

Una Vista Integral de la Síntesis de Astaxantina en *Phaffia rhodozyma*

Cipriano Chávez-Cabrera, Zoila R. Flores-Bustamante, Luis B. Flores-Cotera*
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Cinvestav, Av. IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco, México 07360 D.F. E-mail: lfcotera@cinvestav.mx

RESUMEN

La proporción de los diferentes carotenoides producidos por la levadura *Phaffia rhodozyma* y la cantidad del carotenoide principal, astaxantina, pueden modificarse por cambios en la composición del medio de cultivo y por otros factores ambientales. En este trabajo se hace una revisión de los diferentes factores que afectan la síntesis de astaxantina en ésta levadura y de su regulación. Los estudios realizados hasta ahora coinciden en que la síntesis de astaxantina tiene lugar en condiciones oxidativas, al restringirse el crecimiento, mediado por: a) deficiencia de nitrógeno y fosfato, lo que reduce el crecimiento y la síntesis de proteínas b) la reasimilación de etanol, que produce un desbalance NADH/NAD⁺ y la inhibición del ciclo de Krebs c) la inhibición de la cadena respiratoria, que inhibe la síntesis de ATP d) o bien en mutantes de lento crecimiento, pero con producción aumentada de astaxantina. El inicio de la síntesis de astaxantina en *P. rhodozyma*, puede estimularse por diferentes métodos, pero puede explicarse por un evento común, esto es la inhibición en la oxidación de NADH, debido a un impedimento metabólico.

Palabras clave: *Xanthophyllomyces dendrorhous*, carotenoides, estrés oxidativo, metabolismo de etanol, regulación.

ABSTRACT

The proportions of different carotenoids produced by *Phaffia rhodozyma* and the quantity of astaxanthin, the main carotenoid, can be altered by changes in the culture-medium composition and other environmental factors. In this work we review the different factors that affect astaxanthin synthesis and its regulation in this yeast. A number of studies indicate that astaxanthin synthesis takes place in oxidative conditions, when the growth is restricted by different means like: a) deficiency of nitrogen and phosphate, that reduce growth and protein synthesis, b) ethanol uptake, that increases the NADH/NAD⁺ ratio and inhibits the Krebs cycle function, c) inhibition of the respiratory chain, that inhibits the synthesis of ATP, d) slow-growth mutant strains, with enhanced astaxanthin production. The onset of astaxanthin synthesis in *P. rhodozyma*, can be triggered by different methods, but in all cases it can be explained by a common event, this is the inhibition of NADH oxidation, as a result of a metabolic impediment.

Keywords: *Xanthophyllomyces dendrorhous*, carotenoids, oxidative stress oxidativo, ethanol metabolism, regulation.

INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son pigmentos ampliamente distribuidos en la naturaleza. La astaxantina (3, 3' dihidroxi- β -caroteno 4,4' diona) es un oxicarotenoide (xantofila), responsable de la atractiva pigmentación de animales como el salmón, camarón, langosta, trucha y flamingsos (Shahaidi *et al.*, 1998). Puede ser sintetizada por unos pocos microorganismos entre los que se encuentra la levadura *Phaffia rhodozyma*, aislada originalmente de la flora asociada con árboles de islas japonesas y de la costa oeste de Norteamérica (Miller *et al.*, 1976; Phaff *et al.*, 1972). La levadura es uno de los mejores productores de astaxantina, debido a que crece rápido y a que puede cultivarse económicamente a altas densidades celulares. Por ello se ha estudiado con considerable detalle desde que fue originalmente aislada. Varios trabajos en la literatura han mostrado que diversos factores ambientales, incluyendo los constituyentes del medio de cultivo, afectan la síntesis de astaxantina (Johnson & An, 1991). En ésta revisión ofrecemos una descripción de los factores nutricionales y ambientales que regulan la síntesis de astaxantina en *P. rhodozyma*. Se ofrece una visión integrada de los mecanismos implicados en la iniciación de la síntesis de carotenoides y se muestra que los efectos observados con diferentes nutrientes y condiciones de cultivo, pueden explicarse por eventos con un origen

común. Es decir, impedimentos metabólicos que se traducen en la inhibición del ciclo de Krebs.

PHAFFIA RHODOZYMA

P. rhodozyma es un basidiomiceto que tiene una forma anamórfica "no formadora de basidios" y otra telemórfica "formadora de basidios" *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Golubev, 1995). Sus características peculiares, incluyen sintetizar astaxantina como principal pigmento carotenoide (Andrewes *et al.*, 1976) y ser una levadura facultativa que produce etanol por fermentación de azúcares, a diferencia de otras levaduras carotenogénicas, como *Rhodotorula* y *Cryptococcus* (Johnson & An, 1991).

LA ASTAXANTINA

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- β , β caroteno-4,4'-diona) es un oxicarotenoide ($C_{40}H_{52}O_4$) con un peso molecular de 596.86 uma (Fig. 2). Sus cristales son de color violeta oscuro, con punto de fusión de 217-219°C. La astaxantina, se usa en dietas de trucha arcoíris y salmón, criados en cautiverio para impartirles su pigmentación característica. Debido a su potente actividad antioxidante, superior incluso a la de la vitamina E (Kurashige *et al.*, 1990), se le han asignado aplicaciones en animales, como protector contra la radiación ultravioleta, en la prevención de cáncer y otras enfermedades

degenerativas. (Nishino, 1998) y como estimulante de la respuesta inmune (Jyonouchi *et al.*, 1996).

FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LOS CAROTENOIDES

Una de las funciones más importantes de los carotenoides es proteger los tejidos celulares contra radicales libres oxigenados que se producen durante la respiración normal o mediante la interacción del oxígeno con la luz visible o UV, y moléculas fotosensibles como protoporfirina IX, hemo, bacterioclorofila o clorofila. El oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) son moléculas sumamente reactivas que se cree son los principales agentes oxidantes en sistemas biológicos (King *et al.*, 1995). Estas y otras moléculas oxigenadas reactivas (MOR) como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el superóxido (O_2^-) son capaces de iniciar la peroxidación de lípidos, oxidar proteínas, o causar daño a moléculas de DNA o RNA. En las plantas, los carotenoides son indispensables en la función fotosintética, su ausencia induce la muerte celular por daño fotooxidativo (Armstrong & Hearst, 1996; Armstrong, 1994). En los microorganismos no fotosintéticos, los carotenoides también protegen a las células contra radicales generados durante la respiración o por daño fotooxidativo. Es decir, la presencia de estos pigmentos en todos los organismos se puede explicar por su capacidad para desactivar eficientemente los radicales libres que se

producen durante el metabolismo normal de las células (Armstrong, 1997; Britton, 1995). La regulación de la capacidad antioxidante en las células es de vital importancia, de hecho la presencia de moléculas antioxidantes en niveles apropiados, determinan el desarrollo normal y la longevidad de las células (Konz *et al.*, 1998; Munkres, 1990; Sies, 1993). En *P. rhodozyma* se ha sugerido que la astaxantina inactiva al $^1\text{O}_2$ y radicales peróxido presentes en su habitat natural (flujo mucoide de abedules) o debido al metabolismo oxidativo intracelular propio (Schroeder y Johnson, 1995 a y b; Johnson & Schroeder, 1996). Se ha sugerido que la síntesis de astaxantina compensa la falta o la muy disminuida actividad de otras enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa y catalasa (Johnson & An, 1991; Schroeder & Johnson, 1993; Gu *et al.*, 1997).

BIOSÍNTESIS DE ASTAXANTINA

Las etapas tempranas de la síntesis de carotenoides en *P. rhodozyma*, como ocurre con la síntesis de ácidos grasos en otras levaduras oleaginosas, se lleva a cabo en el citoplasma. El citrato mitocondrial es considerado la fuente más importante de acetil-CoA para la síntesis de ácidos grasos en levaduras oleaginosas y se ha sugerido que también la misma fuente opera para la síntesis de carotenoides en *P. rhodozyma* como se muestra en la figura 1 (Ratledge & Wynn, 2000; Chávez-Cabrera *et al.*, 2010).

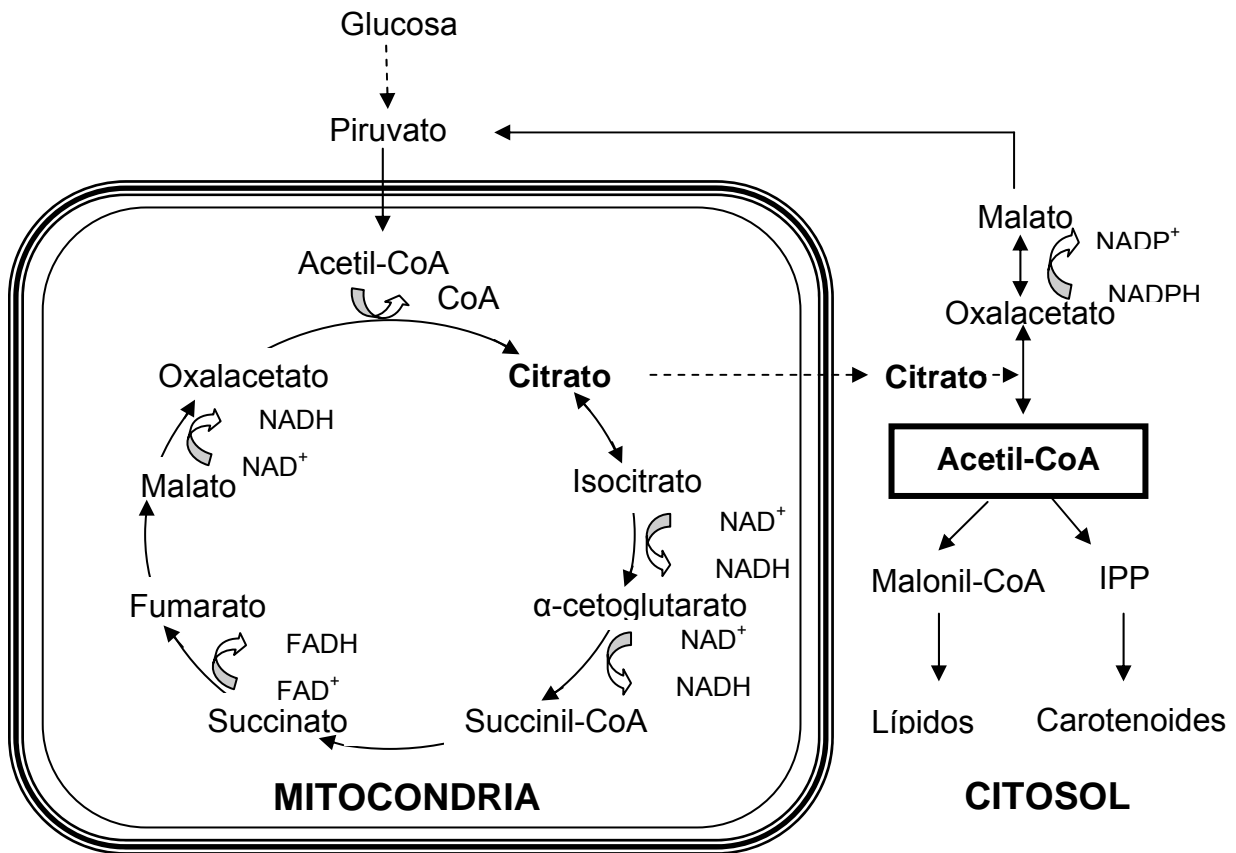


Fig. 1. Ruta proveedora de acetil-CoA para la síntesis de astaxantina en *P. rhodozyma*. Muestra al ciclo de Krebs que al inhibirse acumula citrato mitocondrial, que es exportado al citosol y escindido por la ACL, que provee acetil-CoA citosólico para la síntesis de lípidos y astaxantina.

La biosíntesis de astaxantina en *P. rhodozyma* inicia a partir de acetil-CoA, que se transforma a isopentenil pirofosfato (IPP) a través de la bien conocida ruta del mevalonato, teniendo como intermediarios hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) y mevalonato (Andrewes *et al.*, 1976; Johnson & An, 1991). El IPP es un precursor común para la síntesis de carotenoides, monoterpenos, sesquiterpenos, giberelinas y esteroides entre otros compuestos (Disch *et al.*, 1998). Una molécula de IPP y otra de su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAP), compuestos de cinco carbonos (C5), se

condensan para formar geranil pirofosfato (C10). La adición de unidades adicionales de IPP, forman de manera consecutiva, farnesil pirofosfato (C15) y geranil-geranil pirofosfato, GGPP (C20). La condensación de dos moléculas de GGPP produce fitoeno (C40), cuya desaturación conduce a la formación de licopeno, que es ciclado sucesivamente a γ -caroteno y β -caroteno (C40). La formación de astaxantina involucra la oxidación secuencial del β -caroteno, al que se adicionan grupos oxo en los carbonos C4 y C4' e hidroxilo en los carbonos C3 y C3'

(Rodríguez-Sáiz *et al.*, 2010). En *X. dendrorhous*, el estado sexual de *P. rhodozyma*, la biosíntesis de astaxantina requiere de cuatro enzimas a partir de IPP. Los genes que codifican para estas enzimas son; *crtE* para GGPP sintasa, *crtYB* para fitoeno sintasa/licopeno ciclasa, *crtl* para fitoeno desaturasa, y *crtS* para astaxantina sintasa, (Verdoes *et al.*, 1999a; Ojima *et al.*, 2006; Lodato *et al.*, 2007; Rodríguez-Sáiz *et al.*, 2010). Las enzimas codificadas por los genes *crtYB* y *crtS* son bifuncionales, la primera cataliza la formación de fitoeno y licopeno, mientras que segunda tiene funciones de oxigenasa e hidrolasa, lo que permite la conversión del β -caroteno en astaxantina.

FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCION DE ASTAXANTINA

Limitación de nitrógeno y fósforo

Empleando diferentes cepas de *P. rhodozyma* cultivadas en medios definidos o complejos, la mayor producción de astaxantina generalmente se obtiene a bajas concentraciones de nitrógeno en el medio de cultivo (altas relaciones C/N), pero a expensas de un menor contenido de proteína en las células (Flores-Cotera *et al.*, 2001; Yamane *et al.*, 1997a; Meyer & du Preez, 1994a; Chavez- Cabrera *et al.*, 2010). Análogamente, la acumulación de lípidos, que comparten con los carotenoides el requerimiento de acetil-CoA como precursor, es un evento común en un número de levaduras cuando crecen limitadas por nitrógeno (Ertugay *et al.*, 1997; Ratledge &

Wynn, 2000). Cuando una levadura se cultiva en un medio que contiene amonio como única fuente de nitrógeno, la disponibilidad de esta fuente tiene un efecto considerable en la cantidad de esqueletos de carbono, ATP y NADPH que son canalizados a la síntesis de proteína (Larsson *et al.*, 1993). Al disminuir la disponibilidad de amonio, la demanda de carbono para la síntesis de proteína y nucleótidos disminuye, particularmente de α -cetoglutarato y oxaloacetato, y como resultado la fuente de carbono canalizada al ciclo de Krebs será excesiva. La acumulación de lípidos en estas condiciones es un fenómeno común en muchas levaduras (Ertugay *et al.*, 1997).

Por otro lado, en cultivos de *P. rhodozyma*, con limitación de fósforo, se ha observado que el contenido celular de astaxantina tiene una relación inversa a la concentración de fósforo en el medio de cultivo. A bajas concentraciones de fósforo, no solo se observa un aumento en el contenido de astaxantina, sino también de lípidos. Al igual que en condiciones de limitación de nitrógeno, la limitación de fósforo inhibe la síntesis de proteínas y el crecimiento celular (Callieri *et al.*, 1984; Flores-Cotera *et al.*, 2001), lo que sugiere que una limitada síntesis de proteínas pudiera ser un mecanismo común que estimula la síntesis de astaxantina. Esta interpretación concuerda también con otros datos publicados por ejemplo, An *et al.*, 1989, han sugerido que la velocidad o la eficiencia de utilización de nitrógeno es progresivamente impedida en una serie de

mutantes con mayor contenido de carotenoides. Asimismo, el estudio de diferentes fuentes de nitrógeno para la producción de astaxantina frecuentemente ha conducido a la elección de aminoácidos que son metabolizados lentamente, posiblemente debido a que su uso produce una limitación de nitrógeno (Meyer *et al.*, 1993; Meyer & du Preez, 1994b).

Metabolismo de etanol

En cultivos en lote de *P. rhodozyma* es común la acumulación de etanol durante la fase temprana de crecimiento, en presencia de concentraciones altas de azúcares y/o de limitación de oxígeno (Yamane *et al.*, 1997a). En una fase tardía de crecimiento, a bajas concentraciones de azúcares y al aumentar la del oxígeno, *P. rhodozyma* es capaz de reutilizar el etanol producido inicialmente, al igual que otras levaduras (Yamane *et al.*, 1997b). El etanol generalmente es oxidado vía acetaldehído-acetato-acetil-CoA para alimentar el ciclo de Krebs (Heinisch & Hollenberg, 1993; Vries & Marres, 1987). Efectos comunes de metabolismo de etanol en todos los tipos de células incluyen: 1) aumento de la relación NADH/NAD⁺ y la consecuente inhibición del ciclo de Krebs 2) bloqueo de la división celular y de la replicación. En condiciones oxidativas el ciclo de Krebs es la única fuente de esqueletos carbonados y ATP para la síntesis de aminoácidos, ácidos nucleicos y para la gluconeogénesis (Jones, 1989). En consecuencia, la inhibición controla el crecimiento por deficiencia de precursores para la síntesis. En cepas nativas de *P.*

rhodozyma, comúnmente se observa la acumulación de carotenoides durante la reutilización del etanol en condiciones oxidativas. Chávez-Cabrera *et al.*, 2010, han reportado un incremento en actividad ATP citrato liasa (ACL), enzima clave para proveer acetil-CoA en citosol, asociado a la concentración de oxígeno disuelto (OD) en el medio de cultivo, y que coincide con el inicio de la síntesis de carotenoides. La adición de etanol, a cultivos de *P. rhodozyma* en diferentes fases del crecimiento, aumenta la síntesis de carotenoides (Gu *et al.*, 1997). En cultivos en lote alimentado de *P. rhodozyma*, se han observado aumentos de 2-3 veces en el contenido de carotenoides, cuando se usa etanol como fuente de carbono (Yamane *et al.*, 1997b). Se debe remarcar que los grupos oxigenados de la astaxantina sólo se forman en presencia de ciertos niveles de oxígeno. Es bien conocido que los cultivos de *P. rhodozyma* requieren una tensión de oxígeno mayor de 20%, para una adecuada producción de astaxantina, (Johnson & Lewis, 1979; Yamane *et al.*, 1997a; Chávez-Cabrera *et al.*, 2010). La síntesis se reduce drásticamente en condiciones microaerofílicas, acumulándose principalmente carotenos no oxigenados. La expresión de los genes carotenogénicos, *crtYB* (fitoeno sintasa), *crtI* (fitoeno deshidrogenasa) y *crtS* (astaxantina sintasa), de igual forma ha sido asociada a la reasimilación de etanol (Lodato *et al.*, 2007). La actividad de hidroximetil-glutaril-CoA reductasa (HMGR), enzima clave para la formación de mevalonato, un precursor de carotenoides, también es estimulada por

etanol. Todo lo anterior indica que la síntesis de carotenoides en *P. rhodozyma*, ocurre en condiciones oxidativas, durante la asimilación de etanol.

Inhibidores de la cadena respiratoria

En *P. rhodozyma*, la síntesis de astaxantina es estimulada en presencia de inhibidores de la respiración como cianuro, antimicina, tunicamicina y azida entre otros

(An *et al.*, 1989; Schroeder & Johnson, 1995a y b; Johnson *et al.*, 1994; An & Johnson, 1990). La antimicina y el KCN, bloquean la transferencia de electrones del complejo III y complejo IV respectivamente. Se ha encontrado que en presencia de estos compuestos, la síntesis de astaxantina ocurre paralelamente con un cambio casi completo de respiración sensible a cianuro, a respiración insensible a cianuro (Fig. 2).

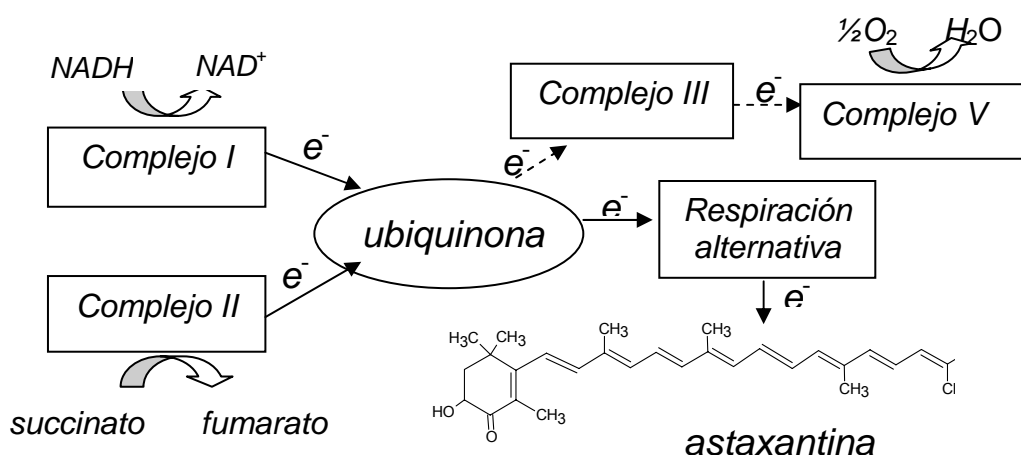


Fig. 2. Modelo del flujo de electrones en cadena respiratoria de *P. rhodozyma* (Adaptado de Hoshino *et al.*, 2004). Muestra la existencia de una ruta de respiración alternativa (RA), que provee electrones para la síntesis de astaxantina, al presentarse restricción del flujo de electrones en cadena de respiración principal.

Debido a esto se ha propuesto que la activación de una vía respiratoria alternativa (RA) está estrechamente ligada a la síntesis de astaxantina (Hoshino *et al.*, 2004). Una cepa silvestre de *P. rhodozyma* fue cultivada en medio líquido con antimicina, tanto en la oscuridad como expuesta a la luz. En esta última condición se observó un mejor crecimiento y el doble de acumulación de carotenoides, lo que se asignó a la inducción

de una vía RA en las condiciones citadas (An & Johnson, 1990; Schroeder & Johnson, 1995a y b). Además, una mutante productora de β-caroteno incapaz de sintetizar astaxantina (*yan-1*), logró restablecer esta capacidad al ser cultivada con antimicina en presencia de luz (An & Johnson, 1990). En virtud de que la antimicina puede estimular la producción de especies de oxígeno reactivas, la inducción de la síntesis de carotenoides por antimicina podría ser también mediada

por estrés oxidativo (An & Johnson, 1990). Otros hongos y levaduras que incluyen especies productoras de carotenoides como *Rhodotorula*, *Cryptococcus* y *Sporobolomyces* poseen también vías RA insensibles a antimicina y a cianuro (Goffeau & Crosby, 1978; Johnson y Schroeder, 1996; Shiraishi & Fujii, 1986). En algunos casos la expresión de un solo polipéptido es suficiente para activar la RA (Albury *et al.*, 1996). Estas vías RA generalmente se activan para permitir el crecimiento en condiciones en las que la cadena respiratoria principal ha sido inhibida ya sea por inhibidores de la respiración o por mutación.

Efecto de la limitación de otros nutrientes

La limitación de nutrientes produce en los microorganismos un gran número de respuestas adaptativas, una de las cuales es la producción de metabolitos secundarios. En muchos casos la producción de metabolitos secundarios es parte de una estrategia de supervivencia en ciertos ambientes y por ello es una propiedad estable en los microorganismos. Concentraciones de Cu^{2+} por debajo de $3.2 \mu\text{M}$ en el medio de cultivo, incrementan el contenido de astaxantina en *P. rhodozyma*, pero a expensas de una ligera disminución en el crecimiento (Flores-Cotera *et al.*, 2001). Sin embargo, concentraciones Cu^{2+} por arriba de esta concentración no tienen efecto en la producción de carotenoides. El cobre es un cofactor de citocromo-oxidasa, la oxidasa terminal de la cadena respiratoria, un déficit de cobre podría limitar el flujo de electrones y estimular así la síntesis de astaxantina. En

contraste, el contenido de astaxantina en *P. rhodozyma* no fue estimulado en cultivos con concentraciones por debajo de $1 \mu\text{M}$ de Fe^{2+} , otro cofactor de enzimas de la cadena respiratoria (Flores-Cotera *et al.*, 2001). Se sabe que las hidroxilasas y oxidasas de varios microorganismos productores de astaxantina requieren de oxígeno y hierro para su actividad (Fraser *et al.*, 1998), quizá debido a esto no se observó una mejor producción de astaxantina en condiciones de limitación de hierro.

OTROS FACTORES QUE REGULAN LA SÍNTESIS DE ASTAXANTINA

En cepas nativas de *P. rhodozyma*, la síntesis de carotenoides es regulada por represión catabólica por carbono (Johnson & Schroeder, 1996; Yamane *et al.*, 1997a). Fuentes de carbono de asimilación lenta promueven una mayor pigmentación de las células, pero a expensas de un menor crecimiento. Entre 11 fuentes de carbono, la celobiosa produce la mayor pigmentación, pero otros disacáridos como la maltosa y sacarosa también dan buenos resultados en términos de pigmentación. En la mayor parte de los estudios realizados con cepas mutantes de *P. rhodozyma*, la formación de astaxantina está asociada al crecimiento (Johnson & Lewis, 1979; Fang & Chiou, 1996; Meyer & du Preez, 1994a; Ukibe *et al.*, 2008). En contraste, en cepas nativas es común un aumento del contenido de astaxantina de las células en las fases tardías de cultivo (Chávez-Cabrera *et al.*, 2010). Lo anterior sugiere que un impedimento metabólico que inhibe el

crecimiento celular en las mutantes, induce la síntesis de astaxantina asociada al crecimiento.

En levaduras y otros organismos, el control global de la vía del mevalonato ocurre en las etapas iniciales de la síntesis de isoprenoides (Goldstein & Brown, 1990; Gu *et al.*, 1997), particularmente en la enzima hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMGR) encargada de la formación de mevalonato. En *Saccharomyces cerevisiae*, la enzima es regulada al menos parcialmente por represión catabólica y por la concentración de oxígeno. La regulación por producto final o bien por algún intermediario de la biosíntesis es otro mecanismo regulatorio común de la síntesis de carotenoides en diversos organismos. En las levaduras, la HMGR es retrorregulada por intermediarios tempranos y por intermediarios tardíos (regulación cruzada) de la vía de los isoprenoides (Hampton *et al.*, 1996; Brown & Goldstein, 1980). En *P. rhodozyma*, la producción de astaxantina es inhibida por β -ionona, que posee un anillo análogo a los del β -caroteno (Lewis *et al.*, 1990). Lo anterior, hace suponer que la síntesis de astaxantina en *P. rhodozyma* es regulada por producto final (Johnson & Schroeder, 1996; Schroeder & Johnson, 1995b).

La fotorregulación de la síntesis de carotenoides ha sido reportada en al menos 15 hongos y en varias algas. Se cree que la traducción de la señal luminosa es mediada por radicales libres formados intracelularmente al interactuar la luz, el oxígeno y moléculas fotosensibles como la

protoporfirina IX, hemo y otras (Bramley & MacKenzie, 1988; Johnson & An, 1991). Otros factores que se han reportado como promotores de la formación de carotenoides incluyen: uso de cultivo alimentado de fuente de carbono (Yamane *et al.*, 1997; Reynders *et al.*, 1996, 1997), uso de fuentes de carbono como glicerol (Johnson *et al.*, 1994), acetato (Meyer & du Preez, 1993), xilosa (Parajó *et al.*, 1997,1998), succinato (Johnson & An, 1991), α -pineno y limoneno (Meyer *et al.*, 1994) entre otros.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La proporción de los diferentes carotenoides producidos por la levadura *P. rhodozyma* y la cantidad de astaxantina en las células pueden alterarse por cambios en la composición del medio de cultivo y por otros factores ambientales. Concentraciones de OD por arriba de 20% y la reasimilación de etanol son factores desencadenantes de la síntesis de astaxantina en *P. rhodozyma* (Yamane *et al.*, 1997a, Chávez-Cabrera *et al.*, 2010). Por otro lado, altas concentraciones de algunos componentes del medio de cultivo como azúcares, fosfatos, sulfato de amonio y cobre tienen un efecto negativo sobre la producción de astaxantina. La concentración de carotenoides totales, así como los contenidos de astaxantina y lípidos en la levadura muchas veces se incrementan a bajas concentraciones de nitrógeno o de fosfatos (Flores-Cotera *et al.*, 2001, Miao *et al.*, 2010, Chávez-Cabrera *et al.*, 2010). En ambos casos, la mayor producción de carotenoides parece ser una respuesta para

canalizar el exceso de carbono y energía, debidos a una limitación del crecimiento y de síntesis de proteínas, ocasionadas por la deficiencia de estos dos nutrientes. En presencia de inhibidores de la cadena respiratoria y en medios deficientes en cobre se obtiene altas proporciones de astaxantina en el pigmento (An *et al.*, 1989; Flores & Sánchez, 2001). Se ha sugerido en estas condiciones, la activación de una vía respiratoria alterna (RA), que participa en la formación de los grupos oxigenados de la astaxantina, al inhibirse la cadena respiratoria principal. Es factible entonces que la activación de la vía RA funcione como un mecanismo para reducir el excedente de NADH, causado por un rápido catabolismo, pero que no puede ser oxidado rápidamente cuando la cadena respiratoria principal se encuentra inhibida.

En resumen, los resultados obtenidos en muy diversas condiciones estudiadas, convergen en que la síntesis de astaxantina en *P. rhodozyma*, tiene lugar al surgir una restricción en el metabolismo, como: a) la inhibición de síntesis de proteínas y nucleótidos por deficiencia de nitrógeno y fosfato, b) la inhibición del ciclo de Krebs durante la reasimilación de etanol, producida por un desbalance NADH/NAD⁺, c) la inhibición de la cadena respiratoria por deficiencia de cobre o uso de inhibidores que producen la acumulación de NADH, d) un lento crecimiento debido a mutación o al uso de fuentes de carbono o nitrógeno de lenta asimilación, que incrementa la pigmentación (Schroeder & Johnson, 1995a). La limitación de nitrógeno o de fosfato, posiblemente

producen un excedente de energía debido a la baja demanda de ATP, para síntesis de proteínas y nucleótidos, derivada de su déficit. Puesto que la fosforilación oxidativa es la principal vía de oxidación de NADH, la relación NADH/NAD⁺ debe necesariamente elevarse. De forma similar, debido a que el etanol es un sustrato muy energético, su metabolismo eleva la relación NADH/NAD⁺ lo que inhibe varias enzimas implicadas en ciclo de Krebs. Por ejemplo, la enzima isocitrato deshidrogenasa, una enzima clave para la operación del ciclo de Krebs, requiere de NAD⁺ para su actividad. La carencia de NAD⁺ la inhibe y da lugar a la acumulación de citrato, que se sabe es precursor de lípidos y de carotenoides. Aparentemente, el mismo reservorio de acetil-CoA producido por escisión de citrato, puede servir tanto en la síntesis de lípidos como de carotenoides (Miao *et al.*, 2010; Chávez-Cabrera *et al.*, 2010; Flores-Cotera *et al.*, 2001; Domínguez-Bocanegra y Torres-Muñoz, 2004). En mutantes de *Rhodotorula gracilis*, deficientes en la sobreproducción de lípidos y carotenoides, se mostró que también eran deficientes en ACL (Venkateswaran *et al.* 1992). En contraste, en presencia de inhibidores de la cadena respiratoria o en condiciones de deficiencia de cobre la síntesis de proteínas podría estar supeditada a la disponibilidad de ATP. Pero un rápido catabolismo junto con una cadena respiratoria inhibida, conduciría también a elevar la relación NADH/NAD⁺. Todo lo anterior indica que la elevación de la relación NADH/NAD⁺ y/o la acumulación de NADH podrían ser eventos comunes y

fundamentales que disparan la síntesis de astaxantina en *P. rhodozyma*. Hasta donde sabemos, actualmente no existe una visión integrada de los cambios asociados con la iniciación de la síntesis de carotenoides, ni en *P. rhodozyma*, ni en otros microorganismos. Este trabajo hace una contribución en este sentido, al sugerir que en *P. rhodozyma*, la estimulación de la síntesis de carotenoides mediante diferentes métodos, pueden explicarse por eventos con un origen común, i.e. la inhibición en la oxidación de NADH, debido a algún tipo de impedimento metabólico.

REFERENCIAS

- Albury MS, Dudley P, Watts FZ & Moore AL (1996) Targeting the plant alternative oxidase protein to *Schizosaccharomyces pombe* mitochondria confers cyanide-insensitive respiration. *J. Biol. Chem.* 271:17062-17066
- An G (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 G & 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* 15:10003-10007
- Armstrong GA (1994) Eubacteria show their true colors: genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *J. Bacteriol.* 176: 4795-4802
- Armstrong GA (1997) Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale. *Ann. Rev. Microbiol.* 51:629-659
- Armstrong GA & Hearst JE (1996) Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J.* 10:228-237
- Bramley PM & Mackenzie A (1988) Regulation of carotenoid biosynthesis. *Curr. Top. Cell Reg.* 29:291-343
- Britton G (1995b) Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: an overview. *FASEB J.* 9:1551-1558
- Brown MS & Goldstein KL (1980) Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J. Lipid Res.* 21:505-517
- Callieri DAS, Nuñez CG, Diaz Ricci JC & Scida L (1984) Batch culture of *Candida utilis* in a medium deprived of a phosphorous source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19:267-271
- Chávez-Cabrera C, Flores-Bustamante Z, Marsch R, Montes M, Sánchez S, Cancino-Díaz J & Flores-Cotera L (2010) ATP-citrate lyase activity and carotenoid production in batch cultures of *Phaffia rhodozyma* under nitrogen-limited and nonlimited conditions. *Appl. Microbiol.*

Artículos

- Biotechnol.* 85:1953–1960
- Disch A, Schewender J, Müller C, Lichtenthaler HK & Rohmer M (1998) Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. *Biochem. J.* 333: 381-388
- 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.* 66:249–252
- Ertugay N, Hamamci H & Bayindirli A (1997) Fed-batch cultivation of bakers' yeast: effect of nutrient depletion and heat stress on cell composition. *Folia Microbiol.* 42:214-218
- 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
- Flores-Cotera LB, Martín R & Sánchez S (2001a) Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55:341-347
- Flores-Cotera L & Sánchez S (2001b) Copper but not iron limitation increases astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in a chemically defined medium. *Biotechnol Lett* 23: 793–797, 2001
- Fraser PD, Shimada H & Misawa N (1998) Enzymic confirmation of reactions involved in routes to astaxanthin formation, elucidated using a direct substrate in vitro assay. *Eu.r J. Biochem.* 252:229-236
- Goffeau A & Crosby B (1978) A new type of cyanide-insensitive, azide-sensitive respiration in the yeast *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. En *Biochemistry and Genetics of Yeast*, Academic Press, N.Y.
- Goldstein JL & Brown MS (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343: 425-430
- Golubev WI (1995) Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Yeast* 11:101-110
- Gu WL, An GH & Johnson EA (1997) Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*. *J Ind. Microbiol. Biotechnol* .19:114-117
- Hampton R, Dimster-Denk D & Rine J (1996) The biology of HMG-CoA reductase: the pros of contra-regulation. *TIBS* 21:140-145
- Heinisch JJ & Hollenberg CP (1993) *Yeast*. In: Rehm HJ, Reed G, Puhler A, Stadler P (eds), *Biotechnology vol 1, Biological fundamentals*, pp 469-514. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany
- Hoshino TK, Ojima KF & Setoguchi VF (2004) Process for producing carotenoids and biological materials useful therefor. US Pat 6,696,293 B2
- Johnson EA & An G (1991) Astaxanthin from microbial sources. *Crit. Rev. Biotechnol.*

Artículos

- 11:297-326
- Johnson EA & Lewis MJ (1979) Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* 115:173-183
- Johnson EA & Schroeder W (1995) Microbial carotenoids. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 53:119-178
- Johnson EA & Schroeder WA (1996) Biotechnology of astaxanthin production in *Phaffia rhodozyma*. En: Takeoka GR, Teranishi R, Williams PJ, Kobayashi A (eds) Biotechnology for improved foods and flavors, pp 39-50. American Chemical Society, Washington DC
- Johnson EA, Yang HH, Geldiay-Tuncer B, Hall WT, Schreiber D & Ho K (1994) Process for in vivo production of astaxanthin and *Phaffia rhodozyma* yeast of enhanced astaxanthin content. US Pat 5,356,809
- Jones RP (1989) Biological principles for the effects of ethanol. *Enz. Microbiol. Biotechnol.* 11:130-153
- Jyonouchi H, Sun S, Mizokami M & Gross MD (1996) Effects of various carotenoides on cloned, effector-stage T-helper cell activity. *Nutr. Cancer* 26:313-324.
- King AJ, Uijttenboogaart TG & De Vries AW (1995) α -Tocopherol, β -carotene and ascorbic acid as antioxidants in stored poultry muscle. *J. Food Sci.* 60:1009-1012
- Konz JO, King J & Cooney CL (1998) Effects of oxygen on recombinant protein expression. *Biotechnol. Prog.* 14:393-409
- Kurashige M, Okimasu E, Inoue M & Utsumi K (1990) Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* 22:27-38.
- Larsson C, Stockar UV, Marison I & Gustafsson L (1993) Growth and metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in chemostat cultures under carbon-, nitrogen-, or carbon and nitrogen-limiting conditions. *J. Bacteriol.* 175:4809-4816
- Lewis MJ, Ragot N, Berlant MC & Miranda M (1990) Selection of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma* with β -ionone. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2944-2945
- Lodato P, Alcaíno J, Barahona S, Niklitschek M, Carmona M, Wozniak A, Baeza M, Retamales P, Jimenez A & Cifuentes V (2007) Expression of the carotenoid biosynthesis genes in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biol. Res.* 40: 73-84.
- 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 (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 mutant of *Phaffia rhodozyma*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 9:514-520

Artículos

- 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 & vanDyk MS (1994) The effect of monoterpenes on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Lett.* 16: 125-128
- 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*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37:595-602
- Miller MW, Yoneyama M & Soneda M (1976) *Phaffia*, a new yeast in the *Deuteromycotina* (*Blastomycetes*). *Int. J. System. Bacteriol.* 26:286-291
- Munkres KD (1990) Pharmacogenetics of cyclic guanylate, antioxidants, and antioxidant enzymes in *Neurospora*. *Free Radic. Biol. Med.* 9:29-38
- Nishino H, Murakoshic M, Tokudad H & Satomid Y (1998) Cancer prevention by carotenoides. *Mutat. Res.* 402:159-163
- Ojima K, Breitenbach J, Visser H, Setoguchi Y, Tabata K, Hoshino T, Berg J & Sandmann G (2006) Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a β -carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. *Mol. Gen. Genomics* 275: 148-158
- Parajó JC, Santos V & Vázquez M (1997) Co-production of carotenoids and xylitol by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Biotechnol. Lett.* 19:139-141
- Parajó JC, Santos V & Vázquez M (1998) Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose. *Process Biochem.* 33:181-187
- Phaff HJ, Miller MW, Yoneyama M & Soneda M (1972) A comparative study of the yeast floras associated with trees on the Japanese islands and on the west coast of north America. Proc. IV IFS: Fermentation Technology Today, Tokyo. Society of Fermentation Technology, Osaka. pp 759-774
- Ratledge C & Wynn JP (2000) Understanding microbial obesity. *SIM* 50(4):181-185.
- Reynders MB, Rawlings DE & Harrison STL (1997) Demonstration of the Crabtree effect in *Phaffia rhodozyma* during continuous and fed-batch cultivation. *Biotechnol. Lett.* 19:549-552
- Reynders MB, Rawlings DE & Harrison STL (1996) Studies on the growth, modeling and pigment production by the yeast *Phaffia rhodozyma* during fed-batch cultivation. *Biotechnol Lett* 18:649-654
- Rodríguez-Sáiz M, de la Fuente JL & Barredo JL (2010). *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88:645-658.
- 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 peroxyl radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *J. Biol. Chem.* 270:18374-18379
- Schroeder WA & Johnson EA (1993).

Artículos

- Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* 139:907-912
- Shahaidi F, Metusalach S & Brown JA (1998) Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38: 1-67
- Shiraishi A & Fujii H (1986) Alternative cyanide- and antimycin A- insensitive respiratory system in *Sporobolomyces* red yeast. *Agric. Biol. Chem.* 50:447-452
- Sies H (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 215:213-219
- Ukibe K, Katsuragi T, Tani Y & Takagi H (2008) Efficient screening for astaxanthin-overproducing mutants of the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by flow cytometry. *FEBS Lett* 286:241-248
- Venkateswaran G, Shashi K & Joseph R (1992) Influence of nitrogen status and mutation on the fatty-acid profile of *rhodotorula-gracilis*. *Curr. Sci.* 62:580-583
- Verdoes JC, Krubasik P, Sandmann G & Vanooyen AJJ (1999a) Isolation and functional characterization of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Mol. Gen. Genet.* 262:453-461.
- Vries SD & Marres CAM (1987) The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis the role in cellular metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 895:205-239
- 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
- Yamane Y, Higashida K, Nakashimada Y, Kakizono T & Nishio N (1997b) Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* enhanced in fed-batch culture with glucose and ethanol feeding. *Biotechnol. Lett.* 19:1109-1111