

UCH-FC
MAG-B
S.687
C-1

"Obtención de mutantes sobreproductoras de astaxantina en cepas antárticas de *Xanthophyllomyces dendrorhous*"

Tesis
Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

Jaime Solís Pinilla

Diciembre, 2015



Directora de Tesis:
Dra. Jennifer Alcaíno Gorman

Co-Director de Tesis:
Dr. Víctor Cifuentes Guzmán

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

Jaime Enrique Solís Pinilla

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día martes 20 de Octubre de 2015.

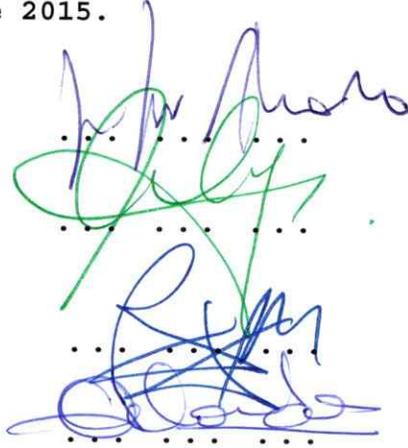
Director de Tesis:
Dra. Jennifer Alcaíno Gorman

Co-Director de Tesis
Dr. Víctor Cifuentes Guzmán

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Marcelo Baeza Cancino

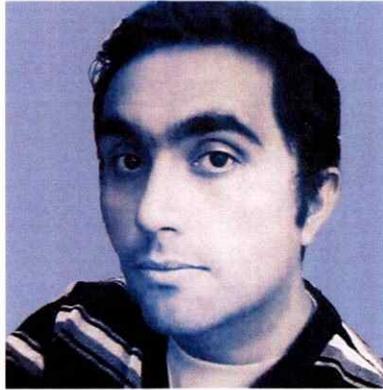
Dra. Julieta Orlando



"El éxito consiste en vencer el temor al fracaso".

Charles Augustin Sainte-Beuve (1804-1869)

JAIME ENRIQUE SOLIS PINILLA



Chileno, 28 años de edad, nacido en Santiago un 14 de marzo de 1987, estudiante de Magister en Ciencias Biológicas.

Oriundo de la comuna de San Ramón, nacido en una humilde familia de comerciantes, cursó su Educación General Básica en los colegios “Maurice and NatalySchool” y “Centro Educacional Purkuyén”, último establecimiento donde egresaría de Educación General Media.

Titulado como Profesor de Biología y Ciencias naturales en la Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación (UMCE) el año 2012.

AGRADECIMIENTOS

“A todos quienes estuvieron acompañándome estos dos años, a la profesora Jennifer Alcaíno, quien me apoyó en este proyecto. Al profesor Víctor Cifuentes, por aceptarme en su laboratorio y al Instituto Antártico Chileno, con su proyecto INACH RG_07-12.

A quienes me brindaron su apoyo en el laboratorio, Dony, Rafael, Héctor, Mario, Salvador y a todos los integrantes de tan buen equipo de trabajo, que fue mi segundo hogar durante este tiempo.

Y por sobre todo, a quien ha sabido acompañarme en este camino, quien me ha dado la vida y las herramientas para salir adelante, el tesón y la alegría de vivir todos los días...

Mi madre”.

ÍNDICE DE MATERIAS

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABLAS.....	8
ABSTRACT.....	11
1.1 LOS CAROTENOIDES.....	1
1.2 LA ASTAXANTINA.....	5
1.3 SÍNTESIS DE CAROTENOIDES Y ASTAXANTINA EN Xd.....	6
1.4 XANTHOPHYLLOMYCES DENDRORHOUS.....	11
1.5 HIPÓTESIS.....	15
1.6 OBJETIVOS.....	15
2. MATERIALES Y METODOS.....	16
2.1 LEVADURAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	16
2.2 DETERMINACIÓN DE BIOMASA DE LEVADURA.....	17
2.3 EXTRACCIÓN DE CAROTENOIDES.....	17
2.4 EXTRACCIÓN DE ERGOSTEROL.....	19
2.5 MUTAGÉNESIS CON RAYOS GAMMA.....	19
2.6 MUTAGÉNESIS CON NTG.....	20
2.7 DETERMINACIÓN DE SOBREVIVENCIA CELULAR.....	20
2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	22
4. RESULTADOS.....	23
3.1 SELECCIÓN DE AISLADOS DE <i>X. DENDRORHOUS</i> DE ACUERDO A LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ERGOSTEROL Y CAROTENOIDES PARA REALIZAR MUTAGÉNESIS AL AZAR.....	23
3.1.1 Determinación de curvas de crecimiento celular.....	23
3.1.2 Análisis de la producción de biomasa en aislados antárticos de <i>X. dendrorhous</i>	25
3.1.3 Cuantificación de la producción de carotenoides totales en aislados antárticos de <i>X. dendrorhous</i>	26
3.1.4 Cuantificación de la producción de ergosterol en aislados antárticos de <i>X. dendrorhous</i>	27
3.2 ENSAYOS DE MUTAGÉNESIS POR MÉTODOS QUÍMICOS (N-METIL-N-NITRO-N-NITROSOGUANIDINA, NTG) Y FÍSICOS (RAYOS GAMMA) DE LOS AISLADOS ANTÁRTICOS DE <i>X. DENDRORHOUS</i> SELECCIONADOS.....	29
3.2.1 Determinación de dosis óptimas para mutagénesis en <i>X. dendrorhous</i>	29
3.2.2 Selección de cepas mutantes de <i>X. dendrorhous</i>	31
3.3 EVALUACIÓN DE LOS MUTANTES DE <i>X. DENDRORHOUS</i> SELECCIONADOS.....	34
3.3.1 Evaluación de la producción de biomasa en aislados mutantes de <i>X. dendrorhous</i>	34
3.3.2 Evaluación de la producción de carotenoides en aislados mutantes de cepas antárticas de <i>X. dendrorhous</i>	36
3.3.3 Determinación de curvas de crecimiento celular de la mutante ANCH13.14 de <i>X. dendrorhous</i>	38
3.3.4 Evaluación de la producción de biomasa en la mutante ANCH13.14 de <i>X. dendrorhous</i>	39
3.3.5 Evaluación de la producción de carotenoides en la mutante ANCH13.14 de <i>X. dendrorhous</i>	40
3.3.6 Evaluación de la producción de ergosterol en la mutante ANCH13.14 de <i>X. dendrorhous</i>	42
5. DISCUSIÓN.....	44
4.1 MÉTODOS ALTERNATIVOS A LA SELECCIÓN VISUAL PARA LA ELECCIÓN DE MUTANTES SOBREPDUCTORAS DE ASTAXANTINA EN <i>X. DENDRORHOUS</i>	44
4.2 IMPORTANCIA DE ANALIZAR EL ORGANISMO PREVIO A LOS ENSAYOS DE MUTAGÉNESIS AL AZAR.....	46
4.3 CUANTIFICACIÓN DE ASTAXANTINA DE LA CEPA ANCH13.14 DE <i>X. DENDRORHOUS</i>	49
4.4 REGULACIÓN EN LAS RUTAS DE SÍNTESIS DE ESTEROLES Y CAROTENOIDES EN <i>X. DENDRORHOUS</i>	50
5. CONCLUSIONES.....	54
6. BIBLIOGRAFÍA.....	55
7. ANEXOS.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

AMD	Sigla inglesa para Degeneración Macular Relacionada con la Edad
ANOVA	Sigla inglesa para Análisis de Varianza
CCHEN	Comisión Chilena de Energía Nuclear
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
DNA	Sigla inglesa para Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
FPP	Farnesil pirofosfato
FPS	Farnesil pirofosfato sintasa
GGPP	Feranylgeranil pirofosfato
h	Hora
RP-HPLC	Sigla inglesa para Cromatografía Líquida de Alta Eficacia de Fase Reversa
INACH	Instituto Antártico Chileno
IPP	Isopentenil pirofosfato
kGy	Kilogray
KOH	Hidróxido de potasio
min	Minuto
ml	Mililitro
nm	Nanómetro
NTG	N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina
°C	Grado Celcius
ROS	Sigla inglesa para Especie Reactiva de Oxígeno
UV	Ultra violeta
Vol	Volumen
YM	Sigla inglesa para Levadura y Malta
µl	Micro litro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Algunos carotenoides presentes en la naturaleza.....	2
Figura 2. Disposición espacial de algunos carotenoides en la membrana plasmática.....	3
Figura 3. Estructura molecular de la astaxantina.....	6
Figura 4. Disrupción del gen CYP61 en la vía de los esteroides.....	7
Figura 5. Estructura molecular del ergosterol	9
Figura 6. Cultivo en placa de aislados antárticos y otras cepas silvestres de <i>X. dendrorhous</i>	12
Figura 7: Cámara de Neubauer	21
Figura 8. Curva de crecimiento celular	23
Figura 9. Producción de biomasa en cepas antárticas de <i>X. dendrorhous</i>	26
Figura 10. Producción de carotenoides en cepas antárticas de <i>X. dendrorhous</i>	27
Figura 11. Relativización de carotenoides en cepas antárticas de <i>X. dendrorhous</i> por su peso seco...28	
Figura 12. Producción de ergosterol en cepas antárticas de <i>X. dendrorhous</i>	30
Figura 13. Curvas de sobrevivencia celular con mutágenos	31
Figura 14. Colonias aisladas de <i>X. dendrorhous</i> provenientes de mutagénesis con rayos gamma (aislado parental: ANCH04).....	33
Figura 15. Colonias aisladas de <i>X. dendrorhous</i> provenientes de mutagénesis con rayos gamma (aislado parental: ANCH13).....	32
Figura 16. Producción de biomasa cepas candidatas por mutagénesis a 120 h de cultivo.....	35
Figura 17. Fenotipos de coloración de las mutantes de <i>X. dendrorhous</i>	36
Figura 18. Producción de carotenoides cepas candidatas por mutagénesis a 120 h de cultivo	37
Figura 19. Curva de crecimiento de las cepas ANCH13.14 y su parental ANCH13.....	38
Figura 20. Producción de biomasa entre cepa mutante (ANCH13.14) y su parental (ANCH13)	40
Figura 21. Cuantificación de carotenoides totales producidos.....	41
Figura 22. Cuantificación de astaxantina producida.....	42
Figura 23. Cuantificación de ergosterol total producido.....	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Fuentes microbianas de astaxantina (Ambati, 2014).....	5
Tabla 2 . Comparación indicadores de crecimiento microbiano en <i>X. dendrorhous</i>	24
Tabla 3 . Comparación indicadores de crecimiento microbiano en <i>X. dendrorhous</i>	39

RESUMEN

Xanthophyllomyces dendrorhous es una levadura basidiomicete que ha sido aislada desde 1960 en Japón, Rusia, Alaska, Finlandia, Estados Unidos y Chile. Esta levadura posee la capacidad de sintetizar el carotenoide astaxantina, un pigmento que tiene múltiples propiedades que la hacen interesante para la industria tanto en el sector agrícola como farmacéutico.

La síntesis de astaxantina, se realiza en respuesta a la exposición a múltiples agentes, entre ellos, aquellos que causan estrés foto-oxidativo en sus células, principalmente los rayos UV, cuya acción es bloqueada por dicha molécula. Sin embargo, la producción de astaxantina en cepas silvestres es baja como para considerarse viable en términos de producción industrial, convirtiéndose en una alternativa las técnicas basadas en el mejoramiento genético de cepas que producen de forma natural un mayor contenido de este carotenoide.

En la XLVI Expedición Científica Antártica se recolectaron 34 muestras de tierra provenientes de la Isla Rey Jorge, territorio antártico, con la finalidad de aislar levaduras. Desde una de estas muestras, proveniente de la Península Barton, se lograron aislar 13 colonias llamadas ANCH01 a 13, que corresponden a la levadura *X. dendrorhous*. Interesantemente, luego de un análisis comparativo de su fenotipo morfológico de pigmentación, se observó que éstas producen mayor cantidad de carotenoides que cepas silvestres continentales aisladas de bosques del sur de Chile por nuestro laboratorio. De esta manera, el objetivo de este trabajo fue la obtención de mutantes sobreproductores de astaxantina, a partir de las cepas antárticas de *X. dendrorhous*, mediante mutagénesis al azar.

A partir de los trece aislados antárticos de *X. dendrorhous*, ANCH04 y ANCH13, presentaron los mayores niveles de carotenoides, por lo que ajustándose a la producción de biomasa, éstos fueron los candidatos más idóneos para realizar mutagénesis al azar y así obtener cepas sobreproductoras de astaxantina.

Los experimentos de mutagénesis al azar se realizaron con nitrosoguanidina (NTG) o rayos gamma. Las curvas de sobrevivencia correspondientes a los tratamientos mutagénicos sugieren una mayor sensibilidad de la cepa ANCH04 (sobrevivencia baja) en comparación con ANCH13 a ambos mutágenos, resultando en una mayor variabilidad fenotípica de pigmentación en los mutantes obtenidos.

Como resultados de los experimentos de mutagénesis al azar de los aislados ANCH04 y ANCH13, se obtuvieron colonias de distintos fenotipos de color (rojas pálidas, rojas intensas, naranjas, amarillas y blancas) que sobrevivieron al tratamiento mutagénico. Los resultados de los ensayos de mutagénesis sugieren que el agente físico radiación gamma fue más eficiente que el agente químico NTG.

Luego de los tratamientos de mutagénesis, se aislaron 15 posibles mutantes mediante selección visual por tonalidades rojas intensas provenientes de la cepa parental ANCH13 y 10 candidatos provenientes de los ensayos de mutagénesis en la cepa ANCH04. Por lo tanto, se analizaron 25 mutantes candidatas, presentando la candidata ANCH13.14 una mayor producción de carotenoides totales (y de astaxantina en particular) luego de 120 h de cultivo en medio completo YM, respecto a su parental.

ABSTRACT

Xanthophyllomyces dendrorhous is a basidiomycetous yeast that has been isolated since 1960 in Japan, Russia, Alaska, Finland, United States and Chile. This yeast is able to synthesize astaxanthin, a carotenoid pigment that has multiple properties that make it interesting for aquaculture and pharmaceutical industry.

The astaxanthin synthesis is made as a response to the exposure of multiple agents, among them, those that cause photo-oxidative stress in cells, especially UV rays whose action is blocked by this molecule. Nevertheless, astaxanthin production in wild-type strains is particularly low to be considered as viable in terms of industrial production, and good alternatives are those techniques based on genetic improvement of strains that naturally produce higher amounts of this carotenoid.

In the XLVI Antarctic Scientific Expedition, 34 soil samples from Rey Jorge Island were collected with the purpose of isolating yeasts. In one of these samples, taken from Barton Peninsula, 13 colonies named as ANCH01 to ANCH13, were isolated that corresponded to the yeast *X. dendrorhous*. Interestingly enough, after a comparative analysis of their pigmentation phenotype, it could be observed that these isolates produce more carotenoids than continental wild-type strains isolated from southern Chile woods by our laboratory. Thus, the aim of the present work was to obtain astaxanthin mutant hyperproducer strains using random mutagenesis of the *X. dendrorhous* Antarctic isolates.

Among the 13 *X. dendrorhous* Antarctic isolates, ANCH04 and ANCH13 presented the highest levels of carotenoids. Therefore, and also considering the biomass production, these isolates were the most suitable candidates to perform random mutagenesis to obtain astaxanthin overproducing strains.

Random mutagenesis experiments were carried out in the isolates previously selected, using N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) or gamma rays. The survival curves corresponding to the treatments with NTG and gamma radiation suggested that ANCH04 was more sensible than ANCH13 in these treatments and resulted in a wider phenotypical variety in the collected mutants.

As a result of the random mutagenesis experiments, colonies with different color phenotypes (pale red, intense red, orange, yellow and white) were collected. The outcomes of the mutagenesis analysis suggested that the gamma radiation was more efficient than the NTG chemical agent to obtain mutants. After mutagenesis treatments, 15 possible mutants were isolated by means of visual selection according to their red tonalities in relation to the parental strain ANCH13 and 10 potential candidates from the mutagenesis of ANCH04. Therefore, 25 mutant candidates were analyzed. The candidate ANCH13.14 showed a higher production of total carotenoids (and astaxanthin) after 120 hours of culture in YM culture media, respect to its parental.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Los carotenoides.

Los carotenoides son un grupo de pigmentos naturales de 40 átomos de carbono al cual pertenecen cerca de 700 estructuras diferentes a los que se les atribuyen numerosas propiedades que podemos encontrar tanto en organismos fotosintéticos como en organismos que no lo son. Estos pigmentos pertenecen al grupo de compuestos naturales llamados isoprenoides, también conocidos como terpenos, que se caracterizan por su esqueleto formado por distintas unidades de isopreno, una molécula de 5 átomos de carbono. Así, los carotenoides contienen 8 unidades de isopreno.

El esqueleto de los carotenoides posee dobles enlaces conjugados lo que les confiere sus propiedades cromofóricas otorgando tonalidades amarillas, naranjas y rojizas, según su espectro de absorción en el rango de los 400 y 500 nm. Estos pigmentos en la naturaleza pueden encontrarse en forma lineal, con anillos cíclicos en uno o ambos extremos, y con la presencia de grupos funcionales (Figura 1).

En los carotenoides existen dos clases diferenciables por su composición molecular. Por una parte están los carotenos que comprenden al grupo de carotenoides más abundantes en la naturaleza, y por otro lado, las xantófilas que a diferencia de los carotenos, contienen grupos funcionales oxigenados (Britton, 1995).

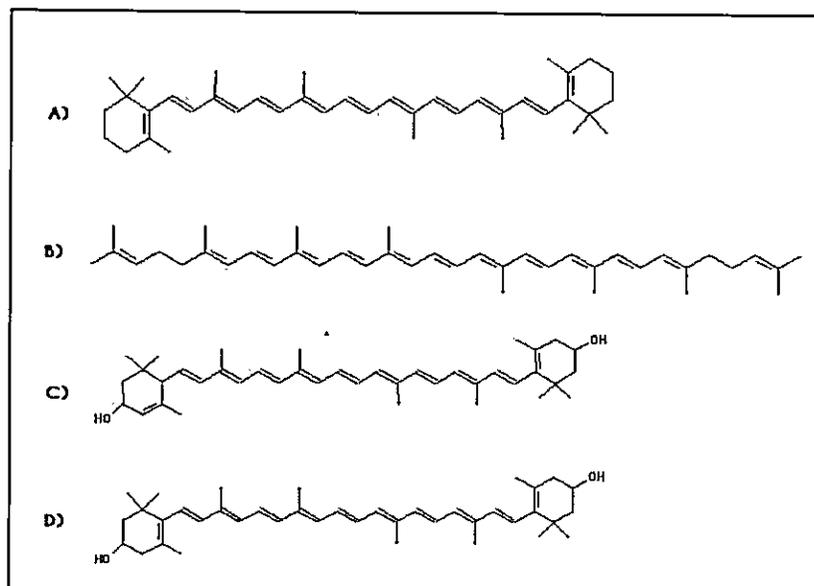


Figura 1. Algunos carotenoides presentes en la naturaleza. Carotenos: A) β -caroteno, B) licopeno, xantófilas, C) luteína, D) zeaxantina.

Los carotenoides son compuestos hidrofóbicos y se ubican generalmente en las membranas celulares jugando un rol importante en la regulación de la fluidez de éstas y es aquí donde, dependiendo de su naturaleza química, ejercen diversos efectos al beneficio de la célula (Gruszecki, 1999). En el caso de moléculas apolares como el licopeno y el β -caroteno, la cadena poliénica se dispone de forma horizontal en la membrana quedando inmersa en las colas hidrofóbicas de los ácidos grasos que la conforman. Se han realizado estudios (McNulty y col., 2006) donde moléculas polares como la astaxantina, al disponerse de forma vertical y exponiendo sus grupos hidroxilos en las caras externa e interna de la célula, tienen una participación más efectiva en la absorción de radicales libres en comparación con otros carotenoides que se disponen de forma horizontal (Figura 2).

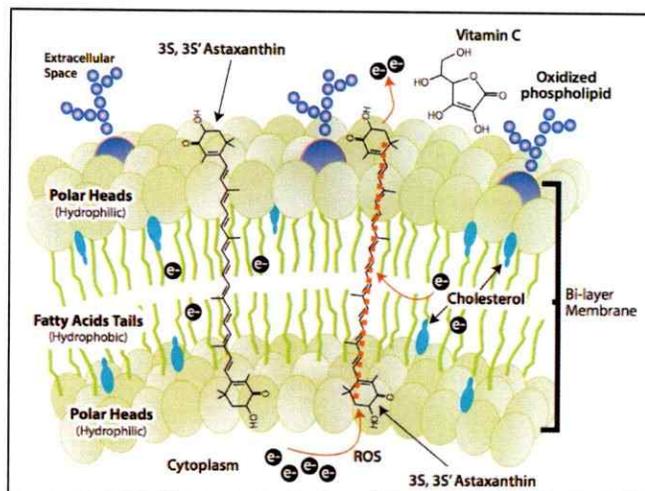


Figura 2.
Disposición espacial de

algunos carotenoides en la membrana plasmática. En vertical, disposición de moléculas del carotenoide astaxantina en la membrana plasmática y su mecanismo de absorción energética provenientes de ROS. (Pashkow y col., 2008).

Disposición
algunos

Diversos organismos son productores de carotenoides; sin embargo, sólo los organismos fotosintéticos y un grupo limitado de organismos no fotosintéticos, son capaces de sintetizar carotenoides *de novo*. Por este motivo, muchas especies deben incorporar estos compuestos a través de su dieta, ya que los carotenoides son moléculas precursoras de otros metabolitos importantes a nivel celular (por ejemplo de la vitamina A o rodopsina), poseen propiedades antioxidantes y participan en la coloración de algunos tejidos como las plumas, carne y exoesqueleto, jugando un importante rol en diversos aspectos del comportamiento de las especies como el cortejo, apareamiento, y otras numerosas facultades en su entorno biológico. Por ejemplo, en plantas algunos carotenoides atraen a organismos polinizadores por sus llamativos colores y también son importantes en la fototaxia y el fototropismo (Borowitzka, 1986).

Adicionalmente, los carotenoides cumplen una importante función en organismos fotosintéticos, ya que son considerados como la primera línea de defensa

que absorbe el exceso de radiación ultra violeta (UV) en la fase clara de la fotosíntesis evitando la generación de singletes de oxígeno ($^1\text{O}_2$) (Ramel y col., 2012) que son dañinos para las células. Similarmente, tanto en organismos no fotosintéticos que sintetizan carotenoides como en los que sólo los consumen, este grupo de moléculas también cumplen un rol de protección frente al estrés oxidativo ocasionado por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) producto del metabolismo celular y la radiación UV incidente sobre las células expuestas. Así, los carotenoides absorben la energía de excitación de $^1\text{O}_2$ y con ello previenen el daño oxidativo a nivel del DNA y de los lípidos que componen la membrana plasmática (Palooza, 1992).

Se ha documentado, que el consumo de β -caroteno en la dieta, disminuye la oxidación de las LDL producto de la capacidad de absorber radicales libres de oxígeno, amortiguando el efecto de los radicales sobre el sistema vascular (Clevidence y Bieri, 1993). Los carotenoides también han sido catalogados como elementos importantes en la visión, ya que se ha descrito una relación entre la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y el estrés oxidativo (Khan y col., 2006), por lo que las propiedades antioxidantes de este grupo de moléculas puede jugar un rol crucial en la prevención de esta enfermedad oftalmológica, en incluso por sus propiedades antioxidantes, existen carotenoides de gran importancia en la industria cosmética utilizados con propósitos de anti-envejecimiento en formulaciones cosméticas (Kidd, 2011).

1.2 La astaxantina.

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- β , β caroteno-4,4'-diona) es un carotenoide tipo xantófila (que posee átomos de oxígeno en su estructura) que se encuentra en varios organismos marinos confiriendo una coloración rojiza, como lo que ocurre en langostas, flamencos, camarones y salmones (Johnson, 2003). Sin embargo, estos animales carecen de las rutas metabólicas que permiten la síntesis *de novo* de este metabolito, por lo que lo adquieren de su dieta. La astaxantina es sintetizada por pocos organismos (Nelis y cols., 1991), incluyendo a algunas bacterias marinas, la microalga *Haematococcus pluvialis*, la planta *Adonis annua* y la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*; sin embargo, las principales fuentes comerciales de astaxantina provienen de microorganismos como los descritos por Ambati (2014).

Tabla 1. Fuentes microbianas de astaxantina

Especie	Porcentaje producción astaxantina en relación con peso seco
<i>Chlorophyceae:</i>	
<i>Haematococcus pluvialis</i>	3,8
<i>Haematococcus pluvialis</i> (K-0084)	3,8
<i>Haematococcus pluvialis</i> (Aislado local)	3,6
<i>Haematococcus pluvialis</i> (Aislado local)	3,4
<i>Haematococcus pluvialis</i> (K-0084)	2,7
<i>Chlorococcum</i>	0,2
<i>Chlorellazofingiensis</i>	0,001
<i>Neochloris wimmeri</i>	0,6
<i>Ulvophyceae:</i>	
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	0,02
<i>Ulva lactuca</i>	0,01
<i>Florideophyceae:</i>	
<i>Catenella repens</i>	0,02
<i>Alphaproteobacteria:</i>	
<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	0,01
<i>Paracoccus carotinifaciens</i> (NITE SD 00017)	2,2
<i>Tremellomycetes:</i>	
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	0,5
<i>Labyrinthulomycetes:</i>	
<i>Thraustochytrium sp. CHN-3</i> (FERM P-18556)	0,2
<i>Malacostraca</i>	
<i>Pandalus borealis</i>	0,12
<i>Pandalus clarkia</i>	0,015

Nota: Tabla tomada de (Ambati, 2014)

Diversas propiedades de la astaxantina la hacen atractiva para su uso comercial, entre ellas las relacionadas con la pigmentación de algunos organismos de interés económico como los salmones. Adicionalmente, este carotenoide tiene numerosas propiedades útiles para la industria farmacéutica, como por ejemplo, propiedades antioxidantes, previniendo el cáncer y enfermedades degenerativas, así también como agente estimulante del sistema inmunológico (Park y col., 2011). Todas estas propiedades se asocian a la estructura molecular de la astaxantina (Guerin y col., 2003) (Figura 3), cuyo rol sería de defensa frente al estrés oxidativo causado por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). El valor de la astaxantina como suplemento alimenticio tanto para la industria farmacéutica como acuícola, alcanza valores de dos mil dólares por kilo (Fruch y Canon, 2005), siendo su fuente principal la síntesis petroquímica.

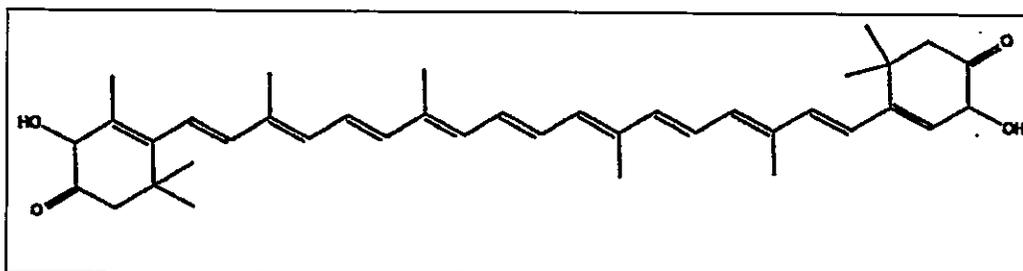


Figura 3. Estructura molecular de la astaxantina

1.3 Síntesis de carotenoides y astaxantina en *Xd*.

La ruta carotenogénica, sus genes y la consiguiente síntesis de astaxantina de *Xd*, se ilustra en la Figura 4. En eucariontes no fotosintéticos, la carotenogénesis comienza desde el Acetil-CoA y a través de la ruta del mevalonato, se sintetiza isopentenil pirofosfato (IPP). A partir de IPP, de 5 carbonos, derivan todos los

isoprenoides incluyendo a los carotenoides y esteroides. A continuación, el IPP es isomerizado a dimetilalil pirofosfato (DMAPP) por la enzima IPP isomerasa codificada por el gen *idi*.

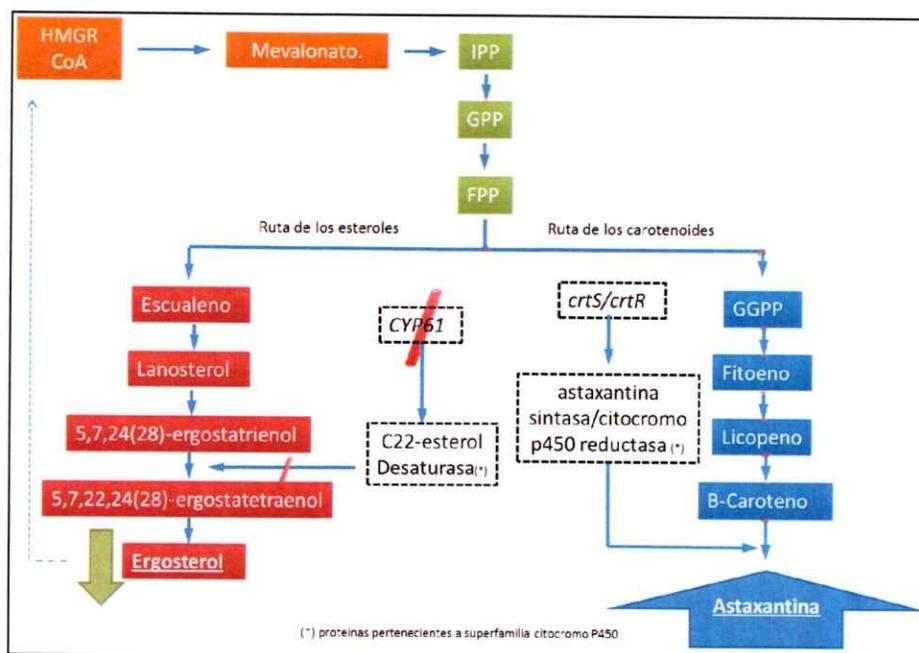


Figura 4. Síntesis de carotenoides y astaxantina en *X.d*. La figura destaca el efecto de la disrupción del gen *CYP61* en la vía de los esteroides sobre la síntesis de carotenoides. La disrupción del gen *CYP61* aumenta la producción de astaxantina, por lo que se cree que los niveles de ergosterol celular son claves en la regulación tanto de esteroides como de carotenoides (Loto y col., 2012). Abreviaturas: IPP (isopentenil pirofosfato), FPP (farnesil pirofosfato), GPP (geranil pirofosfato) y GGPP (geranilgeranil pirofosfato).

Posteriormente, ocurre la condensación de una molécula de IPP con una de DMAPP, formando geranil pirofosfato (GPP, C₁₀), al cual se le adiciona una segunda molécula de IPP formando farnesil pirofosfato (FPP, C₁₅). Estas dos reacciones son catalizadas por la enzima FPP-sintasa codificada por el gen *FPS* (Alcaino y col., 2014). Luego a FPP se le adiciona una tercera molécula de IPP formando geranilgeranil pirofosfato (GGPP, C₂₀) por la enzima GGPP-sintasa codificada por el gen *crtE* (Alcaino y col., 2014). En estos pasos, el FPP es el precursor de los esteroides

mientras que el GGPP es el precursor de los carotenoides.

A continuación en la carotenogénesis, dos moléculas de GGPP son condensadas para formar el fitoeno (C₄₀) que es incoloro, siendo el primer carotenoide que se forma. En *X. dendrorhous*, la formación de fitoeno se lleva a cabo por una enzima de doble actividad: fitoenosintasa y licopeno ciclasa, codificada por el gen *crtYB* (Alcaino, 2002; Verdoes y col., 1999). Verdoes y col., (1999) lograron clonar y caracterizar el gen *crtI* que codifica la enzima fitoenodesaturasa capaz de realizar 4 desaturaciones sucesivas a la molécula de fitoeno para formar licopeno. Posteriormente, la molécula de licopeno sufre la ciclación de sus extremos por la enzima bifuncional fitoenosintasa - licopeno ciclasa para dar origen al β -caroteno, pigmento de color amarillo.

Finalmente, la formación de astaxantina resulta de la hidroxilación en las posiciones 3 y 3', y de la adición de grupos ceto en las posiciones 4 y 4' de los anillos terminales del β -caroteno. Este paso es controlado por el gen *crtS* que codifica la enzima astaxantinasintasa (Álvarez y col., 2006). La enzima astaxantinasintasa pertenece a la familia de proteínas citocromo P450 (Martin y cols., 2008), las que requieren de un dador de electrones para su funcionamiento. Alcaino y col. (2008), clonaron y caracterizaron el gen *crtR* que codifica esta citocromo P450 reductasa.

Es importante destacar que existen numerosas enzimas citocromo P450 que participan en diversas rutas metabólicas; sin embargo, generalmente en una especie existe una única enzima citocromo P450 reductasa capaz de asistir a todas las enzimas citocromo P450 aunque se sugiere que existen donadores de electrones alternativos (Alcaino y col., 2008). Entre las rutas metabólicas donde se han descrito

enzimas citocromo P450, se encuentra la síntesis de esteroides, donde el ergosterol es el esteroide principal en hongos (Granado y col., 1995).

Los esteroides, son alcoholes monohidroxílicos policíclicos de 27 a 29 carbonos solubles en disolventes orgánicos y cuya estructura deriva del esteroide de 17 carbonos formada por tres anillos hexagonales y uno pentagonal. En los esteroides, se añade una cadena lateral de 8 o más átomos de carbono en el carbono 17 y el grupo hidroxilo en el carbono 3 (Fahy y col., 2005). Así como existe el colesterol en humanos, el ergosterol (Figura 5) se encuentra presente en las membranas celulares tanto de plantas como en hongos, cumpliendo un rol estructural regulando la rigidez de las membranas celulares (Abe y col., 2009).

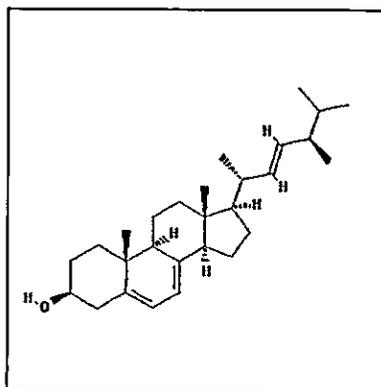


Figura 5. Estructura molecular del ergosterol. De nombre IUPAC (3S,9S,10R,13R,14R,17R)-17-[(E,2R,5R)-5,6-dimethylhept-3-en-2-yl]-10,13-dimethyl-2,3,4,9,11,12,14,15,16,17-decahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol, es un esteroide de 28 C con 3 anillos hexagonales y uno pentagonal, nótese el grupo hidroxilo en C3.

Además de poseer funciones estructurales, el ergosterol también posee beneficios para la salud humana. Existen estudios donde se demuestra que el consumo de la infusión del hongo que acumula ergosterol *Agaricus blazei* por parte de ciudadanos brasileños, disminuye la probabilidad de desarrollo de tumores e incluso

en animales con tumores, disminuye la angiogénesis y la masa tumorizada lo que estaría asociado a la muerte celular de células cancerígenas (Takaku y col., 2001). Por otra parte, el ergosterol es un componente importante para combatir el raquitismo, una enfermedad que lleva a complicaciones óseas principalmente durante los primeros estadios de vida en humanos, siendo la vitamina D (ergocalciferol) es el principal factor deficiente en niños con raquitismo, ya que en general, la leche materna suele contener una baja concentración de esta vitamina cuya producción es a partir de ergosterol o colesterol, e inducida por el componente UV de la radiación solar. Por esta razón, el consumo de ergosterol también supone una alternativa para combatir el raquitismo en zonas templadas o frías con baja radiación solar (Rajakumar y col., 2007).

Las vías de síntesis de los esteroides y de la astaxantina en *X. dendrorhous* (Figura 4) están relacionadas ya que además de que en ambas participan enzimas citocromo P450 y por ende comparten la enzima citocromo P450 reductasa, tienen como precursor común al IPP. Loto y col. (2012) describieron el gen *CYP61* que codifica una enzima intermediaria de la ruta de síntesis del ergosterol (C-22 desaturasa) y encontraron que el mutante *cyp61-* no produce ergosterol y acumula otros esteroides. Interesantemente, la producción de carotenoides, y consecuentemente la de astaxantina, se vio incrementada en estos mutantes sugiriendo que además existe una relación en la regulación de la síntesis de ergosterol y de astaxantina.

En búsqueda de una fuente natural de astaxantina y con la finalidad de mejorar la producción de este pigmento, se han desarrollado numerosas estrategias basadas en el mejoramiento genético en organismos productores. En este sentido, para favorecer la síntesis de carotenoides en la levadura *X. dendrorhous*, se le aplicado

herramientas de ingeniería genética para interrumpir genes regulatorios o sobre-expresar genes carotenogénicos (Loto y col., 2012) como también ensayos de mutagénesis al azar por exposición a rayos gamma entre otros mutágenos físicos y químicos (Mutwakil, 2011).

1.4 *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

X. dendrorhous el nombre de la levadura en estado teleomórfico que pertenece al filo Basidiomycota, clase Tremellomycetes, orden Cistofilobasidiales y familia Cistobasidiaceae (Golubev, 1995), llamada en un principio *Phaffiarhodozyma* ya que sólo se conocía su estado anamórfico y cuyo nombre hace referencia a su descubridor, Herman Phaff (Johnson, 2003). En un principio se logró aislar cepas de esta levadura desde lugares muy limitados; sin embargo, actualmente se han aislado cepas provenientes de diversas zonas del planeta como Japón, Estados Unidos, Alaska, Pakistan, Finlandia, Argentina, Chile y recientemente, desde el territorio Antártico (Contreras y col., 2012).

El principal carotenoide producido por esta levadura es la astaxantina (Johnson y An, 1991); sin embargo, los niveles son bajos para una explotación comercial. Es por ello que las condiciones de crecimiento de esta levadura han sido muy estudiadas y se han documentado diversos métodos estandarizados que optimizan su cultivo, pigmentación y posterior extracción de carotenoides. En un estudio se comparó la producción de astaxantina tanto en *X. dendrorhous* como en el alga *H. pluvialis* que son los organismos más prometedores para la producción de este pigmento a nivel industrial. En condiciones óptimas, la levadura alcanza los 850 µg/g de peso seco, mientras que el alga alcanza los 3.3 mg/g de astaxantina; sin embargo, las

condiciones óptimas de cultivo (nutrientes, aireación y condiciones lumínicas) resultan para el alga muy costosas a largo plazo, por lo que comercialmente no resultaría viable económicamente, lo que sí podría ocurrir con *X. dendrorhous*, quien crece y produce astaxantina, bajo medios de cultivo en condiciones temperatura ambiente, aireación, luminosidad y sustratos más económicos.(Dominguez-Bocanegra, 2012).

En este sentido, en la XLVI Expedición Científica Antártica organizada por el Instituto Antártico Chileno, INACH, se recolectaron 34 muestras de suelo provenientes de la Isla Rey Jorge con la finalidad de aislar levaduras. Desde una de estas muestras, proveniente de la Península Barton, se lograron aislar 13 colonias, llamadas ANCH 01 a 13 que molecularmente se confirmó que corresponden a la levadura *X. dendrorhous*(Figura 6). Interesantemente, éstos aislados presentan distinta pigmentación, lo que permitió clasificarles como: i) rojos, ii) amarillos y iii) amarillo pálido. Sorprendentemente, el contenido total de carotenoides de los aislados rojos es mucho mayor en comparación con cepas silvestres continentales (Contreras y col., 2012).

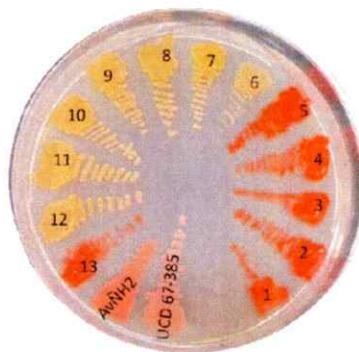


Figura 6. Cultivo en placa de aislados antárticos y otras cepas silvestres de *X. dendrorhous*.Cepas de *X. dendrorhous*cultivadas en placas con medio completo YM a 22°C por 5 días. La numeración corresponde al respectivo aislado antártico ANCH (01 a 13) junto con las cepas continentales UCD 67-385 (procedencia Japón) y AVHN2 (procedencia Ñuble, Chile) (imagen tomada de Contreras y cols., 2012).

Dados estos antecedentes, es imprescindible considerar el potencial industrial de esta levadura, ya que al observar los metabolitos que produce, se hace interesante obtener una cepa que sobreproduzca carotenoides, pero por sobre todo, astaxantina.

Si definimos las características de una cepa sobreproductora de carotenoides, se han documentado como aquellas que producen cantidades mayores de estos metabolitos; sin embargo, se ha observado que también se asociarían a una disminución en la producción de biomasa que aquellas que producen en menor cantidad estos metabolitos (Acheampong y Martin, 1995; Johnson y Lewis, 1979), por lo que la producción de carotenoides y astaxantina no se encuentran asociados directamente al crecimiento. Además, las que producen más carotenoides producirían una menor cantidad de ergosterol, siendo producto que ambas vías, al tener metabolitos precursores en común, comparten elementos reguladores. Es por ello, que una cepa sobreproductora es aquella que se caracteriza idealmente como un productor de pigmentos carotenogénicos y/o que presente una producción de biomasa mayor al ser comparados con cepas de referencia. Asimismo, es importante la normalización de la producción carotenogénica con base a la producción de biomasa, ya que una cepa que no necesariamente produzca una alta cantidad de astaxantina, pero con una producción de biomasa lo suficientemente alta, podría compensar los requerimientos para optimizar la síntesis de carotenoides.

Finalmente, existen criterios deseables basados en la cinética de crecimiento microbiano (aunque no imprescindibles), como conocer la absorbancia máxima (A) que alcanza cada cepa puede alcanzar y en qué tiempo alcanza la fase estacionaria. Identificar las cepas con las velocidades de crecimiento (μ_M) más altas, que se traducen en tiempos generacionales cortos, y que alcanzan una tasa de crecimiento



máxima en menor tiempo; Y la fase de latencia (λ), que debiera ser menor en los candidatos en comparación con las cepas de referencia, para asegurar una producción mayor de carotenoides, traducándose este aspecto en tiempos de adaptación metabólica más breves, y que optimizan el consumo de recursos existentes en los medios de cultivo.

1.5 Hipótesis.

“Mediante mutagénesis al azar de cepas de X. dendrorhous aisladas desde el territorio antártico, se obtendrán levaduras sobreproductoras de astaxantina”

1.6 Objetivos.

1.6.1 Objetivo general.

“Obtener cepas de Xanthophyllomyces dendrorhous sobreproductoras de astaxantina a partir de ensayos de mutagénesis al azar y la posterior selección de aislados antárticos”.

1.6.2 Objetivos específicos.

- 1. Seleccionar aislados antárticos de X. dendrorhous de acuerdo a la producción de biomasa y carotenoides, mediante mutagénesis al azar.*
- 2. Mutagenizar con agentes químicos (NTG) y físicos (rayos gamma) aislados antárticos de X. dendrorhous seleccionados.*
- 3. Evaluar la producción de carotenoides y el crecimiento de los mutantes resultantes.*

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Levaduras y condiciones de cultivo.

Con fines de encontrar el mejor candidato para realizar posteriores experimentos de mutagénesis al azar, es pertinente definir que la cepa cumpla con ciertos requisitos, asociados idealmente a una producción de carotenoides y/o biomasa igual o mayor a una cepa de *X. dendrorhousya* documentada.

Es por ello que, a modo de comparación, se seleccionaron las cepas AVHN2 (aislada de hojas de avellano en el sector de Ñuble Región del Biobío), la cual presenta niveles de biomasa altos, junto con una producción de carotenoides totales cercanos a los 700 ppm; encontrándose como la cepa más estable en estos parámetros, al ser comparada con otras cepas tanto chilenas como internacionales. También junto con ella, se incluyó a la cepa AVHN2.4.8 obtenida por dos rondas de mutagénesis con NTG a partir del parental AVHN2, con una producción de carotenoides totales que ronda los 1.200 ppm (datos no publicados, Laboratorio de Genética U. de Chile).

Se analizaron los aislados antárticos de *X. dendrorhousque* que presentan una coloración rojiza intensa lo que estaría asociado a una alta producción de astaxantina. Éstas fueron: ANCH01, ANCH02, ANCH03, ANCH04, ANCH05 y ANCH13. Además se incluyó a ANCH10 cuya característica es la de tener una pigmentación amarilla (asociada a la producción y acumulación de β -caroteno). Las levaduras se cultivaron en medio completo YM (0,3% extracto de levadura, 0,3% extracto de malta y 0,5% bacto peptona) suplementado con 1% de glucosa a 22°C con agitación

constante. En el caso de cultivos en placas, al medio se le adicionó agar al 1,5%. Para realizar las curvas de crecimiento, matraces de 150 ml con 50 ml de medio de cultivo se inocularon con cultivos en fase exponencial de crecimiento hasta alcanzar una densidad óptica inicial (DO_{600nm}) de 0,1. El crecimiento de los cultivos se siguió mediante la densidad óptica del cultivo a 600 nm con un espectrofotómetro JASCO V-630.

Las curvas de crecimiento se realizaron en triplicados y se tomaron muestras luego de 48, 72 y 120 h de cultivo para evaluar la producción de biomasa, carotenoides y ergosterol.

2.2 Determinación de biomasa de levadura.

La biomasa alcanzada por cada cepa analizada se determinó de acuerdo al peso seco de levadura. Para ello, 1 ml de medio de cultivo YM, en fase esponencial (y en triplicado), se centrifugó en un tubo Eppendorf previamente masado, se descartó el sobrenadante y el pellet celular se dejó secar a 80°C durante 12 h. A continuación, el peso seco de levadura de 1 ml de cultivo se determinó por la diferencia de masa entre el tubo Eppendorf con el pellet seco y vacío.

2.3 Extracción de carotenoides.

Se extrajeron carotenoides a partir de muestras de 15 ml de cultivo. Para ello se colectó por centrifugación el pellet celular y se congeló a -80°C hasta ser procesado.

Para extraer los carotenoides, cada pellet celular se descongeló, se suspendió en 1 ml de agua destilada y se agregó 0,5 ml de volumen de esferas de vidrio BioSpec de 0,5 mm de diámetro con la finalidad de realizar la posterior ruptura

celular mecánica en un molidor BioSpec con agitación durante 3 min. Posteriormente, a cada tubo se le agregó 1 ml de acetona y se homogenizó en molidor durante 3 min. Luego la muestra se centrifugó a 4.000 rpm por 5 min y se recuperó la fase líquida. Este último paso se repitió hasta que el pellet celular quedó incoloro. A la fase líquida, se le agregó la quinta parte de su volumen de éter de petróleo, se homogenizó en un agitador y posteriormente se centrifugó a 4.000 rpm en una centrífuga Sorvall de sobremesa por 5 min, se extrajo la fase superior (éter de petróleo) en tubos de vidrio y este paso se repitió hasta que la fase inferior (acetona) se tornó transparente. Los carotenoides totales se cuantificaron espectrofotométricamente a 465 nm y su concentración se calculó con la siguiente fórmula (An y col., 1989):

$$\frac{(\text{Vol. éter} \cdot \text{DO}_{465} \cdot 100 \cdot \text{vol. peso seco})}{(\text{masa pellet} \cdot 21 \cdot \text{Vol. cultivo original})}$$

Donde “Vol. éter” corresponde al volumen de éter de petróleo expresado en ml, “Vol. peso seco” respecta al volumen de cultivo (1 ml) extraído para su secado, “Masa pellet” corresponde a la masa fresca en gramos existente en 1 ml de cultivo y “Vol. cultivo original” refiere al volumen total de cultivo extraído ($\text{DO}_{600\text{nm}}=8$) para la extracción de carotenoides (15 ml).

La composición de carotenoides se evaluó por RP-HPLC en un equipo Shimadzu SPD-M10A con una columna C18 y como fase móvil acetonitrilo: metanol: isopropanol (85: 10: 5, v/v/v). Los carotenoides se identificaron de acuerdo a su espectro de absorción y tiempo de retención de acuerdo a estándares publicados por Britton y col. (2004).

2.4 Extracción de ergosterol.

La extracción de ergosterol se realizó de acuerdo a Shang(2006). Brevemente, luego de 48, 72 y 120 h de cultivo, se extrajeron esteroides a partir del pellet celular de muestras de 5 ml de cultivo que fueron congeladas a -80°C antes de ser procesadas. El pellet celular de cada muestra se suspendió en 1 ml de agua destilada, se agregaron 16 ml de etanol 60% v/v y 4 g de KOH. Las mezclas se calentaron a baño maría ($78-80^{\circ}\text{C}$) por 2 h y luego se añadieron 10 ml de éter de petróleo. Las fases se separaron por centrifugación y se recuperó la fase superior (éter de petróleo) que contiene a los esteroides no saponificables. La concentración de ergosterol se determinó por absorbancia a 280 nm y se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración ergosterol} = (\text{DO}_{282}) \times e(11.900)$$

Donde “e” corresponde al coeficiente de extinción molar, dada en este caso con $\lambda = 282 \text{ nm}$.

Finalmente, la composición de esteroides se evaluó por RP-HPLC con una columna C18 y como fase móvil metanol: agua (97: 3, v/v).

2.5 Mutagénesis con rayos gamma.

A partir de un cultivo con una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 8 (fase exponencial de crecimiento), se tomó 1 ml de muestra donde posteriormente el pellet celular se suspendió en agua o en buffer STM y luego se irradió con dosis de acuerdo a los resultados de sobrevivencia. Luego, las células se sembraron en placas con medio YM y se incubaron a 22°C hasta el desarrollo de colonias (método adaptado de Sun y col., 2004).

2.6 Mutagénesis con NTG.

A partir de un cultivo con una DO_{600nm} de 8 (fase exponencial de crecimiento), se obtuvieron muestras de 1 ml, donde el pellet celular obtenido se lavó dos veces con buffer citrato (0,1 M ácido cítrico y 0,1 M citrato de sodio, pH 5,5). Luego el pellet se suspendió en una solución de NTG a una concentración de acuerdo a los resultados de sobrevivencia celular con 1 ml de buffer fosfato (0,1 M fosfato monosódico y 0,1 M fosfato disódico, pH 7,0) y se incubó a 22°C con agitación constante durante 30 min. Posteriormente el pellet celular se lavó dos veces con buffer fosfato pH 7,0 y finalmente se sembró en placas de medio sólido YM (método adaptado de An y col., 1989).

2.7 Determinación de sobrevivencia celular.

A partir de los aislados seleccionados, se realizaron suspensiones de cultivos en fase exponencial ($DO_{600=8}$) tratados con mutágenos químicos (NTG) y físicos (Rayos gamma). Se realizó el conteo en cámara Neubauer (Figura 7) visualizada por microscopía óptica a 40x, estandarizando el número de células totales en 1 ml de cultivo sin tratamiento aplicando la siguiente fórmula:

[Cantidad total de células en 5 cuadrados de 0,1 mm de ancho x 5 x (1/factor de dilución)]
--

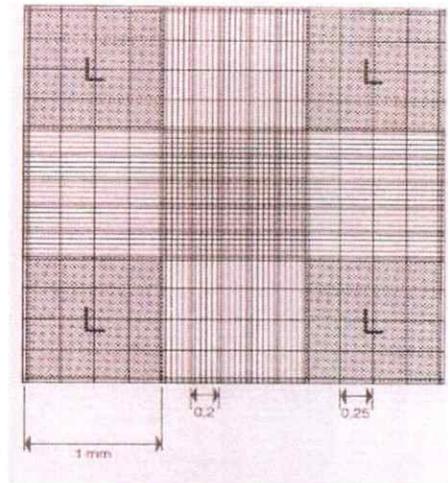


Figura 7: Cámara de Neubauer. Método utilizado para determinar el título de células existentes en un volumen determinado de cultivo.

Para determinar la sobrevivencia celular frente a los tratamientos con mutágenos, se utilizó el método de la micro gota, donde se sembraron 10 μ l de diluciones seriadas, desde 10^{-1} hasta 10^{-8} , de cada cultivo (en triplicados) en placas con medio YM luego de ser tratados con 5, 10, 15, 20, 25 y 30 μ g/ml de NTG o dosis de 2; 3,5; 5; 6; 7 y 8 kGy de rayos gamma (servicio contratado al área de irradiación multipropósito de la Comisión Chilena de Energía Nuclear, CCHEN: <http://www.cchen.cl/>). Las placas se incubaron a 22°C hasta el desarrollo de colonias y posteriormente se contaron y se determinó el título en comparación con el control (cultivo sin tratamiento con mutágeno).

Por otra parte, también se evaluó el medio de suspensión de las células para realizar el tratamiento mutagénico, ya que en el caso del tratamiento con rayos gamma, las células deben estar expuestas por varias horas y el medio puede influir en su sobrevivencia. Se evaluó el buffer STM (270 mM Sacarosa 10 mM Tris-HCl, pH 7,5,

1 mM MgCl₂) y agua como control. Este estudio se realizó en conjunto con el método de microgota ya mencionado para estimar la sobrevivencia.

2.8 Análisis estadísticos.

Las diferencias entre las cepas (cinética de crecimiento, biomasa, ergosterol y carotenoides) se confirmaron mediante el test estadístico ANOVA ($p < 0,05$) de una o dos vías según fue pertinente y con el post-test correspondiente, realizados en el programa "GraphpadPrism 6.0".

Las curvas de crecimiento se ajustaron por la ecuación de Gompertz modificada (Zwitering y col., 1990), mediante el programa "Origin Pro 9.0".

4. RESULTADOS

3.1 Selección de aislados de *X. dendrorhous* de acuerdo a la producción de biomasa, ergosterol y carotenoides para realizar mutagénesis al azar.

3.1.1 Determinación de curvas de crecimiento celular.

Con el objetivo de encontrar el mejor candidato en cuanto a parámetros que favorezcan la sobreproducción de carotenoides (velocidad de crecimiento, producción de biomasa y carotenoides), se realizaron curvas de crecimiento de cada aislado antártico, como de las cepas de referencia (AVNH2 y AVHN2.4.8) en triplicado (Figura 8). Junto con ello, también se analizó la producción de ergosterol.

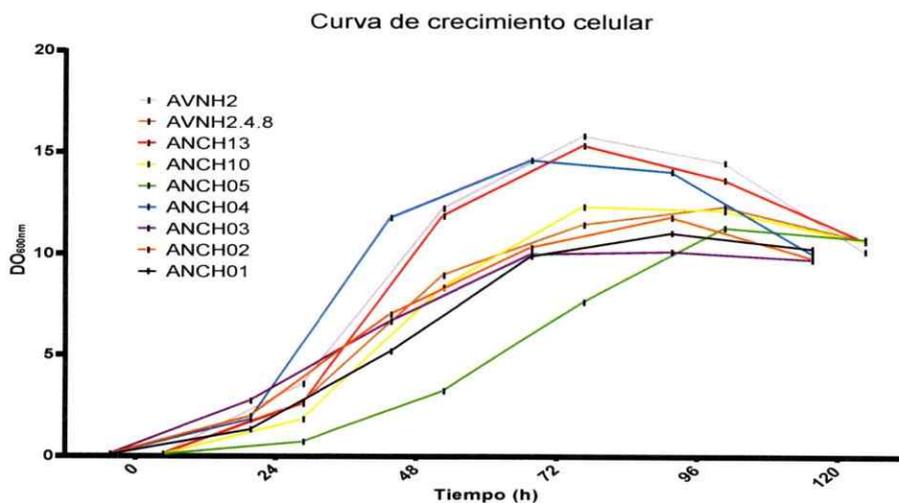


Figura 8. Curva de crecimiento celular. Las cepas se cultivaron en medio completo YM a 22°C con agitación constante. Se tomaron muestras de cada cultivo cada 24 h por 5 días a las cuales se les midió su absorbancia a 600 nm. Cada punto corresponde al valor promedio de tres cultivos independientes con sus desviaciones estándar. Las curvas de crecimiento de cada aislado se representa en un color respectivo, mostrado en la simbología adjunta.

Con la finalidad de comparar el comportamiento de los distintos aislados, se realizó un ajuste de las curvas a la ecuación de Gompertz modificada (Zwietering y col., 1990). Dicho modelo matemático permite el ajuste empírico de la cinética de crecimiento en una población determinada asumiendo que la tasa de crecimiento incrementa monotónicamente hasta alcanzar un máximo y después decrece en forma monótona asintóticamente. Dicho modelo permite analizar patrones observados en un cultivo como la amplitud del tiempo de latencia (fase lag, λ), la tasa máxima de crecimiento (pendiente de la curva en la fase exponencial de crecimiento, μ_m) y la máxima absorbancia alcanzada (A) (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación indicadores de crecimiento microbiano en *X. dendrorhous*.

Cepa	λ	μ_m	A
ANCH01	12,27 \pm 3,59 ns / ns	0,18 \pm 0,06 ns / ns	11,78 \pm 1,19 ** / ns
ANCH02	3,22 \pm 1,94 * / ns	0,12 \pm 0,01 ns / ns	11,82 \pm 1,08 * / ns
ANCH03	0,73 \pm 5,15 * / ns	0,16 \pm 0,07 ns / ns	9,78 \pm 2,53 *** / ns
ANCH04	9,78 \pm 3,03 ns / ns	0,15 \pm 0,02 ns / ns	14,86 \pm 0,33 ns / ns
ANCH05	21,15 \pm 1,84 ns / **	0,20 \pm 0,07 ns / ns	11,34 \pm 1,52 ** / ns
ANCH10	2,52 \pm 5,34 * / ns	0,14 \pm 0,03 ns / ns	12,67 \pm 0,30 ns / ns
ANCH13	6,98 \pm 12,29 ns / ns	0,14 \pm 0,02 ns / ns	15,46 \pm 1,76 ns / ns
AVNH2	17,8 \pm 5,73 **	0,13 \pm 0,02 ns	15,75 \pm 0,14 *
AVNH2.4.8	0,04 \pm 5,86 **	0,16 \pm 0,06 ns	12,61 \pm 0,66 *

Nota: Los símbolos después de los valores dentro de una columna indican diferencias estadísticas al comparar las medias de los aislados antárticos y los de referencia (primera columna versus AVNH2; segunda columna versus AVNH2.4.8): ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ (ANOVA de una vía seguido por el post-test de Dunnett). El número a la izquierda del símbolo \pm representa la desviación estándar.

Si bien la tasa máxima de crecimiento no presentó diferencias significativas respecto a las cepas referenciales, varios aislados presentaron tiempos de latencia mayor y absorbancias máximas menores que los aislados de referencia. Sin embargo, los aislados ANCH04 y ANCH13 no presentaron diferencias en los tres parámetros de crecimiento medidos respecto de los aislados de referencia.

3.1.2 Análisis de la producción de biomasa en aislados antárticos de *X. dendrorhous*.

Con el objetivo de analizar la producción de biomasa de las cepas, se tomaron muestras luego de 48, 72 y 120 h de cultivo en triplicado, y la biomasa se expresó en g de la levadura seca en 1 ml de cultivo (Figura 9). Para evaluar si las diferencias encontradas entre los aislados antárticos y las muestras de referencia son significativas, se realizó un análisis de ANOVA con $p < 0,05$. Los resultados estadísticos muestran que si bien varios aislados presentan una biomasa menor que los aislados de referencia, los aislados ANCH2, ANCH4 y ANCH13 no presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto a los aislados de referencia en todos los tiempos analizados.

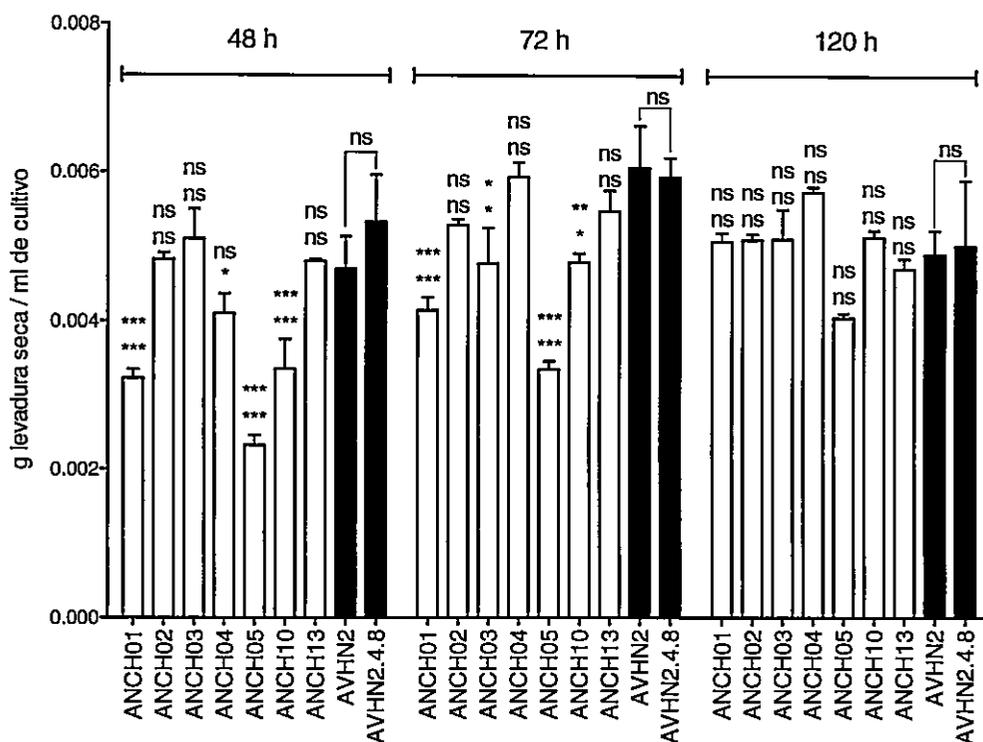


Figura 9. Producción de biomasa en aislados antárticas de *X. dendrorhous*. Los análisis se realizaron luego de 48, 72 y 120 h de cultivo. Los resultados de aislados antárticos se muestran en barras de color blanco, mientras que los de referencia en negro. Se muestran los valores promedio de los triplicados, las barras de error indican la desviación estándar. Los símbolos arriba de las barras indican diferencias estadísticas al comparar las medias de los aislados antárticos y los de referencia (arriba versus AVNH2; abajo versus AVNH2.4.8): ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ (ANOVA de dos vías seguido por el post-test de Bonferroni).

3.1.3 Cuantificación de la producción de carotenoides totales en aislados antárticos de *X. dendrorhous*

Para determinar si existe un candidato con una producción significativamente mayor de carotenoides respecto a los aislados de referencia, se extrajeron pigmentos de todos los aislados estudiados luego de 48, 72 y 120 h de cultivo, los cuales se cuantificaron espectrofotométricamente. Se observó que los aislados ANCH4 y ANCH13 fueron los únicos que presentaron una producción de carotenoides relativizados a la biomasa total alcanzada estadísticamente mayor a la del aislado de

referencia AVHN2 y similar al aislado de referencia AVHN2.4.8 luego de 72 y 120 h de cultivo (Figura 10).

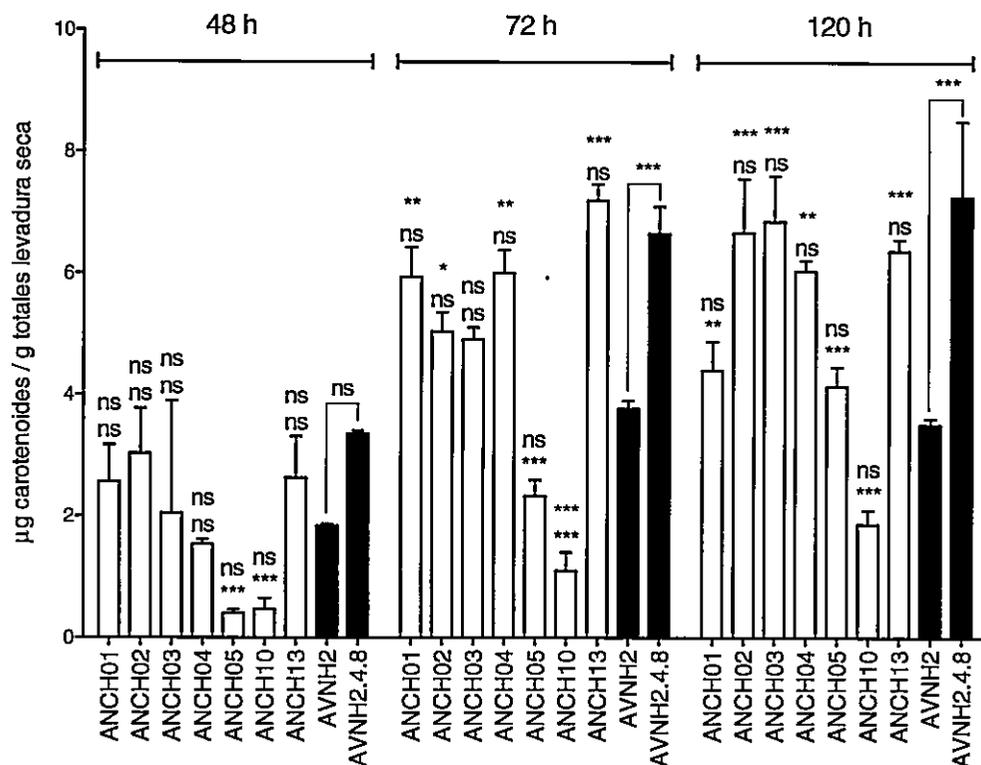


Figura 10. Producción de carotenoides en cepas antárticas de *X. dendrorhous* relativo al peso seco total de levadura. Los análisis se realizaron luego de 48, 72 y 120 h de cultivo. Los resultados de aislados antárticos se muestran en barras de color blanco, mientras que los de referencia en negro. Se muestran los valores promedio de los triplicados, las barras de error indican la desviación estándar. Los símbolos arriba de las barras indican diferencias estadísticas al comparar las medias de los aislados antárticos y los de referencia (arriba versus AVNH2; abajo versus AVNH2.4.8): ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ (ANOVA de dos vías seguido por el post-test de Bonferroni).

4.1.4 Cuantificación de la producción de ergosterol en aislados antárticos de *X. dendrorhous*

Para determinar la producción de ergosterol de los candidatos, se extrajeron muestras luego de 48, 72 y 120 h de cultivo, las cuales fueron medidas espectrofotométricamente (DO₂₈₀). Los datos muestran que ninguno de los aislados

presentó una producción de ergosterol mayor que los aislados de referencia (Figura 11).

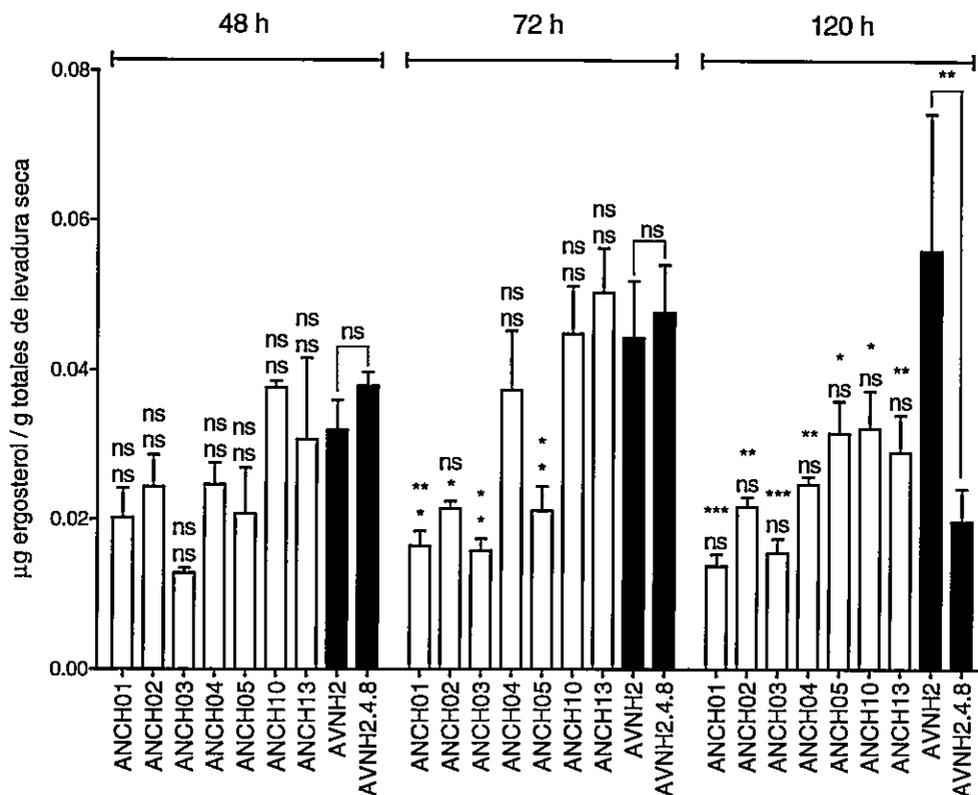


Figura 11. Producción de ergosterol en cepas antárticas de *X. dendrorhous* relativo al peso seco total de levadura. Los análisis se realizaron luego de 48, 72 y 120 h de cultivo. Los resultados de aislados antárticos se muestran en barras de color blanco, mientras que los de referencia en negro. Se muestran los valores promedio de los triplicados, las barras de error indican la desviación estándar. Los símbolos arriba de las barras indican diferencias estadísticas al comparar las medias de los aislados antárticos y los de referencia (arriba versus AVNH2; abajo versus AVNH2.4.8): ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ (ANOVA de dos vías seguido por el post-test de Bonferroni).

De acuerdo a los resultados obtenidos, los análisis de los aislados antárticos muestran que el rendimiento en la producción de carotenoides por biomasa total de los aislados ANCH04 y ANCH13, son los más altos de entre los aislados antárticos, e incluso superan el rendimiento del aislado de referencia AVNH2.



3.2 Ensayos de mutagénesis por métodos químicos (N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina, NTG) y físicos (rayos gamma) de los aislados antárticos de *X. dendrorhous* seleccionados

3.2.1 Determinación de dosis óptimas para mutagénesis en *X. dendrorhous*

Para determinar la dosis óptima de mutágenos químicos y físicos con base en la relación de la concentración del agente mutagénico se determinó la sobrevivencia de la levadura se estimó un nivel de sobrevivencia del 10% de las células tratadas y así facilitar el manejo experimental. Para estos fines la sobrevivencia celular se evaluó mediante el método de las “microgotas”, que nos permite estandarizar la cantidad de células sobrevivientes en un volumen determinado de cultivo en comparación con su cepa parental no tratada con mutágeno.

El método se basa en sembrar 10 μ l de diluciones seriadas de cultivos de la levadura en placas con medio de cultivo YM que fueron tratados o no previamente con mutágenos. Lo anterior se realizó en triplicados para posteriormente observar el desarrollo de colonias y contar el número de ellas que se forma en cada gota y así determinar el título para evaluar el efecto en la sobrevivencia del respectivo mutágeno. Además de determinar la sobrevivencia celular, se estudió el efecto de un estabilizador osmótico STM (270 mM Sacarosa, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl₂) con fines de amortiguar los posibles efectos en la sobrevivencia celular del tiempo de transporte y de exposición de la suspensión celular con rayos gamma (factores externos a la mutagénesis) que requiere este tratamiento.

Los datos de la Figura 12 muestran que el efecto de suspender las células en STM en la sobrevivencia celular es notoria (curvas azules) al mostrar curvas con una menor tendencia a decaer que las células suspendidas en agua (curvas verdes); sin

embargo, la sobrevivencia celular en células suspendidas en agua es lo suficientemente efectiva para poder trabajar con ellas, por lo que los ensayos posteriores se realizaron en suspensiones de agua destilada.

Con estos ensayos se determinó que la concentración más adecuada para realizar los ensayos de mutagénesis con NTG corresponde a los 15 $\mu\text{g/ml}$, mientras que la dosis de radiación gamma apropiada es de a 5 kGy; ambas dosis permiten manejar una cantidad adecuada de células viables, y al mismo tiempo evaluar el posible efecto mutagénico al analizar las colonias viables resultantes de los ensayos.

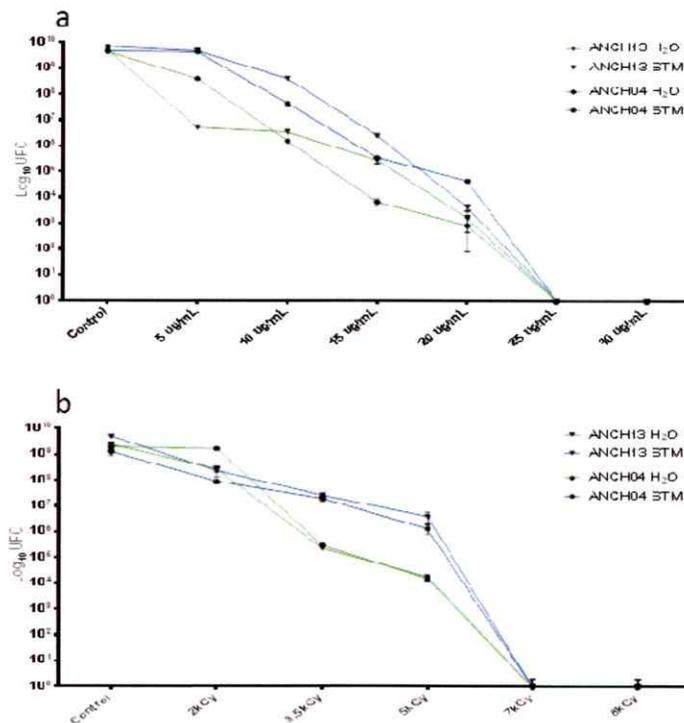


Figura 12. Curvas de sobrevivencia celular con mutágenos. a) Sobrevivencia celular en ensayos con NTG. b) Sobrevivencia celular en ensayos con irradiación gamma. Las curvas verdes representan los ensayos con las células suspendidas en agua; y las azules, en STM. Los puntos en forma de triángulo invertido representan los resultados del aislado ANCH13, los círculos los del aislado ANCH04.

3.2.2 Selección de cepas mutantes de *X. dendrorhous*

Con la finalidad de seleccionar cepas mutantes carotenogénicas de *X. dendrorhous*, se realizaron 4 rondas de *screening* visual buscando a aquellas colonias que presentaron una pigmentación rojiza más intensa lo que estaría asociado a una mayor producción de astaxantina. Sin embargo, también se seleccionaron colonias con diferentes matices de colores blanco, amarillo, naranja y rojo con la finalidad de confirmar que los mutágenos utilizados son efectivos para obtener mutantes carotenogénicos (Figuras 13 y 14). Cabe mencionar, que luego de ensayos de mutagénesis con ambos agentes, los aislados obtenidos por ensayos con NTG presentaban, al cabo de algunas generaciones, cambios en su coloración, volviéndose en su mayoría de color amarillo pálido, por lo que dada su inestabilidad, se seleccionaron exclusivamente aislados de ensayos por radiación gamma.

Interesantemente, las cepas que mostraron mayor estabilidad fueron aquellas obtenidas por mutagénesis con rayos gamma. De esta manera se seleccionaron 25 aislados para posteriores análisis, los cuales son: ANCH04.01, ANCH04.02, ANCH04.04, ANCH04.05, ANCH04.06, ANCH04.07, ANCH04.15, ANCH04.20, ANCH04.22, ANCH04.23, ANCH13.01, ANCH13.02, ANCH13.03, ANCH13.04, ANCH13.05, ANCH13.06, ANCH13.07, ANCH13.14, ANCH13.17, ANCH13.22, ANCH13.23, ANCH13.24, ANCH13.25, ANCH13.26 y ANCH13.28. Estas cepas fueron analizadas en cuanto a su producción de biomasa, de carotenoides totales y de ergosterol con el propósito de dilucidar si entre ellos existe un mutante que cumpla con los requerimientos asociados a una sobreproducción de carotenoides y astaxantina principalmente.

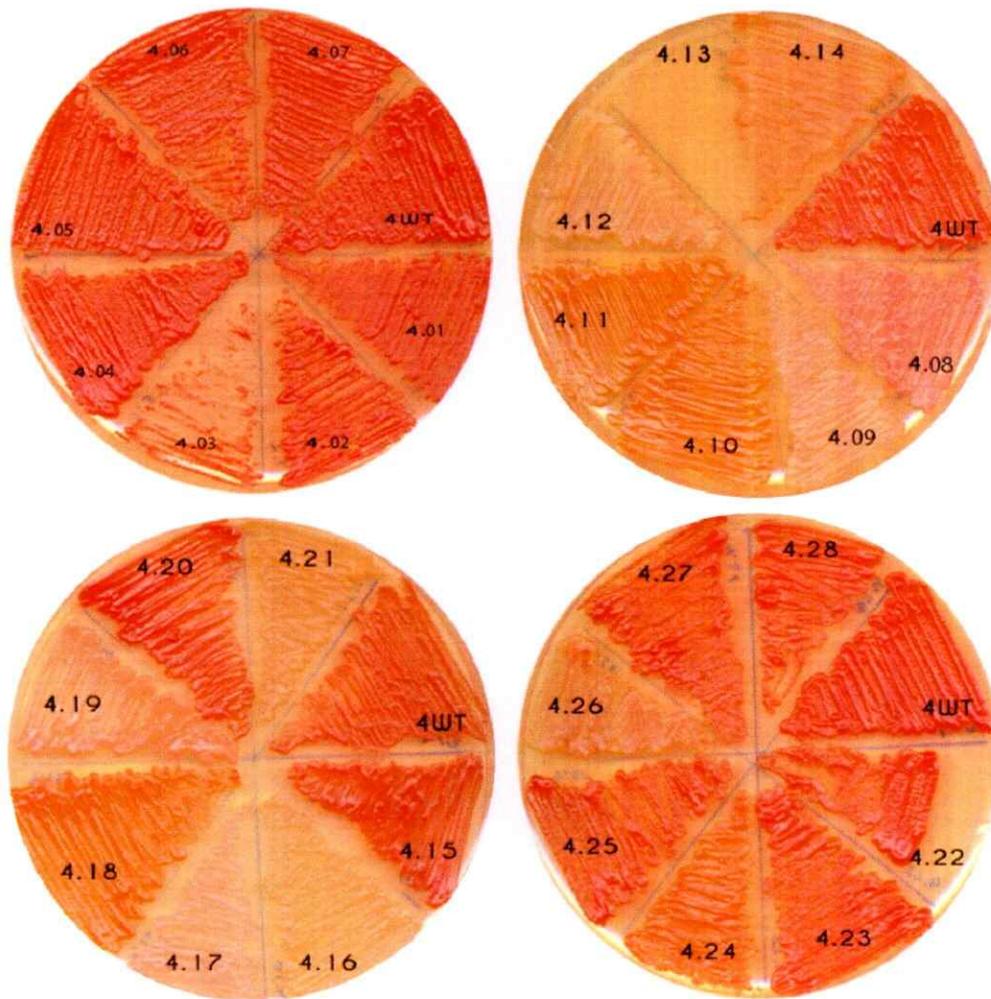


Figura 13. Colonias aisladas de *X. dendrorhous* provenientes de mutagénesis con rayos gamma (aislado parental: ANCH04). Se muestra colonias aisladas luego de la irradiación de ANCH04 con 5 kGy de rayos gamma que presentan distinta coloración indicando alteraciones en la ruta carotenogénica. Se indica el nombre de cada aislado donde el número de la izquierda del punto representa el nombre del parental del cual se obtuvo (ANCH04) y luego del punto se indica el número de orden de aislamiento. ANCH04.03 y ANCH04.13 presentan problemas de crecimiento en cultivo de medio completo sólido.

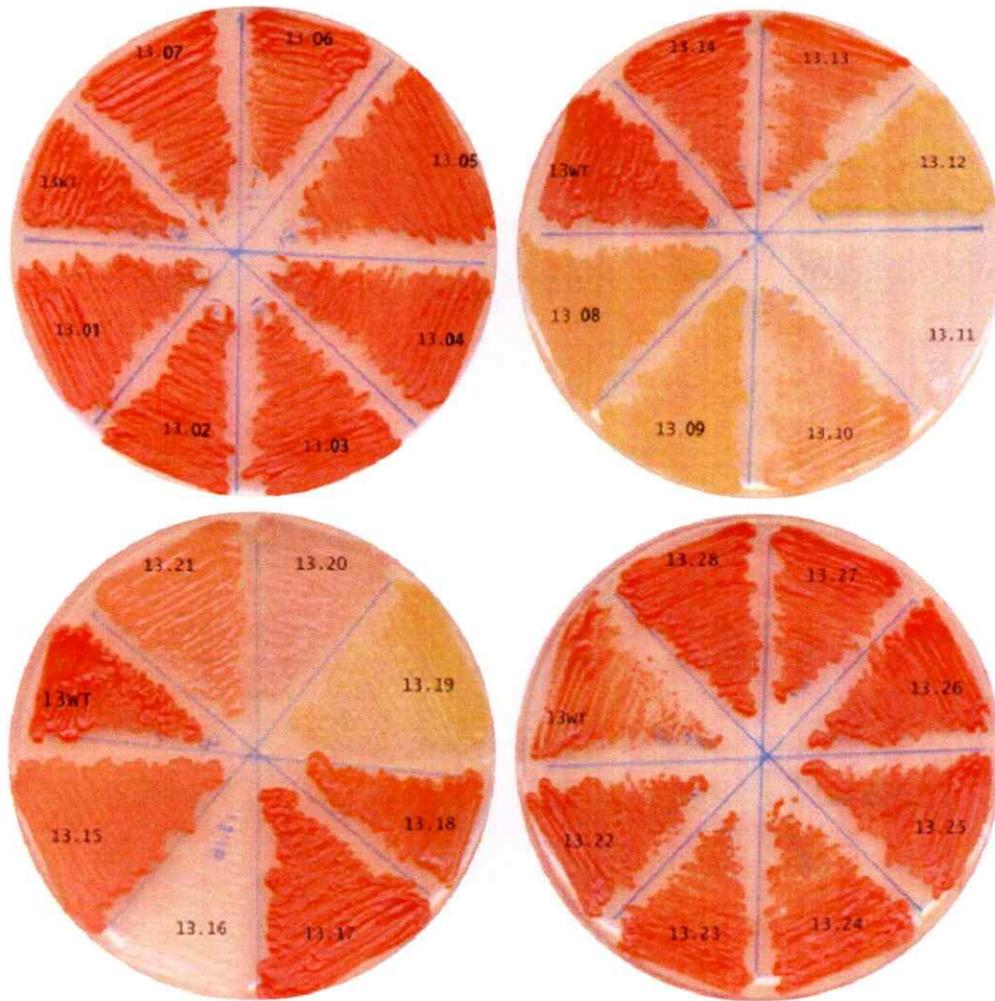


Figura 14. Colonias aisladas de *X. dendrorhous* provenientes de mutagénesis con rayos gamma (aislado parental: ANCH13). Se muestran colonias aisladas luego de la irradiación de ANCH13 con 5 kGy de rayos gamma que presentan distinta coloración indicando alteraciones en la ruta carotenogénica. Se indica el nombre de cada aislado donde el número de la izquierda del punto representa el nombre del parental del cual se obtuvo (ANCH13) y luego del punto se indica el número de orden de aislamiento. El aislado ANCH13.16, presentó problemas de crecimiento en cultivo de medio completo sólido.

3.3 Evaluación de los mutantes de *X. dendrorhous* seleccionados

Luego de la selección de las cepas obtenidas desde los ensayos de mutagénesis al azar, se realizó un análisis para evaluar la producción de biomasa y carotenoides, y de acuerdo a los resultados, seleccionar a uno o más candidatos para estudios posteriores de crecimiento celular y estudios de composición de carotenoides mediante RP-HPLC. De la misma forma que en análisis anteriores, también se utilizó el análisis ANOVA para identificar candidatos con diferencias estadísticamente significativas que sean sobresalientes entre sus pares. Para este objetivo se realizaron cultivos de los aislados seleccionados en matraces con bafle de 500 ml con 250 ml de medio completo YM y bajo agitación constante a 22°C. Como control, se incluyó la respectiva cepa parental (ANCH04 o ANCH13) de la cual derivan los mutantes. Las tomas de muestra se realizaron luego de 120 h de cultivo.

3.3.1 Evaluación de la producción de biomasa en aislados mutantes de *X. dendrorhous*

La Figura 15 muestra el análisis de la producción de biomasa en los mutantes seleccionados que derivan de los parentales ANCH04 y ANCH13. Respecto a ANCH04, se puede observar que no existe un mutante con una mayor producción de biomasa respecto a la parental. En cuanto a los mutantes derivados de ANCH13, el mutante ANCH13.23 alcanzó una mayor biomasa en comparación con el aislado parental ANCH13.



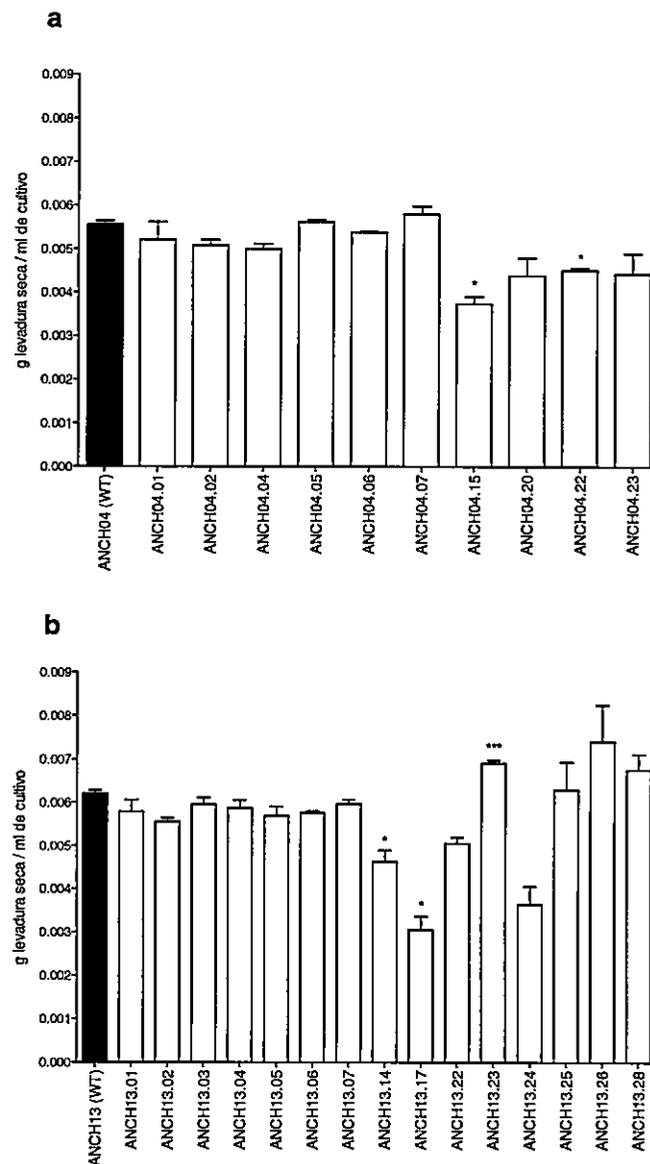


Figura 15. Producción de biomasa de aislados obtenidos por mutagénesis después de 120 h de cultivo.a) Aislados provenientes de la mutagénesis de ANCH04. b)Aislados provenientes de la mutagénesis de ANCH13. Los resultados del aislado parental se muestran en barras de color negro, mientras que los de los aislados sometidos a mutagénesis en negro. Se muestran los valores promedio de los triplicados, las barras de error indican la desviación estándar. Los símbolos arriba de las barras indican diferencias estadísticas al comparar las medias de los aislados mutagenizados y los parentales: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ (ANOVA de una vía RM seguido por el post-test de Dunnett).

3.3.2 Evaluación de la producción de carotenoides en aislados mutantes de cepas antárticas de *X. dendrorhous*

Para evaluar la producción de carotenoides, se cultivaron las cepas candidatas en medio completo YM bajo agitación constante para comparar el rendimiento producción de carotenoides luego de 120 h de cultivo. Si bien no se encontró una cepa mutante con una producción estadísticamente mayor que derive de ANCH04, si se encontró un mutante que deriva de ANCH13 (ANCH13.14) (Figura 16). Este mutante produce $1,878 \pm 127$ ppm de carotenoides, mientras que su parental cultivado paralelamente bajo las mismas condiciones, alcanzó los $1,394 \pm 90$ ppm. A pesar de que presentó una menor producción de biomasa, la mayor producción de carotenoides realizada por la cepa ANCH13.14 (Figura 17) precisó un análisis en mayor detalle en cuanto a la producción de biomasa, curva de crecimiento, producción de carotenoides y de ergosterol.

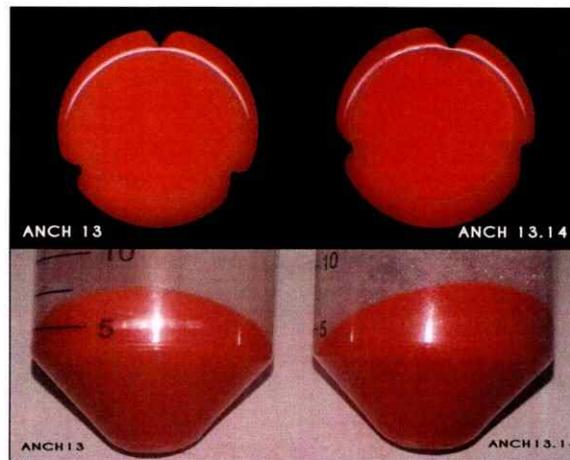


Figura 16. Fenotipos de coloración de la mutante de *X. dendrorhous*. Panel superior: vista de contraste proveniente de pellet celular en matraces con baffle. Panel inferior: vista lateral de tubos Falcon con pellet celular a 120 h de cultivo. Es notoria la diferencia de pigmentación, siendo la cepa ANCH13.14 de tonalidad rojiza intensa en comparación a su parental ANCH13.

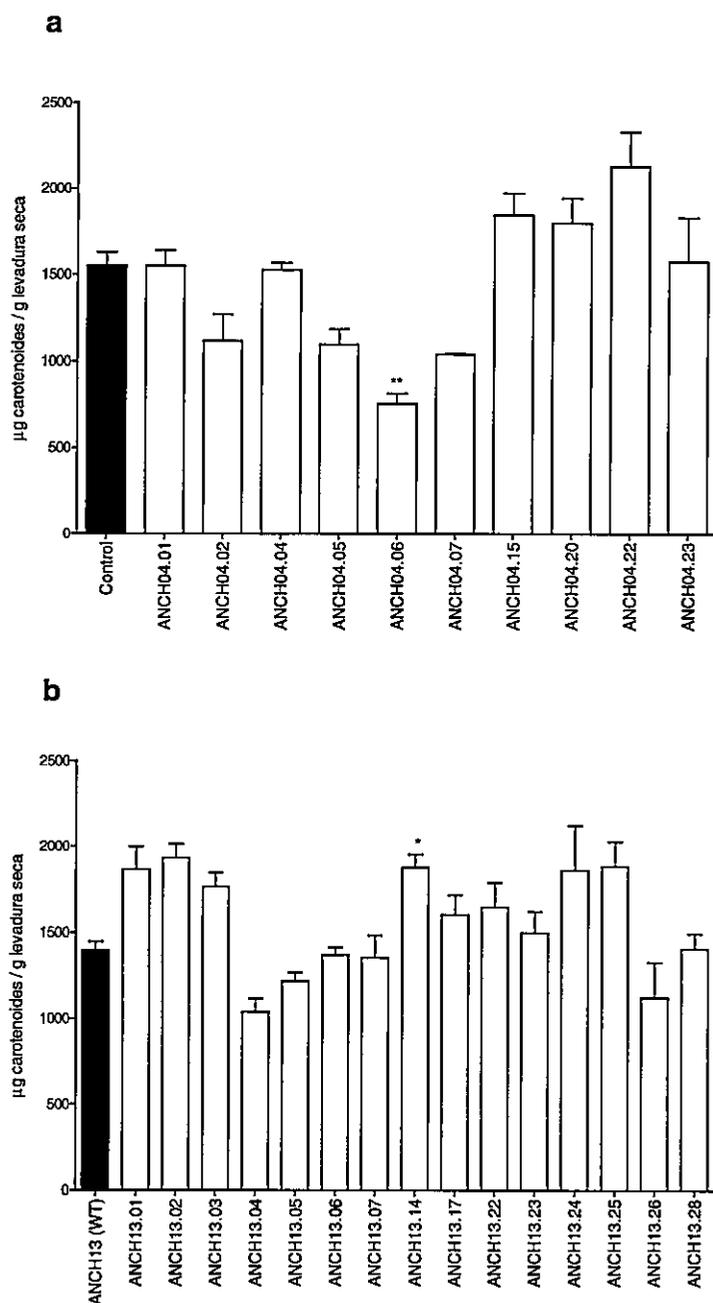


Figura 17. Producción de carotenoides cepas candidatas por mutagénesis a 120 h de cultivo. Producción de biomasa de aislados obtenidos por mutagénesis después de 120 h de cultivo. a) Aislados provenientes de la mutagénesis de ANCH04. b) Aislados provenientes de la mutagénesis de ANCH13. Los resultados del aislado parental se muestran en barras de color negro, mientras que los de los aislados sometidos a mutagénesis en negro. Se muestran los valores promedio de los triplicados, las barras de error indican la desviación estándar. Los símbolos arriba de las barras indican diferencias estadísticas al comparar las medias de los aislados mutagenizados y los parentales: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ (ANOVA de una vía RM seguido por el post-test de Dunnett).

3.3.3 Determinación de curvas de crecimiento celular de la mutante ANCH13.14 de *X. dendrorhous*

En primer lugar las cinéticas de crecimiento tanto de la cepa parental ANCH13, como de la mutante ANCH13.14 fueron realizadas a partir de cultivos en medio completo YM bajo agitación constante a 22°C tomando muestras cada 24 h durante 120 h de cultivo.

Las curvas muestran que la cepa parental alcanzó una estadísticamente significativa mayor DO_{600} de $15,2 \pm 0,7$ que el mutante ANCH13.14 que alcanza los $13,2 \pm 0,4$. Similarmente, la pendiente de la curva en la fase exponencial de crecimiento de la cepa parental presenta una mayor inclinación que la candidata ANCH13.14 con valores de $0,61 \pm 0,15$ y $0,36 \pm 0,05$ respectivamente; sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa (Figura 19 y Tabla 3). Las fases de latencia fueron estadísticamente similares, pero mayor para la cepa ANCH13.14 con $29,1 \pm 2,2$ h, mientras que en la cepa parental fue de $26,5 \pm 0,8$ h.

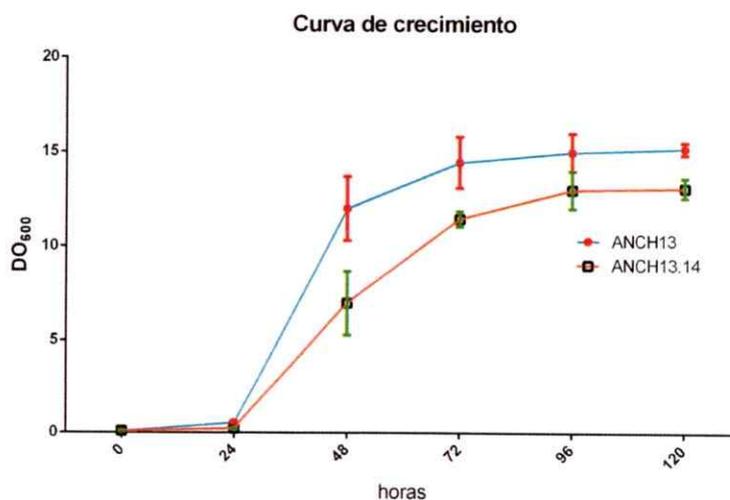


Figura 18. Curva de crecimiento de las cepas ANCH13.14 y su parental ANCH13. Cada curva se construyó con el valor promedio de tres cultivos independientes y las barras representan la desviación estándar. Las curvas se representan en color azul (ANCH13) y naranja (ANCH13.14).

Tabla 3. Comparación indicadores de crecimiento microbiano en *X. dendrorhous*.

Cepa	Parámetros de la curva de crecimiento							
	A		μ m		λ			
ANCH13.14	13,21	\pm 0,37 (a)	0,37	\pm 0,06 (a)	29,07	\pm 2,23 (a)		
ANCH13	15,23	\pm 0,73 (b)	0,61	\pm 0,15 (a)	26,50	\pm 0,83 (a)		

Nota: Letras diferentes en los valores dentro de una columna indican diferencias estadísticamente significativas, los promedios seguidos de la misma letra no difieren significativamente (ANOVA de una vía seguida por el post-test de Tukey). El número a la derecha del símbolo \pm representa su desviación estándar.

3.3.4 Evaluación de la producción de biomasa en la mutante ANCH13.14 de *X. dendrorhous*

Con el propósito de analizar la producción de biomasa, se analizaron tanto las cepas ANCH13.14 como su parental (ANCH13), tomando muestras en triplicado de 1ml de cultivo en crecimiento en medio completo YM con agitación constante en intervalos de 24 h por 5 días. Los datos muestran que luego de 120 h de cultivo, la cepa ANCH13.14 tiene una producción de biomasa no significativamente mayor a su parental en términos estadísticos que alcanza los $0,005 \pm 0,001$ g de levadura por ml de cultivo, mientras que su parental produce $0,004 \pm 0,001$ g/ml.

Además, la Figura 20 muestra una producción máxima y estadísticamente mayor de biomasa por parte de la cepa parental ANCH13 que alcanza los $0,006 \pm 0,001$ g de levadura por ml de cultivo a las 72 h, mientras que la cepa mutante ANCH13.14 alcanza los $0,003 \pm 0,001$ g/ml.

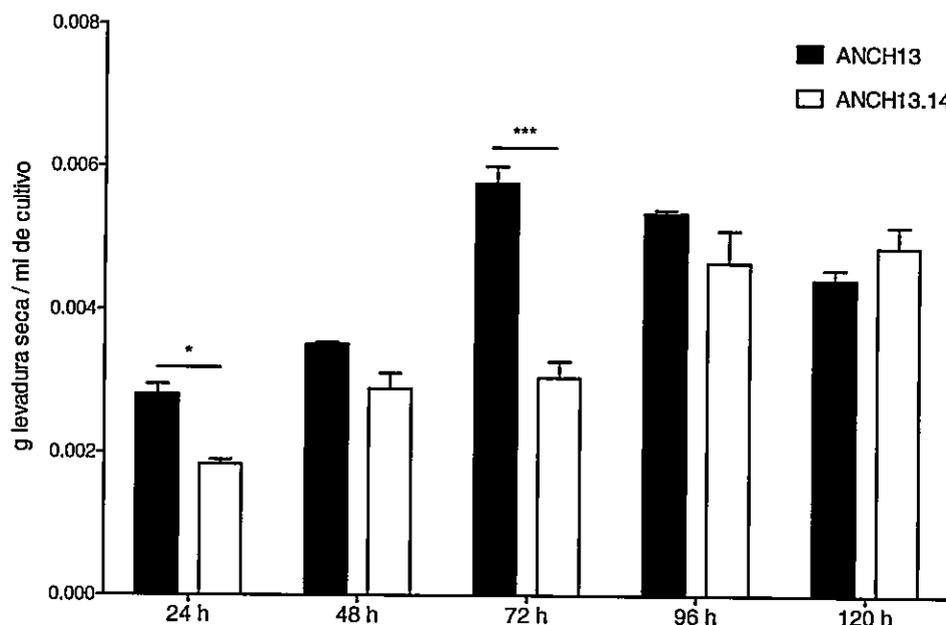


Figura 19. Producción de biomasa del aislado mutante ANCH13.14 y su parental ANCH13. Se muestran los valores promedio de los triplicados, las barras de error indican la desviación estándar. Los símbolos arriba de las barras indican diferencias estadísticas al comparar las medias: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ (ANOVA de dos vías seguido por el post-test de Bonferroni).

3.3.5 Evaluación de la producción de carotenoides en la mutante ANCH13.14 de *X. dendrorhous*

Para analizar y comparar la producción de carotenoides de ANCH13.14 y ANCH13, se tomaron muestras por triplicado de 15 ml de cultivo en medio YM bajo agitación constante a 22°C cada 24 h durante 5 días, los cuales fueron cuantificados y su composición analizada por RP-HPLC.

Si bien se puede observar un crecimiento sostenido en la producción de carotenoides por parte de ambas cepas (Figura 20), quien presenta una mayor producción de carotenoides es la cepa ANCH13.14, que bajo las condiciones del ensayo alcanzó 2.215 ± 171 ppm versus 1.589 ± 129 ppm que produjo ANCH13 luego de 120 h de cultivo. El análisis estadístico también nos indica que luego de 96 h de cultivo, también existe una diferencia significativamente mayor en la

producción de carotenoides en la cepa ANCH13.14 en comparación a su control: 2.128 ± 407 y 1.081 ± 121 ppm, respectivamente.

En cuanto a la composición de los carotenoides, también se encontró una mayor proporción de astaxantina en ANCH13.14 (Figura 21) especialmente luego de las 96 y 120 h de cultivo, alcanzando los 1.196 y 1.415 ppm respectivamente (en comparación a los 767 y 1.159 ppm de la cepa parental ANCH13). Por otra parte, es posible observar que la distribución de los intermediarios metabólicos de la ruta de los carotenoides es más diversa en la cepa mutante que en la cepa parental (Anexos 1 y 2).

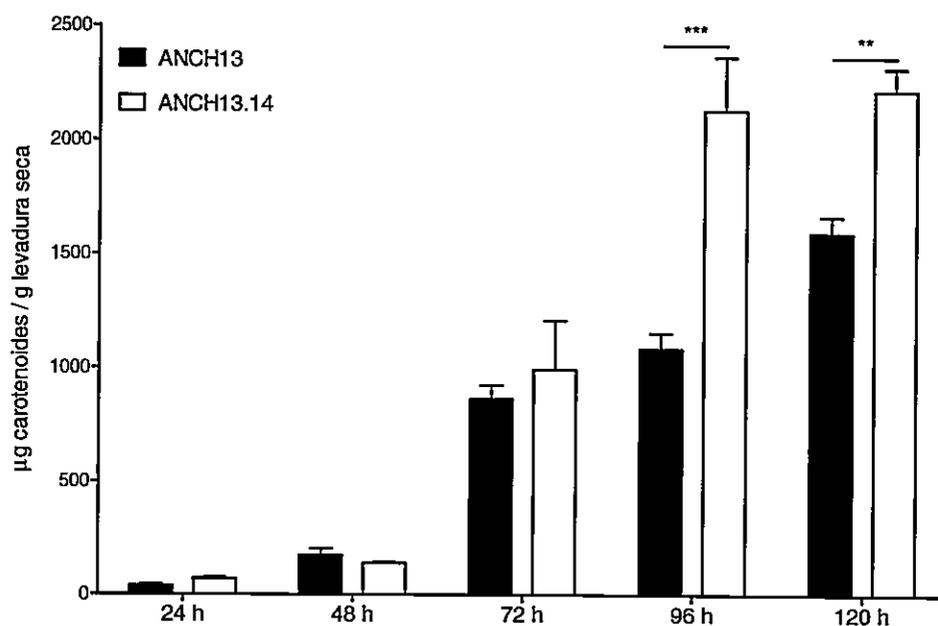


Figura 20. Producción de carotenoides del aislado mutante ANCH13.14 y su parental ANCH13. Se muestran los valores promedio de los triplicados, las barras de error indican la desviación estándar. Los símbolos arriba de las barras indican diferencias estadísticas al comparar las medias: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ (ANOVA de dos vías seguido por el post-test de Bonferroni).

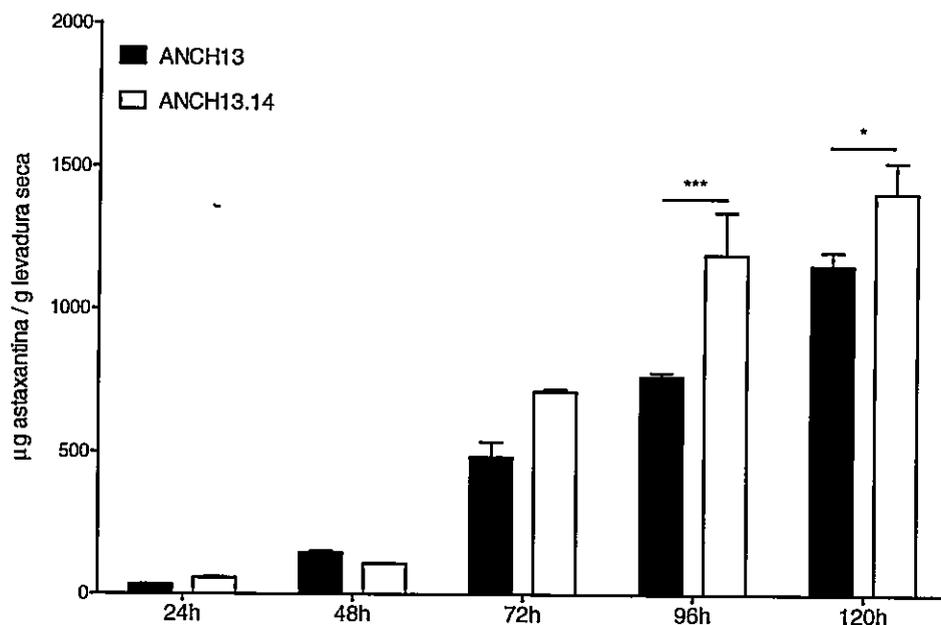


Figura 21. Producción de astaxantina del aislado mutante ANCH13.14 y su parental ANCH13. Se muestran los valores promedio de los triplicados, las barras de error indican la desviación estándar. Los símbolos arriba de las barras indican diferencias estadísticas al comparar las medias: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ (ANOVA de dos vías seguido por el post-test de Bonferroni).

3.3.6 Evaluación de la producción de ergosterol en la mutante ANCH13.14 de *X. dendrorhous*

Finalmente, con el fin de evaluar la producción de ergosterol en la mutante ANCH13.14, se tomaron muestras por triplicado de 5 ml cada 24 h durante 5 días de cultivo, los cuales fueron cuantificados y analizados por RP-HPLC.

Como se observa en la Figura 23, los niveles máximos de producción de ergosterol en ambas cepas, parental y mutante, son mayores al inicio del cultivo mostrando un decrecimiento a lo largo del periodo de análisis en ambas cepas. A las 24 h de cultivo, la cepa mutante ANCH13.14 alcanza los $16,5 \pm 2,2$ mg de ergosterol/g levadura seca, siendo significativamente mayor a la cepa parental que alcanzó los 9,7 mg de ergosterol/g levadura seca.

Similares resultados se observan luego de 48 h de cultivo, donde la cepa ANCH13.14 alcanza $13,13 \pm 1,54$ mg de ergosterol / g levadura seca en comparación a su parental que bordea una producción de $8,23 \pm 0,98$ mg de ergosterol/g levadura seca. Los niveles decaen luego de 120 h de cultivo con una producción sin diferencias estadísticamente significativas entre ambas cepas.

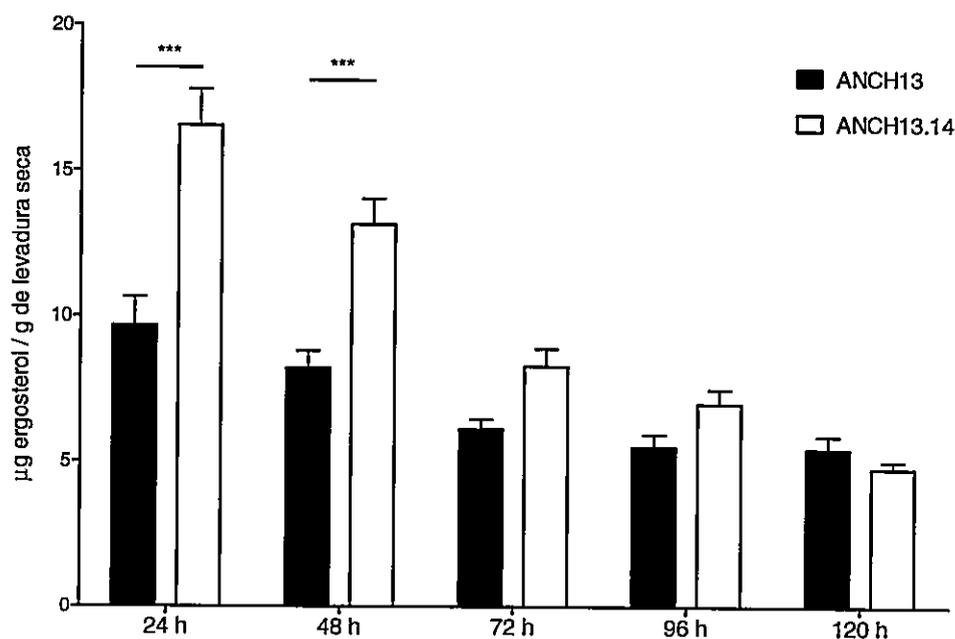


Figura 22. Producción de ergosterol del aislado mutante ANCH13.14 y su parental ANCH13. Se muestran los valores promedio de los triplicados, las barras de error indican la desviación estándar. Los símbolos arriba de las barras indican diferencias estadísticas al comparar las medias: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ (ANOVA de dos vías seguido por el post-test de Bonferroni).

5. DISCUSIÓN

4.1 Métodos alternativos a la selección visual para la elección de mutantes sobreproductoras de astaxantina en *X. dendrorhous*.

La selección de aislados provenientes de ensayos de mutagénesis al azar, debían cumplir con las características de obtener colonias con una coloración rojamás intensa que las parentales o bien, sin ser fundamental, seleccionar colonias de color distinto al rojo para asegurarnos el efecto mutagénicode los agentes NTG y radiación gamma.

Nuestra selección, basado en “*screening* visual”, nos resultó útil en la selección de los candidatos, ya que en posteriores análisis, la cepa ANCH13.14 seleccionada por este método, mostró producir un 22% más de astaxantinaque su parental ANCH13. No obstante, este método resulta exhaustivo para quien realiza la selección, ya que la visión prolongada de un solo color puede terminar sesgando la selección de las tonalidades, habituándosea la coloración y disminuyendo la distinción de los tonos existentes en las colonias rojas. Es por ello que para facilitar las rondas de selección de colonias rojas (asociadas a una mayor producción de astaxantina), sea han desarrollado algunas estrategias que pueden ayudar a la obtención de nuestras cepas, que ya han sido documentadas.

Uno de estos métodos se asociaa agentes inhibidores de la cadena respiratoria como la Antimicina A y el Cianuro (An y col., 1989). El uso de estos agentes inhibidores induce en las células una disminución en la actividad de enzimas pertenecientes a la superfamilia de proteínas citocromo P450, por lo tanto, podrían reducir la actividad de enzimas como la astaxantinasintasa mostrándose colonias amarillas o más pálidas. De esta manera, se facilita la discriminación por color de las

cepas mutantes que tendrían una pigmentación más intensa. El método de fotosensibilización propuesto por An y col. (1997), se basa en un método de selección basado en las características fotoprotectoras de los carotenoides, de forma que la astaxantina juega un rol clave en la selección de mutantes sobreproductoras. Any col. (1997) seleccionó mutantes de *X. dendrorhous* que, como la variante silvestre, presentan baja actividad de la enzima súper óxido dismutasa (SOD) capaz de transformar radicales oxigenados en agua oxigenada y oxígeno en comparación con las cepas parentales. El propósito de este protocolo fue inhibir la actividad de la enzima SOD en cepas mutantes con un agente generador de estrés oxidativo a nivel celular (Toluidina azul O) en exposición a luz para observar la desintegración progresiva de la astaxantina, siendo en menor porcentaje en aquellas cepas sobreproductoras dada la actividad fotoprotectora de este pigmento. Otro de los métodos documentados en la selección de mutantes hiperproductoras de carotenoides es la citometría de flujo, presentado por Strecher y Johnson (2012). Esta técnica permite el recuento y análisis individual de células suspendidas en un fluido, atravesando un fino capilar sobre el que incide un delgado rayo de luz láser; así, la luz transmitida y dispersada por el paso de las células a través del tubo se recoge por dispositivos de detección, permitiendo hacer inferencias en cuanto a tamaño, absorbancia y otras características celulares. Utilizar un filtro capilar que permita realizar estas separaciones, permiten la elección de una longitud de onda como discriminante celular acorde a la absorbancia de los carotenoides o podemos precisar la selección de forma individual en cada célula del cultivo al conocer su DO.

La selección de mutantes por difenilamina (DPA), es un método basado en el bloqueo de la ruta carotenogénica a la altura de la fitoenodesaturasa, por lo tanto las

colonias en presencia de este químico serán blancas ya que acumulan fitoeno. Sin embargo, aquellas mutantes resistentes a DPA tendrán distintos matices anaranjados y rojizos (Chumpolkulwong y col.,1997), las que en condiciones ideales producen hasta dos veces la cantidad de astaxantina que sus cepas parentales.Finalmente, el uso de análogos metabólicos como la β -ionona (Lewis y col., 1990) que es análoga del β -caroteno, compiten por la oxigenación de sus anillos terminales, lo que en altas concentraciones produce el bloqueo en la producción de astaxantina, acumulándose β -caroteno y generando colonias amarillas por una competencia de ambos metabolitos (β -ionona y β -caroteno) por el sitio activo de la astaxantinasintasa. Resultados publicados por Lewis y col. (1990), mostraron mutantes seleccionados con una producción de hasta 5 veces más de astaxantina, en comparación con su parental al utilizar este método de *screening*.

Aun considerando que existen métodos que favorecen la selección de potenciales mutantes sobreproductoresde carotenoides como los presentados anteriormente, no menospreciamos el método utilizado en nuestros ensayos, ya que cumplió con el objetivo de identificar una cepa más rojiza que produce más astaxantina, lo que fue confirmado cuantitativamente.

4.2 Importanciade analizar el organismo previo a los ensayos demutagénesis al azar.

Considerando los agentes mutagénicos utilizados para los ensayos de mutagénesis al azar (NTG y radiación gamma), cabe mencionar que los mejores resultados, basados en un evidente efecto en la diversidad de coloración de las colonias aisladas, así como una tasa de revertancia baja, fueron aquellos aislados, que



proviene de ensayos bajo radiación ionizante gamma, de donde provienen la totalidad de cepas candidatas seleccionadas.

En estudios previos, An y col. (1989), evaluaron la eficacia de antimicina A, el EMS (metanosulfonato de etilo), luz ultravioleta, y NTG para la generación de mutantes carotenogénicas, donde NTG demostró ser el mejor mutágeno entre ellos, ya que generó una variación considerable en la pigmentación entre las colonias seleccionadas. Por estos motivos en este trabajo se utilizó NTG, ya que para un tipo de levadura potencialmente tan resistente a los factores mutagénicos, dadas las condiciones ambientales donde se desarrolla, es pertinente la utilización de un mutágeno eficiente y que tenga una baja tasa de revertantes.

Nuestros resultados revelan, de forma contraria, una nula aparición de matices rojizas al haber sido tratadas con NTG, lo que se podría explicar por una alta capacidad de la levadura para reparar su material genético frente a agentes alquilantes de citosinas mediante metil-transferasas o mecanismos de reparación por escisión de nucleótidos (NER) (Pierce y col., 2009), que por las características hostiles de la Antártica, los aislados antárticos de *X. dendrorhous* adaptaron para desarrollar sistemas de reparación más eficientes que las cepas continentales.

Los aislados obtenidos por mutagénesis al azar provienen únicamente de ensayos por radiación gamma, asegurando el objetivo de obtener aislados sobreproductores. En *X. dendrorhous*, la radiación gamma sólo ha sido utilizada y documentada en los últimos 12 años como una alternativa viable para una mejora en la eficiencia mutagénica con fines de desregulación de ciertas vías como la carotenogénica, obteniéndose resultados alentadores con mutantes que producen cerca de un 50% más de astaxantina que su cepa parental (Sun y col., 2004), e

incluso 8 veces más (Najafi y col., 2011). El mecanismo por el cual la radiación realiza su efecto mutagénico es diferente; la radiación ionizante de onda corta permite el quiebre de la hebra de DNA por ambas cadenas, lo que es reparado por métodos de recombinación tanto homóloga como no homóloga (Pierce y col., 2009). En los métodos de reparación por recombinación no homóloga es mutagénica, ya que ocurre la pérdida de sectores de material genético que pueden generar corrimiento en el marco de lectura sobre genes que participan en funciones metabólicas secundarias, y en nuestro caso, sobre la pigmentación y función antioxidante de la levadura, lo que nos ayudó en la obtención de nuestro sobreproductor.

Estudios previos han analizado numerosos mutágenos que clásicamente se utilizan en diversas especies, como el NTG en *Coprinuszagopus* (Moore.,1968), *Blakesleatrispora* (Wang y col.,2013), *Streptomycescoelicolor*(Delic y col., 1969), *Escherichiacoli*(Adelberg y col.,1965) y *X. dendrorhous*(An y col.,1989; Meyer y col., 1993; Kim y col.,2005; Golkhoo y col., 2007). La radiación UV (Retamales y col., 1998)y EMS en *X. dendrorhous* (Leonard y col., 2013), siendo esta última de bajo potencial mutagénico dada la baja efectividad y alta tasa de revertantes.

Se hace importante, analizar el efecto de otros agentes mutagénicos, como los mencionados anteriormente, para revisar el afecto de cada uno de ellos sobre los aislados antárticos, y en lo posible, buscar nuevos mutágenos donde podamos obtener nuevos sobreproductores.

4.3 Cuantificación de astaxantina de la cepa ANCH13.14 de *X. dendrorhous*.

Los resultados de ANCH13.14 muestran una producción mayor de carotenoides y astaxantina que la cepa parental ANCH13, siendo significativamente mayor a 96 y 120 h de cultivo, cumpliendo el objetivo general de obtener una cepa sobreproductora, alcanzando a 120h los 1.415 ppm versus los 1.159 ppm de su parental, siendo un 22% más su producción de astaxantina.

Se han documentado ampliamente, ensayos donde se busca aumentar la producción del carotenoide astaxantina en *X. dendrorhous*, bajo diferentes métodos de mutagénesis al azar. Una de ellas, es el realizado por An y col. (1989), quien a partir de ensayos de mutagénesis con EMS, obtuvo cepas que producen 600 ppm de astaxantina, mientras con NTG, alcanzan los 900 ppm, en vez de los 400 ppm que se obtienen de la cepa parental usada por ellos, llamada UCD-67-385.

El uso de radiación gamma, ha sido documentado por Sun y col. (2003), quienes a partir de una cepa parental que produce hasta 2.200 ppm de carotenoides, obtuvieron un aislado bajo una dosis 6 kGy que produce 3.300 ppm. Por otra parte, Sun y col. (2004), obtuvieron luego de un tratamiento de 5 kGy de una cepa que produce cerca 196 ppm de astaxantina, una cepa capaz de producir hasta 2.562 ppm. Finalmente, Liu y col. (2008) obtuvieron una cepa que sintetizó un 125% más de astaxantina en comparación con la cepa parental (2.512 vs 1.114 ppm de astaxantina, respectivamente). La determinación de este pigmento, al considerar factores como la biomasa y la curva de crecimiento que presenta la cepa mutante y su parental, hacen interesante continuar analizándolas.

4.4 Regulación en las rutas de síntesis de esteroides y carotenoides en *X. dendrorhous*.

La ruta carotenogénica y de síntesis de esteroides derivan de la ruta del mevalonato y curiosamente en *X. dendrorhous*, Loto y col. (2012) publicaron que mutantes que no producen ergosterol tienen altos niveles de astaxantina, lo que probablemente se explicaría por un mecanismo de regulación por retroalimentación negativa por producto final (ergosterol). En los mutantes que no producen ergosterol, los transcritos del gen *HMGR*, que codifican la HMG CoA reductasa que convierte la 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA en mevalonato, el cual es un punto clave en la regulación de la vía del mevalonato (Calo y col., 1995), se ven incrementados. Probablemente la síntesis de carotenoides y de esteroides podrían estar regulada por la Proteína de Unión al Elemento Regulado por Esteroides (SREBP, por su sigla en inglés), mecanismo estudiado ampliamente en mamíferos y recientemente en las levaduras *Cryptococcus neoformans* y *Schizosaccharomyces pombe* (Bien y Espenshade., 2010). SREBP es un activador transcripcional cuya acción se encuentra reprimida al estar anclado a la membrana del retículo endoplasmático cuando los niveles de esteroides son altos. Así cuando los niveles de esteroides bajan, SREBP se transporta al aparato de Golgi donde sufre cortes proteolíticos que liberan el dominio de unión a DNA y de activación de la transcripción que se transloca al núcleo. Es ahí donde SREBP se une al elemento regulador SRE (Elemento de Respuesta a Esteroides) río arriba de genes blanco, incluyendo a *HMGR*, para favorecer su transcripción y consecuentemente la síntesis de esteroides (Bien y Espenshade., 2010) y de otros metabolitos que derivan de la ruta del mevalonato como los carotenoides. Entonces, en ausencia de ergosterol, SREBP estaría activo favoreciendo la síntesis de

carotenoides. El hecho de que nuestros resultados muestran un incremento en ambos productos: carotenoides y esteroides, lo que también se ha documentado en *Rhodotorulaglutinis* (Marova y cols. 2010), es un punto muy interesante, ya que tanto esteroides y carotenoides son metabolitos atractivos desde un punto de vista biotecnológico. Considerando que las evidencias indican que en *X. dendrorhous* existe una proteína SREBP (se ha encontrado un gen candidato en el genoma de la levadura junto con otros elementos que participan en esta vía de regulación, datos aun no publicados), es posible que en el mutante ANCH13.14, la vía SREBP esté afectada permitiendo que haya sobreproducción de carotenoides y ergosterol.

Tanto en la cepa ANCH13 como en la ANCH13.14, la mayor producción de ergosterol ocurre entre las 24 y 48 h de cultivo, mientras que la astaxantina alcanza sus máximos entre las 96 y 120h; este “desfase” podría explicarse porque las células en su fase estacionaria temprana (24 a 48h), al reproducirse, deben sintetizar numerosos lípidos que componen sus membranas celulares, entre ellas el ergosterol; mientras que en fase exponencial tardía, estacionaria y de muerte (72 a 120h), producto de la actividad celular la cantidad de ROS aumenta, lo que lleva a la célula a usar estrategias preventivas frente a la oxidación del material genético, lo que se traduce en la síntesis de carotenoides y de astaxantina.

4.6 Conocimiento de los costes de producción de la cepa mutante ANCH13.14 de *X. dendrorhous*.

Conforme nuestra cepa cumple con el objetivo principal de nuestra investigación, el paso siguiente sería analizar los costes asociados a los resultados que la acompañan, una larga fase de latencia puede afectar los costos de producción dado el largo periodo que se tomaría a nivel industrial en preparar su metabolismo en la asimilación de las fuentes de carbono y nitrógeno, aumentando los costes de producción, por lo que la mejora de las rutas implicadas en dichos aspectos de la levadura, pueden ayudarnos a reducir costes.

Específicamente, luego de la selección de una cepa sobreproductora deben realizarse ensayos de fermentación para analizar las condiciones óptimas de crecimiento (Domínguez-Bocanegra y col., 2007), dadas las condiciones de oxigenación, pH óptimo, velocidad de agitación, temperatura óptima, presión osmótica, tipo de fuente de carbono, fuentes de nitrógeno asociadas y proporción de elementos traza. Es importante considerar también la posibilidad de posteriores experimentos que se enfoquen en la mejora de la ruta metabólica mediante mutagénesis dirigida previa caracterización molecular de la cepa en cuestión.

Considerando las proyecciones de este trabajo, hasta hace unos 2 años, los intentos por mejorar ensayos enfocados en la obtención de cepas hiperproductoras de carotenoides no eran combinados, siendo conocidos los experimentos de mutagénesis al azar y los de ingeniería genética por separado. Sólo recientemente (y en paralelo al desarrollo de esta tesis) se documentó un trabajo que buscó la mejora en la producción de astaxantina mediante la combinación de estrategias de mutagénesis al azar e ingeniería genética (Gassel y col., 2013). En dicho trabajo se seleccionaron

mutantes sobreproductores de carotenoides obtenidos mediante tratamiento con NTG que luego se transformaron con fragmentos de DNA portadores del gen *crtYB* (Verdoes y col. 2003) y *crtS* (Ojima y col., 2006). Los resultados mostraron la eficiencia de esta estrategia, obteniéndose mutantes que producen hasta 6.000 μg de carotenoides/g masa seca de los cuales el 88% corresponde a astaxantina, mientras que la cepa parental apenas alcanzaba los 119 μg de carotenoides/g masa seca con un 72% de astaxantina. Considerando este último trabajo, el mutante obtenido en esta tesis es un excelente candidato para manipular genéticamente mediante ingeniería genética para favorecer aún más la producción de carotenoides y consecuentemente, de astaxantina.

5. CONCLUSIONES

- Los ensayos de mutagénesis al azar son adecuados para la obtención de cepas sobreproductoras de metabolitos; por ello, análisis previos del organismo así como las características de su entorno ayudan a elegir el mejor mutágeno para experimentos posteriores.
- Las cepas antárticas de *X. dendrorhous* resultaron ser buenas candidatas para la realización de ensayos de mutagénesis al azar para obtener cepas sobreproductoras de carotenoides.
- La cepa ANCH13.14 constituye una cepa apropiada para posteriores análisis de caracterización molecular y programas de mejoramiento genético dado sus altos niveles en la producción de astaxantina y de ergosterol.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, F., & Hiraki, T. (2009). Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1788(3), 743–752.
- Acheampong, E., & Martin, A. (1995). Kinetic studies on the yeast *Phaffiarhodozyma*. *J Basic Microbiol*, 35(3), 147-155.
- Adelberg, E., Mandel, M., & Ching Chen, G. (1965). Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K12. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 18(5-6), 788-795.
- Alcaíno, J. 2002. "Organización estructural del gen de la fitoenosintasa en el genoma de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex *Phaffiarhodozyma*)". Tesis para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología. Universidad de Chile, Santiago.
- Alcaíno, J., Barahona, S., Carmona, M., Lozano, C., Marcoleta, A., Niklitschek, M., Cifuentes, V. (2008). Cloning of the cytochrome p450 reductase (*crtR*) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiology*, 8, 169
- Alcaíno, J., Romero, I., Niklitschek, M., Sepúlveda, D., Rojas, M., Baeza, M., Cifuentes, V. (2014). Functional characterization of the *Xanthophyllomyces dendrorhous* farnesyl pyrophosphate synthase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoding genes that are involved in the synthesis of isoprenoid precursors. *PLoS ONE*, 9(5), p.e96626.
- Álvarez, V., Rodríguez-Sáiz, M., de la Fuente, J. L., Gudiña, E. J., Godio, R. P., Martín, J. F., Barredo, J. L. (2006). The *crtS* gene of *Xanthophyllomyces dendrorhous* encodes a novel cytochrome-P450 hydroxylase involved in the conversion of β -carotene into astaxanthin and other xanthophylls. *Fungal Genetics and Biology*, 43(4), 261–272.
- Ambati, R. R., Moi, P. S., Ravi, S., & Aswathanarayana, R. G. (2014). Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - A review. *Marine Drugs*, 12(1), 128–152.
- An GH, Schuman DB, Johnson EA (1989) Isolation of *Phaffiarhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Applied and Environmental Microbiology*, 55:116-124

- An, G. (1997). Photosensitization of the yeast *Phaffiarhodozyma* at a low temperature for screening carotenoid hyperproducing mutants. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 66(3), 263-268.
- Bien, C. M., & Espenshade, P. J. (2010). Sterol regulatory element binding proteins in fungi: Hypoxic transcription factors linked to pathogenesis. *Eukaryotic Cell*, 9(3), 352-359.
- Bieri, J., Brown, E. y Smith, J. (1985). Determination of Individual Carotenoids in Human Plasma by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*, 8(3), pp.473-484.
- Blumenthal, J., Barefoot, J., & Haney, T. (1986). Communication to the editor. *Journal of Psychosomatic Research*, 30(3), 387.
- Borowitzka, M. A. (1986). Micro-algae as sources of fine chemicals. *Microbiological Science*, 3(12), 372-375.
- Brehm-Stecher, B., & Johnson, E. (2012). Isolation of carotenoid hyperproducing mutants of *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffiarhodozyma*) by flow cytometry and cell sorting. *Microbial Carotenoids From Fungi*, 207-217.
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(15), 1551-1558.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., y Pfander, H. (2004). *Carotenoids*. Editorial :BirkhauserBasel.
- Calo, P., de Miguel, T., Velázquez, J. and Villa, T. (1995). Mevalonic acid increases trans-astaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffiarhodozyma*. *Biotechnology Letters*, 17(6), pp.575-578.
- Chumpolkulwong, N., Kakizono, T., Nagai, S., & Nishio, N. (1997). Increased astaxanthin production by *Phaffiarhodozyma* mutants isolated as resistant to diphenylamine. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83(5), 429-434.
- Contreras, G., Barahona, S., Rojas, M. C., Baeza, M., Cifuentes, V., & Alcaíno, J. (2013). Increase in the astaxanthin synthase gene (*crtS*) dose by in vivo DNA fragment assembly in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Biotechnology*, 13, 84.
- Contreras, G., Barahona, S., Rojas, M. C., Baeza, M., Cifuentes, V., & Alcaíno. (2012). El color del salmón y las levaduras antárticas. *Boletín Antártico Chileno* N° 31, 12-13.

- Delić, V., Hopwood, D. and Friend, E. (1970). Mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) in *Streptomyces coelicolor*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 9(2), pp.167-182.
- Domínguez-Bocanegra, a. R., Ponce-Noyola, T., & Torres-Muñoz, J. a. (2007). Astaxanthin production by *Phaffiarhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: A comparative study. Applied Microbiology and Biotechnology, 75(4), 783–791.
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S. M., Blanc, P., Murthy, K. N. C., & Ravishankar, G. a. (2005). Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: A scientific oddity or an industrial reality? Trends in Food Science and Technology, 16(9), 389–406.
- Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Murphy, R. C., Dennis, E. A. (2005). A comprehensive classification system for lipids. Journal of Lipid Research, 46(5), 839–861.
- Flores-Cotera, L. B., Martín, R., & Sánchez, S. (2001). Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffiarhodozyma*: Influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium. Applied Microbiology and Biotechnology, 55(3), 341–347.
- Frucht, L. E., & Kanon, S. (2005). Israel grows red algae in the desert to fight disease. Disponible en: <http://www.israel21c.org/israel-grows-red-algae-in-the-desert-to-fight-disease/>
- Gassel, S., Breitenbach, J., & Sandmann, G. (2014). Genetic engineering of the complete carotenoid pathway towards enhanced astaxanthin formation in *Xanthophyllomyces dendrorhous* starting from a high-yield mutant. Applied Microbiology and Biotechnology, 98(1), 345–350.
- Gil-Hwan, a. N., Schuman, D. B., & Johnson, E. a. (1989). Isolation of *Phaffiarhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. Applied and Environmental Microbiology, 55(1), 116–124.
- Golkhoo S, Barantalab F, Ahmadi AR, H. Z. (2007). Purification of astaxanthin from mutant of *Phaffiarhodozyma* JH-82 which isolated from forests trees of Iran. Pakistan Journal of Environmental Sciences, 10(5), 802-805.
- Golubev, W. (1995). Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffiarhodozyma*). Yeast, 11(2), 101-110.
- Granado, J., Felix, G., & Boller, T. (1995). perception of fungal sterols in plants. Plant Physiology, 107, 485–490.

- Gruszecki, W. I., Sujak, A., Strzalka, K., Radunz, A., & Schmid, G. H. (1999). Organisation of xanthophyll-lipid membranes studied by means of specific pigment antisera, spectrophotometry and monomolecular layer technique lutein versus zeaxanthin. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 54(7-8), 517-525.
- Guerin, M., Huntley, M. E., & Olaizola, M. (2003). *Haematococcus* astaxanthin: Applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*, 21(5), 210-216.
- H.J. Nelis., A.P. De Leenheer. (1991). Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. *Journal of Applied Bacteriology* 1991, 70, 181-191.
- Hamelin, C., & Chung, Y. S. (1974). Optimal conditions for mutagenesis by ozone in *Escherichia coli* K12. *Mutation Research*, 24(3), 271-279.
- Isler, O., Rüegg, R., & Schwieter, U. (1967). Carotenoids as food colorants. *Pure and Applied Chemistry. Chimie Pure et Appliquee*, 14(2), 245-263.
- Johnson, E. a. (2003). *Phaffiarhodozyma*: Colorful odyssey. *International Microbiology*, 6(3), 169-174.
- Johnson, E. a., & An, G-H. (1991). Astaxanthin from microbial sources. *Critical Reviews in Biotechnology*, 11(4), 297-326.
- Johnson, E., & Lewis, M. (1979). Astaxanthin Formation by the yeast *Phaffiarhodozyma*. *Journal Of General Microbiology*, 115(1), 173-183.
- Khan, J. C., Shahid, H., Thurlby, D. a, Bradley, M., Clayton, D. G., Moore, a T., Yates, J. R. W. (2006). Age related macular degeneration and sun exposure, iris colour, and skin sensitivity to sunlight. *The British Journal of Ophthalmology*, 90(1), 29-32.
- Kidd, P. (2011). Astaxanthin, cell membrane nutrient with diverse clinical benefits and anti-aging potential. *Alternative Medicine Review*, 16(4), 355-364.
- Kim, J. H., & Chang, H. I. (2006). High-level production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant JH1, using chemical and light induction. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(3), 381-385.
- Lee, S., Ahn, G, Won, M., & Song, K. B. I. N. (2002). Low-dose gamma irradiation as means of isolating carotenoid-hyperproducing yeast mutant, 12, 1010-1012.
- Leonard, C. a., Brown, S. D., & Hayman, J. R. (2013). Random mutagenesis of the *Aspergillus oryzae* genome results in fungal antibacterial activity. *International Journal of Microbiology*, 2013, 1-5.

- Loto, I., Gutiérrez, M. S., Barahona, S., Sepúlveda, D., Martínez-Moya, P., Baeza, M., Alcaíno, J. (2012). Enhancement of carotenoid production by disrupting the C22-sterol desaturase gene (*CYP61*) in *Xanthophyllomycesdendrorhous*. *BMC Microbiology*, 12(1), 235.
- Marcoleta, A., Niklitschek, M., Wozniak, A., Lozano, C., Alcaíno, J., Baeza, M., & Cifuentes, V. (2011). "Glucose and ethanol-dependent transcriptional regulation of the astaxanthin biosynthesis pathway in *Xanthophyllomycesdendrorhous*." *BMC Microbiology*, 11(1), 190-201.
- Martín, J. F., Gudiña, E., & Barredo, J. L. (2008). Conversion of beta-carotene into astaxanthin: Two separate enzymes or a bifunctional hydroxylase-ketolase protein? *Microbial Cell Factories*, 7(3), 1-10.
- McNulty, H. P., Byun, J., Lockwood, S. F., Jacob, R. F., & Mason, R. P. (2007). Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768(1), 167-174.
- Meyer, P., du Preez, J. and Kilian, S. (1993). Selection and evaluation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffiarhodozyma*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9(5), pp.514-520.
- Moore, B. D. (1968). The Mutagenic Action of N-methyl-W-nitro-N-nitrosoguanidine. *Journal of General Microbiology*, 55, 121-125.
- Mutwakil, M. H. Z. (2011). Mutation Induction in *Aspergillusterrus* Using N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine (NTG) and Gamma Rays. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(12), 496-500.
- Nagy, Á., Palágyi, Ferenczy, L., & Vágvölgyi, C. (1997). Radiation-induced chromosomal rearrangement as an aid to analysis of the genetic constitution of *Phaffiarhodozyma*. *FEMS Microbiology Letters*, 152(2), 249-254.
- Najafi, N., Ahmadi, A.-R., Hosseini, R., & Golkhoo, S. (2011). Gamma irradiation as a useful tool for the isolation of astaxanthin-overproducing mutant strains of *Phaffiarhodozyma*. *Canadian Journal of Microbiology*, 57(9), 730-734.
- Ojima, K., Breitenbach, J., Visser, H., Setoguchi, Y., Tabata, K., Hoshino, T., van den Berg, J. and Sandmann, G. (2006). Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomycesdendrorhous* (*Phaffiarhodozyma*) and its assignment as a β -carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. *Molecular Genetics and Genomics*, 275(2), 148-158.
- Palozza, P., & Krinsky, N. I. (1992). Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 297(2), 291-295.

- Park, J. S., Mathison, B. D., Hayek, M. G., Massimino, S., Reinhart, G. a., & Chew, B. P. (2011). Astaxanthin stimulates cell-mediated and humoral immune responses in cats. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144(3-4), 455–461.
- Pashkow, F., Watumull, D., & Campbell, C. (2008). Astaxanthin: A Novel Potential Treatment for Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Disease. *The American Journal Of Cardiology*, 101(10), S58-S68.
- Pierce, B. (2009). *Genética*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Rajakumar, K., Greenspan, S. L., Thomas, S. B., & Holick, M. F. (2007). Solar ultraviolet radiation and vitamin D: A historical perspective. *American Journal of Public Health*, 97(10), 1746–1754.
- Ramel, F., Birtic, S., Cuine, S., Triantaphylides, C., Ravanat, J.-L., & Havaux, M. (2012). Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants. *Plant Physiology*, 158(3), 1267–1278.
- Retamales, P., León, R., Martínez, C., Hermosilla, G., Pincheira, G., & Cifuentes, V. (1998). Complementation analysis with new genetic markers in *Phaffiarhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 73(3), 229–236.
- Riccioni, G. (2009). Carotenoids and cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports*, 11(6), 434–439.
- Schmidt, I., Schewe, H., Gassel, S., Jin, C., Buckingham, J., Hümbelin, M., Schrader, J. (2011). Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffiarhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(3), 555–571.
- Shang, F., Wen, S., Wang, X. y Tan, T. (2006). Effect of nitrogen limitation on the ergosterol production by fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 122(3), pp.285-292.
- Stachowiak, B. (2013). Efficiency of selected mutagens in generating *Xanthophyllomyces dendrorhous* strains hyperproducing astaxanthin. *Polish Journal of Microbiology*, 62(1), 67–72.
- Stahl, W., Stahl, W., Heinrich, U., Heinrich, U., Wiseman, S., Wiseman, S., Tronnier, H. (2001). Biochemical and molecular action of nutrients research communication. *The Journal of Nutrition*, 49(10), 1449–1451.
- Sun, N., Lee, S., & Song, K. Bin. (2004). Characterization of a carotenoid-hyperproducing yeast mutant isolated by low-dose gamma irradiation. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 263–267.

- Visser, H., Van Ooyen, A. J. J., & Verdoes, J. C. (2003). Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *FEMS Yeast Research*, 4(3), 221–231
- Wang, Q., Luo, W., Gu, Q. Y., Feng, L. R., Li, H. G., & Yu, X. Bin. (2013). Enhanced lycopene content in *Blakesleatrispora* by effective mutation-screening method. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(7), 1692–1700.
- Wozniak, A., Lozano, C., Barahona, S., Niklitschek, M., Marcoleta, A., Alcaíno, J., Cifuentes, V. (2011). Differential carotenoid production and gene expression in *Xanthophyllomyces dendrorhous* grown in a nonfermentable carbon source. *FEMS Yeast Research*, 11(3), 252–262
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., y Van 't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1875–1881.

7. ANEXOS

Anexo 1. Cantidad y porcentaje de carotenoides de la cepa mutante ANCH13.14 de *X. dendrorhous*.

Composición	24h			48h			72h			96h			120h		
	Porcentaje (%)	SD (%)	Cantidad (ppm)	Porcentaje (%)	SD (%)	Cantidad (ppm)	Porcentaje (%)	SD (%)	Cantidad (ppm)	Porcentaje (%)	SD (%)	Cantidad (ppm)	Porcentaje (%)	SD (%)	Cantidad (ppm)
astaxantina	85,70	± 10,75	58,92	76,28	± 2,17	107,12	72,06	± 1,29	714,38	56,19	± 12,23	1196,13	63,91	± 8,59	1415,88
phoenicoxantina	9,06	± 3,46	6,23	10,21	± 1,18	14,45	8,61	± 0,96	85,33	9,45	± 1,49	201,08	10,37	± 2,68	229,74
cantaxantina	3,85	± 5,44	2,64	1,89	± 0,99	2,69	5,85	± 2,84	57,96	7,57	± 3,57	161,06	8,94	± 4,68	198,06
OHKloruleno	ND	± ND	ND	ND	± ND	ND	3,89	± 0,38	38,53	3,54	± 3,69	75,35	3,21	± 3,02	71,11
OHequinonona	1,15	± 1,63	0,79	6,77	± 1,34	9,71	4,30	± 3,05	42,66	7,08	± 1,02	150,78	4,73	± 2,77	104,86
equinenona	ND	± ND	ND	ND	± ND	ND	1,26	± 0,14	12,46	2,83	± 2,43	60,24	2,02	± 0,77	44,83
licopeno	ND	± ND	ND	ND	± ND	ND	1,56	± 0,80	15,47	2,94	± 1,21	62,51	1,96	± 1,12	43,35
loruleno	ND	± ND	ND	ND	± ND	ND	ND	± ND	0,00	0,95	± 1,38	20,22	0,55	± 0,95	12,11
γ-caroteno	ND	± ND	ND	1,69	± 0,63	2,44	ND	± ND	0,00	2,80	± 1,62	59,53	0,35	± 0,61	7,83
β-caroteno	ND	± ND	ND	2,59	± 1,35	3,77	2,17	± 1,19	21,51	6,19	± 4,69	131,76	3,92	± 1,17	86,77
Total	99,75		99,43	99,69		140,18	99,69		99,53		2118,67	99,96		2214,53	

(*) ND: No Detectado; SD: Desviación Estándar; ppm: Partes por millón.

Anexo 2. Cantidad y porcentaje de carotenoides de la cepa parental ANCH13 de *X. dendrorhous*.

Composición	Distribución de carotenoides														
	24h			48h			72h			96h			120h		
	Porcentaje (%)	SD (%)	Cantidad (ppm)	Porcentaje (%)	SD (%)	Cantidad (ppm)	Porcentaje (%)	SD (%)	Cantidad (ppm)	Porcentaje (%)	SD (%)	Cantidad (ppm)	Porcentaje (%)	SD (%)	Cantidad (ppm)
astaxantina	83,79	± 5,93	32,16	83,83	± 5,80	146,02	56,24	± 10,58	484,00	71,00	± 3,25	767,55	72,92	± 5,31	1159,03
phoenicoxantina	15,65	± 5,63	6,00	9,80	± 0,46	17,07	10,94	± 1,14	94,18	9,91	± 1,16	107,13	10,07	± 1,95	160,01
canfaxantina	ND	± ND	ND	2,80	± 0,42	4,88	13,42	± 1,05	115,47	8,64	± 1,53	93,40	7,74	± 0,89	123,08
OHKtoruleno	ND	± ND	ND	ND	± ND	ND	ND	± ND	ND	ND	± ND	ND	2,39	± 1,46	37,94
OHequinonona	ND	± ND	ND	2,27	± 1,17	3,95	6,77	± 3,80	58,29	3,19	± 2,06	34,49	0,00	± ND	ND
equinenona	ND	± ND	ND	1,03	± 0,59	1,79	4,76	± 1,98	40,97	2,45	± 1,44	26,49	1,49	± 0,66	23,74
licopeno	ND	± ND	ND	ND	± ND	ND	ND	± 3,75	ND	ND	± ND	ND	2,19	± 0,12	34,81
β-caroteno	ND	± ND	ND	ND	± ND	ND	7,77	± ND	66,84	4,78	± 0,11	51,67	2,21	± 2,64	35,08
Total	99,44	± 11,56	38,16	99,73	± 8,44	173,71	99,90	± 22,30	859,76	99,97	± 9,56	1080,73	99,00	± 13,04	1573,69

(*) ND: No Detectado; SD: Desviación Estándar; ppm: Partes por millón.