

MEJORAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE β -CAROTENO DE UNA CEPA DE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE MEDIANTE EVOLUCIÓN ADAPTATIVA EN
LABORATORIO EMPLEANDO β -IONONA COMO PRESIÓN SELECTIVA

JAVIER ALBERTO RIVERO SÁNCHEZ

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

2017

MEJORAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE β -CAROTENO DE UNA CEPA DE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE MEDIANTE EVOLUCIÓN ADAPTATIVA EN
LABORATORIO EMPLEANDO β -IONONA COMO PRESIÓN SELECTIVA

JAVIER ALBERTO RIVERO SÁNCHEZ

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

Directores

Ph.D. KATY C. KAO

Ingeniera Química

Ph.D. VIVIANA SÁNCHEZ TORRES

Ingeniera Química

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

2017

DEDICATORIA

A Dios por siempre estar ahí en mis batallas más difíciles.

A mi familia que siempre me motivó a seguir adelante y confió plenamente en mis capacidades.

A Laura quien siempre me impulsa a soñar en grande y está a mi lado apoyándome día a día.

A Luis por sus consejos y por acogerme en su hogar durante esta pasantía.

AGRADECIMIENTOS

A la Ph.D. Katy C. Kao, profesora del Departamento De Ingeniería Química de Texas A&M University, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y por su constante apoyo en el desarrollo de este proyecto.

Al candidato a Ph.D. en Ingeniería Química George Peabody por enseñarme los fundamentos teóricos y prácticos requeridos en este proyecto.

A la Universidad Industrial de Santander, que mediante su Oficina de Relaciones Exteriores y la Escuela de Ingeniería Química, ayudó a que la realización de este proyecto fuera posible.

A mi directora, la profesora Ph.D. Viviana Sánchez Torres por su respaldo y valiosos aportes.

TABLA DE CONTENIDO

| | pág. |
|---|------|
| INTRODUCCIÓN | 14 |
| 1. MARCO TEÓRICO | 16 |
| 1.1 CAROTENOIDES | 16 |
| 1.2 BIOSÍNTESIS DE β -CAROTENO | 17 |
| 1.3 MEJORAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES | 19 |
| 1.4 EVOLUCIÓN ADAPTATIVA EN LABORATORIO | 21 |
| 2. METODOLOGÍA | 22 |
| 2.1 CONDICIONES DE CULTIVO | 23 |
| 2.2 ESTUDIO DE TOXICIDAD | 23 |
| 2.3 EXPERIMENTO DE EVOLUCIÓN ADAPTATIVA | 24 |
| 2.4 CUANTIFICACIÓN DE β -CAROTENO | 24 |
| 2.5 SELECCIÓN DE MUTANTES | 25 |

| | |
|---|----|
| 2.6 PRUEBA DE ESTABILIDAD | 26 |
| 3. RESULTADOS | 27 |
| 3.1 CURVAS DE CRECIMIENTO | 27 |
| 3.2 PRESIÓN SELECTIVA | 28 |
| 3.3 EVOLUCIÓN ADAPTATIVA | 28 |
| 3.4 MUTANTES CON PRODUCCIÓN DE β -CAROTENO MEJORADA | 30 |
| 3.5 ESTABILIDAD DE LA PRODUCCIÓN DE β -CAROTENO | 32 |
| 4. CONCLUSIONES | 33 |
| 5. RECOMENDACIONES | 34 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 35 |
| BIBLIOGRAFÍA | 44 |
| ANEXOS | 47 |

LISTA DE TABLAS

| | pág. |
|---|------|
| Tabla 1. Producción de β -caroteno en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 20 |

LISTA DE FIGURAS

| | pág. |
|---|-------------|
| Figura 1. Ruta metabólica de la producción de β -Caroteno en <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> | 18 |
| Figura 2. Cuadro metodológico | 22 |
| Figura 3. Curvas de crecimiento de YLH2 en medio YNB con diferentes concentraciones de β -ionona | 27 |
| Figura 4. Producción de β -caroteno promedio de las poblaciones de YLH2 durante experimentos de evolución | 29 |
| Figura 5. Densidad óptica final promedio de las poblaciones de YLH2 durante experimentos de evolución | 30 |
| Figura 6. Producción de β -caroteno de las cepas mutantes aisladas | 31 |
| Figura 7. Estabilidad de la producción de β -caroteno de las cepas mutantes después de 5 transferencias | 32 |

LISTA DE ANEXOS

| | pág. |
|----------------------------|------|
| ANEXO A. Medios de cultivo | 47 |

RESUMEN

TÍTULO: MEJORAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE β -CAROTENO DE UNA CEPA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* MEDIANTE EVOLUCIÓN ADAPTATIVA EN LABORATORIO EMPLEANDO β -IONONA COMO PRESIÓN SELECTIVA*

AUTOR: JAVIER ALBERTO RIVERO SÁNCHEZ**

PALABRAS CLAVE: β -CAROTENO, EVOLUCIÓN ADAPTATIVA EN LABORATORIO, *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, β -IONONA

DESCRIPCIÓN:

El β -caroteno es un carotenoide de alto valor comercial y creciente demanda como precursor de la vitamina A, al que también se le ha atribuido un rol central en la prevención y terapia del cáncer. Adicionalmente, este compuesto reduce el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, desarrollo de cataratas y degeneración macular relacionada con la edad. En años recientes, la producción de carotenoides naturales a partir de diferentes microorganismos ha sido estudiada como una alternativa más ecológica que la fabricación sintética mediante procesos químicos. Sin embargo, su rendimiento aún no satisface los estándares industriales y se requiere una mayor mejora.

En este proyecto de investigación una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* productora de carotenoides fue forzada a mutar mediante experimentos de evolución adaptativa en laboratorio empleando β -ionona como presión selectiva para aumentar su nivel de producción de β -caroteno. Seguidamente, se aislaron mutantes con el fin de obtener una producción superior a la de las poblaciones evolucionadas, lográndose aislar una mutante con una producción mejorada de β -caroteno de 17.8 ± 0.9 mg/g de peso seco celular, una producción 2.2 veces mayor que la de la cepa parental y 1.7 veces mayor respecto a trabajos previos (10.30 ± 0.04 mg/g de peso seco celular). Finalmente, se realizó una prueba de estabilidad de la producción de las mutantes aisladas, encontrándose que esta se reduce considerablemente con el aumento del número de generaciones.

* Trabajo de Grado.

** Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Directores: Ph.D. Katy C. Kao y Ph.D. Viviana Sánchez Torres.

ABSTRACT

TITLE: IMPROVING β -CAROTENE PRODUCTION IN A CAROTENOIDS PRODUCER OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* BY ADAPTIVE LABORATORY EVOLUTION USING β -IONONE AS SELECTIVE PRESSURE*

AUTHOR: JAVIER ALBERTO RIVERO SÁNCHEZ**

KEYWORDS: β -CAROTENE, ADAPTIVE LABORATORY EVOLUTION, *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, β -IONONE

DESCRIPTION:

β -carotene is a carotenoid of high commercial value and increasing demand as a precursor of vitamin A. It has also been ascribed a central role in cancer prevention and therapy. Additionally, this compound reduces the risk of suffering cardiovascular diseases, cataract development and age-related macular degeneration. In recent years, the production of natural carotenoids using different microorganisms has been studied as an environmentally friendly alternative than the synthetic manufacture by chemical processes. However, its yield has been unable to meet the industrial standards and further improvement is required.

In this research project a carotenoids producer strain of *Saccharomyces cerevisiae* was forced to mutate by adaptive laboratory evolution experiments using β -ionone as the selective pressure to increase its β -carotene production level. Next, mutants were isolated in order to obtain a superior production to that of the evolved populations. A mutant with an improved β -carotene production of 17.8 ± 0.9 mg/g (dry cell weight) was isolated, such production represents an improvement of 2.2-fold with respect to the parental strain and 1.7-fold with respect to previous works (10.30 ± 0.04 mg/g dry cell weight). Finally, a stability test was performed on the production of the isolated mutants, this experiment revealed that β -carotene production was significantly reduced as the number of generations increased.

* Bachelor Thesis.

** Faculty of Physicochemical Engineering. School of Chemical Engineering. Directors: Ph.D. Katy C. Kao and Ph.D. Viviana Sánchez Torres.

INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son un grupo de más de 700 pigmentos naturales sintetizados por plantas, algas, hongos y bacterias [1], comercialmente utilizados en la industria de alimentos, farmacéutica, cosmética y agrícola [2, 3], que tienen un papel único e importante como precursores de la vitamina A en seres humanos y animales. De los carotenoides provitamina A, el β -caroteno es el mejor de todos [4].

Actualmente, más del 90% del β -caroteno comercial es producido por síntesis química, la cual genera algunos subproductos que tienen efectos secundarios indeseables al consumirse. No obstante, debido a la creciente preocupación pública por la inocuidad de los alimentos, el uso de β -caroteno sintético ha sido severamente controlado en años recientes [5, 6].

Lo anterior ha generado un renovado interés por las fuentes microbianas, que además representan un enfoque más ecológico frente a la síntesis química [7] y tienen la ventaja de utilizar sustratos de bajo costo [8]. Sin embargo, hasta la fecha, el rendimiento de la producción de β -caroteno sigue siendo incapaz de satisfacer las demandas industriales [6].

La evolución adaptativa en laboratorio es una herramienta importante para la ingeniería de cepas con fenotipos relevantes desde el punto de vista industrial, que gracias al cultivo bajo condiciones controladas de estrés, permite dirigir la evolución de los microorganismos hacia mutaciones deseadas. En un proyecto anterior llevado a cabo en el grupo de investigación de la Dra. Katy C. Kao, se logró aislar una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* superproductora de β -caroteno (SM14)

mediante una estrategia de evolución adaptativa a corto plazo, implementando choques con peróxido de hidrógeno como presión selectiva [9]. La producción de β -caroteno de dicha cepa fue optimizada en un biorreactor hasta 25.52 ± 2.15 mg/g de peso seco celular [10] y es hasta la fecha la máxima reportada en la literatura en *S. cerevisiae*. SM14 es utilizada como control positivo de la producción de β -caroteno en este trabajo, sin embargo, en las condiciones de cultivo empleadas su producción fue 10.30 ± 0.04 mg/g de peso seco celular.

Varias investigaciones han reportado que la β -ionona estimula la producción de β -caroteno en microorganismos carotenogénicos como *Blakeslea trispora* y que su sitio de acción se encuentra en las primeras etapas de la ruta de biosíntesis de carotenoides, aumentando la traslación en la fase de formación de la unidad isoprenoide isopentenil pirofosfato (IPP), bloque estructural de la biosíntesis de carotenoides y esteroides [11, 12].

El presente proyecto de investigación se planteó con el objetivo de incrementar la producción de β -caroteno de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* productora de carotenoides mediante evolución adaptativa en laboratorio a largo plazo, empleando β -ionona como presión selectiva. Esta estrategia resultó ser satisfactoria, permitiendo aislar la cepa mutante YLH2-23 con una producción de β -caroteno de 17.8 ± 0.9 mg/g de peso seco celular, una producción 2.2 veces mayor que la de la cepa parental YLH2 (8.0 ± 0.6 mg/g de peso seco celular) y 1.7 veces mayor respecto a SM14 (10.30 ± 0.04 mg/g de peso seco celular).

1. MARCO TEÓRICO

1.1 CAROTENOIDES

Los carotenoides son isoprenoides de 40 carbonos producidos por organismos fototróficos, como plantas y algas, y también por ciertos hongos y bacterias [13]. Según su composición química, los carotenoides se clasifican en carotenos, formados únicamente por carbono e hidrógeno y en xantofilas, que poseen uno o más átomos de oxígeno en su estructura. En su mayoría están compuestos por una cadena central de carbono con dobles enlaces conjugados y grupos cíclicos en ambos extremos [14]. Estas moléculas de intensa coloración son responsables del color amarillo, naranja y rojo de varias frutas, vegetales, flores, aves, peces y crustáceos [15].

El β -caroteno, el licopeno, la luteína y la zeaxantina son algunos de los carotenoides más conocidos y considerados benéficos para la salud humana [16]. Particularmente, el β -caroteno es un carotenoide de creciente demanda como precursor de la vitamina A, al que también se le ha atribuido un papel central en la terapia y prevención del cáncer. Adicionalmente, reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares, desarrollo de cataratas y degeneración macular. Junto a sus efectos medicinales, el β -caroteno es usado en la industria nutracéutica, cosmética y de producción de alimentos para animales debido a sus propiedades antioxidantes y colorantes [14].

El mercado global de carotenoides totalizó 1.5 billones de dólares en 2014 y se espera alcance alrededor de 1.8 billones de dólares en 2019, con una tasa de crecimiento del 3.9%. Debido a sus sobresalientes propiedades se proyecta una cuota del mercado global de carotenoides para el β -caroteno del 14% en 2019 [17], la cual en la actualidad es cubierta principalmente por las compañías BASF y DSM [18].

1.2 BIOSÍNTESIS DE β -CAROTENO

La mayoría del β -caroteno comercial es obtenido por síntesis química. Sólo el 2% es natural y es utilizado en su mayoría como suplemento nutricional. El β -caroteno natural puede extraerse de fuentes vegetales o producirse mediante procesos biotecnológicos usando microorganismos [19].

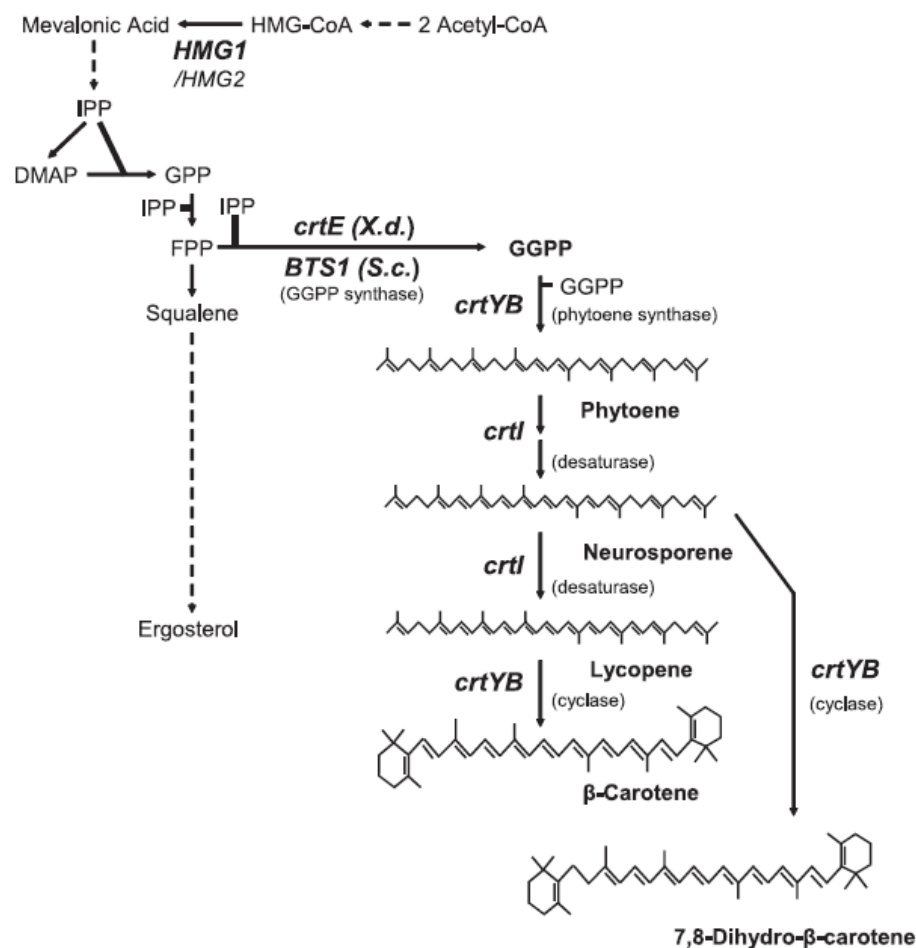
El β -caroteno originado de fuentes vegetales es generalmente obtenido por extracción con solventes como hexano, acetona, acetato de etilo, etanol y lactato de etilo, de zanahorias y de aceite de palma [20]. Sin embargo, existen algunos problemas asociados a la variabilidad estacional y geográfica que no pueden ser controlados [8].

Los microorganismos carotenogénicos más usados en la producción a escala industrial son el hongo *Blakeslea trispora* y el alga *Dunaliella salina*. *D. salina* es un alga unicelular halófila que acumula altos niveles de β -caroteno como respuesta al estrés. Su producción está ligada a altas condiciones de salinidad, temperatura y luz [21, 22]. Por su parte, con *B. trispora* el β -caroteno se obtiene mediante un proceso de fermentación que utiliza un cultivo mixto de dos tipos sexualmente compatibles (+) y (-) de cepas naturales del hongo y puede emplear melazas como sustrato [23, 24].

Una forma alternativa de producción de β -caroteno implica la expresión heteróloga de genes biosintéticos de β -caroteno en microorganismos no carotenogénicos tales como *Escherichia coli* [25], *Candida utilis* [26] y *Saccharomyces cerevisiae* [27]. En contraste con otros huéspedes, *S. cerevisiae* es un microorganismo de fácil modificación genética que exhibe un eficiente metabolismo isoprenoide y se clasifica como seguro por la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos, lo que la hace aún más atractiva para la producción de β -caroteno con fines farmacéuticos, nutricionales y de alimentación [28, 29].

Todos los carotenoides se producen a partir de isopentenil pirofosfato (IPP) y dimetilalil difosfato (DMAPP), que se sintetizan a través de la ruta metabólica del mevalonato (MVA) en el caso de los hongos o de la recientemente descubierta ruta del 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP), en el caso de bacterias, algas y plantas [6, 24]. Las cepas de *S. cerevisiae*, YLH2 y SM14, empleadas en este trabajo incorporan los genes de biosíntesis de carotenoides *crtE*, *crtYB* y *crtI* de la levadura carotenogénica *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Figura 1).

Figura 1. Ruta metabólica de la producción de β -Caroteno en *Xanthophyllomyces dendrorhous*



Fuente: [29]

1.3 MEJORAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES

Una estrategia típica en la ingeniería metabólica de *S. cerevisiae* hacia una producción más eficiente de carotenoides consiste en aumentar el suministro del precursor farnesil pirofosfato (FPP). Esto puede lograrse mediante la sobreexpresión de la enzima limitante de velocidad *tHMG1* y la represión de la ruta del escualeno [30, 31]. Del mismo modo, la producción heteróloga de carotenoides en *E. coli* se ha incrementado mediante la ingeniería metabólica de la ruta endógena del 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) y la introducción de la ruta externa del mevalonato (MVA) a fin de aumentar el suministro de isopentenil pirofosfato (IPP), bloque estructural de la producción de carotenoides [32].

Además de la optimización de las rutas de biosíntesis de isoprenoides, equilibrar el suministro de intermediarios de rutas metabólicas centrales como el piruvato y el gliceraldehído-3-fosfato (G3P) también es crítico para la producción de carotenoides, puesto que en la ruta del MEP se requieren por partes iguales, pero el nivel intracelular de G3P es mucho más bajo que el de piruvato. La reorientación del flux del carbono de piruvato a G3P mediante la sobreexpresión de la enzima fosfoenolpiruvato sintasa y la inactivación de rutas competidoras, han demostrado incrementar la producción de licopeno en *E. coli* [32, 33].

Por otro lado, la optimización de las fuentes de carbono mediante la suplementación de azúcares y aminoácidos ha conducido a una producción de altos nivel de β -caroteno y licopeno en *E. coli* [34, 35].

Recientemente, la evolución adaptativa en laboratorio fue aplicada con éxito para mejorar la producción de carotenoides en una cepa de *S. cerevisiae* mediante la explotación de las propiedades antioxidantes de los carotenoides. Para ello, se llevó a cabo un experimento de evolución adaptativa a corto plazo usando choques periódicos de peróxido de hidrógeno [9], del cual se aisló la mutante SM14, cuya producción fue posteriormente optimizada en un biorreactor hasta 25.52 ± 2.15 mg/g

de peso seco celular, aumentando la relación C/N en medio YNB estándar de 8.8 a 50 y operando a 30°C con pH 4.0 y agitación constante de 800 rpm [10]. El análisis del transcriptoma de SM14 reveló una sobreexpresión de genes relacionados con la biosíntesis de lípidos y la ruta del mevalonato [9]. A la fecha, SM14 acumula más β -caroteno que cualquier otra cepa reportada en la literatura. En la Tabla 1 se encuentra la producción de β -caroteno de diferentes cepas de *S. cerevisiae* obtenidas por varios grupos de investigación.

Tabla 1. Producción de β -caroteno en *Saccharomyces cerevisiae*

| Cepa | Producción de β-caroteno [mg/g de peso seco celular] | Condiciones de Cultivo |
|------------------|--|---|
| YB/I/E | 5.90 | 72 h, 30°C, 225 rpm, medio YNB [29] |
| T73-63 | 5.89 | 12 h, 28°C, 180 rpm, 300 mL de jugo de uva [36] |
| WAT11/pRS406-mva | 0.39 | 72 h, 30°C, 250 rpm, 50 mL de medio SD-HIS-URA [27] |
| Sc-EYBIH | 0.53 | 120 h, 20°C, 200 rpm, 25 mL de medio SD [37] |
| IME167 | 0.55 | 24 h, 30°C, 180 rpm, 50 mL de medio SCD [38] |
| YXWP-53 | 7.41 | 72 h, 30°C, 230 rpm, 100 mL de medio YPDG [39] |
| SM14 | 25.52 | 90 h, 30°C, 800 rpm, pH 4.0, 3 L de medio YNB 50 C/N en biorreactor Applikon® de 7 L [10] |

1.4 EVOLUCIÓN ADAPTATIVA EN LABORATORIO

La técnica de evolución adaptativa en laboratorio consiste en el cultivo continuo de microorganismos por múltiples generaciones bajo condiciones claramente definidas [40]. Durante estos experimentos surgen mutaciones debidas a las condiciones de cultivo y las que son beneficiosas frente a la presión selectiva se fijan en la población a lo largo del tiempo, permitiendo seleccionar fenotipos mejorados [41]. En comparación con la ingeniería racional y la modificación de enzimas específicas, ésta herramienta tiene la ventaja de permitir que las mutaciones beneficiosas se produzcan en una variedad de genes en paralelo [42].

La presión selectiva se clasifica en dos categorías principales, de estrés nutricional y de estrés ambiental. El estrés nutricional se usa generalmente cuando se desea adaptar cepas al consumo de sustratos de bajo costo como el glicerol. Por su parte, los factores de estrés ambiental a los que mayormente se desea aumentar la tolerancia incluyen altas temperatura, el estrés osmótico, la oxigenación y los disolventes orgánicos [43].

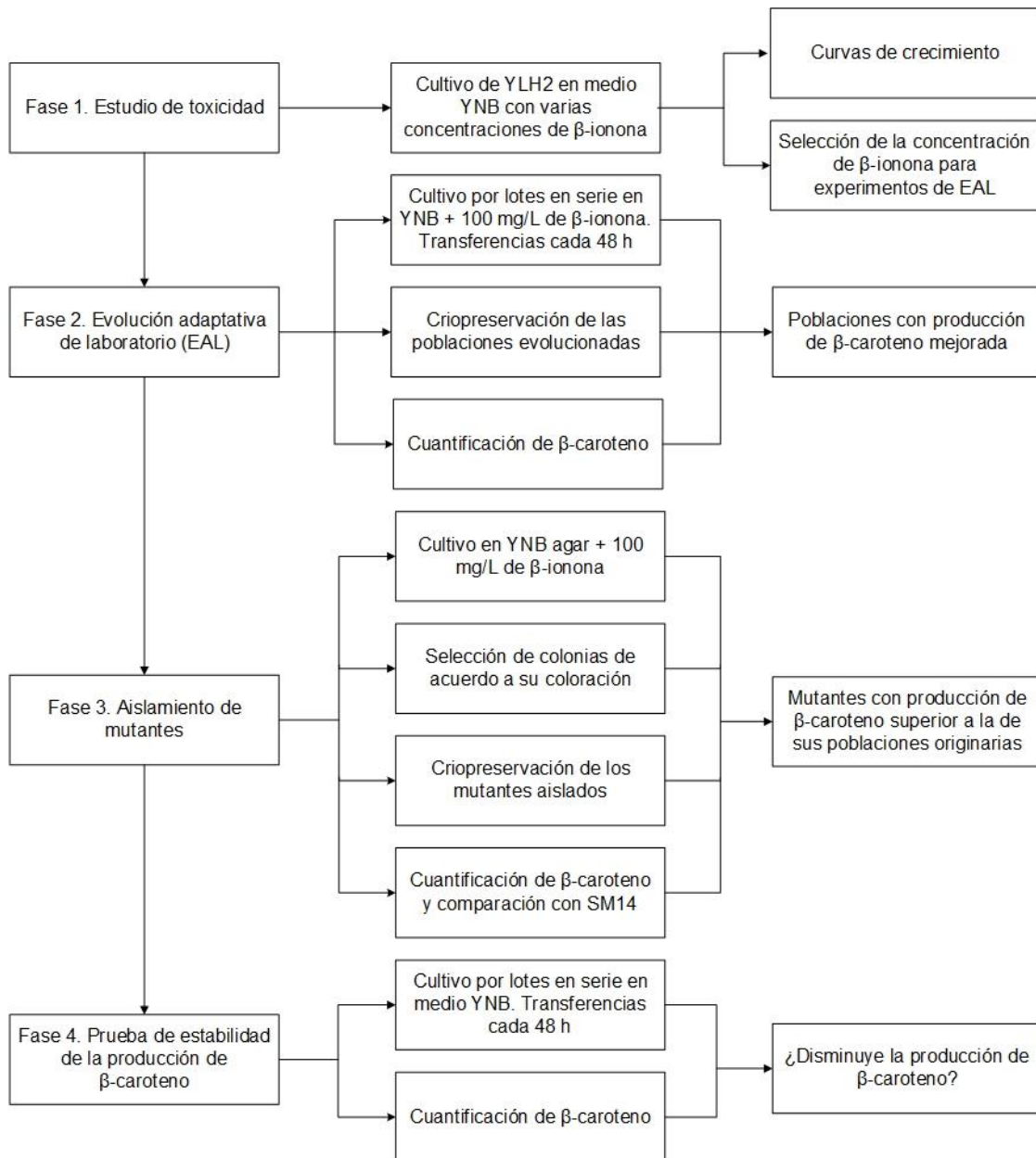
Existen dos métodos para la evolución de microorganismos, el cultivo por lotes, en el que las poblaciones se propagan en serie a nuevos frascos con medio de cultivo fresco a intervalos de tiempo regulares, o en quimiostatos, en los que el crecimiento en un biorreactor permite el control riguroso de nutrientes y otros factores tales como pH y oxigenación. [44].

Las aplicaciones biotecnológicas más comunes de la evolución adaptativa en laboratorio comprenden la activación de rutas alternas para consumo de sustratos no nativos o producción de productos no nativos, aumento de la tasa de crecimiento y concentración de productos, y adaptación de cepas bacterianas a diferentes condiciones ambientales como el aumento de la tolerancia al estrés que suele ocurrir en el procesamiento industrial [45].

2. METODOLOGÍA

En la Figura 2 se presentan las fases desarrolladas en este proyecto investigativo.

Figura 2. Cuadro metodológico



2.1 CONDICIONES DE CULTIVO

Todos los cultivos en medio líquido, incluyendo los del experimento de evolución adaptativa, fueron incubados a una temperatura 30°C, con agitación constante de 250 rpm en una incubadora Excella E24 Incubator Shaker Series (New Brunswick).

2.2 ESTUDIO DE TOXICIDAD

YLH2 fue cultivada en matraces Erlenmeyer de 100 mL con diferentes concentraciones de β -ionona con el fin de determinar su efecto inhibitorio en el crecimiento de la misma y escoger la concentración a emplear como presión selectiva en el experimento de evolución adaptativa. Para ello, se preparó un stock de 200 g/L de β -ionona (Alfa Aesar) en una solución 80% (v/v) de etanol. Esta mezcla fue esterilizada por filtración y almacenada a -20°C para su uso en otros experimentos.

YLH2 fue sembrada en un plato de YNB agar (Anexo A) e incubada por 3 días. Seguidamente, se seleccionaron dos colonias para inocular dos precultivos en tubos de ensayo con 5 mL de medio YNB. Transcurridas 24 horas se evaluó el crecimiento del cultivo midiendo la densidad óptica a 600 nm utilizando un espectrofotómetro UV/VIS Biomate 3 (Thermo Fisher Scientific) y se calculó el volumen de precultivo necesario para inocular, con cada uno de ellos, 4 matraces de 100 mL con 25 mL de medio YNB con una densidad óptica inicial de 0.1. A dichos matraces se añadió suficiente solución de β -ionona para alcanzar una concentración de 50 mg/L, 100 mg/L y 200 mg/L, además se incluyó un control sin β -ionona. Independientemente de la concentración de β -ionona se adicionó 1% (v/v) de una solución 80% (v/v) de etanol para aumentar la solubilidad de la β -ionona en el medio de cultivo.

Se realizaron mediciones de densidad óptica a 600 nm por un periodo de tiempo aproximado de 48 horas para obtener las curvas de crecimiento de la cepa.

2.3 EXPERIMENTO DE EVOLUCIÓN ADAPTATIVA

YLH2 fue sembrada en un plato de YPD agar e incubada por 3 días a 30°C. Posteriormente, dos colonias independientes fueron inoculadas en tubos de ensayo con 5 mL de medio YPD (Anexo A) e incubadas por 24 horas. Cada precultivo fue empleado para inocular dos matraces Erlenmeyer de 100 mL con 25 mL de medio YNB, uno con 100 mg/L de β -ionona y un control sin β -ionona. Independiente de la concentración de β -ionona se añadió 1% (v/v) de una solución 80% (v/v) etanol. La densidad óptica inicial de los cultivos se fijó en 0.1 durante el transcurso de la evolución.

Cada 48 horas los cultivos fueron transferidos a medio YNB fresco. La concentración de β -ionona y etanol se mantuvieron constantes a lo largo de toda la evolución. Al final de cada lote se criopreservaron muestras de 1 mL de cultivo de cada Erlenmeyer con 17% (v/v) glicerol a -80°C. Lo anterior, con el propósito de conservar los diferentes fenotipos obtenidos en diferentes puntos de tiempo de la evolución. Este experimento se extendió hasta alcanzar 100 generaciones.

2.4 CUANTIFICACIÓN DE β -CAROTENO

La producción de β -caroteno fue cuantificada en diferentes puntos de tiempo a lo largo de los experimentos de evolución con el fin de estudiar como mejoró este fenotipo. En total se evaluó la producción de 4 poblaciones por cada punto de tiempo, 2 evolucionadas en β -ionona y 2 controles evolucionadas sin β -ionona. Las poblaciones fueron inoculadas directamente de los viales criogénicos en tubos de ensayo con 3 mL de medio YNB. Transcurridas 48 horas se midió la densidad óptica a 600 nm de los precultivos y se transfirió suficiente volumen de los mismos a tubos de ensayo con 3 mL de medio YNB para ser incubados por 5 días antes de extraer del β -caroteno. La densidad óptica inicial de los cultivos se fijó en 0.1.

Una vez completado el tiempo de cultivo, se evaluó su densidad óptica y se recolectaron muestras de 1 mL de cada tubo, las cuales fueron reenvasadas en viales de 2 mL para ser centrifugadas a 5000 rpm por 3 minutos en una centrífuga Microcentrifuge 5424 (Eppendorf). Seguidamente, el sobrenadante fue aspirado con una bomba de vacío y se añadieron 200 μ L de perlas de vidrio de 425-600 μ m (Sigma) y 1 mL de dodecano (TCI America). A continuación, se efectuó la lisis celular en un disruptor Genie Cell Disruptor (Scientific Industries), realizando dos ciclos de agitación de 6 minutos. Los viales fueron centrifugados nuevamente a 5000 rpm por 3 minutos con el fin de separar las perlas y restos celulares de la mezcla de carotenoides y dodecano. La cuantificación del β -caroteno intracelular se llevó a cabo midiendo la absorbancia a 454 nm de muestras de 200 μ L en un espectrofotómetro lector de microplacas Infinite M200 (TECAN). El rendimiento fue calculado empleando la siguiente conversión [10]:

$$\frac{mg}{g_{(peso\ seco\ celular)}} = \frac{10 \times [mg/L]}{DO_{600} \times 7.61985} \quad (1)$$

2.5 SELECCIÓN DE MUTANTES

Estos experimentos fueron llevados a cabo con el fin de aislar colonias con producción de β -caroteno potencialmente mejorada. Para ello, las 2 poblaciones evolucionadas en β -ionona de la última transferencia fueron inoculadas directamente de los viales criogénicos a tubos de ensayo con 3 mL de medio YNB. Transcurridas 24 horas, los precultivos fueron transferidos a matraces Erlenmeyer de 100 mL con 25 mL de medio YNB, 100 mg/L de β -ionona y 1% (v/v) de una solución 80% (v/v) de etanol. Su densidad óptica inicial fue 0.1.

Luego de 48 horas de cultivo las poblaciones fueron normalizadas a una densidad óptica de aproximadamente 2 y sembradas con una dilución de 1×10^4 en cajas de Petri con YNB agar+100 mg/L β -ionona y en cajas con YNB agar sin β -ionona.

Después de 6 días de incubación a 30°C, se escogieron 8 colonias de cada población que tuvieran mayor intensidad en su coloración naranja y tamaño en comparación a la cepa parental y a SM14.

Las colonias seleccionadas fueron cultivadas en YNB y criopreservadas después de 24 horas como se explicó en la sección 2.3. El resto del cultivo se incubó hasta completar 5 días, para cuantificar la producción de β -caroteno y preseleccionar las 3 mejores mutantes de cada población. Las cepas mutantes aisladas fueron nombradas de acuerdo al siguiente formato, YLH2-AB, A es el número de la población de la que proviene y B es el número de la colonia. Por ejemplo, YLH2-12, fue la segunda colonia escogida de la población 1.

2.6 PRUEBA DE ESTABILIDAD

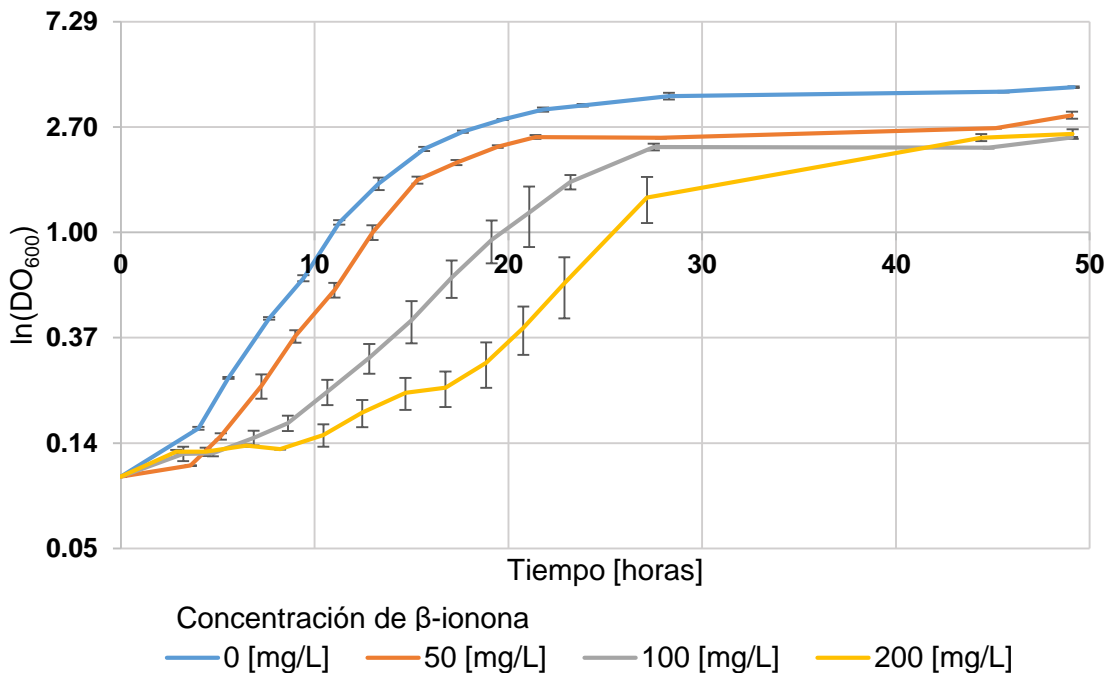
Esta prueba se llevó a cabo con el fin de evaluar la estabilidad de la producción de β -caroteno de las mutantes aisladas, realizando transferencias por varias generaciones en medio YNB. Las mutantes aisladas fueron sembradas en platos de YNB agar e incubadas por 3 días a 30°C. Dos colonias de cada una fueron cultivadas en tubos de ensayo con 3 mL de medio YNB y transferidas cada 48 horas a medio fresco hasta completar 5 transferencias. Esta última, fue incubada por 5 días antes extraer y cuantificar la producción β -caroteno.

3. RESULTADOS

3.1 CURVAS DE CRECIMIENTO

Los cultivos de YLH2 expuestos a β -ionona redujeron su densidad óptica final en promedio un 32% respecto a los cultivos sin β -ionona, los cuales alcanzaron una densidad óptica final de aproximadamente 3.9. Del mismo modo, extendieron su fase de latencia y tardaron mayor tiempo en alcanzar la fase estacionaria, siendo este efecto más notorio en los cultivos con 200 mg/L de β -ionona (Figura 3).

Figura 3. Curvas de crecimiento de YLH2 en medio YNB con diferentes concentraciones de β -ionona



La velocidad de crecimiento específico ($\mu_{m\acute{a}x}$) de YLH2 en los medios de cultivo con concentración de 50 mg/L de β -ionona se mantuvo igual que en los cultivos control

sin β -ionona ($0.24 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$). La mayor inhibición se obtuvo en los cultivos con 100 mg/L y 200 mg/L de β -ionona, cuyas velocidades de crecimiento específico fueron $0.18 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ y $0.18 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Una vez establecido que se lograba el mismo efecto inhibitorio con 100 mg/L β -ionona y 200 mg/L β -ionona, se escogió la menor concentración como presión selectiva para los experimentos de evolución adaptativa, con el fin disminuir el uso de reactivos. Varios autores han reportado el efecto inhibitorio de la β -ionona en el crecimiento de microorganismos como *Geotrichum sp.* y *Aspergillus niger*, en los cuales se encontró inhibición completa del crecimiento con concentraciones de 2 mg/L y 2 g/L, respectivamente. Este compuesto actúa como antifúngico inhibiendo la cadena respiratoria y previniendo el consumo de oxígeno [46, 47].

3.2 PRESIÓN SELECTIVA

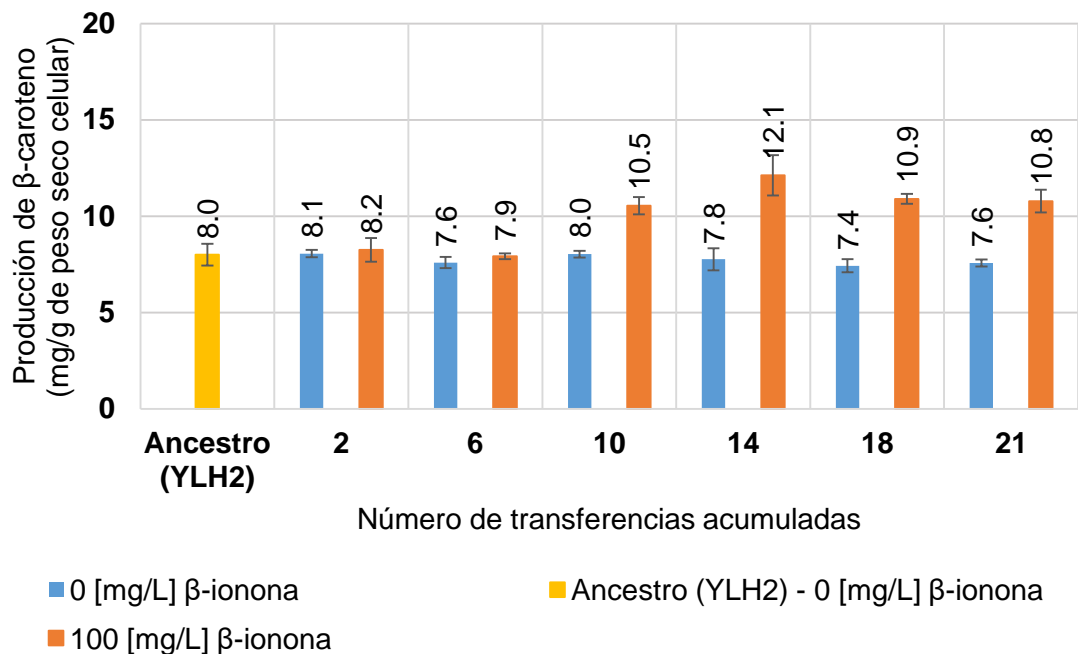
La β -ionona es el estimulador más común de la biosíntesis de β -caroteno a nivel industrial [19, 23]. Varias investigaciones han encontrado que la exposición a β -ionona estimula las primeras etapas de la carotenogénesis en hongos como *Phycomyces blakesleeanus* y *Blakeslea trispora*, encontrándose su sitio de acción en la ruta metabólica del mevalonato, entre la formación del ácido 5-fosfomevalónico y el dimetilalil difosfato (DMAPP), es decir, en la fase de formación de la unidad isoprenoide (IPP), precursora de la síntesis de carotenoides y esteroides [11, 12]. Con base en este conocimiento, se planteó que la propagación a largo plazo de la cepa YLH2 de *S. cerevisiae* en cultivos por lote con concentración constante de 100 mg/L de β -ionona permitiría obtener poblaciones evolucionadas con productividad de β -caroteno mejorada en comparación a la cepa parental.

3.3 EVOLUCIÓN ADAPTATIVA

Los experimentos de evolución adaptativa se extendieron hasta completar 21 transferencias, momento en el que los cultivos alcanzaron 100 generaciones. Cabe

resaltar que en experimentos de este tipo, la literatura sugiere entre 100 y 2000 generaciones para obtener mejoras en los fenotipos deseados [40]. En la Figura 4 se puede apreciar que la producción de β -caroteno de las poblaciones de YLH2 evolucionadas en β -ionona (barras naranja) empezó a incrementar después de la sexta transferencia y alcanzó un pico de 12 ± 1 mg/g de peso seco celular en la transferencia 14. Luego tuvo una tendencia a disminuir hasta alcanzar una producción de 10.8 ± 0.6 mg/g de peso seco celular en la transferencia 21. Según lo esperado, los cultivos sin β -ionona (barras azules) mantuvieron su producción aproximadamente constante.

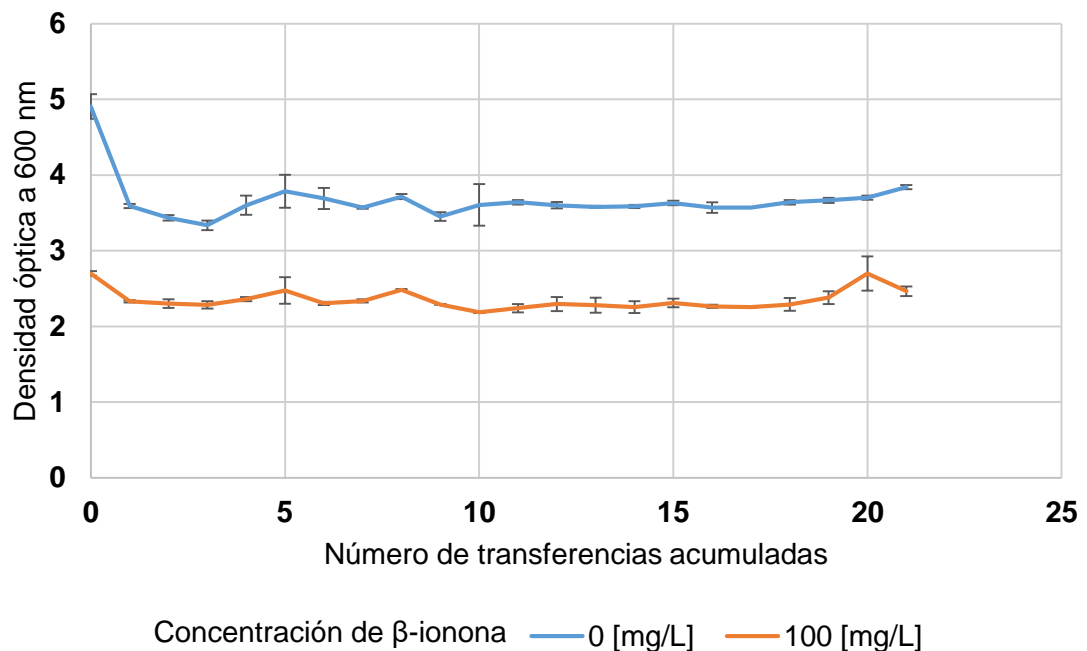
Figura 4. Producción de β -caroteno promedio de las poblaciones de YLH2 durante experimentos de evolución



En la Figura 5, se puede observar que la densidad óptica final, después de 48 horas de incubación, de los cultivos de YLH2 expuestos a β -ionona se mantuvo constante a lo largo de la evolución. Esto un indicador de que no hubo un incremento de la

tolerancia a dicho compuesto. La disminución en la densidad óptica observada entre la transferencia 0 y la transferencia 1 se debe a que el precultivo fue realizado en medio YPD, en el cual las levaduras disponen de más nutrientes que en el medio YNB, y parte de éste fue transferido con el inóculo al medio de cultivo de la transferencia 0, lo cual permitió que ésta alcanzara un mayor crecimiento.

Figura 5. Densidad óptica final promedio de las poblaciones de YLH2 durante experimentos de evolución

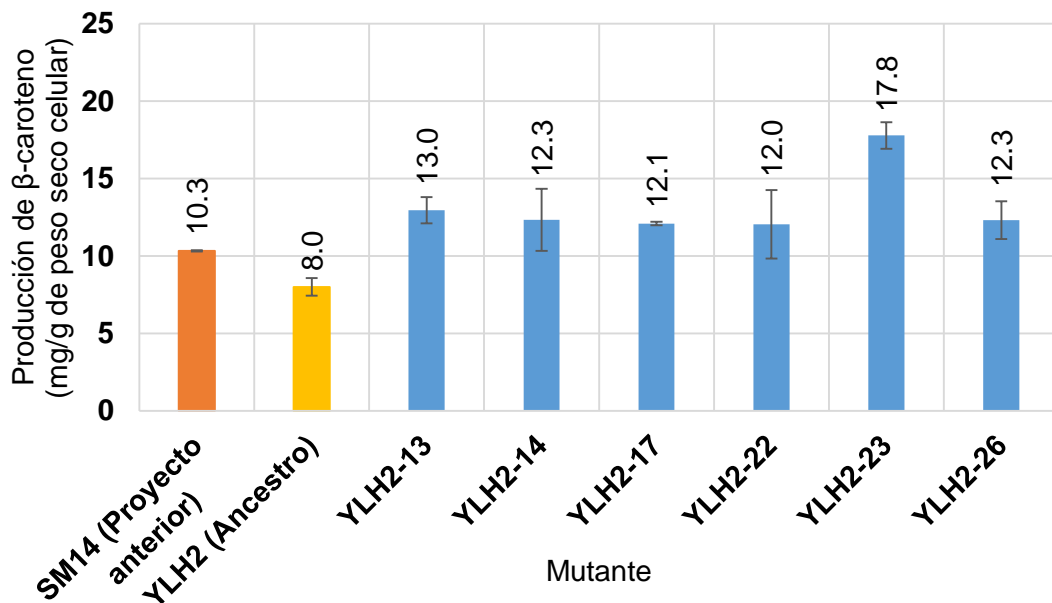


3.4 MUTANTES CON PRODUCCIÓN DE β -CAROTENO MEJORADA

En la Figura 6 se puede apreciar que la estrategia implementada para el aislamiento de mutantes fue satisfactoria, puesto que se logró aislar mutantes con producción de β -caroteno superior a la del promedio de las poblaciones al final de los experimentos de evolución (10.8 ± 0.6 mg/g de peso seco celular). La mutante con mayor producción de todas fue YLH2-23 con una producción de 17.8 ± 0.9 mg/g de

peso seco celular, 2.2 veces mayor que la de la cepa parental YLH2 (8.0 ± 0.6 mg/g de peso seco celular). Del mismo modo, todas las mutantes exhibieron una producción de β -caroteno superior a la de la cepa superproductora de carotenoides SM14, obtenida en este grupo de investigación mediante una estrategia de evolución adaptativa a corto plazo implementando peróxido de hidrógeno como presión selectiva [9]. La producción β -caroteno de la mutante YLH2-23 fue 1.7 veces mayor que la de SM14 (10.30 ± 0.04 mg/g de peso seco celular). Cabe resaltar que la producción reportada en la literatura de 25.52 ± 2.15 mg/g de peso seco celular, alcanzada por SM14 bajo condiciones optimizadas de operación en el biorreactor, difiere de la detectada en tubos de ensayo debido a las diferentes condiciones de cultivo empleadas. Tal producción fue alcanzada empleando medio YNB con una alta relación carbono nitrógeno, la cual está asociada a una mejora en la acumulación de lípidos y carotenoides en levaduras oleaginosas [48]. Otro factor que influyó tal disminución fue la reducida cantidad de oxígeno disuelto en los tubos de ensayo en comparación al biorreactor.

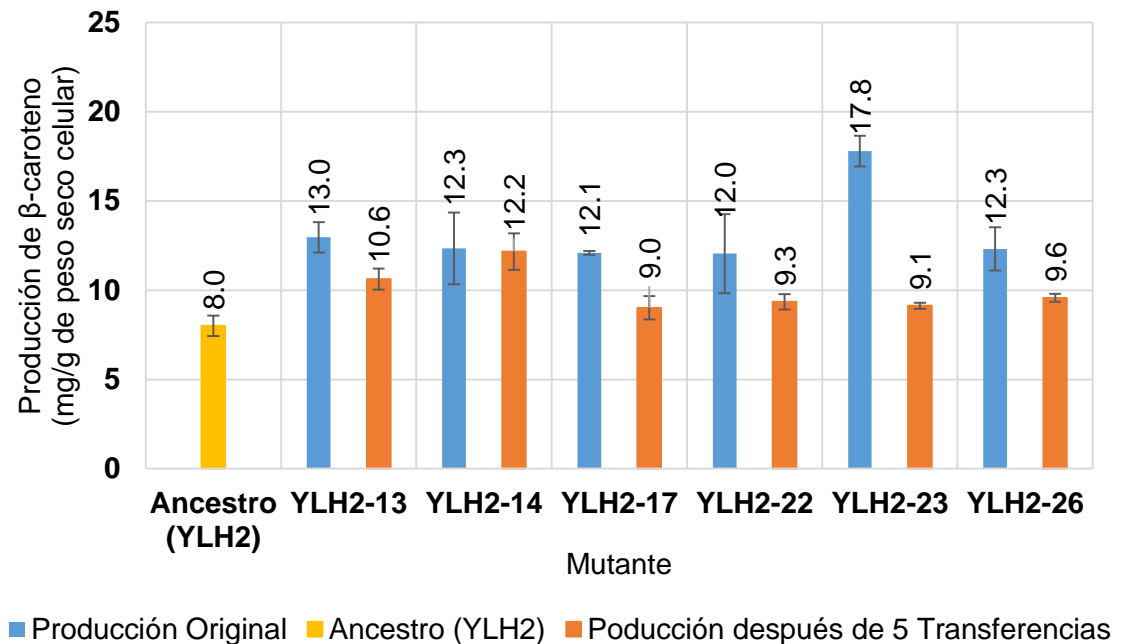
Figura 6. Producción de β -caroteno de las cepas mutantes aisladas



3.5 ESTABILIDAD DE LA PRODUCCIÓN DE β -CAROTENO

En la Figura 7 se puede comparar la producción de β -caroteno de las cepas mutantes luego de 5 transferencias en medio YNB con su producción original. En ella podemos apreciar que la producción de β -caroteno no es estable con el aumento en el número de generaciones, dada su considerable reducción. Tal disminución de la productividad podría ser resultado de inestabilidad genómica debida a múltiples mutaciones del material genético en respuesta al estrés causado por la β -ionona [40, 45]. A pesar de que la tendencia evolutiva de las cepas es a perder la mutación que les confiere el aumento en la producción β -caroteno, se verificó experimentalmente que la producción mejorada detectada en cultivos frescos es constante.

Figura 7. Estabilidad de la producción de β -caroteno de las cepas mutantes después de 5 transferencias



4. CONCLUSIONES

La β -ionona tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* que reduce su producción final de biomasa y extiende su fase de latencia. Durante los experimentos de evolución adaptativa no se observó un aumento en su tolerancia.

La evolución adaptativa utilizando β -ionona como presión selectiva fue efectiva para encontrar cepas de *Saccharomyces cerevisiae* con mayor producción de β -caroteno respecto al ancestro. La cepa YLH2-23 tuvo una producción de β -caroteno de 17.8 ± 0.9 mg/g de peso seco celular, 2.2 veces mayor que la de la cepa parental (8.0 ± 0.6 mg/g de peso seco celular).

En las condiciones de cultivo empleadas, la cepa mutante YLH2-23 produjo 1.7 veces más de β -caroteno que la mejor cepa productora reportada previamente en la literatura SM14 (10.30 ± 0.04 mg/g de peso seco celular), obtenida previamente en este grupo de investigación.

Los resultados de la prueba de estabilidad de producción de β -caroteno sugieren que las mutaciones que confieren la producción mejorada en la cepa YLH2 no son estables con el aumento del número de generaciones.

5. RECOMENDACIONES

Realizar una comparación del ADN de la cepa parental con en el de las mutantes aisladas con el fin de establecer los genes asociados al incremento en la producción de β -caroteno.

Estudiar la producción de β -caroteno de YLH2-23 en un biorreactor bajo las condiciones de operación optimizadas encontradas para SM14. YLH2-23 es una cepa promisoría a acumular mayor cantidad de β -caroteno que SM14.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] JASWIR, Irwandi, et al. Carotenoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011, vol. 5, nro. 33, p. 7119-7131.

[2] NAMITHA, K. y NEGI, P. Chemistry and biotechnology of carotenoids. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2010, vol. 50, nro. 8, p. 728-760.

[3] CORDERO, Baldo, et al. Enhancement of carotenoids biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* by nuclear transformation using a phytoene synthase gene isolated from *Chlorella zofingiensis*. *Applied Genetics And Molecular Biotechnology*. 2011, vol. 91, p. 341-351.

[4] THATTE, Prachi; INDRANI, D y LAKSHMI, Jyothi. Retention and bioaccessibility of β -carotene from natural and synthetic sources on baking. *Journal of Food Quality*. 2011, vol. 34, nro. 6, p.403-412.

[5] ORDOÑEZ, M., et al. Modelling of batch kinetics of aerobic carotenoid production using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Engineering Journal*. 2016, vol. 114, p. 226-236.

[6] YANG, Jianming y GUO, Lizhong. Biosynthesis of β -carotene in engineered *E. coli* using the MEP and MVA pathways. *Microbial Cell Factories*. 2014, vol.13, nro. 1, p. 1-11.

[7] RODRÍGUEZ-SÁIZ, Marta; DE LA FUENTE, Juan Luis y BARREDO, José Luis. *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, vol. 88, nro. 3, p. 645-658.

[8] MATA-GÓMEZ, Luis Carlos, et al. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial cell factories*. 2014, vol. 13, p 1-11.

[9] REYES, Luis; GOMEZ, Jose y KAO, Katy. Improving carotenoids production in yeast via adaptive laboratory evolution. *Metabolic Engineering*. 2014, vol. 21, p. 26-33.

[10] OLSON, Michelle, et al. Characterization of an evolved carotenoids hyper-producer of *Saccharomyces cerevisiae* through bioreactor parameter optimization and Raman spectroscopy. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2016, vol. 43, nro. 10, p. 1355-1363.

[11] VERESHCHAGINA, O; MEMORSKAYA, A y TERESHINA, V. Trisporoids under the stimulation of carotenogenesis in *Blakeslea trispora*. *Microbiology*. 2012, vol. 81, nro. 5, p. 526-533.

[12] LAMPILA, L; WALLEN, S y BULLERMAN, L. A review of factors affecting biosynthesis of carotenoids by the order Mucorales. *Mycopathologia*. 1985, vol. 90, p. 65-80.

[13] CATALDO, Vicente, et al. Chemical vs. biotechnological synthesis of C13-apocarotenoids: current methods, applications and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, vol. 100, nro. 13, p. 5703-5718.

[14] THAKUR, Meenu y AZMI, Wamik. Nutraceutical β -carotene from natural non-conventional sources and its applications. *Annals of Phytomedicine*. 2013, vol. 2, nro. 1, p. 59-73.

[15] JACKSON, Henry; BRAUN, Cristi y ERNST, Hansgeorg. The chemistry of novel xanthophyll carotenoids. *American Journal Of Cardiology*. 2008, vol. 101, nro. 10, p. 50-57.

[16] BOON, Caitlin, et al. Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2010, vol. 50, nro. 16, p. 515-532.

[17] BCC RESEARCH. The global market for carotenoids [En línea]. 2015, Julio. [Citado el 26 de Diciembre de 2016]. Disponible en: <https://goo.gl/TqfDNh>.

[18] GLOBAL MARKETS INSIGHT. Beta carotene: market size, industry analysis report, regional outlook, application development potential, price trend and competitive market [En línea]. Citado el 26 de Diciembre de 2016]. Disponible en: <https://goo.gl/1lqEEu>.

[19] ROUKAS, Triantafyllos. The role of oxidative stress on carotene production by *Blakeslea trispora* in submerged fermentation. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2015, p. 1-10.

[20] RIBEIRO, Bernardo; BARRETO, Daniel y COELHO, Maria. Technological aspects of β -carotene production. *Food and Bioprocess Technology*. 2011, vol. 4, nro. 5, p. 693-701.

[21] LAMERS, Packo, et al. Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010, vol. 106, nro. 4, p. 638-648.

[22] BOROWITZKA, Michael. High-value products from microalgae: their development and commercialization. *Journal of Applied Phycology*. 2013, vol. 25, nro. 3, p. 743-756.

[23] MEHTA, Bina; OBRAZTSOVA, Irina y CERDÁ-OLMEDO, Enrique. Mutants and intersexual heterokaryons of *Blakeslea trispora* for production of β -carotene and lycopene. *Applied And Environmental Microbiology*. 2003, vol. 69, nro. 7, p. 4043-4048.

- [24] SANDMANN, Gerhard. Carotenoids of biotechnological importance. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2015, vol. 148, p. 449-467.
- [25] ZHAO, Jing, et al. Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving β -carotene production. *Metabolic Engineering*. 2013, vol. 17, p. 42-50.
- [26] MIURA, Y, et al. Production of the carotenoids lycopene, β -carotene, and astaxanthin in the food yeast *Candida utilis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998, vol. 64, nro. 4, p. 1226-1229.
- [27] LI, Qian, et al. Enhancing beta-carotene production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering. *Microbiology Letters*. 2013, vol. 345, p. 94-101.
- [28] SUN, Yuxia, et al. Enhanced production of β -carotene in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by inverse metabolic engineering with supplementation of unsaturated fatty acids. *Process Biochemistry*. 2016, vol. 51, p. 568-577.
- [29] VERWAAL, René, et al. High-level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied And Environmental Microbiology*. 2007, vol. 73, nro. 13, p. 4342-4350.

[30] YE, Victor y BHATI, Sujata. Pathway engineering strategies for production of beneficial carotenoids in microbial hosts. *Biotechnology Letters*. 2012, vol. 34, nro. 8, p. 1405-1414.

[31] XIE, Wenping, et al. Construction of lycopene-overproducing *Saccharomyces cerevisiae* by combining directed evolution and metabolic engineering. *Metabolic Engineering*. 2015, vol. 30, p. 69-78.

[32] DAS, Amitabha, et al. An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, vol. 77, nro. 3, p. 505-512.

[33] LIN, Yuheng; JAIN, Rachit y YAN, Yajun. Microbial production of antioxidant food ingredients via metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014, vol. 26, p. 71-78.

[34] KIM, Yeong-Su, et al. Increase of lycopene production by supplementing auxiliary carbon sources in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, vol. 90, nro. 2, p. 489-497

[35] NAM, Hyun-Koo, et al. Increase in the production of b-carotene in recombinant *Escherichia coli* cultured in a chemically defined medium supplemented with amino acids. *Biotechnology Letters*. 2013, vol. 35, nro. 2, p. 265-271.

[36] YAN, Guo-liang, et al. Enhanced Production of β -Carotene by Recombinant Industrial Wine Yeast Using Grape Juice as Substrate. *Current Microbiology*. 2012, vol. 64, nro. 2, p. 152-158.

[37] SHI, Feng, et al. Temperature influences b-carotene production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing carotenogenic genes from *Phaffia rhodozyma*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014, vol. 30, nro. 1, p. 125-133.

[38] BEEKWILDER, Jules, et al. Polycistronic expression of a β -carotene biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae* coupled to β -ionone production. *Journal of Biotechnology*. 2014, vol. 192, p. 383-392.

[39] XIE, Wenping, et al. Construction of a controllable β -carotene biosynthetic pathway by decentralized assembly strategy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2014, vol. 111, nro. 1, p. 125-133.

[40] DRAGOSITS, Martin y MATTANOVICH, Diethard. Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Factories*. 2013, vol. 12, nro. 64, p. 1-17.

[41] LACROIX, Ryan, et al. Use of adaptive laboratory evolution to discover key mutations enabling rapid growth of *Escherichia coli* k-12 mg1655 on glucose minimal medium. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015, vol. 81, nro. 1, p. 17-30.

- [42] QIN, Dandan, et al. An auto-inducible *Escherichia coli* strain obtained by adaptive laboratory evolution for fatty acid synthesis from ionic liquid-treated bamboo hydrolysate. *Bioresource Technology*. 2016, vol. 221, p. 375-384.
- [43] SUN, Xiao-Man, et al. Adaptive evolution of *Schizochytrium* sp. by continuous high oxygen stimulations to enhance docosahexaenoic acid synthesis. *Bioresource Technology*. 2016, vol. 211, p. 374-381.
- [44] GRESHAM, David y DUNHAM, Maitreya. The enduring utility of continuous culturing in experimental evolution. *Genomics*. 2014, vol. 104, p. 399-405.
- [45] PORTNOY, Vasilii; BEZDAN, Daniela y ZENGLER, Karsten. Adaptive laboratory evolution—harnessing the power of biology for metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011, vol. 22, nro. 4, p. 590-594.
- [46] LARROCHE, C; CRUELY, C y GROS, J. Fed-batch biotransformation of β -ionone by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1995, vol. 43, nro. 2, p. 222-227.
- [47] MALDONADO-ROBLEDO, G., et al. Production of tobacco aroma from lutein. Specific role of the microorganisms involved in the process. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003, vol. 62, nro. 5, p. 484-488.

[48] BRAUNWALD, T., et al. Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013, vol. 97, nro. 14, p. 6581-6588.

BIBLIOGRAFÍA

ALKIM, Ceren; TURANLI-YILDIZ, Burcu y ÇAKAR, Z. Evolutionary Engineering of Yeast. En: Mapelli, Valeria. *Yeast Metabolic Engineering: methods and protocols*. New York: Springer New York, 2014, p. 169-183.

BARRICK, Jeffrey y LENSKI, Richard. Genome dynamics during experimental evolution. *Nature Reviews Genetics*. 2013, vol. 14, p. 827–839.

BRENNAN, Timothy, et al. Evolutionary Engineering Improves Tolerance for Replacement Jet Fuels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015, vol. 81, nro. 10, p. 3316-3325.

ELENA, Santiago y LENSKI, Richard. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nature Reviews Genetics*. 2003, vol. 4, nro. 6, p. 457-469.

LÓPEZ, Javiera. Production of β -ionone by combined expression of carotenogenic and plant CCD1 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*. 2015, vol. 14, p. 1-13.

LÓPEZ-MALO, María, et al. Evolutionary engineering of a wine yeast strain revealed a key role of inositol and mannoprotein metabolism during low-temperature fermentation. *BMC Genomics*. 2015, vol. 16, p. 1-15.

PATZSCHKE, Anett, et al. Enhanced glutathione production by evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology Journal*. 2015, vol. 10, nro. 11, p. 1719-1726.

PEABODY, George; WINKLER, James y KAO, Katy C. Tools for developing tolerance to toxic chemicals in microbial systems and perspectives on moving the field forward and into the industrial setting. *Current Opinion in Chemical Engineering*. 2014, vol. 6, p. 9–17.

PORTNOY, Vasiliy; BEZDAN, Daniela y ZENGLER, Karsten. Adaptive laboratory evolution—harnessing the power of biology for metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011, vol. 22, nro. 4, p. 590-594.

REYES, Luis; GOMEZ, Jose y KAO, Katy. Improving carotenoids production in yeast via adaptive laboratory evolution. *Metabolic Engineering*. 2014, vol. 21, p. 26-33.

VACHALI, Preejith; BHOSALE, Prakash y BERNSTEIN, Paul. Microbial carotenoids. En: BARREDO, José-Luis. *Microbial Carotenoids From Fungi: Methods and protocols*. León: Humana Press, 2012, p. 41-61.

VERWAAL, René, et al. High-level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied And Environmental Microbiology*. 2007, vol. 73, nro. 13, p. 4342-4350.

WAHL, Lindi y ZHU, Anna. Survival probability of beneficial mutations in bacterial batch culture. *Genetics*. 2015, vol. 200, p. 309-320.

WALLACE-SALINAS, Valeria y GORWA-GRAUSLUND, Marie. Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, vol. 6, nro. 1, p. 1-9.

WINKLER, James; REYES, Luis H. y KAO, Katy C. Adaptive Laboratory Evolution for Strain Engineering. En: ALPER, Hal. *Systems Metabolic Engineering: Methods and protocols*. Hatfield: Humana Press, 2013, p. 211-222.

ANEXOS

ANEXO A. Medios de cultivo

| Ingredientes para preparar 1 L de Medio de Cultivo | | |
|---|--|---------------------|
| Medio | Componente | Cantidad [g] |
| YNB | Dextrosa | 20 |
| | Base nitrogenada de levadura sin sulfato de amonio y aminoácidos | 1.7 |
| | Sulfato de amonio | 5 |
| YNB Agar | Dextrosa | 20 |
| | Base nitrogenada de levadura sin sulfato de amonio y aminoácidos | 1.7 |
| | Sulfato de amonio | 5 |
| | Agar | 20 |
| YPD | Extracto de levadura | 10 |
| | Peptona | 20 |
| | Dextrosa | 20 |
| YPD Agar | Extracto de levadura | 10 |
| | Peptona | 20 |
| | Dextrosa | 20 |
| | Agar | 20 |