

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE LA ENZIMA ATP CITRATO-LIASA EN LA LEVADURA CAROTENOGÉNICA *Phaffia rhodozyma*.

M. Ángeles Martínez, Ruth Martín y Sergio Sánchez.

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, IIB, UNAM.

Circuito escolar de Ciudad Universitaria, México DF. CP 04510. Fax 56223855

e-mail: sersan@servidor.unam.mx

Palabras clave: *Phaffia rhodozyma*, citrato, ATP citrato-liasa

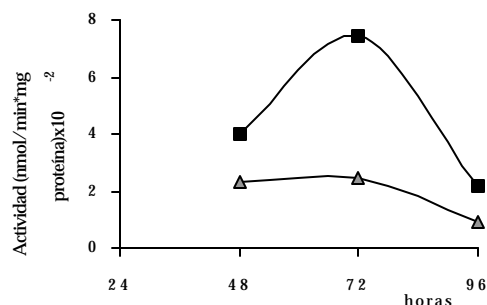
Introducción: Diversas especies de levaduras pueden clasificarse como oleaginosas porque acumulan grandes cantidades de lípidos por arriba del 70% de su biomasa. Ciertas condiciones nutricionales como una disminución del nitrógeno del medio de cultivo o un exceso de carbono favorecen la acumulación (1). *Phaffia rhodozyma* es una levadura carotenogénica que puede ser considerada como oleaginosa debido a la gran cantidad de lípidos que contiene, entre ellos produce diversos carotenoides, principalmente astaxantina (2). Desde el punto de vista bioquímico se ha clasificado a las levaduras por la presencia de la enzima ATP citrato-liasa (ATP-CL) en oleaginosas y no oleaginosas. Esta enzima es la responsable de escindir el citrato que sale de la mitocondria en presencia de ATP en oxalacetato y acetil-CoA, siendo ésta última el principal sustrato de la biosíntesis de esteroides (3). No se conoce la presencia de esta enzima en *P. rhodozyma*, sin embargo en trabajos previos se ha observado que la adición de citrato en el medio de cultivo incrementa la concentración de carotenoides (4), lo que supone que esta levadura utiliza el citrato como precursor de lípidos, posiblemente a través de la ATP-CL. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es investigar la presencia de la enzima ATP-CL en *P. rhodozyma*.

Metodología. Se utilizó la cepa de *P. rhodozyma* NRRL Y 10922, cultivada en el medio de Johnson and Lewis (2) modificado, en las condiciones establecidas para el mejor crecimiento y producción de pigmentos. El citrato frío y marcado con C^{14} se adicionaron en una concentración 30 mM, a las 24 horas de incubación en concentraciones de 1 y 6% de glucosa como fuente de carbono. La actividad de la enzima se determinó por el método de Srere (5). Se determinaron carotenoides totales (CT), crecimiento, sustrato residual y pH (4).

Resultados y discusión. En un medio de cultivo con glucosa 6% se realizaron adiciones de citrato a las 24, 36 y 48 horas de fermentación. A las 24 horas de adición se obtuvo el mejor crecimiento y producción de CT con respecto a los demás tiempos de adición. En sistemas adicionados con citrato y en ausencia de éste se detectó la actividad de ATP-CL, observándose un pico máximo de actividad a las 72 horas de incubación siendo mayor en presencia de citrato (Fig.1). La actividad enzimática de la ATP-CL fue medida en dos concentraciones de glucosa (1 y 6%) en un sistema adicionado con citrato. A las 72 horas de incubación se obtuvo una actividad específica para glucosa 6% de 1.28×10^{-2} nmol min⁻¹ mg proteína⁻¹ mientras que en

glucosa 1% fue de 0.766×10^{-2} nmol min⁻¹ mg proteína⁻¹. Al adicionar ácido cítrico marcado con C^{14} adicionado a las 24 horas de fermentación, en glucosa al 1 y 6%, se detectaron CT con marca, obteniendo valores de 1925 y 70 cpm/mg de células respectivamente; esto último probablemente esté relacionado con lo reportado en *C. utilis* donde se encuentran dos sistemas de transporte para citrato, ambos inhibidos en presencia de glucosa (6).

Figura 1. Actividad de ATP citrato-liasa en ausencia (▲) y presencia de citrato (■).



Conclusiones. La enzima ATP citrato-liasa se encuentra presente en la levadura *P. rhodozyma*, esto la clasifica como microorganismo oleaginoso. La actividad de la enzima se ve favorecida en altas concentraciones de glucosa y con la adición de citrato al medio de cultivo.

Bibliografía.

- Botham, P.A. and Ratledge, C. (1979). A biochemical explanation for lipid accumulation in *Candida 107* and other oleaginous micro-organisms. *J. Gen. Microbiol.* 114:361-375.
- Johnson, E.A. and Lewis, M.J. (1979). "Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*". *J. Gen. Microbiol.* 115:173-183.
- Ratledge, C. and Wynn, J.P. (2000). "Understanding microbial obesity". *SIM*, 50(4):181-185.
- Flores-Cotera, L.B., Martín, R. and 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
- Srere, P.A. (1962). Citrate cleavage enzyme. *Method. Enzymol.* 5:641-644.
- Cássio, F. and Leão, C. (1991). Low and high affinity transport systems for citric acid in the yeast *Candida utilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(12):3623-3628.