



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

"LA CAROTENOGÉNESIS COMO ESTRATEGIA
DE DEFENSA CONTRA EL ESTRÉS OXIDATIVO
PROVOCADO POR ÓXIDO NÍTRICO EN LA
LEVADURA *Phaffia rhodozyma*".

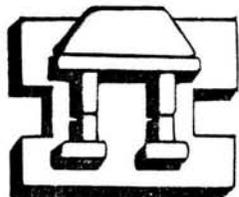
TRABAJO POR DESEMPEÑO ESCOLAR

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

DANIELA ELVIRA CASTRO GRANADOS



IZTACALA

TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉX.

MARZO, 2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



U.N.A.M. CAMPUS

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, dentro de las instalaciones del Laboratorio de Microbiología Industrial, del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología.

La investigación fue dirigida y asesorada por el Dr. Sergio Sánchez Esquivel, jefe del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología; y por la Maestra en Ciencias Bioquímicas Erika Grajales Esquivel quien fungió como asesora técnica.

El reporte se elaboró, para la obtención del título de Licenciado en Biología, bajo la nueva modalidad de titulación por desempeño académico, en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM; y corresponde al informe de las actividades realizadas durante los semestres 7º y 8º en las asignaturas LICYT I Y II.

El trabajo realizado forma parte de la Tesis que para obtener el grado de Maestra en Ciencias Bioquímicas, presentó la Química de alimentos Erika Grajales Esquivel.

**ESTE TRABAJO SE LO DEDICO DE MANERA
MUY ESPECIAL A ...**

A mis padres RAÚL y ELVIRA de quienes siempre estaré orgullosa. Gracias por darme la vida y guiarme a través de mi sendero académico. Saben que lo que soy se los debo a ustedes y siempre serán indispensables para mi felicidad.

A mis hermanitos ORLANDO Y CLAUDIA "yaya" por ser lo que son y por estar siempre ahí. ÁNIMO. Recuerden que los quiero mucho.

A LUIS GABRIEL porque desde que llegaste a mi vida la has iluminado. Gracias por todos los momentos tan especiales e inolvidables que hemos compartido y por tu paciencia a lo largo del desarrollo de este trabajo. Amor sabes que sin ti no lo hubiera logrado. Gracias por tu apoyo.

AGRADECIMIENTOS

- Al Doctor Sergio Sánchez Esquivel por compartir conmigo sus experiencias y conocimientos, por recibirme en su grupo de trabajo y por el apoyo mostrado a lo largo del desarrollo de este proyecto.
- A la Maestra en Ciencias Bioquímicas Erika Grajales por toda su confianza y paciencia durante el tiempo que compartimos juntas el estudio de *Pfaffia rhodozyma*, por todas sus enseñanzas y por ser parte fundamental de este trabajo. GRACIAS
- A los revisores de este trabajo Dr. Martín Palomar Morales, Dr. Sergio Sánchez Esquivel, Dr. Sergio Vaca Pacheco, QFB Ruth Martín Fuentes y QFB Irma Delfín Alcalá por su tiempo y sus valiosas observaciones.
- A todos mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Industrial: Ángeles M., Ángeles S., Beth, Bety, Eli, Enrique, Erika, Erika G., Iveta, Gabby, Gilberto, Jazmín, Lalo, Laurita, Luz, Magda, Romina, Ruth, Silvia y Vero; por que cuando necesite de alguno de ustedes siempre estuvieron en la mejor disposición de brindarme ayuda y dedicarme su valioso tiempo.

- A la Bióloga Silvia Guzmán y a Elizabeth Moreno por darme su amistad y hacer amenas mis horas de comida, a la QFB Ruth Martín por todos sus consejos y experiencia, a Verónica Novéron por contagiarme su alegría y por todas sus atenciones y a Magda Contreras por toda su ayuda y amistad.
- Al Doctor Alejandro Granados por todos sus consejos y por ser MI TÍO.
- A todos los profesores que en algún momento de mi paso por la carrera de Biología, me enseñaron el amor hacia mi carrera dejando huella en mi vida.
- A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM y al Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM por todas las facilidades brindadas durante la realización de este trabajo.

Índice

IZT.	Página
ÍNDICE.....	2
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
ANTECEDENTES.....	15
OBJETIVOS.....	17
METODOLOGÍA.....	18
RESULTADOS.....	25
DISCUSIÓN.....	30
CONCLUSIONES.....	35
LITERATURA CITADA.....	36
APÉNDICE.....	40

Resumen

Los carotenoides, además de ser los pigmentos naturales por excelencia, son precursores de la vitamina A y actúan como antioxidantes biológicos protegiendo a las células contra los radicales libres. La astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β' -caroten-4,4'-diona) es el pigmento responsable de la coloración en crustáceos, aves y pescados y éstos la obtienen a partir de su dieta a través del necton y zooplancton; su biosíntesis está limitada a pocas especies de microorganismos incluyendo a la levadura *Phaffia rhodozyma*. Esta levadura además de fermentar azúcares posee la característica de ser carotenogénica.

Diversos factores han sido reportados como estimuladores de la carotenogénesis en microorganismos, Grajales en 2002, encontró que el aminoácido arginina (fuente de nitrógeno orgánico) presentó un efecto estimulador sobre la producción de carotenoides (470 μg /g de células) en comparación con el control (230 μg /g de células). Y propuso que el aumento en la carotenogénesis, por parte de *P. rhodozyma*, podría ser debido a que el grupo guanidino de la arginina, es utilizado por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) para producir óxido nítrico (NO), el cual al ser un radical libre, genera en las células de la levadura estrés oxidativo y éstas, en respuesta, activan la biosíntesis de los carotenoides.

En apoyo a esta hipótesis se colaboró en los trabajos realizados por Grajales en 2002; y se cultivó a la levadura en presencia de nitroprusiato de sodio (NPS) un donador de NO y se observó que efectivamente el NO induce la carotenogénesis.

Resumen

Se cultivó también a la levadura en ausencia total de O_2 (pero en presencia de arginina) y no se percibió estimulación en la carotenogénesis debido a que el efector óxido nítrico, no se había formado. Por último, se midió a la NOS en extractos enzimáticos de la levadura cultivada en presencia y ausencia de arginina. Además de haber encontrado actividad, ésta resultó ser más elevada en presencia del aminoácido.

Introducción

CAROTENOIDES

Características y Funciones:

Los carotenoides son tetraterpenos, compuestos de 40 átomos de carbono, formalmente derivados del fitoeno⁵. Como grupo, son moléculas extremadamente lipofílicas con poca o nula solubilidad en agua⁴. Por ello, su localización está restringida a áreas hidrofóbicas de las células. Sin embargo, cuando están asociados a proteínas o substituidos por grupos polares fuertes pueden encontrarse en ambientes acuosos³.

Muchas de las funciones que poseen son consecuencia de su capacidad para absorber la luz, por lo que su papel natural es dar color. Por esto podemos observar colores que van desde el amarillo al rojo. Esta propiedad se deriva de la presencia de dobles enlaces conjugados que conforman un cromóforo largo, el cual, posee la característica de absorber luz en la región visible²⁸.

Los carotenoides se dividen en dos grupos según su estructura química: carotenos ($C_{40}H_{56}$) que no contienen oxígeno en sus anillos terminales (figura 1) y xantofilas ($C_{40}H_{56}O_2$) que sí lo contienen²⁸ (figura 2).

Los carotenoides se encuentran en animales, algas, hongos y bacterias; y muchos factores ambientales (luz, temperatura, oxígeno, minerales, fuente de

Introducción

carbono y nitrógeno) pueden alterar las concentraciones de estas moléculas en los tejidos y organismos.

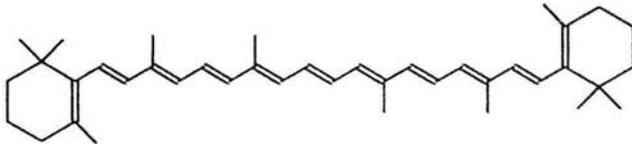


FIGURA 1: β -CAROTENO (PRINCIPAL CAROTENO)

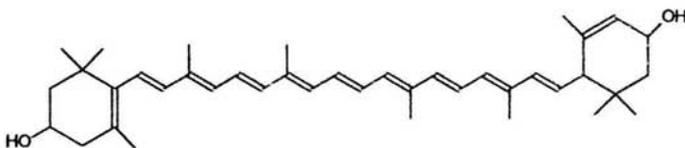


FIGURA 2: LUTEÍNA (UNA DE LAS PRINCIPALES XANTOFILAS)

ACTIVIDAD DE PROVITAMINA A

Una de las funciones mejor conocidas de algunos carotenoides es la capacidad de ser metabólicamente transformados a retinoides, los cuales son compuestos con actividad biológica de provitamina A. Se ha sugerido que el sitio inicial de esta conversión es la pared del intestino y que la reacción es catalizada por la β -caroteno-15, 15'-dioxigenasa.

Introducción

Este proceso resultaría en la formación de retinal, el cual puede sufrir reducción reversible a retinol u oxidación hasta ácido retinoico²⁷.

COLORANTES

Estudios realizados en los años 70 demostraron que algunos colorantes sintéticos presentaban efectos cancerígenos y embriotóxicos; y fueron prohibidos por la Food and Drug Administration (FDA) en los años 80¹⁷. Es por eso que los carotenoides han adquirido gran importancia y se han utilizado como una alternativa para sustituir a los colorantes sintéticos rojos y amarillos.

Los carotenoides se han usado tradicionalmente como aditivos en algunos alimentos, bebidas y forrajes, en forma de extractos naturales o como compuestos puros. Los colorantes más usados en alimentos, fármacos y cosméticos incluyen al β -caroteno, la cantaxantina, la luteína, la astaxantina, la zeaxantina, la capsantina, la capsorubina y a algunos apocarotenoides^{17, 21, 22, 28}.

En la avicultura se han utilizado durante muchos años extractos naturales de zeaxantina, luteína y cantaxantina, para la alimentación de gallinas de postura, pollos de engorda y la optimización del color de la yema de huevo y la piel de pollo^{9, 16}. Otros como el β -caroteno y el 8-apocarotenal se utilizan en la producción de quesos, mantequilla, jugos, helados y dulce²¹.

Introducción

ESTIMULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE

Aún no se conoce con certeza el mecanismo por el cual los pigmentos de tipo carotenoide pueden funcionar en esta estimulación, lo que se conoce es que el daño oxidativo a las membranas limita la respuesta inmune y posiblemente los carotenoides funcionen como antioxidantes de éstas²⁷.

ANTIOXIDANTES

La función de los carotenoides como antioxidantes en los organismos está bien establecida, ya que participan en la inactivación de radicales libres que se producen durante el metabolismo normal de las células¹⁵ y proporcionando protección contra la combinación potencialmente dañina del oxígeno con la luz visible o UV^{2, 3}.

En microorganismos y plantas se ha demostrado que los carotenoides inactivan a los radicales libres mediante un proceso en el que se transfiere la energía de altos niveles de excitación a un triplete del carotenoide¹⁵.

ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Se sabe que los radicales libres son moléculas con un electrón libre, no apareado, y por consecuencia especies altamente reactivas capaces de iniciar la peroxidación de lípidos y con ello la destrucción de estructuras que

Introducción

los contienen como las membranas celulares; de inactivar proteínas, enzimas, o de causar mutaciones en moléculas de ADN o ARN^{4, 6}. Algunos ejemplos de radicales libres son las especies reactivas de oxígeno (ERO) que a continuación se describen en la Tabla 1.

TABLA 1: ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

ESPECIES NOMBRE	REACTIVAS FÓRMULA	DE OXÍGENO (ERO) FORMACIÓN
Ozono	O ₃	Descargas eléctricas sobre el O ₂ o por acción de la luz UV
Oxígeno en singulete	¹ O ₂	Oxígeno en forma excitada
Superóxido	O ₂ ⁻	Oxígeno que ha captado un electrón
Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂	Cuando el superóxido capta otro electrón y se protona
Radical hidroxilo	HO·	Producto que se genera cuando el H ₂ O ₂ se rompe al captar un electrón y tiene un electrón menos que el otro producto, el ión hidroxilo
Óxido nítrico	NO·	Se forma por la actividad de la óxido nítrico sintasa sobre el grupo guanidino de la arginina
Peroxinitrito	HOONO	Producto de la reacción espontánea del NO con el O ₂ ⁻

(Tomado de Hansberg, 1999)

Introducción

ASTAXANTINA

Propiedades y Usos

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β' -caroten-4,4'-diona) es un pigmento compuesto por ocho unidades de isoprenoides que comúnmente se encuentra en animales marinos (figura 3). Los salmónidos y crustáceos la obtienen en su dieta para adquirir su distintiva coloración¹¹.

La astaxantina tiene dos carbonos asimétricos en las posiciones 3 y 3', por lo que puede existir en cuatro configuraciones incluyendo los enantiómeros 3S, 3'S y 3R, 3'R; o las formas meso 3R, 3'S y 3'R, 3S¹⁶.

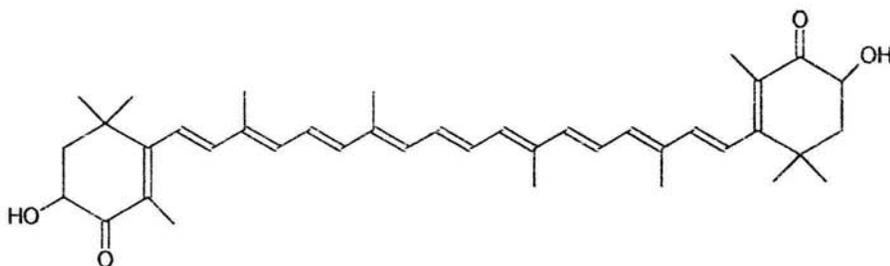


FIGURA 3: ASTAXANTINA

Su fórmula química es $C_{40}H_{52}O_4$, tiene un peso molecular de 596.86 g/mol y un punto de fusión de 224 °C. Es soluble en diclorometano, cloroformo, acetona y DMSO. En presencia de cualquier base puede sufrir una oxidación rápida e irreversible al derivado 2,3-dehidro ($C_{40}H_{48}O_4$), llamado astaceno¹³.

Introducción

Biosíntesis

Los carotenoides son sintetizados a partir de la vía de los terpenoides o isoprenoides. Los precursores isoprenoides son el ácido mevalónico (MVA) e isopentenil difosfato. La ruta biosintética se conoce como la vía mevalónica¹². La astaxantina, como los otros carotenoides, es un producto de la vía mevalónica, que está representada en la figura 4.

La astaxantina posee un gran interés científico y comercial debido a sus grandes perspectivas de aplicación en la industria farmacéutica como marcador en el seguimiento de células, como agente antioxidante y antitumoral; en la industria de cosméticos; en la industria alimentaria como suplemento y complemento en la coloración indirecta y directa de diversos productos; en la acuicultura como fuente de pigmentación en la dieta de crustáceos (camarón y langosta), de peces, en la fijación del colorante en el músculo de la trucha arco iris y principalmente del salmón¹².

Su biosíntesis está limitada a pocas especies de microorganismos incluyendo a la levadura *Phaffia rhodozyma*¹⁶, a la microalga *Haematococcus pluvialis*¹⁹, y a las bacterias *Brevibacterium* sp¹³ *Agrobacterium aurantiacum*, *Paracoccus carotinifaciens* y *Alcaligenes* sp cepa PC-133.

Introducción

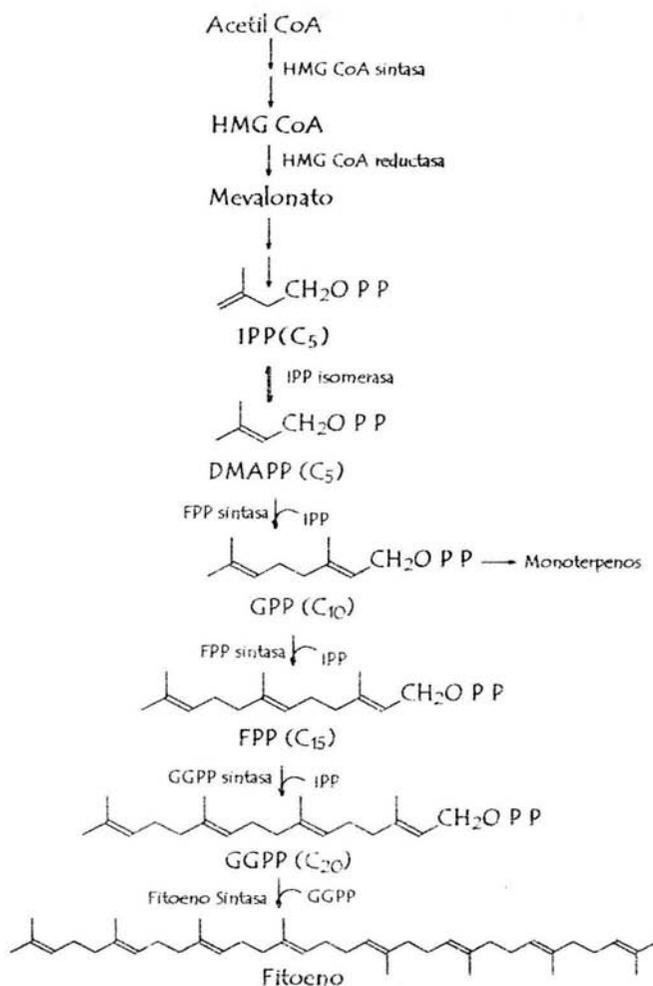


FIGURA 4: BIOSÍNTESIS DEL FITOENO POR LA VÍA DEL MEVALONATO. Hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA), isopentenil pirofosfato (IPP), dimetilalil pirofosfato (DMAPP), geranilpirofosfato (GPP), farnesilpirofosfato (FPP), geranilgeranilpirofosfato (GGPP).²⁸

Introducción

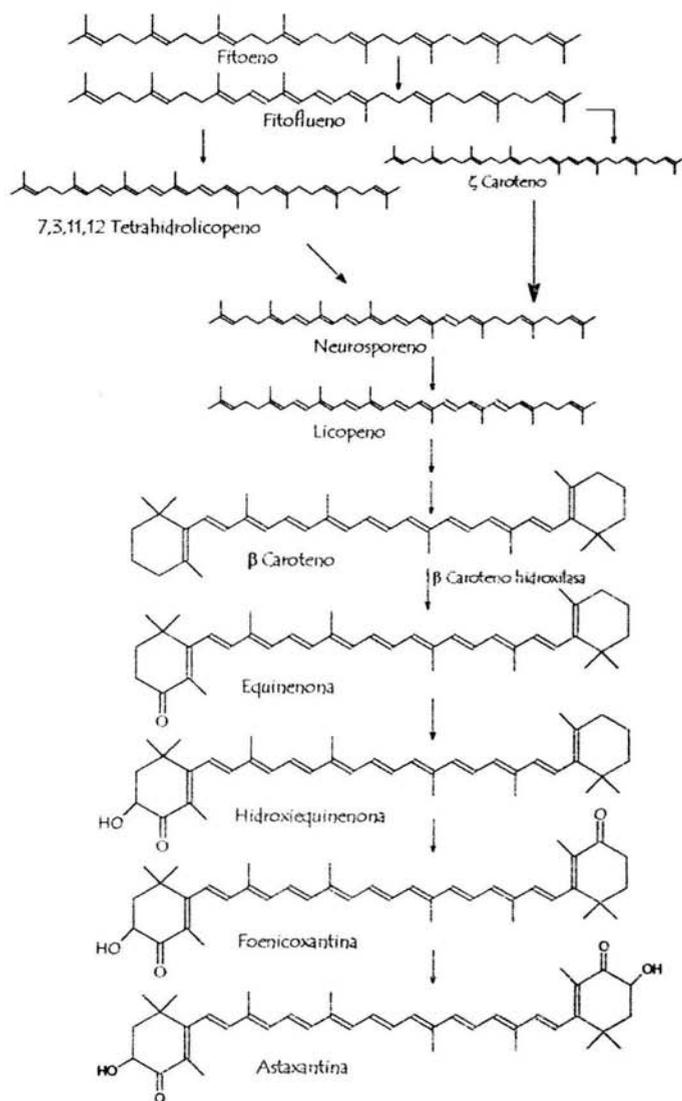


FIGURA 4: CONTINUACIÓN BIOSÍNTESIS FITOENO

Introducción

Phaffia rhodozyma

La levadura *P. rhodozyma* pertenece al grupo de los basidiomicetos y fue aislada en los años 70 en regiones montañosas de Japón, Alaska y en la antigua URSS¹⁶, por Herman Phaff, Martín Miller y Minoru Yoneyama, de resinas de varias especies de *Betuna* y árboles relacionados¹³. Su ciclo sexual se ha demostrado en una cepa nombrada *Xanthophyllomyces dendrorhous*, pero aún es causa de controversia¹³.

La característica peculiar de esta levadura es que, además de ser carotenogénica, tiene la habilidad de fermentar azúcares como la glucosa, la maltosa, la sacarosa y la rafinosa, produciendo etanol y CO₂.

En cepas silvestres se ha reportado que puede sintetizar carotenoides (de 300 a 500 µg de carotenoides /g levadura)¹⁶ como el β-caroteno, γ-caroteno, toruleno y la astaxantina que, por mucho, es el carotenoide más abundante sintetizado por ésta (85-87% del total)^{1, 14} y está presente en la configuración 3R, 3'R¹⁶. El crecimiento de la levadura y la síntesis de carotenoides, son óptimos a una temperatura de 20-22 ° C y a un pH de 5.0¹⁰.

Desde la década pasada ha existido un interés significativo por el desarrollo de *P. rhodozyma* como fuente de astaxantina para el cultivo de peces y crustáceos⁹. Es por eso que varias compañías como Phillips Petroleum, Ingene, Universal Foods y Gist Brocades han iniciado la comercialización del pigmento producido por esta levadura^{22, 28}.

Antecedentes

Diversos factores han sido reportados como estimuladores de la carotenogénesis en microorganismos, en *P. rhodozyma* se ha propuesto que el $^1\text{O}_2$ y el radical peróxido inducen la biosíntesis de astaxantina^{18,31}.

Grajales encontró en 2002, que el aminoácido arginina (fuente de nitrógeno orgánico) presentó un efecto estimulador sobre la producción de carotenoides¹³, y propuso que el aumento en la carotenogénesis por parte de *P. rhodozyma*, podría ser debido a que el grupo guanidino de la arginina, es utilizado por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) para producir óxido nítrico (NO), el cual al ser un radical libre, genera en las células de la levadura estrés oxidativo y éstas en respuesta, activan la biosíntesis de los carotenoides¹³.

La enzima NOS cataliza la oxidación de la arginina para producir NO y citrulina²⁹. La generación de óxido nítrico es un proceso de oxidación en 2 etapas: la primera de ellas depende de la acción de los grupos hemo de la enzima y conduce a la síntesis de un intermediario estable denominado N-hidroxi-L-arginina. En una reacción posterior, se lleva a cabo la oxidación de este compuesto, en presencia de NADPH, para producir NO. Ambos pasos son catalizados por los cofactores FAD y FMN y de la misma manera es requerida la tetrahidrobiopterina (H_4B)²⁵ (figura 5).

La enzima Óxido Nítrico Sintasa (NOS) ha sido ampliamente estudiada en los mamíferos debido a que posee funciones fisiológicas y patológicas importantes³². Aunque muchas isoformas de NOS's han sido purificadas y caracterizadas de diferentes tejidos y células en mamíferos y plantas, sólo se

Antecedentes

han encontrado en la literatura unos cuantos reportes en microorganismos³².

En 1994, la NOS fue parcialmente purificada en la bacteria *Nocardia* sp y encontrada dependiente de la presencia de NADPH, Ca²⁺, FAD, FMN Y H₄B⁷; en 1996 Stachura *et al* encontraron que la bacteria *Helicobacter pylori*, expresaba a la NOS en pacientes con úlcera duodenal. Sin embargo, el significado de su presencia, no se conoce aún. Wahn-Soo Choi *et al*, en 1997, identificaron en *Staphylococcus aureus* una isoforma diferente de la NOS en mamíferos²⁴.

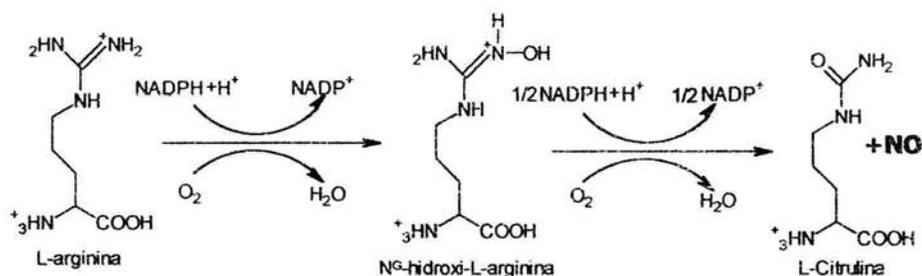


FIGURA 5: PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO POR LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA

Debido a que el incremento en la síntesis de carotenoides puede deberse a diversos factores, entre los cuales se encuentra el estrés oxidativo, es de interés científico el estudio de la presencia de la enzima óxido nítrico sintasa en la levadura carotenogénica *Phaffia rhodozyma*.

Objetivos

GENERAL

- Determinar si la estimulación de la carotenogénesis es una respuesta al estrés oxidativo provocado por la presencia del óxido nítrico generado por la enzima óxido nítrico sintasa en la levadura *Phaffia rhodozyma*.

PARTICULARES

- Determinar la concentración de arginina con mayor estimulación sobre la síntesis de carotenoides.
- Comprobar si la presencia de óxido nítrico generado químicamente, provoca una estimulación en la síntesis de carotenoides.
- Demostrar la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa en la levadura *P. rhodozyma*.
- Evaluar la participación del oxígeno en la actividad de la óxido nítrico sintasa.

Materiales y Métodos

CEPA DE *Phaffia rhodozyma*

La cepa de *P. rhodozyma* (NRRL Y-10922) utilizada en este trabajo fue proporcionada por "The Agricultural Research Service Culture Collection" del "Northern Regional Research Laboratory" en Peoria, Illinois; 61604 USA.

ACTIVACIÓN DE LA CEPA DE *Phaffia rhodozyma*

La cepa se obtuvo a partir de un liofilizado que fue resuspendido en 1 mL de medio de cultivo YM (ver su composición en MEDIOS DE CULTIVO) en condiciones estériles. Posteriormente, las células resuspendidas fueron inoculadas en agar YM, en cajas petri de plástico, por agotamiento.

Las cajas sembradas se incubaron durante 48 horas a una temperatura de 22 °C; y una vez que se observó crecimiento (colonias redondas, cóncavas, con margen entero, cremosas, opacas y con el color naranja-rosáceo) se mantuvieron en refrigeración para su futura utilización.

MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo se describen a continuación.

Materiales y Métodos

AGAR YM IZT.

COMPONENTES	g/L
Extracto de levadura	9
Extracto de malta	9
Bacto peptona	15
Glucosa	30

NOTA: agar 1.5%



U.N.A.M. CAMPUS

SOLUCIÓN DE VITAMINAS

VITAMINA	Mg
Pantotenato de Calcio	60
Tiamina	30
Biotina	2
Cianocobalamina	3
Piridoxina	15
Riboflavina	30
Niacina	180

NOTA:

1. Disolver en 400 mL de agua destilada, ajustar a pH 3.5 - 4.0 con HCl.
2. Esterilizar por filtración la solución de vitaminas.

Materiales y Métodos

MEDIO DE CULTIVO QUÍMICAMENTE DEFINIDO PARA LA LEVADURA Phaffia rhodozyma, (Flores-Cotera, 2001)

NUTRIENTE	COMPONENTE	MOLARIDAD	(W/V) L
C	Glucosa	170 mM	30g
N	(NH ₄) ₂ SO ₄	60/22 mM	7.9/2.9g
P	Na ₂ HPO ₄	10/4 mM	1.41/0.56g
	NaH ₂ PO ₄	10/4 mM	1.38/0.55g
K	K ₂ SO ₄	5/0.7 mM	0.87/0.12g
Mg	MgSO ₄	1.2 mM	0.3g
Ca	CaCl ₂ · H ₂ O	0.15 mM	22mg
Cu	CuSO ₄ · 5H ₂ O	5 mM	1.25mg
Fe	FeSO ₄ · 7H ₂ O	21 mM	5.8mg
Mn	MnSO ₄ · H ₂ O	10 mM	1.7mg
Zn	ZnSO ₄ · H ₂ O	40 mM	11.5mg
Co	CoSO ₄ · 7H ₂ O	0.71 mM	0.2mg
B	H ₃ BO ₄	1.67 mM	0.13mg
Mo	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	2 mM	0.5mg
Na	NaCl	17 mM	1.0mg
S	Na ₂ SO ₄	2.11 mM	0.3mg
Vitaminas	Sol. de vitaminas		0.5ml

FERMENTACIONES

PREINÓCULO:

Para el preinóculo se tomó una asada de células de *P. rhodozyma* procedentes de las cajas sembradas anteriormente (ver activación de la cepa) y se inocularon en 30 mL de medio YM líquido, en matraces de 250 mL. Los matraces fueron incubados durante 48 horas, a 22 ° C con una agitación constante de 150 rpm. Después del tiempo de incubación, todo el contenido del matraz se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en solución salina isotónica estéril al mismo volumen. Este procedimiento se repitió dos veces más. A continuación se midió la densidad óptica del preinóculo en un espectrofotómetro a una λ de 540 nm. La concentración del preinóculo debe ser del 2 % (densidad óptica de 1.5).

Todas las fermentaciones se realizaron en un medio de cultivo químicamente definido, previamente preparado e inoculado con la suspensión del preinóculo, en matraces bafleados de 250 mL (o botellas de 100 mL con tapón de rosca para los experimentos en ausencia de oxígeno), a una temperatura de 22 ° C con agitación constante a 150 rpm. Este procedimiento se siguió de la misma manera en todas las condiciones evaluadas durante este trabajo y las únicas variantes se realizaron en las concentraciones de arginina y amonio según el experimento realizado.

Materiales y Métodos

MUESTREO

El muestreo se llevó a cabo cada 24 horas, desde el tiempo cero hasta las 96 horas, y se realizó de la siguiente manera (a menos que se indique alguna diferencia).

En tubos de ensayo de 5mL se pusieron 2mL del medio de cultivo de cada condición evaluada y se centrifugaron a velocidad máxima durante 10 minutos. Se guardaron tanto las células como el sobrenadante y se realizaron sus respectivas determinaciones.

A las células se les determinó el crecimiento por densidad óptica y los carotenoides totales por el método de Sedmak; al sobrenadante se le midió el pH (ver técnicas en el apéndice).

La actividad enzimática de la óxido nítrico sintasa (NOS) se determinó a través de los extractos enzimáticos de la levadura mediante un kit colorimétrico (específico para esta enzima) llamado " Calbiochem No. 482702" , capaz de medir a la enzima a través de la formación de nitratos y nitritos, los cuales son productos de degradación del óxido nítrico (Ver preparación de los extractos enzimáticos en el apéndice).

Materiales y Métodos

EXPERIMENTOS

1. Se determinó la concentración de arginina que presentó un efecto mayor sobre la producción de los carotenoides y el crecimiento en la levadura *Phaffia rhodozyma* (para utilizarla en los experimentos posteriores). Las condiciones evaluadas fueron: 2, 10, 20, 30, 40 y 50 mM de arginina.
2. También se cultivó a la levadura en presencia de nitroprusiato de sodio (SNP, nitrosilcianoferrato de sodio), un donador de NO; con el objeto de probar una vez más el mecanismo de defensa que la levadura presenta al encontrarse en un ambiente de estrés, es decir, que el NO induce de alguna manera producción de carotenoides. Se utilizaron tres concentraciones del SNP: 0.1, 0.5 y 1mM y éstas se adicionaron al medio de cultivo después de 24 horas de crecimiento.
3. Para comprobar si la arginina estaba provocando un estrés oxidativo dentro de las células de *P. rhodozyma* y éstas, en respuesta, producían una mayor cantidad de carotenoides, al ser utilizado este aminoácido por la NOS para producir NO; se llevó a cabo una fermentación donde se cultivó a la levadura en presencia y ausencia del aminoácido arginina, con el objeto de realizar extractos enzimáticos de estas célula, para medir si existía o no actividad enzimática de la NOS y así poder probar su presencia en la levadura.

Materiales y Métodos

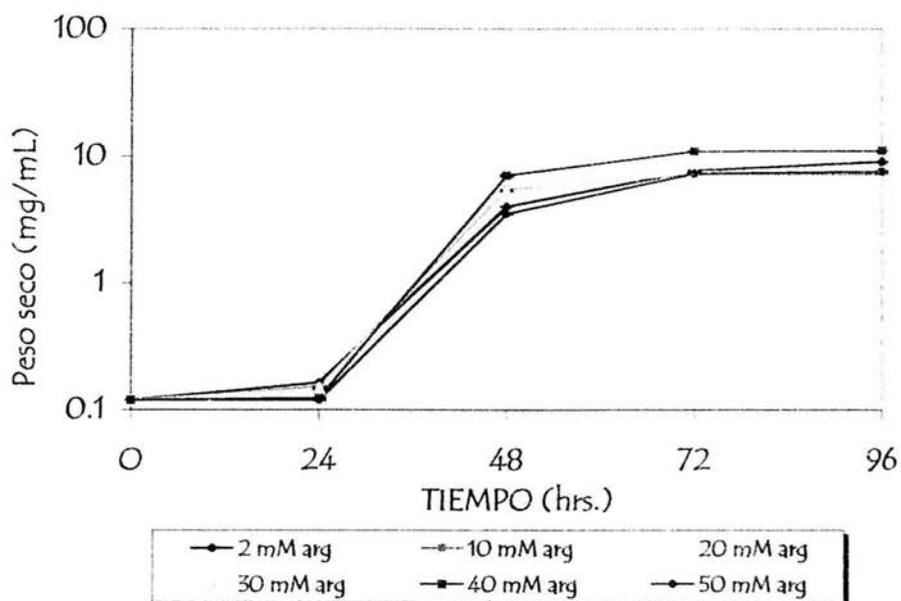
4. Por último, se cultivó a la levadura en presencia de arginina pero en ausencia total de oxígeno, con el fin de comprobar que el otro sustrato de la enzima NOS es el oxígeno molecular, pues si éste no estaba presente durante la fermentación, se esperaba que no hubiera producción de NO y por consecuencia no se observaría un aumento en la producción de los carotenoides. Esta fermentación se llevó a cabo en botellas de 100 ml con un volumen de llenado del 20 % durante 192 horas y la adición de la arginina se realizó a las 24 horas de cultivo.

Resultados

Experimento 1:

a) Crecimiento de la levadura *Phaffia rhodozyma* cultivada a diferentes concentraciones del aminoácido arginina: 2, 10, 20, 30, 40, y 50 mM.

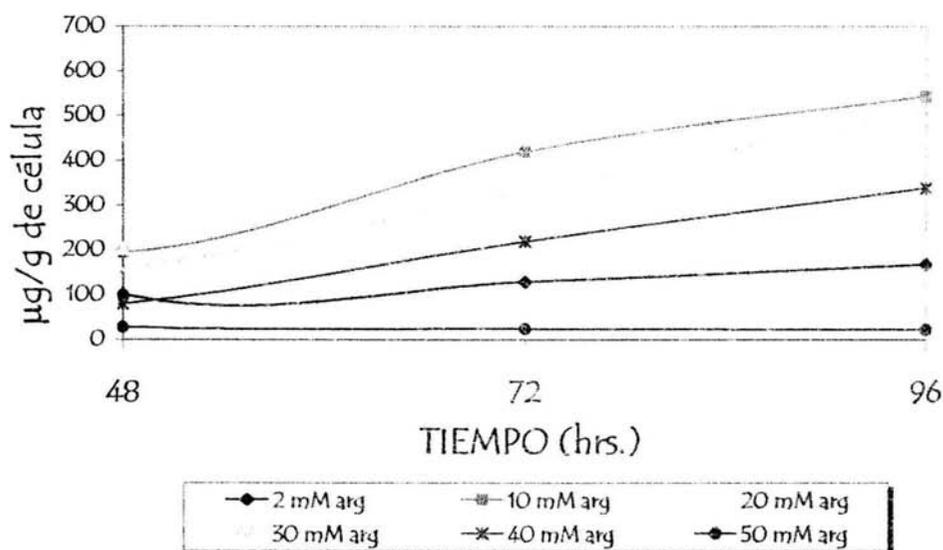
GRÁFICA #1: Cinética de crecimiento de la levadura *Phaffia rhodozyma* en diferentes concentraciones de Arginina.



Resultados

b) Producción de carotenoides a diferentes concentraciones del aminoácido arginina: 2, 10, 20, 30, 40, y 50 mM por la levadura *Phaffia rhodozyma* (gráfica 2).

GRÁFICA #2: Producción específica de carotenoides por la levadura *Phaffia rhodozyma* a diferentes concentraciones de arginina.

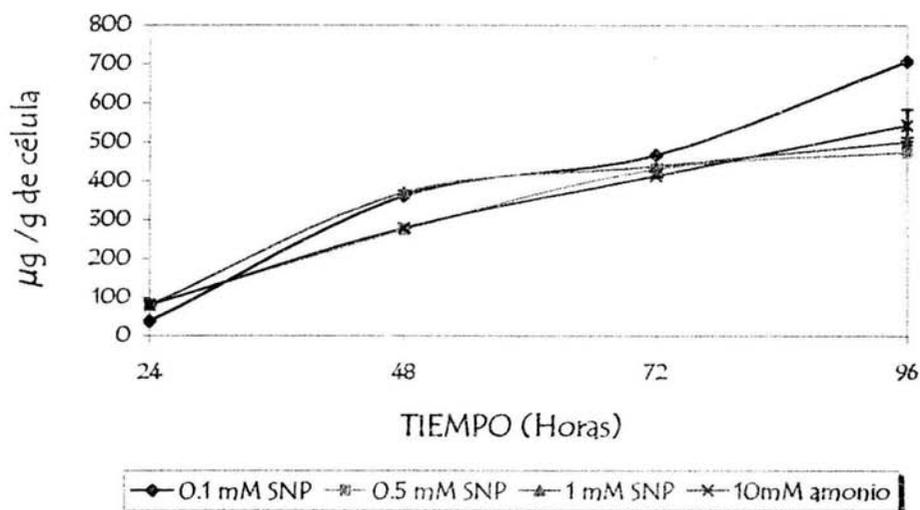


Resultados

Experimento 2: Producción de carotenoides por la levadura *Phaffia rhodozyma* en presencia de un donador de óxido nítrico, el SNP.

ESTE EXPERIMENTO FORMA PARTE DE LOS RESULTADOS REPORTADOS EN LA TESIS DE MAESTRÍA DE ERIKA GRAJALES, 2002 (Página 73)

GRÁFICA #3: Producción específica de carotenoides por la levadura *Phaffia rhodozyma* cultivada en presencia de un donador de NO-

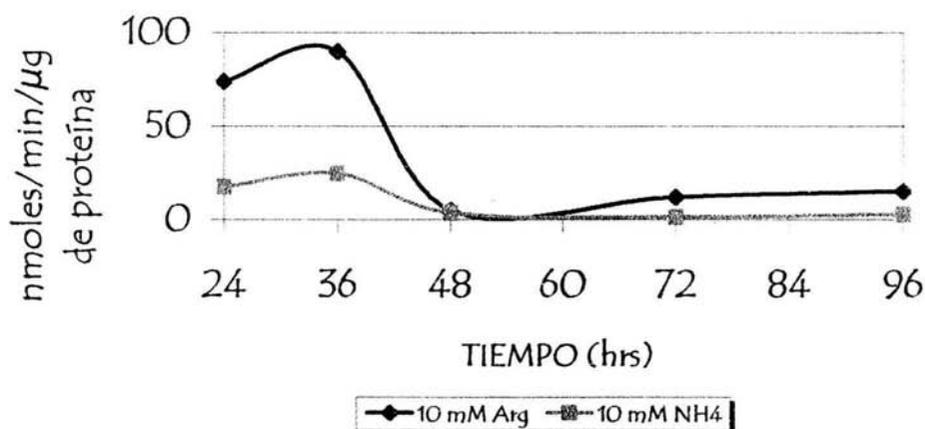


Resultados

Experimento 3: Cultivo de la levadura *Phaffia rhodozyma* en presencia y ausencia del aminoácido arginina.

ESTE EXPERIMENTO FORMA PARTE DE LA TESIS DE MAESTRÍA DE ERIKA GRAJALES, 2002

GRÁFICA #4: Actividad enzimática de NOS en la levadura *Phaffia rhodozyma* en presencia y ausencia de arginina.

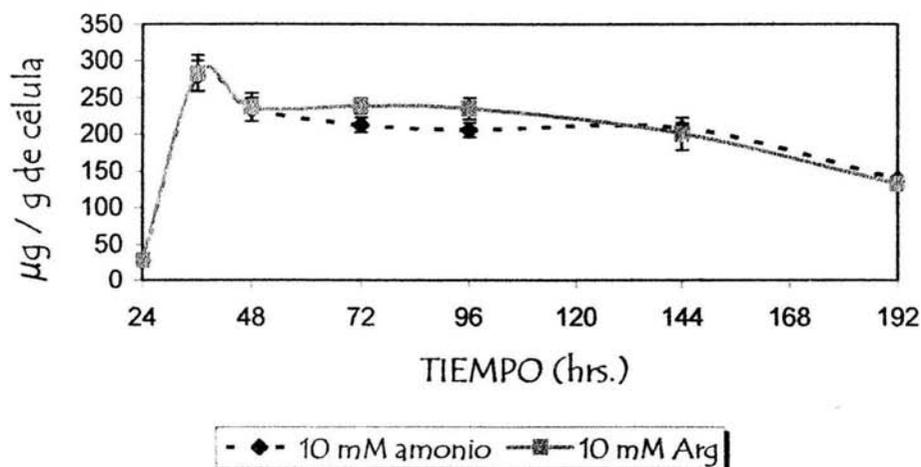


Resultados

Experimento 4: Cultivo de la levadura *Phaffia rhodozyma* en presencia del aminoácido arginina, pero en ausencia de oxígeno.

ESTE EXPERIMENTO FORMA PARTE DE LOS RESULTADOS REPORTADOS EN LA TESIS DE MAESTRÍA DE ERIKA GRAJALES, 2002 (Página 65)

GRÁFICA #5: Producción específica de carotenoides por la levadura *Phaffia rhodozyma* cultivada en ausencia de oxígeno.



Discusión

Experimento 1:

Grajales en 2002, evaluó las concentraciones 2, 10 y 20 mM de arginina y las comparó con diferentes concentraciones de sulfato de amonio (como control); observando una estimulación en la producción de los carotenoides totales al utilizar arginina como fuente de nitrógeno. En este experimento se incrementaron las concentraciones de arginina, con el fin de determinar cuál de estas estimularía en mayor cantidad la producción de carotenoides totales y que efecto tendrían en el crecimiento de la levadura. Las concentraciones fueron 2, 10, 20, 30, 40 y 50 mM.

En la gráfica #1 se muestra que el crecimiento de la levadura *Phaffia rhodozyma* no varió al ser cultivada en las diferentes concentraciones de arginina. Esto puede deberse a que el aminoácido no es tóxico para la levadura y puede utilizarlo para su crecimiento como fuente de nitrógeno. En las seis condiciones evaluadas, la cinética de crecimiento fue similar. Del tiempo cero a las 24 horas de fermentación, se observó la fase de adaptación, en la que la levadura inicia el reconocimiento de las condiciones presentes en su ambiente, para poder utilizar los nutrientes en la siguiente fase. La fase exponencial comenzó a partir de las 24 horas y continuó hasta las 48 horas, al observarse un cambio drástico en la pendiente. Por último la fase estacionaria se determinó a partir de las 48 horas con término en las 96 horas de fermentación; debido a que la concentración celular de las 72 horas presentó valores similares a los de las 48 horas.

Discusión

En el experimento que está representado en la gráfica #2, se observó que las concentraciones que estimularon en mayor cantidad la producción de los carotenoides fueron: 20, 10 y 30 mM. Por lo que se determinó que la concentración óptima de arginina para los siguientes experimentos sería 10 mM, debido a que si no existió gran diferencia entre 20 mM (611.204 μg CT/g de célula) y 10mM (543.11 μg CT /g célula) es recomendable la utilización de la concentración menor. Este resultado concuerda con lo descrito por Grajales, 2002.

Es importante notar que con 2, 40 y 50 mM las producciones obtenidas fueron menores. La concentración 2 mM no presentó estimulación, únicamente permitió el crecimiento. La concentración 50 mM al parecer tuvo un efecto negativo sobre la producción de carotenoides ya que junto con 40 mM, se ve una disminución en la producción con respecto a 10, 20 y 30 mM. Este efecto podría explicarse al pensar que altas concentraciones de arginina (40 y 50 mM) resultan tóxicas para las células, sin embargo, esto se contrapone al observar en la gráfica #1 que el crecimiento no se ve afectado. Por lo que este efecto podría deberse a una inhibición por sustrato de la enzima óxido nítrico sintasa. En cuanto a el efecto con 2mM puede suponerse que es muy poca la cantidad de arginina para poder generar NO e inducir la producción de carotenoides.

Experimento 2:

Se sabe que el NO \cdot es una especie reactiva de oxígeno y debido a que posee

Discusión

un electrón libre no apareado pertenece al grupo de los radicales libres causantes de producir, entre otras cosas, estrés oxidativo dentro de las células. En microorganismos solo se conocen algunos reportes sobre la existencia de la NOS y por tanto de la producción de NO.

En general, las células de levadura y muchos organismos, tienen varios mecanismos de defensa contra el ataque de los radicales libres, entre ellos se encuentra un multisistema enzimático a través del cual son capaces de transformar estas especies reactivas en agua, como por ejemplo, las enzimas superóxido dismutasa, la catalasa y los niveles de glutatión; o mediante un proceso en el que transfieren la energía de altos niveles de excitación a un triplete del carotenoide. Conociendo este último mecanismo de defensa se puede explicar el aumento en la producción de carotenoides en presencia del aminoácido arginina, pues como ya se explicó antes, todo indica que se está produciendo óxido nítrico en las células de *P. rhodozyma*.

En la gráfica #3, se muestra el comportamiento de la producción de carotenoides al cultivar a la levadura *Phaffia rhodozyma* en presencia de un donador de óxido nítrico, el NPS, adicionado en diferentes concentraciones (0.1, 0.5 y 1mM) a las 24 horas de fermentación (estas concentraciones fueron descritas por Membrillo *et al.*, 2000 como condiciones ideales para ver el efecto del NPS sobre la defensa de *E. coli* al estrés oxidativo). Y se observó que la menor concentración de NPS, indujo una mayor producción de carotenoides al compararla con la adición de 0.1y 0.5 mM de NPS y el control amonio 10 mM.

Discusión

El crecimiento en las tres concentraciones de NPS fue semejante, es decir, alrededor de 4 mg / mL y en presencia de amonio fue de 10 mg / mL (a las 96 horas de fermentación). Esto sugiere que el NO generado afecta el crecimiento de la levadura; pero en relación a la producción de carotenoides, puede pensarse que induce la carotenogénesis. Sin embargo, en altas concentraciones el NO es tóxico para la célula, pues la producción mayor de carotenoides se obtuvo en 0.1 mM de NPS y no en 0.5 y 1 mM de NPS, donde la producción fue semejante a la obtenida en presencia de amonio 10 mM. Sin embargo, puede sugerirse también, que el NPS en altas concentraciones si estimula la producción de carotenoides, pero éstos pueden estarse desintegrando para poder inactivar al NO generado.

Experimento 3:

En la gráfica #4 se observa que la estimulación por la presencia de arginina apoya la hipótesis de que en la levadura *Phaffia rhodozyma* está presente la enzima NOS¹³. Se buscó la actividad de NOS (con un kit colorimétrico específico para esta enzima) en extractos enzimáticos de células cultivadas en presencia y ausencia de arginina. En ambas condiciones se obtuvo actividad; y como se esperaba, en presencia de arginina se observó una mayor actividad de NOS comparada con el control de amonio. Este resultado confirma que la arginina es utilizada por la NOS para producir NO y citrulina, lo cual también apoya los resultados obtenidos en los experimentos 1 y 2. La mayor actividad se obtuvo a las 36 horas de cultivo en ambas condiciones.

Discusión

Experimento 4:

Los resultados obtenidos en la gráfica #5 muestran el cultivo de la levadura *Phaffia rhodozyma* en presencia del aminoácido arginina, pero en ausencia de oxígeno. Se observa que en la producción de carotenoides no hubo estimulación por parte de la arginina, ya que la producción es similar tanto en presencia como en ausencia de ella. Esto puede explicarse porque aún en presencia del primer sustrato: la arginina, la enzima NOS no puede llevar a cabo su actividad y producir NO debido a que, el segundo sustrato: el oxígeno no está presente. Y al no producirse NO no existe estrés que estimule la carotenogénesis.

Conclusiones

- La concentración mínima del aminoácido arginina que resultó con mayor efecto en la producción de los carotenoides fue 10 mM.
- Se encontró actividad enzimática de la óxido nítrico sintasa en la levadura *Phaffia rhodozyma*.
- El aminoácido arginina es el responsable del efecto positivo en la producción de carotenoides por parte de la levadura, al ser éste sustrato de la NOS junto con el oxígeno molecular.
- Todas las evidencias mostradas en este trabajo apuntan a que la carotenogénesis en *P. rhodozyma*, es una estrategia de defensa contra el estrés oxidativo provocado por el óxido nítrico.

Bibliografía

1. Andrews, G. A., Phaff, J. H y Starr, P. M. 1976. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a Red-Pigmented Fermenting Yeast. *Phytochem.* 15:1003-1007.
2. Armstrong, G. A. 1994. Eubacteria Show Their True Colors: Genetics of Carotenoid Pigment Biosynthesis From Microbes to Plants. *J. Bacteriol.* 176: 4795-4802
3. Armstrong, G. A. y J. E. Hearst. 1996. Genetics and Molecular Biology of Carotenoid Pigment Biosynthesis. *FASEB J.* 10:228-237
4. Armstrong, G. A. 1997. Genetics of Eubacterial Carotenoid Biosynthesis: A Colorful Tale. *Ann. Rev. Microbiol.* 51:629-659
5. Britton, G. 1991. Carotenoids. *Meth. Plant. Biochem.* 7:473-517
6. Britton, G.; S. Liaeen-Jensen y H. Pfander. 1995. Carotenoids Today and Challenges for the Future.
7. Chen Yijun y Rosazza P. N. 1994. A Bacterial Nitric Oxide Synthase from a *Nocardia* Species. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 203(2):1251-1258.
8. Di Mascio, P.; Devaasagayam T. P. A., Kaiser, S. y Sies, H. 1990. Carotenoid, Tocopherols and Tilos as Biological Singulet Molecular Quenchers. *Biochem. Soc. Trans.* 18:1054-1056.
9. Fletcher, D. L. 1992. Methodology for Achieving Pigment Specifications. *Poultry Sci.* 71:773-743.
10. Flores-Cotera, L. B. (2001). Influencia de Factores Nutricionales en la Producción de Astaxantina por *Phaffia rhodozyma*. Tesis de Doctorado, Facultad de Química. UNAM. pp 100
11. Fraser, P. D., Miura Y. y Misawa, N. 1997. *In Vitro* Characterization of Astaxanthin Biosynthetic Enzymes. *J. Biol. Chem.* 272:6128-6135.

Bibliografía

12. González Salazar Margarita. 2000. La astaxantina y su Biosíntesis. *Contactos* 36: 61-64
13. Grajales E. E. (2002). Efecto de la Fuente de Nitrógeno sobre el crecimiento y la carotenogénesis en la levadura *Phaffia rhodozyma*. Tesis de maestría, UNAM. pp 98
14. Haard F. N. 1988. Astaxanthin Formation by the Yeast *Phaffia rhodozyma* on Molasses. *Biotechnology Letters*. 10(9):609-614.
15. Hansberg Wilhelm. 1999. La Biología del Dioxígeno en Singulete. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 2(2):47-55.
16. Johnson E. A. y An G. 1991. Astaxanthin from Microbial Sources. *Crit. Rev. Biotechnol.* 11(4):297-326.
17. Johnson, E. A. y Schroeder, W. A. 1995. Microbial Carotenoids. *Adv. Biochem. Eng.* 53:119-178.
18. Johnson, E. A. y Schroeder, W. A. 1996. Biotechnology of Astaxanthin Production in *Phaffia rhodozyma*.
19. Karnaukov, V. N. 1990. Carotenoids: Recent Progress, Problems and Prospects. *Comp. Biochem. Physiol.* 95B:1-20.
20. Kiechle, F. L y Malinski, T. 1993. *Am. J. Clin. Pathol.* 100, 567-575. En: Whan-Soo Choi, Man-Sik Chang, *et al.* 1997. Identification of Nitric Oxide Synthase in *Staphylococcus aureus*. *Biochem. And Biophys. Res. Comm.* 237:554-558.
21. Klauj, H. y J. C. Bauernfeind. 1981, Carotenoids as Food Color.
22. Membrillo-Hernández, J. M.; Coopaman, A.; Channa, M. A novel mechanism for upregulation of the *Escherichia coli* K-12 hmp (flavo-hemoglobin) gene by the "NO releaser", S-

Bibliografía

nitrosoglutathione: nitrosation of homocysteine and modulation of MetR binding to the gly A-hmp intergenic. *Mol. Microbiol.* 29(4):1101-1112

23. Miller, M. W., Minoru, Y. y Soneda M. 1976. *Phaffia*, a New Yeast Genus in the *Deuteromycotina* (*Blastomycetes*). *International Journal of Systematic Bacteriology.* 26(2):286-291.
24. Nakano, T., Tosa, M. y Takeuchi, M. 1995. Improvement of Biochemical Features in Fish Health by Red Yeast and Synthetic Astaxanthin. *J. Agric. Food. Chem.* 43:1570-1573.
25. Nathan, Carl. 1992. Nitric Oxide as a Secretory Product of Mammalian Cells. *FASEB J.* 6, 3051-3064.
26. Nelis, J.H. y A. P. De Leenheer. 1991. Microbial Sources of Carotenoid Pigments Used in Foods and Feeds. *J. Appl. Bacteriol.* 70:181-191.
27. Rodríguez, R.; Ruíz, B. y Sánchez, S. 1998. Los Carotenoides en la Salud. *Boletín de Educación Bioquímica.* 17(3): 115-121.
28. Sánchez, A.; Flores-Cotera, L. B.; Langley, E.; Martín, R.; Maldonado, G.; y Sánchez, S. 1999. Carotenoides: Estructura, Función, Biosíntesis, Regulación y Aplicaciones. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 41:175-191.
29. Scott-Burden, T.; Vanhoutte, PM. 1993. The Endothelium as a Regulator of Vascular Smooth Muscle Proliferation. *Circulation.* 87(Suppl V):V-51-V-55. Cita en INTERNET: Vanhoutte, M. P., Perrault, L. y Vilaine J. P. *Disfunción Endotelial y Enfermedad Vascular.* Institut the Recherches Internationales Servier, Curbevois. Francia.
30. Stachura, J., Konturek, J. W., Karczewska, A.; Domschke, W.; Popiela, T.; and Kounturek, S. J. 1996. *J. Physiol. Pharmacol.* 47(1):131-135.

Bibliografía

31. Stadtman, E. R. 1992. Protein Oxidation and Aging. *Science* 257:1220-1224.
32. Whan-Soo, C.; Man-Sik, C.; Jeung-Whan, H.; and Hyang-Woo, L. 1997. Identification of Nitric Oxide Synthase in *Staphylococcus aureus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 237:554-558.
33. Yokoyama, A., Izumida, H y Miki, W. 1994. Production of Astaxanthin and α -Ketozeaxanthin by the Marine Bacterium *Agrobacterium aurantiacum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58:1842-1844.

IZT.



UNAN CAMPUS

Apéndice

DENSIDAD ÓPTICA

1. Resuspender las células en 2 mL de solución salina isotónica para conseguir el volumen original.
2. Agitar con vortex.
3. Tomar 1ml de la mezcla y vaciarlo a otro tubo de 5 mL.
4. El tubo que quedó con 1mL se congela para determinar carotenoides totales.
5. Hacer una dilución 1:5 (agregar 4 mL más de solución salina isotónica)
6. Agitar con vortex.
7. Leer en el espectrofotómetro a una λ de 540 nm.

CAROTENOIDES TOTALES

1. Agregar 0.5 mL de levadura a un tubo de ensayo.
2. Centrifugar a 6500 rpm / 10 minutos.

Apéndice

3. Desechar al sobrenadante a un vaso de precipitado cuidando de no desechar las células y secar rápidamente el borde con un pedazo de papel.
4. Agitar el pellet en vortex hasta deshacer el agregado.
5. Agregar perlas de vidrio hasta cubrir la superficie del contenido.
6. Tubo por tubo calentar 1 minuto en baño María a una temperatura entre 58 y 60 ° C después de haber agregado 0.8 mL de dimetil sulfóxido (DMSO), el cual debe estar también a 58 ° C, tapar los tubos con canicas y agitar el tubo en vortex durante 1 minuto.

Este procedimiento debe ser alternando 1 minuto calentando el tubo y otro minuto en el vortex.

7. Agregar 0.2 mL de K_2PO_4 0.01M a los tubos.
8. Agregar 2.5 mL de mezcla fría de hexano acetato de etilo / hexano (1:1), tapar con las canicas y ponerlos dentro de una caja negra, ya que los carotenoides son sensibles a la luz.
9. Agitar 1 minuto en vortex.
10. Mantener en el congelador durante 30 minutos.

Apéndice

Hasta este paso los tubos pueden permanecer en el congelador durante 24 horas.

11. Centrifugar a 5000 rpm / 5 minutos.

12. Remover la fase orgánica con una pipeta cuidando de no extraer las células, poner el sobrenadante directamente en las cubetas del espectrofotómetro y leer a una λ de 480nm.

$$\mu\text{g Carotenoides} = \frac{(A) (10^6)}{(1\% \text{ E } 1\text{cm}) (100)}$$

Donde:

A = absorbancia observada

10^6 = factor de conversión para expresar carotenoides en μg

1% E 1cm = coeficiente de extinción específica

100 = constante para eliminar el factor porcentaje

Apéndice

POLVOS DE ACETONA

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO DE PROTEÍNAS DE Phaffia rhodozyma.

1. Montar en un matraz Kitasato un embudo Buchner.
2. Aplicar al matraz vacío.
3. Poner en el embudo papel filtro y agregarle agua destilada para que se pegue.
4. Vaciar 30 mL del inóculo, o la cantidad que se tenga en el matraz.
5. Lavar con 50 mL de solución salina isotónica.
6. Agregar 25 mL de acetona.
7. Retirar el papel filtro y meter este en el congelador dentro de cajas Petri durante 10 minutos.
8. Si en este paso no se termina la técnica, los papeles filtro se pueden quedar por mucho más tiempo en el congelador.

Apéndice

9. En un mortero, triturar con el pistilo trozos de hielo seco, y cuando sublime casi en su totalidad, raspar la monocapa de células del papel filtro con una espátula y verterlas en el mortero.
10. Una vez que las células estén en el mortero, incorporar todo el contenido y resuspender en 3 mL de buffer de PO_4^{3-} 8mM a pH 6.
11. Es importante esperar la sublimación del hielo seco, porque al agregar el buffer la suspensión puede congelarse si no ha sublimado totalmente. El buffer debe estar en el congelador y sólo se sacará para la resuspensión.
12. Tomar los 3 mL y vaciarlos a tubos para centrifuga. Vaciar 1ml más al mortero para enjuagar e impedir que se quede muestra en él. De la misma manera vaciar el mililitro al tubo para centrifuga.
13. Equilibrar los tubos con el buffer.
14. Centrifugar en una ultracentrifuga a las siguientes condiciones: Programar la temperatura mínimo 4 ° C y máximo 14 ° C; la velocidad a 20.000 rpm y el tiempo a 45 minutos.
15. Cuando termine el tiempo de centrifugado, sacar las muestras.
16. Recuperar la mayor cantidad del sobrenadante de cada tubo, teniendo cuidado de no tomar células.

Apéndice

17. Vaciar el sobrenadante a tubos Eppendorf y realizar la determinación de proteínas por Lowry.
18. Si no se quiere realizar la determinación en ese momento se pueden congelar los tubos.