



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**Estudio Genético, Proteómico y Metabólico de Mutantes
Carotenogénicas de *Phaffia rhodozyma***

Tesis que presenta

Alejandra Barbachano Torres

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Directora de Tesis: **María Teresa Ponce Noyola**

México, D.F.

Marzo de 2014

“El desarrollo de esta tesis de Doctorado tuvo el apoyo del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) a través de la beca número 172824.”

Dedicada al amor de mi vida,
mi esposo.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis la Dra. **Ma. Teresa Ponce Noyola** que prestó apoyo y dedicación a cada uno de los aspectos de esta tesis.

A mis asesores la Dra. **Ana Carmela Ramos Valdivia** por su valiosa y constante aportación en los temas de rutas metabólicas y estrés oxidativo, al Dr. **Carlos Cerda García Rojas** por su incondicional ayuda con enfoque químico, al Dr. **Luis Miguel Salgado Rodríguez** por su tenaz y amplia colaboración en cuestiones genéticas y proteómicas, y al Dr. **Fernando Esparza García** por su enseñanza en aspectos microbiológicos de este trabajo.

Se agradece al Dr. **Enrique Cerdá Olmedo y su equipo de trabajo** del Departamento de Genética de la Universidad de Sevilla por haber permitido y ayudado a realizar una estancia de investigación en su laboratorio.

A la M. en C. **Odilia Pérez** por su entrenamiento y ayuda para el desarrollo del proyecto.

Contenido

RESUMEN	XI
ABSTRACT	XIII
INTRODUCCIÓN	1
Estrés oxidativo	2
Carotenoides	2
Clasificación	3
Función.....	4
Interacciones en la membrana celular.....	5
Aplicaciones.....	6
Astaxantina	7
Beneficios del consumo de la astaxantina	8
Aplicaciones.....	9
Fuentes.....	9
<i>Phaffia rhodozyma</i>	11
Biosíntesis de astaxantina en <i>Phaffia rhodozyma</i>	13
Gen <i>crtS</i>	16
Mejoramiento genético de <i>Phaffia rhodozyma</i>	17
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVOS.....	22
Objetivo general	23
Objetivos específicos	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Microorganismo y condiciones de cultivo.....	25
Mutagénesis.....	25
Determinación de carotenoides totales	26

Cuantificación de carotenoides por HPLC	26
Extracción de proteínas	27
Cuantificación de proteína	28
SDS-PAGE	28
Extracción de ADN genómico	29
Amplificación del gen <i>crtS</i>	29
Clonación del producto de PCR.....	31
Extracción de ADN plasmídico (Miniprep)	31
Digestión de ADN plasmídico.....	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
Obtención y caracterización de mutantes	34
Estrés oxidativo	34
Análisis proteómico	38
Secuenciación de regiones ITS	38
Secuenciación del gen <i>crtS</i>	38
Secuenciación del gen <i>crtYB</i>	44
CONCLUSIONES	46
PERSPECTIVAS.....	49
REFERENCIAS.....	51
ANEXO 1	59
ANEXO 2	60
Abstract	62
Keywords	62
Introduction	63
Materials and Methods.....	64
<i>Microorganism and culture conditions</i>	64
<i>Mutagenesis conditions</i>	64

<i>Carotenoid extraction and quantification</i>	64
<i>Protein extraction</i>	65
<i>Analysis</i>	65
<i>Electrophoresis</i>	65
<i>Statistical analyses</i>	66
Results and Discussion.....	66
<i>Mutant isolation</i>	66
<i>Protein profiles</i>	69
<i>Protein identification</i>	70
Acknowledgements	73
References.....	74
ANEXO 3	87
Secuencia ITS1-5.8S-ITS2.....	88
ANEXO 4	89
Secuencia de nucleótidos del gen <i>crtS</i>	90
En azul los intrones	90
>WtA.....	90
>WtB.....	91
ANEXO 5	93
Alineamiento de secuencia de aminoácidos del gen <i>crtS</i> obtenido en bases de datos y las versiones obtenidas de Wt.	94
ANEXO 6	98
Alineamiento de secuencias de aminoácidos del gen <i>crtS</i> de las cepas Wt XR5, XR17, XY13, XY21 y XP26.....	99
ANEXO 7	102
Versiones obtenidas de la secuencia de <i>crtYB</i>	103
>WtA.....	103
>WtB.....	104
ANEXO 8	106
Alineamiento de secuencia de aminoácidos del gen <i>crtYB</i> obtenido en bases de datos y las versiones obtenidas de Wt.	107

ANEXO 9	110
Alineamiento de secuencias de aminoácidos del gen <i>crtYB</i> de las versiones obtenidas de Wt y XP26.....	111

Índice de tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos usados en este trabajo.	30
--	----

Índice de figuras

FIGURA 1. Clasificación de los carotenoides: (A) carotenos y (B) xantofilas.	3
FIGURA 2. Orientación de carotenoides en la membrana celular.....	6
FIGURA 3. Estructura química de la astaxantina.	7
FIGURA 4. Isómeros configuracionales de la astaxantina.....	8
FIGURA 5. <i>Phaffia rhodozyma</i> . A) fotografía con microscopio electrónico de barrido de levadura gemando y B) fotografía con microscopio electrónico de barrido de basidio con basidiosporas (Echavarri-Erasun and Johnson 2005).....	12
FIGURA 6. Ruta del mevalonato para la biosíntesis de carotenoides.	14
FIGURA 7. Biosíntesis de β -caroteno en <i>Phaffia rhodozyma</i>	15
FIGURA 8. Biosíntesis de astaxantina en <i>Phaffia rhodozyma</i>	16
FIGURA 9. Efecto del H ₂ O ₂ sobre el crecimiento de la cepa silvestre y mutantes de <i>P. rhodozyma</i> en cultivo por lote. (A) sin H ₂ O ₂ (control); (B) H ₂ O ₂ 5 mM; (C) H ₂ O ₂ 10 mM. ..	35
FIGURA 10. Efecto del H ₂ O ₂ sobre la producción de carotenoides de la cepa silvestre (Wt) y mutantes (XR4, XW10, XY21 y XP24) de <i>P. rhodozyma</i> en cultivo por lote.	37
FIGURA 11. Esquema de fragmentos de amplificación del gen <i>crtS</i> con los oligonucleótidos seleccionados.	39
FIGURA 12. Amplificación de fragmentos de PCR para secuenciación. A) Fragmentos crtS2F/2R. B) Fragmentos crtS3F/3R. M: Marcador de tamaño molecular; carriles1 al 6 son cepas Wt, XP26, XR5, XR17, XY13 y XY21, respectivamente.	40
FIGURA 13. Amplificación y clonación del fragmento crtS4F/1R. A) Producto de amplificación por PCR de fragmento crtS4F/1R; carriles1 al 8 son cepas Wt, XP26, XR5, XR17, XY13, XY21, XW10 y XW20, respectivamente. B) Digestión del DNA plasmídico de clonas con fragmento crtS4F/1R; carriles 1-4:Wt, 5-8:XP26, 9-12:XR5, 13-16:XR17, 17-20:XY13, 21-24:XY21.	41

FIGURA 14. Electroferogramas representativos de los resultados de la secuenciación. A) Mezcla de nucleótidos en las posiciones 460, 468 y 469 de la secuenciación con el oligonucleótidos crtS3F de la mutante XP26. B) Secuencia del fragmento crtS4F/1R con cambios en las posiciones 641 y 646..... 42

FIGURA 15. Amplificación y posiciones de los oligonucleótidos en el gen *crtYB*. A) Amplificación por PCR del fragmento crtYB1F/4R. B) Esquema de secuenciación del gen *crtYB*..... 44

RESUMEN

Phaffia rhodozyma sintetiza astaxantina como el derivado de xantofilas más representativo. Este compuesto manifiesta propiedades antioxidantes y su producción ha sido estimulada vía especies reactivas de oxígeno, sin embargo, los mecanismos detallados para la carotenogénesis en esta levadura no han sido elucidados. Se obtuvieron diferentes mutantes de color (naranja intenso, naranja claro, rosado, amarillo y blanco) de esta especie que fueron caracterizadas y algunas de ellas seleccionadas para su estudio de estimulación por ROS, análisis del perfil proteómico en 2DE y secuenciación de los genes *crtS* y *crtYB*.

La inducción de estrés oxidativo con H₂O₂ 5 mM prolongó la fase lag en todas las cepas sin afectar el crecimiento alcanzado al final del cultivo. El incremento de carotenoides por estrés oxidativo fue 3.5 veces mayor en mutantes que acumulan carotenoides que en cepas acumuladoras de xantofilas.

El uso de 2DE mostró diferencias en los perfiles proteómicos de la cepa silvestre y sus mutantes de color. Del número total de manchas detectadas en cada gel (297-417), 128 proteínas estuvieron presentes en todas las cepas. Las mayores coincidencias se dieron entre las mutantes amarilla y la blanca con un coeficiente de correlación de 0.6, sin embargo, la mutante naranja intenso presentó más coincidencias en su perfil proteómico con la cepa silvestre. La secuenciación de algunas de las proteínas expresadas diferencialmente indicó que las proteínas pertenecientes al ciclo de los ácidos tricarboxílicos y de respuesta a estrés están estrechamente relacionadas con el proceso carotenogénico.

La secuenciación del gen *crtS* sólo presentó cambios en la mutante XY21 demostrando que el producto de este gen no es el único responsable del fenotipo amarillo de *P. rhodozyma*.

ABSTRACT

Phaffia rhodozyma synthesizes astaxanthin as the most representative xanthophyll derivative. This compound displays antioxidant properties and its production has been stimulated via reactive oxygen species (ROS). Detailed mechanisms for carotenogenesis in *P. rhodozyma* have not been elucidated. Differently colored mutants (red, orange, pink, yellow and white) were obtained from this yeast species, and some were selected for exposure to ROS, analysis of their protein profiles by 2DE and sequencing *crtS* and *crtYB* genes.

Addition of H₂O₂ extended the lag phase in all strains but reached similar growth at the stationary phase as that observed for their own control culture. The addition of H₂O₂ increased the carotenoid contents in 16 % for wild type and XR4 red mutant and 60 % in white and yellow mutants.

Differences in the proteomic profiles of wild type *P. rhodozyma* and its colored mutants were demonstrated using 2DE. Of the total number of spots detected in each gel (297-417), 128 proteins were present in all strains. The red mutant showed the greatest number of matches with respect to the wild type (305 spots), while the white and yellow mutants, which had reduced concentrations of total carotenoids, presented the highest correlation coefficient (0.6) between each other. A number of differentially expressed proteins were sequenced, indicating that tricarboxylic acid cycle and stress response proteins are closely related to the carotenogenic process.

Sequencing *crtS* demonstrated that the product of this gene is not the only responsible of yellow phenotype of *P. rhodozyma*.

INTRODUCCIÓN

Estrés oxidativo

Las *especies reactivas de oxígeno* (ROS, por sus siglas en inglés) son compuestos intermediarios generados como subproductos de la reducción de oxígeno molecular a agua como resultado del metabolismo celular normal. En este proceso son formados el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot), que corresponden a la reducción en donde participan uno, dos y tres electrones respectivamente (Sies 1997).

Todos los componentes celulares (lípidos, ácidos nucleicos, proteínas y carbohidratos) son sensibles al daño por ROS. Las células tienen recursos para protegerse de los efectos dañinos de las ROS. Entre estos recursos se encuentran la producción de antioxidantes, de enzimas [dismutasas del superóxido (SODs), peroxidasas del glutatión (GPOXs) y catalasas (CATs)] y el sistema de reparación del DNA (Ahmad 1995).

La acumulación de ROS en la célula ya sea por incremento de éstos o por inhabilidad de los sistemas biológicos para detoxificar los intermediarios reactivos o reparar el daño causado se denomina estrés oxidativo (Ahmad 1995; Pradedova *et al.* 2011).

Un antioxidante es una molécula que tiene la habilidad de remover radicales libres del sistema ya sea reaccionando con ellos para producir compuestos inocuos o interrumpiendo las reacciones de oxidación (Britton 1995; Pradedova *et al.* 2011).

Carotenoides

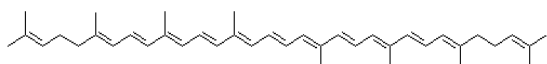
Los carotenoides son una clase de pigmentos naturales ampliamente distribuidos en la naturaleza y son sintetizados por bacterias, hongos y algunos organismos fotosintéticos (Sandman *et al.* 1999; Das *et al.* 2007). Estos pigmentos tienen una intensa coloración amarilla, naranja o roja y sus moléculas son insolubles en agua (Britton 1995; Salazar-González 2000; Estrada *et al.* 2008).

En la actualidad se conocen más de 750 estructuras diferentes de carotenoides. El esqueleto principal es un tetraterpeno C40 con un sistema de dobles enlaces conjugados que los hace sensibles a la luz, el calor, los ácidos y el oxígeno (Johnson and An 1991). Su estructura principal puede ser modificada por reacciones de ciclación, hidroxilación y adición de grupos funcionales oxigenados (Britton 1995; Mijts *et al.* 2004).

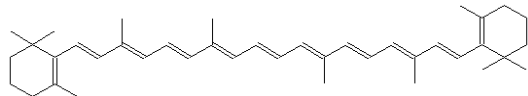
Clasificación

Los carotenoides se clasifican en dos grandes grupos: carotenos y xantofilas (Figura 1). Los primeros se encuentran en menor proporción en la naturaleza y no tienen ninguna sustitución con oxígeno en su estructura, mientras que las xantofilas se encuentran en forma mayoritaria en la naturaleza y tienen al menos un átomo de oxígeno en su estructura (Britton 1995; Salazar González 2000; Umeno *et al.* 2005; Jackson *et al.* 2008).

A)

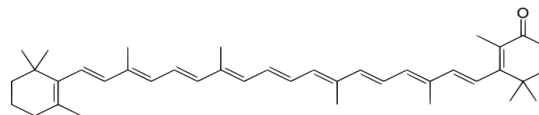


Licopeno

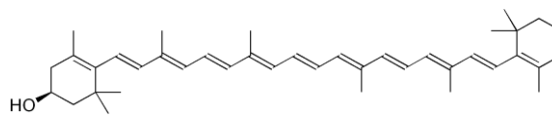


β -Caroteno

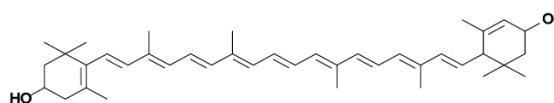
B)



Equinenona



Criptoxantina



Luteína

FIGURA 1. Clasificación de los carotenoides: (A) carotenos y (B) xantofilas.

Todos los carotenoides pueden derivarse de la estructura acíclica de dobles enlaces conjugados $C_{40}H_{56}$, por hidrogenación, deshidrogenación, ciclación u oxidación, o cualquier combinación de estos procesos (IUPAC 1974).

Los carotenoides más abundantes y ampliamente estudiados son la vitamina A (incluyendo al ácido retinóico, retinol y retinal), α y β -caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina, β -criptoxantina y astaxantina (Azqueta y Collins 2012).

Función

Los carotenoides desempeñan funciones importantes:

1. En organismos **fotosintéticos** atrapan energía luminosa de longitudes de onda que son pobremente absorbidas por la clorofila, de esta manera hacen más eficiente la fotosíntesis. Además tienen un papel protector al disipar el exceso de energía previniendo la formación de especies reactivas de oxígeno y desactivando iones de oxígeno generados durante el proceso fotosintético (Jackson *et al.* 2008).
2. En organismos **no fotosintéticos**, han sido vinculados a mecanismos de prevención de la oxidación (Salazar-González 2000). El sistema conjugado rico en electrones de estos pigmentos es el responsable de su actividad antioxidante (McNulty *et al.* 2008).

Entre las propiedades biológicas atribuidas a la presencia de carotenoides se encuentran el mejoramiento de la capacidad de fertilidad o reproducción en algunos animales, la disminución del grado de transformación maligna de las células y el riesgo a enfermedades degenerativas. En algunos casos, la relación causal entre la presencia de carotenoides y la acción biológica es bastante clara. En muchos otros casos, el efecto biológico parece estar asociado con los carotenoides pero no se ha establecido la causa por la que ocurre y deben ser de consideración en el futuro (Krinsky 1994).

Interacciones en la membrana celular

Los carotenoides pueden ser incorporados en la membrana lipídica a distintas concentraciones pero la orientación de éstos dentro de la bicapa depende de la estructura de cada carotenoide individual. Los carotenoides no polares, licopeno y β -caroteno, se mantienen por completo en la parte interna hidrocarbonada de la membrana y retiene un grado substancial de movilidad (Britton 1995). Dichos carotenoides desordenan la bicapa de la membrana y estimulan la peroxidación de lípidos (McNulty *et al.* 2008).

Por otro lado, la presencia de sustituyentes polares en los carotenoides, especialmente grupos hidroxilo como en la astaxantina y zeaxantina, interaccionan con las cabezas polares de los fosfolípidos que constituyen la bicapa y mantienen a la molécula en una posición a través de la membrana (Figura 2). Sin embargo conservan la estructura de la membrana y exhiben una actividad antioxidante significativa.

El alineamiento transmembranal de los carotenoides polares provee una variación en los extremos hidrofílicos para ser adecuadamente expuestos y puedan así interactuar con especies reactivas de oxígeno en ambiente acuoso. De esta manera se facilita potencialmente el transporte de las ROS a través de los dobles enlaces del esqueleto carbonado del compuesto. Dicho alineamiento también provee proximidad a cofactores, tales como la vitamina C, que sirven como pozo para aceptar radicales catiónicos, recargando efectivamente la capacidad de transferir electrones (Britton 1995; McNulty *et al.* 2008; Pashkow *et al.* 2008).

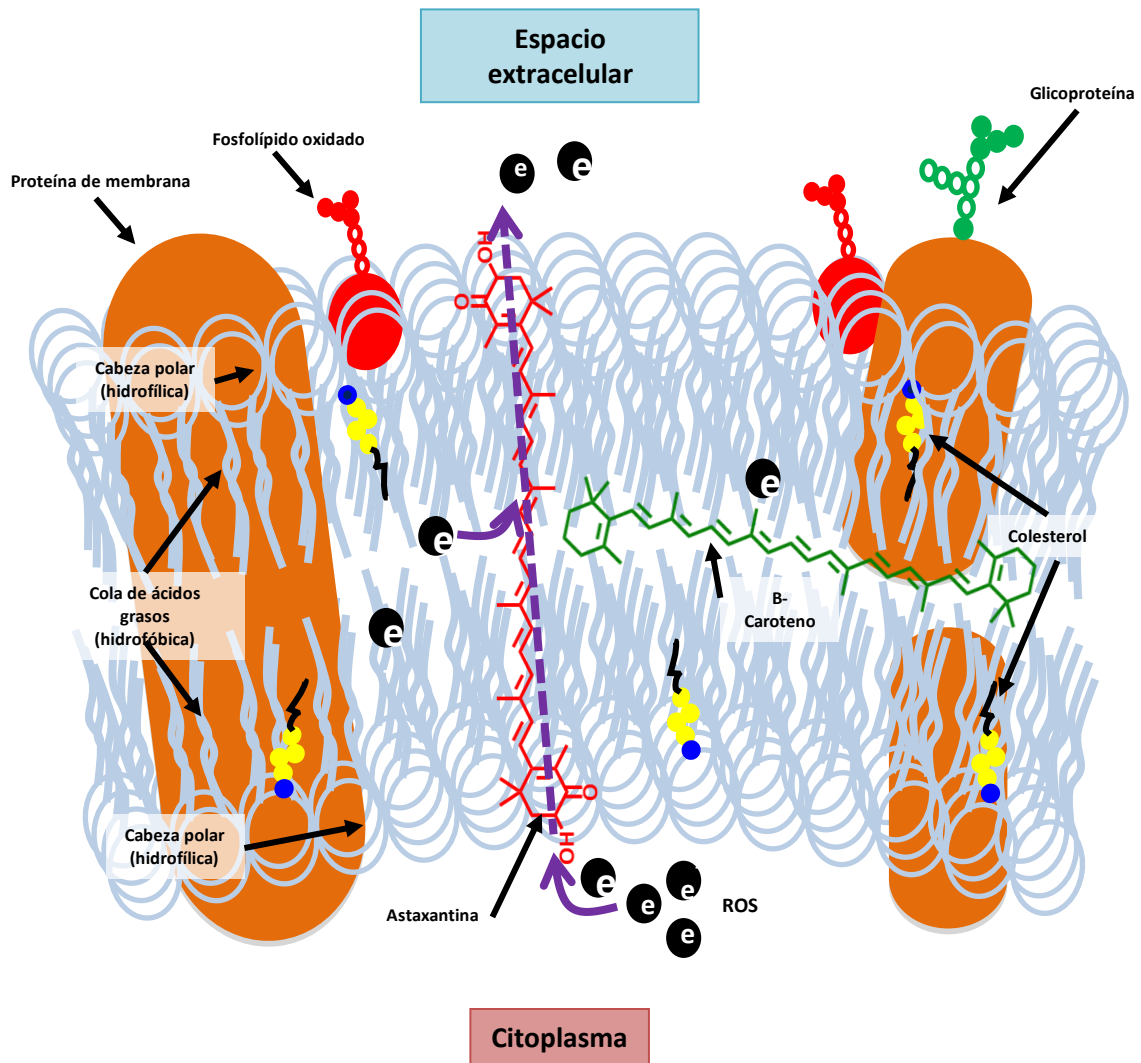


FIGURA 2. Orientación de carotenoides en la membrana celular.

Aplicaciones

Se estima que la venta total de carotenoides en 2010 fue de 1200 millones de dólares con la posibilidad de crecer a 1400 millones de dólares en 2018 a una velocidad de 2.3 % anual (März 2011).

Las características de los carotenoides permiten su uso en la industria farmacéutica en forma de cápsulas suaves o inyecciones, en la industria de los alimentos para productos procesados o frescos, también en la industria apícola para la pigmentación de la yema de huevos y en la industria de cosméticos o compuestos químicos finos para investigación. La mayoría de los carotenoides comercializados industrialmente

son sintetizados químicamente, aunque algunos están disponibles también como extractos naturales (Sandman *et al.* 1999; Olaizola 2000; Bhosale y Bernstein 2005; Dufossé *et al.* 2005; Higuera-Ciapara *et al.* 2006; Papp *et al.* 2006).

Astaxantina

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- β -caroteno-4,4'-diona, $C_{40}H_{52}O_4$) es una xantofila de color naranja-rojizo cuya molécula está configurada con dos grupos alcohol y dos grupos ceto (Figura 3) (Hussein *et al.* 2006). Su nombre se deriva del género de cangrejo *Astacus astacus* y le da coloración a algunas aves, crustáceos y salmones (Salazar-González 2000). En su forma pura, el pigmento tiene apariencia de un polvo fino color café violáceo (Johnson and An 1991).

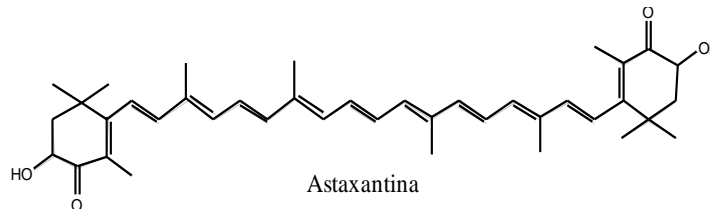


FIGURA 3. Estructura química de la astaxantina.

Al igual que todos los carotenoides, la astaxantina es insoluble en agua y tiene baja solubilidad en grasas y aceites, lo que limita sus aplicaciones. Se han descrito diferentes métodos para mejorar sus propiedades, por ejemplo, disminuyendo el tamaño de cristal a partículas con tamaño menor a 10 μm (Guo *et al.* 2010). Sin embargo, los grupos 3-hidroxilo y 4-ceto en ambos anillos ionona terminales causan atributos únicos a la astaxantina como su mayor polaridad comparada con otros carotenoides y su mayor actividad antioxidante (Schmidt *et al.* 2011).

La astaxantina tiene dos carbonos asimétricos en las posiciones 3 y 3' y puede existir en tres configuraciones (Figura 4), incluyendo los enantiómeros (3S, 3'S y 3R, 3'R) así como la mesoforma (3S, 3'R o 3R, 3'S) (Johnson *et al.* 1991; Jackson *et al.* 2008).

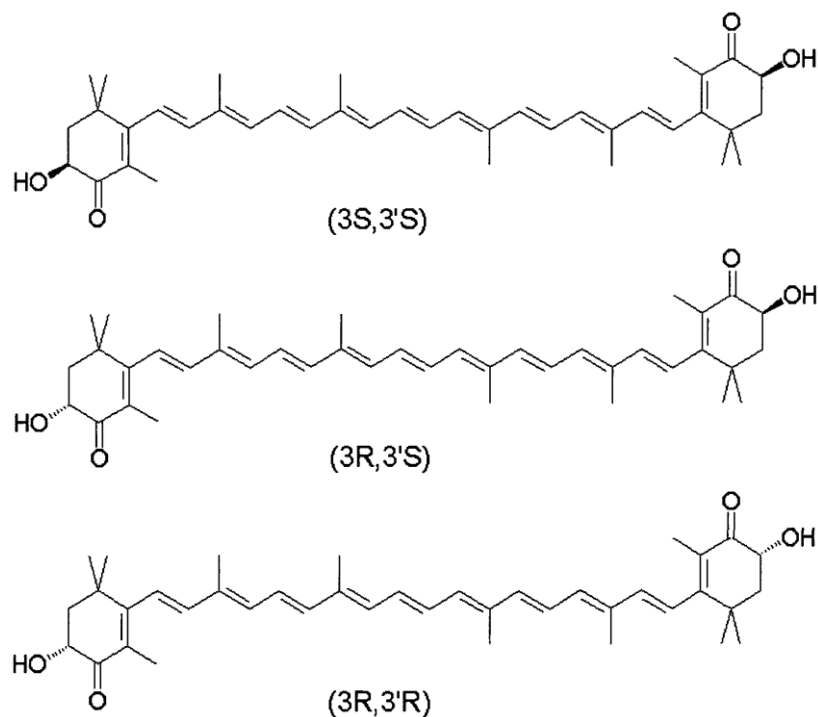


FIGURA 4. Isómeros configuracionales de la astaxantina.

Dependiendo de su origen, la astaxantina puede ser encontrada en asociación con otros compuestos. Puede estar esterificada en uno o ambos grupos hidroxilo con diferentes ácidos grasos tales como palmítico, oléico, esteárico y linoléico. También puede ser encontrada libre, ésto es sin los grupos hidroxilo esterificados, o bien formando complejos químicos con proteínas (carotenoproteínas) o lipoproteínas (carotenolipoproteínas) (Higuera-Ciapara *et al.* 2006).

Beneficios del consumo de la astaxantina

La astaxantina tiene actividad atrapadora de radicales libres incluso más potente que los carotenoides no polares β -caroteno y licopeno (McNulty *et al.* 2008).

Se le han atribuido funciones como:

- Proteger contra la oxidación de ácidos grasos insaturados esenciales
- Proteger contra efectos de la luz UV, los cuales son un factor de riesgo para el cáncer de piel

- Mejorar la actividad y función inmune
- Proteger contra infecciones de *Helicobacter pylori*, que es considerado un factor importante en la inducción de gastritis, úlceras y cáncer estomacal en humanos
- Proteger contra condiciones degenerativas, tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares y cataratas (Johnson y An 1991; Hu *et al.* 2006).

Las investigaciones de los beneficios de la astaxantina como suplemento alimenticio son muy recientes y básicamente se han limitado a ensayos *in vitro* o pruebas preclínicas (Higuera-Ciapara *et al.* 2006; Pashkow *et al.* 2008).

Aplicaciones

La astaxantina es el tercer carotenoide más importante que se produce actualmente ya que representa el 18.8 % del mercado total de carotenoides después de la luteína y el β -caroteno que representan el 19.2 y 22 % respectivamente. Se espera que el mercado de la astaxantina alcance los 250 millones de dólares en 2018 a una velocidad de crecimiento de 1.5 % anual (März 2011).

Las propiedades antioxidantes de la astaxantina hacen que tenga aplicaciones como producto nutracéutico. La dosis recomendada de esta xantofila por día es de 5 mg y con base en esto, se han fabricado varios suplementos que consisten en soluciones inyectables, cápsulas o cremas tópicas (Higuera-Ciapara *et al.* 2006).

El color de la astaxantina ofrece oportunidades comerciales como pigmento en la industria de la cosmetología y los alimentos (Miao *et al.* 2010). Sin embargo, el 90% de la producción de astaxantina actual es destinada como aditivo en alimentos de salmón y trucha en criaderos. Lo anterior favorece la coloración característica para su comercialización (Olaizola 2000; Verdoes *et al.* 2003; Johnson 2003; Schmidt *et al.* 2011).

Fuentes

La astaxantina se obtiene principalmente por síntesis química, o de fuentes naturales como la microalga *Haematococcus pluvialis*, la levadura *Phaffia rhodozyma* y los subproductos de crustáceos (Johnson y An 1991, Li *et al.* 2011).

Para la síntesis química de astaxantina existen varias estrategias. Una de ellas involucra la reacción Witting de dos equivalentes de una sal de fosfonio C15 con un dialdehído C10 (Jackson *et al.* 2008). Otras son la síntesis C10+C20+C10 vía condensación dienoléter, hidroxilación de la cantaxantina e isomerización de luteína a zeaxantina seguido de su oxigenación hasta astaxantina (Schmidt *et al.* 2011).

Para generar compuestos enantiopuros en el desarrollo de productos farmacéuticos, la quiralidad debe ser introducida en una etapa muy temprana de la síntesis y debe de ser mantenida, escalable y reproducible, lo que incrementa los costos de producción (Jackson *et al.* 2008).

La creciente demanda de productos naturales y el alto costo de la astaxantina sintética ha estimulado la búsqueda de fuentes naturales de astaxantina con potencial para la industrialización con el fin de cubrir el mercado donde son requeridos aproximadamente 100,000 kg por año (Johnson y An 1991; Higuera-Ciapara *et al.* 2006; Schmidt *et al.* 2011).

En el mercado se encuentran muchos productos de astaxantina derivados de *H. pluvialis*, esta microalga produce el pigmento exclusivamente en isómeros (3S, 3'S) y principalmente esterificada por ácidos grasos. Los avances en tecnología de fotobiorreactores han sido una herramienta fundamental para alcanzar la producción comercial requerida. El sistema de producción consiste en peceras grandes bajo condiciones controladas, seguido del proceso de rompimiento de la pared celular para incrementar la biodisponibilidad del carotenoide ya que los quistes presentan baja digestibilidad. La biomasa finalmente se seca para obtener un polvo fino de color rojizo que alcanza rendimientos desde 1.5 a 3 % en base seca (Li *et al.* 2011, Schmidt *et al.* 2011).

Los subproductos de crustáceos son otra fuente de astaxantina y son generados durante las operaciones de recuperación o acondicionamiento de la porción

comestible de cangrejos, camarones y langostas. El contenido de carotenoides en subproductos de camarones y langostas varía entre 0.12 y 0.15 mg/g. La astaxantina se encuentra principalmente libre o esterificada con ácidos grasos y también pueden encontrarse pequeñas cantidades de luteína, zeaxantina y astaceno (Higuera-Ciapara *et al.* 2006).

El potencial de utilización de subproductos de crustáceos para inducir la pigmentación de peces ha sido estudiado, pero el bajo rendimiento de astaxantina implica la incorporación de grandes cantidades de subproductos en los ingredientes de alimentación (10-25 %) con el fin de alcanzar un proceso de pigmentación eficiente. Una desventaja adicional es el alto contenido de cenizas y quitina que disminuyen significativamente la absorción del pigmento por el pez (Higuera-Ciapara *et al.* 2006).

Otra fuente natural de astaxantina es la levadura *Phaffia rhodozyma* cuya característica principal es el color naranja-rojizo de las colonias que forma, debido a la presencia de pigmentos carotenoides. Su variación en intensidad depende de la cepa (Johnson 2003), sin embargo, las principales limitantes de esta fuente comercial de pigmento son los bajos rendimientos de astaxantina en aislados silvestres de la levadura y su gruesa pared celular y cápsula que dificultan la asimilación de la astaxantina (Johnson 2003; Schmidt *et al.* 2011).

Una ventaja de *P. rhodozyma* es que sintetiza astaxantina como principal carotenoide (75-90 %), no requiere luz para su crecimiento y pigmentación, puede utilizar varios tipos de azúcares bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas y puede crecer a velocidades de 0.10 a 0.15 h⁻¹ (Yamane *et al.* 1997).

Phaffia rhodozyma

En los años '70, el microbiólogo Herman Phaff aisló una levadura de exudados de árboles en Japón, Alaska y Rusia que fue designada inicialmente "*Rhodozyma montanae*", posteriormente *Phaffia rhodozyma* y la especie se describió como una levadura anamorfa (asexuada) de origen basidiomicete (Miller *et al.* 1976). La

especie telemorfa (sexuada) fue descrita posteriormente y se denominó *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Golubev 1995).

Actualmente, *P. rhodozyma* (*X. dendrorhous*) se define como un hongo basidiomicete basado en su morfología, características de la pared celular, el modo de gemación, pigmentación y propiedades metabólicas, además está relacionada filogenéticamente a otras levaduras imperfectas productoras de carotenoides, incluyendo *Rhodotorula* y *Cryptococcus* (Golubev 1995; Johnson 2003). El estudio de secuencias intragenómicas sugiere que *P. rhodozyma* se derivó de una basidiospora de la especie telemorfa con deficiencia de apareamiento (Fell *et al.* 2007). Es una levadura psicrófila moderada cuya temperatura de mayor producción de carotenoides y crecimiento es entre 18 y 22 °C. Los valores de pH óptimos están en el intervalo de 5 a 6. La concentración crítica de oxígeno disuelto es de 10 al 20 % de saturación del aire, concentraciones menores de oxígeno disuelto conduce a limitaciones en el crecimiento o la producción de carotenoides (Schmidt *et al.* 2011).

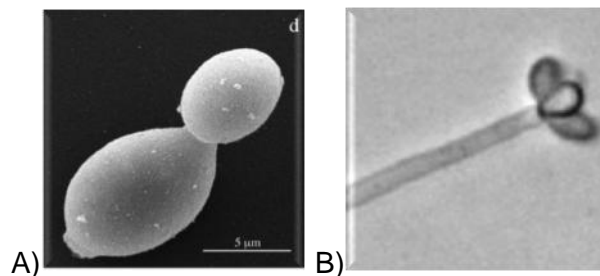


FIGURA 5. *Phaffia rhodozyma*. A) fotografía con microscopio electrónico de barrido de levadura gemando y B) fotografía con microscopio electrónico de barrido de basidio con basidiosporas (Echavarrí-Erasun and Johnson 2005).

Entre los esfuerzos que se han realizado para incrementar los rendimientos de este pigmento se encuentran la evaluación de los efectos de diferentes nutrientes del medio de cultivo sobre la producción de biomasa y astaxantina, otros en la optimización de las condiciones que favorezcan los rendimientos de astaxantina y algunos otros en la utilización de cepas mejoradas genéticamente para incrementar dichos rendimientos (Bhosale *et al.* 2005; Rodríguez-Saiz *et al.* 2010).

Actualmente la levadura se comercializa en un polvo fino como fuente natural de astaxantina, proteína y otros nutrientes utilizados como ingredientes para la alimentación de salmones. Se manufactura por fermentación natural en un ambiente cuidadosamente controlado de manera que se obtenga un producto con alto porcentaje de astaxantina libre (8 mg/g) (Higuera-Ciapara *et al.* 2006; Schmidt *et al.* 2011).

Se tienen evidencias de que la función principal de la astaxantina y carotenoides relacionados en *P. rhodozyma* y otros organismos es para proteger contra el daño oxidativo por su actividad como antioxidante y su síntesis puede ser inducida por estrés oxidativo (Schroeder y Johnson 1995; Yamane *et al.* 1997; Lee *et al.* 2004; Liu y Wu 2006; Pashkow *et al.* 2008).

Biosíntesis de astaxantina en *Phaffia rhodozyma*

Se han hecho diversos trabajos sobre la química de los carotenoides, sin embargo se conoce muy poco de la biosíntesis de los mismos, particularmente de las xantofilas. En *P. rhodozyma*, los carotenoides son producidos a partir de la ruta del mevalonato (MVA), el cual es el primer precursor específico de los terpenoides formado a partir del acetil CoA y del acetoacetil CoA (Figura 6.). El MVA es convertido a isopentenil pirofosfato (IPP), el cual es el precursor biológico universal de C5 en los isoprenoides (Johnson *et al.* 1991; Calo *et al.* 1995; Miao *et al.* 2010; Schmidt *et al.* 2011).

La isomerización del isopentenil pirofosfato (IPP) catalizada por la IPP isomerasa (codificada por el gen *idi*) forma dimetilalil pirofosfato (DMAPP), posteriormente la condensación secuencial de tres moléculas de IPP dan lugar a la formación del geranylgeranyl pirofosfato (GGPP; C20), paso catalizado por la GGPP sintasa, la cual es codificada por el gen *crtE* (Lodato *et al.* 2007; Verwaal *et al.* 2007; Wang *et al.* 2007; Miao *et al.* 2010).

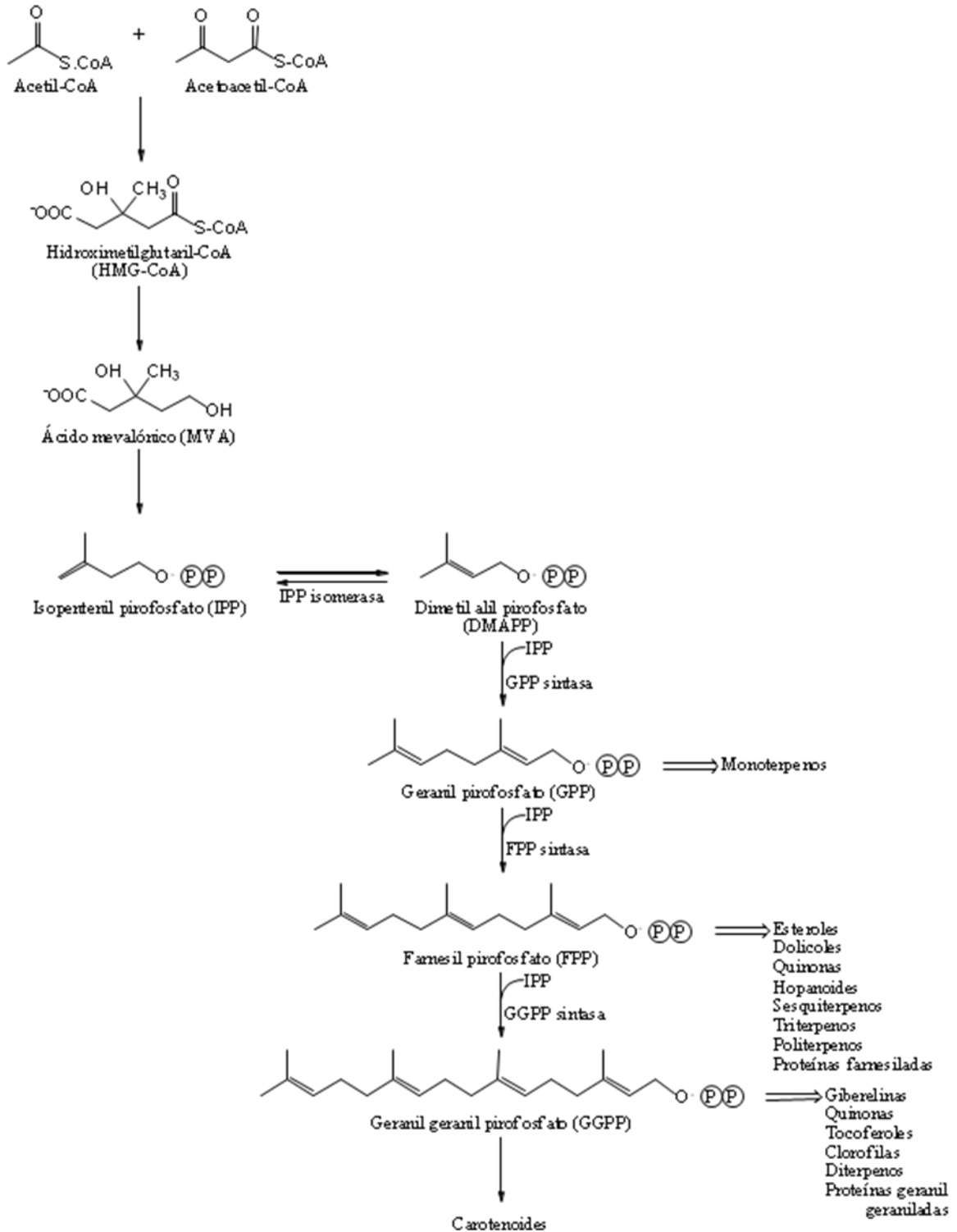


FIGURA 6. Ruta del mevalonato para la biosíntesis de carotenoides.

La formación de β -caroteno ocurre mediante la condensación de dos moléculas de geranil geranil pirofosfato (GGPP) para formar fitoeno que está catalizada por la fitoeno sintasa (gen *crtYB*) (Figura 7). La introducción de cuatro dobles enlaces en la molécula de fitoeno para formar licopeno se cataliza por la fitoeno desaturasa (gen *crtI*). La ciclación de los extremos acíclicos del licopeno para dar lugar al γ -caroteno y el β -caroteno está a cargo de la licopeno ciclasa (gen *crtYB*) (Martin *et al.* 2008; Miao *et al.* 2010; Schmidt *et al.* 2011).

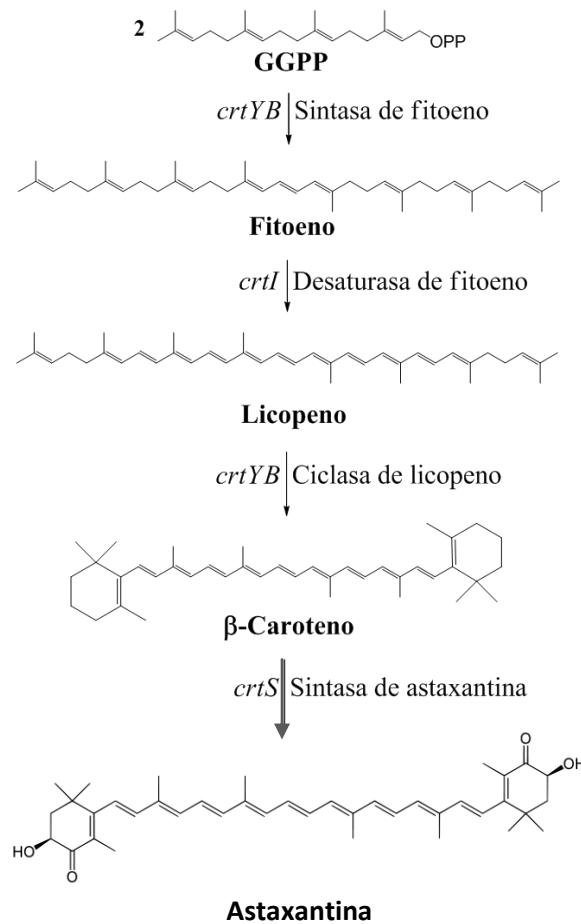


FIGURA 7. Biosíntesis de β -caroteno en *Phaffia rhodozyma*

La formación de astaxantina a partir de β -caroteno se considera el producto de las actividades enzimáticas hidroxilasa y cetolasa (Figura 8). A diferencia de otros organismos, donde se necesitan dos genes independientes para llevar a cabo este paso, en *P. rhodozyma* el gen *crtS* probablemente desarrolle ambas actividades (Álvarez *et al.* 2006; Ojima *et al.* 2006; Alcaíno *et al.* 2008).

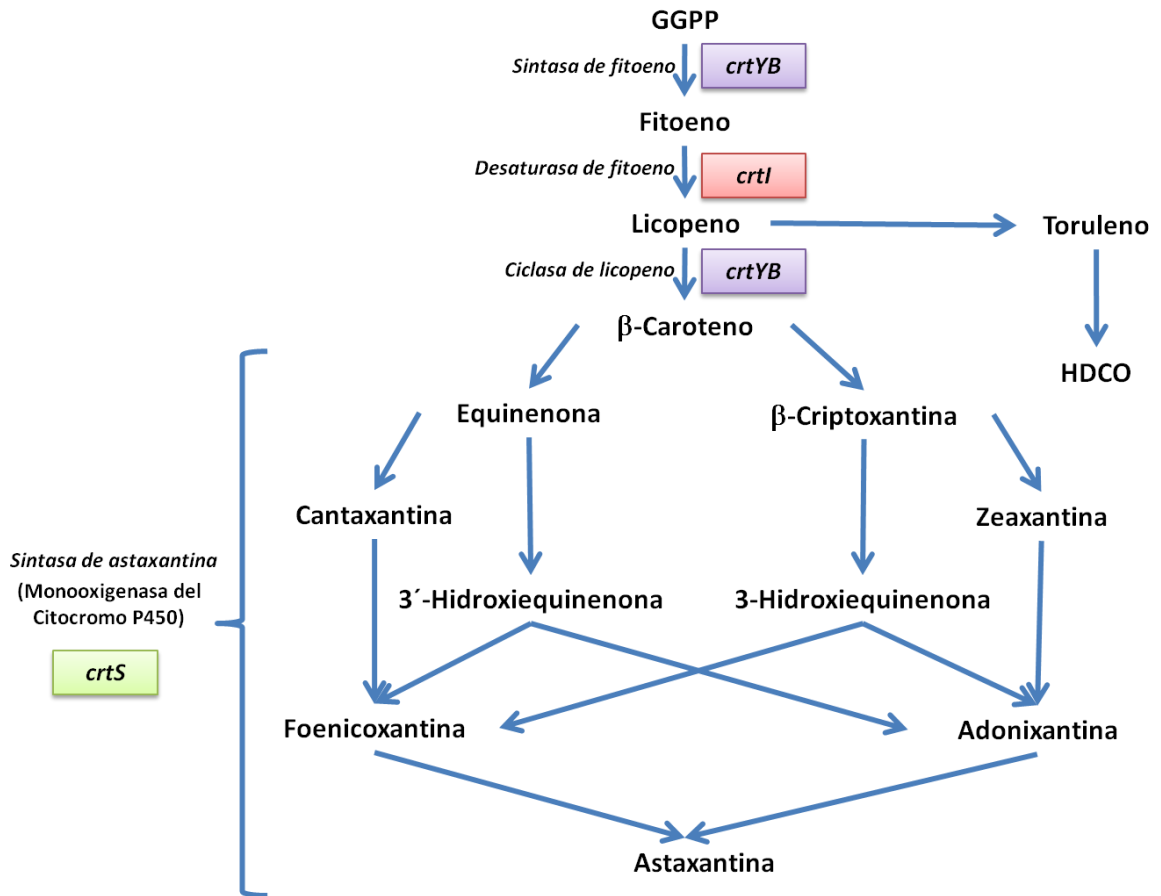


FIGURA 8. Biosíntesis de astaxantina en *Phaffia rhodozyma*

Gen *crtS*

El gen *crtS* (o *ast*) que codifica para la astaxantina sintasa, está involucrado con la conversión del β -caroteno en astaxantina y otras xantofilas (Álvarez *et al.* 2006; Ojima *et al.* 2006). Dicho gen tiene un marco abierto de lectura de 3160 pb que consta de 18 exones y 17 intrones. La proteína codificada por este gen tiene un masa molecular aproximada de 62.6 kDa y presenta similitud a otras monooxigenasas del citocromo P-450 (Martín *et al.* 2008).

Estudios filogenéticos revelan que el producto del gen *crtS* está estrechamente relacionado a la citocromo P-450 hidroxilasa de hongos, especialmente a los Basidiomycota *Cryptococcus neoformans* y *Ustilago maydis* y los Ascomycota *Aspergillus fumigatus*, *Giberella moniliformis* y *Neurospora crassa*. Sin embargo

mostró poca identidad a los productos del gen *crtZ* involucrado en la biosíntesis de carotenoides en bacterias (Martín *et al.* 2008).

Está claro que el producto del gen *crtS* (astaxantina sintasa) está involucrado en la conversión de β -caroteno, sin embargo, no está claro si la enzima es capaz de adicionar los dos grupos ceto e hidroxilo a los dos anillos de la molécula de β -caroteno (Alcaíno *et al.* 2008). Otra enzima clave en la biosíntesis de astaxantina es la citocromo P450 reductasa (codificada por el gen *crtR*) responsable de proveer de los electrones necesarios a la astaxantina sintasa para la oxigenación del β -caroteno y la obtención de la astaxantina (Alcaíno *et al.* 2008).

Mejoramiento genético de *Phaffia rhodozyma*

Muchos esfuerzos en investigación se han enfocado en el mejoramiento de la producción de astaxantina, como son la optimización del medio de cultivo y las condiciones de fermentación. Sin embargo, estas mejoras no han sido suficientes para la explotación comercial. Otra forma es el aislamiento de cepas hiperproductoras de astaxantina, ésto puede lograrse con el uso de mutagénesis al azar o por manipulación de la expresión de uno o más genes de la biosíntesis de astaxantina o la combinación de ambos (Visser *et al.* 2003; Gassel *et al.* 2013).

La mutagénesis al azar es una manera relativamente fácil de obtener cepas con contenido de astaxantina mejorado y para ello se han usado la luz ultravioleta y compuestos como metanosulfonato de etilo (EMS), *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (NTG) entre otros (Visser *et al.* 2003).

Debido a que la ruta de regulación de carotenoides es pobremente conocida (Gassel *et al.* 2013), la inducción de mutaciones al azar dentro de la secuencia genética resulta ser una opción relativamente sencilla para la creación de una colección de organismos con variantes genotípicas mediante un adecuado criterio de selección. Cada variante del gen tiene mutaciones diferentes por lo que cada una alterará la secuencia aminoacídica para la que codifica, cambiando por tanto la proteína. De esta manera se puede estudiar la función del gen de interés (Alberts *et al.* 2002).

JUSTIFICACIÓN

P. rhodozyma es una levadura formadora de carotenoides, principalmente astaxantina. Este pigmento tiene un alto valor agregado por su eficiencia en el atrapamiento de radicales libres y por el aumento del sistema inmune de los vertebrados. Sin embargo, el 90 % de su producción está destinada a criaderos acuícolas para dar el color característico a salmones y truchas. La producción biológica a nivel industrial de la astaxantina en esta levadura se ve limitada por los bajos rendimientos de formación de carotenoides. Una alternativa para incrementarlos es mediante el mejoramiento genético que depende de un amplio conocimiento de los procesos de regulación de su biosíntesis. Éstos pueden conocerse mediante un estudio proteómico que ligue un fenotipo con una secuencia genómica.

Por lo anterior, la identificación de cambios metabólicos, proteómicos y genéticos de mutantes de la carotenogénesis aportará conocimientos en el proceso de formación de carotenoides en *P. rhodozyma*, que eventualmente podrían conducir a la manipulación de la ruta de biosíntesis para el mejoramiento de los rendimientos de producción de astaxantina.

HIPÓTESIS

H1. Cambios en los perfiles proteómicos se podrán relacionar con cambios en el contenido de carotenoides de mutantes de *P. rhodozyma*. Validada.

H2. Mutaciones en el gen *crtS* será relacionado con diferencias en el contenido de xantofilas de *P. rhodozyma*. Validada para una mutante.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar cambios genéticos, proteómicos y metabólicos que se relacionen con la producción de carotenoides en *P. rhodozyma*.

Objetivos específicos

- Obtener mutantes de *P. rhodozyma* con perfil de carotenoides modificado
- Obtener la secuencia del gen *crtS* en mutantes con contenido de xantofilas modificado.
- Obtener el perfil proteómico de mutantes carotenogénicas.
- Comparar diferencias en contenido de carotenoides, secuencia del gen *crtS* y perfil proteómico de mutantes de *P. rhodozyma*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo y condiciones de cultivo

Se empleó la cepa silvestre CDBB-L-685 (NRRL-Y-10921) de *Phaffia rhodozyma*. El medio mínimo contenía, por litro, 20 g de D-(+)-glucosa, 2 g de asparagina·H₂O, 5 g de KH₂PO₄, 500 mg de MgSO₄·7H₂O, 28 mg de CaCl₂, 1 mg de tiamina·HCl, 2 mg de ácido cítrico·H₂O, 1.5 mg de Fe(NO₃)₃·9H₂O, 1 mg de ZnSO₄·7H₂O, 300 µg de MnSO₄, 50 µg de CuSO₄·5H₂O, 50 µg de NaMoO₄·2H₂O. La glucosa debe ser esterilizada por separado. Los ingredientes menores, incluyendo el CaCl₂, se prepararon 100X y se mantuvieron asépticos con unas gotas de cloroformo. El medio rico utilizado se obtuvo con la adición de 1 g/L de extracto de levadura al medio mínimo (Cerdá Olmedo *et al.* 1987).

El medio YM contiene por litro 3 g de extracto de levadura, 3 g de extracto de malta, 5 g de bactopectona y 1 g de D-(+)-glucosa. El medio sólido se obtuvo con 15 g/L de agar.

Phaffia rhodozyma se conservó resuspendiendo 10⁶ células en 0.5 mL de glicerol al 20 %. El mantenimiento se realizó sembrando en medio YM sólido a partir de la suspensión de células en glicerol, se incubó a 22 °C durante 7 días, posteriormente se almacenó a 4 °C y se realizaron resiembras bimestrales.

Los cultivos líquidos se realizaron en matraces de 250 mL con 50 mL de medio YM, donde se suspendió una colonia de aproximadamente 5 mm de diámetro y se incubó a 22 °C con agitación a 200 rpm durante 48 h, este crecimiento sirvió como inóculo para otros cultivos.

Mutagénesis

Para inducir mutaciones se usó *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (NTG) 2 mg/mL (Sigma-Aldrich). Se cosecharon 10⁶ células a la mitad de la fase exponencial de crecimiento, se lavaron dos veces con agua destilada estéril y se resuspendieron en 9 mL de agua destilada estéril. La suspensión celular se dividió en 10 muestras de 900 µL y se agregó la dosis de NTG requerida.

Las muestras se incubaron a 22 °C, en oscuridad y con agitación ligera durante 15 o 30 min. Posteriormente, las células se lavaron tres veces con

agua destilada estéril y se resuspendieron en 1 mL de agua destilada estéril para realizar diluciones y sembrarlas en medio rico sólido. Después de incubar 7 días a 22 °C se contaron las células viables.

Determinación de carotenoides totales

Se siguió el método reportado por Sedmak (1990). Se tomó 1 mL de muestra que se lavó dos veces con agua destilada y se desechó el sobrenadante, se agregaron 0.5 g de perlas de vidrio (425-600 μm de diámetro) y 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) precalentado a 55°C. El paquete celular se sonicó (Sonicator Cole Parmer mod. 8851) el tiempo necesario para que la pastilla se resuspendiera. La suspensión celular se agitó vigorosamente, se agregaron 1 mL de acetona, 1 mL de éter de petróleo y 1 mL de NaCl al 20 % y se centrifugó durante 5 min a 5000 rpm. La fracción etérea, que contiene el pigmento, fue leída a 480 nm de absorbancia.

La determinación de los carotenoides totales se realizó utilizando el coeficiente de extinción de la astaxantina ($A_{1\text{cm}}^{1\%} = 2100$) con la siguiente ecuación (An *et al.* 1989; Rodriguez-Amaya y Kimura 2004):

$$\text{Carotenoides}(\mu\text{g} / \text{mL}) = \frac{A(\text{mL})(10^4)}{A_{1\text{cm}}^{1\%}(\text{peso muestra})}$$

Cuantificación de carotenoides por HPLC

Se cosecharon las células después de 72 h de cultivo, se liofilizaron para determinar la biomasa seca y posteriormente se trituraron en mortero con arena de mar pura. Para la extracción de los carotenoides se agregó acetona a las células trituradas, se agitó vigorosamente durante 30 s y se centrifugó para recuperar el solvente. Se repitió este paso las veces necesarias hasta recuperar una fase orgánica incolora. La acetona se volatilizó en presencia de nitrógeno gaseoso y los carotenoides se resuspendieron en 100 μL de hexano. El extracto se almacenó en atmósfera de nitrógeno para evitar degradación por el oxígeno atmosférico.

Para la cuantificación de carotenoides se utilizó el equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Agilent Technologies 1260 con detector de arreglo de diodos (DAD). La separación de los carotenoides en la muestra se realizó en una columna Hybar RT LiChrosorb RP-18 5 μm (4 x 125 mm) usando metanol, acetonitrilo y cloroformo (47:47:6) como fase móvil a velocidad de flujo constante de 1 mL/min, durante 20 min a 286, 450 y 473 nm. Los carotenoides fueron identificados por su tiempo de retención (astaxantina 2 min, licopeno 6 min, neurosporeno 7 min, β -caroteno 9.5 min, fitoeno 11 min) o su espectro de absorción (Britton *et al.* 2004).

Extracción de proteínas

Se obtuvo el paquete celular de un cultivo de 20 h, se lavó dos veces con agua desionizada y se eliminó el sobrenadante. Se maceraron las células en el mortero con nitrógeno líquido y se resuspendieron en 5 mL de Tris-HCl 50 mM pH 7.4 y PMSF 0.5 mM, posteriormente se agregaron 5 mL de una solución de carbonato de sodio 100 mM y la suspensión se incubó 1 h en hielo con agitación eventual (Molloy 2008). La suspensión se centrifugó a 4,000 x g durante 5 min para remover restos celulares y se recuperó la fase acuosa.

La proteína se limpió, concentró y cambió de amortiguador mediante precipitación ácida con ácido tricloroacético (TCA). Se agregó TCA a una concentración final de 10 % y se dejó reposar 2 h a -4 °C. Se centrifugó a 12,000 rpm en una centrífuga Eppendorf 5417R durante 15 min para recuperar la pastilla protéica y se desechó el sobrenadante. La pastilla se lavó con acetona para eliminar restos de TCA, posteriormente con etanol al 70 % para eliminar sales y se dejaron evaporar los restos de solvente. Finalmente se resuspendió la pastilla en 200 μL de amortiguador de rehidratación modificado (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 1 %, Triton X-100 0.5 %, Tris-HCl 40 mM, anfolitos pH 3-10 0.5 % y azul de bromofenol al 0.1 %). La muestra se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min para desechar las proteínas insolubles.

Cuantificación de proteína

El contenido de proteína se determinó por el método de Lowry (1951) que se describe a continuación. Se tomaron 10 μL de muestra y se llevaron a 250 μL , se agregaron 25 μL de desoxicolato de sodio al 0.15 % y se incubó 10 min a temperatura ambiente. La proteína se precipitó con 25 μL de TCA al 72 % y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 250 μL de reactivo 1 (20 g/L de Na_2CO_3 y 4 g de NaOH) y se transfirió a tubos de ensaye. Se agregaron 2.5 mL de una solución (hecha al momento) de reactivo A: 100 mL de reactivo 1, 1 mL de reactivo 2 (CuSO_4 1%), 1 mL de reactivo 3 (tartrato de sodio y potasio 2%). Se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Se agregaron 250 μL de reactivo de Folin fenol (Sigma) 1 N, se dejó reposar 30 min y se leyó la absorbancia a 660 nm ajustando a cero con blanco de reactivos. La curva estándar se realizó en un intervalo de 0 a 200 μg de albúmina de suero de bovino.

SDS-PAGE

Para verificar la calidad de las muestras y corroborar visualmente la concentración de proteína se realizaron geles de poliacrilamida al 10 % en condiciones desnaturalizantes como lo describe Laemmli (1970). Se aplicaron 10 μg de proteína y se tiñeron los geles con azul de Coomassie G-250 (Candiano *et al.* 2004).

Electroforesis en dos dimensiones (2DE)

La electroforesis en dos dimensiones (2DE) se llevó a cabo usando tiras de 11 cm, con gradiente de pH inmovilizado (tiras IPG) con un intervalo de pH de 3-10 (Bio-Rad). Las tiras fueron rehidratadas con la aplicación de la muestra (200 μg de extracto proteico) preparada en el regulador de rehidratación en condiciones de 50 V durante 13 h a 20 °C. Después del isoelectroenfoco (IEF), las tiras fueron equilibradas en una solución de equilibrio (Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, urea 6 M, DTT 1%, glicerol 30%, SDS 2% y azul de bromofenol 0.002%) durante 15 min con agitación suave, después se equilibró 15 min más con la misma solución reemplazando el DTT por iodoacetamida 4%. Para la

separación en dos dimensiones, las tiras se pusieron en la parte superior de geles prefabricados al 12% y se sellaron con agarosa. El amortiguador de corrida (Tris base 0.025 M, glicina 0.192 M y SDS 0.1% pH 8.8) fue usado 1X a 200 V hasta el final de la corrida.

Los geles se tiñeron con Coomassie G-250 (Candiano et al. 2004), se escanearon en un densitómetro calibrado Gel-Doc (BioRad) con una resolución de 600 dpi y las imágenes se procesaron y analizaron con el Software de Análisis de Geles PDQuest con t-test ANOVA. Las manchas proteicas fueron manualmente escindidas y enviadas a Arizona Proteomics Consortium College of Pharmacy, Tucson USA para su secuenciación. Los datos fueron buscados en la base de datos Uniprot/Swiss-Prot para su identificación.

Para cada cepa se realizaron por lo menos tres experimentos 2DE independientes.

Extracción de ADN genómico

El ADN utilizado para la amplificación de fragmentos de PCR se obtuvo con el GenElute Plant Genomic ADN Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) según las indicaciones del fabricante.

La integridad del ADN se verificó en geles de agarosa al 1 % en regulador Tris-Acetato-EDTA (TAE) que se tiñeron con bromuro de etidio.

La cuantificación de contenido de ADN se determinó midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm, considerando que la densidad óptica de 1 corresponde a 50 µg/mL de ADN. La pureza de la muestra se estimó con la relación de absorbancias 260/280.

Amplificación del gen *crtS*

Los oligonucleótidos usados se enlistan en la Tabla 1; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µL conteniendo 0.2 µL de polimerasa, 2.0 µL de regulador MgCl₂ 2 mM, 0.5 µL dNTPs 10 mM, 1 µL de cada oligonucleótido 10 mM y 2-200 ng de ADN.

Se usó la polimerasa Expand High Fidelity (Roche) para todas las amplificaciones excepto para los fragmentos a ser clonados en los que se usó EcoTaq.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador modelo FTGENE2D, Techne (Cambridge) de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s; reasociación a 55 °C durante 30 s; síntesis a 72 °C durante 2 min; la extensión final fue a 72 °C durante 7 min. Los productos de reacción se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % en regulador TAE y 0.5 µg/mL de bromuro de etidio. La purificación de los fragmentos para su secuenciación se llevó a cabo con el kit illustra™ GFX™ PCR ADN and gel band purification (General Electric) según las indicaciones del distribuidor.

TABLA 1. Oligonucleótidos usados en este trabajo.

Oligo-nucleótido	Dirección	Secuencia 5´a 3´	Gen objetivo
ITS1	D	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	ITS
ITS4	R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS
crtS-1R	R	ACGTAGAAGTCATAGCGCCT	<i>crtS</i>
crtS-2F	D	CCAGCAGTTGATCAAGCGAAC	<i>crtS</i>
crtS-2R	R	GGTTCGGATGGACAAACTGG	<i>crtS</i>
crtS-3F	D	GCTCAGTCGTCCAATCTTAACG	<i>crtS</i>
crtS-3R	R	CCAACTCGTCGGGAAACTG	<i>crtS</i>
crtS-4F	D	CGGACTTACCGATGGGTTTG	<i>crtS</i>
crtS-4R	R	GCAAGTGGGATGAACTGTGAC	<i>crtS</i>
crtS-5F	D	CTTCGTCTAGACCCTCCTAG	<i>crtS</i>
crtYB1F	D	GACTGGCGCTGAAAGAACAG	<i>crtYB</i>
crtYB2F	D	GCCATCTGATCTATACTCTCCC	<i>crtYB</i>
crtYB3F	D	GCCGAGCAAAGTCAACTATTGC	<i>crtYB</i>
crtYB4F	D	GGACCTGCATAACAGATACGC	<i>crtYB</i>
crtYB5F	D	GCTAGGGACATTAAGGGGAC	<i>crtYB</i>
crtYB4R	R	CTCAATCTTCTTTCTCTAGGTGC	<i>crtYB</i>

D=directo, R=reverso

Clonación del producto de PCR

Los fragmentos de PCR amplificados con EcoTaq se ligaron al vector pGEM®-T Easy (Promega) en una relación de vector-inserto 1:3. Las reacciones de ligación se llevaron a cabo en un volumen final de 10 µL conteniendo 5 µL de amortiguador de ligación rápida 2X, 1 µL de vector, 3 µL de producto de PCR, 1 µL de T4 ligasa de ADN. La mezcla de ligación se incubó toda la noche a 4 °C.

Para la transformación se mezclaron 5 µL de producto de ligación con 100 µL de células competentes de *E. coli* DH5α, la mezcla se incubó en hielo durante 30 min. El choque térmico se realizó elevando la temperatura a 42 °C durante 1 min e incubando posteriormente en hielo 1 min. El volumen final se llevó a 1 mL con medio LB y se incubó a 37 °C durante 45 min. Las células transformadas se cosecharon por centrifugación a 9,000-10,000 rpm durante 2 min y el paquete celular se resuspendió en 100 µL de medio LB. Las células se sembraron (10 µL) en cajas con medio LB con 100 µg/mL de ampicilina, 40 µg/mL de X-Gal y 12 µg/mL de IPTG y se incubaron 18 h a 37 °C.

Extracción de ADN plasmídico (Miniprep)

Se seleccionaron 4 colonias transformantes (blancas) de cada clonación, se transfirieron a tubos con 5 mL de medio LB con ampicilina y se incubaron toda la noche a 37 °C. Se cosecharon las células de 1.5 mL de cultivo mediante centrifugación a 12,000 rpm durante 30 s. El paquete se resuspendió en 100 µL de solución 1 (glucosa 50 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0) y se agitó vigorosamente. Se añadieron 200 µL de solución 2 (NaOH 0.2 N, SDS 1 %) y se mezcló por inversión. Se añadieron 150 µL de solución de acetato potásico 3 M en ácido acético glacial y se agitó suavemente. El lisado bacteriano se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se trató con RNAsa a 65 °C durante 10 min. Se agregaron 2 volúmenes de etanol 96° a temperatura ambiente, se mezcló vigorosamente y se incubó 2 min a temperatura ambiente. La solución se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Se añadió 1 mL de etanol 70 % a 4 °C, se centrifugó de nuevo para eliminar el sobrenadante y se dejó evaporar todo el

etanol restante. El ADN plasmídico se resuspendió en 20 μL de agua desionizada.

Digestión de ADN plasmídico

Para asegurar que el fragmento fue insertado, se digirió el ADN con la enzima EcoRI. La reacción de digestión se llevó a cabo en un volumen final de 20 μL conteniendo 2 μL de ADN, 1 μL de enzima, 2 μL de amortiguador H (específico para EcoRI) y 15 μL de agua desionizada. Se incubó al menos 1 h a 37 °C. Los productos de digestión se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención y caracterización de mutantes

Los resultados y discusión de la obtención de mutantes de *P. rhodozyma* y su caracterización se describen en el capítulo de libro “Carotenogenesis induction with hydrogen peroxide in *Xanthophyllomyces dendrorhous* colored mutants” (Anexo 1 del presente trabajo).

Estrés oxidativo

Con el fin de identificar el paso en el que ocurre la estimulación de la producción de carotenoides por estrés oxidativo y el efecto de éste en el crecimiento de *P. rhodozyma*, se seleccionaron 4 mutantes con contenido de carotenoides distinto. Las mutantes seleccionadas fueron XR4 (hiperproductora de carotenoides), XW10 (acumuladora de fitoeno), WY21 (acumuladora de β -caroteno) y XP26 (mayor proporción de HDCO y menos contenido de carotenoides totales). Las mutantes seleccionadas además de la cepa silvestre fueron cultivadas en medio YM y estresadas con la adición de dos concentraciones de H_2O_2 , 5 y 10 mM al momento de inocular.

En los cultivos control sin adición de H_2O_2 , el comportamiento fue muy parecido en todos ellos, tanto en las mutantes como en la cepa silvestre. La fase lag duró aproximadamente 8 h disparándose la fase exponencial que se prolongó hasta las 20 h, donde se alcanzó la fase estacionaria. Los cultivos se dejaron hasta que cumplieron 72 h (Figura 9A).

El crecimiento en cultivo por lote de las cepas Wt, XW10 y XP26 fue menos afectado por los tratamientos con H_2O_2 , sin embargo, la fase lag se alargó en todas las cepas con el aumento de la concentración de H_2O_2 (Figura 9B y 9C). La adición de H_2O_2 10 mM aumentó 4 y 7.5 veces la fase lag en las mutantes XY21 y XR4, respectivamente. A pesar de esto, el crecimiento final mostró una tendencia a una recuperación a los mismos valores de la cepa Wt.

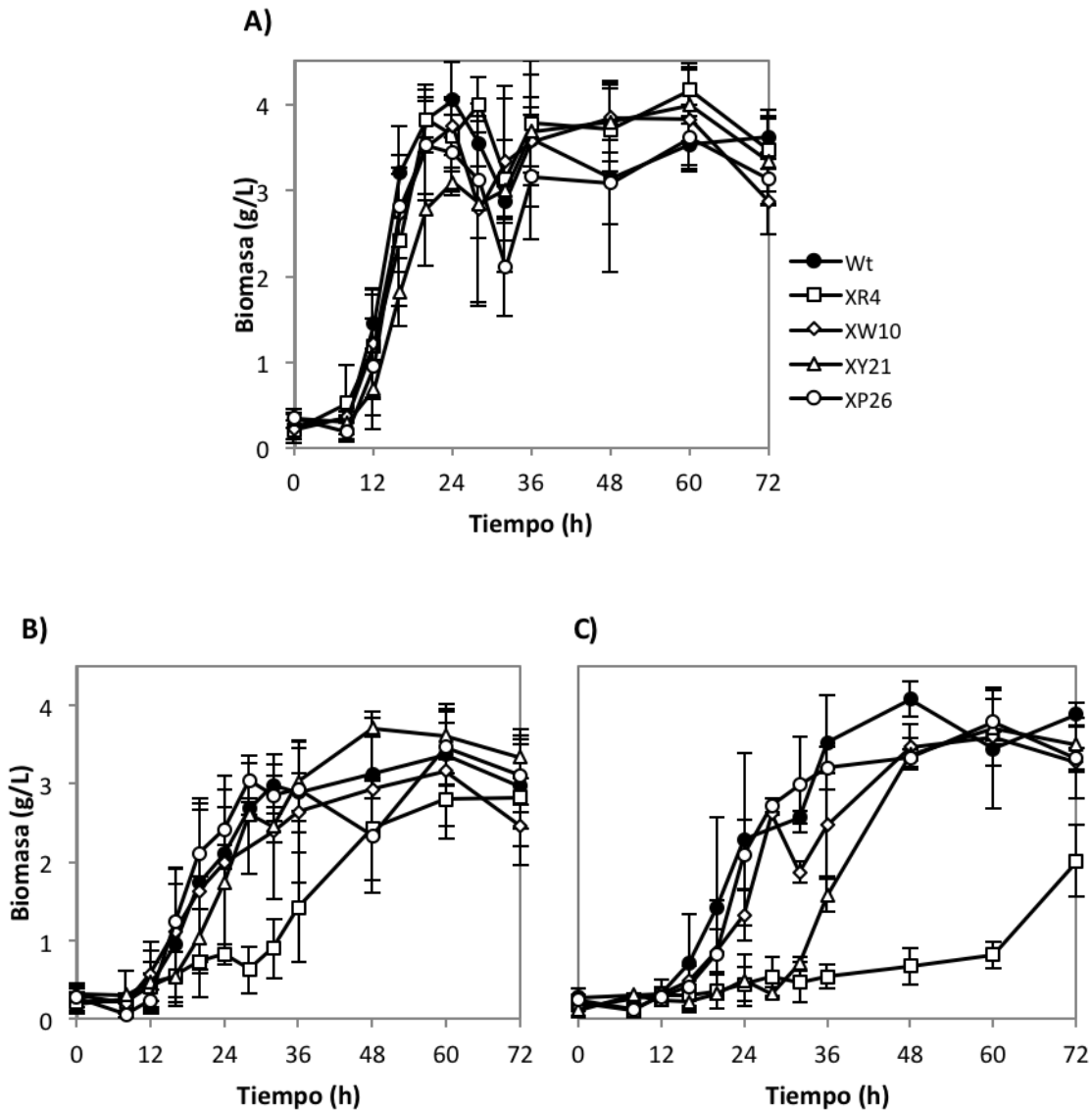


FIGURA 9. Efecto del H_2O_2 sobre el crecimiento de la cepa silvestre y mutantes de *P. rhodozyma* en cultivo por lote. (A) sin H_2O_2 (control); (B) H_2O_2 5 mM; (C) H_2O_2 10 mM.

Ducrey-Santopietro y colaboradores (1998) realizaron experimentos en cultivo continuo con *P. rhodozyma* donde mezclaron en partes iguales tres cepas con la misma velocidad de crecimiento, una cepa silvestre, una productora de β -caroteno y otra que no acumula carotenoides. A este sistema administraron un pulso de H_2O_2 (50 mM) y Fe^{2+} (100 μ M) y determinaron supervivencia en cultivo sólido. Los autores encontraron que la mutante blanca murió rápidamente mientras que las cepas silvestre y productora de β -caroteno tenían la misma resistencia a morir por la presencia de radicales libres. Se ha estudiado el poder antioxidante de los

carotenoides y se ha demostrado que las ROS incrementan su producción (Schroeder y Johnson 1993; Ducrey-Santopietro *et al.* 1998; Liu *et al.* 2006; Ukibe *et al.* 2009).

Por otro lado, el grupo de Ukibe (2009) evaluó la tolerancia a H₂O₂ de células de *S. cerevisiae* transformada con los genes *crtl*, *crtYB* y *crtS* de la carotenogénesis. Para ello cultivaron las cepas en medio sólido con 1.7 mM de H₂O₂ y encontraron que las cepas acumuladoras de xantofilas tenían mayor nivel de tolerancia al estrés oxidativo que las no carotenogénicas. En contraste, la cepa acumuladora de β-caroteno no le confería resistencia a estrés oxidativo.

En el presente trabajo, la cepa que no produce carotenoides tiene el mismo comportamiento que la cepa silvestre bajo estrés oxidativo mientras que las mutantes más pigmentadas tienen una fase de adaptación más larga. Tales cambios pueden deberse a las diferencias en los sistemas empleados, sin embargo, no pueden descartarse otros mecanismos de regulación de la carotenogénesis. Cabe recordar que el ergosterol es un componente de la membrana celular en levaduras y es sintetizado a partir del farnesil pirofosfato (FPP) que también es intermediario de la biosíntesis de carotenoides (Ukibe *et al.* 2009). Es posible que en *P. rhodozyma* bajo condiciones de estrés oxidativo la ruta de biosíntesis de ergosterol se desvíe a carotenoides.

Respecto a la medición de carotenoides, la adición de H₂O₂ 5 mM incrementó el contenido de éstos en todas las cepas evaluadas excepto en XP26 (Figura 10). Los mayores incrementos fueron del 64 y 60 % en las cepas XW10 y XY21, respectivamente, esto sugiere que la inducción de la carotenogénesis puede ocurrir antes de la condensación de las moléculas de GGPP. Mientras que en las cepas Wt y XR4, que acumulan principalmente astaxantina, los incrementos fueron del 16 y 18 % respectivamente. Esto indica que los pasos de oxigenación de la molécula de β-caroteno para formar xantofilas, catalizados por la astaxantina sintasa en conjunto con la citocromo P450 reductasa son cuello de botella en la síntesis de astaxantina en *P. rhodozyma*.

Visser y colaboradores (2003) sobreexpresaron el gen *crtYB* de *P. rhodozyma* por transformación integrativa de copias múltiples de dicho gen controladas por la región promotora del gen *gpd*, lo que resultó en la acumulación de β -caroteno y equinenona. Esto sugirió que las reacciones de oxigenación limitan la velocidad de formación de astaxantina en tales transformantes.

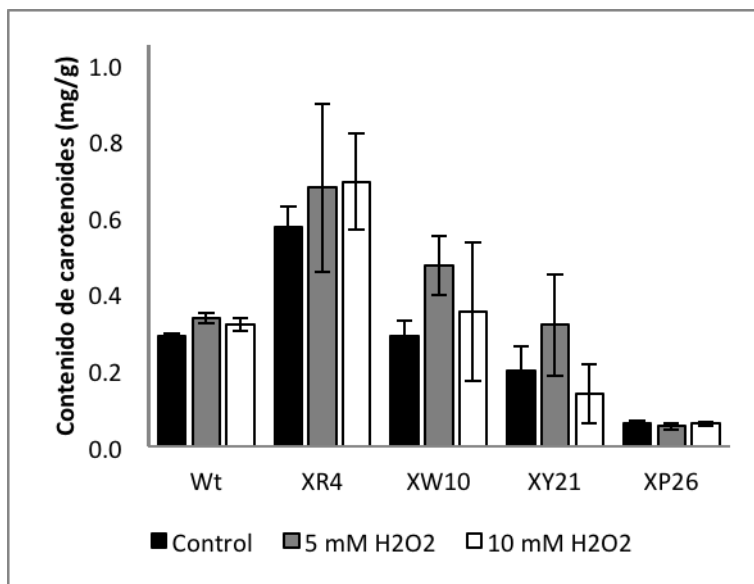


FIGURA 10. Efecto del H₂O₂ sobre la producción de carotenoides de la cepa silvestre (Wt) y mutantes (XR4, XW10, XY21 y XP24) de *P. rhodozyma* en cultivo por lote.

Por otra parte, la adición de H₂O₂ 10 mM mantuvo constante o disminuyó la producción de carotenoides por *P. rhodozyma* posiblemente porque tal concentración fue suficientemente alta para motivar un desbalance mayor al que las células pueden contrarrestar con su maquinaria antioxidante. Schroeder *et al.* (1995) expusieron a la cepa 67-385 de *P. rhodozyma* a ¹O₂ generado fotoquímicamente y encontraron que a altas concentraciones de este agente disminuyó la cantidad de carotenoides acumulados debido a la muerte celular ocasionada por dicho ROS.

Análisis proteómico

Los resultados y discusión del análisis proteómico de *P. rhodozyma* y sus mutantes se describen en el artículo “Analysis of proteomic changes in colored mutants of *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*)” (Anexo 2 del presente trabajo).

Secuenciación de regiones ITS

Para saber la variabilidad intraespecies de la cepa silvestre NRRL-Y-10921 de *P. rhodozyma* con otras reportadas en la literatura, se realizó la secuenciación de las regiones ITS y del DNA ribosómico 5.8 S de ésta. Se logró la secuenciación de 480 pb (Anexo 3) correspondientes a las regiones ITS1, DNA ribosómico 5.8 S e ITS2, sin embargo, el fragmento final presentó una gran variabilidad génica que limitó su identificación. La secuencia obtenida tuvo 95 % de identidad con las cepas CBS9090, NRRLY27348, NRRLY17442, NRRLY17434, ATCC24261, CBS5908, PYCC4172, ATCC24228 y ATCC24230 de *P. rhodozyma*. A excepción de PYCC4172, todas ellas son conocidas como la forma telemorfa de *X. dendrorhous* (Kucsera *et al.* 1998; Fell 2007; Libkind *et al.* 2007).

Secuenciación del gen *crtS*

Con el objetivo de identificar cambios genéticos que pudieran generar variaciones en el contenido de xantofilas en *P. rhodozyma* se amplificó y secuenció el gen *crtS* que codifica para la astaxantina sintasa. Esta enzima cataliza la formación de astaxantina a partir de β -caroteno. Para ello se seleccionaron la cepa silvestre (Wt) y cinco mutantes con fenotipos variados que pudieran mostrar distinta información. Éstas se describen a continuación:

- **XR5:** Mutante roja con el mismo contenido de astaxantina que Wt, la mitad de β -caroteno y no se detectó presencia de HDCO.
- **XR17:** Mutante roja con 2.8 veces más carotenoides totales, 5 veces más HDCO y 50 % menos β -caroteno.

- **XY13:** Mutante amarilla con 50 % menos carotenoides totales, de los cuales el 58 % es β -caroteno. Este contenido de caroteno es 2 veces mayor que la cepa silvestre.
- **XY21:** Mutante amarilla que acumula únicamente β -caroteno (6 veces más que la cepa silvestre) pero el contenido de carotenoides totales es aproximadamente 15 % menor.
- **XP26:** Mutante rosa que tiene aproximadamente 80 % menos carotenoides totales de los cuales el 12.5 % es HDCO (10 veces más que la cepa silvestre).

El gen *crtS* consta de 3,174 pb, de las cuales las primeras 1,250 pb se secuenciaron amplificando el fragmento por PCR. Las últimas 1,924 generaron muchas variaciones. Para resolver este inconveniente se clonó el fragmento de PCR para su secuenciación posterior.

En la secuenciación de la primera mitad del gen se usaron los pares de oligonucleótidos *crtS*-2F/*crtS*-2R y *crtS*-3F/*crtS*-3R que generan fragmentos con tamaño esperado de 1,020 pb y 1,200 pb, respectivamente. La segunda mitad se amplificó con el par de oligonucleótidos *crtS*-4F/*crtS*-1R para obtener un fragmento de 2,030 pb para su clonación posterior (Figura 11).

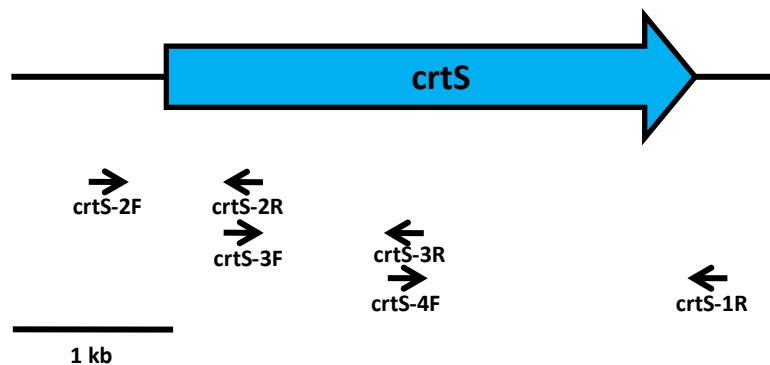


FIGURA 11. Esquema de fragmentos de amplificación del gen *crtS* con los oligonucleótidos seleccionados.

La amplificación y secuenciación de los fragmentos crtS2F/2R y crtS3F/3R se realizó por triplicado. En la Figura 12 se pueden observar los productos de amplificación con el tamaño esperado para cada una de las cepas seleccionadas.

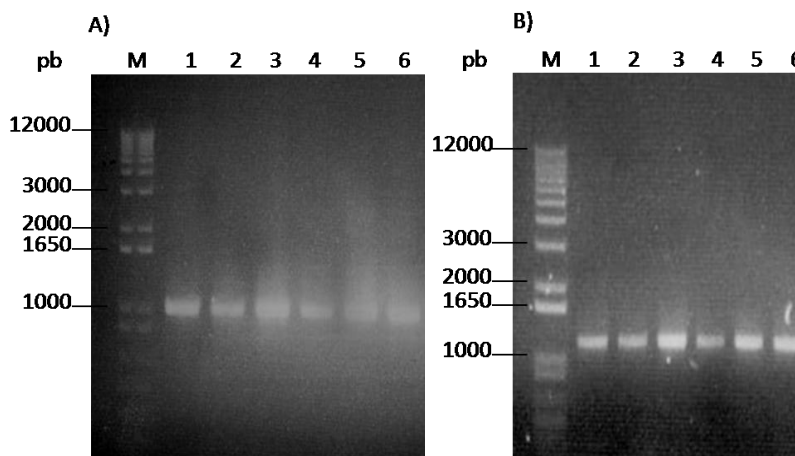


FIGURA 12. Amplificación de fragmentos de PCR para secuenciación. A) Fragmentos crtS2F/2R. B) Fragmentos crtS3F/3R. M: Marcador de tamaño molecular; carriles 1 al 6 son cepas Wt, XP26, XR5, XR17, XY13 y XY21, respectivamente.

La amplificación, clonación y secuenciación del fragmento crtS4F/1R se realizó por duplicado. En la Figura 13A se observan los fragmento de amplificación esperados, este producto de PCR se clonó en el vector pGEM-T Easy, posteriormente se seleccionaron 4 clonas de cada mutante para la extracción del DNA plasmídico. La inserción del fragmento en el vector se verificó mediante digestión del DNA plasmídico con la enzima EcoRI que liberó el vector de 3,000 pb y el fragmento de aproximadamente 2,030 pb. Éste último tiene un sitio de corte para la misma enzima que libera dos fragmentos uno de 1,380 y otro de 650 pb aproximadamente (Figura 13B). Estas clonas se usaron para la secuenciación con los oligonucleótidos crtS-4F, crtS-4R, crtS-5F y crtS-1R.

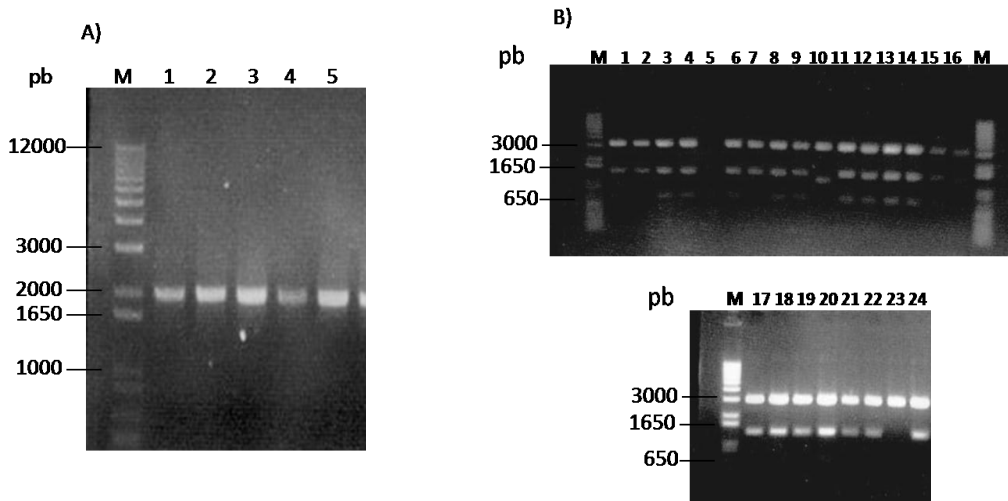
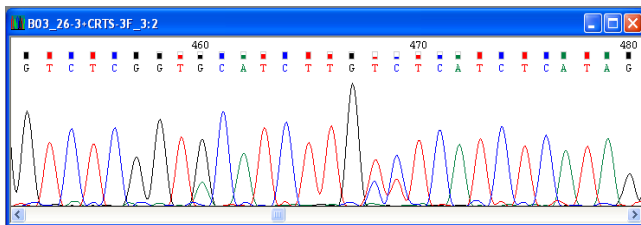


FIGURA 13. Amplificación y clonación del fragmento crtS4F/1R. A) Producto de amplificación por PCR de fragmento crtS4F/1R; carriles 1 al 8 son cepas Wt, XP26, XR5, XR17, XY13, XY21, XW10 y XW20, respectivamente. B) Digestión del DNA plasmídico de clonas con fragmento crtS4F/1R; carriles 1-4:Wt, 5-8:XP26, 9-12:XR5, 13-16:XR17, 17-20:XY13, 21-24:XY21.

Se obtuvieron cerca de 20 secuencias para cada mutante, del alineamiento de éstas se obtuvo la secuencia de DNA genómico de 3174 pb. En varias posiciones específicas del gen se encontraron mezclas de un par de nucleótidos (Figura 14A), que sugiere la existencia de al menos dos copias del mismo gen. En la secuenciación de las clonas del fragmento crtS4F/1R ya no se observaron mezclas de nucleótidos pero se encontraron nucleótidos distintos para las réplicas de una misma secuencia, ésto reafirma la suposición anterior (Niklitschek *et al.* 2008) (Figura 14B).

En el estudio del cariotipo electroforético de *P. rhodozyma* ATCC 24230, realizado por Niklitschek y colaboradores (2008) se observó que el gen *crtS* se encuentra en dos bandas cromosomales distintas, confirmando así la presencia de al menos dos copias del gen en el genoma de la levadura.

A)



B)

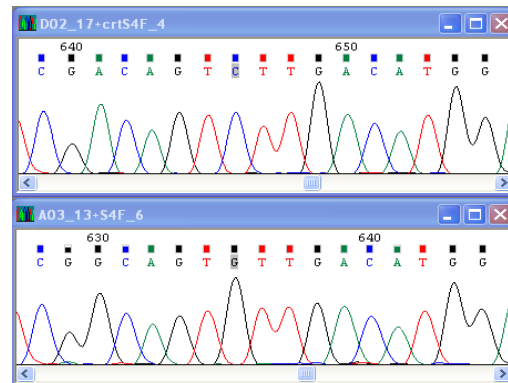


FIGURA 14. Electroferogramas representativos de los resultados de la secuenciación. A) Mezcla de nucleótidos en las posiciones 460, 468 y 469 de la secuenciación con el oligonucleótidos crtS3F de la mutante XP26. B) Secuencia del fragmento crtS4F/1R con cambios en las posiciones 641 y 646.

Debido a las mezclas de nucleótidos, se obtuvieron dos versiones del gen *crtS* (Anexo 4). La versión A (WtA) contiene los nucleótidos que son distintos a los encontrados en la base de datos de *P. rhodozyma* VKPM Y2410 en la NCBI. La versión B (WtB) mantiene las similitudes. Lo anterior con la finalidad de identificar mutaciones silenciosas, neutras, con cambio de sentido, sin sentido o cambio del marco abierto de lectura como consecuencia de esas diferencias. El marco abierto de lectura (ORF) de 1674 pb se dedujo tomando como referencia la secuencia reportada para la cepa VKPM Y2410. El alineamiento del ORF de WtA con la secuencia de referencia mostró 32 variaciones

El polipéptido deducido de las dos versiones de la secuencia de nucleótidos anterior, tiene 557 aminoácidos (Anexo 5), su masa molecular y pI predichos son 62.6 kDa y 5.67 respectivamente. Con base en la comparación de varias monooxigenasas del citocromo P-450 realizado por Álvarez *et al.* (2006) se identificaron el sitio de unión a oxígeno (₃₃₉AGYETS₃₄₄), el dominio de unión hemo (₄₈₈FISGPRACFG₄₉₇) y un dominio común en todas las proteínas del citocromo P-450 (₃₉₄ESLR₃₉₇) involucrado en el mantenimiento de la estructura tridimensional. También se observó la Cys₄₉₅ que provee el tiolato para la unión al grupo hemo, así como sitios potenciales de N-glicosilación en las posiciones 42, 86, 219 y 449.

De las 32 variaciones encontradas en el ORF, 30 fueron cambios silenciosos, es decir, que el triplete codifica para el mismo aminoácido. Las otras dos diferencias son un cambio de sentido de glicina en la posición 277 por ácido glutámico y un cambio neutro de glutamina en lugar de arginina en la posición 284.

En el alineamiento de las secuencias de aminoácidos predichas para el gen *crtS* de las mutantes seleccionadas (Anexo 6) se observaron los siguientes cambios:

- XR5: cambio de Asn→Asp₄₂.
- XR17: cambio de Asn→Asp₄₂, Lys→Glu₉₁ y Thr→Ala₃₄₆.
- XY13: cambio de Asn→Ser₄₂.
- XY21: cambio de Asn→Asp₄₂ y Arg→Leu₂₅₈.
- XP26: cambio de Phe→Ser₅₀₀.

Todas las mutaciones mencionadas se encuentran como una mezcla de ambos aminoácidos debido a que no fueron modificadas todas las copias del gen, esto permite que las deficiencias de un gen mutado puedan ser compensadas con la otra copia del mismo sin mutar.

Las cepas rojas XR5 y XR17, así como las amarillas XY13 y XY21, presentaron mutaciones en la Asn₄₂ de su secuencia de aminoácidos donde se encuentra un posible sitio de N-glicosilación, pero las diferencias en sus fenotipos no pueden ser relacionados con dichos cambios. La N-glicosilación es importante para el plegamiento, ensamble y formación de enlaces disulfuro de algunas proteínas, contribuye a la remoción de proteínas mal plegadas e influye en el tráfico de proteínas a través de la ruta de secreción (Roboti y High 2012).

Se esperaba que el marco abierto de lectura del gen *crtS* de la mutante XY21 presentara un codón de paro que explicara su fenotipo, sin embargo, se encontró el cambio de G→A en el nucleótido 1649 que corresponde a la secuencia donadora del sitio de procesamiento del intrón 9. Los grupos de trabajo de Ojima y Álvarez (2006), de manera independiente, también encontraron este tipo de mutación en el intrón 8 del gen *crtS* en otras cepas acumuladoras de β-caroteno. Este tipo de mutaciones tiene como consecuencia un ARNm inmaduro que no se

traduce a la correspondiente astaxantina sintasa o bien, una enzima inactiva (Kupfer *et al.* 2004).

La relación molar de astaxantina/ β -caroteno en las cepas Wt y XP26 es 7 y 6.3, respectivamente. En otras palabras, XP26 conservó las proporciones de conversión de producto lo que sugiere que la mutación Phe \rightarrow Ser₅₀₀ en el gen *crtS* de la mutante rosa XP26 no afecta la actividad de la astaxantina sintasa.

Secuenciación del gen *crtYB*

El fenotipo rosa de la mutante XP26 puede deberse a una deficiente actividad de la licopeno ciclasa codificada por el gen *crtYB*. Por ello se secuenció este gen en las cepas Wt y XP26 mediante amplificación por PCR del fragmento *crtYB1F/4R* de 2,927 pb (Figura 15A) y se secuenció con los oligonucleótidos *crtYB1F*, *crtYB2F*, *crtYB3F*, *crtYB4F*, *crtYB5F* y *crtYB4R* (Figura 15B).

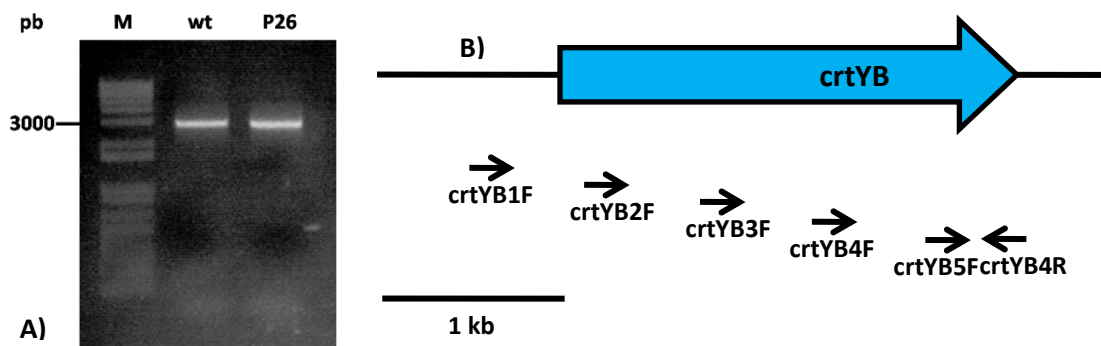


FIGURA 15. Amplificación y posiciones de los oligonucleótidos en el gen *crtYB*. A) Amplificación por PCR del fragmento *crtYB1F/4R*. B) Esquema de secuenciación del gen *crtYB*.

De la secuenciación se determinó que el gen *crtYB* consta de 2,386 nucleótidos, cuenta con cuatro intrones y el ORF es de 2,022 nucleótidos. En el ORF se encontraron 52 nucleótidos en forma de mezcla de la misma manera que se observó en el gen *crtS*.

Con el fin de evaluar las consecuencias de los cambios en las secuencias nucleotídicas de *crtYB* se generaron dos versiones del gen. Los nucleótidos

iguales a las bases de datos se asignaron a una versión del gen mientras que los nucleótidos diferentes a otra (Anexo 7). La versión con las diferencias en la secuencia de nucleótidos significan cambios de Leu→Arg₁₁₉, Glu→Lys₃₀₇, Ile→Thr₃₇₇, Gln→Arg₄₁₀, Ile→Thr₄₅₁ e Ile→Val₅₀₃ de la secuencia de 673 aminoácidos predicha para el gen *crtYB* (Anexo 8).

De la predicción del polipéptido se identificó el dominio licopeno ciclasa por duplicado en el extremo amino terminal (31-98 y 151-246) y el dominio fitoeno sintasa (299-658) en el extremo carboxilo terminal (Verdoes *et al.* 1999; Arrach *et al.* 2001). También se localizaron los aminoácidos conservados que sirven de tapa del sitio activo, los que forman el hueco de unión al sustrato, los residuos catalíticos y los sitios de unión Mg²⁺-sustrato que son regiones ricas en aspartato (Anexo 9).

La secuencia de aminoácidos predicha para la mutante XP26 presentó cambios de Asp→Asn₅₄₉ y Ser→Phe₆₁₀. Dado que estas mutaciones están dentro del dominio fitoeno sintasa y como se acumula 5 veces más fitoeno proporcionalmente que en la cepa Wt, se sugiere que estas mutaciones no son responsables del fenotipo rosa.

CONCLUSIONES

El tratamiento de *Phaffia rhodozyma* con 0.96 M·s de NTG condujo al aislamiento de mutantes con el perfil de carotenoides modificado. La letalidad del mutágeno está directamente relacionada con la dosis del mismo entre 0 y 1.2 M·s.

En las mutantes blancas (XW) y anaranjado pálido (XO) la acumulación de fitoeno se debió al daño en la fitoeno deshidrogenasa, mientras que la acumulación de β -caroteno como producto final en la cepa XY21 es debida a la inactivación de la actividad astaxantina sintasa.

Bajo condiciones de estrés oxidativo con H_2O_2 5 mM, el incremento porcentual de carotenoides totales 3.5 veces mayor en mutantes que acumulan carotenoides no oxigenados (XW10 y XY21) que en cepas que acumulan xantofilas (cepa silvestre y mutante XR4) indica que la astaxantina sintasa es un cuello de botella en la biosíntesis de xantofilas de *P. rhodozyma*.

La acumulación de fitoeno se ve inducida por estrés oxidativo (H_2O_2 5 mM) en la mutante blanca XW10 por lo que la carotenogénesis estaría siendo inducida antes de la condensación de las moléculas de GGPP para la formación de fitoeno.

Los perfiles proteómicos de las cepas mutantes con respecto a la cepa silvestre mostraron diferencias significativas. Sin embargo los perfiles de la mutante roja XR y la cepa silvestre mostraron similitud del 91%.

La sobreexpresión de BT3 (glutamato deshidrogenasa 3) acompañada de la disminución de BT1 (glutamato deshidrogenasa 1) en la mutante XR4 pueden explicar la sobreproducción de astaxantina en dicha mutante.

Las proteínas diferenciales secuenciadas BT1 y BT3, BT2, BT4, BT5, BT6, y BT8 que corresponden a las proteínas glutamato deshidrogenasa, actina, UDP-glucurónico descarboxilasa, dihidrolipoil descarboxilasa, proteína de choque térmico de 70 kDa y la SNZERR de la biosíntesis de piridoxina, respectivamente, están involucradas en la formación de carotenoides vía el ciclo de los ácidos tricarbónicos y los mecanismos de respuesta a estrés oxidativo de la célula.

El cambio de G→A en la secuencia donadora del sitio de procesamiento del intrón 9 es responsable del fenotipo amarillo de XY21. Las demás mutantes XY deben su fenotipo a un mecanismo diferente a XY21.

Las mutaciones encontradas en el gen *crtYB* de la cepa XP26 no son responsables de su fenotipo ya que el análisis de la secuencia mostró que ninguna de las diferencias tiene consecuencia en marco abierto de lectura.

PERSPECTIVAS

Estudiar la razón por la que no pueden aislarse mutantes estables de *Phaffia rhodozyma* que acumulen licopeno.

Relacionar el contenido de carotenoides en distintas cepas silvestres de *P. rhodozyma* con la susceptibilidad a inducción de mutaciones.

Secuenciar todas las copias del gen *crtS* de *P. rhodozyma* por clonación así como determinar la funcionalidad de las mismas mediante ensayos de Northern blot.

Mutagenizar la cepa XR4 para incrementar la velocidad de crecimiento y aumentar la productividad en la fermentación de *P. rhodozyma* para hacerla un microorganismo más competitivo industrialmente.

Silenciar o disminuir la expresión del gen *GDH1* acompañado de la sobreexpresión de *GDH3* con la finalidad de comprobar su efecto en la producción de carotenoides.

Comprobar la función de todas las proteínas identificadas como posibles responsables de cambios en la producción de carotenoides.

REFERENCIAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Roberts K y Walter P (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science

Alcaíno J, Barahona S, Carmona M, Lozano C, Marcoleta A y Niklitschek M (2008) Cloning of the cytochrome p450 reductase (*crtT*) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiol* 8: 1-13

Álvarez V, Rodríguez-Sáiz M, de la Fuente J L, Gudiña E J, Godio R P, Martín J F y Barredo J L (2006) The *crtS* gene of *Xanthophyllomyces dendrorhous* encodes a novel cytochrome-P450 hydroxylase involved in the conversion of beta-carotene into astaxanthin and other xanthophylls. *Fungal Genet Biol* 43: 261-272

An GH, Schumau D B y Johnson E A (1989) Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl Environ Microb* 55: 116-124

Arrach N, Fernández-Martín R, Cerdá-Olmedo E y Ávalos J (2001) A single gene for lycopene ciclase, phytoene synthase, and regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *PNAS* 98: 1687-1692

Azqueta A y Collins A R (2012) Carotenoids and DNA damage. *Mutat Res/Fundamental* 733:4-13

Bhosale P y Bernstein P S (2005) Microbial xanthophylls. *Appl Microbiol Biot* 68: 445-455

Britton George (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The EASER J* 9: 1551-1558

Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (2004) *Carotenoids Handbook*. Basel: Birkhäuser

Calo P, de Miguel T, Velázquez J B y Villa T G (1995) Mevalonic acid increases trans-astaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol Lett* 17: 575-578

Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri G M, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L y Righetti P G (2004) Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25: 1327–1333

Cerdá-Olmedo E y Lipson E D (1987) *Phycomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. Pág. 337

Das A, Yoon S H, Lee S H, Kim J Y, Oh D K y Kim S W (2007) An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools. *Appl Microbiol Biot* 77:505–512

Ducrey Santopietro L M, Spencer J F T, Spencer D M y Siñeriz F (1998) Effects of oxidative stress on the production of carotenoid pigments by *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*). *Folia Microbiol* 43:173-176

Dufossé L, Galaup P, Yaron A, Arad S M, Blanc P, Murthy K N C y Ravishankar G A (2005) Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends Food Sci Tech* 16: 389–406

Estrada A F, Maier D, Scherzinger D, Avalos J y Al-Babili S (2008) Novel apocarotenoid intermediates in *Neurospora crassa* mutants imply a new biosynthetic reaction sequence leading to neurosporaxanthin formation. *Fungal Genet Biol* 45:1497–1505

Fell J W, Scorzetti G, Statzell-Tallman A y Boundy-Mills K (2007) Molecular diversity and intragenomic variability in the yeast genus *Xanthophyllomyces*: the origin of *Phaffa rhodozyma*? *FEMS Yeast Res* 7: 1399–1408

Gassel S, Schewe H, Schmidt I, Schrader J y Sandmann G (2013) Multiple improvement of astaxanthin biosynthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous* by a combination of conventional mutagenesis and metabolic pathway engineering. *Biotechnol Lett* 35:565–569

Golubev Wladyslav I (1995) Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Yeast*. 11: 101-110

Guo J, Jones M J y Ulrich J (2010) Polimorphism of 3,3-dihydroxy- β,β -carotene-4,4-dione (astaxanthin) *Chem Eng Res Des* 88: 1648–1652

Higuera-Ciajara I, Félix-Valenzuela L y Goycoolea F M (2006) Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Crit Rev Food Sci* 46: 185-196

Hu Z C, Zheng Y G, Zhao W y Shen Y C (2006) pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enzyme Microb Tech* 39: 586-590

Hussein G, Sankawa U, Goto H, Matsumoto K y Watanabe H (2006) Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *J Nat Prod* 69: 443-449

IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry and the IUPAC—IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1974) Nomenclature of Carotenoids. IUPAC London

Jackson H, Braun C L y Ernst H (2008) The chemistry of novel xanthophyll carotenoids. *Am J Cardiol* 101: 50-57

Johnson E A (2003) *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. *Int Microbiol* 6: 169-174

Johnson E A y An G H (1991) Astaxanthin from microbial sources. *Crit Rev Biotechnol* 11: 297-326

Krinsky N I (1994) The biological properties of carotenoids. *Pure Appl Chem* 66(5): 1003-1010

Kucsera J, Pfeiffer I y Ferenczy L (1998) Homothallic life cycle in the diploid red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Ant Leeuw* 73:163-168

Kupfer D M, Drabenstot S D, Buchanan K L, Lai H, Zhu H, Dyer D W, Roe B A y Murphy J W (2004) Introns and Splicing Elements of Five Diverse Fungi. *Eukaryotic cell* 3: 1088-1100

Laemmli U K (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685

Lee S H, Sun N K, Jang J W, An G H, Won M y Song K B (2004) Characterization of *Phaffia rhodozyma* 3A 4-8 generated by low-dose gamma-irradiation. *J Food Sci* 69: 258-261

Li J, Zhu D, Niu J, Shen S y Wang G (2011) An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol Adv* 29: 568–574

- Libkind D, Ruffini A, van Broock M, Alves L y Sampaio J P** (2007) Biogeography, host specificity, and molecular phylogeny of the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma* and its sexual form *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Environ Microbiol* 73: 1120-1125
- Liu Y S y Wu J Y** (2006) Hydrogen peroxide-induced astaxanthin biosynthesis and catalase activity in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Microbiol Biot* 73: 663-668
- Lodato P, Alcaíno J, Barahona S, Retamales P, Jiménez A y Cifuentes V** (2004) Study of the expression of carotenoid biosynthesis genes in wild-type and deregulated strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Ex.: *Phaffia rhodozyma*). *Biol Res* 37: 83-93
- Lowry O H, Rosebrough N J, Farr G L y Randall R S** (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Martín J F, Gudiña E y Barredo J L** (2008) Conversion of beta-carotene into astaxanthin: Two separate enzymes or a bifunctional hydroxylase-ketolase protein? *Microb Cell Fact* 7: 1-10
- März U** (2011) The Global Market for Carotenoids. *BCC Research* <http://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/carotenoids-global-market-fod025d.html>
- McNulty H, Jacob R F y Mason P** (2008) Biologic activity of carotenoids related to distinct membrane physicochemical interactions. *Am J Cardiol* 101: 20-29
- Miao L, Chi S, Tang Y, Su Z, Yin T, Guan G y Li Y** (2010) Astaxanthin biosynthesis is enhanced by high carotenogenic gene expression and decrease of fatty acids and ergosterol in a *Phaffia rhodozyma* mutant strain. *FEMS Yeast Res* 11: 192–201
- Mijts B N, Lee P C y Schmidt-Dannert C** (2004) Engineering carotenoid biosynthetic pathways. *Method Enzymol* 388: 67-74
- Miller M W, Yoneyama M y Soneda M** (1976) *Phaffia*, a new yeast genus in the *Deuteromycotina*(*Blastomycetes*). *Int J Syst Bact* 26: 286-291
- Molloy M P** (2008) Isolation of bacterial cell membranes proteins using carbonate extraction. *Methods Mol Biol*, New Jersey 424: 397-401

Niklitschek M, Alcaíno J, Barahona S, Sepúlveda D, Lozano C, Carmona M, Marcoleta A, Martínez C, Lodato P, Baeza M y Cifuentes V (2008) Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biol Res* 41: 93-108

Olaizola M (2000) Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. *J Appl Phycol*. 12: 499-506

Ojima K, Breitenbach J, Visser H, Setoguchi Y, Tabata K, Hoshino T, van den Berg J y Sandmann G (2006) Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a β -carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. *Mol Genet Genomics* 275: 148-158

Papp Tamás, Velayos A, Bartók T, Eslava A P, Vágvölgyi C y Iturriaga E A (2006) Heterologous expression of astaxanthin biosynthesis genes in *Mucor circinelloides*. *Appl Microbiol Biotechnol* 69: 526-531

Pashkow F J, Watumull D G y Campbell C L (2008) Astaxanthin: A novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 101: 58D-68D

Pradedova E V, Isheeva O D y Salyaev R K (2011) Classification of the antioxidant defense system as the ground for reasonable organization of experimental studies of the oxidative stress in plants. *Russ J Plant Physiol* 58: 210–217

Rodriguez-Amaya D B y Kimura Mieko (2004) HarvestPlus handbook for carotenoid analysis. *HarvestPlus Technical Monograph 2*, Washington, DC. Págs. 38-42.

Rodriguez-Saiz M, de la Fuente J L, Barredo J L (2010) *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. *Appl Microbiol Biotechnol* 88:645-658

Salazar-González M (2000) La astaxantina y su biosíntesis. *ContactoS* 36: 61-64

Sandmann G, Albrecht M, Schnurr G, Knörzer O y Böger P (1999) The biotechnological potential and design of novel carotenoids by gene combination in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 17: 233-237

- Schmidt I, Schewe H, Gassel S, Jin C, Buckingham J, Hümbelin M, Sandmann G y Schrader J** (2011) Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Microbiol Biotechnol* 89: 555–571
- Schroeder W A y Johnson E A**(1993) Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. *J Gen Microbiol* 139: 907-912
- Schroeder W A y Johnson E A** (1995) Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *J Biol Chem* 270: 18374-18379
- Sedmak J J, Weerasinghe D K y Jolly SO** (1990) Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol Tech* 4: 107-112
- Sies H** (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82: 291-295
- Ukibe K, Hashida K, Yoshida N y Takagi H** (2009) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for astaxanthin production and oxidative stress tolerance. *App Environ Microbiol* 75:7205–7211
- Umeno D, Tobias A V y Arnold F H** (2005) Diversifying carotenoid biosynthetic pathways by direct evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* 69: 51-78
- Verdoes J C, Krubasik K P, Sandmann G y Van Ooyen A J** (1999) Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Mol Gen Genet* 262: 453-461
- Verwaal R, Wang J, Meijnen J P, Visser H, Sandmann G, van den Berg J A y van Ooyen A**(2007) High level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Environ Microbiol* 73: 4342-4350
- Visser H, van Ooyen A J J y Verdoes J C** (2003) Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *FEMS Yeast Res* 4: 221-231
- Wang F, Jiang J G y Chen Q** (2007) Progress on molecular breeding and metabolic engineering of biosynthesis pathways of C30, C35, C40, C45, C50 carotenoids. *Biotechnol Adv* 25: 211-222

Yamane Y, Higashida K, Nakashimada Y, Kakizono T y Nishio N (1997) Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis. *Appl Environ Microbiol* 63: 4471-4478

ANEXO 1

ANEXO 2

Analysis of proteomic changes in colored mutants of *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*)

Alejandra Barbachano-Torres¹, Lina M Castelblanco-Matiz¹, Ana C Ramos-Valdivia¹, Carlos M Cerda-García-Rojas², Luis M Salgado³, César M Flores-Ortiz⁴ and Teresa Ponce-Noyola^{1*}

¹Department of Biotechnology and Bioengineering. CINVESTAV-IPN 07360 México.

²Department of Chemistry, CINVESTAV-IPN 07360 México.

³CICATA-Qro, Instituto Politécnico Nacional 76090 México.

⁴FES-Iztacala UNAM 54090 México

*Correspondence: Teresa Ponce-Noyola. Department of Biotechnology and Bioengineering. CINVESTAV-IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional # 2508. Zacatenco, Gustavo A. Madero, 07360 Mexico City, Mexico. Tel. +52 55 5747 3800; e-mail: tponce@cinvestav.mx

Abstract

The yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* synthesizes astaxanthin as its most prevalent xanthophyll derivative. Comparisons between the protein profiles of mutant lines of this yeast can provide insight into the carotenogenic pathway. Differently colored mutants (red, orange, pink, yellow and white) were obtained from this yeast species, and their protein profiles were determined using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2DE). Individual proteins differentially expressed were identified using mass spectrometry. The red mutants hyperproduced total carotenoids (mainly astaxanthin), while in white and orange mutants, mutagenesis affected the phytoene dehydrogenase activity as indicated by the accumulation of phytoene. Inactivation of astaxanthin synthase after the mutagenic treatment was evident in β -carotene accumulating mutants. Differences in the proteomic profiles of wild type *X. dendrorhous* and its colored mutants were demonstrated using 2DE. Of the total number of spots detected in each gel (297-417), 128 proteins were present in all strains. The red mutant showed the greatest number of matches with respect to the wild type (305 spots), while the white and yellow mutants, which had reduced concentrations of total carotenoids, presented the highest correlation coefficient (0.6) between each other. A number of differentially expressed proteins were sequenced, indicating that tricarboxylic acid cycle and stress response proteins are closely related to the carotenogenic process.

Keywords

Carotenoid biosynthesis; proteomic profile; secondary metabolism; stress response; tricarboxylic acid cycle

Introduction

Carotenoids are natural pigments synthesized by plants and microorganisms (Sandmann et al. 1999). Astaxanthin is an orange-red carotenoid that possesses more powerful free radical quenching activity than the carotenoids β -carotene and lycopene (McNulty et al. 2008). The first compound has been implicated in the improvement of the immune response, protection against UV light effects, and prevention of degenerative conditions such as cancer, cardiovascular diseases and cataracts (Johnson and Ann 1991; Hu et al. 2006). This pigment can be used as a nutraceutical product, as well as a colorant in cosmetology and the food industry; however, 90% of astaxanthin production is directed to the aquaculture industry for salmon feeding (Olaizola 2000; Verdoes et al. 2003; Long 2004).

The main sources of astaxanthin are crustacean byproducts, the microalgae *Haematococcus pluvialis*, the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (formerly known as *Phaffia rhodozyma*) and chemical synthesis (Johnson and Ann 1991). The potential of *X. dendrorhous* as an industrial astaxanthin producer is supported by its synthesis of astaxanthin as its main carotenoid, its lack of a light requirement for growth and pigmentation, and its high specific growth rate. The main obstacle to the use of the yeast is its low production yields (Yamane et al. 1997; Johnson 2003; Bhosale and Bernstein 2005).

Astaxanthin and ergosterol are isoprenoids belonging to the conserved mevalonate pathway in *X. dendrorhous*. Carotenoid biosynthesis, including astaxanthin, is a well-regulated process, and a number of works have hypothesized a possible astaxanthin biosynthetic pathway (Misawa and Shimada 1998; Verdoes et al. 2003, Martínez-Moya et al. 2011). A proteomic analysis of this yeast in the exponential and stationary phases provided an overview of potentially important carotenogenesis-related proteins (Martinez-Moya et al. 2011). However, no previous work has compared the protein profiles of *X. dendrorhous* mutants, which could separate those proteins important to carotenogenesis from those related to the tricarboxylic acid cycle (Chávez-Cabrera et al. 2010).

Expression proteomics allows for the identification of novel proteins involved in a biosynthetic pathway and may provide new insight into regulatory mechanisms (Wang et al. 2010). Forward mutations and metabolic suppressors have been used for years to determine the functions of and relationships between normal gene products, as well as to provide the raw material for the analysis of gene product structure-function relationships (Lawrence 2002). In the present work, the protein

profiles of colored mutants of *X. dendrorhous* were compared to gain insight into the potential protein network related to the carotenogenic pathway in this yeast.

Materials and Methods

Microorganism and culture conditions

A wild-type culture of *Xanthophyllomyces dendrorhous* (CDBB-L-685) was obtained from the “Colección Microbiana Departamento de Biotecnología y Bioingeniería”, CINVESTAV Mexico. Accession numbers in other microbial collections: NRRL Y-10921; ATCC 24202; CBS 5905. Wild and mutant strains were grown in 250 mL baffled flasks containing 50 mL of YM medium (DIFCO, USA), with 1% glucose (JT BAKER, Mexico) as the carbon source, and incubated for 48 h at 20 °C and 150 rpm. The inoculum size was 10% v/v. For the carotenoid content experiments, the cells were grown in YM-agar cultures for 7 days at 20 °C.

The cells in the liquid cultures were recovered by centrifugation at 5,000 rpm for 10 min and were washed twice with distilled water. The recovered pellet was resuspended in distilled water to the original volume and used for further analysis.

Mutagenesis conditions

Mutant strains were obtained through N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) treatment (Sigma-Aldrich). Cell suspension in exponential growth phase were harvested and treated with a dose of 0.96 M·s NTG. The cell suspensions with the mutagen were incubated in darkness under slight agitation. About 1×10^6 cells/mL exposed, were gently but continuously shaken during exposure at 22 °C. Cells were washed three times with sterile distilled water by centrifugation before plating in YM agar. Mutants were screened by visual examination of isolated colonies after 7 days of incubation at 22 °C (González-Roncero et al. 1984)

Carotenoid extraction and quantification

The cells were lyophilized, then macerated in a mortar with silicon dioxide. Acetone was added to the disrupted cells, and the mixture was agitated vigorously before the organic phase was recollected. This step was repeated until colorless acetone was obtained. The organic phase was volatilized with a stream of nitrogen, and the carotenoids were resuspended in 100 μ L of hexane (Sedmak et al. 1990). Total carotenoid content was estimated spectrophotometrically at the

absorbance maxima of each metabolite: 480 nm for astaxanthin, 287 nm for phytoene and 450 nm for β -carotene (Ann et al 1989). Carotenoid content was calculated using an $E1\% = 2100$ for astaxanthin, 2590 for β -carotene and 760 for phytoene. The carotenoid analysis was conducted using an HPLC (HP 1100 series) with a diode array detector (DAD), Hypersil ODS-2 (C18) 5 μ m (4.6 x 150mm) column and acetonitrile:methanol:chloroform (47:47:6) as mobile phase with a flow rate of 1 mL/min. The identification and quantification of the pigments was based on their retention times and peak areas.

Protein extraction

Whole-cell protein extracts were obtained from a 20 h old culture, corresponding to the beginning of carotenoid biosynthesis. The cell pellet was macerated with liquid nitrogen in a mortar until a fine powder was obtained, then resuspended in 5 mL of 50 mM Tris- HCl pH 7.4 and 0.5 mM PMSF. Subsequently, 5 mL of 100 mM sodium carbonate solution were added, and the suspension was incubated for 1 h on ice (Molloy 2008). The cell debris was separated by centrifugation at 6,000 rpm for 20 min at 4 °C (Eppendorf 5804R).

The proteins from the aqueous phase were precipitated using a 10% final concentration of trichloroacetic acid (TCA) and recovered by centrifugation at 10,000 rpm for 15 min. The supernatant was then discarded, and the protein pellet was washed with acetone to remove the remaining TCA and with 70% ethanol to remove any salts. The remaining ethanol was evaporated, and the pellet was resuspended in 200 μ L of modified Rehydration Buffer (mRB) (7 M urea, 2 M thiourea, 1% CHAPS, 0.5% Triton X-100, 40 mM Tris-HCl, 0.5% ampholites 3-10 and 0.1% bromophenol blue). The insoluble particles were separated by centrifugation at 10,000 rpm for 15 min and discarded. The protein solution was desalted in Micro Bio Spin G-30 columns (Bio Rad) using Rehydration Buffer (Bio Rad).

Analysis

The cell growth was determined by measuring the optical density at 660 nm. The lyophilized cells were weighed to record dry weight. The protein content was quantified according to Lowry et al. (1951).

Electrophoresis

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed using 10% gels, according to Laemmli (1970).

Two-dimensional gel electrophoresis (2DE) was conducted using 11 cm immobilized pH gradient (IPG) strips with a pH range of 3-10 (Bio-Rad). The strips were rehydrated with 200 µg of the protein sample at 50 V for 13 h at 20 °C, and focusing proceeded according to the supplier's specifications. After IEF, the strips were equilibrated in an equilibrium solution (1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 1% DTT, 30% glycerol, 2% SDS, 0.002% bromophenol blue) for 15 min under mild agitation, then for 15 min more in the same buffer solution with DTT replaced by 4% iodoacetamide. For the second dimensional separation, the strips were laid on top of the 12% precast gels and sealed with agarose. Running buffer (0.025 M Tris base, 0.192 M glycine, and 0.1% SDS, pH 8.8) was used at 1X and 200 V until the end of the run.

The protein samples were stained with colloidal Coomassie G-250 (Candiano et al. 2004). At least three independent 2DE experiments were performed for each strain.

The gels were scanned using a Gel-Doc calibrated densitometer (BioRad) at a resolution of 600 dpi, and the images were processed and analyzed using PDQuest 2DE Gel Analysis Software (BioRad) with the ANOVA t-test. The protein spots were manually excised and sent to the Arizona Proteomics Consortium College of Pharmacy for sequencing. The data were searched against the Uniprot/Swiss-Prot protein database for protein identification.

Statistical analyses

All experiments were performed in triplicate. Analyses of variance (ANOVA) were done with NCSS, 2007 for Windows. Reported values were considered significantly different at $\alpha = 0.05$.

Results and Discussion

Mutant isolation

Astaxanthin is a pigment with high added value, however more studies are required to understand the biochemical, physiological and biological processes for optimizing its production. One method to study this process is to obtain mutants of a selected microorganism, which be able to produce

different pigment intermediates. Carotenogenic mutants as those of *Xanthophyllomyces dendrorhous* may provide information that help to understand the astaxanthin production. Therefore, this yeast was subjected to mutagenic treatments with different NTG dosages to determine the adequate dose (D) required for an increased number of mutants with modified carotenoid profiles (Supplementary Fig. 1). *X. dendrorhous* treated with NTG at different doses exhibited a direct relation of lethality with the mutagen dose. This relationship behaved exponentially ($S = 358.8e^{-6.01D}$) until 1.22 M.s, where S is the survival percentage and D is the dose of NTG. A dose of 0.96 M.s led to a 1% total survival rate of cells, with a mutant frequency of 7.5×10^{-4} . The mutagenic treatments generated 114 strains with color or morphological changes, but only 27 of these strains were selected for their differences in total carotenoid contents.

The mutants of *X. dendrorhous* were classified based on their color into one of the following groups: white (XW), yellow (XY), pale orange (XO), pink (XP) or red (XR) (Fig. 1). To characterize the mutant strains for their carotenoid contents and their differences with respect to the wild type, HPLC analysis was performed after 7 days of growth in YM-agar cultures (Table 1).

The XO, XP and XR mutants accumulated astaxanthin as the main colored carotenoid, and the differences among their phenotypes were dependent on the quantity and proportion of each carotenoid (Table 1). Nearly all of the red mutants (XR) exhibited increased astaxanthin content in comparison with the wild strain (Wt). The mutants XR4 and XR17 increased by 2.6 and 2.9 fold over the wild type, respectively reaching 2.28 and 2.50 mg of the xanthophyll / (g dry cell weight). This increase, combined with the high molar ratio of astaxanthin/ β -carotene (26.7 and 12.1) observed in XR4 and XR17, led to a more intense red color in these mutants. As it was expected, the XR mutants produced more astaxanthin than the wild strain. In a previous study, An et al. (1989) isolated the *Phaffia rhodozyma* mutant ant-1-4 from a double mutagenic treatment with 50 μ M antimycin A and NTG, which produced approximately 3 times more astaxanthin (0.9 to 1.3 mg/g) than the parental UCD-FST 67-385 wild type. Cifuentes et al. (1997) obtained mutants from *P. rhodozyma* UCD 67-385 using 40 μ g/mL NTG. The survival rate of this experiment was 0.5%, and the resulting atxS1 mutant produced 1.37 mg of astaxanthin/ g dcw (dry cell weight) (3.7 fold increase). After ion beam implantation on *P. rhodozyma* ZJB 00010, Liu et al. (2008) obtained the mutant E5042, which produced 2.51 mg/g dcw of total carotenoids in comparison to the wild-type strain production of approximately 1.11 mg/g. This value represents an increase of 2.3 fold, which is according to that of the present results.

All of the white mutants (XW) accumulated phytoene in the same proportion (Table 1), indicating that phytoene dehydrogenase (desaturase) activity, which catalyzes the desaturation of phytoene to form lycopene, was decreased by the mutagenic treatment and the astaxanthin synthesis flux was

diverted to other carotenoids. In the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*, mutants with changes on the carotenoid biosynthesis pathway, before the formation of colored carotenoids, exhibited a "blue-green" phenotype, in contrast to the red one of wild type cells. Two of these strains accumulated phytoene, and an *in vitro* assay confirmed that these mutants failed to dehydrogenate phytoene (Giuliano et al. 1986). Qin et al. (2007) obtained albino mutants that accumulated phytoene using a T-DNA insertion within the phytoene desaturase gene, generating same phenotype to that of the white mutants obtained in the present study.

In the pale orange mutants (XO), over half of the total carotenoid contents corresponded to phytoene. This result suggests a deficiency in phytoene dehydrogenase, as also occurred in the XW mutants.

As it was expected, the yellow mutants (XY) accumulated β -carotene as the main colored carotenoid (11-36%), while astaxanthin and the other xanthophylls represented up to 10% and the remaining total carotenoid content consisted of phytoene. In these mutants where a slight presence of astaxanthin was detected, the cytochrome P450 reductase (CPR) may be damaged allowing the accumulation of β -carotene, but a possible alternative electron donor may provide sufficient for the synthesis of astaxanthin (Alcaíno et al. 2008). However in XY21 mutant xanthophylls were absent, these results suggested the inactivation of astaxanthin synthase activity in analogy to phytoene dehydrogenase. The sequencing of the *crtS* gene in XY21 showed a G→A change in nucleotide 1649, which corresponds to a donor sequence of the intron 9 splicing site (data not shown); this change may have caused the inappropriate processing of the mRNA which resulted in a damaged protein. Álvarez et al. (2006) and Ojima et al. (2006) observed similar mutations in the intron 8 regions of other β -carotene accumulating strains, which also led to enzyme inactivity.

Among the pink mutants (XP), XP26 produced 10 times more HDCO than the wild type, proportionally. The molar ratio of astaxanthin/ β -carotene was 7 in the wild type strain, and this ratio was similar to that observed in the XO and XP mutants. This indicated that the conversion product rate of astaxanthin synthase was retained and the *crtS* gene was apparently unaffected by mutagenesis. Conversely, the high proportions of torulene and HDCO in the XP mutants suggested that lycopene cyclase was modified. These monocyclic carotenes were accumulated and oxidized in the beta ring to generate HDCO. Verdoes et al. (1999), overexpressing the *crtI* gene in *X. dendrorhous*, obtained pink and dark red transformants with increased total torulene (red color) and HDCO (pink color) contents, while simultaneously decreasing the quantities of the bicyclic carotenoids echinenone and astaxanthin.

In the present work we did not find mutants that accumulate lycopene neither mutants that not produced any carotenoid. These results suggest that the bifunctional enzyme phytoene

synthase/lycopene cyclase, encoding for *crtYB* gene, was not inactivated or multiple copies of this gene are present in the genome of *X. dendrorhous*. Kucsera et al. (1998) and Medwid (1998) determined that *X. dendrorhous* (CBS 5905; ATCC 24202) is polyploid, therefore mutants of *X. dendrorhous* are heterozygotes for the *crtYB* gene with a mutant and a wild type allele, which may explain the absence of phytoene synthase/lycopene cyclase defective mutants. Kucsera et al. (1998) also stated that the possibility of aneuploidies in the population should not be excluded. If aneuploidies do in fact exist, several chromosomes may be present as a single copy, which could explain the presence of mutants for *crtS*.

Hermosilla et al. (2003) found that *X. dendrorhous* is diploid and could be in a condition of natural heterozygosis, in which one homologous chromosome contains a wild-type allele while the other contains a nonfunctional allele. These results could explain the higher frequency of *X. dendrorhous* mutants observed to be defective in phytoene desaturase (coded by *crtI*) and astaxanthin synthase (coded by *crtS*) as opposed to those deficient in phytoene synthase/lycopene cyclase (coded by *crtYB*).

All of the enzymes of the carotenoid biosynthetic pathway in *X. dendrorhous* were rendered deficient in this work with the exception of phytoene synthase/lycopene cyclase, suggesting that several copies of the gene coding for this bifunctional enzyme are present in the genome and indicating the importance of these pigments to the yeast. The maintenance of the molar ratio of astaxanthin/ β -carotene in the XO and XP mutants, as well as its increase in the XR mutants, indicates that astaxanthin synthase and cytochrome P450 reductase are bottleneck to xanthophyll biosynthesis in *X. dendrorhous*.

Protein profiles

The strains Wt, XR4, XW10 and XY21, each belonging to a different group of mutants but possessing similar growth kinetics, were analyzed for their protein profiles and compared to gain insight into carotenoid metabolism. Protein extracts were obtained from cultures 20 h old; the point at which the exponential growth phase ends and pigment accumulation from secondary metabolism begins (Barbachano-Torres et al. 2012). The protein quantification for 2DE was confirmed using SDS-PAGE.

After normalizing the total quantity of valid spots in with PDQuest software and visual observation, 2DE gel image analysis indicated both qualitative and quantitative differences in the number and spot intensity of the 2DE patterns for the four strains. Most of the protein spots were resolved in the

5-8 pH and 14-200 kDa ranges. These protein patterns were reproducible in independent cell extracts.

Of the total number of spots detected in each gel (297-417), 128 were present in all of the samples (Table 2). There were greater differences in the numbers of resolved and variable spots between Wt and XY21 than in the other strains (14 variable spots), while the highest profile similarity was observed between Wt and XR4.

Approximately 91% of the spots found for XR4 corresponded with those of the Wt strain, while 23 of these were overexpressed in XR4. For the XW10 strain, spots in the pH 6-8 range were not easily detected. XY21 presented 289 identical spots from 300 present in the replicates in comparison with the Wt; many of these spots had significantly different intensities, but the main pattern was conserved between the two strains. The protein patterns of XW10 and XY21 were the most similar among the strains, with a correlation coefficient of 0.6.

Protein identification

Eight differentially expressed proteins were selected for sequencing and identification (spot quantity scores are detailed in Table 3). Cross-species protein identification was employed because the genes and proteins of *X. dendrorhous* have been poorly characterized.

The comparison of the differentially expressed protein spots from *X. dendrorhous* wild type and mutant strains indicated a high degree of change due to mutagenic treatment.

Protein spot BT1 [NADP(H) dependent glutamate dehydrogenase (GDH1)] was selected based on its decreased intensity in XR4 in comparison with Wt, XW10 and XY21 strains. BT2 (actin) was identified only in XR4; BT3 [NADP(H) dependent glutamate dehydrogenase (GDH3)] was increased in XR4, while BT4 (UDP-glucuronic acid decarboxylase) was decreased in all of the mutants. BT5 (dihydrolipoyl-dehydrogenase) increased in XR4 in comparison to the Wt, but decreased in XW10 and XY21. BT6 (heat shock 70 kDa protein) was not detected in XY21, while BT7 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) and BT8 (a probable pyridoxine biosynthesis SNZERR) were overexpressed in XR4 and nearly absent in XY21 (Fig. 2). It is worth of mention that the proteins identified in spots BT1, BT3, BT5 and BT7 belong to primary metabolism.

The proteins of the BT1 and BT3 spots were identified as NADP(H) dependent glutamate dehydrogenase (GDH1) and (GDH3) respectively, involved in ammonia assimilation and glutamate biosynthesis, catalyzing the reductive amination of α -keto-glutarate to form glutamate (Asadollahi et

al. 2009; Rodríguez-Sáiz et al. 2009). These GDH's have different molecular weights and similar pI (Table 3). In *Saccharomyces cerevisiae* there are three glutamate dehydrogenase enzymes encoded by *GDH1*, *GDH2* and *GDH3*. *GDH3* appears to have arisen from gene duplication of *GDH1* within whole genome, while *GDH2*, unlike the other two, is an NADH-dependent enzyme (DeLuna et al. 2001; Kampranis and Makris 2012).

The existence of multiple isoforms of NADP-GDH activity would provide the pacemaker mechanism necessary to optimize glutamate biosynthesis under either fermentative or respiratory conditions without compromising the energy-yielding metabolism (Miller and Magasanik 1990; DeLuna et al. 2001). Asadollahi et al. (2009) and Kocharin (2013) found that deletion of *GDH1* gene in *S. cerevisiae*, caused a significant decrease in the maximum specific growth rate of this strain, but overexpression of *GDH2* partially restored the growth of *GDH1* deficient mutants as an alternative pathway for ammonium assimilation. This condition enhanced the available NADPH in the cytosol for other NADPH requiring enzymes including HMG-CoA reductase. The conversion of HMG-CoA to mevalonate is an NADPH requiring step, and deletion of *GDH1* could be beneficial for carbon flux through the mevalonate pathway which provides the precursor for the biosynthesis of carotenoids (Kampranis and Makris 2012). XR4 strain could be a *GDH1* (BT1) suppressed mutant combined with the increase of *GDH3* (BT3), which might shift the metabolic flux towards the ergosterol pathway and then enhanced carotenoid production.

On the other hand, as GDH catalyzed reductive amination of α -keto-glutarate to form glutamate, deficiency in this activity could increase levels of α -keto-glutarate, which could result in an increase of tricarboxylic acid cycle activity associated with the production of large quantities of reactive oxygen species. An (2001) reported that nitrogen assimilation and the concentration of tricarboxylic acid cycle intermediates were involved in regulation of carotenoid biosynthesis.

BT5 corresponds to a dihydrolipoyl dehydrogenase (E_3), a flavoprotein component of the multienzyme pyruvate dehydrogenase and, α -keto-glutarate dehydrogenase (α -KGDH) complexes located in the mitochondria (Browning et al. 1988). The activity of dihydrolipoyl dehydrogenase-containing enzymes over its substrates, pyruvate and α -keto-glutarate, promoted pronounced reactive oxygen (ROS), due to multiple one-electron transfer reactions (Tahara et al. 2007). In addition, α -KGDH is regulated by the NADH/NAD⁺ ratio (Tretter and Adam-Vizi 2005). High respiratory and TCA cycle activity is associated with production of large quantities of ROS, which has been demonstrated that enhance carotenoid production in *P. rhodozyma* (Schroeder and Johnson 2003). The increased production of E_3 could be enhancing activity of α -KGDH and then production of ROS, which stimulate carotenoid production. NADH supply to the respiratory chain is limited only when α -KGDH is also inhibited by ROS.

BT7, identified as a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, was overexpressed in XR4 (Verdoes et al. 1997). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, α -keto-glutarate dehydrogenase complex and glutamate dehydrogenase are related to the production of high-energy intermediaries that would be useful to astaxanthin production, specifically for astaxanthin synthase activity. However, in astaxanthin formation as well as fatty acid biosynthesis, acetyl-CoA is required, and citrate is known to be the precursor of this acetyl-CoA (Chávez-Cabrera et al. 2010; Lee et al. 2012). Latter enzymes may modify acetyl-CoA production related to carotenoid formation by linking carbohydrate (energy) and nitrogen metabolism (Rodríguez-Sáiz et al. 2009; Chávez-Cabrera et al. 2010).

On the other hand, the other identified proteins were not related to primary metabolism or energy management in the cells, however they were selected to be sequenced for displaying a variable intensity in the electrophoretic patterns of mutant strains with respect to that of the wild strain.

BT2 spot was only detected in the XR4 mutant and corresponded to actin, a structural protein and one of the most abundant proteins in several eukaryotic cells. Farah and Amberg (2007) demonstrated that cysteine 285 and 374 of actin are important physiological sensors of intracellular oxidative stress and regulate programmed cell death during the aging of *Saccharomyces cerevisiae*. Since carotenoids and actin can decrease intracellular ROS, expression of these compounds could be regulated by the same mechanism.

Then BT4 protein that decreased in all the mutants was identified as UDP glucuronic acid decarboxylase. This protein is part of intermediary metabolism (UniProt Q96V00) and is related to the use of sugar donors, cell integrity, temperature sensitivity and virulence. The enzyme is unrelated to carotenoid formation but is important to cell morphology (Griffith et al. 2004).

BT6, a heat shock 70 kDa protein, and BT8, a probable SNZERR regulation mechanism, were decreased in the XY21 mutant. One function of the heat shock 70 kDa protein is the binding of unfolded proteins to prevent aggregation (Becker and Craig 1994). The heat shock 70 kDa protein has been related to stress conditions (Shi and Thomas 1992). Flaherty et al. (1991) have stated that these enzymes strikingly similar in rabbit and bovine systems, suggesting the existence of a common molecular system along the evolutionary pathway. The SNZERR protein is involved in pyridoxine synthesis by supplying ammonia for the ring nitrogen of pyridoxine (Kondo et al. 2004), and it has been related to singlet oxygen resistance, ethylene response and stress induction in fungi (Mittenhuber 2001). However, other functions of this protein are currently unknown (Tanaka et al. 2005).

In many organisms, carotenoids are secondary metabolites accumulated in presence of ROS, and in *X. dendrorhous* they are antioxidants produced for protection against these reactive species (Schroeder and Johnson 1993; Liu and Wu 2006). Dihydrolipoyl dehydrogenase, the heat shock 70 kDa protein, SNZERR and actin are all related to stress or ROS production and could therefore be related to xanthophyll production in *X. dendrorhous* mutants.

The present proteomic study of *X. dendrorhous* carotenogenic mutants indicated significant differences between the strains and identified eight proteins with differential expression. Overproduction of a biochemical compound often requires manipulation of several genes in the cell. Since the metabolic pathways are highly inter-connected, manipulation of a gene will often have secondary effects on other pathways and subsequently on the cell behavior. Nevertheless these results, six of these proteins (glutamate dehydrogenase, actin, UDP-glucuronic acid decarboxylase, dihydrolipoyl dehydrogenase, the heat shock 70 kDa protein and the probable pyridoxine biosynthesis SNZERR) could be related to the tricarboxylic acid cycle or stress responses, which are involved in carotenoid formation. However, further work must be addressed to clarify the complicated regulation of the carotenoid biosynthesis pathway as a part of secondary metabolism and oxidative stress.

Acknowledgements

We thank Professors E. Cerdá-Olmedo and J. Ávalos and their working groups from the Genetic Department at Seville University for their technical support in mutant isolation and characterization. A Barbachano-Torres and LM Castelblanco-Matiz thank CONACYT-México for doctoral (172824 and 219320 respectively) fellowships.

References

Alcaíno J, Barahona S, Carmona M, Lozano C, Marcoleta A, Niklitschek M, Sepúlveda D, Marcelo B (2008) Cloning of the cytochrome P450 reductase (*crtR*) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *X. dendrorhous*. *BMC Microbiol* 8 (189): 1-13

Álvarez V, Rodríguez-Sáiz M, de la Fuente JL, Gudiña E J, Godio R P, Martín JF, Barredo JL (2006) The *crtS* gene of *Xanthophyllomyces dendrorhous* encodes a novel cytochrome-P450 hydroxylase involved in the conversion of beta-carotene into astaxanthin and other xanthophylls. *Fungal Genet Biol* 43: 261-272

An GH (2001) Improved growth of the red yeast, *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*), in the presence of tricarboxylic acid cycle intermediates. *Biotechnol Lett* 23:1005–1009

An GH, Schumau DB, Johnson EA (1989) Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl Environ Microbiol* 55:116-124

Asadollahi MA, Maury J, Patil KR, Schalk M, Clark A, Nielsen J (2009) Enhancing sesquiterpene production in *Saccharomyces cerevisiae* through *in silico* driven metabolic engineering. *Metabolic Eng* 11:328-334

Barbachano-Torres A, Ramos-Valdivia AC, Cerda-García-Rojas CM, Salgado-Rodríguez LM, Flores-Ortiz C, Ponce-Noyola T (2012) Carotenogenesis induction with hydrogen peroxide in *Xanthophyllomyces dendrorhous* colored mutants. In: Mendez-Vilas A (ed) *Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. pp 598-602

Becker J, Craig EA (1994) Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem*. 219: 11-23

Bhosale P, Bernstein PS (2005) Microbial xanthophylls. *Appl Microbiol Biotechnol* 68: 445-455

Browning KS, Uhlinger DJ, Reed LJ (1988) Nucleotide sequence for yeast dihydrolipoamide dehydrogenase. *PNAS* 85: 1831-1834

Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri G M, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG (2004) Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25: 1327–1333

Chávez-Cabrera C, Flores-Bustamante ZR, Marsch R, Montes M del C, Sánchez S, Cancino-Díaz JC, Flores-Cotera LB (2010) ATP-citrate lyase activity and carotenoid production in batch cultures of *Phaffia rhodozyma* under nitrogen-limited and nonlimited conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 1953-1960

Cifuentes V, Hermosilla G, Martínez C, León R, Pincheira G, Jiménez A (1997) Genetics and electrophoretic karyotyping of wild-type and astaxanthin mutant strains of *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek* 72: 111–117

DeLuna A, Avendano A, Riego L, González A (2001) NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. *J Biol Chem* 276: 43775-43783

Farah ME, Amberg DC (2007) Conserved actin cysteine residues are oxidative stress sensors that can regulate cell death in yeast. *Mol Biol Cell* 18: 1359–1365

Flaherty KM, McKay DB, Kabsch W, Holmes KC (1991) Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. *PNAS* 88: 5041–5045

Giuliano G, Pollock D, Scolnik PA (1986) The gene *crtl* mediates the conversion of phytoene into colored carotenoids in *Phodopseudomonas capsulata*. *J Biol Chem* 261: 12925-12929

González-Roncero M I, Zabala C, Cerdá Olmedo E (1984) Mutagenesis in multinucleate cells: the effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on *Phycomyces* spores. *Mutat Res* 125: 195-204

Griffith C L, Klutts J S, Zhang L, Levery SB, Doering T L (2004) UDP-glucose dehydrogenase plays multiple roles in the biology of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *J Biol Chem* 279: 51669-51676.

Hermosilla G, Martínez C, Retamales P, León R, Cifuentes V (2003) Genetic determination of ploidy level in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Antonie van Leeuwenhoek* 84: 279-287

Hu ZC, Zheng YG, Wang Z, Shen YC (2006) pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enzyme Microbial Technol* 39: 586-590

Johnson EA, An GH (1991) Astaxanthin from microbial sources. *Crit Rev Biotech* 11: 297-326

Johnson EA (2003) *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. *Int Microbiol* 6: 169-174

Kampranis S, Makris AM (2012) Developing a yeast cell factory for the production of terpenoids. *Comput Struct Biotechnol J* 3: 1-7 doi:10.5936/csbj.201210006

Kocharin K (2013) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for polyhydroxybutyrate production. Dissertation, Chalmers University of Technology. Göteborg, Sweden.

Kondo H, Nakamura Y, Dong YX, Nikawa JI, Sueda S (2004) Pyridoxine biosynthesis in yeast: participation of ribose 5-phosphate ketol-isomerase. *Biochem J* 379: 65–70

Kucsera J, Pfeiffer I, Ferenczy L (1998) Homothallic life cycle in the diploid red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Antonie van Leeuwenhoek* 73:163-168

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Lawrence CW (2002) Classical mutagenesis techniques. *Methods Enzymol* 350: 189-99

Lee YJ, Kim KJ, Kang HY, Kim HR, Maeng PJ (2012) Involvement of GDH3-encoded NADP+-dependent glutamate dehydrogenase in yeast cell resistance to stress-induced apoptosis in stationary phase cells. *J Biol Chem* 287: 44221-44233

Liu YS, Wu JY (2006) Hydrogen peroxide-induced astaxanthin biosynthesis and catalase activity in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Microbiol Biotechnol* 73: 663-668

Liu ZQ, Zhang JF, Zheng YG, Shen YC (2008) Improvement of astaxanthin production by a newly isolated *Phaffia rhodozyma* mutant with low- energy ion beam implantation. *J Appl Microbiol* 104: 861-872

Long Thomas Veach (2004) Process for production of carotenoids, xanthophylls and apo-carotenoids utilizing eukaryotic microorganisms. US PATENT 7563935 B2.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr GL, Randall RS (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265-275

Martinez-Moya P, Watt SA, Niehaus K, Alcaíno J, Baeza M, Cifuentes V (2011) Proteomic analysis of the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. BMC Microbiol 11: 1-14

Medwid RD (1998) *Phaffia rhodozyma* is polyploid. J Ind Microbiol Biotechnol 21: 228-232

McNulty H, Jacob RF, Mason P (2008) Biologic activity of carotenoids related to distinct membrane physicochemical interactions. Am J Cardiol 101: 20-29

Miller SM, Magasanik B (1990) Role of NAD-linked glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol 172: 4927-4935

Mittenhuber G (2001) Phylogenetic analyses and comparative genomics of vitamin B6 (Pyridoxine) and pyridoxal phosphate biosynthesis pathways. J Mol Microbiol Biotechnol 3: 1-20

Misawa N, Shimada H (1998) Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. J Biotechnol 59:169-181

Molloy MP (2008) Isolation of bacterial cell membranes proteins using carbonate extraction. Methods Mol Biol 424: 397-401

Ojima K, Breitenbach J, Visser H, Setoguchi Y, Tabata K, Hoshino T, van den Berg J, Sandmann G (2006) Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a β -carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. Mol Genet Genomics 275: 148-158

Olaizola M (2000) Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. J App Phycol 12: 499-506

Qin G, Gu H, Ma L, Peng Y, Deng XW, Chen Z, Qu LJ (2007) Disruption of phytoene desaturase results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellins biosynthesis. Cell Res 17: 471-482

Rodríguez-Sáiz M, Godio RP, Alvarez V, de la Fuente JL, Martín JF, Barredo JL (2009) The NADP-dependent glutamate dehydrogenase gene from the astaxanthin producer *Xanthophyllomyces dendrorhous*: use of its promoter for controlled gene expression. *Mol Biotechnol* 41: 165-72

Sandmann G, Albrecht M, Schnurr G, Knörzer O, Böger P (1999) The biotechnological potential and design of novel carotenoids by gene combination in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 17: 233-237

Schroeder WA, Johnson EA (1993) Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. *J Gen Microbiol* 139: 907–912

Sedmak JJ, Weerasinghe DK, Jolly SO (1990) Extraction and quantification of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol Tech* 4:107-112

Shi Y, Thomas JO (1992) The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol Cell Biol* 12: 2186-2192

Tahara EB, Barros MH, Oliveira GA, Netto LE, Kowaltowski AJ (2007) Dihydrolipoyl dehydrogenase as a source of reactive oxygen species inhibited by caloric restriction and involved in *Saccharomyces cerevisiae* aging. *FASEB J* 21: 274-83

Tanaka T, Tateno Y, Gojobori T (2005) Evolution of vitamin B6 (pyridoxine) metabolism by gain and loss of genes. *Mol Biol Evol* 22: 243-250

Tretter L, Adam-Vizi V (2005) Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Phil Trans R Soc B* 360: 2335-2345

Verdoes J C, Krubasik K P, Sandmann G, Van Ooyen A J (1999) Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Mol Gen Genet* 262: 453-461

Verdoes J C, Sandmann G, Visser H, Diaz M, van Mossel M, van Ooyen A (2003) Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Appl Environ Microbiol* 69: 3728–3738

Verdoes JC, Wery J, Boekhout T, Van Ooyen AJ (1997) Molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Phaffia rhodozyma*. *Yeast* 13: 1231-42

Wang C, Long X, Mao X, Dong H, Xu L, Li Y (2010) SigN is responsible for differentiation and stress responses based on comparative proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor* wild-type and sigN deletion strains. *Microbiol Res* 165: 221-31

Yamane Y, Higashida K, Nakashimada Y, Kakizono T, Nishio N (1997) Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis. *Appl Environ Microbiol* 63: 4471-4478

FIGURES

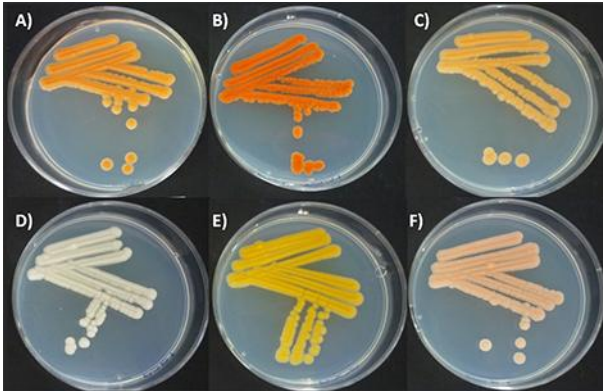


Fig. 1 Mutants of *X. dendrorhous* obtained after treatment with NTG. A) Wild type, B) Red, C) Pale orange, D) White, E) Yellow, and F) Pink mutants.

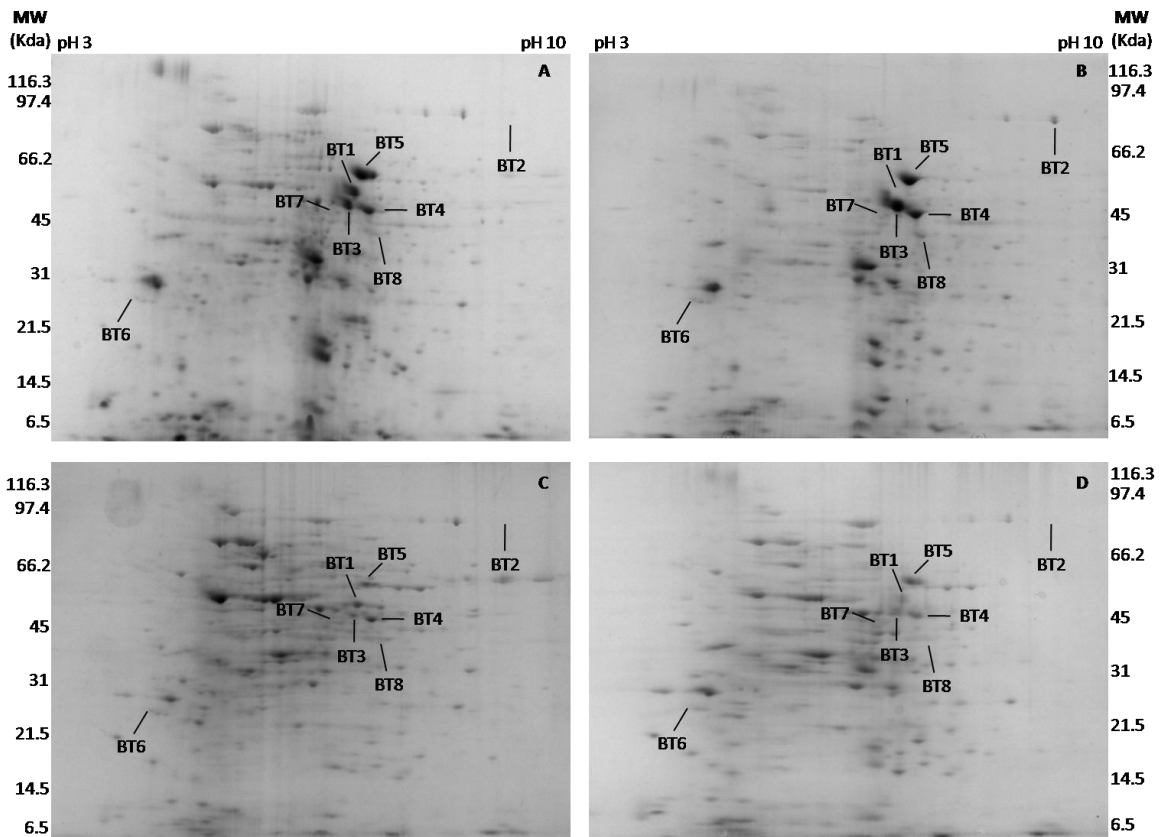


Fig. 2 Proteome profile of soluble proteins of *X. dendrorhous* a) Wild type; b) XR4; c) XW10 and d) XY21 mutant strains at stationary growth phase in YM medium. BT represents the spots that were sequenced.

Supplementary files

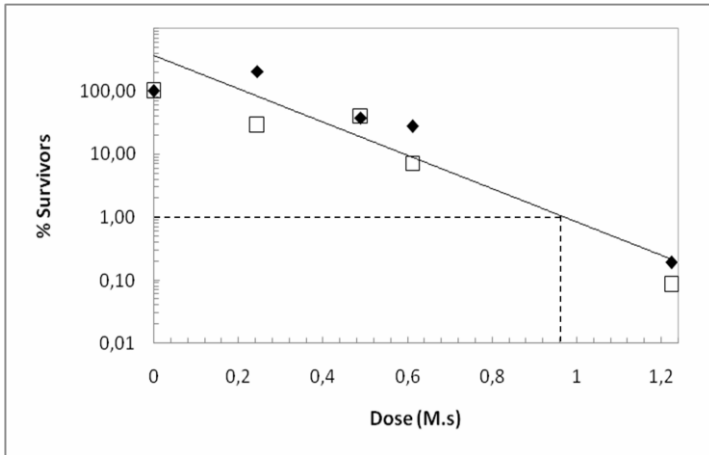


Fig. 1 Survival of *X. dendrorhous* after its exposition to several NG concentrations and exposition time: □15 min, ◆30 min.

Table 1. Carotenoid content in *X. dendrorhous* wild type and colored mutant strains.

Strain	Astaxanthin	β - carotene	HDCO	Phytoene	Xantophylls	Total
mg/(g dry weight)						
Wild type						
(Wt)	0.681	0.097	0.009	0.111	0.073	0.971
Red mutants						
XR1	1.199	0.148		2.037		3.386
XR3	0.641	0.110		1.514		2.267
XR4	1.764	0.066	0.088	0.983	0.363	3.264
XR5	0.603	0.048		0.966		1.618
XR6	1.138	0.093		0.727		1.959
XR15	1.183	0.188	0.064	0.825	0.099	2.361
XR16	0.919	0.075	0.040	0.984	0.167	2.185
XR17	1.786	0.147	0.160	1.996	0.403	4.492
Pale orange mutants						
XO7	0.562	0.071		1.139		1.772
XO8	0.213	0.022		1.706		1.941
XO9	0.179	0.018		1.690		1.887
XO12	0.321			1.781	0.078	2.180
XO14	0.316			1.844	0.127	2.288
XO18	0.674		0.018	2.289	0.208	3.188
XO25	0.466			1.473	0.120	2.060
XO27	0.557	0.061		1.526		2.145
XO29	0.266	0.013	0.006	0.171	0.052	0.508
White mutants						
XW10				2.566		2.566
XW19				2.404		2.404
XW20				2.670		2.670
XW22				2.186		2.186
Yellow mutants						
XY13	0.148	0.215		1.442	0.044	1.849
XY21		0.610		0.866		1.476
XY23	0.043	0.603		0.977	0.052	1.675
XY24	0.009	0.721		0.983	0.047	1.761
Pink mutants						
XP26	0.124	0.018	0.021	0.163		0.325

XP28	0.277	0.031	0.021	0.452	0.781
-------------	-------	-------	-------	-------	-------

The experiments were performed in triplicated in independent experiments. Analyses of variance (ANOVA) were done with NCSS, 2007 for Windows. Reported values were considered significantly different at $\alpha = 0.05$.

Table 2. Spots resolved on 2DE, with indication of common and variable ones.

Strain	Spots detected	Spots common to all the replicates (Maximum-minimum number of spots)	Common/variable spots for all of the samples ^a
Wt	368	310 (318-417)	128/182
XR4	362	289(336-387)	128/183
XW10	340	275(339-340)	128/185
XY21	300	237(297-302)	128/199

^a Common and variable spots are in comparison to the Master gel, which contained the spots of all samples.

Table 3. Differentially regulated proteins identified in *X. dendrorhous* mutants.

Number	Mr/pI	Name	Normalized spot quantity				Matched peptides	% Coverage
			Wt	XR4	XW10	XY21		
BT1	50/5.99	Glutamate dehydrogenase	173776	5585	205874	21163	VQFNSALGPYK HIGPLTDVPAGDIGVGGR HAEGSSAGWTGKK ADVALPSATQNEVSEEEAK VASEACWLGPAKAANAGGVAVSGLEMSQNSAR	20
BT2	42/5.38	Actin	0	112629	0	0	AGFAGDDAPRAVFPVIVGRPR DSYVGDEAQSQR VAPEEHPVLLTEAPLNPK SYELPDGQVLTIGNER	18
BT3	47/5.98	Glutamate dehydrogenase	150255	661414	59134	5578	ALEVQIPER VLWEDDEGNVHANR VQFNSALGPY NALTGLMMGGGK FCQSFMAELSRHIGPLTDVPAGDIGVGGREVGFLFGAYKKHRNE FSGILTGK HAEGSSAGWTGKKVLISGSGNVAQYAALK TLKDFLDSSNGK ADVALPSATQNEVSEEEAK VASEACWLGPAKAANAGGVAVSGLEMSQNSAR	42
BT4	47/6.16	UDP-glucuronic acid decarboxylase	383105	219566	204147	94438	ACYDEGKR GEDMTVYGDGSQTR IFNTFGPR RILVTGGAGFVGSHLVDR TTVSHWVGHPNFEMVR VVSNFIQALK	18
BT5	42/6.26	Dihydrolipoyl dehydrogenase	311113	403364	75141	50188	CIGDVTFGPMLAHK AEEEGIAAVELIK TCHAHPTLSEAFK	8.1

BT6	72/5.07	Heat shock 70 kDa protein	4624	70212	25788	0	SNKITITNDKGR TKDNNILGK	3.2
BT7	36/5.79	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	7000	17065	13143	5291	YDSTHGVFK GAGANIIPSSTGAAK VcDLVSYIAAQDAK	11
BT8	33/5.93	Probable pyridoxine biosynthesis SNZERR	19407	50015	18450	2503	TGLAQLK ISEGAAMIR TKGEAGTGNVVEAVR	10

ANEXO 3

Secuencia ITS1-5.8S-ITS2

ACGCAAGCTCTTTTATCATTTAAAAAACACCAGTCGATTGTATGTTTCGAAACACTATAAAACA
CAATAAACTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGA
TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTG
GTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGAAACACTCTCAACCGGGTGTCCTTTCTTTG
TTGAGAGGCGCCCGGCTTGGACTTGGACGGTTCTGCTGGCCCTGATTTGGTTCGGGGTTCGGCT
CGTCTTAAAACGATCAGTGGGTGTGTGCGGTTCTGCTGGCGAAGCGCGCGCGGCCCTTCA
CGATATGAAAAAGTGTGGAGAGTCGCTGTCTGTGTGTGTGTGGGTTTCCTCGGGAACACAC
AGACTAGCCGGTACAACATAACGAGCCATGCG

ANEXO 4

Secuencia de nucleótidos del gen *crtS*.

En azul los intrones

>WtA

ATGTTTCATCTTGGTCTTGCTCACAGGTGCTTTAGGCCTGGCTGCTTTCTCATGGGCATCCATAGCGTTCT
TCAGTCTTTACCTCGCTCCGAGGCGATCTTCACTGTATAACCTTCAGG**GTGAGAATTGAGCTCTGGAATC**
ATGCTTGTGTAAATCCTATAATCTCATTGTCCTATTCCCTCTTCTTCATCCTCTCTTCAGGCCCGAATCA
TACCAATTACTTCACAGGCAATTTTTTAGACATCCTCTC**GTGAGTTTTTCATCATTGGCTCAGTCGTCCAA**
TCTGAACGATCATCGCTCACGACCTTTCGGACGCGTTCCTTCTTTCTATGTGAAATCTGATCTTTGGTTTG
TTACGAGCGCACAGAGCTCGTACAGGTGAAGAGCATGCGAAGTACAGAGAAAAATACGGAAGCACCTCC
GGTTTGCTGGGATTGCTGGAGCACCCGCTTGAACCTCGACCGATCCGAAAGTCTTCAACCA**GTTTGTCCA**
TCCGAACCCCTCATCCTCCTGCTGATCAATTGAACTGTAGTTCACGCATTTTGAATGGACAGTGTGATG
AAAGAAGCCTACGACTATCCGAAACCTGGTATGGCCGCTCGAGTGCTCAGAATTGCTACCGGAGATGGTG
TTGTAACGGCGGAAG**GTGCTTTTCAAGTTCCTTATATCACATCTAATTCACTCGGCGCGATTGGACTCA**
ACATTTCTGACGAGCCTGTCACCTTGTTTTTCACTCCATGGTCTCGGTACATCTTGCTTCATCTCATAGGT
GAAGCTCATAAGCGACATCGAAGGATCATGATCCCCCTCTCTGTCCGCTCAGGCCGTTAAGTCGATGGTCC
CAATTTTCTTAGAGAAAGGTATGGAACCTGTCGACAAGATGATGGAGGATGCGGCTGAGAAGGATATGGC
CGTGGGAGAGTCGGCCGGTAAAAAGAAGCAACCAGGCTCGAGACCGAAGGAGTCGATGTAAAGGATTGG
GTC**GTGAGTACCTGCCTGTTCCCTCACCTTGACGGACGAAGCATATCAAGGAAAGTTTCATTGACTGACA**
AACACTATCTTACCAGGGTCGAGCTACTCTGGACGTCATGGCTCTTGCAGGTCAGTCTACTCTCTCTTAT
AAATGCTCCACATATGTATGCATATACTGACATGCTCTTCCCTTTATTCGATACGACGTCATATATCCAGG
GTTTGACTATAAGAGCGACTCGCTCCAGAACAAGACCAATGAGCTCTATGTCGCTTTTGTCCGACTTACC
GATGGGTTTGCTCCTACCTTGGACTCATTCAAGGCTATCATGTGGGATTTTGTACCTTACTTCCGAACTA
TGGTATGCTCTGCCATTTCTTTGATATCCAAAGATTATAGATAGGTTACTTGCTAAAATCTCAGCTATCGTG
AACAGAAACGGAGACATGAGATACCTTTAACTCAAGGATTAGCAGTTTCCCGACGAGTTGGGATCGTAAG
TGCCAGATCAAGCCTCTCTGCATATTTCTTGGTCATCATCTTAACCTTCTAGCCTCATTTCATCTATTGTGC
GCAATAGGGGCTTATGGAGCAAAAAGAAGCGGGCTGTGCTTGGCTCAGCTTCCGATCAGGCTGTTGATAAG
AAGGATGTTCAAGGTCGGGATATCCTAAGTCTCCTAG**GTTAGTAACGTTTTTTAAACGTATATATAAAGTG**
GCGACGTTCTTTTCTGACCACTGTCAATATGCTCGTTACTAGTGAGAGCAAACATCGCCGCCAACCTGC
CTGAATCTCAAAAGCTGTCCGATGAGGAGGTACTCGCTCAGATCAGTAACCTGTTGTTTGTGATATGA
GTGTGTATCCTTTTCCCTCTCTATTCTTAGCTGATTTAAAGCACTAATAGAGGTCTTGATGTTTTCTGTT
TGATCAGAACTTCTTCGACAGTGTGACATGGATGTTTCACCGACTCTCAGAAGACAAAGCCGTTCAGGA
TAAACTTCGGGAAGAAATTTGTCAGATCGACACGGATATGCCTACGCT**GTGAGGATGTTTTTGTGCTGA**
ATTACTTCTTCTTGCAAAAGACTGAAACGGCCGTCATTCTTGTATCCTTTTTAGAGACGAACTTAATGCC
TTGCCTTATCTCGAAGCG**GTTGGTTC**CGATTCTTGGTTTTGTCTTCCAAACACCATACGAATTATTGCT
CATCTGACTTGCGTCTACGGCTGTGAAATTTAACTAGTTTGTAAAGAGTCTCTTCGTCTAGACCCTCC
TAGTCCCTATGCTAACCGTGAATGCCTAAAGGATGAAGAC**GTATGTTGGCTTCATCACGCATGATTTTAA**
TTTCGTGTTCCCTTTGTACATACGCATACAGGCTGACCGAGCTCAAATTCGGCTTCCCTCTTCTGTACTTT
TCTTTTTCTGGCCTTTCTTATCTTCGTTCTTCGACCAAAATTTGTCACAGTTCATCCCACTTGCCGAGCC
TGTAATTGGTCCGGATGGATCGGTCATCAATGAGGTCCGGATCACGAAAGGAACGATGGTCATGCTT**CGT**

AAGTTTTTTTTTTGTTTCATCTTGTCATGAAACAGTTTCTAATAGACGCGAACCAATTCAGCGTTGTTCAACATCAACCGATCAAAGTTCATTTATGGAGAAGATGCAGAAGAATTCAGGTACAATTTCTTTTTCTTTTCTTTTTAGTCAATCGGTTTTCGTGGCGTAATTGACCAGGCTCTCTTTTAATCTCCCGAAAGACCGGAGAGGTGGCTTGAGGACGTAACAGACTCACTCAACAGTATTGAAGCACCCATGGACACCAGGCGAGCTGTATGTTTTATTGAGTTTACCTCTGTGATTTTTGCAAAACGTTGAATTTTCGCGCTTCCCTTGTTTTTGAACCTCAGTCATCTCTGGACCCAGAGCTTGCTTGTAAGTTTCTTCTCATCTAGCGCCTTAGCAGTATCCGATCAGCGATCTATTTCTTTGTACGATTGTTTCTGACTCTCTCGACTTCCACAGTGGTTGGCGATTTCGCTGTCGCCGAGATGAAGGCCTTCTTGTTTGTCACTCTCCGTCGAGTCCAGTTCGAGCCCATCATCTCTCATCCAGAGTACGAGCACATCACCTTGATCATTTCCCGTCCCTCGAATCGTAGGTAGAGAGAAGGAGGGGTACCAGATGCGTTTGCAGGTCAAGCCGGTCGAATGA

>WtB

ATGTTTCATCTTGGTCTTGCTCACAGGTGCTTTAGGCCTGGCTGCTTTCTCATGGGCATCCATAGCGTTCTTCAGTCTTTACCTCGCTCCGAGGCGATCTTCACTGTATAACCTTCAGGTGAAGAATTGAGCTCTGGAATCATGCTTGTGTAAATCCTTTAATCTCATTTCATCCTATTCCTCTTCTTCATCCTCTCTTCAGGCCCGAATCATACCAACTACTTTACAGGCAATTTTTTAGACATCCTCTCGTGAGTTTTTCATCATTGGCTCAGTCGTCCAACTTTAACGATCATCGCTAACGACCTTTTCGGACGCGTTCTTCTTTCTATGTGAAATCTGATCTTTGGTTTTGTTACGAGAGCACAGAGCTCGTACAGGTGAAGAGCATGCGAAGTACAGAGAAAAATACGGAAGCACCCCTCCGGTTTGCTGGGATTGCTGGAGCACCCGCTTGAACCTCGACCGATCCGAAAGTCTTCAACCAGTTTGTCCATCCGAACCCCTCATCCTCCTCTGCTGATCAATTCAACTGTAGTTAACGCACTTTGAATGGACAGTGTGATGAAAGAAGCCTACGACTATCCGAAACCTGGTATGGCCGCTCGAGTGTCTCAGAATTGCTACCGGAGATGGTGTGTTTACGGCGGAAGGTGCTTTTCAAGTTCTCTTATATCACATCTAATCCACTCGGCGCGATTGGACTCAACATTTCTGACGAGCCTGTACACCTTGTTTTCACTTCATGGTCTCGGTGCATCTTGTCTCATCTCATAGGTGAAGCTCATAAGCGACATCGAAGGATCATGATCCCCCTCTCTGTCCGCTCAGGCCGTTAAGTCGATGGTCCCAATTTTCTTAGAAAAAGGTATGGAACCTTGTGACAAGATGATGGAGGATGCGGCTGAGAAGGATATGGCCGTGGGAGAGTCGGCCGGTAAAAAGAAGCAACCAGACTCGAGACCGAAGGAGTCGATGTAAAGGATTGGTCTGTGAGTACCCGCCATTTCCCTCACCTTGATGGACGAAGCATATCAAGGAAAGGTTTCATTGACTGACAACACTATCTTACCAGGGTCGAGCTACTCTGGACGTCATGGCTCTTGCAGGTCAGTCCATTCTCTCTTACAAATGCTCCACATGTGCATGCATGTAAGTACTGACACGCTCTTCCCTATATTCGATACGACGTCATATGTCCAGGTGTTGACTATAAGAGCGACTCGCTCCAGAACAAGACCAATGAGCTCTATGTCCCTTTGTCCGACTCACCAGTGGGTTTGCTCCTACCTTGACTCGTTCAAGGCTATCATGTGGGATTTTGTACCTTACTTCCGAACTATGGTATGTCTGCCATTTTTTGTATCTCAAAGATTATGGATAGGTTATCTGCTAAAATTTACCTATCGTGAACAGAAACGGAGACATGAGATACCTTTGACTCAAGGATTAGCAGTTTCCCGACGAGTTGGGATCGTAAGTGCCAGATCGAGCCTCTTTGAACATTTCTTGGTTCATCATCTTAACCTCCTAGGTTTCATTTCATCCATGGCGACAATAAGGAGCTTATGGAGCAAAAAGAAGCAGGCGTGTCTGGCTCAGCTTCCGATCAGGCCGTTGACAAGAAGGATGTCCAAGGTCGAGATATCCTAAGTCTCCTAGGTTAGTAACGTTTTTTAAACGTATATACAGAGCGCGACATTTCTTTCCCTGACAACGTCAACATGCTCGTTACTAGTGAGAGCAAACATCGCCGCCAACCTGCTGAATCTCAAAAGCTGTCCGATGAGGAGTACTCGCTCAGATCAGTAACCTGTTATTTGCTGGATATGAGTGTATCCTTTCCCTCTCTATCCTTAGCTGATTTAAAAGCACTAATAGAGGCTTTTATGTTTCTGTTTGATCAGAACCTTCTTCGACAGTCTTGACATGGATGTTTACCAGTCTCAGAAGACAAAGCTGTTTCAGGATAAACTTCGAGAAGAAATTTGTCAGATCGACACGGATATGCCTACGCTGTGAGGATGTTTTTGTATGCTAA

ATTACTTCTTCTTGCAAATGACTAAAACGGCCTTCCATTCTTGATCCATTTTAGAGACGAACTTAATGCG
TTGCCTTATCTCGAAGCGGTTGGTTCCTCGATTCTTGGTCTTGTCTTCCAAATACAATACGGATTATTGCT
CATCTGATTTGCGTCTACGGGCTGTGGAATTTAACTAGTTTGTTAAGGAGTCTCTTCGTCTAGACCCTCC
TAGTCCTTATGCTAACCGTGAATGCTTGAAGGATGAAGACGTATGTTGGCTTCATCACGCATAATTTTCA
TTTCATATTCCTTTGTACATACGCATACAGGCTGACCGAGCTCAAATTCGGCTTCCTCTTCTGTGCTTC
TTTTTCTGGCCTTCTTATCTTCATTCTTCAACAAAATTTGTACAGTTCATCCCACCTGCCGAGCCTG
TCATTGGTCGAGATGGGTCGGTCATCAATGAGGTCCGGATCACGAAAGGAACGATGGTCATGCTTCGTAA
GTTTTCTTTTATTTTCATCTGGTCCATGAAATAGTTTCTGATAGACGCGGACCAATTCAGCGTTGTTCAAC
ATCAATCGTTCAAAAGTTCATTTATGGAGAAGATGCAGAAGAATTCAGGTACAATTCGTTTTTCTTTTAA
AGCCAATCGGTTTCGTAGCGTAATGACCGGGCTCTCTTTTAATTTCTCGAAAGACCGGAGAGGTGGCTT
GAGGACGTAACAGACTCGCTCAACAGTATTGAAGCACCTATGGACACCAGGCGAGCTGTATGTTTTATT
GATTTTATCTTTGTGAATTTTGCAAACGTTGAACTTCGCGCTTCCCTTGTGTTGAAATCCCAGTTATC
TCTGGACCCAGAGCTTGCTTGTAAAGTTTCTTCTCATCTGGCGCCTTAGCAGTATCCGATCATCCATCTAG
TTCTTTGTACGATTGTTTCTGACTCTCTCGACTTTCGCAGTGGTTGGCGATTTGCTGTGCGCGAGATGAA
GGCCTTCTTGTGTTGTCACTCTCCGTCGGGTCCAGTTCGAGCCCATCATCTCTCATCCAGAGTACGAGCAC
ATCACCTTGATCATTTCCCGTCTCGAATCGTTGGTAGAGAGAAGGAGGGGTACCAGATGCGTTTGCAGG
TCAAGCCGGTCGAATGA

ANEXO 5

Alineamiento de secuencia de aminoácidos del gen *crtS* obtenido en bases de datos y las versiones obtenidas de Wt.

En amarillo el sitio de unión a oxígeno, en verde el dominio de unión hemo y en rosa el dominio común de las proteínas del citocromo P-450.

```

ATCC96815      MFILVLLTGALGLAAFSWASIAFFSLYLAPRRSSLYNLQGNHTNYFTGNFLDILSARTG  60
ATCC96594      MFILVLLTGALGLAAFSWASIAFFSLYLAPRRSSLYNLQGNHTNYFTGNFLDILSARTG  60
VKPMY2410      MFILVLLTGALGLAAFSWASIAFFSLYLAPRRSSLYNLQGNHTNYFTGNFLDILSARTG  60
ATCC24203      MFILVLLTGALGLAAFSWASIAFFSLYLAPRRSSLYNLQGNHTNYFTGNFLDILSARTG  60
DQ002006.1    MFILVLLTGALGLAAFSWASIAFFSLYLAPRRSSLYNLQGNHTNYFTGNFLDILSARTG  60
WtB            MFILVLLTGALGLAAFSWASIAFFSLYLAPRRSSLYNLQGNHTNYFTGNFLDILSARTG  60
ATCC24230      MFILVLLTGALGLAAFSWASIAFFSLYLAPRRSSLYNLQGNHTNYFTGNFLDILSARTD  60
WtA            MFILVLLTGALGLAAFSWASIAFFSLYLAPRRSSLYNLQGNHTNYFTGNFLDILSARTG  60
*****.

ATCC96815      EEHAKYREKYGSTLRFAGIAGAPVLNSTDPKVFNHVMKEAYDYPKPGMAARVLRITGDG  120
ATCC96594      EEHAKYREKYGSTLRFAGIAGAPVLNSTDPKVFNHVMKEAYDYPKPGMAARVLRITGDG  120
VKPMY2410      EEHAKYREKYGSTLRFAGIAGAPVLNSTDPKVFNHVMKEAYDYPKPGMAARVLRITGDG  120
ATCC24203      EEHAKYREKYGSTLRFAGIAGAPVLNSTDPKVFNHVMKEAYDYPKPGMAARVLRITGDG  120
DQ002006.1    EEHAKYREKYGSTLRFAGIAGAPVLNSTDPKVFNHVMKEAYDYPKPGMAARVLRITGDG  120
WtB            EEHAKYREKYGSTLRFAGIAGAPVLNSTDPKVFNHVMKEAYDYPKPGMAARVLRITGDG  120
ATCC24230      EEHAKYREKYGSTLRFAGIAGAPVLNSTDPKVFNHVMKEAYDYPKPGMAARVLRITGDG  120
WtA            EEHAKYREKYGSTLRFAGIAGAPVLNSTDPKVFNHVMKEAYDYPKPGMAARVLRITGDG  120
*****

ATCC96815      VVTAEGEAHRHRRIMIPSLSAQAVKSMVPIFLEKGMELVDKMMEDAAEKDMAVGESAGE  180
ATCC96594      VVTAEGEAHRHRRIMIPSLSAQAVKSMVPIFLEKGMELVDKMMEDAAEKDMAVGESAGE  180
VKPMY2410      VVTAEGEAHRHRRIMIPSLSAQAVKSMVPIFLEKGMELVDKMMEDAAEKDMAVGESAGE  180
ATCC24203      VVTAEGEAHRHRRIMIPSLSAQAVKSMVPIFLEKGMELVDKMMEDAAEKDMAVGESAGE  180
DQ002006.1    VVTAEGEAHRHRRIMIPSLSAQAVKSMVPIFLEKGMELVDKMMEDAAEKDMAVGESAGE  180
WtB            VVTAEGEAHRHRRIMIPSLSAQAVKSMVPIFLEKGMELVDKMMEDAAEKDMAVGESAGE  180

```

ATCC24230 VVTAEGEAHRHRRIMIPSLSAQAVKSMVPIFLEKGMELVDKMMEDAAEKDMAVGESAGE 180

WtA VVTAEGEAHRHRRIMIPSLSAQAVKSMVPIFLEKGMELVDKMMEDAAEKDMAVGESAGE 180

ATCC96815 KKATRLETEGVDVKDWVGRATLDVMALAGFDYKSDSLQNKTNELYVAFVGLTDGFAPTLTD 240

ATCC96594 KKATRLETEGVDVKDWVGRATLDVMALAGFDYKSDSLQNKTNELYVAFVGLTDGFAPTLTD 240

VKPMY2410 KKATRLETEGVDVKDWVGRATLDVMALAGFDYKSDSLQNKTNELYVAFVGLTDGFAPTLTD 240

ATCC24203 KKATRLETEGVDVKDWVGRATLDVMALAGFDYKSDSLQNKTNELYVAFVGLTDGFAPTLTD 240

DQ002006.1 KKATRLETEGVDVKDWVGRATLDVMALAGFDYKSDSLQNKTNELYVAFVGLTDGFAPTLTD 240

WtB KKATRLETEGVDVKDWVGRATLDVMALAGFDYKSDSLQNKTNELYVAFVGLTDGFAPTLTD 240

ATCC24230 KKATRLETEGVDVKDWVGRATLDVMALAGFDYKSDSLQNKTNELYVAFVGLTDGFAPTLTD 240

WtA KKATRLETEGVDVKDWVGRATLDVMALAGFDYKSDSLQNKTNELYVAFVGLTDGFAPTLTD 240

ATCC96815 SFKAIMWDFVPYFRTMKRRHEIPLTQGLAVSRRVGIELMEQKKQAVLGSASDQAVDKKDV 300

ATCC96594 SFKAIMWDFVPYFRTMKRRHEIPLTQGLAVSRRVGIELMEQKKQAVLGSASDQAVDKKDV 300

VKPMY2410 SFKAIMWDFVPYFRTMKRRHEIPLTQGLAVSRRVGIELMEQKKQAVLGSASDQAVDKKDV 300

ATCC24203 SFKAIMWDFVPYFRTMKRRHEIPLTQGLAVSRRVGIELMEQKKQAVLGSASDQAVDKKDV 300

DQ002006.1 SFKAIMWDFVPYFRTMKRRHEIPLTQGLAVSRRVGIELMEQKKQAVLGSASDQAVDKKDV 300

WtB SFKAIMWDFVPYFRTMKRRHEIPLTQGLAVSRRVGIELMEQKKQAVLGSASDQAVDKKDV 300

ATCC24230 SFKAIMWDFVPYFRTMKRRHEIPLTQGLAVSRRVGIELMEQKKQAVLGSASDQAVDKKDV 300

WtA SFKAIMWDFVPYFRTMKRRHEIPLTQGLAVSRRVGIGLMEQKKRAVLGSASDQAVDKKDV 300

***** *****:*****

ATCC96815 QGRDILSLLVRANIAANLPESQKLSDEEVLAQISNLLFAGYETSSTVLTWFMHRLSEDKA 360

ATCC96594 QGRDILSLLVRANIAANLPESQKLSDEEVLAQISNLLFAGYETSSTVLTWFMHRLSEDKA 360

VKPMY2410 QGRDILSLLVRANIAANLPESQKLSDEEVLAQISNLLFAGYETSSTVLTWFMHRLSEDKA 360

ATCC24203 QGRDILSLLVRANIAANLPESQKLSDEEVLAQISNLLFAGYETSSTVLTWFMHRLSEDKA 360

DQ002006.1 QGRDILSLLVRANIAANLPESQKLSDEEVLAQISNLLFAGYETSSTVLTWFMHRLSEDKA 360

WtB QGRDILSLLVRANIAANLPESQKLSDEEVLAQISNLLFAGYETSSTVLTWFMHRLSEDKA 360

ATCC24230 QGRDILSLVVRANIAANLPESQKLSDEEVLAQISNLLFAGYETSSTVLTWMFHRLSEDKA 360

WtA QGRDILSLVVRANIAANLPESQKLSDEEVLAQISNLLFAGYETSSTVLTWMFHRLSEDKA 360

ATCC96815 VQDKLREEICQIDTDMPTLDELNALPYLEAFVKESLRDPPSPYANRECLKDEDFIPLAE 420

ATCC96594 VQDKLREEICQIDTDMPTLDELNALPYLEAFVKESLRDPPSPYANRECLKDEDFIPLAE 420

VKPMY2410 VQDKLREEICQIDTDMPTLDELNALPYLEAFVKESLRDPPSPYANRECLKDEDFIPLAE 420

ATCC24203 VQDKLREEICQIDTDMPTLDELNALPYLEAFVKESLRDPPSPYANRECLKDEDFIPLAE 420

DQ002006.1 VQDKLREEICQIDTDMPTLDELNALPYLEAFVKESLRDPPSPYANRECLKDEDFIPLAE 420

WtB VQDKLREEICQIDTDMPTLDELNALPYLEAFVKESLRDPPSPYANRECLKDEDFIPLAE 420

ATCC24230 VQDKLREEICQIDTDMPTLDELNALPYLEAFVKESLRDPPSPYANRECLKDEDFIPLAE 420

WtA VQDKLREEICQIDTDMPTLDELNALPYLEAFVKESLRDPPSPYANRECLKDEDFIPLAE 420

ATCC96815 PVIGRDGSVINEVRITKGTMVMLPLFNINRSKFIYGEDAEFRPERWLEDVTDLSNSIEA 480

ATCC96594 PVIGRDGSVINEVRITKGTMVMLPLFNINRSKFIYGEDAEFRPERWLEDVTDLSNSIEA 480

VKPMY2410 PVIGRDGSVINEVRITKGTMVMLPLFNINRSKFIYGEDAEFRPERWLEDVTDLSNSIEA 480

ATCC24203 PVIGRDGSVINEVRITKGTMVMLPLFNINRSKFIYGEDAEFRPERWLEDVTDLSNSIEA 480

DQ002006.1 PVIGRDGSVINEVRITKGTMVMLPLFNINRSKFIYGEDAEFRPERWLEDVTDLSNSIEA 480

WtB PVIGRDGSVINEVRITKGTMVMLPLFNINRSKFIYGEDAEFRPERWLEDVTDLSNSIEA 480

ATCC24230 PVIGRDGSVINEVRITKGTMVMLPLFNINRSKFIYGEDAEFRPERWLEDVTDLSNSIEA 480

WtA PVIGRDGSVINEVRITKGTMVMLPLFNINRSKFIYGEDAEFRPERWLEDVTDLSNSIEA 480

ATCC96815 PYGHQASFISGPRACFGWRFAVAEMKAFVTLRRVQFEPISHPEYEHITLIISRPRIV 540

ATCC96594 PYGHQASFISGPRACFGWRFAVAEMKAFVTLRRVQFEPISHPEYEHITLIISRPRIV 540

VKPMY2410 PYGHQASFISGPRACFGWRFAVAEMKAFVTLRRVQFEPISHPEYEHITLIISRPRIV 540

ATCC24203 PYGHQASFISGPRACFGWRFAVAEMKAFVTLRRVQFEPISHPEYEHITLIISRPRIV 540

DQ002006.1 PYGHQASFISGPRACFGWRFAVAEMKAFVTLRRVQFEPISHPEYEHITLIISRPRIV 540

WtB PYGHQASFISGPRACFGWRFAVAEMKAFVTLRRVQFEPISHPEYEHITLIISRPRIV 540

ATCC24230 PYGHQAS FISGPRACFGWRFAVAEMKAFVTLRRVQFEPIISHPEYEHITLIISRPRIV 540

WtA PYGHQAS FISGPRACFGWRFAVAEMKAFVTLRRVQFEPIISHPEYEHITLIISRPRIV 540

ATCC96815 GREKEGYQMLQVKPVE 557

ATCC96594 GREKEGYQMLQVKPVE 557

VKPMY2410 GREKEGYQMLQVKPVE 557

ATCC24203 GREKEGYQMLQVKPVE 557

DQ002006.1 GREKEGYQMLQVKPVE 557

WtB GREKEGYQMLQVKPVE 557

ATCC24230 GREKEGYQMLQVKPVE 557

WtA GREKEGYQMLQVKPVE 557

ANEXO 6

Alineamiento de secuencias de aminoácidos del gen *crtS* de las cepas Wt XR5, XR17, XY13, XY21 y XP26.

```

R17      MFILVLLTGALGLAAFSWASIAFFSLYLAPRRSSLYNLQGPDHTNYFTGNFLDILSARTG 60
Y21      MFILVLLTGALGLAAFSWASIAFFSLYLAPRRSSLYNLQGPDHTNYFTGNFLDILSARTG 60
R5       MFILVLLTGALGLAAFSWASIAFFSLYLAPRRSSLYNLQGPDHTNYFTGNFLDILSARTG 60
Wt       MFILVLLTGALGLAAFSWASIAFFSLYLAPRRSSLYNLQGPHTNYFTGNFLDILSARTG 60
P26      MFILVLLTGALGLAAFSWASIAFFSLYLAPRRSSLYNLQGPHTNYFTGNFLDILSARTG 60
Y13      MFILVLLTGALGLAAFSWASIAFFSLYLAPRRSSLYNLQGPSHTNYFTGNFLDILSARTG 60

*****

R17      EEHAKYREKYGSTLRFAGIAGAPVLNSTDPEVFNHVMKEAYDYPKPGMAARVLR IATGDG 120
Y21      EEHAKYREKYGSTLRFAGIAGAPVLNSTDPKVFNHVMKEAYDYPKPGMAARVLR IATGDG 120
R5       EEHAKYREKYGSTLRFAGIAGAPVLNSTDPKVFNHVMKEAYDYPKPGMAARVLR IATGDG 120
Wt       EEHAKYREKYGSTLRFAGIAGAPVLNSTDPKVFNHVMKEAYDYPKPGMAARVLR IATGDG 120
P26      EEHAKYREKYGSTLRFAGIAGAPVLNSTDPKVFNHVMKEAYDYPKPGMAARVLR IATGDG 120
Y13      EEHAKYREKYGSTLRFAGIAGAPVLNSTDPKVFNHVMKEAYDYPKPGMAARVLR IATGDG 120

*****

R17      VVTAEGEAHRHRRIMIPSLSAQAVKSMVPIFLEKGMELVDKMMEDAAEKDMAVGESAGE 180
Y21      VVTAEGEAHRHRRIMIPSLSAQAVKSMVPIFLEKGMELVDKMMEDAAEKDMAVGESAGE 180
R5       VVTAEGEAHRHRRIMIPSLSAQAVKSMVPIFLEKGMELVDKMMEDAAEKDMAVGESAGE 180
Wt       VVTAEGEAHRHRRIMIPSLSAQAVKSMVPIFLEKGMELVDKMMEDAAEKDMAVGESAGE 180
P26      VVTAEGEAHRHRRIMIPSLSAQAVKSMVPIFLEKGMELVDKMMEDAAEKDMAVGESAGE 180
Y13      VVTAEGEAHRHRRIMIPSLSAQAVKSMVPIFLEKGMELVDKMMEDAAEKDMAVGESAGE 180

*****

R17      KKATRLETEGVDVKDWVGRATLDVMALAGFDYKSDSLQNKTNELYVAFVGLTDGFAP TLD 240
Y21      KKATRLETEGVDVKDWVGRATLDVMALAGFDYKSDSLQNKTNELYVAFVGLTDGFAP TLD 240
R5       KKATRLETEGVDVKDWVGRATLDVMALAGFDYKSDSLQNKTNELYVAFVGLTDGFAP TLD 240

```

Wt KKATRLETEGVVDKDWVGRATLDVMALAGFDYKSDSLQKTNELYVAFVGLTDGFAPTLT 240

P26 KKATRLETEGVVDKDWVGRATLDVMALAGFDYKSDSLQKTNELYVAFVGLTDGFAPTLT 240

Y13 KKATRLETEGVVDKDWVGRATLDVMALAGFDYKSDSLQKTNELYVAFVGLTDGFAPTLT 240

R17 SFKAIMWDFVPYFRTMKRRHEIPLTQGLAVSRRVGIELMEQKKQAVLGSASDQAVDKKDV 300

Y21 SFKAIMWDFVPYFRTMKLRHEIPLTQGLAVSRRVGIELMEQKKQAVLGSASDQAVDKKDV 300

R5 SFKAIMWDFVPYFRTMKRRHEIPLTQGLAVSRRVGIELMEQKKQAVLGSASDQAVDKKDV 300

Wt SFKAIMWDFVPYFRTMKRRHEIPLTQGLAVSRRVGIELMEQKKQAVLGSASDQAVDKKDV 300

P26 SFKAIMWDFVPYFRTMKRRHEIPLTQGLAVSRRVGIELMEQKKQAVLGSASDQAVDKKDV 300

Y13 SFKAIMWDFVPYFRTMKRRHEIPLTQGLAVSRRVGIELMEQKKQAVLGSASDQAVDKKDV 300

R17 QGRDILSLLVRANIAANLPESQKLSDEEVLAQISNLLFAGYETS SAVLTWWMFHRLSEDKA 360

Y21 QGRDILSLLVRANIAANLPESQKLSDEEVLAQISNLLFAGYETS STVLTWWMFHRLSEDKA 360

R5 QGRDILSLLVRANIAANLPESQKLSDEEVLAQISNLLFAGYETS STVLTWWMFHRLSEDKA 360

Wt QGRDILSLLVRANIAANLPESQKLSDEEVLAQISNLLFAGYETS STVLTWWMFHRLSEDKA 360

P26 QGRDILSLLVRANIAANLPESQKLSDEEVLAQISNLLFAGYETS STVLTWWMFHRLSEDKA 360

Y13 QGRDILSLLVRANIAANLPESQKLSDEEVLAQISNLLFAGYETS STVLTWWMFHRLSEDKA 360

*****:*****

R17 VQDKLREEICQIDTDMPTLDELNALPYLEAFVKESLR LDPPSPYANRECLKDEDFIPLAE 420

Y21 VQDKLREEICQIDTDMPTLDELNALPYLEAFVKESLR LDPPSPYANRECLKDEDFIPLAE 420

R5 VQDKLREEICQIDTDMPTLDELNALPYLEAFVKESLR LDPPSPYANRECLKDEDFIPLAE 420

Wt VQDKLREEICQIDTDMPTLDELNALPYLEAFVKESLR LDPPSPYANRECLKDEDFIPLAE 420

P26 VQDKLREEICQIDTDMPTLDELNALPYLEAFVKESLR LDPPSPYANRECLKDEDFIPLAE 420

Y13 VQDKLREEICQIDTDMPTLDELNALPYLEAFVKESLR LDPPSPYANRECLKDEDFIPLAE 420

R17 PVIGRDSVINEVRITKGTMVMLPLFNINRSKFIYGEDAEFRPERWLEDVTDLSLSIEA 480

Y21 PVIGRDGVSINEVRITKGTMVMLPLFNINRSKFIYGEDAEEFRPERWLEDVTDLSLSIEA 480
R5 PVIGRDGVSINEVRITKGTMVMLPLFNINRSKFIYGEDAEEFRPERWLEDVTDLSLSIEA 480
Wt PVIGRDGVSINEVRITKGTMVMLPLFNINRSKFIYGEDAEEFRPERWLEDVTDLSLSIEA 480
P26 PVIGRDGVSINEVRITKGTMVMLPLFNINRSKFIYGEDAEEFRPERWLEDVTDLSLSIEA 480
Y13 PVIGRDGVSINEVRITKGTMVMLPLFNINRSKFIYGEDAEEFRPERWLEDVTDLSLSIEA 480

R17 PYGHQAS FISGPRACFGWRFAVAEMKAFLEFVTLRRVQFEPISHPEYEHITLIISRPRIV 540
Y21 PYGHQAS FISGPRACFGWRFAVAEMKAFLEFVTLRRVQFEPISHPEYEHITLIISRPRIV 540
R5 PYGHQAS FISGPRACFGWRFAVAEMKAFLEFVTLRRVQFEPISHPEYEHITLIISRPRIV 540
Wt PYGHQAS FISGPRACFGWRFAVAEMKAFLEFVTLRRVQFEPISHPEYEHITLIISRPRIV 540
P26 PYGHQAS FISGPRACFGWRSAVAEMKAFLEFVTLRRVQFEPISHPEYEHITLIISRPRIV 540
Y13 PYGHQAS FISGPRACFGWRFAVAEMKAFLEFVTLRRVQFEPISHPEYEHITLIISRPRIV 540

R17 GREKEGYQMLQVKPVE 557
Y21 GREKEGYQMLQVKPVE 557
R5 GREKEGYQMLQVKPVE 557
Wt GREKEGYQMLQVKPVE 557
P26 GREKEGYQMLQVKPVE 557
Y13 GREKEGYQMLQVKPVE 557

ANEXO 7

Versiones obtenidas de la secuencia de *crtYB*.

>WtA

ATGACGGCTCTCGCATATTACCAGATGTTTGTCTCCATACCTCTTCTTCGTTTTGCACACCACT
TATGTGTGCATATGTGTGTGCGTCCTTCCAAATCTTCAATGACTAACATCTTTACCGTGCTCT
TCTTCTTAGCCATCTGATCTATACTCTCCAATTCTTGGTCTTCTCGGTCTGCTCACTTCCCCG
ATTTTGACAAAATTTGACATCTACAAAATATCGATCCTCGTATTTATTGCGTTTAGTGCAACCA
CACCATGGGACTCATGGATCATCAGAAATGGCGCATGGACATATCCCTCAGCGGAGAGTGGCCA
AGGCGTGTTTGAACGTTTCTAGAGTTAGTCGACCGTTAATTCTCTAAGCCGCGCGTCGTTTCC
GCGATTACATTTAACATCTGAATTTATCCCTGATCAACAGTGTTCATATGAAGAGTACGCTTT
CTTTGTCATTCAAACCGTAATCACCGGCTTGGTCTACGTCTTGGCAACTAGGCACCTTCTCCCA
TCTCTCGCGCTTCCCAAGACTAGATCGTCCGCCCTTCTCTCGCGCTCAAGGCGCTCATCCCTC
TGCCATTATCTACCTATTTACCGCTCACCCAGCCATCGCCCGACCCGCTCGTGACAGATCA
CTACTTCTACATGCGGGCACTCTCCTTACTCATCACCCACCTACCATGCTCTTGGCAGCATT
TCAGGCGAATATGCTTTTCGATTGGAAAAGTGGCCGAGCAAAGTCAACTATTGCAGCAATCATGA
TCCCGACGGTGTATCTGATTTGGGTAGATTATGTTGCTGTCCGTCAAGACTCTTGGTCGATCAA
CGATGAGAAGATTGTAGGGTGGAGGCTTGGAGGTGTACTACCCATTGAGGAAGCTATGTTCTTC
TTACTGACGAATCTAATGATTGTTCTGGGTCTGTCTGCCTGTAAGTTGATCTCATCCTCTCTT
CCTTTGGTGAAAAAGCTGTTTGGCTGATTGCTGCGAATTCACCCATCGGAATCTGTAGCGATC
ATACTCAGGCCCTATACCTGCTACACGGTCGAACTATTTATGGCAACAAAAGATGCCATCTTC
ATTTCCCCTCATTACACCGCCTGTGCTCTCCCTGTTTTTTAGCAGCCGACCATACTCTTCTCAG
CCAAAACGTGACTTGAACCTGGCAGTCAAGTTGTTGGAGGAAAAGAGCCGGAGCTTTTTTGTG
CCTCGGCTGGATTTCTAGCGAAGTTAGGGAGAGGCTGGTTGGACTGTGAGCACGCATTCTTTA
GGTTTGTTCGGTCTTTACCTTCATGTGCATTCGCTGATCAGTTTTCTTGGTGATCCGGGACCT
GCATAACAGATACGCATTCTGCCGGGTGACTGATGATCTTATCGACTCTCCTGAAGTATCTTCC
AACCCGCATGCCACAATTGACATGGTCTCCGATTTTCTTACCCTACTATTTGGGCCCCCGCTAC
ACCCTTCGCAACCTGACAAGATCCTTTCTTCGCCTTTACTTCTCCTTCGCACCCTTCCCGACC
CACGGGAATGTATCCCCTCCCGCCTCCTCCTTCGCTCTCGCCTGCCGAGCTCGTTCAATTCCTT
ACCGAAAGGGTTCCCGTTCAATACCATTTGCCTTCAGGTTGCTCGCTAAGTTGCAAGGGCTGA
TCCCTCGATACCCACTCGACGAACCTTAGAGGATACACCACTGATCTTATCTTTCTTTATC
GACAGAGGCAGTCCAGGCTCGGAAGACGCCTATCGAGACCACAGCTGACTTGCTGGACTATGGT
CTATGTGTAGCAGGCTCAGTCGCCGAGCTATTGGTCTATGTCTCTTGGGCAAGTGCACCAAGTC
AGGTCCCTGCCACCATAGAAGAAAGAGAAGCTGTGTTAGTGGAAGCCGAGAGATGGGAACTGC
CCTTCAGTTGGTGAACATTGCTAGGGACATTAAGGGGACGCAACAGAAGGGAGATTTTACCTA
CCACTCTCATCTTTGGTCTTCGGGATGAATCAAAGCTTGCATCCCGACTGATTGGACGGAAC
CTCGGCCTCAAGATTTTCGACAACTCCTCAGTCTATCTCCTTCGTCCACATTACCATCTTCAA
CGCCTCAGAAAAGCTTCCGGTTCGAATGGAAGACGTAICTCGCTTCCATTAGTCGCCTACGCAGAG

GATCTTGCCAAACATTCTTATAAGGGAATTGACCGACTTCTACCGAGGTTCAAGCGGGAATGC
GAGCGGCTTGCGCGAGCTACCTACTGATCGGCCGAGAGATCAAAGTCGTTTGGAAAGGAGACGT
CGGAGAGAGAAGGACAGTTGCCGGATGGAGGAGAGTACGGAAAGTCTTGAGTGTGGTCATGAGC
GGATGGGAAGGGCAGTAA

>WtB

ATGACGGCTCTCGCATATTACCAGATGTTTGTCTCTATACTCTTCTTCGTTTTGCATATCACT
CATGTTTTGCATATGTGTGTGCGTCCTTTCAAATCTCTCAATGACTAACATCCTGACCGTGCTCT
TCTTCTTAGCCATCTGATCTATACTCTCCAATTCTTGGTCTTCTCGGCCTGCTCACTTCCCCG
ATCTTGACAAAATTTGACATCTATAAAATATCGATCCTCGTATTCATTGCGTTTTAGTGCAACCA
CACCGTGGGACTCATGGATCATCAGAAATGGCGCATGGACATATCCGTCAGCGGAGAGTGGCCA
AGGCGTGTTTGGAACGTTTCTAGAGTTAGTCGACCATTAATTCTCTTAGTCGTGCGTCGCTTCC
GCGATTACACTTAACATCTGAATTTATCCCTGATCAACAGCGTTCCATATGAAGAGTACGCTTT
CTTTGTCATTCAAACCGTGATCACCGGCTTGGTCTACGTCTTGCAACTAGGCACCTTCTCCCA
TCTCTCGCGCTTCCAAGACTAGATCTTCCGCCCGTTCTCTCGCGCTAAAGGCGCTCATCCCTC
TGCCCATTTATCTACCTATTTACCCTCACCCAGCCATCGCCCGACCCACTCGTGACAGATCA
CTACTTTTACATGCGGGCACTCTCCTTACTCATCACTCCACCTACCATGCTCTTGGCAGCATT
TCAGGCGAATATGCTTTCGATTGGAAAAGTGGTCGAGCAAAGTCAACTATTGCAGCAATCATGA
TCCCGACGGTGTATCTGATTTGGGTAGATTATGTTGCTGTTGGTCAAGACTCTTGGTCGATCAA
CGATGAGAAGATTGTAGGGTGGAGGCTTGGAGGCGTACTACCCATCGAGGAAGCTATGTTCTTC
TTATTGACGAATCTAATGATTGTTCTGGGTCTGTCTGCCTGTAAGTTGATCTCCTCCTCTCTT
CCTTTGGCGAAAAAGCTGTTTTGCTGATTGCTGCGACTTCACCCATCGAAATCTGTAGCGATC
ATACTCAGGCCCTATACCTGCTACACGGTCAACTATATATGGCAACAAAAGATGCCATCTTC
ATTTCCCCTCATTACACCGCCTGTGCTCTCCCTATTTTTTAGCAGCCGACCATACTCTTCTCAG
CCAAAACGTGACTTGGAACTGGCAGTCAAGTTGTTGGAGAAAAGAGCCGGAGCTTTTTTGTGG
CCTCGGCTGGATTTCCCTAGCGAAGTCAGGGAGAGGCTGGTTGGATTGTGAGCACGCATTCTTTA
GGTTTGTTCGGTCTTTTCATCTTCATGTGCATTCGCTGATCAGTTTTCTTGGTGGTTCGGGACCT
GCTTAACAGATACGCGTTCTGCCGAGTACTGATGATCTTATCGACTCTCCTGAAGTATCTTCC
AACCCGCATGCCACAATTGACATGGTCTCCGATTTTCTTACCCTACTATTTGGGCCCCCGCTAC
ACCCTTCGCAACCTGACAAGACCCTTTCTTCGCCCTTACTTCCCTCCTTCGCACCCTTCCCGACC
CACAGGAATGTATCCCCTCCCGCCTCCTCCTTCGCTCTCGCCTGCCGAGCTTGTTTCGATTCCTT
ACCGAAAGGGTCCCCGTCCAATACCATTTGCCTTCAGGTTGCTCGCTAAATTGCAAGGGCTGA
TCCCTCGATACCCACTCGACGAACTCCTTAGAGGATATACCACTGATCTCACCTTTCCCTTATC
GACAGAGGCAGTCCAGGCTCGGAAGACCCCTATCGAGACCACAGCTGACTTGCTGGACTATGGT
TTATGTGTAGCAGGCTCAGTCGCTGAACTATTGGTCTATGTCTCTTGGGCAAGTGCACCAAGTC
AAGTCCCTGCCACCGTAGAAGAAAGAGAAGCTGTGTTAGTGGCAAGCCGAGAGATGGGAACCGC
CCTTCAGTTGGTGAATATTGCTAGGGACATTAAGGGGACGCAACAGAAGGAAGATTTTACCTA

CCACTCTCATTCTTTGGTCTTCGGGATGAATCAAAGCTTGCATTCCGACTGATTGGACGGAAC
CTCGGCCTCAAGATTTGACAAACTTCTTAGTCTATCTCCTTCGTCCACATTACCATCCTCAA
CGCCTCAGAAAAGTTCCGGTTCGAATGGAAGACGTACTCGCTTCCATTAGTCGCTTACGCAGAG
GATCTCGCCAAACATTCTTATAAGGGAATTGACCGACTTCCTACCGAGGTTCAAGCGGGAATGC
GAGCGGCTTGCGCGAGCTACCTACTGATCGGCCGAGAGATCAAAGTCGTTTGAAAGGAGACGT
CGGAGAGAGAAGGACAGTTGCTGGATGGAGGAGAGTACGGAAAGTCTTGAGTGTGGTCATGAGC
GGATGGGAAGGGCAGTAA

ANEXO 8

Alineamiento de secuencia de aminoácidos del gen *crtYB* obtenido en bases de datos y las versiones obtenidas de Wt.

```

crtYB      MTALAYYQIHLYTLPILGLLGLLTSPILTKFDIYKISILVFIAFSATTPWDSWIIRNGA 60
Wta        MTALAYYQIHLYTLPILGLLGLLTSPILTKFDIYKISILVFIAFSATTPWDSWIIRNGA 60
Wtb        MTALAYYQIHLYTLPILGLLGLLTSPILTKFDIYKISILVFIAFSATTPWDSWIIRNGA 60
*****

crtYB      WTYPSAESGQGVFGTFLDVPYEEYAFFVIQTVITGLVYVLA TRHLLPSLALPKTRSSALS 120
Wta        WTYPSAESGQGVFGTFLDVPYEEYAFFVIQTVITGLVYVLA TRHLLPSLALPKTRSSALS 120
Wtb        WTYPSAESGQGVFGTFLDVPYEEYAFFVIQTVITGLVYVLA TRHLLPSLALPKTRSSARS 120
*****

crtYB      LALKALIPLPIIYLFTHAHPSPSPDPLVTDHYFYMRALSLLITPPTMLLAALS GEYAFDWK 180
Wta        LALKALIPLPIIYLFTHAHPSPSPDPLVTDHYFYMRALSLLITPPTMLLAALS GEYAFDWK 180
Wtb        LALKALIPLPIIYLFTHAHPSPSPDPLVTDHYFYMRALSLLITPPTMLLAALS GEYAFDWK 180
*****

crtYB      SGRAKSTIAAIMIPTVYLIWVDYVAVGQDSWSINDEKIVGWRLGGVLP IEEAMFFLLTNL 240
Wta        SGRAKSTIAAIMIPTVYLIWVDYVAVGQDSWSINDEKIVGWRLGGVLP IEEAMFFLLTNL 240
Wtb        SGRAKSTIAAIMIPTVYLIWVDYVAVGQDSWSINDEKIVGWRLGGVLP IEEAMFFLLTNL 240
*****

crtYB      MIVLGLSACDHTQALYLLHGRTIYGNKKMPSSFPLITPPVLSLFFSSRPYSSQP KRDELEL 300
Wta        MIVLGLSACDHTQALYLLHGRTIYGNKKMPSSFPLITPPVLSLFFSSRPYSSQP KRDELEL 300
Wtb        MIVLGLSACDHTQALYLLHGRTIYGNKKMPSSFPLITPPVLSLFFSSRPYSSQP KRDELEL 300
*****

```

crtYB AVKLLLEEKSRSSFVVASAGFPSEVRERLVGLYAFCRVTDDLIDSPEVSSNPATIDMVSDF 360
WTa AVKLLLEEKSRSSFVVASAGFPSEVRERLVGLYAFCRVTDDLIDSPEVSSNPATIDMVSDF 360
WTb AVKLLLEEKSRSSFVVASAGFPSEVRERLVGLYAFCRVTDDLIDSPEVSSNPATIDMVSDF 360
*****;*****

crtYB LTLFLGPPHLHPSQPDKILSSPLLPPSHPSRPTGMYPLPPPSLSPAELVQFLTERVPVQY 420
WTa LTLFLGPPHLHPSQPDKILSSPLLPPSHPSRPTGMYPLPPPSLSPAELVQFLTERVPVQY 420
WTb LTLFLGPPHLHPSQPDKTLSSPLLPPSHPSRPTGMYPLPPPSLSPAELVRFILTERVPVQY 420
***** *****;*****

crtYB HFAFRLAKLQGLIPRYPLDELLRGYTTDLIFPLSTEAVQARKTPIETTADLLDYGLCVA 480
WTa HFAFRLAKLQGLIPRYPLDELLRGYTTDLIFPLSTEAVQARKTPIETTADLLDYGLCVA 480
WTb HFAFRLAKLQGLIPRYPLDELLRGYTTDLTFPLSTEAVQARKTPIETTADLLDYGLCVA 480
***** *****

crtYB GSVAE LLVYVSWASAPSQVPATIEEREAVLVASREMGTALQLVNIARDIKGDATEGRFY 540
WTa GSVAE LLVYVSWASAPSQVPATIEEREAVLVASREMGTALQLVNIARDIKGDATEGRFY 540
WTb GSVAE LLVYVSWASAPSQVPATVEEREAVLVASREMGTALQLVNIARDIKGDATEGRFY 540
*****;*****

crtYB PLSFFGLRDESKLAIPTDWTEPRQDFDKLLSLSPSSTLPSSNASESFRFEWKTYSLPLV 600
WTa PLSFFGLRDESKLAIPTDWTEPRQDFDKLLSLSPSSTLPSSNASESFRFEWKTYSLPLV 600
WTb PLSFFGLRDESKLAIPTDWTEPRQDFDKLLSLSPSSTLPSSNASESFRFEWKTYSLPLV 600

crtYB AYAEDLAKHSYKIDRLPTEVQAGMRAACASYLLIGREIKVVKGDVGERRTVAGWRRVR 660
WTa AYAEDLAKHSYKIDRLPTEVQAGMRAACASYLLIGREIKVVKGDVGERRTVAGWRRVR 660
WTb AYAEDLAKHSYKIDRLPTEVQAGMRAACASYLLIGREIKVVKGDVGERRTVAGWRRVR 660

crtYB KVLSVMSGWEGQ 673

WTa KVLSVMSGWEGQ 673

WTb KVLSVMSGWEGQ 673

ANEXO 9

Alineamiento de secuencias de aminoácidos del gen *crtYB* de las versiones obtenidas de Wt y XP26.

En amarillo, residuos tapa de sitio catalítico. En rojo, hueco de unión al sustrato. En verde, residuos catalíticos. En gris, sitio de unión Mg²⁺-sustrato=regiones ricas en aspartato.

```

WTb      MTALAYYQIHLIYTLPIGLLGLLTSPILTKFDIYKISILVFIAFSATTPWDSWIIRNGA  60
P26b     MTALAYYQIHLIYTLPIGLLGLLTSPILTKFDIYKISILVFIAFSATTPWDSWIIRNGA  60
WTa      MTALAYYQIHLIYTLPIGLLGLLTSPILTKFDIYKISILVFIAFSATTPWDSWIIRNGA  60
P26a     MTALAYYQIHLIYTLPIGLLGLLTSPILTKFDIYKISILVFIAFSATTPWDSWIIRNGA  60
*****

WTb      WTYP  
SAESGQGVFGTFLDVPYEEYAFFVIQTVITGLVYVLATRHL  
LPSLALPKTRSSARS  120
P26b     WTYP  
SAESGQGVFGTFLDVPYEEYAFFVIQTVITGLVYVLATRHL  
LPSLALPKTRSSARS  120
WTa      WTYP  
SAESGQGVFGTFLDVPYEEYAFFVIQTVITGLVYVLATRHL  
LPSLALPKTRSSALS  120
P26a     WTYP  
SAESGQGVFGTFLDVPYEEYAFFVIQTVITGLVYVLATRHL  
LPSLALPKTRSSALS  120
*****

WTb      LALKALIPLPIIYLFTAHPSPSPDPLVTDHYFYMRALSLLITPPTMLLAALS  
GGEYAFDWK  180
P26b     LALKALIPLPIIYLFTAHPSPSPDPLVTDHYFYMRALSLLITPPTMLLAALS  
GGEYAFDWK  180
WTa      LALKALIPLPIIYLFTAHPSPSPDPLVTDHYFYMRALSLLITPPTMLLAALS  
GGEYAFDWK  180
P26a     LALKALIPLPIIYLFTAHPSPSPDPLVTDHYFYMRALSLLITPPTMLLAALS  
GGEYAFDWK  180
*****

WTb      SGRAKSTIAAIMIPTVYLIWVDYVAVGQDSWSINDEKIVGWRLLGGVLP  
IEEAMFFLLTNL  240
P26b     SGRAKSTIAAIMIPTVYLIWVDYVAVGQDSWSINDEKIVGWRLLGGVLP  
IEEAMFFLLTNL  240
WTa      SGRAKSTIAAIMIPTVYLIWVDYVAVGQDSWSINDEKIVGWRLLGGVLP  
IEEAMFFLLTNL  240
P26a     SGRAKSTIAAIMIPTVYLIWVDYVAVGQDSWSINDEKIVGWRLLGGVLP  
IEEAMFFLLTNL  240

```

WTb MIVLGLSACDHTQALYLLHGRTIYGNKKMPSSFPLITPPVLSLFFSSRPYSSQPKRDLEL 300

P26b MIVLGLSACDHTQALYLLHGRTIYGNKKMPSSFPLITPPVLSLFFSSRPYSSQPKRDLEL 300

WTa MIVLGLSACDHTQALYLLHGRTIYGNKKMPSSFPLITPPVLSLFFSSRPYSSQPKRDLEL 300

P26a MIVLGLSACDHTQALYLLHGRTIYGNKKMPSSFPLITPPVLSLFFSSRPYSSQPKRDLEL 300

WTb AVKLLEK**KSR**S**F**FVASAGFPSEVRERLVGL**Y**A**F**C**R**V**T****D**D**L**I**D**SPEVSSNPATIDMVSD**F** 360

P26b AVKLLEK**KSR**S**F**FVASAGFPSEVRERLVGL**Y**A**F**C**R**V**T****D**D**L**I**D**SPEVSSNPATIDMVSD**F** 360

WTa AVKLLEK**KSR**S**F**FVASAGFPSEVRERLVGL**Y**A**F**C**R**V**T****D**D**L**I**D**SPEVSSNPATIDMVSD**F** 360

P26a AVKLLEK**KSR**S**F**FVASAGFPSEVRERLVGL**Y**A**F**C**R**V**T****D**D**L**I**D**SPEVSSNPATIDMVSD**F** 360

*****:*****

WTb LTLLFGPPLHPSQPDKTLSSPLLPPSHPSRPTGMYPLPPPPSLSPAELVRFILTERVPVQY 420

P26b LTLLFGPPLHPSQPDKTLSSPLLPPSHPSRPTGMYPLPPPPSLSPAELVRFILTERVPVQY 420

WTa LTLLFGPPLHPSQPDKILSSPLLPPSHPSRPTGMYPLPPPPSLSPAELVQFLITERVPVQY 420

P26a LTLLFGPPLHPSQPDKILSSPLLPPSHPSRPTGMYPLPPPPSLSPAELVQFLITERVPVQY 420

***** *****:*****

WTb HFAFRL**L**AKLQGLIPRYPLDELLRGYTTDLTFPLSTEAVQARKTPIETTADLLD**Y**GLCVA 480

P26b HFAFRL**L**AKLQGLIPRYPLDELLRGYTTDLTFPLSTEAVQARKTPIETTADLLD**Y**GLCVA 480

WTa HFAFRL**L**AKLQGLIPRYPLDELLRGYTTDLIFPLSTEAVQARKTPIETTADLLD**Y**GLCVA 480

P26a HFAFRL**L**AKLQGLIPRYPLDELLRGYTTDLIFPLSTEAVQARKTPIETTADLLD**Y**GLCVA 480

***** *****:*****

WTb GSV**A**EL**L**IVYVSWASAPSQVPATVEEREAVLVASREM**G**TALQLVNIAR**D**IK**G**DATE**G**RFYL 540
P26b GSV**A**EL**L**IVYVSWASAPSQVPATVEEREAVLVASREM**G**TALQLVNIAR**D**IK**G**DATE**G**RFYL 540
WTa GSV**A**EL**L**IVYVSWASAPSQVPATIEEREAVLVASREM**G**TALQLVNIAR**D**IK**G**DATE**G**RFYL 540
P26a GSV**A**EL**L**IVYVSWASAPSQVPATIEEREAVLVASREM**G**TALQLVNIAR**D**IK**G**DATE**G**RFYL 540
*****:*****

WTb PLSFFGLRDESKLAIPTDWTEPRPQDFDKLLSLSPSSTLPSSNASESFRFEWKTYSLPLV 600
P26b PLSFFGLRNEKLAIPDWTEPRPQDFDKLLSLSPSSTLPSSNASESFRFEWKTYSLPLV 600
WTa PLSFFGLRDESKLAIPTDWTEPRPQDFDKLLSLSPSSTLPSSNASESFRFEWKTYSLPLV 600
P26a PLSFFGLRDESKLAIPTDWTEPRPQDFDKLLSLSPSSTLPSSNASESFRFEWKTYSLPLV 600
*****:*****

WTb AYAEDLAKHSYKIDRLPTEVQ**S****G**MRAACASYLLIGREIKVVWKG**D**VGER**R**TVAGWRRVR 660
P26b AYAEDLAKHFYKIDRLPTEVQ**A****G**MRAACASYLLIGREIKVVWKG**D**VGER**R**TVAGWRRVR 660
WTa AYAEDLAKHSYKIDRLPTEVQ**A****G**MRAACASYLLIGREIKVVWKG**D**VGER**R**TVAGWRRVR 660
P26a AYAEDLAKHSYKIDRLPTEVQ**A****G**MRAACASYLLIGREIKVVWKG**D**VGER**R**TVAGWRRVR 660
***** *****

WTb KVL**S**V**V**M**S**G**W**E**G**Q 673
P26b KVL**S**V**V**M**S**G**W**E**G**Q 673
WTa KVL**S**V**V**M**S**G**W**E**G**Q 673
P26a KVL**S**V**V**M**S**G**W**E**G**Q 673
