

**MEJORAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES EN
SACCHAROMYCES CEREVISIAE USANDO EVOLUCIÓN ADAPTATIVA EN
LABORATORIO**

JOSÉ MIGUEL GÓMEZ MORENO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2014

**MEJORAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES EN
SACCHAROMYCES CEREVISIAE USANDO EVOLUCIÓN ADAPTATIVA EN
LABORATORIO**

JOSÉ MIGUEL GÓMEZ MORENO

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
Ingeniero Químico**

Directores

Ph. D. KATY C. KAO

Ingeniera Químico

Ph. D. LUIS H. REYES

Ingeniero Químico

Ph. D. VIVIANA SÁNCHEZ TORRES

Ingeniera Químico

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2014

*A mis padres que siempre estuvieron a mi lado, por brindarme su apoyo
incondicional y amor*

A mi hermano, Juan David, por ser mi apoyo y amigo en todos los momentos

*A Irmis, gracias por alegrarme la vida, ser mi compañía y enseñarme que todo en
la vida es posible*

*A mis compañeros durante este proceso, gracias por su sincera amistad y
compañía*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Doctora Katy C. Kao, profesora de Texas A&M University, por brindarme la oportunidad de trabajar con su grupo de investigación para realizar mi proyecto de investigación y además motivarme en la investigación en el área de la ingeniera genética.

Al Doctor Luis H. Reyes por darme su apoyo y acompañamiento diario durante los experimentos de este proyecto.

A la Doctora Viviana Sánchez por ayudarme durante la realización de este proyecto y su interés en el mismo.

A Irmis Osorio, por motivarme en la realización de la pasantía de investigación para hacer este proyecto.

A Carmen Helena Osorio por ser una ayuda incondicional durante mi estadía en College Station, Estados Unidos.

A mis profesores por guiar este proceso de formación y dedicar su tiempo para la enseñanza.

A la Universidad Industrial de Santander por brindarme el espacio para generar pensamiento crítico, adquirir los conocimientos de la Ingeniería Química y darme la oportunidad de vivir experiencias inolvidables.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	14
1. MARCO TEÓRICO	16
1.1. Carotenoides.....	16
1.2. Producción de carotenoides con <i>S. cerevisiae</i>	18
1.3. Evolución adaptativa de laboratorio	19
1.4. Definiciones	20
2. METODOLOGÍA	22
2.1. Cepas, plásmidos y condiciones de crecimiento.....	22
2.2. Generación del productor de carotenoides	22
2.3. Eliminación de <i>ctt1</i> catalasa.....	23
2.4. Experimento de evolución adaptativa	23
2.5. Cuantificación de carotenoides	24
2.6. Selección de mutantes individuales	25
2.7. Choque con peróxido de hidrógeno	25
2.8. Extracción del ARNm	26
2.9. Transcripción inversa, hibridación de microarreglos y análisis de datos.....	26
2.10. PCR en tiempo real (RT-PCR).....	27
2.11. Producción de carotenoides en un biorreactor.....	27
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	28
3.1. Estableciendo el método de presión selectiva para la evolución	28
3.2. Evolución adaptativa	29
3.3. Selección de mutantes individuales	30
3.4. Análisis del transcriptoma de los mutantes individuales	33

3.5. Biorreactor	36
3.6. Comparación con otros laboratorios	38
4. CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFÍA.....	41
CITAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
ANEXOS	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los carotenoides predominantes en los humanos (β -caroteno, β -criptoxantina, α -caroteno, luteína, licopeno y zeaxantina).	17
Figura 2. Ruta metabólica para la producción de β -caroteno.	18
Figura 3. Crecimiento de las cepas YLH2 y YLH3, en presencia de 690 mM de peróxido de hidrógeno y sin presencia de peróxido de hidrógeno.	28
Figura 4. Comparación visual de la cantidad de carotenoides producidos por el ancestro YHL2 y la población P1-24.	29
Figura 5. Mejoramiento observado en la producción de carotenoides durante la evolución adaptativa para la población 1 (P1).	30
Figura 6. Mejoramiento observado en la producción de carotenoides durante la evolución adaptativa para la población 2 (P2).	31
Figura 7. Comparación de la cantidad de β -caroteno producido entre las poblaciones evolucionadas y sus mutantes individuales	32
Figura 8. Porcentaje de supervivencia de algunos mutantes individuales a choques con peróxido de hidrógeno (1.05 M).	33
Figura 9. Ruta metabólica para la biosíntesis de Ergosterol, incluyendo la biosíntesis de carotenoides de <i>X. dendrorhous</i> . Genes con alta regulación se encuentran resaltados.	35
Figura 10. Producción de carotenoides de la cepa SM14, usando un biorreactor de 7 litros.	37
Figura 11. Imágenes del crecimiento de la cepa SM14 con el tiempo.	38
Figura 12. Relación para cuantificar los carotenoides.	52
Figura 13. Relación para cuantificar β -caroteno.	52

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ciclo de los choques con peróxido de hidrógeno durante la evolución. Las poblaciones se nombran de acuerdo a los días que lleva la evolución.....	23
Tabla 2. Comparación en la producción de β -caroteno respecto a otros laboratorios, usando <i>S. cerevisiae</i> modificada.....	38
Tabla 3. Cepas usadas.	46
Tabla 4. Medios de cultivo.	47
Tabla 5. Lista de los mutantes individuales seleccionados de las poblaciones evolucionadas.	54

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. CEPAS USADAS EN LOS EXPERIMENTOS.....	46
ANEXO B. MEDIOS DE CULTIVO	47
ANEXO C. MÉTODO DE ACETATO DE LITIO – HIGH EFFICIENCY TRANSFORMATION PROTOCOL	48
ANEXO D. CURVAS DE CALIBRACIÓN.....	51
ANEXO E. TRANSCRIPCIÓN INVERSA	52
ANEXO F. ESPECIFICACIONES DEL PCR EN TIEMPO REAL.....	53
ANEXO G. MUTANTES INDIVIDUALES SELECCIONADOS DE LAS POBLACIONES EVOLUCIONADAS	54

RESUMEN

TÍTULO: MEJORAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* USANDO EVOLUCIÓN ADAPTATIVA EN LABORATORIO*

AUTOR: José Miguel Gómez Moreno**

PALABRAS CLAVES: carotenoides, evolución adaptativa, presión selectiva, *Saccharomyces cerevisiae*.

DESCRIPCIÓN

Los carotenoides son tetraterpenoides pigmentados producidos naturalmente por diversos organismos incluyendo plantas, bacterias y hongos. Los carotenoides son conocidos como antioxidantes y anticancerígenos los cuales tienen un efecto positivo en la salud humana. El β -caroteno es esencial para los animales superiores debido a que es precursor de la vitamina A. Recientemente se ha explorado la producción de carotenoides usando microorganismos buscando obtener un proceso de menor impacto ambiental y más eficiente que los métodos que emplean síntesis química. La evolución adaptativa de laboratorio usa presión selectiva como fuerza impulsora para seleccionar mutantes con características mejoradas, alternativa que no ha sido explorada para aumentar la producción de carotenoides. Debido a que estos compuestos poseen características antioxidantes, se planteó que usar estrés oxidativo como fuerza impulsora para la evolución incrementaría la producción de carotenoides. El objetivo principal de este proyecto fue incrementar la cantidad de carotenoides producidos por una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* modificada, aplicando evolución adaptativa empleando peróxido de hidrógeno como presión selectiva. La mayor cantidad de β -caroteno producida después del proceso de evolución fue de 18 [mg/g peso seco celular], 3 veces mayor que la producida por su ancestro que tiene una producción de 6 [mg/g peso seco celular] de β -caroteno.

* Trabajo de grado.

* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directores: Ph.D. Katy C. Kao, Ph.D. Luis H. Reyes y Ph.D. Viviana Sánchez Torres.

ABSTRACT

TITLE: IMPROVING CAROTENOIDS PRODUCTION IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* VIA ADAPTIVE LABORATORY EVOLUTION*

AUTHORS: Jose Miguel Gomez Moreno**

KEY WORDS: carotenoids, adaptive evolution, selective pressure, *Saccharomyces cerevisiae*.

DESCRIPTION

Carotenoids are an attractive class of tetraterpenoid pigmented compounds naturally produced by diverse organisms including plants and numerous fungi and bacteria. These compounds are known as antioxidants and anticancer agents that have a potential positive impact on human health. β -carotene is essential for animals because it is a precursor of vitamin A. Recently, production of carotenoids has been amply explored using biosynthetic routes, via metabolic engineering and synthetic biology, using different microbial systems for a more environmentally friendly and efficient production platform. Laboratory adaptive evolution uses a selective pressure as driving force for the selection of mutants with enhanced characteristics. Since carotenoids have antioxidant properties, we hypothesized that oxidative stress can be used as a driving force for the directed evolution of microbial systems for enhanced carotenoids production. The main objective of this work is to improve heterologous carotenoids production by a genetically modified strain of *Saccharomyces cerevisiae* using adaptive evolution with a proper selective pressure (hydrogen peroxide). The highest β -carotene yield achieved after a short-term evolution experiment was 18 [mg/g dry cell weight], corresponding to an increase of 3-fold in comparison with the ancestral strain (6 [mg/g dry cell weight]).

* Research project.

* Faculty of physicochemical engineering. School of Chemical Engineering. Directors: Ph.D. Katy C. Kao, Ph.D. Luis H. Reyes and Ph.D. Viviana Sanchez Torres.

INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son una clase de tetraterpenoide pigmentado producido por diversos organismos incluyendo plantas, algas, hongos y bacterias. Estos compuestos son conocidos como antioxidantes y anticancerígenos los cuales tienen un efecto positivo en la salud humana. El β -caroteno es esencial para los animales superiores debido a que es precursor de la vitamina A. Hoy en día, las industrias producen carotenoides a partir de síntesis química o mediante su extracción de plantas; estos compuestos son utilizados en la industria nutracéutica en la elaboración de suplementos, alimentos fortificados y cosméticos. Recientemente se ha explorado la producción de carotenoides, a través de rutas metabólicas, usando microorganismos para obtener un proceso de menor impacto ambiental y más eficiente.

La evolución adaptativa de laboratorio usa presión selectiva como fuerza impulsora para seleccionar mutantes con características mejoradas, alternativa que no ha sido explorada para aumentar la producción de carotenoides. Debido a que estos compuestos poseen características antioxidantes, se planteó que usar estrés oxidativo como fuerza impulsora para la evolución incrementaría la producción de carotenoides.

El objetivo principal de este proyecto fue incrementar la cantidad de carotenoides producidos por una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, modificada genéticamente para producir carotenoides usando genes de *Xanthophyllomyces dendrorhous*, haciendo uso de la evolución adaptativa estableciendo peróxido de hidrógeno como presión selectiva. Posteriormente, para las cepas mejoradas se realizaron estudios genéticos para determinar el cambio en la expresión de los genes y así determinar las rutas metabólicas que se vieron afectadas en la evolución, también se realizaron experimentos con un biorreactor para analizar el crecimiento de estas cepas productoras de carotenoides.

1. MARCO TEÓRICO

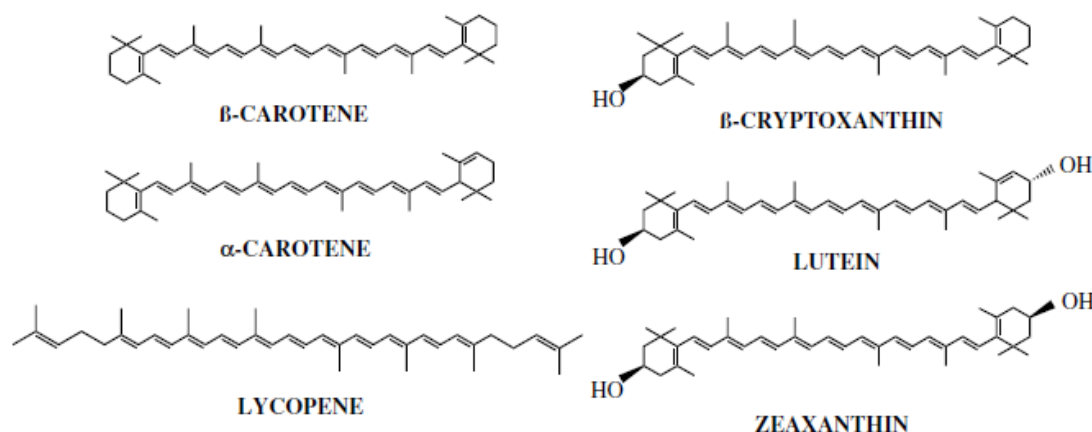
1.1. Carotenoides

Los carotenoides son tetraterpenoides pigmentados sintetizados por plantas, y otros organismos fotosintéticos y no-fotosintéticos como algas, hongos y bacterias. Ellos están presentes, como microcomponentes, en frutas y vegetales y son los responsables por su coloración amarilla, naranja y roja (zanahoria, tomate, papaya, entre otros) [1]. En algunas aves, insectos, peces y crustáceos la presencia de carotenoides es importante para su coloración; sin embargo los animales y humanos no son capaces de sintetizar estos compuestos y dependen de su suministro dietario. Estos son usados como pigmentos para alimentos de consumo humano y como constituyentes en vitaminas y suplementos dietarios [2].

Según investigaciones, los carotenoides son los responsables de las propiedades benéficas de las frutas y vegetales previniendo enfermedades humanas incluyendo las cardiovasculares, cáncer y otras enfermedades crónicas [3], [4], además estos representan una fuente importante de vitamina A, debido a que son precursores de esta. En la actualidad la mayoría de investigaciones relacionadas con carotenoides están enfocadas hacia las propiedades antioxidantes de estos [3].

La mayoría de los carotenoides están compuestos por una cadena central de carbono alternando enlaces simples y dobles, con diferentes grupos cíclicos o acíclicos al final de la cadena (Figura 1). Existen más de 600 tipos de carotenoides y sus funciones bioquímicas están determinadas por la conjugación de los enlaces dobles presentes, además estos son los responsables del color [5]. Los carotenoides mostrados en la Figura 1 representan la mayoría de los carotenoides en la dieta humana.

Figura 1. Estructura de los carotenoides predominantes en los humanos (β -caroteno, β -criptoxantina, α -caroteno, luteína, licopeno y zeaxantina).



Fuente: N. I. Krinsky, E. J. Johnson.

La síntesis química de carotenoides, específicamente el β -caroteno, se inició en 1961 [7]. Actualmente la síntesis química ha logrado desarrollar varios tipos de carotenoides y estos procesos tienen como ventajas carotenoides de alta pureza y calidad, y costos de producción bajos. Sin embargo, existen algunas desventajas como: complejidad para sintetizar nuevos tipos de carotenoides (nuevas rutas químicas) y además producción de estereoisómeros que pueden ser indeseados para el consumo público y producir efectos secundarios negativos [2].

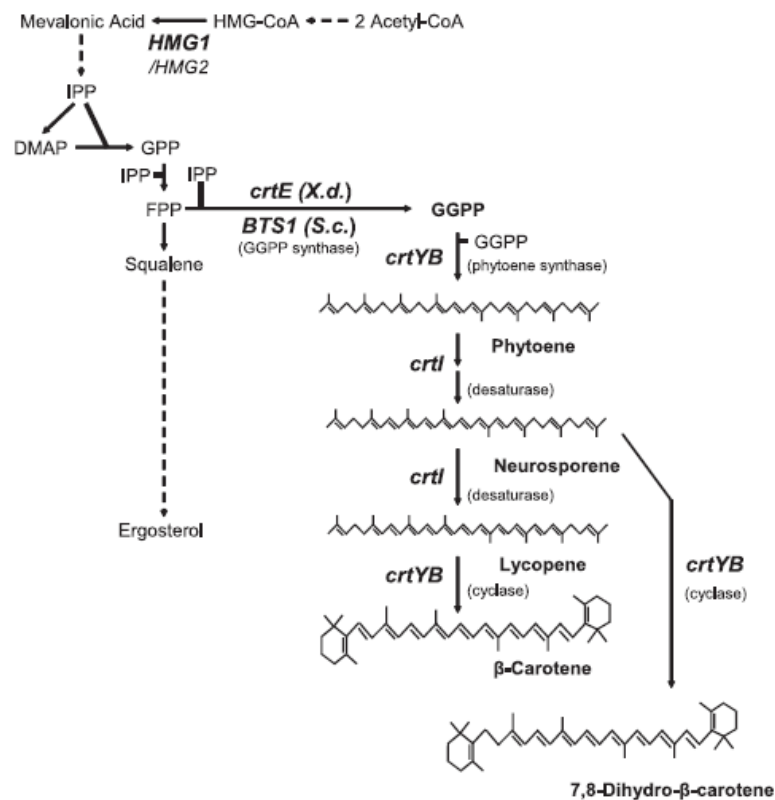
Hoy en día, se están realizando investigaciones que buscan mejorar el sistema de producción de carotenoides, usando técnicas modernas de bioprocesos y la tecnología del ADN recombinante [2], con diferentes microorganismos como *Dunaliella salina* (micro alga) [8], *Dunaliella bardawil* (micro alga) [9], *Blakeslea trispora* (hongo) [10], *Rhodotlura glutinis* (hongo) [11], *Rhodotlura graminis* (hongo) [12], *Sporobolomyces roseus* (hongo) [13], *Sporidiobolus salmonicolor* (hongo) [14], *Saccharomyces cerevisiae* (hongo) [15], *Flavobacterium multivorum* (bacteria) [16], *Halomonas elongata* (bacteria) [17], *Sphingomonas paucimobilis* (bacteria) [18] y *Escherichia coli* (bacteria) [19]. El microorganismo más avanzado

en las investigaciones es *Dunaliella salina*, debido a que ya existe producción a escala industrial de carotenoides (específicamente β -caroteno) mediante esta especie de micro alga en Australia, Estados Unidos e Israel [20].

1.2. Producción de carotenoides con *S. cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es la levadura más utilizada en biotecnología en todo el mundo, debido en gran parte a su fisiología única y a su importante rol en fermentaciones de alimentos y otros procesos industriales. Estudios de clasificación, filogenia, fisiología, y ecología de los *Saccharomyces* han proporcionado valiosos avances y oportunidades para aplicaciones industriales y como organismo modelo [21]–[23].

Figura 2. Ruta metabólica para la producción de β -caroteno.



Fuente: R. Verwaal *et al.*

Debido a las características únicas de este microorganismo y a la facilidad para su manipulación genética, este ha sido modificado genéticamente usando la tecnología de ADN recombinante, integrando genes de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (productor de carotenoides) que le dan la cualidad de producir carotenoides. Los genes integrados para la producción de carotenoides son *ctrYB*, *ctrl* y *ctrE** [15]. En la Figura 2 se puede observar la ruta metabólica para la producción de carotenoides (fitoeno, neurosporeno, 7-8-Dihidro- β -caroteno, licopeno y β -caroteno) en la cual se puede ver la influencia de los genes integrados. Como se puede notar el β -caroteno es el producto final de la ruta y por tanto es el producto principal.

1.3. Evolución adaptativa de laboratorio

La evolución adaptativa de laboratorio es un método de gran alcance para mejorar características de cepas comunes en la industria (ej., tolerancia a inhibidores, consumo de sustratos, condiciones de crecimiento) sin la necesidad de conocer los mecanismos genéticos. Este proceso implica la propagación de una cepa microbiana por cientos de generaciones bajo el efecto de una presión selectiva deseada, esta presión selectiva debe estar relacionada directamente con la característica que se quiere mejorar en la cepa. Generalmente los mutantes con velocidades de crecimiento mejoradas, debido a tolerancia incrementada o a rápido consumo de los nutrientes limitantes, se expandirán en la población con el tiempo [24].

Comúnmente los experimentos de evolución se realizan transfiriendo por lotes la cepa o usando biorreactores continuos. La transferencia por lotes tiene la ventaja de ser un método fácil de configurar y utilizar, pero tiene la desventaja de que con cada transferencia se están seleccionando solo una pequeña parte de la población evolucionada. Los biorreactores continuos necesitan una inversión inicial más alta, pero evitan el problema de seleccionar solo una parte de la población durante la evolución. Aunque cualquier microorganismo cultivable puede ser usado en la

evolución, los más utilizados son *E. coli* y *S. cerevisiae* debido a su amplia caracterización [24].

1.4. Definiciones

ARNm (Ácido ribonucleico mensajero): lleva la información sobre la secuencia de aminoácidos de la proteína desde el ADN hasta el ribosoma, lugar donde se sintetizan las proteínas de la célula.

Auxotrófico: un microorganismo es auxótrofo cuando solo es capaz de crecer en presencia de alguna sustancia específica, que no es capaz de sintetizar y la cepa la necesita para su crecimiento.

cADN (ADN complementario): ADN sintetizado a partir de ARNm.

Evolución: cambio de los organismos en el tiempo por factores ambientales o inducidos.

Genes: segmentos específicos de ADN que controlan las estructuras y funciones celulares, es la unidad funcional de la herencia.

Hibridación de microarreglos: es una técnica mediante la cual es posible identificar y analizar alteraciones genéticas del tipo ganancia o pérdida de material genético en una muestra de ADN en comparación con una muestra de referencia.

HPLC (Cromatografía líquida de alta eficacia): es una técnica de laboratorio utilizada para separar, identificar y cuantificar las moléculas de mezclas de componentes.

Iniciador: es una cadena de ácido nucleico que sirve como punto de partida para una replicación del ADN.

Microarreglos o Chip de ADN: es una superficie sólida a la cual se une una colección de fragmentos de ADN. Estos se usan para analizar la expresión de los genes de una cepa respecto a otra.

OD (Densidad óptica): es la absorbancia por unidad de longitud. Esta medición es importante para determinar la cantidad de células en un cultivo o la fase en que se encuentran.

PCR (Reacción en cadena de la polimerasa): es una técnica cuyo objetivo es amplificar un fragmento de ADN particular para obtener un gran número de copias de este, usando una polimerasa termoestable y dos iniciadores.

Plásmido: son moléculas de ADN extra cromosómico circular o lineal que se replican y transcriben independiente del ADN cromosómico. Generalmente codifican genes que pueden conferir características especiales a un microorganismo.

Técnicas de recombinación: procedimientos utilizados para unir segmentos de ADN en un sistema libre células. Una molécula de ADN recombinante puede introducirse dentro de una célula para ser replicado.

Transformación: proceso que permite introducir a células vivas moléculas de ADN.

Transcripción inversa: consiste en obtener una copia sencilla de ADN (cADN) a partir de ARNm. Este proceso es importante para poder observar la transcripción celular de la cepa.

Vector: es un plásmido que es usado para integrarlo a una cepa.

2. METODOLOGÍA

2.1. Cepas, plásmidos y condiciones de crecimiento

S. cerevisiae GSY1136 [25] fue escogida como la plataforma para desarrollar el experimento, esta cepa no produce carotenoides. El vector YIplac211YB/I/E* [15] fue usado para introducir los genes *ctrYB*, *ctrl* y *ctrE** en la cepa. Todas las cepas utilizadas están en el ANEXO A.

S. cerevisiae se cultivó a 30°C con agitación a 60 rpm por 72 horas en YPD usando tubos de ensayo de 12 ml. Para la selección de mutantes y otros análisis se usaron cajas de Petri con medio YPD agar. Para almacenamiento a largo plazo las células fueron guardadas en tubos criogénicos con 17% de glicerol a -80°C. En la ANEXO B se encuentran los medios de cultivo con sus componentes y concentraciones.

2.2. Generación del productor de carotenoides

Este proceso se llevó a cabo para crear una cepa de *S. cerevisiae* productora de carotenoides. El gen *ura3* fue quitado del mutante ancestro GSY1136 usando ácido 5-fluoroorótico para crear YLH0 auxotrófico para uracilo y poder utilizar el uracilo para la selección. La transformación del vector YIplac211YB/I/E* (productor de carotenoides) en YLH0 fue llevada a cabo usando el método de acetato de litio (ANEXO C) [26], con el uracilo como marcador para la integración. De esta transformación se generó YLH1. Las células transformadas se seleccionaron con YNB + 2% D-glucosa (p/v), incubándolas a 30°C por 3 días, y verificado usando amplificación con PCR.

2.3. Eliminación de *ctt1* catalasa

Este procedimiento se llevó a cabo para eliminar el gen *ctt1*, que le da facultad al microorganismo de protegerse de daños oxidativos producidos por el peróxido de hidrógeno. La catalasa *ctt1* fue suprimida del genotipo usando recombinación homóloga con el gen *neo*. Los iniciadores usados para la amplificación, fueron: delantero: 5'-TTA AAA AAA TCC TTC TCT TGT CTC ATG CCA ATA AGA TCA ATC AGC TCA GCT TCA CAA ATG CGG ATC CCC GGG TTA ATT AA-3' y reverso: 5'-TAT AAT TAC GAA TAA TTA TGA ATA AAT AGT GCT GCC TTA ATT GGC ACT TGC AAT GGA CCA GAA TTC GAG CTC GTT TAA AC-3'. El plásmido pFA6a-kanMX6 [27] fue usado como ADN molde para el gen *neo*. La transformación del gen recombinado se realizó usando el procedimiento de acetato de etilo (ANEXO C) [26]. Las células recombinadas fueron seleccionadas usando YPD + geneticina (G418), incubado a 30°C por 2 días, verificado mediante amplificación con PCR. Los iniciadores utilizados para la verificación fueron: delantero 5'-ATT CGA CGT AGC CTG GAC AC-3' y reverso 5'-TAA TCG TTG AGT TCA TGC CG-3'. Como resultado se obtuvo la cepa YLH2 (ANEXO A).

2.4. Experimento de evolución adaptativa

Este experimento fue realizado usando 3 mL de medio YPD en tubos de ensayo de 12 mL a 30°C con agitación de 60 rpm.

Dos colonias independientes de YLH2 (ancestro) fueron inoculadas para formar dos poblaciones (P1 y P2) para la evolución. Cada 24 horas el 7% del volumen del cultivo fue transferido en medio fresco.

Choques con peróxido de hidrógeno fueron realizados en dos esquemas diferentes, que pueden ser observados en la Tabla 1. Los choques consisten en transferir 500 µL del cultivo en un tubo de microcentrífuga y agregarle peróxido de hidrogeno durante 30 minutos. Luego 200 µL del cultivo chocado fueron

inoculados en 3 mL de medio YPD fresco e incubados, dependiendo de la fase se realizaron choques con peróxido de hidrógeno cada 24 (fase 1) o 48 (fase 2) horas.

Tabla 1. Ciclo de los choques con peróxido de hidrógeno durante la evolución. Las poblaciones se nombran de acuerdo a los días que lleva la evolución (ej. P1-07 es la población 1 en el séptimo día de evolución).

Esquema de presión selectiva	Poblaciones	Luego de 24 horas de cultivo	Luego de 48 horas de cultivo
Fase 1	P1: P1-01 a P1-07 P2: P2-01 a P2-15	Tratamiento con choque durante 30 minutos	Tratamiento con choque durante 30 minutos
Fase 2	P1: P1-08 a P1-34 P2: P2-16 a P2-40	Tratamiento con choque durante 30 minutos	Fase de recuperación

2.5. Cuantificación de carotenoides

Este experimento se realizó para cuantificar la cantidad de carotenoides y β -caroteno producido por las cepas. Para la cuantificación de carotenoides de las poblaciones evolucionadas, 3 mL de medio YPD fueron inoculados con cada población e incubados a 30 °C por 72 horas. 250 μ L del cultivo fueron transferidos a un tubo de 2 mL y centrifugados durante 2 min a 12,000 rpm. El sobrenadante fue retirado. La lisis de las células secas se realizó usando aproximadamente 250 μ L de perlas de vidrio de 425-600 μ m (Sigma) y 1 mL de dodecano para extraer los carotenoides, utilizando un Disruptor Genie Cell Disruptor (Scientific Industries) (Dispositivo que genera movimiento para hacer la ruptura celular). Las muestras fueron tratadas dos veces en el disruptor por 6 minutos para garantizar la ruptura de las células y recuperación de los carotenoides. Los restos celulares y perlas de vidrio fueron separados del sobrenadante centrifugando por 2 minutos a 15,000 rpm. El total de carotenoides fue cuantificado midiendo la absorbancia desde 350 nm hasta 600 nm usando un espectrofotómetro lector de microplacas (TECAN

Infinite® M200). El total relativo de carotenoides producidos se determinó calculando el área bajo la curva del espectro, usando el ancestro YLH2 como referencia (ANEXO A). La cuantificación de β -caroteno se realizó con la absorción a 454 nm [15]. Una curva estándar para la cuantificación de β -caroteno se generó usando β -caroteno disponible comercialmente (Enzo Life Sciences) a 454 nm. Para garantizar significancia en los resultados se realizaron 3 réplicas para cada cuantificación. En el ANEXO D se pueden observar las gráficas que relacionan la cantidad de carotenoides y β -caroteno con la absorbancia.

2.6. Selección de mutantes individuales

El objetivo de esta selección fue buscar mutantes individuales que produzcan más carotenoides que su población. Al final del experimento de evolución se identificaron las poblaciones con mejor producción de carotenoides. Las poblaciones seleccionadas fueron inoculadas en cajas de Petri con YPD agar e incubadas durante 48 horas. Luego se escogieron tres colonias individuales, de las poblaciones inoculadas, en base a su color rojo y el tamaño normal, comparado con el ancestro YLH2. Cada colonia escogida fue inoculada en 3 mL de medio YPD e incubada durante 72 horas para realizar cuantificación de carotenoides. El mejor productor de carotenoides de cada población fue seleccionado para análisis posteriores.

2.7. Choque con peróxido de hidrógeno

Este experimento se realizó para observar como cambiaba la resistencia de los mutantes al peróxido de hidrógeno (oxidación) respecto al avance de la evolución. Cada mutante individual fue inoculado en 3 mL de medio YPD e incubado durante 72 horas. Las muestras fueron normalizadas a una densidad óptica de ~ 2.0 . El cultivo (500 μ L) fue transferido a un tubo de microcentrífuga y expuesto a 1.05 M de peróxido de hidrógeno durante 30 minutos. Las muestras fueron diluidas,

puestas en cajas de Petri con YPD agar e incubadas por 48 horas para contar las colonias. Una réplica sin choque fue hecha para realizar comparaciones.

2.8. Extracción del ARNm

La extracción del ARNm es necesaria para poder generar el cADN imprescindible para la hibridación de microarreglos. Los mutantes individuales fueron inoculados en 25 mL de medio YPD en un matraz de 125 mL con una densidad óptica de ~0.05. Las células fueron recogidas a finales de la fase exponencial (densidad óptica ~4.0), usando filtración con embudos filtrantes analíticos (Nalgene), luego se resuspendieron las células en 10 mL de RNA*later* (Sigma) (RNA*later* conserva el material genético intacto para ser usado cuando sea necesario) y fueron guardados a -80°C para análisis posteriores. Se realizaron 3 réplicas biológicas para cada cepa.

2.9. Transcripción inversa, hibridación de microarreglos y análisis de datos

Este proceso se realizó para identificar y analizar las alteraciones genéticas de los mutantes individuales comparados con el ancestro. En el ANEXO E se pueden ver las especificaciones de la transcripción inversa. El programa Microarray Data Analysis System (MIDAS) fue usado para normalizar la información usando el algoritmo LOWESS [28]. La expresión de los genes fue identificada usando el método de rango de productos con un valor-p crítico < 0.05. El programa para análisis de microarreglos MeV (TM4) [29] fue usado para analizar la agrupación y análisis de perfil de expresiones. La base de datos de genoma *Saccharomyces* (SGD) [30] fue usada para analizar los datos basados en la ontología de los genes. Para un análisis más avanzado de funciones biológicas enriquecidas se utilizó Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) [31], [32].

2.10. PCR en tiempo real (RT-PCR)

El RT-PCR permite amplificar y simultáneamente cuantificar la cantidad de ADN amplificado, con esta prueba se analizó la expresión de los genes que activan la ruta metabólica de la producción de carotenoides. La extracción y transcripción inversa del ARNm de las muestras de estudio fue realizado como se describió en las secciones anteriores. El RT-PCR se realizó con el cADN como ADN molde, utilizando el sistema de detección CFX384 Real-Time PCR (Bio-Rad Laboratories, CA). Más detalles ver ANEXO F.

2.11. Producción de carotenoides en un biorreactor

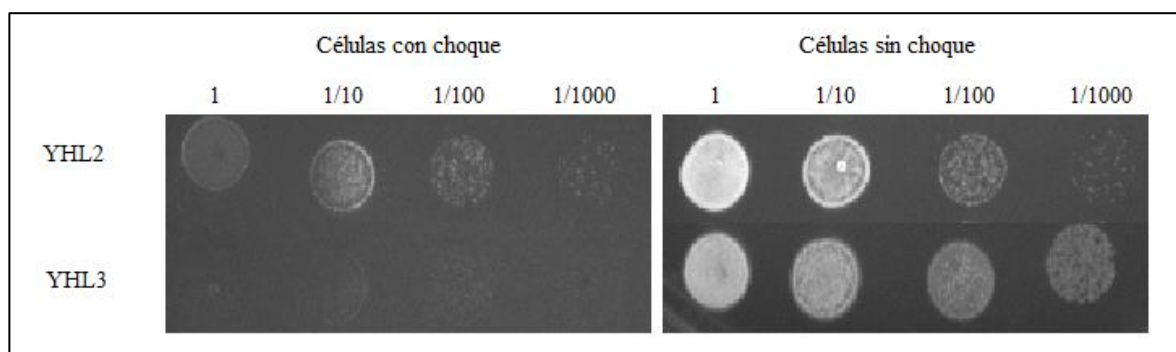
Este estudio se realizó para observar el comportamiento en la producción de carotenoides a escala mayor. Los cultivos para la fermentación fueron preparados de la siguiente manera: muestras de los mutantes individuales se inocularon en 3 mL de medio YNB (20 g/L glucosa) e incubados a 30°C por 24 horas con agitación constante de 250 rpm. El contenido de este cultivo fue utilizado para inocular 50 mL de medio YNB (20g/L glucosa) e incubado en las mismas condiciones durante 24 horas. Los 50 mL de cultivo fueron usados para inocular un biorreactor de vidrio autoclavable de 7 L (Applikon®) con 3 L de YNB (20g/L glucosa). La temperatura fue fijada a 30°C y el pH se mantuvo en 5.5 adicionando 2N HCl o 2N NaOH según la necesidad, además se usó agitación a 300 rpm. Todos los experimentos fueron realizados en modo discontinuo hasta que el etanol producido fuera consumido.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. Estableciendo el método de presión selectiva para la evolución

Basados en el conocimiento de las propiedades antioxidantes de los carotenoides [33], se planteó que la cepa productora de carotenoides va a tener una ventaja de crecimiento, respecto a una no productora de carotenoides, en la presencia de estrés oxidativo (específicamente peróxido de hidrógeno). Como *S. cerevisiae* produce catalasas para la degradación del peróxido de hidrógeno, primero se eliminó la catalasa citosólica, codificada por *ctt1*, de una cepa productora de carotenoides. La eliminación del gen *ctt1* resultó en una apreciable disminución en la producción de carotenoides (aproximadamente 43%). Sin embargo, la producción de carotenoides permitió a las células (YLH2) crecer más ante la presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno, con respecto a la cepa YLH3 (no productora de carotenoides, ANEXO A); en la ausencia del gen *ctt1* para las dos cepas (Figura 3). El efecto protector de los carotenoides en *S. cerevisiae* ya se habían observado previamente en otras investigaciones [34], [35].

Figura 3. Crecimiento de las cepas YLH2 y YLH3, en presencia de 690 mM de peróxido de hidrógeno y sin presencia de peróxido de hidrógeno.



3.2. Evolución adaptativa

La cantidad total de carotenoides producidos se incrementó rápidamente después del inicio de la evolución adaptativa usando peróxido de hidrogeno, durante la Fase 1 (Tabla 1). Se alcanzó una producción de 12 [mg/g peso seco celular] de β -caroteno y se observó un aumento en la coloración de los cultivos como se ve en la Figura 4. Este mejoramiento corresponde a un incremento del 100% respecto a la cantidad de β -caroteno producido por la población ancestral (6 [mg/g peso seco celular]). Desafortunadamente la Fase 2 de la evolución no resultó en un incremento adicional en la cantidad promedio de carotenoides producidos, debido a razones desconocidas.

Figura 4. Comparación visual de la cantidad de carotenoides producidos por el ancestro YHL2 y la población P1-24.



3.3. Selección de mutantes individuales

Finalizada la evolución, se seleccionaron algunas poblaciones, de P1 y P2, para buscar mutantes individuales con mayor producción de carotenoides. Las poblaciones fueron escogidas basados en los picos observados en la producción de β -caroteno para cada una, ver Figura 5 y Figura 6. Detalles de los mutantes individuales se encuentran en el ANEXO G. El cambio en la concentración de los choques con peróxido de hidrógeno durante la evolución se realizó para observar cómo se comportaban los microorganismos ante concentraciones más altas, debido a que se observó que la concentración afectaba el desarrollo de la evolución se continuo con la concentración inicial.

Figura 5. Mejoramiento observado en la producción de carotenoides durante la evolución adaptativa para la población 1 (P1). Cantidad promedio de β -caroteno producido (línea negra) y concentración de peróxido de hidrógeno usado en los choques (línea roja). La línea azul representa la cantidad de β -caroteno producido por el ancestro. Las barras de error muestran la desviación estándar para 3 mediciones biológicas.

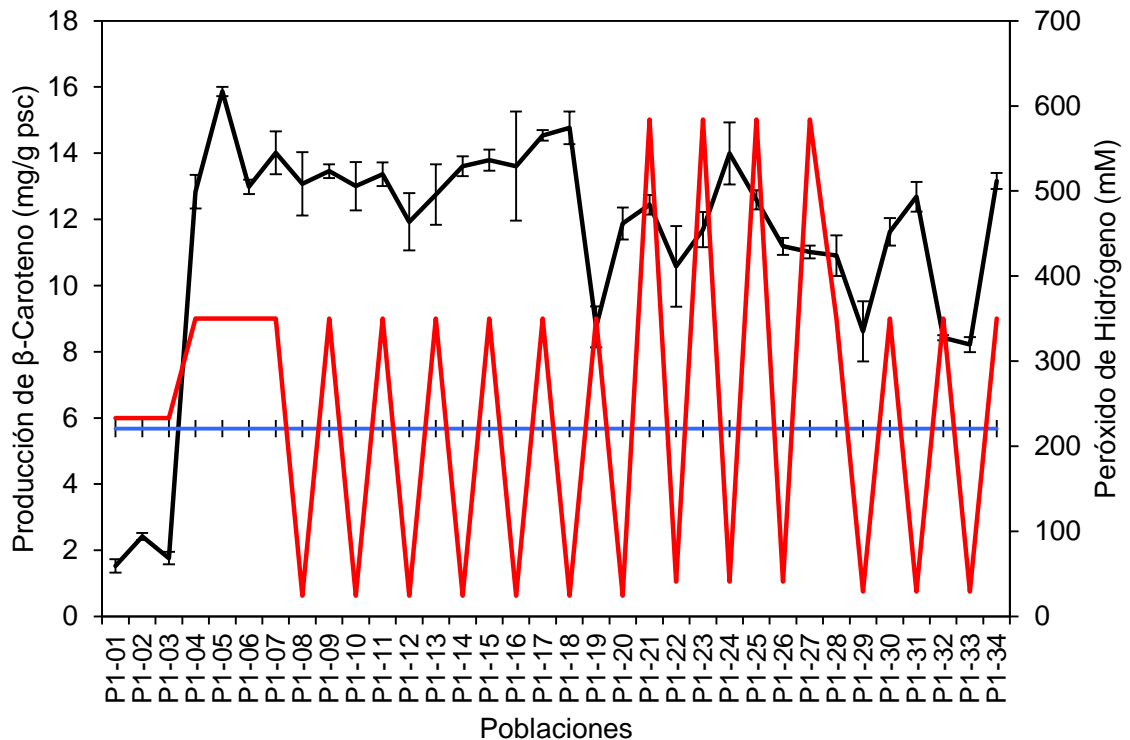
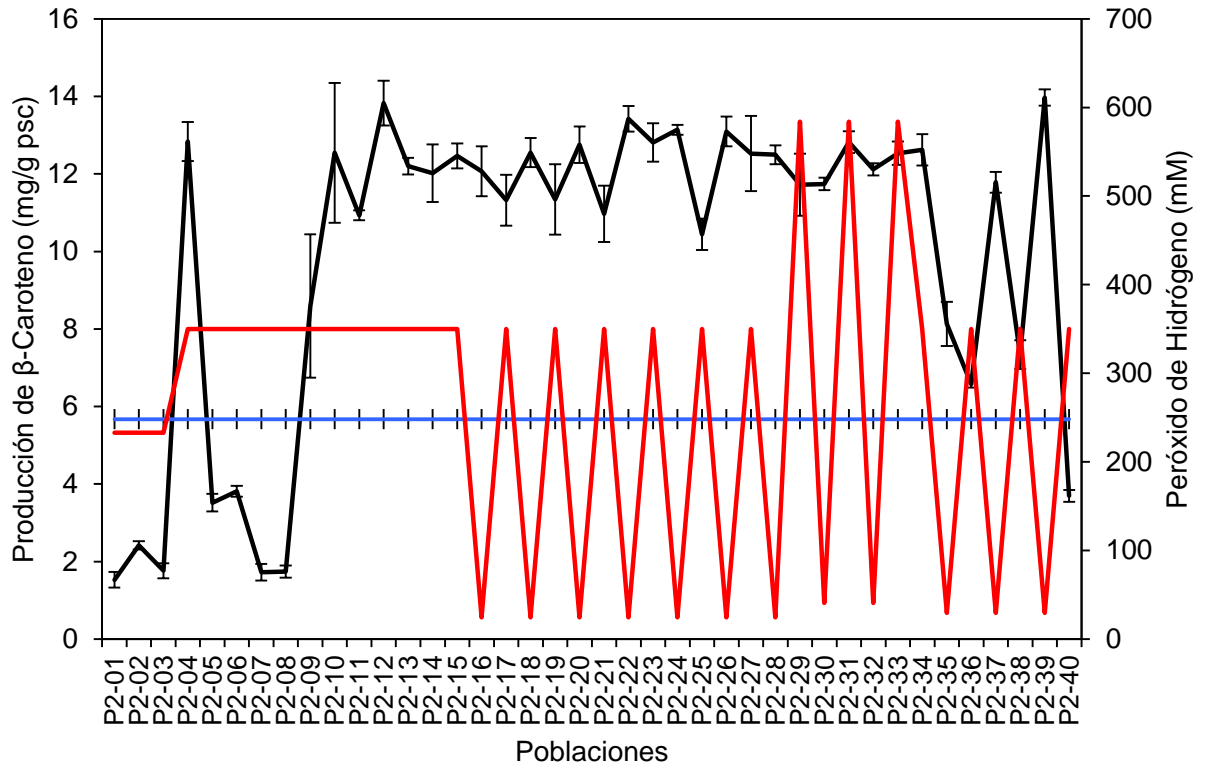
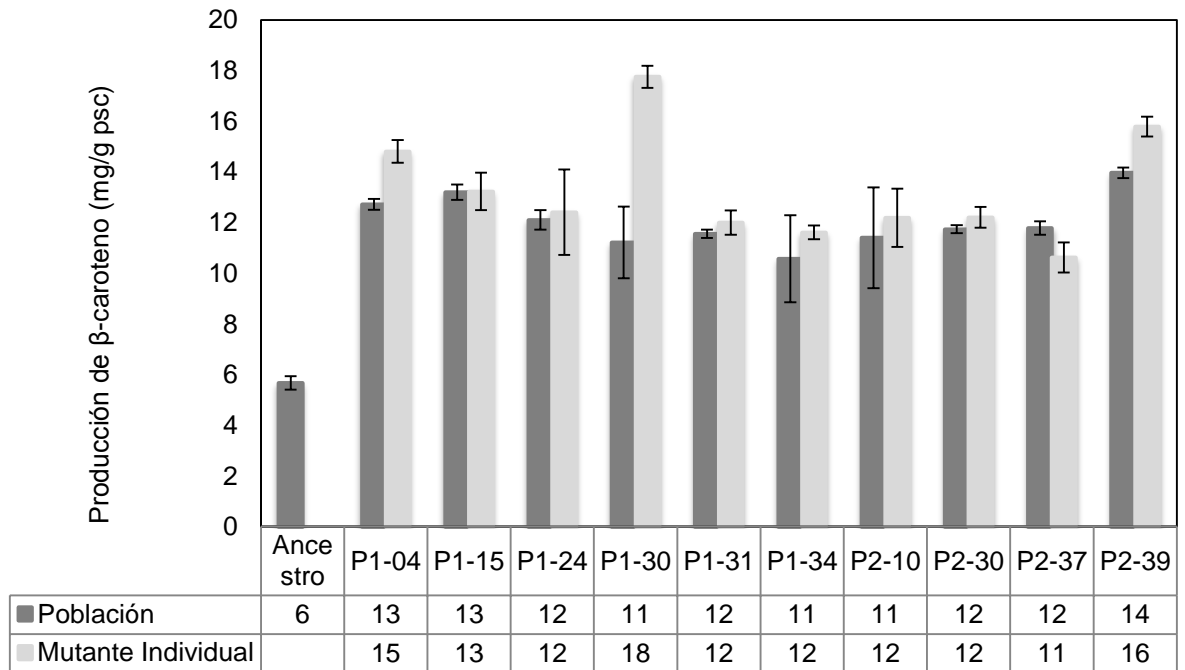


Figura 6. Mejoramiento observado en la producción de carotenoides durante la evolución adaptativa para la población 2 (P2). Cantidad promedio de β -caroteno producido (línea negra) y concentración de peróxido de hidrógeno usado en los choques (línea roja). La línea azul representa la cantidad de β -caroteno producido por el ancestro. Las barras de error muestran la desviación estándar para 3 mediciones biológicas.



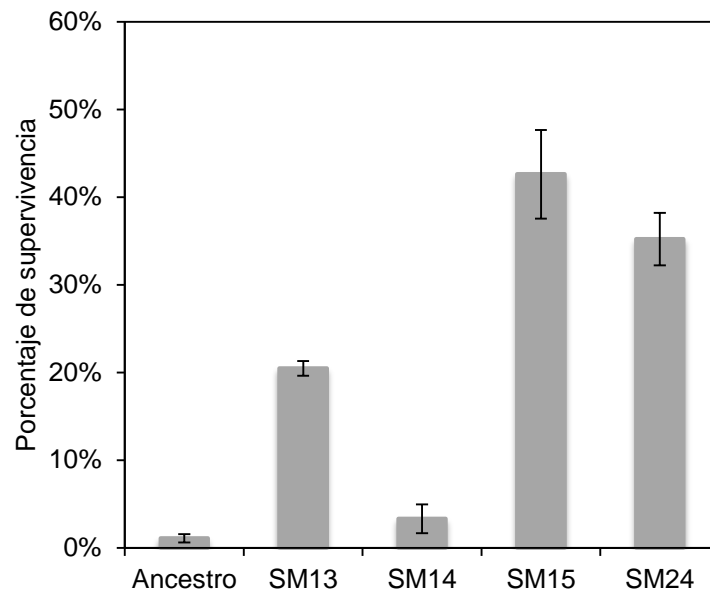
La cantidad de β -caroteno producido por los mutantes individuales fue cuantificada y comparada con las poblaciones de las que fueron seleccionados, los resultados se encuentran resumidos en la Figura 7. En general, la cantidad de β -caroteno producida por los mutantes individuales fue significativamente mayor que la cantidad promedio producida por las poblaciones de las que fueron seleccionados. El mutante individual SM14 fue el mayor productor con aproximadamente 200% más β -caroteno (18 ± 1 [mg/g peso seco celular]) comparado con el ancestro YLH2 (6 ± 1 [mg/g peso seco celular]).

Figura 7. Comparación de la cantidad de β -caroteno producido entre las poblaciones evolucionadas (gris oscuro) y sus mutantes individuales (gris claro). Las cantidades mostradas para población y mutante individual son la cantidad de β -caroteno producido de cada uno en miligramos/gramos peso seco celular.



Los choques con peróxido de hidrógeno, usando 1.05 M H_2O_2 , fueron realizados para determinar cuáles de los mutantes había incrementado su capacidad de sobrevivir en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno. En la Figura 8 se puede observar que todos los mutantes individuales tratados incrementaron el porcentaje de supervivencia. En la sección 2.7 se puede observar los detalles de este experimento.

Figura 8. Porcentaje de supervivencia de algunos mutantes individuales a choques con peróxido de hidrógeno (1.05 M).



3.4. Análisis del transcriptoma de los mutantes individuales

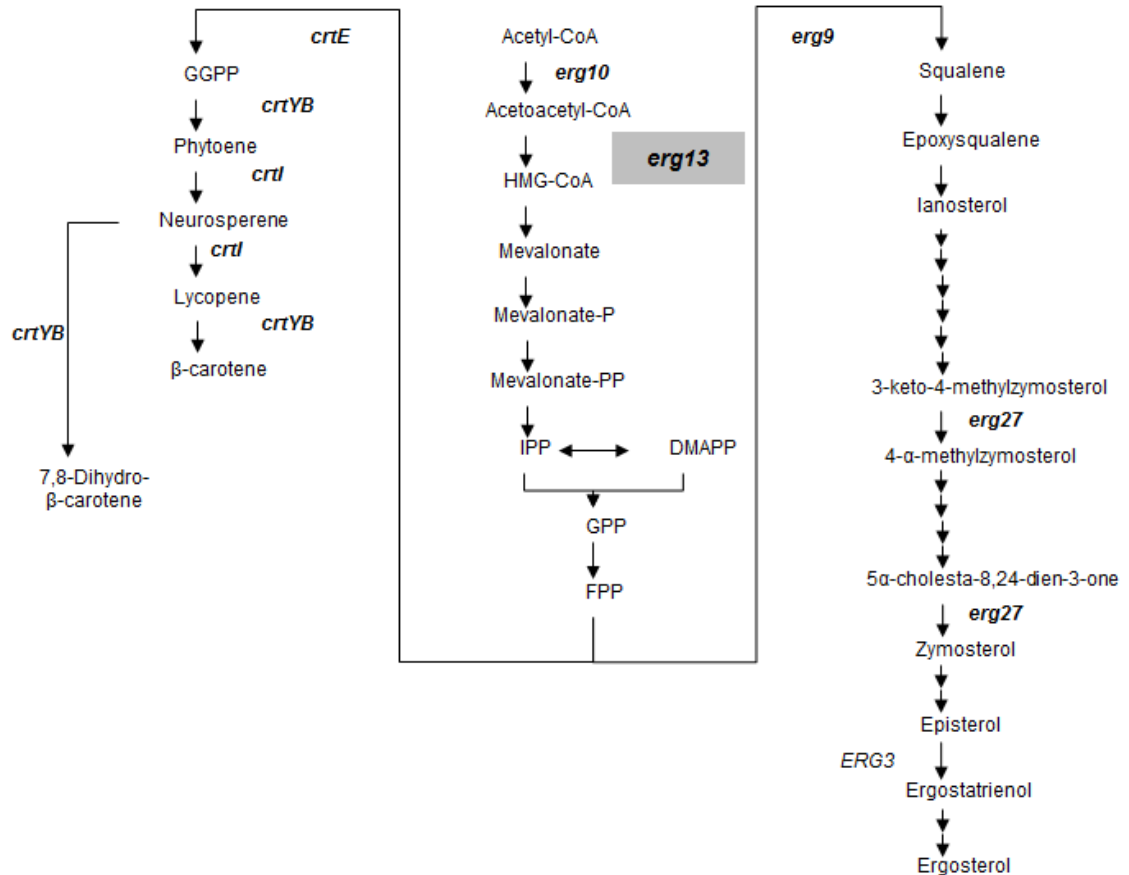
Los cuatro mejores productores de carotenoides (SM12, SM13, SM14 y SM22) fueron seleccionados para realizarles análisis molecular con el objetivo de identificar los mecanismos de las cepas que incrementaron la producción de carotenoides. El incremento en la expresión de los genes relacionados con la producción de carotenoides fue estudiado comparando los mutantes individuales y el ancestro YHL2; se usó RT-PCR (sección 2.10) para analizar la expresión de los genes *ctrYB*, *ctrl* y *ctrE** (genes de *Xanthophyllomyces dendrorhous*). Los resultados demostraron que no hay diferencias de expresión en los genes *ctrYB*, *ctrl* y *ctrE** entre los mutantes individuales y la cepa YLH2. Este resultado permite ver que hay una ruta diferente para el aumento en la producción de carotenoides.

Usando hibridación de microarreglos, el transcriptoma de los mutantes individuales seleccionados SM12, SM13, SM14 y SM22 fue comparado con la cepa YHL2, tomándola como referencia. Los genes expresados de manera significativa (valor-

p < 0.05) fueron analizados para identificar los potenciales mecanismos que incrementaron la producción de carotenoides; en promedio los mutantes individuales tuvieron 107 genes con alta regulación y 97 con baja regulación respecto al ancestro YHL2.

Se encontró que la expresión en los mutantes analizados (SM12, SM13, SM14 y SM22) es altamente similar. Estos poseen en común aproximadamente el 50% de los genes perturbados (59 genes), lo que sugiere que los mecanismos de aumento en la producción de carotenoides son similares entre los mutantes. El análisis de los genes perturbados sugiere que el aumento en la producción de carotenoides en estas cepas está relacionado con un flujo metabólico canalizado hacia la biosíntesis de lípidos, específicamente la ruta metabólica del mevalonato, incrementando la producción de carotenoides debido a la acumulación de pirofosfato de isopentenilo (IPP). Alta regulación de *erg13* sugiere un incremento en el flujo metabólico por la ruta del mevalonato, lo que lleva a un eventual aumento en la producción de carotenoides. En la Figura 9 se puede observar la ubicación del gen *erg13* en la ruta metabólica.

Figura 9. Ruta metabólica para la biosíntesis de Ergosterol, incluyendo la biosíntesis de carotenoides de *X. dendrorhous*. Genes con alta regulación se encuentran resaltados.



Fuente: E. I. Wilding *et al.*

Varios genes relacionados con la respuesta ante el estrés oxidativo fueron identificados con perturbaciones. Los genes, *aad6* (en SM12, SM13 Y SM22), *mxr2* (en SM12, SM13, SM14 y SM22), *uga1* (en SM22) y *rox1* (en SM12), involucrados en la respuesta ante estrés oxidativo poseen baja regulación en los mutantes. Por otra parte, los genes *gnd1* (en SM14), *sko1* (en SM12) y *hor2* (en SM14 y SM22), cuyas expresiones habían decrecido bajo estrés oxidativo en otras investigaciones [37]–[39], se encontraron con alta expresión en los mutantes del presente trabajo. El resultado sugiere que el incremento en la producción de carotenoides alivia el estrés oxidativo en la célula.

3.5. Biorreactor

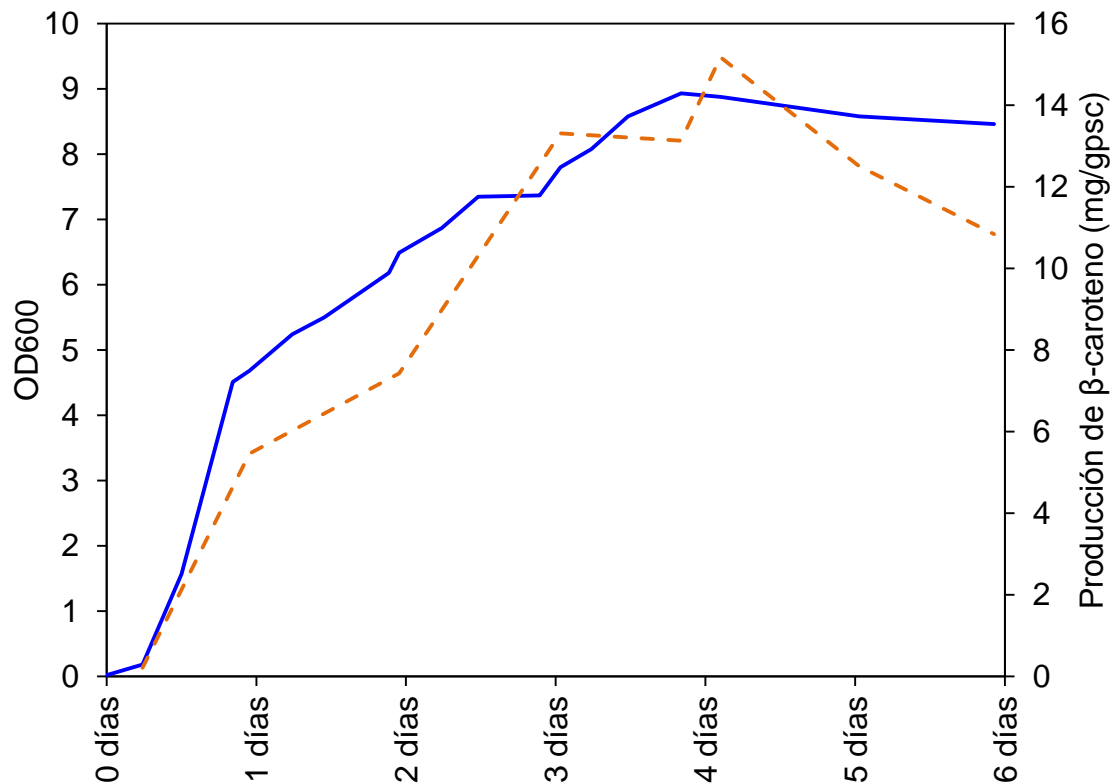
Se realizaron experimentos con un biorreactor de 7 L para maximizar la producción de carotenoides. La cepa SM14 fue seleccionada para este proceso debido a que fue la mejor productora de carotenoides. La utilización de YNB se debe a que al usar YPD en el biorreactor se produce espuma que afecta el crecimiento celular y las condiciones del proceso.

En este estudio inicial, el biorreactor fue suplido con aireación de 6.0 L/min con el objetivo de mantener el oxígeno disuelto en por lo menos 50%. Luego de 24 horas, la cantidad de glucosa en el medio fue consumida (verificado con HPLC) y la cantidad de β -caroteno producido en ese punto fue de 6 mg/g peso seco celular. 24 horas después, el etanol acumulado en el caldo de cultivo comenzó a ser consumido (como fuente de carbono), y la producción neta de β -caroteno se incrementó notablemente, alcanzando 15 mg/g peso seco celular, como se muestra en la Figura 10. Para verificar que el uso de etanol como fuente de carbono incrementa la productividad de β -caroteno comparado con la glucosa, se realizaron dos experimentos discontinuos usando la cepa SM14 en medio YNB con 2% de D-glucosa (p/v) o 4% de etanol (v/v) hasta la parte final de la fase exponencial (antes de que comenzara el crecimiento diaúxico en el cultivo con glucosa). Los resultados fueron 8.8 mg/g peso seco celular y 15.2 mg/g peso seco celular en glucosa y etanol respectivamente, lo que significa un incremento del $73\% \pm 6\%$ en la producción de β -caroteno usando etanol comparado con la glucosa. Según información encontrada, en la mayoría de las cepas de levadura la acumulación de carotenoides se inicia en la parte final de la fase exponencial y continua en la fase estacionaria, lo cual es normalmente observado en la producción de metabolitos secundarios [40].

Debido a las diferencias presentadas en las condiciones de crecimiento de las cepas (medio de cultivo YPD y YNB, pH y aireación) entre el biorreactor y los tubos de ensayo, la productividad en el biorreactor (15 mg/g peso seco celular) fue

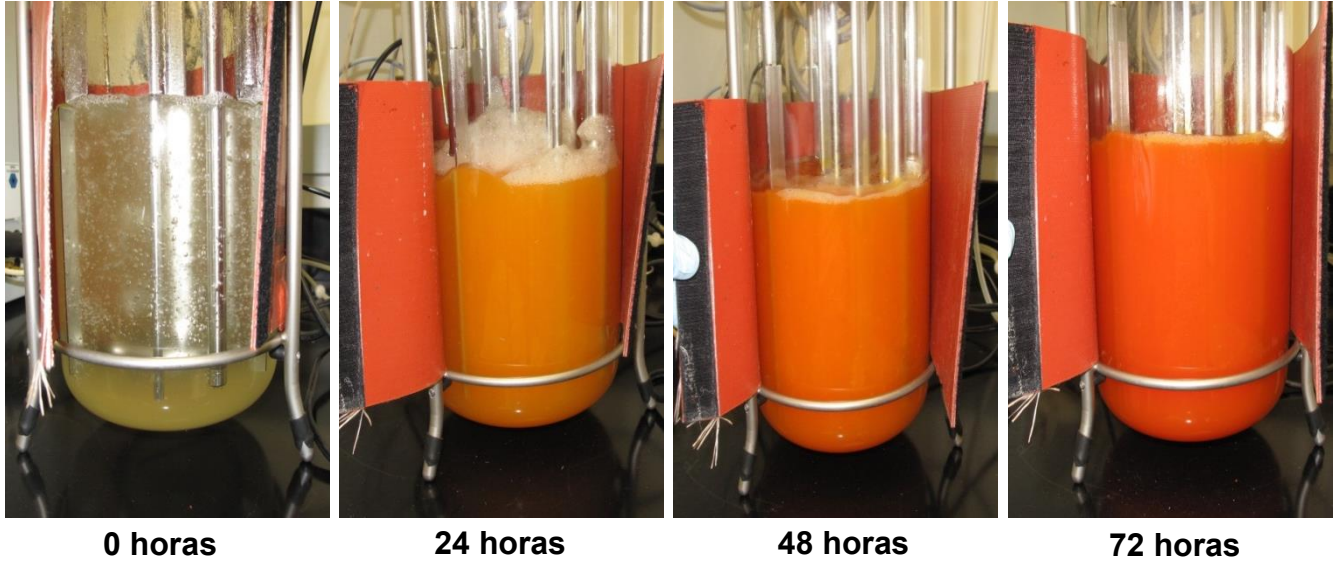
menor que la productividad obtenida en los tubos de ensayo (18 ± 1 mg/g peso seco celular). Los parámetros específicos que afectan la producción de carotenoides en el biorreactor aún no se han investigado.

Figura 10. Producción de carotenoides de la cepa SM14, usando un biorreactor de 7 litros. Línea sólida: OD (densidad óptica a 600 nm). Línea discontinua: producción de β -caroteno.



En la Figura 11 se puede observar el cambio en la densidad óptica y el aumento en la coloración, lo que significa un incremento en la concentración celular y de carotenoides, durante 72 horas de crecimiento celular de la cepa SM14. El medio utilizado fue YNB (20 g/L glucosa), pH mantenido en 5.5, agitación a 300 rpm y temperatura de 30°C.

Figura 11. Imágenes del crecimiento de la cepa SM14 con el tiempo.



3.6. Comparación con otros laboratorios

A partir de la producción obtenida de β -caroteno, se realizó una comparación respecto a la cantidad producida de β -caroteno por otros laboratorios. Como se puede observar en la Tabla 2, la cantidad producida de β -caroteno por este trabajo es aproximadamente 3 veces mayor respecto a la mejor de las cepas de *S. cerevisiae* productoras de carotenoides investigadas. Esto se debe a que la evolución adaptativa fue satisfactoriamente utilizada para el incremento de carotenoides, método que nunca había sido experimentado para este objetivo.

Tabla 2. Comparación en la producción de β -caroteno respecto a otros laboratorios, usando *S. cerevisiae* modificada.

Microorganismo	Producción de β -caroteno (mg/g peso seco celular)	Condiciones de Crecimiento	Año	Fuente
<i>S. cerevisiae</i> Modificada	18.00	Tubos 3 mL (YPD), 72 horas, 60 rpm, 30°C	2012-2013	Autor
<i>S. cerevisiae</i> Modificada	6.29	Erlenmeyer 200 mL (YNB), 16 horas, 180 rpm, 30°C	2011	[41]
<i>S. cerevisiae</i> Modificada	3.90	Flask 500 mL (YNB), 72 to 96 horas, 120 rpm, 30°C	2011	[42]
<i>S. cerevisiae</i> Modificada	5.88	Erlenmeyer (YNB), 225 rpm, 30°C	2007	[15]

Este trabajo de investigación fue publicado en la revista *Metabolic Engineering* en su volumen 21 en enero de 2014 y tiene como título “*Improving carotenoids production in yeast via adaptive laboratory evolution*” [43].

4. CONCLUSIONES

La evolución adaptativa fue satisfactoriamente aplicada para el incremento en la producción de carotenoides con una cepa de *S. cerevisiae* modificada genéticamente, alcanzando una producción de 18 mg/g peso seco celular de β -caroteno lo que significa un incremento de tres veces en la producción respecto al ancestro (6 mg/g peso seco celular).

El análisis del transcriptoma reveló un incremento en la expresión de varios genes relacionados con la biosíntesis de lípidos, específicamente un incremento en el flujo metabólico por la ruta del mevalonato, lo que lleva a un eventual aumento en la producción de carotenoides.

El crecimiento de la cepa SM14 en un biorreactor permitió observar que la cantidad de carotenoides producidos es menor que la obtenida usando los tubos de ensayo, esto se debe a las diferencias presentadas en las condiciones de crecimiento como medio de cultivo, pH y aireación.

Comparando la cantidad producida de β -caroteno por las cepas desarrolladas de *S. cerevisiae* en este trabajo y la cantidad producida de β -caroteno por cepas de *S. cerevisiae* en otras publicaciones, se puede observar que la cepa evolucionada en este trabajo representa la mayor producción de β -caroteno.

Este trabajo demuestra que una apropiada presión selectiva se puede emplear para mejorar la producción de un metabolito secundario realizando una evolución dirigida.

BIBLIOGRAFÍA

CHERRY, J. Michael *et al.* Saccharomyces Genome Database: the genomics resource of budding yeast. En: *Nucleic Acids Res.* 2012, vol. 40, p. D700–5.

GIETZ, Daniel *et al.* Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. En: *Nucl Acid Res.* 1992, vol. 20, p. 1425.

IZAWA, S *et al.* Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adaptive response to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. En: *Biochem. J.* 1998, vol. 330, p. 811–817.

KAO, Katy and SHERLOCK, Garvin. Molecular characterization of clonal interference during adaptive evolution in asexual populations of *Saccharomyces cerevisiae*. En: *Nat. Genet.* 2008, vol. 40, p. 1499–1504.

REYES, Luis *et al.* Improving carotenoids production in yeast via adaptive laboratory evolution. En: *Metab. Eng.* Jan. 2014, vol. 21, p. 26–33.

UKIBE, Ken *et al.* Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for astaxanthin production and oxidative stress tolerance. En: *Appl. Environ. Microbiol.* Nov. 2009, vol. 75, no. 22, p. 7205–11.

WINKLER, James *et al.* Adaptive Laboratory Evolution for Strain Engineering. En: *Systems Metabolic Engineering.* vol. 985. 2013. p. 211–222.

YAN, Guo-liang *et al.* Important role of catalase in the production of β -carotene by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* under H₂O₂ stress. En: *Curr. Microbiol.* Mar. 2011, vol. 62, no. 3, p. 1056–61.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A. V. Rao and L. G. Rao, "Carotenoids and human health.," *Pharmacol. Res.*, vol. 55, no. 3, pp. 207–16, Mar. 2007.
- [2] R. L. Ausich, "Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology," *Pure Appl. Chem.*, vol. 69, no. 10, pp. 2169–2174, 1997.
- [3] S. A. Paiva and R. M. Russell, "Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants.," *J. Am. Coll. Nutr.*, vol. 18, pp. 426–433, 1999.
- [4] P. Astorg, S. Gradelet, R. Bergès, and M. Suschetet, "Dietary lycopene decreases the initiation of liver preneoplastic foci by diethylnitrosamine in the rat.," *Nutr. Cancer*, vol. 29, pp. 60–68, 1997.
- [5] G. Britton, "Structure and properties of carotenoids in relation to function.," *FASEB J.*, vol. 9, pp. 1551–1558, 1995.
- [6] N. I. Krinsky and E. J. Johnson, "Carotenoid actions and their relation to health and disease.," *Mol. Aspects Med.*, vol. 26, no. 6, pp. 459–516, Dec. 2005.
- [7] J. D. Surmatis and A. Ofner, "A New Synthesis of trans- β -Carotene and Decapreno- β -carotene 1," *J. Org. Chem.*, vol. 26, no. 4, pp. 1171–1173, Apr. 1961.
- [8] M. García-González, J. Moreno, J. C. Manzano, F. J. Florencio, and M. G. Guerrero, "Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis-beta-carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor.," *J. Biotechnol.*, vol. 115, no. 1, pp. 81–90, Jan. 2005.
- [9] B. Mogedas, C. Casal, E. Forján, and C. Vílchez, " β -Carotene production enhancement by UV-A radiation in *Dunaliella bardawil* cultivated in laboratory reactors," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 108, pp. 47–51, 2009.
- [10] S. Choudhari and R. Singhal, "Media optimization for the production of beta-carotene by *Blakeslea trispora*: a statistical approach.," *Bioresour. Technol.*, vol. 99, no. 4, pp. 722–30, Mar. 2008.
- [11] S.-L. Wang, D.-J. Chen, B.-W. Deng, and X.-Z. Wu, "Effects of high hydrostatic pressure on the growth and beta-carotene production of *Rhodotorula glutinis*," *Yeast (Chichester, England)*, vol. 25, no. 4, pp. 251–7, Apr-2008.

- [12] P. Buzzini, A. Martini, M. Gaetani, B. Turchetti, U. M. Pagnoni, and P. Davoli, "Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula graminis* DBVPG 7021 as a function of trace element concentration by means of response surface analysis," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 36, no. 5–6, pp. 687–692, Apr. 2005.
- [13] I. R. Maldonado, D. B. Rodriguez-Amaya, and A. R. P. Scamparini, "Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem," *Food Chem.*, vol. 107, no. 1, pp. 145–150, Mar. 2008.
- [14] E. Valduga, A. Valério, H. Treichel, A. Furigo Júnior, and M. Di Luccio, "Kinetic and stoichiometric parameters in the production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) in synthetic and agroindustrial media.," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 157, no. 1, pp. 61–9, Apr. 2009.
- [15] R. Verwaal, J. Wang, J.-P. Meijnen, H. Visser, G. Sandmann, J. a van den Berg, and A. J. J. van Ooyen, "High-level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 13, pp. 4342–50, Jul. 2007.
- [16] P. Bhosale and P. S. Bernstein, "Beta-carotene production by *Flavobacterium multivorum* in the presence of inorganic salts and urea.," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 31, pp. 565–571, 2004.
- [17] M. Rodríguez-Sáiz, C. Sánchez-Porro, J. L. De La Fuente, E. Mellado, and J. L. Barredo, "Engineering the halophilic bacterium *Halomonas elongata* to produce beta-carotene.," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 77, no. 3, pp. 637–43, Dec-2007.
- [18] C. Silva, J. M. S. Cabral, and F. van Keulen, "Isolation of a beta-carotene over-producing soil bacterium, *Sphingomonas* sp.," *Biotechnology letters*, vol. 26, no. 3, pp. 257–62, Feb-2004.
- [19] S.-W. Kim, J.-B. Kim, W.-H. Jung, J.-H. Kim, and J.-K. Jung, "Over-production of beta-carotene from metabolically engineered *Escherichia coli*," *Biotechnology letters*, vol. 28, no. 12, pp. 897–904, Jun-2006.
- [20] S. Emeish, "Production of Natural Beta Carotene from *Dunaliella* Living in the Dead Sea," *Jordan J. Earth*, 2012.
- [21] E. M. M. Phaff, H. J., Miller, M. W., "The Life of Yeasts," 1978. .
- [22] J. S. H. Rose, A.H., *The Yeasts: Yeast Technology*. Elsevier, 1993, p. 620.

- [23] G. M. Walker, *Yeast Physiology and Biotechnology*. John Wiley & Sons, 1998, p. 350.
- [24] J. Winkler, L. H. Reyes, and K. C. Kao, "Systems Metabolic Engineering," vol. 985, pp. 211–222, 2013.
- [25] K. C. Kao and G. Sherlock, "Molecular characterization of clonal interference during adaptive evolution in asexual populations of *Saccharomyces cerevisiae*," *Nat. Genet.*, vol. 40, pp. 1499–1504, 2008.
- [26] D. Gietz, A. St Jean, R. A. Woods, and R. H. Schiestl, "Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells.," *Nucl Acid Res*, vol. 20, p. 1425, 1992.
- [27] J. Bähler, J. Q. Wu, M. S. Longtine, N. G. Shah, A. McKenzie, A. B. Steever, A. Wach, P. Philippsen, and J. R. Pringle, "Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*," *Yeast*, vol. 14, pp. 943–951, 1998.
- [28] J. Quackenbush, "Microarray data normalization and transformation.," *Nat. Genet.*, vol. 32 Suppl, pp. 496–501, 2002.
- [29] A. I. Saeed, N. K. Bhagabati, J. C. Braisted, W. Liang, V. Sharov, E. A. Howe, J. Li, M. Thiagarajan, J. A. White, and J. Quackenbush, "[9] TM4 Microarray Software Suite," *Methods in Enzymology*, vol. 411. pp. 134–193, 2006.
- [30] J. M. Cherry, E. L. Hong, C. Amundsen, R. Balakrishnan, G. Binkley, E. T. Chan, K. R. Christie, M. C. Costanzo, S. S. Dwight, S. R. Engel, D. G. Fisk, J. E. Hirschman, B. C. Hitz, K. Karra, C. J. Krieger, S. R. Miyasato, R. S. Nash, J. Park, M. S. Skrzypek, M. Simison, S. Weng, and E. D. Wong, "Saccharomyces Genome Database: the genomics resource of budding yeast.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, pp. D700–5, 2012.
- [31] D. W. Huang, B. T. Sherman, and R. A. Lempicki, "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources.," *Nat. Protoc.*, vol. 4, pp. 44–57, 2009.
- [32] D. W. Huang, B. T. Sherman, and R. A. Lempicki, "Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, pp. 1–13, 2009.

- [33] S. A. R. Paiva and R. M. Russell, "Review Series: Antioxidants and their Clinical Applications - β -Carotene and Other Carotenoids as Antioxidants," vol. 18, no. 5, pp. 426–433, 1999.
- [34] K. Ukibe, K. Hashida, N. Yoshida, and H. Takagi, "Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for astaxanthin production and oxidative stress tolerance.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 22, pp. 7205–11, Nov. 2009.
- [35] G. Yan, H. Liang, Z. Wang, X. Yang, D. Liu, J. Liu, and C. Duan, "Important role of catalase in the production of β -carotene by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* under H₂O₂ stress.," *Curr. Microbiol.*, vol. 62, no. 3, pp. 1056–61, Mar. 2011.
- [36] E. I. Wilding, J. R. Brown, A. P. Bryant, A. F. Chalker, D. J. Holmes, K. A. Ingraham, S. Iordanescu, C. Y. So, M. Rosenberg, and M. N. Gwynn, "Identification, evolution, and essentiality of the mevalonate pathway for isopentenyl diphosphate biosynthesis in gram-positive cocci.," *J. Bacteriol.*, vol. 182, pp. 4319–4327, 2000.
- [37] S. Izawa, K. Maeda, T. Miki, J. Mano, Y. Inoue, and A. Kimura, "Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adaptive response to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*," *Biochem. J.*, vol. 330 (Pt 2, pp. 811–817, 1998.
- [38] A. K. Pahlman, K. Granath, R. Ansell, S. Hohmann, and L. Adler, "The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress.," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, pp. 3555–3563, 2001.
- [39] M. Rep, M. Proft, F. Remize, M. Tamás, R. Serrano, J. M. Thevelein, and S. Hohmann, "The *Saccharomyces cerevisiae* Sko1p transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of a set of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage.," *Mol. Microbiol.*, vol. 40, pp. 1067–1083, 2001.
- [40] I. Marova, M. Certik, and E. Breierova, "Production of Enriched Biomass by Carotenogenic Yeasts - Application of Whole-Cell Yeast Biomass to Production of Pigments and Other Lipid Compounds."
- [41] G. Yan, K. Wen, and C. Duan, "Enhancement of β -carotene production by over-expression of HMG-CoA reductase coupled with addition of ergosterol

biosynthesis inhibitors in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*.,” *Curr. Microbiol.*, vol. 64, no. 2, pp. 159–63, Feb. 2012.

- [42] N. Lange and A. Steinbüchel, “ β -Carotene production by *Saccharomyces cerevisiae* with regard to plasmid stability and culture media.,” *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 91, no. 6. pp. 1611–22, Sep-2011.
- [43] L. H. Reyes, J. M. Gomez, and K. C. Kao, “Improving carotenoids production in yeast via adaptive laboratory evolution.,” *Metab. Eng.*, vol. 21, pp. 26–33, Jan. 2014.

ANEXOS

ANEXO A. CEPAS USADAS EN LOS EXPERIMENTOS

Tabla 3. Cepas usadas.

Cepa	Genotipo relevante	Fuente
GSY1136	Mata, <i>ura3-52</i> , <i>gal+</i> en S288c como base, <i>YBR209W::Act1p-GFP-Act1t-ura3</i>	Kao and Sherlock [25]
YLH0	GSY1136 Δ <i>ura3</i>	Este trabajo
YLH1	GSY1136 <i>YIplac211YB/I/E*</i>	Este trabajo
YHL2	GSY1136 <i>YIplac211YB/I/E* Δctt1</i>	Este trabajo
YLH3	GSY1136 Δ <i>ctt1</i>	Este trabajo

ANEXO B. MEDIOS DE CULTIVO

Tabla 4. Medios de cultivo.

Nombre	Componentes	Cantidad (1 Litro)
YPD	Extracto de levadura	10.0 gramos
	Peptona	20.0 gramos
	D-glucosa	20.0 gramos
YPD Agar	Extracto de levadura	10.0 gramos
	Peptona	20.0 gramos
	D-glucosa	20.0 gramos
	Agar	15.0 gramos
YNB	D-glucosa	20.0 gramos
	Base nitrogenada de levadura	1.7 gramos
	Sulfato de amonio	5.0 gramos

Fuente: Laboratory of Dr. Kao.

ANEXO C. MÉTODO DE ACETATO DE LITIO – HIGH EFFICIENCY TRANSFORMATION PROTOCOL

1. Inoculate 2-5 ml of liquid YPD or 10 ml SC and incubate with shaking overnight at 30°C.

2. Count o/n culture and inoculate 50 ml of warm YPD to a cell density of 5×10^6 /ml culture.

i) Dilute overnight YPD or SC cultures 10-1 or more in water.

ii) Carefully place 10 μ l of the cell suspension between the cover slip and the base of haemocytometer. Let the cells settle onto the haemocytometer grid for a few minutes. The grid area is typically 1 square millimeter, divided into 25 equal-sized squares, and the volume measured is 10^{-4} ml.

ii) Count the number of cells in 5 diagonal squares

iv) Calculate the cell titer as follows: cells counted $\times 5 \times$ dilution factor $\times 1/\text{volume}$ measured by the 25 squares of the haemocytometer. $239 \text{ cells} \times 5 \times 10$ (dilution factor) $\times 1/10^{-4}\text{ml} = 1.2 \times 10^8 \text{ cells/ml}$.

v) *Saccharomyces cerevisiae* divides by budding from a mother cell. Count budded cells as a single cells. Count cells with equal bud sizes as two cells there is evidence of additional buds forming on either cell. Some strains form clumps of cells which reduce plating efficiency. A single clump of cells will only give rise to one colony on a plate, which may complicate further analysis.

vi) You may also use OD600 to determine cell titer; however the relationship between cell number and OD is strain specific.

3. Incubate the culture at 30°C on a shaker at 200 rpm until its equivalent to 2×10^7 cells/ml. This will take 3 to 5 hours. This culture will give sufficient cells for 10 transformations.

Note:

i) It is important to allow the cells to complete at least two divisions.

ii) Transformation efficiency (transformants/ μg plasmid/ 10^8 cells) remains constant for 3 to 4 cell divisions.

4. Harvest the culture in a sterile 50 ml centrifuge tube at $3000 \times g$ (5000 rpm) for 5 min.

5. Pour off the medium, resuspend the cells in 25 ml of sterile water and centrifuge again.

6. Pour off the water, resuspend the cells in 1.0 ml 100 mM LiAc and transfer the suspension to a 1.5 ml microfuge tube.

7. Pellet the cells at top speed for 15 sec and remove the LiAc with a micropipette.

8. Resuspend the cells to a final volume of 500 μl (2×10^9 cells/ml) --about 400 μl of 100 mM LiAc--

Note: If the cell titer of the culture is greater than 2×10^7 cells/ml the volume of the LiAc should be increased to maintain the titer of this suspension at 2×10^9 cells/ml. If the titer of the culture is less than 2×10^7 cells/ml then decrease the amount of LiAc.

9. Boil a 1.0 ml sample of SS-DNA for 5 min. and quickly chill in ice water.

**** It is not necessary or desirable to boil the carrier DNA every time. Keep a small aliquot in your own freezer box and boil after 3-4 freeze-thaws. But keep on ice when out.

10. Vortex the cell suspension and pipette 50 μl samples into labelled microfuge tubes. Pellet the cells and remove the LiAc with a micropipette.

11. The basic "transformation mix" consists of:

240 μl PEG (50% w/v)

36 μl 1.0 M. LiAc

50 μl SS-DNA (2.0 mg/ml)

X μl Plasmid DNA (0.1 - 10 μg)

34-X μl Sterile ddH₂O

360 μl TOTAL

Carefully add these ingredients in the order listed.

Note: The order is important here! The PEG should go in first, which shields the cells from the detrimental effects of the high concentration of LiAc.

One can also premix the ingredients except for the plasmid DNA then add 355µl of TRAF0 mix on top of the cell pellet. Then add the 5 µl of plasmid DNA and mix. Take care to deliver the correct volume as the Trafo mix is viscous.

12. Vortex each tube vigorously until the cell pellet has been completely mixed. Usually takes about 1 min.

13. Incubate at 30oC for 30 min.

14. Heat shock in a water bath at 42oC for 30 min.

Note: The optimum time can vary for different yeast strains. Please test this if you need high efficiency from your transformations.

15. Microfuge at 6-8000 rpm for 15 sec and remove the transformation mix with a micropipette.

16. Pipette 1.0 ml of sterile water into each tube and resuspend the pellet by pipetting it up and down gently.

Note: We like to be as gentle as possible at this step if high efficiency is important. Excessive washing washes away transformants.

17. Plate from 2 to 200 µl of the transformation mix onto SC-minus plates. If plating less than 200 µl deliver into a pool of not more than a final volume of 200 µl of sterile water on the plate.

Note: When spreading yeast inoculums onto the plate gently distribute the fluid completely with a sterile glass rod with a minimum of strokes. Allow the fluid to be taken up by the plate prior to incubation.

18. Incubate the SC minus plates for 2 - 4 days to recover transformants.

ANEXO D. CURVAS DE CALIBRACIÓN

Figura 12. Relación para cuantificar los carotenoides.

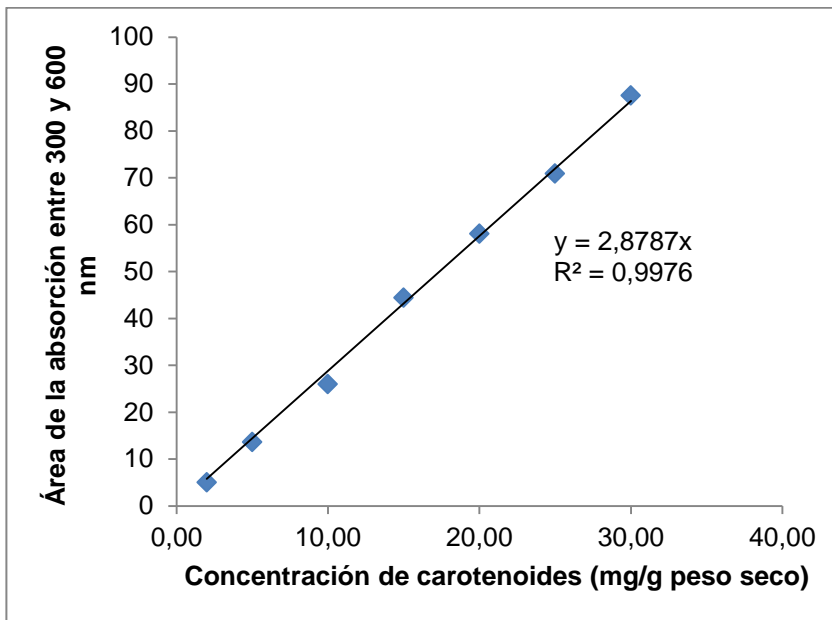
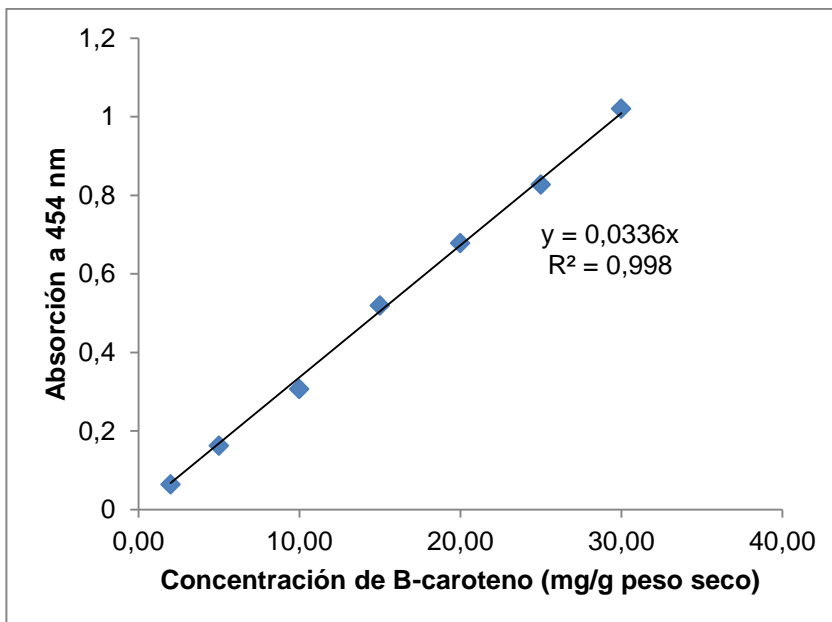


Figura 13. Relación para cuantificar β -caroteno.



ANEXO E. TRANSCRIPCIÓN INVERSA

La transcripción inversa se preparó mezclando 10 µg del ARNm extraído, IU SuperScript® III transcriptasa inversa (Life Technologies), nucleótidos (dATP-5mM, dGTP-5mM, dCTP-5mM, dTTP-2mM y alilo amino dUTP-3mM) y Oligo (dT)₂₀ cebadores (primers) (Life Technologies) para sintetizar el cADN. El cADN fue recuperado mediante precipitación con etanol en hielo. Cy-3 y Cy-5 mono-Reactivo Dye Pack (tinte, GE Healthcare) fueron utilizados para etiquetar las muestras de cADN. Las muestras etiquetadas de cADN fue hibridado a el *S. cerevisiae* G4813 Gene Expression Microarray (Agilent Technologies). La colección fue escaneada usando el GenePix 4100^a Microarray Scanner y el programa Genepix Pro 6.0 (Molecular Devices) para obtener la imagen del análisis.

ANEXO F. ESPECIFICACIONES DEL PCR EN TIEMPO REAL

GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) fue utilizado para todos los experimentos PCR en tiempo real, usando 20 ng de cADN y 0.5 µM de cada iniciador. Los iniciadores utilizados para el experimento fueron: gen de control (COQ5): GAC TTC AAT ACA GTC TTC GAA CCA AA (delantero) and TCC TTA TAC AGC TGC TGT TAC AAT T (reverso). crtYB gene: TGC CAC AAT TGA CAT GGT CT (delantero) and AGG CGA AAT GGT ATT GAA CG (reverso). crtI gene: GAA GTC GAG CGT TTT GAA GG (delantero) and AGG ATT TGG CCA ATG AAC TG (reverso). crtE gene: GGG ATT CCG CAG ACA ATA AA (delantero) and CTT TCG AGA ACG GAA TCT GC (reverso). El protocolo del termociclador fue: 95°C por 3 minutos seguido de 39 ciclos de 95°C por 10 segundos seguido de 55°C por 30 segundos.

ANEXO G. MUTANTES INDIVIDUALES SELECCIONADOS DE LAS POBLACIONES EVOLUCIONADAS

Tabla 5. Lista de los mutantes individuales seleccionados de las poblaciones evolucionadas.

Mutante individual	Población progenitora
SM11	P1-04
SM12	P1-15
SM13	P1-24
SM14	P1-30
SM15	P1-31
SM16	P1-34
SM21	P2-10
SM22	P2-30
SM23	P2-37
SM24	P2-39