

Caracterización de Mutaciones Puntuales de Poblaciones de Levaduras Evolucionadas
Productoras de B-Caroteno a Través de CRISPR-Cas9

María Alejandra Gómez Rodríguez

Trabajo de Grado para Optar el título de Ingeniera Química

Directores

Katy Kao

Doctor en Ingeniería Química

Viviana Sánchez Torres

Doctor en Ingeniería Química

Codirector

Avinash Godara

Magister en Ingeniería Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Fisicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2019

Dedicatoria

*A mis padres, porque me han brindado su amor, sabiduría
y apoyo incondicional durante toda mi vida.*

*A mi hermano Walter, porque me ha enseñado a soñar
en grande y me ha motivado a alcanzar mis metas.*

A mis hermanas, por llenar de luz y alegría mis días.

A Leo, Ari y Eddy, por toda su ayuda y cariño.

*A mis amigos y cada una de las personas
que contribuyeron de una u otra forma en este logro.*

Agradecimientos

A la Universidad Industrial de Santander, y sus maestros por todas sus enseñanzas.

A la Dra. Katy Kao, profesora de Texas A&M University, por darme la oportunidad de ser parte de su grupo y permitirme conocer el mundo de la investigación.

A M.Sc. Avinash Godara, por compartir sus conocimientos, por su paciencia para enseñarme y guiarme durante el desarrollo experimental de este proyecto.

A la Dra. Viviana Sánchez, por su interés en este proyecto y sus valiosas sugerencias.

A Walter, Leo y Eddy por su ayuda durante mi estadía en EE. UU.

Contenido

	Pág.
Introducción	14
1. Objetivos	16
1.1 Objetivo General	16
1.2 Objetivos Específicos.....	16
2. Marco Teórico.....	17
2.1 Carotenoides	17
2.2 Cepa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> productora de carotenoides	17
2.3 Investigaciones previas desarrolladas en el grupo de investigación.....	19
2.4 Transformación	19
2.4.1 Métodos de transformación.....	20
2.4.2 Técnica CRISPR-Cas9.....	20
2.4.2.1 Plásmido PCRCT.	22
2.4.2.2 Ensamble Golden Gate.	22
3. Metodología	24
3.1 Cepas, plásmidos y condiciones de crecimiento.....	24
3.2 Transformación con la técnica CRISPR-Cas9	25
3.3 Nomenclatura	26

3.4 Curvas de crecimiento.....	27
3.5 Cuantificación de β -caroteno	27
3.6 Choque con peróxido de hidrógeno	28
3.7 Efecto sinérgico entre mutantes puntuales.....	29
3.8 Producción de β -caroteno en un biorreactor	29
4. Resultados y Análisis.....	30
4.1 Transformación con CRISPR-Cas9	30
4.1.1 Verificación del Golden Gate Assembly.	30
4.1.2 Verificación con PCR-ARMS.....	31
4.2 Curvas de crecimiento.....	33
4.3 Cuantificación de β -caroteno	35
4.4 Choque con peróxido de hidrógeno	36
4.5 Efecto sinérgico entre mutantes puntuales.....	38
4.6 Biorreactor	39
5. Conclusiones	41
Referencias Bibliográficas	42
Apéndices.....	46

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Estructura del β -caroteno.....	17
Figura 2. Ruta metabólica del β -caroteno.	18
Figura 3. Evolución adaptativa para aumentar la producción de carotenoides.....	19
Figura 4. Comparación gráfica de los mecanismos de reparación de DSBs, NHEJ y HDR.	21
Figura 5. Flujo de trabajo del Ensamble Golden Gate.....	23
Figura 6. Diagrama de la metodología.....	24
Figura 7. Esquema del proceso de transformación.	26
Figura 8. Resultados de la digestión de restricción. 1: Plásmido pCRCT después de la digestión, 2: Secuencia Ladder, marcador de peso molecular – BioLabs®) 3: Plásmido FLO1 después de la restricción de digestión con la inserción de la secuencia guía y donadora.	31
Figura 9. Resultados de PCR ARMS en gel electroforesis para la mutación puntual en scy1 (FY2). 1-2: Resultados de PCR al usar cebadores wild-type. 3: Marcador de peso molecular. 4-5: Resultados PCR al usar cebadores mutant-type.....	32
Figura 10. Curva de crecimiento para mutaciones puntuales reconstruidas en YLH2 en medio YPD.....	34
Figura 11. Rendimiento de β -caroteno [mg/g peso seco celular].	36
Figura 12. Cepas mutantes reconstruidas en FY2 expuestas a 1 M H_2O_2 por 1 hora.	37
Figura 13. Efecto sinérgico entre mutantes.....	39
Figura 14. Resultados HPLC con H_2SO_4 0.005 M como fase móvil.....	40
Figura 15. Producción de β -caroteno de la cepa YAG28, usando un biorreactor de 1L.	40

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Cepas de levadura transformadas en YLH2 y FY2.	33
Tabla 2. Velocidad específica de crecimiento (μ), fase de latencia y concentración celular después de 24 horas para las diferentes mutaciones puntuales en YLH2.	34

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Preparación medios de cultivo.....	46
Apéndice B. Mutaciones puntuales presentes en las cepas evolucionadas.....	47
Apéndice C. Transformación.....	49
Apéndice D. Curvas estándar para la cuantificación de β -caroteno	52

Glosario

- **Gen:** Segmento específico de ADN que controla la estructura y función celular.
- **Mutación puntual:** Se produce cuando se altera un solo par de bases de la secuencia de ADN.
- **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.
- **Plásmido:** Moléculas de ADN extra cromosómico que se replican y transcriben independientes del ADN cromosómico.
- **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 cebadores.
- **PCR ARMS:** es un método simple para detectar cualquier mutación que involucre cambios de una sola base o pequeñas deleciones. ARMS se basa en el uso de cebadores de PCR específicos de secuencia que permiten la amplificación del ADN de prueba solo cuando el alelo objetivo está contenido dentro de la muestra (Little, 2001). Se hace la comparación de dos reacciones de PCR, una donde se utilizan cebadores complementarios a la secuencia de ADN sin la mutación y otra donde se usan cebadores complementarios a la secuencia de ADN con la mutación.

Resumen

Título: Caracterización de Mutaciones Puntuales de Poblaciones de Levaduras Evolucionadas Productoras de B-Caroteno a Través de CRISPR-Cas9*

Autor: María Alejandra Gómez Rodríguez **

Palabras Clave: β -caroteno; Levadura; Mutación puntual; CRISPR-Cas9.

Descripción:

En previas investigaciones, se obtuvieron las cepas de levadura hiperproductores de β -caroteno SM12, SM13 y SM14, utilizando la estrategia de adaptación evolutiva de laboratorio (ALE) (Reyes, Gomez, & Kao, 2014), donde se hizo la propagación de la cepa ancestro YLH2 por varias generaciones bajo la presión selectiva ejercida por el peróxido de hidrogeno, el cual está relacionado directamente con la propiedad antioxidante del β -caroteno y después se hizo la secuenciación del genoma de estas cepas evolucionadas. En este estudio cada una de las mutaciones puntuales identificadas en las cepas de levadura evolucionadas se reconstruyeron en la cepa ancestro usando la técnica de edición genética CRISPR-Cas9 y se analizaron los rendimientos de producción, la cinética de crecimiento y la tolerancia al estrés oxidativo de los mutantes puntuales reconstruidos. De manera que se logró identificar las mutaciones puntuales responsables del aumento de la producción de β -caroteno. Los resultados mostraron que la mutación puntual presente en la región ymr045c/ymr046c del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* incrementaron significativamente la producción de β -caroteno. Posteriormente, se hizo un análisis del efecto sinérgico de las diferentes mutaciones puntuales donde se logró encontrar una combinación de mutantes que incrementaba en más de un 30% el rendimiento de producción de β -caroteno en comparación con la mejor cepa evolucionada SM14. La producción de la cepa mejorada construida se escaló en un biorreactor de 1 L donde se logró obtener un rendimiento de 39.8 mg/g peso seco celular que fue un 82% mayor en comparación con la cepa SM14 después de 64 horas.

* Trabajo de Grado

** Facultad de ingeniería Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directores: Katy Kao, Doctor en Ingeniería Química, Viviana Sánchez Torres, Doctor en Ingeniería Química. Codirector: Avinash Godara, Magister en Ingeniería Química.

Abstract

Title: Characterization of Point Mutations From Evolved Populations of B-Carotene Producing Yeast Through CRISPR-Cas9*

Authors: María Alejandra Gómez Rodríguez**

Keywords: β -caroteno; Yeast; Point mutation; CRISPR-Cas9.

Description:

In earlier work, β -carotene hyperproducing mutant strains SM12, SM13 and SM14 were obtained using an ALE strategy (Reyes, Gomez, & Kao, 2014), in this process the propagation of YLH2, ancestral yeast strain, was made for several generations under the effect of hydrogen peroxide, which is directly related to the antioxidant property of β -carotene; and then genome sequencing of these evolved strains was made. In this study, the point mutations identified in the evolved yeast strains are reconstructed in the ancestral strain using the CRISPR-Cas9 genetic editing technique and production yields, growth kinetics and oxidative stress tolerance were analyzed for the punctual mutants reconstructed. In this way, it was identified the point mutations responsible for increased β -carotene production. Results revealed several new genetic determinants associated with increased β -carotene production. Specifically, a mutation in the region ymr045c/ymr046c of *Saccharomyces cerevisiae* genome was able to increase the β -carotene production significantly alone. Then, the synergistic effect between different point mutations was studied, where a special combination of mutants was found, which increased the yield of β -carotene production by more than 30% in comparison with the strain SM14 (best producer of the evolved strains). The performance of the improved strain constructed was further quantified using 1 L bioreactor, and a β -carotene yield of 39.8 mg/gdcw, which is ~82% higher compared with the evolved strain SM14 was observed.

* Bachelor Thesis

** Facultad de ingeniería Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directores: Katy Kao, Doctor en Ingeniería Química, Viviana Sánchez Torres, Doctor en Ingeniería Química. Codirector: Avinash Godara, Magister en Ingeniería Química.

Introducción

Los carotenoides son un importante grupo de pigmentos naturales y liposolubles encontrados en plantas y microorganismos, los cuales son la fuente de los colores amarillo, naranja y rojo de muchas plantas. Algunos carotenoides actúan como precursores de vitamina A, así como antioxidantes protectores de membrana que limpian el $^1\text{O}_2$ y atrapan los radicales peroxilo (ROO)(Hernández-Almanza et al., 2016). El estilo de vida actual busca mejorar el valor nutricional y la calidad de los alimentos, así como la sustitución de los colorantes artificiales por naturales, aumentando de esta forma la demanda de carotenoides. Los cuales también son utilizados como medida preventiva para enfermedades como la artritis, diabetes, cáncer, entre otras (Mesquita, Teixeira, & Servulo, 2017). En la industria farmacéutica, actúa como un agente colorante para tabletas, y en la industria cosmética como ingrediente bioactivo de las cremas, que protege las lesiones cutáneas contra la oxidación y la exposición a la radiación UV (Bogacz-Radomska & Harasym, 2018). El mercado mundial de carotenoides alcanzó \$ 1.5 mil millones de dólares en 2017 y se espera que alcance \$ 2.0 mil millones de dólares para 2022, con una tasa de crecimiento anual compuesta de 5.7% durante el período 2017-2022 (McWilliams, 2018).

La forma más antigua de obtener carotenoides es la extracción de material vegetal, basada en procesos fisicoquímicos. La principal desventaja de este método de producción es el alto costo, los determinantes geográficos y la estacionalidad de la materia prima. Actualmente, la producción industrial de carotenoides se ejecuta a través de la síntesis química, la cual se ha utilizado desde su desarrollo en 1950. Sin embargo, de los casi 700 carotenoides naturales, solo unos pocos se

sintetizan a escala industrial y en la producción se generan residuos peligrosos que pueden afectar al medio ambiente (Rodriguez-Concepcion et al., 2018). Estas razones fueron fundamentales para la búsqueda de otro método de producción de carotenoides, donde la biosíntesis microbiana es de gran interés; dado que hay más versatilidad en el uso de sustratos, uso de residuos agroindustriales y la posibilidad del control de las condiciones de operación como pH, temperatura, oxígeno disuelto e intensidad de luz (Mata-Gómez, Montañez, Méndez-Zavala, & Aguilar, 2014).

En un trabajo anterior se logró incrementar la cantidad de β -caroteno producido en la cepa modificada YLH2 de *Saccharomyces cerevisiae* (Moreno, Kao, Reyes, & Sanchez, 2014), aplicando evolución adaptativa de laboratorio (ALE). En este proceso se hizo la propagación de una cepa microbiana por varias generaciones bajo la presión selectiva ejercida por el peróxido de hidrógeno, el cual está relacionado directamente con la propiedad antioxidante del β -caroteno, obteniéndose las cepas productoras mejoradas de β -caroteno con sus respectivos rendimientos SM12 (13 mg/ g peso seco celular), SM13 (12 mg/ g peso seco celular) y SM14 (18 mg/ g peso seco celular) (Reyes, Gomez, & Kao, 2014) Después para cada cepa de levadura evolucionada se identificó la localización de las diferentes mutaciones puntuales, el tipo y sus características. El objetivo principal de este trabajo de grado es introducir por separado cada una de las mutaciones puntuales encontradas en las cepas de levadura SM12, SM13 y SM14, a la cepa ancestro YLH2 usando la técnica CRISPR-Cas9, la cual permite cambiar una secuencia específica en el genoma de cualquier célula de manera muy precisa y controlada, con el fin de determinar si cada una de las mutaciones encontradas en las cepas de levadura evolucionadas tienen una acción positiva o negativa en la producción de β -caroteno.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Introducir por separado cada una de las mutaciones puntuales presentes en SM12, SM13 y SM14 a la cepa de levadura ancestro (YLH2) utilizando la técnica CRISPR-Cas9 con el fin de identificar el efecto de las mutaciones individuales en la producción de β -caroteno.

1.2 Objetivos Específicos

Determinar si se produce un efecto sinérgico entre diferentes combinaciones de las mutaciones puntuales que permita alcanzar una mayor producción de β -caroteno que con la cepa de levadura SM14.

Evaluar la producción de β -caroteno en un biorreactor batch de 1 L con la mejor cepa productora como inóculo.

Introducir por separado cada una de las mutaciones puntuales presentes en SM12, SM13 y SM14 a la cepa FY2 (no productora de carotenoides), para observar el papel que cumplen estas mutaciones en la resistencia al peróxido de hidrógeno sin el efecto antioxidante del β -caroteno.

2. Marco Teórico

2.1 Carotenoides

La mayoría de los carotenoides son tetraterpenoides, compuestos de cuarenta átomos de carbono y dos anillos terminales, formados de ocho unidades de isoprenoides unidas de forma que la molécula es lineal y simétrica (Melendez, Vicario, & Heredia, 2007). Existen más de setecientos tipos de carotenoides descritos, de los cuales cincuenta son precursores de Vitamina A (Cardoso et al., 2017). El β -caroteno, distinguido por tener dos anillos-beta al final de ambos lados de la molécula (Figura 1), es uno de los compuestos más estudiados debido a su actividad antioxidante y a su carácter pro-Vitamina A, siendo ampliamente usado en la industria de alimentos y farmacéutica (Hernández-Almanza et al., 2016).

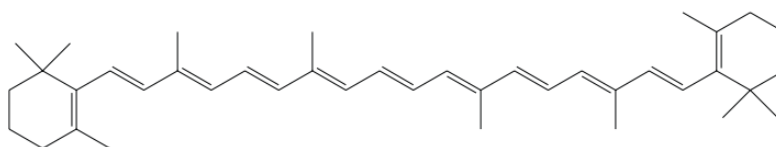


Figura 1. Estructura del β -caroteno. Adaptado de: (Mezzomo & Ferreira, 2016).

2.2 Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* productora de carotenoides

Saccharomyces cerevisiae es una levadura usada en la producción de un amplio rango de productos industriales, debido a su fisiología única, y su tolerancia a pH ácidos y altas concentraciones de sal (Kampranis & Makris, 2012). *S. cerevisiae* es un sistema eucariota de rápido crecimiento, no

patógeno y con características únicas, del cual se conoce la secuencia completa de su genoma, permitiendo su fácil manipulación genética (Ostergaard, Olsson, & Nielsen, 2000). Los genes carotenogénicos integrados en *S. cerevisiae* para la producción de carotenoides son *ctrYB*, *ctrI* y *ctrE*, los cuales son provenientes de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Verwaal et al., 2007). La biosíntesis de carotenoides en eucariotas es realizada por medio de la ruta del mevalonato (Figura 2), donde el acetyl-CoA se convierte a IPP, el cual es isomerizado a DMAAPP, después este compuesto es catalizado por preniltransferasa para obtener GGPP; posteriormente dos moléculas de GGPP son condensadas para formar fitoeno (el primer carotenoide C40 de la ruta) el cual es desaturado para formar licopeno, del cual son derivados carotenoides cíclicos como el β -caroteno, γ -caroteno, toruleno, torularrodina y astaxantina (Das et al., 2007).

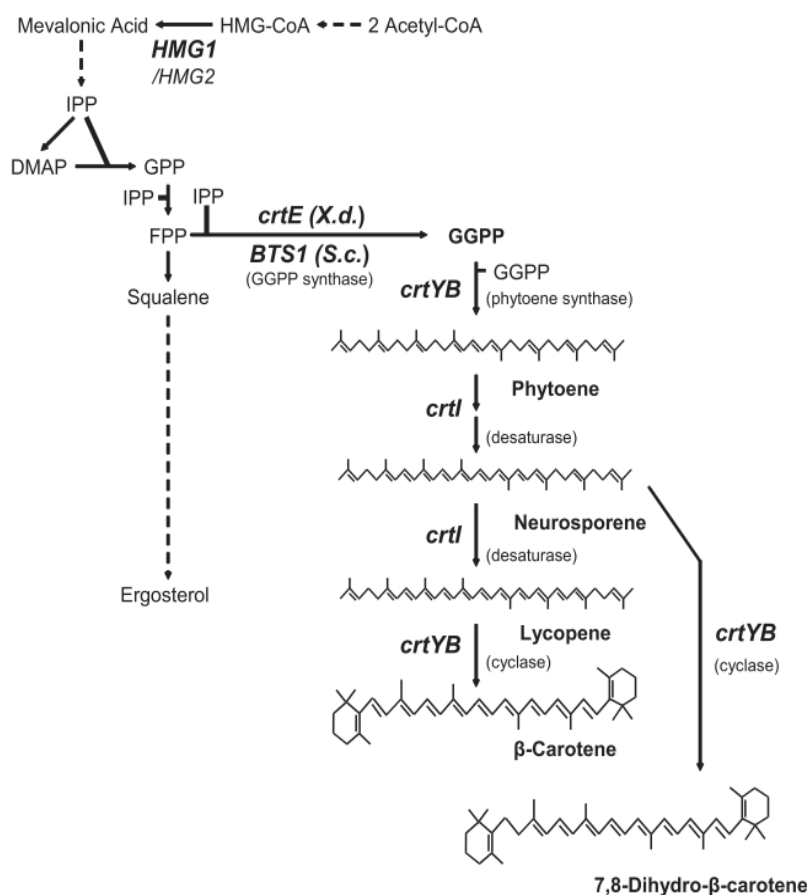


Figura 2. Ruta metabólica del β -caroteno. Adaptado de: (Verwaal et al., 2007).

2.3 Investigaciones previas desarrolladas en el grupo de investigación

En un trabajo anterior (Moreno, Kao, Reyes, & Sanchez, 2014), se logró incrementar la cantidad de β -caroteno producido por una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* modificada mediante evolución adaptativa de laboratorio (Figura 3) usando estrés oxidativo como fuerza impulsora para la evolución, puesto que estos compuestos poseen características antioxidantes. La mayor cantidad de β -caroteno producida después del proceso de evolución fue en la cepa SM14 con un rendimiento de 18 mg/g peso seco celular, tres veces mayor que la producida por su ancestro YLH2 que tiene una producción de 6 mg β -caroteno /g peso seco celular. Otras cepas productoras obtenidas después de la evolución fueron SM12 y SM13 con rendimientos de 13 mg β -caroteno /g peso seco celular y 12 mg β -caroteno /g peso seco celular respectivamente. Después se obtuvo la secuencia del genoma completo de cada una de las cepas evolucionadas y se compararon con el genoma de la cepa ancestro YLH2, de tal forma que se pudo identificar, localizar y caracterizar cada una de las mutaciones puntuales presentes en las cepas evolucionadas.

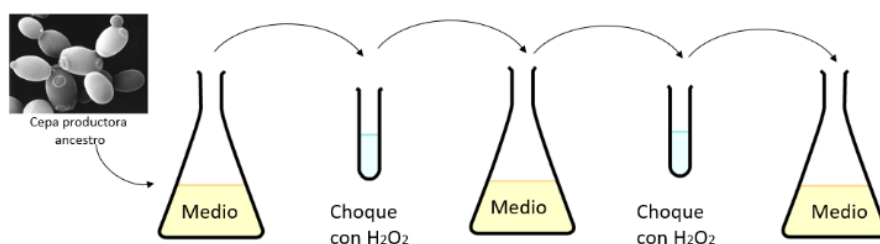


Figura 3. Evolución adaptativa para aumentar la producción de carotenoides.

2.4 Transformación

La transformación es la alteración genética de una célula como resultado de la absorción directa, incorporación y expresión del material genético exógeno (Nicholl, 2008). Para tener como

resultado una transformación exitosa, es necesario que el ADN exógeno atraviese la pared celular y la membrana plasmática, y sea entregado en el citosol de tal forma que logre llegar al núcleo (Kawai, Hashimoto, & Murata, 2010).

2.4.1 Métodos de transformación. Los métodos de transformación más utilizados en la actualidad se pueden clasificar en dos tipos: químicos y físicos. Los métodos químicos están basados en el uso de compuestos químicos cargados que puedan facilitar la transferencia de ADN directamente a la célula. Estos compuestos sintéticos se introducen cerca a la vecindad de las células receptoras, alterando la membrana celular, de manera que amplían el tamaño de los poros y permiten el paso del ADN a la célula. Los compuestos más usados con este propósito son fosfato de calcio, lípidos catiónicos, DEAE dextrano, entre otros (Kawai et al., 2010). Por otro lado, los métodos físicos están basados en la introducción mecánica de las moléculas al interior de la célula, entre ellos están: electroporación, microinyección directa, biolística y otros (Rivera, Magaña-Ortíz, Gómez-Lim, Fernández, & Loske, 2014).

2.4.2 Técnica CRISPR-Cas9. La técnica CRISPR- Cas9 es una herramienta de edición genética, que actúa como unas tijeras moleculares capaces de cortar cualquier secuencia de ADN del genoma de forma específica y permitir la inserción de cambios en la misma (Addgene Team, 2016). Esta técnica tiene tres componentes principales: la enzima endonucleasa Cas9 encargada de cortar la cadena de ADN en una secuencia específica; el ARN guía (gARN), que actúa como guía para que la endonucleasa Cas9 y la secuencia PAM, la cual consiste en una secuencia de tres a cinco nucleótidos en la cadena de ADN a modificar, siendo indispensable para el reconocimiento del objetivo por parte de la endonucleasa, ya que Cas9 no se unirá con éxito o escindirán la secuencia de ADN objetivo si no es seguido por esta secuencia (Pardo P. & Rodríguez B, 2017).

La Cas9 es guiada por el gARN y corta específicamente el ADN de doble cadena en la región concreta deseada; después de que se obtiene la rotura de doble cadena (Double Strand Break - DSB) se inicia el proceso de reparación. La DSB puede repararse mediante dos formas (Figura 4): Non-Homologous End Joining (NHEJ), que produce inserciones y/o eliminaciones en la secuencia de ADN y la Homology-Directed Repair (HDR) en la cual se suministra una secuencia donadora que permite introducir mutaciones precisas en el material genético (Doudna & Charpentier, 2014). En una primera etapa, el gARN, complementario a la región del ADN que se quiere modificar, se asocia con la enzima Cas9 la cual corta el ADN en la región concreta. En la segunda etapa se activan los mecanismos naturales de reparación del ADN fragmentado. Cuando se proporciona a la célula una molécula de ADN que sirva como molde durante la reparación, a la que se ha añadido un cambio, la célula lo copiará y el cambio quedará incorporado en el ADN (Pardo P. & Rodriguez B, 2017).

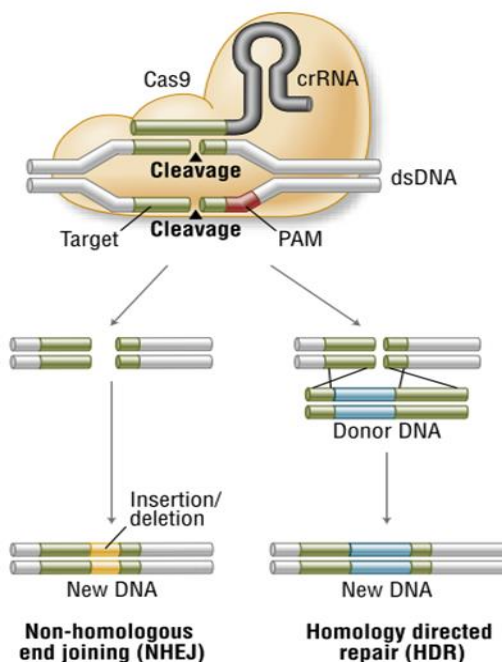


Figura 4. Comparación gráfica de los mecanismos de reparación de DSBs, NHEJ y HDR.

Adaptado de: (Doudna & Charpentier, 2014).

2.4.2.1 Plásmido PCRCT. Para aprovechar al máximo y facilitar el uso de la técnica CRISPR-Cas9, se ha construido un sistema de homología integrada (Homology-Integrated CRISPR-Cas9) obteniéndose el plásmido pCRCT (Bao et al., 2015) el cual contiene la secuencia codificadora de Cas9, bajo el control de un promotor y un terminador funcionales, también presenta un sitio BsaI de inserción del fragmento de ADN codificador del gARN. Es decir, este vector contiene todos los elementos necesarios para la modificación genética con CRISPR-Cas9 a excepción del gARN que va a ser específico de la cadena de ADN de la célula que se va a modificar, por dicha razón este plásmido contiene la enzima de restricción BsaI con el fin de ensamblar el fragmento de gARN por medio del Ensamble Golden Gate.

Adicionalmente este plásmido contiene marcas para hacer la selección después de efectuarse la transformación; para levaduras se tiene la presencia del gen URA3, el cual restaura la actividad de la Orotidina-5'-fosfato descarboxilasa la cual cataliza una reacción en la síntesis de uracilo, permitiendo el crecimiento en medios no suplementados con uracilo. Después de la transformación se usa medio sintético sin uracilo para el crecimiento de las levaduras permitiendo la selección de las colonias que contienen el plásmido (Bergman, n.d.). Por otro lado, para hacer la selección en bacterias se tiene la presencia de un marcador de resistencia a la ampicilina (antibiótico), por lo que las células bacterianas que contienen el plásmido pueden crecer en presencia de ampicilina.

2.4.2.2 Ensamble Golden Gate. El ensamble Golden Gate es un método de clonación molecular que permite ensamblar simultánea y direccionalmente múltiples fragmentos de ADN en una sola pieza utilizando enzimas de restricción Tipo II y ADN ligasa T4 (Figura 5). Inicialmente, se realiza la digestión con la enzima de restricción BsaI en el vector de destino y en el fragmento a insertar,

de tal forma que estos sitios quedan con extremos cohesivos de cuatro bases diseñados para realizar posteriormente el ensamblaje con ayuda de la ADN ligasa T4, la cual es una enzima que forma enlaces covalentes y que realiza la unión de los fragmentos (New England BioLabs, 2016).

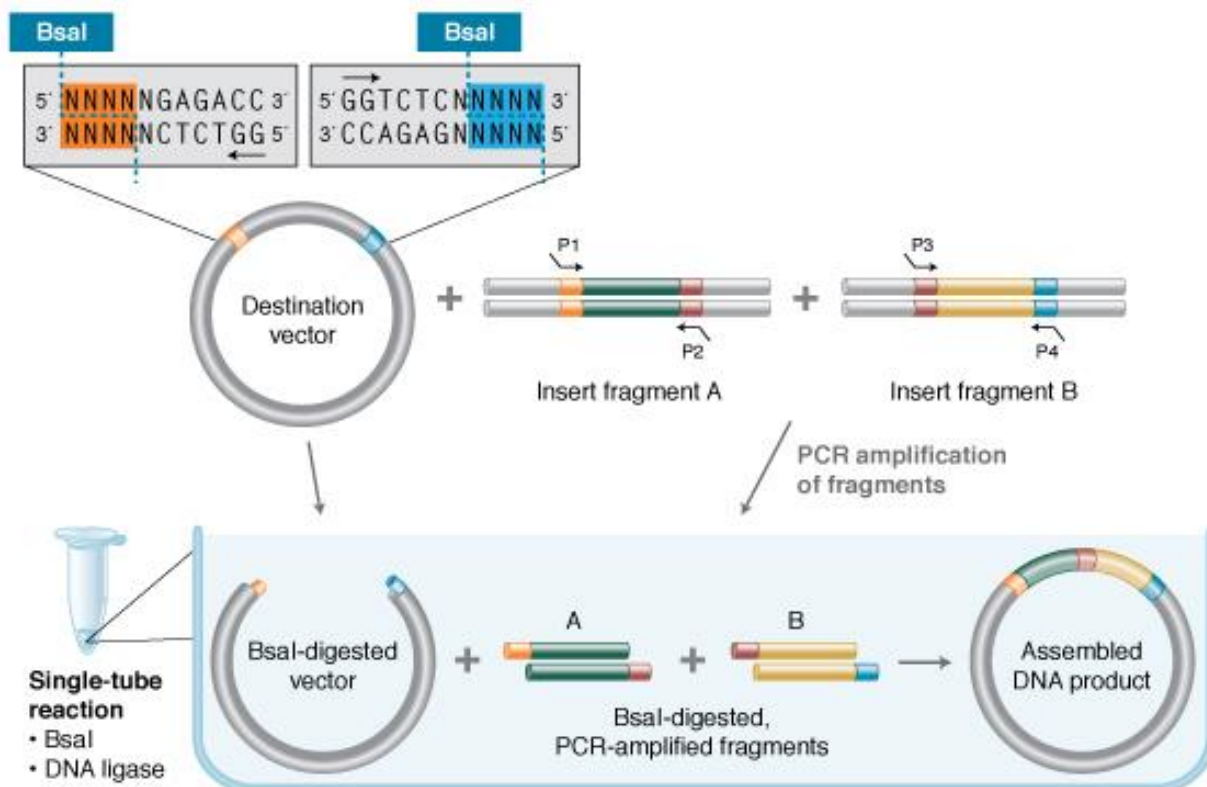


Figura 5. Flujo de trabajo del Ensamble Golden Gate. Adaptado de: (New England BioLabs, 2016).

3. Metodología

En la Figura 6 se puede observar de manera general el diagrama de flujo de la metodología llevada a cabo en este proyecto.

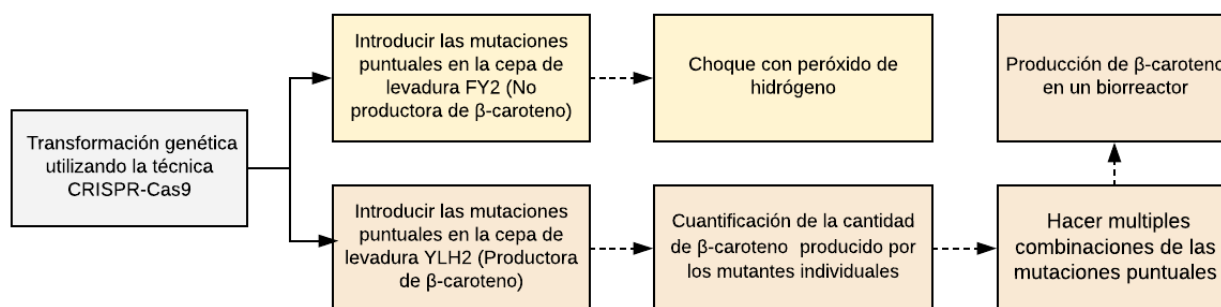


Figura 6. Diagrama de la metodología.

3.1 Cepas, plásmidos y condiciones de crecimiento

Las cepas de *S. cerevisiae* YLH2 (Reyes et al., 2014) y FY2 (Winston, Dollard, & Ricupero-hovasse, 1995) fueron las cepas parentales en este estudio, y la cepa DH5α de *E. coli* se empleó para la clonación. El sistema de plásmido pCRCT se usó para construcciones de CRISPR-Cas9 (Bao et al., 2015). La composición de los medios de cultivo utilizados se puede consultar en el Apéndice A. Las cepas de levadura se cultivaron en medio de cultivo YPD a 30 °C y las bacterias en medio LB con ampicilina a 37 °C. Se utilizaron para la selección de levaduras cajas Petri con medio SC-Ura, el cual contiene todos los aminoácidos necesarios para el crecimiento a excepción del uracilo. Para la selección de bacterias se emplearon cajas Petri con medio LB con ampicilina.

Para el almacenamiento a largo plazo, las células se mantuvieron en tubos criogénicos con 50% de glicerol a -80 ° C.

3.2 Transformación con la técnica CRISPR-Cas9

Las mutaciones puntuales identificadas previamente de las cepas evolucionadas SM12, SM13 y SM14 (Apéndice B) se introdujeron en las cepas YLH2 y FY2 utilizando el sistema CRISPR-Cas9 con Homology-Directed Repair (HDR). La reacción de Golden Gate se usó para ensamblar la secuencia donante y la secuencia guía en el plásmido pCRCT, de tal manera que todos los componentes CRISPR -Cas9 estén en un vector para proceder con la transformación (Figura 7). Las secuencias guía y donadora fueron sintetizadas químicamente por Integrated DNA Technologies – USA, las cuales son diferentes para cada mutación. Seguidamente, el plásmido se transfirió a células competentes de *E. coli* DH5 α y se incubaron durante la noche en platos de LB con ampicilina (100 μ g/ml). La colonia bacteriana transformada con la construcción correcta del plásmido se verificó mediante digestión de restricción y se cultivó durante la noche para la extracción del plásmido con el Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research, USA). Se construyó un plásmido para cada una de las mutaciones (Apéndice C.1).

Las cepas de *S. cerevisiae* YLH2 y FY2 se cultivaron a 30 °C en 5 ml de YPD líquido hasta alcanzar la fase exponencial (5×10^6 - 2×10^7 células/ml o OD600 entre 0.8-1.0), para proceder con la transformación usando el Frozen-EZ Yeast Transformation Kit (Zymo Research), en el cual se aumenta el tamaño de los poros de la pared celular a causa de la presencia de fosfato de calcio. Las células competentes se pusieron en contacto con el plásmido y luego se incubaron en platos

de medio SC-Ura a 30°C. Los platos se incubaron durante tres días, después se verificó la presencia de las mutaciones con el sistema PCR-ARMS (Little, 2001). Las células transformadas se curaron haciendo tres traspasos cada ocho horas a medio de cultivo fresco de YPD y posteriormente se volvió a verificar con amplificación por PCR-ARMS. Consulte el Apéndice C.2. para ver gráficamente el procedimiento realizado.

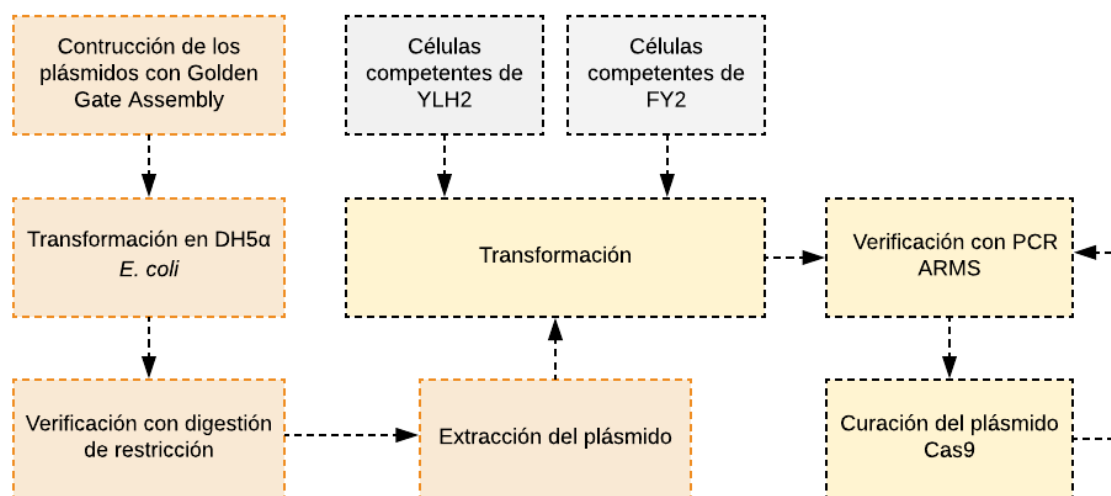


Figura 7. Esquema del proceso de transformación.

3.3 Nomenclatura

La nomenclatura utilizada para cada una de las mutaciones puntuales es la siguiente: a cada mutación puntual le fue asignado un nombre que puede ser consultado en la tabla 1. Cuando se va a hacer referencia a alguna mutación se hablará del gen en el cual se encuentre localizada. Por ejemplo, si se desea hablar de la cepa YLH2 que tiene la mutación presente en el gen *flo1*, se dirá la mutación en *flo1* en YLH2 o se utilizara el nombre que le fue asignado YAG04. Por otro lado, es importante resaltar que la cepa YLH2 es productora de carotenoides y la cepa FY2 no lo es. Las cepas de

FY2 con las diferentes mutaciones puntuales se usaron únicamente para realizar el choque con peróxido de hidrógeno.

3.4 Curvas de crecimiento

Se realizaron las curvas de crecimiento para cada mutación en la cepa parental YLH2, midiendo la absorbancia a 600 nm cada 12 min usando un espectrofotómetro lector de microplacas (TECAN Infinite® M Nano), donde se inocularon 5 µl de cada una de las cepas transformadas en 200 µl de YPD líquido en microplacas a 30 °C y se incubaron durante 48 horas. Se usaron tres replicas biológicas para el análisis.

3.5 Cuantificación de β -caroteno

El procedimiento de cuantificación del β -caroteno se realizó según lo descrito por (Reyes et al., 2014). En resumen, se usó una colonia individual para inocular 5 ml de medio líquido YPD y se hizo crecer durante la noche a 30 °C y 250 rpm, luego se subcultivó en 5 ml de YPD fresco a un OD600 ~ 0.05 y se cultivó durante 72 horas a 30 °C y 250 rpm. Después de 72 h, para todas las muestras se midió la densidad óptica a 600 nm y se centrifugaron 200 µl de cultivo y el sobrenadante se aspiró al vacío. Se agregaron 200 µl de perlas de tamaño de 425 a 600 µm (Sigma), para romper la célula puesto que el β -caroteno es un producto intracelular, y 1 ml de dodecano (TCI America), usado como solvente, la ruptura celular se efectuó usando el Genie Cell Disruptor (Scientific Industries) durante 2 ciclos de 6 minutos para asegurar la ruptura completa. A continuación, la mezcla se centrifugó y 200 µl del sobrenadante se transfirieron a una placa de 96 pozos para mediciones de absorbancia a 454 nm, que corresponden al pico de β -caroteno (Verwaal

et al., 2007) utilizando el lector de microplacas (TECAN Infinite ® M Nano). Se usaron tres réplicas biológicas por cepa.

3.6 Choque con peróxido de hidrógeno

En el experimento de ALE, realizado previamente se utilizó estrés oxidativo como fuerza impulsora (Reyes, Gomez, & Kao, 2014). Por lo tanto, es posible que las mutaciones seleccionadas hayan sido un resultado de la tolerancia al estrés oxidativo en lugar de un alto rendimiento de β -caroteno, y que el incremento en la producción hubiese sido un efecto secundario. Con el fin de aclarar lo que paso realmente en el experimento de ALE, se llevó a cabo el choque con peróxido de hidrógeno en la cepa de levadura FY2, la cual no es productora de β -caroteno; de manera que la tolerancia a la oxidación es el resultado únicamente de la presencia de la mutación puntual y no del efecto antioxidante del β -caroteno.

El choque con peróxido de hidrógeno se realizó de la siguiente forma: cada uno de los mutantes puntuales se inoculó en 5 ml de medio líquido de YPD y se incubó durante 72 horas a 30 °C y 200 rpm, con el fin de que todas las cepas mutadas estuvieran a punto de llegar a la fase estacionaria de su crecimiento. Las muestras se normalizaron a un $OD_{600} \approx 1.0$. Se transfirieron 500 μ l de cultivo a un tubo de microcentrífuga, se centrifugaron y se extrajo el sobrenadante. Los pellets de células se expusieron a una concentración 1 M de peróxido de hidrógeno durante 1 hora en una incubadora con agitación a 30 °C y se usó una réplica sin choque como control. Después, se hicieron diluciones seriadas de las muestras en PBS, 5 μ l de cada dilución fueron sembrados en platos de YPD e incubados por 48 h a 30 °C.

3.7 Efecto sinérgico entre mutantes puntuales

La existencia de interacciones sinérgicas potenciales entre las mutaciones puntuales en la producción se evaluó mediante un modelo aditivo. Se realizaron múltiples combinaciones entre las mutaciones puntuales para determinar si existe un efecto sinérgico entre el acoplamiento de dos o tres mutaciones dando como resultado una mayor producción de β -caroteno que las mutaciones individuales. Las combinaciones se realizaron teniendo en cuenta la cantidad de β -caroteno producido por los mutantes individuales. Esta combinación se realiza haciendo las transformaciones adicionales necesarias después de que la mutación se encuentra incorporada al material genético. Por ejemplo, a la mutación en el gen *dak2/aqy3* en YLH2 se le inserta el plásmido *pALG6* con el mismo procedimiento descrito en la sección 3.2. para obtener la combinación de mutaciones puntuales en los genes *dak2/aqy3* y *alg6* incorporada al material genético de la célula. Si se desea agregar la mutación en el gen *ymr045c/ymr046c*, se realiza el mismo procedimiento explicado anteriormente. Después se hace la cuantificación de la cantidad de β -caroteno producido por estas cepas construidas con la metodología explicada en la sección 3.5.

3.8 Producción de β -caroteno en un biorreactor

Este estudio se realizó para observar el comportamiento en la producción de carotenoides a gran escala. El cultivo para la fermentación se preparó de la siguiente manera: la combinación de tres mutaciones puntuales en los genes *dak2/aqy3*, *alg6* y *ymr045c/ymr046c* en la cepa YLH2 se inoculó en 3 ml de medio YPD y se incubó a 30 °C con una agitación constante de 250 rpm. El

contenido de este cultivo se utilizó para inocular 50 ml de medio YPD e incubar en las mismas condiciones. El cultivo de 50 ml se utilizó para inocular un biorreactor de vidrio de 3 L con 1 L de medio líquido YPD. El biorreactor se corrió por 72 horas, el OD₆₀₀ inicial se ajustó a 0.05, la temperatura a 29.5 ° C, el pH se mantuvo en 4.0 agregando HCl 2 N o NaOH 2 N según fuera necesario, con agitación de 800 rpm y un flujo de aire constante de 2.6 L/min. La concentración de glucosa, ácido acético y etanol a lo largo de la fermentación en el biorreactor se evaluó mediante cromatografía líquida de alta eficacia - HPLC (Agilent 1200 Series Technologies®). El análisis se llevó a cabo con H₂SO₄ 0.005 M como fase móvil y un caudal de 0.6 ml/min a 50 ° C usando un detector de RI.

4. Resultados y Análisis

4.1 Transformación con CRISPR-Cas9

4.1.1 Verificación del Golden Gate Assembly. La digestión de restricción es el proceso de cortar moléculas de ADN en fragmentos más pequeños con enzimas especiales llamadas endonucleasas de restricción (Engler, Kandzia, & Marillonnet, 2008). En la Golden Gate Assembly se usó BsaI como sitio de restricción, por lo tanto, para su verificación el plásmido construido se cortó con esta enzima para hacer una comparación con el plásmido original pCRCT en electroforesis en gel. Cuando se hace la digestión de restricción con BsaI del plásmido pCRCT se obtienen dos fragmentos: uno que va a tener una longitud de 459 bp y otro que va a tener 10346 bp, donde se encuentran todos los elementos de CRISPR-Cas9. Por ejemplo, en los resultados de

electroforesis en gel para el plásmido FLO1 (Figura 8), después de la digestión de restricción se obtuvieron dos fragmentos, el primer fragmento que tiene 10346 bp, siendo la parte del plásmido que contiene los elementos de CRISPR-Cas9, y otro que tiene 132 bp, el cual es la longitud de la secuencia guía y donadora del plásmido FLO1. Al comparar los dos fragmentos pequeños del pCRCT y pFLO1 se puede evidenciar que efectivamente se dio el ensamble Golden Gate, porque la longitud del fragmento de FLO1 es menor a la del pCRCT. Se realizó el mismo proceso de verificación para todos plásmidos construidos.

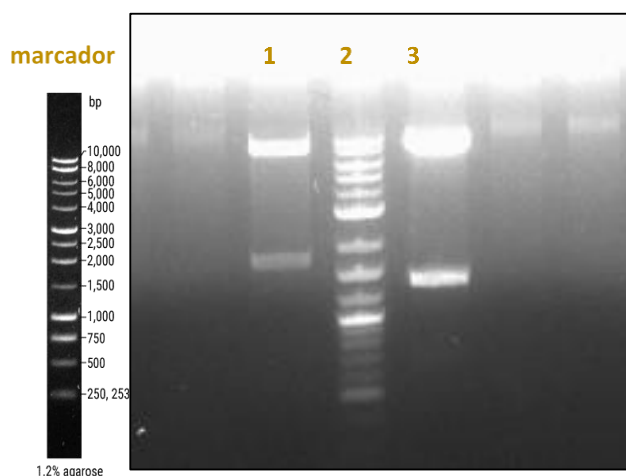


Figura 8. Resultados de la digestión de restricción. 1: Plásmido pCRCT después de la digestión, 2: Secuencia Ladder, marcador de peso molecular – BioLabs®) 3: Plásmido FLO1 después de la restricción de digestión con la inserción de la secuencia guía y donadora.

4.1.2 Verificación con PCR-ARMS. La transformación se verificó con PCR ARMS. ARMS se basa en el uso de cebadores de PCR específicos de secuencia que permiten la amplificación del ADN de prueba solo cuando el alelo objetivo está contenido dentro de la muestra (Little, 2001). Después de tres días de incubación, se seleccionaron las colonias más pequeñas en los platos Petri para realizar la verificación de PCR-ARMS. Como ejemplo, se muestran en la Figura 9 los

resultados del PCR-ARMS para la mutación presente en el gen *scy1* en FY2, donde se seleccionaron y analizaron dos colonias diferentes; en este caso el ADN de las colonias fue amplificado con PCR usando cebadores complementarios a la secuencia de ADN sin la mutación (*wild-type*) y cebadores complementarios a la secuencia que contiene la mutación (*mutant-type*), al hacer esta comparación se evidencia que la transformación fue efectiva porque la amplificación con el cebador *mutant-type* presenta una línea bien definida en el gel, es decir que la mutación está presente porque se dio la amplificación, a diferencia del *wild-type* que no mostró ninguna. Este procedimiento de verificación se realizó para todas las transformaciones en YLH2 y FY2.

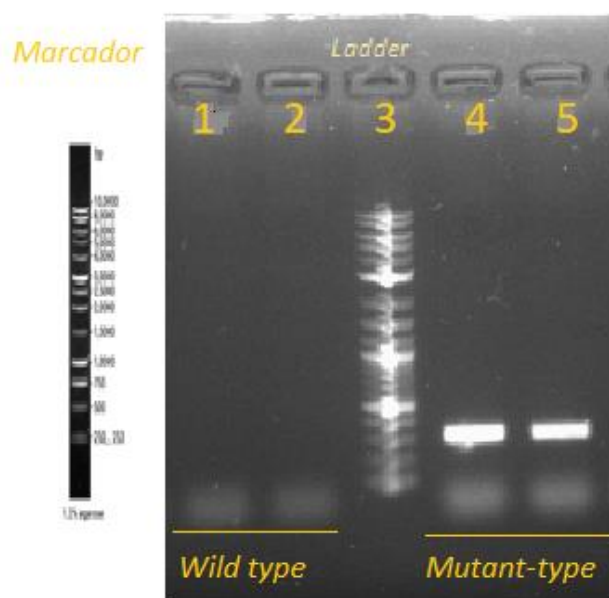


Figura 9. Resultados de PCR ARMS en gel electroforesis para la mutación puntual en *scy1* (FY2). 1-2: Resultados de PCR al usar cebadores *wild-type*. 3: Marcador de peso molecular. 4-5: Resultados PCR al usar cebadores *mutant-type*.

En la tabla 1. Se encuentra el resumen de todas las transformaciones realizadas y el nombre asignado a cada una dependiendo de las cepas parentales YLH2 y FY2 en las que se encuentra.

Tabla 1.

Cepas de levadura transformadas en YLH2 y FY2.

Plásmido	Resultado transformación	Cepa mutada de YLH2	Cepa mutada de FY2
pHIS7	Mutación en el <i>gen his7</i>	YAG01	YAG31
pSRO9/GFD2	Mutación en el <i>gen sro9/gfd2</i>	YAG02	YAG32
pTYE7	Mutación en el <i>gen tye7</i>	YAG03	YAG33
pFLO1	Mutación en el <i>gen flo1</i>	YAG04	YAG34
pAQY3/DAK2*	Mutación en el <i>gen DAK2/AQY3</i>	YAG05	YAG35
pSCY1	Mutación en el <i>gen SCY1</i>	YAG06	YAG36
pEPL1*	Mutación en el <i>gen EPL1</i>	YAG07	YAG37
pALG6*	Mutación en el <i>gen ALG6</i>	YAG08	YAG38
pMDS3*	Mutación en el <i>gen MDS3</i>	YAG09	YAG39
pYMR045C/YMR046C	Mutación en el <i>gen en ymr045c/ymr046c</i>	YAG10	YAG40

Nota: *Estas transformaciones fueron realizadas previamente para la cepa parental YLH2.

4.2 Curvas de crecimiento

Se realizaron las curvas de crecimiento para la cepa parental y las cepas con las diferentes mutaciones puntuales en YLH2 (Figura 10), igualmente se calculó la velocidad específica de crecimiento máxima (μ), el tiempo de fase de latencia y la cantidad de células presentes después de 24 h (Tabla 3). Los resultados de la cinética de crecimiento no mostraron diferencias significativas en las tasas de crecimiento específicas (μ) de ninguno de los mutantes reconstruidos en comparación con la cepa parental YLH2. Sin embargo, la duración de la fase de latencia durante el crecimiento disminuyó en la mayoría de mutantes reconstruidos en comparación con la cepa YLH2. Las mutaciones YAG08 y YAG10 redujeron notablemente el tiempo de fase de latencia a 4.56 h y 2.17 h respectivamente en comparación a la cepa parental YLH2 que tiene un tiempo de fase de latencia de 15.05 h. La mutación YAG10 también condujo a un aumento de la

concentración celular a partir de las 24 horas de crecimiento, debido a la reducción de la fase de latencia y la fase exponencial más larga que presenta.

Tabla 2.

Velocidad específica de crecimiento (μ), fase de latencia y concentración celular después de 24 horas para las diferentes mutaciones puntuales en YLH2.

Cepa	μ [h ⁻¹]	Fase de latencia [h]	OD ₆₀₀ a las 24 h
YLH2 (<i>Cepa parental</i>)	0.09	15.05	0.25
YAG01	0.08	12.68	0.24
YAG02	0.09	13.73	0.24
YAG03	0.08	12.87	0.24
YAG04	0.11	13.07	0.28
YAG05	0.07	15.02	0.20
YAG06	0.07	14.07	0.22
YAG07	0.08	14.07	0.22
YAG08	0.08	4.56	0.25
YAG09	0.08	13.07	0.24
YAG10	0.08	2.17	0.48

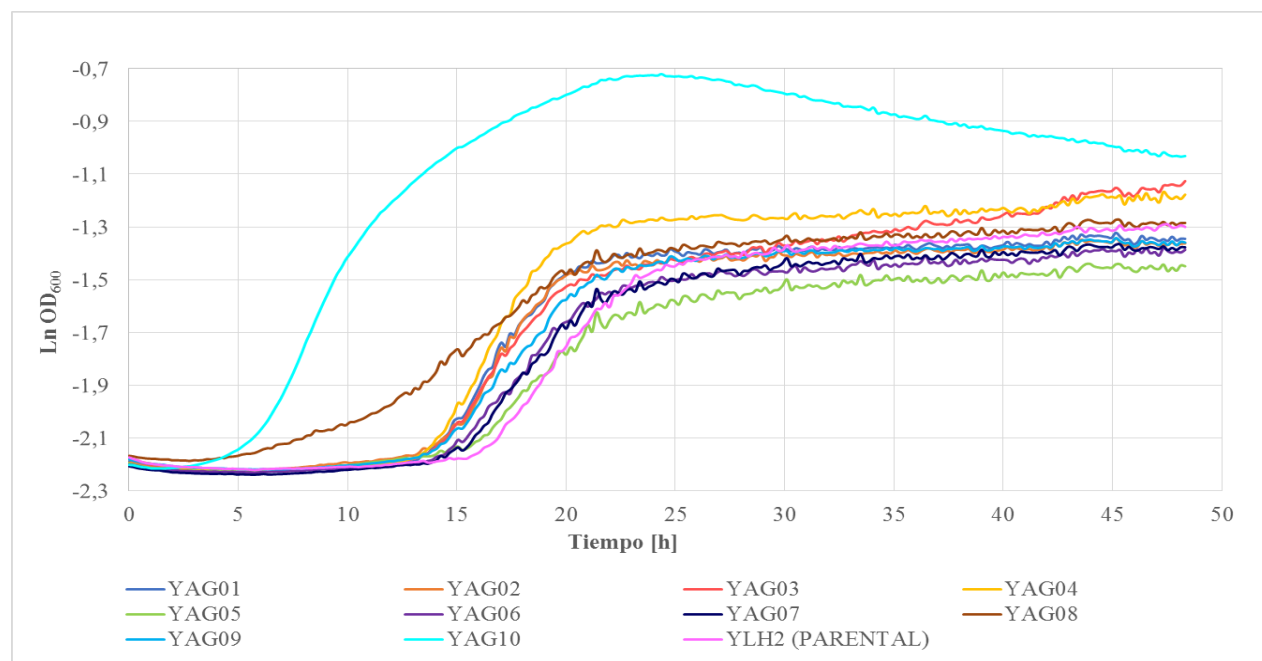


Figura 10. Curva de crecimiento para mutaciones puntuales reconstruidas en YLH2 en medio YPD.

4.3 Cuantificación de β -caroteno

Una curva estándar para la cuantificación se generó usando β -caroteno disponible comercialmente (Enzo Life Sciences) y otra curva estándar para relacionar densidad óptica a 600 nm con la concentración de biomasa (Apéndice D). Estas curvas de calibración fueron correlacionadas con los resultados obtenidos de las densidades ópticas a 600 nm y 454 nm de las cepas analizadas con el fin de obtener el rendimiento en unidades de [mg β -caroteno /g peso seco celular].

La cuantificación de β -caroteno (Figura 11) reveló que el rendimiento de estas mutaciones puntuales reconstruidas es mayor que el de la cepa parental YLH2 (6 mg/g peso seco celular) a excepción de la cepa YAG01 que mostró un rendimiento de 3.67 mg/g peso seco celular. Las cepas YAG06 y YAG09 mostraron un rendimiento de 10.07 mg/g peso seco celular y 10.47 mg/g peso seco celular respectivamente siendo menor al producido por la cepa evolucionada SM13 (12 mg/g peso seco celular). Por otro lado, la cepa YAG10 presente en la región *ymr045c/ymr046c*, mostró un rendimiento de 20.49 mg/g peso seco celular, siendo superior al de la mejor cepa productora evolucionada SM14 (18mg/g peso seco celular). Las mutaciones puntuales presentes en los genes *ep11*, *aqy3/dak2* y *flo1* tienen una acción positiva en la producción de β -caroteno, siendo mayor al rendimiento de la cepa evolucionadas SM13 (12 mg/g peso seco celular), igualmente las mutaciones presentes en los genes *alg6*, *tye7* y *sro9/gfd2* mostraron una producción significativa en la producción de β -caroteno superando el rendimiento de la cepa evolucionada SM12 (13 mg/g peso seco celular).

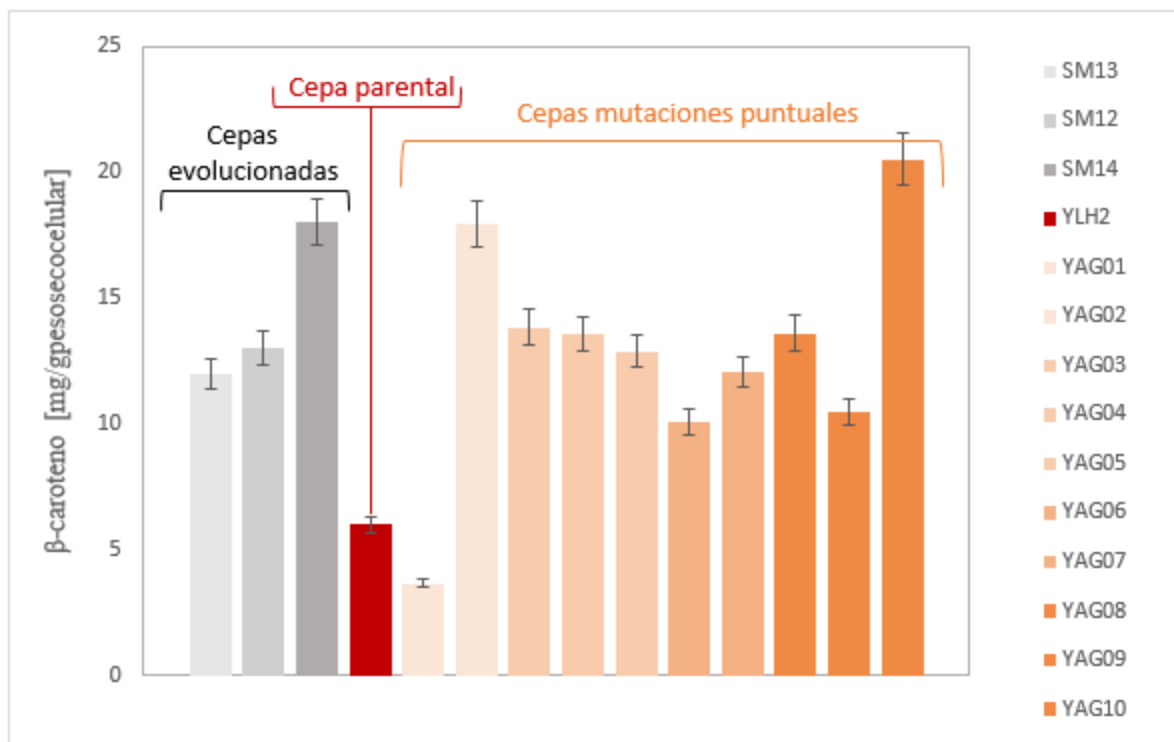


Figura 11. Rendimiento de β -caroteno [mg/g peso seco celular].

4.4 Choque con peróxido de hidrógeno

Para determinar si la tolerancia al estrés oxidativo de las cepas evolucionadas fue un resultado de la alta producción β -caroteno o si este hubiese sido un efecto secundario se realizó choque con 1 M de H_2O_2 a las diferentes mutaciones puntuales en FY2, (cepa no productora de β -caroteno), de manera que la tolerancia a la oxidación es el resultado únicamente de la presencia de la mutación puntual y no del efecto antioxidante del β -caroteno. Como se observa en la Figura 12, ninguna de las mutaciones analizadas confirió una mayor tolerancia al estrés con H_2O_2 . Las mutaciones presentes en el gen *sro9/gfd2* y la región *ymr045c/ymr046c* mostraron el mayor rendimiento de β -caroteno en la cepa parental YLH2, en la cepa parental FY2 estas mismas mutaciones YAG32 y YAG40 respectivamente causaron una reducción significativa en la tolerancia al H_2O_2 . Los

resultados también mostraron que la mutación en el gen *his7* (YAG31) no tuvo un efecto significativo sobre la tolerancia al estrés oxidativo. La mutación intergénica en *dak2/Aqy3* (YAG35) tampoco condujo a un aumento de la tolerancia al H_2O_2 . Con base a los resultados obtenidos, se evidencia que la estrategia ALE seleccionó con éxito las mutaciones que confirieron específicamente una mayor producción del producto deseado con propiedades antioxidantes, en lugar de una mayor tolerancia al estrés oxidativo.

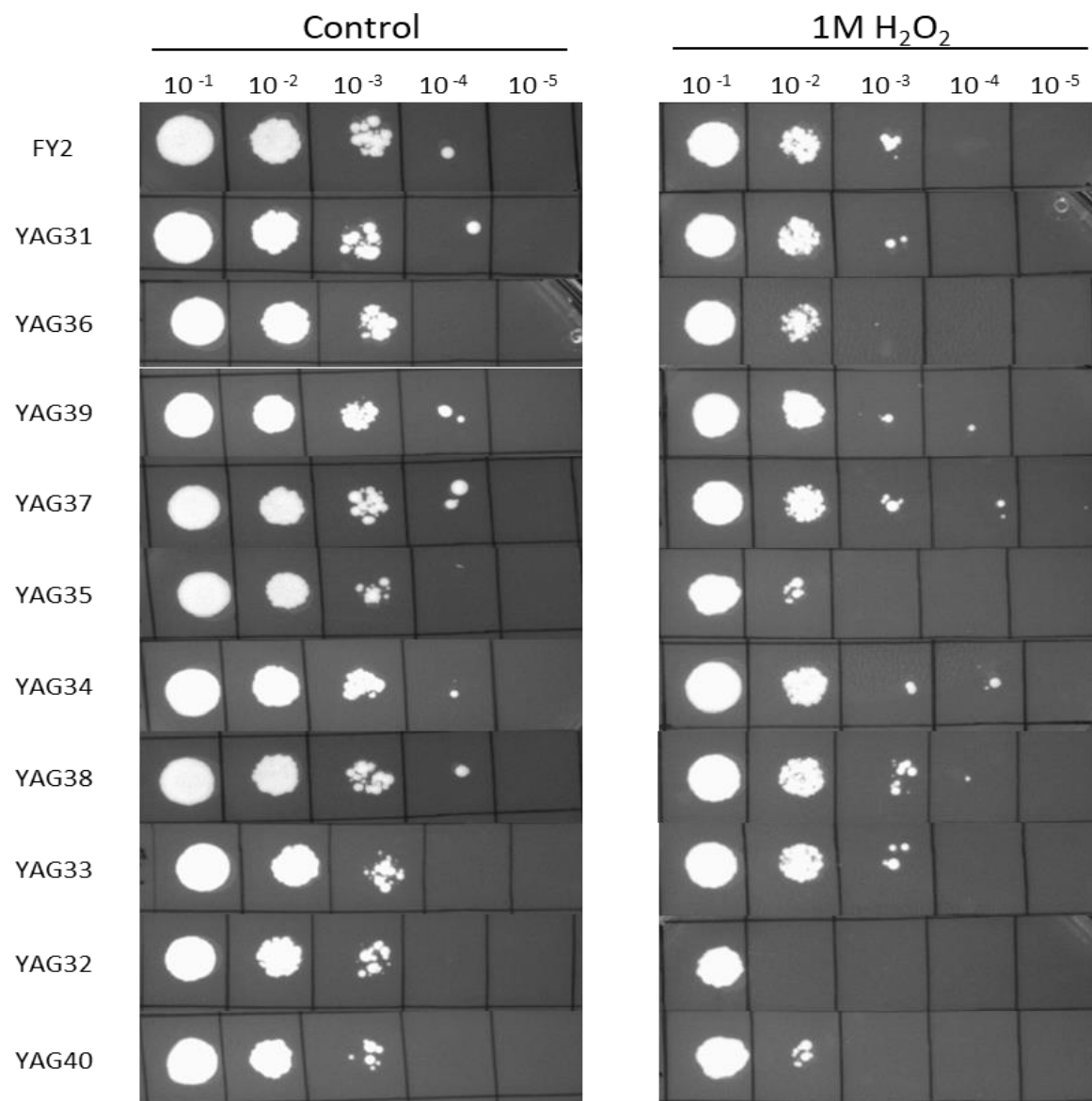


Figura 12. Cepas mutantes reconstruidas en FY2 expuestas a 1 M H_2O_2 por 1 hora.

4.5 Efecto sinérgico entre mutantes puntuales

El efecto sinérgico existe si la combinación de dos o más mutaciones muestra un mejor resultado para el rendimiento general de β -caroteno que el de la mutación individual. Dado que se identificaron múltiples mutaciones que tienen efectos beneficiosos en el rendimiento del β -caroteno, se generaron combinaciones de las mutaciones puntuales identificadas en SM12, SM13 y SM14. En la Figura 13, se observan los dos mejores resultados después de hacer las combinaciones.

El rendimiento de la cepa YAG28, la cual contiene las mutaciones presentes en *ymr045c/ymr046c*, *alg6* y *aqy3/dak2* reconstruidas en YLH2 tiene un incremento en la producción de β -caroteno, obteniéndose un rendimiento de 24.87 mg/g peso seco celular, el cual es aproximadamente 21% mayor que el obtenido por la mejor mutación puntual productora YAG10 y aproximadamente un 38% mayor que el de la cepa evolucionada SM14. La cepa YAG30 obtenida después de la combinación de mutaciones en *ymr045c/ymr046c*, *sro9* y *alg6*, *epl1*, *aqy3/dak2*, también mostró una mejora en el rendimiento de la producción de β -caroteno en comparación con las mutaciones individuales.

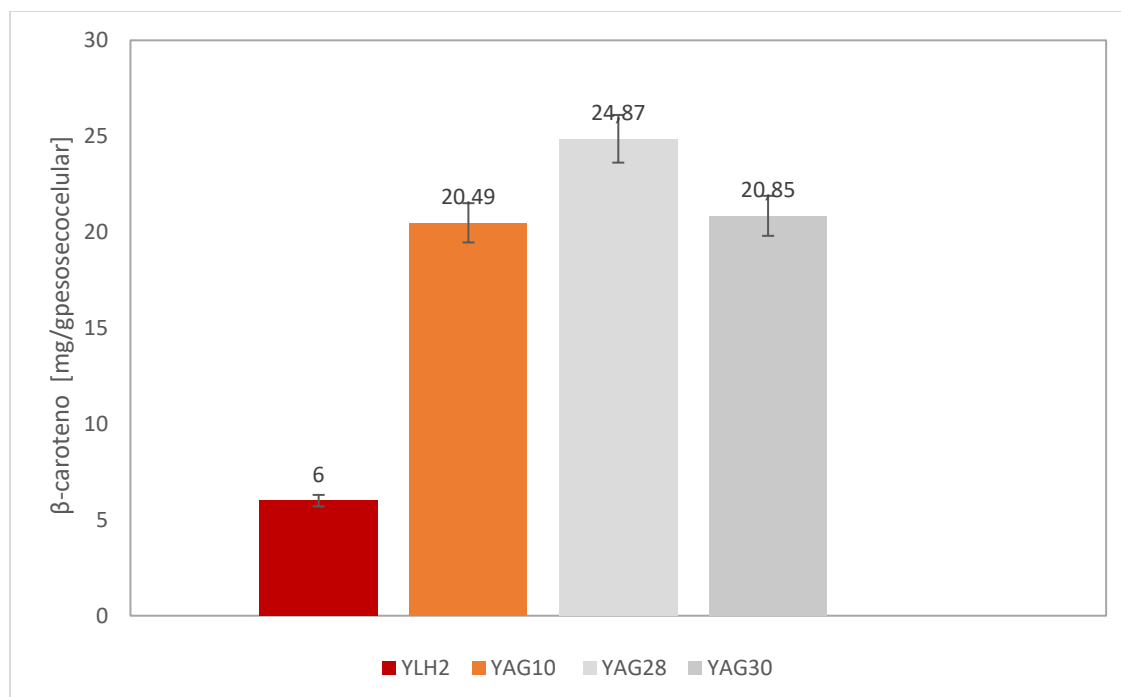


Figura 13. Efecto sinérgico entre mutantes.

4.6 Biorreactor

Al analizar el efecto sinérgico entre mutantes se obtuvo la cepa productora mejorada YAG28, esta cepa recombinada se seleccionó para inocular un reactor batch con YPD como medio de cultivo con el fin de maximizar la producción de β -caroteno. Esta cepa produjo 39.78 mg/g peso seco celular después de 64 horas. Al hacer la verificación con HPLC (Figura 14) se evidenció que después de 24 horas, la cantidad de glucosa en el medio casi se consumió y el etanol acumulado empezó a consumirse lo que permitió incrementar la tasa de producción y alcanzar una producción de β -caroteno de 45.62 mg /gdcw a las 38 horas como se muestra en la Figura 15.

La cepa YAG28 mostró un rendimiento de 39.8 mg/g peso seco celular que fue aproximadamente un 82% mayor en comparación con la cepa SM14 (20.7 mg /gdcw) después de

64 horas. Igualmente, esta cepa mostró un mayor crecimiento en el fermentador, alcanzando un OD₆₀₀ alrededor de 20 en comparación con la cepa SM14 que solo alcanza un OD₆₀₀ de 17 después de 64 horas.

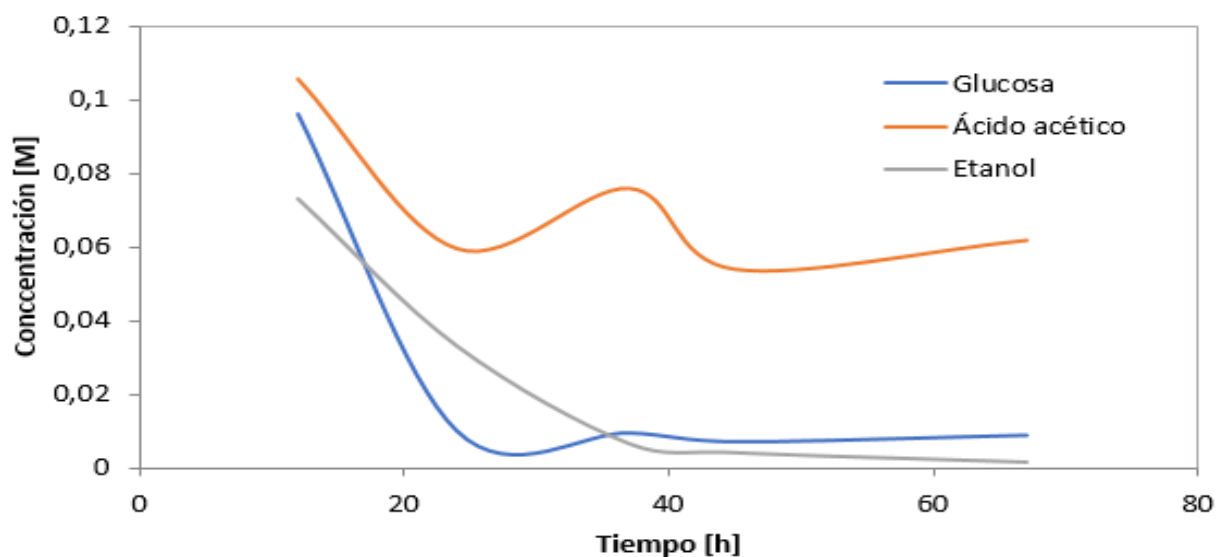


Figura 14. Resultados HPLC con H₂SO₄ 0.005 M como fase móvil.

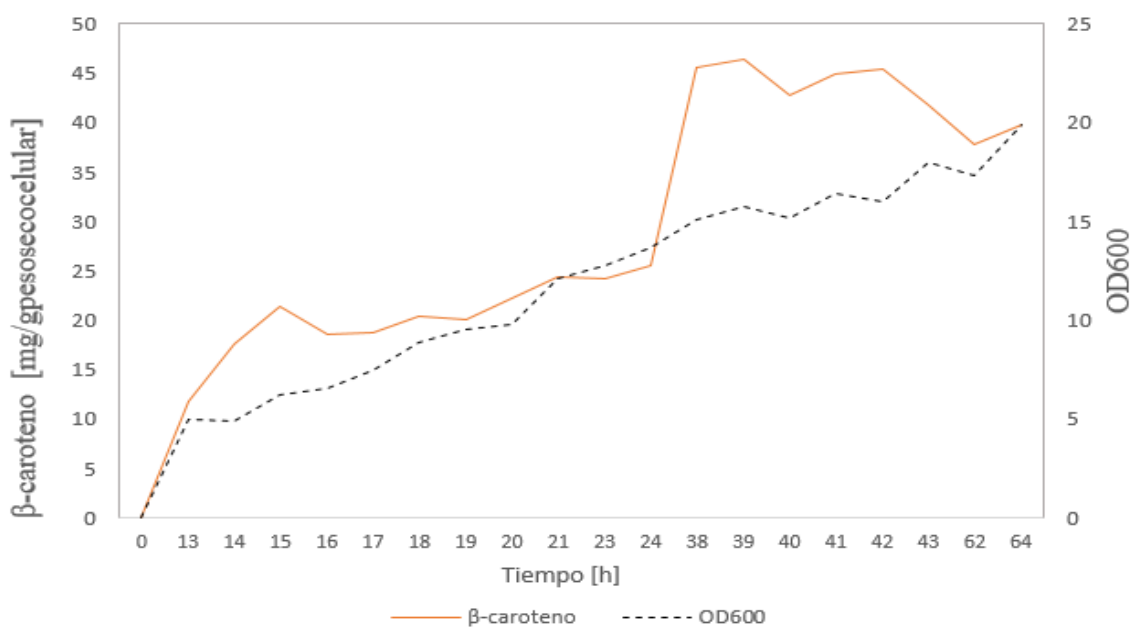


Figura 15. Producción de β-caroteno de la cepa YAG28, usando un biorreactor de 1L.

5. Conclusiones

Se confirmó que las mutaciones presentes en las cepas evolucionadas por ALE obtenidas por el grupo de investigación en trabajos previos confieren a una mayor producción de β -caroteno y ese incremento no fue una consecuencia secundaria del aumento de la tolerancia al estrés oxidativo.

En este trabajo se logró identificar las mutaciones beneficiosas para la producción de β -caroteno en *Saccharomyces cerevisiae* y también se demostró que no existe una relación directa entre el rendimiento de producción y la tolerancia al peróxido de hidrógeno.

Al generar diferentes combinaciones de mutaciones puntuales, se identificó una combinación de mutaciones que condujo a un aumento aproximadamente de un 82% en el rendimiento de β -caroteno en un biorreactor batch en comparación con la cepa evolucionada SM14 obtenida en trabajos previos de ALE.

Referencias Bibliográficas

- Addgene Team. (2016). *CRISPR 101: A Desktop Resource* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00232-16>
- Bao, Z., Xiao, H., Liang, J., Zhang, L., Xiong, X., Sun, N., Zhao, H. (2015). Homology-Integrated CRISPR-Cas (HI-CRISPR) System for One-Step Multigene Disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synthetic Biology*, 4(5), 585–594. <https://doi.org/10.1021/sb500255k>
- Bergman, L. W. (n.d.). Growth and Maintenance of Yeast, 177.
- Bogacz-Radomska, L., & Harasym, J. (2018). β -Carotene—properties and production methods. *Food Quality and Safety*, 2(2), 69–74. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy004>
- Cardoso, L. A. C., Karp, S. G., Vendruscolo, F., Kanno, K. Y. F., Zoz, L. I. C., & Carvalho, J. C. (2017). Biotechnological Production of Carotenoids and Their Applications in Food and Pharmaceutical Products. *Carotenoids*. <https://doi.org/10.5772/67725>
- Das, A., Yoon, S. H., Lee, S. H., Kim, J. Y., Oh, D. K., & Kim, S. W. (2007). An update on microbial carotenoid production: Application of recent metabolic engineering tools. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(3), 505–512. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1206-3>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213). <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Engler, C., Kandzia, R., & Marillonnet, S. (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS ONE*, 3(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003647>

- Hernández-Almanza, A., Montañez, J., Martínez, G., Aguilar-Jiménez, A., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. (2016). Lycopene: Progress in microbial production. *Trends in Food Science and Technology*, 56, 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.08.013>
- Kampranis, S. C., & Makris, A. M. (2012). Developing a Yeast Cell Factory for the Production of Terpenoids. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 3(4), e201210006. <https://doi.org/10.5936/csbj.201210006>
- Kawai, S., Hashimoto, W., & Murata, K. (2010). Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: methods and possible underlying mechanism. *Bioengineered Bugs*, 1(6), 395–403. <https://doi.org/10.4161/bbug.1.6.13257>
- Little, S. (2001). Amplification-Refractory Mutation System (ARMS) Analysis of Point Mutations. *Current protocols in Human genetics*, 1–12. <https://doi.org/10.1515/cppm-2015-0059>
- Mata-Gómez, L. C., Montañez, J. C., Méndez-Zavala, A., & Aguilar, C. N. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: An overview. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-12>
- Melendez, A. J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2007). Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 57(2), 109–117.
- Mesquita, S. D. S., Teixeira, C. M. L. L., & Servulo, E. F. C. (2017). Carotenoides: Propriedades, aplicações e mercado. *Revista Virtual de Quimica*, 9(2), 672–688. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170040>
- Mezzomo, N., & Ferreira, S. R. S. (2016). Carotenoids functionality, sources, and processing by supercritical technology: A review. *Journal of Chemistry*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3164312>

- Moreno, J., Kao, K., Reyes, L. H., & Sanchez, V. (2014). *MEJORAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES EN SACCHAROMYCES CEREVISIAE USANDO EVOLUCIÓN ADAPTATIVA EN LABORATORIO*.
- New England BioLabs. (2016). DNA MODIFYING ENZYMES NEB Golden Gate Assembly Mix.
- Nicholl, D. S. T. (2008). *An Introduction to Genetic Engineering. The effects of brief mindfulness intervention on acute pain experience: An examination of individual difference* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Ostergaard, S., Olsson, L., & Nielsen, J. (2000). Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 34–50. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.34-50.2000>
- Pardo P., M., & Rodriguez B, E. (2017). Overview of the CRISPR-Cas9 system and design of sgRNAs for genomic DNA editing in yeast. Universidade da coruna.
- Reyes, L. H., Gomez, J. M., & Kao, K. C. (2014). Improving carotenoids production in yeast via adaptive laboratory evolution. *Metabolic Engineering*, 21, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.11.002>
- Rivera, A. L., Magaña-Ortíz, D., Gómez-Lim, M., Fernández, F., & Loske, A. M. (2014). Physical methods for genetic transformation of fungi and yeast. *Physics of Life Reviews*, 11(2), 184–203. <https://doi.org/10.1016/j.plrev.2014.01.007>
- Rodriguez-Concepcion, M., Avalos, J., Bonet, M. L., Boronat, A., Gomez-Gomez, L., Hornero-Mendez, D., ... Zhu, C. (2018). A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Progress in Lipid Research*, 70(April), 62–93. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.04.004>

- Salazar Montee, A., Sandoval Rodríguez, A., & Armendáriz Borunda, J. (2013). *Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*.
- Verwaal, R., Wang, J., Meijnen, J. P., Visser, H., Sandmann, G., Van Den Berg, J. A., & Van Ooyen, A. J. J. (2007). High-level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(13), 4342–4350.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02759-06>
- Winston, F., Dollard, C., & Ricupero-hovasse, S. L. (1995). Construction of a Set of Convenient *Saccharomyces cerevisiae* Strains that are Isogenic to S288C, 11, 53–55.

Apéndices

Apéndice A. Preparación medios de cultivo

Preparación Medios de Cultivo

Medio de cultivo	Componentes (Cantidad 1L)
Luria Broth (LB)	-10g Peptona -5g Extracto de levadura -10g Cloruro de sodio (NaCl) -1L Agua tipo II
	Nota: Para platos de agar agregar 20g de Agar por cada litro de medio.
YPD	-20g Peptona -10g Extracto de levadura -20g D-glucosa -1L Agua tipo II
	Nota: Para platos de agar agregar 20g de Agar por cada litro de medio.
YNB	-20g D-glucosa -1.7g de YNB sin sulfato de amonio y aminoácidos -5g Sulfato de amonio -1L Agua tipo II
	Nota: Para platos de agar agregar 20g de Agar por cada litro de medio.
SC-URA	-YNB -Drop out mix: -Uracil [Agregar 2 g/L] (Preparado en el laboratorio agregando los aminoácidos uno a uno). -20g de agar por litro para platos

Fuente: Laboratorio Dr. Kao

Apéndice B. Mutaciones puntuales presentes en las cepas evolucionadas.

Clasificación de las mutaciones por efectos del fenotipo afectado:

- **Mutación intergénica:** mutación en regiones de DNA situadas entre los genes. Las cuales se consideran mutaciones neutras puesto que alteran el genoma sin función fenotípica aparente.
- **Mutaciones silenciosas o sinónimas:** Frecuentes en el ADN codificante y no afectan la secuencia de la proteína, debido al carácter degenerado del código genético.
- **Mutaciones no silenciosas:** Afectan la secuencia proteica y pueden ocasionar tanto efectos negativos como benéficos en el genotipo resultante.
- **Mutaciones que cambian el sentido:** Consisten en la modificación de un nucleótido provocando la codificación de un aminoácido diferente.
- **Mutaciones que no cambian el sentido:** Es un tipo de mutación puntual en una secuencia de ADN que provoca la aparición de un codón de terminación prematuro, llamado también codón sinsentido, en el ARNm transcripto, lo cual conduce a su vez a la producción de un producto proteico truncado, incompleto y por lo general no funcional. Por lo cual no se provoca cambio de un aminoácido por otro.

Cambio de marco de lectura (Frameshift mutation): Este tipo de mutación se da cuando por inserción o pérdida de pares de bases se cambia el marco de lectura. Para la decodificación, las bases se leen de tres en tres, esto es, cada tres bases determinan un aminoácido. Si se cambia el marco de lectura, cambia la forma de agrupar esas tres bases y se colocaran aminoácidos erróneos (Salazar Montee, Sandoval Rodríguez, & Armendáriz Borunda, 2013).

Mutaciones puntuales en las cepas evolucionadas SM12, SM13 y SM14, tipo de mutación y cambio de aminoácido.

Cepa	Cr *	Posición	Tipo	Gen en el cual se encuentra la mutación	Tipo de mutación	Cambio de aminoácido
SM12	2	716,077	G→A	HIS7	Cambio de sentido	Serina > Leucina
	3	58,528	T→A	SRO9/GFD2	Intergénica	
	15	977,984	T→G	TYE7	Cambio de sentido	Asparagina > Alanina
SM13	1	204,327	G→A	FLO1	Cambio de sentido	Valina > Isoleucina
	2	716,077	G→A	HIS7	Cambio de sentido	Serina > Leucina
	3	58,825	T→A	SRO9/GFD2	Intergénica	
	6	22,874	A→G	AQY3/DAK2	Intergénica	
	7	354,893	C→T	SCY1	Silenciosa	
SM14	6	88,592	T→G	EPL1	Cambio de sentido	Leucina > Triptófano
	7	124,954 [^] 124,955	insA* *	MDS3	Con desplazamiento del marco de lectura	La traducción se detiene temprano
	13	361,550	G→A	YMR045C/YMR046C	Cambio de sentido	Histidina > Tirosina
	15	330,827	A→C	ALG6	Cambio de sentido	Serina > Arginina
	2	716,077	G→A	HIS7	Mutación con cambio de sentido	Serina > Leucina

Nota: *Cromosoma. ** Inserción.

Apéndice C. Transformación

Plásmidos ensamblados con Golden Gate

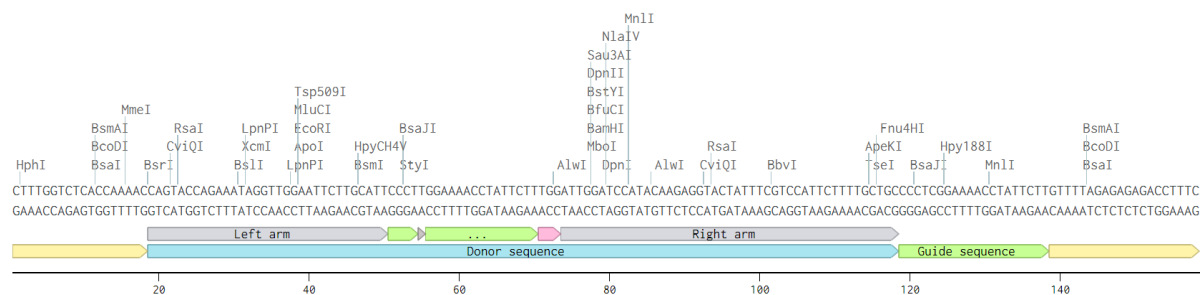
Secuencia guía y donadora

Secuencia donadora: Es la secuencia que se va a suministrar para hacer Homology-Directed Repair (HDR), permitiendo introducir las mutaciones precisas en el material genético. Teniendo en cuenta que ya se tiene la ubicación exacta de la mutación puntual, el ADN objetivo debe preceder inmediatamente a una secuencia PAM 5'-NGG (Protospacer Adjacent Motif) la cual consiste en una secuencia de tres nucleótidos en la cadena de ADN a modificar, siendo indispensable para el reconocimiento del objetivo por parte de la endonucleasa. El primer paso es identificar la secuencia PAM más cercana a la mutación puntual (Figura 16), la plantilla donante también debe tener secuencias de reparación homologas adicionales de 50 bp inmediatamente arriba y abajo del sitio de corte (Bao et al., 2015)

Secuencia guía: El ARN guía (gARN) actúa como guía para que la endonucleasa Cas9 pueda ejercer su acción de corte en una secuencia específica del genoma. La secuencia guía puede ser cualquier secuencia de ADN de 20 nucleótidos que esté presente antes de la secuencia PAM (Addgene Team, 2016).

Las secuencias guía y donadora para todas las mutaciones puntuales fueron sintetizadas químicamente por Integrated DNA Technologies – USA. Para hacer más fácil la identificación, se

decidió nombrar la secuencia guía y donadora con el nombre del gen donde se encuentra la mutación.



Secuencia donadora y secuencia guía de la mutación puntual en his7.

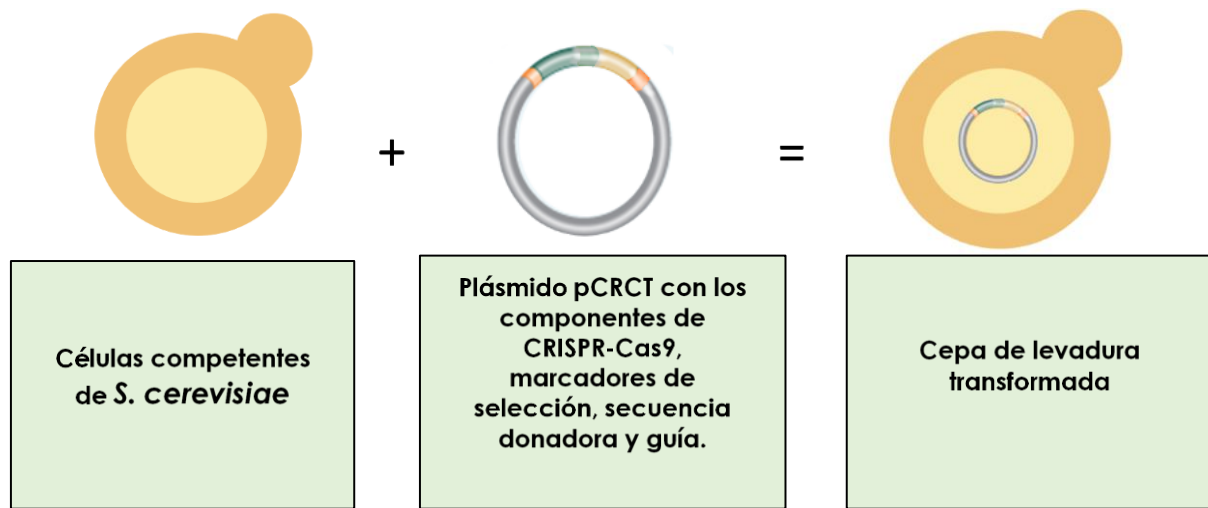
La secuencia donadora se encuentra en color azul, la cual contiene la secuencia PAM, la mutación puntual que se desea introducir y las secuencias de reparación homologas. La secuencia guía que se encuentra en color verde y dos terminaciones en color amarillo con los sitios de restricción Bsa I para hacer el ensamble en el pCRCT.

Ensamble de los plásmidos.

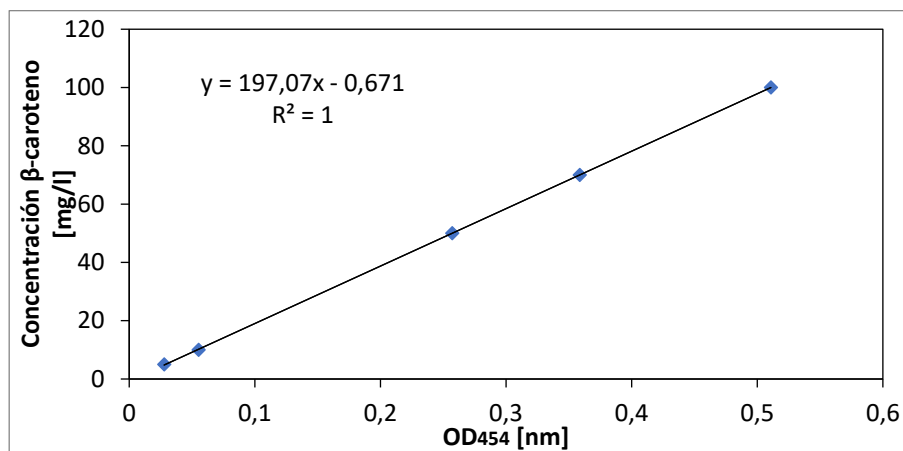


HIS7	pCRCT	pHIS7
YMR045C/YMR046C	pCRCT	pYMR045C/YMR046C
SRO9/GFD2	pCRCT	pSRO9/GFD2
TYE7	pCRCT	pTYE7
SCY1	pCRCT	pSCY1
FLO1	pCRCT	pFLO1

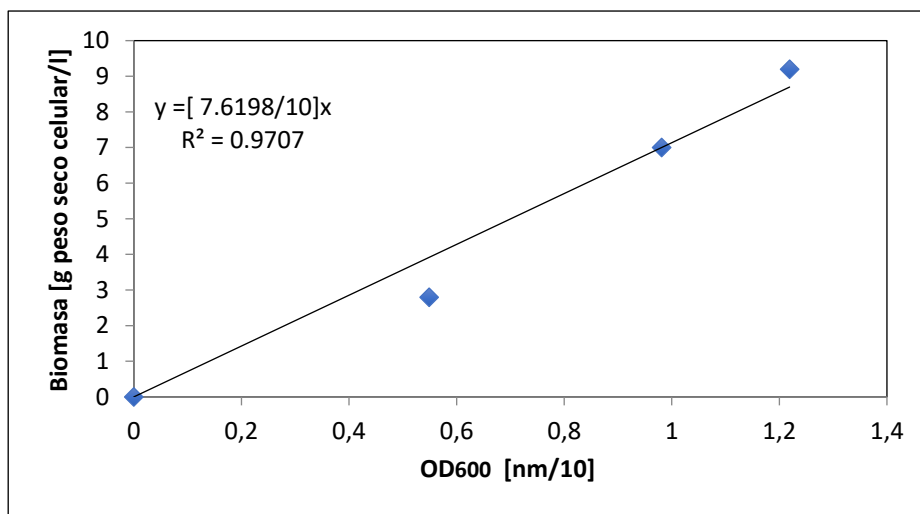
*Los plásmidos de las mutaciones AQY3/DAK2, EPL1, MDS3 y ALG6 fueron construidos previamente.

Cepas transformadas**Esquema transformación de las cepas de levadura**

Apéndice D. Curvas estándar para la cuantificación de β -caroteno



Curva estándar para relacionar la OD₄₅₄ y la concentración de β -caroteno.



Curva estándar para relacionar la OD₆₀₀ y la concentración de biomasa.

La concentración de β -caroteno en [mg/l] se haya con la ecuación de la figura 15. Después, para hallar el rendimiento en [mg β -caroteno/g peso seco celular] se relacionan las dos fórmulas:

$$\frac{mg\beta\text{caroteno}}{g \text{ peso seco celular}} = \frac{[mg\beta\text{caroteno}/L] * 10}{OD600 * 7.62}$$