

VCH-FC
Biot. molecular
W492
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO

“Transformación de *Saccharomyces cerevisiae* con genes de *Xanthophyllomyces dendrorhous* para producción de carotenoides”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

NICOLE ANDREA WERNER RATTO

Director de Seminario de Título: Dr. Víctor Cifuentes G.
Co-Director de Seminario de Título: Dra. Jennifer Alcaíno G.

Julio 2012
Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Sra. Nicole Andrea Werner Ratto.

“Transformación de *Saccharomyces cerevisiae* con genes de *Xanthophyllomyces dendrorhous* para producción de carotenoides”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Dr. Víctor Cifuentes
Director Seminario de Título

Firma manuscrita en azul de Víctor Cifuentes sobre una línea horizontal.

Dra. Jennifer Alcaíno
Co-Directora

Firma manuscrita en azul de Jennifer Alcaíno sobre una línea horizontal. A la derecha de la firma se encuentra un sello circular de la Facultad de Ciencias, Biblioteca Central, U. de Chile.

Comisión de Evaluación

Dr. Michael Handford

Firma manuscrita en azul de Michael Handford sobre una línea horizontal.

Dr. Claudio Martínez

Firma manuscrita en azul de Claudio Martínez sobre una línea horizontal.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a quienes han apoyado mi trabajo, especialmente a mis directores de seminario, los profesores Víctor y Jenny quienes contribuyeron enormemente en el desarrollo de este trabajo, discutiendo los resultados y ayudando a resolver los inconvenientes que se presentaron en el camino. También quiero agradecer a mis compañeros en el laboratorio de genética, especialmente a Dony, que hizo un gran aporte en el trabajo realizado para completar este seminario, a Salvador, quien se encargó de enseñarme a trabajar en el laboratorio desde el primer día y ha sido un gran compañero de trabajo y amigo, y a mis amigas Pamela y Natty con quienes he compartido grandes momentos.

Por otra parte quiero dar las gracias a quienes me han acompañado durante toda mi vida y que quiero mucho. Mis padres, Oscar y Alejandra, que siempre han estado ahí cuando los he necesitado y a mis hermanos, Daniel y Camila. Quiero mencionar también al resto de mi familia; mis abuelos, con quienes he tenido la suerte de poder compartir muchos momentos, mis tíos y la Rosi. Además quiero agradecer a César, mi esposo, que ha sido un pilar fundamental en mi desarrollo científico y que siempre ha estado dispuesto a escucharme.

Finalmente, agradezco a mis compañeros de pregrado, especialmente a mis amigos que se han mantenido pese al paso del tiempo; Pamela, Karina, Carolina, Manuel, Pablo, Ignacio, Esteban, Diego y Gonzalo.

Financiado por proyecto FONDECYT 1100324.

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT	xi
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes generales	1
1.2 Carotenoides en general.....	2
1.3 β -Caroteno.....	3
1.4 Astaxantina	3
1.5 Carotenogénesis en <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	5
1.6 Producción de carotenoides por Ingeniería metabólica.....	8
1.7 Antecedentes metodológicos de trabajo	11
1.8 Hipótesis Del Trabajo.....	14
1.9 Objetivo General.....	14
1.10 Objetivos Específicos	14
2 MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1 Cepas y plásmidos.....	15
2.2 Oligonucleótidos y Ácidos Nucleicos.....	17
2.3 Cultivo de microorganismos.....	19
2.3.1 <i>S. cerevisiae</i>	19
2.3.1.1 Eliminación del marcador de selección y réplica de placas.....	19
2.3.1.2 Curvas de crecimiento.....	20
2.3.2 <i>E. coli</i>	20
2.4 Purificación de ácidos nucleicos.....	21
2.4.1 DNA plasmidial.....	21
2.4.2 DNA genómico de <i>S. cerevisiae</i>	21
2.4.3 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.....	22
2.5 Reacciones de PCR.....	22
2.5.1 PCR estándar.....	22
2.5.2 PCR de elongación (OE-PCR).....	23
2.6 Análisis de DNA.....	24
2.6.1 Electroforesis en geles de agarosa.....	24
2.6.2 Digestión con endonucleasas de restricción.....	24
2.6.3 Secuenciación de DNA.....	24
2.7 Transformación genética por electroporación.....	24
2.7.1 Ligado de DNA.....	24
2.7.2 Electrotransformación de <i>E. coli</i>	25
2.7.3 Electrotransformación de <i>S. cerevisiae</i>	26
2.8 Extracción de pigmentos y RP-HPLC.....	27
3 RESULTADOS	29

3.1	Construcción de módulos de expresión de genes de carotenogénesis para <i>S. cerevisiae</i>.	29
3.1.1	Amplificado e hibridación de fragmentos.	29
3.1.2	Clonado de módulos en vector pBluescript SK.	34
3.2	Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	36
3.2.1	Cepa resistente al antibiótico higromicina B	36
3.2.1.1	Escisión del módulo de resistencia a higromicina B	41
3.2.1.2	Obtención de cepa sobreproductora de β -caroteno.	42
3.2.1.3	Extracción y análisis de pigmentos.	48
3.2.1.4	Curva de crecimiento y producción de pigmentos en el tiempo.	51
3.2.2	Sistema de transformación para cepa productora de astaxantina.	55
4	DISCUSIÓN	57
4.1	Construcción de módulos de expresión en <i>S. cerevisiae</i> .	57
4.2	Transformación de <i>S. cerevisiae</i> resistente a higromicina B.	58
4.3	Transformación de <i>S. cerevisiae</i> para la producción de β -caroteno.	60
4.3.1	Producción de pigmentos y curva de crecimiento	62
4.4	Sistema de transformación de <i>S. cerevisiae</i> para la producción de astaxantina.	66
5	CONCLUSIONES	69
6	PROYECCIONES	70
7	CONGRESOS	71
8	BIBLIOGRAFIA	72

INDICE DE TABLAS



Tabla 1.- Cepas utilizadas y construidas en este trabajo	15
Tabla 2.- Plásmidos utilizados y construidos en este trabajo.....	16
Tabla 3.- Oligonucleótidos utilizados en este trabajo	17
Tabla 4.- Fragmentos amplificados para la construcción de cada módulo y partidores usados en cada reacción.	30
Tabla 5.- Combinaciones de partidores usadas para la amplificación de fragmentos para cada transformación	37
Tabla 6.- Resultados de cuantificación de pigmentos totales y de β-caroteno de cultivos únicos crecidos a 22°C por tres días..	50
Tabla 7.- Producción de pigmentos en el tiempo por las cepas Bcar4, 256 y scHYG en medio YM con o sin higromicina B (50 μg/ml)	54

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Esquema indicando la ruta de biosíntesis de carotenoides para <i>X. dendrorhous</i>	7
Figura 2.- Sistema de co-transformación en <i>S. cerevisiae</i>	13
Figura 3.- Construcciones de DNA hechas en este trabajo	31
Figura 4.- Resultados PCR de elongación del módulo <i>crtE</i>	33
Figura 5.- PCR para identificar clones de <i>E. coli</i> con el módulo <i>crtR</i> en pBS	35
Figura 6.- Esquema de pasos para transformación de <i>S. cerevisiae</i> resistente a higromicina B	38
Figura 7.- Resultados de PCR para cepas transformadas con módulo de resistencia a higromicina B	40
Figura 8.- Esquema mostrando el orden de inserción de módulos para la transformación de <i>S. cerevisiae</i> productora de β -caroteno	43
Figura 9.- Fenotipo de cepas productoras de β -caroteno	44
Figura 10.- PCR para comprobar la integración de módulos en cepas productoras de β -caroteno	46
Figura 11.- Cultivos usados para extracción de pigmentos	49
Figura 12.- Curva de crecimiento a 30°C de cepas transformantes en medio YM o YM suplementado con higromicina B (50 μ g/ml).	52
Figura 13.- Proporciones de intermediarios de la ruta de síntesis de carotenoides a diferentes tiempos de cultivo	56

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Ampicilina
DO	Densidad óptica
DTT	Ditioeritol
cDNA	DNA complementario
dNTP	Desoxirribonucleotido trifosfato
EDTA	Tetra acetato disódico de etilendiamina
h	horas
RP-HPLC	Cromatografía líquida en fase reversa
Hyg	Higromicina
Kb	Kilobases
LB	Medio de Luria Betrani
Min	Minutos
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
Rcf	Fuerza centrifuga relativa
S	Segundos
TAE	Tris, acetato, EDTA
TE	Tris, EDTA
x-gal	5-bromo 4-cloro 3-indolil β -D-galactopiranosido

RESUMEN

En la actualidad existe un gran interés en la producción comercial de compuestos naturales para su uso en diversos procesos. Un ejemplo son los carotenoides, moléculas orgánicas aisladas desde fuentes naturales como microorganismos, algas y plantas. Son de especial importancia comercial ya que muchas de ellas poseen propiedades antioxidantes, lo que las hace relevantes a nivel farmacéutico. Además presentan diversas tonalidades de amarillo, naranja y rojo, por lo que también son utilizadas como pigmentos, por ejemplo, en alimentos.

Este trabajo se enfocó en la obtención de cepas industriales transgénicas de *Saccharomyces cerevisiae* capaces de producir carotenoides utilizando los genes que participan en la biosíntesis de astaxantina en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Se construyeron módulos de expresión en *S. cerevisiae* uniendo promotores y terminadores de esta levadura a cDNAs de *X. dendrorhous* por PCR de extensión. Los cDNAs usados corresponden a los genes *crtE*, *crtI*, *crtYB*, *crtS* y *crtR* de *X. dendrorhous*, que codifican las enzimas geranylgeranyl pirofosfato sintasa, fitoeno desaturasa, fitoeno/ β -caroteno sintasa, astaxantina sintasa y citocromo P450 reductasa, respectivamente. Las transformaciones se hicieron mediante la metodología *DNA assembler* agregando un módulo portador del gen *hph* de *Escherichia coli*, que confiere resistencia a higromicina B como marcador de selección. Además, en los extremos del marcador de selección se añadieron repetidos directos para permitir su escisión por recombinación homóloga en transformantes seleccionados.

El primer logro que se obtuvo, a partir de una variedad industrial de *S. cerevisiae*, fue una cepa resistente a higromicina B, denominada sc-HYG, a través de la integración de un módulo de expresión del gen *hph* en el locus YPRC_T3 de la levadura,

flanqueado por repetidos directos que permitieran su escisión, lo que fue comprobado, obteniendo una nueva cepa, sc-HYG-, sensible al antibiótico.

Posteriormente, se obtuvo las cepas productoras de β -caroteno, Bcar1 y Bcar4, las que llevan integrado en su genoma módulos de expresión de los genes *crtE*, *crtI* y *crtYB*, además del módulo de resistencia a higromicina B. La extracción y análisis de los pigmentos de estas cepas indica que la cepa Bcar4 produce más carotenoides que la cepa Bcar1 (1.234 vs 413 ppm). El análisis comparativo de las curvas de crecimiento de las cepas nuevas y la parental industrial, indica que la inserción de dichos genes en la cepa Bcar4 no afecta su crecimiento.

Por otra parte, se estableció el sistema de transformación mediante ingeniería metabólica para, a futuro, obtener una cepa productora de astaxantina.

ABSTRACT

Currently, there is a large interest in producing natural compounds for their commercialization. Carotenoids are organic molecules isolated from a variety of natural sources such as microorganisms, algae and plants. There is commercial interest in these compounds since they possess antioxidant properties, which make them suitable for the pharmaceutical market. Besides, these compounds have a range of colors going from yellow, to orange and red, which makes them suitable for being used as natural pigments, for example, in the food industry.

This work focused on obtaining transgenic yeast strains of *S. cerevisiae* that can synthesize carotenoids by expressing genes from the astaxanthin biosynthesis pathway of the yeast *X. dendrorhous*. *S. cerevisiae* expression modules were constructed by attaching promoters and terminators from this yeast to cDNAs for *X. dendrorhous*' carotenogenic genes. These genes were *crtE*, *crtI*, *crtYB*, *crtS* and *crtR* and encode the enzymes geranylgeranyl pyrophosphate synthase, phytoene desaturase, phytoene/ β -carotene synthase, astaxanthin synthase and cytochrome P450 reductase, respectively. Transformations were carried out using DNA assembler methodology, incorporating also an expression module containing the *hph* gene from *E. coli*, which confers resistance to the antibiotic hygromycin B, as a selection marker. On each side of the selection marker direct repeats were included, so the module could be excised by homologous recombination after selection.

The first strain obtained was sc-HYG, an industrial *S. cerevisiae* strain resistant to hygromycin B by the integration of the *hph* gene expression module in the YPRC τ 3 locus. The module excision methodology was proven successful by removing the selection marker from this strain, obtaining strain sc-HYG-.

β -carotene producing strains, Bcar1 and Bcar4, were obtained by integrating expression modules for genes *crtE*, *crtI*, *crtYB* and also the hygromycin B resistance marker to the genome. Pigments were extracted from both strains and it was determined that strain Bcar4 produced more carotenoids than Bcar1 (1,234 vs. 413 ppm). Growth curves were built in order to determine that gene integration at *locus* YPRC τ 3 did not affect the strain's growth in comparison with the parental industrial strain.

Finally, we assayed and established the transformation conditions for obtaining a metabolically engineered strain that produces astaxanthin, in the future.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes generales

La astaxantina (3,3-dihidroxi-b-caroteno-4,4-diona) es un compuesto natural perteneciente a la familia de las xantófilas, carotenoides oxigenados de cuarenta carbonos con tonalidades amarillas.

Es posible encontrar este pigmento en un limitado número de microorganismos y en algunas plantas y microalgas, que son capaces de sintetizarlo *de novo*. Sin embargo, los animales lo obtienen solamente por medio de la dieta. La astaxantina tiene un alto interés comercial debido a su uso como aditivo en la alimentación de peces salmónidos criados en cautiverio, además de presentar una serie de beneficios sobre la salud humana, especialmente por poseer propiedades anti inflamatorias y anti oxidantes (Pashkow y col., 2008).

A nivel de industria, tradicionalmente, la producción de astaxantina se lleva a cabo mediante síntesis química. Sin embargo, hoy en día existe en los consumidores una creciente oposición al uso de aditivos artificiales en alimentos, además de ser un procedimiento de alto costo (Milledge, 2011). Estos inconvenientes han generado la necesidad de la búsqueda de fuentes naturales del pigmento, entre las que destacan la levadura basidiomicete *Xanthophyllomyces dendrorhous*, ex: *Phaffia rhodozyma* (Miller y col., 1976) y la microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow, 1844) junto con el desarrollo de investigación dirigida a la optimización de su producción en estos organismos.

1.2 Carotenoides en general

La familia de carotenoides comprende un grupo de moléculas químicas que tienen en común una estructura de cadena lineal de carbonos con una serie de dobles enlaces en su porción central. El número de carbonos en este grupo de compuestos, con más de 600 estructuras conocidas, puede variar entre 30 y 50, pero la mayor parte presenta cadenas de 40 carbonos (Sandmann, 2001). Así mismo, los carotenoides se clasifican en carotenos o xantófilas dependiendo si son hidrocarburos puros, o bien, si incluyen átomos de oxígeno en su estructura, respectivamente (Britton, 1995).

Estos compuestos son producidos principalmente por plantas dónde cumplen un rol fundamental en la fotosíntesis dependiente de oxígeno, al absorber energía lumínica de longitudes de onda entre 400 y 500 nm (Britton, 1995). También son sintetizados por microorganismos como algas, y algunas bacterias, hongos filamentosos y levaduras (Frengova y Beshkova, 2009). En el caso de animales, estos pigmentos no pueden ser producidos *de novo* y deben adquirirse a través de la dieta.

El mercado de los carotenoides a nivel mundial, de acuerdo al reporte publicado por BCC Research, hasta el año 2008, alcanzó los \$766 millones de dólares en 2007 con una proyección esperada de US\$919 millones hacia el año 2015 (Lange y Steinbuchel, 2011). De esto, la mayor parte corresponde al mercado del β -caroteno avaluado en US\$247 millones en el año 2007 y que se espera alcance los US\$285 millones para el año 2015. Al mercado del β -caroteno le sigue el de la astaxantina, con un mercado avaluado en US\$219 millones en el año 2007 que hacia el año 2015 llegaría a los US\$253 millones.

1.3 β -Caroteno.

El β -caroteno, uno de los primeros carotenoides descritos, es de importante interés en la industria debido a que en mamíferos es precursor de la vitamina A, retinal y ácido retinoico, compuestos relevantes para la nutrición, visión y diferenciación celular, respectivamente (Armstrong y Hearst, 1996). Su color amarillo lo hace muy atractivo como colorante natural para alimentos, además de tener propiedades antioxidantes beneficiosas para la salud (Guerin y col., 2003, Fregova y Bershkova, 2009).

Entre los organismos que producen este compuesto de forma natural se encuentra el alga *Dunaliella*, la que corresponde a la principal alternativa a la síntesis química de β -caroteno. De sus especies *D. burdawill* y *D. salina*, se obtiene alrededor de un 10% del peso seco del alga en β -caroteno, sin embargo, existen altas pérdidas en la producción por contaminación con microorganismos desde el ambiente, ya que por lo general, su cultivo se realiza en sistemas abiertos (Ben-Amotz, 1995, Prieto y col., 2011). En este caso, el rendimiento final depende de condiciones de cultivo como luz, salinidad, temperatura, etc., pero en general se ve favorecido cuando estas condiciones generan estrés en el alga, llegando a obtener hasta 328,8 mg de carotenoide por litro de cultivo por mes (Prieto y col., 2011).

1.4 Astaxantina

La astaxantina es un carotenoide altamente apetecido por la industria por su alta estabilidad química y debido a su pigmentación de color rojizo, especialmente útil para la industria de la acuicultura, además de sus propiedades antioxidantes, que son superiores a otros compuestos de la misma familia (Dufossé y col., 2005). Este pigmento se encuentra presente en la mayoría de los crustáceos y en peces salmónidos, lo que se puede observar en su tonalidad anaranjada. Sin embargo, éste

no es sintetizado por ellos y deben obtenerlo a través de la dieta, generalmente, desde microalgas. La coloración de peces salmónidos es muy importante en la venta de este producto, ya que es percibida como un indicador de calidad de la carne del pez y permite aumentar su valor comercial. Por tal motivo, nace la preocupación en la industria por encontrar fuentes de carotenoides de alta calidad y bajo costo (Johnson y An, 1991).

En los últimos años, la industria farmacéutica también ha mostrado interés por la astaxantina ya que se ha demostrado que otorga mayores beneficios para la salud en comparación con el consumo de otros carotenoides. En primer lugar, según estudios realizados en ratones, la astaxantina presenta propiedades anti-carcinógenas, específicamente para cáncer de vejiga, cavidad oral, colon y cáncer de mama (Higuera-Ciapara y col., 2006). Por otra parte, se ha evaluado su capacidad de prevenir enfermedades cardiovasculares relacionadas con altas cantidades de lipoproteína de baja densidad o LDL como, por ejemplo, arteroesclerosis (revisado por Pashkow y col., 2008).

La mayor parte de la producción de astaxantina es a través de síntesis química, una opción que entrega mayor rendimiento si se compara con su obtención desde fuentes naturales, como la levadura basidiomicete *X. dendrorhous*. Entre los esfuerzos realizados para mejorar directamente la síntesis de pigmentos en la levadura, se pueden mencionar trabajos de mutagénesis y selección de cepas sobreproductoras (An y col., 1989; An y col., 1991; Ukibe y col., 2008; Baeza y col., 2009) y trabajos de ingeniería genética sobre la levadura (Misawa y Shimada, 1998; Verdoes y col., 2003). Además se han realizado estudios que buscan optimizar las condiciones de cultivo para una mayor producción de carotenoides, determinando los efectos del pH (Johnson y Lewis 1979; Hu y col., 2006) y diferentes fuentes de carbono y nitrógeno usadas en la

fermentación (Johnson y Lewis, 1979; Yamane y col., 1997; Flores-Cotera y col., 2001; Hu y col., 2005). Además existen estudios de los efectos de aireación y transferencia de oxígeno (Johnson y Lewis, 1979; Yamane y col., 1997; Liu y Wu, 2007) y de la luz (Johnson y Lewis, 1979; An y Johnson, 1990). Estos estudios han aumentado el conocimiento de cómo ciertas variables afectan la producción de astaxantina. Sin embargo, no han permitido mejoras sustanciales en el rendimiento. También se ha intentado mejorar el proceso de fermentación (Vazquez y Martin, 1998; Flores-Cotera y col., 2001; Lu y col., 2008, de la Fuente y col., 2010), llegando a obtener un máximo de 4.700 ppm de astaxantina por 10 litros de cultivo (de la Fuente y col., 2010).

Pese al conocimiento generado sobre la biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous*, a la fecha no se ha logrado integrarla al mercado como una alternativa de producción del pigmento. Por ello, varios grupos han buscado producir este y otros carotenoides en organismos no carotenogénicos ampliamente utilizados para obtención de compuestos recombinantes, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* y *Escherichia coli* (Yamano y col., 1994, Misawa y Shimada, 1998, Miura y col., 1998, Verwaal y col., 2007, Ukibe y col., 2009). Este trabajo planteó la incorporación mediante ingeniería metabólica de genes carotenogénicos de *X. dendrorhous* en *S. cerevisiae*, para obtener una cepa que sintetice carotenoides.

1.5 Carotenogénesis en *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

En levaduras, el sustrato para la síntesis de carotenoides es el isopentenil pirofosfato (IPP), molécula de 5 átomos de carbono derivada de la vía del mevalonato. Por la acción de la enzima isopentenil pirofosfato isomerasa, producto del gen *idi* (Kajiwara y col., 1997), se genera el dimetilalil pirofosfato (DMAPP), isómero activo del IPP. Ambas moléculas se condensan para formar geranil pirofosfato (GPP), un

compuesto de 10 carbonos, al que luego se adiciona una molécula de IPP por la acción de la enzima farnesil pirofosfato sintasa, codificada por el gen *FPS* (Romero, 2010) formando farnesil pirofosfato (FPP). Luego, al FPP se agrega otro IPP en una reacción catalizada por la enzima geranylgeranyl pirofosfato sintasa, producto del gen *crtE* (Niklitschek, 2008), obteniendo geranylgeranyl pirofosfato (GGPP). El primer carotenoide en la ruta de síntesis de astaxantina, fitoeno, es blanco y se forma por la condensación de dos moléculas de GGPP, reacción catalizada por la enzima bifuncional Fitoeno/ β -caroteno sintasa (PBS), producto del gen *crtYB* (Verdoes y col., 1999, Alcaíno, 2002). Posteriormente, ocurre la síntesis de licopeno con la generación de 4 dobles enlaces carbono-carbono por acción de la enzima fitoeno desaturasa, codificada por el gen *crtl* (Verdoes y col., 1999, León, 2000). La actividad licopeno ciclasa (β -caroteno sintasa) de la enzima bifuncional PBS, conduce la formación de β -caroteno (figura 1).

La astaxantina se obtiene por la acción de la enzima astaxantina sintasa, codificada por el gen *crtS* (Álvarez y col., 2006, Carmona, 2007), que genera dos grupos hidroxilo y dos grupos ceto en ambos anillos del β -caroteno. Cabe destacar que la enzima astaxantina sintasa pertenece a la familia de proteínas citocromo P450, enzimas que requieren de una enzima auxiliar donante de electrones para su actividad, la citocromo P450 reductasa (figura 1). La citocromo P450 reductasa de *X. dendrorhous* es codificada por el gen *crtR* (Alcaíno, 2008, Alcaíno y col., 2008) y es esencial en la síntesis de astaxantina en *X. dendrorhous*.

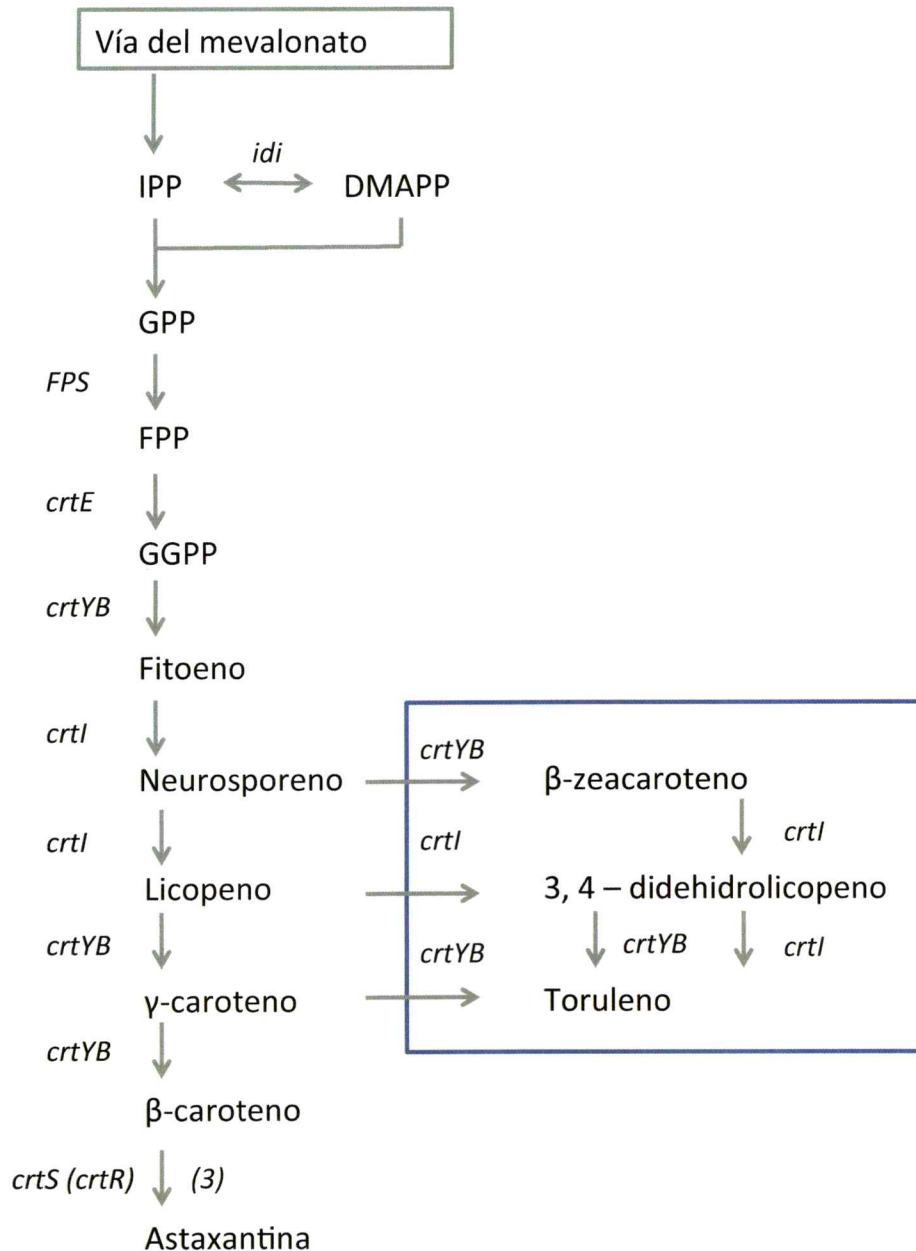


Figura 1.- Esquema indicando la ruta de biosíntesis de carotenoides para *X. dendrorhous* (Andrewes y Starr, 1976, An y col., 1999). Cada paso se señala por una flecha gris acompañada por el gen que codifica para la enzima que cataliza ese paso. Entre paréntesis se indica el número de intermediarios que existirían para el paso de β-caroteno a astaxantina. Parte de la vía de síntesis de carotenoides monocíclicos se muestra dentro del recuadro azul. Adaptado de Visser y col. (2003).

Además de esta vía, se ha propuesto que existe una ruta alternativa que lleva a la formación de carotenoides monocíclicos (An y col. 1999). Ésta, diverge a partir de neurosporeno y conduce a la obtención de compuestos como β -zeacaroteno, 3,4 didehidrolicopeno, toruleno, HDCO (3-hidroxi-3',4'-didehidro- β , ψ caroteno-4-ona) y DCD (3,3'-dihidroxi- β , ψ -caroteno-4,4'diona). Las enzimas que catalizarían estas reacciones serían las mismas que participan de la ruta de síntesis de astaxantina. La primera parte de la ruta de formación de carotenoides monocíclicos, hasta toruleno, se presenta dentro de la figura 1.

1.6 Producción de carotenoides por Ingeniería metabólica

Debido al interés en la obtención de astaxantina desde fuentes naturales, recientemente se han desarrollado trabajos, mediante ingeniería metabólica, que incorporan genes de la ruta de síntesis de carotenoides en microorganismos no carotenogénicos tales como *E. coli*, *C. utilis* y *S. cerevisiae*. Entre las ventajas que presentaría el uso de estos organismos se encuentra el gran conocimiento adquirido sobre su genética y fisiología y la facilidad de manipulación y cultivo. Inicialmente, se expresaron genes de las bacterias *Erwinia uredovora* y *Agrobacterium aurantiacum* en *E. coli* para sintetizar licopeno, β -caroteno y zeaxantina (revisado por Misawa y Shimada, 1998). También, estos genes se probaron en *S. cerevisiae*, logrando producir licopeno, β -caroteno y zeaxantina (Yamano y col., 1994) y en *C. utilis* obteniendo licopeno, fitoeno, β -caroteno y astaxantina (Miura y col., 1998).

A diferencia de los trabajos mencionados previamente, este proyecto propuso la expresión de genes de *X. dendrorhous* en una cepa industrial *S. cerevisiae* para generar una cepa alternativa productora de carotenoides.

Durante cientos de años se ha usado *S. cerevisiae* en procesos como la industria del pan y en la fermentación de bebidas alcohólicas, lo que ha llevado a que también se le conozca como la "levadura de cerveza". En la actualidad es un organismo reconocido como seguro (GRAS) por la administración de drogas y alimentos (FDA) de Estados Unidos y se utiliza como suplemento alimenticio y para la producción de fármacos recombinantes de las familias de flavonoides e isoprenoides (revisado por Huang y col., 2008). Su amplio uso en estudios científicos condujo a que su genoma fuera el primer genoma eucarionte completamente secuenciado (Goffeau y col., 1996). Lo anterior llevó a un rápido desarrollo del conocimiento de sus genes (Giaever y col., 2002), regulación transcripcional (Wodicka y col., 1997, Lee y col., 2002), redes metabólicas (Forster y col., 2003), interacciones entre proteínas y formación de complejos proteicos (Ho y col., 2001, Krogan y col., 2006), entre muchos trabajos. De esta manera, el gran conocimiento de la genética, bioquímica y fisiología de esta levadura, junto con el abundante número de herramientas y tecnologías para su manipulación genética, la convierten en un organismo muy utilizado para la producción de metabolitos de interés (Ostergaard y col., 2000 y Novoigt, 2008).

La capacidad de síntesis de carotenoides de *S. cerevisiae* se demostró por la producción de β -caroteno (Verwaal y col., 2007) y de astaxantina (Ukibe y col., 2009), esta última en bajas cantidades. Sin embargo, estos trabajos presentan impedimentos para su proyección en la obtención de carotenoides a nivel industrial.

En el trabajo de Verwaal del año 2007, la formación de β -caroteno se logró al expresar los genes *crtYB* (que codifica la enzima PBS) y *crtl* (fitoeno desaturasa) de *X. dendrorhous* regulados por el promotor TDH3 (gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa) y el terminador CYC1 (citocromo C, isoforma 1), ambos de *S. cerevisiae*, en un vector episomal. La producción se vio incrementada cuando se expresó adicionalmente el gen

que codifica para la enzima GGPP-sintasa, ya sea *BTS1* de *S. cerevisiae* o *crtE* de *X. dendrorhous*. Pese a la obtención de pigmentos, el sistema era inestable ya que las células perdieron pigmentación con el paso de las generaciones. Como alternativa, los genes usados previamente se integraron en el genoma de la levadura en los loci *ura3-52*, *leu2,3-112* y *trp1-289*. De esta manera se logró una producción estable, pero en cepas que requieren de la suplementación de aminoácidos para su crecimiento (Verwaal y col., 2007), situación incompatible con un proceso industrial. En un trabajo posterior se logró estabilizar la producción de carotenoides en *S. cerevisiae* con genes expresados episomalmente al incluir el gen que codifica la enzima mevalonato quinasa (*mvaK1*) de *Staphylococcus aureus* en una cepa de *S. cerevisiae* carente de la versión silvestre de este gen (Lange y Steinbuchel, 2011).

En relación a los intentos de producción de astaxantina en *S. cerevisiae*, sólo se ha reportado el uso de vectores episomales, los cuales llevan genes de carotenogénesis de *X. dendrorhous*, controlados por el promotor y terminador de la enzima alcohol deshidrogenasa, *ADH1* de *S. cerevisiae* (Ukibe y col., 2009). Además, estos vectores incluyen el uso de marcadores auxotróficos para su selección, lo que implica un mayor requerimiento nutricional en los medios de cultivo, haciendo su uso industrial económicamente inviable. En este caso la obtención de astaxantina sólo se logró, en muy baja cantidad, al expresar en la levadura módulos que contenían los genes *BTS1* de *S. cerevisiae* y *crtS*, *crtYB*, *crtI* y *crtR* de *X. dendrorhous* (Ukibe y col., 2009).

El trabajo realizado en este seminario de título buscó crear nuevas cepas de *S. cerevisiae* productoras de carotenoides mediante la integración genómica de módulos de expresión conteniendo diferentes genes que participan de la síntesis de astaxantina,

regulados por promotores y terminadores de *S. cerevisiae* en una cepa industrial de esta levadura.

1.7 Antecedentes metodológicos de trabajo

La expresión de genes carotenogénicos de *X. dendrorhous* en *S. cerevisiae* para la producción de β -caroteno (Verwaal y col., 2007, Lange y Steinbuchel, 2011) y astaxantina (Ukibe y col., 2009) ya ha sido realizada en cepas de laboratorio. Sin embargo, las cepas obtenidas no han sido apropiadas para su uso a nivel industrial debido a baja producción de pigmentos, inestabilidad de plásmidos y altos requerimientos nutricionales para su cultivo. En atención a lo previamente descrito, en el presente trabajo se buscó alternativas que permitieran evitar los inconvenientes reportados y proyectar la utilización de una cepa industrial, modificada genéticamente, en procesos productivos de pigmentos carotenoides.

El primer punto de innovación fue la integración de los genes de carotenogénesis de *X. dendrorhous* en el genoma de *S. cerevisiae*. Para ello fue necesario determinar una región genómica que al ser reemplazada o interrumpida no afectara el crecimiento normal de la levadura y que a la vez mostrara niveles de expresión adecuados. Se seleccionó la región YPRC τ 3, ubicada en el cromosoma XVI, dado que se documentó previamente que este *locus* no codificante resulta en un mayor nivel de expresión que otras regiones genómicas y su interrupción no afecta la fisiología de la levadura (Bai y col., 2009). Cabe destacar que dicha región corresponde a un transposon de tipo Ty $\bar{4}$ que se encuentra representado en baja frecuencia en el genoma de *S. cerevisiae* (Hug y Feldmann, 1996).

En segundo lugar, se decidió seguir la estrategia de co-transformación descrita por Shao y Zhao. (2009) que permite incorporar vías de síntesis completas en un solo paso

de transformación, mediante los mecanismos de recombinación propios de la levadura para realizar el ensamblaje de fragmentos de DNA. Para ello, es necesario añadir regiones de homología con el fragmento de DNA al que se quiere unir en los extremos de cada segmento de DNA a transformar, como se muestra en la figura 2. Además se utilizaron diferentes promotores y terminadores en la construcción de los módulos de expresión de cada gen. De este modo cada uno de los genes a expresar une en su extremo 5' a un promotor y en 3' a un terminador, ambos elementos evaluados previamente para la expresión de genes en *S. cerevisiae* (Hauf y col., 2000, Shao y Zhao, 2009). Estos elementos reguladores son diferentes para cada módulo de expresión construido con el objeto de evitar eventos de recombinación que puedan llevar a la pérdida de uno o más genes.

Para la selección de transformantes se incorporó un módulo de resistencia al antibiótico higromicina B usando el gen *hph* de *E. coli* (Taxis y Knop, 2006). Dado que el uso de antibióticos para la producción de elementos para el consumo humano es cada vez menos aceptada, se agregó un par de secuencias repetidas directas flanqueando el módulo de resistencia a higromicina B. Al quitar la presión selectiva sobre la cepa transformante y luego de múltiples ciclos de división celular, en algunas células los repetidos directos recombinarían entre sí, eliminando el módulo de selección y dejando como cicatriz a uno de los repetidos en la región de integración (Manivasakan y col., 1995, Akada y col., 2006).

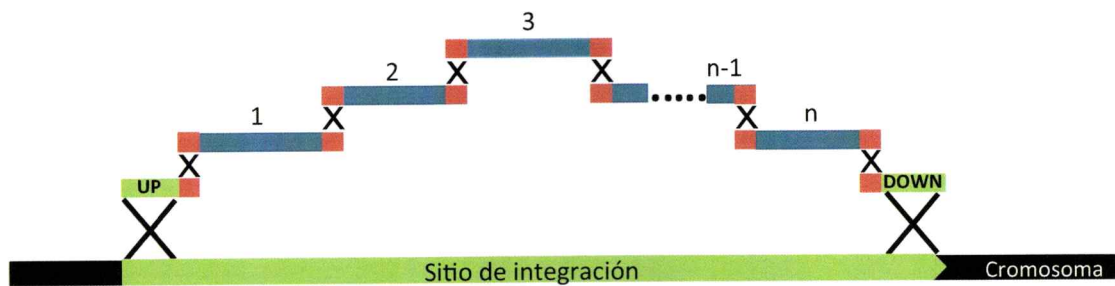


Figura 2.- Sistema de co-transformación en *S. cerevisiae*. Los n módulos a transformar se muestran como fragmentos en azul con extremos rojos que representan los sectores homólogos necesarios para la recombinación *in vivo*, indicados por cruces de color negro. En negro se representa el cromosoma de la levadura dentro del que se indica por un bloque verde el sitio seleccionado para la integración de los módulos. Las regiones verdes rotuladas "up" y "down" corresponden a los extremos río arriba y río abajo del sitio de integración, respectivamente.

1.8 Hipótesis Del Trabajo

La integración genómica de módulos de expresión de genes de la ruta de biosíntesis de astaxantina de *X. dendrorhous* en *S. cerevisiae* conduciría a la producción de β -caroteno y astaxantina en esta última levadura.

1.9 Objetivo General

Construir una cepa industrial de *S. cerevisiae* productora de carotenoides mediante ingeniería metabólica utilizando genes carotenogénicos de *X. dendrorhous*.

1.10 Objetivos Específicos

1.- Construcción de módulos de expresión del tipo promotor-cDNA de gen-terminador de los genes; *crtE*, *crtI*, *crtYB*, *crtS* y *crtR* de *X. dendrorhous* y *hph* de *E. coli* (como marcador de selección) con diferentes promotores y terminadores de *S. cerevisiae*, para luego clonarlos en el vector pBluescript SK- de *E. coli*.

2.- Transformación de *S. cerevisiae* con distintas combinaciones de los módulos; *hyg*, *crtE*, *crtI*, *crtYB*, para la producción de β -caroteno, y los módulos *hyg*, *crtE*, *crtI*, *crtYB*, *crtS*, *crtR* para la producción de astaxantina, por co-transformación de módulos con homología en sus extremos.

3.- Eliminación del marcador de selección de resistencia a higromicina B por recombinación entre repetidos directos en los extremos del módulo.

4.- Análisis del contenido y composición de carotenoides mediante cromatografía líquida en fase reversa de las cepas recombinantes de *S. cerevisiae*.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas y plásmidos.

Para los experimentos de transformación se usaron las cepas de *S. cerevisiae* S288c (ATCC 204508, silvestre) y 256 (cepa industrial, Lefersa). En el caso de transformación con plásmidos y su propagación, se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α (Sambrook y Russel, 2001). Para el clonamiento en *E. coli* se utilizó el plásmido pBluescript SK- (pBS). Las cepas generadas y los plásmidos construidos en esta tesis, se describen en las tablas 1 y 2, respectivamente.

Tabla 1.- Cepas utilizadas y construidas en este trabajo.

Cepa	Genotipo o característica relevante	Referencia
<i>E. coli</i> DH5 α .	F-, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk-, mk+), phoA, supE44, λ -, thi-1, gyrA96, relA1	Sambrook y Russel, 2001.
<i>S. cerevisiae</i> s288c	MAT α , SUC2, gal2, mal, mel, flo1, flo8-1, hap1, ho, bio1, bio6	Mortimer y Johnston, 1986.
<i>S. cerevisiae</i> 256	Cepa industrial sensible a higromicina B, Lefersa	Esta tesis
<i>S. cerevisiae</i> schYG	Transformante Hyg ^R de cepa 256. Contiene módulo de resistencia a higromicina B en la región YPRCT3.	Esta tesis
<i>S. cerevisiae</i> Bcar1	Transformante Hyg ^R de cepa 256 productora de β -caroteno. Contiene los módulos de expresión de los genes <i>crtE</i> , <i>crtI</i> y <i>crtYB</i> en la región YPRCT3.	Esta tesis
<i>S. cerevisiae</i> Bcar4	Cepa 256 Hyg ^R segregante de Bcar1, sobreproductora de β -caroteno. Contiene los módulos de expresión de los genes <i>crtE</i> , <i>crtI</i> y <i>crtYB</i> en la región YPRCT3	Esta tesis

<i>S. cerevisiae</i> schYG-	Derivada de cepa schYG. sensible a higromicina B por pérdida del módulo de resistencia. Contiene una "cicatriz" de 50 pb en la región YPRCT3	Esta tesis
--------------------------------	---	------------

Tabla 2.- Plásmidos utilizados y construidos en este trabajo. Los cDNA provienen de *X. dendrorhous* cepa UCD 67-385 (ATCC 24230).

Plásmido	Característica	Referencia
pBluescript SK- (pBS)	ColE1 origen de replicación, Amp ^R , usado para clonamiento de módulos.	Invitrogen
pL25	pBS con cDNA gen <i>crtI</i>	Lodato, 2002
pJ1	pBS con cDNA gen <i>crtYB</i>	Alcaíno, 2002
pXD-mcrtE	pBS con cDNA gen <i>crtE</i>	Niklitschek, 2008
pC2	pBS con cDNA gen <i>crtS</i>	Carmona, 2007
pcXDA.44.29	pBS con cDNA gen <i>crtR</i>	Alcaíno, 2008
pMN-hyg	pBS con módulo de resistencia a antibiótico en <i>X. dendrorhous</i> , contiene el gen <i>hph</i> de <i>E. coli</i>	Niklitschek, 2007
pSC-crtI	pBS con módulo de expresión en <i>S. cerevisiae</i> de gen <i>crtI</i>	Esta tesis
pSC-crtYB	pBS con módulo de expresión en <i>S. cerevisiae</i> de gen <i>crtYB</i>	Esta tesis
pSC-crtE	pBS con módulo de expresión en <i>S. cerevisiae</i> de gen <i>crtE</i>	Esta tesis
pSC-crtS	pBS con módulo de expresión en <i>S. cerevisiae</i> de gen <i>crtS</i>	Esta tesis
pSC-crtR	pBS con módulo de expresión en <i>S. cerevisiae</i> de gen <i>crtR</i>	Esta tesis
pSC-hyg	pBS con módulo de resistencia a higromicina B en <i>S. cerevisiae</i>	Esta tesis
pSC-UPdr	pBS con fragmento de 598pb de la región YPRCT3 de <i>S. cerevisiae</i> s256c y una secuencia adicional de 50 pb.	Esta tesis
pSC-DOWN	pBS con fragmento de 449pb de la región YPRCT3 de <i>S. cerevisiae</i> s256c.	Esta tesis

2.2 Oligonucleótidos y Ácidos Nucleicos.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados por *Alpha DNA* o IDT (*Integrated DNA Technologies*). El nombre, secuencia y dirección de cada uno de ellos se indica en la tabla 3. Como marcadores de peso molecular se utilizó; λ *HindIII* (Fermentas). La cuantificación de DNA se realizó por comparación de intensidad de banda respecto al marcador λ *HindIII*.

Tabla 3.- Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5' a 3')	DNA Blanco o función	Dirección
Construcción de módulos			
TDH3p.F	agttcgagttatcattatcaatactgc	Promotor <i>TDH3</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Directo
TDH3p-CrtE.R	gcgtaatccattttgttttatg	Promotor <i>TDH3</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Reverso
CrtE-TDH3p.F	aaacaacaataatggattacgcgaa c	cDNA del gen <i>crtE</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Directo
CrtE-TDH3t.R	agtaaattcactcacagaggatc	cDNA del gen <i>crtE</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Reverso
TDH3t-CrtE.F	tccctctgtgaggaattactttaaact	Terminador <i>TDH3</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Directo
TDH3t.R	atcctggcggaaaaaattcattg	Terminador <i>TDH3</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Reverso
TEFp.F	aagcaacaggcgcgttg	Promotor <i>TEF</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Directo
TEFp-CrtYB.R	gag agc cgt cat ttt gta att aaa act tag att	Promotor <i>TEF</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Reverso
CrtYB-TEFp.F	ttt aat tac aaa atg acg gct ctc gca tat tac	cDNA del gen <i>crtYB</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Directo
CrtYB-TEFt.R	tat caa tct cct tac tgc cct tcc cat ccg ctc	cDNA del gen <i>crtYB</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Reverso
TEFt-CrtYB.F	gaa ggg cag taa gga gat tga taa gac ttt tct	Terminador <i>TEF</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Directo
TEFt.R	aaa aga cca aac ggt gac gtt	Terminador <i>TEF</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Reverso
ADH1p.F	actgtagcccggtagac	Promotor <i>ADH</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Directo
ADH1p-CrtI.R	ttctttccattgtatatgagatagttgatt g	Promotor <i>ADH</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Reverso
CrtI-ADH1p.F	tctcatatacaatgggaaaagaacaa gatcag	cDNA del gen <i>crtI</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Directo
CrtI-his3t.R	gcaacaagcftgcagaaagcaaga acaccaac	cDNA del gen <i>crtI</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Reverso
his3t-CrtI.F	ctgctttctgacaagcttgtgctcgggc aag	Terminador <i>his3</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Directo
his3t.R	atatgaaatgctttcttg	Terminador <i>his3</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Reverso
HXT7p.F	ctcgtaggaacaatttcggg	Promotor <i>HXT7</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Directo
HXT7p-CrtS.R	ccaagatgaacatttttgattaaatt	Promotor <i>HXT7</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Reverso
CrtS-HXT7p.F	ttaatcaaaaaatgttcattcttgctctg	cDNA del gen <i>crtS</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Directo
CrtS-PGK1t.R	ttcaattcaattcattgcacggcctt	cDNA del gen <i>crtS</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Reverso
PGK1t-CrtS.F	cggctcgaatgaattgaattgaattg	Terminador <i>PGK1</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Directo

PGK1t.R	ggcttcaagcttacacaacacg	Terminador <i>PGK1</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Reverso
*2pgk1p.f	ctcaactcaagacgcacagatat	Promotor <i>PGK1</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Directo
PGK1p-CrtR.R2	agfgtggccattgtttatattgtg	Promotor <i>PGK1</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Reverso
CrtR-PGK1p.F	aatataaaacaatggccacactctcc	cDNA del gen <i>crtR</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Directo
CrtR-HXT7t.R	agttcgcaactacgaccagacgtc	cDNA del gen <i>crtR</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Reverso
HXT7t-CrtR.F	tctggctgtagttgccaacttttatt	Terminador <i>HXT7</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Directo
*HXT7t.R2	agttgtagacgtgggtctgcg	Terminador <i>HXT7</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Reverso

Transformación

21up.F	aaaggagggtcacgcattat	Fragmento <i>up</i>	Directo
DR.Pmet.R	gactagtgcttgaagtacaatttact gctcagaggctcattcgattgcagtcaa aca	Añade a fragmento <i>up</i> cola homóloga a módulo <i>HYG</i>	Reverso
pMET.F	caatcgaatgagcctctgagcag	Promotor módulo <i>crtE</i>	Directo
DR.21dw.R	aatgattacaactctagtcgaaaaaac aagtagacgtctgacgtcccatccagt caaaca	Añade a módulo de resistencia a higromicina B cola homóloga a fragmento <i>down</i>	Reverso
21dw.F	gatgggacgtcagcactgta	Fragmento <i>down</i>	Directo
21dw.Rb	cgattccacatgtgtctca	Fragmento <i>down</i>	Reverso
DRpTDH.R	taittacgtattcttgaatggcagattg ataatgataaactgaaactcagtcaaa ca	Añade a módulo de resistencia a higromicina B cola homóloga a módulo <i>crtE</i>	Reverso
pTDH.F	agttcgagttatcattatcaatactgc	Módulo <i>crtE</i>	Directo
tTDH-pTEF.R	gtaaggattcgcggctcctgaaaatta aaagccaacgcgcctgtgctatcct ggcgg	Añade a módulo <i>crtE</i> cola homóloga a módulo <i>crtYB</i>	Reverso
tTDH-pTEF.F	tggtcttttttaagttacaaatgaattt ttccgcccaggataagcaacaggcgc g	Añade a módulo <i>crtYB</i> cola homóloga a módulo <i>crtE</i>	Directo
tTEF-pADH.R	gaaactcगतatgatgatggctatcaa gtctaccgggctacagtaaaagacc aaacgg	Añade a módulo <i>crtYB</i> cola homóloga a módulo <i>crtI</i>	Reverso
tTEF-pADH.F	ctgctcatagaattcttcttaacgt caccgfttggtcttactgtagcccggg	Añade a módulo <i>crtI</i> cola homóloga a módulo <i>crtYB</i>	Directo
this3.R	atatgaaatgctttctgt	Módulo <i>crtI</i>	Reverso
this3-21dw.F	taggtggcaagtggtattccgtaagaa caacaagaaaagcattcatatgatgg gacgtc	Añade a fragmento <i>down</i> cola homóloga a módulo <i>crtI</i>	Directo
this3.pHXT.F	taggtggcaagtggtattccgtaagaa caacaagaaaagcattcatatctcgt aggaac	Añade a fragmento <i>down</i> cola homóloga a módulo <i>crtR</i>	Directo
tPGK1.pPGK.F 2	gaaggatattttcgaaataaacctg ttgtgtaagcttgaagccctcaactcaa gac	Añade a módulo <i>crtR</i> cola homóloga a módulo <i>crtS</i>	Directo
tHXT-21dw.F	acaaatattccaatttgctcgcagacc cacgtctacaaagttgggatgggacg tcagc	Añade a fragmento <i>down</i> cola homóloga a módulo <i>crtR</i>	Directo
tPGK1.pPGK.R 2	tgctattgtgcagatgtataatctgt gcgtctgagttgaaggcttcaagctt ac	Añade a módulo <i>crtS</i> cola homóloga a módulo <i>crtR</i>	Reverso
tHXT21dw.R	gattacaactctagtcgaaaaacaag tacagtgctgacgtccatcccaactt tgtag	Añade a módulo <i>crtR</i> cola homóloga a fragmento <i>down</i>	Reverso

Análisis de transformantes

ATGcpr	atggccacactctccgat	cDNA del gen <i>crtR</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Directo
cpr7b	gaacaccacggtgtggaata	cDNA del gen <i>crtR</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Reverso
crtI.F2	ccgttggtgttcttgcttc	cDNA del gen <i>crtI</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Directo
Int21dw.rb	cctctttacaagcggagccta	Zona río abajo a sitio de integración	Reverso
crtYB.FIV	gctccattagtcgcctacg	cDNA del gen <i>crtYB</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Directo
crtI.R1	tgagaatcgatacccgttcc	cDNA del gen <i>crtI</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Reverso
IntHyg.F	gtgtcacgttgcaagacctg	Región interna gen <i>hph</i> , <i>E. coli</i>	Directo
crtE.R	agaggagacggatgattgaag	cDNA del gen <i>crtE</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Reverso
crtE.F	ctcatcgagactcgtcatca	cDNA del gen <i>crtE</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Directo
crtYBrev1.r	cgcatgtagaagtagtgatctgt	cDNA del gen <i>crtYB</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Reverso
IntHyg.R	cgacctcgtattggaatc	Región interna gen <i>hph</i> , <i>E. coli</i>	Reverso
Int21upF	aatacaggcgaatgtctagg	Zona río arriba a sitio de integración	Directo

* Oligonucleótido utilizado para construcción de módulos y análisis de transformantes.

2.3 Cultivo de microorganismos.

2.3.1 *S. cerevisiae*

Los medios para el cultivo de levadura corresponden a YM (0,3 % extracto de levadura, 0,3 % extracto de malta, 0,5 % peptona) y YEP (1 % extracto de levadura, 2 % peptona, 2 % glucosa). Para cultivos en placa se agregó bacto-agar al 1,5 %. Para la selección de transformantes que derivan de las cepas S288c o 256 se agregó a las placas el antibiótico higromicina B a una concentración final de 50 o 100 µg/ml, respectivamente. Los cultivos en placa se incubaron a 30 °C y los cultivos líquidos se crecieron a 22 °C o 30 °C con agitación constante.

2.3.1.1 Eliminación del marcador de selección y réplica de placas.

Para la eliminación del módulo de resistencia a higromicina B (marcador de selección), se creció la cepa transformante en medio líquido YEP a 22 °C sin presión

selectiva. Diariamente se inoculó 50 ml de medio fresco con 1 ml de cultivo del día anterior, esto se repitió durante 14 días.

Para hacer réplica de placas se tomó una muestra del cultivo de interés y se diluyó de tal manera de obtener colonias aisladas al sembrar en placas YEP-agar. Las placas se incubaron por un día a 30 °C y al día siguiente, se realizaron réplicas de la placa en placas YEP y YEP-higromicina 100 µg/ml utilizando un paño de terciopelo estéril sobre el que se presionó primero la placa con colonias y luego cada una de las placas sobre las que se hizo las réplicas. Las réplicas se incubaron por un día a 30 °C y se compararon visualmente seleccionando aquellas colonias que no crecieron en medio con antibiótico.

2.3.1.2 Curvas de crecimiento.

Se caracterizó el crecimiento de las cepas transformantes schYG, Bcar4 y la cepa silvestre 256 de *S. cerevisiae* elaborando una curva de crecimiento en medio YM con o sin suplementar el antibiótico higromicina B. Se dejó un cultivo en el medio correspondiente durante 30 h del que se tomó 1,5 ml para inocular un volumen de 150 ml de medio con o sin suplementar. Los cultivos se hicieron por triplicado y se incubaron a 30 °C con agitación constante. Se midió la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV150-02 a diferentes tiempos de cultivo.

2.3.2 *E. coli*

Para el cultivo de *E. coli* se utilizó medio LB (Luria Betrani) que contiene 1 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura y 0,5 % de NaCl. En el caso de cultivo en placa se agregó al medio Bacto-Agar al 1,5 %. Para el reconocimiento de clones transformantes, que poseen el plásmido pBS recombinante, el medio se suplementó

con ampicilina (100 µg/ml) y X-Gal (30 µg/ml) (Sambrook y col., 2001). Las placas se incubaron a 37 °C y los cultivos líquidos se crecieron a 37 °C durante 18 h con agitación constante.

2.4 Purificación de ácidos nucleicos.

2.4.1 DNA plasmidial.

La extracción de DNA plasmidial desde *E. coli* se realizó según lo descrito por Sambrook y cols. (2001). El DNA plasmidial utilizado para secuenciar se obtuvo mediante el kit de extracción de DNA Plasmidial (Axygene), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. El DNA obtenido se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

2.4.2 DNA genómico de *S. cerevisiae*.

La obtención de DNA genómico de levadura se realizó por ruptura mecánica en el que se mezcló 100 µl de microesferas de vidrio de 0,5 mm de diámetro (BioSpec Products Inc., USA) con 600 µl de amortiguador TE (25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0) y una colonia de células que se tomó desde una placa con un asa estéril. La mezcla se puso 3 min en un molidor de células Mini-Beadbeater-16 (BioSpec) y se centrifugó por 5 min a 4.000 g para luego traspasar el sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. A este tubo se agregó un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló por vórtex y centrifugó 1 min a 18.500 g en una microcentrífuga. Se recogió el sobrenadante y se traspasó a un tubo limpio, se agregó un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) para luego mezclar en vortex y centrifugar por 1 min a 18.500 g. Nuevamente, se pasó el sobrenadante a un tubo limpio y se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto frío. Esta mezcla se dejó a -20

°C por 1 h, se centrifugó por 10 min a 18.500 g y se eliminó el sobrenadante por inversión. El DNA se dejó secar a 37 °C por 5 min y se suspendió en 50 µl de agua.

2.4.3 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.

Para la recuperación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa, se cortó el fragmento de interés y se purificó con el kit DNA UltraClean™ 15 (MO BIO) o Wizard SV Gel and PCR Cleanup System (Promega), según las indicaciones del fabricante.

2.5 Reacciones de PCR.

2.5.1 PCR estándar.

Se realizó reacciones de PCR con enzima *Taq* DNA polimerasa (purificada en Laboratorio de Genética) para análisis de clones y transformantes. Para la obtención de fragmentos (promotor, cDNA de gen y terminador), y amplificación de DNA para transformación se usó la enzima *Pfu* DNA polimerasa (*PfuUltra*™ II HS DNA polymerase de Stratagene).

Las reacciones de PCR con *Taq* DNA polimerasa se realizaron en un volumen final de 25 µl. Esta reacción contenía amortiguador de PCR 1X pH 8,4 (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM), amortiguador BCP (100 mM Rojo cresol, 8,3 % de glicerol), 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxinucleótidos trifosforilados (dNTP), 1 mM de cada partidor, entre 10 y 20 ng de DNA molde y 1 unidad de enzima *Taq* DNA polimerasa. Se utilizó un termociclador 2720 Thermal Cycler de Applied Biosystems y el programa fue: desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, 35 ciclos de: desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineación de partidores a 55 °C por 30 s y elongación a 72 °C por 3 min, y por último una elongación final a 72 °C por 10 min. Cuando se hizo PCR de colonia en lugar de

agregar DNA a la mezcla de reacción se tomó una pequeña cantidad de células con un mondadientes directamente desde la colonia a analizar.

Las reacciones con *Pfu* DNA polimerasa se realizaron en un volumen final de 75 µl y se uso entre 30 y 60 ηg de DNA molde, 3 unidades de enzima *Pfu* DNA polimerasa, amortiguador de reacción 1x, una concentración final de 1 mM para cada partidor y 0,2 mM de cada dNTP. El protocolo de reacción fue modificado respecto al protocolo para PCR con *Taq* DNA polimerasa reduciendo el tiempo de elongación a 72 °C de 3 min a 1 min.

2.5.2 PCR de elongación (OE-PCR).

La reacción de PCR de elongación ("overlap extension PCR", OE-PCR) (Higuchi, 1988) se realizó en un volumen final de 25 µl e incluyó 20 ηg del fragmento más pequeño de DNA y 60 ηg del fragmento de DNA más largo a unir, 1 unidad de enzima *Pfu* DNA polimerasa, amortiguador de reacción 1x y una concentración final de 0,2 mM de cada dNTP. En este reacción no se agregaron partidores ya que la elongación ocurre desde los extremos de las hebras unidas en la hibridación. El protocolo utilizado fue de 1 min a 95 °C, 10 ciclos de; 1 min a 94 °C, 1 min a 52 °C y 1 min a 72 °C, con una elongación final de 10 min a 72 °C. Luego, la mezcla de reacción obtenida se amplificó a través de una reacción de PCR estándar con *Pfu* DNA polimerasa, siguiendo el protocolo indicado anteriormente, utilizando la mezcla de reacción del OE-PCR como molde.

2.6 Análisis de DNA.

2.6.1 Electroforesis en geles de agarosa.

Para visualizar y cuantificar los productos de PCR, DNA plasmidial y DNA genómico se agregó a la muestra el amortiguador de carga BCP (100 mM Rojo cresol, 8,3 % glicerol). La muestra se corrió en gel de agarosa a una concentración entre 0,7 y 1 % al que se agregó bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y amortiguador TAE (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico, 1 mM EDTA pH 8.0), siendo este último también el amortiguador de corrida.

2.6.2 Digestión con endonucleasas de restricción.

El vector pBS se linearizó incubando con la enzima *EcoRV* (Fermentas) en amortiguador 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl y 0,1 mg/ml BSA, pH 8,5. Se utilizó 1U de enzima por cada µg de DNA a digerir.

2.6.3 Secuenciación de DNA.

Las reacciones de secuenciación se realizaron en un secuenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) con el kit de terminadores fluorescentes BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Las secuencias se analizaron con el programa *Contig Express* del paquete de programa Vector NTI v1.0.

2.7 Transformación genética por electroporación.

2.7.1 Ligado de DNA.

Las reacciones de ligado se realizaron siguiendo las recomendaciones del proveedor de la enzima T4 DNA ligasa (Fermentas). Se utilizó el DNA a ligar en una

proporción molar 3:1 respecto del vector pBS, con 5U de T4 DNA ligasa, buffer de reacción 1x, polietilenglicol (PEG) 4.000 al 10 % y 10 mM de ATP en un volumen final de 20 μ l. La reacción se incubó a 22 °C por 1 h, se dializó durante 10 min en membranas de nitrocelulosa (Millipore) contra agua destilada y se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

2.7.2 Electrotransformación de *E. coli*.

Las células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α se prepararon inoculando 5 ml de un cultivo de 12 h en 500 ml de medio LB con ácido nalidixico (15 μ g/ml) que se incubó a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm entre 0,4 y 0,6 (fase exponencial temprana media). Luego, se centrifugó a 4.000 g durante 15 min a 4 °C para coleccionar las células y se eliminó el sobrenadante. Las células se lavaron dos veces con agua destilada estéril y fría, con 1 l y 500 ml respectivamente, y una vez con 20 ml de glicerol al 10 % (v/v). Finalmente, las células se suspendieron en 3 ml de glicerol al 10 % (v/v) y se tomaron alícuotas de 40 μ l en tubos Eppendorf para almacenarlas a -80 °C hasta su utilización.

Para la transformación se descongeló una de las alícuotas y se le agregó 4 μ l de DNA transformante, manteniendo la mezcla en hielo. Las condiciones de electroporación fueron: 25 μ F, 200 Ω y 2,5 kV en una cubeta de 2 mm. Luego, a la suspensión de células se le adicionó 1 ml de medio LB y se transfirió a un tubo Eppendorf que se incubó a 37 °C por 1 h. Se sembraron alícuotas de 100 μ l en placas con LB-ampicilina- X-Gal y se incubaron a 37 °C hasta el desarrollo de colonias. Se seleccionaron las colonias blancas, las que fueron analizadas mediante PCR de colonia.

2.7.3 *Electrotransformación de S. cerevisiae.*

Para la preparación de células de levadura electrocompetentes se sembró una colonia en 30 ml de medio YEP líquido durante la noche a 22 °C con agitación constante. A la mañana siguiente, se agregó al cultivo 30 ml de medio YEP fresco y se incubó por 3 h más. Las células se recolectaron por centrifugación a 4.000 g durante 5 min, se lavaron tres veces con 40 ml de agua destilada estéril fría y una vez con 4 ml de sorbitol 1M. Finalmente, las células se suspendieron en 0,2 ml de sorbitol 1M y se dividieron en alícuotas de 40 µl que se almacenaron a 4 °C por un máximo de dos días.

La preparación del DNA para transformar *S. cerevisiae* se hizo mezclando fragmentos de DNA, obtenidos previamente mediante PCR y purificados, en las siguientes cantidades: 250 ng de los fragmentos homólogos al sitio de blanco de integración y 350 ng de cada módulo de expresión. La mezcla total de DNA se precipitó agregando 2 volúmenes de etanol absoluto e incubando durante 16 h a -20 °C. Se centrifugó 10 min a 18.500 g, se eliminó el etanol por inversión y se dejó secar a 37°C por 5 min. El DNA seco se suspendió en 4 µl de agua.

Para transformar, se agregó a una alícuota de células competentes de *S. cerevisiae* los 4 µl de DNA preparado previamente. La mezcla se puso en una cubeta de electroporación de 2 mm y se incubó en hielo por 5 min antes de dar el pulso eléctrico (1,5 kV, 25 µF, 200 Ω) en electroporador GenePulser Xcell™ (BioRad). Posteriormente, las células se suspendieron en medio YEP y se incubaron a 30 °C por 1 h. Las células se centrifugaron y lavaron con sorbitol 1M a temperatura ambiente y se suspendieron en 1 ml de sorbitol 1M. Se sembraron fracciones de 100 µl en placas YEP suplementadas con higromicina B a 50 µg/ml para la cepa S288c o 100 µg/ml para la cepa 256, y se incubaron a 30°C por dos días.

2.8 Extracción de pigmentos y RP-HPLC

La extracción de pigmentos se hizo desde cultivos de 50 ml incubados durante 72 h a 22 °C con agitación constante, o bien, desde alícuotas tomadas desde la curva de crecimiento de la cepa correspondiente, basándose en el protocolo descrito para *X. dendrorhous* por An y colaboradores (1989). Se tomó un volumen de 4 o 5 ml por triplicado para determinar el peso seco en un tubo Eppendorf de 1,5 ml previamente masado. Estas muestras se dejaron secando a 80 °C por 24 h y se masaron, nuevamente, para calcular la diferencia respecto al tubo vacío. Por otro lado, se tomó otro volumen de cultivo para extracción de pigmentos y se centrifugó por 5 min a 4.000 g en una centrifuga Sorvall de sobremesa. El pellet celular se lavó con 10 ml de agua destilada, se suspendió en 1,5 ml de agua destilada y se agregó 0,5 ml de microesferas de vidrio de 0,5 mm de diámetro (BioSpec Products Inc., USA). Posteriormente, se agitó en molidor de células Mini-Beadbeater-16 (BioSpec) por 3 min. Para extraer los pigmentos, se agregó 2 ml de acetona y se agitó nuevamente en molidor de células por 3 min, se centrifugó por 5 min a 4.000 g para recuperar la fase superior en otro tubo. Este procedimiento de extracción por acetona se repitió hasta que los restos celulares quedaron de color blanco. Finalmente, se midió el volumen de acetona recuperado y se agregó la quinta parte de éter de petróleo. La mezcla se agitó en vórtex durante 10 min, se separaron las fases por centrifugación por 5 min a 4.000 g y se recuperó la fase superior con los pigmentos. Para conocer la concentración de carotenoides totales, se calculó el volumen de éter de petróleo recuperado y se midió la absorbancia a 474 nm.

El cálculo del contenido total de carotenoides (en partes por millón) en la muestra se realizó según la ecuación 1, donde; A corresponde a la absorbancia a 474 nm, E es el

volumen de éter de petróleo recuperado en ml, D es la dilución usada para medir, S es el volumen de cultivo usado para medir peso seco de levadura en ml, P es el volumen de cultivo usado para la extracción de pigmentos en ml y W es el peso seco de levadura en gramos.

$$\text{Carotenoides} = \frac{E \times A \times D \times S \times 100}{P \times W \times 21} \quad \text{Ecuación 1}$$

El análisis de la composición de pigmentos se realizó mediante cromatografía líquida en fase reversa en un equipo de HPLC (RP-HPLC) con un detector de arreglo de diodos Shimadzu SPD-M10A. Para ello, se dejó evaporar el éter de petróleo de cada muestra y los pigmentos se suspendieron en 1 ml de acetona al momento de cargar la muestra en el equipo. Se utilizó una columna Lichrospher RP18 125-4 (Merck) y como fase móvil una mezcla de acetonitrilo:metanol:isopropanol (85:10:5), con un flujo de 1 ml/min en condiciones isocráticas. La identificación de pigmentos se realizó por comparación con estándares específicos de acuerdo al tiempo de retención y su espectro de absorción.

3 RESULTADOS

3.1 Construcción de módulos de expresión de genes de carotenogénesis para *S. cerevisiae*.

3.1.1 Amplificado e hibridación de fragmentos.

Para la construcción de cada módulo de expresión primero se amplificó cada fragmento, es decir, promotor, cDNA de cada gen y terminador por PCR con *Pfu* DNA polimerasa, para evitar errores, de acuerdo a lo indicado en tabla 4. Los promotores y terminadores se amplificaron desde DNA genómico extraído de la cepa S288c de *S. cerevisiae*, y los cDNA de los genes carotenogénicos desde los vectores pXD-mcrtE (gen *crtE*), pC2 (gen *crtS*) y pXDA.44.29 (gen *crtR*) (tabla 1). En cada reacción de PCR se usó partidores específicos, según se indica en la tabla 4, que permitieran la hibridación entre los fragmentos adyacentes en el respectivo módulo. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y luego se purificaron desde el mismo. La unión de fragmentos se hizo mediante PCR de elongación (OE-PCR) y el producto de la reacción de elongación se purificó desde un gel de agarosa. En la figura 3 se muestra un esquema de cada uno de los módulos construidos y clonados en el vector pBS.

Tabla 4.- Fragmentos amplificados para la construcción de cada módulo y partidores usados en cada reacción.

Módulo	Fragmento amplificado (tamaño pb)	Partidor directo	Partidor reverso
<i>crtE</i>	Promotor TDH3 (680)	TDH3p.F	TDH3p-CrtE.R
	Gen <i>crtE</i> (1131)	CrtE-TDH3p.F	CrtE-TDH3t.R
	Terminador TDH3 (300)	TDH3t-CrtE.F	TDH3t.R
<i>crtYB</i>	Promotor TEF1 (500)	TEFp.F	TEFp-CrtYB.R
	Gen <i>crtYB</i> (2022)	CrtYB-TEFp.F	CrtYB-TEFt.R
	Terminador TEF1 (300)	TEFt-CrtYB.F	TEFt.R
<i>crtI</i>	Promotor ADH1 (503)	ADH1p.F	ADH1p-CrtI.R
	Gen <i>crtI</i> (1749)	CrtI-ADH1p.F	CrtI-his3t.R
	Terminador his3 (301)	his3t-CrtI.F	his3t.R
<i>crtS</i>	Promotor HXT7 (391)	HXT7p.F	HXT7p.CrtS.R
	Gen <i>crtS</i> (1674)	CrtS-HXT7p.F	CrtS-PGK1t.R
	Terminador PGK1 (332)	PGK1t-CrtS.F	PGK1t.R
<i>crtR</i>	Promotor PGK1 (762)	2pgk1p.f	PGK1p-CrtR.R
	Gen <i>crtR</i> (2241)	CrtR-PGK1p.F	CrtR-HXT7t.R
	Terminador HXT7 (299)	HXT7t-CrtR.F	HXT7t.R2

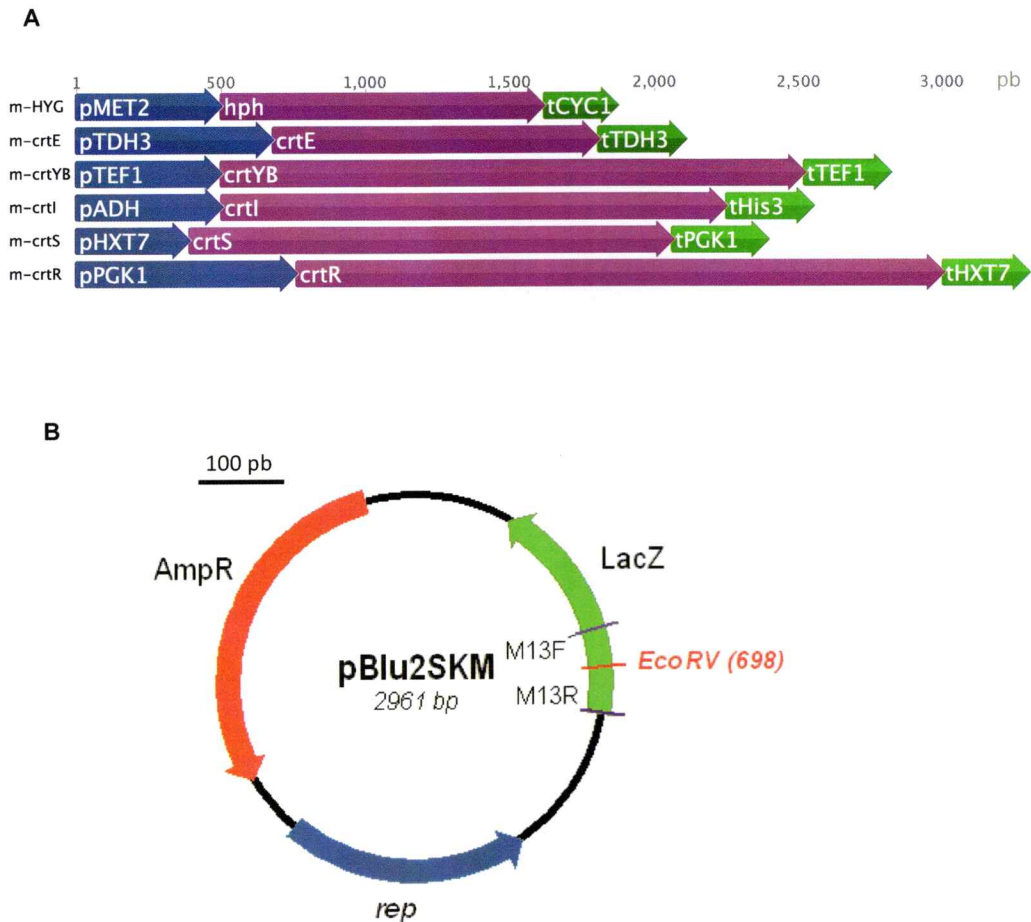


Figura 3.- Construcciones de DNA hechas en este trabajo. A) Esquema de módulos de expresión en *S. cerevisiae* mencionados en este trabajo. El nombre de cada módulo se muestra al costado izquierdo precedido por una m, promotores se encuentran en color azul, genes en violeta y terminadores en verde. Sobre las figuras se indica la escala en pb. **B)** Mapa del plásmido pBluescript SK-, en que se insertaron los módulos usados en este trabajo, en color rojo se indica la región codificante para el gen de la β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina, en azul se muestra la región *rep*, que corresponde al replicón pMB1 y permite la replicación del plásmido y en verde muestra la región codificante *lacZ* que codifica para una porción de la enzima β -galactosidasa. Como líneas violeta se indica la posición de los sitios de hibridación de los partidores universales M13F y M13R, y en rojo en lugar en que se insertó cada módulo, correspondiente al sitio de corte con la endonucleasa de restricción *EcoRV*.

A modo de ejemplo, en la figura 4 se muestra la migración en un gel de agarosa de los fragmentos obtenidos para la construcción del módulo de expresión del gen *crtE* (GenBank: DQ012943) y . En el gel se muestran los amplificadores de PCR para cada uno de los componentes del módulo y se indican sus respectivos tamaños; promotor del gen de la enzima gliceraldehído 3-fosfato-dehidrogenasa (TDH3p, Gene ID: 853106), cDNA del gen *crtE* y terminador del gen TDH3 (TDH3t). Además se muestra el producto de la unión *crtE*-TDH3t y la unión de *crtE*-TDH3t con TDH3p, formando el módulo completo.

Los módulos de expresión de los genes *crtS* (GenBank: DQ002006) y *crtR* (GenBank: EU884133) se construyeron de la misma manera, siguiendo los tamaños esperados de cada fragmento y luego de la unión de ellos. El módulo *crtS* comprende la unión del promotor del transportador de hexosa 7 (pHXT7, Gene ID: 851943) de *S. cerevisiae*, de 391 pb, con el cDNA del gen *crtS* (astaxantina sintasa) de *X. dendrorhous* de 1.674 pb y el terminador PGK1 (3-fosfoglicerato quinasa, Gene ID: 850370) de *S. cerevisiae* con un tamaño de 332 pb. En su construcción, en primer lugar se obtuvo el fragmento pHXT7-*crtS* de 2.065 pb y luego el módulo completo (pHXT7-*crtS*-tPGK1) con un tamaño de 2.397 pb. El módulo *crtR* se formó al unir el promotor PGK1 (762 pb) de *S. cerevisiae* con el cDNA del gen *crtR* (citocromo p450 reductasa de *X. dendrorhous*, 2.241 pb) y el terminador HXT7 (299 pb) de *S. cerevisiae*. Para su construcción primero se generó el fragmento pPGK1-*crtR* de 3.003 pb al que se unió el terminador, obteniendo el módulo final con un tamaño de 3.302 pb.

Los módulos expresión de los genes *hph* (que confiere resistencia a higromicina B), *crtI* (GenBank: DQ028748) y *crtYB* (GenBank: DQ016503) se construyeron en paralelo por Dony Sepúlveda, siguiendo la misma metodología.

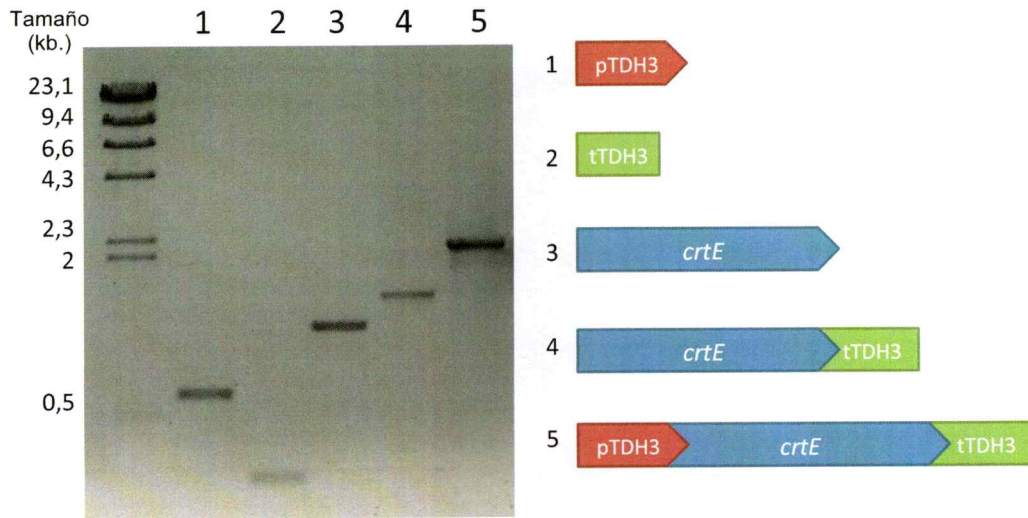


Figura 4.- Resultados PCR de elongación del módulo *crtE*. A la izquierda se presenta una imagen de un gel de agarosa con los fragmentos utilizados para la construcción del módulo. Se muestra el marcador DNA bacteriófago lambda digerido con *HindIII*, carriles; 1) promotor TDH3 (TDH3p.F y TDH3p-crtE.R, 680 pb), 2) terminador TDH3 (TDH3t-crtE.F y TDH3t.R, 300 pb), 3) cDNA *crtE* (crtE-TDH3p.F y crtE-TDH3t.R, 1131 pb), 4) *crtE* +terminador TDH3 (crtE-TDH3p.F y TDH3t.R, 1431 pb), 5) módulo *crtE* completo, promotor TDH3 + *crtE* + terminador TDH3 (TDH3p.F y TDH3t.R, 2111 pb). A la derecha se muestra un esquema representando cada fragmento amplificado con un número correlativo a su carril en el gel de agarosa. En rojo se muestra el promotor TDH3, en azul el cDNA del gen *crtE* y en verde el terminador TDH3.

Para la construcción del módulo de resistencia a higromicina B se unió el promotor del gen de la enzima L-homoserina-O-acetiltransferasa (pMET2, Gene ID: 855444) con el gen *hph* de *E. coli* y el terminador del gen de la citocromo C isoforma 1 (tCYC1, Gene ID: 853507). El módulo del gen *crtI* se construyó uniendo el promotor de la enzima alcohol deshidrogenasa 1 (pADH1, Gene ID: 854068) con el cDNA para el gen *crtI* y el terminador de la enzima Imidazolglicerol-fosfato deshidratasa (tHis3, Gene ID: 854377). El módulo del gen *crtYB* se fabricó con el promotor del factor de elongación traduccional 1 (pTEF1, Gene ID: 856195), el cDNA del gen *crtYB* y el terminador TEF1 (tTEF1).

3.1.2 Clonado de módulos en vector pBluescript SK.

Cada módulo de expresión construido se ligó independientemente al vector pBluescript SK (pBS) digerido, previamente, con la endonucleasa de restricción *EcoRV*. La figura 3 B muestra un esquema de este vector y se indica con color rojo el sitio de corte reconocido por *EcoRV* donde se ligó cada módulo. El producto de la reacción de ligado se transformó en células electrocompetentes de *E. coli* y se seleccionaron colonias de color blanco resistentes al antibiótico ampicilina. Para confirmar la presencia del módulo en las colonias transformantes, se hizo PCR de colonias con partidores específicos de cada módulo.

En la figura 5 se muestra como ejemplo la detección del módulo de expresión del gen *crtR* en las colonias transformantes de *E. coli*. Primero se analizaron varias de estas colonias para chequear la presencia del gen *crtR* usando partidores que amplifican un fragmento interno de alrededor de 1,4 kb de dicho gen (partidores ATGcpr.F y cpr7b) (figura 5, A). Se obtuvo un resultado positivo en las colonias 1, 4, 10

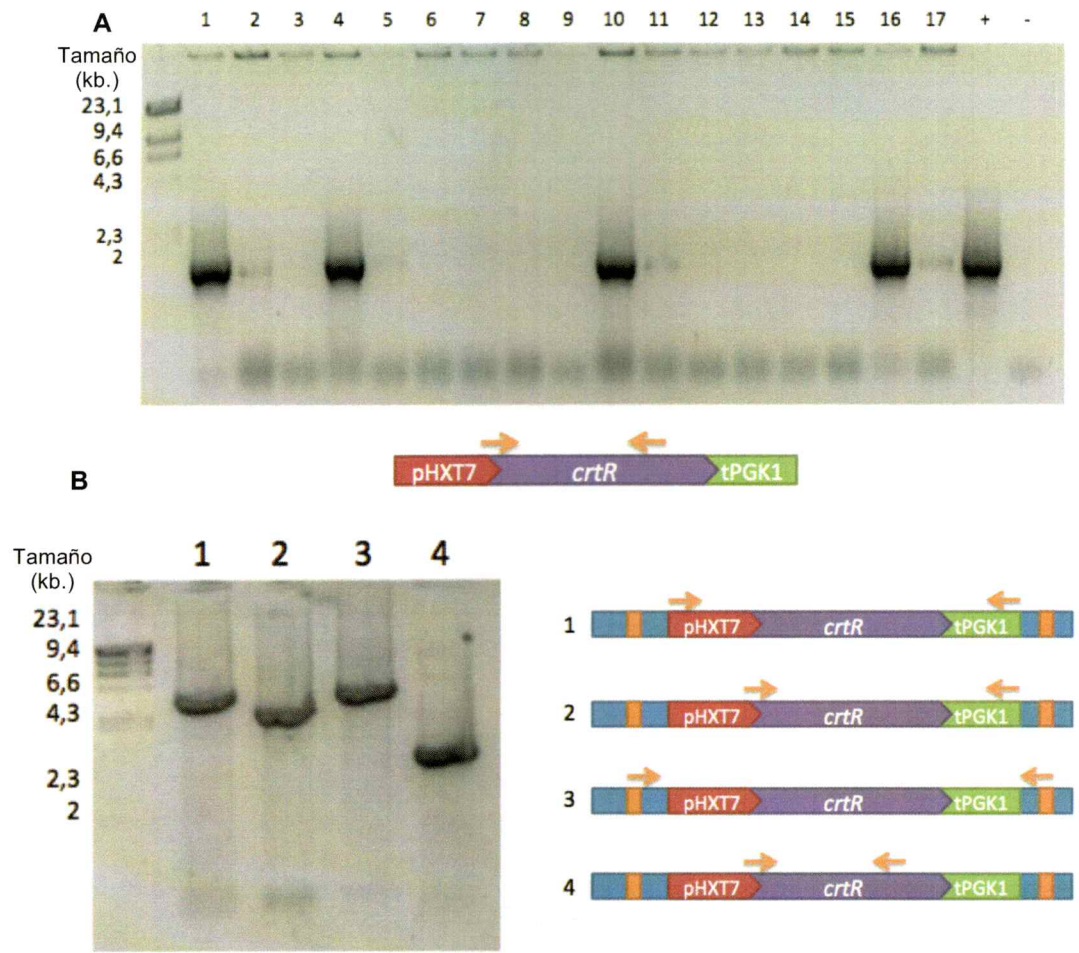


Figura 5.- PCR para identificar clones de *E. coli* con el módulo *crtR* en pBS. **A)** Amplicones obtenidos luego de realizar reacciones de PCR con partidores internos para cDNA del gen *crtR* en 17 colonias transformadas con el módulo *crtR* en el vector pBS, se observan 4 colonias positivas con un amplificado de aproximadamente 1,4 kb, usando los partidores ATGcpr.F (directo) y cpr7b (reverso). Estas colonias corresponden a las indicadas con los números 1, 4, 10 y 16, sobre el carril respectivo. **B)** Amplificación por PCR utilizando como molde el DNA plasmidial extraído desde la colonia 4 para confirmar la presencia del módulo completo en el plásmido; carriles 1: módulo completo (partidores 2pgk1p.F y HXT7t.R, tamaño aproximado de 3,3 kb), 2: gen-terminador (ATGcpr, HXT7t.R, 2,5 kb), 3: amplificado entre regiones M13 del vector, correspondientes a DNA del vector más el inserto (M13F, M13R, 3,5 kb) y 4: control de amplificado en PCR de colonia (ATGcpr y cpr7b, 1,4 kb). A la derecha se esquematiza la posición de los amplificados respecto al módulo. En ambos geles el primer carril lleva el marcador de tamaño molecular, DNA bacteriófago lambda digerido con *HindIII*.

y 16. De manera aleatoria se seleccionó la colonia 4 de la cual se extrajo DNA plasmidial y se analizó por PCR estándar para confirmar la presencia y correcta estructura del módulo dentro del vector (figura 5, panel B y C). El plásmido derivado de pBS que contiene el módulo *crtR* se denominó pSC-crtR. De la misma forma, se procedió con los otros módulos para obtener los plásmidos pSC-HYG, pSC-crtE, pSC-crtYB, pSC-crtI y pSC-crtS (tabla 5).

Cada inserto de estos plásmidos, correspondientes a los módulos de expresión para los genes de carotenogénesis de *X. dendrorhous* y del gen *hph* de *E. coli*, fue secuenciado completamente para confirmar su correcta construcción.

3.2 Transformación de *S. cerevisiae*

3.2.1 Cepa resistente al antibiótico higromicina B

Con el fin de utilizar como marcador de selección la resistencia al antibiótico higromicina B se analizó cualitativamente la resistencia al antibiótico de las cepas S288c y 256. Para ello se prepararon placas YM-agar suplementadas con diferentes concentraciones de antibiótico (entre 4 y 50 µg/ml) y se evaluó el crecimiento de colonias de levadura en la placa luego de incubar por 2 días a 30 °C. Se determinó que la concentración de higromicina B a utilizar para la selección en placa de transformantes que derivan de la cepa S288c es de 50 µg/ml, ya que no se observó el crecimiento de colonias a esta concentración. Para la cepa 256 se decidió usar el doble de concentración, es decir 100 µg/ml ya que mostró mayor resistencia al antibiótico que la cepa anterior. Para evaluar el sistema de transformación, por *DNA assembler*, y de selección, inicialmente se transformó la cepa 256 introduciendo solo el módulo de resistencia a higromicina B, según el esquema presentado en la figura 6, donde se

Tabla 5.- Combinaciones de partidores usadas para la amplificación de fragmentos para cada transformación.

Transformación	Módulo o fragmento amplificado (tamaño pb)	Plásmido usado para amplificar	Partidor directo	Partidor reverso
HygR	<i>Up</i> (598)	pSC-UP	21up.F	DRpmet.R
	m-Hyg (1874)	pSC-Hyg	pmet.F	DR21dw.R
	<i>Down</i> (449)	pSC-DOWN	21dw.F	21dw.Rb
β-caroteno	<i>Up</i> (598)	pSC-UP	21up.F	DRpmet.R
	m-Hyg (1874)	pSC-Hyg	pmet.F	DRpTDH.R
	m-crtE (2111)	pSC-crtE	pTDH.F	tTDHpTEF.R
	m-crtYB (2822)	pSC-crtYB	tTDHpTEF.F	tTEFpADH.R
	m-crtI (2553)	pSC-crtI	tTEFpADH.F	this3.R
	<i>Down</i> (449)	pSC-DOWN	this3-21dw.F	21dw.Rb
Astaxantina	<i>Up</i> (598)	pSC-UP	21up.F	DRpmet.R
	m-Hyg (1874)	pSC-Hyg	pmet.F	DR21dw.R
	m-crtE (2111)	pSC-crtE	pTDH.F	tTDHpTEF.R
	m-crtYB (2822)	pSC-crtYB	tTDHpTEF.F	tTEFpADH.R
	m-crtI (2553)	pSC-crtI	tTEFpADH.F	this3.R
	m-crtS (2397)	pSC-crtS	this3.pHXT.F	tPGK1.pPGK.R2
	m-crtR (3302)	pSC-crtR	tPGK1.pPGK.F2	tHXT21dw.R
	<i>Down</i> (449)	pSC-DOWN	tHXT21dw.F	21dw.R

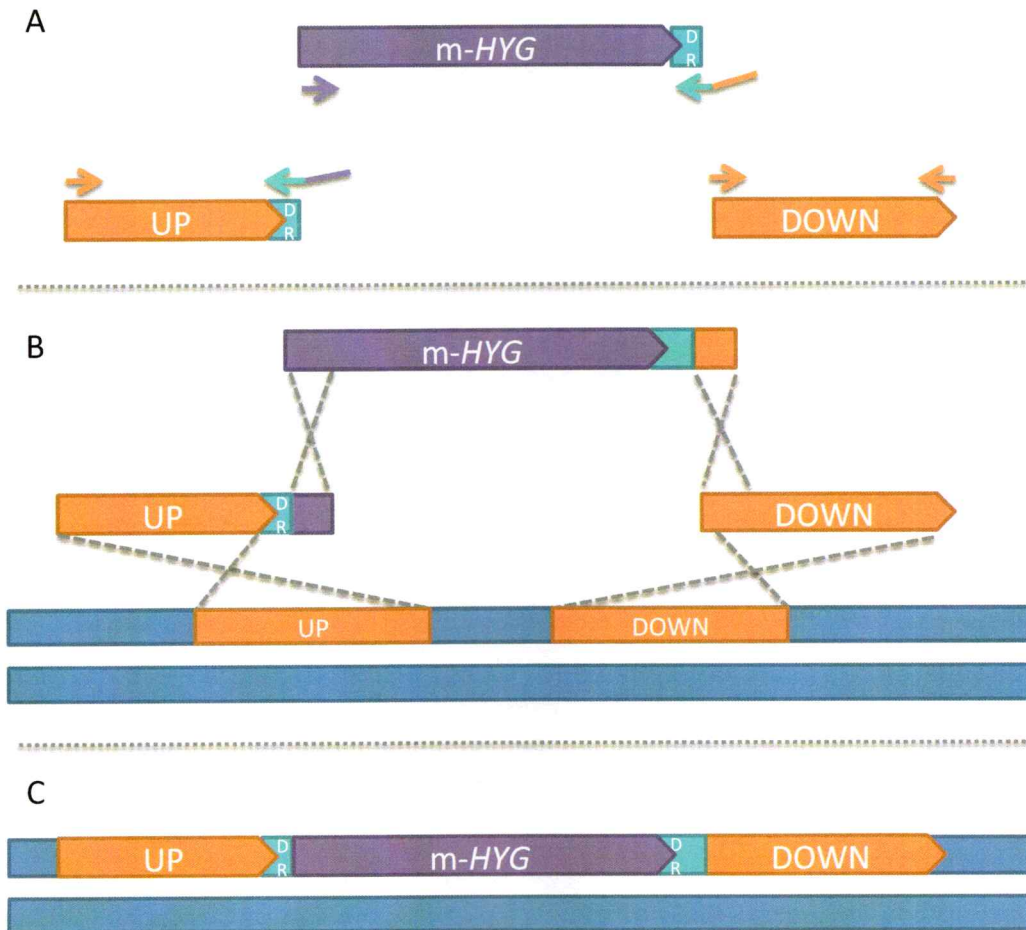


Figura 6.- Esquema de pasos para transformación de *S. cerevisiae* resistente a higromicina B. En naranja se muestran los segmentos de DNA (*UP* y *DOWN*) usados para dirigir la integración del módulo en el cromosoma, en violeta el módulo de resistencia a higromicina B, en celeste los repetidos directos (DR) usados posteriormente para la escisión del módulo y en azul se representa el cromosoma de la levadura. Se incluye en la representación una segunda copia del cromosoma de la levadura, sin embargo, no se conoce cuántas copias se encuentran en la cepa utilizada. **A)** Amplificado por PCR de fragmentos para la transformación usando partidores que incluyen una región homóloga al DNA con que se quiere unir. Los partidores se representan por flechas del color del fragmento que amplifican. **B)** Eventos de recombinación homóloga que ocurrirían en la transformación. Los fragmentos amplificados previamente son co-transformados en *S. cerevisiae* donde hay recombinación, indicado por líneas punteadas, entre segmentos homólogos y con uno de los cromosomas de la levadura. **C)** Resultado esperado del ensamblaje de fragmentos en el cromosoma de la levadura.

muestra el sitio de integración y el orden de los fragmentos una vez ensamblados e integrados. Además se amplificaron los fragmentos necesarios para la integración dirigida del módulo. Estos fragmentos corresponden a una región de 598 pb río arriba del sitio de integración (*up*) y una región de 449 pb río abajo al sitio de integración (*down*), a estas regiones se agregó una secuencia de 50 pb a modo de repetidos directos (*DR*) que permitirán la escisión del módulo por recombinación entre ellos.

Previo a la transformación, los fragmentos se amplificaron desde DNA plasmidial por PCR usando *Pfu* DNA polimerasa, con los partidores y plásmidos indicados en la tabla 2, y luego fueron purificados desde gel de agarosa. Los partidores utilizados en la amplificación de cada fragmento incluyen una región de 50 pb homóloga al fragmento aledaño con el que se desea ensamblar en la transformación. Se tomó 250 ng de los fragmentos *up* y *down*, y 350 ng del módulo de resistencia a higromicina B y se precipitaron en conjunto. Con la mezcla de fragmentos, se transformaron células electrocompetentes de la cepa 256 de *S. cerevisiae* y las células transformadas se seleccionaron en placas YEP suplementadas con higromicina B. De esta manera se obtuvo 3 transformantes resistentes a higromicina, que se aislaron para luego extraer su DNA cromosómico.

La incorporación del módulo en la ubicación esperada se evaluó por PCR estándar sobre DNA genómico de la levadura transformante, usando diferentes combinaciones de partidores y comparando los amplificados obtenidos con el control de DNA genómico de la cepa parental sin transformar. Como se puede observar en la figura 7, las cepas amplifican para la región de inserción mostrando una banda de 1,8 kb (partidores *Int21up.F* e *Int21dw.Rb*, panel A). La presencia de esta banda en la cepa transformante no corresponde al tamaño esperado para la región luego de la integración del módulo de expresión del gen *hph*. Sin embargo, las cepas

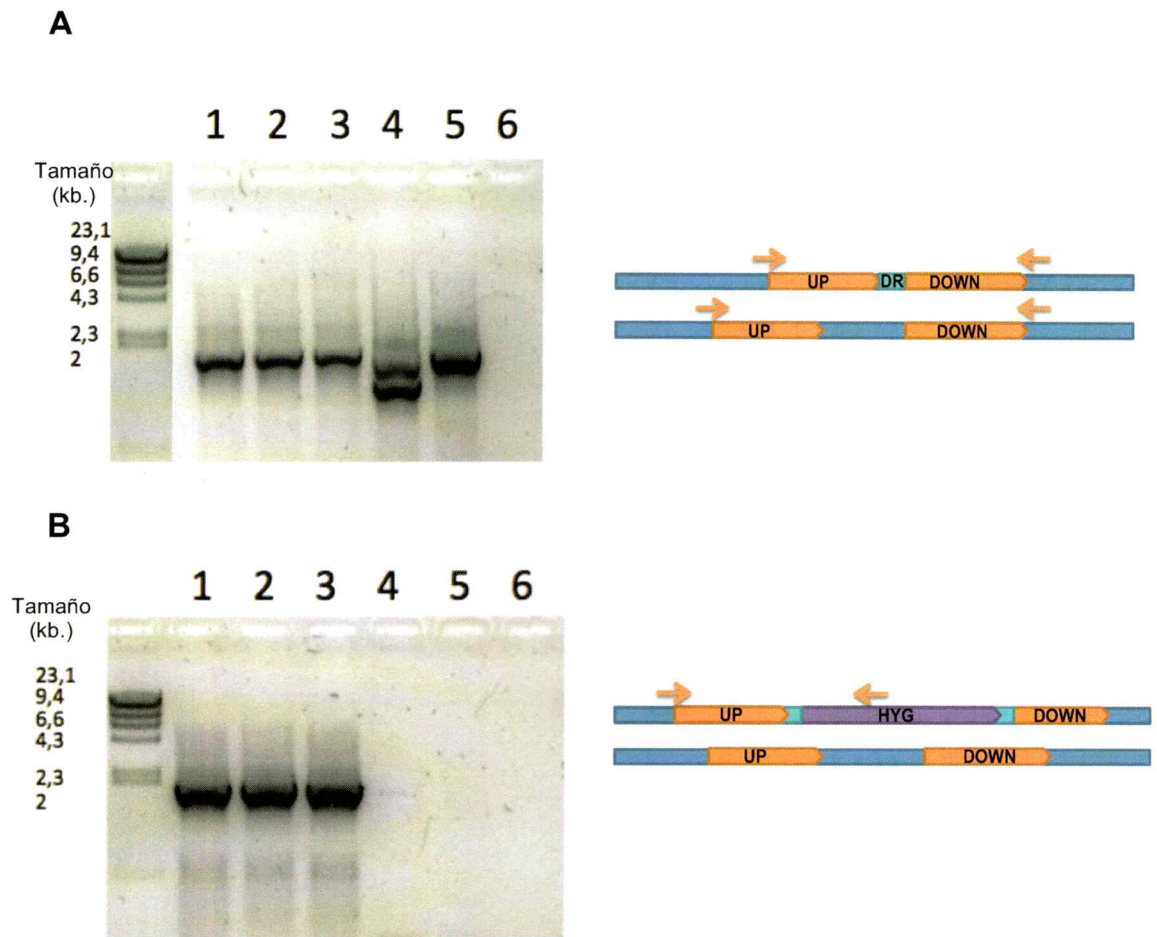


Figura 7.- Resultados de PCR para cepas transformadas con módulo de resistencia a higromicina B. Amplicones obtenidos desde cepas transformantes resistentes a higromicina B (schHYG1, 2, 3), se indican como 1, 2 y 3 sobre el carril respectivo. El carril 4 corresponde al resultado obtenido desde la cepa schHYG-, en la que se escindió el módulo de resistencia a higromicina B. Con el número 5, se indica la cepa silvestre (256) y con el 6 el control negativo sin DNA. **A)** Amplificado de la región genómica en la que se insertó el módulo de resistencia a higromicina, analizada usando los partidores Int21up.F e Int21dw.Rb. A la derecha se presenta un esquema de las regiones amplificadas silvestre y luego de escindido el módulo de resistencia a higromicina B. **B)** Amplificado de la porción anterior del módulo de resistencia a higromicina B usando los partidores Int21up.F e IntHyg.R. A la derecha se muestra un esquema de la región amplificada. Junto a cada serie se cargó marcador de tamaño DNA bacteriófago lambda digerido con *Hind*III.

transformantes, indicadas como 1, 2 y 3, amplifican el fragmento correspondiente al módulo de resistencia a higromicina con parte del sitio de inserción río arriba dando un fragmento de alrededor de 1,9 kb (Int21up.F, IntHyg.R, panel B). Esto indicaría que la cepa utilizada en la transformación es aneuploide o bien tiene más de una copia de la región de integración. De las cepas obtenidas se seleccionó la transformante número 1, a la que se referirá como cepa schYG.

3.2.1.1 Escisión del módulo de resistencia a higromicina B

La escisión del módulo de resistencia a higromicina B se logró cultivando la cepa schYG en medio YEP líquido sin presión selectiva con agitación a 22 °C durante 14 días. El cultivo se refrescó diariamente y se sembró una alícuota del cultivo en placas YEP-agar de tal manera de obtener colonias independientes. Las placas se incubaron a 30 °C por un día y luego se realizó una réplica de placas con medio YEP suplementado con antibiótico (higromicina B, 100 µg/ml) y sin suplementar, que fueron incubadas durante otro día. Se seleccionaron aquellas colonias sensibles al antibiótico y se extrajo DNA genómico para analizar por PCR estándar la ausencia del módulo de resistencia a higromicina.

En el carril 4 del panel A de la figura 7 se muestra el cambio en el patrón de amplificación de DNA de la cepa sensible (cepa schYG-) a higromicina B debido a la escisión del módulo de resistencia al antibiótico. Se observa un amplificado de 1,5 kb para la región de integración del módulo (partidores Int21up.F e Int21dw.Rb) a diferencia de un amplificado de 1,9 kb en las cepas resistentes. Además se observa la presencia de una banda adicional con menor intensidad y de un tamaño cercano a las 1,7 kb. Dado que la levadura transformada es aneuploide, existiría mas de un sitio sobre el cual puede haber recombinación, lo que en este caso explica la aparición de

esta banda adicional. Por otra parte se confirmó la pérdida del módulo de resistencia a higromicina B ya que no se observan amplificadores al utilizar partidores específicos para dicho módulo (carril 4, figura 7 panel B). El amplificado de 1,5 kb de la región de integración de la cepa scHYG- se purificó desde el gel y se secuenció para corroborar la pérdida del módulo completo. Al analizar la secuencia se confirmó que efectivamente el módulo de resistencia a higromicina B se escindió, dejando como evidencia de su anterior presencia la secuencia de un repetido directo (DR) en el sitio de inserción.

3.2.1.2 Obtención de cepa sobreproductora de β -caroteno

Para obtener una cepa industrial de *S. cerevisiae* productora de β -caroteno se transformó la cepa 256 mediante el método *DNA assembler* con los módulos de expresión para los genes *hph*, *crtE*, *crtYB* y *crtI*, determinando como sitio de integración el *locus* YPRC τ 3. El procedimiento para dicha transformación y el orden esperado para la integración de los genes se esquematiza en la figura 8.

De esta transformación se obtuvo una colonia transformante resistente a higromicina B que presentó un fenotipo de color anaranjado, denominada Bcar1. Como se mencionó previamente, la cepa 256 sería aneuploide para el sitio de integración en el genoma, por lo que se puede esperar la aparición de colonias segregantes en cepas transformantes. Esto se observó al rayar la cepa Bcar1 en placas de agar, donde se encontraron algunas colonias segregantes que mostraban diferente fenotipo (figura 9 A). En la figura 9 B es posible observar la variedad de tonalidades que muestran las colonias segregantes en un rayado de la cepa Bcar1, dentro de un recuadro se indican tres colonias adyacentes que muestran diferente pigmentación entre sí.

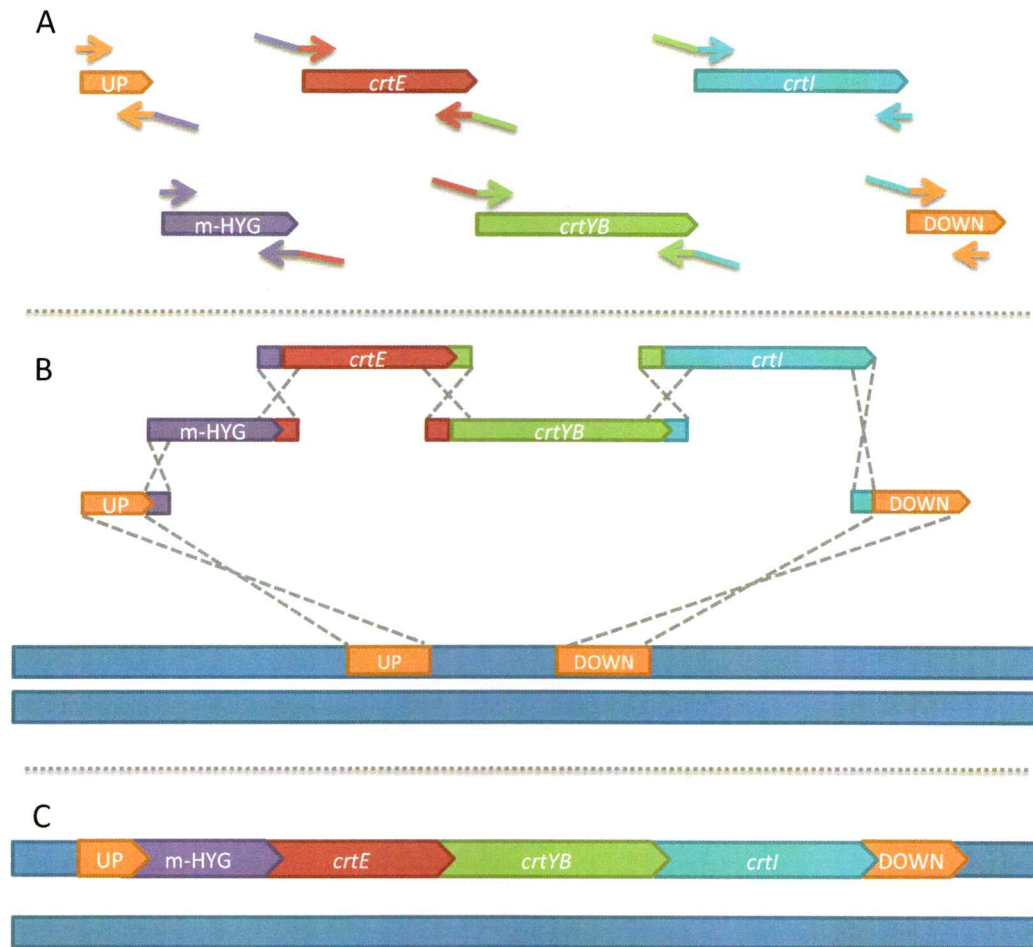


Figura 8.- Esquema mostrando el orden de inserción de módulos para la transformación de *S. cerevisiae* productora de β -caroteno. En naranja se muestran los segmentos de DNA (*UP* y *DOWN*) usados para dirigir la integración del módulo en el cromosoma, en violeta el módulo de resistencia a higromicina B, en rojo el módulo *crtE*, en verde el módulo *crtYB*, en celeste el módulo *crtI* y en azul se representa el cromosoma de la levadura. Se incluye en la representación una segunda copia del sitio de integración dado que no se conoce cuántas copias se encuentran en la cepa utilizada. **A)** Amplificado por PCR de módulos para la transformación usando partidores que incluyen una región homóloga al fragmento con que se quiere unir. Los partidores se representan por flechas del color del DNA que amplifican más una cola del color del fragmento con el que quiere ensamblar. **B)** Eventos de recombinación homóloga que ocurrirían en la transformación llevando al ensamblaje de los módulos entre sí y con el cromosoma. Los fragmentos amplificados previamente son co-transformados en *S. cerevisiae* donde hay recombinación, indicado por líneas punteadas, entre segmentos homólogos y el cromosoma de la levadura. **C)** Resultado final del ensamblaje de fragmentos en el cromosoma de la levadura mostrando el orden esperado.

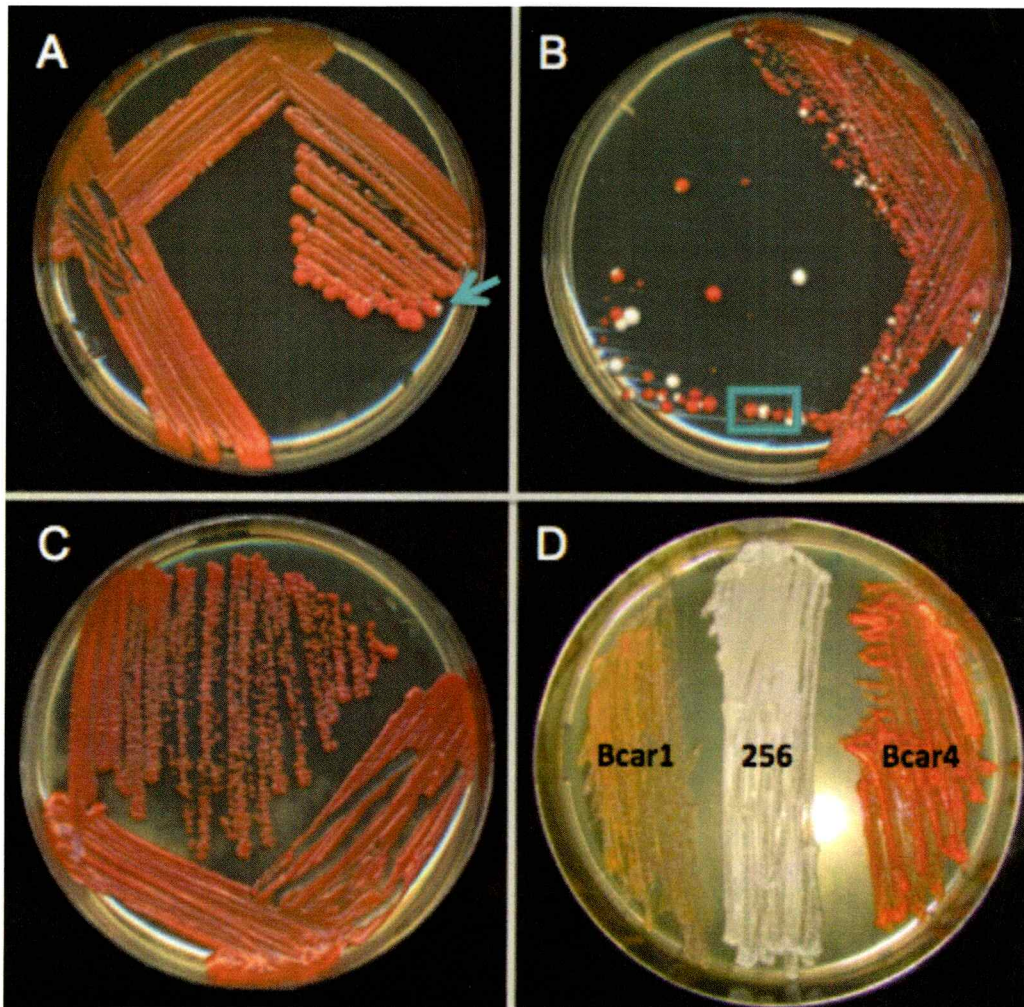


Figura 9.- Fenotipo de cepas productoras de β -caroteno. **A)** Cepa Bcar1 en placa YEP, la flecha indica una colonia segregante blanca. **B)** Rayado derivado de cepa Bcar1 en higromicina 500 μ g/ml, dentro del cuadro se muestran tres colonias de tonalidad diferente, una de color naranja, la siguiente de color blanco y la tercera de color rojo. **C)** Cepa Bcar4 en placa YEP higromicina 500 μ g/ml. **D)** Rayados de las cepas Bcar1, a la izquierda, 256, en el centro, y Bcar4, a la derecha, en placa YEP, en el que se puede apreciar la diferencia en pigmentación de cada cepa luego de dos días de incubación a 30 °C.

Con el propósito de incrementar la producción de pigmentos en la levadura, se seleccionaron por inspección visual colonias segregantes con mayor pigmentación que la cepa parental Bcar1. Para ello se tomó una colonia de la cepa Bcar1 y se rayó sobre placas de agar suplementadas con concentraciones de antibiótico mayores a la utilizada para la selección de transformantes (100 µg/ml) hasta llegar a una concentración de 500 µg/ml. Estas placas se incubaron por 2 días a 30 °C y luego se seleccionó la colonia que mostró mayor pigmentación y estabilidad, nombrándola como Bcar4 (figura 9 C).

En la figura 9 D se puede comparar la pigmentación de las cepas Bcar1, 256 y Bcar4 rayadas sobre una misma placa. Es posible observar que la cepa 256 no produce pigmentos, mostrando un color blanco. En cambio las cepas Bcar1 y Bcar4 presentan pigmentación de tonalidad anaranjada con diferente intensidad de coloración.

Se extrajo DNA genómico desde ambas cepas transformantes el que se analizó por PCR para confirmar la inserción de los módulos en el orden esperado (figura 10). A partir de los amplificados obtenidos se observa que los cuatro módulos de expresión de los genes, *hph*, *crtE*, *crtI* y *crtYB*, están presentes. No se observó un amplificado para la unión de los módulos *crtYB* y *crtI* (figura 10, panel A), sin embargo, los demás fragmentos analizados amplifican acorde al tamaño esperado, esto es; 2,2 kb para la unión del módulo de resistencia a higromicina B con el módulo *crtE* (figura 10, panel C), 1,6 kb para la combinación de módulos *crtE* y *crtYB* (figura 10, panel D), y 0,8 kb para el módulo *crtI* con el fragmento *down* (figura 10, panel B), que indica la incorporación del módulo con la región esperada río abajo. Las bandas observadas indican que efectivamente fragmentos de DNA se ensamblaron e integraron en el sitio

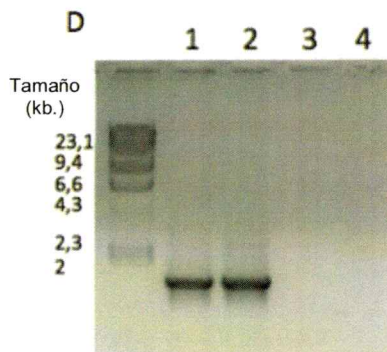
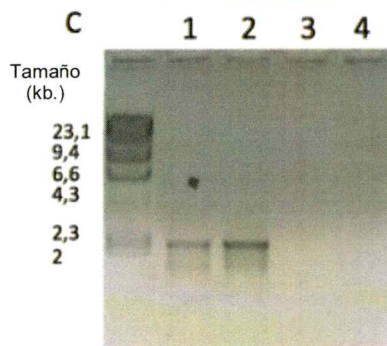
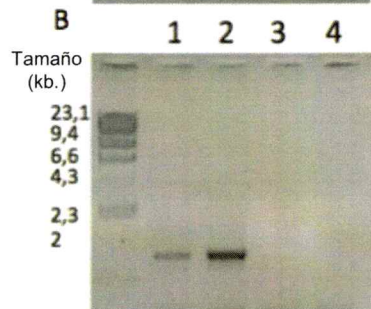
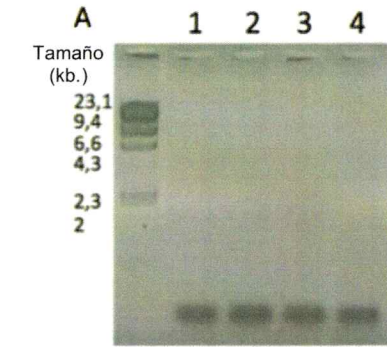


Figura 10.- PCR para comprobar la integración de módulos en cepas productoras de β -caroteno. Se analizó la cepa Bcar1, en carril 1, cepa Bcar4, en carril 2, DNA genómico de *S. cerevisiae* 256, carril 3 y control negativo con agua en carril 4. **A)** Análisis de unión entre módulos *crtYB* y *crtI* (*crtYB.FIV* y *crtI.R1*), donde no se encuentra el amplificado esperado de 1,5 kb. **B)** Análisis de unión módulo *crtI* con región genómica rio abajo, representado por un amplificado de 0,8 kb (*crtI.F2* e *Int21dw.Rb*). **C)** Análisis de unión módulo resistencia a higromicina B con módulo *crtE*, con un amplificado de 2,2 kb (*Inthyg.F* y *crtE.R*). **D)** Unión de módulos *crtE* con *crtYB*, representada por un amplificado de 1,6 kb (*crtE.F* y *crtYBrev1.R*). Junto a cada serie se cargó marcador de tamaño DNA lambda digerido con *HindIII*. A la derecha de cada panel se muestra un esquema de integración esperada para módulos, donde se indica por flechas los sitios de unión de partidores.

dirigido, confirmando la funcionalidad del método *DNA assembler* para la transformación de cepas industriales.

3.2.1.3 Extracción y análisis de pigmentos.

Con el fin de comprobar que la coloración en las colonias transformantes Bcar1 y Bcar4 de *S. cerevisiae* se debe a la producción de β -caroteno, se analizaron sus pigmentos. Además se determinó el efecto del tipo de medio de cultivo en la producción de carotenoides. Por ello, se creció la cepa Bcar4 en los medios de cultivo YEP (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa) o YM (0,3% extracto de levadura, 0,3% extracto de malta, 0,5% peptona) y se comparó también el efecto de la adición de antibiótico al cultivo (higromicina 50 μ g/ml). La cepa Bcar1 se creció solo en medio YEP ya que se esperaba que produjera una menor cantidad de pigmentos en comparación a la cepa Bcar4. En este ensayo se cultivó una colonia, tomada desde placa, en 50 ml de medio líquido con agitación constante a 22 °C durante 3 días. Desde este cultivo se colectó una muestra de 5 ml para determinar la biomasa medida como peso seco de la levadura. Los pigmentos se extrajeron a partir de 32 ml de cultivo. La coloración de los diferentes 4 cultivos analizados se muestra en la figura 11 y se observa que en todas las condiciones se producen pigmentos. Sin embargo, los niveles de pigmentos en cada condición son diferentes como lo muestra la intensidad del color que se observa en los matraces.

La composición de los pigmentos obtenidos desde estos cultivos se analizó por cromatografía líquida en fase reversa en un equipo de HPLC (RP-HPLC). Los pigmentos se identificaron de acuerdo a estándares según tiempo de retención y espectro de absorción. Los resultados se resumen en la tabla 6. En todos los casos

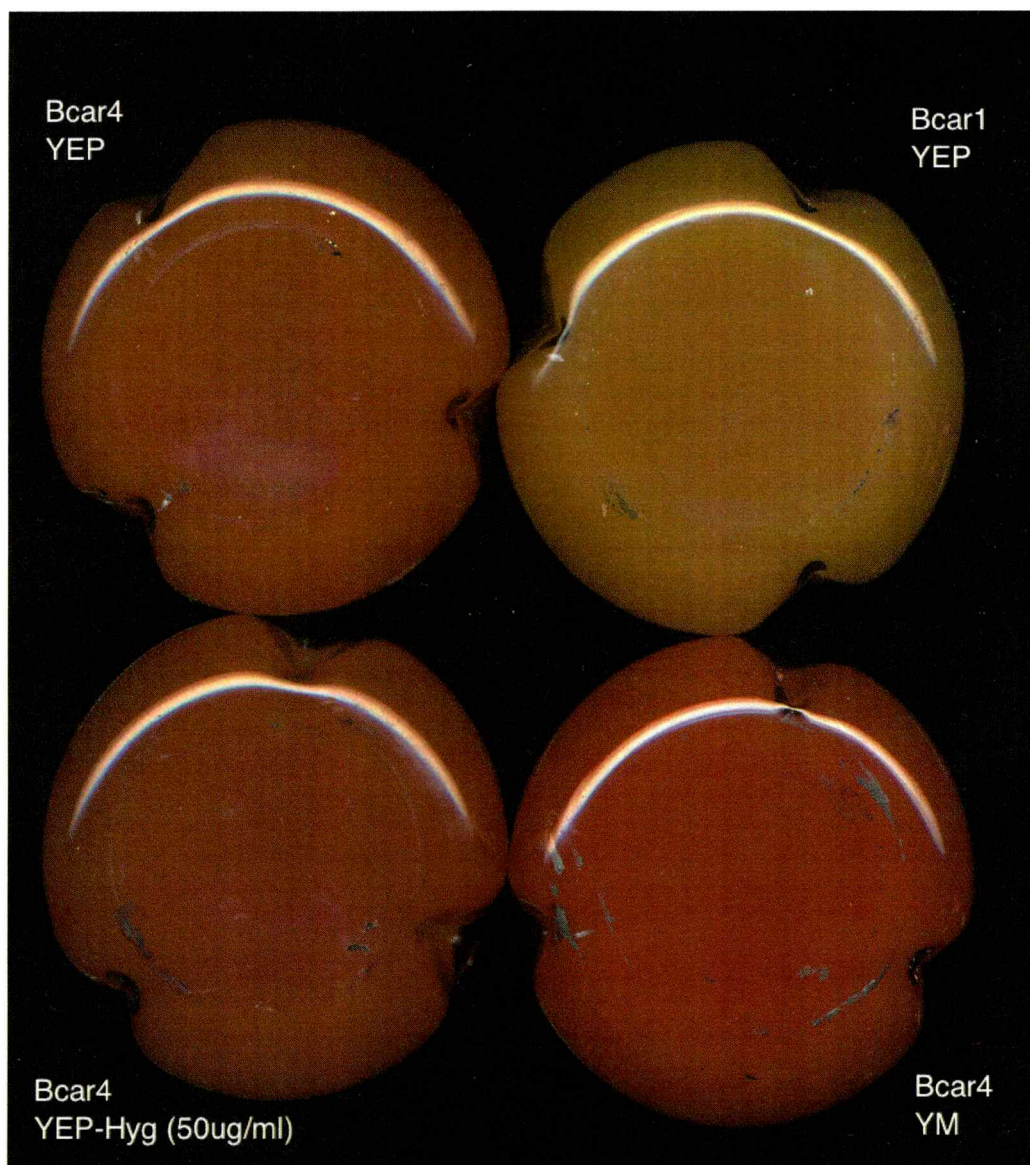


Figura 11.- Cultivos usados para extracción de pigmentos. Los cultivos se crecieron con agitación a 22°C por 3 días, en la imagen se indican el medio de cultivo y la cepa utilizada. A partir de estos cultivos se extrajeron pigmentos y se determinó su concentración y composición.

Tabla 6.- Resultados de cuantificación de pigmentos totales y de β -caroteno de cultivos únicos crecidos a 22°C por tres días.

Cepa	Medio	Pigmentos totales (ppm)	Porcentaje relativo de β-caroteno	β-caroteno (ppm)
Bcar1	YEP	413,0	87 %	359,3
Bcar4	YEP	1233,7	73 %	900,6
Bcar4	YEP-H *	3288,6	60,7 %	1996,2
Bcar4	YM	5586,1	65,5 %	3658,9

*YEP suplementado con higromicina a una concentración final de (50 μ g/ml).

hubo producción de β -caroteno como pigmento principal. Sin embargo, su proporción respecto a los pigmentos totales fue diferente según el medio utilizado (tabla 6). Los resultados indican que la cepa Bcar4 produce cerca del triple de pigmentos (totales y de β -caroteno) que la cepa Bcar1 bajo las mismas condiciones en cultivo en medio YEP. También se observa que al crecer la cepa Bcar4 en un medio suplementado con higromicina B (50 $\mu\text{g/ml}$) se produce una mayor cantidad de pigmentos totales y β -caroteno que en medio sin antibiótico. Además se obtuvo que en medio YM se produce alrededor de 4,5 veces más pigmentos que en medio YEP. Por otra parte, se aprecia que el porcentaje de β -caroteno respecto a pigmentos totales varía con las diferentes condiciones de cultivo, disminuyendo a mayor cantidad de pigmentos totales producidos.

3.2.1.4 Curva de crecimiento y producción de pigmentos en el tiempo.

Para evaluar si la inserción de los módulos de expresión en el genoma de las cepas transformantes tiene algún efecto sobre el crecimiento de éstas, se construyeron curvas de crecimiento de la cepa Bcar4 en comparación con la cepa silvestre 256 en medio YM, ya que según lo observado en la tabla 6 en este medio se produce una mayor cantidad de pigmentos. También se analizó el crecimiento de la cepa Bcar4 en medio YM suplementado con higromicina B (50 $\mu\text{g/ml}$), comparando en este caso con la cepa schYG, la cual es resistente a higromicina B, pero no muestra pigmentación, de este modo es posible determinar si la producción de carotenoides tiene algún efecto sobre el crecimiento de la levadura.

En la figura 12 se ilustran las cuatro curvas de crecimiento a 30°C y se observa que en medio YM sin suplementar antibiótico, la cepa transformante Bcar4 y la cepa silvestre 256 no presentan diferencias significativas en su crecimiento indicando que la

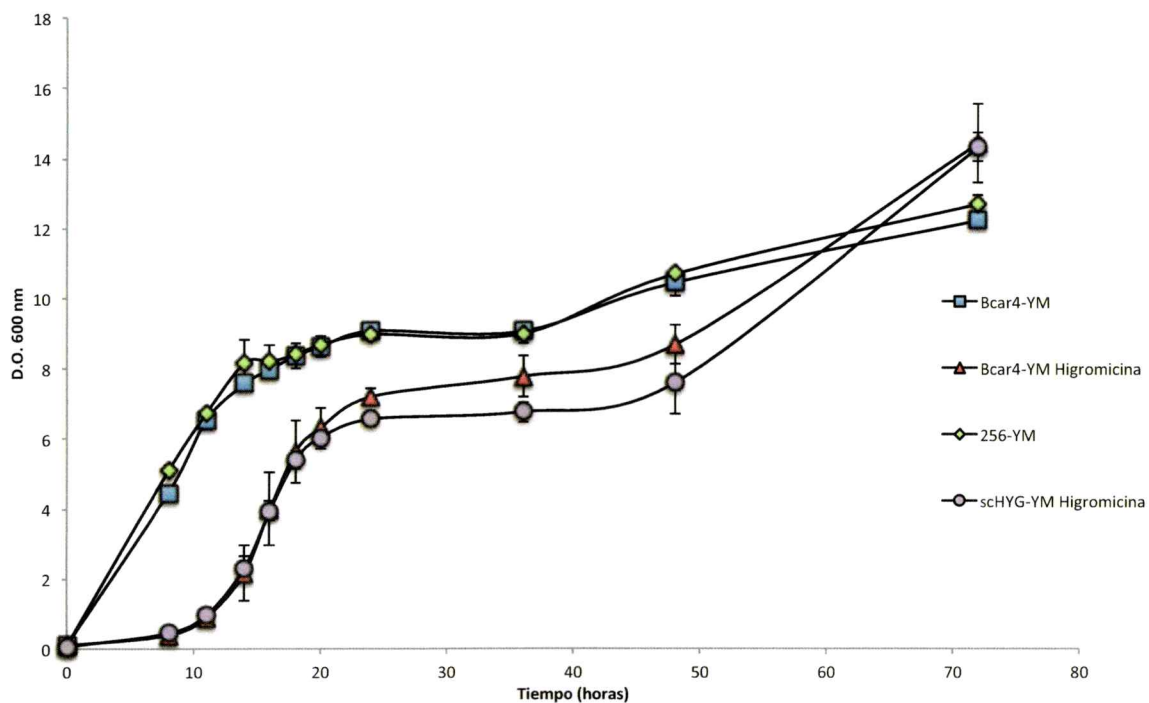


Figura 12.- Curva de crecimiento a 30°C de cepas transformantes en medio YM o YM suplementado con higromicina B (50 µg/ml). Azul; cepa Bcar4 en medio YM, verde; cepa control 256 en medio YM, rojo; cepa Bcar4 en medio YM suplementado con antibiótico, violeta; control cepa resistente a higromicina B en medio suplementado con higromicina B. Cada punto representa el promedio de tres cultivos independientes.

inserción de los módulos de expresión en la región YPRC τ 3 no altera el crecimiento de la levadura bajo las condiciones utilizadas. De igual manera, no se observaron diferencias en el crecimiento de las cepas Bcar4 y scHYG cultivadas en medio YM suplementado con higromicina B (50 μ g/ml), por lo que la producción de carotenoides no afectaría el crecimiento de la levadura. Al comparar las cuatro curvas de crecimiento existe una diferencia entre las cepas cultivadas sin y con suplementación de antibiótico, lo que se refleja por un crecimiento más lento de las cepas en presencia de antibiótico.

Paralelamente, se evaluó la producción de pigmentos a lo largo de la curva de crecimiento para lo cual se tomaron muestras de 30 ml de cultivo en diferentes tiempos la que se dividió en fracciones de 4 ml para medir biomasa como peso seco, por triplicado, y 18 ml para extracción y análisis de pigmentos.

Los pigmentos totales obtenidos para las diferentes cepas se muestran en la tabla 7. Las cepas control, 256 y scHYG, no producen pigmentos. Esto se comprobó al realizar su extracción y medir directamente la absorbancia de las muestras a 474 nm y también al analizar las mismas por RP-HPLC, donde no se distinguieron picos a longitudes de onda que absorben los carotenoides.

Como se puede observar en la tabla 7, la producción de pigmentos de la cepa Bcar4 crecida en un medio suplementado o no con antibiótico, no muestra variaciones significativas entre las 36 y 48 horas de cultivo, sin embargo, si presenta un aumento importante a las 72 horas de cultivo. Pese al aumento en carotenoides totales, el β -caroteno no incrementó en el tiempo en igual proporción y su porcentaje respecto al total de pigmentos producidos disminuyó.

Se analizó el cambio en la composición de pigmentos en la cepa Bcar4 cultivada en medio YM y en medio YM suplementado con higromicina B. Los porcentajes respecto

Tabla 7.- Producción de pigmentos a 30 °C en el tiempo por las cepas Bcar4, 256 y schYG en medio YM con o sin higromicina B (50 µg/ml) .

Tiempo		YM		YM Higromicina	
		Bcar4	256	Bcar4	schYG
36 h	Pigmentos totales (ppm)	318,9 (±33,2)	4,5 (±3,2)	647(±33,5)	1,8 (±1,5)
	% β-caroteno	84,7	ND	84,2	ND
	β-caroteno (ppm)	270,1(±28,1)	ND	544,8(±28,2)	ND
48 h	Pigmentos totales (ppm)	268 (±12)	1,9 (±1,3)	713(±22)	0,52 (±0,74)
	% β-caroteno	83,9	ND	75,1	ND
	β-caroteno (ppm)	224,8(±10)	ND	535,5(±14,1)	ND
72 h	Pigmentos totales (ppm)	1800 (±383)	2,6 (±2,3)	2719(±77)	0,4 (±0,5)
	% β-caroteno	13,4	ND	24,4	ND
	β-caroteno (ppm)	241,2(±51,3)	ND	663(±18,8)	ND

¹ ND: no detectado en RP-HPLC. Promedios obtenidos desde tres cultivos independientes, entre paréntesis se indica la desviación estándar para cada dato.

al total de pigmentos para cada intermediario identificado se presentan en la figura 13. Se observó un aumento en los intermediarios de la síntesis de β -caroteno, especialmente γ - caroteno y licopeno, a las 72 h de cultivo.

3.2.2 Sistema de transformación para cepa productora de astaxantina.

Con la intención de producir astaxantina en *S. cerevisiae*, se construyeron módulos de expresión de los genes carotenogénicos *crtE*, *crtI*, *crtYB*, *crtS* y *crtR*, los que junto con el módulo de resistencia a higromicina B y los fragmentos *up* y *down* permitirían la transformación de la levadura. Siguiendo el sistema de transformación probado en la cepa 256, los partidores y plásmidos para la amplificación de cada módulo se indican en la tabla 2. De este modo queda programado el modelo a seguir para futuras transformaciones que permitan obtener una cepa productora de astaxantina.

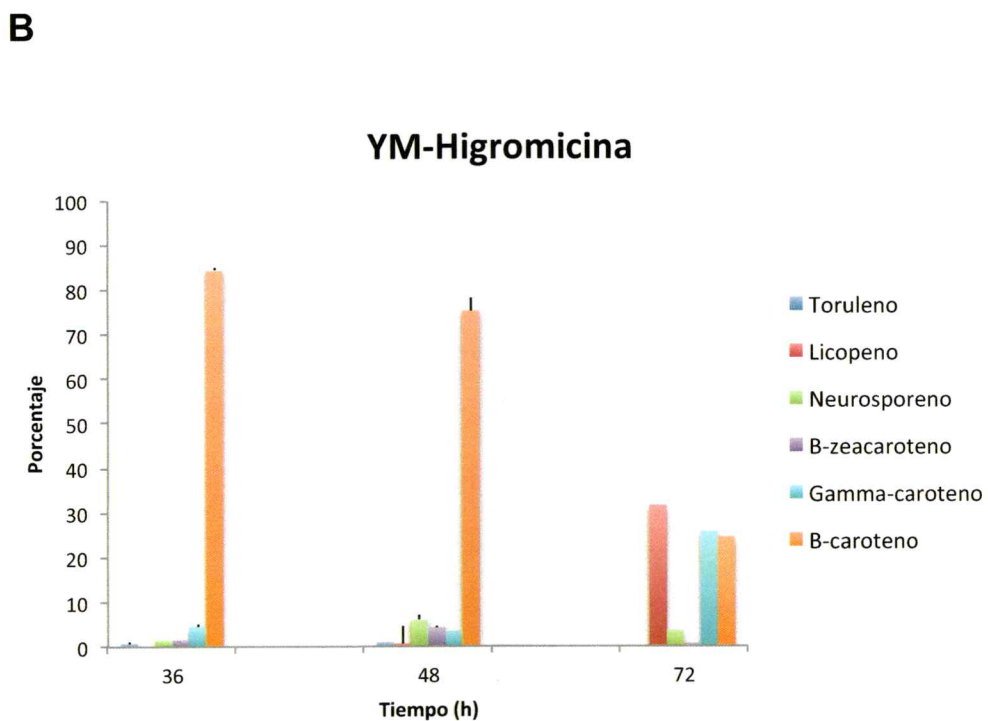
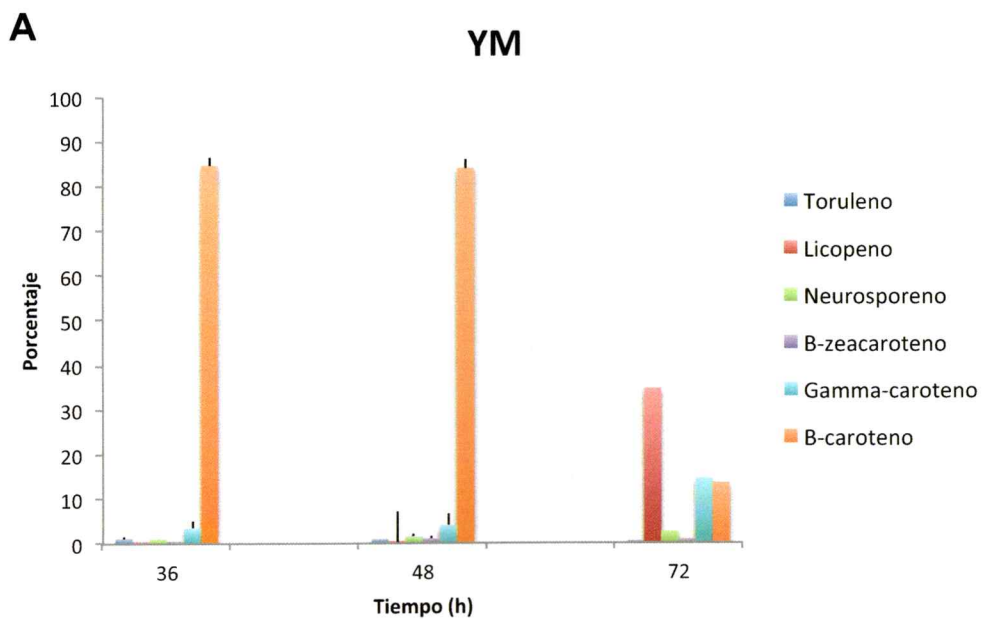


Figura 13.- Proporción de intermediarios de la ruta de síntesis de carotenoides a diferentes tiempos de cultivo. Se analizó la composición de pigmentos producidos por la cepa Bcar4 en 36, 48 o 72 horas de cultivo. **A)** Composición de pigmentos producidos por cepa Bcar4 cultivada en medio YM **B)** Composición de carotenoides producidos por cepa Bcar4 cultivada en medio YM suplementado con higromicina B (50 µg/ml). Cada barra corresponde al promedio de tres muestras independientes.

4 DISCUSIÓN

4.1 Construcción de módulos de expresión en *S. cerevisiae*.

En este trabajo se construyeron módulos de expresión en *S. cerevisiae* para los genes de *X. dendrorhous crtE*, *crtS* y *crtR*. Para esto se amplificó cada componente, es decir, promotor, cDNA del gen, y terminador por separado los que luego fueron unidos usando PCR de elongación. Los módulos fueron clonados en el vector pBluescript-SK y transformados en *E. coli*.

Si bien la construcción de los módulos fue un proceso complejo, su obtención abre la posibilidad de realizar diversas transformaciones, ya sea combinando diferentes módulos de expresión y/o modificando el orden de integración de éstos. Ello se logra solamente cambiando los partidores usados para amplificar cada módulo desde su plásmido, previo a la transformación, de esta manera se obtienen módulos con regiones de homología que permiten nuevas combinaciones. Al no depender de un vector para la transformación en la levadura también es posible construir y agregar nuevos módulos para genes no considerados en este trabajo, como por ejemplo *FPS* (farnesil pirofosfato sintasa) e *idi* (isopentenil difosfato isomerasa), combinándolos con los módulos ya construidos. Esta alternativa permitiría mejorar la producción de pigmentos en las cepas al aumentar la disponibilidad de precursores de su síntesis. También se podría incrementar la producción de β -caroteno el integrar y sobreexpresar un módulo que contenga parte del gen *hmgR* correspondiente al dominio catalítico de la enzima HMG-CoA reductasa, a modo de aumentar los precursores disponibles, o al agregar copias adicionales del gen *crtI* (Verwaal y col., 2007). Existen otras enzimas de la vía del mevalonato que también podrían ser sobreexpresadas, como por ejemplo la mevalonato quinasa (MVK), fosfomevalonato quinasa (PMVK) o mevalonato pirofosfato

decarboxilasa (MVD). Una de las ventajas del método de transformación es que permite la inserción de múltiples genes a la vez, lo que incluso permitiría incorporar una copia extra de la vía del mevalonato completa en cepas ya transformadas, usando un segundo marcador de selección.

La selección de promotores y terminadores se hizo considerando que estos ya hubiesen sido utilizados satisfactoriamente en *S. cerevisiae* en la expresión de otros genes involucrados en rutas metabólicas exógenas a dicha especie de levadura. Para ello se evaluó, principalmente, los promotores utilizados por Shao y Zhao. (2009), quienes transformaron *S. cerevisiae* con módulos de expresión de genes que llevaron a la obtención de una ruta funcional para la expresión de varios genes carotenogénicos de *E. uredovora* en *S. cerevisiae*. Además, en este trabajo se evitó el uso de promotores y terminadores de un mismo gen en la construcción de un módulo, ya que podría ocurrir recombinación entre el módulo construido y el gen endógeno de *S. cerevisiae*.

4.2 Transformación de *S. cerevisiae* resistente a higromicina B.

Se utilizó el método *DNA assembler* (Shao y Zhao., 2009) para transformar la cepa 256 de *S. cerevisiae* utilizando tres fragmentos de DNA; región río arriba (*up*), módulo de resistencia a higromicina B y región río abajo (*down*). La obtención de cepas transformantes y su análisis por PCR permitió confirmar que esta tecnología es efectiva en nuestra cepa industrial de *S. cerevisiae*. Como resultado se consiguieron clones recombinantes que contenían el módulo de resistencia a higromicina B integrado en el *locus* esperado. Así también se comprobó la funcionalidad del módulo de resistencia a higromicina B en *S. cerevisiae*.

Al analizar por PCR el amplificado para el *locus* YPRC τ 3, correspondiente al sitio de integración, se notó que tanto en la cepa silvestre, como en cepas transformadas se amplificó una banda de 1,8 kb correspondiente al tamaño de la región silvestre. Esto indica que la cepa sería aneuploide, o bien, que tiene más de una copia de la secuencia sobre la que se produce recombinación. Vale recordar que el origen del sitio de integración corresponde a un transposon, el que se puede encontrar repetido en el genoma, por lo que este resultado no es de extrañar.

El que la región de integración corresponda a un transposon puede constituir una desventaja en el sistema ya que podrían ocurrir eventos de transposición e incluso recombinación homóloga entre repeticiones del transposon que se encuentren en otros lugares dentro del genoma de la levadura. Sin embargo, el sitio seleccionado corresponde a un transposon que presenta un bajo número de copias y del que no se han podido documentar eventos de transposición (Hug y Feldmann, 1996). Además presenta como ventaja el hecho que se conoce que este sitio es transcrito en proporción suficiente para permitir la expresión de vías exógenas a la levadura (Bai Flagfeldt y col., 2009). Si se hubiese realizado el trabajo utilizando algún otro sitio de la levadura habría sido necesario, primero, definir si la integración de material genético en el sitio afecta el crecimiento y metabolismo de la levadura. En segundo lugar sería necesario determinar si el organismo expresa los genes integrados en ese sitio, considerando que en eucariontes la cromatina puede encontrarse en distintos estados de compactación que afectan la expresión de genes.

Por otra parte, que exista más de una copia del sitio de integración permitiría aumentar el número de copias de los módulos integrados, abriendo la posibilidad de aumentar la producción de pigmentos. El incremento de la dosis génica se ha logrado en *X. dendrorhous* al usar el método de doble recombinante (Niklitschek y col., 2008),

que consiste en aumentar la presión selectiva sobre una cepa heterocigota con el fin de obtener y favorecer el crecimiento de cepas recombinantes homocigotas para el marcador de selección. Esta metodología también se ha probado en cepas de *X. dendrorhous* transformadas por el método *DNA assembler*, logrando obtener cepas homocigotas a partir de heterocigotas que sobreexpresan los genes *crtI*, *crtYB* y *crtS* (Contreras, 2012).

En cada extremo del módulo de resistencia a higromicina B se añadió una secuencia de 50 pb (repetido directo) con el fin de permitir la escisión del módulo desde el genoma de la levadura por recombinación entre ellos (Längle-Rouault y Jacobs, 1995). Según lo esperado, el módulo se escindió desde el genoma dejando una secuencia del repetido directo como cicatriz en el sitio dónde se integró inicialmente. Dado que en este trabajo se utilizó una cepa de aplicación industrial, la posibilidad de eliminar el marcador de selección y así evitar el uso de antibióticos en el cultivo de la levadura permitiría que la comercialización, ya sea del extracto de levadura o del pigmento puro, sea mejor recibida por el consumidor. Por otra parte, la presencia de la "cicatriz" dejada por la escisión del módulo puede ser utilizada como un identificador de la cepa en caso que ésta fuera empleada sin autorización de la empresa.

4.3 Transformación de *S. cerevisiae* para la producción de β -caroteno.

La transformación de *S. cerevisiae* con los módulos de expresión de los genes *crtE*, *crtI* y *crtYB*, además del módulo de resistencia a higromicina B, permitió obtener una cepa productora de β -caroteno con genes carotenogénicos integrados en su genoma.

Uno de los principales desafíos en el trabajo con cepas industriales de *S. cerevisiae* es la alta diversidad y polimorfismos a nivel cromosómico, además de ser

genéticamente inestables. Estas características dificultan la aplicación de técnicas de biología molecular (Attfield y Bell, 2003). La metodología usada para la transformación con estos genes marca una nueva aproximación a la ingeniería metabólica de *S. cerevisiae* para la producción de carotenoides dado que en trabajos previos (Verwaal y col., 2007, Ukibe y col. 2009, Lange y Steinbuchel, 2011) la transformación de *S. cerevisiae* ha sido mediada por vectores episomales o integrativos. El uso de vectores constituye una limitación respecto al número de genes que se puede incorporar a la levadura debido al tiempo que toma la construcción de los vectores, el uso de enzimas de restricción para la construcción de éstos y a la necesidad de usar marcadores de selección diferentes para cada uno de ellos.

La funcionalidad de los módulos de expresión y el éxito de la transformación pudo comprobarse inicialmente por la obtención de una colonia pigmentada de tonalidad anaranjada, llamada Bcar1. Esta cepa mostró ser inestable al ser sembrada sobre placas, generando colonias segregantes de diferentes coloraciones. Esto corresponde al hecho que la cepa sería aneuploide, lo que permitiría la recombinación entre sitios de integración con inserto y silvestres, generando inestabilidad fenotípica de la cepa.

A partir de estas colonias segregantes se pudo seleccionar por inspección visual colonias que mostraron un fenotipo pigmentado más intenso. De esta selección se obtuvo la cepa Bcar4, la que mostró ser más estable al observarse una menor aparición de colonias segregantes que la cepa parental. El análisis por PCR de la integración de los genes en ambas cepas confirmó que los módulos de expresión utilizados en la transformación se encuentran integrados en el genoma de la levadura y en el orden esperado, a excepción de la conexión entre los módulos *crtYB-crtI*. Esta unión de módulos no pudo ser detectada por PCR, posiblemente debido a problemas con la reacción. Se puede inferir que ambos módulos están en el lugar esperado ya

que, por PCR, se identificó que el módulo *crtYB* está contiguo al módulo *crtE* y que el módulo *crtI* se encuentra río arriba de la región de integración *DOWN*. Además, se pudo comprobar funcionalmente, por producción de pigmentos, que los módulos se expresan y traducen correctamente.

4.3.1 Producción de pigmentos y curva de crecimiento

La diferencia en la pigmentación de colonias de las cepas Bcar1 y Bcar4 puede deberse a la cantidad total de pigmentos o bien a una diferencia en la proporción de intermediarios de la vía. Luego de crecer las cepas en cultivo líquido, realizar la extracción y analizar pigmentos se confirmó que la desigualdad de coloración se debe a que la cepa Bcar1 produce una menor cantidad de pigmentos totales que la cepa Bcar4 (413 ppm contra 1.234 ppm). Adicionalmente, también hay cambios en la composición de carotenoides en ambas cepas, siendo el porcentaje de β -caroteno en relación a pigmentos totales mayor en la cepa Bcar1 (87% contra 73%). Aún así, la cepa Bcar4 produce una mayor cantidad de β -caroteno, por lo que se seleccionó para continuar el trabajo.

Como Bcar4 posee resistencia al antibiótico higromicina B se evaluó si el uso de antibiótico en el cultivo afecta la producción de β -caroteno y también si el medio de cultivo usado altera la cantidad de pigmento producido. Para ello, se comparó la cantidad y proporción de carotenoides en tres condiciones de cultivo; medio YEP, medio YEP suplementado con higromicina B (50 μ g/ml) y medio YM. Bajo los mismos parámetros de crecimiento la producción de β -caroteno fue de 3.659 ppm en medio YM, contra 901 ppm en medio YEP, lo que indica que el medio adecuado para una mayor producción de pigmentos es el primero. Por otra parte, la adición de antibiótico al cultivo favorecería la síntesis de carotenoides, ya que la cantidad de β -caroteno

obtenida es más del doble. El aumento en la productividad al agregar antibiótico puede deberse a que al mantener la presión de selección, la pérdida por recombinación de los genes integrados resulta letal, por lo que se mantiene una población productora de pigmentos en el cultivo.

Verwaal y col. en el año 2007, generaron cepas de *S. cerevisiae* que llevaban diferentes genes de *X. dendrorhous*, tanto en vectores episomales, como integrados en el genoma. A modo de referencia, los autores lograron producir 141 ppm de β -caroteno al integrar los genes *crtE*, *crtI* y *crtYB* de *X. dendrorhous* en el *locus ura3-52* del genoma de *S. cerevisiae*. Esta extracción de pigmentos se hizo luego de cultivar a 30 °C por 72 h en medio *yeast nitrogen base* (YNB, Difco) suplementado con glucosa 2% y uracilo. Los genes integrados en esta cepa son los mismos usados en la cepa Bcar4, de la que se obtuvo 900 ppm de β -caroteno, al cultivarla a 22°C en medio YEP por 72 h. Si bien las condiciones de cultivo no son iguales a las usadas en este trabajo, son la referencia más cercana para realizar comparaciones. La cepa Bcar4 proviene de una cepa parental industrial, mientras que la cepa transformada por Verwaal y col. deriva de un parental de uso en laboratorio. El tener una cepa industrial productora de carotenoides abre la posibilidad de realizar fermentaciones de prueba y probar el uso de medios de cultivo complejos que permiten proyectar su aplicación a la industria.

El máximo de β -caroteno obtenido por Verwaal y col. fue de 5.900 ppm al expresar los tres genes mencionados previamente, más una copia extra del gen *crtI* integrada en el *locus leu2,3-112* y un fragmento del gen *hmgR1* que codifica el dominio catalítico de la enzima HMG-CoA reductasa, integrada en el *locus trp1-289*. Sin embargo, para el crecimiento de aquella cepa, fue necesario suplementar el medio con uracilo, leucina y triptófano, por lo que su uso a nivel industrial se hace poco viable debido al costo que implica el uso de suplementos en cultivos a gran escala. La cepa que se obtuvo en

este trabajo puede crecer y pigmentar sin que se agregue higromicina, por lo que no requiere suplementos para su cultivo. Esto la hace adecuada para pruebas industriales y proyecciones para mejorar su producción de pigmentos al seguir lo hecho por los autores citados anteriormente y agregar una copia extra del módulo de expresión del gen *crtl* y expresar el dominio catalítico de la enzima HMG-CoA reductasa.

Para evaluar si la integración de módulos de expresión en el *locus* seleccionado afecta el crecimiento en las cepas transformantes en relación a la cepa parental, se construyó una curva de crecimiento y además se extrajo pigmentos a diferentes tiempos de cultivo. La curva de crecimiento se hizo a 30 °C, temperatura cercana al óptimo de crecimiento de *S. cerevisiae* (Salvadó y col., 2011). Mediante la construcción de la curva fue posible determinar que la integración de los módulos y su expresión no afectan el crecimiento de la cepa Bcar4 en relación a su parental 256. Así también se comparó el crecimiento de la cepa Bcar4 en medio suplementado con higromicina B con la cepa schYG, notando que el crecimiento es similar en ambos casos.

Como es de esperar, la cepa parental no produce pigmentos durante su desarrollo, lo que se comprobó al someter a cultivos de las cepas 256 y schYG al protocolo de extracción de pigmentos. En ambos casos, los extractos presentaron absorbancia a 474 nm muy baja que principalmente se debe al ruido del sistema. Aún así cada uno de los extractos se analizó por RP-HPLC para confirmar que no existen picos con espectro de absorción característico de carotenoides, permitiendo confirmar que los pigmentos obtenidos desde las cepas Bcar 1 y Bcar4 son producidos por efecto de los genes integrados en su genoma.

La producción de pigmentos en la cepa Bcar4 crecida a 30 °C varió en el tiempo, sin mostrar diferencias significativas entre las 36 y 48 h de cultivo, pero aumentando más de 5 veces a las 72 h. Pese al aumento en carotenoides totales, el contenido de β -

caroteno no aumentó en el tiempo de igual manera, alcanzando, en este ensayo, una producción de 241 ± 51 ppm en medio YM y 663 ± 19 ppm en medio YM suplementado con higromicina B a las 72 h.

Es importante destacar que la producción de pigmentos cambia al modificar la temperatura a la que se crecen los cultivos. Al cultivar las cepas a 30 °C en lugar de 22 °C, hay una disminución en la cantidad y proporción de pigmentos producidos luego de 72 h, esto podría deberse a diferencias en el metabolismo fermentativo de *S. cerevisiae* que es más activo a 30 °C reduciendo la disponibilidad de precursores para iniciar la síntesis de carotenoides y afectando las concentraciones de glucosa en el medio y la cantidad de etanol producido por el cultivo (Ruohonen y col., 1995).

Se analizaron los precursores de β -caroteno presentes en las diferentes muestras de Bcar4 obtenidas a lo largo de la curva de crecimiento, existiendo un aumento en el porcentaje de precursores producidos entre las 48 y 72 h, especialmente, licopeno. Según la vía de síntesis de carotenoides (figura 1) la síntesis de este compuesto es catalizada por el producto del gen *crtI*. La expresión de este gen en el módulo construido se encuentra regulada por un promotor *ADH1* de alrededor de 500 pb. Según lo indicado por Ruohonen y col. (1995), la regulación del promotor *ADH1* varía según el tamaño de este y por la concentración de etanol en el medio. En los cultivos de *S. cerevisiae* habría un aumento en la concentración de etanol en el medio por procesos fermentativos, lo que en este caso podría aumentar la expresión del gen *crtI* debido a la regulación de su promotor. Como consecuencia de este cambio en los niveles de expresión del gen habría un aumento en la cantidad de licopeno, pero no de β -caroteno. También es posible que hayan cambios en la expresión de los genes *crtE*, controlado por el promotor *TDH3*, y *crtYB*, controlado por el promotor *TEF1*, ya que se

ha reportado que el nivel de expresión por estos promotores puede variar según las concentraciones de glucosa disponibles en el medio de cultivo (Partow y col. 2010).

Finalmente, es posible indicar que los parámetros óptimos para la obtención de β -caroteno en condiciones de laboratorio utilizando la cepa Bcar4 sería cultivar la levadura en medio YM a 22°C con agitación durante 80 h. Bajo estas condiciones se observó la máxima producción tanto de pigmentos totales (5.586 ppm), como de β -caroteno (3.659 ppm).

A futuro es necesario probar medios de cultivo que sean más económicos para proyectar el uso de esta levadura en fermentaciones y así evaluar su potencial aplicación a nivel industrial. Estudios realizados en *X. dendrorhous* en nuestro laboratorio han mostrado que el uso de medios industriales, en esta levadura, permite obtener mayor cantidad de pigmentos que medios de laboratorio, por lo que existe la posibilidad que la producción de pigmentos en *S. cerevisiae* incremente.

4.4 Sistema de transformación de *S. cerevisiae* para la producción de astaxantina.

En este trabajo se establecieron las condiciones para futuras transformaciones de *S. cerevisiae* con el fin de obtener cepas productoras de astaxantina. Estas condiciones se basan en los resultados positivos obtenidos en la transformación para obtener cepas productoras de β -caroteno, además de observaciones respecto a factores que pueden ser mejorados en próximos experimentos.

Los módulos de expresión de los genes *crtE*, *crtYB* y *crtI* demostraron ser funcionales en *S. cerevisiae*, además se comprobó que la levadura es capaz de sintetizar los precursores de síntesis de astaxantina. Con el fin de obtener una cepa que sintetice astaxantina, deben ser integrados módulos de expresión de los genes

crtS y *crtR*, que fueron construidos en este trabajo. Para que sea posible obtener astaxantina estos genes deben ser expresados y sus enzimas, funcionales dentro de la célula.

Shao y Zhao (2009) observaron que el número de fragmentos de DNA co-transformados en la levadura influye sobre la eficiencia de la transformación; a un mayor número de fragmentos de DNA a ensamblar, disminuye la cantidad de transformantes que se obtienen. Lo anterior también se observó en este trabajo, ya que para obtener una cepa productora de β -caroteno se usaron 6 fragmentos de DNA en la transformación (*up*, m-HYG, m-*crtE*, m-*crtI*, m-*crtYB* y *down*) y se obtuvo solo una colonia transformante. En cambio, en la transformación para obtener una cepa resistente a higromicina B, donde se usaron 3 fragmentos (*up*, m-HYG y *down*), se obtuvieron tres transformantes que presentaban el módulo integrado en el sitio esperado. En el caso de la transformación para obtener cepas productoras de astaxantina se deben usar al menos 7 fragmentos de DNA (*up*, m-HYG, m-*crtI*, m-*crtYB*, m-*crtS*, m-*crtR* y *down*), lo que disminuiría la probabilidad de obtener transformantes.

Por otra parte, existen aspectos relativos a la técnica utilizada que pueden ser mejorados para aumentar la eficiencia de próximas transformaciones. El método de transformación se basa en la recombinación entre extremos homólogos de diferentes fragmentos (figura 2), por lo que la longitud de la región homóloga incluida en los extremos influye en el éxito de la transformación. Esto fue destacado por Shao y col. (2009) quienes observaron que la eficiencia de la transformación por integración en el cromosoma de la levadura aumenta al agregar regiones homólogas de mayor extensión en cada extremo. Según lo indicado por estos autores, el largo de los sitios homólogos entre fragmentos sería un factor crítico a medida que aumenta el número

de módulos que se co-transforman. En el caso de las transformaciones realizadas en este trabajo las regiones de homología añadidas por partidores a cada fragmento son de 46 pb, quedando en total 92 pb homólogos entre fragmentos. Sin embargo, no todos los fragmentos llevaron ambas regiones (Figura 8) debido a que al amplificar el módulo con los partidores aparecieron bandas inespecíficas como producto de PCR. Por ejemplo el módulo *crtI* se amplificó con los partidores tTEFpADH.F, que amplifica desde el extremo 5' del módulo y le agrega una cola de 46 pb homóloga al módulo *crtYB*, y el partidor *this3.R*, que amplifica desde el extremo 3' del módulo y no lleva cola. Al co-transformar los fragmentos el extremo 3' de éste módulo recombinará con el fragmento homólogo de 46 bp que lleva el segmento DOWN, a diferencia del extremo 5' que recombinará con el módulo *crtYB* que también lleva una cola homóloga, sumando 92 pb de homología entre ambos. Si bien para que la transformación sea exitosa no es necesario que las zonas homólogas sean del mismo tamaño, el tener una mayor cantidad de pares de bases en común favorece la recombinación exitosa entre fragmentos. Para asegurar la obtención de transformantes a futuro, es necesario considerar un mayor largo de las regiones de homología en los extremos de los fragmentos que se co-transformará.

5 CONCLUSIONES

- Utilizando la metodología *DNA assembler* se transformó la cepa industrial 256 de *S. cerevisiae* para hacerla resistente al antibiótico higromicina B al integrar un módulo de expresión del gen *hph* de *E. coli* en la región YPRC τ 3 del genoma de la levadura, generando la cepa sc-HYG. Fue posible comprobar que la metodología de transformación propuesta no sólo sirve para cepas de laboratorio de *S. cerevisiae*, si no también es posible aplicarla en la transformación de cepas industriales.
- Fue posible eliminar el marcador de selección integrado en el genoma de la cepa sc-HYG, mediante la recombinación entre repetidos directos situados en los extremos del módulo de resistencia a higromicina B. Esto permitiría reutilizar el marcador de selección en transformaciones sobre la misma cepa y también retirar el gen de resistencia a antibiótico para el uso de la cepa en la industria.
- Se obtuvo una cepa industrial de *S. cerevisiae* productora de β -caroteno, Bcar1, al integrar en el genoma de la levadura módulos de expresión para los genes *crtE*, *crtI* y *crtYB* de *X. dendrorhous*. Al aumentar la presión de selección sobre la cepa Bcar1 fue posible obtener la cepa Bcar4 que produce una mayor cantidad de pigmentos.
- La integración de los módulos de expresión y la producción de carotenoides en la cepa Bcar4 no afecta el crecimiento de la levadura comparada con su cepa parental. Esto indica que la cepa puede ser ensayada en medios industriales y en fermentaciones a pequeña escala para evaluar su viabilidad como una fuente natural productora de β -caroteno. Así también sienta un precedente

favorable a investigación futura para desarrollar cepas industriales de *S. cerevisiae* productoras de astaxantina.

6 PROYECCIONES

- Utilizar la metodología desarrollada en este trabajo para realizar la transformación para obtener una cepa productora de astaxantina, agregando los módulos *crtS* y *crtR*.
- Ensayar la producción de pigmentos en medios industriales a modo de conocer si la levadura mantiene su productividad en medios de menor costo.
- Probar la producción de pigmentos en fermentaciones pequeñas a modo de comprobar si la productividad de la cepa se mantiene en volúmenes de cultivo mayores.

7 CONGRESOS

Nicole Werner, Jennifer Alcaíno, Dionisia Sepúlveda, Salvador Barahona, Marcelo Baeza, Víctor Cifuentes, 2011, XXXIII Congreso Chileno de Microbiología, Olmué, Chile, "Producción de beta-caroteno en *Saccharomyces cerevisiae* expresando genes de *Xanthophyllomyces dendrorhous*."

Nicole Werner, Jennifer Alcaíno, Dionisia Sepúlveda, Marcelo Baeza, Víctor Cifuentes, 2010, LIII Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile, Santa Cruz, Chile "Ensamblaje de vías carotenogénicas en *Saccharomyces cerevisiae* mediante el uso de regiones de homología".

8 BIBLIOGRAFIA

- Akada, R. y col. 2006. PCR-mediated seamless gene deletion and marker recycling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23: 399-405.
- Alcaino, J. 2002. Organización estructural del gen de la fitoeno sintasa en el genoma de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex *Phaffia rhodozyma*). Tesis para optar al título de Ingeniero en biotecnología molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Alcaino, J. 2008. Estudio de la participación de una citocromo p450 reductasa (CPR) en la biosíntesis de astaxantina en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias mención Microbiología. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Alcaino, J., y col. 2008. Cloning of the cytochrome p450 reductase (*crtR*) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiol* 8: 169.
- Alvarez, V. y col. 2006. The *crtS* gene of *Xanthophyllomyces dendrorhous* encodes a novel cytochrome-p450 hydroxylase involved in the conversion of beta-carotene into astaxanthin and other xanthophylls. *Fungal Genet Biol* 43: 261-272.
- An, G. H., y col. 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl Environ Microbiol* 55: 116-124.
- An, G. H., y col. 1991. Isolation and characterization of carotenoid hyperproducing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting. *Biotechnol* 9: 70-73.
- An, G. H. y col. 1999. Monocyclic carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*). *J Biosc Bioeng* 88: 189-193.
- An, G. H. y Johnson, E. A. 1990. Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 57: 191-203.
- Andrewes, A.G. y Starr, M.P. 1976. (3R,3PR)-Astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Phytochemistry* 15: 1009-1011.
- Armstrong, G. A. y Hearst, J. E. 1996. Carotenoids 2: genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J* 10: 228-237.
- Attfield, P., Bell, P. 2003. Genetics and classical genetic manipulations of industrial yeasts Functional genetics of industrial yeasts. Springer, Berlin, 17-55.
- Baeza, M. y col. 2009. Isolation, characterization and long term preservation of mutant strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J Basic Microbiol* 49: 135-141.
- Bai Flagfeldt, D. y col. 2009. Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 26: 545-551.

- Ben-Amotz, A. 1995. New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for B-carotene production. *J Appl Phycol* 7: 65-68.
- Britton, G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to the function. *FASEB J* 9: 1551-1558.
- Carmona, M. 2007. Caracterización estructural del gen ast de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex *Phaffia Rhodozyma*). Tesis para Magíster en Ciencias Biológicas mención genética. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Contreras, G. 2012. Sobreexpresión de genes ensamblados mediante recombinación homóloga en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Seminario de título para optar al título de Ingeniero en biotecnología molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- de la Fuente, J. L. y col. 2010. High-titer production of astaxanthin by the semi-industrial fermentation of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J Biotechnol* 148: 144-146.
- Dufossé, L. y col. 2005. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends Food Sci Tech* 16: 389-406.
- Flores-Coterà, L. B. y col. 2001. Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma* : influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium. *Appl Microbiol Biotechnol* 55: 341-347.
- Forster, J. y col. 2003. Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *Genome Res* 13: 244-253.
- Frengova, G. I. y Beshkova, D. M. 2009. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: Yeasts of biotechnological importance. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36: 163-180.
- Giaever, G. y col. 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418: 387-391.
- Goffeau, A. y col. 1996. Life with 6000 Genes. *Science* 274: 546, 563-547.
- Guerin, M. y col. 2003. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol* 21: 210-6.
- Hauf, J. y col. 2000. Simultaneous genomic overexpression of seven glycolytic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Tech* 26: 688-698.
- Higuchi, R., y col. 1988. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* 16: 7351-7367.
- Higuera-Ciapara, I. y col. 2006. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr* 46: 185-196.
- Ho, Y. y col. 2002. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* in mass spectrometry. *Nature* 415: 180-183.
- Hu, Z. y col. 2006. Ph control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enzyme Microb Tech* 39: 586-590.

- Huang, B. y col. 2008. Heterologous production of secondary metabolites as pharmaceuticals in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* 30: 1121-1137.
- Hug, A.M. y Feldmann H. 1996. Yeast retrotransposon Ty4: the majority of the rare transcripts lack a U3-R sequence. *Nucleic Acids Res* 24: 2338-2346.
- Johnson, E. A. y Lewis, M. J. 1979. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *J Gen Microbiol* 115: 173-183.
- Johnson, E. A. y Gil-Hwan A. 1991. Astaxanthin from microbial sources. *Crit Rev Biotechnol* 11: 297-326.
- Kajiwara, S. y col. 1997. Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem J* 324: 421-426.
- Krogan, N. J. y col. 2006. Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440: 637-643.
- Lange, N. y Steinbuchel, A. 2011. Beta-carotene production by *Saccharomyces cerevisiae* with regard to plasmid stability and culture media. *Appl Microbiol Biotechnol* 91:1611-1622.
- Länge-Rouault, F. y Jacobs, E. 1995. A method for performing precise alterations in the yeast genome using a recyclable selectable marker. *Nucleic Acids Res*, 23: 3079-3081.
- Lee, T. I. y col. 2002. Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 298: 799-804.
- León, R. 2000. Aislamiento y caracterización del gen de la fitoeno deshidrogenasa de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex *Phaffia Rhodozyma*). Tesis para optar al grado de Doctor en ciencias mención biología. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Liu, Y. S. y Wu, J. Y. 2007. Perfusion culture process plus H₂O₂ stimulation for efficient astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnol Bioeng* 97: 568-573.
- Lodato, P. 2002. Estudio de la expresión de genes de la carotenogénesis en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias mención Microbiología. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Lu, M. y col. 2008. Kinetic model for optimal feeding strategy in astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 24: 1937-1942.
- Manivasakam, P. y col. 1995. Micro-homology mediated Pcr targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 23: 2799-2800.
- Milledge, J.J. 2011. Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Rev Environ Sci Biotechnol* 10: 31-41.
- Miller, M. W. y col. 1976. *Phaffia*, a new yeast genus in the Deuteromycotina (Blastomycetes). *Int J Syst Micr* 26: 286-291.

- Misawa, N. y Shimada, H. 1998. Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. *J Biotechnol* 59: 169-181.
- Miura, Y. y col. 1998. Production of the carotenoids lycopene, B-carotene and astaxanthin in the food yeast *Candida utilis*. *Appl Environ Microbiol* 64: 1226-1229.
- Mortimer, R. K y Johnston, J R. 1986. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* 113: 35-43.
- Nevoigt, E. 2008. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 72: 379-412.
- Niklitschek, M. 2007. Desarrollo de un casete de resistencia a antibiótico en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Seminario para optar al título de Ingeniero en biotecnología molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Niklitschek, M. 2008. Estudio genético molecular del gen crtE involucrado en la ruta de biosíntesis de astaxantina en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis para Magíster en ciencias biológicas mención microbiología. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Niklitschek, M. y col. 2008. Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biol Res* 41: 93-108.
- Ostergaard, S. y col. 2000. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 34-50.
- Partow, S. y col. 2010. Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 27: 955-964.
- Pashkow, F. J. y col. 2008. Astaxanthin: A novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 101: 58-68.
- Prieto, A. y col. 2011. Assessment of carotenoid production by *Dunaliella salina* in different culture systems and operation regimes. *J Biotechnol* 151: 180-185.
- Romero, I. 2010. Participación del gen farnesil pirofosfato sintasa (FPS) en la biosíntesis de astaxantina en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Seminario de título para optar al título de Ingeniero en biotecnología molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Ruohonen, L., y col. 1995. Modifications to the ADH1 promoter of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of heterologous proteins. *J Biotechnol*. 39: 193-203.
- Salvadó, Z., y col. 2011. Temperature adaptation markedly determines evolution within the genus *Saccharomyces*. *Appl Environ Microbiol* 77: 2292-2302.
- Sambrook, J. y Russell, D. W. 2001. Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, Nueva York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandmann, G. 2001. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Arch Biochem Biophys* 351: 4-12.

- Shao, Z. y Zhao, H. 2009. DNA Assembler, an in vivo genetic method for rapid construction of biochemical pathways. *Nucleic Acids Res* 37: e16.
- Taxis, C. y Knop, M. 2006. System of centromeric, episomal, and integrative vectors based on drug resistance markers for *Saccharomyces cerevisiae*. *BioTechniques* 40: 73-78.
- Ukibe, K. y col. 2009. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for astaxanthin production and oxidative stress tolerance. *Appl Environ Microbiol* 75: 7205-7211.
- Ukibe, K. y col. 2008. Efficient screening for astaxanthin-overproducing mutants of the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by flow cytometry. *FEMS Microbiol Lett* 286: 241-248.
- Verdoes, J. C. y col. 1999. Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnol Bioeng* 63: 750-755.
- Verdoes, J. C. y col. 2003. Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Appl Environ Microbiol* 69: 3728-3738.
- Vazquez, M. y Martin, A. M. 1998. Optimization of *Phaffia rhodozyma* continuous culture through response surface methodology. *Biotechnol Bioeng* 57: 314-320.
- Verwaal, R. y col. 2007. High-level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Environ Microbiol* 73: 4342-4350.
- Visser, H., y col. 2003. Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *FEMS Yeast Res* 4: 221-231.
- Wodika, L. y col. 1997. Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotech* 15: 1359-1367.
- Yamane, Y. y col. 1997. influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis. *Appl Environ Microbiol* 63: 4471-4478.
- Yamano, S. y col. 1994. Metabolic engineering for production of B-carotene and lycopene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotech Biochem* 58: 1112-1114.