado de un caroteno acíclico (licopeno), un caroteno dicíclico ( $\beta,\beta'$ -caroteno) y una xantofila (violaxantina).

Los carotenoides como grupo son extremadamente hidrofóbicos con poca o ninguna solubilidad en agua, de forma que se encuentran restringidos a zonas hidrofóbicas dentro de la célula. Obviamente los grupos funcionales polares alteran la polaridad y afectan a las interacciones con otras moléculas.

Las propiedades de absorción de cada carotenoide dependen del grado de conjugación de los dobles enlaces y del estado de isomerización del esqueleto polieno: se necesita un mínimo de siete dobles enlaces conjugados para la absorción de luz en la región visible del espectro. Además el incremento del número de dobles enlaces conjugados en un carotenoide acíclico hace que su color cambie del amarillo, vía naranja y rojo brillante, al rojo oscuro, en una molécula de 40 átomos de carbono con la máxima desaturación posible (15 dobles enlaces conjugados): al aumentar su número, aumenta la longitud de onda de la luz absorbida, con lo que el compuesto adquiere una coloración más rojiza. El fitoeno, que posee sólo tres dobles enlaces conjugados, absorbe luz en el rango del ultravioleta, por lo que aparece incoloro a la vista. Los grupos ceto en las posiciones 2 y 2' de la cadena acíclica o en las posiciones 4 y 4' de los anillos ionona de los extremos de la molécula contribuyen al sistema de dobles enlaces conjugados.

Debido a su esqueleto polieno, los carotenoides son potentes agentes antioxidantes, y las xantofilas se han mostrado como eficientes sumideros de radicales libres (Krinsky, 1994), por lo que entre sus funciones destaca su papel protector frente al daño oxidativo, actuando en procesos de fotooxidación y en reacciones de peroxidación mediadas por radicales (Bartley y Scolnik, 1995).

Los carotenoides son esenciales para aquellos organismos que realizan la fotosíntesis oxigénica (cianobacterias, algas y plantas superiores): son componentes imprescindibles del aparato fotosintético, donde desempeñan funciones de protección frente a las especies reactivas de oxígeno generadas durante la fotosíntesis, disipan el exceso de energía absorbido por los pigmentos antena y participan en la captación adicional de energía para la fotosíntesis (Cunningham y Gantt, 1998). Sin embargo, son sintetizados también por algunas bacterias heterotróficas, levaduras, hongos y plantas fotoautotróficas, para los que no son esenciales pero en los que desempeñan un papel importante al actuar como agentes antioxidantes (Britton, 1983; Goodwin, 1986): este comportamiento “no esencial” es semejante al de muchos otros metabolitos secundarios producidos por estos organismos. Los animales carecen de la capacidad de sintetizarlos *de novo*, por lo que deben incorporarlos a través de la dieta.

Debido a la coloración que producen, son responsables del color de las flores y los frutos de muchas plantas, así como de algunos animales (aves, insectos, crustáceos, etc.) (Britton, 1983), y son precursores de la síntesis de fitohormonas (Hable *et al.*, 1998). Algunos de ellos relacionados con el  $\beta$ -caroteno, como la vitamina A, el retinal y el ácido retinoico, desempeñan funciones importantes en la visión, la nutrición, el crecimiento y el desarrollo celular (Britton, 1983). En otros casos presentan actividad como provitamina A, estimulan la respuesta inmune, o están implicados en la comunicación celular (Chew, 1993; Chew y Park, 2004; Jyonouchi *et al.*, 1994). Los efectos beneficiosos conocidos de los carotenoides son atribuidos sólo a un pequeño número de los cientos de moléculas de este grupo presentes en la naturaleza.

### **1.2.2. Astaxantina**

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- $\beta,\beta'$ -caroteno-4,4'-diona, figura 1.7.) es un pigmento que pertenece a la familia de las xantofilas. Es uno de los principales pigmentos presentes en el medio marino, contribuyendo a la coloración típica del caparazón de muchos crustáceos (camarón, quisquilla, gamba, langosta, etc.), de la carne de salmónidos y de las plumas de algunas aves (flamenco). Este compuesto de coloración rosa-anaranjada fue aislado e identificado por primera vez a partir de langostas (Kuhn y Sørensen, 1938).

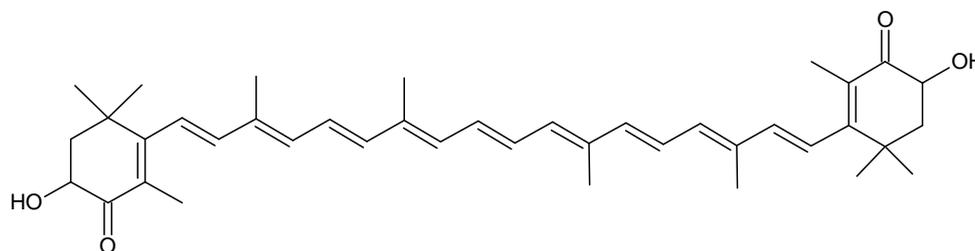


Figura 1.7. Estructura química de la astaxantina

Presenta un peso molecular de 596,8 Da; teniendo como fórmula  $C_{40}H_{52}O_4$ . Está compuesta por una larga cadena polienica de dobles enlaces con un anillo polar de seis carbonos en los extremos, lo que le confiere carácter insoluble en agua y naturaleza lipofílica. Su número del registro del CAS es 472-61-7 y su temperatura de fusión es de

aproximadamente 224°C. Cuando cristaliza forma un cristal fino de color marrón violeta oscuro. Es soluble en compuestos orgánicos como el disulfuro de carbono, acetona, benceno y cloroformo. Es insoluble en solventes acuosos y la mayoría de solventes orgánicos, pero puede disolverse a temperatura ambiente en diclorometano, cloroformo, acetona, dimetilsulfóxido y otros solventes no polares. La longitud de onda a la que presenta una máxima absorción en éter de petróleo es de 475 nm.

Este pigmento es una molécula simétrica, que presenta dos centros quirales y que por lo tanto presenta cuatro estereoisómeros: 3*R*,3'*S*; 3*S*,3'*R*; 3*S*,3'*S* y 3*R*,3'*R*. Los estereoisómeros con las conformaciones 3*S*,3'*S* y 3*R*,3'*R* se denominan enantiómeros, mientras que las conformaciones: 3*R*,3'*S* y 3*S*,3'*R* se les suele llamar conformaciones “meso”, siendo formas ópticamente inactivas. En el hongo *X. dendrorhous* la conformación mayoritaria es 3*R*,3'*R*; al igual que la existente en el kril. Sin embargo, tanto en el salmón como en el alga verde *H. pluvialis* la conformación predominante es 3*S*,3'*S*.

En cada anillo terminal existen como sustituyentes un grupo ceto (posiciones 4 y 4') y un grupo hidroxilo (posiciones 3 y 3'). Estos grupos hidroxilo pueden estar libres o pueden reaccionar con un ácido (como un ácido graso) para formar un éster. Así, la formación de ésteres con ácidos grasos provoca que la molécula resultante sea más hidrofóbica. En términos de hidrofobicidad, se observa que la hidrofobicidad de los di-ésteres es mayor que la de los mono-ésteres y que a su vez es mayor que la de la astaxantina libre. Mientras que en el salmón la forma dominante es la libre, en el kril, *Xanthophyllomyces* y *Haematococcus* la forma mayoritaria es la esterificada.

Su utilización dentro de la industria de la acuicultura es muy importante puesto que provee la coloración rojiza-anaranjada a los animales, al carecer de la fuente natural de este pigmento. También, este compuesto es esencial como componente nutricional dado que favorece un adecuado crecimiento y reproducción de los salmónidos y crustáceos. Además de por su color, la astaxantina tiene un gran valor debido a sus propiedades antioxidantes, las cuales han demostrado ser superiores a las del β-caroteno e incluso a las del α-tocoferol (Miki, 1991).

### 1.2.2.1. Producción de astaxantina

Debido a su interés en el mercado (es el principal carotenoide usado a nivel mundial en la industria de la acuicultura) la empresa Roche empezó en 1990 la producción de astaxantina sintética (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006), cubriendo prácticamente la totalidad del mercado (estimado en unos 150-200 millones de dólares). Esta astaxantina consiste en una mezcla 1:2:1 de los isómeros (3*S*, 3'*S*/3*R*, 3'*S*/3*R*, 3'*R*). Sin embargo la demanda creciente de este pigmento para su utilización en la producción de alimentos funcionales, una síntesis relativamente compleja y un elevado coste, ha estimulado la búsqueda de distintas fuentes naturales de astaxantina con un uso potencial para la industria (Johnson, 2003). Además, el producto obtenido mediante síntesis química contiene sólo un 8% de astaxantina, y tiene un coste de 20000-24000 euros/Kg (Tinoi *et al.*, 2006). Su estabilidad y su actividad son menores que las del producto natural, y se ha visto que la astaxantina sintética se absorbe y

deposita peor que la de origen natural (Fang y Cheng, 1993). Por otra parte, cuando se utilizan aditivos para la alimentación humana o animal, los consumidores prefieren que su origen sea biológico antes que químico; además de las estrictas normas y reglamentos que se aplican a estos carotenoides de síntesis química/pigmentos purificados.

De forma natural la astaxantina es producida por unos pocos organismos (tabla 1.3.), de los que solamente el alga verde *Haematococcus pluvialis* y el hongo levaduriforme *Xanthophyllomyces dendrorhous* (con 30 y 4 mg de astaxantina por gramo de peso seco respectivamente) pueden competir con la astaxantina sintética (Tinoi *et al.*, 2006).

	<b>Organismo</b>	<b>Referencia</b>
<b>Bacteria</b>	<i>Mycobacterium lacticola</i>	Nelis y DeLeenheer, 1991
	<i>Paracoccus</i> sp. N81106	Yokoyama <i>et al.</i> , 1994
	<i>Paracoccus haeuendaensis</i>	Lee <i>et al.</i> , 2004
<b>Microalga</b>	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Boussiba y Vonshak, 1991
	<i>Chlorella zofingiensis</i>	Rise <i>et al.</i> , 1994
<b>Hongo</b>	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Andrewes <i>et al.</i> , 1976
<b>Planta</b>	<i>Adonis annua</i>	Renstrom <i>et al.</i> , 1981
<b>Insecto</b>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Moran y Jarvik, 2010

Tabla 1.3. Relación de los organismos conocidos productores de astaxantina.

El alga verde de agua dulce *H. pluvialis* acumula grandes cantidades de astaxantina en sus aplanosporas cuando se expone a condiciones de crecimiento desfavorables o a diferentes situaciones de estrés medioambiental, como pueden ser la escasez de nitrógeno, la escasez de fosfato, una elevada concentración de sal en el medio o la alta intensidad luminosa. Durante este proceso las células vegetativas del alga forman cistos y su color cambia del verde al rojo (Boussiba y Vonshak, 1991). La astaxantina se encuentra formando ésteres entre uno o ambos grupos hidroxilo con diferentes ácidos grasos como palmítico, oleico, esteárico o linoléico.

En *X. dendrorhous*, a diferencia de *H. pluvialis*, la astaxantina se encuentra dentro de acúmulos lipídicos. Además, la astaxantina se encuentra en forma libre (Andrewes y Starr, 1976): se ha visto que los ésteres de astaxantina son peor utilizados en acuicultura que la forma libre (Margalith, 1999). Por otra parte, el isómero de la astaxantina producido por *X. dendrorhous* (3*R*, 3'*R*) parece que es absorbido peor por los peces que el producido por *H. pluvialis* (3*S*, 3'*S*) (Margalith, 1999).

#### 1.2.2.2. Función de la astaxantina en *Xanthophyllomyces dendrorhous*

*X. dendrorhous* es deficiente en enzimas que participan en la destoxificación de especies reactivas de oxígeno, como son el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), el radical hidroxilo (OH<sup>·</sup>) y el oxígeno singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), lo que la hace más susceptible a estas especies. Los carotenoides, localizados en glóbulos lipídicos en el citoplasma y en las membranas de la levadura, pueden compensar esta falta de enzimas antioxidantes (Schroeder y Johnson, 1993; 1995a; 1995b). *X. dendrorhous* posee solamente una superóxido dismutasa (SOD) asociada al ión manganeso (Mn-SOD) y probablemente mitocondrial, careciendo

totalmente de las superóxido dismutasas citosólicas Fe-SOD y Cu/Zn-SOD. Además, el contenido en catalasa principalmente durante la fase estacionaria es bajo en comparación con *Saccharomyces cerevisiae*, volviéndose altamente sensible a la exposición a peróxido de hidrógeno en esta fase (Schroeder y Johnson, 1993). El envejecimiento de los hongos está acompañado por un incremento en la formación de especies reactivas de oxígeno, así como por el incremento del potencial redox de las células. Curiosamente, las últimas fases del crecimiento y la fase estacionaria están asociadas a un incremento en la respiración insensible a cianuro, y constituyen el periodo más activo de síntesis de xantofilas en *X. dendrorhous* (Schroeder y Johnson, 1995a).

El radical oxígeno singlete es una especie de oxígeno altamente reactiva, que puede inducir daños en el ADN y provocar la oxidación de proteínas (Sies y Menck, 1992). El radical  $^1\text{O}_2$  se puede formar en procesos mediados por la luz pero también en oscuridad, en procesos de descomposición de endoperóxidos y en otros tipos de reacciones químicas y enzimáticas. En los sistemas biológicos estas reacciones tienen lugar en procesos de peroxidación lipídica y por acción de peroxidasas (Cadenas y Sies, 1984; Kanofsky, 1989). También se ha propuesto que el radical  $^1\text{O}_2$  se puede generar a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$  y  $\text{OH}^-$  en un proceso espontáneo, no enzimático (Krinsky, 1977). La eliminación enzimática de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^-$  en organismos con niveles elevados de catalasas, peroxidasas y superóxido dismutasas conduce a la formación de oxígeno molecular. Dado que *X. dendrorhous* carece de elevados niveles de esas enzimas, también debe tener dificultades para eliminar el radical  $^1\text{O}_2$  (Schroeder y Johnson, 1995a).

*X. dendrorhous* posee un alto contenido en ácidos grasos, representando los ácidos oleico y linoléico el 70-75% del total. Precisamente estos dos ácidos grasos se encuentran entre los más reactivos con el radical  $^1\text{O}_2$ . Los carotenoides, que están asociados con los lípidos y con la membrana celular, pueden servir como un excelente mecanismo de defensa contra la peroxidación lipídica en la célula (Schroeder y Johnson, 1995a). *S. cerevisiae*, que carece de carotenoides, es muy resistente al radical  $^1\text{O}_2$  quizás debido a que posee grandes cantidades de enzimas destoxicantes, posee menos lípidos, y contiene predominantemente ácido palmitoleico, que es menos reactivo con el radical  $^1\text{O}_2$ . Por lo tanto, se puede afirmar que los carotenoides protegen a *X. dendrorhous* del efecto letal que tendrían sobre ella los radicales  $^1\text{O}_2$  (Schroeder y Johnson, 1995a).

Los aislados naturales de *X. dendrorhous* han sido encontrados sólo en nichos ecológicos concretos, como son los exudados de árboles de hoja caduca en regiones elevadas de latitudes norte (Phaff *et al.*, 1972), el cuerpo fructífero de *Cyttaria hariatii* (parásito de *Nothofagus* spp.) en la región de la Patagonia argentina (Libkind *et al.*, 2007a) o las hojas de *Eucalyptus globulus* en Chile (Weber *et al.*, 2008). Esta especificidad sugiere que se debe estar produciendo algún tipo de interacción entre el árbol y la levadura. Se sabe que las plantas sintetizan compuestos antiparasitarios y antimicrobianos, especialmente en respuesta a infecciones o a heridas. Una de las plantas que se ha estudiado es *Betula papyrifera*, que produce un compuesto que cataliza la formación de radicales  $^1\text{O}_2$  cuando se expone a luz ultravioleta, por lo que en esas condiciones los carotenoides proporcionen una ventaja selectiva a las cepas más pigmentadas de *X. dendrorhous*. Estos resultados sugieren que el

árbol produce un compuesto que favorece la presencia de *X. dendrorhous* como constituyente de la microflora de su corteza, y que la carotenogénesis ha evolucionado como un mecanismo de defensa que le asegure la supervivencia ante los radicales  $^1\text{O}_2$  fotogenerados en el ambiente por el hospedador (Schroeder y Johnson, 1995a).

Los cambios en los niveles de especies reactivas de oxígeno afectan a la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*. Así, los radicales  $^1\text{O}_2$  parecen inducir la síntesis de carotenoides mediante un proceso de activación génica (Schroeder y Johnson, 1995b). La inducción de la carotenogénesis mediada por la luz, descrita previamente en *X. dendrorhous* (An y Johnson, 1990; Meyer y du Preez, 1994b), puede tener como intermediario al radical  $^1\text{O}_2$ . Una breve exposición a  $^1\text{O}_2$  induce la síntesis de carotenoides, no siendo necesario que se mantenga la exposición para la estimulación de la carotenogénesis. Esto indica que su efecto se debe producir en una etapa temprana de la ruta de síntesis de astaxantina, y que probablemente afecte a genes o proteínas reguladoras (Schroeder y Johnson, 1995b). También en otros metabolitos secundarios como la penicilina se ha descrito que el estrés oxidativo y probablemente el oxígeno singlete producido en *Penicillium chrysogenum* aumenta la expresión de los genes biosintéticos de penicilina y la producción de este antibiótico (Jami *et al.*, 2010).

Los radicales peróxido reducen el contenido de astaxantina en *X. dendrorhous* por degradación oxidativa, provocando un aumento en los niveles de  $\beta$ -caroteno, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de retroregulación de la carotenogénesis por el producto final (Schroeder y Johnson, 1995b).

Las diferencias observadas en los efectos sobre el metabolismo de los carotenoides de los radicales  $^1\text{O}_2$  y peróxido se deben a la diferente forma de interacción que tienen con ellos. Los radicales  $^1\text{O}_2$  son destoxificados por los carotenoides a través de cambios en su estado de energía, pero sin modificación de la estructura covalente de los carotenoides. Por el contrario, los radicales peróxido reaccionan covalentemente con los carotenoides, lo que conduce a su degradación posterior, posiblemente por reacciones que implican la participación de enzimas de tipo citocromo P-450 o flavín-oxigenasas, como ocurre en otros terpenoides y esteroides (Schroeder y Johnson, 1995b).

Por lo tanto, parece que en la regulación de los niveles de carotenoides en *X. dendrorhous* participa la inducción por  $^1\text{O}_2$ , la inhibición por producto final (astaxantina), y la acción de las rutas de degradación. Esto muestra que la levadura ha desarrollado un sofisticado sistema que le permite modificar rápidamente su capacidad carotenogénica dependiendo de las condiciones ambientales y del estado fisiológico de la célula (Schroeder y Johnson, 1995b).

El hecho de que las especies reactivas de oxígeno participen en la regulación de la biosíntesis de carotenoides, y que los carotenoides puedan actuar protegiendo frente a los daños celulares causados por ellas, sugiere que *Xanthophyllomyces* podría servir como un excelente modelo eucariota unicelular para estudiar la biología molecular del envejecimiento y las enfermedades degenerativas asociadas al daño por especies reactivas de oxígeno en

eucariotas. Estudios evolutivos han puesto de manifiesto que los basidiomicetos se encuentran más próximos a los humanos que los ascomicetos, por lo que debe ser un modelo más apropiado que *S. cerevisiae* para realizar esos estudios de envejecimiento celular (Johnson, 2003).

### 1.2.2.3. Aplicaciones: uso de la astaxantina en la acuicultura

El color de los salmónidos y crustáceos es percibido por los consumidores como un indicador de su calidad. El color rojizo-anaranjado característico de estos organismos procede de los carotenoides obtenidos de la alimentación que se depositan en su piel, músculo exoesqueleto y gónadas, ya sea en su forma química original o modificada dependiendo de la especie (Meyer y Chen, 1982). El carotenoide predominante es la astaxantina: por ejemplo en el exoesqueleto de los camarones la astaxantina representa el 84-90%. En el medio acuático las microalgas sintetizan la astaxantina, que serán consumidas por el zooplancton, insectos o crustáceos y posteriormente serán ingeridos por los peces para conseguir su coloración característica. Los peces criados en cautividad no tienen acceso a esas fuentes naturales de astaxantina, por lo que es necesario suministrarla en la alimentación.

Además de la coloración que otorga a los animales, la astaxantina tiene otras funciones importantes en los peces relacionadas principalmente con la reproducción: acelera la madurez sexual, incrementa la fertilización y la supervivencia de los huevos. Se ha visto que la astaxantina también mejora la función hepática, aumenta el potencial de defensa frente al estrés oxidativo (Nakano *et al.*, 1995) y tiene una influencia significativa en los mecanismos de biodefensa (Amar *et al.*, 2001)

En cuanto a los crustáceos, los estudios realizados principalmente en camarones sugieren que la astaxantina incrementa la tolerancia al estrés, mejora la respuesta inmune, actúa como protector intracelular y tiene un efecto sustancial sobre el crecimiento y supervivencia de las larvas (Gabaudan, 1996; Darachi *et al.*, 1999)

### 1.2.2.4. Aplicaciones: utilización de la astaxantina como antioxidante

Un metabolismo normal aerobio genera moléculas oxidativas, o lo que es lo mismo radicales libres (moléculas con electrones desapareados, que han perdido algún electrón) como hidroxilos y peróxidos, así como especies reactivas del oxígeno (singlete) que son necesarios para mantener los procesos de la vida. Sin embargo, cantidades excesivas de estos compuestos son peligrosas debido a su elevada reactividad: pueden reaccionar con diversos componentes intracelulares como proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN (Di Mascio *et al.*, 1991). Esta situación puede generar daño oxidativo a través de una reacción en cadena con efectos devastadores, causando oxidación proteica y lipídica y daño en el ADN in vivo: esto es el estrés oxidativo. Todo este daño intracelular está asociado a diferentes enfermedades como son la degeneración macular por procesos de envejecimiento, retinopatía, carcinogénesis, arteriosclerosis y Alzheimer.

Para controlar y reducir la oxidación, el cuerpo humano genera sus propios antioxidantes enzimáticos: superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa, así como otras moléculas con

actividades antioxidantes. Sin embargo, en muchos casos estos compuestos no son suficientes: muchos estudios han demostrado que se puede inhibir la oxidación con el consumo de cantidades adecuadas de antioxidantes, como la vitamina E (Burton *et al.*, 1982).

Un antioxidante es una molécula que tiene la habilidad de eliminar los radicales libres, bien reaccionando con ellos y produciendo compuestos inocuos o impidiendo las reacciones de oxidación (Britton, 1995). Los antioxidantes pueden ser solubles en agua (incluyen la vitamina C), o lipofílicos: se incluyen la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) y carotenoides como la astaxantina y el  $\beta$ -caroteno.

Distintos estudios indican que los efectos potenciales de los carotenoides en la salud humana están asociados con sus propiedades antioxidantes: las personas que ingieren altas concentraciones de carotenoides tienen un riesgo bajo de enfermedades crónicas como enfermedades cardiovasculares, desarrollo de cataratas, degeneración macular y algunos tipos de cáncer (Ziegler, 1991; Mayne, 1996). Sin embargo, los antioxidantes también pueden actuar como prooxidantes, es decir, sustancias que pueden inducir estrés oxidativo.

Respecto a la astaxantina sólo se conoce su actividad antioxidante, que es unas 10 veces mayor que la de otros carotenoides como la zeaxantina, luteína, cantaxantina y  $\beta$ -caroteno; y 100 veces más que el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E)

### 1.2.2.5. Aplicaciones: astaxantina como suplemento de la dieta humana

Los productores de astaxantina han intentado durante mucho tiempo entrar en el mercado de la acuicultura, con muy poco éxito. Sin embargo, recientemente su atención ha girado a otra industria en crecimiento: el mercado de nutraceuticos (McCoy, 1999). Actualmente existe una gran variedad de productos que se venden en tiendas de alimentos naturales, en forma de suplementos alimenticios. Debido a sus elevadas propiedades antioxidantes a estos suplementos se les ha atribuido propiedades potenciales contra muchas enfermedades.

La astaxantina se está estudiando como tratamiento de distintos tipos de cáncer (Mayne, 1996; Chew *et al.*, 1999). Se ha observado que el  $\alpha$ -caroteno y la astaxantina son más eficaces en la prevención de cierto tipo de tumores que el  $\beta$ -caroteno.

También existen estudios sobre la actuación de la astaxantina en la prevención de enfermedades cardíacas (Guerin *et al.*, 2003). Los resultados observados sugieren que la astaxantina posee un efecto inhibitorio sobre la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) o “colesterol malo” (Iwamoto *et al.*, 2000), lo que prevendría el desarrollo de arterioesclerosis.

La bacteria *Helicobacter pylori* es considerado como un factor importante en la inducción de gastritis aguda, úlceras pépticas y cáncer de estómago en humanos. Algunos estudios indican una acción antibacteriana de la astaxantina frente a esta bacteria, lo que supone una nueva estrategia en el tratamiento de las infecciones humanas debidas a *H. pylori* (Wang *et al.*, 2000).

El grupo dirigido por el Dr. Jyonouchi ha desarrollado sus investigaciones sobre la actividad potencial de la astaxantina como modulador del sistema inmune. La astaxantina incrementa el número de linfocitos B (productores de anticuerpos) y aumenta la producción de linfocitos T-helper (Jyonouchi *et al.*, 1996). Debido a esta actividad inmunomoduladora, la astaxantina se ha usado como tratamiento para enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple, artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn (Lignell y Bottiger, 2001).

La luz ultravioleta es un factor de riesgo significativo para el cáncer de piel, debido a la activación de las reacciones en cadena que genera peróxidos y otros radicales libres. Estas moléculas dañan estructuras celulares como el ADN, lo que incrementa el riesgo de desarrollo de cáncer. La capacidad de estimular y modular el sistema inmune, así como de proteger al ADN del daño por radiación ultravioleta, hacen que la astaxantina sea empleada para prevenir daños por exposición a la radiación UV (Lorenz, 2002).

La astaxantina tiene otros beneficios adicionales como son la actividad antiinflamatoria (Uchiumi, 1990; Nakajima, 1995), la actividad preventiva frente a las cataratas (Guyen *et al.*, 1998), como tratamiento de la artritis reumatoide y también frente al síndrome del túnel carpiano (Lignell y Bottiger, 2001; Cyanotech, 2002).

### 1.2.2.6. Aplicaciones: la astaxantina como suplemento dietético en mamíferos y pollos

Se han realizado diversas investigaciones usando ésteres de astaxantina en mamíferos para estudiar su efectividad como tratamiento en enfermedades musculares, como la rabdomiolisis de esfuerzo equina (Lignell, 2001) o para incrementar la producción en mamíferos (porcino, bovino y ovino) (Lignell y Inborr, 2000). Por otra parte, la administración de astaxantina mejora el estado general de los animales y reduce la mortalidad de los pollos. La producción de huevos y la coloración amarilla de las yemas de huevo también se ve aumentada, mientras que las infecciones por salmonelas se ven reducidas (Lignell *et al.*, 1998). Además, proporciona una pigmentación a la carne de pollo, que es un atributo deseado por algunos consumidores.

## **1.3. BIOSÍNTESIS DE ASTAXANTINA**

### 1.3.1. Ruta de biosíntesis: etapas tempranas

La astaxantina deriva de la ruta de biosíntesis de los isoprenoides: a partir del acetil-CoA y por la vía del mevalonato se forma isopentenilpirofosfato (IPP). Éste es isomerizado en dimetilalilpirofosfato (DMAPP) (enzima codificada por el gen *idi*), seguido por la adición secuencial (enzima codificada por el gen *crtE*) de 3 moléculas de IPP para dar el precursor C<sub>20</sub> geranilgeranilpirofosfato (GGPP). El primer paso específico y crucial de la ruta de síntesis de los carotenoides es la formación de fitoeno, por condensación de dos moléculas de GGPP (enzima codificada por el gen *crtYB*). Posteriormente se producen 4 deshidrogenaciones

(enzima codificada por el gen *crtI*) y 2 ciclaciones (enzima codificada por el gen *crtYB*), que originan el  $\beta$ -caroteno (Figura 1. 8. A).

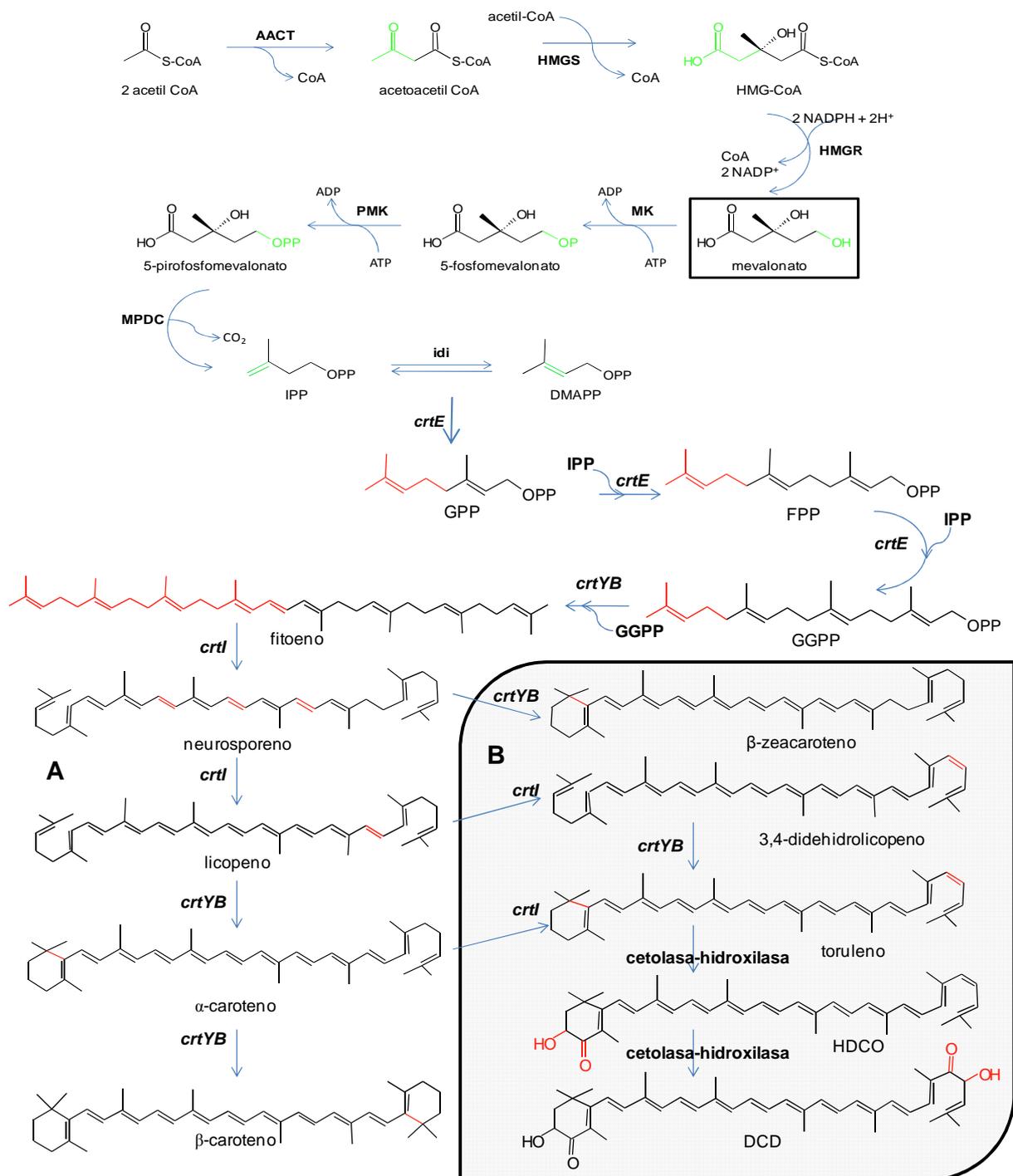


Figura 1.8. Esquema de la ruta de biosíntesis de astaxantina en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **A:** Ruta entre la molécula inicial acetil-CoA y  $\beta$ -caroteno. **B:** Ruta monocíclica. En **negrita** se encuentran las actividades enzimáticas implicadas. HMGS: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA. IPP: isopentenil pirofosfato. DMAPP: dimetilalilpirofosfato. GPP: geranilpirofosfato. FPP: farnesilpirofosfato. GGPP: geranilgeranilpirofosfato. HDCO: 3-hidroxi-3',4'-didehidro- $\beta$ , $\psi$ -caroteno-4-ona. DCD: 3,3'-dihidroxi- $\beta$ , $\psi$ -caroteno,4,4'-diona. AACT: acetil-CoA acetiltransferasa. HMGS: HMG-CoA sintasa. HMGR: HMG-CoA reductasa. MK: mevalonato quinasa. PMK: fosfomevalonato quinasa. MPDC: fosfomevalonato descarboxilasa. *idi*: IPP isomerasa. *crtE*: GGPP sintasa. *crtYB*: fitoeno –  $\beta$ -caroteno sintasa. *crtI*: fitoeno desaturasa.

Al mismo tiempo parece existir una vía paralela que termina en la formación de compuestos monocíclicos (figura 1.8. B) y que fue propuesta por An y colaboradores (1999). Esta ruta diverge de la ruta bicíclica a nivel del neurosporeno, para dar  $\beta$ -zeacaroteno,  $\gamma$ -caroteno, toruleno, 3-hidroxi-3',4'-didehidro- $\beta$ , $\Psi$ -caroteno-4-ona (HDCO) y finalmente 3,3'-dihidroxi- $\beta$ , $\Psi$ -caroteno,4,4'-diona (DCD). El aumento del contenido en HDCO y DCD en mutantes de *X. dendrorhous* superproductores de carotenoides en relación a las cepas silvestres parece indicar que cuanto mayor es el contenido en carotenoides, mayor es el uso de la ruta monocíclica. Este resultado sugiere que las enzimas carotenogénicas forman complejos enzimáticos, y que las mutaciones que afectan a la carotenogénesis provocan cambios en la proporción de las enzimas en los complejos (An *et al.*, 1999). El aumento del contenido en estos pigmentos en mutantes superproductores de carotenoides deteriora la calidad de la levadura como fuente de pigmentos, ya que estos compuestos apenas se encuentran en la carne del salmón alimentado con *X. dendrorhous*.

Sin embargo, la existencia de dos rutas para la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous* no está del todo clara, y no es aceptada por muchos investigadores. Schroeder y Johnson (Schroeder y Johnson, 1995b) concluyeron que sólo existe una ruta, la propuesta originalmente por Andrewes y colaboradores (1976), y que el resto de carotenoides, encontrados normalmente en bajas concentraciones, y que no encajan dentro de los precursores o intermediarios bicíclicos de la ruta, pueden ser productos formados en las reacciones de los intermediarios con radicales libres (el papel protector de los carotenoides contra el daño oxidativo causado por diferentes radicales ha sido ampliamente demostrado [Schroeder y Johnson, 1995a; Ducrey-Santopietro *et al.*, 1998]). También se ha sugerido que la presencia de carotenoides asimétricos puede ser debida a la actividad de un complejo enzimático bifuncional, que catalizaría reacciones en ambos extremos de los precursores simétricos del  $\beta$ -caroteno, y que bajo condiciones de estrés se vería alterada la catálisis, originándose productos asimétricos, que posteriormente podrían ser modificados por reacciones de oxidación y degradación, dando lugar a carotenoides que no deberían estar presentes de acuerdo con la ruta propuesta originalmente por Andrewes y colaboradores (1976). Esto plantea dudas sobre la existencia o no de la ruta monocíclica propuesta por An y colaboradores (1999) como forma de explicar la presencia de los carotenoides monocíclicos.

Con todo, si no existe la llamada ruta monocíclica de biosíntesis de carotenoides, queda la duda de porqué se acumulan grandes cantidades de HDCO en *X. dendrorhous*. La presencia de este tipo de pigmentos se ha intentado explicar de varias formas:

- A) Como precursor de la síntesis de astaxantina (Johnson y An, 1991).
- B) Como producto de degradación parcial de otra xantofila por la acción de radicales libres (Schroeder y Johnson, 1993; 1995b).
- C) Como resultado de la inhibición de la ciclación.

### 1.3.2. Etapas tardías: conversión de $\beta$ -caroteno en astaxantina

Si nos centramos en el proceso de conversión de  $\beta$ -caroteno en astaxantina vemos que en otros organismos como son la bacteria *Paracoccus sp.* N81106 o el alga verde *H. pluvialis* se requieren dos actividades enzimáticas: una cetolasa que incorpora dos grupos ceto en los carbonos C-4 y C-4' (gen *crtW* en *Paracoccus* y gen *bkt* en *Haematococcus*) y una hidroxilasa que incorpora dos grupos hidroxilo en los carbonos C-3 y C-3' (gen *crtZ* en *Paracoccus*, gen *chy* en *Haematococcus*); apareciendo varios intermediarios hidroxilados o cetolados dependiendo del organismo. Sin embargo, en *Xanthophyllomyces* la ruta biosintética de la astaxantina no está clara: se han buscado en el genoma los genes homólogos a estas cetolasas e hidroxilasas, pero no se han podido localizar (Álvarez *et al.*, 2006). Sin embargo, se han clonado dos genes que codifican para dos citocromo P-450 implicadas en la transformación de  $\beta$ -caroteno en astaxantina. El primero de los dos genes es el gen *crtS* que codifica para una citocromo P-450 monooxigenasa, el cual se ha comprobado ampliamente su participación en la biosíntesis de astaxantina a partir de  $\beta$ -caroteno. La función de la proteína codificada por el gen *crtS* no está clara, puesto que se desconoce qué actividad enzimática lleva a cabo (figura 1.9. [Martin *et al.*, 2008]). El segundo gen encontrado se denominada *crtR*, que codifica para una citocromo P-450 reductasa. Su función sería la de donar los electrones necesarios para modificar el  $\beta$ -caroteno, de forma que las proteínas CrtS y CrtR formarían un sistema típico de citocromos P-450.

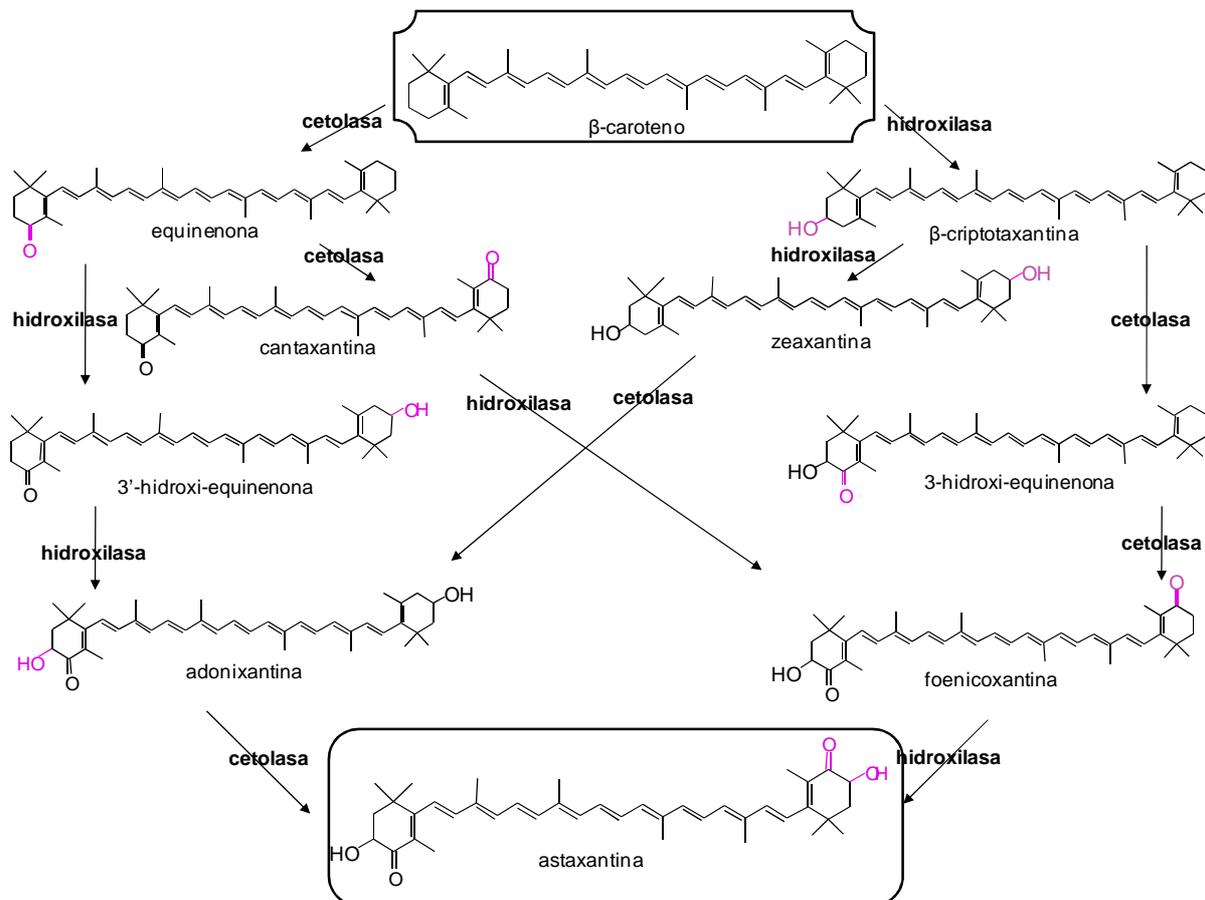


Figura 1.9. Esquema de las posibles vías de conversión de  $\beta$ -caroteno en astaxantina. En **negrita** se representa las actividades enzimáticas necesarias.

### **1.3.3. Etapas enzimáticas limitantes**

La conversión de 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) en mevalonato, llevada a cabo por la enzima HMG-CoA reductasa, es una etapa limitante en la síntesis de astaxantina, como se pone de manifiesto al adicionar mevalonato. En el trabajo de Calo y colaboradores (1995) se observa un aumento de 4 veces de los niveles de astaxantina y carotenoides totales. Los compuestos isoprenoides son precursores de otras rutas, como por ejemplo en la síntesis de colesterol. Por ello, cuando se añaden al medio de cultivo inhibidores de la biosíntesis de colesterol (como los inhibidores del tipo fenoxipropilamina que inhibe la escualeno sintasa) la producción de astaxantina se ve incrementada 1,3 veces (Hoshino *et al.*, 2005).

La introducción del gen *idi* (IPP-DMAPP isomerasa) de *X. dendrorhous* en una cepa de *Escherichia coli* productora de carotenoides, hace que la producción de estos compuestos aumente entre 1.3 y 3 veces (Verdoes y van Ooyen, 1999). Aparentemente, la actividad IPP isomerasa es un paso limitante en la carotenogénesis en *E. coli*. En *X. dendrorhous* el IPP se forma a través de la ruta del mevalonato, y la IPP-DMAPP isomerasa lo transforma en DMAPP; por ello, el gen *idi* en *X. dendrorhous* es esencial, al igual que ocurre en *Saccharomyces cerevisiae* (Mayer *et al.*, 1992). En *E. coli* la situación es diferente, ya que el IPP no se produce a través de la ruta del mevalonato (Rohmer *et al.*, 1997), y el gen *idi* no es esencial (Hahn *et al.*, 1999), por lo que el DMAPP debe producirse por otro tipo de IPP isomerasa diferente o a partir de otro precursor. Así, la carotenogénesis en *E. coli* es fisiológicamente diferente a la de *X. dendrorhous*, y el papel y la regulación de la IPP isomerasa en la carotenogénesis también debe serlo (Visser *et al.*, 2003).

Cuando provocamos la interrupción del gen *crtYB* (que cataliza la conversión de geranilgeranilpirofosfato (GGPP) en fitoeno, así como la ciclación del licopeno), los transformantes obtenidos no acumulan carotenoides (Verdoes *et al.*, 2003), mientras que la sobreexpresión del gen *crtYB* en una cepa productora de astaxantina (CBS 6938) mediante integración de múltiples copias del gen, provoca un pequeño aumento en la producción total de carotenoides. Al mismo tiempo, tanto la producción específica como la producción relativa de astaxantina se ve reducida, mientras que la producción de equinenona y, en menor medida, de  $\beta$ -caroteno, se ven incrementadas. También se observa una disminución en la producción de carotenoides monocíclicos derivados del 3,4-didehidro-licopeno (HDCO y toruleno), debido a una mayor eficacia de la reacción de conversión de licopeno en  $\beta$ -caroteno. El incremento en la producción de  $\beta$ -caroteno y equinenona, y el descenso en la producción de toruleno y HDCO indican que, en este caso, los pasos limitantes para la formación de astaxantina son las reacciones de oxigenación. Por su parte, la sobreexpresión del gen *crtYB* en un mutante que produce  $\beta$ -caroteno (PR-1-104 [Girard *et al.*, 1994]) provoca un aumento en su producción, aunque inferior al 50% (Verdoes *et al.*, 2003; Visser *et al.*, 2003).

De los resultados obtenidos por Ducrey-Santopietro y Kula (Ducrey-Santopietro y Kula, 1998), se puede concluir que la deshidrogenación del fitoeno (catalizada por la enzima CrtI) constituye un cuello de botella en la carotenogénesis en *X. dendrorhous*, por lo que la mejora de esta etapa podría conducir a una mayor producción de astaxantina. La sobreexpresión del

gen *crtI* en *X. dendrorhous* CBS 6938 provoca un incremento en la producción de carotenoides monocíclicos (toruleno, HDCO) y un descenso en la producción de carotenoides bicíclicos (equinenona,  $\beta$ -caroteno y astaxantina). En el caso de la cepa PR-1-104, la sobreexpresión del gen *crtI* provoca un aumento en la producción relativa del carotenoide monocíclico toruleno, y un descenso en la producción de  $\beta$ -caroteno y de los carotenoides totales. En ambos casos existe una correlación negativa entre la producción de toruleno y la producción total de carotenoides (Verdoes *et al.*, 2003; Visser *et al.*, 2003). En condiciones normales la reacción dominante es la ciclación del licopeno, que dirige la ruta hacia astaxantina, pero al sobreexpresar el gen *crtI* se intensifica la formación del 3,4-didehidrolicopeno (posee un doble enlace más que el licopeno), lo que provoca el acúmulo de toruleno y HDCO (Verdoes *et al.*, 2003; Visser *et al.*, 2003).

Como anteriormente se comentó, en base al análisis de mutantes superproductores y al uso de inhibidores específicos de la síntesis de carotenoides (An *et al.*, 1999) se ha propuesto la existencia de una ruta monocíclica en la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*, además de la ruta bicíclica propuesta originalmente por Andrewes y colaboradores (1976). El hecho de que la sobreexpresión del gen *crtI* en un mutante que produce  $\beta$ -caroteno como producto final haga que el producto final pase a ser toruleno en lugar de HDCO o DCD, sugiere que las enzimas que convierten  $\beta$ -caroteno en astaxantina deben ser las mismas que convierten toruleno en HDCO, de modo que esas enzimas pueden actuar tanto sobre carotenoides monocíclicos como sobre bicíclicos. En algunos de los mutantes superproductores de carotenoides estudiados por An y colaboradores (1999), una o más mutaciones que afecten a la actividad de la enzima fitoeno sintasa o a la expresión del gen *crtI*, pueden explicar el incremento observado en los niveles de carotenoides monocíclicos (Verdoes *et al.*, 2003; Visser *et al.*, 2003).

Las enzimas que participan en la síntesis de carotenoides en *Xanthophyllomyces* son específicas sólo para determinadas regiones de la molécula sustrato. Así, el neurosporeno puede ser sustrato para la actividad ciclase del gen *crtYB* (Verdoes *et al.*, 1999a), y una única desaturasa es la responsable de la introducción de hasta cinco dobles enlaces en la molécula de fitoeno (Verdoes *et al.*, 2003).

Una reacción decisiva para la formación de carotenoides monocíclicos o bicíclicos, es la secuencia de desaturaciones del fitoeno para formar licopeno y, posteriormente 3,4-didehidrolicopeno. En las cepas silvestres de *X. dendrorhous* la ciclación del licopeno, que dirige el flujo metabólico hacia la astaxantina, es la reacción dominante. Pero la sobreexpresión del gen que codifica la enzima fitoeno desaturasa (*crtI*) hace que se intensifique la formación de 3,4-didehidrolicopeno, resultando en el acúmulo de toruleno y HDCO. Aparentemente, el nivel de expresión del gen *crtI* determina el número de dobles enlaces que son introducidos por la desaturasa. De los resultados de sobreexpresión de los genes *crtI* y *crtYB* se puede concluir que la competencia entre la desaturasa y la ciclase por el sustrato licopeno gobierna el flujo metabólico, bien vía  $\beta$ -caroteno hasta astaxantina, o vía 3,4-didehidro-licopeno hacia HDCO. Esto indica que, cambios en las proporciones de las enzimas carotenogénicas en *X. dendrorhous*, ya sean inducidas por mutaciones o por

ingeniería metabólica, pueden afectar a la cantidad y composición de carotenoides (Verdoes *et al.*, 2003).

Es posible que, al igual que ocurre en *Phycomyces blakesleeanus*, las enzimas que participan en la carotenogénesis se encuentren formando complejos, como se deduce de los resultados obtenidos al sobreexpresar los genes *crtI* y *crtYB*. Así, el aumento de los niveles de la enzima fitoeno desaturasa puede alterar la secuencia de las reacciones, y por lo tanto, los productos finales que se forman. (Verdoes *et al.*, 2003).

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

La regulación de la síntesis de carotenoides ha sido ampliamente estudiada en los hongos *Neurospora crassa* y *Fusarium fujikuroi* (que producen neurosporaxantina), *Phycomyces blakesleeanus* y *Mucor circinelloides* (forman  $\beta$ -caroteno), en los que también se han aislado y caracterizado los genes y enzimas carotenogénicas. La transcripción de esos genes está inducida por la luz mediante unos mecanismos de regulación que se conocen sólo en parte, y que resultan en un incremento en la biosíntesis de compuestos carotenoides. Se han descrito algunos de los genes que participan en esa regulación en *N. crassa* y en *P. blakesleeanus* (Talora *et al.*, 1999; Cerdá-Olmedo, 2001). En *M. circinelloides* el gen *crgA* codifica un regulador negativo de la carotenogénesis fotoinducible, ya que la pérdida de su función provoca el acúmulo de carotenoides en presencia de luz y en oscuridad (Navarro *et al.*, 2000).

En *P. blakesleeanus* y *F. fujikuroi* parece haber también un mecanismo de retroregulación en la biosíntesis de carotenoides, ya que mutantes con los genes *carB* y *carRA* interrumpidos acumulan cantidades mayores de carotenoides intermediarios en relación a las respectivas cepas silvestres (Cerdá-Olmedo, 1985; Fernández-Martín *et al.*, 2000; Linnemannstöns *et al.*, 2002). En *P. blakesleeanus* el  $\beta$ -caroteno, como producto final mayoritario, parece regular su propia síntesis, mediante un proceso de retroregulación en el/los paso(s) anteriores a la síntesis del fitoeno (Bramley y Mackenzie, 1988).

Pero mientras que la ruta de biosíntesis de carotenoides parece ser bastante universal, los mecanismos reguladores son diferentes: los hongos pertenecientes a los géneros *Phycomyces*, *Blakeslea* y *Gibberella* responden de diferente forma a agentes que actúan sobre la carotenogénesis, como la luz visible y diferentes agentes químicos (Cerdá-Olmedo, 1994).

En un estudio realizado por Ducrey-Santopietro y Kula (Ducrey-Santopietro y Kula, 1998), se llegó a la conclusión de que es el  $\beta$ -caroteno, en lugar de la astaxantina, el que jugaba un papel importante en la retroregulación de la carotenogénesis en *X. dendrorhous*. Esto es contrario a lo que Schroeder y Johnson (Schroeder y Johnson, 1995b) habían sugerido: que era la astaxantina la implicada en la retroregulación.

En el caso de *X. dendrorhous* existe muy poca información sobre la regulación de la carotenogénesis. La astaxantina se produce como metabolito secundario, y determinadas condiciones nutricionales afectan a su biosíntesis (Johnson y Lewis, 1979). Concretamente,

niveles elevados de glucosa y condiciones semianaeróbicas reducen notablemente la formación de carotenoides. Bajo estas condiciones, además, no se producen xantofilas o se producen a concentraciones muy bajas (Johnson y Lewis, 1979; Yamane *et al.*, 1997). La relación carbono/nitrógeno ha sido descrita como un factor crítico para la máxima producción de astaxantina (Meyer y du Preez, 1994b; Flores-Cotera *et al.*, 2001; Vustin *et al.*, 2004).

Basándonos en el análisis proteómico realizado por Martínez-Moya y colaboradores (2011), se observa que existe una regulación estricta de las proteínas relacionadas con la utilización de los carbohidratos y los lípidos lo que permitiría asegurar un aporte adecuado de acetil-CoA para el metabolismo celular. Así mismo también se observa sobrerregulación redox-proteínas específicas como monoxigenasas y citocromos P-450, que probablemente proporcionen el nivel redox necesario para las reacciones tardía de la síntesis de astaxantina.

#### 1.3.4.1 Regulación por la luz

La carotenogénesis se ve afectada por la irradiación con luz blanca en muchos organismos como algas, hongos y bacterias, aunque la intensidad y la exposición depende de cada microorganismo; en el alga *H. pluvialis*, la producción de astaxantina se ve estimulada por intensidades luminosas altas (Kobayashi *et al.*, 1992). En *Xanthophyllomyces* se ha propuesto que la producción de astaxantina es fotoinducible: se ha visto que la concentración de astaxantina permanece constante en células crecidas en oscuridad, pero bajo iluminación intensa los niveles de astaxantina aumentan. Esta estimulación es transitoria, y cuando los cultivos se incuban de nuevo en oscuridad, se observa una reducción en el contenido total de carotenoides. La producción máxima de astaxantina se obtiene cuando los cultivos se iluminan continuamente a intensidades luminosas moderadas (Meyer y du Preez, 1994b). An y Johnson (An y Johnson, 1990) señalaron que la exposición a la luz estimula la producción total de carotenoides en *Xanthophyllomyces* (principalmente astaxantina), y que tiene un efecto negativo sobre el crecimiento. Se ha sugerido que las especies reactivas de oxígeno participan de forma activa en el aumento de la producción de carotenoides inducido por la luz en *X. dendrorhous* (Schroeder y Johnson, 1995b). Por ello, sería necesario realizar más estudios para resolver el papel de la luz en la regulación de la carotenogénesis en *X. dendrorhous*.

#### 1.3.4.2. Efecto de la temperatura

La temperatura es otro factor importante que afecta tanto al crecimiento como a la formación de metabolitos al provocar cambios en muchas de las rutas biosintéticas, incluyendo la ruta de los carotenoides. Estudios realizados con diferentes cepas silvestres de *X. dendrorhous* indican que la temperatura óptima para el crecimiento celular y la formación de pigmentos está entre 20 y 22°C (Johnson y Lewis, 1979; Meyer y du Preez, 1994b), al igual que ocurre en las cepas superproductoras de astaxantina estudiadas (Fang y Chiou, 1996). Se ha visto que las bajas temperaturas (4°C) provocan cambios en la composición y en la concentración (con un aumento del 50%) de carotenoides totales (Ducrey-Santopietro y Kula, 1998). Así mismo, una temperatura de 30° C hace que el patrón de carotenoides cambie de forma que los compuestos presentes son torularrodina (60%), toruleno (30%) y  $\beta$ -caroteno (5%), (Polulyakh *et al.*, 1992).

### 1.3.4.3. Efecto de la fuente de carbono

*X. dendrorhous* puede llevar a cabo dos tipos de metabolismo dependiendo del tipo de fuente de carbono presente en el medio de cultivo. La glucosa y otros azúcares fermentables son asimilados a través de la ruta glicolítica seguido de una fermentación alcohólica hasta la formación de etanol, incluso en presencia de oxígeno (Reynders *et al.*, 1997). Sin embargo, las fuentes de carbono no fermentables como el etanol o el succinato se transforman mediante oxidación en acetyl-CoA para incorporarse al ciclo del ácido cítrico.

Como sucede con algunos metabolitos secundarios el uso de concentraciones elevadas de glucosa como fuente de carbono suponen una mínima producción de pigmentos. Así mismo, la inducción de la carotenogénesis coincide con el agotamiento de azúcar y el comienzo del consumo de etanol. Esto se lleva a cabo a través de la regulación a nivel transcripcional (Marcoleta *et al.*, 2011), estando implicados los genes de biosíntesis *crtI*, *crtYB* y *crtS* probablemente relacionado con la presencia de sitios de unión para el regulador catabólico general MIG1 en los promotores de dichos genes.

Sin embargo, fuentes de carbono no fermentables como el etanol provocan un aumento en la síntesis de pigmentos en *X. dendrorhous* (Gu *et al.*, 1997; Johnson y Lewis, 1979; Marcoleta *et al.*, 2011; Vazquez *et al.*, 1997). Se han propuesto tres posibles explicaciones para este fenómeno: el etanol y su posterior conversión en acetato por la aldehído oxidasa genera radicales superóxido, que son los que inducen la síntesis de carotenoides. Alternativamente el acetato puede continuar la ruta metabólica para formar acetyl-CoA, siendo precursor en la síntesis de isoprenoides por la ruta del mevalonato. En tercer lugar se ha propuesto que el aumento en la biosíntesis de carotenoides por efecto del etanol se debe a una combinación de los mecanismos anteriormente propuestos junto a otros todavía no descritos.

### 1.3.4.4. Efecto de la fuente de nitrógeno

En *H. pluvialis*, la limitación de nitrógeno es un factor clave para el acúmulo de astaxantina (Kakizono *et al.*, 1992). Algo similar ocurre en *X. dendrorhous*, donde el nitrógeno afecta de forma significativa a la carotenogénesis. En diversos estudios se observó un incremento en la producción de carotenoides relacionado con un descenso en la concentración de nitrógeno en el medio (Meyer y du Preez, 1994b; Yamane *et al.*, 1997; Flores-Cotera *et al.*, 2001). El descenso en la concentración de nitrógeno provoca una reducción en la síntesis de proteínas, lo que hace que aumenten los niveles de carbono, ATP y NADPH en la célula. Para adecuar estos niveles al estado normal, se produce un aumento en la síntesis de ácidos grasos y carotenoides (Flores-Cotera *et al.*, 2001). Esto confirma el hecho de que mutantes de *X. dendrorhous* con el contenido en carotenoides incrementado presenten una reducción de la tasa de utilización de nitrógeno (An *et al.*, 1989), o que sean deficientes en la aminación de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos (An, 2001), y que fuentes de nitrógeno que se metabolizan lentamente hayan sido seleccionadas para la producción de astaxantina (Meyer *et al.*, 1993).

#### 1.3.4.5. Regulación por fosfato

Otro de los elementos que parece afectar a la carotenogénesis es el fosfato; un nutriente que regula muchos metabolitos secundarios (Martin, 2004). Se ha visto que bajas concentraciones de fosfato en el medio provocan un aumento en la producción de astaxantina en *Xanthophyllomyces*. Ello puede ser debido también a un descenso en la síntesis de proteínas, provocado por la escasez de fosfato para la síntesis de ARN. Otra explicación sería que la limitación de fosfato disminuyese la actividad de la cadena respiratoria, de forma similar a como lo hace la antimicina A, y que se ha visto que incrementa la producción de astaxantina en *X. dendrorhous*. O puede que las bajas concentraciones de fosfato incrementen la actividad de fosfatasa, como ocurre en otros microorganismos, y que son necesarias para la síntesis de carotenoides ya que sus precursores se encuentran fosforilados (Flores-Cotera *et al.*, 2001).

#### 1.3.4.6. Efecto de la aireación

Un factor importante para la biosíntesis de muchos metabolitos secundarios es la aireación del medio de cultivo. La carotenogénesis es un proceso aeróbico, de forma que el flujo de aire en el cultivo es un factor esencial para la asimilación del sustrato así como para el crecimiento y la producción. La disminución de la disponibilidad de oxígeno reduce la síntesis de astaxantina, y provoca el acúmulo de carotenos (Johnson y Lewis, 1979): esto indica que la oxigenación de los carotenos a través de la activación del oxígeno molecular es un factor limitante para la síntesis de astaxantina. Por analogía con otras rutas biosintéticas relacionadas (por ejemplo la biosíntesis de esteroides), la fuente de oxígeno activo y de enzimas implicadas en la oxigenación podría ser la cadena respiratoria mitocondrial y las proteínas de tipo hemo asociadas (por ejemplo las citocromo P-450 monooxigenasas) (Nelson y Strobel, 1987).

#### 1.3.4.7. Otros factores

La adición de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos al medio de cultivo reprime el acúmulo de carotenoides en *X. dendrorhous* (An, 2001). Una respiración y actividad del ciclo de los ácidos tricarbónicos elevadas están asociadas a la producción de grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno, que provocan un aumento en la producción de carotenoides (Schroeder y Johnson, 1993). Por otro lado, la adición de citrato al medio provoca un incremento de la concentración de carotenoides en las células, y de forma paralela se reduce la síntesis de proteínas, lo que sugiere que la restricción de la síntesis de proteínas juega un papel importante en la síntesis de carotenoides (Flores-Cotera *et al.*, 2001).

Ciertos inhibidores respiratorios, como la antimicina A, modulan fuertemente la síntesis de astaxantina. Al sembrar *X. dendrorhous* en medio de cultivo suplementado con antimicina A, se forman colonias de morfología inusual, caracterizadas por la presencia de una superficie inferior lisa no pigmentada, que desarrolla unas microcolonias hijas (*papillae*) muy pigmentadas después de uno o dos meses de incubación. El aislamiento y la purificación de esas microcolonias pone de manifiesto el desarrollo de cepas mutantes con un incremento del contenido en pigmentos de dos a cinco veces comparado con la cepa parental. Sorprendentemente, estas cepas superproductoras resultan ser más sensibles a antimicina A y

a otros inhibidores respiratorios en medio líquido, a pesar de haber sido aisladas como colonias resistentes en placas con antimicina A, aunque al crecer tras un mes de incubación la antimicina A probablemente se ha degradado. Estas cepas, además, utilizan ciertas fuentes de nitrógeno más lentamente, y mueren más rápidamente en presencia de peróxido de hidrógeno. La composición de carotenoides en esos mutantes es diferente a la de las cepas silvestres, con carotenoides muy oxigenados que no se observan normalmente en la cepa parental, lo que sugiere que en estas cepas se tiende a oxigenar y desaturar precursores del  $\beta$ -caroteno en una cantidad mayor que en la cepa parental. La fisiología de estas cepas llevó a plantear la hipótesis de que una alteración en el citocromo b, junto con un exceso de especies reactivas de oxígeno, estimulaba la producción de carotenoides en *X. dendrorhous* (An *et al.*, 1989).

Parece que los cambios inducidos por la antimicina A implican la alteración de un punto de control importante en la biosíntesis de astaxantina, y que se pueden aislar cepas susceptibles a ella por varios métodos independientes, sin requerimiento de usar antimicina A. No se conoce el mecanismo por el cual la selección con antimicina A provoca un aumento en la síntesis de astaxantina, pero parece que las reacciones asociadas con la cadena respiratoria, y posiblemente con enzimas de tipo citocromo P-450, son importantes para el control de su tasa de biosíntesis.

Otro factor a tener en cuenta son los ácidos grasos presentes en la célula. Se ha visto que existe una correlación negativa entre los niveles de astaxantina y la biosíntesis de ácidos grasos (Miao *et al.*, 2010). La supresión de la síntesis de ácidos grasos mediante el tratamiento con el inhibidor metabólico triclosán provoca un aumento en la producción de astaxantina. Así mismo mutantes producidos con nitrosoguanidina y Co-60 seleccionados por una mayor temperatura de crecimiento y una mayor producción de astaxantina, muestran un menor contenido en ácidos grasos. Una disminución en la presencia de ácidos grasos podría provocar la acumulación de acetil-CoA, que como precursor de astaxantina favorecería su síntesis.

### **1.3.5. El gen *crtS* y la biosíntesis de astaxantina**

En el año 2000, (Hoshino *et al.*, 2000) se describió la existencia en *X. dendrorhous* ATCC 96594 de un gen posiblemente implicado en la conversión de  $\beta$ -caroteno en astaxantina, al que denominaron *ast* (astaxantina sintasa). Posteriormente Álvarez y colaboradores clonaron y secuenciaron el gen de *X. dendrorhous* CECT 11028 equivalente al gen *ast* de *Xanthophyllomyces dendrorhous* ATCC 96594 (Álvarez *et al.*, 2006), y que se le denominó *crtS* para mantener la terminología general de los genes implicados en la biosíntesis de carotenoides (*crt*).

El análisis informático de la secuencia de este gen permitió identificar un marco de lectura abierta (ORF) de 3166 pb de longitud, correspondiente al gen *crtS*. La comparación de la secuencia de ADN genómico del gen *crtS* con la secuencia del ADNc del gen *ast* descrita por Hoshino y colaboradores (2000) puso de manifiesto que el gen constaba de 18 exones (en las posiciones 1-118, 201-249, 365-481, 554-645, 769-983, 1067-1100, 1190-1332, 1406-1465,

1548-1647, 1724-1820, 1898-2008, 2085-2118, 2209-2280, 2429-2516, 2580-2637, 2714-2787, 2865-2889 y 2980-3166) y que estaba interrumpido por 17 intrones (cuyos tamaños oscilan entre 64 y 149 pb distribuidos de forma homogénea a lo largo de todo el gen (Figura 1.6.). Este elevado número de intrones es típico de los genes de *X. dendrorhous*, incluidos aquellos implicados en la carotenogénesis (*crtI*: 11 intrones [Verdoes *et al.*, 1999b]; *crtYB*: 4 intrones [Verdoes *et al.*, 1999a]; *eph1*: 8 intrones [Visser *et al.*, 1999]; *gpd*: 6 intrones [Verdoes *et al.*, 1997]).

El estudio de la región promotora muestra la presencia de secuencias importantes para el inicio de la transcripción corriente arriba de la ORF (figura 1.10.):

- Regiones ricas en pirimidinas entre las posiciones -47 a -82 y -105 a -124 (en relación al codón ATG de inicio de la traducción situado en la posición 1905). Las regiones ricas en pirimidinas sugieren un posible sitio de inicio de la transcripción, ya que suelen presentarse inmediatamente corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción en genes con elevada expresión (Davis y Hynes, 1991).

- Una caja TATA-“like” (TTTAAAA se localizó en la posición -352 [semejante al consenso TATAAA]). Muchos de los genes de hongos poseen una caja TATA localizada entre 30 y 50 pb corriente arriba del punto de inicio de la transcripción (Davis y Hynes, 1991), lo que está de acuerdo con la supuesta caja TATA localizada 352 pb corriente arriba del punto de inicio de la traducción del gen *crtS*.

- Dos cajas CAAT potenciales en las posiciones -489 y -578. La caja CAAT está presente en la región promotora de alrededor del 30% de los genes eucariotas conocidos, y localizada entre las posiciones 50 y 200 corriente arriba del punto de inicio de la transcripción (Davis y Hynes, 1991).

- Cuatro motivos de unión a CreA ([G/C][C/T]GG[A/G]G) (Cubero y Scazzocchio, 1994) en las posiciones -475, -614, -754 y -853. La presencia en la región promotora del gen *crtS* de cuatro motivos consenso de unión a CreA, un regulador negativo que está implicado en el catabolismo del carbono (Cubero y Scazzocchio, 1994), indica una posible represión catabólica por carbono.

En la región 3' del gen se encontró la secuencia consenso AATAAA, implicada probablemente en la poliadenilación del ARNm, en la posición 434 corriente abajo del codón de fin de la traducción (TGA).

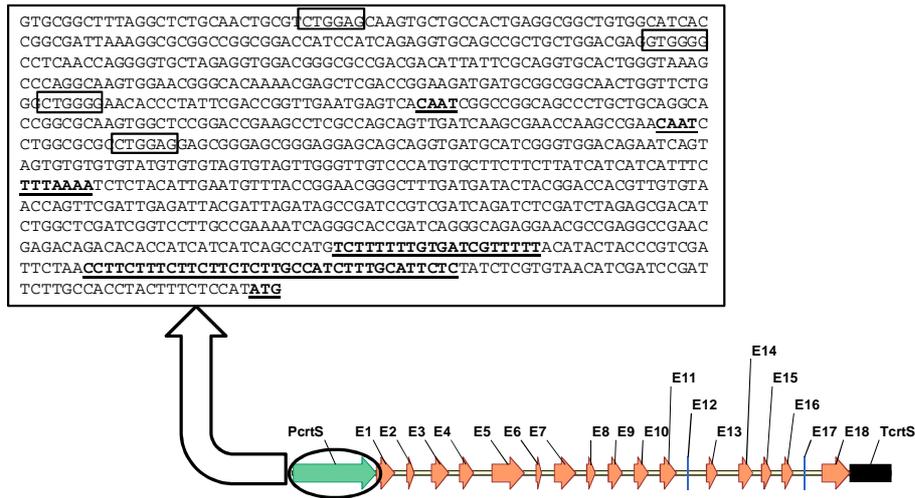


Figura 1.10. Representación esquemática del gen *crtS*. Los exones se representan como cajas nombradas desde E-1 hasta E-18. En la región promotora (*PcrTS*) aparecen subrayadas las regiones ricas en pirimidinas, la caja TATA y las cajas CAAT. Los motivos de unión a CreA se encuentran encuadrados. El terminador se nombra como *TcrTS*.

El polipéptido deducido a partir de la secuencia de nucleótidos del ADNc del gen *crtS* de *X. dendrorhous* CECT 11028 está formado por 557 aminoácidos, teniendo una masa molecular estimada de 62,63 KDa, y un pI de 5.75. La comparación de su secuencia de aminoácidos con las secuencias de las proteínas depositadas en las bases de datos (figura 1.11.) indica que la proteína CrtS es una citocromo P-450 monooxigenasa, perteneciente a la subfamilia 3A y que presenta semejanza con otras citocromo P-450 monooxigenasas descritas en hongos, plantas y animales.

Al comparar la secuencia de aminoácidos de la proteína CrtS con otras citocromo P-450 monooxigenasas, se observó la presencia de varias regiones conservadas; como es la región amino terminal de carácter hidrofóbico, que es característica de las proteínas citocromo P-450 unidas a membrana, y cuya función podría estar relacionada con el anclaje de la proteína a la membrana (Sakaguchi *et al.*, 1987). Los dominios característicos propios de esta familia de enzimas que esta comparación permitió identificar en la proteína CrtS son las siguientes (tabla 1.4. y figura 1.12.):

- Dominio de unión a oxígeno (<sup>339</sup>AGYETS<sup>344</sup>), que incluye los residuos invariables G340 y T343, comunes a todas las proteínas citocromo P-450 (Teutsch *et al.*, 1993). El dominio de unión a oxígeno está muy conservado en todas las citocromo P-450 monooxigenasas de eucariotas: el oxígeno se une al residuo Gly, obteniendo dos electrones de la oxidación del NAD(P)H a través de los residuos Glu o Asp existentes en el motivo (Teutsch *et al.*, 1993).

- Dominio hélice K (<sup>394</sup>ESLR<sup>397</sup>), que se encuentra en todas las proteínas citocromo P-450, y que participa en el mantenimiento de la estructura tridimensional de la proteína mediante la formación de puentes de hidrógeno con regiones próximas al grupo hemo (Yu y Strobel, 1997).

- Dominio de unión al grupo hemo (<sup>488</sup>FISGPRACFG<sup>497</sup>), que se cree que participa en el plegamiento del sitio de unión del grupo hemo (“*heme-binding pocket*”) (Poulos *et al.*, 1987). El dominio de unión al grupo hemo representa el centro catalítico de la enzima, siendo esencial el residuo Cys para la actividad catalítica: la modificación de la polaridad de los residuos de este motivo provoca pérdida de actividad sobre algunos sustratos (Shimizu *et al.*, 1988). El residuo Cys495 conservado proporciona el grupo tiol, que participa en la unión del átomo de hierro del grupo hemo (Shimizu *et al.*, 1988).

Especie	Dominio I	Dominio II	Dominio III
<i>X. dendrorhous</i>	<sup>339</sup> AGYETS <sup>344</sup>	<sup>394</sup> ESLR <sup>397</sup>	<sup>488</sup> FISGPRACFG <sup>497</sup>
<i>C. neoformans</i>	<sup>360</sup> AGNETS <sup>365</sup>	<sup>415</sup> EALR <sup>418</sup>	<sup>512</sup> FLGGARNICIG <sup>521</sup>
<i>A. fumigatus</i>	<sup>341</sup> AGHETT <sup>346</sup>	<sup>403</sup> EVFR <sup>406</sup>	<sup>481</sup> FLHGPRSCIG <sup>490</sup>
<i>A. gambiae</i>	<sup>301</sup> AGHETV <sup>306</sup>	<sup>357</sup> ETLR <sup>360</sup>	<sup>426</sup> FSTGVRSCIG <sup>435</sup>
<i>G. moniliformis</i>	<sup>352</sup> AGHETT <sup>357</sup>	<sup>420</sup> EVMR <sup>423</sup>	<sup>509</sup> FLHGPRSCIG <sup>518</sup>
<i>N. crassa</i>	<sup>340</sup> AGHETT <sup>345</sup>	<sup>402</sup> ETLR <sup>405</sup>	<sup>495</sup> FLHGPRSCIG <sup>504</sup>
<i>U. maydis</i>	<sup>431</sup> AGYETT <sup>436</sup>	<sup>490</sup> ESLR <sup>493</sup>	<sup>582</sup> FISGPRGCIG <sup>591</sup>
<i>X. laevis</i>	<sup>308</sup> AGYETT <sup>313</sup>	<sup>365</sup> ETLR <sup>368</sup>	<sup>438</sup> FGDGPRNCIG <sup>447</sup>
<i>O. aries</i>	<sup>305</sup> AGYETS <sup>310</sup>	<sup>362</sup> ETLR <sup>365</sup>	<sup>435</sup> FGTGPRNCIG <sup>446</sup>
<i>A. thaliana</i>	<sup>375</sup> AGHETT <sup>380</sup>	<sup>431</sup> ESLR <sup>434</sup>	<sup>507</sup> FGGGPRKCIG <sup>516</sup>
<i>H. sapiens</i>	<sup>304</sup> AGYETT <sup>309</sup>	<sup>361</sup> ETLR <sup>364</sup>	<sup>434</sup> FGSGPRNCIG <sup>443</sup>

Tabla 1.4. Alineamiento de los dominios conservados de la proteína CrtS de *X. dendrorhous* CECT 11028 con los de las citocromo P-450 hidroxilasas de *Cryptococcus neoformans* (AAW43969), *Aspergillus fumigatus* (EAL87523), *Anopheles gambiae* (EAA01070), *Giberella moniliformis* (AAN74818), *Neurospora crassa* (XP\_332111), *Ustilago maydis* (EAK85193), *Xenopus laevis* (AAH60496), *Ovis aries* (Q29496), *Arabidopsis thaliana* (AAL08302), *Homo sapiens* (AAA35747). Los residuos conservados en el sitio de unión al oxígeno (I), la hélice K (II), y el dominio de unión al grupo hemo (III), que son invariables en la mayoría de las enzimas citocromo P-450, se representan en **negrita**.

La secuencia de aminoácidos deducida de la proteína CrtS incluye, además, cuatro posibles motivos de N-glicosilación (NX[T/S]) (Marshall, 1972) en las posiciones 42, 86, 219 y 449 (figura 1.12.).

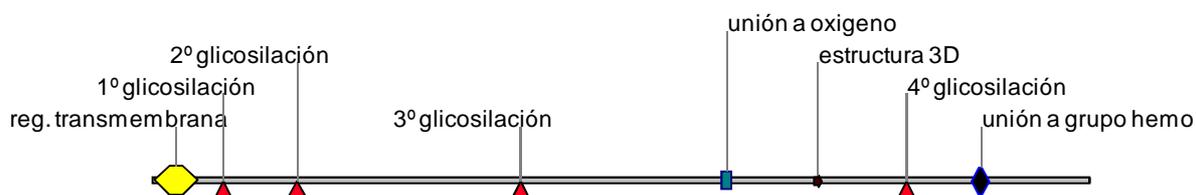


Figura 1.12. Representación esquemática unidimensional de la proteína CrtS, indicando las posiciones relativas de los distintos dominios detectados.

La cepa ATCC 96815 (cepa Yan-1, Schroeder y Johnson, 1995b) presenta bloqueada la síntesis de astaxantina por mutaciones en el gen *crtS*, que provocan un cambio del marco de lectura (Álvarez *et al.*, 2006). Al complementar esta cepa con el gen *crtS* de la cepa CECT 11028, se observó que se restaura la producción de astaxantina; acumulándose también otros intermediarios como la criptoxantina, la zeaxantina y HDCO (Álvarez *et al.*, 2006; Ojima *et al.*, 2006). La producción de pequeñas cantidades de zeaxantina (derivado dihidroxilado)

sugiere que la enzima CrtS lleva a cabo la hidroxilación en ambos anillos  $\beta$ -iona. La falta de cantaxantina (derivado dicetolado) en un principio sugiere que la proteína CrtS carece de actividad cetolasa. A pesar de esto, Ojima y colaboradores () propusieron que la proteína CrtS es una enzima bifuncional capaz de realizar las dos actividades enzimáticas. La presencia de dos actividades enzimáticas en una única proteína o en proteínas separadas sigue aun sin ser resuelta (Martin *et al.*, 2008).

Esta enzima es capaz de actuar sobre el colorante fenoxazona, dando lugar a una reacción de fluorescencia que tiene como producto la resofurina. Este fenómeno se puede emplear para la localización de la actividad de la proteína CrtS dentro de la célula, vía microscopio de fluorescencia. Dicha reacción nos muestra que la enzima CrtS se encuentra localizada en los glóbulos lipídicos, al que igual que la astaxantina y demás carotenoides (Echavarri-Erasun, 2003).

### **1.3.6. El gen *crtR***

Recientemente se ha encontrado un nuevo gen que parece estar involucrado en la formación de astaxantina a partir de  $\beta$ -caroteno (Alcaíno *et al.*, 2008). Se trata del gen *crtR*, que codifica para una citocromo P-450 reductasa. Esta proteína CrtR aprovisionaría a la proteína CrtS de los electrones necesarios para llevar a cabo la reducción de un átomo de oxígeno durante la oxigenación del  $\beta$ -caroteno.

Este gen presenta 3 exones que dan lugar a una proteína de 746 aminoácidos y un peso molecular predicho de 81,9 kDa (figura 1.13.). La proteína tiene 22 aminoácidos hidrofóbicos en su región amino terminal, un segmento transmembrana típico de las citocromo P-450 reductasas conocidas que ancla la proteína a la membrana del retículo endoplásmico en la célula. CrtR también presenta dominios conservados propios de este tipo de proteínas, como los siguientes:

- Dominio de unión a FMN: comprende los aminoácidos 71 y 213.
- Dominio de unión a FAD: entre los aminoácidos 275 y 512.
- Dominio de unión a NAD(P)H: localizado entre los aminoácidos 582 y 709.
- Dos posibles regiones de unión a citocromos P-450 (P450-1 y P450-2): estas regiones presentes en CrtR se caracterizan por la presencia de aminoácidos ácidos (ácido aspártico en la posición: 112, 117, 122, 127, 210, 211, 218, ácido glutámico en las posiciones: 114, 115, 119, 126, 216, 217).

Los residuos de ácido aspártico en la posición 210, 211 y 218 están extremadamente conservados en todas las citocromo P-450 reductasas conocidas. Las regiones de unión a citocromos P-450 se encuentran en el dominio de unión a FMN. Esto concuerda con el flujo

de electrones desde el NAD(P)H a la FAD a FMN y finalmente a la enzima citocromo P450 monooxigenasa.

Cuando se produjo la delección del gen, el patrón de producción de carotenoides cambió completamente. *Xanthophyllomyces* inactivado en *crtR* es incapaz de formar astaxantina, acumulando  $\beta$ -caroteno y un poco de equinona. Al estudiar la relación entre los genes *crtS* y *crR* a nivel de ARN se vio que mientras la expresión del *crtS* alcanza su máximo a las 66 horas, *crtR* se mantiene constante a lo largo de toda la curva de crecimiento. Así, a pesar del hecho de que ambas proteínas están implicadas en la misma etapa de la biosíntesis de astaxantina, parece que no hay ninguna relación, a nivel de ARNm, en su expresión génica. Por ello se puede decir que los dos genes no están regulados de la misma manera en el nivel de la transcripción.

Así mismo, cuando se introduce los genes de la ruta de biosíntesis de astaxantina en *Saccharomyces cerevisiae* (*crtI*, que codifica para una fitoeno desaturasa; *crtYB*, que da lugar a una enzima bifuncional con actividades fitoeno sintasa y licopeno ciclasa; *crtS*, que origina una citocromo P-450 monooxigenada implicada en la conversión de  $\beta$ -caroteno en astaxantina) sin la participación de *crtR* (Ukibe *et al.*, 2009), se produce un acúmulo de  $\beta$ -caroteno sin llegarse a formar astaxantina. Sin embargo, si se produce la co-expresión de estos genes junto a *crtR* sí que se llega a formar astaxantina. Esto pudiera ser debido a que los sistemas de citocromos P-450 presentan dos o tres componentes estrechamente ligados, siendo necesaria la presencia de la reductasa para que se produzca la reacción.

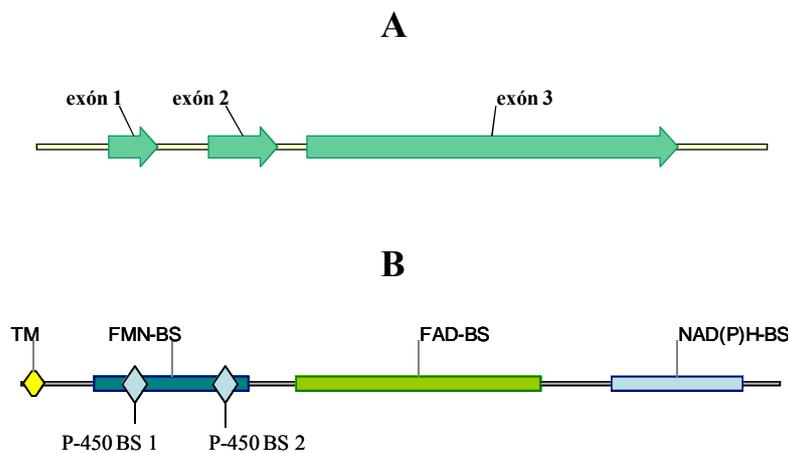


Figura 1.13. Representación esquemática del gen *crtR* y la proteína para la que codifica. **A:** esquema de la distribución y tamaño relativo de los exones presentes en el gen *crtR*. **B:** representación lineal de la proteína CrtR en la que se representa la distribución relativa de los dominios detectados: TM  $\rightarrow$  región transmembrana; P-450 BS1/2  $\rightarrow$  sitios de unión a citocromo P-450; FMN-BS  $\rightarrow$  sitio de unión a FMN; FAD-BS  $\rightarrow$  sitio de unión a FAD; NAD(P)H-BS  $\rightarrow$  sitio de unión a NAD(P)H.

### 1.4. BIOTECNOLOGÍA EN *Xanthophyllomyces dendrorhous*

Las mayores limitaciones para utilizar las cepas silvestres de *X. dendrorhous* como fuente comercial de astaxantina son los bajos niveles de astaxantina encontrados, así como el grosor y la rigidez de su pared celular, lo que dificulta su extracción (Johnson y Lewis, 1979; Johnson y An, 1991; Johnson y Schroeder, 1995; Johnson, 2003). El contenido en astaxantina de las cepas silvestres varía entre 200 y 400 µg de astaxantina por gramo de peso seco (Johnson y Lewis, 1979; Johnson y Schroeder, 1995). Estos niveles tienen que incrementarse entre 10 y 50 veces para ser competitivos con la astaxantina procedente de síntesis química (Johnson y Schroeder, 1995). Por lo tanto, la biotecnología tiene un papel esencial para aumentar sus niveles y reducir el elevado coste de producción, que limita el uso de *X. dendrorhous* como fuente natural de astaxantina.

Existen distintas aproximaciones para mejorar la producción como pueden ser:

- Optimización de los medios de cultivo y de los parámetros físicos y químicos de la fermentación.
- Obtención de cepas mejoradas mediante técnicas tradicionales.
- Mejora en la extracción de la astaxantina.
- Utilización de técnicas de ADN recombinante.

#### **1.4.1. Adición al medio de precursores y compuestos que estimulan la producción**

Se ha visto que diferentes compuestos añadidos al medio de cultivo incrementan la producción de carotenoides en *X. dendrorhous*. Entre estos compuestos está la valina (Meyer *et al.*, 1993), el extracto de levadura (Fang y Cheng, 1993), el ácido acético (Meyer y du Preez, 1993), el ácido mevalónico (Calo *et al.*, 1995) y el etanol (Gu *et al.*, 1997). También precursores de la síntesis de astaxantina, como el licopeno, añadidos al medio de cultivo estimulan la producción de astaxantina.

El uso de algunos de estos compuestos, como el mevalonato (precursor de los isoprenoides), incrementa significativamente la producción de astaxantina (hasta cuatro veces), pero es demasiado caro para utilizarlo en fermentaciones a gran escala (Calo *et al.*, 1995). Sin embargo, otros compuestos como el etanol, constituyen una forma simple y económica de incrementar la producción de astaxantina en procesos industriales (Gu *et al.*, 1997).

En el estudio realizado por Gu y colaboradores (1997) se vio que la adición de una concentración de etanol del 0.2% al medio de cultivo provocaba un incremento en la síntesis de carotenoides en mutantes de *X. dendrorhous* con el metabolismo respiratorio alterado, y

que no afectaba de forma apreciable al crecimiento de la levadura. Este efecto se puede explicar de varias formas:

- Por un lado el etanol provoca un incremento en la formación de especies reactivas de oxígeno, que ya se ha visto que estimulan la síntesis de astaxantina en *Xanthophyllomyces* (Schroeder y Johnson, 1995b). Algunas de las reacciones de eliminación del etanol generan acetato, que incrementa la producción de carotenoides en *X. dendrorhous* (Meyer y du Preez, 1993).
- El etanol incrementa la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa, que es clave en la biosíntesis de isoprenoides, y cuya sobreexpresión provoca un aumento en la producción de carotenoides (Gu *et al.*, 1997).

El uso de compuestos estimulantes procedentes de hongos se ha convertido en una estrategia importante para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos celulares, entre ellos astaxantina y otros carotenoides de importancia económica, como  $\beta$ -caroteno, licopeno, cantaxantina, zeaxantina y luteína. En el caso de *X. dendrorhous*, se ha visto que varios metabolitos fúngicos provocan un incremento en el crecimiento y en la producción de carotenoides totales y de astaxantina. Sin embargo se desconoce cuál es el mecanismo por el que actúan, aunque en algunos de los casos podría ser que estos metabolitos fúngicos fuesen precursores de la síntesis de astaxantina. El uso de estos compuestos supone una nueva forma de incrementar la producción de carotenoides utilizando esta levadura en procesos industriales (Wang *et al.*, 2005).

### **1.4.2. Optimización de las condiciones de fermentación**

La composición del medio de cultivo, entre otros factores ambientales, afecta a la producción de astaxantina en *X. dendrorhous*. El perfil de carotenoides producidos depende de la cepa, de la fuente de carbono utilizada y de las condiciones de cultivo, por lo que es necesario realizar una optimización específica para cada cepa que va a ser utilizada de forma industrial (Vázquez *et al.*, 1997; Palágyi *et al.*, 2001). Aunque para la producción de astaxantina a gran escala es necesario obtener la máxima producción posible de biomasa, este incremento en la producción de biomasa está acompañado, normalmente, por un descenso en la producción de carotenoides (An *et al.*, 1989; 1999). Por lo tanto, es necesario encontrar medios de cultivo y condiciones de fermentación que incrementen la producción de biomasa sin que descienda la producción de carotenoides.

La carotenogénesis en las cepas silvestres de *X. dendrorhous* ocurre una vez que la glucosa del medio se ha agotado, por lo que concentraciones elevadas de glucosa provocan un descenso en la síntesis de carotenoides y llevan al acúmulo de carotenos (Johnson y Lewis, 1979). La glucosa proporciona altas tasas de crecimiento, pero una producción de astaxantina moderada (Johnson y Lewis, 1979). Por lo tanto, la disponibilidad de fuentes de carbono no represoras además de la del nitrógeno son importantes para la regulación de la carotenogénesis (An, 2001).

El oxígeno disuelto es el principal factor para el crecimiento y la carotenogénesis (An *et al.*, 1996): la limitación de la disponibilidad de oxígeno reduce drásticamente la producción de astaxantina (Yamane *et al.*, 1997). *X. dendrorhous* es un organismo aeróbico, cuyo crecimiento depende del aporte de oxígeno al cultivo. La tasa de producción de astaxantina en cultivos en medio líquido aumenta al incrementarse la captación de oxígeno. Por ello debe tenerse en cuenta que la tasa de transferencia de oxígeno del espacio libre del matraz a las células es directamente proporcional a la velocidad de agitación e inversamente proporcional al volumen de líquido del matraz (Yamane *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2006).

La adición al medio de cultivo de aminoácidos derivados del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT), como son ácido aspártico, asparragina, glutamato, glutamina y prolina provoca un incremento de la biomasa generada, pero desciende la producción de carotenoides en relación a los resultados obtenidos al utilizar sulfato amónico como fuente de nitrógeno. Por otra parte, los intermediarios del CAT (succinato,  $\alpha$ -cetoglutarato, fumarato, malato y citrato) promueven el crecimiento, pero no reducen el contenido en carotenoides. El hecho de que el aporte de aminoácidos derivados de los intermediarios del CAT provoque un incremento en el crecimiento y un descenso en la producción de carotenoides se explica porque la transferencia de nitrógeno requiere energía, y este proceso induce la formación de especies reactivas de oxígeno. Por lo tanto, el aporte de aminoácidos derivados de los intermediarios del CAT provoca un descenso en la producción de especies reactivas de oxígeno debido a un descenso de la actividad del CAT, lo que puede reducir la producción de carotenoides (An, 2001).

Los resultados de todos estos estudios resultan útiles para el cultivo a gran escala de *X. dendrorhous*; complementándose con los estudios realizados sobre el uso a nivel industrial de medios de cultivo de bajo coste, como pueden ser los elaborados a base de melazas (Haard, 1988), extracto líquido de maceración de maíz (Kesava *et al.*, 1998) y subproductos de la trituración húmeda del maíz (Hayman *et al.*, 1995). Estos medios pueden ser utilizados junto con otros que son ricos en ácidos orgánicos del CAT, como zumo de uva (Meyer y du Preez, 1994a), para incrementar la producción de biomasa sin que se produzca pérdida en la producción de carotenoides (An, 2001).

El sistema tradicional de producción en “batch” tiene el inconveniente de inducir el efecto Crabtree (caracterizado por la síntesis de etanol y ácidos orgánicos como productos de la fermentación), debido a las altas concentraciones de azúcares inicial, la disminución de pigmento y el rendimiento de la biomasa. Por encima de 12 g/l de concentración de carbono, la producción de carotenoides por *X. dendrorhous* comienza a disminuir y se observa el efecto Crabtree (Reynders *et al.*, 1997). La estrategia para resolver este problema es el cultivo en “fed-batch”. A concentraciones de 27 y 55 g/l de glucosa, existe una buena relación entre la formación de biomasa observada y la predicha por el modelo de balance de masa. Con 125 g/l de glucosa, la formación de biomasa es menor de lo previsto, apareciendo acumulados en el medio de cultivo productos de fermentación como el etanol y ácido acético.

### 1.4.3. Uso de medios de cultivo de bajo coste

Aunque *X. dendrorhous* tiene un gran valor comercial como fuente de carotenoides naturales, el elevado coste de producción limita su uso. Una forma de reducir este coste es utilizando sustratos más baratos. Esta levadura puede crecer en una gran variedad de fuentes de carbono, que incluyen monosacáridos y disacáridos, como glucosa, maltosa, sacarosa, celobiosa, xilosa, arabinosa y lactosa (Johnson y An, 1991; Fang y Cheng, 1993). Además, se han realizado estudios sobre el uso de medios de cultivo elaborados a base de subproductos de bajo coste y residuos de origen agro-industrial para la producción de astaxantina en *Xanthophyllomyces*, como residuos de alfalfa (Okagbue y Lewis, 1984), melazas de caña de azúcar (Haard, 1988; Fontana *et al.*, 1996), hidrolizados de turba (Martin *et al.*, 1993; Vázquez y Martin, 1998), zumo de uva (Meyer y du Preez, 1994a), subproductos de la maceración húmeda del maíz (Hayman *et al.*, 1995), jugo de caña de azúcar (Florêncio *et al.*, 1998), hidrolizados hemicelulósicos de eucalipto (Parajó *et al.*, 1998b), hidrolizados de *Yucca fillifera* (Ramírez *et al.*, 2000), leche de coco (Domínguez-Bocanegra y Torres-Muñoz, 2004) o residuos de mostaza (Tinoi *et al.*, 2006). En general, el uso de estos medios de cultivo de bajo coste provoca un incremento significativo del crecimiento y de la síntesis de astaxantina (1.1-3.8 veces; tabla 1.5.) comparado con los resultados obtenidos en un medio estándar (Tinoi *et al.*, 2006).

Sustrato	Suplemento	Cepa	Producción (µg/g de peso seco)
Melazas de caña	Peptona	UCD 67-210	1182
Hidrolizados de turba	Peptona	NCHU-FS301*	1567
Jugo de uvas	Peptona y YE	N9*	1240
Subproductos de la maceración húmeda del maíz	-----	NRRL Y-17270	400
Hidrolizados de eucalipto	Peptona	NRRL Y-17268	448
Xilosa	Peptona, YE y ME	NRRL Y-17268	571
Jugo de <i>Yucca</i>	-----	25-2*	1203
Jugo de piña	-----	GM807*	493,84
Residuos de mostaza	-----	TISTR 5730	1312
Melaza	Peptona	UCD 67-210	1182
Leche de coco	-----	NRRL -10921	850
		R1*	1850

Tabla 1.5. Tabla en la que se presenta distintos sustratos en los que se ha crecido distintas cepas de *X. dendrorhous*, indicando la producción de astaxantina. Con un asterisco (\*) se indican las cepas mutantes. Al analizar la tabla hay que tener en cuenta que cada cepa es distinta, y que el perfil de carotenoides obtenidos difiere entre distintas cepas y las distintas fuentes de carbono presentes en el medio. YE: extracto de levadura; ME: extracto de malta.

Vázquez y colaboradores (1997) estudiaron la concentración y el perfil de carotenoides producidos por diferentes cepas de *X. dendrorhous* crecidas en medios de cultivo cuyas fuentes de carbono eran azúcares como sacarosa (que puede ser extraída de la remolacha o de

la caña de azúcar), glucosa (que se puede obtener de la hidrólisis del almidón o de sustratos celulósicos) o xilosa (que se obtiene mediante hidrólisis ácida suave de la fracción hemicelulósica de algunos materiales lignocelulósicos, como maderas duras, mazorcas de maíz o bagazo). La comparación de las fuentes de carbono utilizadas muestra que la glucosa da origen a una menor concentración de pigmentos, mientras que los mejores resultados en concentración de carotenoides, proporción de astaxantina y productividad de carotenoides se alcanzaron en medio con xilosa. El hecho de que la glucosa permita una alta tasa de crecimiento, pero sólo una producción moderada de carotenoides, concuerda con los resultados obtenidos por Johnson y Lewis (Johnson y Lewis, 1979) y Meyer y du Preez (Meyer y du Preez, 1994b).

El perfil de carotenoides producidos en las cepas silvestres de *X. dendrorhous* depende de la cepa y de la fuente de carbono utilizada. Teniendo en cuenta la concentración total de pigmentos y el perfil de carotenoides, de las fuentes de carbono analizadas en este estudio la xilosa resultó ser la que producía las mayores concentraciones volumétricas de astaxantina (Vázquez *et al.*, 1997).

- Jugo de piña (Jirasripongpun *et al.*, 2008): entre los residuos agrícolas e industriales de Tailandia (como por ejemplo las melazas, suero de leche y piña), la piña es una atractiva fuente para la producción de carotenoides por contener fuentes de carbono utilizables y un pH ácido. Tailandia es el primer productor mundial de piña. Este zumo contiene sacarosa, glucosa y fructosa, con un pH de 4 que le hace adecuado para el crecimiento de *X. dendrorhous*. También incluye pequeñas cantidades de minerales (Ca, Na, K, Fe, Mg, P), proteínas, vitaminas (A, B, C, E, K), niacina y folato. Además se ha visto que tiene  $\beta$ -caroteno, que podría ser utilizado como precursor de la astaxantina. De esta forma, el zumo de piña sería un medio de crecimiento satisfactorio y barato que no necesitaría ningún suplemento. Una gran cantidad de azúcares reducidos en el medio hace que el peso seco de la levadura aumente. Sin embargo, debido al efecto inhibitorio sobre la producción de carotenoides que tienen los azúcares (Johnson y Lewis, 1979), la concentración óptima de zumo de piña en el medio de cultivo es del 10%, pasando de una producción de 297,93  $\mu\text{g}$  astaxantina/g levadura seca en medio YM a 493,84  $\mu\text{g}$ /g con zumo de piña.

- Jugo de *Yucca fillifera* (Ramírez *et al.*, 2000): existe una extensa región en México que comprende los estados de San Luis Potosí, Coahuila, Zacatecas y Nuevo León que se caracteriza por presentar un clima semiárido con una vegetación dominante compuesta entre otras especies por la palma china, *Yucca fillifera*. En comparación con otras variedades comerciales de dátiles, el fruto de la palma china contiene poca pulpa y un elevado contenido en semillas lo que lo hace comercialmente poco atractivo. Se ha comprobado que el jugo de *Yucca* junto a una fuente apropiada de nitrógeno, como la urea, representa un excelente medio de cultivo para la producción de astaxantina con una producción de 1203  $\mu\text{g}$  astaxantina/g levadura seca.

- Leche de coco en bruto (Domínguez-Bocanegra y Torres-Muñoz, 2004): la pulpa de coco es ampliamente utilizada en la industria mexicana para la producción de champús, caramelos, comida, etc. Sin embargo, la leche de coco a pesar de tener una composición

rica en nutrientes (tabla 1.5.) es un producto residual que es desechado. Si comparamos este medio con el medio estándar que se suele utilizar para el crecimiento de *X. dendrorhous* en laboratorio (YM), una cepa silvestre como la NRRL-1092 pasa de producir 450 µg astaxantina/g levadura seca a 850 µg astaxantina/g levadura seca.

- Hidrolizados hemicelulósicos de madera de eucalipto (Parajó *et al.*, 1997b): los materiales lignocelulósicos son baratos, renovables y fácilmente disponibles para la producción de soluciones azucaradas; como son los polisacáridos de la madera (incluyendo la celulosa y hemicelulosa). Estos pueden ser hidrolizados con ácidos o enzimáticamente a los correspondientes monosacáridos de forma que permitan ser utilizados como medio para la fermentación. En el caso de la hidrólisis ácida de la madera de eucalipto, se produce una hidrólisis selectiva de la fracción hemicelulósica, liberando una solución de azúcares en la que la xilosa es el principal componente. Otros azúcares (como la glucosa, arabinosa y disacáridos), ácido acético (derivado de los grupos acetilos de la madera), furfural (generados por la deshidratación de pentosas) y compuestos fenólicos también se encuentran en el medio. A pesar de que *X. dendrorhous* es capaz de utilizar xilosa, para poder usar los hidrolizados hemicelulósicos es necesario añadirle 3 g/l de peptona, lo que encarece el proceso.

- Residuos de mostaza (Tinoi *et al.*, 2006): los residuos de mostaza se forman después de la producción de isotiocianato de alilo (aceite de mostaza, ITA) de la semilla de mostaza (*Brassica juncea* var. Forge) El ITA se utiliza en fumigantes, ungüentos y cataplasmas de mostaza así como agente saborizante. De 10 toneladas de semillas se producen 70 toneladas de suspensión de residuos. Comparando la producción de astaxantina en un medio elaborado a base de desechos de mostaza hidrolizados y precipitados (MPH) y un medio estándar (YM), se puede ver que en el primero la producción (25,8 mg/l) es once veces mayor que en el segundo (2,34 mg/l). Por lo tanto, el medio MPH podría ser un medio efectivo para la producción comercial de astaxantina con bajo coste, ya que no necesita suplementos, y los desechos de mostaza están disponibles durante la producción de alil isotiocianato. Además, su utilización reduce el impacto ambiental generado por su eliminación.

- Melazas (Haard, 1988; An *et al.*, 2001): la melaza es un líquido más o menos viscoso de color pardo oscuro y sabor muy dulce que queda como residuo de la fabricación del azúcar de caña o de remolacha. Cuando se crece *Xanthophyllomyces* en un medio con un 7-10% de melaza se forma de 2 a 3 veces más astaxantina que lo descrito anteriormente. El rendimiento de astaxantina con un 10% de melaza como sustrato de fermentación fue de 15,3 mg/ml, aproximadamente 3 veces más que con glucosa.

- Jugo de caña de azúcar (Fontana *et al.*, 1996): en Brasil se le considera una fuente de carbono barata, debido a su elevada producción (572,6 millones de toneladas en el año 2008) Se emplea para el consumo y la producción de etanol. De hecho se vende a 13 \$ por tonelada, y su contenido en sacarosa está en torno al 15%. Utilizando un medio simple con

el jugo de la caña de azúcar diluida, urea y fosfato sódico se ha mejorado el rendimiento de producción hasta llegar a obtener más de 1300 µg /g levadura seca.

- Residuos de maíz (Hayman *et al.*, 1995; Kesava *et al.*, 1998; Leathers, 2003; Nghiem *et al.*, 2009): los residuos agrícolas son atractivos por su disponibilidad, bajo valor y una composición rica en lignocelulosas. Entre ellos la fibra de maíz es un subproducto del proceso de molienda húmeda. Los hidrolizados de maíz diluidos son una gran fuente para la producción, favorecido por la adicción de urea y fosfato potásico al medio.

- Hidrolizados de turba (Martin *et al.*, 1993): la turba es un material orgánico compacto, de color pardo por lo general oscuro de aspecto terroso y rico en carbono. Está formado por una masa esponjosa y ligera en la que aún se aprecian los componentes vegetales que la originaron, y que se usa como combustible o en jardinería para mejorar la retención de agua. La hidrólisis se realiza utilizando un tratamiento con altas presiones y 185°C. Estos hidrolizados junto a la adicción de peptonas permiten una producción de 1279 µg/g levadura seca, comparable con otros resultados.

- Jugo residual de alfalfa (Okagbue *et al.*, 1984): la alfalfa es una leguminosa importante por su contenido de triptófano y clorofila. Presenta un alto rendimiento agrícola y se utiliza principalmente para el forraje. Al elaborarse el concentrado proteico de las hojas, se produce como subproducto el jugo residual. Este jugo de alfalfa permite un buen crecimiento de *Xanthophyllomyces*, sin embargo la formación de astaxantina se ve inhibida. Los suplementos nutricionales no revierten la inhibición, por lo que es probable que contenga algún inhibidor de la biosíntesis de astaxantina. Así, a pesar de que no sirve para la producción de pigmentos se podría utilizar en el caso de querer utilizar la biomasa de la levadura como fuente de proteínas.

### **1.4.4. Obtención de cepas mejoradas**

Otra estrategia dirigida a reducir los costes de producción es la obtención de cepas superproductoras de astaxantina. Se han descrito protocolos eficientes para el aislamiento de diferentes tipos de mutantes de *X. dendrorhous* (Palágyi *et al.*, 1995). Una forma relativamente sencilla de obtener cepas mutantes es mediante mutagénesis al azar y selección por color. Para ello se han usado agentes físicos (luz ultravioleta, radiación  $\gamma$ ) y químicos (etil-metano sulfonato [EMS], 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina [NTG] o antimicina A).

Sin embargo, uno de los inconvenientes de la mutagénesis al azar es la introducción de mutaciones secundarias, que pueden afectar a la fisiología, la viabilidad o la capacidad metabólica de la célula. Además, mediante este método no ha sido posible aislar mutantes bloqueados en todos los pasos de la ruta de síntesis de astaxantina (licopeno, derivados oxigenados del  $\beta$ -caroteno) (Visser *et al.*, 2003). El principal problema de este procedimiento es la inestabilidad genética de los mutantes obtenidos. Así, los mutantes obtenidos por tratamiento con EMS revierten con gran frecuencia (An *et al.*, 1989). A pesar de ello se han logrado obtener mutantes estables con niveles de producción de astaxantina incrementados.

Sin embargo, muchos de estos mutantes estables presentan fuertes reducciones en la tasa de crecimiento o en la producción de biomasa, o acumulan elevados niveles de carotenoides intermediarios o derivados que no resultan interesantes (An *et al.*, 1989).

También se han obtenido cepas de *X. dendrorhous* con la producción de carotenoides incrementada mediante la técnica de fusión de protoplastos (Chun *et al.*, 1992). En algunos casos no existen datos sobre el crecimiento de las cepas, por lo que no se puede realizar una comparación de la producción total de astaxantina entre ellas.

La selección de mutantes superproductores de astaxantina en medio sólido es complicada puesto la producción de carotenoides oxigenados se ve inhibida debido a los bajos niveles de oxígeno (Johnson y Lewis, 1979). Estas condiciones suponen un problema para detectar cepas superproductoras, sobre todo si hay que analizar un gran número de colonias, por lo que se han desarrollado diferentes procedimientos de selección.

Algunos de estos métodos son de selección positiva, como el uso de inhibidores de la carotenogénesis ( $\beta$ -ionona, difenilamina) (Lewis *et al.*, 1990; Chumpolkulwong *et al.*, 1997). En este caso los mutantes superproductores de carotenoides muestran resistencia a estos compuestos, mientras que en los no superproductores la biosíntesis de carotenoides es inhibida. Otros procedimientos usan un sistema de selección negativa, como la mayor sensibilidad de las cepas superproductoras de carotenoides a antimicina A (un inhibidor respiratorio) en relación a los no superproductores (An *et al.*, 1989). Otros métodos usados para la selección de mutantes superproductores son selección con especies reactivas de oxígeno (Schroeder *et al.*, 1996), tratamiento con etanol (Gu *et al.*, 1997), citometría de flujo y selección celular (An *et al.*, 1991), o el uso de análogos de glucosa (como la 2-desoxiglucosa) con el fin de aislar cepas en las que la síntesis de carotenoides no se encuentre reprimida por glucosa (An *et al.*, 1988).

Puesto que las técnicas de mutagénesis al azar tienen limitaciones considerables a la hora de obtener mutantes superproductores, otras opciones son el estudio de las funciones de la astaxantina en la levadura, con el fin de desarrollar sistemas de selección positiva para la obtención de cepas que produzcan más pigmentos (Schroeder *et al.*, 1996), o aislar los genes responsables de la síntesis de astaxantina y desarrollar herramientas como la transformación para apoyar el aislamiento de mutantes (Visser *et al.*, 2003).

### **1.4.5. Uso de la tecnología del ADN recombinante en *X. dendrorhous***

En general, el aumento en la producción de astaxantina que se consigue con los métodos descritos hasta ahora no es suficiente para hacerlos comercialmente rentables. Más recientemente, el aumento del conocimiento de la biología molecular de *X. dendrorhous* y de los genes y enzimas implicados en la biosíntesis de astaxantina y su regulación (Verdoes *et al.*, 1999a; 1999b; Visser *et al.*, 2003; Lodato *et al.*, 2004; Álvarez *et al.*, 2006; Ojima *et al.*, 2006; Alcaíno *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2008) debería tener gran impacto en el desarrollo de cepas con mayor producción y en procesos de producción industrial.

Esta estrategia puede ser útil para aumentar el flujo metabólico hacia la ruta de biosíntesis, como puede ser la sobreexpresión de la enzima limitante, aumento en precursores o la modificación en la regulación. Sin embargo, esto requiere el desarrollo de sistemas de transformación eficientes para esta levadura (Adrio y Veiga, 1995; Rubinstein *et al.*, 1996; Wery *et al.*, 1997; 1998; Martínez *et al.*, 1998), así como el aislamiento de todos los genes implicados en la biosíntesis de astaxantina.

Por ello, se ha estado desarrollado y optimizado sistemas de transformación para *Xanthophyllomyces* usando los promotores de los genes de la actina y de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gpd*) de la propia levadura, para expresar el gen de resistencia a kanamicina del transposón Tn5, que le confiere resistencia a geneticina (G418). También se ha estudiado el empleo del promotor de la glutamato deshidrogenasa NADP-dependiente (*gdhA*) propio de *Xanthophyllomyces*, acoplándolo al gen de resistencia a higromicina (*hph*), para su uso en el control de la expresión en basidiomicetos (Rodríguez-Sáiz *et al.*, 2009). En condiciones óptimas, la eficacia de transformación obtenida fue de  $1 \times 10^3$  transformantes por  $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico (Wery *et al.*, 1998). La combinación de sobreexpresión y delección de los genes específicos de la biosíntesis de carotenoides puede permitir modificar el contenido en carotenoides y dirigir la síntesis hacia la producción de un carotenoide concreto en mayor cantidad (Verdoes *et al.*, 2003).

De este modo, el flujo en la ruta de biosíntesis de astaxantina puede ser manipulado modificando las cantidades y actividades de las enzimas carotenogénicas. Por lo tanto, sería importante, a fin de optimizar la producción de astaxantina, sobreexpresar los diferentes genes que participan en la carotenogénesis en la misma medida, de manera que no se alteren las proporciones entre las diferentes enzimas (Verdoes *et al.*, 2003). Se han desarrollado cepas de *X. dendrorhous* productoras de zeaxantina y  $\beta$ -criptoxantina (y que no producen astaxantina), partiendo de una cepa productora de  $\beta$ -caroteno (*X. dendrorhous* ATCC 96815) mediante la expresión de un gen que codifica una  $\beta$ -caroteno hidroxilasa bacteriana (*crtZ*), (Hoshino *et al.*, 2004).

### **1.4.6. Extracción de la astaxantina**

La acumulación de astaxantina en *Xanthophyllomyces* tiene lugar intracelularmente por lo que el grosor y la rigidez de la pared celular de *X. dendrorhous* dificultan la extracción del pigmento; de forma que es necesario añadir un nuevo paso de rotura celular y liberación de las astaxantina al proceso de producción. La rotura de la pared celular de la levadura previa a su adicción a la dieta animal, ya sea por rotura mecánica o digestión enzimática, es esencial para que se produzca la absorción del pigmento puesto que solamente así la astaxantina está disponible. La industria biotecnológica ha desarrollado diferentes técnicas para liberar el pigmento de la levadura, como la optimización de las condiciones de secado, técnicas de rotura mecánica y tratamientos enzimáticos (Johnson *et al.*, 1978; Okagbue y Lewis, 1984; An y Choi 2003; Ni *et al.*, 2008). Sin embargo, la rotura física y la digestión biológica, la violencia del tratamiento homogeneizador y los costes comerciales de las enzimas líticas

limitan un amplio uso de *X. dendrorhous*. En el proceso de tratamiento químico, la alteración de células con ácido o base son una forma razonable de degradar las paredes celulares de la levadura. El HCl en concentraciones elevadas es eficaz para degradar la pared celular de la levadura. El uso de todos estos métodos se traduce en una pérdida de pigmento en cierta medida, a lo que hay que añadir que son difíciles de aplicar a gran escala, en parte debido a la sensibilidad de astaxantina a la oxidación.

La extracción a escala industrial con solventes orgánicos es la principal forma de afrontar este reto. A pesar de ello, estos métodos tradicionales tienen una serie de inconvenientes como son la toxicidad de los solventes, su impacto en el medio ambiente, su coste, y el hecho de que el aplicar calor para la evaporación de los solventes puede provocar una degradación irreversible del producto. Aparte de esto, se han desarrollado procedimientos de extracción mediante el uso de fluidos supercríticos como el dióxido de carbono, que debido a sus propiedades muestran una mayor capacidad de difusión que los solventes orgánicos convencionales, incrementando así el rendimiento de la extracción (Lim *et al.*, 2002). Se han realizado estudios para la extracción de carotenoides a partir de fuentes naturales mediante esta técnica, así como para la extracción de astaxantina a partir de *H. pluvialis*. Lim y colaboradores (2002) han puesto a punto un protocolo para la extracción de astaxantina a partir de *X. dendrorhous* utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico, que muestra un rendimiento del 90% de astaxantina recuperada. Sin embargo, la extracción se lleva a cabo a elevadas presiones y se requiere un equipo costoso.

Recientemente ha aumentado el interés por las extracciones y separaciones basadas en surfactantes, debido a que tienen unos bajos requerimientos en energía, los surfactantes pueden reciclarse y reutilizarse y son capaces de tratar fácilmente los compuestos degradados. Uno de los métodos que se ha estudiado es la posibilidad de utilizar microburbujas de gas coloidal estabilizadas por surfactantes generadas por la agitación a gran velocidad del surfactante y situadas en una columna de flotación (“aprhone” del inglés “aphrons”) para extraer la astaxantina de la levadura (Dermiki *et al.*, 2008; Dermiki *et al.*, 2009), que son (figura 1.14.). Dependiendo del tipo de surfactante utilizado (catiónico, aniónico o no-iónico), la superficie externa de la microburbuja será de una forma u otra permitiendo controlar la selectividad de la adsorción molécula-burbuja.

Esta técnica permite separar el producto de todo el líquido sin necesidad de centrifugar, debido a la flotabilidad de las burbujas de aire. Sin embargo, uno de los problemas que puede tener es eliminar el surfactante en el paso final de recuperación, puesto que altas concentraciones de alguno de ellos (como el CTAB: bromuro de hexadecil trimetil amonio; surfactante catiónico) son tóxicas. Sin embargo, el uso de surfactantes no-iónicos de grado alimenticio ofrecen la ventaja de no tener que ser eliminados pudiendo aumentar la biodisponibilidad de la astaxantina.

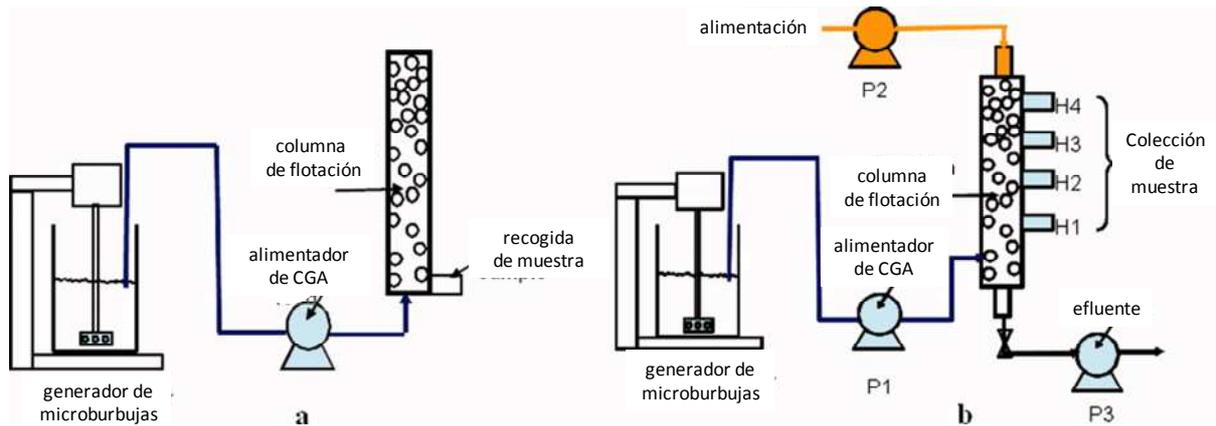


Figura 1.14. Representación esquemática de una columna de flotación acoplada a experimentos en “batch” (a) y experimentos continuos (b). En los experimentos en “batch”, primero se introduce la muestra y luego se generan las microburbujas que son introducidas por una bomba peristáltica. En los experimentos continuos primero se generan las microburbujas, que se introducen en la columna por una bomba (P1). Luego se introduce la muestra (alimentación) controlado por otra bomba (P2). En la parte inferior hay una válvula conectada a otra bomba (P3) para controlar el efluente. CGA: “aprhones” de gas coloidal; P1/P2/P3: bombas peristálticas (modificado de Dermiki *et al.*, 2009).

Al mismo tiempo, se han desarrollado procedimientos en los que *Bacillus circulans* se inocula en fermentadores donde está creciendo *X. dendrorhous*, de forma que las enzimas líticas secretadas por la bacteria hidrolizan parcialmente la pared celular de la levadura facilitando la recuperación de la astaxantina. Dado que las condiciones óptimas de crecimiento son diferentes para los dos microorganismos, es necesario optimizar los parámetros del cultivo (pH, temperatura, concentración de glucosa, tiempo de incubación, etc.) para incrementar la eficacia de la técnica (Johnson *et al.*, 1977; Johnson *et al.*, 1979; Fang y Wang, 2002).

## 1.5. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

La astaxantina es de gran interés industrial debido a dos de sus características más importantes: su color rojizo y su elevado poder antioxidante. Por ello existe un gran interés dentro del mercado de la alimentación de salmónidos y crustáceos a los que les aporta el color rosado característico; y en el mercado de la industria farmacéutica como tratamiento de diversas enfermedades provocadas por el envejecimiento celular debido a radicales libres (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006).

Entre los microorganismos productores de astaxantina *X. dendrorhous* es uno de los dos microorganismos capaces de competir a nivel industrial con la astaxantina producida de forma sintética (Tinoi *et al.*, 2006). Por ello se trabaja con esta levadura para tratar de conocer la ruta de biosíntesis de este carotenoide y optimizar su producción. Entre las herramientas utilizadas se encuentran las técnicas de ingeniería genética, que permiten el estudio de la función de los genes mediante su delección o sobreexpresión. Por ello los objetivos marcados fueron:

1. Búsqueda en *X. dendrorhous* CECT 11028 de los genes *ku70* y *ku80* que participan en la recombinación no homóloga.
2. Sobreexpresión del gen *crtS* nativo en las cepas de *X. dendrorhous* CECT 11028 y ATCC 96815, y estudio de sus efectos sobre la biosíntesis de diversas xantofilas.
3. Sustitución del promotor nativo del gen *crtS* por el de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Pgpd*) de *X. dendrorhous* y el de la glutamato deshidrogenasa (*Pgdh*) de *X. dendrorhous*. Sobreexpresión de estos genes quimera y estudio de sus efectos.
4. Complementación de la cepa ATCC 96815 con enzimas con actividad conocida para determinar la función del gen *crtS*.



## **Materialles y Métodos**

---



## 2.1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

A continuación se describen los microorganismos utilizados en el presente trabajo, así como sus principales características.

### 2.1.1. Cepas de *Xanthophyllomyces dendrorhous*

- *Xanthophyllomyces dendrorhous* CECT 11028 (= *Xanthophyllomyces dendrorhous* ATCC 24203). Cepa silvestre, productora de astaxantina. Fue aislada de un exudado de *Alnus japonica* de Shinkai, Kiso (Japón).
- *Xanthophyllomyces dendrorhous* ATCC 96815. También depositada como *Xanthophyllomyces dendrorhous* ATCC 74486, y descrita como cepa Yan-1 por Schroeder y Johnson (1995a). Mutante no productor de astaxantina, derivado de *Xanthophyllomyces dendrorhous* UCD 67-385 (= *Xanthophyllomyces dendrorhous* ATCC 24230) por mutagénesis con nitrosoguanidina, y que acumula  $\beta$ -caroteno como producto final.

### 2.1.2. Cepas de *Escherichia coli*

- *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Hanahan, 1983). Cepa utilizada normalmente en experimentos de transformación debido a la alta eficiencia que puede conseguirse con ella (hasta  $5 \times 10^8$  transformantes por  $\mu\text{g}$  de ADN). Además resulta interesante por poseer una delección en el gen *lacZ* (*lacZ* $\Delta$ M15), lo que permite seleccionar fácilmente aquellos transformantes que posean un plásmido capaz de originar la  $\alpha$ -complementación de esa mutación (por ejemplo pBluescript®).

## 2.2. VECTORES DE CLONACIÓN

### 2.2.1. Vectores plasmídicos utilizados

- **pBluescript® KS (+/-)** (Fermentas GmbH, figura 2.1.). Vector comercial derivado del pUC19. Es un plásmido multicopia de *E. coli*, con un tamaño de 2961 pb, y que presenta un sitio de clonación múltiple con dianas únicas para diferentes endonucleasas de restricción situado entre el promotor y el gen *lacZ*, de modo que la restauración de la actividad  $\beta$ -galactosidasa cuando se transforman cepas que presentan una delección en ese gen es indicadora de la ausencia de insertos (como se describió para el caso del pUC19). Contiene el origen de replicación ColE1 para *E. coli* del plásmido pBR322, y posee además un origen de replicación para el fago f1, lo que permite rescatar el plásmido en forma de ADN monocatenario, y su uso para la secuenciación de los fragmentos de ADN clonados. El origen de replicación de f1 y el sitio de clonación múltiple (policonector) se presentan en ambas orientaciones. Entre las versiones (+) y (-) varía la orientación del origen de f1, de modo que en las versiones (+), la cadena rescatada al obtener ADN de

cadena sencilla es la codificante para el fragmento del gen *lacZ*, mientras que en las versiones (-) es la complementaria.

- **pGEM<sup>®</sup>-T Easy** (Promega Corporation, figura 2.1.). Plásmido multicopia de *E. coli* con un tamaño de 3015 pb. Contiene los promotores T7 y SP6 flanqueando el sitio de clonación múltiple (lo que permite, en determinadas condiciones, la transcripción del ADN exógeno), que se encuentra dentro de la región que codifica la subunidad  $\alpha$  (gen *lacZ*) de la enzima  $\beta$ -galactosidasa; la inactivación insercional de la subunidad  $\alpha$  permite identificar directamente los clones recombinantes, mediante selección por color, en placas suplementadas con IPTG y X-Gal, como se describió en los casos anteriores. Posee además el origen de replicación del fago filamentosos f1, y un gen que codifica una  $\beta$ -lactamasa, que confiere resistencia a ampicilina a las bacterias que portan el plásmido. Este vector está especialmente diseñado para la clonación directa de productos de PCR; para ello en este trabajo digerido con *EcoRV* (que presenta una única diana de restricción en el policonector), que genera extremos romos, y se le ha añadido en ambos extremos 3' una timina; esa timina saliente incrementa enormemente la eficiencia de la ligación de los productos de PCR en el plásmido, ya que previene la recircularización del vector, y proporciona un extremo protuberante compatible con los productos de PCR generados por ciertas polimerasas termoestables (como la *Taq* Polimerasa), que añaden una única desoxiadenosina en los extremos 3' de los fragmentos de ADN amplificados.
- **pGEM<sup>®</sup>-5Zf (+/-)** (Promega Corporation, figura 2.1.). Plásmido multicopia de *E. coli*, derivado del pGEM<sup>®</sup>-3Zf, cuyo tamaño es de 3000 pb. Presenta las mismas características y aplicaciones que el pGEM<sup>®</sup>-3Zf, diferenciándose en las dianas para endonucleasas de restricción presentes en el policonector, que en este caso son para *ApaI*, *AatII*, *SphI*, *NcoI*, *SacII*, *EcoRV*, *SpeI*, *NotI*, *PstI*, *Sall*, *NdeI*, *SacI*, *BstXI* y *NsiI*. Las formas (+) y (-) del plásmido se diferencian en la orientación del origen de replicación del fago filamentosos f1 en relación al gen *lacZ*; en la forma (+), ambos presentan la misma orientación, mientras que en la forma (-) su orientación es opuesta.
- **pBGgHg** (Chen *et al.*, 2000; figura 2.1.). Plásmido integrativo bifuncional, con un tamaño de 9.6 Kb, y que tiene como base el vector pCAMBIA 1300. Este plásmido presenta los bordes derecho (RB) e izquierdo (LB) del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens*, y entre ellos se encuentran los genes que codifican la enzima higromicina B fosfotransferasa (*hph*) de *E. coli* y la proteína fluorescente verde (*enhanced green fluorescent protein, egfp*) de *Aequorea victoria*. Ambos genes se encuentran bajo control del promotor del gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gpd*) de *Agaricus bisporus*, y con el terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Además dispone de los orígenes de replicación correspondientes a los plásmidos pBR322 y pVS1, y de un gen de resistencia a kanamicina para selección en bacterias.

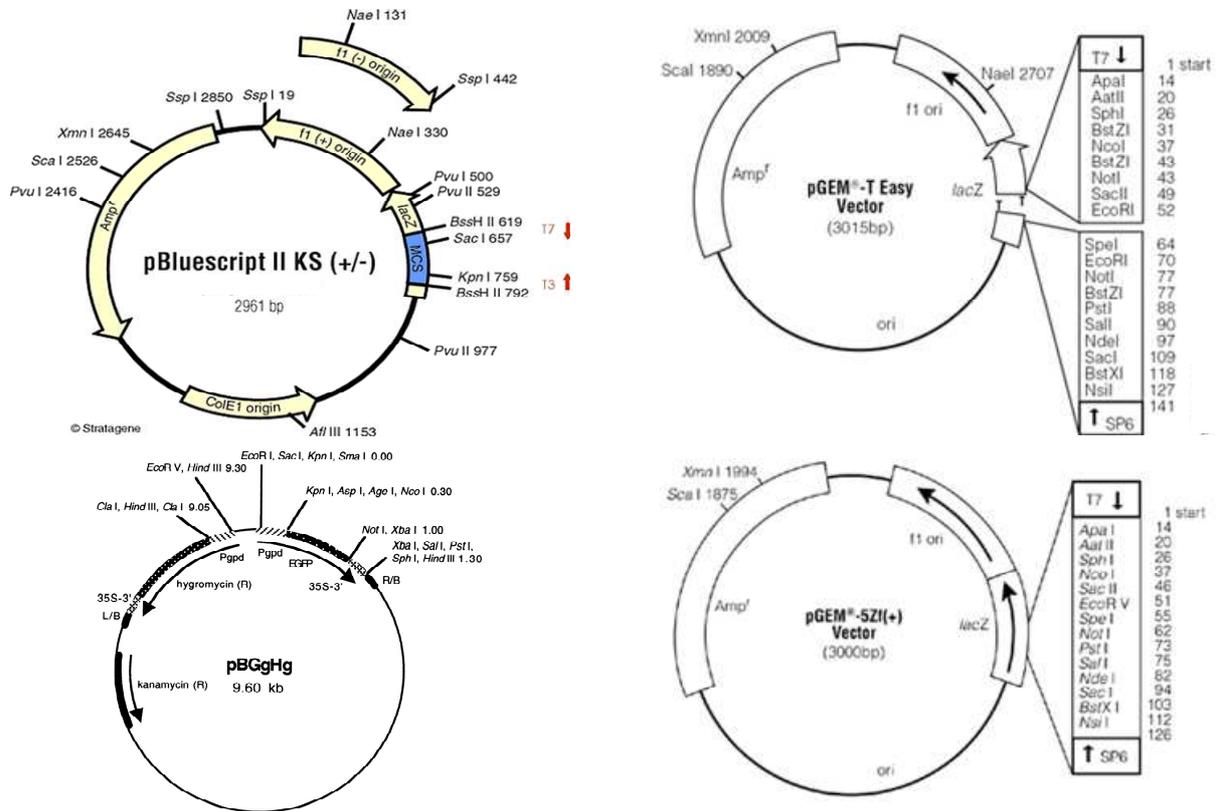


Figura 2.1. Esquemas de los vectores plasmídicos comerciales empleados. bp: pares de bases.

- **pG5-*hph-crtS***: plásmido creado en nuestro laboratorio que consta de un pGEM®-5Zf en el que se clonó por PCR los genes *crtS* y *hph* en el sitio *EcoRV*, a partir de una construcción previa hecha en el pBGgHg. En el pBGgHg se eliminó la proteína fluorescente verde (GFP) cortando el plásmido con la enzima de restricción *PvuII*, y se clonó en su lugar el gen *crtS* amplificado por PCR (figura 2.2.).
- **pG5-ADNr**: plásmido creado en nuestro laboratorio. Es un pGEM®-5Zf en el que se clonaron en el sitio *SalI* los genes ribosomales de *Xanthophyllomyces dendrorhous* por digestión con la enzima de restricción *SalI* del ADN total de *X. dendrorhous* CECT 11028 (figura 2.2.).
- **pGTE-PgpII**: plásmido creado en nuestro laboratorio, que consta de un pGEM®-T Easy en el que se clonó por PCR el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gpd*) a partir de la cepa *X. dendrorhous* CECT 11028 (figura 2.2.).
- **pG5-*crtS***: plásmido creado en nuestro laboratorio que consta de un pGEM®-5Zf en el que se clonó el gen *crtS* por digestión *PstI* a partir del fago del que fue aislado el gen (figura 2.2.).
- **pBS-Pgdh** (Rodríguez-Sáiz *et al.*, 2009). Plásmido cedido por el Dr. J. L. Barredo de Antibióticos S.A. que consta de una pBluescript® KS en el que se había clonado el promotor y parte del gen de la glutamato deshidrogenasa (*gdh*) (figura 2.2.).

- **pAK96** (Misawa *et al.*, 1995). Plásmido que contiene algunos de los genes carotenogénicos *crtW* ( $\beta$ -caroteno cetolasa) y *crtZ* ( $\beta$ -carotenos hidroxilasa) de *Paracoccus* sp. N81106 (antes denominada *Agrobacterium aurantiacum*, figura 2.2.).
- **pBS-*crtH1*** (Yu *et al.*, 2006). Plásmido que contiene el gen *crtH1* ( $\beta$ -caroteno hidroxilasa) de la planta *Adonis aestivalis* (figura 2.2.).

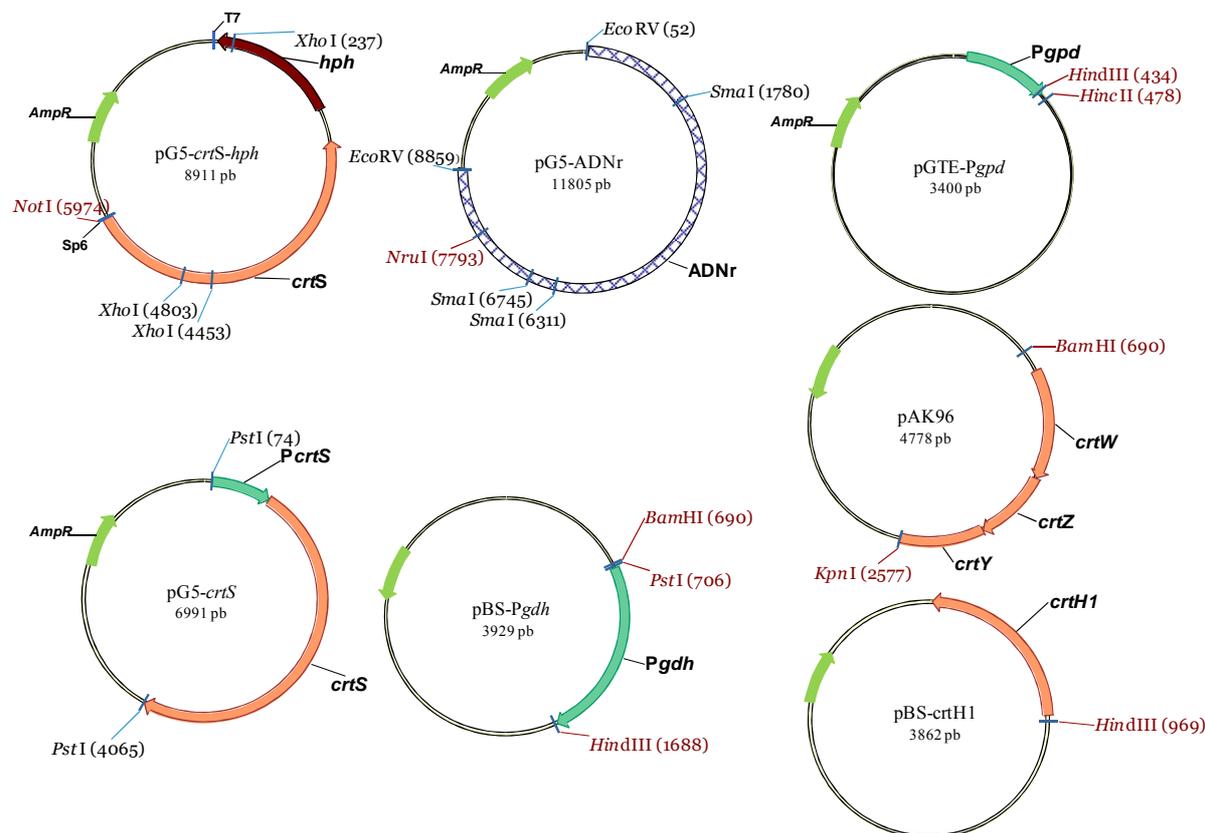


Figura 2.2. Esquema de los vectores plasmídicos creados en el laboratorio o cedidos que han sido utilizados. pb: pares de bases.

## 2.3. PRODUCTOS Y REACTIVOS

### 2.3.1. Enzimas

Las endonucleasas de restricción *Apa*I, *Bam*HI, *Bgl*II, *Bgl*III, *Bst*XI, *Cla*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hinc*II, *Hind*III, *Nco*I, *Not*I, *Nru*I, *Pst*I, *Pvu*II, *Sac*I, *Sac*II, *Sal*I, *Sma*I, *Spe*I, *Xba*I, *Xho*I fueron suministradas por la casa comercial Takara; mientras que *Pdm*I (*Xmn*I) procede de Fermentas GmbH.

Las enzimas de modificación utilizadas fueron las siguientes: fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Fermentas GmbH), ADN polimerasa del fago T4 (Fermentas GmbH), ADN ligasa del fago T4 (Fermentas GmbH), lisozima (Fluka Chemie), *Taq* ADN Polimerasa (Promega Biotec) y ribonucleasa A (Sigma-Aldrich Co. LLC).

### 2.3.2. Ácidos nucleicos

Se utilizó el ADN del bacteriófago Lambda (Fermentas GmbH) como marcador de tamaños en los experimentos de electroforesis de ADN en geles de agarosa, tras su digestión con la endonucleasa *HindIII*. También se empleó como marcador de peso molecular el marcador de *1 Kb plus DNA Ladder* de Invitrogen.

Los oligonucleótidos utilizados fueron suministrados por Sigma Genosys, y se describen en la Tabla 2.1.

Oligonucleótidos	Secuencia	Tm (° C)
<b>APAT</b>	CTCTGCAGGGGCCCAACATGAAGATC	76,3
<b>HIND1</b>	TACTTTAAGCTTATGTTCATCTTGGT	60,0
<b>GPDBH1F</b>	CTGGTGGATCCAGGTATGTA	59,8
<b>TgdhF</b>	GGGTAGGCGATTAGTGGAGG	64,5
<b>TghdR21</b>	GGGATCCAGAGAAACTCTGAT	61,0
<b>CRTWH3F</b>	GGGAAGCTTATGAGCGCA	64,0
<b>CRTWH3R</b>	AGGAAAGCTTTCATGCGG	62,9
<b>CRTZH3F</b>	GGGGGAAAGCTTATGACCA	63,7
<b>CRTZH3R</b>	GCCAGCAGCACGTAAGCTT	65,5
<b>CRTH1F</b>	AACAAGCTTACCATCATGCTAGCTTCAATG	70,5
<b>CRTH1R</b>	GCACTAGTCTATAAGGCATTTCATACGCTTT	67,4
<b>GPDRIF</b>	GACTAAAGGATCGATCTGGTGGCTGCAGGTATGTACGTGA	80,9
<b>GDHRIF</b>	GACTAAAGGATCGATGAATTCGAAGAAGGAGAAGGAGAAA	76,6
<b>GDHRIR</b>	GACCAAGATGAACATGGTTGATGGAAGATGTGGAGGAGAA	81,4
<b>ASTRIF</b>	CATCTTCCATCAACCATGTTTCATCTTGGTCTTGCTCACAG	81,2
<b>ASTRIR</b>	GTGTGGCCTATCGATTCTGCAGTCGACAAACATGAAGATC	81,5
<b>GDH3ZF</b>	AGAATACTCAAGCTTGAATTCGAAGAAGGAGAAGGAGAAA	75,3
<b>AST3ZR</b>	TCCTCTAGAGTCGACCTGCAGTCGACAAACATGAAGATCA	81,1
<b>Ex6F</b>	GGTCGAGCTACTCTGGACGTCATG	70,1
<b>Ex9R</b>	TAGGAGACTTAGGATATCCCGACC	64,2
<b>ActF</b>	TGACGAGGCTCAGTCCAAGCGAGG	76,3
<b>ActR</b>	GTCTGCATCTCCTGCTCGAAATCG	71,9

Tabla 2.1. Secuencia y Tm de los diferentes oligonucleótidos sintéticos utilizados durante el transcurso del trabajo.

### 2.3.3. Conjuntos (kits) de sistemas comerciales

En determinados casos, los protocolos se realizaron utilizando conjuntos de sistemas (*kits*) que contienen los reactivos, enzimas y tampones necesarios para llevarlos a cabo. A continuación se indican los conjuntos de sistemas utilizados, junto con las casas comerciales proveedoras:

- *DIG-DNA Labeling Kit* (Roche): utilizado para el marcaje de sondas de ADN con digoxigenina mediante cebadores al azar.

- *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences): se utilizó para recuperar los fragmentos de ADN de geles de agarosa o de solución.
- *Illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare): se empleó para obtener ADN plasmídico con rapidez y calidad, para secuenciación.
- *SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq* (Invitrogen): utilizado para la retrotranscripción y posterior amplificación mediante PCR de moléculas de ARN.

### 2.3.4. Pigmentos

El  $\beta$ -caroteno y la astaxantina fueron adquiridos a Sigma-Aldrich Co. LLC.

## 2.4. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo que se describen a continuación fueron esterilizados en autoclave. En los casos en que la esterilización se haya llevado a cabo mediante otros procedimientos se indicará específicamente.

### 2.4.1. Medios de cultivo para *Xanthophyllomyces dendrorhous*

- **Medio YM:** utilizado para el crecimiento de *X. dendrorhous*. Su composición es (g/L):

Extracto de levadura	3 g	Peptona	5 g
Extracto de malta	3 g	Glucosa	10 g

Se ajusta el pH a 6,5. Para su uso como medio sólido, se añadió agar a una concentración final del 2%.

- **Medio YPD:** utilizado para el crecimiento de *X. dendrorhous* tras su transformación por electroporación. Su composición es (g/l):

Extracto de levadura	10 g	Glucosa	20 g
Peptona	20 g		

Se ajusta el pH a 6,5. Para su uso como medio sólido se añadió agar a una concentración final del 2%. Este medio se esteriliza en olla a presión durante 15 minutos a 121° C.

- **Medio YNB:** utilizado para el crecimiento de *X. dendrorhous* de forma comparativa entre fuentes de nitrógeno. Su preparación se realiza a partir del preparado comercial de Difco denominado *Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate*. Su composición final por litro de medio es de:

<b>Glucosa</b>	5 g	<b>Elementos traza</b>	
		Ácido bórico	500 µg
<b>Fuente de nitrógeno*</b>		Sulfato cúprico	40 µg
		Yoduro potásico	100 µg
<b>Vitaminas</b>		Cloruro férrico	200 µg
Biotina	2 µg	Sulfato de manganeso	400 µg
Pantotenato cálcico	400 µg	Molibdato sódico	200 µg
Ácido fólico	2 µg	Sulfato de zinc	400 µg
Inositol	2000 µg		
Niacina	400 µg	<b>Sales</b>	
Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	200 µg	Fosfato monopotásico	1 g
Clorhidrato de piridoxina	400 µg	Sulfato de magnesio	0,5 g
Riboflavina	200 µg	Cloruro sódico	0,1 g
Clorhidrato de tiamina	400 µg	Cloruro cálcico	0,1 g

\***Fuente de nitrógeno:** puede ser acetato amónico o glutamato sódico a una concentración final de 20 µM, dependiendo del experimento.

La preparación de 1 litro de medio se realiza disolviendo 1,7 g de base, 5 g de glucosa y la fuente de nitrógeno a una concentración final de 20 µM. Se esteriliza por filtración.

#### **2.4.2. Medios de cultivo para *Escherichia coli***

- **Medio LB (Luria-Bertani)** (Miller, 1972). Medio de cultivo utilizado normalmente para *E. coli*. Su composición es (g/L):

Bacto-triptona	10 g	Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g		

El pH se ajusta a 7,3 con NaOH. Para su uso como medio sólido, se añadió agar a una concentración final del 2%.

- **Medio TB** (Tartol y Hobbs, 1987). Medio utilizado para el crecimiento de *E. coli* con el fin de obtener ADN plasmídico. Su composición es (g/L):

Extracto de levadura	24 g	Glicerol	4 mL
Bacto-triptona	12 g		

Se ajusta el volumen a 900 ml y se esteriliza. Una vez enfriado el medio, y antes de su uso, se añaden 10 ml de una solución KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,17 M y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,72 M estéril por cada 90 ml de medio.

- **Medio SOB** (Hanahan, 1983). Su composición es (g/L):

Bacto-triptona	20 g	NaCl	0,584 g
Extracto de levadura	5 g	KCl	0,186 g

El pH se ajusta a 7,5 con KOH. Para su uso como medio sólido, se añadió agar a una concentración final del 2%. Inmediatamente antes de su uso, se suplementó con 1 ml por cada 100 ml de medio de una solución MgCl<sub>2</sub> 1 M, MgSO<sub>4</sub> 1 M. Para obtener el medio **SOC**, se añade 1 ml de una solución de glucosa 2 M estéril por cada 100 ml de medio. Ambos medios se utilizaron para preparar células competentes de *E. coli*, así como durante su transformación.

### 2.4.3. Suplementos de los medios de cultivo

- La **ampicilina** (Amp) se prepara a una concentración de 100 mg/mL disuelta en agua de tipo 1, y se utilizó para la selección de transformantes de *E. coli* a una concentración de 100 µg/mL.
- El **IPTG** (1-isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) se prepara a una concentración 100 mM en agua de tipo 1, y el **X-Gal** (5-Br-4-Cl-3-indolil-β-D-galactopiranosido) se prepara a una concentración de 20 mg/mL en dimetilformamida. Ambos compuestos se emplearon para la selección por color de transformantes en *E. coli*, utilizándose a concentraciones finales de 0,05 mM y 40 µg/mL, respectivamente.
- La **higromicina** (hyg) se preparó a una concentración de 10 mg/mL disuelta en agua de tipo 1, y se utilizó a una concentración de entre 10 y 20 µg/mL en medio sólido, dependiendo de la cepa de *X. dendrorhous* utilizada.

## 2.5. CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Las cepas de *X. dendrorhous* se sembraron en placas Petri con medio YM sólido (o YM sólido suplementado con higromicina a la concentración adecuada, en el caso de los transformantes), y se incubaron a 21°C durante cinco días. Esas placas se conservaron selladas con Parafilm® a 4°C, durante un periodo máximo de dos meses, siendo necesario resembrarlas pasado ese tiempo.

Para una conservación a largo plazo las cepas de *X. dendrorhous* se liofilizaron y se conservaron como liófilos a 4° C o a temperatura ambiente.

## 2.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ADN

### 2.6.1. Aislamiento de ADN

#### 2.6.1.1. Aislamiento de ADN total de *Xanthophyllomyces dendrorhous*

Para la extracción de ADN total de *X. dendrorhous* a gran escala, se utilizó un protocolo basado en el aislamiento de ADN en hongos filamentosos.

#### ***Protocolo para la extracción de ADN total de X. dendrorhous***

1. Cultivo de la cepa: las diferentes cepas de *X. dendrorhous* se cultivan en 100 mL de medio YM líquido en matraces lisos de 500 mL de capacidad, inoculados con una colonia procedente de un cultivo fresco en medio sólido. La incubación se realiza en agitadores orbitales a 21°C y 220 rpm, durante 96 horas.
2. Se recogen 50 mL de cultivo en un tubo de 50 mL, y se centrifuga a 4800 rpm 5 minutos para bajar las células y eliminar el sobrenadante. Se congela a -20°C hasta que se extraiga.
3. En un mortero limpio (lavado con etanol absoluto) y frío (con nitrógeno líquido) se vierten las células y se tritura hasta formar un polvillo. Se recoge todo en tubos de 10 mL hasta una altura de 1 mL y se colocan en hielo.
4. Se añaden 3 mL de tampón de extracción (calentado a 65° C) y se mezclan agitando el tubo. Se incuba a 65° C durante 20 minutos.
5. Se añaden 3 mL de CIA y se mezcla suavemente, procurando quitar el gas que se forma. Se incuba en hielo 30 minutos.
6. Se centrifuga 30 minutos a 4200 rpm y 4° C, y se transfiere la fase acuosa a un tubo limpio.
7. Se añade 1 volumen de isopropanol y se mezcla por inversión. Se incuba 10 minutos a temperatura ambiente (el DNA se hace visible).
8. Se centrifuga a 4800 rpm, 5 minutos y temperatura ambiente. Se elimina el sobrenadante y se deja secar. Se resuspende en 800 µL de agua de tipo 1 (se puede dejar a 4° C toda la noche para que se resuspenda lentamente). Se transfiere a un tubo de 2 mL.
9. Se añaden 400 µL de acetato de amonio 7,5 M (para precipitar las proteínas), se mezcla por inversión y se incuba en hielo una hora.
10. Se centrifuga a 13200 rpm durante 30 minutos a 4° C. Se pasa el sobrenadante a un tubo limpio y se añaden 0,54 volúmenes de isopropanol (600 µL) Se incuba a temperatura ambiente 10 minutos. El ADN aparece más limpio que en el paso 7.
11. Se centrifuga a 13200 rpm durante 20 minutos y se elimina el sobrenadante. Se resuspende en 700 µL de agua de tipo 1 y se trata con ribonucleasa A, a una concentración final de 40 µg/mL durante 30 minutos a 37° C.
12. Se añade un volumen de fenol neutro a la solución de ADN, se mezcla bien, y se centrifuga a 13200 rpm durante 5 minutos.

13. Se recoge la fase superior, se pasa a un tubo nuevo y se añade un volumen de fenol-CIA neutro; se mezcla bien y se centrifuga a 13200 rpm durante 5 minutos. Este paso se repite hasta que la interfase aparece limpia.
14. Por último, la fase acuosa se trata con un volumen de CIA, se centrifuga a 13200 rpm durante 5 minutos, y de nuevo la fase acuosa superior se pasa a un tubo limpio.
15. El ADN se precipita con 1/10 de volumen de acetato sódico 3M pH 5,2 y dos volúmenes y medio de etanol frío (-20°C). Se incuba durante dos horas a -20°C y se centrifuga a 13200 rpm y 4°C durante 30 minutos. El precipitado obtenido se lava con 500 µl de etanol 70% (v/v), se deja secar y se resuspende en 100 µl de agua de tipo 1.

- Tampón de extracción: NaCl 0,7 M; Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0,1 M; Tris-HCl 0,1 M pH 8,0; EDTA 0,05 M pH 8,0; SDS 1% (p/v).
- Fenol neutro: se pesan 200 g de fenol cristalizado y se disuelve en 200 mL de Tris-HCl 0,5M pH 8. Se mantiene agitando hasta que todo el fenol esté bien disuelto, para posteriormente dejar reposar hasta que se separen las dos fases. Se retira la mayor cantidad posible de fase acuosa superior, y se guarda la solución a 4°C en un frasco opaco.
- CIA (cloroformo-alcohol isoamílico): se prepara mezclando cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 24:1.
- Fenol-CIA neutro: se prepara mezclando un volumen de fenol neutro y uno de CIA.
- Ribonucleasa A: se disuelve la ribonucleasa A, a una concentración de 10 mg/mL, en agua de tipo 1. La mezcla se hierve durante 15 minutos y se deja enfriar lentamente a temperatura ambiente; se reparte en alícuotas y se conserva a -20°C.

Cuando pretendemos obtener ADN total de *X. dendrorhous* pero en una menor escala y con una mayor rapidez utilizamos un protocolo distinto:

### ***Protocolo para la extracción de ADN total de X. dendrorhous a pequeña escala***

1. Se parte de cultivos de *X. dendrorhous* en medio YM líquido, como en el caso anterior (aunque en este caso se necesita menos volumen de cultivo), o bien de cultivos en medio YM sólido. En el primer caso, 5 mL del cultivo se transfieren a un tubo de 10 mL, y las células se recogen por centrifugación a 4800 rpm durante 10 minutos, mientras que en el segundo caso, se recogen las células de la placa con la ayuda de una espátula limpia, y se transfieren a un tubo de 10 mL.
2. Las células se lavan dos veces con NaCl al 0,9% (p/v). Tras el segundo lavado, los tubos se dejan secando boca abajo durante unos minutos, de modo que se elimine la mayor parte del líquido.
3. Se añaden a cada tubo 0,7 mL de solución LETS y un volumen de 0,5 ml de bolas de vidrio de 0,45 mm de diámetro; se agita vigorosamente con vórtex durante 1-2 minutos.
4. Se añade a la mezcla un volumen de fenol-CIA, se mezcla bien y se centrifuga a 13200 rpm durante 5 minutos. Se recoge la fase superior en un tubo limpio.

5. El ADN se precipita añadiendo 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M pH 5,2, y dos volúmenes y medio de etanol absoluto frío (-20°C); se incuba durante dos horas y media a -20°C y a continuación se centrifuga durante 30 minutos a 13200 rpm y 4°C.
6. El precipitado obtenido se lava con 500 µL de etanol al 70% (v/v), se deja secar y se resuspende en 40 µL de agua de tipo 1.

- Solución LETS: LiCl 0,1 M; EDTA 10 mM pH 8,0; Tris-HCl 10 mM pH 8,0; SDS 0,5% (p/v).

#### 2.6.1.2. Aislamiento de ADN plasmídico de *Escherichia coli*

Para aislar ADN plasmídico de *E. coli* a gran escala, se siguió el método de la lisis alcalina descrito por Maniatis y colaboradores (Maniatis *et al.*, 1982), cuyo proceso detallado es el siguiente:

##### ***Protocolo para la extracción de ADN plasmídico de E. coli a gran escala (lisis alcalina)***

1. Se siembra la colonia de *E. coli* portadora del plásmido deseado en 50 ml de medio (TB, LB) con antibiótico. Se incuba O/N a 37° C y 250 rpm.
2. Se pasa a un tubo de 50 mL y se centrifuga a 4800 rpm durante 5 minutos. El precipitado se resuspende en 10 mL de Solución I. La mezcla se incuba 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Se añaden 20 mL de solución II recién preparada. Se mezclan los contenidos invirtiendo lenta y suavemente el tubo varias veces, y se incuba 10 minutos en hielo.
4. Se añaden 15 mL de solución III FRIA (guardada a 4° C) Se mezclan los contenidos invirtiendo los tubos más bruscamente que en el paso anterior y se incuba 10 minutos en hielo.
5. Se centrifuga a 6500 rpm durante 30 minutos a 4° C. Se recoge el sobrenadante en un tubo de 50 mL, haciéndolo pasar por puntas de pipeta P5000 con algodón hidrofóbico. Se reparte en dos tubos.
6. Se añaden 0,6 volúmenes (12 mL) de isopropanol y se incuban 15 minutos a temperatura ambiente.
7. Se centrifuga durante 15 minutos a 6500 rpm y temperatura ambiente. Se elimina el sobrenadante y se deja secar.
8. Se resuspende cada tubo en 0,9 mL de agua de tipo 1 y transfiere a un tubo de 2 mL. Se trata con ribonucleasa A (concentración final: 40 µg/mL) durante 40-45 minutos a 37° C.
9. Se extrae con 1 volumen de fenol, 1 volumen de fenol-CIA, 1 volumen de CIA. Se precipita con 2 volúmenes de etanol frío y 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M. Se deja a -20° C durante 30 minutos.
10. Se centrifuga durante 30 minutos a 4° C. El precipitado se lava con 1 mL de etanol 70% (se prepara en el momento) Se centrifuga 15 minutos y se deja secar. Se resuspende en 200 µL de agua de tipo 1 y se juntan ambos contenidos en un tubo.

- Solución I de lisis alcalina: EDTA 10 mM pH 8,0; glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0.

- Solución II de lisis alcalina: NaOH 0,2 N; SDS 1% (p/v).
- Solución III de lisis alcalina: se mezclan 60 ml de acetato potásico 5 M, 11,5 mL de ácido acético glacial y 28,5 mL de agua destilada. La solución resultante tiene un valor de pH de 4,8.

Cuando se necesitó analizar un número elevado de colonias, se realizaron minipreparaciones de ADN, que permiten obtener ADN plasmídico a pequeña escala, siguiendo el protocolo de lisis por ebullición descrito por Holmes y Quigley (Holmes y Quigley, 1981).

### ***Protocolo para la extracción de ADN plasmídico de E. coli a pequeña escala (minipreps)***

1. Se inocula la colonia con un palillo estéril en un eppendorf de 1,5 mL con 800  $\mu$ L de medio de cultivo (LB o TB) y con la concentración de antibiótico adecuada para mantener el plásmido (Ampicilina  $\rightarrow$  100  $\mu$ g/mL). Se deja crecer durante toda la noche a 37 $^{\circ}$  C y 250 rpm.
2. Se recogen las células centrifugado a 4800 rpm durante 5 minutos y se elimina el sobrenadante.
3. Se añaden 250  $\mu$ L de solución STET con lisozima (10 mg/mL) y se resuspende completamente con la ayuda de un vórtex y se hierve durante unos 40 segundos.
4. Se centrifuga rápidamente a 13200 rpm durante 5 minutos y se elimina el pellet (proteínas, los restos celulares y el ADN cromosómico bacteriano) con un palillo.
5. Se añade 1/10 de volumen de acetato sódico 3M pH 5,2 (25  $\mu$ L) y 1 volumen de isopropanol (250  $\mu$ L) para precipitar el ADN plasmídico. Se mezcla por inversión.
6. Se incuba 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga a 13200 rpm durante 20 minutos.
7. Se eliminar el sobrenadante y se deja secar.
8. Se resuspende en 40  $\mu$ L de agua de tipo 1 y se mezcla con vórtex. 4  $\mu$ L son suficientes para un análisis en gel de agarosa por tamaño y por endonucleasas de restricción.

- STET: EDTA 50 mM pH 8,0; sacarosa 8% (p/v); Tris-HCl 10 mM pH 8,0; Tritón X-100 0,5% (v/v).

En ocasiones y con el fin de muestrear un mayor número de colonias, en cada minipreparación se sembraron más de una colonia por tubo. En esos casos y una vez visualizado el ADN plasmídico por gel de agarosa se procedía a hacer una extracción rápida de cada colonia individual (*cracking*). Esta técnica no permite una digestión posterior.

### ***Protocolo para la extracción de ADN plasmídico de E. coli a pequeña escala y con rapidez.***

1. Se pone en un eppendorf 40  $\mu$ L de solución de lisis I (tantos eppendorf como colonias queremos analizar), y se pica la colonia con un palillo resuspendiéndola en el tubo no mucho tiempo. Es mejor una vez resuspendida la colonia desechar el palillo, puesto que si se deja dentro absorbe la solución de lisis I. Se deja 15 minutos a temperatura ambiente.

2. Mientras se prepara la Solución II de la que se añaden 8  $\mu\text{L}$  a cada eppendorf una vez transcurridos los 15 minutos de espera. Se dejan los tubos 20 minutos a  $-80^\circ\text{C}$ .
3. Se sacan en hielo y se centrifugan 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$  y 13200 rpm, y se vuelven a poner en hielo.
4. Se cargar todo el volumen ( $\sim 30 \mu\text{L}$ ) en un gel de agarosa.
  - Solución de lisis I: EDTA 10 mM; Tris-HCl 10 mM; NaOH 0,1 N; SDS 1% (v/v).
  - Solución II: 3  $\mu\text{L}$  de HCl 1N + 5  $\mu\text{L}$  tampón de carga (ej. 150  $\mu\text{L}$  HCl + 250  $\mu\text{L}$  tampón carga). El tampón de carga empleado es el tampón comercial que acompaña a las enzimas de la casa comercial Takara Bio Inc.

Cuando fue necesario obtener ADN plasmídico de *E. coli* para secuenciación, la extracción se realizó a partir de cultivos en 5 ml de medio LB líquido (suplementado con el antibiótico adecuado) del clon de interés, crecidos durante 8-10 horas a  $37^\circ\text{C}$  y 250 rpm. Para el aislamiento se utilizó el sistema comercial *illustra plasmidPrep Mini Spin Kit* siguiendo las instrucciones del fabricante. De este modo el ADN obtenido es de mayor calidad, lo que mejora el resultado de la secuenciación.

### **2.6.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa**

La electroforesis en geles de agarosa se realizó siguiendo las indicaciones de Maniatis y colaboradores (Maniatis *et al.*, 1982). Los geles de agarosa se prepararon a concentraciones de 0,8-1% (p/v), disolviendo la agarosa por calentamiento en tampón TAE 1x.

La electroforesis se desarrolló en tampón TAE 1x. El espesor de los geles fue de 4-6 mm, y la altura de la capa de tampón TAE situada entre la cara superior del gel y la superficie se mantuvo en 0,5 cm aproximadamente. El voltaje aplicado no superó en ningún caso los 5 V/cm. En el caso de geles utilizados para transferir e hibridar (hibridación tipo *Southern*), y a fin de obtener una mejor resolución y menor distorsión, se emplearon campos eléctricos menos intensos (de hasta 1 V/cm).

Las muestras de ADN, antes de ser cargadas en los pocillos del gel, se mezclaron con 1/10 de volumen del tampón de carga comercial concentrado. La cantidad de ADN cargado fue de hasta 5  $\mu\text{g}$  por centímetro de pocillo en muestras preparativas; en el caso de geles vayas a ser transferidos y utilizados en experimentos de hibridación tipo *Southern*, se cargaron 10  $\mu\text{g}$  por carril cuando se trataba de ADN total digerido, y menos de 0,5  $\mu\text{g}$  por carril cuando era ADN procedente de plásmidos.

Las bandas de ADN se visualizaron y fotografiaron sobre el transiluminador GeneFlash de Syngene (que emite luz UV) tras la tinción con una solución de bromuro de etidio a una concentración de 1,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  durante 15-30 minutos dependiendo del estado del bromuro de etidio preparado.

Como marcador de tamaño, se utilizó el ADN del fago Lambda digerido con *HindIII* (que genera fragmentos de 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 125 pb) o el *1 Kb plus DNA Ladder* de Invitrogen.

- TAE 50x: 57,1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0; 242 g de Tris base, y agua destilada hasta completar un litro.
- Bromuro de etidio: se prepara una solución a una concentración de 10 mg/ml en agua, y se conserva a 4°C protegida de la luz. Para preparar 1 litro de solución de bromuro de etidio diluida, mezclar 150 µL de esta solución con 1 litro de agua destilada (concentración final de 1,5 µg/mL).

### 2.6.2.1. Cuantificación y análisis de la pureza del ADN

Las preparaciones de ADN se cuantificaron por comparación visual de la intensidad luminosa de las bandas electroforéticas (teñidas con bromuro de etidio, y bajo la luz ultravioleta del transiluminador) con el patrón proporcionado por la digestión con *HindIII* del ADN del fago Lambda de concentración conocida. En concreto, como marcador se utilizaron 500 ng de ADN del fago Lambda digerido con *HindIII*, de modo que a cada banda le corresponde una cantidad de ADN proporcional a su tamaño.

Cuando fue necesario cuantificar con mayor exactitud las muestras de ADN (como por ejemplo para determinar la cantidad de ADN a utilizar para las reacciones de marcaje en los experimentos de secuenciación), se empleó la espectrofotometría empleando el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000. Para determinar el grado de pureza de las muestras de ADN, se empleó la relación A260/A280, teniendo en cuenta que una muestra pura de ADN presenta un valor de A260/A280=1.8.

### 2.6.2.2. Recuperación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Para extraer ADN de geles de agarosa tras la electroforesis, una vez teñido y visualizado se procedió primero a recortar el gel alrededor de la banda deseada, y a continuación se extrajo el ADN del taco de agarosa mediante el sistema comercial *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 2.6.3. Modificación del ADN

### 2.6.3.1. Digestión con endonucleasas de restricción

Las digestiones de ADN con endonucleasas de restricción se llevaron a cabo, de forma general, en volúmenes de 20-50 µL, dependiendo de su aplicación. Se siguieron las recomendaciones del proveedor en lo que se refiere a la temperatura y el tampón utilizado. La cantidad de enzima añadida fue de 0,5 a 1 unidades por µg de ADN (como norma general, la proporción de enzima en la solución final de digestión debe ser menor del 10% del total de la mezcla, debido a la elevada concentración de glicerol presente en las soluciones de almacenamiento de las enzimas). Los tiempos de incubación oscilaron entre 2 y 16 horas. La cantidad de enzima añadida y el tiempo de incubación se determinaron en base a la actividad enzimática (de acuerdo con las indicaciones de los proveedores) en las diferentes condiciones

utilizadas: el tampón (cuando fue necesario utilizar dos enzimas simultáneamente en un tampón no óptimo), la actividad frente a ADN plasmídico, la termoestabilidad de la enzima en incubaciones prolongadas y la proximidad del sitio de corte al extremo de la molécula de ADN.

Una vez finalizada la digestión, el ADN puede ser analizado directamente mediante electroforesis. En el caso de que el ADN obtenido tenga que ser sometido a otros tratamientos enzimáticos, es necesario proceder previamente a la eliminación de la enzima y de las sales del tampón mediante extracción con fenol y posterior precipitación del ADN.

#### 2.6.3.2. Modificación de los extremos de ADN

##### - *Rellenado de extremos 5' protuberantes*

En ocasiones, los extremos 5' protuberantes generados por determinadas enzimas de restricción tuvieron que ser convertidos a extremos romos, con el fin de poder ligar entre sí extremos no compatibles; para lo que se recurrió al fragmento Klenow de la ADN Polimerasa I de *E. coli*.

##### ***Protocolo para relleno de extremos 5' protuberantes***

1. El ADN digerido, una vez purificado y precipitado, se lleva a 40  $\mu\text{L}$  de agua de tipo 1 y se le añade 5  $\mu\text{L}$  del tampón de reacción 10x suministrado junto con la enzima.
2. Se añaden 5  $\mu\text{L}$  de dNTP Mix (que contiene una mezcla de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato a una concentración 0,5 mM cada uno) y 0,5  $\mu\text{L}$  (2 unidades) del fragmento *Klenow* de la ADN Polimerasa I. Se mezcla y se deja incubando a 37°C durante 5 minutos.
3. Pasados los 5 minutos se inactiva la enzima por incubación a 65°C durante 10 minutos.
4. Se elimina la enzima mediante extracción fenólica y se precipita el ADN con 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M pH 5,2 y dos volúmenes y medio de etanol absoluto frío durante dos horas a -20°C.
5. Finalmente se centrifuga a 13200 rpm y 4°C durante 30 minutos, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el ADN en 20  $\mu\text{L}$  de agua de tipo 1.

##### - *Ligación de fragmentos de ADN*

Las uniones covalentes entre fragmentos de ADN y vectores de clonación se realizaron en volúmenes de 10-20  $\mu\text{L}$ . Para ello se utilizó la ligasa de ADN del fago T4, junto con el tampón suministrado por el proveedor. La relación entre la cantidad de vector e inserto utilizada varió dependiendo del experimento; normalmente se utilizó una relación inserto:vector de 7:1, pero en el caso de ligaciones más complicadas, se puede favorecer la eficiencia aumentando la relación inserto:vector. En lo referente a la temperatura y el tiempo de incubación, también existen variaciones; para el caso de ligaciones de extremos romos, las incubaciones se realizaron durante una hora a temperatura ambiente, y luego toda la noche a 4°C; cuando los extremos eran cohesivos, las incubaciones se realizaron toda la noche a temperatura ambiente. Las nuevas moléculas generadas durante este proceso fueron

posteriormente transformadas en la cepa de *E. coli* adecuada, como se describe en el apartado 2.7.2.2. de los Materiales y Métodos.

***Protocolo para ligación de fragmentos de ADN***

1. Se mezcla en un microtubo entre 50 y 100 ng del ADN vector con la cantidad de ADN inserto adecuada determinada previamente.
2. Se añade el agua de tipo 1 necesaria para alcanzar un volumen final de reacción de 10 µL, y se calienta la mezcla a 65°C durante 15 segundos, con el fin de relajar las moléculas de ADN.
3. Se enfria en hielo y se le añade 1 µL del tampón de ligación 10x suministrado con la enzima, junto con 1 µL de ADN ligasa del fago T4.
4. Se incuba de acuerdo con las condiciones citadas anteriormente, tras lo cual se puede guardar a -20°C hasta el momento de realizar la transformación.

**2.6.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Existen distintas enzimas ADN polimerasa termoestables que se pueden emplear en reacciones de PCR, y cuyo uso depende de la fidelidad requerida y del tamaño del fragmento de ADN que queremos amplificar. En nuestro caso se emplearon dos distintas:

- *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* de Promega: se utiliza para la amplificación de ADN donde no importa la presencia de errores (tiene una tasa de error de  $2,28 \times 10^{-5}$ ), teniendo un tamaño máximo de amplificación de 4 Kb. La enzima es una modificación de la *Taq* polimerasa que carece de la actividad exonucleasa 5' → 3'. En los extremos añade colas de poli-A. Viene junto a dos tampones: 5x *Green GoTaq® Reaction Buffer* y 5x *Colorless GoTaq® Reaction Buffer*, que pueden ser utilizados indistintamente. Las reacciones se preparan siguiendo esta relación:

	<b>Volumen</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
<b>tampón 5x</b>	10 µL	1X	95° C	5 minutos	1
<b>MgCl<sub>2</sub> 25 mM</b>	7 µL	3,5 mM	95° C	40 segundos	30
<b>dNTPs (2 mM)</b>	5 µL	0,2 mM	Tm <sup>2</sup>	40 segundos	
<b>Oligonucleótidos (20 µM)</b>	2,5 µL c.u. <sup>1</sup>	1 µM	72° C	1 min/1Kb	
<b>DMSO</b>	2,5 µL	5%	72° C	5 minutos	1
<b>ADN molde</b>	--	<0.5µg/50µL	4° C	--	
<b>enzima (5U/µl)</b>	0,25 µL	0,025 U/µL	<sup>1</sup> c.u.: cada uno		
<b>agua</b>	Hasta un volumen final de 50 µL		<sup>2</sup> Tm: temperatura de anillamiento		

- *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* de Finnzymes: esta ADN polimerasa es una enzima de tipo *Pyrococcus* junto a un dominio con una procesividad mejorada. Genera fragmentos de ADN amplificados largos con alta fidelidad y rapidez. Presenta una tasa de error de  $4,4 \times 10^{-7}$  (es decir 1 error por  $4,4 \times 10^7$  nucleótodos copiados). Contiene las actividades 5'→3' ADN polimerasa y 3'→5' exonucleasa. Viene provista con dos tampones de reacción: HF y GC. Aunque la tasa de error de esta enzima es inferior al emplear el tampón HF, el tampón GC puede mejorar el rendimiento con ADN molde de secuenciación difícil (como son los ADN ricos en secuencias GC o con estructuras secundarias).

	Volumen	Concentración final	Temperatura	Tiempo	Ciclos
tampón 5x	10 µL	1X	95° C	5 minutos	1
dNTPs (2 mM)	5 µL	0,2 mM	95° C	40 segundos	30
Oligonucleótidos (20 mM)	1,3 µL c.u. <sup>1</sup>	0,5 µM	Tm <sup>2</sup>	40 segundos	
DMSO	2,5 µL	5%	72° C	30 seg/1Kb	
ADN molde	--	1 pg - 10 ng por 50 µL	72° C	5 minutos	
enzima (2U/µl)	0,5 µL	0,02 U/µL	4° C	--	
agua	Hasta un volumen final de 50 µL		<sup>1</sup> c.u.: cada uno <sup>2</sup> Tm: temperatura de anillamiento		

### **2.6.4. Hibridación de ADN (método de Southern)**

#### **2.6.4.1. Transferencia de ADN a membranas de nylon**

El primer paso para la hibridación de fragmentos de ADN es la separación de esos fragmentos mediante electroforesis en un gel de agarosa, según se indica en el apartado 2.6.2 de los Materiales y Métodos. Una vez separados los fragmentos de ADN se transfieren a membranas de nylon (*Hybond-N®*, Amersham), utilizando un sistema de vacío (*VacuGene XL*, Pharmacia), mediante el siguiente protocolo:

#### ***Protocolo para la transferencia de ADN a membranas de nylon***

1. Primeramente se analiza el gel con el ADN mediante tinción convencional con bromuro de etidio y se fotografía.
2. Mientras se lleva a cabo la tinción se corta una membrana de nylon (*Hybond-N®*, Amersham) de las mismas dimensiones que el gel de agarosa. Se trata la membrana con agua de tipo 1 y se coloca en la unidad de transferencia, por debajo de la máscara de plástico que se ajuste al tamaño de nuestro gel de agarosa, de modo que esta máscara solape con la membrana unos 5 mm por cada lado.
3. Una vez teñido y fotografiado, se coloca el gel sobre la membrana, empezando por uno de los lados, y dejándolo caer lentamente, para evitar que se formen burbujas

entre ambos. Se conecta el vacío, manteniéndolo aproximadamente en 50 milibares. Si el gel de agarosa no es capaz de hacer vacío por si solo es necesario sellar los bordes añadiendo agarosa fundida en TAE 1X.

4. Se cubre la superficie del gel con solución despurinizante, y se incuba durante 15-20 minutos (o hasta que el azul de bromofenol del tampón de carga cambie a color amarillo).
5. Se retira la solución despurinizante y se vuelve a cubrir la superficie del gel con solución desnaturalizante. Se incuba durante 15-20 minutos; tras los cuales se retira la solución como en el paso anterior.
6. Se cubre la superficie del gel con solución neutralizante y se deja transcurrir otros 15-20 minutos; posteriormente se elimina la solución.
7. Para finalizar la transferencia, se cubre la superficie del gel con SSC 20x durante una hora. Pasado ese tiempo, se elimina toda la solución, se marcan la posición de los pocillos del gel sobre la membrana y se separan el gel y la membrana de la unidad de transferencia. El gel puede volver a teñirse con bromuro de etidio para comprobar que el proceso de transferencia ha sido eficiente.
8. Se coloca la membrana sobre papel Whatman™ 3MM (con el lado en el que están marcados los pocillos hacia arriba), y antes de que se seque, se fija el ADN a la membrana de nylon mediante luz ultravioleta, en un *Stratalinker® UV Crosslinker* de Stratagene (120 milijulios/cm<sup>2</sup>, 254 nm de longitud de onda).
9. Se lava la membrana durante 10 minutos con SSC 2x. La membrana ya está lista para ser sometida al proceso de hibridación (apartado 2.6.4.3 de los Materiales y Métodos). Si no se va a seguir procesando en el momento, se puede guardar a 4°C hasta el momento de su uso.

- Solución despurinizante: HCl 0,25 M. Guardar a temperatura ambiente hasta un máximo de un mes.
- Solución desnaturalizante: NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M. Guardar a temperatura ambiente (tres meses como máximo).
- Solución neutralizante: NaCl 1,5 M; Tris-HCl 1,5 M; ajustar el pH a 7,5 con HCl concentrado. Guardar a temperatura ambiente hasta un máximo de tres meses.
- SSC 20x: NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M; pH 7,0. Guardar a temperatura ambiente hasta un máximo de tres meses.

### 2.6.4.2. Marcaje de las sondas de hibridación

Para el marcaje de las sondas de ADN se utilizó una técnica de marcaje no radiactivo, que incorpora en el ADN un análogo de nucleótidos, la digoxigenina-11-dUTP. La digoxigenina es un hapteno esteroide, que se une al nucleótido trifosfato d-UTP por un enlace éster. Las sondas se marcan por un método basado en la unión de oligonucleótidos a la sonda de forma aleatoria (iniciación al azar o *random primed*) y su posterior extensión por el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*. El protocolo de marcaje utilizado fue el siguiente:

*Protocolo para el marcaje de sondas de ADN*

1. Se toma 1  $\mu\text{g}$  del ADN que va a ser utilizado como sonda y se lleva a 15  $\mu\text{L}$  de agua de tipo 1.
2. Se desnaturaliza el ADN en un baño de agua hirviendo (o en un termomezclador a 95° C) durante 15 minutos, e inmediatamente poner en hielo.
3. Se añaden 2  $\mu\text{L}$  de *DIG-DNA Labelling Mix 10x* y 2  $\mu\text{L}$  de *Hexanucleotide Mix 10x*, además de 1  $\mu\text{L}$  del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I (5 u/ $\mu\text{L}$ ). Se mezcla bien y se deja incubando durante 12-20 horas a 37°C.
4. Finalmente se para la reacción añadiendo 2  $\mu\text{L}$  de EDTA 0,2 M pH 8,0 (paso opcional).
5. Esta la sonda marcada se conserva a -20°C hasta el momento de su uso.

- *DIG-DNA Labelling Mix 10x*: reactivo comercial (Roche Diagnostics GmbH) para el marcaje de las sondas con digoxigenina, cuya composición es: dATP 1 mM, dCTP 1 mM, dGTP 1 mM, dTTP 0,65 mM; DIG-dUTP 0,35 mM.

En este proceso, la cadena sintetizada incorpora moléculas de digoxigenina en forma de DIG-11-dUTP, en una proporción de una cada 20-25 nucleótidos. Posteriormente, las moléculas de digoxigenina se detectan con anticuerpos anti-digoxigenina, que a su vez están conjugados con la enzima fosfatasa alcalina, mediante quimioluminiscencia (se aporta un sustrato para la fosfatasa alcalina, que al ser degradado por ella genera luz).

#### 2.6.4.3. Hibridación y detección

Una vez transferido y fijado el ADN a la membrana de nylon, y marcada la sonda que queremos utilizar, se realiza la hibridación. El proceso de hibridación se puede dividir en cuatro etapas diferentes: prehibridación, hibridación, lavados y detección.

1. *Prehibridación*: la finalidad de este paso es bloquear los sitios activos de la membrana donde no se ha unido ADN durante la transferencia, para evitar la unión inespecífica de la sonda a esos sitios. Además permite equilibrar la membrana con el tampón de hibridación.
2. *Hibridación*: en este paso se produce la unión de la sonda marcada con el ADN fijado en la membrana. La especificidad de la unión dependerá tanto de las condiciones de incubación (temperatura, concentración de sales y detergentes en el tampón de hibridación) como de las de los lavados posteriores.
3. *Lavados*: permiten eliminar las uniones inespecíficas que se hayan producido entre la sonda y los ácidos nucleicos. Para reducir en lo posible esas uniones inespecíficas, se puede aumentar la temperatura de los lavados, bajar la concentración de sales o aumentar la concentración de detergentes en el tampón de lavado.
4. *Detección*: tras los lavados se detectan las bandas donde se ha producido la unión específica de la sonda con los ácidos nucleicos mediante autorradiografía.

*Protocolo para la hibridación y detección de ADN*

1. Se introduce la membrana en un tubo de hibridación y se añade tampón de hibridación. Se cierra el tubo herméticamente, y se sitúa en un horno de hibridación precalentado a la temperatura adecuada. Se mantiene girando en el horno de hibridación un mínimo de dos horas.
2. Se desnaturaliza la sonda, marcada y disuelta en solución de prehibridación, en un baño de agua hirviendo durante 15 minutos (o en su defecto en un termomezclador a 95° C), e inmediatamente se pone en hielo.
3. Acto seguido, se eliminarla solución de prehibridación y se sustituye por la sonda desnaturalizada. Se vuelve a cerrar el tubo y se coloca de nuevo en el horno de hibridación. La hibridación debe durar un mínimo de 6 horas.
4. Se recuperar la sonda pasado el periodo de hibridación, recogéndola a un tubo estéril, y se conserva a -20°C para ser reutilizada.
5. Se lava dos veces la membrana con la solución I durante 5-10 minutos y a temperatura ambiente.
6. Se lava la membrana una vez con la solución II, durante 15 minutos y a la temperatura de hibridación.
7. Se equilibra durante 1 minuto con *washing buffer*. El filtro puede quedar sumergido en esta solución si no se va a seguir procesando.
8. Se lava la membrana durante 30 minutos con *blocking solution*.
9. Se lava otros 30 minutos con *blocking solution* con anticuerpo al 1:10000.
10. Se hacen 2 lavados de 15 minutos con *washing buffer*.
11. Se equilibra durante 5 minutos con solución III.
12. Se incuba la membrana en oscuridad con una solución de CDP-Star® (sustrato quimioluminiscente de la fosfatasa alcalina, Roche Diagnostics GmbH) 1:1000 en solución III durante 5 minutos, y a continuación exponer durante 5-15 minutos sobre un film de autorradiografía (*Hyperfilm™ ECL*, de GE Healthcare).
13. Se lava el film de autorradiografía con la solución de revelado. Una vez que aparezcan la señal de las bandas de hibridación se pasa el film a la segunda solución, la de paro. En este paso hay que tener cuidado para que el film no se queme con la sobreexposición a la solución de revelado.
14. Se lava el film revelado con la solución de paro durante 2 ó 3 minutos. Posteriormente se pasa el film a la solución de fijación otros 2 ó 3 minutos.
15. Para finalizar se lava el film con agua para eliminar los restos de solución de fijación y se deja secar.

- Tampón de hibridación: SSC 5x, N-lauril sarcosina 0,1% (p/v), SDS 0,02% (p/v), *Blocking reagent* 1% (p/v).
- Solución I: SSC 2x, SDS 0,1% (p/v).
- Solución II: SSC 0,1x, SDS 0,1% (p/v).
- Washing buffer: ácido maleico 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5; Tween 20 0,3% (v/v)
- Blocking solution: ácido maleico 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 con *blocking reagent* al 1% (p/v). El anticuerpo empleado para la detección de la digoxigenina

presente en la sonda marcada es de Roche Applied Science (*Anti-digoxigenin-AP Fab fragments*), añadiéndose 5 µl de anticuerpo por cada 50 mL de *blocking solution*.

- Solución III: Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM.
- Solución de revelado: revelador Kodak Professional HC-110, se prepara un volumen de stock y 30 volúmenes de agua.
- Solución de paro: ácido acético al 3%.
- Solución de fijación: fijador AGEFIX B&W, se prepara 1 volumen de stock y 3 volúmenes de agua.

Este sistema de hibridación permite reutilizar las membranas: esto nos permite, por ejemplo, hibridar la misma membrana con dos sondas diferentes, o bien con la misma sonda pero a dos temperaturas diferentes, sin tener que repetir los pasos de electroforesis y transferencia del ADN. Para ello es necesario eliminar la sonda unida a la membrana, lo que se realiza del siguiente modo:

#### ***Protocolo para eliminar la sonda unida al ADN tras la hibridación***

1. Tras los pasos de hibridación y detección, se sumerge la membrana en agua de tipo 1 durante unos minutos.
2. Se realizan dos lavados de 20 minutos de duración cada uno con *stripping solution*, a 37°C y con agitación.
3. Por último, lavar la membrana con SSC 2x durante 10 minutos. La membrana puede ser reutilizada inmediatamente, comenzando por el paso de prehibridación. Si no se va a utilizar en el momento, se guarda a 4°C.

- Stripping solution: SDS 0,1 %, NaOH 0,2 N.

#### **2.6.4.4. Análisis bioinformático de las hibridaciones tipo *Southern***

El análisis de las hibridaciones tipo *Southern* para determinar el número de copias presentes en cada cepa se llevo a cabo mediante el programa Gel-Pro Analyzer 4.0 (Media Cybernetics, L.P. 1996-2000).

#### **2.6.5. Secuenciación de ADN**

La secuenciación de fragmentos de ADN se llevó a cabo por el servicio de Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de León (Inbiotec). Las secuencias de nucleótidos obtenidas se analizaron mediante el uso de los programas del paquete informático Lasergene v7.1 (DNASTAR, Inc., 1997-2006) y Vector NTI 11.0 Advance (Invitrogen Corp. 2008).

## 2.7. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ARN

### 2.7.1. Aislamiento de ARN

Para el aislamiento de ARN a gran escala de *X. dendrorhous* se empleó una variante del protocolo propuesto por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski y Sacchi, 1987):

#### ***Protocolo para la extracción de ARN total de X. dendrorhous***

1. Se crece el hongo durante 48 horas en 100 mL y se recogen las células. Se lava con NaCl 0,9% y se congela a -80°C.
2. El micelio se rompe en un mortero con N<sub>2</sub> líquido (se limpia con etanol y cloroformo) hasta reducirlo a polvo. Se recoge en un eppendorf de 2 mL hasta la marca de 0,5 mL.
3. Se añaden 1,3 mL de tampón EFA y se homogeneiza en vórtex durante 1 minuto. Se deja en hielo hasta tener todas las muestras preparadas (todo el proceso se lleva a cabo en hielo).
4. Se centrifuga a 13200 rpm a 4°C durante 5 minutos.
5. Se recoge el sobrenadante y se añaden 130 µL de CIA. Los tubos se agitan enérgicamente durante 15 segundos.
6. Se centrifuga a 13200 rpm durante 5 minutos a 4°C y se recoge la fase acuosa (superior).
7. Se añade 0,5 volúmenes de LiCl 8 M y se mantiene a 4°C un mínimo de 30 minutos. Se observará un gran precipitado blanco. Se puede dejar toda la noche a 4°C.
8. Se centrifuga a 13200 rpm a 4°C durante 15 minutos y se elimina con una pipeta el líquido, con cuidado de no arrastrar el precipitado.
9. Se añade 1 mL de etanol 70% (v/v), homogeneizando suavemente hasta que el precipitado se resuspende y sólo se observan hebras de ácido nucleico en la suspensión.
10. Se centrifuga 5 minutos a 13200 rpm y se vuelve a lavar con 400 µL de etanol 70%. Se vuelve a centrifugar.
11. Se elimina el etanol con la pipeta y se deja secar el precipitado en hielo. Se resuspende en 30-50 µL de **agua de tipo 1 estéril 2x** (esterilizada 2 veces).

- Tampón de extracción: isotiocianato de guanidinio 4 M; lauril sarcosina 0,5 M; citrato sódico 25 mM pH 7,0.
- Tampón EFA: 1 ml tampón de extracción; 0,7 µl de β-mercaptoetanol; 1 mL fenol.

Se puede visualizar la integridad del ARN extraído visualizándolo en un gel de agarosa normal, pero recién preparado y corriéndolo en tampón TAE limpio. Se deja correr poco tiempo y se tiñe con bromuro de etidio, también durante poco tiempo.

Para comprobar la pureza y la concentración se utiliza el espectrofotómetro NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000:

- D.O. 260 nm indica la concentración: 1 D.O. equivale a 40 µg de ARN
- D.O. 260/280 nm muestra el grado de contaminación por proteínas. Debe ser mayor o igual a 2.
- D.O. 260/230 nm revela la contaminación por compuestos orgánicos. Se situará en torno a 2.

**2.7.2. Retrotranscripción de ARN y amplificación por PCR (RT-PCR)**

Previamente a la utilización del ARN en la técnica de retrotranscripción es necesario realizar un tratamiento con ADNasa para evitar una posible contaminación por ADN que origine falsos resultados.

**2.7.2.1. Eliminación de contaminación por ADN**

Siguiendo el protocolo que nos proporciona la casa comercial proveedora de la ADNasa (en este caso se emplea *RQ1 RNase-Free DNase* de Promega), se realiza el tratamiento a 1 µg de ARN:

- ARN 1-8 µL
- *RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer* 1µL
- *RQ1 RNase-Free DNase* 1u/µg RNA
- MQ libre de ARNasa hasta un volumen final de 10µL

Se incuba a 37° C durante 30 minutos. Posteriormente se añade 1 µL de la *Stop Solution* para finalizar la reacción. Se deja 10 minutos a 65° C para desactivar la ADNasa.

**2.7.2.2. RT-PCR**

Para realizar la síntesis del ADN complementario al ARN mensajero y su posterior amplificación se utilizó el sistema comercial *SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq* de Invitrogen. Este sistema comercial contiene una mezcla de *SuperScript™* Transcriptasa Reversa y de *Platinum® Taq* ADN polimerasa, de forma que la transcripción reversa se encuentra acoplada a la amplificación por PCR sin pasos adicionales.

La mezcla de la reacción y el programa de temperaturas fueron los siguientes:

Componente	Cantidad	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Reaction Mix 2x</b>	10 µL	50° C	30 minutos	1
<b>Oligonucleótidos (20 µM)</b>	0,4 µL c.u. <sup>1</sup>	94° C	2 minutos	1
<b>RT/Platinum Taq Mix</b>	0,4 µL	94 ° C	30 segundos	15-35
<b>ARN libre de ADN</b>	20 ng	Tm	30 segundos	
<b>MQ</b>	<b>Vf = 20 µL</b>	72° C	1 minuto por Kb	
<sup>1</sup> c.u.: cada uno		72 °C	5 minutos	1
Tm: temperatura de anillamiento		4°C	--	

Siempre que se realizaba una reacción de RT-PCR se pone un control negativo, poniendo en paralelo una reacción de PCR con el sistema comercial *GoTaq*<sup>®</sup> *DNA Polymerase* de Promega. Cuando simplemente se quiere ver si existe transcrito, la reacción de RT-PCR se visualiza a tiempo final (ciclo 35). Sin embargo, cuando se quieren detectar diferencias se realiza una RT-PCR semicuantitativa tomando alícuotas en los ciclos 15, 20, 25, 30 y 35. Como control de los niveles de transcripción se utilizó el gen de la actina de *X. dendrorhous*, amplificado con los cebadores ActF y ActR que hibridan en el exón 5 de dicho gen.

## 2.8. TRANSFORMACIÓN DE MICROORGANISMOS

### 2.8.1. Transformación de *Xanthophyllomyces dendrorhous*

Para la transformación de *X. dendrorhous* se siguió el protocolo de electroporación descrito por Wery y colaboradores (1998).

#### *Protocolo para la transformación de X. dendrorhous*

1. A partir de un cultivo en medio líquido de *X. dendrorhous*, se inoculan cuatro matraces de fondo liso de 500 mL de capacidad, con 100 mL de medio YM líquido cada uno, y se incuban en un agitador orbital a 21°C y 220 rpm, durante un máximo de 24 horas, hasta que uno de ellos alcance una densidad óptica a 600 nm de 1,2.
2. El cultivo seleccionado se recoge en un tubo GSA, y se centrifuga a 4000 rpm y 21°C durante 10 minutos.
3. Se elimina el sobrenadante y se resuspenden las células en 12,5 mL de tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,0; suplementado con ditioneitol (DTT) a una concentración final 25 mM. Se incuban durante 15 minutos a 21°C y a 200 rpm.
4. Se recogen las células mediante centrifugación a 4000 rpm y 21°C durante 10 minutos. Los siguientes pasos se realizan a 4°C en un baño de agua- hielo, utilizando materiales y soluciones previamente enfriadas.
5. Las células se resuspenden mediante agitación suave en 12,5 mL de solución STM, y se centrifugan a 4000 rpm durante 10 minutos; este lavado se repite una vez más.
6. Finalmente las células se resuspenden en 500 µL de solución STM.
7. Para cada experimento de electroporación se utilizan 100 µL de células, que se mezclan con un máximo de 5 µg de ADN (el volumen de ADN no debe superar los 5 µL), y se dejan en hielo durante 5 minutos. La mezcla se transfiere a una cubeta de electroporación (gap 2mm) previamente mantenida en hielo. Las condiciones de electroporación son 50 µF, 600 Ω y 800 V.
8. Tras la electroporación, las células se incuban dos minutos en hielo, se resuspenden en 1,5 mL de medio YM, y se incuban a 21°C y 200 rpm durante 3 horas. Acto seguido se plaquean en YM o YPD suplementados con higromicina a una concentración de 10-15 µg/mL.
9. Las placas se incuban durante 5 días a 21°C para permitir el crecimiento de los transformantes.

- Solución STM: sacarosa 270 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,0; MgCl<sub>2</sub> 1mM.

## **2.8.2. Transformación de *Escherichia coli***

### 2.8.2.1. Preparación de células competentes de *E. coli*

El protocolo seguido para inducir el estado de competencia en *E. coli* fue el descrito por Inoue y colaboradores (1990):

#### ***Protocolo para la obtención de células competentes de E. coli***

1. Se siembra una placa de medio LB con la cepa de *E. coli* que va a ser utilizada como receptora en la transformación, de modo que se obtengan colonias aisladas, y se incuba a 37°C durante 12-14 horas.
2. Se inoculan 100 ml de medio SOB, en un matraz de 500 mL de capacidad, con una de las colonias de *E. coli*, y se incuba a 37°C durante 6-8 horas (preinóculo).
3. Se preparan 6 matraces de fondo liso de 500 mL de capacidad con 100 mL de medio SOB cada uno; se inoculan (por duplicado) con 2,5, 5 y 10 mL del preinóculo. Los cultivos se incuban a 18°C y 200 rpm durante toda la noche.
4. A la mañana siguiente se mide la densidad óptica a 600 nm de los cultivos, hasta que uno de ellos alcance un valor entre 0,2 y 0,4. En ese momento el matraz se pone en un baño de agua-hielo (4°C) y se mantiene así durante 20 minutos.
5. El cultivo se transfiere a un tubo GSA frío (previamente mantenido a -20°C) y se centrifuga a 3000 rpm y 4°C durante 10 minutos.
6. Se elimina el medio de cultivo, aspirando con una micropipeta los restos que puedan quedar, y se resuspenden las células en 32 mL de solución de Inoue fría (mantenida a 4°C) con agitación suave y manteniendo su temperatura en torno a los 4°C (en un baño de agua-hielo).
7. A continuación se centrifugan como en el paso 5, y se elimina completamente el sobrenadante.
8. Se resuspenden las células en 8 mL de solución de Inoue fría (mantenida a 4°C) con agitación suave y manteniendo su temperatura en torno a los 4°C (en un baño de agua-hielo).
9. Una vez resuspendidas completamente las células, se añaden 600 µL de DMSO y se mezcla con agitación suave, sin retirar del baño de agua-hielo. Se mantiene en reposo y a 4°C durante 10 minutos.
10. La suspensión celular se reparte en alícuotas de 100 µL en tubos eppendorf (mantenidos previamente a -20°C), que se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido, y se guardan a -80°C hasta el momento de su uso.

- Solución de Inoue: MnCl<sub>2</sub> 55 mM, CaCl<sub>2</sub> 15 mM, KCl 250 mM, PIPES pH 6,7 10 mM. PIPES: piperazine-1,2-bis [2-ethanesulfonic acid] 0.5 M; se ajusta el pH a 6,7 con KOH 5 M y se esteriliza por filtración; se reparte en alícuotas y se guarda a -20°C.

### 2.8.2.2. Procedimiento de transformación de *E. coli*

El protocolo de transformación de las células competentes de *E. coli* que se siguió fue el descrito por Hanahan (1983).

#### ***Protocolo para la transformación de células competentes de E. coli***

1. Se descongela un vial de células competentes (100  $\mu$ L) en un baño de agua-hielo, se mezclan 50-100  $\mu$ L de la suspensión bacteriana con el ADN (el volumen de la solución de ADN no debe superar el 10% del volumen de células utilizadas), y se mantiene en hielo durante 30 minutos.
2. Se somete la mezcla a un choque térmico por inmersión en un baño a 42°C durante 90 segundos, y rápidamente se coloca de nuevo en hielo, donde se deja 2-3 minutos.
3. Se añaden 800  $\mu$ L de medio LB, y se incuba a 37°C y 220 rpm durante una hora, para permitir a las células que incorporen el plásmido expresar la resistencia al antibiótico utilizado como marcador de selección.
4. Se siembran alícuotas en placas de medio LB, suplementado con el antibiótico necesario para la selección de los transformantes a la concentración adecuada.
5. Se incuba a 37°C hasta que aparezcan los transformantes (12-16 horas).

## 2.9. ANÁLISIS DE PIGMENTOS

### 2.9.1. Extracción de pigmentos de *Xanthophyllomyces dendrorhous*

Para la extracción de pigmentos de *X. dendrorhous* se siguió una modificación del protocolo descrito por An y colaboradores (2001):

#### ***Protocolo para la extracción de pigmentos de X. dendrorhous***

1. El cultivo se realiza en matraces lisos de 500 mL de capacidad, con 100 mL de medio YM, que se inoculan con una colonia individual, procedente de un cultivo fresco en medio sólido, de la cepa a analizar. Los cultivos se incuban en un agitador orbital a 21°C y 220 rpm durante 96 horas.
2. Para realizar la extracción, se toman 2 mL del cultivo, y se recogen las células mediante centrifugación a 4800 rpm durante 5 minutos.
3. A continuación se realizan dos lavados con 1 mL de acetona y 1 mL de agua destilada resuspendiendo las células y centrifugando de nuevo en las mismas condiciones que en el paso anterior.
4. Una vez eliminado el sobrenadante, se añade 1 mL de bolas de vidrio (de 400-600  $\mu$ m de diámetro) y 1 mL de DMSO (precalentado a 60°C) para lisar las células. Se agita con vórtex durante 1 minuto, y se incuba durante 10 minutos a 60°C.
5. Se aplica de nuevo agitación durante 1 minuto, y acto seguido se añaden, de forma sucesiva 1 mL de acetona, 1 mL de n-hexano y 1 mL de NaCl al 20% (p/v). Se mezcla suavemente el contenido del tubo, procurando eliminar el gas que se forma. Posteriormente se agita con vórtex y se centrifuga a 4800 rpm durante 10 minutos para separar las fases.

6. Se recoge la fase superior (n-hexano), que contiene los pigmentos, y se pasa a un tubo eppendorf nuevo.
7. Para concentrar los pigmentos, el extracto se evapora a sequedad en el *speed-vac*. Los pigmentos se conservan secos y a -20°C hasta el momento de su uso.

### **2.9.2. Análisis de pigmentos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

El análisis de los carotenoides mediante HPLC se realizó a 474 nm, con una columna Nucleosil 100 NH<sub>2</sub> (5µm, 250 x 4.6 mm); la fase móvil utilizada fue acetato de etilo:n-hexano (80:20), con un flujo de 0,8 mL/minuto y una duración de 15 minutos.

Tanto los extractos como los patrones se resuspendieron en n-hexano:acetato de etilo, y los diferentes carotenoides se identificaron a partir del tiempo de elución, en comparación con los patrones usados.



## **Resultados y Discusión**



### 3.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES *KU70* Y *KU80* EN *X. dendrorhous*

La caracterización de las diferentes cepas de *X. dendrorhous* productoras de astaxantina requiere una manipulación eficiente de su genoma. Una forma de llevar a cabo dicha caracterización es mediante la interrupción o delección de los genes de interés a través de la construcción de un vector de interrupción génica y su posterior integración en el gen diana. La integración de fragmentos de ADN exógeno en un cromosoma requiere la reparación de las roturas de la doble cadena de ADN. En eucariotas se han identificado dos rutas por las que se realiza esta reparación: la recombinación homóloga y la recombinación por unión de extremos no homólogos (recombinación no homóloga). La recombinación homóloga genera integraciones específicas, siendo llevada a cabo en *S. cerevisiae* por el grupo de proteínas Rad52 (Krogh y Symington, 2004).

Dependiendo del organismo, la reparación de las roturas de la doble cadena de ADN se produce mayoritariamente a través de la recombinación de extremos no homólogos, generándose integraciones al azar. Este tipo de recombinación no homóloga está controlada por tres complejos proteicos (figura 3.1., Critchlow y Jackson, 1998; Pastwa y Blasiak, 2003):

- El complejo formado por el heterodímero Ku70/Ku80 (Hdf1 y Hdf2 en levaduras) y la subunidad catalítica de la ADN proteína quinasa (ADN-PKsc). El heterodímero es el detector primario de la rotura. Se une a los extremos del ADN, protegiéndolos de la degradación, alineándolos y preparándolos para la ligación. Así mismo recluta a DNA-PKsc, activando su función quinasa y cuyas proteínas sustrato no se han establecido todavía pudiendo ser el propio complejo Ku70/Ku80 o alguno de los otros dos complejos proteicos.
- El complejo MRX formado por Mre11, Rad 50 y Xrs2 es el encargado de realizar el procesamiento de los extremos de ADN para la posterior ligación mediante actividades nucleasa y polimerasa. Este complejo también participa en la recombinación homóloga.
- El complejo heterotrimérico ADN ligasa IV formado por Lig4-Lif1-Nej1 lleva a cabo a ligación de las roturas de ADN de doble cadena.

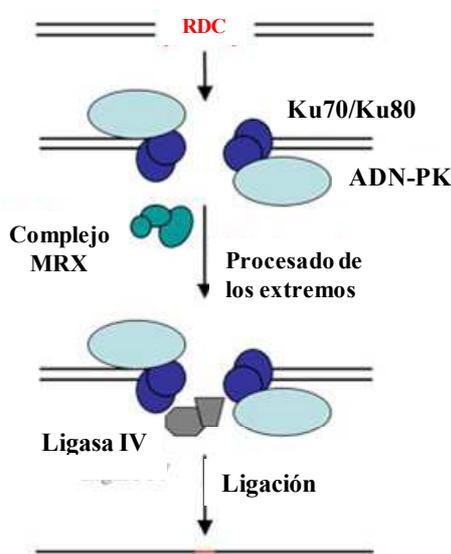


Figura 3.1. Esquema que representa las proteínas que intervienen en la reparación de una rotura de doble cadena de ADN. RDC: rotura de doble cadena.

En estudios recientes (de Boer *et al.*, 2010; Goins *et al.*, 2006; Ninomiya *et al.*, 2004; Pöggeler y Kück, 2006) se ha comprobado que la delección de los genes *ku70* y *ku80* provoca que la frecuencia de la recombinación homóloga aumente, como en el caso de *Aspergillus niger*, en el que la delección del gen *kusA* (homólogo de la proteína Ku70) hace que la eficiencia de la integración homóloga sea del 80% frente al 7% de la cepa silvestre (Meyer *et al.*, 2007).

Como el genoma de *X. dendrorhous* no está secuenciado, con el fin de identificar y posteriormente delecionar los genes *ku70* y *ku80* se buscó en las bases de datos las secuencias proteicas de los distintos genes homólogos clonados en diversos hongos basidiomicetos. De las bases de datos se seleccionaron las secuencias de los genes de *Coprinopsis cinerea*, *Cryptococcus neoformans*, *Laccaria bicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Ustilago maydis*. Una vez obtenidas las distintas secuencias proteicas de ambos genes se introdujeron en la aplicación online “Block Maker” ([http://blocks.fhcr.org/blocks/make\\_blocks.html](http://blocks.fhcr.org/blocks/make_blocks.html)). Esta aplicación alinea las secuencias de proteínas y encuentra bloques comunes dentro de cada proteína y entre los distintos organismos. Estos bloques son segmentos alineados y sin huecos que corresponden a las regiones altamente conservadas de las proteínas. Una vez obtenidos los bloques (figura 3.2. y 3.3.) se analizaron mediante la herramienta informática online CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers, <http://blocks.fhcr.org/blocks/codehop.html>). Esta aplicación online genera por traducción inversa oligonucleótidos, teniendo en cuenta el uso de codones del microorganismo elegido (en este caso *Ustilago maydis*, por ser el más parecido a *Xanthophyllomyces* de los existentes en la base de datos de la aplicación).

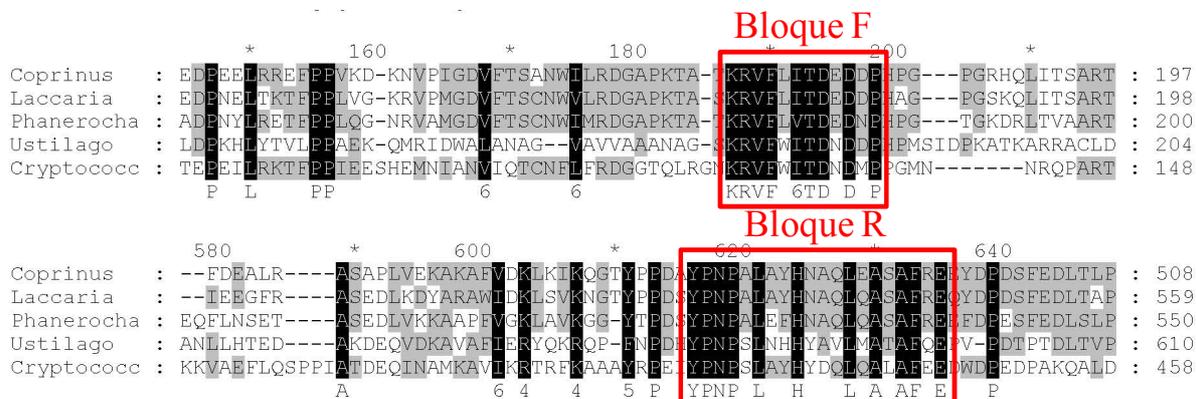


Figura 3.2. Representación gráfica parcial del alineamiento de la secuencia proteica de los genes KU70 de *C. cinerea*, *C. neoformans*, *L. bicolor*, *P. chrysosporium* y *U. maydis*. Los aminoácidos coloreados en negro son aquellos que presentan un porcentaje de conservación del 100%. Los aminoácidos coloreados en gris tienen un porcentaje de conservación del 90%. Los bloques a partir de los que se seleccionaron los oligonucleótidos están marcados con un recuadro rojo: el bloque F muestra la localización del oligonucleótido KU70FP, mientras que el bloque R corresponde al oligonucleótido KU70RP.

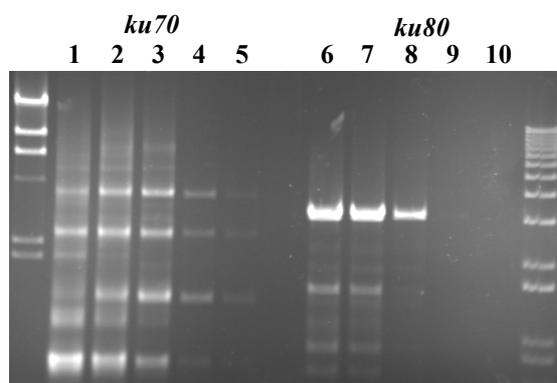
Los oligonucleótidos seleccionados a partir de los bloques obtenidos fueron:

Nombre	Secuencia	Tm (° C)
<b>KU70FP</b>	AAGCGGGTCTTCTGGRTNACN	62,8
<b>KU70RP</b>	GGTGGTTGAGGGCGGGRTTNG	73,3
<b>KU80F</b>	CGACTTCGACTTCCACCGCRM	69,6
<b>KU80R</b>	CGGGGTTGTAGGAGTCCCAGR	68,3



Figura 3.3. Representación gráfica de parte del alineamiento de la secuencia proteica de los genes KU80 de *C. cinerea*, *C. neoformans*, *L. bicolor*, *P. chrysosporium*, *U. maydis*. Los aminoácidos coloreados en negro son aquellos que presentan un porcentaje de conservación del 100%. Los aminoácidos coloreados en gris tienen un porcentaje de conservación del 90%. Los bloques a partir de los que se seleccionaron los oligonucleótidos están marcados con un recuadro rojo: el bloque F muestra la localización del oligonucleótido KU80F, mientras que el bloque R corresponde al oligonucleótido KU80R.

Una vez recibidos los oligonucleótidos se procedió a realizar una PCR con gradiente de temperatura empleando las enzimas “*GoTaq<sup>®</sup> Flexi DNA Polymerase*” y “*Phusion High-Fidelity DNA Polymerase*” y utilizando como ADN molde el ADN total de la cepa de *X. dendrorhous* CECT 11028 (figura 3.4.). Las bandas purificadas obtenidas de la amplificación con la enzima *GoTaq<sup>®</sup>* fueron clonadas en el pGEM<sup>®</sup>T-Easy puesto que esta enzima añade colas de poli-A en los extremos de los fragmentos amplificados. Sin embargo, dado que la enzima *Phusion* deja extremos romos, los fragmentos de ADN amplificados con esta enzima se clonaron en el vector pGEM<sup>®</sup>-5Zf digerido con la enzima de restricción *HincII* que deja extremos romos. Una vez seleccionados los clones se secuenciaron y se compararon con la base de datos. Las bandas clonadas no mostraron homología con ninguna secuencia KU70 o KU80 descrita (tabla 3.2.).



Genes	Gradiente de temperatura (° C)					
<i>ku70</i>	1	2	3	4	5	
	58	61,6	65,2	68,6	70	
	<i>ku80</i>	6	7	8	9	10
		55	56,4	59,8	63,4	66,9

Figura 3.4. Fotografía de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra los fragmentos de ADN generados al amplificar ADN total de *X. dendrorhous* CECT 11028. En la tabla se muestra el gradiente de las temperaturas de anillamiento empleado para realizar las reacciones de PCR.

Productos de PCR	Proteína	Organismo	% Identidad (n° de aminoácidos)
<i>ku70</i>	Fucosidasa	<i>Anolis carolinensis</i>	44 (32)
	Transportador de glicina tipo 2	<i>Mus musculus</i>	30 (66)
	Regulador transcripcional	<i>Gallus gallus</i>	46 (28)
	Proteína similar a proteínas diana de señalización lateral	<i>Medicago truncatula</i>	38 (69)
<i>ku80</i>	Proteína citoplásmica	<i>Cryptococcus neoformans</i>	73 (111)
	Glucósido hidrolasa	<i>Rhodotorula glutinis</i>	71 (111)

Tabla 3.2. Relación de las proteínas que presentan semejanza con las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de los diferentes fragmentos de ADN amplificados mediante PCR, usando como molde el ADNt de *X. dendrorhous* CECT 11028. Se indica también el organismo al que pertenece la proteína, así como el porcentaje aminoácidos idénticos (entre paréntesis se muestra el número de aminoácidos utilizado para realizar el cálculo del porcentaje de identidad).

Teniendo en cuenta que el mecanismo de reparación de roturas de doble cadena de ADN mediante la unión de extremos no homólogos está extendido en eucariotas, se descarta la ausencia de los genes *ku70* y *ku80* en *X. dendrorhous* como explicación de la no obtención de la secuencia de los genes. Si analizamos los espaciadores intergénicos (ITS 1 y 2) y el gen de ARN ribosomal 5,8S de los microorganismos utilizados para llevar a cabo la obtención de los oligonucleótidos observamos que el organismo utilizado como referencia en el uso de codones se encuentra alejado filogenéticamente de *Xanthophyllomyces*. Posiblemente este hecho haya provocado que los oligonucleótidos empleados no hayan sido lo suficientemente específicos para amplificar los genes *ku70* y *ku80*.

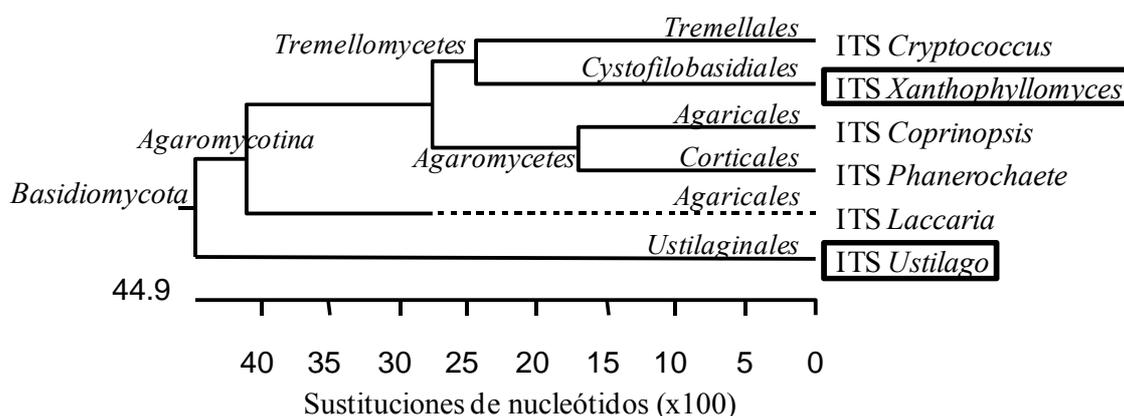


Figura 3.5. Árbol filogenético donde se muestran las relaciones taxonómicas basadas en los espaciadores intergénicos ITS 1 y 2 y el gen de ARN ribosomal 5,8S. Los organismos son: *Cryptococcus neoformans*, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Coprinopsis cinerea*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Laccaria bicolor*, y *Ustilago maydis*.

### 3.2. SOBREEXPRESIÓN DEL GEN *crtS* DE *Xanthophyllomyces dendrorhous* CON SU PROMOTOR NATIVO

El gen *crtS* interviene en la última etapa de la síntesis de astaxantina, siendo imprescindible su participación para la conversión de  $\beta$ -caroteno en astaxantina (Álvarez *et al.*, 2006). Con el fin de estudiar las vías para incrementar la producción de este compuesto se propuso elevar la expresión de este gen en las cepas existentes de *Xanthophyllomyces* aumentando el número de copias presentes. Para ello se utilizó como estrategia su integración a través del ADN ribosomal (ADNr): *X. dendrorhous* presenta más de 60 copias de estos genes distribuidos por el genoma. Al representar este ADN una diana ampliamente distribuida, la presencia de fragmentos de ADNr flanqueando un gen conlleva un incremento en la eficiencia de transformación, así como su integración en varias copias (Wery *et al.*, 1997). Por otra parte la interrupción de una o varias copias de estos genes ribosomales no afecta al desarrollo normal de *X. dendrorhous*.

#### **3.2.1. Construcción de los plásmidos pG5-*hph-crtS*-ADNr (+/-)**

Se partió de un plásmido existente en el laboratorio que contiene el gen *crtS* junto al gen de resistencia a higromicina *hph* (pG5-*hph-crtS*), y de otro plásmido que contiene los genes ribosomales (pG5-ADNr).

El plásmido pG5-*hph-crtS* es un vector creado en el laboratorio a partir de una construcción previa hecha en el vector pBGgHg. Para construir el plásmido pG5-*hph-crtS* primeramente se eliminó la proteína fluorescente verde (Gfp) del vector pBGgHg cortando el plásmido con la enzima de restricción *PvuII*. En su lugar se clonó el gen *crtS*, que fue obtenido por digestión del fago 160*crtS* (fago aislado en el laboratorio que contiene el gen *crtS* flanqueado por los genes *eph* [codifica una epóxido hidrolasa] y *obp* [codifica para una proteína de unión a oxisteroles]) con la enzima de restricción *PstI*. De los fragmentos generados por digestión del ADN fágico con la enzima de restricción *PstI* se extrajo el fragmento de 4 Kb, que es el que contiene el gen *crtS* completo y posteriormente se rellenó con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*. El plásmido pG5-*hph-crtS* es un pGEM<sup>®</sup>-5Zf en el que se clonó los genes *crtS* y *hph* en el sitio *EcoRV* a partir de los fragmentos amplificados por PCR empleando como molde de la construcción previa que contiene estos dos genes juntos y realizada en el vector pBGgHg (figura 3.6.).

El plásmido pG5-ADNr es también un vector creado en el laboratorio. Es un pGEM<sup>®</sup>-5Zf en el que se clonaron en el sitio *SalI* los genes ribosomales de *Xanthophyllomyces dendrorhous* por digestión con la enzima de restricción *SalI* del ADN total de *X. dendrorhous* CECT 11028.

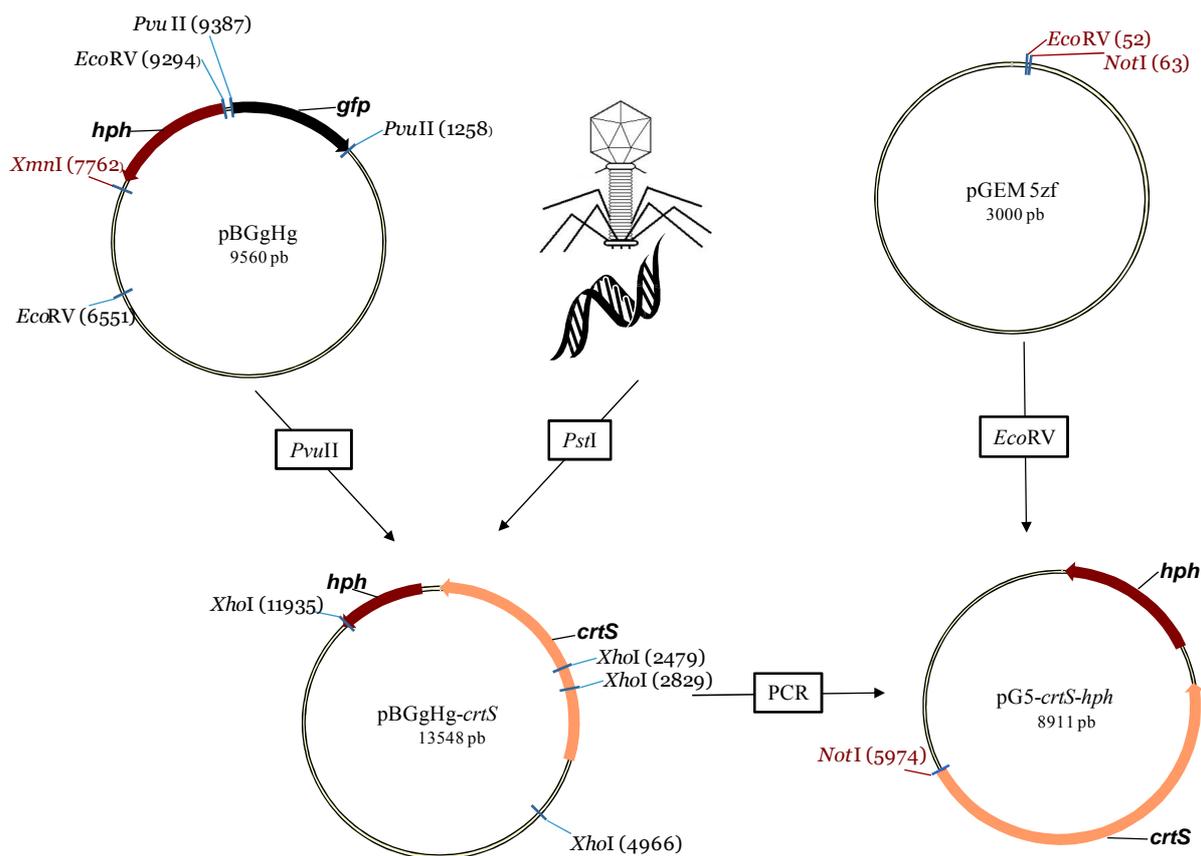


Figura 3.6. Representación gráfica del proceso de construcción del vector pG5-*crtS-hph* a partir del vector pBGgHg, ADN plasmídico y el vector pGEM<sup>®</sup>-5Zf. *hph*: higromicina fosfotransferasa, gen de resistencia a la higromicina. *gfp*: proteína fluorescente verde. *crtS*: gen implicado en la biosíntesis de astaxantina.

Por un lado se digirió el vector que contiene el gen *crtS* (pG5-*hph-crtS*) con *NotI* (tiene un corte único de forma que lineariza el vector) y se extrajo el ADN para posteriormente rellenar los extremos como se describe en el apartado 2.6.3.2.1 de Materiales y Métodos.

Por otro lado se digirió el plásmido que contiene los genes ribosomales (pG5-ADNr) con *SmaI*, obteniéndose 3 fragmentos de 6500, 4500 y 435 pb. Estos fragmentos de ADN se digirieron con *EcoRV*, obteniéndose a su vez fragmentos de 4500, 3000, 2100, 1800 y 435 pb. Se extrajo la banda de interés que presenta un tamaño de 2100 pb.

Estos dos fragmentos de ADN (el plásmido pG5-*hph-crtS* linearizado y rellenado, y el fragmento de 2100 pb procedente del ADN ribosomal de *X. dendrorhous*) se ligaron como se describe en el apartado 2.6.3.2. de Materiales y Métodos. Una vez obtenidas las construcciones (el fragmento de ADNr se clonó en los dos sentidos posibles: pG5-*hph-crtS*-ADNr +; pG5-*hph-crtS*-ADNr -), se comprobó mediante la digestión con distintas enzimas de restricción la correcta incorporación de los fragmentos de ADN. Finalmente para transformar por electroporación las dos cepas de *X. dendrorhous* disponibles (CECT 11028 y ATCC 96815) ambas construcciones fueron digeridas con la enzima de restricción *NruI* (figura 3.7.), que presenta un sitio de corte único localizado en el fragmento de ADNr de forma que al linearizar el vector los genes *crtS* y *hph* aparecen flanqueados por un fragmento de ADNr.

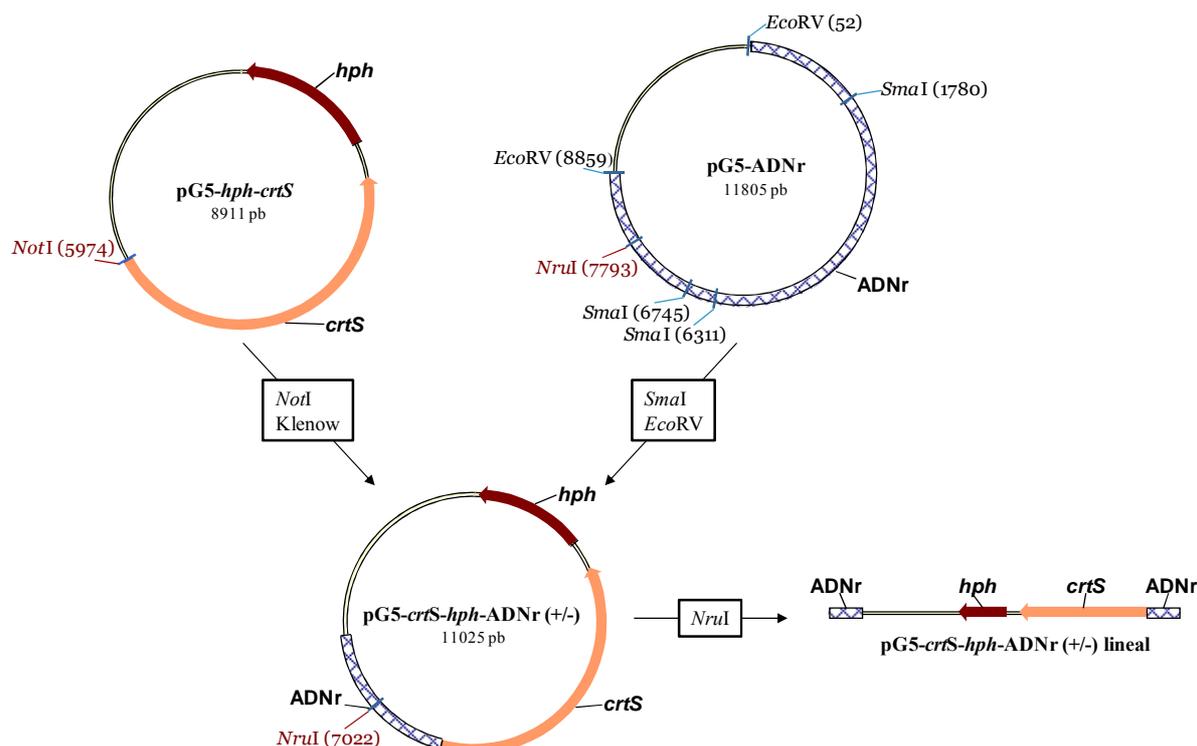


Figura 3.7. Representación gráfica de los vectores pG5-hph-crtS-ADNr (+/-). *hph*: higromicina fosfotransferasa, gen de resistencia a la higromicina; *crtS*: gen implicado en la biosíntesis de astaxantina; ADNr: fragmento de ADN ribosomal.

Como resultado de la electroporación con estas construcciones se obtuvieron colonias resistentes a higromicina. Estas colonias resistentes al marcador de selección se sembraron en medio YM sólido con higromicina y se cultivaron en medio líquido (sin antibiótico) para extraer ADN, ARN y pigmentos como se describió en los apartados 2.6.1.1. y 2.7.1. de Materiales y Métodos.

### 3.2.2. Verificación de los transformantes mediante hibridación del tipo “Southern”

Se realizaron hibridaciones del tipo “Southern” con los ADN totales de los transformantes para comprobar la correcta integración de la construcción. El ADN de los transformantes y el de la cepa silvestre se digirieron con varias endonucleasas de restricción (*Bam*HI, *Eco*RI y *Xho*I). Una vez transferido a la membrana de nylon, la hibridación se realizó con dos sondas distintas: se usó como sonda un fragmento interno de 485 pb del gen *crtS*, extraído del plásmido pG5-*crtS* (figura 2.2. de Materiales y Métodos) por digestión con la enzima de restricción *Spe*I (figura 3.8.). También se usó como sonda un fragmento interno de 600 pb del gen *hph*, extraído del plásmido pBGgHg por digestión *Eco*RV – *Eco*RI.

En la hibridación del tipo “Southern” de los ADN totales digeridos con *Bam*HI y utilizando la sonda del gen *crtS* visualizamos una banda correspondiente al gen silvestre (banda de 5,8 Kb) presente en todas las cepas analizadas, y una banda de 4,2 Kb correspondiente a la construcción y que únicamente aparece en las cepas que efectivamente han incorporado la construcción. El análisis de las bandas por densitometría con el programa Gel-Pro Analyzer 4.0 (apartado 2.6.4.4. de Materiales y Métodos) nos indica que la cantidad de copias extra existentes varía entre 4 y 9 copias dependiendo del transformante analizado.

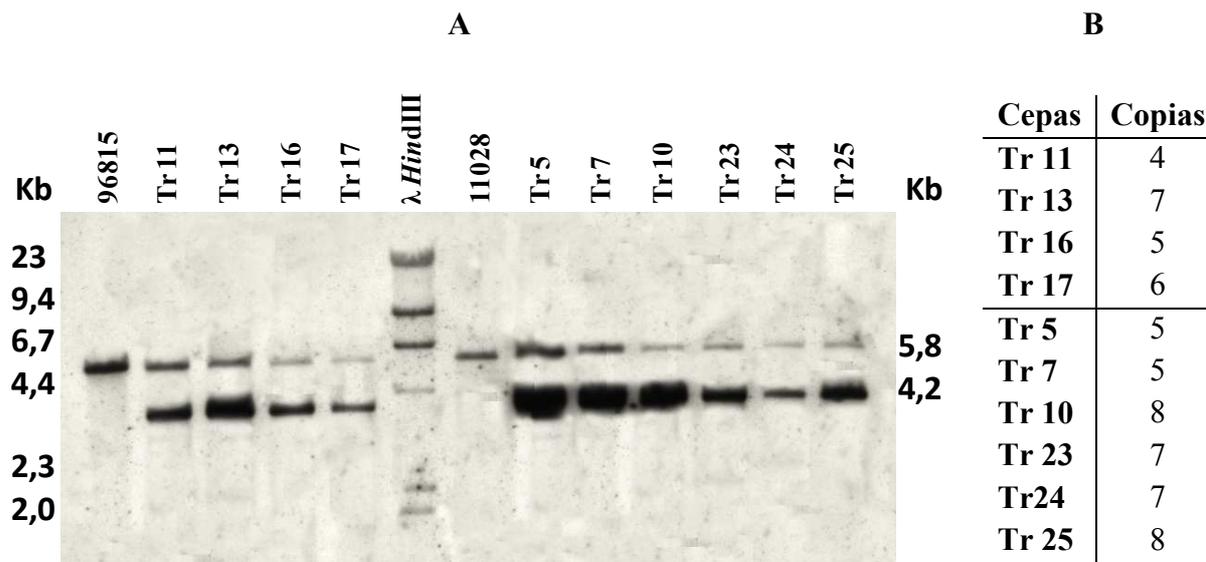


Figura 3.8. **A:** análisis mediante hibridación de tipo “Southern” de las cepas silvestre ATCC 96815 y CECT 11028, así como de los transformantes obtenidos con las construcciones pG5-*hph-crtS*-ADNr (+/-). Los ADNs totales se digirieron con la enzima de restricción *Xho*I. Se utilizó como sonda un fragmento interno del gen *crtS* (485 pb). La temperatura de hibridación es de 75° C. 96815 corresponde a la cepa ATCC 96815; 11, 13, 16 y 17 corresponden a transformantes derivados de la cepa ATCC 96815; 11028 corresponde a la cepa CECT 11028; 5, 7, 10, 23, 24 y 25 corresponden a transformantes derivados de la cepa CECT 11028. Se usó como marcador de peso molecular el ADN del fago  $\lambda$  digerido con *Hind*III marcado con digoxigenina de la casa comercial Roche. **B:** tabla con el número de copias extra del gen *crtS* en cada transformante en relación con la copia nativa. Tr es la abreviación de transformante.

### 3.2.3. Análisis transcripcional de la expresión del gen *crtS*

Se extrajo ARN total de todas las cepas transformantes así como de las dos cepas parentales a partir de cultivos crecidos durante 48 horas, tal y como se describe en el apartado 2.7.1. de Materiales y Métodos. Una vez cuantificadas las muestras de ARN en el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 se realizaron los cálculos necesarios para tener 20 ng de ARN en cada reacción de retrotranscripción, teniendo en cuenta el tratamiento previo con ADNasa necesario para asegurarnos la eliminación de una posible contaminación de las muestras de ARN por ADN.

Una vez llevado a cabo el tratamiento con ADNasa se realizó la RT-PCR tal y como se describe en el apartado 2.7.2.2. de Materiales y Métodos utilizando los oligonucleótidos Ex5F y Ex9R, que hibridan en los exones 5 y 9 respectivamente del gen *crtS* y que generan un fragmento de ADN de 580 pb si se amplifica a partir de ARN mensajero (ARNm) no procesado (o ADN) o un fragmento de ADN de 336 pb si la amplificación se realiza a partir de ARNm procesado. Como control de la transcripción se usó el gen de la actina, empleando los oligonucleótidos ActF y ActR que hibridan en el exón 5 del gen de la actina de *X. dendrorhous*, y que generan una fragmento de ADN de 522 pb. Así mismo se puso una reacción de PCR con la enzima *GoTaq*® empleando como molde el ARN tratado con ADNasa para comprobar que el tratamiento con la enzima ADNasa ha funcionado y no existe contaminación por ADN. El programa de temperaturas utilizado para estas reacciones de PCR fue el mismo que el empleado para hacer las reacciones de RT-PCR. En todas las reacciones

de PCR realizadas el resultado fue negativo, indicando que el tratamiento con la enzima ADNasa fue el adecuado. En el caso de que no hubiera sido negativo, tendría que haberse repetido el tratamiento con la ADNasa para asegurarnos que los datos que obtenemos se deben a la amplificación a partir de ARN y no de ADN.

Para realizar una cuantificación aproximada de las diferencias de expresión del gen *crtS* se realizó una RT-PCR semicuantitativa de forma que se tomaron muestras a distintos ciclos de amplificación (concretamente en los ciclos 15, 20, 25, 30 y 35; figura 3.9.).

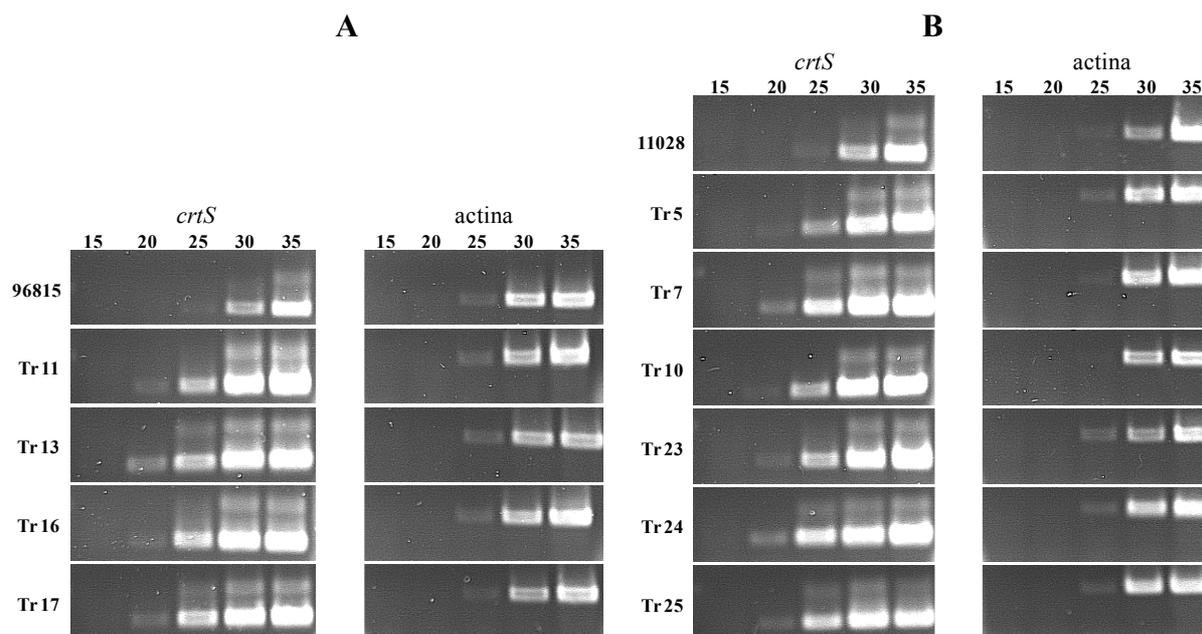


Figura 3.9. Fotografías de geles de agarosa donde se muestran las RT-PCR de los ARN totales de las cepas silvestres y sus respectivos transformantes obtenidos con los vectores pG5-*hph-crtS*-ADNr (+/-). A: 96815 corresponde a la cepa ATCC 96815; Tr.11, 13, 16 y 17 corresponden a transformantes derivados de la cepa ATCC 96815. B: 11028 corresponde a la cepa CECT 11028; Tr.5, 7, 10, 23, 24 y 25 corresponden a transformantes derivados de la cepa CECT 11028. Tr es la abreviación de transformante.

Al analizar las muestras de RT-PCR por electroforesis en gel de agarosa, comprobamos que en las reacciones realizadas para el gen *crtS* aparecen dos fragmentos de ADN que corresponden con los dos tipos de transcrito: procesado (banda de menor tamaño y mayoritaria) y sin procesar (banda de mayor tamaño y poco representada). Tomando como referencia las cepas parentales observamos que en las cepas transformadas existe una mayor expresión del gen *crtS* puesto que los fragmentos de ADN amplificado se visualizan en ciclos más tempranos (ciclo 20) que en su cepa parental correspondiente (ciclo 25).

El estudio de las bandas de RT-PCR por densitometría con el programa Analyzer 4.0 se realizó comparando la señal de densidad óptica integrada (IOD) obtenida en el ciclo 25 para los genes *crtS* y actina, de forma que la señal obtenida para el gen de la actina supone un control de la transcripción puesto que es un gen constitutivo que se expresa de forma homogénea. Los datos obtenidos muestran que la expresión del gen *crtS* en los transformantes se encuentra aumentada entre un 51% y un 400 %, considerando un 100% el valor obtenido para la cepa silvestre CECT 11028 (Figura 3.10.).

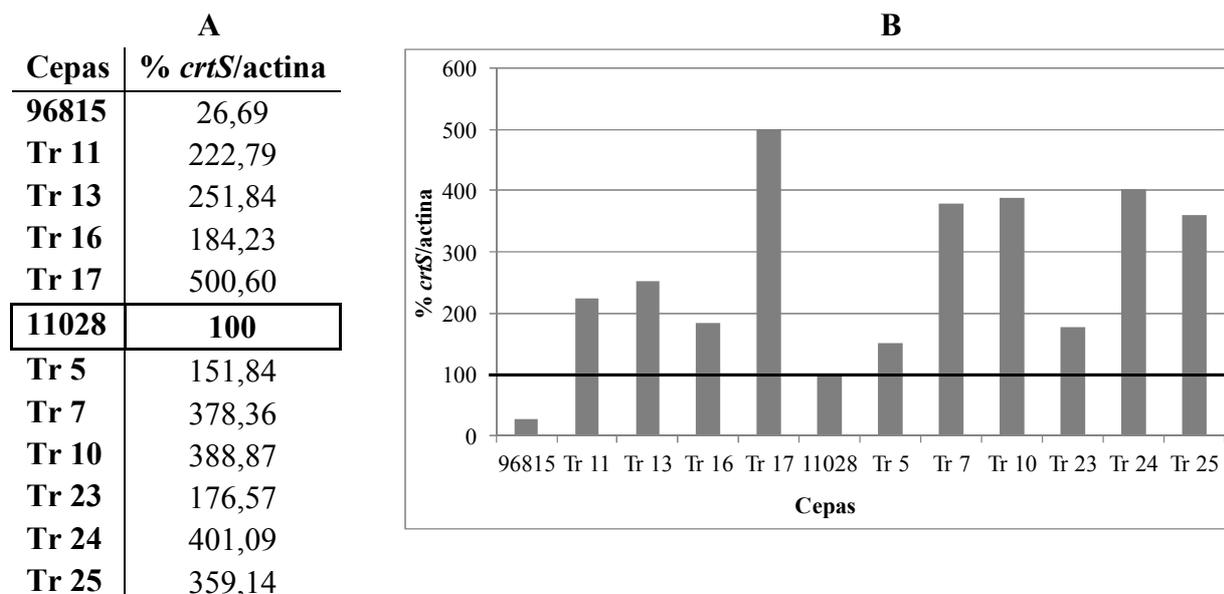


Figura 3.10. A: tabla donde se muestra el porcentaje relativo de la relación entre la IOD de las reacciones de RT-PCR realizadas para el gen *crtS* y las reacciones realizadas para el gen de la actina de los distintos transformantes con las construcciones pG5-*crtS*-*hph*-ADNr (+/-) frente a la cepa silvestre *X. dendrorhous* CECT 11028. B: gráfica donde se representa las distintas cepas frente a los porcentajes de la relación entre la expresión del gen *crtS* y la expresión de la actina, tomando como 100% el valor de la cepa silvestre *X. dendrorhous* CECT 11028. 96815 corresponde a la cepa ATCC 96815; Tr 11, 13, 16 y 17 corresponden a transformantes derivados de la cepa ATCC 96815 con las construcciones pG5-*crtS*-*hph*-ADNr (+/-); 11028 corresponde a la cepa CECT 11028; Tr 5, 7, 10, 23, 24 y 25 corresponden a transformantes derivados de la cepa CECT 11028 con la construcción pG5-*crtS*-*hph*-ADNr (+/-). Tr es la abreviación de transformante.

### 3.2.4. Producción de pigmentos

Se analizaron los pigmentos producidos por los distintos transformantes mediante HPLC, (apartado 2.7.2. de Materiales y Métodos). Al analizar la cantidad de astaxantina producida y comparándola con la producida por la cepa CECT 11028 (productora de astaxantina) se observa que, en todos los casos, la producción específica aumenta. Dentro del grupo de las cepas derivadas de la ATCC 96815, existe un incremento en la producción de este pigmento de entre un 8-65% tomando como 100% la cepa silvestre CECT 11028. El transformante con una mayor producción forma 2,32 mg de astaxantina/g peso seco, frente a los 1,4 mg de astaxantina/g peso seco de la cepa silvestre CECT 11028 (figura 3.11.). Además el crecimiento de los transformantes respecto a las cepas silvestres no se ve afectado. Al analizar la producción de pigmentos del grupo derivado de la cepa CECT 11028 se observa un incremento de entre 32 y 242% respecto a la cepa silvestre, tomando ésta como el 100% de producción de astaxantina. El transformante con una mayor producción alcanza 4,8 mg de astaxantina/g peso seco, frente a los 1,4 mg de astaxantina/g peso seco de la cepa silvestre CECT 11028 (figura 3.11.).

A pesar de que en todos los transformantes la producción específica se ve aumentada (siempre respecto a la cepa silvestre CECT 11028), al realizar una prueba T de Student (marcado como asteriscos en figura 3.11.) vimos que solamente en cinco de los transformantes derivados de la cepa CECT 11028 las diferencias son realmente significativas ( $p < 0,05$ ) mientras que en el resto de transformantes las diferencias no son significativas. Obviamente al comparar los datos de los transformantes derivados de la cepa ATCC 96815 con su cepa

parental los resultados son altamente significativos, ya que esta cepa (no transformada) no produce astaxantina.

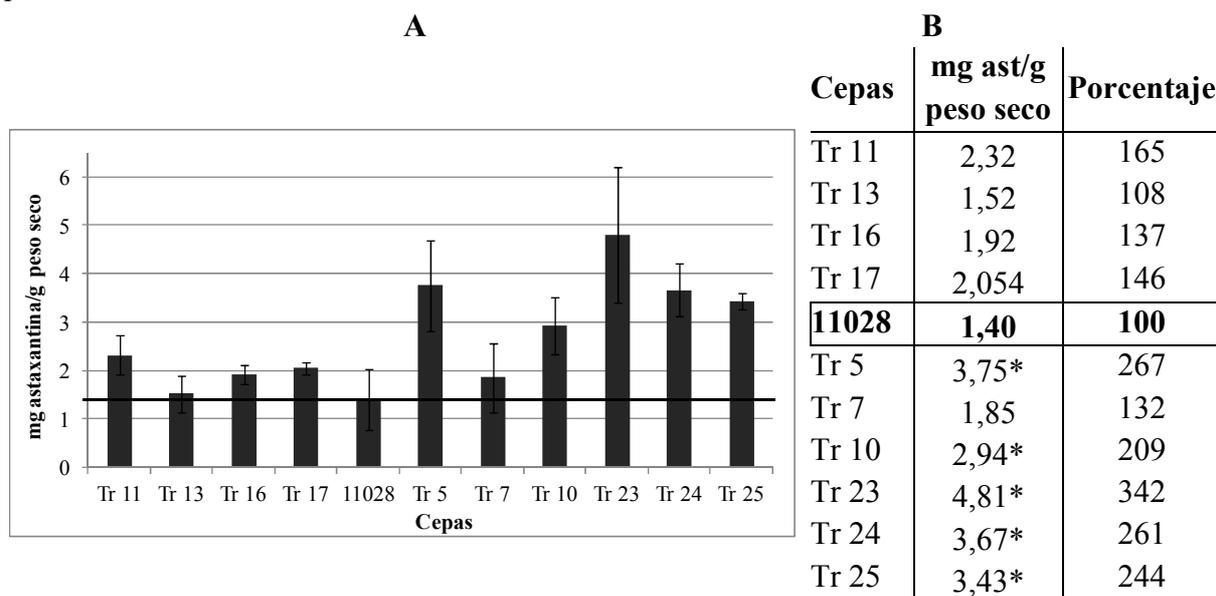


Figura 3.11. Representación gráfica de la producción específica de astaxantina de las cepas silvestres y de los transformantes con las construcciones pG5-*crtS-hph*-ADNr (+/-). Tr 11, 13 16 y 17 corresponden a los transformantes derivados de la cepa ATCC 96815; 11028 corresponde a la cepa CECT 11028; Tr 5, 7, 10, 23, 24 y 25 corresponden a los transformantes de la cepa CECT 11028. **A:** gráfico de producción específica de astaxantina (expresada en microgramos de astaxantina por gramo de peso seco). **B:** tabla que contiene los valores de producción específica de astaxantina (expresado en microgramos de astaxantina por gramo peso seco) y la comparación respecto a la cepa silvestre CECT 11028 (\*Porcentaje, la cepa CECT 11028 representa el 100%). Tr es la abreviación de transformante. \*  $p < 0,05$  significativo.

Al analizar los compuestos intermedios de la ruta de biosíntesis en base al porcentaje de área que representan cada uno respecto al conjunto de compuestos detectados se observa que la producción de  $\beta$ -caroteno y 3-hidroxi-3',4'-didehidro- $\beta$ , $\Psi$ -caroteno-4-diona (HDCO) se reduce notablemente: producen entre un 78 y un 96 % menos que la producción de  $\beta$ -caroteno de la cepa CECT 11028, y entre un 67 y un 96% de la producción de HDCO (figura 3.6. y tabla 3.3.). Por el contrario, la producción de cantaxantina y zeaxantina aumenta, sobre todo la primera. De hecho en los transformantes 13 (deriva de la cepa ATCC 96815) y 7 (deriva de la cepa 11028) llegan a producir más cantidad de cantaxantina que de astaxantina (ver figura 3.12. y tabla 3.3.). Este resultado es muy interesante y permite inferir la función enzimática primaria de la enzima CrtS, que ha sido objeto de polémica (Martin *et al.*, 2008) (véase la discusión, posteriormente).

Cuando realizamos una prueba T sobre los porcentajes de área, tomando como referencia los datos obtenidos para la cepa silvestre CECT 11018 vemos que la reducción en la producción de  $\beta$ -caroteno y HDCO es significativa ( $p < 0,05$ ). En el caso de la cantaxantina, salvo en el transformante 23 (deriva de la cepa CECT 11028) en que las diferencias no son significativas, el aumento en su producción muestra diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

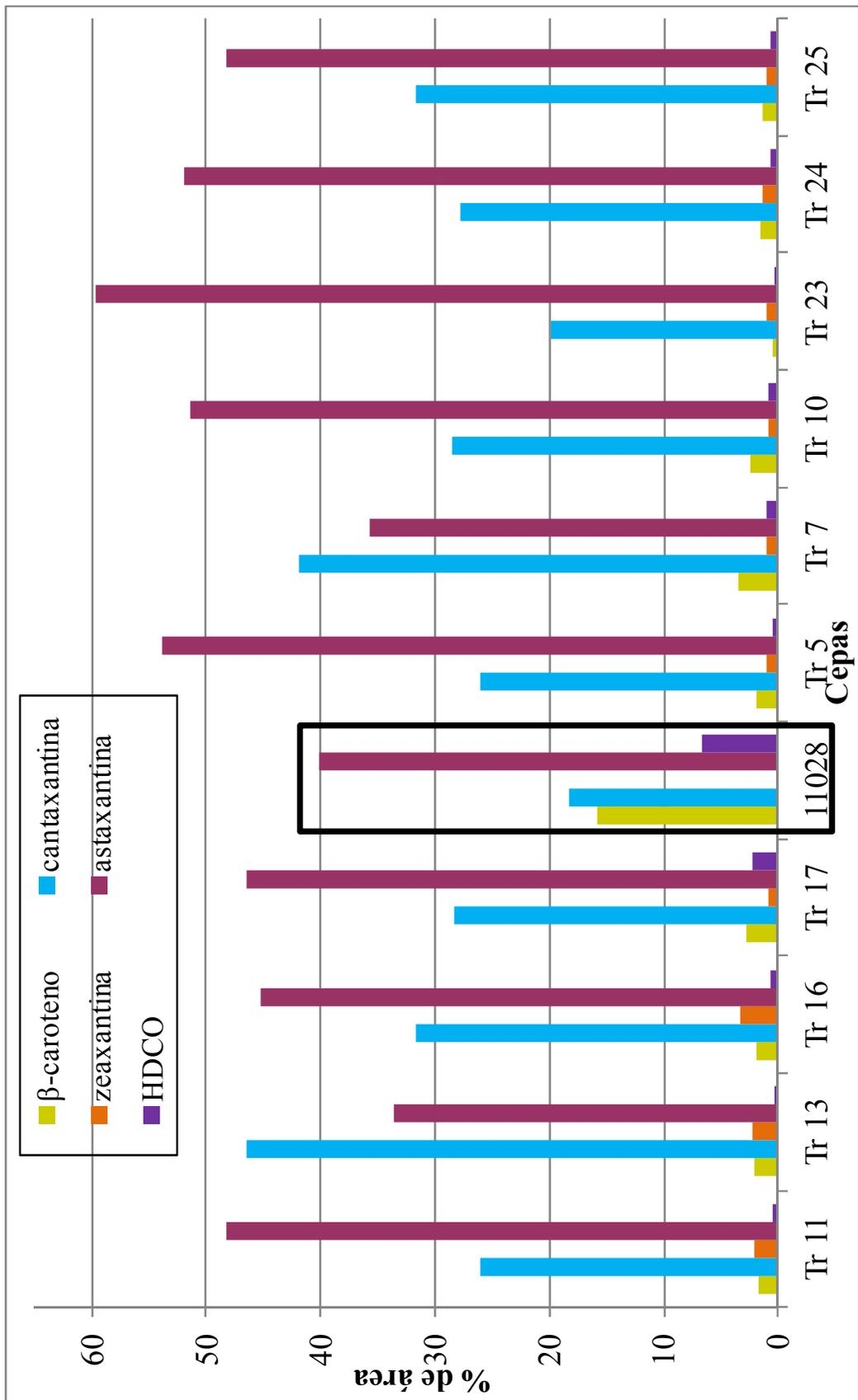


Figura 3. 12. Gráfico resumen donde se representa la producción de los distintos carotenoides producidos por los distintos transformantes con las construcciones *pG5-crtS-hph-ADNr (+/-)* expresados en porcentaje de área respecto al total de compuestos detectados en el análisis por HPLC. En el recuadro se destaca la cepa silvestre CECT 11028. 11, 13, 16 y 17 corresponden a los transformantes derivados de la cepa ATCC 96815. 5, 7, 10, 23, 24 y 25 corresponden a los transformantes derivados de la cepa CECT 11028.

Cepas silvestre y transformadas	$\beta$ -caroteno	cantaxantina	zeaxantina	astaxantina	HDCO
Tr 11	1,74	25,99	2,14	48,25	0,60
Tr 13	2,18	46,54	2,36	33,64	0,30
Tr 16	1,97	31,73	3,39	45,22	0,70
Tr 17	2,86	28,29	0,88	46,47	2,26
<b>11028</b>	<b>15,89</b>	<b>18,25</b>	<b>0,14</b>	<b>40,11</b>	<b>6,72</b>
Tr 5	1,95	25,99	0,96	53,90	0,56
Tr 7	3,51	41,84	1,08	35,81	1,03
Tr 10	2,53	28,45	0,96	51,39	0,79
Tr 23	0,59	19,81*	1,08	59,68	0,28
Tr 24	1,50	27,77	1,35	51,86	0,68
Tr 25	1,44	31,61	1,03	48,25	0,67

Tabla 3.3. Tabla que presenta la relación de pigmentos producidos por la cepa silvestre CECT 11028 y los transformantes con las construcciones pG5-*crtS-hph*-ADNr (+/-) expresados en porcentaje de área. 11, 13 16 y 17 corresponden a los transformantes derivados de la cepa ATCC 96815; 11028 corresponde a la cepa CECT 11028; 5, 7, 10, 23, 24 y 25 corresponden a los transformantes de la cepa CECT 11028. Tr es la abreviatura de transformante. \*no significativo.

Como comentamos en el apartado 1.3.4. de la Introducción, en la actualidad se especula con que la enzima CrtS contenga una actividad hidroxilasa. En vista de los resultados obtenidos en este trabajo (mayor producción de cantaxantina), este supuesto no sería correcto dado que la cantaxantina es un derivado dicetolado. Los resultados sugieren que hay una limitación en la conversión de cantaxantina en astaxantina, o lo que es lo mismo en la actividad  $\beta$ -caroteno 3,3'-hidroxilasa. Esto se explicaría con el hecho de que la expresión del gen *crtR*, que codifica para la proteína encargada de aportar el poder reductor a la proteína CrtS, presente un patrón de expresión distinto al del gen *crtS* (Alcaíno *et al.*, 2008). El aumento en la expresión del gen *crtS* no se traduciría en un aumento en la expresión de *crtR*, lo que provocaría que el poder reductor necesario para la total conversión del  $\beta$ -caroteno en astaxantina no estuviera disponible deteniéndose la biosíntesis en la cantaxantina.

### 3.3. SOBREEXPRESIÓN DEL GEN *crtS* DE *Xanthophyllomyces dendrorhous* CON OTROS PROMOTORES

Una vez observados los resultados obtenidos al transformar *X. dendrorhous* con las construcciones pG5-*hph-crtS*-ADNr (+/-), se realizó una construcción similar pero sustituyendo el promotor propio del gen *crtS* por otros promotores más fuertes como son el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gpd*) y el de la glutamato deshidrogenasa (*gdh*) del propio *X. dendrorhous*.

El primero de los promotores (*Pgpd*) fue clonado en el laboratorio, dando lugar al plásmido pGTE-*Pgpd*. El promotor fue amplificado por PCR con la enzima *GoTaq*<sup>®</sup> con los oligonucleótidos GPDF y GPDR, utilizando como molde ADN genómico de la cepa CECT 11028 de *X. dendrorhous*. El fragmento amplificado se clonó en el pGEM<sup>®</sup> T-Easy

aprovechando las colas de poli-A que deja la enzima *GoTaq*<sup>®</sup>. El segundo de los promotores (*Pgdh*) fue cedido por Antibióticos S.A., (*pBS-Pgdh*), y se encuentra clonado en el plásmido *pBlueScript*<sup>®</sup> KS.

### 3.3.1. Sustitución del promotor nativo del gen *crtS* por el de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gpd*)

Para realizar el proceso de sustitución del promotor nativo del gen *crtS* por el promotor *Pgpd* se aprovechó un corte *HindIII* incluido en el oligo reverso GPDR con el que se amplificó por PCR el promotor que se ubica junto al codón de inicio de la transcripción del gen. Por ello se diseñaron unos oligonucleótidos para amplificar el gen *crtS* (sin su promotor) que contuvieran por un lado en la región 5' el sitio de corte para la enzima de restricción *HindIII* (no corta dentro de la región codificante del gen). Por el otro lado (región 3') se diseñaron otros oligonucleótidos que contuvieran sitios de cortes que no estuvieran presentes en la región codificante del gen y que si estuvieran en el vector *pGEM*<sup>®</sup> T-Easy. Finalmente se utilizaron los oligos HIND1 y APAT (*HIND1* presenta un sitio de restricción para la enzima *HindIII*, mientras que *APAT* contiene un sitio de corte para la enzima *ApaI*).

Se digirió el plásmido que contiene el promotor *Pgpd* (*pGTE-Pgpd*) con las enzimas de restricción *HindIII* y *HincII*. Se amplificó el gen *crtS* sin su promotor, y posteriormente se digirió con *HindIII*. Se ligaron ambos fragmentos (figura 3.13.) y se obtuvo el plásmido *pGTE-Pgpd-crtS*, en el cual al gen *crtS* le hemos sustituido su propio promotor por el promotor *Pgpd*.

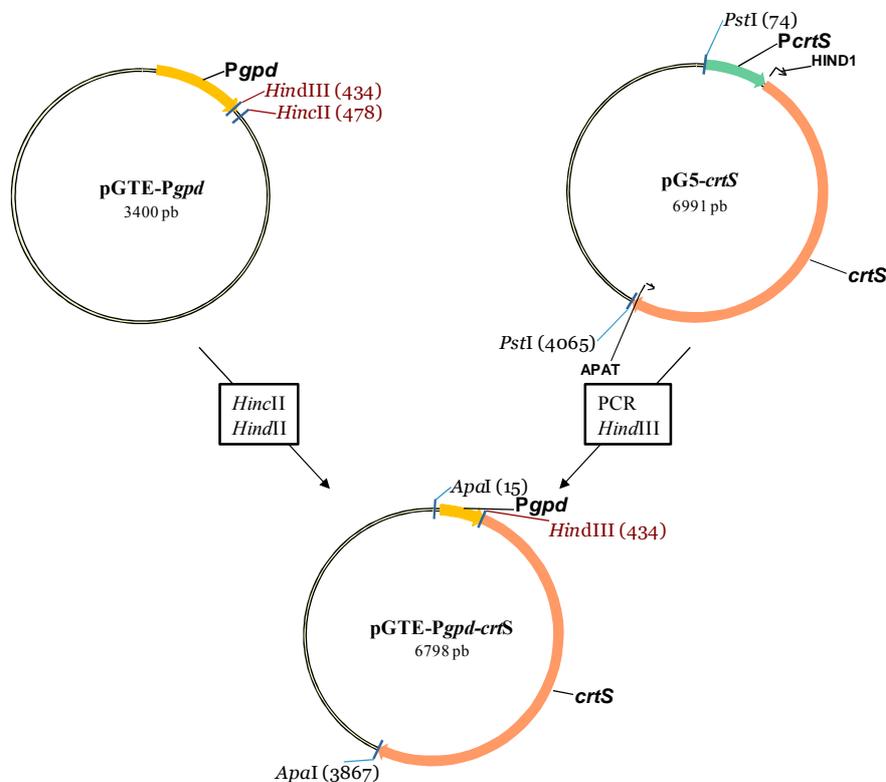


Figura 3.13. Representación gráfica del proceso seguido para cambiar el promotor nativo del gen *crtS* (*PcrtS*) por el promotor del gen que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *X. dendrorhous* (*Pgpd*).

### 3.3.2. Sustitución del promotor nativo del gen *crtS* por el de la glutamato deshidrogenasa (*gdh*)

En una estrategia paralela, la sustitución del promotor nativo del gen *crtS* por el promotor *Pgdh* se llevó a cabo mediante la técnica de **PCR de fusión**. Esta técnica trata de unir dos fragmentos distintos mediante la técnica de PCR. Ambos fragmentos se amplifican con unos oligonucleótidos a los que se les incorpora en la zona 5' una zona homóloga al otro fragmento al que se quiere fusionar. Una vez amplificados por separado ambos fragmentos de ADN, los productos de PCR obtenidos se mezclan y se realiza una nueva reacción de PCR pero esta vez sin estos oligonucleótidos. Al desnaturalizar y renaturalizar el ADN, las zonas homólogas aparean actuando como cebadores para su amplificación. De esta forma se obtiene un fragmento de ADN resultado de la fusión de los dos fragmentos iniciales.

Se diseñaron unos oligonucleótidos para amplificar por separado el promotor *Pgdh* y el gen *crtS* sin su promotor que se incorporan 15 nucleótidos complementarios a la zona a la que se va a fusionar. Se realizan 2 reacciones de PCR distintas con las parejas de nucleótidos GDHRIF/GDHRIR y ASTRIF/ASTRIR, y con el producto de estas dos reacciones de PCR se pone una única reacción sin oligonucleótidos: las zonas homólogas van a aparear entre si y van a actuar como iniciadores (“primers”). De esta forma se obtiene un fragmento de ADN en el cual se ha sustituido el promotor propio del gen del *crtS* por el promotor *Pgdh* (figura 3.14.).

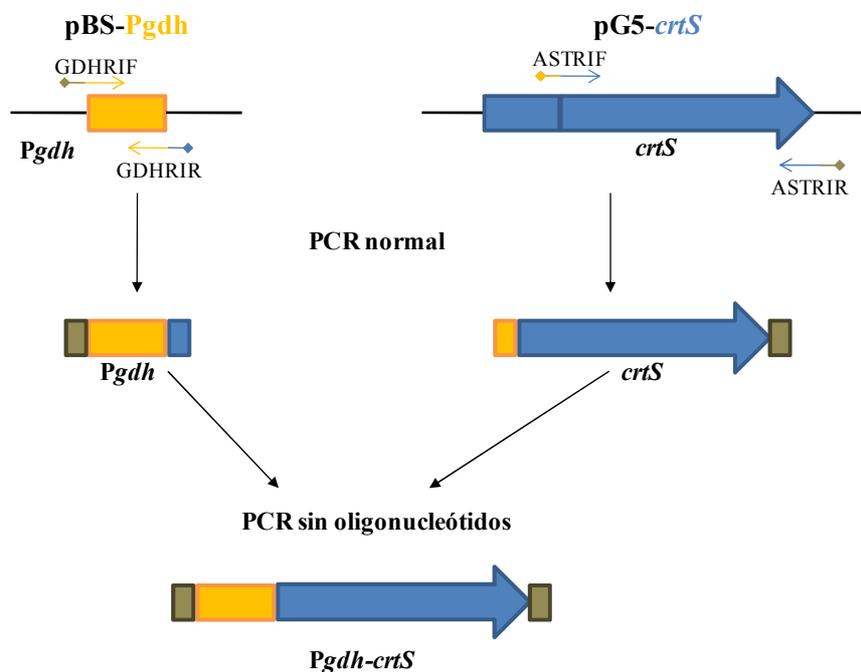


Figura 3.14. Representación gráfica de la PCR de fusión utilizada para sustituir el promotor del gen *crtS* por el promotor *Pgdh*. Los oligonucleótidos GDHRIF y ASTRIR contienen 15 nucleótidos complementarios a la zona del ADN ribosomal donde se pretendió clonar. GDHRIR presenta 15 nucleótidos complementarios a la región 5' del gen *crtS*, a partir del codón de inicio; ASTRIF incorpora 15 nucleótidos complementarios a la región 3' del promotor *Pgdh*.

### **3.3.3. Clonación del gen *crtS* con el promotor sustituido en el locus del ADN ribosomal**

Una vez obtenido el fragmento de ADN en el cual se ha sustituido el promotor propio del gen *crtS* por los promotores *Pgpd* y *Pgdh*, se busca realizar las construcciones en las que este gen modificado este incluido dentro del ADNr junto al marcador de resistencia a higromicina (*hph*).

A partir del vector pG5-ADNr construimos los plásmidos que contienen además de parte del ADN ribosomal de *Xanthophyllomyces*, el gen marcador de resistencia a higromicina (*hph*) y el gen *crtS* con el promotor sustituido por uno de los dos promotores fuertes. Para ello digerimos el vector pG5-ADNr con la enzima de restricción *SmaI* obteniéndose unos fragmentos de ADN de 6500, 4500 y 435 pb; extrayéndose el fragmento de 6500 pb. Así mismo se digirió el vector pBGgHg con las enzimas de restricción *EcoRV* y *XmnI*, de forma que aparecen unos fragmentos de 6800, 1500 y 1200 pb de los recuperamos el fragmento de 1500 pb pues es donde se localiza el gen *hph* intacto. Al ligar el vector pG5-ADNr cortado con *SmaI* con el gen *hph* obtuvimos el vector pG5-ADNr-*hph* donde se clonó el gen *crtS* con el promotor sustituido (figura 3.15.).

Una vez conseguido el vector pG5-ADNr-*hph* se digirió con la enzima de restricción *NruI*, que presenta un único sitio de corte en la construcción y que se encuentra dentro de uno de los dos fragmentos de ADN ribosomal existentes en el plásmido (figura 3.15.). Además, empleando la enzima *Phusion* se amplificó por PCR el gen *crtS* con el promotor sustituido con los oligonucleótidos que adecuados (GPDBH1/AST3ZR para el gen *crtS* con el promotor *Pgpd* y GDHRIF/ASTRIR para el gen *crtS* con el promotor *Pgdh*). Posteriormente se ligaron los fragmentos de ADN amplificados por PCR y purificados al vector digerido (figura 3.15.). Se obtuvieron las construcciones pG5-ADNr-*hph-Pgpd/crtS* y pG5-ADNr-*hph-Pgdh/crtS*.

Estas construcciones se digirieron con la enzima *PvuII* de forma que para cada uno de los vectores obtenemos dos fragmentos de ADN: uno de mayor tamaño (9,6 Kb para el que contiene el promotor *Pgpd* y 10,2 Kb para el promotor *Pgdh*) que es el que se extrajo y otro de 2,6 Kb que corresponde con parte del vector pGEM<sup>®</sup>-5Zf en el que se había clonado inicialmente el ADN ribosomal. De esta forma obtuvimos en forma linear el gen *crtS* con el promotor sustituido junto al gen marcador *hph* y parte del ADN ribosomal, que fue utilizado para transformar las dos cepas de *X. dendrorhous* disponibles.

Se obtuvieron transformantes resistentes al marcador de selección, que fueron analizados mediante reacciones de PCR con la enzima *GoTaq*<sup>®</sup> utilizando la pareja de oligonucleótidos GPDRIF/AST3ZR para las cepas analizadas para la construcción con el promotor *Pgpd* (pG5-ADNr-*hph-Pgpd/crtS*), mientras que para la construcción con el promotor *Pgdh* (pG5-ADNr-*hph-Pgdh/crtS*) se empleó la pareja de oligonucleótidos GDHRIF/AST3ZR. Sin embargo, ninguna de las cepas analizadas presentó el gen *crtS* con el promotor sustituido. Esto pudo ser debido a que al haber tres zonas de recombinación (figura 3.15.) es posible que únicamente se produjera la recombinación entre las dos que flanquean el gen marcador *hph*, que es el carácter por el que inicialmente se seleccionan los transformantes.

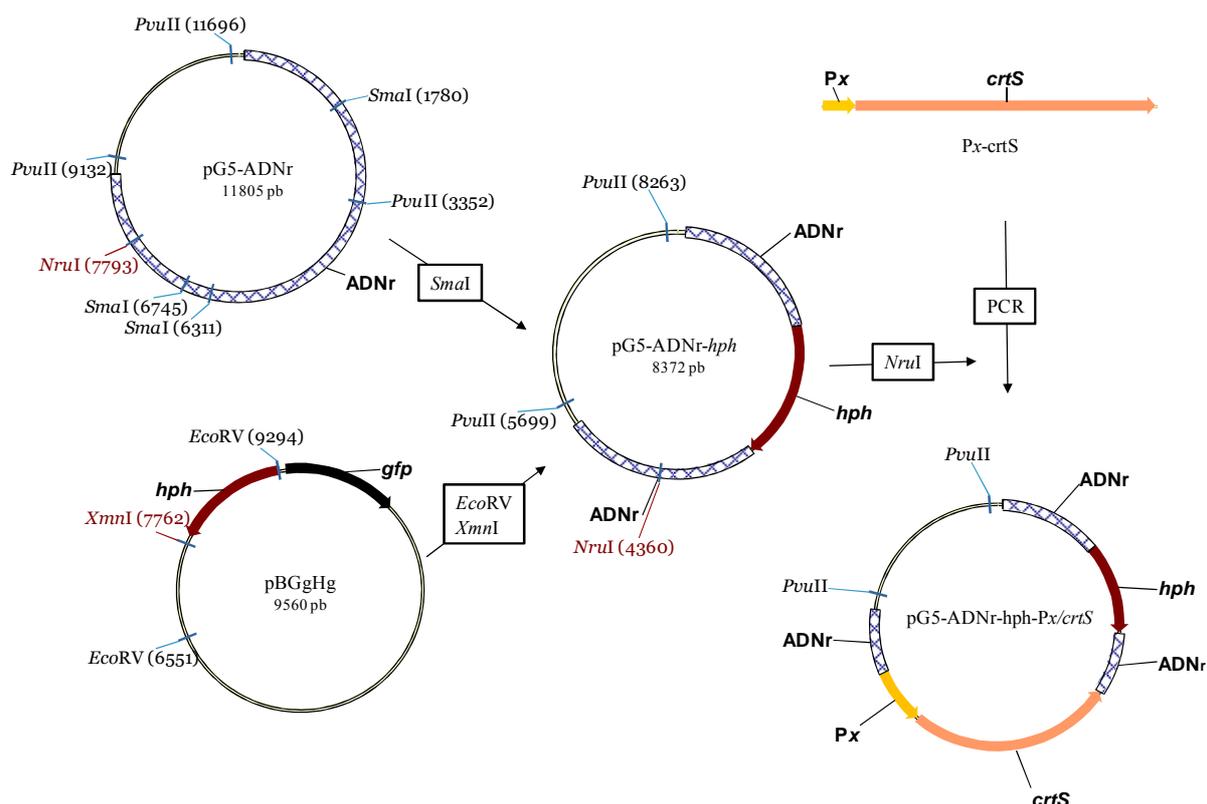


Figura 3.15. Representación genérica y esquemática del proceso llevado a cabo para la construcción de los plásmidos que contienen ADN ribosomal, el gen de resistencia a higromicina y el gen *crtS* con el promotor sustituido por un promotor fuerte. ADNr: ADN ribosomal; *hph*: gen de resistencia a higromicina; *gfp*: proteína fluorescente verde; Px: promotor fuerte (*Pgpd* o *Pgdh* dependiendo del vector); *crtS*: gen implicado en la biosíntesis de astaxantina.

Puesto que no obtuvimos transformantes con las construcciones anteriores nos propusimos conseguir estos transformantes utilizando una estrategia similar pero partiendo del vector pG5-*crtS*-*hph*-ADNr. Se eliminó el gen *crtS* con el promotor nativo digiriendo el plásmido con las enzimas de restricción *SpeI* y *SmaI*, de forma que obtenemos unos fragmentos de 6958, 2285, 1048, 485 y 249 pb. Se extrajo el fragmento de mayor tamaño, que contiene el vector pGEM<sup>®</sup> 5zf con el gen de resistencia a higromicina *hph* y un fragmento de ADN ribosomal. Se rellenaron los extremos de este fragmento de ADN con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* y se procedió a ligar los extremos rellenados, obteniéndose el vector pG5-*hph*-ADNr (de ahora en adelante pIMR: plásmido de integración múltiple ribosomal) (figura 3.16.).

Este vector pIMR fue digerido con la enzima *EcoRV* (presenta una única diana de restricción para esta enzima) donde se clonó el gen *crtS* con el promotor sustituido por los promotores *Pgpd* y *Pgdh* amplificados por PCR con la enzima *Phusion*. De esta forma obtuvimos los vectores pIM-*Pgpd/crtS* y pIM-*Pgdh/crtS* (figura 3.16.).

Una vez obtenidos estos plásmidos y para electroporar las dos cepas parentales disponibles se digirieron con la enzima de restricción *NruI* que presenta un sitio único de corte dentro del fragmento de ADN ribosomal. De esta forma obtenemos un vector lineal y los genes *hph* y *crtS* con el promotor sustituido presentan un fragmento de ADN ribosomal a cada lado (figura 3.16.).

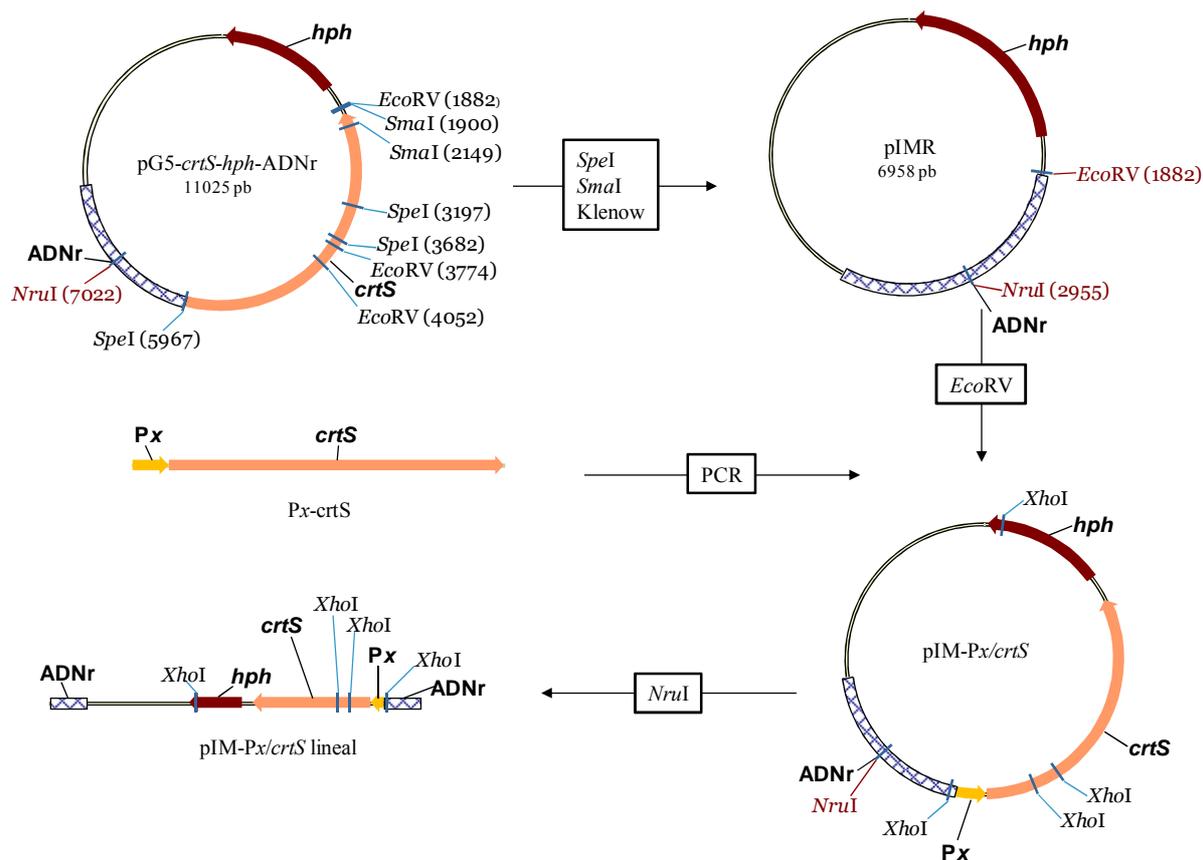


Figura 3.16. Representación genérica de los pasos llevados a cabo para obtener las construcciones pIM-Px/crtS a partir del vector pG5-crtS-hph-ADNr. ADNr: ADN ribosomal; hph: gen de resistencia a higromicina; crtS: gen implicado en la biosíntesis de astaxantina; Px: promotor fuerte (Pgpd o Pgdh dependiendo de la construcción).

Como resultado de la electroporación con los dos vectores se obtuvieron varias colonias resistentes a higromicina, que se sembraron en medio YM sólido con higromicina y se cultivaron en medio líquido (sin antibiótico) para extraer ADN y pigmentos, como se describió en los apartados 2.6.1.1. y 2.7.1. de Materiales y Métodos.

### 3.3.4. Verificación de los transformantes mediante hibridación del tipo “Southern”

Con el fin de comprobar que los transformantes habían integrado correctamente la construcción se realizaron hibridaciones del tipo “Southern” con los ADN totales de estos transformantes y sus cepas parentales. El ADN de los transformantes y el de las cepas parentales se digirieron con la enzima de restricción XhoI. Una vez transferido a la membrana de nylon, la hibridación se realizó utilizando como sonda un fragmento interno de 485 pb del gen crtS, extraído del plásmido pG5-crtS por digestión con la enzima de restricción SpeI.

Con la hibridación del tipo “Southern” de los ADN totales digeridos con XhoI y utilizando la sonda del gen crtS visualizamos una banda correspondiente al gen silvestre (banda de 5,8 Kb) presente en todas las cepas, y una banda de 4,1 Kb correspondiente a la construcción y que únicamente aparece en las cepas transformantes (figura 3.17.). El análisis de las bandas por densitometría con el programa Gel-Pro Analyzer 4.0 (apartado 2.6.4.4. de Materiales y

Métodos) nos indica que la cantidad de copias extra existentes varía entre 2 y 13 copias dependiendo del transformante analizado.

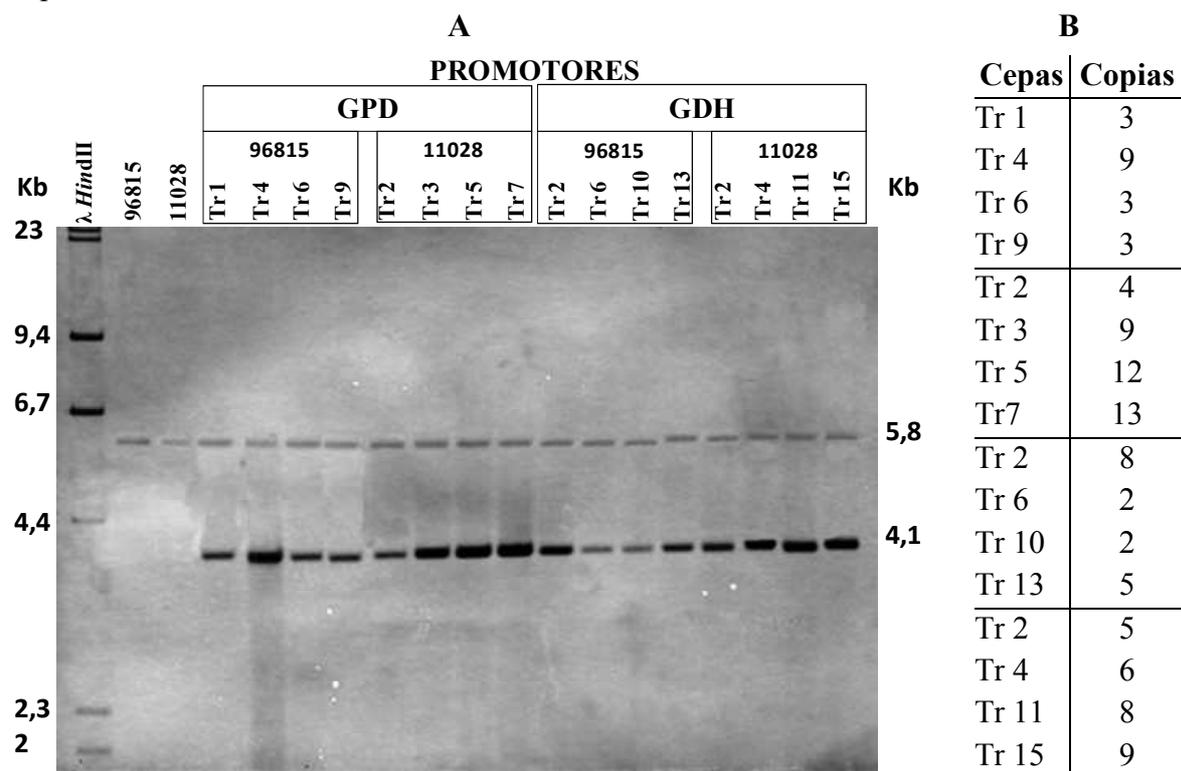


Figura 3.17. A: análisis mediante hibridación de tipo “Southern” de las cepas silvestre ATCC 96815 y CECT 11028, así como de los transformantes obtenidos con las construcciones pIM-Pgpd/crtS y pIM-Pgdh/crtS. Los ADNs totales se digirieron con la enzima de restricción XhoI. Se utilizó como sonda un fragmento interno del gen crtS (485 pb). La temperatura de hibridación fue de 75° C. 96815 corresponde a la cepa ATCC 96815; 11028 corresponde a la cepa CECT 11028. Tr 1, 4, 6 y 9 corresponde a los transformantes derivados de la cepa ATCC 96815 con la construcción pIM-Pgpd/crtS; mientras que Tr 2, 3, 5 y 7 son los transformantes derivados de la cepa CECT 11028 con la construcción pIM-Pgpd/crtS. Tr 2, 6, 10 y 13 se refieren a los transformantes derivados de la cepa ATCC 96815 con la construcción pIM-Pgdh/crtS; Tr 2, 4, 11 y 15 corresponden a los transformantes derivados de la cepa CECT 11028 con la construcción pIM-Pgdh/crtS. Se usó como marcador de peso molecular el fago λ digerido con HindIII marcado con digoxigenina de la casa comercial Roche. B: tabla con el número de copias extra del gen crtS en cada transformante en relación con la copia nativa. Tr es la abreviación de transformante.

### 3.3.5. Análisis de los transformantes pIM-Pgpd/crtS

Una vez comprobado que teníamos transformantes con la construcciones pIM-Pgpd/crtS se llevó a cabo un análisis transcripcional y de producción de pigmentos.

#### 3.3.5.1. Expresión del gen crtS en transformantes con pIM-Pgpd/crtS

Para realizar una cuantificación aproximada de las diferencias de expresión del gen crtS entre las cepas parentales y los transformantes con pIM-Pgpd/crtS se realizó una RT-PCR semicuantitativa con 20 ng de ARN total por reacción y tratado con ADNasa. Como control de transcripción se usó el gen de la actina, y como control de la presencia de ADN se puso una PCR con ese mismo ARN tratado y el mismo programa de temperaturas usado para el gen crtS. Se tomaron muestras a distintos ciclos de amplificación (concretamente en los ciclos 15, 20, 25, 30 y 35; figura 3.18.).

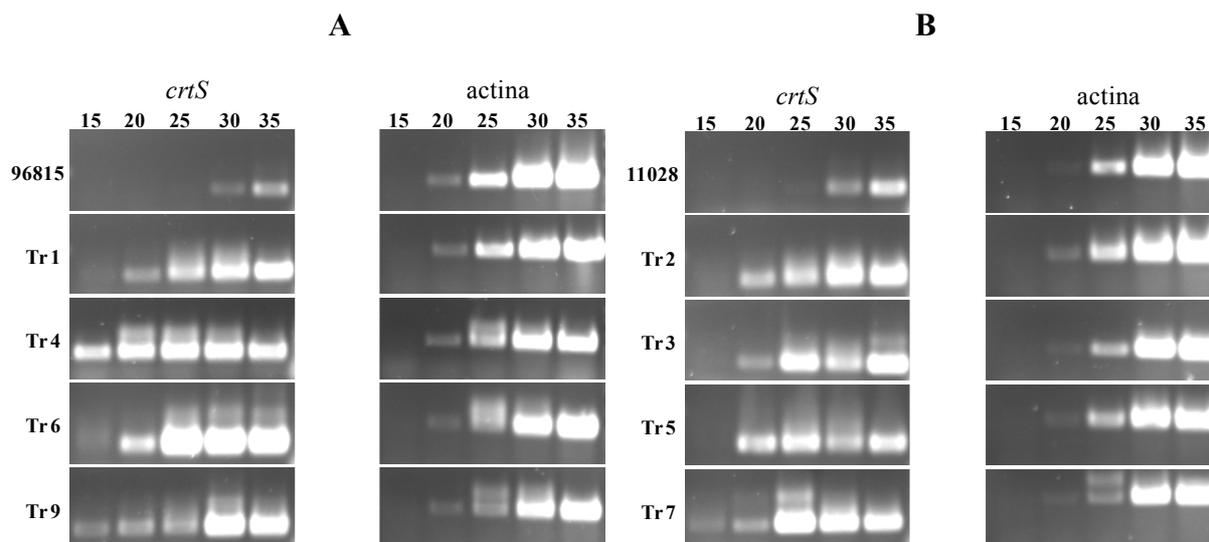


Figura 3.18. Fotografías de geles de agarosa donde se muestran las RT-PCR de los ARN totales de las cepas silvestres y sus respectivos transformantes obtenidos con el vector pIM-*Pgpd/crtS*. **A:** 96815 corresponde a la cepa ATCC 96815; Tr 1, 4, 6 y 9 corresponden a transformantes derivados de la cepa ATCC 96815. **B:** 11028 corresponde a la cepa CECT 11028; Tr 2, 3, 5 y 7 corresponden a transformantes derivados de la cepa CECT 11028. Tr es la abreviación de transformante.

Tomando como referencia las cepas parentales observamos que en las cepas transformadas existe claramente una mayor expresión del gen *crtS* puesto que los fragmentos de ADN amplificado se visualizan en ciclos más tempranos (ciclo 15 o 20 dependiendo del transformante) que en su cepa parental correspondiente (ciclo 25). Igualmente al comparar los resultados obtenidos para el gen con su promotor nativo (figura 3.9.) y para el gen con el promotor sustituido por el promotor *Pgpd* (figura 3.18.) vimos que la expresión con el promotor fuerte es superior a la obtenida con el promotor nativo, lo que concuerda con el hecho de que el promotor *Pgpd* es un promotor fuerte y constitutivo, mientras que el promotor nativo sea un promotor sujeto a una regulación ya sea por fuente de carbono (presenta cuatro cajas CreA) u otros factores que no se conocen hasta el momento (probablemente *LaeA* y/o *VelvetA*, que responden a la luz).

El estudio de las bandas de RT-PCR por densitometría con el programa Analyzer 4.0 se realizó comparando la señal obtenida en el ciclo 25 para los genes *crtS* y *actina*. Los datos obtenidos muestran que la expresión del gen *crtS* en los transformantes se encuentra drásticamente aumentada entre un 475% y un 1245 % (Figura 3.19.).

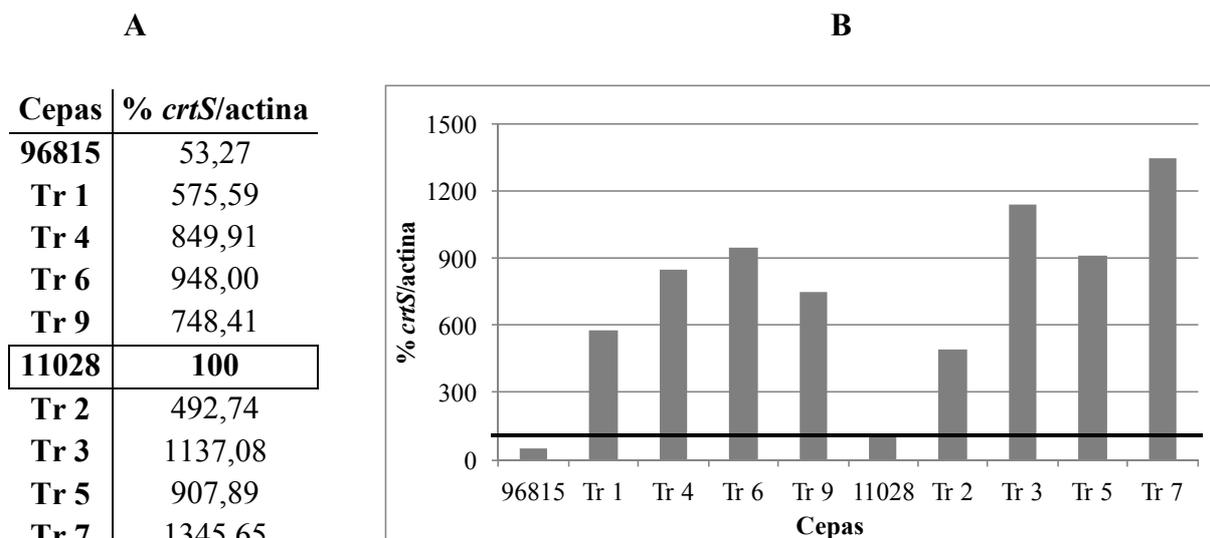


Figura 3.19. Representación de la relación de la expresión del gen *crtS* y la expresión del gen de la actina en los transformantes con la construcción pIM-Pgpd/*crtS* y la cepa silvestre CECT 11028. **A:** tabla donde se muestra el porcentaje relativo de la relación de la expresión del gen *crtS* y la expresión del gen de la actina de los transformantes frente a la cepa silvestre *X. dendrorhous* CECT 11028. **B:** gráfica donde se representa las distintas cepas frente a los porcentajes de la relación entre la expresión del gen *crtS* y la expresión de la actina, tomando como 100% el valor de la cepa silvestre *X. dendrorhous* CECT 11028. 96815 corresponde a la cepa ATCC 96815; Tr 1, 4, 6 y 9 corresponden a transformantes derivados de la cepa ATCC 96815; 11028 corresponde a la cepa CECT 11028; Tr 2, 3, 5 y 7 corresponden a transformantes derivados de la cepa CECT 11028. Tr es la abreviación de transformante.

### 3.3.5.2. Producción de pigmentos en transformantes con pIM-Pgpd/*crtS*

Se analizaron los pigmentos producidos por los distintos transformantes mediante HPLC, (apartado 2.7.2. de Materiales y Métodos). Al analizar la producción específica de astaxantina y comparándola con la producción específica de la cepa CECT 11028 (productora de astaxantina) se observa que mientras en algunos casos la producción de astaxantina aumenta un 16% llegando al 116%, en otros casos se observa una reducción de la producción de astaxantina de hasta un 13% (figura 3.20.). Sin embargo, al realizar la prueba T de Student entre los valores de producción específica de los transformantes y el valor de producción de la cepa silvestre CECT 11028 comprobamos que estas diferencias no son significativas, tanto para los transformantes derivados de la cepa ATCC 96815 como para los transformantes derivados de la cepa CECT 11028. Al realizar esa misma prueba T de Student para los transformantes derivados de la cepa ATCC 96815 comparándolos con su cepa de origen (ATCC 96815) obtenemos que las diferencias son significativas. Los resultados nos indican que el gran aumento del transcrito de *crtS* observado en algunos transformantes no se traduce en un incremento significativo de la producción de astaxantina.

Al analizar los compuestos intermedios de la ruta de biosíntesis se observa que la producción de  $\beta$ -caroteno, HDCO y zeaxantina se reduce notablemente. Por el contrario, la producción de cantaxantina y astaxantina aumenta. De hecho el transformante 1 (deriva de la cepa ATCC 96815) llega a producir más cantidad de cantaxantina que de astaxantina (tabla 3.4. y figura 3.21.).

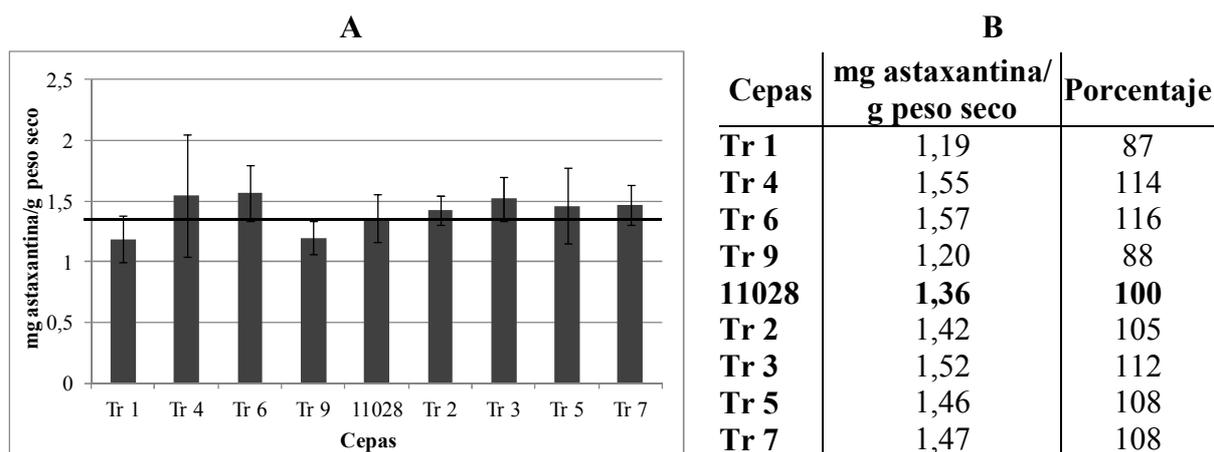


Figura 3.20. Representación gráfica de la producción de astaxantina de las cepas silvestres y de los transformantes con la construcción pIM-Pgpd/crtS. Tr 1, 4, 6 y 9 corresponden a los transformantes derivados de la cepa ATCC 96815; 11028 corresponde a la cepa CECT 11028; Tr 2, 3, 5 y 7 corresponden a los transformantes de la cepa CECT 11028. **A**: gráfico de producción específica de astaxantina (expresada en microgramos de astaxantina por gramo de peso seco). **B** tabla con los valores de producción específica de astaxantina (expresado en microgramos de astaxantina por gramo peso seco) y la comparación respecto a la cepa silvestre CECT 11028 (en porcentaje, la cepa CECT 11028 representa el 100%). Tr es la abreviación de transformante.

Al estudiar el porcentaje de área que representa cada pigmento respecto al total de los detectados mediante HPLC vemos que se produce una reducción significativa en la producción relativa de  $\beta$ -caroteno, HDCO y zeaxantina. En el caso de la producción relativa de la astaxantina vemos que la variación es significativa.

Cepas	$\beta$ -caroteno	cantaxantina	zeaxantina	astaxantina	HDCO
Tr 1	4,21	46,54	1,75	39,05	1,18
Tr 4	2,02	25,05	1,00	<b>60,49*</b>	0,74
Tr 6	1,86	22,26	0,72	63,28	0,67
Tr 9	3,23	34,70*	0,95	49,04	0,87
<b>11028</b>	<b>9,28</b>	<b>15,38</b>	<b>6,31</b>	<b>46,66</b>	<b>4,93</b>
Tr 2	2,6	31,94	1,43	53,82	0,81
Tr 3	2,18	30,14	1,34	56,19	0,76
Tr 5	2,00	24,72	0,78	60,24	0,72
Tr 7	2,34	29,79	1,15	55,23	0,76

Tabla 3.4. Tabla que presenta la relación de pigmentos producidos por la cepa silvestre CECT 11028 y los transformantes con la construcción pIM-Pgpd/crtS expresados en porcentaje de área. Tr 1, 4, 6 y 9 corresponden a los transformantes derivados de la cepa ATCC 96815; 11028 corresponde a la cepa CECT 11028; Tr 2, 3, 5 y 7 corresponden a los transformantes de la cepa CECT 11028. \*no significativo.

A pesar de que la expresión del gen *crtS* se encuentra aumentada de forma significativa, la producción específica de astaxantina no se ve aumentada de forma significativa. Esto podría deberse a que un exceso de proteína CrtS provoque que la modificación post-traduccional no sea la adecuada o que este exceso de proteína sea detectado como dañino para la célula y se activen los procesos de degradación proteica. De esta forma la cantidad de proteína funcional no sería suficiente para provocar un aumento en la producción de astaxantina.

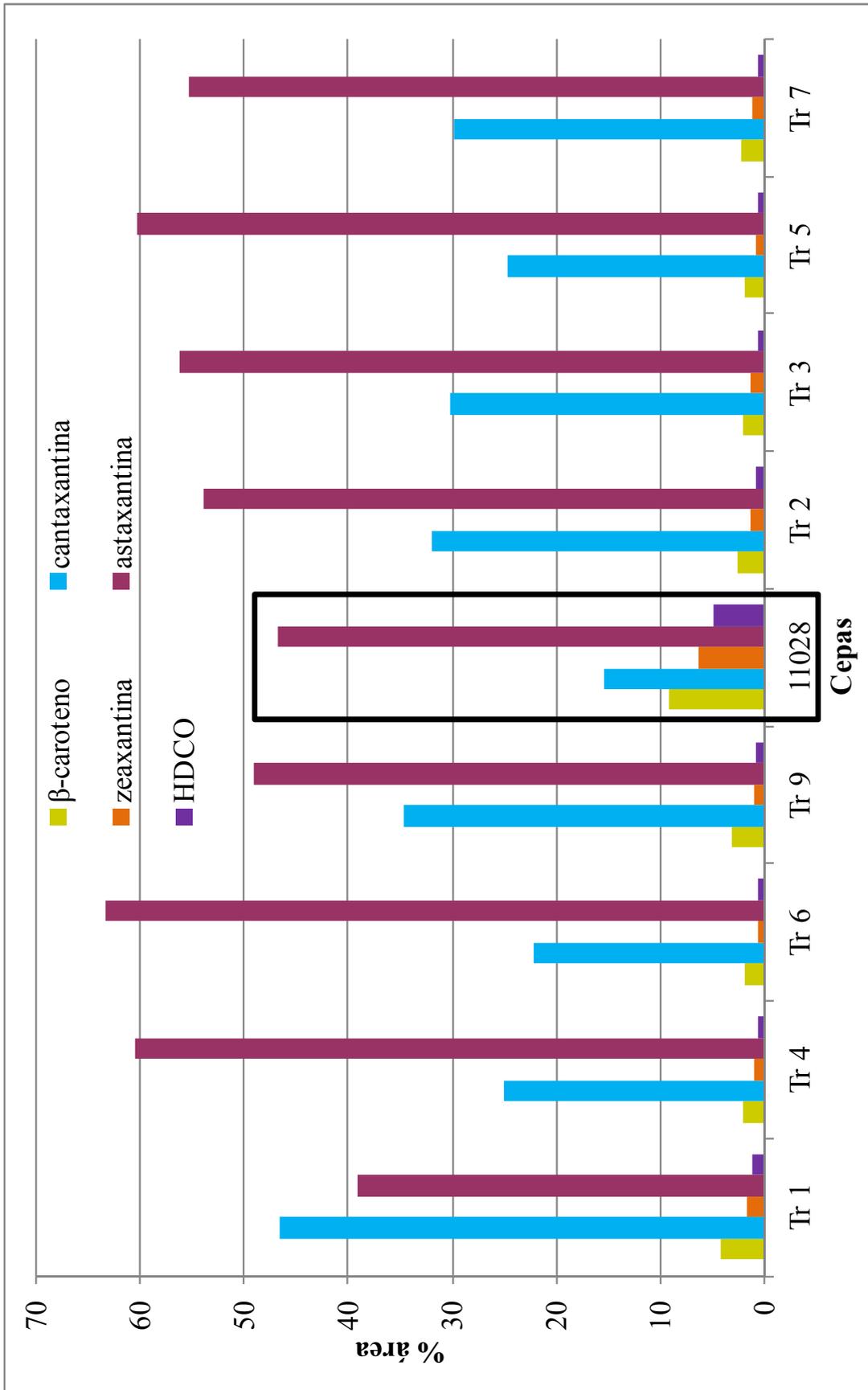


Figura 3. 21. Gráfico resumen donde se representa la producción de los distintos carotenoides producidos por los distintos transformantes con la construcción pIM-Pgpd/crtS expresados en porcentaje de área. En el recuadro se destaca la cepa silvestre CECT 11028. Tr 1, 4, 6 y 9 corresponden a los transformantes derivados de la cepa ATCC 96815. 2, 3, 5 y 7 corresponden a los transformantes derivados de la cepa CECT 11028.

### 3.3.6. Análisis de los transformantes pIM-Pgdh/crtS

Una vez obtenidos los transformantes con la construcción pIM-Pgdh/crtS se procedió a su análisis a nivel de ARN y de producción de pigmentos. Puesto que el promotor Pgdh es un promotor reprimible por fuente de nitrógeno (Rodríguez-Saiz *et al.*, 2009), además de llevarlos a cabo en medio YM los estudios se realizaron también en el medio definido YNB utilizando como fuente de nitrógeno acetato amónico o glutamato sódico (este última es una fuente no represora; ver apartado 2.4.1. de Materiales y Métodos).

#### 3.3.6.1. Expresión del gen crtS en transformantes con pIM-Pgdh/crtS

Para analizar la expresión del gen *crtS* en las cepas silvestres se extrajo ARNt a partir de cultivos crecidos en los tres medios de cultivo y recogidos a las 48 horas, tal y como se describe en el apartado 2.7.1. de Materiales y Métodos. La cuantificación aproximada de las diferencias de expresión del gen *crtS* entre las cepas parentales y los transformantes con pIM-Pgdh/crtS se realizó mediante una RT-PCR semicuantitativa con 20 ng de ARN total por reacción y tratado con ADNasa. Como control de transcripción se usó el gen de la actina, y como control de la presencia de ADN se llevó a cabo una PCR con ese mismo ARN tratado y el mismo programa de temperaturas usado para el gen *crtS*. Se tomaron muestras a distintos ciclos de amplificación (concretamente en los ciclos 15, 20, 25, 30 y 35; figuras 3.22., 3.24. y 3.26.).

- *Medio YM*: la expresión del gen *crtS* de los transformantes pIM-Pgdh/crtS se encuentra aumentada respecto a la obtenida para la cepa silvestre (figura 3.22. y 3.23.). La señal de amplificación mediante RT-PCR en los transformantes aparece en el ciclo 20 mientras que en las cepas parentales esto no ocurre hasta el ciclo 25, lo que es indicio de que la cantidad de ARN procedente del gen *crtS* es superior en las cepas transformantes.

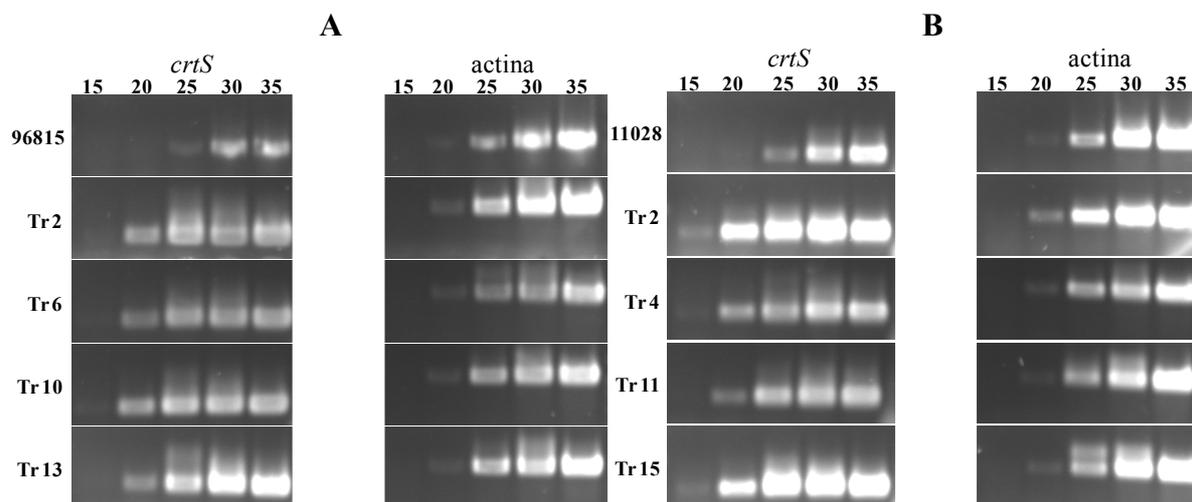


Figura 3.22. Fotografías de geles de agarosa donde se muestran las RT-PCR de los ARN totales de las cepas silvestres y sus respectivos transformantes obtenidos con el vector pIM-Pgdh/crtS obtenidos a partir de cultivos crecidos en medio YM. **A**: 96815 corresponde a la cepa ATCC 96815; Tr 2, 6, 10 y 13 corresponden a transformantes derivados de la cepa ATCC 96815. **B**: 11028 corresponde a la cepa CECT 11028; Tr 2, 4, 11 y 15 corresponden a transformantes derivados de la cepa CECT 11028. Tr es la abreviación de transformante.

El análisis de las bandas de RT-PCR por densitometría se realizó comparando la señal obtenida en el ciclo 25 para los genes *crtS* y actina. Los datos obtenidos muestran que la

expresión del gen *crtS* en los transformantes se encuentra aumentada entre un 113% y un 347%, considerando un 100% el valor obtenido para la cepa silvestre CECT 11028 (Figura 3.23.).

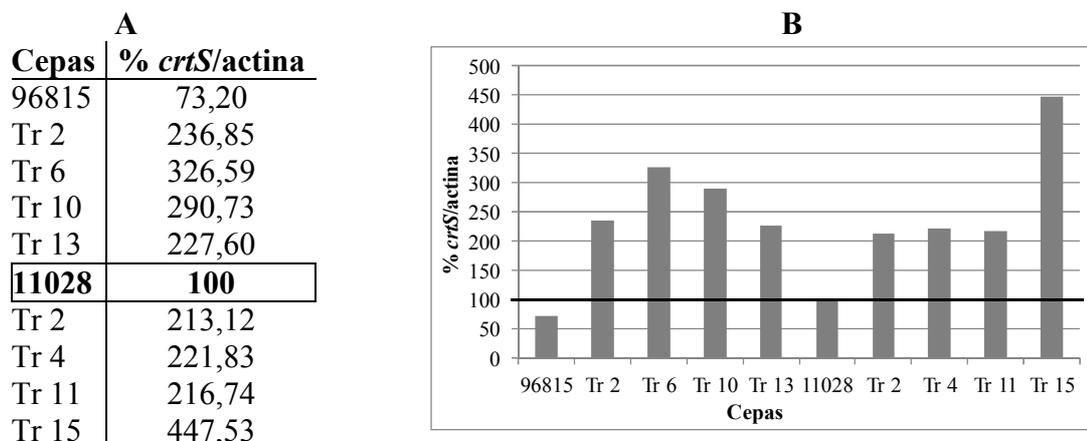


Figura 3.23. Representación de la relación de la expresión del gen *crtS* frente a la expresión del gen de la actina en los transformantes con la construcción pIM-Pgdh/*crtS* y la cepa silvestre CECT 11028, crecidos en el medio de cultivo YM. **A:** tabla donde se muestra el porcentaje relativo de la relación entre la IOD de las RT-PCR realizadas para el gen *crtS* y las realizadas para el gen de la actina frente a la cepa silvestre *X. dendrorhous* CECT 11028. **B:** gráfica donde se representa las distintas cepas frente a los porcentajes de la relación entre la expresión del gen *crtS* y la expresión de la actina, tomando como 100% el valor de la cepa silvestre *X. dendrorhous* CECT 11028. 96815 corresponde a la cepa ATCC 96815; Tr 2, 6, 10 y 13 corresponden a transformantes derivados de la cepa ATCC 96815; 11028 corresponde a la cepa CECT 11028; Tr 2, 4, 11 y 13 corresponden a transformantes derivados de la cepa CECT 11028. Tr es la abreviación de transformante.

- *Medio YNB-A* (medio YNB con acetato amónico): en este medio de cultivo definido la expresión del gen *crtS* se encuentra aumentada en las cepas transformantes respecto a la cepa parental correspondiente dado que vemos claramente señal en el ciclo 20, mientras que en las cepas parentales no aparece señal de amplificación hasta el ciclo 25 (figura 3.24.).

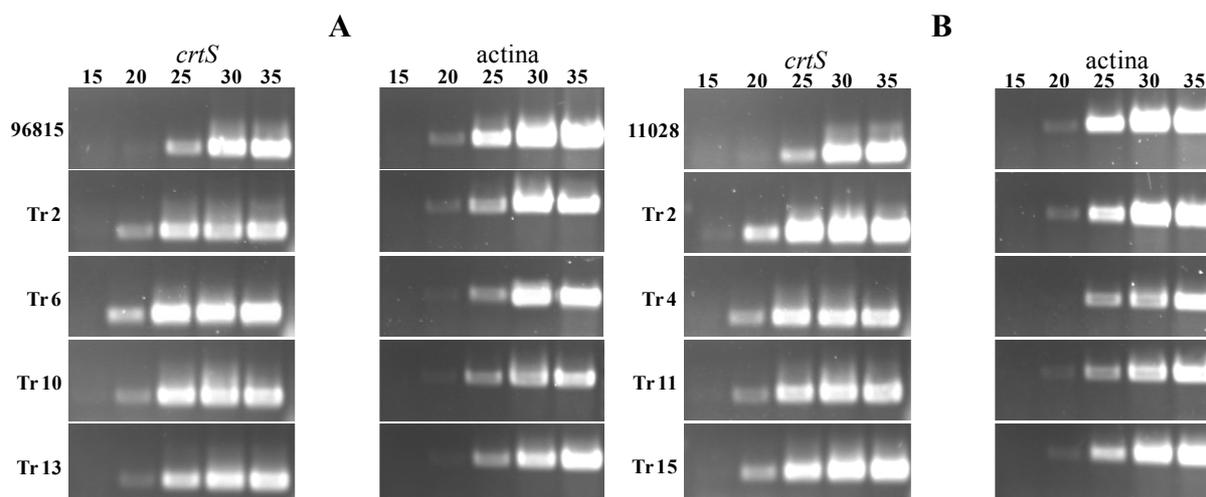


Figura 3.24. Fotografías de geles de agarosa al 0,8% teñidos con bromuro de etidio donde se muestran las RT-PCR de los ARN totales de las cepas silvestres y sus respectivos transformantes obtenidos con el vector pIM-Pgdh/*crtS* obtenidos a partir de cultivos crecidos en medio YNB con acetato amónico. **A:** 96815 corresponde a la cepa ATCC 96815; Tr 2, 6, 10 y 13 corresponden a transformantes derivados de la cepa ATCC 96815. **B:** 11028 corresponde a la cepa CECT 11028; Tr 2, 4, 11 y 15 corresponden a transformantes derivados de la cepa CECT 11028. Tr es la abreviación de transformante.

El análisis mediante densitometría de las bandas amplificadas por RT-PCR se realizó comparando la señal obtenida en el ciclo 25 para el gen *crtS* y el gen de la actina (figura

3.25.). Los datos muestran que el aumento en la expresión del gen *crtS* en los transformantes pIM-Pgdh/*crtS* crecidos en medio YNB con acetato amónico como fuente de nitrógeno varía entre un 190% y un 461%.

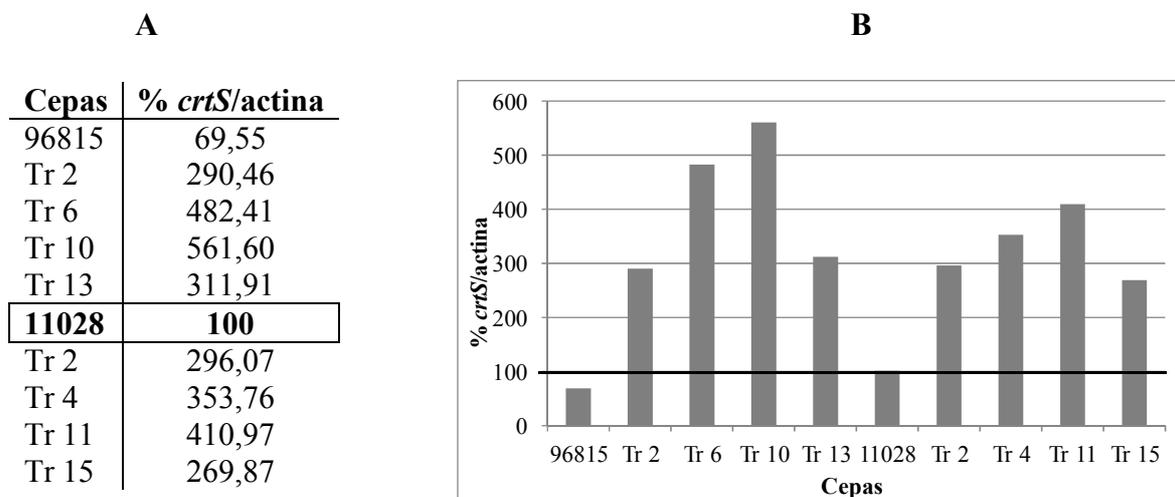


Figura 3.25. Representación de la relación de la expresión del gen *crtS* frente a la expresión del gen de la actina en los transformantes con la construcción pIM-Pgdh/*crtS* y la cepa silvestre CECT 11028, crecidos en el medio de cultivo YNB-A. **A:** tabla donde se muestra el porcentaje relativo de la relación entre la IOD de las RT-PCR realizadas para el gen *crtS* y las realizadas para el gen de la actina frente a la cepa silvestre *X. dendrorhous* CECT 11028. **B:** gráfica donde se representa las distintas cepas frente a los porcentajes de la relación entre la expresión del gen *crtS* y la expresión de la actina, tomando como 100% el valor de la cepa silvestre *X. dendrorhous* CECT 11028. 96815 corresponde a la cepa ATCC 96815; Tr 2, 6, 10 y 13 corresponden a transformantes derivados de la cepa ATCC 96815; 11028 corresponde a la cepa CECT 11028; Tr 2, 4, 11 y 13 corresponden a transformantes derivados de la cepa CECT 11028. Tr es la abreviación de transformante.

- *Medio YNB-G* (medio YNB con glutamato sódico): en este medio de cultivo definido la expresión del gen *crtS* se encuentra aumentada en las cepas transformantes respecto a las cepas parentales (figura 3.26.) pues mientras en las cepas silvestres la señal de amplificación aparece en el ciclo 25 en los transformantes se observa en el ciclo 20.

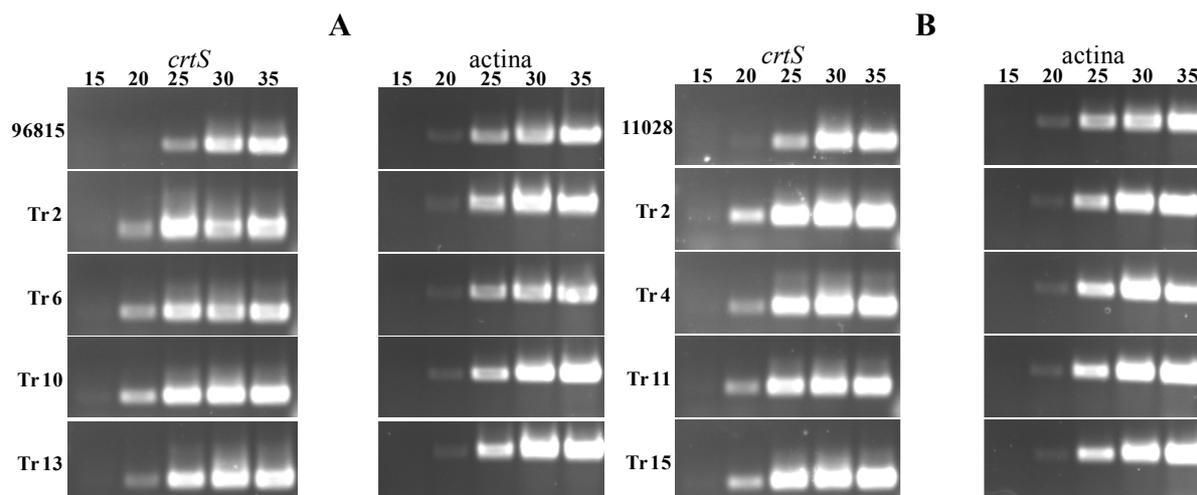


Figura 3.26. Fotografías de geles de agarosa donde se muestran las RT-PCR de los ARN totales de las cepas silvestres y sus respectivos transformantes obtenidos con el vector pIM-Pgdh/*crtS* obtenidos a partir de cultivos crecidos en medio YNB-G. **A:** 96815 corresponde a la cepa ATCC 96815; Tr 2, 6, 10 y 13 corresponden a transformantes derivados de la cepa ATCC 96815. **B:** 11028 corresponde a la cepa CECT 11028; Tr 2, 4, 11 y 15 corresponden a transformantes derivados de la cepa CECT 11028. Tr es la abreviación de transformante.

Se realizó un análisis de las fotografías por densitometría de las bandas amplificadas por RT-PCR comparando la señal obtenida en el ciclo 25 para los genes *crtS* y actina (figura 3.27.). Los datos muestran que el aumento en la expresión del gen *crtS* en los transformantes pIM-Pgdh/*crtS* crecidos en medio YNB con glutamato sódico como fuente de nitrógeno se encuentran entre un 22% y un 95%, tomando como 100% la expresión en la cepa silvestre CECT 11028.

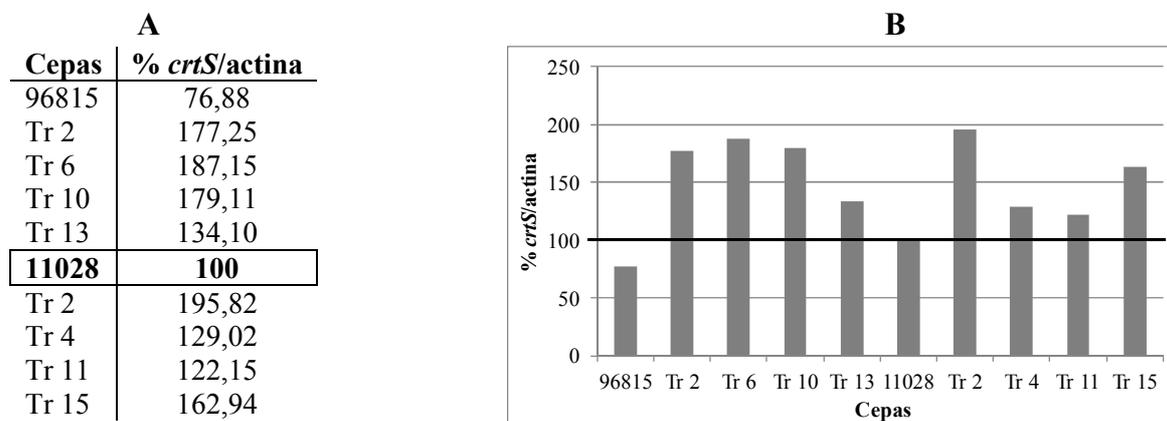


Figura 3.27. Representación de la relación de la expresión del gen *crtS* frente a la expresión del gen de la actina en los transformantes con la construcción pIM-Pgdh/*crtS* y la cepa silvestre CECT 11028, crecidos en el medio de cultivo YNB con glutamato sódico. **A:** Tabla donde se muestra el porcentaje relativo de la relación entre la IOD de las RT-PCR realizadas para el gen *crtS* y las realizadas para el gen de la actina frente a la cepa silvestre *X. dendrorhous* CECT 11028. **B:** Gráfica donde se representa las distintas cepas frente a los porcentajes de la relación entre la expresión del gen *crtS* y la expresión de la actina. 96815 corresponde a la cepa ATCC 96815; Tr 2, 6, 10 y 13 corresponden a transformantes derivados de la cepa ATCC 96815; 11028 corresponde a la cepa CECT 11028; Tr 2, 4, 11 y 13 corresponden a transformantes derivados de la cepa CECT 11028. Tr es la abreviación de transformante.

### 3.3.6.2. Producción de pigmentos en transformantes con pIM-Pgdh/*crtS*

Se estudió la producción de pigmentos en las dos cepas parentales ATCC 96815 (acumula  $\beta$ -caroteno) y CECT 11028 (forma astaxantina) y sus correspondientes transformantes con la construcción pIM-Pgdh/*crtS* en tres medios de cultivos diferentes: el medio complejo YM, el medio definido YNB con acetato amónico y el medio definido YNB con glutamato sódico. Cabe señalar que el crecimiento en los distintos medios es significativamente diferente: mientras que en el medio complejo YM alcanzan un peso seco en torno a 5 mg/mL, en el medio definido con acetato amónico se queda en 1,6 mg/mL mientras que con glutamato sódico crece hasta los 2,5 mg/mL. Las diferencias de crecimiento entre los dos tipos de medio definido se deben probablemente a las diferencias en la utilización del acetato amónico frente al glutamato sódico.

- *Medio YM:* la producción específica de astaxantina de los transformantes con la construcción pIM-Pgdh/*crtS* respecto a la cepa silvestre CECT 11028 no muestra variaciones significativas (figura 3.28.). La producción aumenta hasta un 25% respecto a la cepa silvestre, mientras el transformante 10 (deriva de la cepa ATCC 96815) se reduce un 4%. Al comparar la producción de los transformantes derivados de la cepa ATCC 96815 vemos que en este caso las diferencias sí son altamente significativas.

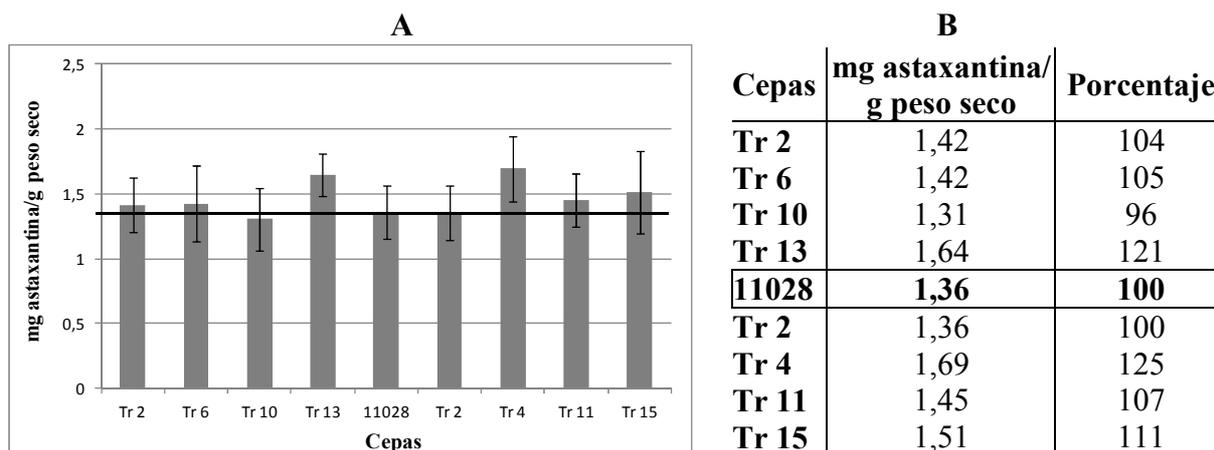


Figura 3.28. Representación gráfica de la producción de astaxantina de las cepas silvestres y de los transformantes con la construcción pIM-Pgdh/crtS en medio YM. Tr 2, 6, 10 y 13 corresponden a los transformantes derivados de la cepa ATCC 96815; 11028 corresponde a la cepa CECT 11028; Tr 2, 4, 11 y 15 corresponden a los transformantes de la cepa CECT 11028. A: gráfico de producción específica de astaxantina (expresada en microgramos de astaxantina por gramo de peso seco). B: tabla con los valores de producción específica de astaxantina (expresado en microgramos de astaxantina por gramo peso seco) y la comparación respecto a la cepa silvestre CECT 11028 (porcentaje respecto a la cepa CECT 11028). Tr es la abreviación de transformante.

Una vez estudiado la producción específica de astaxantina, se analizaron los compuestos intermedios de la ruta de biosíntesis respecto al porcentaje de área que representan en los cromatogramas procedentes del HPLC (tabla 3.5. y figura 3.29.). Se observó que la producción de  $\beta$ -caroteno y HDCO se redujo de forma significativa. Así mismo la producción de zeaxantina también se redujo, aunque al realizar la prueba de T de Student no muestra diferencias significativas.

Por el contrario, en el caso de la cantaxantina la producción se ve aumentada significativamente. Si nos fijamos en la astaxantina vemos que a pesar de que en la producción específica no hay variaciones significativas, los datos de porcentaje de área muestran que existen diferencias significativas.

Cepas	$\beta$ -caroteno	cantaxantina	zeaxantina	astaxantina	HDCO
Tr 2	1,85	29,34	2,19	59,26	0,59
Tr 6	1,75	25,55	2,29	61,19	0,60
Tr 10	1,93	28,99	2,98	57,65	0,62
Tr 13	1,46	21,97	2,98	64,88	0,48
<b>11028</b>	<b>9,28</b>	<b>15,38</b>	<b>6,305</b>	<b>46,66</b>	<b>4,93</b>
Tr 2	2,08	32,31	2,40	56,15	0,73
Tr 4	1,41	20,20	3,16	66,96	0,55
Tr 11	1,34	20,42	3,20	66,79	0,58
Tr 15	1,87	26,96	3,01	59,14	0,60

Tabla 3.5. Tabla que presenta la relación de pigmentos producidos por la cepa silvestre CECT 11028 y los transformantes con la construcción pIM-Pgdh/crtS en el medio de cultivo YM expresados en porcentaje de área. Tr 2, 6, 10 y 13 corresponden a los transformantes derivados de la cepa ATCC 96815; 11028 corresponde a la cepa CECT 11028; Tr 2, 4, 11 y 13 corresponden a los transformantes de la cepa CECT 11028. Tr es la abreviatura para transformante.

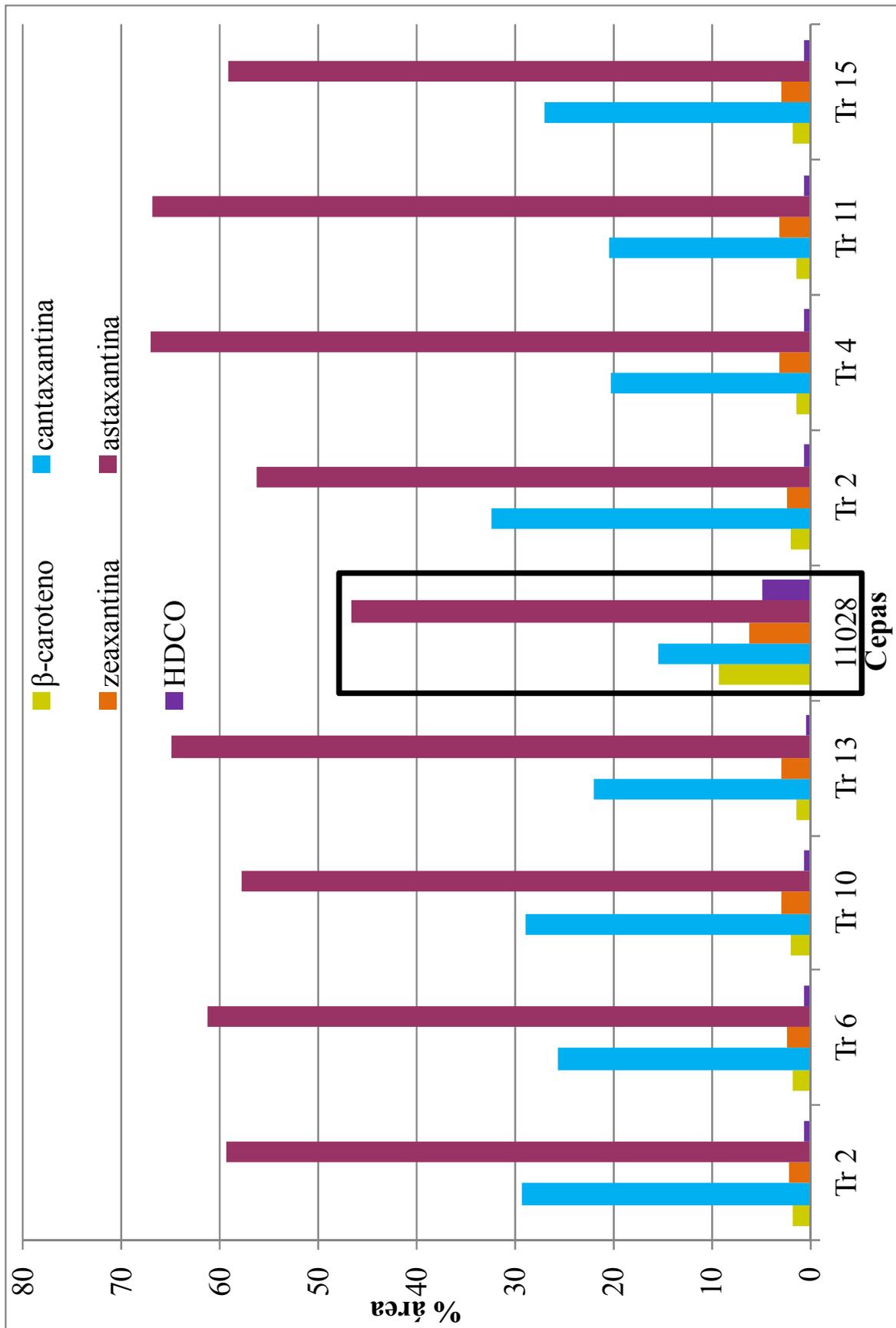


Figura 3.29. Gráfico resumen donde se representa la producción de los distintos carotenoides producidos por los distintos transformantes con la construcción pIM-gdh/crtS en el medio de cultivo YM expresados en porcentaje de área. En el recuadro se destaca la cepa silvestre CECT 11028. Tr 2, 6, 10 y 13 corresponden a los transformantes derivados de la cepa ATCC 96815. 2, 4, 11 y 15 corresponden a los transformantes derivados de la cepa CECT 11028.

- *Medio YNB-A*: la producción específica de astaxantina de los transformantes con la construcción pIM-Pgdh/crtS respecto a la cepa silvestre CECT 11028 en medio definido con acetato amónico como fuente de nitrógeno se encuentra reducida mayoritariamente de forma significativa, salvo en un transformante derivados de la cepa ATCC 96815 en el que la reducción no es significativa (transformante 10), (figura 3.30.).

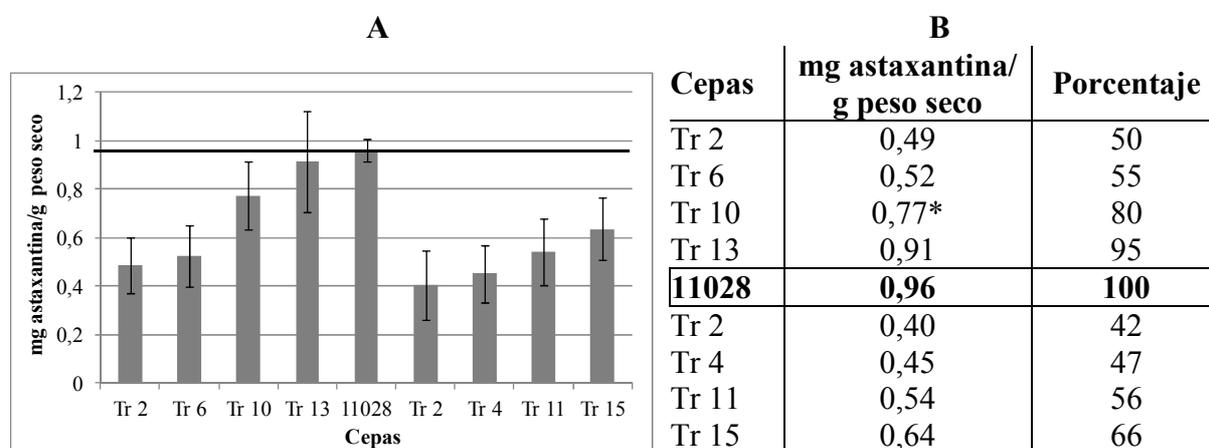


Figura 3.30. Representación gráfica de la producción de astaxantina de las cepas silvestres y de los transformantes con la construcción pIM-Pgdh/crtS en medio YNB-A. Tr 2, 6, 10 y 13 corresponden a los transformantes derivados de la cepa ATCC 96815; 11028 corresponde a la cepa CECT 11028; Tr 2, 4, 11 y 15 corresponden a los transformantes de la cepa CECT 11028. **A**: gráfico de producción específica de astaxantina (expresada en microgramos de astaxantina por gramo de peso seco). **B**: tabla con los valores de producción específica de astaxantina (expresado en microgramos de astaxantina por gramo peso seco) y la comparación respecto a la cepa silvestre CECT 11028 (Porcentaje respecto a la cepa CECT 11028). Tr es la abreviación de transformante. \*no significativo.

Posteriormente se procedió a analizar la producción relativa de los distintos intermediarios de la ruta de biosíntesis de la astaxantina en base a los cromatogramas de HPLC obtenidos. Así vimos que el porcentaje de área correspondiente al  $\beta$ -caroteno aumentó respecto al de la cepa silvestre CECT 11028 de forma significativa, salvo en un caso (transformante 13 derivado de la cepa ATCC 96815) en el que la prueba T de Student no muestra variaciones significativas (tabla 3.6. y figura 3.31.).

En el caso de la cantaxantina mientras que en unos casos la producción aumentó (transformantes 2 y 6 derivados de la cepa ATCC 96815, 2 y 11 de la cepa CECT 11028) aunque no es significativo, en el resto de transformantes la formación de cantaxantina se vio reducida aunque solamente presentaron variación significativa en los derivados de la cepa ATCC 96815 (transformantes 10 y 13). Los datos para la zeaxantina mostraron un comportamiento parecido al de la cantaxantina: mientras en unos transformantes la producción de zeaxantina aumentó (transformantes 2 y 4 de la cepa CECT 11028), en el resto se vio disminuida. A pesar de esto salvo los transformantes 2, 6 y 13 (derivan de la cepa ATCC 96815) que mostraron unas variaciones significativas, en el resto de los transformantes las variaciones no son significativas.

La astaxantina es un caso aparte puesto que en todos los transformantes su producción se vio reducida de forma significativa salvo en 2 transformantes (10 y 13 de la cepa ATCC 96815) en los que la variación no es significativa. El compuesto monocíclico HDCO no se

detectó en ninguna de las cepas transformantes, a pesar de que sí se encontró en la cepa silvestre CECT 11028.

Cepas	$\beta$ -caroteno	cantaxantina	zeaxantina	astaxantina	HDCO
Tr 2	5,08	14,22*	0,38	43,37	--
Tr 6	5,00	13,93*	0,44	45,22	--
Tr 10	3,93	10,95	0,38*	52,45*	--
Tr 13	3,49*	7,05	0,54	53,31*	--
<b>11028</b>	<b>2,91</b>	<b>13,85</b>	<b>0,77</b>	<b>61,17</b>	<b>1,29</b>
Tr 2	6,26	15,39*	1,31*	41,98	--
Tr 4	5,31	13,35*	0,99*	45,35	--
Tr 11	5,13	14,74*	0,51*	42,74	--
Tr 15	5,02	13,84*	0,61*	44,57	--

Tabla 3.6. Tabla que presenta la relación de pigmentos producidos por la cepa silvestre CECT 11028 y los transformantes con la construcción pIM-Pgdh/crtS en el medio de cultivo YNB-A expresados en porcentaje de área. Tr 2, 6, 10 y 13 corresponden a los transformantes derivados de la cepa ATCC 96815; 11028 corresponde a la cepa CECT 11028; Tr 2, 4, 11 y 13 corresponden a los transformantes de la cepa CECT 11028. Tr es la abreviatura para transformante. \*no significativo.

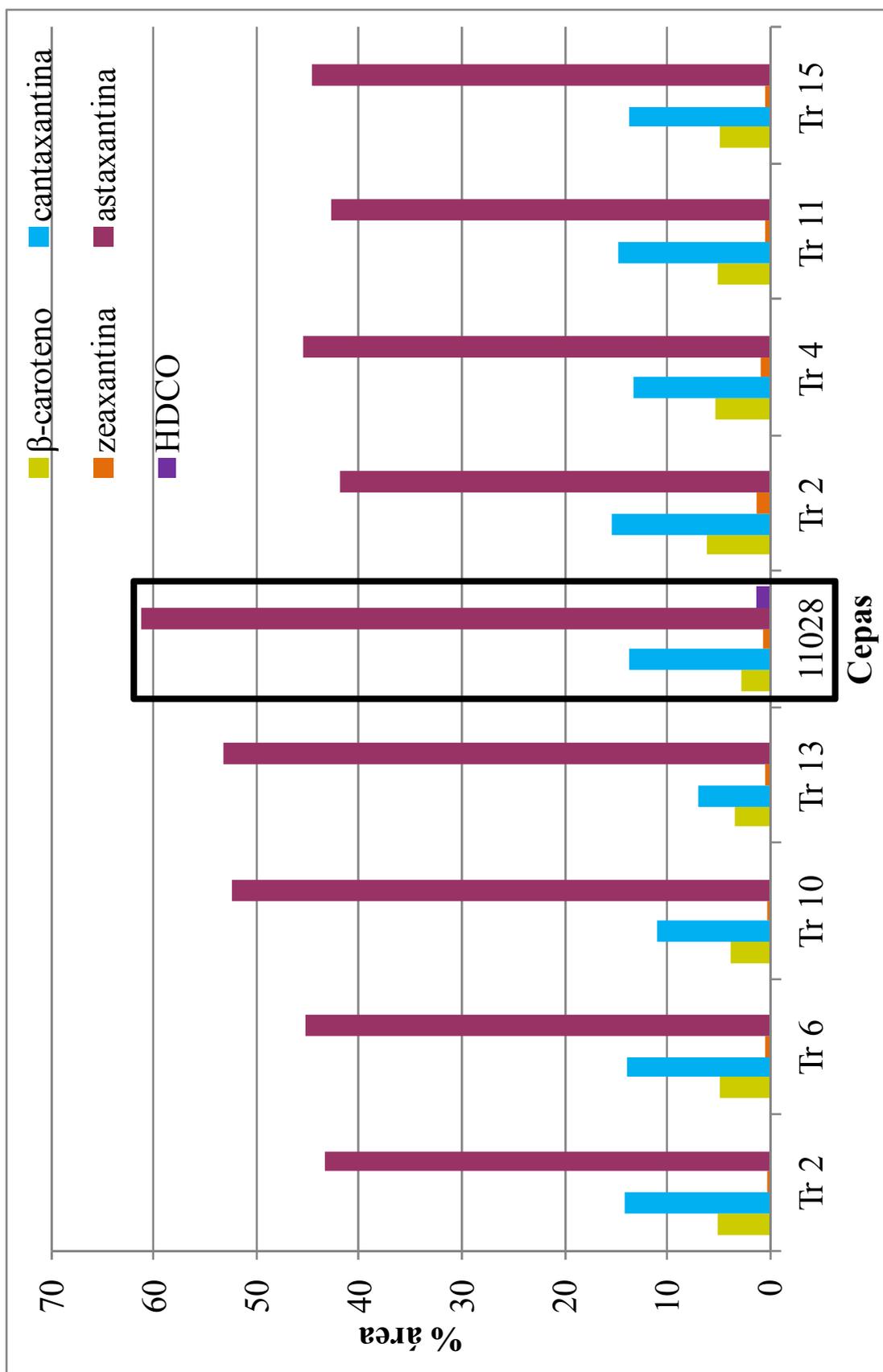


Figura 3.31. Gráfico resumen donde se representa la producción de los distintos carotenoides producidos por los distintos transformantes con la construcción pIM-gdh/crtS en el medio de cultivo YNB-A expresados en porcentaje de área. En el recuadro se destaca la cepa silvestre CECT 11028. Tr 2, 6, 10 y 13 corresponden a los transformantes derivados de la cepa ATCC 96815. 2, 4, 11 y 15 corresponden a los transformantes derivados de la cepa CECT 11028. Tr es la abreviatura de transformante.

- Medio YNB-G: la producción específica de astaxantina de los transformantes con la construcción pIM-Pgdh/crtS respecto a la cepa silvestre CECT 11028 en medio definido con glutamato sódico como fuente de nitrógeno se encuentra reducida con unas diferencias (figura 3.32.).

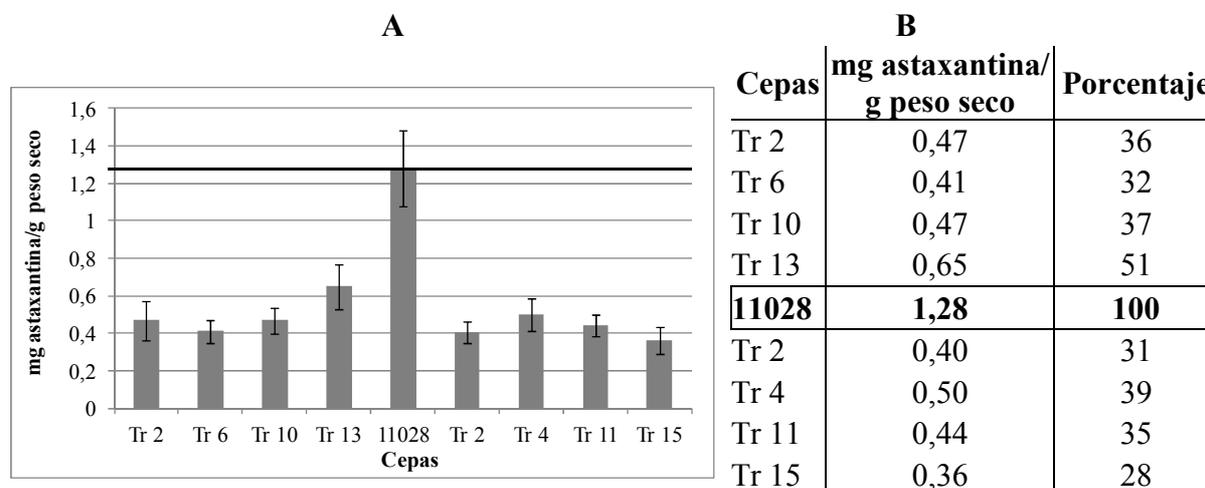


Figura 3.32. Representación gráfica de la producción de astaxantina de las cepas silvestres y de los transformantes con la construcción pIM-Pgdh/crtS en medio YNB-G. Tr 2, 6, 10 y 13 corresponden a los transformantes derivados de la cepa ATCC 96815; 11028 corresponde a la cepa CECT 11028; Tr 2, 4, 11 y 15 corresponden a los transformantes de la cepa CECT 11028. **A**: gráfico de producción específica de astaxantina (expresada en microgramos de astaxantina por gramo de peso seco). **B**: tabla con los valores de producción específica de astaxantina (expresado en microgramos de astaxantina por gramo peso seco) y la comparación respecto a la cepa silvestre CECT 11028 (Porcentaje respecto a la cepa CECT 11028). Tr es la abreviación de transformante.

Finalmente se estudió la producción relativa de pigmentos expresada en porcentaje de área a partir de los cromatogramas obtenidos mediante HPLC (tabla 3.7. y figura 3.33.). Al comparar los resultados entre los distintos transformantes y la cepa silvestre se vio que el  $\beta$ -caroteno aumentó de forma significativa en todos los transformantes analizados. La formación de zeaxantina aumenta significativamente en cuatro de los transformantes, mientras que en el resto de transformantes la variación no es significativa respecto a la cepa silvestre. En cuanto a la cantaxantina y la astaxantina vemos que la producción se reduce de forma significativa. Por el contrario y al igual que sucede en el medio definido con acetato amónico el HDCO no se detecta en los transformantes a pesar de si encontrarse en la cepa silvestre CECT 11028.

En conjunto vemos que la sobreexpresión del gen *crtS* con el promotor de la glutamato deshidrogenasa en medio complejo no implica una mayor producción de astaxantina, debido probablemente a que el exceso de proteína CrtS hace que o bien sea tóxica para la célula y sea degradada o bien que la el procesado post-traducciona no sea el adecuado y la proteína no sea funcional. Así mismo e igual a lo que sucede cuando sobreexpresamos el gen *crtS* con el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa vemos que la conversión del  $\beta$ -caroteno en astaxantina está limitada por el aporte de poder reductor, y se acumula el intermediario dicetolado cantaxantina.

Cepas	$\beta$ -caroteno	cantaxantina	zeaxantina	astaxantina	HDCO
Tr 2	5,85	13,07	0,57	39,47	--
Tr 6	6,04	13,89	0,52*	37,36	--
Tr 10	5,32	13,19	0,54*	39,07	--
Tr 13	4,49	2,743*	0,41*	46,47	--
<b>11028</b>	<b>1,46</b>	<b>10,26</b>	<b>0,38</b>	<b>69,72</b>	<b>0,58</b>
Tr 2	6,03	13,31	0,59	37,73	--
Tr 4	5,16	11,72	0,63	42,64	--
Tr 11	4,95	11,41	0,55	41,19	--
Tr 15	6,94	14,09	0,57*	32,67	--

Tabla 3.7. Tabla que presenta la relación de pigmentos producidos por la cepa silvestre CECT 11028 y los transformantes con la construcción pIM-Pgdh/crtS en el medio de cultivo YNB-G expresados en porcentaje de área. Tr 2, 6, 10 y 13 corresponden a los transformantes derivados de la cepa ATCC 96815; 11028 corresponde a la cepa CECT 11028; Tr 2, 4, 11 y 13 corresponden a los transformantes de la cepa CECT 11028. Tr es la abreviatura para transformante. \*p<0,05 poco significativo; \*no significativo.

En cuanto a los resultados obtenidos para el medio definido YNB con las dos fuentes de nitrógeno vemos que estos medios no son adecuados para la producción de xantofilas. La síntesis de astaxantina es un proceso que requiere un gran aporte de energía. La reducción de la producción de astaxantina son en ambos casos significativas, debido posiblemente a que el gasto energético requerido para la transcripción del gen *crtS* impida una completa síntesis de astaxantina, puesto que en ambos casos vemos que también aumenta el acúmulo de  $\beta$ -caroteno.

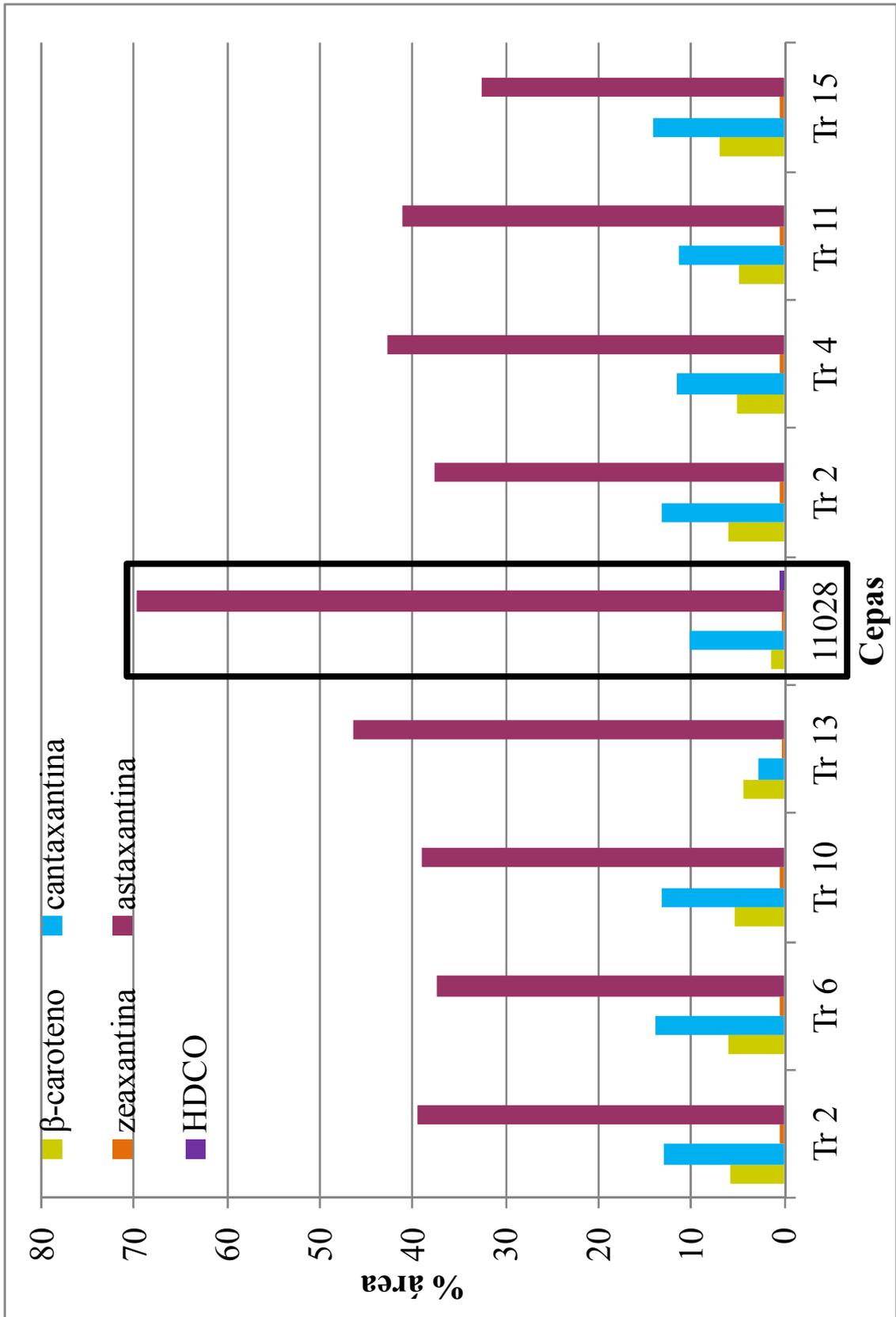


Figura 3.33. Gráfico resumen donde se representa la producción de los distintos carotenoides producidos por los distintos transformantes con la construcción pIM-gdh/crtS en el medio de cultivo YNB-G expresados en porcentaje de área. En el recuadro se destaca la cepa silvestre CECT 11028. Tr 2, 6, 10 y 13 corresponden a los transformantes derivados de la cepa ATCC 96815. 2, 4, 11 y 15 corresponden a los transformantes derivados de la cepa CECT 11028. Tr es la abreviatura de transformante.

### 3.4. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DEL GEN *crtS*: complementación de la cepa ATCC 96815

A pesar de que se conoce la secuencia nucleotídica del gen *crtS* y que su participación en la conversión de  $\beta$ -caroteno en astaxantina es esencial, todavía se desconoce cuál es la actividad enzimática real que posee la proteína codificada por dicho gen. Existen dos hipótesis fundamentales (Martin *et al.*, 2008): 1) es una enzima bifuncional que realiza las dos actividades implicadas (las actividades cetolasa e hidroxilasa), o 2) por el contrario únicamente realiza una de ellas (la actividad cetolasa o la hidroxilasa).

Para tratar de aclarar algo el tema se pensó en complementar la cepa ATCC 96815 (tiene mutado el gen *crtS* por lo que no produce astaxantina, acumulando  $\beta$ -caroteno) con otros genes involucrados en la oxidación del  $\beta$ -caroteno. Los genes seleccionados fueron el gen *crtW* (codifica una  $\beta$ -caroteno cetolasa) y el *crtZ* (codifica una  $\beta$ -caroteno hidroxilasa) de la bacteria *Paracoccus* sp. N81106 (antes denominada *Agrobacterium aurantiacum*: bacteria Gram-negativa marina que es capaz de sintetizar astaxantina, [Yokoyama *et al.*, 1994]). También se escogió el gen *crtH1* (codifica una  $\beta$ -caroteno hidroxilasa) de *Adonis aestivalis* (planta que acumula xantofilas en sus flores, [Seybold y Goodwin, 1959]).

#### **3.4.1. Sustitución de los promotores y terminadores de los genes *crtW* y *crtZ* de *Paracoccus* sp. N81106**

Para llevar a cabo el trabajo se partió del plásmido pAK96 que contiene algunos de los genes de la ruta de biosíntesis de astaxantina en *Paracoccus* (Misawa *et al.*, 1995). Puesto que estos genes son de origen bacteriano y estamos trabajando con un hongo basidiomiceto, es necesario cambiar los promotores y terminadores que poseen por otros propios de hongos. Dado que teníamos clonado el promotor del gen de la gliceraldehído-3-fosfato (*Pgpd*) de *X. dendrorhous* en un plásmido pGEM<sup>®</sup>-T Easy (pGTE-*Pgpd*), y en nuestro laboratorio se había amplificado por PCR con la enzima *Phusion* el terminador del gen de la glutamato deshidrogenasa (*TgdhA*) a partir del ADN genómico de *Agaricus bisporus* (hongo basidiomiceto), se decidió emplear ambos (*Pgpd* y *TgdhA*) en los experimentos de expresión heteróloga.

Se comenzó por digerir el plásmido que contiene el promotor *Pgpd* (pGTE-*Pgpd*) con la enzima de restricción *HincII* para clonar el terminador utilizando los extremos romos dejados por la enzima *Phusion* al amplificar dicho terminador con los oligonucleótidos *TgdhAF* y *TgdhAR21*. Una vez ligado y obtenida la construcción (pGTE-*Pgpd-TgdhA*) (figura 3.34.) se comprobó que el terminador había sido clonado en la orientación adecuada mediante digestiones con distintas enzimas de restricción y su posterior secuenciación. Posteriormente se digirió el plásmido pGTE-*Pgpd-TgdhA* con la enzima de restricción *HindIII* para introducir en ese punto los genes de interés (*crtW* y *crtZ*).

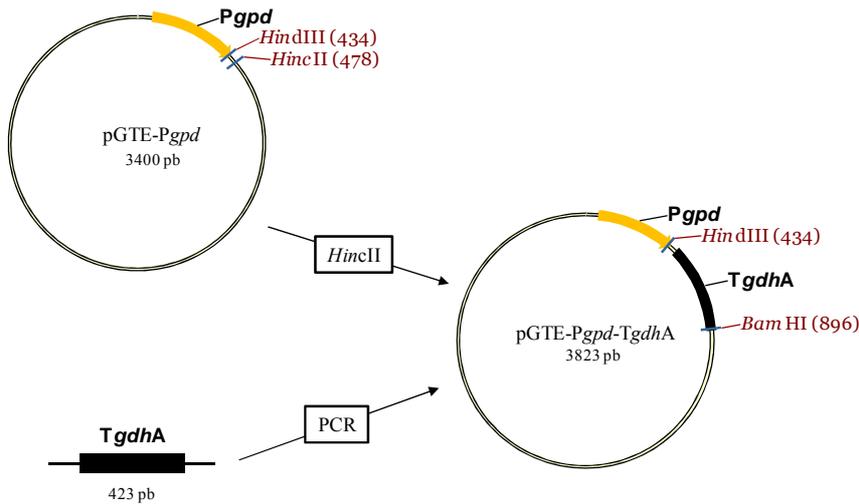


Figura 3.34. Esquema del proceso seguido para clonar el terminador de glutamato deshidrogenasa (*gdh*) de *Agaricus bisporus* junto al promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gpd*) de *X. dendrorhous*.

Por otra parte los genes *crtW* y *crtZ* se amplificaron mediante PCR con la enzima *GoTaq*<sup>®</sup> con unos oligonucleótidos que presentaban en su secuencia un sitio de corte para la enzima *HindIII* (CRTWH3F/CRTWH3R para el gen *crtW*, CRTZH3F/CRTZH3R para el gen *crtZ*). Los dos fragmentos amplificados por PCR se digirieron con la enzima de restricción *HindIII*, se purificaron y se clonaron en el vector pGTE-Pgpd-TgdhA previamente digerido con la enzima de restricción *HindIII*. De esta forma se obtuvieron dos construcciones, una para el gen *crtW* (pGTE-PcrtWT) y otra para el gen *crtZ* (pGTE-PcrtZT), en los que los genes *crtW* y *crtZ* se encuentran acoplados al promotor *Pgpd* de *X. dendrorhous* y al terminador *TgdhA* de *A. bisporus* (fig. 3.35.).

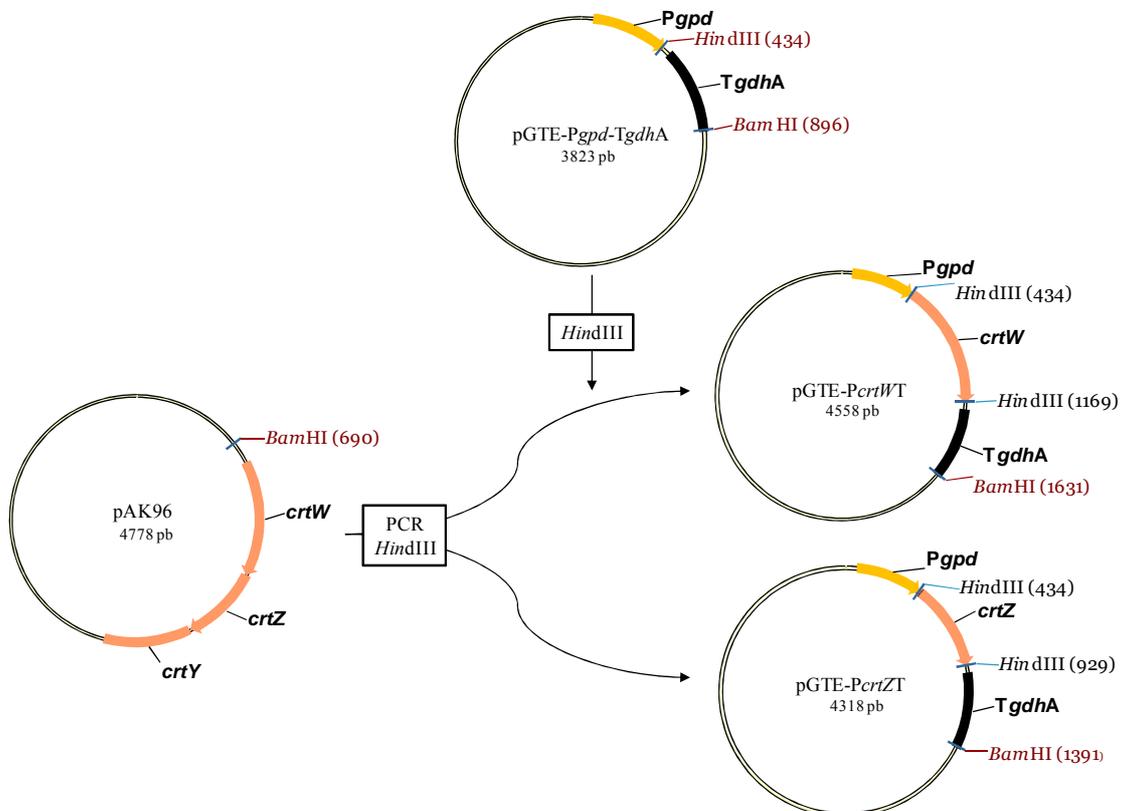


Figura 3.35. Representación esquemática del proceso de acoplamiento de los genes *crtW* y *crtZ* al promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Pgpd*) de *X. dendrorhous*, y al terminador de la glutamato deshidrogenasa (*TgdhA*) de *Agaricus bisporus*.

**3.4.2. Complementación de la cepa ATCC 96815 con los genes *crtW* y *crtZ* de *Paracoccus sp.* N81106**

Una vez fusionados los genes *crtW* y *crtZ* de *Paracoccus* al promotor *Pgpd* de *X. dendrorhous* y al terminador *TgdhA* de *A. bisporus* el siguiente paso fue realizar una construcción en la que se encuentren junto a fragmentos de ADN ribosomal y al marcador de resistencia a higromicina *hph*. Para ello se partió del plásmido pG5-ADNr-*hph* (ver figura 3.15.).

Con el fin de facilitar la clonación dentro del vector pG5-ADNr-*hph* de los genes *crtW* y *crtZ* se introdujo dentro de este plásmido el sitio de clonación múltiple del vector pBluescript® KS. Para ello se digirió el vector pG5-ADNr-*hph* con la enzima de restricción *NruI*, que contiene un único sitio de restricción dentro del vector que está situado en el fragmento de 2,1 Kb del ADN ribosomal. Por otro lado se obtuvo el sitio de clonación múltiple mediante digestión del vector pBluescript® KS con la enzima de restricción *PvuII*, que libera un fragmento de ADN de aproximadamente 400 pb. Este fragmento se clonó en el vector pG5-ADNr-*hph* previamente digerido con *NruI* (ambos cortes son compatibles pues son romos). De esta forma se obtuvo el vector pG5-ADNr-*hph*-KS (figura 3.36.). En este nuevo vector fue factible clonar los genes *crtW* y *crtZ*, en el sitio de corte único *BamHI* que posee.

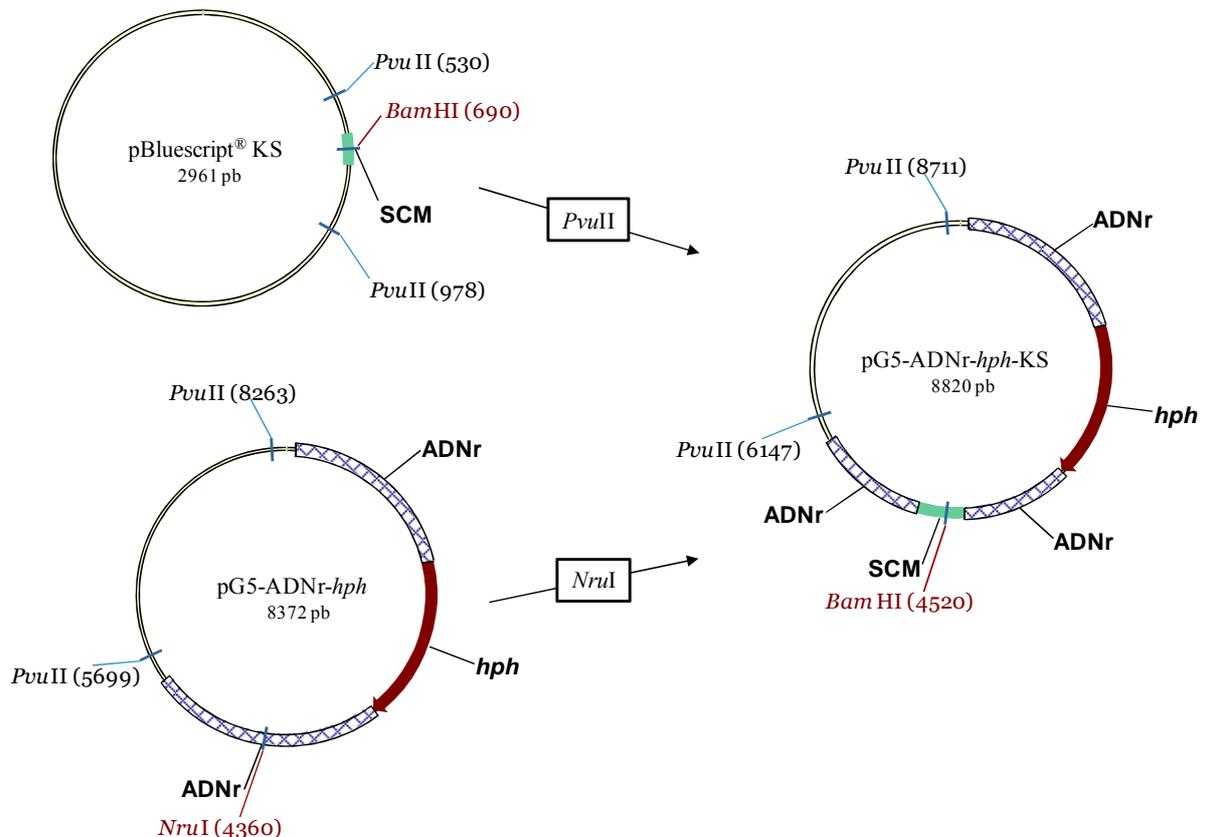


Figura 3.36. Representación esquemática de la incorporación del sitio de clonación múltiple del plásmido pBluescript® KS dentro del vector pG5-ADNr-*hph*. ADNr: ADN ribosomal; *hph*: marcador de selección por resistencia a higromicina; SCM: sitio de clonación múltiple.

Para poder clonar los genes *crtW* y *crtZ* con el promotor *Pgpd* y el terminador *TgdhA* en el sitio de corte *Bam*HI se amplificaron ambos genes con los oligonucleótidos GPDBH1F y TgdhAR21 que presentan en su secuencia un sitio de corte para esta enzima de restricción, utilizando como ADN molde los vectores pGTE-*PcrtWT* y pGTE-*PcrtZT*. Los productos de las reacciones de PCR se digirieron con la enzima de restricción *Bam*HI y se purificaron para ligarlos con el vector pG5-ADNr-*hph*-KS digerido con *Bam*HI. De este modo se obtuvieron los vectores pG5-ADNr-*hph*-*PcrtWT* (presenta el gen *crtW*) y pG5-ADNr-*hph*-*PcrtZT* (contiene el gen *crtZ*) (figura 3.37.).

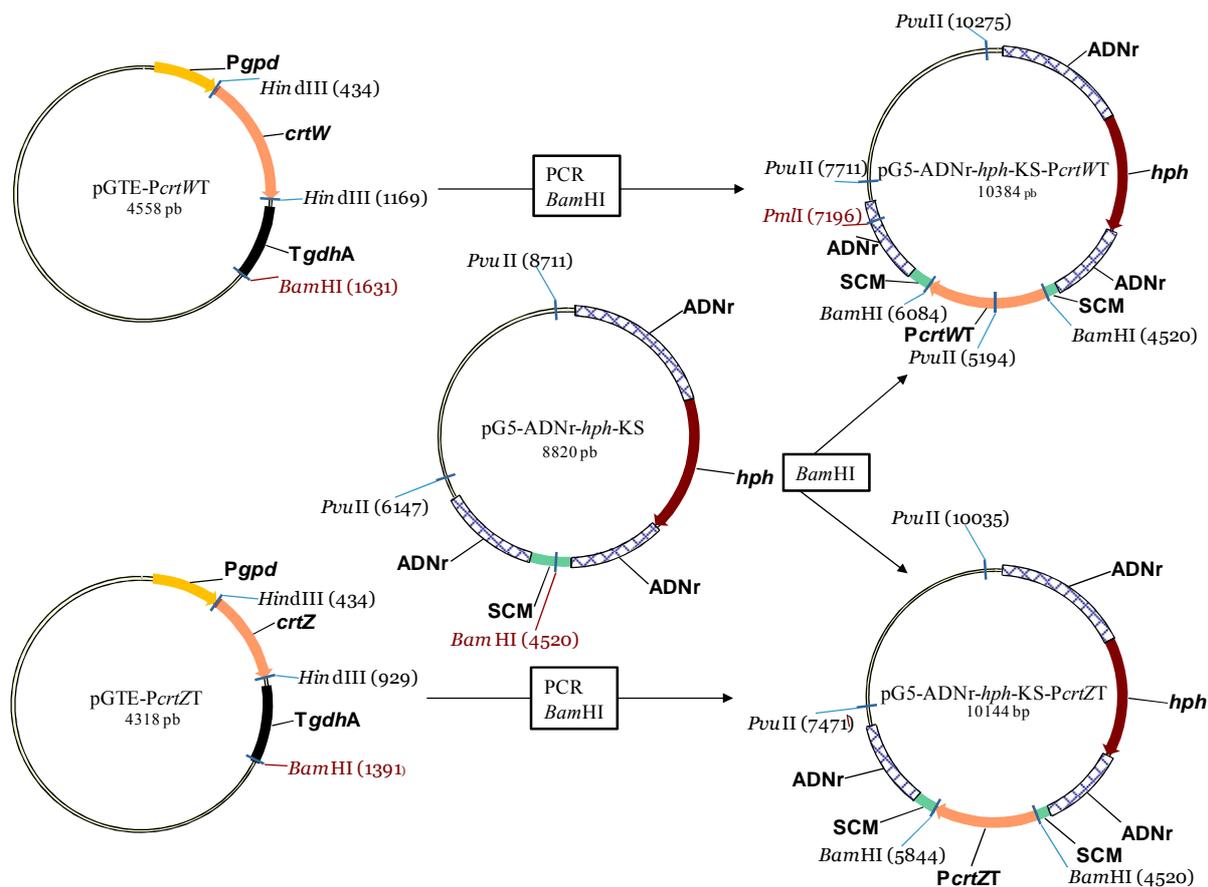


Figura 3.37. Representación esquemática del proceso llevado a cabo para la creación de los vectores pG5-ADNr-*hph*-*PcrtWT* y pG5-ADNr-*hph*-*PcrtZT*. ADNr, ADN ribosomal; *hph*, gen de resistencia a higromicina; SCM, sitio de clonación múltiple; *PcrtWT* y *PcrtZT*, genes *crtW* y *crtZ* con el promotor *Pgpd* de *X. dendrorhous* y el terminador *TgdhA* de *A. bisporus*.

Una vez obtenidas estas dos construcciones, la construcción que contiene el gen *crtW* se digirió con la enzima de restricción *Pml*I (presenta un corte único en el vector por lo que lo lineariza), mientras que el plásmido que contiene el gen *crtZ* se cortó con la enzima de restricción *Pvu*II (genera dos fragmentos de ADN, de los que se extrae el de mayor tamaño de 7,5 Kb) para transformar con la construcción linearizada o con el fragmento (en el caso del plásmido con *crtZ*) la cepa ATCC 96815, tal y como se describe en el apartado 2.6.1. de Materiales y Métodos.

Al igual que nos ocurrió con las primeras construcciones realizadas con el gen *crtS* con su promotor sustituido por los promotores *Pgpd* y *Pgdh* se obtuvieron transformantes resistentes al marcador de selección, pero al ser analizados por reacciones de PCR con la pareja de oligonucleótidos GPDBH1F y TgdhAR21 no mostraron la presencia de los genes de interés.

Por ello se procedió a llevar a cabo una estrategia similar a la que resultó efectiva para obtener transformantes con el gen *crtS* con el promotor sustituido.

Se partió del plásmido pIMR (ver figura 3.16) el cual se digirió con la enzima de restricción *EcoRV* para linearizarlo. Así mismo los genes *crtW* y *crtZ* con el promotor *Pgpd* y el terminador *TgdhA* se amplificaron empleando la enzima *Phusion* con los oligonucleótidos GPDBH1F y TgdhAR21 empleando como ADN molde los plásmidos pGTE-*PcrtWT* y pGTE-*PcrtZT*. Los fragmentos de ADN amplificados se purificaron y se ligaron al vector pIMR linearizado, dando lugar a los vectores pIM-*PcrtWT* y pIM-*PcrtZT* (figura 3.38).

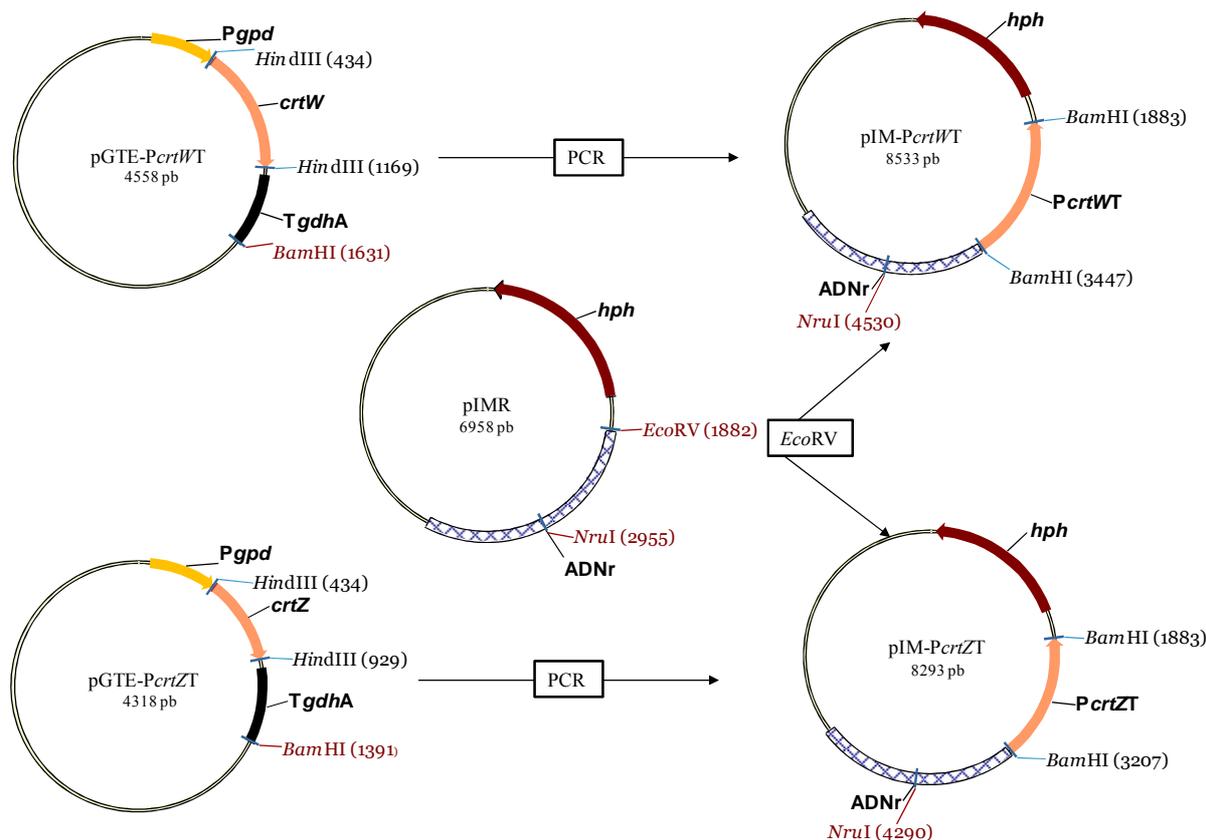


Figura 3.38. Representación gráfica del proceso por el cual se construyeron los plásmidos pIM-*PcrtWT* y pIM-*PcrtZT*. ADNr, ADN ribosomal; *hph*, gen de resistencia a higromicina; *PcrtWT* y *PcrtZT*, genes *crtW* y *crtZ* acoplados al promotor *Pgpd* y al terminador *TgdhA*.

Para transformar la cepa ATCC 96815 estas construcciones se digirieron con la enzima de restricción *NruI* que presenta un sitio único de corte dentro del fragmento de ADN ribosomal presente en el plásmido, de forma que los genes *crtW* o *crtZ* y *hph* se encuentran flanqueados por un fragmento de ADN ribosomal. A pesar de intentarlo varias veces no se consiguieron transformantes que contuvieran la construcción al analizar por PCR con la pareja de oligonucleótidos GPDBH1F y TgdhAR21 las cepas resistentes al marcador de selección.

### 3.4.3. Complementación de la cepa ATCC 96815 con el gen *crtH1* de *Adonis aestivalis*

Puesto que actualmente se desconoce la actividad enzimática llevada a cabo por la proteína CrtS se pensó en complementar la cepa ATCC 96815 (tiene mutado el gen *crtS*) con otros genes involucrados en la oxidación del  $\beta$ -caroteno. Como las construcciones previas con los

genes de *Paracoccus* sp. N81106 no parecían funcionar, se decidió probar con el gen *crtHI* de *Adonis aestivalis* que codifica para una  $\beta$ -caroteno hidroxilasa.

El desarrollo este trabajo comenzó a partir del plásmido pBS-*crtHI* que contiene el ADN complementario (ADNc) del gen *crtHI* que codifica para una  $\beta$ -caroteno hidroxilasa de *A. aestivalis* (Yu *et al.*, 2006). Puesto que este gen procede de una planta y estamos trabajando con un hongo basidiomiceto, es necesario cambiar el promotor y terminador que posee por unos propios de hongos. Dado que teníamos clonados en un mismo plásmido (pGTE-Pgpd-TgdhA) el promotor del gen de la gliceraldehído-3-fosfato (Pgpd de *X. dendrorhous*) junto al terminador del gen de la glutamato deshidrogenasa (TgdhA) de *A. bisporus*, se decidió emplear este vector en el experimento de expresión heteróloga del ADNc del gen *crtHI*.

Primeramente se amplificó el ADNc del gen *crtHI* a partir del vector pBS-*crtHI* con los oligonucleótidos CRTH1F y CRTH1R, que incorporaban en sus secuencias nucleotídicas un sitio *Hind*III en el oligonucleótido CRTH1F situado en la región 5' del gen y un sitio *Spe*I en el oligonucleótido CRTH1R que anilla en la zona 3' del gen *crtHI*. El fragmento amplificado por PCR con la enzima *Phusion* se purificó y se clonó en el vector pGEM<sup>®</sup>-5Zf digerido previamente con *Eco*RV. De esta forma se obtuvo el vector pG5-*crtHI* (figura 3.39.). Este nuevo vector se digirió con las enzimas de restricción *Hind*III y *Spe*I, para posteriormente extraer la banda de 942 pb correspondiente al ADNc del gen *crtHI*. Dicho fragmento de ADN fue clonado en el plásmido pGTE-Pgpd-TgdhA previamente digerido con las enzimas de restricción *Hind*III y *Spe*I. De esta forma se obtuvo el vector pGTE-PcrtHIT.

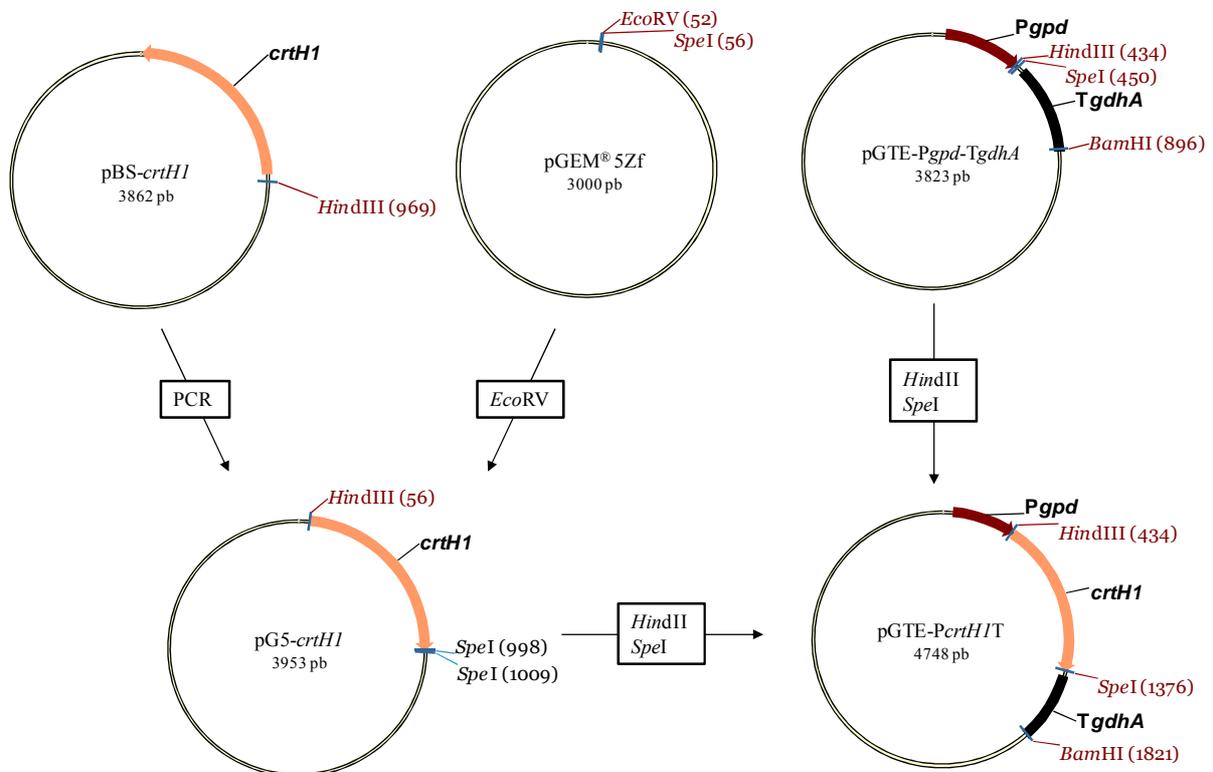


Figura 3.39. Representación gráfica del proceso llevado a cabo para acoplar el gen *crtHI* al promotor Pgpd y al terminador TgdhA. PcrtHIT, gen *crtHI* acoplado al promotor Pgpd y al terminador TgdhA.

Con el propósito de facilitar la integración en el genoma, se procedió a clonar el ADNc del gen *crtHI* junto al promotor *Pgpd* y al terminador *TgdhA* en el plásmido pG5-ADNr-*hph* que contiene parte del ADNr, junto a un marcador de resistencia (gen *hph*) para poder seleccionar las colonias transformadas. Para ello se digirió *NruI*, que tiene un corte único dentro del ADN ribosomal. Así mismo se realizó una reacción de PCR con la enzima *Phusion* sobre el vector pGTE-*PcrtHIT* con los oligonucleótidos GPDBH1 y TgdhAR21, cuyo producto se purificó y se ligó al plásmido pG5-ADNr-*hph* lo que originó el plásmido pG5-ADNr-*hph-PcrtHIT* (figura 3.40.). Este vector se digirió con la enzima de restricción *ApaI* para linearizarlo y transformar con él la cepa ATCC 96815.

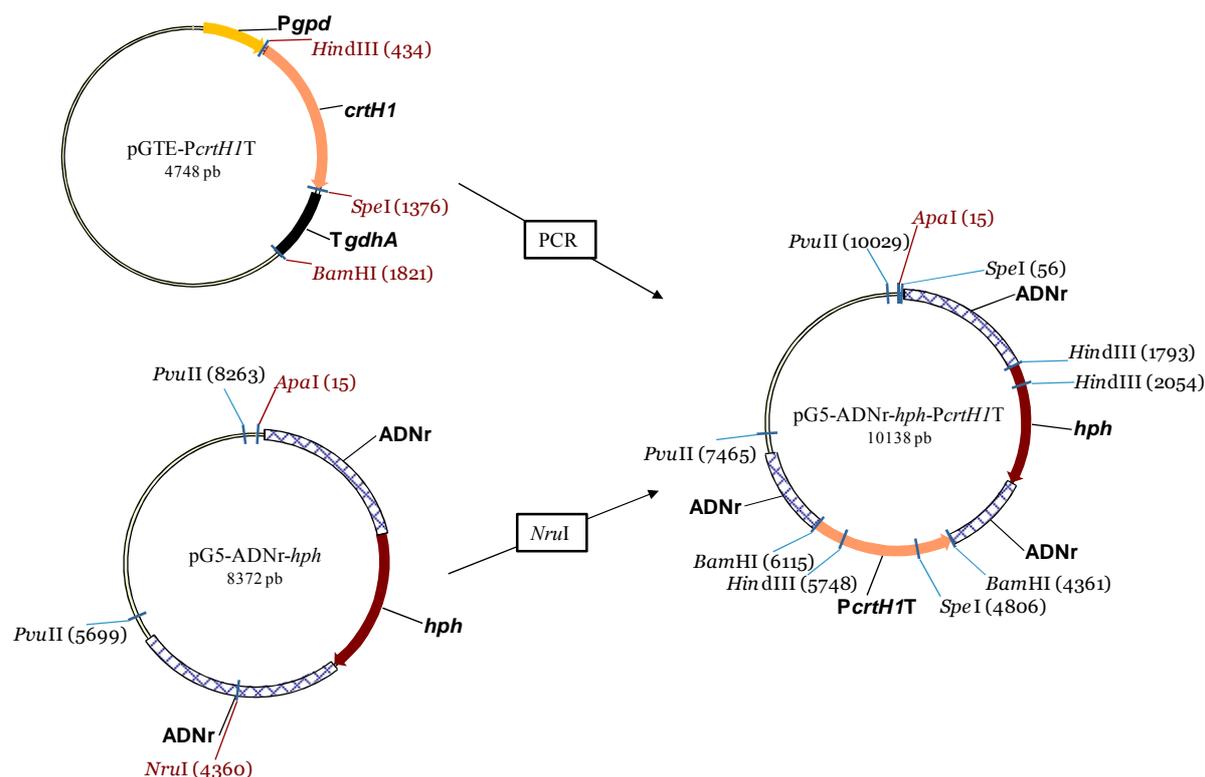


Figura 3.40. Representación gráfica del proceso de construcción del plásmido pG5-ADNr-*hph-PcrtHIT*.ADNr, ADN ribosomal; *hph*, gen de resistencia a higromicina, *PcrtHIT*, gen *crtHI* acoplado al promotor *Pgpd* y al terminador *TgdhA*.

Al igual que en otras construcciones similares no se obtuvieron transformantes que integraran el ADNc del gen de interés *crtHI*. Por ello se procedió a rehacer la construcción a partir del plásmido pIMR que resultó efectivo en la obtención de transformantes del gen *crtS* con el promotor sustituido. Inicialmente se amplificó el gen *crtHI* con el promotor *Pgpd* y el terminador *TgdhA* con los oligonucleótidos GPDBH1 y TgdhAR21, utilizando la enzima *Phusion*. El fragmento de ADN amplificado por PCR se purificó y se clonó en el vector pIMR que previamente se digirió con la enzima de restricción *EcoRV* (figura 3.41.). De esta forma se obtuvo el vector pIM-*PcrtHIT*, que se digirió con la enzima de restricción *NruI* que presenta un sitio único dentro del plásmido.

A pesar de intentarlo reiteradas veces no se encontraron transformantes de la cepa ATCC 96815 que contuvieran el gen *crtHI* acoplado al promotor *Pgpd* y al terminador *TgdhA*.

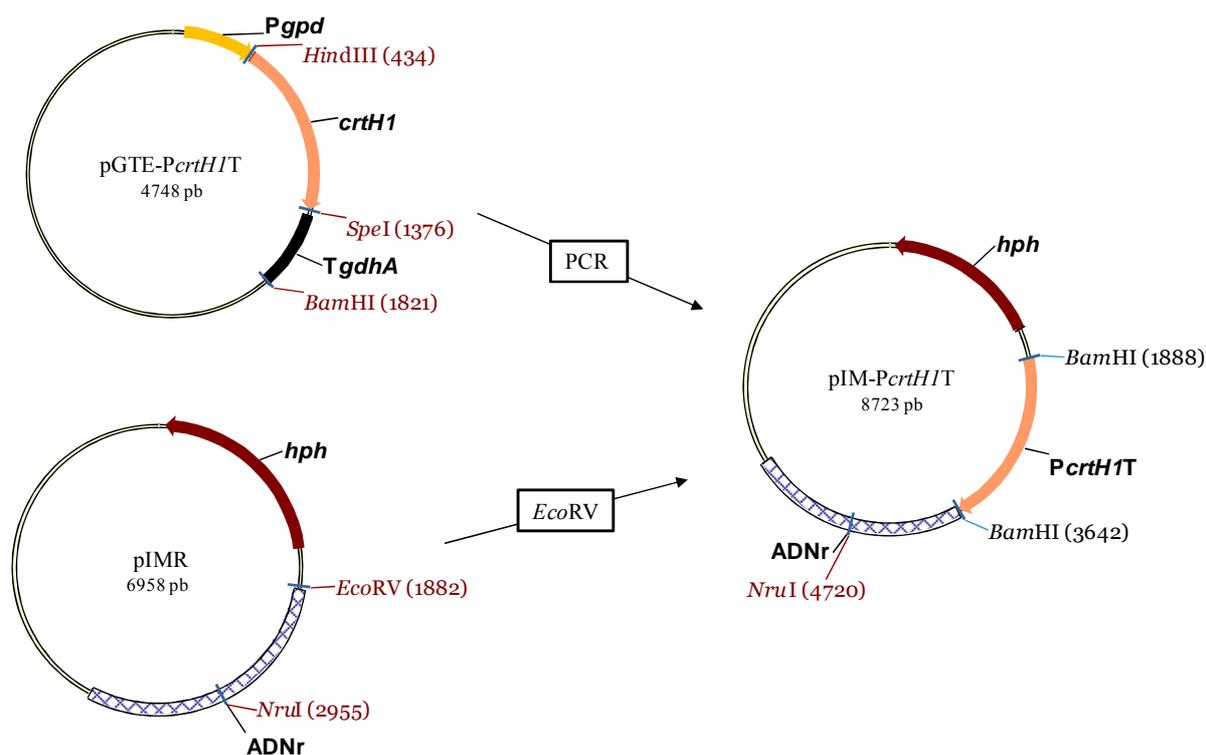


Figura 3.41. Representación gráfica del desarrollo del plásmido pIM-PcrH1T. ADNr, ADN ribosomal; *hph*, gen de resistencia a higromicina; *PcrH1T*, gen *crtH1* de *A. aestivalis* acoplado al promotor *Pgpd* de *X. dendrorhous* y al terminador *TgdhA* de *A. bisporus*.

### 3.5. DISCUSIÓN GENERAL

La modificación de la frecuencia de recombinación homóloga y heteróloga es una de las estrategias para mejorar la eficiencia de la transformación en hongos. Las roturas de ADN de doble cadena son un grave problema para las células puesto que pueden dar lugar a la muerte celular. Por ello las células presentan diversos mecanismos para encargarse de estas roturas, entre los que se encuentra la reparación por unión de extremos de ADN no homólogos (Pastwa y Blasiak, 2003). Esta reparación no homóloga es un proceso crucial que se ha conservado a lo largo de la evolución, puesto que se ha encontrado en diversos organismos desde bacterias (Weller *et al.*, 2002) hasta levaduras y mamíferos (Crichlow y Jackson, 1998). El heterodímero formado por las proteínas Ku70 y Ku80, es esencial para una reparación eficiente mediante unión de extremos no homólogos, por lo que ha sido la diana escogida para eliminar la recombinación no homóloga y así aumentar la eficiencia de integración heteróloga (de Boer *et al.*, 2010; Goins *et al.*, 2006; Meyer *et al.*, 2007; Ninomiya *et al.*, 2004; Pöggeler y Kück, 2006). En nuestro trabajo se buscaron en *Xanthophyllomyces* los dos genes que codifican para las proteínas Ku70 y Ku80 a partir de las regiones conservadas de cinco secuencias de aminoácidos de esas proteínas en hongos basidiomicetos filogenéticamente próximos a *X. dendrorhous*. A pesar de centrarnos en las regiones más altamente conservadas no fuimos capaces de obtener la secuencia de los genes *ku70* y *ku80* en *X. dendrorhous*. Es posible que en el paso de secuencia aminoacídica a secuencia nucleotídica la homología entre las regiones conservadas se diluya por diferencias en el uso de codones que presenta cada especie o por la presencia de intrones dentro de esas regiones conservadas. Por ello sería

recomendable realizar la búsqueda a partir del uso de codones propio del hongo objeto de estudio, aunque una situación ideal implicaría la secuenciación del genoma del microorganismo.

### Estudios de la expresión del gen *crtS*

El principal objetivo de este trabajo era realizar un estudio sobre las implicaciones de la expresión del gen *crtS* en la síntesis de astaxantina en *X. dendrorhous*. La expresión del gen *crtS* es imprescindible para la biosíntesis de astaxantina puesto que la mutación de dicho gen provoca que *X. dendrorhous* deje de producir astaxantina. Por ello nos propusimos estudiar los efectos de su sobreexpresión con su propio promotor y bajo el control de dos promotores fuertes como son el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Pgpd*) y el promotor de la glutamato deshidrogenasa (*Pgdh*). Para aumentar la frecuencia de integración en el genoma y que ésta sea estable, se introdujo parte del ADN<sub>r</sub> de *X. dendrorhous* en los vectores usados. El ADN<sub>r</sub> es el ADN que codifica para el ARN ribosomal y que está presente en múltiples copias en el genoma. La utilización de este ADN como diana para la integración del vector de expresión hace que éste se integre en el genoma hospedador en alto número de copias, lo que puede dar un efecto de dosis génica que contribuya a la sobreexpresión del gen en cuestión.

En los experimentos realizados en medio complejo YM con los tres promotores empleados vemos que en todos los casos la expresión del gen *crtS* aumenta respecto de los datos obtenidos para la cepa silvestre CECT 11028. Cabe destacar que el promotor *Pgpd* de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *X. dendrorhous* es el más fuerte de los tres puesto que al normalizar la expresión del gen *crtS* respecto al gen de la actina y tomando como 100% la cepa silvestre ATCC 11028 dentro de cada tanda de reacciones de RT-PCR (una tanda por promotor y medio de cultivo) observamos que los niveles de expresión del gen *crtS* bajo el control de este promotor *Pgpd* son mayores a los observados para los otros dos promotores empleados (*PcrtS* y *Pgdh*), los cuales muestran diferencias altamente significativas respecto a los valores obtenidos para los otros dos promotores. Entre el promotor nativo y el promotor *Pgdh* apenas hay diferencias, no siendo significativas.

En todos los experimentos de transformación con el gen *crtS* en la cepa ATCC 96815 (bloqueada en el gen *crtS*) restaura la producción de astaxantina independientemente del promotor utilizado en dichas transformaciones. En todos los casos estudiados se alcanzan niveles de producción (en medio complejo YM) similares a los niveles de la cepa silvestre.

En conjunto vemos que la producción específica de astaxantina en medio complejo YM de los transformantes con los distintos promotores acoplados al gen *crtS* solamente aumenta de forma significativa en las cepas derivadas de la cepa silvestre CECT 11028 y que contienen la construcción de sobreexpresión con el gen *crtS* con su propio promotor. Estos datos nos muestran que una mayor expresión de un gen biosintético no provoca siempre una mayor producción de metabolitos, quizás debido a la actuación de la regulación post-transcripcional, ya sea reduciendo la traducción del ARN mensajero o a nivel de proteína por aumento de la tasa de degradación o por modificaciones post-traduccionales inadecuadas.

Es interesante que los promotores *Pgpd* y *Pgdh* no superen al promotor nativo del gen *crtS*, lo que sugiere que las secuencias upstream del gen *crtS* propiamente dicho juegan un papel esencial en la regulación y programación de la expresión.

Al analizar el conjunto de pigmentos producidos en medio complejo vemos que la cantidad de  $\beta$ -caroteno formado se reduce, lo que indica la existencia de un posible cuello de botella en la conversión de  $\beta$ -caroteno en los siguientes intermediarios. Al aumentar la cantidad de proteína CrtS se consume el  $\beta$ -caroteno para dar lugar a más intermediarios oxigenados como es la cantaxantina y a más astaxantina. Sin embargo y de acuerdo a lo descrito por Alicaíno y colaboradores (2008), al presentar los genes *crtS* y *crtR* diferentes patrones de expresión vemos que aunque se aumente la expresión de *crtS* la conversión de  $\beta$ -caroteno en astaxantina no es total por la falta de otra enzima y/o del poder reductor necesario para llevar a cabo este paso. Así mismo vemos que la formación del compuesto monocíclico HDCO se ve reducida, lo cual se explicaría por la existencia de una ruta alternativa de producción de carotenoides monocíclicos tal y como apuntan An y colaboradores (1999): al verse favorecida la conversión de  $\beta$ -caroteno en astaxantina habría menos compuestos disponibles para la formación de HDCO.

Los medios de cultivo definidos son normalmente peores para la producción de metabolitos secundarios que los medios de cultivo complejos debido a la presencia de estimuladores (*elicitors*) en los medios complejos (Liu *et al.*, 2001). De los experimentos realizados en los dos medios definidos vemos que en el medio que tiene glutamato sódico (YNB-G) como fuente de nitrógeno existe un mayor crecimiento celular (2,5 mg peso seco/mL de cultivo) que en el medio con acetato de amonio (YNB-A) como fuente de nitrógeno (1,6 mg peso de seco/mL de cultivo), aunque en ambos casos es inferior a los datos obtenidos para el medio complejo (5 mg peso seco/mL de cultivo). Las diferencias entre el medio complejo y los medios definidos se explican porque éste es un medio más rico que permite un mayor crecimiento, mientras que los dos medios definidos son más restrictivos que no soportan gran crecimiento celular. Sin embargo, vemos que la producción específica en medio complejo YM y medio definido YNB-G es similar (1,36 y 1,28 mg de astaxantina/g de peso seco respectivamente), no existiendo diferencias significativas. Por el contrario la producción específica en el medio definido YNB-A se ve reducida hasta los 0,96 mg de astaxantina/g de peso seco, siendo esta reducción significativa comparándolo tanto con el medio complejo YM como con el medio definido YNB-G. Dentro de los medios definidos la diferencia vendría dada por la distinta utilización de las dos fuentes de nitrógeno como fuente de carbono: mientras que el acetato contiene dos átomos de carbono el glutamato presenta cinco, lo que conllevaría una mayor producción energética por mol de sustrato al ser oxidados a CO<sub>2</sub>.

### Sobreexpresión del gen *crtS*

Los transformantes que contienen la construcción de sobreexpresión con el gen *crtS* bajo el control del promotor *Pgdh* muestran una mayor expresión de este gen en los dos medios definidos empleados. Sin embargo, este aumento en la expresión es mayor en el medio definido con acetato de amonio (YNB-A) que en el medio que lleva con glutamato sódico (YNB-G) como fuente de nitrógeno.

La producción específica de astaxantina en ambos medios definidos se reduce frente a la cepa silvestre CECT 11028, aunque de forma más significativa en el medio YNB-G con glutamato sódico como fuente de nitrógeno. Las diferencias dentro de cada cepa entre los distintos medios sin embargo no son significativas salvo en dos transformantes (el número 10 derivado de la cepa ATCC 96815, y el número 15 derivado de la cepa CECT 11028) en los que las diferencias muestran poca significación. Esto puede ser debido a que 1) no se transcriba el exceso de ARN mensajero ó 2) a que el aumento en la expresión provoque que se acentúe la regulación post-transcripcional para reajustar la cantidad de proteína CrtS presente en la célula. En el caso de la cepa silvestre la producción de astaxantina es mayor en el medio YNB-G lo que podría explicarse por una mayor disponibilidad energética de este medio.

En el conjunto de pigmentos producidos en medio definido vemos que la acumulación de  $\beta$ -caroteno aumenta en todos los transformantes en los dos medios como resultado de la disminución de la síntesis de astaxantina, manteniéndose más o menos estables los intermediarios.

La conversión de  $\beta$ -caroteno requiere la participación de dos actividades enzimáticas distintas que son una hidroxilación y una cetolación. Hasta ahora en *X. dendrorhous* sólo se han identificado dos proteínas que participan en la conversión, una de las cuales es la enzima CrtR que presenta actividad reductasa. La otra proteína es CrtS que presenta semejanzas con las citocromos P450 monooxigenasas, pero de la que se desconoce la actividad enzimática que lleva a cabo. De ahí que se planteó la complementación de una cepa bloqueada en el gen *crtS* con genes que realizaran una función similar en otros organismos, como son los genes *crtW* y *crtZ* de *Paracoccus sp.* y *crtH1* de *A. aestivalis*. Sin embargo, a pesar de realizar dos tipos de construcciones distintas en las que dichos genes se encuentran modificados para su expresión en *X. dendrorhous* no se consiguió obtener transformantes con ninguna de ellas.

La razón por la que no se consiguieron transformantes en repetidos experimentos de transformación es desconocida, pero podría explicarse por dos motivos: 1) la baja eficiencia del sistema de transformación de *X. dendrorhous* y 2) la complejidad de los plásmidos construidos con los promotores *Pgpd* y *Pgdh* que probablemente disminuyan mucho más aún la eficiencia de transformación. Esta dificultad podría superarse en el futuro si se mejora la eficiencia del sistema de transformación, por ejemplo mediante el aislamiento de los genes *ku70* y *ku80*.

**Conclusiones**

---



1. Puesto que no pudieron amplificarse por PCR los genes *ku70* y *ku80* de *X. dendrorhous* no parece existir una similitud elevada entre las secuencias de los genes *ku70* y *ku80* empleados para diseñar los oligonucleótidos y las secuencias de estos mismos genes en *Xanthophyllomyces dendrorhous* CECT 11028.
2. La integración del gen *crtS* con su propio promotor en múltiples copias utilizando un vector con ADN ribosomal provoca el incremento en la expresión de este gen.
3. La integración del gen *crtS* de *X. dendrorhous* acoplado a los promotores de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Pgpd*) y de la glutamato deshidrogenasa (*Pgdh*) conlleva la sobreexpresión del gen *crtS*.
4. El promotor *Pgpd* mostró ser el promotor más fuerte de los empleados en la sobreexpresión del gen *crtS*.
5. La sobreexpresión del gen *crtS* no conlleva siempre un aumento en la producción de cantaxantina y en menor grado astaxantina.
6. No se consiguió obtener la expresión heteróloga en la cepa *X. dendrorhous* ATCC 96815 de los genes *crtW* y *crtZ* de *Paracoccus sp.* N81106 que participan en la síntesis de astaxantina en dicha bacteria.
7. No se consiguió llevar a cabo la expresión heteróloga en la cepa *X. dendrorhous* ATCC 96815 del *crtHI* de *Adonis aestivalis* que participa en la síntesis de astaxantina en dicha planta.



## **Bibliografía**

---



**A**

- Adrio JL, López M, Casqueiro J.** 1995. Electrophoretic karyotype of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Curr. Genet.* **27**:447-450.
- Adrio JL, Veiga M.** 1995. Transformation of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Tech.* **9**:509-512.
- Adrio JL, Veiga M, Casqueiro J, López M, Fernández C.** 1993. Isolation of *Phaffia rhodozyma* auxotrophic mutants by enrichment methods. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **39**:303-312.
- Alcaíno J, Barahona S, Carmona M, Lozano C, Marcoleta A, Niklitschek M, Sepúlveda D, Baeza M, Cifuentes V.** 2008. Cloning of the cytochrome p450 reductase (*crtR*) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiol.* **8**:169.
- Álvarez V, Rodríguez-Sáiz M, de la Fuente JL, Gudiña EJ, Godio RP, Martín JF, Barredo JL.** 2006. The *crtS* gene of *Xanthophyllomyces dendrorhous* encodes a novel cytochrome-P450 hydroxylase involved in the conversion of  $\beta$ -carotene into astaxanthin and other xanthophylls. *Fungal Genet. Biol.* **43**:261-272.
- Alvaro-Benito, M., de Abreu, M., Fernandez-Arrojo, L., Plou, F.J., Jimenez-Barbero, J., Ballesteros, A., Polaina, J., Fernandez-Lobato, M.** 2007. Characterization of a beta-fructofuranosidase from *Schwanniomyces occidentalis* with transfructosylating activity yielding the prebiotic 6-kestose. *J. Biotechnol.* **132**(1):75–81.
- Amar EC, Kiron V, Satoh S, Watanabe T.** 2001. Influence of various dietary synthetic carotenoids on bio-defense mechanisms in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, **32**:162-173.
- An GH.** 2001. Improved growth of the red yeast, *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*), in the presence of tricarboxylic acid cycle intermediates. *Biotechnol. Lett.* **23**:1005-1009.
- An GH, Chang KW, Johnson EA.** 1996. Effect of oxygen radicals and aeration on carotenogenesis and growth of *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*). *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**:103-109.
- An GH, Cho MH, Johnson EA.** 1999. Monocyclic carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*). *J. Biosci. Bioeng.* **88**:189-193.

**An GH, Choi ES.** (2003) Preparation of the red yeast, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, as feed additive with increased availability of astaxanthin. *Biotechnol. Lett.* **25**:767–771.

**An GH, Jang BG, Cho MH.** 2001. Cultivation of the carotenoid-hyperproducing mutant 2A2N of the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) with molasses. *J. Biosci. Bioeng.* **92**:121-125.

**An GH, Johnson EA.** 1990. Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek* **57**:191-203.

**An GH, Schuman DB, Johnson EA.** 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:116-124.

**Andrewes AG, Phaff HJ, Starr MP.** 1976. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red pigmented fermenting yeast. *Phytochemistry* **15**:1003-1007.

**Andrewes AG, Starr MP.** 1976. (3*R*,3'*R*)-astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Phytochemistry* **15**:1009-1011.

**Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore D, Smith JA, Seidman JG, Struhl K.** 1987. Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates. Brooklyn. New York.

## **B**

---

**Baeza M, Flores O, Carrasco M, Rozas JM, Oviedo V, Barahona S, Cifuentes V.** 2010. The inter-generic fungicidal activity of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J. Microbiol.* **48**(6):822-828.

**Baeza M, Sanhueza M, Flores O, Oviedo V, Libkind D y Cifuentes V.** 2009. Polymorphism of viral dsRNA in *Xanthophyllomyces dendrorhous* strains isolated from different geographic areas. *Viol. J.* **6**:160.

**Bartley GE, Scolnik PA.** 1995. Plant carotenoid: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell* **7**:1027-1038.

**Böer E, Wartmann T, Luther B, Manteuffel R, Bode R, Gellissen G, Kunze G.** 2004. Characterization of the AINV gene and the encoded invertase from the dimorphic yeast *Arxula adenivorans*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **86**:121–134.

**Boussiba S.** 2000. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response. *Physiol. Plant* **108**:111-117.

**Boussiba S, Vonshak A.** 1991. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Cell Physiol.* **32**:1077-1082.

**Bramley PM, Mackenzie A.** 1988. Regulation of carotenoid biosynthesis. *Curr. Top. Cell. Regul.* **29**:291-343.

**Britton G.** 1983. Carotenoids. The biochemistry of natural pigments. Cambridge University Press. Cambridge. pp 23-73.

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

**Britton G.** 1998. Overview of carotenoid biosynthesis. En: *Carotenoids: biosynthesis and metabolism*. Britton G, eds. Birkhauser. Basel. pp 13-147.

**Burton GW, Joyce A, Ingold KU.** 1982. First proof that vitamin E is major lipid-soluble chain breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet II*: 327.

## C

---

**Cadenas E, Sies H.** 1984. Low-level chemiluminescence as an indicator of singlet oxygen in biological systems. *Methods Enzymol.* **105**:221-231.

**Calo PT, de Miguel T, Velázquez JB, Villa TJ.** 1995. Mevalonic acid increases trans-astaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Lett.* **17**:575-578.

**Cannizzaro C, Christensen B, Nielsen J, von Stockar U.** 2004. Metabolic network analysis on *Phaffia rhodozyma* yeast using <sup>13</sup>C-labeled glucose and gas chromatography-mass spectrometry. *Metab. Eng.* **6**:340-351.

**Castillo A, Cifuentes V.** 1994. Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Phaffia rhodozyma*. *Curr. Genet.* **26**:364-368.

**Cerdá-Olmedo E.** 1985. Carotene mutants of *Phycomyces*. *Methods Enzymol.* **110**:220-243.

**Cerdá-Olmedo E.** 1994. The genetics of chemical diversity. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**:151-160.

**Cerdá-Olmedo E.** 2001. *Phycomyces* and the biology of light and color. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**:503-512.

**Chávez FP, Pons T, Delgado JM, Rodriguez L.** 1998. Cloning and sequence analysis of the gene encoding invertase (INV1) from the yeast *Candida utilis*. *Yeast* **14**:1223–1232.

**Chen J, Chen X, Xu X, Ning Y, Jin Z, Tian Y.** 2011. Biochemical characterization of an intracellular <sup>6</sup>G-fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous* and its use in production of neo-fructooligosaccharides (neo-FOSs). *Bioresour. Technol.* **102**(2):1715-1721.

**Chen X, Stone M, Schlagnhauser C, Romaine CP.** 2000. A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium* -mediated transformation of *Agaricus bisporus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4510-4513.

**Chew BP.** 1993. Role of carotenoids in the immune response. *J. Dairy Sci.* **76**:2804-2811.

**Chew BP, Park JS.** 2004. Carotenoid action on the immune response. *J. Nutr.* **134**:257-261.

**Chew BP, Park JS, Wong M, Wong TS.** 1999. A comparison of the anticancer activities of dietary  $\beta$ -carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice *in vivo*. *Anticancer Res.* **19**:1849-1853.

**Chomeczynski O, Sacchi N.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162**(1):156-159.

**Chumpolkulwong N, Kakizono T, Nagai S, Nishio N.** 1997. Increased astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutants isolated as resistant to diphenylamine. *J. Ferment. Bioeng.* **83**:429-434.

**Chun SB, Chin JE, Bai S, An GH.** 1992. Strain improvement of *Phaffia rhodozyma* by protoplast fusion. *FEMS Microbiol. Lett.* **93**:221-226.

**Cifuentes V, Hermosilla G, Martínez C, Leon 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.

**Critchlow SE, Jackson Sp.** 1998. DNA end-joining: from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* **23**(10):394-398.

**Cruz JM, Parajó JC.** 1998. Improved astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* growing on enzymatic wood hydrolysates containing glucose and cellobiose. *Food Chem.* **63**:479-484.

**Cubero B, Scazzocchio C.** 1994. Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CREA-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* **13**:407-415.

**Cunningham FX, Gantt E.** 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **49**:557-583.

**Cyanotech.** 2002. Cyanotech reports two clinical studies of Bioastin. Are presented at American College of Nutrition Meeting.

## **D**

---

**Darachi J, Piyatiratitivorakul S, Menasveta P.** 1999. Effect of astaxanthin on growth and survival of *Penaeus monodon* larvae. En: *Proceeding of the 37<sup>th</sup> Kasetsart University Annual Conference*. Pp 36-41. Oates, CG Ed.

**Davis MA, Hynes MJ.** 1991. Regulatory circuits in *Aspegillus nidulans*. En: *More gene Manipulations in Fungi*. Bennet JW, Lasure LL, eds. Academic Press. San Diego, CA. pp 151-189.

**De Boer P, Bastiaans J, Touw H, Kerkman R, Bronkhof J, van der Berg M, Offringa R.** 2010. Highly efficient gene targeting in *Penicillium chrysogenum* using the bi-partite approach in  $\Delta lig4$  or  $\Delta ku70$  mutants. *Fungal Genet. Biol.* **47**(10): 839-846.

**Dermiki M, Bourquin AL, Jauregui P.** 2009. Separation of astaxanthin from cells of *Phaffia rhodozyma* using colloidal gas aphrons in a flotation column. *Biotechnol. Prog.* **26**(2):477-87.

**Dermiki M, Gordon MH, Jauregui P.** 2008. The use of colloidal gas aphrons as novel downstream processing for the recovery of astaxanthin from cells of *Phaffia rhodozyma*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **83**:174-182.

**Díaz A, Sieiro C, Blanco P, Villa TG.** 2002. Effect of squalene on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma*. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **18**:811-812.

**Di Mascio P, Murphy ME, Sies H.** 1991. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**:149S-200S.

**Domínguez-Bocanegra AR, Torres-Muñoz JA.** 2004. Astaxanthin hyperproduction by *Phaffia rhodozyma* (now *Xanthophyllomyces dendrorhous*) with raw coconut milk as sole source of energy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**:249-52.

**Ducrey-Santopietro LM, Kula MR.** 1998. Studies of astaxanthin biosynthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). Effect of inhibitors and low temperature. *Yeast* **14**:1007-1016.

**Ducrey-Santopietro LM, Spencer DM, Spencer JFT, Siñeriz F.** 1998. Effects of oxidative stress on production of carotenoid pigments by *Phaffia rhodozyma*. *Folia Microbiol.* **43**:173-176.

**Dudasova Z, Dudas A, Chovanec M.** 2004. Non-homologous end-joining factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**:581-601.

## **E**

---

**Echavarri-Erasun C.** 2003. Intracellular oxidation of phenoxazone as an indicator of P450 activity in the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Visual Resources. American Society for Microbiology, Washington, DC. [www.microbelibrary.org](http://www.microbelibrary.org) Acceso: 10 de enero de 2011.

**Echavarri-Erasun C.** 2005. Multibudding in *Xanthophyllomyces dendrorhous* cells under hydric and nitrogen stress. Visual Resources. American Society for Microbiology, Washington, DC. [www.microbelibrary.org](http://www.microbelibrary.org) Acceso: 10 de enero de 2011.

**Echavarri-Erasun C, Johnson EA.** 2004. Stimulation of astaxanthin formation in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by the fungus *Epicoccum nigrum*. *FEMS Yeast Res.* **4**:511-519.

**Edge R, McGarvey DJ, Truscott TG.** 1997. The carotenoids as antioxidants: a review. *J. Photochem. Photobiol.* **41**:189-200.

## **F**

---

**Fan L, Vonshak A, Gabbay R, Cohen Z, Boussiba S.** 1995. The biosynthetic pathway of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* as indicated by inhibition with diphenylamine. *Plant Cell Physiol.* **36**:1519-1524.

**Fang TJ, Cheng YS.** 1993. Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. *J. Ferment. Bioeng.* **75**:466-469.

**Fang TJ, Chiou TY.** 1996. Batch cultivation and astaxanthin production by a mutant of the red yeast *Phaffia rhodozyma* NCHU-FS501. *J. Ind. Microbiol.* **16**:175-181.

**Fang TJ, Wang JM.** 2002. Extractability of astaxanthin in a mixed culture of a carotenoid over-producing mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Bacillus circulans* in two-stage batch fermentation. *Process Biochem.* **37**:1235-1245.

- Farine S, Versluis C, Bonnici PJ, Heck A, L'Homme C, Puigserver A, Biagini A.** 2001. Application of high performance anion exchange chromatography to study invertase-catalysed hydrolysis of sucrose and formation of intermediate fructan products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**:55–60.
- Fell JW, Blatt GM.** 1999. Separation of strains of the yeasts *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Phaffia rhodozyma* based on rDNA IGS and ITS sequence analysis. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **23**:677-681.
- Fell JW, Scorzetti G, Statzell-Tallman A, Boundy-Mills K.** 2007. Molecular diversity and intragenomic variability in the yeast genus *Xanthophyllomyces*: the origin of *Phaffia rhodozyma*?. *FEMS Yeast Research.* **7**:1399-1408.
- Fernández-Martín R, Cerdá-Olmedo E, Ávalos J.** 2000. Homologous recombination and allele replacement in transformants of *Fusarium fujikuroi*. *Mol. Gen. Genet.* **263**:838-845.
- Florêncio JA, Soccol CR, Furlanetto LF, Bonfim TMB, Krieger N, Baron M, Fontana JD.** 1998. A factorial approach for a sugarcane juice-based low cost culture medium: increasing the astaxanthin production by the red yeast *Phaffia rhodozyma*. *Bioprocess Eng.* **19**:161-164.
- Flores-Cotera LB, 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**:341-347.
- Fontana JD, Chocial MB, Baron M, Guimaraes MF, Maraschin M, Ulhoa C, Florencio JA, Bonfim TMB.** 1997. Astaxanthinogenesis in the yeast *Phaffia rhodozyma*. Optimization of low-cost culture media and yeast cell wall lysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **63**:305-314.
- Fontana JD, Guimaraes MF, Martins NJ, Fontana CA, Baron M.** 1996. Culture of the astaxanthinogenic yeast *Phaffia rhodozyma* in low cost media. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **57**:413-422.
- Fukuhara H.** 1995. Linear DNA plasmids of yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **131**(1):1-9.

## **G**

---

- Gabaudan J.** 1996. Dietary astaxanthin improves production yield in shrimp farming. *Fish Chimes*, **46**:897-930.

**Ghazi I, Fernandez-Arrojo L, Garcia-Arellano H, Ferrer M, Ballesteros A, Plou FJ,** 2007. Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. *J. Biotechnol.* **128**:204–211.

**Girard P, Falconnier B, Bricout J, Vladescu B.** 1994.  $\beta$ -carotene producing mutants of *Phaffia rhodozyma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**:183-191.

**Goins CL, Gerik KJ, Lodge JK.** 2006. Improvements to gene deletion in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*: absence of Ku proteins increases homologous recombination, and co-transformation of independent DNA molecules allows rapid complementation of deletion phenotypes. *Fungal Genet. Biol.* **43**:531-544.

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

**Golubev WI.** 1998. *Xanthophyllomyces* Golubev. En: *The Yeasts: a taxonomic study*. Kurtzman CP, Fell JW, eds. Elsevier. Amsterdam. pp 718-719.

**Goodwin TW.** 1980. Biosynthesis of carotenoids. En: *The biochemistry of the carotenoids*. Goodwin TW, eds. Chapman and Hall. London. pp 33-76.

**Goodwin TW.** 1986. Metabolism, nutrition, and function of carotenoids. *Annu. Rev. Nutr.* **6**:273-281.

**Gu WL, An GH, Johnson EA.** 1997. Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **19**:114-117.

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

**Guyen VCh, Kenmotsu M, Arai H, Yamashita E.** 1998. Astaxanthin containing food or drink. Patent abstract JP10276721.

## **H**

---

**Haard NF.** 1988. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. *Biotechnol. Letters.* **10**(9):609-614.

**Hable WE, Oishi KK, Schumaker KS.** 1998. Viviparous-5 encodes phytoene desaturase, an enzyme essential for abscisic acid (ABA) accumulation and seed development in maize. *Mol. Gen. Genet.* **257**:167-176.

- Hahn FM, Hurlburt AP, Poulter D.** 1999. *Escherichia coli* open reading frame 696 is *idi*, a non-essential gene encoding isopentenyl diphosphate isomerase. *J. Bacteriol.* **181**:4499-4504.
- Hanahan D.** 1983. Studies of transformation of *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol.* **166**:557-580.
- Hayman GT, Mannarelli BM, Leathers TD.** 1995. Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* grown on media composed of corn wet-milling co-products. *J. Ind. Microbiol.* **14**:389-395.
- Hermosilla G, Martínez C, Retamales P, León R, Cifuentes V.** 2003. Genetic determination of ploidy level in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Antonie van Leeuwenhoek* **84**:279-287.
- Herskowitz I, Rine J, Strathern JN.** 1992. Mating-type determination and mating-type interconversion in *Saccharomyces cerevisiae*. En: Jones EW, Pringle JR & Broach JR (Eds) *The Molecular Biology and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae: Gene Expression*, eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 583–657.
- Higuera-Ciapara I, Félix-Valenzuela L, Goycoolea FM.** 2006. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, **46**:185-196.
- Holmes DS, Quigley M.** 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**:193-197.
- Hoshino T, Fujii R, Nakahara T.** 1993. Molecular cloning and sequence analysis of the *crtB* gene of *Thermus thermophilus* HB27, an extreme thermophile producing carotenoid pigments. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3150-3153.
- Hoshino T, Masuda S, Setoguchi Y.** 2005. Process for producing carotenoides. US Patent 2005/0260700 A1.
- Hoshino T, Ojima K, Setoguchi Y.** 2000. Astaxanthin synthase. Hoffman-LaRoche, *European Patent* 1035206-A3.
- Hoshino T, Ojima K, Setoguchi Y.** 2004. Production of zeaxanthin by recombinant *Phaffia rhodozyma* strain. PCT Int. Appl. Application: WO 2003-EP10574 20030923.
- Hu ZC, Zheng YG, Wang Z, Shen YC.** 2006. pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enzyme Microb. Technol.* **39**:586-590.

## I

---

**Inoue H, Nojima H, Okayama H.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**:23-28.

**Iwamoto T, Hosoda K, Hirano R, Kurata H, Matsumoto A, Miki W, Kamiyama M, Itakura H, Yamamoto S, Kondo K.** 2000. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by astaxanthin. *J. Atheroscler. Thromb.* **7**:216-222.

## J

---

**Jami MS, Barreiro C, García-Estrada C, Martín JF.** 2010. Proteome analysis of the penicillin producer *Penicillium chrysogenum*: characterization of protein changes during the industrial strain improvement. *Moll. Cell. Proteomics.* **9**(6):1182-1198.

**Jirasripongpun K, Pewlong W, Kitraksa P, Krudngern C.** 2008. Carotenoid production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*: use of pineapple juice as a production medium. *Lett. Appl. Microbiol.* **47**(2):112-116.

**Johnson EA.** 2003. *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. *Int. Microbiol.* **6**:169-174.

**Johnson EA, An GH.** 1991. Astaxanthin from microbial sources. *Crit. Rev. Biotechnol.* **11**:297-326.

**Johnson EA, Conklin DE, Lewis MJ.** 1977. The yeast *Phaffia rhodozyma* as a dietary pigment source for salmonids and crustaceans. *J. Fish. Res. Board Can.* **34**:2417-2421.

**Johnson EA, Lewis MJ.** 1979. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* **115**:173-183.

**Johnson EA, Lewis MJ, Grau, CR.** 1980a. Pigmentation of egg yolks with astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Poultry Sci.* **59**:1777-1782.

**Johnson EA, Schroeder WA.** 1995. Microbial carotenoids. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **53**:119-178.

**Johnson EA, Villa TG, Lewis MJ.** 1980. *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets. *Aquaculture* **20**:123-134.

**Johnson EA, Villa TG, Lewis MJ, Phaff HJ.** 1978. Simple method for the isolation of astaxanthin from the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma*. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**:1155-1159.

**Johnson EA, Villa TG, Lewis MJ, Phaff HJ.** 1979. Lysis of the cell wall of the yeast *Phaffia rhodozyma* by a lytic enzyme complex from *Bacillus circulans* WL-12. *J. Bacteriol.* **119**:207-219.

**Jyonouchi HL, Sun S, Mizokami M, Gross M.** 1996. Effects of various carotenoids on cloned, effector-stage T-helper cell activity. *Nutrition and cancer*, **23**:171-183.

**Jyonouchi HL, Zhang MG, Tomita Y.** 1994. Immunomodulating actions of carotenoids: enhancement of *in vivo* and *in vitro* antibody production to T-dependent antigens. *Nutr. Cancer* **21**:47-58.

## **K**

---

**Kakizono T, Kobayashi M, Nagai S.** 1992. Effect of carbon/nitrogen ratio on encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferment. Bioeng.* **74**:403-405.

**Kanofsky JR.** 1989. Singlet oxygen production by biological systems. *Chem. Biol. Interact.* **70**:1-28.

**Kesava SS, An GH, Kim CH, Rhee SK, Choi ES.** 1998. An industrial medium for improved production of carotenoids from a mutant strain of *Phaffia rhodozyma*. *Bioprocess Eng.* **19**:165-170.

**Kim JH, Choi SK, Choi SY, Kim HK, Chang HI.** 2005a. Suppressive effect of astaxanthin isolated from the *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant on ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**:1300-1305.

**Kim JH, Kang SW, Kim SW, Chang HI.** 2005b. High-level production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant JH1 using statistical experimental designs. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**:1743-1748.

**Klar AJS.** 1992. Molecular genetics of the fission yeast cell type: mating type and mating-type interconversion. En: Jones EW, Pringle JR & Broach JR (Eds). *The Molecular Biology and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Gene Expression*, eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp 745-777.

**Kobayashi M, Kakizono T, Yamaguchi K, Nishio N, Nagai S.** 1992. Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic condition. *J. Ferment. Bioeng.* **74**:17-20.

**Krinsky NI.** 1977. Singlet oxygen in biological systems. *TIBS* **2**:35-38.

**Krinsky NI.** 1989. Antioxidant functions of carotenoids. *Free. Radic. Biol. Med.* **7**:617-635.

**Krinsky NI.** 1994. The biological properties of carotenoids. *Pure Appl. Chem.* **66**:1003-1010.

**Kreger-van Rij NJW.** 1998. The yeast: a taxonomic study. *Fourth Edition (ed. by Kurtzman C.P. and Fell J.W.) Elsevier Science, Amsterdam.*

**Krogh BO, Symington LS.** 2004. Recombination proteins in yeast. *Annu. Rev. Genet.* **38**:233-271.

**Kruger MC, Brown KE, Collett G, Layton L, Schollum LM.** 2003. The effect of fructooligosaccharides with various degrees of polymerization on calcium bioavailability in the growing rat. *Experimental Biology and Medicine* **228**, 683–688.

**Kucsera J, Pfeiffer I, Ferenczy L.** 1995a. Genetic demonstration of the sexual life cycle in the biotechnologically important yeast *Phaffia rhodozyma*. *17<sup>th</sup> ISSY, Yeast Growth and Differentiation: Biotechnological, Biochemical and Genetic aspects, Edinburg, UK, August 27-29, p. 46.*

**Kucsera J, Pfeiffer I, Ferenczy L.** 1995b. Occurrence of petite mutation in *Phaffia rhodozyma*. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **42**:134-135.

**Kucsera J, Pfeiffer I, Ferenczy L.** 1996. *Phaffia rhodozyma* strain CBS 5905 is a petite-positive basidiomycetous yeast. *IUMS Congresses '96, Jerusalem, Israel, August 18-23, p. 56.*

**Kucsera J, Pfeiffer I, Ferenczy L.** 1998. Homothallic life cycle in the diploid red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Antonie van Leeuwenhoek* **73**:163-168.

**Kucsera J., Pfeiffer I., Takeo K.** 2000. Biology of the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Mycosciencie* **41**:195-199.

**Kucsera J, Takeo K.** 1998. Protoplast formation induced by various cell wall lytic enzymes in *Phaffia rhodozyma*. In: *Progress in Mycological Sciences in Japan and the United Kingdom, 6<sup>th</sup> International Symposium of the Mycological Society of Japan - 1998 Japan-UK International Mycological Symposium, Keyaki Hall, Chiba University, Japan, November 26-27, p86.*

**Kurtzman CP, Fell JW.** 1998. The Yeasts, a taxonomic study. Elsevier Science B.V. Amsterdam.

**Kusdiyantini E, Gaudin P, Goma G, Blanc PJ.** 1998. Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. *Biotechnol. Letters* **20**:929-934.

## **L**

---

**Leach J, Finkelstein DB, Rambosek JA.** 1986. Rapid miniprep of DNA from filamentous fungi. *Fungal Genet. Newsl.* **33**:32-33.

**Leathers TD.** 2003. Bioconversions of maize residues to value-added coproducts using yeast-like fungi. *FEMS Yeast Research* **3**:133-140.

**Lee JH, Kim YS, Choi TJ, Lee WJ, Kim YT.** 2004. *Paracoccus haeundaensis* sp. nov., a Gram-negative halophilic, astaxanthin-producing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:1699-1702.

**Lewis MJ, Ragot N, Berlant MC, Miranda M.** 1990. Selection of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma* with  $\beta$ -ionone. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2944-2945.

**Libkind D, Moliné M, de García V, Fontenla S, van Broock M.** 2007a. Characterization of a novel South American population of the astaxanthin producing yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**(3):151-158.

**Libkind D, Moline M, van Brook M.** 2010. Production of the UVB-absorbing compound mycosporine-glutaminol-glucoside by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *FEMS Yeast Res.* **11**(1):52-59.

**Libkind D, Ruffini A, van Broock M, Alves L, Sampaio JP.** 2007b. Biogeography, host specificity, and molecular phylogeny of the Basidiomycetus yeast *Phaffia rhodozyma* and its sexual form, *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:1120-1125

**Lim GB, Lee SY, Lee EK, Haam SJ, Kim WS.** 2002. Separation of astaxanthin from the red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction. *Biochem. Engin. Journal* **11**:181-187.

**Lignell A.** 2001. Medicament for improvement of duration of muscle function or treatment of muscle disorders or diseases. Patente US6245818.

**Lignell A, Bottiger P.** 2001. Use of xanthophylls, astaxanthin e.g. for treatment of autoimmune diseases, chronic viral and intracellular bacterial infections. Patente WO01/24787 A1.

**Lignell A, Nicolin C, Larsson Lars-Hak et al.** 1998. Method for increasing the production of/in breeding and production animals in the poultry industry. Patente US5744502.

**Lignell A, Inbarr J.** 2000. Agent for increasing the production of/in breeding and production mammals. Patente US6054491.

**Lim GB, Lee SY, Lee EK, Haam SJ, Kim WS.** 2002. Separation of astaxanthin from the red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction. *Biochem. Engin. Journal.* **11**: 181-187.

**Linde D, Macias I, Fernández-Arrojo L, Plou FJ, Jiménez A, Fernández-Lobato M.** 2009. Molecular and biochemical characterization of a b-fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**(4):1065-1073.

**Linnemannstöns P, Prado MM, Fernández-Martín R, Tudzynski B, Avalos J.** 2002. A carotenoid biosynthesis gene cluster in *Fusarium fujikuroi*: the genes *carB* and *carRA*. *Mol. Genet. Genomics* **267**:593-602.

**Liu G, Casqueiro J, Bañuelos O, Cardoza RE, Gutiérrez S, Martín JF.** 2001. Targeted inactivation of the *mecB* gene, encoding cystathionine-gamma-lyase, shows that the reverse transsulfuration pathway is required for high-level cephalosporin biosynthesis in *Acremonium chrysogenum* C10 but not for methionine induction of the cephalosporin genes. *J. Bacteriol.* **183**(5):1765-1772.

**Liu YS, Wu JY, Ho KP.** 2006. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. *Biochem. Eng. J.* **27**: 331-335.

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

**Lodato P, Alcaíno J, Barahona S, Retamales P, Cifuentes V.** 2003. Alternative splicing of transcripts from *crtI* and *crtYB* genes of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:4676-4682.

**Lodato P, Alcaíno J, Barahona S, Retamales P, Jiménez A, Cifuentes V.** 2004. Study of the expression of carotenoid biosynthesis genes in wild-type and deregulated strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Ex.: *Phaffia rhodozyma*). *Biol. Res.* **37**:83-93.

**Lorenz RT.** 2002. Method for retarding and preventing sunburn by UV light. Patente US 6433025.

## **M**

---

**Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J.** 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.

**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*. *BCM Microbiology*. **11**:190

**Margalith PZ.** 1992. Enhancement of carotenoids synthesis by fungal metabolites. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**:664-666.

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

**Marshall RD.** 1972. Glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* **41**:673-702.

**Martin AM, Acheamparg E, Patel TR.** 1993. Production of astaxanthin by *Phaffia rhodozyma* using peat hydrolysates as substrate. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **58**:223-230.

**Martin JM.** 2004. Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. *J. Bacteriol.* **186**(6):5197-5201.

**Martin JM, Gudiña E, Barredo JL.** 2008. Conversion of  $\beta$ -carotene into astaxanthin: Two separate enzymes or a bifuncional hidroxilase-ketolase protein? *Microbial Cell Factories*. **7**:3.

**Martínez C, Hermosilla G, León R, Pincheira G, Cifuentes V.** 1998. Genetic transformation of astaxanthin mutants of *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**:147-153.

**Martínez-Moya P, Watt SA, Niehaus K, Alcaíno J, Baeza M, Cifuentes V.** 2011. Proteomic analysis of the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiology*. **11**:131.

**Mayer MP, Hahn FM, Stillman DJ, Poulter CD.** 1992. Disruption and mapping of *IDII*, the gene for isopentenyl diphosphate isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **8**:743-748.

- Mayne ST.** 1996.  $\beta$ -carotene, carotenoids and disease prevention in humans. *FASEB J.* **10**:690-701.
- McCoy M.** 1999. Astaxanthin market a hard one to crack. *Chem. Eng. News.* **77**(14):15-17.
- Medwid RD.** 1998. *Phaffia rhodozyma* is polyploid. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **21**:228-232.
- Meyer PS, Chen HM.** 1982. Astaxanthin and its role in fish culture. En *Proceeding of the warmwater fish culture*. Pp. 153-165. Stickney, R. R., and Meyers, PS (Eds.) Louisiana State University.
- Meyer PS, du Preez JC.** 1993. Effect of acetic acid on astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Lett.* **15**:919-924.
- Meyer PS, du Preez JC.** 1994a. Astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **10**:178-183.
- Meyer PS, du Preez JC.** 1994b. Effect of culture conditions on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma* in batch and chemostat culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**:780-785.
- Meyer PS, du Preez JC, Kilian SG.** 1993. Selection and evaluation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **9**:514-520.
- Meyer V, Arentshorst M, El-Ghezal A, Ann-Christin Drews AC, Kooistra R, van den Hondel CA, Ram AF.** 2007. Highly efficient gene targeting in the *Aspergillus niger kusA* mutant. *J. Biotechnol.* **128**(4):770-775.
- Miao L, Wang Y, Chi S, Yan J, Guan G, Hui B, Li Y.** 2010. Reduction of fatty acid flux results in enhancement of astaxanthin synthesis in a mutant strain of *Phaffia rhodozyma*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **37**(6):595-602.
- Miki W.** 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl. Chem.* **63**:141-146.
- Miller JH.** 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.
- Miller MW, Phaff HJ.** 1998. *Phaffia*. En: *The yeasts, a taxonomic study*. 4th edition. Kurtzman CP, Fell JW, eds. Elsevier. Amsterdam. p 789.
- Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM, Rice-Evans CA.** 1996. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett.* **384**:240-242.

**Miller MW, Yoneyama M, Soneda M.** 1976. *Phaffia*, a new yeast genus in the Deuteromycotina (Blastomycetes). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**:86-291.

**Misawa N, Satomi Y, Kondo K, Yokoyama A, Kajiwara S, Saito T, Ohtani T, Miki W.** 1995. Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J. Bacteriol.* **177**:6575-6584.

**Moliné M, Arbeloa EM, Flores MR, Libkind D, Fariás ME, Bertolotti SG, Churio MS, van Broock MR.** 2011. UVB photoprotective role of mycosporines in yeast: photostability and antioxidant activity of mycosporine-glutaminol-glucoside. *Radiat. Res.* **175**(1):44-50.

**Moran NA, Jarvik T.** 2010. Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids. *Science* **328**(5978):574-5.

**Moreno S, Sanchez Y, Rodriguez L.** 1990. Purification and characterization of the invertase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. J.* **267**:697-702.

**Mussatto S, Rodrigues L, Teixeira J.** 2009a. D-Fructofuranosidase production by repeated batch fermentation with immobilized *Aspergillus japonicus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **36**, 923-928.

**Mussatto, S.I., Aguilar, C.N., Rodrigues, L.R., Teixeira, J.A.,** 2009b. Colonization of *Aspergillus japonicus* on synthetic materials and application to the production of fructooligosaccharides. *Carbohydrate Research* **344**, 795-800.

## **N**

---

**Nagy A, Garamszegi N, Vágvölgyi C, Ferenczy L.** 1994. Electrophoretic karyotypes of *Phaffia rhodozyma* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **123**:315-318.

**Nagy A, Palágy Z, Ferenczy L, Vágvölgyi C.** 1997. Radiation-induced chromosomal rearrangement as an aid to analysis of the genetic constitution of *Phaffia rhodozyma*. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**:249-254.

**Nakajima H.** 1995. Stabilized powder of *Phaffia* coloring matter oil containing astaxanthin as main component and its production. Patent abstract JP7099924.

**Nakano T, Tosa M, Takeuchi M,** 1995. Improvement of biochemical features in fish health by red yeast and synthetic astaxanthin. *J. Agric. Food Chem.* **43**:1570-1573.

**Navarro E, Ruiz-Pérez VL, Torres-Martínez S.** 2000. Over-expression of the *crgA* gene abolishes light requirement for carotenoid biosynthesis in *Mucor circinelloides*. *Eur. J. Biochem.* **267**:00-807.

**Nelis HJ, DeLeenheer AP.** 1991. Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. *J. Appl. Bacteriol.* **70**:181-191.

**Nelson DR, Strobel HW.** 1987. Evolution of cytochrome P-450 proteins. *Mol. Biol. Evol.* **4**:572-593.

**Nghiem NP, Montanti J, Johnston D.** 2009. Production of astaxanthin from corn fiber as a value-added cop of fuel ethanol fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **154**:227-237.

**Ni H, Chen QH, He HQ, Wu GB, Yang YF.** 2008. Optimization of acidic extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *J. of Zhejiang Univ. Sci. B.* **9**(1):51-59.

**Ning Y, Wang J, Chen J, Yang N, Jin Z, Xu X.** 2010. Production of neo-fructooligosaccharides using free-whole-cell biotransformation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Bioresour. Technol.* **101**(19):7472-7478.

**Ninomiya Y, Suzuki K, Ishii C, Inoue H.** 2004. High efficient gene replacements in *Neurospora strains* deficient for nonhomologous end-joining. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**:12248-12253.

## O

---

**Ojima K, Breitenbach J, Visser H, Setoguchi Y, Tabata K, Hoshino T, van den Berg J, Sandmann G.** 2006. Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a  $\beta$ -carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. *Mol. Genet. Genomics* **275**:148-58.

**Okagbue RN, Lewis MJ.** 1984. Autolysis of the red yeast *Phaffia rhodozyma*: a potential tool to facilitate extraction of astaxanthin. *Biotechnol. Lett.* **6**:247-250.

## P

---

**Palágyi Z, Ferenczy L, Vágvölgyi C.** 2001. Carbon-source assimilation pattern of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **17**:95-97.

- Palágyi Z, Nagy A, Vágvölgyi C, Ferenczy L.** 1995. A new mutation protocol for obtaining auxotrophic mutants of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Tech.* **9**:401-402.
- Palozza P, Krinsky NI.** 1992. Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Arch. Biochem. Biophys.* **297**:291-295.
- Parajó JC, Santos V, Vázquez M.** 1997a. Co-production of carotenoids and xylitol by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Biotechnol. Lett.* **19**:139-141.
- Parajó JC, Santos V, Vázquez M.** 1998a. Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose. *Process Biochem.* **33**:181-187.
- Parajó JC, Santos V, Vázquez M.** 1998b. Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* growing on media made from hemicellulosic hydrolysates of *Eucalyptus globulus* wood. *Biotechnol. Bioeng.* **59**:501-506.
- Parajó JC, Santos V, Vázquez M, Cruz JM.** 1997b. Production of carotenoids by *Xanthophyllomyces dendrorhous* growing on enzymatic hydrolysates of prehydrolysed wood. *Food Chem.* **60**:347-355.
- Pastwa E, Blasiak J.** 2003. Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochim. Pol.* **50**(4):891-908.
- Pfeiffer I, Kucsera J, Ferenczy L.** 1994a. Identification of double-stranded RNA viruses in *Phaffia rhodozyma*. *Fungal Genet. Newslett.* **123**:315-318
- Pfeiffer I, Kucsera J, Ferenczy L.** 1995. Characterization of linear DNA plasmids in *Phaffia rhodozyma*. 17<sup>th</sup> ISSY, *Yeast Growth and Differentiation: Biotechnological, Biochemical and Genetic aspects*, Edinburg, UK, August 27-31, p. 45.
- Pfeiffer I, Kucsera J, Varga J, Ferenczy L.** 1994b. Regulatory effect of linear DNA plasmids in *Phaffia rhodozyma*. En: Abstract book of 7th Int. Congr. Mycol. Div. IUMS. Prague. p 364.
- Pfeiffer I, Kucsera J, Varga J, Párducz A, Ferenczy L.** 1996. Variability and inheritance of double-stranded RNA viruses in *Phaffia rhodozyma*. *Curr. Genet.* **30**:294-297.
- Phaff HJ.** 1986. My life with yeasts. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**:1-28.
- Phaff HJ, Miller MW, 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. En: *Fermentation Technology Today*. Terui G. Eds. Society of Fermentation Technology. Osaka. Japan. pp 759-774.

**Pöggeler S, Kück U.** 2006. Highly efficient generation of signal transduction knockout mutants using a fungal strain deficient in the mammalian ku70 ortholog. *Gene* **378**:1-10.

**Polman JK, Larkin JM.** 1989. Purification of DNA from agarose gels. *Biotechnol. Tech.* **3**:329-332.

**Polulyakh OV, Podoprigova OI, Eliseev SA, Ershov YV, Bykhovsky VY, Dmitrovsky AA.** 1992. Biosynthesis of torulene and torularhodin in the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Appl. Biochem. Microbiol.* **27**(4): 411-414.

**Poulos TL, Finzel BC, Howard AJ.** 1987. High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam. *J. Mol. Biol.* **195**:687-700.

## **R**

---

**Ramírez J, Gutiérrez H, Gschaedler A.** 2001. Optimization of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through factorial design and response surface methodology. *J. Biotechnol.* **88**:259-268.

**Ramírez J, Núñez ML, Valdivia R.** 2000. Increased astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant grown on date juice from *Yucca fillifera*. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **24**:187-190.

**Reddy VA, Maley F.** 1990. Identification of an active-site residue in yeast invertase by affinity labelling and site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **265**:10817–10820.

**Reddy VA, Maley F.** 1996. Studies on identifying the catalytic role of Glu-204 in the active site of yeast invertase. *J. Biol. Chem.* **271**:13953–13957.

**Renstrom B, Berger H, Liaaen-Jensen S.** 1981. Esterified, optically pure (3S,3'S)-astaxanthin from flowers of *Adonis annua*. *Biochem. Syst. Ecol.* **9**:249-250.

**Retamales P, Hermosilla G, León R, Martínez C, Jiménez A, Cifuentes V.** 2002. Development of the sexual reproductive cycle of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J. Microbiol. Meth.* **48**:87-93.

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

- Reynders MB, Rawlings DE, Harrison STL.** 1997. Demonstration of the Crabtree effect in *Phaffia rhodozyma* during continuous and fed-batch cultivation. *Biotechnol. Letters*. **19**:549-552.
- Rise M, Cohen E, Vishkautsan M, Cojocar M, Gottlieb HE, Arad SM.** 1994. Accumulation of secondary carotenoids in *Chlorella zofingiensis*. *J. Plant Physiol*. **144**:287-292.
- Rohmer M, Seemann M, Horbach S, Bringer-Meyer S, Sahn H.** 1997. Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **118**:2564-2566.
- Rodriguez J, Perez JA, Ruiz T, Rodriguez L.** 1995. Characterization of the invertase from *Pichia anomala*. *Biochem. J.* **306**:235-239.
- Rodríguez-Sáiz M, Godio RP, Alvarez V, de la Fuente JL, Martín JF, Barredo JL.** 2009. The NADP-dependent glutamate dehydrogenase gene from the astaxanthin producer *Xanthophyllomyces dendrorhous*: use of its promoter for controlled gene expression. *Mol. Biotechnol.* **41**(2):165-172.
- Roman H, Phillips MM, Sands SM.** 1995. Studies of poliploid *Saccharomyces*: tetraploid segregation. *Genetics* **40**:546-561.
- Rubinstein L, Altamirano A, Ducrey-Santopietro L, Baigori M, de Figueroa LC.** 1996. Transformation of *Phaffia rhodozyma* by electroporation. *Biotechnol. Tech.* **10**:929-932.

## S

---

- Sakaguchi M, Mihara K, Sato R.** 1987. A short amino-terminal segment of microsomal cytochrome P-450 functions both as an insertion signal and as a stop-transfer sequence. *EMBO J.* **6**:2425-2431.
- Salinas MA, Perotti NI.** 2009. Production of fructosyltransferase by *Aureobasidium* sp. ATCC 20524 in batch and two-step batch cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **36**, 39-43.
- Sandmann G.** 1994a. Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. *Eur. J. Biochem.* **223**:7-24.
- Sandmann G.** 2000. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Arch. Biochem. Biophys.* **385**:4-12.

**Sandmann G, Misawa N.** 2002. Fungal carotenoids. *The Mycota. Industrial Applications*. H.D. Osiewacz (Ed.).

**Schroeder WA, Calo P, DeClerq ML, Johnson EA.** 1996. Selection for carotenogenesis in the yeast *Phaffia rhodozyma* by dark-generated singlet oxygen. *Microbiology* **142**:2923-2929.

**Schroeder WA, Johnson EA.** 1993. Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* **139**:907-912.

**Schroeder WA, Johnson EA.** 1995a. Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. *J. Ind. Microbiol.* **14**:502-507.

**Schroeder WA, Johnson EA.** 1995b. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *J. Biol. Chem.* **270**:18374-18379.

**Sedmak JJ, Weerasinghe DK, Jolly SO.** 1990. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Tech.* **4**:107-112.

**Seybold A, Goodwin TW.** 1959. Occurrence of ataxanthin in the flower petals of *Adonis annua* L. *Nature.* **184**:1714-1715.

**Shimizu T, Hirano K, Takahashi M, Hatano M, Fujii-Kuriyama Y.** 1988. Site-directed mutagenesis of rat liver cytochrome P-450d: axial ligand and heme incorporation. *Biochemistry* **27**:4138-4141.

**Sieiro C, Poza M, de Miguel T, Villa TG.** 2003a. Genetic basis of microbial carotenogenesis. *Int. Microbiol.* **6**:1-16.

**Sieiro C, Poza M, Villa TG.** 2003b. A quarter of a century in microbial xanthophylls. *Microorganisms for Health Care, Food and Enzyme Production* **1**:85-101.

**Sies H, Menck CFM.** 1992. Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutat. Res.* **275**:367-375.

**Simpson KL, Chichester CO.** 1981. Metabolism and nutritional significance of carotenoids. *Annu. Rev. Nutr.* **1**:351-374.

**Slaninova I, Kucsera J, Svoboda A.** 1999. Topology of microtubules and actin in the life cycle of *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Antonie Leeuwenhoek J. Microbiol.* **73**:229-236.

**Sommaruga R, Libdkind D, van Brook M, Whitehead K.** 2004. Mycosporine-glutaminol-glucoside, a UV-absorbing compound of two *Rhodotorula* yeast species. *Yeast.* **21**(13):1077-1081.

**Stahl W, Sies H.** 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine* **24**:345-351.

**Stewart ML., Timm DA, Slavin JL.** 2008. Fructooligosaccharides exhibit more rapid fermentation than long-chain inulin in an in vitro fermentation system. *Nutrition Research* **28**, 329–334.

**Sugiyama J, Fukagawa M, Chiu S, Komagata K.** 1985. Cellular carbohydrate composition, DNA base composition, ubiquinone systems and diazonium blue B color test in the genera *Rhodospiridium*, *Leucosporidium*, *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **31**:519-550.

## **T**

---

**Talora C, Franchi L, Linden H, Ballario P, Macino G.** 1999. Role of a white collar-1 white collar-2 complex in blue-light signal transduction. *EMBO J.* **18**:4961-4968.

**Tartol KD, Hobbs CA.** 1987. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res. Lab. Focus* **9**:12.

**Taussig R, Carlson M.** 1983. Nucleotide sequence of the yeast SUC2 gene for invertase. *Nucl. Acids. Res.* **11**:1943–1954.

**Terao J.** 1989. Antioxidant activity of  $\beta$ -carotene-related carotenoids in solution. *Lipids* **24**:659-661.

**Teutsch HG, Hasenfratz MP, Lesot A, Stoltz C, Garnier JM, Jeltsch JM, Durst F, Werck-Reichhart D.** 1993. Isolation and sequence of a cDNA encoding the Jerusalem artichoke cinnamate 4-hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenylpropanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:4102-4106.

**Tinoi J, Rakariyatham N, Deming RL.** 2006. Utilization of mustard waste isolates for improved production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **33**:09-314.

## **U**

---

**Uchiumi K.** 1990. Astaxanthin containing composition. Patent abstract JP2049091.

**Ukibe K, Hashida K, Yoshida N, Takagi H.** 2009. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for astaxanthin production and oxidative stress tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**(22):7205-7211.

## **V**

---

**Varga J, Vágvölgyi C, Nagy A, Pfeiffer I, Ferenczy L.** 1995. Isoenzyme, restriction fragment length polymorphism, and random amplified polymorphic DNA characterization of *Phaffia rhodozyma* Miller et al. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:173-174.

**Vázquez M.** 2001. Effect of the light on carotenoid profiles of *Xanthophyllomyces dendrorhous* strains (formerly *Phaffia rhodozyma*). *Food Technol. Biotechnol.* **39**:123-128.

**Vázquez M, Martin AM.** 1998. Optimization of *Phaffia rhodozyma* continuous culture through response surface methodology. *Biotechnol. Bioeng.* **57**:314-320.

**Vázquez M, Santos V, Parajó JC.** 1997. Effect of the carbon source on the carotenoid profiles of *Phaffia rhodozyma* strains. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **19**:263-268.

**Verdoes JC, Krubasik P, Sandmann G, van Ooyen AJJ.** 1999a. Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Mol. Gen. Genet.* **262**:453-461.

**Verdoes JC, Misawa N, van Ooyen AJJ.** 1999b. Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnol. Bioeng.* **63**:750-755.

**Verdoes JC, Sandmann G, Visser H, Díaz M, van Mossel M, van Ooyen AJJ.** 2003. Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:3728-3738.

**Verdoes JC, van Ooyen AJJ.** 1999. Isolation of isopentenyl diphosphate isomerase encoding gene of *Phaffia rhodozyma*; improved carotenoid production in *Escherichia coli*. *J. Bot. Gall.* **146**:43-53.

**Verdoes JC, van Ooyen AJJ.** 2000. Codon usage in *Xanthophyllomyces dendrorhous* (formerly *Phaffia rhodozyma*). *Biotechnol. Lett.* **22**:9-13.

**Verdoes JC, Wery J, Boekhout T, van Ooyen AJJ.** 1997. Molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Phaffia rhodozyma*. *Yeast* **13**:1231-1242.

**Verdoes JC, Wery J, van Ooyen AJJ.** 1996. Improved methods for transforming *Phaffia* strains, transformed *Phaffia* strains so obtained and recombinant DNA in said method. International Patent Application PCT/EP96/05887.

**Verwaal R, Wang J, Meijnen JP, Visser H, Sandmann G, van den Berg JA, van Ooyen A.** 2007. High-level production of  $\beta$ -carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:4342-4350.

**Visser H, de Bont JAM, Verdoes JC.** 1999. Isolation and characterization of the epoxide hydrolase-encoding gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5459-5463.

**Visser H, van Ooyen AJJ, Verdoes JC.** 2003. Metabolic engineering of the astaxanthinbiosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *FEMS Yeast Res.* **4**:221-231.

**Vustin MM, Belykh EN, Kishilova SA.** 2004. Relationship between astaxanthin production and the intensity of anabolic processes in the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Mikrobiologiya* **73**:751-757.

## **W**

---

**Wang W, Yu L, Zhou P.** 2005. Effects of different fungal elicitors on growth, total carotenoids and astaxanthin formation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Bioresour. Technol.* **97**:26-31.

**Wang X, Willen R, Wadstrom T.** 2000. Astaxanthin-rich algal meal and vitamin C inhibit *Helicobacter pylori* infection in BALB/cA mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2452-2457.

**Weber RW, Becerra J, Silva MJ, Davoli P.** 2008. An unusual *Xanthophyllomyces* strain from leaves of *Eucalyptus globulus* in Chile. *Mycol. Res.* **112**:861-867.

**Weber RW, Davoli P, Anke H.** 2006. A microbial consortium involving the astaxanthin producer *Xanthophyllomyces dendrorhous* on freshly cut birch stumps in Germany. *Mycologist* **20**:57-61.

**Weller GR, Kysela B, Roy R, Tonkin LM, Scanlan E, Della M, Devine SK, Day JP, Wilkinson A, di Fagagna FD, Devine KM, Bowater RP, Jeggo PA, Jackson SP, Dohert AJ.** 2002. Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria. *Science*. **297**:1686-1689.

**Wery J, Dalderup MJM, Linde JT, Boekhout T, van Ooyen AJJ.** 1996. Structural and phylogenetic analysis of the actin gene from the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Yeast* **12**:641-651.

**Wery J, Gutker D, Renniers ACHM, Verdoes JC, van Ooyen AJJ.** 1997. High copy number integration into the ribosomal DNA of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Gene* **184**:89-97.

**Wery J, Verdoes JC, van Ooyen AJJ.** 1998. Efficient transformation of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Tech.* **12**:399-405.

## **Y**

---

**Yamane Y, Higashida K, Nakashimada Y, Kakizono T, Nishio N.** 1997. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4471-4478.

**Yokoyama A, Izumida H, Miki W.** 1994. Production of astaxanthin and 4-ketozeaxanthin by the marine bacterium, *Agrobacterium aurantiacum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**:1842-1844.

**Yokoyama A, Miki W.** 1995. Composition and presumed biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin-producing bacterium *Agrobacterium aurantiacum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**:139-144.

**Yu B, Lydiate DJ, Schäfer UA, Hannoufa A.** 2006. Characterization of a beta-carotene hydroxylase of *Adonis aestivalis* and its expression in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. **226**(1):181-192.

**Yu XC, Strobel HW.** 1997. Hydroperoxide-mediated cytochrome P450-dependent 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid destruction, product formation and P450 modification. *Moll. Cell. Biochem.* **167**:159-168.

**Z**

---

**Zhang F, Hang XM, Fan XB, Li GJ, Yang H.** 2007. Selection and optimization procedure of symbiotic for cholesterol removal. *Anaerobe* **13**, 185–192.

**Ziegler RG.** 1991. Vegetables, fruits and carotenoids and the risk of cancers. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**:251S-259S.

