

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



Tesis Doctoral

**Búsqueda, clonación y expresión de genes de
carotenogénesis.**

José Miguel Araya Garay

Santiago de Compostela, 2012

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

**Búsqueda, clonación y expresión de genes de
carotenogénesis.**

Memoria presentada por José Miguel Araya Garay para optar al grado de Doctor en
Biotecnología

Santiago de Compostela, 2012

Fdo.: José Miguel Araya Garay

Santiago de Compostela, 2012 **TOMÁS GONZÁLEZ VILLA,**
CATEDRÁTICO DE MICROBIOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO
DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CERTIFICA:

La presente tesis titulada “**Búsqueda, clonación y expresión de genes de carotenogénesis**” que presenta José Miguel Araya Garay para optar al grado de Doctor en Biotecnología, ha sido realizada bajo mi dirección y la de la Dra. Patricia Veiga Crespo, en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela, y hallándose concluida, autorizo su presentación para que sea evaluada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmamos en la presente en Santiago de Compostela, Marzo, 2012.

Fdo.: Tomás González Villa.

Fdo.: Patricia Veiga Crespo.

“El que lee mucho y anda mucho, ve mucho y sabe mucho”

Miguel de Cervantes

A mis seres queridos

Agradecimientos:

Al Profesor Tomás González Villa, por haberme integrado en su grupo de investigación bajo su tutela académica, por su confianza, ayuda, paciencia y apoyo a lo largo de este trabajo.

A la Doctora Patricia Veiga Crespo por la codirección de este trabajo, por la ayuda y paciencia durante la realización de este trabajo.

Al Doctor Manuel Rey Méndez, por haberme integrado en su grupo de investigación durante todo el año 2011, por su apoyo, confianza y amistad.

A mis compañeros de laboratorio, Dr. Juan Vallejo, Dr. José Manuel Ageitos, Dra. Lucía Blasco, Dra. Trinidad de Miguel, José Luis Rodríguez y Sara Tomé. Especiales agradecimientos a Lucía Feijoo, por la inestimable ayuda.

Prof. Misawa (Research Institute for Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural University, Japan). Por los plásmidos cedidos para la realización de este trabajo.

Prof. Gerhard Sandmann (J. W. Goethe Universität, Frankfurt, Germany). Por el plásmido cedido para la realización de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de Bioquímica y Sistemática Molecular (CIBUS), Dr. Javier Quinteiro, Jorge, Lois, Belén, Lara y Noelia, por su amistad y buenos días de ciencia pura.

A Rosa Martín, por haberme integrado a las actividades del Foro de Recursos Marinos y de la Acuicultura Gallega.

A mis amigos de Santiago de Compostela, grandes personas...

A mi Galicia querida

A mi familia y Pachy

ABREVIATURAS

BrEt	Bromuro de Etidio
cDNA	DNA complementario o DNA de cadena sencilla
<i>crtQ</i>	Enzima ζ-caroteno desaturasa en cianobacterias
Da	Dalton
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Nucleótidos
DTT	Dithiothreitol
DW	(Dry Weight), peso seco
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EtOH	Etanol
FAD	Dinucleótido flavin adenina
FADH2	Dinucleótido flavin adenine reducido
Fc	<i>Ficus carica</i>
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramos
GGPP	Geranil-geranilpirofosfato
GRAS	(Generally Regarded As Safe), generalmente referido como seguro
h	Hora
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
L	Litro
LB	Medio Luria-Bertani
β-LCY	Enzima Licopeno β-ciclase
<i>β-lcy</i> o <i>crtL</i>	Gen licopeno β-ciclase
ε-LCY	Enzima epsilon licopeno ciclase
M	Molar
MeOH	Metanol
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Mili molar
mRNA	RNA mensajero
ms	Milisegundos

MTBE	Metil ter-butil eter
mV	Milivoltios
MVA	Ácido mevalónico
MEP	2-C-metil-Deritritol- 4-fosfato
N ₂	Nitrógeno gas
NAD	Dinucleótido de nicotinamida adenina
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
NFZ	Norflurazón
ORF	(Open reading frame), marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PM	Peso Molecular
RNA	Ácido ribonucleico
s	Segundos
SDS	Dodecilsulfato sódico
U	Unidad
UTR	Región no traducida
UV-Vis	Ultravioleta-visible
V	Voltios
ZDS	Enzima ζ-caroteno desaturasa en plantas o microalgas
Zds	Gen ζ-caroteno desaturasa en plantas o microalgas
μL	Microlitros
μg	Microgramos
°C	Grados Centígrados o Celsius
λ	Longitud de Onda

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
1. Carotenoides: conceptos generales	3
1.1. Estructura química y clasificación de los carotenoides	6
1.2. Propiedades físico-químicas de los carotenoides	8
1.3. Funciones biológicas de los carotenoides	10
1.4. Importancia nutricional de los carotenoides	11
2. Biosíntesis de carotenoides	13
2.1. Formación del precursor isopentenil difosfato (IPP)	14
2.2. Formación de fitoeno a partir de IPP y DMAPP	16
2.3. Reacciones de desaturación	18
2.4. Reacciones de ciclación	20
2.5. Síntesis de xantofilas	22
3. Complementación heteróloga	25
4. Aplicaciones biotecnológicas de los carotenoides	27
5. Potencial de <i>Pichia pastoris</i> para la producción de carotenoides	29
6. Análisis de Carotenoides	30
7. <i>Ficus carica</i>, una especie ancestral	31
OBJETIVOS	33
MATERIALES Y MÉTODOS	37
1. Tejido vegetal	39
2. Cepas y medios de cultivo	39
2.1. Bacterias utilizadas	39
2.1.1. Cepas comerciales	39
2.1.2. Cepas recombinantes para ensayos de complementación heteróloga en <i>E. coli</i>	39

2.2. Levaduras utilizadas	42
2.2.1. Levaduras comerciales	42
2.2.2. Levaduras recombinantes de <i>Pichia pastoris</i>	42
2.3 Medios y condiciones de cultivo	43
2.3.1. Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	43
2.3.2. Cultivo de <i>Pichia pastoris</i>	44
3. Oligonucleótidos empleados	44
3.1. Oligonucleótidos para la clonación del gen <i>zds-Fc</i>	44
3.2. Oligonucleótidos para la clonación del gen β - <i>lcy-Fc</i>	45
3.3. Cebadores para la clonación de genes de carotenogénesis en el vector pGAPZ α A	46
3.4. Oligonucleótidos para mutagénesis	47
4. Plásmidos	48
5. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos	55
5.1. Extracción y purificación de RNA total desde tejido vegetal	55
5.1.1. Ruptura del tejido vegetal	55
5.1.2. Homogenización del tejido	55
5.1.3. Extracción de RNA	55
5.1.4. Lavado del RNA extraído	55
5.1.5. Elución de RNA	56
5.2. Extracción de DNA	56
5.2.1. Extracción de DNA genómico de <i>Ficus carica</i>	56
5.2.2. Extracción de DNA genómico de <i>Pichia pastoris</i>	57
5.3 Amplificación de DNA. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	57
5.3.1. Síntesis de cDNA	57
5.3.2. Amplificación de la región interna	58

5.3.2.1. Amplificación de la región interna del gen ζ -caroteno desaturasa de <i>Ficus carica</i>	58
5.3.2.2. Amplificación de la región interna del gen licopeno β -ciclase de <i>Ficus carica</i>	58
5.3.3. RACE-PCR	59
5.3.3.1. Amplificación del extremo 5' del gen <i>zds-Fc</i>	59
5.3.3.2. Amplificación del extremo 3' del gen <i>zds-Fc</i>	60
5.3.3.3. Amplificación del extremo 5' del gen <i>β-lcy-Fc</i>	61
5.3.3.4. Amplificación del extremo 3' del gen <i>β-lcy-Fc</i>	62
5.3.4. Amplificación del cDNA portador de la región codificante del gen <i>zds</i> de <i>Ficus carica</i>	62
5.3.5. Amplificación del cDNA portador de la región codificante del gen <i>β-lcy</i> de <i>Ficus carica</i>	62
5.3.6. Amplificación de los genes de carotenogénesis para su expresión en <i>Pichia pastoris</i>	62
5.3.7. Mutagénesis dirigida	63
5.4. Secuenciación	65
5.4.1. Secuenciación de los insertos clonados en el vector pCR Blunt II TOPO	65
5.4.2. Secuenciación de los insertos clonados en el vector pUC19	65
5.4.3. Secuenciación de los insertos clonados en el vector pET21a	65
5.4.4. Secuenciación de los insertos clonados en el vector pGAPZA	65
5.4.5. Secuenciación de los insertos mutados en el vector pGAPZA	66
5.5. Electroforesis de DNA	66
5.6 Extracción y purificación de DNA a partir de geles de agarosa	66
5.7 Cuantificación de DNA	67

5.7.1 Determinación de la concentración de DNA mediante espectrofotometría	67
5.7.2 Determinación de la concentración de DNA mediante electroforesis	67
5.7.3. Determinación de la concentración de DNA mediante espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (BioRad)	67
5.8. Extracciones de DNA plasmídico	68
5.8.1. Extracción de DNA plasmídico empleando el kit “High Pure Plasmid Miniprep” (Roche Applied Science)	68
5.8.2. Extracción de DNA plasmídico empleando el kit “Miniprep Express Matrix” (Qbiogene)	68
5.8.3. Extracción de DNA plasmídico empleando el kit “Plasmid Midiprep” (Qiagen)	69
5.9. Ligación vector-inserto	69
5.9.1. Ligación de productos de PCR con extremos romos	69
5.9.2. Ligación de productos de digestión	70
6. Clonación de DNA	70
6.1.1. Clonación de la región interna del gen <i>zds</i> de <i>Ficus carica</i> en el vector pCR Blunt II TOPO	70
6.1.2. Clonación del extremo 5' y 3' del gen <i>zds-Fc</i> en el vector pUC19	70
6.1.2.1. Fosforilación del inserto (DNA purificado)	70
6.1.2.2. Digestión y defosforilación del vector	71
6.1.3. Clonación del cDNA portador de la región codificante correspondiente al gen <i>zds</i> de <i>Ficus carica</i> en el vector pET21a	71
6.2.1. Clonación de la región interna del gen licopeno β -ciclase de <i>Ficus carica</i> en vector pCR Blunt II TOPO	72
6.2.2. Clonación del extremo 5' y 3' del gen β - <i>lcy-Fc</i> en el vector pUC19	72
6.1.3.1. Fosforilación del inserto (DNA purificado)	72

6.1.3.2. Digestión y defosforilación del vector	72
6.2.3. Clonación del cDNA portador de la región codificante correspondiente al gen β -lcy de <i>Ficus carica</i> en el vector pET21a	72
6.3. Clonación de los genes de carotenogénesis en el vector pGAPZaA	73
7. Técnicas de transformación	76
7.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	76
7.1.1. Células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i> , método de $CaCl_2$ Rb	76
7.1.2. Células electrocompetentes de <i>Escherichia coli</i>	77
7.1.3. Transformación de <i>Escherichia coli</i> por shok térmico	78
7.1.4. Transformación de <i>Escherichia coli</i> por electroporación	78
7.2. Transformación de <i>Pichia pastoris</i>	79
8. Caracterización de los genes	80
8.1.1. Determinación de la actividad ζ -caroteno desaturasa de la enzima ZDS	80
8.1.2. Determinación de la actividad licopeno β -ciclase de la enzima β -LCY	80
8.1.3. Determinación de la actividad β -caroteno ketolasa y β -caroteno hidroxilasa en <i>Escherichia coli</i>	81
8.1.4. Determinación de la expresión de carotenoides en transformantes de <i>Pichia pastoris</i>	81
9. Análisis de pigmentos	82
9.1. Extracción de carotenoides desde cultivos bacterianos	82
9.2. Extracción de carotenoides desde cepas transformantes de <i>Pichia pastoris</i>	82
9.3. Identificación y cuantificación de carotenoides mediante HPLC	84
10. Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida (SDS-PAGE)	85
11. Análisis bioinformáticos	87

11.1. Árboles filogenéticos	87
11.2. Bioinformática	88
RESULTADOS	89
1. Búsqueda, clonación y expresión heteróloga en <i>E.coli</i> del gen <i>zds</i> de <i>Ficus carica</i>	91
1.1. Clonación del gen zeta-caroteno desaturasa de <i>Ficus carica</i> (<i>zds-Fc</i>)	91
1.2. Caracterización de la secuencia ZDS de <i>F. carica</i>	93
1.3. Determinación de la actividad ζ-caroteno desaturasa de la enzima ZDS	96
1.4. Identificación de carotenoides por HPLC	97
1.4.1. Cepa BL-EBPZ	97
1.4.2. Cepa BL-EBRZ	98
2. Búsqueda, clonación y expresión heteróloga en <i>E.coli</i> del gen <i>β-lcy</i> de <i>Ficus carica</i>	101
2.1. Clonación del gen licopeno β-ciclase de <i>Ficus carica</i> (<i>β-lcy-Fc</i>)	101
2.2. Caracterización de la secuencia β-LCY de <i>Ficus carica</i>	103
2.3. Determinación de la actividad licopeno β-ciclase de la enzima β-LCY	106
2.4. Identificación de carotenoides por HPLC para β-LCY	107
3. Análisis filogenético de ZDS y β-LCY	109
3.1. Árbol filogenético para ZDS	109
3.2. Árbol filogenético para β-LCY	112
4. Actividad β-caroteno ketolasa y β-caroteno hidroxilasa de los genes <i>crtW</i> y <i>crtZ</i>	113
5. Construcción de nuevas cepas de <i>Pichia pastoris</i> para la producción de licopeno, β-caroteno y astaxantina	116
5.1. Construcción de plásmidos para dirigir la síntesis de licopeno	116

5.2. Construcción de plásmidos para dirigir la síntesis de β -caroteno	120
5.2. Construcción del plásmido para dirigir la síntesis de astaxantina	122
5.3. Selección y caracterización de clones recombinantes de <i>Pichia pastoris</i>	124
5.4. Extracción de carotenoides y análisis por HPLC	126
DISCUSIÓN	129
CONCLUSIONES	141
BIBLIOGRAFÍA	145
ANEXO	167

INTRODUCCIÓN

1. Carotenoides: conceptos generales

Los carotenoides son componentes químicos de lo que colectivamente se conoce como la ruta de biosíntesis de los terpenoides (Cunningham y Grantte, 1998). Los terpenoides son compuestos químicamente diversos y estructuralmente complejos contruidos de unidades de isopreno de 5 carbonos, por lo que también suelen ser llamados isoprenoides. Los terpenoides son la mayor familia de productos naturales conocida (Brown y Somerville, 2001; Bramley, 2002), con una amplia variedad de funciones fisiológicas (Croteau, 2000). Alrededor de 40.000 moléculas de isoprenoides diferentes se han identificado en la biota del planeta (Rodríguez-Concepcion y Boronat, 2002; Rohdich *et al.*, 2005; Withers y Keasling, 2007). La mayor diversidad de isoprenoides se encuentra en plantas, en donde despliegan tanto funciones esenciales primarias como funciones secundarias no esenciales. Los isoprenoides más abundantes en células vegetales (esteroles y carotenoides) están involucrados en el mantenimiento de la fluidez de la membrana (función desempeñada por los esteroles en la mayoría de los eucariotas), así como en la estabilización de las membranas tilacoidales y protección de los componentes fotosintéticos contra el daño foto-oxidativo (función desempeñada por los carotenoides) (Hirschberg, 2001; Fraser y Bramley, 2004). Otros isoprenoides intervienen en procesos de modificación post-traduccional de proteínas como la prenilación (grupos prenil) y la glicosilación (dolicoles) y forman parte de las cadenas de transporte electrónico (la cadena lateral de los tocoferoles y de las quinonas ubiquinona, plastoquinona y prenilquinona), vitaminas como tocoferol (vitamina E) o la filoquinona (vitamina K1) (Rómer *et al.*, 2000). Asimismo, algunos reguladores del desarrollo como citoquininas, brasinoesteroides, giberelinas, ácido abscísico y estrigolactonas son también de naturaleza isoprenoide. No obstante, la mayoría de los isoprenoides presentes en las plantas actúan como metabolitos secundarios en la interacción de las plantas con su entorno. Algunos terpenos, como los monoterpenos o los sesquiterpenos, desempeñan un importante papel en la defensa de la planta frente a patógenos y herbívoros (McGarvey y Croteau, 1995). Otros monoterpenos volátiles presentes en flores y frutos son los responsables de participar en la atracción de insectos y aves para favorecer la polinización o dispersión de las semillas (Croteau *et al.*, 2000; Chappell, 2002). Además, varios grupos de isoprenoides son empleados comercialmente como fuente natural de pigmentos, aromas, fibras o ceras, así como por sus aplicaciones farmacéuticas, agroquímicas o como fitonutrientes beneficiosos para la salud humana.

Un grupo particularmente importante de isoprenoides son los carotenoides. Estos pigmentos naturales ampliamente distribuidos en la naturaleza, son componentes indispensables en las células. Se estima que la naturaleza produce aproximadamente 100 millones de toneladas de carotenoides al año (Rodríguez, 1999; Che Man y Tan, 2003). Son producidos por organismos fotosintéticos: bacterias fotosintéticas anaeróbicas, cianobacterias, algas y plantas superiores, así como numerosas bacterias no fotosintéticas y hongos (Goodwin, 1980). También se encuentran en mamíferos, pájaros, peces e invertebrados que aunque no pueden sintetizarlos “*de novo*”, son capaces de incorporarlos a través de la dieta.

Los carotenoides adquieren su nombre del pigmento más representativo del grupo, el β -caroteno, que fue descubierto en zanahorias *Daucus carota* (*D. carota*) por Wackenroder en 1831. Posteriormente, Berzelius (1837) acuñó el término "xantofila" para denotar químicamente un pigmento amarillo que había extraído de las hojas senescentes. Tswett, reconociendo la naturaleza química de los compuestos relacionados conocidos como carotenos y xantofilas, creó en 1911, la designación de "Carotenoides" para abarcar los dos tipos de pigmentos (Tswett, 1911). Hoy en día, el término “caroteno” se utiliza para referirse a un carotenoide hidrocarbonado y “xantofila” denota un caroteno modificado con uno o más grupos funcionales que contienen oxígeno. Un siglo y medio después del aislamiento del primer caroteno, 700 carotenoides de diferentes estructuras, además de sus isómeros, han sido caracterizados (O’Neil y Schwartz, 1992).

En plantas, los carotenoides determinan la coloración de órganos vegetales, subterráneos (β -caroteno en la raíz de la zanahoria), frutos (licopeno en el tomate), flores (criptoxantina en la caléndula), semillas (zeaxantina en el maíz), etc. Pero además se encuentran en todas las hojas verdes, aunque están ocultos por la clorofila; en otoño, al desaparecer la clorofila, contribuyen a dar al follaje una tonalidad característica que va desde amarillo al pardo, pasando por el rojo (Nelis y De Leenheer, 1989). En las plantas, la síntesis de carotenoides se lleva a cabo invariablemente en los plastos, por ejemplo en cloroplastos, cromoplastos etc., existiendo evidencia substancial de la participación de las membranas plastídicas en su biosíntesis (Fraser y Bramley, 2004). En cloroplastos se encuentran asociados a ciertas proteínas integrales de la membrana tilacoidal donde participan en los procesos de captación de luz y actuando como antioxidantes esenciales para la fotoprotección del aparato fotosintético (Demming-Adams *et al.*, 1996; Baroli y Niyogi, 2000). En algunos tejidos no fotosintéticos, los carotenoides se acumulan en plastos especializados llamados cromoplastos. En estos plastos, los carotenoides son secuestrados en distintos tipos de estructuras lipoproteicas y

cristalinas (Vishnevetsky *et al.*, 1999a). Además de colorear flores y frutos, los productos de degradación de los carotenoides (apocarotenoides), proporcionan aromas y sabores característicos. Algunas moléculas hormonales como el ácido abscísico o las estrigolactonas, esenciales en la regulación del desarrollo vegetal, son también apocarotenoides (Nambara y Marion-Poll, 2005; Klee, 2008).

Aunque sólo los organismos fotosintéticos y ciertas bacterias y hongos son capaces de sintetizarlos, los carotenoides también juegan un importante papel como antioxidantes y factores provitamínicos en muchos animales. En mamíferos, participan en la producción esencial de retinoides como el retinol o la vitamina A (Fraser y Bramley, 2004). En pájaros, los carotenoides incluidos en la dieta son los responsables del color amarillo y rojo de las plumas, astaxantina en flamencos (*Phoenicopterus ruber*) e Ibis escarlata (*Eudocimus ruber*), así como del color de la piel y carne en las gallinas (*Gallus gallus*), y especialmente de la yema de huevo (luteína y zeaxantina).

En ambientes acuáticos, los carotenoides son uno de los grupos más importantes de pigmentos naturales (Matsuno y Hirao, 1989). En peces adquieren gran importancia en la pigmentación de la carne de truchas (*Salmo trutta*, *Oncorhynchus mikiss*) y salmones (*Salmo salar*, *Oncorhynchus kisutch*) (astaxantina), además en estos últimos se ha demostrado la relación entre la pigmentación por carotenoides y su atractivo sexual (Blount *et al.*, 2003; Lewinsohn *et al.*, 2005a). En crustáceos la astaxantina y carotenoides relacionados pueden estar presentes en concentraciones muy altas, a menudo como complejos carotenoproteínicos de color verde, púrpura o azul mientras el animal está vivo; al ser cocinado se desnaturalizan dando lugar al color rojo característico (Britton, 1992). En equinodermos como el erizo de mar (*Paracentrotus lividus*) los carotenoides juegan un importante rol en la reproducción, desarrollo y fagocitosis (Rodríguez-Bernaldo *et al.*, 2001).

En el mundo microbiano, los carotenoides están presentes en algas, hongos y bacterias (Goodwin, 1980; Sieiro *et al.*, 2003). Entre los hongos destacan la cantaxantina en *Cantharellus cinnabarinus*, el licopeno en *Blakeslea trispora* y la astaxantina en *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*X. dendrorhous*; syn *Phaffia rhodozyma*). En las algas verdes cabe mencionar la luteína producida por *Spongiococcum exentricum* y *Chlorella pyrenoidosa*, el β -caroteno presente en *Dunaliella salina* (*D. salina*) y la astaxantina procedente de *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*). Por otra parte, en bacterias no fotosintéticas *Erwinia ureodovora* (*E. ureodovora*) y *Flavobacterium sp.* como productores de

zeaxantina, *Streptomyces chrestomyceticus*, productor de licopeno y cantaxantina en *Brevibacterium* KY-4313 y mayoría de halobacterias. Entre las bacterias fotosintéticas se ha descrito la presencia de astaxantina en *Anabaena variabilis* (*A. variabilis*) y *Agrobacterium aurantiacum* (*A. aurantiacum*) (Figura 1).

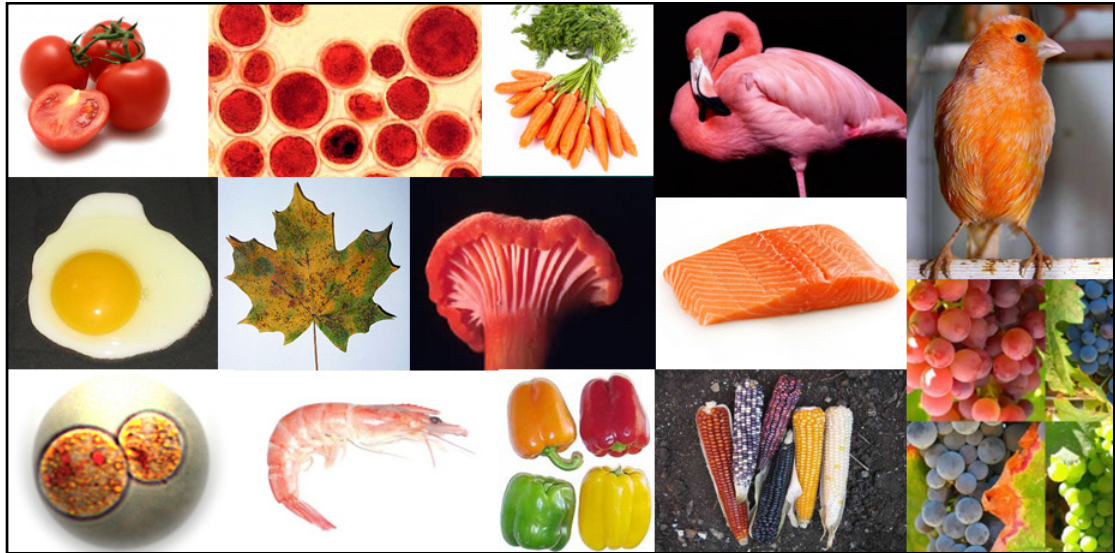


Figura 1. Ejemplo de carotenoides presentes en la naturaleza.

1.1. Estructura química y clasificación de los carotenoides

Como ocurre con cualquier compuesto químico, las funciones de los carotenoides son debidas en última instancia a su estructura química. En el caso particular de estos isoprenoides, la característica estructural más llamativa es su sistema de dobles enlaces conjugados característico que no sólo afecta a sus propiedades de absorción de luz, y por tanto a su color (Britton, 1995; Meléndez-Martínez *et al.*, 2007), sino también a su reactividad frente a radicales libres (Woodall *et al.*, 1997 a,b), a la forma de la molécula (Weedon, 1995) y a su efectividad en los procesos de transferencia de energía dentro del aparato fotosintético (Cogdell *et al.*, 1994; Britton, 1995; Young *et al.*, 1997).

La estructura básica de los carotenoides es un tetraterpeno simétrico y lineal de 40 átomos de carbono, formado a partir de ocho unidades isoprenoides de 5 carbonos como ya ha sido

mencionado, unidas de manera tal que el orden se invierte al centro (Figura 2). Este esqueleto básico puede modificarse por hidrogenación, deshidrogenación, ciclación, migración del doble enlace, acortamiento o extensión de la cadena, reordenamiento, isomerización, oxidación, o por combinaciones de estos procesos, dando como resultado una gran diversidad de estructuras.

La mayoría de los carotenoides se nombran por su nomenclatura tradicional, según las normas de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC). Tradicionalmente, los carotenoides se nombraron en función de la fuente de la que se aislaron por primera vez. Así, el término caroteno proviene del nombre científico de la zanahoria (*D. carota* L.), mientras que los pigmentos aislados del pensamiento (*Viola tricolor* L.) y algunas algas del género *Fucus* se denominaron violaxantina y fucoxantina, respectivamente.

Dependiendo de la disposición de los sustituyentes, los dobles enlaces carbono-carbono pueden existir en dos configuraciones, llamadas como isómeros E/Z o *cis/trans*. Según el número de dobles enlaces presentes en la molécula, teóricamente se pueden formar un gran número de diferentes mono y poli *cis* isómeros geométricos. Sin embargo, debido a los impedimentos estéricos, pocos isómeros se formarán en concentración apreciable en las reacciones de isomerización. En la naturaleza, los carotenoides principalmente se encuentran en la configuración *all-trans*.

Formalmente, todos los carotenoides pueden ser obtenidos desde una unidad acíclica C₄₀H₅₆ y todos contienen un sistema de dobles enlaces conjugados que les confiere sus propiedades físicas, bioquímicas, biológicas y químicas.

Basándonos en su composición, los carotenoides se subdividen en dos grupos: aquellos que contienen solamente átomos de carbono e hidrógeno son llamados carotenos o carotenoides hidrocarbonados, éstos pueden ser acíclicos como el licopeno (Figura 2A), monocíclicos como el γ -caroteno (Figura 2B) o dos anillos al final de la molécula (bicíclicos) como el β -caroteno (Figura 2C) (Gross, 1987; Britton, 1998; Fraser y Bramley, 2004).

Los carotenoides que contienen al menos un grupo oxígeno, se denominan xantofilas (Armstrong, 1997) u oxocarotenoides (carotenoides oxigenados) como la luteína, zeaxantina, violaxantina, astaxantina, etc., (Figura 2D). Los grupos oxigenados funcionales más comunes son los hidroxil- y epoxil- (epóxidos 5,6- ó 5,8-). También se han identificado carotenoides con grupos aldehído, ceto, carboxil, oxo, carbometoxil y metoxil (Gross, 1987; Britton, 1998; Fraser y Bramley, 2004).

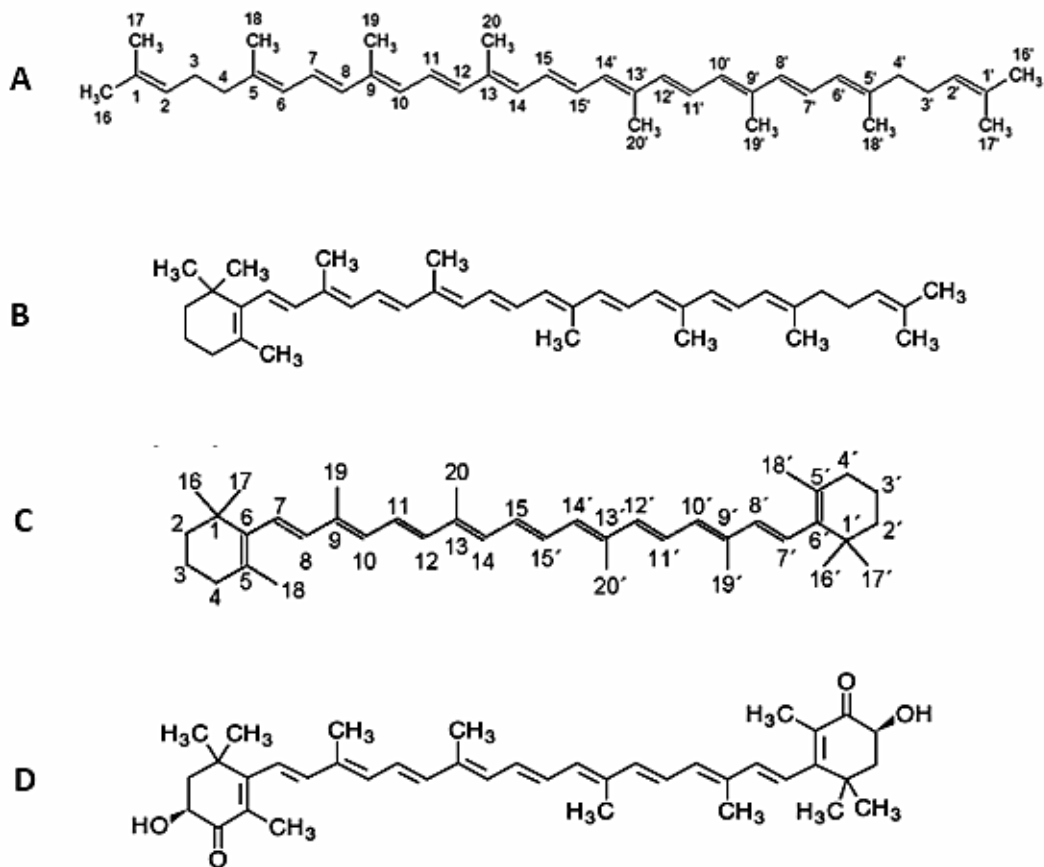


Figura 2. Ejemplo de tipos estructurales de carotenoides. (A) Estructura de caroteno lineal fitoeno. (B) Estructura del caroteno monocíclico, γ -caroteno. (C) Estructura del caroteno bicíclico, β -caroteno. (D) Estructura de la xantofila astaxantina. Se indica en las estructuras del fitoeno (A) y el β -caroteno (C) el sistema de numeración de carbonos empleado en la nomenclatura de los carotenoides.

1.2. Propiedades físico-químicas de los carotenoides

Los carotenoides regulan las propiedades físicas de las membranas celulares vegetales de forma similar a como lo hace el colesterol en las membranas animales (Gruszecki y Strzalka, 2005).

El espectro de absorción UV-Vis de los carotenoides es de interés para aclarar su estructura, ya que ésta determina en parte la función biológica del pigmento. Los máximos de absorción

en longitud de onda varían desde 450 a 490 nm. Normalmente aparecen tres máximos cuyas longitudes de onda (λ) dependen del número de dobles enlaces conjugados y del disolvente empleado para la medida (Britton, 1995; Schiedt y Liaaen-Jensen, 1995). La λ a la que absorben los carotenoides aumenta con el número de dobles enlaces conjugados y está directamente relacionada con su color. Así, el licopeno, que es el caroteno más insaturado, es rojo, mientras que el fitoeno (3 dobles enlaces conjugados) y fitoflueno (5 dobles enlaces conjugados), son incoloros (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007).

La ciclación también influye en el grado de coloración, el máximo de absorción aparece a longitudes de onda menores en comparación con los carotenoides no cíclicos con el mismo número de dobles enlaces conjugados (Britton, 1991), así, el β -caroteno y el γ -caroteno, aunque tienen el mismo número de dobles enlaces conjugados que el licopeno, son de color naranja y rojo-naranja, respectivamente.

Los carotenoides se consideran lípidos y como tales, hidrofóbicos y solubles en otros lípidos y disolventes orgánicos como acetona, etanol, metanol, éter etílico hexano y cloroformo entre muchos otros. Los carotenos se solubilizan mejor en solventes apolares como éter de petróleo y hexano, mientras que las xantofilas en solventes polares como etanol y metanol (Gross, 1987).

La polaridad de los carotenoides está directamente relacionada con su estructura química: la polaridad aumenta con el número de dobles enlaces conjugados. En los carotenos cíclicos, el anillo β - es más polar que el anillo ϵ -. En las xantofilas, la polaridad de los grupos funcionales aumenta desde el grupo menos polar monoepoxi al más polar hidroxilo (Gross, 1987).

En general, el carácter hidrofóbico de la mayoría de los carotenoides hace que tiendan a la agregación y cristalización en medio acuoso (Britton, 1995), siendo un ejemplo típico los cristales de licopeno en los cromoplastos de los tomates (Nguyen *et al.*, 2001; Seybold *et al.*, 2004), también se encuentran en solución en medios lipídicos, en dispersión coloidal o en combinación con proteínas en fase acuosa (Fraser y Bramley, 2004). Esta asociación con proteínas permite además a los carotenoides permanecer en una posición correcta con respecto a otras moléculas, siendo ejemplos claros de este hecho los complejos pigmento-proteína que mantienen a carotenoides y clorofilas en posiciones adecuadas para los procesos de transferencia de energía que tienen lugar durante la fotosíntesis (Frank y Cogdell, 1993; Gruszecki *et al.*, 1999). Las caroteno-proteínas son también solubles en agua y el color de estos complejos es estable durante años a temperatura ambiente y en contacto con el aire, por

lo que tienen un gran interés como posibles colorantes (Armenta-López *et al.*, 2004; Britton, 1983).

Analíticamente, el color de los carotenoides es de gran importancia, ya que un cambio de color durante el análisis es indicativo de síntesis, degradación o de modificación estructural de los pigmentos.

1.3. Funciones biológicas de los carotenoides

En Plantas, los carotenoides presentes en los complejos antena fotosintéticos recogen la luz radiante en sus longitudes de onda en la región azul del espectro (400-600 nm), una región que no es cubierta por las clorofilas, gracias a sus sistemas de dobles enlaces conjugados. La energía absorbida por los carotenoides en estas longitudes de onda puede ser transferida al centro de reacción fotosintética vía clorofilas (Bartley y Scolnik, 1995), ampliando así el espectro de luz que un organismo puede utilizar para la fotosíntesis (Valencia y Robles-Sardin, 2005). En concreto, en el complejo antena LHCII se ha descrito la existencia de sitios de unión a cuatro carotenoides, tres de los cuales (dos moléculas de luteína y una de neoxantina) participan en la captación y transferencia de energía. El cuarto carotenoide es un pigmento del ciclo de las xantofilas (zeaxantina, anteraxantina o violaxantina), que juega un papel decisivo en la disipación de la energía excedente (fotoprotección) y en la detoxificación de las formas reactivas del oxígeno que se forman durante la fotosíntesis (Merchant y Sawaya, 2005).

El β -caroteno por su parte, actúa como cofactor en el fotosistema II, mediando la transferencia electrónica del citocromo b559 y de la clorofila ChlZD2 al centro de reacción P680+ (Merchant y Sawaya, 2005).

Los carotenoides también son precursores de diversos compuestos volátiles importantes para el aroma de flores y frutos (Bouvier *et al.*, 2003b; Lewinsohn *et al.*, 2005a). Distintas variedades de tomate, sandía y melón (Lewinsohn *et al.*, 2005a; Ibdah *et al.*, 2006), caracterizadas por importantes diferencias en su perfil cualitativo de carotenoides, presentan además marcadas diferencias en los terpenos volátiles que poseen, existiendo una correlación entre el perfil de carotenoides específico de cada variedad y el perfil de apocarotenoides que presentan. Así, en aquellas variedades que carecen de carotenoides, como el mutante *yellow*

flesh de tomate, las variedades amarillas de sandía o las variedades de melón de pulpa verde pálida, no presentaron apocarotenoides (Ibdah *et al.*, 2006). Adicionalmente, existen cada vez más evidencias de la importancia de algunos apocarotenoides como señalizadores, regulando distintos aspectos del desarrollo de las plantas, como la dominancia apical y la ramificación (Schwartz *et al.*, 2004).

Un producto importante de la rotura oxidativa de C40-*cis*-epoxi-carotenoide, es el punto de partida para la biosíntesis del ácido abscísico (ABA) (Rock y Zeevaart, 1991), hormona vegetal que juega un papel fundamental en la regulación de las respuestas de las plantas a diferentes situaciones de estrés, en especial la deficiencia hídrica, y en muchos procesos del desarrollo, como la maduración, latencia y germinación de las semillas, el crecimiento vegetativo y la senescencia (Zeevaart y Creelman, 1988).

1.4. Importancia nutricional de los carotenoides

Sin duda el mayor beneficio que presenta una dieta rica en carotenoides, en concreto en β -caroteno, es su papel como provitamina A (Granado *et al.*, 1992; Grassmann *et al.*, 2002) siendo esta la función de los carotenoides mejor establecida (Olson, 1993). En mamíferos, los carotenoides como el β -caroteno, son convertidos en vitamina A (retinal) por la acción de la enzima intestinal mono-oxigenasa presente en la mucosa intestinal y en el hígado (Misawa *et al.*, 1994). Alrededor de un 70 % de la ingesta de β -caroteno se absorbe, y la eficiencia de la absorción decrece rápidamente cuando se incrementa la ingesta, siendo la tasa de conversión de β -caroteno de 6:1 (6 μg de β -caroteno es equivalente a 1 μg de retinal) (Taylor y Ramsay, 2005). Sin embargo, la absorción también depende del tipo de vegetal. Se ha comprobado que los carotenos se absorben dos o tres veces mejor de los vegetales de hoja verde que de los vegetales rojos o amarillos como las zanahorias (Krinsky, 1993).

El requerimiento mínimo para que una molécula tenga actividad provitamina A es un anillo β -ionona no sustituido en uno de los extremos de su molécula (Casas y Mallent, 1988) y una cadena poliénica de once carbonos. Por lo tanto, si nos basamos en las consideraciones estructurales de los más de 700 carotenoides que han sido aislados actualmente en la naturaleza (O'Neil y Schwartz, 1992), aproximadamente 50 de ellos tendrían actividad provitamina A. Algunos ejemplos de este tipo de carotenoides son α -caroteno, β -caroteno, ζ -

caroteno, β -criptoxantina y zeaxantina entre otros, los cuales tienen actividad provitamina A, pero en menor grado que el β -caroteno.

La dieta proporciona vitamina A de dos formas, como vitamina A preformada (retinil éster, retinol, retinal, 3-dehidroretinol y ácido retinoico) a partir de alimentos de origen animal, o como carotenoides, que se pueden transformar biológicamente en vitamina A (provitaminas A), generalmente a partir de alimentos de origen vegetal. La provitamina A tiene la ventaja de convertirse en vitamina A sólo cuando el cuerpo lo requiere; evitando así la toxicidad potencial de una sobredosis de vitamina (van den Berg *et al.*, 2000; Fraser y Bramley, 2004; Meléndez-Martínez *et al.*, 2004).

La vitamina A es un nutriente esencial para el hombre y resto de mamíferos porque no pueden sintetizarla (Meléndez-Martínez *et al.*, 2003). Esta vitamina posee una función importante en la regulación de la visión, crecimiento y reproducción humana. Es esencial para la diferenciación celular normal de la mayoría de los epitelios, incluyendo a los de la piel, bronquios, tráquea, estómago, intestino, útero, riñones y otros órganos (Ong y Choo, 1997; Rodríguez, 1999; Che Man y Tan, 2003). Derivado de su actividad provitamina A, los carotenoides desempeñan en el organismo una función importante en la disminución del riesgo de formación de cataratas y degeneración macular (Christen *et al.*, 2003) y la formación y proliferación de epitelios (Snodderly, 1995; van den Berg *et al.*, 2000; Fraser y Bramley, 2004; Meléndez-Martínez *et al.*, 2004). También ha sido recogido que una ingesta diaria elevada de carotenoides en la dieta, como β -caroteno, junto con otros carotenos como el licopeno, se correlaciona con la prevención y modulación de la patogénesis de ciertos tipos de cánceres (Van Breemen *et al.*, 1993; Van Poppel y Goldbohm, 1995; Giovannucci, 1999; Michaud *et al.*, 2000; Slattery *et al.*, 2000), disminución del riesgo de adquirir cáncer de pulmón (Wurtzel, 2001; Fraser y Bramley, 2004), cáncer de próstata (Giovannucci *et al.*, 1995; Agarwal, 2000) y cáncer de pecho (Dorgan *et al.*, 1998). De igual manera, estos carotenos se han relacionado con la protección contra enfermedades coronarias (Bartley y Scolnik, 1994; Kohlmeier, 1995; Palace *et al.*, 1999; Kritchevsky, 1999; Osganian *et al.*, 2003) y por sus funciones relacionadas con un aumento del sistema inmune (Hosotani y Kitagawa, 2003; Cooper, 2004; Bertram y Vine, 2005). Las xantofilas luteína y zeaxantina forman parte del sistema ocular de mamíferos y son conocidas por disminuir el riesgo de padecer cataratas (Landrum y Bone, 2001). En el caso de ingestas elevadas de luteína se ha observado su efecto positivo en la disminución del riesgo de cáncer de colon (Slattery *et al.*, 2000). Además, la λ a la que absorben algunos carotenoides proporciona protección frente a

los daños inducidos en la piel por la radiación UV y algunas enfermedades degenerativas asociadas a la edad avanzada (Rodríguez, 1999; Bruno y Medeiros, 2000; Olmedilla *et al.*, 2001; Nishino *et al.*, 2002; Guerin *et al.*, 2003; Semba y Dagneile, 2003; Cooper, 2004; Fraser y Bramley, 2004; Meléndez-Martínez *et al.*, 2004). La astaxantina y luteína presentan también acción antimutagénica, antiinflamatoria, desintoxicante y reductora de colesterol (Demming-Adams, 2002; Stahl y Sies, 2005).

Estos efectos biológicos se han atribuido a una propiedad antioxidante de los carotenoides para desactivar radicales libres altamente agresivos para el organismo que se originan como subproductos del metabolismo celular (Lorenz y Cysewski, 2000; Richmond, 2000; Eonson *et al.*, 2003) y la captura de especies de oxígeno reactivas como el oxígeno en singlete (van den Berg *et al.*, 2000; Khor y Raajeswari, 2001; Fraser y Bramley, 2004; Meléndez-Martínez *et al.*, 2004).

2. Biosíntesis de carotenoides

La biosíntesis de carotenoides tiene un origen evolutivo muy antiguo, y su síntesis ha sido modulada a través del proceso evolutivo (Cerrullo *et al.*, 2002), siendo la ruta de síntesis en bacterias tanto en aquellas que realizan fotosíntesis anaerobia o aerobia o en eubacterias que no realizan fotosíntesis (Harker y Bramley, 1999) prácticamente idéntica. Sin embargo, la ruta biosintética en plantas superiores es diferente a la operativa en microorganismos y ha sido objeto de estudio en los últimos años (Cunningham y Gantt, 1998; Hirschberg, 2001; Sandmann, 2001; Cunningham, 2002; Sandmann, 2002; Fraser y Bramley, 2004; Bouvier *et al.*, 2005; DellaPenna y Pogson, 2006; Howitt y Pogson, 2006; Sandmann *et al.*, 2006; Cong *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2011). Todas las enzimas implicadas en la biosíntesis de carotenoides en plantas superiores están codificadas por genes nucleares y poseen en el extremo amino-terminal un péptido señal de localización en plastidios, donde tienen lugar las reacciones de biosíntesis de carotenoides (Sandmann, 1994).

2.1. Formación del precursor isopentenil difosfato

Todos los isoprenoides derivan de la unidad fundamental de 5 átomos de carbono, isopentil difosfato (IPP) y de su isómero alélico dimetilalil difosfato (DMAPP). Actualmente se conoce la existencia de dos rutas biosintéticas independientes y compartimentalizadas para la formación de estos precursores isoprenoides.

La ruta del ácido mevalónico (MVA), presente en algunos procariotas gram-positivos y en arqueobacterias, hongos, algas, plantas y animales; y la ruta del del 2-C-metil-Deritritol-4-fosfato (MEP), que está presente en la mayoría de eubacterias incluyendo *Escherichia coli* (*E. coli*) y la mayoría de las bacterias patogénicas, algas verdes, plantas y algunos protozoarios (Figura 3).

En las plantas, las enzimas de la ruta del MVA se localizan en varios compartimentos subcelulares incluyendo los peroxisomas y el retículo endoplasmático (Leivar *et al.*, 2005; Carrie *et al.*, 2007). Actualmente se asume que esta ruta genera como producto final IPP citosólico que después se utiliza para la producción de esteroides, citoquininas, brasinosteroides, sesquiterpenos, dolicoles y grupos prenil, además, parte del IPP derivado de la ruta del MVA es transportado a las mitocondrias para la síntesis de ubiquinona y otros isoprenoides mitocondriales (Disch *et al.*, 1998) (Figura 3). En la ruta del MVA, el DMAPP se forma a partir de IPP por la acción del enzima IPP-DMAPP isomerasa (IDI).

La vía del 2-C-metil-Deritritol- 4-fosfato (MEP), en la que transcurren, la biosíntesis del IPP plastídico y sus derivados isoprenoides (carotenoides, monoterpénos, la cadena lateral de las clorofilas, plastoquinona, tocoferoles y las hormonas giberelinas y ácido abcísico) (Figura 3), fue descrita por vez primera por Rohmer *et al.*, (1993) y actualmente se han identificado todos los genes implicados, tanto en plantas como en bacterias, aunque la contribución de cada enzima al control del flujo metabólico en esta ruta, así como su participación en el contenido final de IPP y DMAPP disponibles para la síntesis de isoprenoides aún no ha sido caracterizada en detalle.

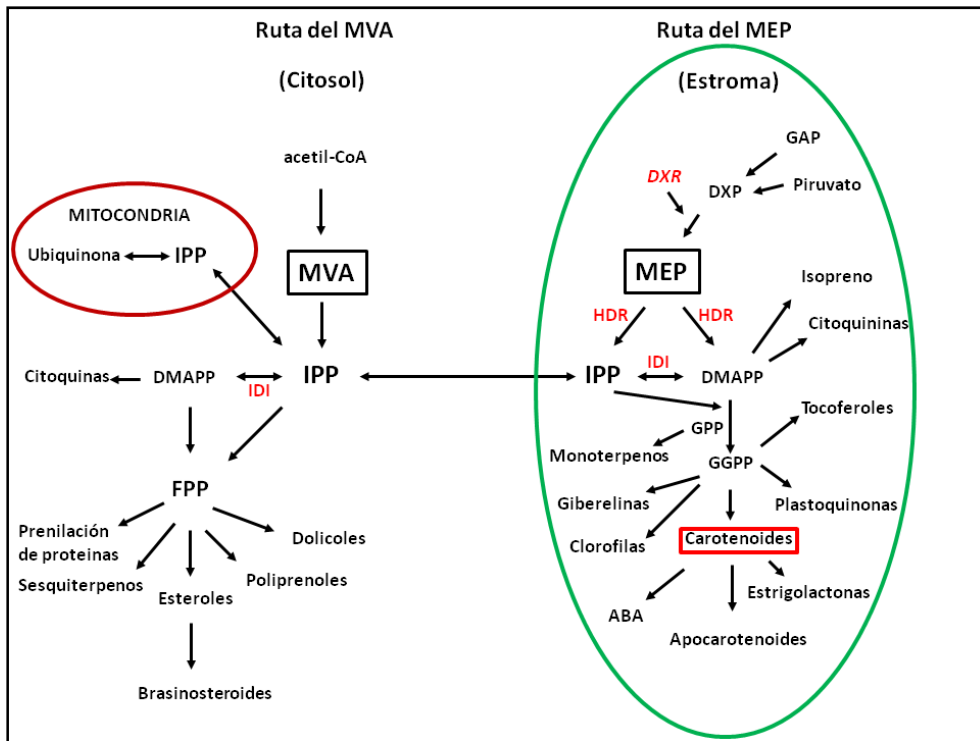


Figura 3. Ruta del ácido mevalónico (MVA) y ruta vía del 2-C-metil-Deritritol- 4-fosfato (MEP).

En contraste con el resto de los organismos, que sólo poseen una única vía para sintetizar los precursores de sus isoprenoides, las plantas usan tanto la ruta del MEP como la ruta del MVA para la síntesis de IPP y DMAPP, la mayor parte del IPP y DMAPP destinado a la síntesis de isoprenoides plásticos procede de la vía MEP (Figura 3). Además, a pesar de que ambas rutas se localizan en diferentes compartimentos celulares (Roberts, 2007; Withers y Keasling, 2007), diversos estudios indican que existe intercambio de metabolitos entre ellas (Bouvier *et al.*, 2005), aunque el tráfico de estos parece ocurrir preferencialmente del plastidio al citosol y únicamente en determinadas condiciones ambientales (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002).

El primer paso específico de la ruta del MEP es el rearrreglo intramolecular seguido de un proceso inespecífico de reducción de DXP (Rohmer, 1999) para originar MEP en una reacción catalizada por el enzima DXP reductoisomerasa (DXR). A continuación se produce la conversión del MEP en una mezcla de IPP y DMAPP (en una proporción aproximada de 5:1) por el enzima HMBPP reductasa (HDR) (Lange *et al.*, 1998; Withers y Keasling, 2007).

2.2. Formación de fitoeno a partir de IPP y DMAPP

La condensación de una molécula de IPP (C5) con una molécula de DMAPP (C5), da lugar al intermediario geranyl pirofosfato GPP, (C10) que se condensa con una molécula adicional de IPP, formando farnesil pirofosfato FPP, (C15). Este compuesto junto con otra molécula adicional de IPP produce geranylgeranyl pirofosfato (GGPP, C20), precursor común de carotenoides, clorofilas y giberelinas, y ubicado en el estroma (Figura 4). Esta serie de reacciones de condensación ocurren mediante ataque de unión carbonilo al doble enlace C-3,4 de la molécula de IPP, con la consiguiente pérdida del fosfato inorgánico. Cada una de estas reacciones está mediada por la acción de una enzima, denominada Geranylgeranyl difosfato sintasa (GGPS) (Figura 4). De este punto en adelante, toda la ruta metabólica pasa del estroma a la membrana plastídica.

La primera reacción específica de la ruta de biosíntesis de carotenoides es la condensación cabeza-cabeza de dos moléculas de *trans* GGPP para formar fitoeno. Todas las reacciones subsecuentes involucran la conversión de esta estructura básica (Cunningham y Grantte, 1998) (Figura 4). Esta reacción es catalizada en plantas por el polipéptido monomérico, fitoeno sintasa (PSY) y ocurre en dos etapas. La primera etapa consiste en la condensación de dos moléculas de GGPP, previa eliminación de un grupo difosfato de una de ellas, dando lugar al prefitoeno. A continuación, el prefitoeno sufre un reordenamiento molecular que conlleva la eliminación de un grupo difosfato y neutralización de un carbocatión (Bouvier *et al.*, 2005).

El producto mayoritario de las PSY de plantas es 15-*cis*-fitoeno (Goodwin, 1983) y su correcta actividad enzimática de PSY requiere asociación a membrana (Schledz *et al.*, 1996; Cunningham, 2002).

Los genes que codifican PSY han sido clonados de diversas plantas. En *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) parece estar codificada por un único gen, mientras que en tomate *Lycopersicon esculentum* (*L. esculentum*) y tabaco (*Nicotiana plumbgliflora*) existen dos genes que codifican PSY funcionales (Fraser *et al.*, 1999; Fraser y Bramley, 2004). En el caso del tomate, la isoforma PSY-1 es la responsable de la síntesis de fitoeno en tejido cromoplástico, mientras que PSY-2 lo es en tejido cloroplástico (Fraser *et al.*, 1999). Pese a que los genes que codifican ambas isoformas de PSY son 91% idénticos, la disfunción de PSY-1 no es compensada eficazmente por PSY-2 (Fraser *et al.*, 1999).

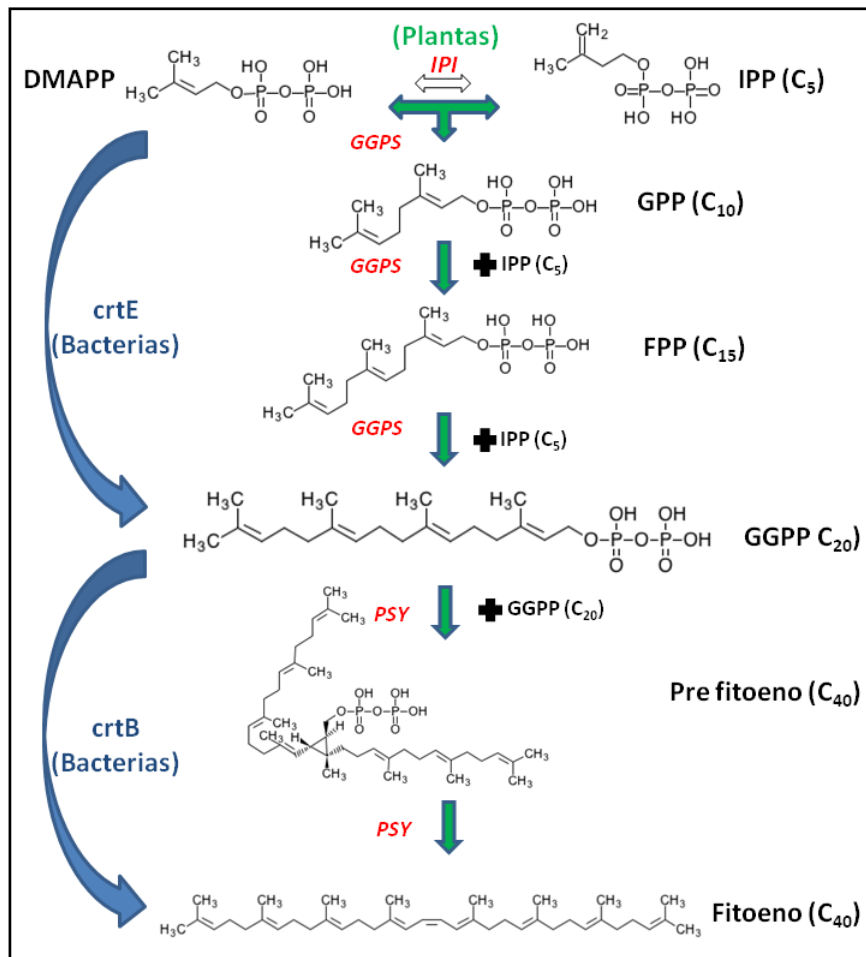


Figura 4. Esquema general de la biosíntesis de fitoeno en plantas superiores. En rojo se indican las enzimas que catalizan cada reacción, *IPI* (isopentil pirofosfato isomerasa), *GGPS* (geranilgeranil pirofosfato sintetasa) y *PSY* (fitoeno sintetasa) y en negro los compuestos, **DMAPP** (dimetil-alil-pirofosfato), **IPP** (isopentil pirofosfato), **GPP** (geranil pirofosfato), **FPP** (farnesil pirofosfato), **GGPP** (geranilgeranil pirofosfato), **Pre fitoeno** y **Fitoeno**.

Estas dos enzimas del principio de la ruta de biosíntesis de carotenoides, geranilgeranil pirofosfato sintetasa (*GGPS*) y fitoeno sintetasa (*PSY*), están relacionadas estructural y funcionalmente en todos los organismos carotenogénicos (Armstrong y Hearst, 1996). Genes bacterianos homólogos codificantes para geranilgeranil pirofosfato sintetasa (*crtE*) y fitoeno sintetasa (*crtB*) han sido descritos en *E. uredothora* (Misawa y Shimada, 1998). Así como en el hongo *M. circinelloides* donde el gen *carG* codifica para geranilgeranil pirofosfato sintetasa (Velayos *et al.*, 2003).

2.3. Reacciones de desaturación

Las diferentes fitoeno desaturasas descritas hasta ahora, difieren en el número de pasos de desaturación que realizan y de sus estructuras. Entre ellas existen el tipo bacteriano/hongo codificada por el gen *crtI* y el tipo cianobacterias/alga/planta, codificada por el gen *crtP* o *pds*. En cianobacterias existen dos genes relacionados estructuralmente que pueden codificar para la enzima zeta-caroteno desaturasa: *crtQ* (antes llamado *zds*) de *A. variabilis* que está evolutivamente relacionado con el gen bacteriano *crtI*, mientras que el segundo tipo *crtQb* (también llamado *crtQ-2*) de *Synechocystis* es muy similar a *crtP* y está estrechamente relacionado con el gen de planta *zds* (Sandmann, 1998).

En contraste con las bacterias y hongos, en donde todas las reacciones de desaturación desde fitoeno hasta licopeno son llevadas a cabo por una única enzima fitoeno desaturasa (*crtI*), en plantas son necesarias cuatro reacciones secuenciales de desaturación (Figura 5). Estas reacciones están catalizadas por dos enzimas, fitoeno desaturasa (PDS) (Pecker *et al.*, 1992; Busch *et al.*, 2002; Lange y Ghassemian, 2003) y zeta-caroteno desaturasa (ZDS) (Beyer *et al.*, 1989; Bartley *et al.*, 1991; Hugueney *et al.*, 1992; Shaub *et al.*, 2005). La primera desaturasa (PDS) utiliza cada lado del fitoeno simétrico para producir zeta-caroteno vía fitoflueno. La segunda desaturasa (ZDS) lleva a cabo la reacción con zeta-caroteno para formar licopeno vía neurosporeno (Cunningham, 2002) (Figura 5).

Cada una de estas enzimas introduce dos dobles enlaces simétricos en ambos extremos de la molécula sustrato. La introducción secuencial de dobles enlaces en los carbonos 11 y 11' de la molécula de fitoeno está catalizada por la enzima PDS. Esta desaturación de la molécula viene acompañada de isomerización *cis* de los enlaces 9 y 9' produciéndose fitoflueno (15,9'-*dicis*-fitoflueno) y ζ-caroteno (9,15,9'-*tricis*-ζ-caroteno). A continuación el doble enlace 15-*cis* es isomerizado a la forma *trans*, originándose 9,9'-*dicis*-ζ-caroteno. La forma en que esta isomerización (enzimática o no) tiene lugar aún no ha sido del todo resuelta. En el siguiente paso la enzima ZDS introduce dobles enlaces en forma *cis* en los carbonos 7 y 7', formándose neurosporeno (7,9,9'-*tricis*-neurosporeno) y finalmente prolicopeno (7,9,7',9'-*tetracis*-licopeno) (Breitenbach y Sandmann, 2005).

canalizados hacia el oxígeno vía una oxidasa cloroplástica terminal o a la cadena de transporte electrónico de la fotosíntesis.

Las secuencias de aminoácidos de PDS de plantas, microalgas y cianobacterias están muy bien conservadas (McCarthy *et al.*, 2004; Lohr *et al.*, 2005). Sin embargo, presentan poca identidad con la correspondiente fitoeno desaturasa de bacterias codificada por el gen *crtI*, que parece haber surgido de forma independiente en la evolución. Esta enzima bacteriana ha sido ampliamente utilizada en abordajes de ingeniería genética que pretendían incrementar los niveles de carotenoides en diferentes especies de plantas (Fraser y Bramley, 2004). La co-expresión de los genes bacterianos *crtB* y *crtI* en tubérculos de patata produce un aumento de los niveles de pigmentos (Diretto *et al.*, 2007). Del mismo modo, la co-expresión de ambos genes en endospermo de arroz induce la acumulación de β -caroteno, dando lugar al conocido “golden rice” (Ye *et al.*, 2000). Además, esta enzima CrtI, que presenta poca similitud con las desaturasas e isomerastas de carotenoides vegetales, no es inhibida por NFZ (Misawa *et al.*, 1993).

2.4. Reacciones de ciclación

La ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas superiores se bifurca en la ciclación del licopeno, dependiendo del tipo de ciclación que sufran los extremos de ésta molécula pueden producirse dos tipos de anillos, ϵ - ó β -, que únicamente difieren en la posición de un doble enlace en el anillo ciclohexano (Cunningham, 2002). El tipo de anillo producido depende de la enzima licopeno ciclasa (LCY) que actúa sobre el extremo de la molécula (Hirschberg *et al.*, 1997). En plantas superiores se han identificado dos tipos de LCYs: β -LCY (beta licopeno ciclasa), que cataliza la formación de anillos β - y ϵ -LCY (épsilon licopeno ciclasa) que introduce un anillo ϵ - (Figura 6). Un único producto génico, la Licopeno β -ciclasa (LCY- β) cataliza la formación del β -caroteno (Fraser y Bramley, 2004; Araya *et al.*, 2011). La enzima β -LCY puede actuar secuencialmente sobre ambos extremos de la molécula de licopeno dando lugar al β -caroteno, produciéndose γ -caroteno como intermediario (Figura 6). Sin embargo, ϵ -LCY únicamente puede introducir un anillo en uno de los dos extremos de la molécula de licopeno, originándose δ -caroteno. La actuación de β -LCY sobre el extremo lineal del δ -caroteno da lugar al α -caroteno (Figura 6), (Hirschberg, 2001; Fraser y Bramley, 2004; Bouvier *et al.*, 2005). Únicamente en algunas especies de lechuga (*Lactuca sativa*) se

ha descrito la existencia de una ϵ -LCY capaz de introducir dos anillos ϵ - en ambos extremos de la molécula de licopeno, generándose lactucaxantina (Cunningham y Gantt, 2001).

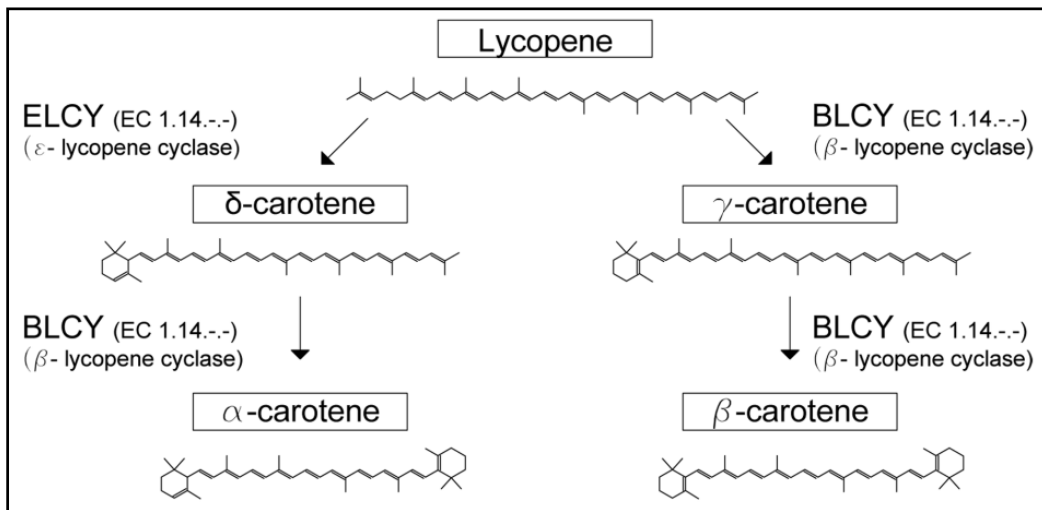


Figura 6. Esquema general de las reacciones de ciclación de la ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas. Se indican las enzimas que catalizan cada reacción: BLCY (β-licopeno ciclasa), ELCY (ε-licopeno ciclasa).

Los genes que codifican β-LCYs han sido identificados en higuera *Ficus carica* (*F. carica*) (GeneBank Data Access: JF279547), tomate *L. esculentum* (Nº Acc. X86452), zanahoria *D. carota* (Nº Acc. ABB52071), limón *Citrus sinensis* (*C. sinensis*) (Nº Acc. ABB72443), papaya *Carica papaya* (*C. papaya*) (Nº Acc. ABD91578) y kiwi *Actinidia deliciosa* (*A. deliciosa*) (Nº Acc. ACJ66629), entre otras plantas superiores, presentando todas ellas un porcentaje de identidad a nivel de aminoácidos de al menos un 78 %. Las proteínas maduras poseen un sitio de unión a dinucleótido (FAD/NADH) que parece estar implicado en su activación alostérica (Hornero y Britton, 2002) y dos motivos conservados característicos de este tipo de enzimas (Huguenev *et al.*, 1995). En tomate se ha descrito la existencia de una segunda β-LCY (β-LCY2) específica de tejido cromoplástico, que es 53% idéntica a nivel de aminoácidos a la β-LCY canónica (Ronen *et al.*, 2000).

La similitud entre los genes de cianobacterias (*crtL*) y los de bacterias (*crtY*) para licopeno ciclasas es más bien baja. Sin embargo, existen diferentes motivos conservados en las secuencias de aminoácidos de CrtY, CrtL y los genes de licopeno ciclasa de las plantas (*lcy*).

Estos incluyen una región hipotética de sitio de unión a dinucleotido, similar a la encontrada en fitoeno desaturasas y zeta caroteno desaturasas (Armstrong *et al.*, 1993; Hugueneu *et al.*, 1995; Cunningham *et al.*, 1996) y otros cuatro motivos descritos como esenciales para la actividad licopeno ciclasa (Bouvier *et al.*, 1997). Debido a estas similitudes, se asume un origen filogenético común de los genes *crtY*, *crtL* y *lcy*, (Hugueneu *et al.*, 1995).

Sin embargo, en bacterias, hongos y plantas, existen dos tipos completamente diferentes de licopeno ciclasas. Una es codificada por el clásico gen monomérico bacteriano β -ciclasa, *crtY* (Misawa *et al.*, 1990), que puede ser un antepasado del gen *crtL*, que codifica una β -ciclasa en cianobacterias. En las bacterias gram positivas dos genes *crtYc* y *crtYd* han sido descritos (Krubasik y Sandmann, 2000; Viveiros *et al.*, 2000). Estos genes codifican dos proteínas que tienen que interactuar como un heterodímero para la β -ciclación del licopeno. A partir de este tipo de licopeno ciclasa, en hongos como *X. dendrorhous* los genes han evolucionado hacia una doble función, licopeno ciclasa /fitoeno sintasa y se han fusionado en el gen bifuncional *crtYB* (Verdoes *et al.*, 1999). El producto de este gen tiene dos actividades catalíticas en la biosíntesis de carotenoides, convierte GGPP en fitoeno, así como también el licopeno en β -caroteno. La secuencia de aminoácidos deducida a partir del cDNA es similar en su extremo C-terminal con las secuencias de fitoeno sintetasa de otros organismos y similar en su extremo N-terminal con las licopeno ciclasa heterodiméricas *CrtYc* y *CrtYd* de *Brevibacterium linens* (Krubasik y Sandmann, 2000). Genes similares han sido clonados del hongo *Mucor circinelloides* (*M. circinelloides*) (Velayos *et al.*, 2000) y *Phycomyces blakesleeanus* (Arrach *et al.*, 2001; Sanz *et al.*, 2011).

2.5. Síntesis de xantofilas

En plantas, los carotenoides oxigenados (xantofilas), se forman a partir de α -caroteno ó β -caroteno modificados mediante oxidación enzimática. Las xantofilas comprenden la mayoría de los pigmentos en la membrana del tilacoide (Cunningham, 2002). Su ciclo, es un proceso flexible, que responde no sólo a las condiciones lumínicas sino también a otros factores ambientales como las temperaturas extremas, el déficit hídrico o la disponibilidad de nutrientes (Demmig *et al.*, 1996). La hidroxilación secuencial en los C-3 y 3' de los anillos de α - y β -caroteno resulta en la formación de luteína y zeaxantina, vía α y β -criptoxantina, respectivamente. La hidroxilación de los anillos β - es catalizada por acción de la enzima β -

caroteno hidroxilasa (β -CHX), mientras que sobre los anillos ϵ - actúa la enzima ϵ -caroteno hidroxilasa (ϵ -CHX). Los tipos, el origen y las funciones de CHXs de plantas han sido revisados recientemente (Inoue, 2004). En *A. thaliana* (Tian y DellaPenna, 2001), pimiento *Capsicum annuum* (*C. annuum*) (Bouvier *et al.*, 1998) y tomate *L. esculentum* (Hirschberg, 2001), se han identificado dos genes que codifican β -CHX, y en *A. thaliana* existen indicios de la presencia de una tercera β -CHX (Tian *et al.*, 2003). En tomate, una de las isoformas β -CHX se expresa en tejido verde, mientras que la otra parece ser específica de tejidos cromoplásticos (Hirschberg, 2001; Galpaz *et al.*, 2006).

La luteína es el producto final de la rama β,ϵ - de la ruta de biosíntesis de carotenoides, mientras que las xantofilas de la rama β,β - sufren modificaciones adicionales (Figura 7).

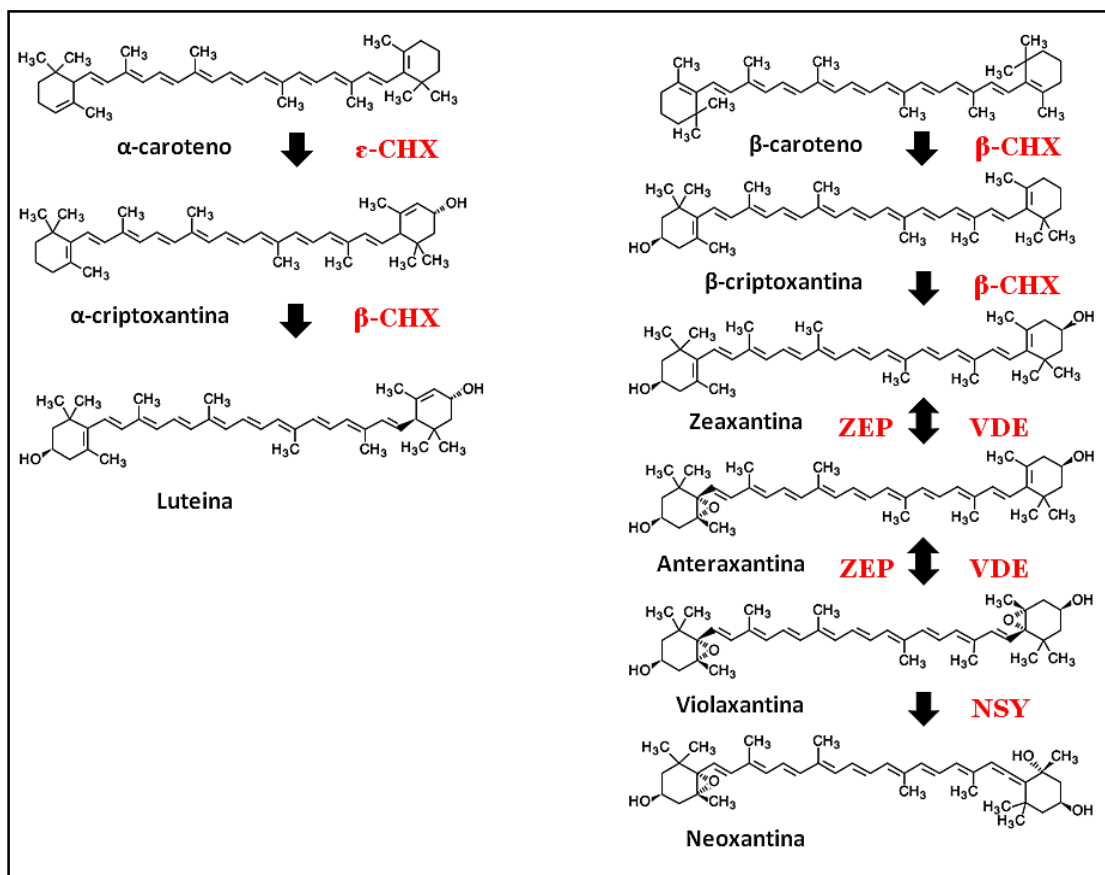


Figura 7. Esquema general de biosíntesis de xantofilas, adaptado de Fraser y Bramley, (2004). En azul se indican las enzimas que catalizan cada reacción: β -CHX (β -caroteno hidroxilasa), ϵ -CHX (ϵ -caroteno hidroxilasa), ZEP (zeaxantina epoxidasa), VDE (violaxantina de-epoxidasa), NSY (neoxantina sintasa).

La introducción secuencial, catalizada por zeaxantina epoxidasa (ZEP), de grupos epoxi en posiciones C-5,6 y C-5',6' de la zeaxantina da lugar a la formación de anteraxantina y violaxantina. Esta secuencia de reacciones es reversible, y la violaxantina puede ser reconvertida a zeaxantina mediante de-epoxidación catalizada por VDE (violaxantina de-epoxidasa). Este conjunto de reacciones reversibles se engloba bajo el nombre de “ciclo de las xantofilas” (Gross, 1987; Demmig-Adams *et al.*, 1996). Genes que codifican ZEP y VDE han sido identificados en distintos vegetales (Fraser y Bramley, 2004; Bouvier *et al.*, 2005).

La enzima neoxantina sintasa (NSY) cataliza la conversión de violaxantina a neoxantina, la última xantofila de la rama β,β - de la ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas (Figura 7). Se han clonado genes que codifican enzimas con reducida actividad NSY *in vitro* de tomate *L. esculentum* (Bouvier *et al.*, 2000), patata *Solanum tuberosum* (al Babili *et al.*, 2000) y *A. thaliana* (North *et al.*, 2007).

En microorganismos, los grupos de genes responsables de la síntesis de xantofilas han sido aislados de varias bacterias carotenogénicas como la bacteria epifítica *E. uredovora* y la bacteria marina *A. aurantiacum*. En *E. uredovora* o *Erwinia herbicola* (*E. herbicola*) el producto final de la ruta de biosíntesis de carotenoides es zeaxantina- β -diglucosido (Misawa *et al.*, 1990; Hundle *et al.*, 1991; Nakagawa y Misawa, 1991; Hundle *et al.*, 1994; Misawa, 1997) y esta codificada en un grupo de 6 genes (*crtE*, *crtB*, *crtI*, *crtY*, *crtX* y *crtZ*) (Misawa *et al.*, 1990; Sandmann y Misawa, 1992; Misawa, 1997). Mientras que en *A. aurantiacum* y *Alcaligenes* sp. (PC-1), el producto final es astaxantina (Yokoyama *et al.*, 1994) y esta codificada en un grupo de 5 genes (*crtW*, *crtZ*, *crtY*, *crtI* y *crtB*) (Misawa *et al.*, 1995b), siendo los genes *crtW* y *crtZ* los responsables directos de la síntesis de astaxantina a partir de β -caroteno (Misawa y Shimada, 1998) (Figura 8). Aunque *crtZ* de *A. aurantiacum* es funcionalmente similar a la de *E. uredovora*, la afinidad por el sustrato es diferente; *crtZ* de *A. aurantiacum* tiene preferencia por el sustrato cantaxantina, mientras que *crtZ* de *E. uredovora* tiene preferencia por el β -caroteno como sustrato. (Fraser *et al.*, 1997).

Se han propuesto dos rutas diferentes de biosíntesis de astaxantina: una que empieza con la oxidación del β -caroteno pasando por equinenona, cantaxantina y fenicoxantina, y otra que comienza con la hidroxilación del β -caroteno, con β -criptoxantina, zeaxantina y adonixantina como intermediarios (Sandmann, 1994; Cunningham y Gantt, 1998; Margalith, 1999). Estas rutas ha sido demostrada mediante análisis funcional de las ketolasas tipo *crtW/crtZ* de la bacteria marina *A. aurantiacum* (Misawa *et al.*, 1995b; Misawa y Shimada, 1998) (Figura 8) y

el alga verde *H. pluvialis*, las cuales sólo aceptan β -caroteno como sustrato (Fan *et al.*, 1995; Lotan y Hirschberg, 1995; Misawa *et al.*, 1995; Breitenbach *et al.*, 1996; Linden, 1999). Recientemente, también mediante análisis funcional de la ketolasa de *Muriella zofingiensis*, Huang *et al.*, (2006) han demostrado que el producto del gen *bkt* de esta alga puede actuar tanto sobre β -caroteno como sobre zeaxantina.

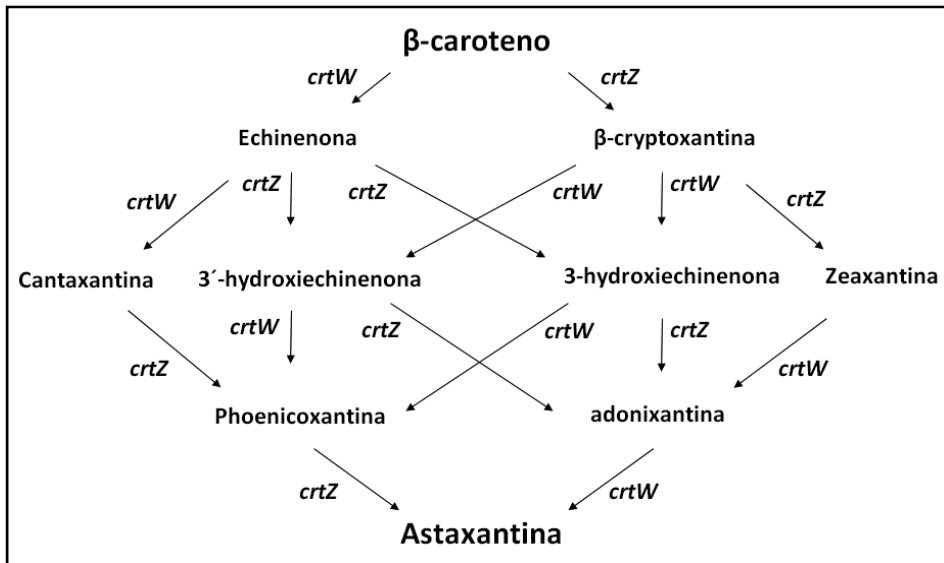


Figura 8. Ruta de biosíntesis de astaxantina a partir de β -caroteno en la bacteria marina *A. aurantiacum*, basado en Misawa y Shimada, (1998).

3. Complementación heteróloga

La enorme diversidad y la distribución tan abundante de los carotenoides naturales constituyen un desafío para el aislamiento y el entendimiento comparativo de una gran variedad de genes y productos génicos. Así, todo o parte del grupo de genes de carotenoides de *E. uredozona*, *E. herbicola*, *A. aurantiacum* y *Rhodococcus capsulatus* (*R. capsulatus*), se ha clonado en *E. coli* haciendo que esta bacteria no productora de pigmentos, la capacidad de acumular una amplia gama de carotenoides de color (Misawa *et al.*, 1990; Sandmann *et al.*, 1990). De hecho, la ruta de biosíntesis se puede reconstituir en vivo, incluso si las enzimas son de origen tan diverso como las codificadas por bacterias, levaduras, cianobacterias o plantas (Chamovitz *et al.*, 1992; Misawa *et al.*, 1994; Araya *et al.*, 2011).

Se ha utilizado el método de complementación del color o complementación heteróloga (Figura 9) para la identificación de genes eucariotas responsables de la biosíntesis de enzimas carotenogénicas (Lotan y Hirschberg, 1995; Cong *et al.*, 2009; Araya-Garay *et al.*, 2011), el cual aprovecha de la capacidad de las enzimas carotenogénicas para funcionar en la bacteria *E. coli*, debido a su similitud con la bioquímica de plástidos de plantas (Gallagher *et al.*, 2003).

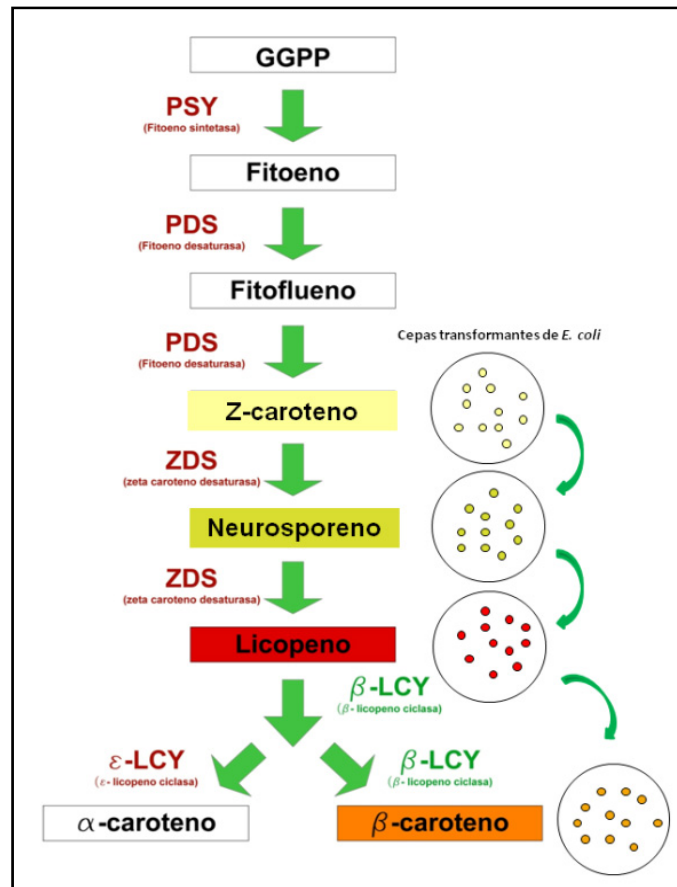


Figura 9. Esquema de la complementación de color para la identificación de genes de carotenogénesis.

En este método, a partir de plásmidos recombinantes específicos, expresando diferentes combinaciones de genes carotenogénicos, cada cepa de *E. coli* transformada produce un pigmento mayoritario específico, el cual sirve como sustrato de la enzima objeto de la investigación. De esta manera, por complementariedad de genes, y siempre y cuando la proteína sea funcional, se obtiene el producto del siguiente nivel de la ruta de carotenoides. Los carotenoides acumulados en estas cepas transformantes, muestran un color típico que es

visible a simple vista en las colonias, medios de cultivo y más intensamente en un precipitado celular.

La expresión de genes de carotenogénesis en *E. coli* ha sido útil para la identificación de la función de productos génicos (Linden *et al.*, 1991, 1994; Kuntz *et al.*, 1992; Pecker *et al.*, 1992; Sandmann, 1993; Li *et al.*, 1996), la disección de las rutas (Sandmann y Misawa, 1992; Hundle *et al.*, 1993), el estudio de los reguladores transcripcionales de genes carotenogénicos (Penfold y Pemberton, 1994) y el aislamiento y caracterización de nuevos genes que codifican enzimas de la ruta de biosíntesis de carotenoides (Kajiwara *et al.*, 1995; Lotan y Hirschberg, 1995; Cong *et al.*, 2009; Araya-Garay *et al.*, 2011).

Finalmente, para el estudio de los genes de carotenogénesis, la utilidad de *E. coli* depende de una adecuada expresión de los genes, que produzcan cambios visibles en la pigmentación de las colonias y que estos resultados fenotípicos puedan ser contrastados por métodos de análisis tradicionales, como espectrofotometría o HPLC.

4. Aplicaciones biotecnológicas de los carotenoides

Los carotenoides, al igual que otros isoprenoides, presentan numerosas aplicaciones en medicina y agricultura, en la formulación de nutracéuticos y suplementos vitamínicos y en la elaboración de productos funcionales. También, son ingredientes de productos cosméticos como maquillaje ó bronceadores, y como precursores de apocarotenoides con propiedades como sabores y aromas. Su uso como aditivos alimentarios en la Unión Europea se rige según la directiva 94/36/CEE. Los carotenos (E-160) son empleados en la industria alimentaria para colorear productos lácteos y cárnicos, productos derivados de huevo, conservas de pescado y vegetales, mermeladas, bebidas refrescantes y helados. Las xantofilas (E-161) tienen poca importancia como aditivos alimentarios directos para el hombre, pero son muy importantes como aditivos en el alimento suministrado a las truchas y salmones criados en piscifactorías (astaxantina) y también en el suministrado a las gallinas (zeaxantina y luteína).

Debido a sus propiedades beneficiosas para la salud humana y a sus propiedades empleadas en el mundo de la industria, se ha generado una fuerte demanda en la producción de carotenoides. Sin embargo, las técnicas empleadas hasta ahora han demostrado ser insuficientes, por lo que aparece como una alternativa muy atractiva la producción

biotecnológica de carotenoides, tanto en sistemas microbiológicos para su empleo como factorías celulares (Calo y Villa, 1995; de Miguel *et al.*, 2000; Schmidt-Dannert *et al.*, 2000; Sandmann, 2001; Ajikumar *et al.*, 2008; Araya-Garay *et al.*, 2011) como en plantas, mediante ingeniería genética para enriquecerlas en su producción de carotenoides (Ye *et al.*, 2000; Buzzini *et al.*, 2001; Frengova *et al.*, 2003; Giuliano *et al.*, 2008).

Desde que Misawa *et al.*, (1990) clonaran el cluster de genes de biosíntesis de carotenoides de *E. uredoovora*, diferentes aproximaciones biotecnológicas han sido llevadas a cabo en el clonaje de genes carotenogénicos, permitiendo la combinación de genes procedentes de diferentes organismos, en secuencias de reacciones biosintéticas nuevas, generando una amplia diversidad química. Además, debido a que numerosas enzimas carotenogénicas son capaces de aceptar más de un sustrato diferente, ha permitido generar una aún mayor diversidad de arquitecturas moleculares.

En plantas, se ha aumentado el valor nutricional de varias especies de interés agronómico mediante la manipulación genética de la ruta de carotenogénesis (Giuliano *et al.*, 2000; Sandman, 2001; 2006; Botella-Pavía y Rodríguez-Concepción, 2006), por ejemplo, en la colza o canola, *Brassica napus*, la sobreexpresión del gen *crtB* bacteriano con un promotor específico fue suficiente para incrementar el contenido de β -caroteno 50 veces (Shewmaker *et al.*, 1999).

La baja productividad de β -caroteno en el endospermo del arroz dorado original (Ye *et al.*, 2000) ha sido parcialmente superado sustituyendo la PSY de narciso por la de maíz, en la construcción génica original. Esto ha incrementado la cantidad de carotenoides totales en el endospermo de arroz de 1,6 $\mu\text{g/g}$ a 37 $\mu\text{g/g}$ (Paine *et al.*, 2005). O los efectos colaterales observados en plantas de tomate transgénico que sobreexpresa PSY, (Fray *et al.*, 1995) (baja talla y reducido contenido en clorofila) han sido evitados dirigiendo la enzima PSY específicamente hacia el cromoplasto del fruto mediante la fusión de un péptido señal específico (Fraser *et al.*, 2002).

También, se ha conseguido mediante ingeniería genética la producción “*in vivo*” de astaxantina y otros carotenoides por plantas que no los sintetizan de forma natural (Mann *et al.*, 2000; Stalberg *et al.*, 2003; Ralley *et al.*, 2004; Gerjets y Sandmann, 2006).

Por otro lado, aunque la ingeniería de levaduras recombinantes para la producción de carotenoides está poco explorada, los resultados son muy prometedores. Algunos ejemplos como los realizados en *Sacharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (Yamamo *et al.*, 1994;

Verwaal *et al.*, 2007; Ukibe *et al.*, 2009; Lange y Steinbüchel, 2011), *Candida utilis* (*C. utilis*) (Misawa y Shimada, 1998; Miura *et al.*, 1998; Shimada *et al.*, 1998), *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) (Bhataya *et al.*, 2009; Araya-Garay *et al.*, 2012) y el hongo filamentoso *M. circinelloides* (Papp *et al.*, 2006).

Todos estos microorganismos no carotenogénicos han sido exitosamente ingenierizados mediante su transformación con genes apropiados de organismos carotenogénicos para producir tanto licopeno, β -caroteno o astaxantina, mediante la desviación de la ruta del ergosterol con genes derivados de *E. uredovora*, *A. aurantiacum*, o *X. dendrorhous*. Además, mediante la optimización de las vías metabólicas, así como la utilización de cepas mutantes y condiciones especiales de fermentación en biorreactores, ha permitido mejorar en varios grados de magnitud la productividad en estos sistemas (An *et al.*, 1989; Yuan *et al.*, 2006; Verwaal *et al.*, 2007).

Sin embargo, pese a los avances realizados en esta área, aún son muchas las incógnitas por resolver en cuanto a cómo se regula la biosíntesis de estos pigmentos o cual es la mejor combinación de genes para obtener un producto mayoritario más puro. Además, el limitado conocimiento de los pasos limitantes en la biosíntesis de carotenoides así como otros factores relacionados con su almacenamiento o su relación con otras vías biosintéticas, impiden la conversión de esta incipiente industria biotecnológica en una industria madura, constituyendo estos factores por su importancia, un área de estudio de elevado interés.

5. Potencial de *Pichia pastoris* para la producción de carotenoides

Las levaduras exhiben un eficiente metabolismo de isoprenoides y son capaces de acumular grandes cantidades de compuestos hidrofóbicos como ergosterol en sus membranas (Vik y Rine, 2001). Además, muchas especies de levaduras son consideradas como organismos GRAS (generally recognized as safe) por la US Food and Drug Administration.

P. pastoris es una levadura metilotrófica que ha sido ampliamente utilizada como organismo huésped para producir una gran variedad de proteínas heterólogas tanto para investigación como para propósitos industriales (Cerregghino y Cregg, 2000; Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Además, la mayoría de las manipulaciones genéticas utilizadas en *P. pastoris* son similares a las usadas para *S. cerevisiae*. Sin embargo, *P. pastoris* tiene una fuerte preferencia por el

metabolismo respiratorio y debido a esto crece a muy altas densidades celulares sin la acumulación de altas concentraciones de etanol como usualmente ocurre en cultivos de alta densidad de *S. cerevisiae* (Cereghino *et al.*, 2002).

Las mayores ventajas de este tipo de sistema de expresión incluyen su simplicidad, la disponibilidad en el mercado de vectores integrativos para crear cepas recombinantes estables (Cregg, 2007) y la capacidad como eucariota de realizar modificaciones post-traduccionales (Cereghino y Cregg, 2000; Cregg *et al.*, 2000). Por ello, las proteínas eucariotas expresadas en *P. pastoris* son plegadas, procesadas y ensambladas en moléculas funcionales cuando son sintetizadas en esta levadura. Además, *P. pastoris* ofrece mejores niveles de expresión que otros sistemas de expresión de eucariotas tales como baculovirus, células de insectos, adenovirus y células de mamíferos (Cregg *et al.*, 2000; Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Por último, debido a que *P. pastoris* sintetiza farnesil difosfato (FPP) como producto de su metabolismo endógeno, es posible la introducción de los genes necesarios para la construcción de una ruta biosintética nueva para producir carotenoides.

Sin embargo, a pesar de todas las ventajas que ofrece esta levadura, los estudios enfocados a la producción heteróloga de carotenoides son todavía muy escasos (Bhataya *et al.*, 2009; Araya-Garay *et al.*, 2012).

6. Análisis de Carotenoides

La determinación de la composición completa de carotenoides es complicada, costosa y árdua (Kimura y Rodríguez-Amaya, 2002). La aplicación de los distintos tratamientos puede provocar la formación de isómeros (*cis*) que no tienen la misma actividad y la formación de nuevos compuestos. Además, debido a que los carotenoides contienen dobles enlaces conjugados, los cuales presentan gran susceptibilidad a degradaciones por exposición a la luz y a altas temperaturas, su extracción debe realizarse lo más rápidamente, a temperatura ambiente o preferiblemente por debajo de esta (4°C), en un lugar donde no se expongan a la luz directamente. También el aire debido al oxígeno favorece la oxigenación de los enlaces dobles a funciones epóxido, hidroxilos y peróxidos, entre otros. Por esta razón la extracción de carotenoides se debe preferiblemente realizar en ausencia de oxígeno (por ejemplo con una atmósfera artificial de nitrógeno).

Un procedimiento recomendable para eliminar el agua presente en las muestras es deshidratar los tejidos con etanol o metanol a ebullición seguido de filtración. El tejido deshidratado se puede entonces extraer con un solvente apolar. Una alternativa a este proceso de deshidratación es la liofilización, la cual resulta ventajosa porque se realiza a baja temperatura y al vacío, eliminando la posibilidad de degradación por altas temperaturas y presencia de oxígeno.

Por otro lado la disrupción celular es un paso clave en la purificación y cuantificación de compuestos intracelulares y tiene importantes efectos en la calidad y cantidad de producto recuperado (Johnson *et al.*, 1979; Becerra *et al.*, 2001; Buxadó *et al.*, 2004).

Debido a su mayor tamaño y a la diferente estructura que presenta la pared celular de las levaduras en comparación con la de bacterias, diferentes métodos (mecánicos, químicos o enzimáticos) se han utilizado para destruir las paredes celulares y acceder al contenido citoplasmático (Johnson *et al.*, 1978; 1980). El mejor método depende tanto de las características de la levadura (tipo de levadura, tiempo de cultivo, tasa específica de crecimiento, etc.), como del destino del producto expresado (Kula, 1990; Liu y Wu, 2006).

7. *Ficus carica*, una especie ancestral

F. carica L., es un árbol caducifolio perteneciente a la familia *Moraceae* y cuya antigüedad lo sitúan como uno de los primeros árboles frutales cultivados (Figura 10).

Hoy en día, los higos son un cultivo importante en todo el mundo tanto para el consumo en fresco o como fruto seco (Solomon *et al.*, 2006). Sobre la base de la Ingesta Dietética de Referencia (DRI) y los datos, publicados por la Food and Nutrition Board del Instituto de Medicina de EE.UU., la composición nutricional de los higos secos (Vinson *et al.*, 2005), ha demostrado ser una fuente superior de minerales, vitaminas, aminoácidos, fibras crudas, polifenoles y varios carotenoides, incluidos el licopeno, β -caroteno la luteína y el α -caroteno (Vinson, 1999; Lianju *et al.*, 2003; Vinson *et al.*, 2005), siendo el licopeno el carotenoide más abundante, seguido del β -caroteno y luteína. Los higos contienen todos los carotenoides principales que aparecen en el plasma humano (Su *et al.*, 2002). Sin embargo, pese a su importancia y antigüedad, hasta ahora ningún gen de la ruta de biosíntesis de carotenoides se ha descrito en esta especie.



Figura 10. Árbol, hojas y fruto de *Ficus carica*.

OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido la búsqueda, clonación y expresión de genes de carotenogénesis.

Este objetivo general se ha desarrollado en los siguientes objetivos específicos:

1. Búsqueda y clonación del gen ζ -caroteno desaturasa (*zds*) de *Ficus carica*.
2. Búsqueda y clonación del gen licopeno β -ciclase (*β -lcy*) de *Ficus carica*.
3. Expresión heteróloga de los genes *zds-Fc* y *β -lcy-Fc* en *Escherichia coli* y determinación de la actividad desaturasa y ciclase de los productos génicos.
4. Construcción de una nueva cepa recombinante de *Pichia pastoris* X-33 productora de licopeno.
5. Construcción de una nueva cepa recombinante de *Pichia pastoris* X-33 productora de β -caroteno.
6. Construcción de una nueva cepa recombinante de *Pichia pastoris* productora de astaxantina.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. TEJIDO VEGETAL

Se utilizaron hojas frescas de *F. carica* a las cuales se les extrajo inmediatamente el RNA total.

2. CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO

2.1. Bacterias utilizadas.

2.1.1. Cepas comerciales

***E. coli* Top 10 One Shot (Invitrogen).** F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu) galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻

***E. coli* XL1-blue (Stratagene).** recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, lac, F' proAB, lacIq Z ΔM15, Tn10 (tetr).

***E. coli* DH5α (Hanahan 1983).** supE44 -lacUI69Δ (phi-80 lacZ-Δ-M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1.

***E. coli* XL 10-Gold (Stratagene).** endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet^R F'[proAB lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^R Amy Cm^R)]

***E. coli* BL-21 (DE3) (Invitrogen).** F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]).

2.1.2. Cepas recombinantes para ensayos de complementación heteróloga en *E. coli* (Este estudio).

Se transformó *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pACCRT-EBI y generó *E. coli* BL-EBI (Tabla 1), esta cepa bacteriana expresa las enzimas GGPP sintetasa, fitoeno sintetasa y fitoeno desaturasa de *E. uredovora* y era capaz de sintetizar licopeno.

Esta cepa de *E. coli* recombinante fue utilizada como control positivo para el ensayo enzimático de la enzima zeta-caroteno desaturasa y como control negativo en el ensayo enzimático de la enzima licopeno beta-ciclasa, ambas de *F. carica*.

La transformación de *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pACCRT-EBP resultó en la cepa de *E. coli* BL-EBP (Tabla 1), esta cepa bacteriana expresaba los genes *crtE* (GGPP sintetasa) y *crtB* (fitoeno sintetasa) de *E. uredovora* además del gen *crtP* (fitoeno desaturasa) de *Synechococcus sp.* Esta cepa era capaz de producir ζ -caroteno.

La cepa de *E. coli* BL-EBR (Tabla 1) fue generada por transformación de *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pACCRT-EBR, que portaba los genes *crtE* y *crtB* de *E. uredovora* además del gen *crtR* (fitoeno desaturasa) de *R. capsulatus*. Esta cepa era capaz de acumular neurosporeno.

El plásmido pET21-zdsFc fue expresado en *E. coli* BL21 (DE3) y generó la cepa de *E. coli* BL-ZDS que expresaba el gen *zds* de *F. carica* (Tabla 1). Esta cepa se utilizó para electroforesis de proteínas en geles de acrilamida (SDS-PAGE).

La cepa BL-EBP co-transformada con el plásmido pET21-zdsFc resultó en la cepa BL-EBPZ que era capaz de sintetizar neurosporeno y licopeno (Tabla 1). Del mismo modo la cepa de *E. coli* BL-EBR co-transformada con el plásmido pET21-zdsFc resultó en la cepa BL-EBRZ que era capaz de sintetizar licopeno (Tabla 1).

El plásmido pET21-lcy β fue expresado en *E. coli* BL21 (DE3) y generó la cepa de *E. coli* BL-LCY que expresaba el gen β -*lcy* de *F. carica* (Tabla 1). Esta cepa se utilizó para electroforesis de proteínas en geles de acrilamida (SDS-PAGE).

La cepa BL-EBI co-transformada con el plásmido pET21-lcy β resultó en la cepa recombinante BL-EBIL que era capaz de sintetizar β -caroteno (Tabla 1).

Finalmente, la cepa *E. coli* BL-EBIL productora de β -caroteno fue co-transformada con el plásmido pAK96K y generó la cepa recombinante BL-EBILWZ que era capaz de acumular astaxantina (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas recombinantes de *E. coli* generadas en este estudio y plásmidos utilizados para las transformaciones. La tabla incluye además los genes codificados por los plásmidos recombinantes, el origen de los genes, así como también los nombres de cada enzima y actividad de la proteína codificada por esos genes.

Cepa de <i>E. coli</i> recombinante	Plásmido transformante	Genes codificados	Origen DNA	Actividad enzimática	Sustrato enzimático	Producto enzimático
BL-EBI	pACCRT-EBI	<i>crtE</i>	<i>E. uredoovora</i>	GGPP sintetasa	FPP/GPP	GGPP
		<i>crtB</i>	<i>E. uredoovora</i>	Fitoeno sintetasa	GGPP	Fitoeno
		<i>crtI</i>	<i>E. uredoovora</i>	Fitoeno desaturasa	Fitoeno	Licopeno
					ζ-caroteno	Licopeno
				Neurosporeno	Licopeno	
BL-EBP	pACCRT-EBP	<i>crtE</i>	<i>E. uredoovora</i>	GGPP sintetasa	FPP/GPP	GGPP
		<i>crtB</i>	<i>E. uredoovora</i>	Fitoeno sintetasa	GGPP	Fitoeno
		<i>crtP</i>	<i>Synechococcus sp.</i>	Fitoeno desaturasa	Fitoeno	ζ-caroteno
BL-EBR	pACCRT-EBR	<i>crtE</i>	<i>E. uredoovora</i>	GGPP sintetasa	FPP/GPP	GGPP
		<i>crtB</i>	<i>E. uredoovora</i>	Fitoeno sintetasa	GGPP	Fitoeno
		<i>crtR</i>	<i>R. capsulatus</i>	Fitoeno desaturasa	Fitoeno	Neurosporeno
BL-ZDS	pET21-zds	<i>zds-Fc</i>	<i>F. carica</i>	ζ-caroteno desaturasa	ζ-caroteno	Licopeno
					Neurosporeno	Licopeno
BL-EBPZ	pACCRT-EBP	<i>crtE</i>	<i>E. uredoovora</i>	GGPP sintetasa	FPP/GPP	GGPP
		<i>crtB</i>	<i>E. uredoovora</i>	Fitoeno sintetasa	GGPP	Fitoeno
		<i>crtP</i>	<i>Synechococcus sp.</i>	Fitoeno desaturasa	Fitoeno	ζ-caroteno
	pET21-zds	<i>zds-Fc</i>	<i>F. carica</i>	ζ-caroteno desaturasa	ζ-caroteno	Licopeno
				Neurosporeno	Licopeno	
BL-EBRZ	pACCRT-EBR	<i>crtE</i>	<i>E. uredoovora</i>	GGPP sintetasa	FPP/GPP	GGPP
		<i>crtB</i>	<i>E. uredoovora</i>	Fitoeno sintetasa	GGPP	Fitoeno
		<i>crtR</i>	<i>R. capsulatus</i>	Fitoeno desaturasa	Fitoeno	Neurosporeno
	pET21-zds	<i>zds</i>	<i>F. carica</i>	ζ-caroteno desaturasa	Neurosporeno	Licopeno
BL-LCY	pET21-lycβ	<i>β-lyc-Fc</i>	<i>F. carica</i>	Lycopeno β-cyclasa	Licopeno	β-caroteno
					Y-caroteno	β-caroteno
					δ-caroteno	α-caroteno
BL-EBIL	pACCRT-EBI	<i>crtE</i>	<i>E. uredoovora</i>	GGPP sintetasa	FPP/GPP	GGPP
		<i>crtB</i>	<i>E. uredoovora</i>	Fitoeno sintetasa	GGPP	Fitoeno
		<i>crtI</i>	<i>E. uredoovora</i>	Fitoeno desaturasa	Fitoeno	Licopeno
					ζ-caroteno	Licopeno
				Neurosporeno	Licopeno	
	pET21-lycβ	<i>β-lyc-Fc</i>	<i>F. carica</i>	Lycopeno β-cyclasa	Licopeno	β-caroteno
					Y-caroteno	β-caroteno
				δ-caroteno	α-caroteno	
BL-EBILWZ	pACCRT-EBI	<i>crtE</i>	<i>E. uredoovora</i>	GGPP sintetasa	FPP/GPP	GGPP
		<i>crtB</i>	<i>E. uredoovora</i>	Fitoeno sintetasa	GGPP	Fitoeno
		<i>crtI</i>	<i>E. uredoovora</i>	Fitoeno desaturasa	Fitoeno	Licopeno
					ζ-caroteno	Licopeno
				Neurosporeno	Licopeno	
	pET21-lycβ	<i>β-lyc-Fc</i>	<i>F. carica</i>	Lycopeno β-cyclasa	Licopeno	β-caroteno
					Y-caroteno	β-caroteno
					δ-caroteno	α-caroteno
pAK96K	<i>crtW</i>	<i>A. aurantiacum</i>	β-caroteno ketolasa	β-caroteno	Astaxantina	
	<i>crtZ</i>	<i>A. aurantiacum</i>	β-caroteno hidroxilasa	β-caroteno	Astaxantina	

2.2. Levaduras utilizadas.

2.2.1. Levaduras comerciales

***Pichia pastoris* X-33 (Invitrogen).** Genotipo silvestre.

2.2.2. Levaduras recombinantes de *Pichia pastoris*

Pp-EBI (Este estudio). Cepa de *P. pastoris* X-33 en la que se integró en el DNA genómico las secuencias codificantes de los genes *crtE* (GGPP sintetasa), *crtB* (fitoeno sintetasa) y *crtI* (fitoeno desaturasa) de la bacteria *E. uredovora* que le conferirían a esta cepa la capacidad de sintetizar licopeno (Tabla 2).

Pp-EBIL (Este estudio). Cepa de *P. pastoris* X-33 en la que se integró en el DNA genómico las secuencias codificantes de los genes *crtE*, *crtB* y *crtI* de la bacteria *E. uredovora* y del gen licopeno β -ciclasa, *crtL* (*β -lcy-Fc*) de *F. carica*, estos genes integrados en el genoma de *P. pastoris* X33, le conferirían la capacidad de sintetizar β -caroteno (Tabla 2).

Pp-EBILWZ (Este estudio). Cepa recombinante Pp-EBIL en la que se integró en DNA genómico las secuencias codificantes de los genes *crtW* (β -caroteno ketolasa) y *crtZ* (β -caroteno hidroxilasa) de *A. aurantiacum* que le conferirían a esta cepa la capacidad de sintetizar astaxantina (Tabla 2).

Tabla 2. Cepas recombinantes de *P. pastoris* obtenidas en este estudio.

Cepa Transformada	Plásmido transformante	Cepa recombinante	Genes codificados	Origen DNA	Actividad enzimática	Sustrato enzimático	Producto enzimático
<i>P. pastoris</i> X-33	pGAPZA-EBI*	Pp-EBI	<i>crtE</i>	<i>E. uredovora</i>	GGPP sintetasa	FPP/GPP	GGPP
			<i>crtB</i>	<i>E. uredovora</i>	Fitoeno sintetasa	GGPP	Fitoeno
			<i>crtI</i> *	<i>E. uredovora</i>	Fitoeno desaturasa	Fitoeno	Licopeno
<i>P. pastoris</i> X-33	pGAPZA-EBI*L*	Pp-EBIL	<i>crtE</i>	<i>E. uredovora</i>	GGPP sintetasa	FPP/GPP	GGPP
			<i>crtB</i>	<i>E. uredovora</i>	Fitoeno sintetasa	GGPP	Fitoeno
			<i>crtI</i> *	<i>E. uredovora</i>	Fitoeno desaturasa	Fitoeno	Licopeno
			<i>crtL</i> *	<i>F. carica</i>	Lycopeno β -ciclasa	Licopeno	β -caroteno
					Y-caroteno	β -caroteno	
Pp-EBIL	pGAPZA-WZ	Pp-EBILWZ	<i>crtE</i>	<i>E. uredovora</i>	GGPP sintetasa	FPP/GPP	GGPP
			<i>crtB</i>	<i>E. uredovora</i>	Fitoeno sintetasa	GGPP	Fitoeno
			<i>crtI</i> *	<i>E. uredovora</i>	Fitoeno desaturasa	Fitoeno	Licopeno
			<i>crtL</i> *	<i>F. carica</i>	Lycopeno β -ciclasa	Licopeno	β -caroteno
						Y-caroteno	β -caroteno
			<i>crtW</i>	<i>A. aurantiacum</i>	β -caroteno ketolasa	β -caroteno	Astaxantina
			<i>crtZ</i>	<i>A. aurantiacum</i>	β -caroteno hidroxilasa	β -caroteno	Astaxantina

2.3 Medios y condiciones de cultivo

2.3.1. Cultivo de *Escherichia coli*

LB (Luria-Bertani): Triptona 10 g/L, Extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L. Este medio se suplementó con ampicilina (50 µg/mL), kanamicina (50 µg/mL) o cloranfenicol (34 µg/mL) cuando se transformaron las células con un plásmido que confería resistencia a alguno de estos antibióticos. Los antibióticos se esterilizaron por filtración empleando membranas de 0.22 µm y se añadieron al medio estéril.

LB (low salt): Triptona 10 g/L, Extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L. Se utilizó LB de baja concentración salina cuando el medio se suplementó con zeocina. Así la cantidad de NaCl se redujo a la mitad, el pH se equilibró en 7.5 y las placas se guardaron a 4 °C en oscuridad hasta su uso.

Se añadió 0.4 mM IPTG cuando fue necesaria la inducción del promotor *lac*. Se añadieron 5 µL de 0.8 M IPTG y 40 µL de X-Gal (20 mg/mL) disuelto en dimetilformamida según describe Sambrook *et al.*, (2000), al menos media hora antes de la siembra.

SOC: Triptona 20 g/L, Extracto de levadura 10 g/L, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM. Este medio de cultivo se empleó para realizar el protocolo de transformación con la cepa One Shot TOP 10, tal como indicó el fabricante. Así, las células se mantuvieron una hora en este medio antes de ser sembradas en placas con medio selectivo.

NZY⁺: Hidrolizado de caseína 10 g/L, Extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L. El medio NZY⁺ se empleó para realizar el protocolo de transformación con la cepa XL10-Gold tal como indicó el fabricante. Así las células se mantuvieron una hora en este medio antes de ser sembradas en placas de LB con zeocina. Antes de la utilización de este medio se añadió los siguientes suplementos esterilizados previamente por filtración: 12.5 mL de 1 M MgCl₂; 12.5 mL de 1 M MgSO₄; 20 mL de glucosa al 20 g/L.

Para los medios sólidos se añadió agar bacteriológico 20 g/L. Se esterilizó en un autoclave a 121 °C, 1.1 atm y 20 min.

Las células de *E. coli* One Shot TOP10 fueron crecidas en medio LB bajo en sal, a 37 °C con agitación 180 rpm. Para selección y/o mantenimiento de colonias y/o cultivos portadoras del plásmido pGAPZαA se utilizó medios suplementados con zeocina (25 µg/mL), (Invitrogen).

Las células de *E. coli* XL 10-Gold fueron cultivadas en medio LB a 37 °C y 180 rpm.

Las cepas recombinantes de *E. coli* productoras de carotenoides fueron crecidas en medio LB suplementado con ampicilina (50 µg/mL) y cloranfenicol (34 µg/mL) a 28 °C 48 h con agitación 180 rpm y en oscuridad.

2.3.2. Cultivo de *Pichia pastoris*

YPD: Peptona 20 g/L, Extracto de levadura 10 g/L, Glucosa 20 g/L.

YPDS: Peptona 20 g/L, Extracto de levadura 10 g/L, Glucosa 20 g/L, 1 M sorbitol.

Para los medios sólidos se añadió agar bacteriológico 20 g/L. Los medios de cultivo fueron esterilizados mediante autoclave a 121 °C y 1 atm durante 15 min.

Las células de *P. pastoris* fueron crecidas en medio YPD o YPDS a 30°C y 200 rpm.

Para selección y/o mantenimiento de colonias/cultivos portadoras del plásmido pGAPZαA se utilizó zeocina (100 µg/mL) (Invitrogen).

3. OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS

3.1. Oligonucleótidos para la clonación del gen *zds-Fc*

Los cebadores degenerados ZDS DegF y ZDS DegR (Tabla 3) fueron diseñados utilizando el programa Primer Premier 5.0 (Biosoft International), de acuerdo a los motivos conservados de otras secuencias codificantes de zeta-caroteno desaturasa anotadas en la base de datos del NCBI.

Los cebadores específicos ZDS-Fc1, ZDS-Fc2, ZDS-Fc3, ZDS-Fc4 y ZDS-Fc5 se diseñaron utilizando el programa Primer Premier 5.0 (Biosoft International) a partir de la secuencia interna del gen *zds-Fc* (Tabla 3).

Finalmente, los cebadores ZDS-*EcoRI* F y ZDS-*XhoI* R fueron diseñados en las regiones flanqueantes del gen *zds-Fc* y se les añadió además, las dianas de restricción *EcoRI* y *XhoI* para facilitar su posterior clonaje (Tabla 3).

Los oligonucleótidos específicos del sistema pET, T7 F y T7 R, se obtuvieron de Novagen (Tabla 3).

Tabla 3. Cebadores utilizados para la amplificación del gen *zds-Fc*. Nota: F, forward; R, reverse; ORF, open reading frame.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador	Aplicación
ZDS DegF	5' GGBGAACTTGATTTYCGVTT 3'	RT-PCR
ZDS DegR	5' ATCACANGCWGCMACATATGCATC 3'	RT-PCR
ZDS-Fc1	5' CCCACCTAAGATGAAACCTGCCC 3'	5' RACE-PCR
ZDS-Fc2	5' GCGTGCCACCTTTGGAGATGAAC 3'	5' RACE-PCR
ZDS-Fc3	5' GCCCAACTGGAAACCGGAAAT 3'	5' RACE-PCR
ZDS-Fc4	5' GCCCAGTTGTAAAGGCTCTCGTTGA 3'	3' RACE-PCR
ZDS-Fc5	5' GGTCATCTCCAAAGGTGGCACGC 3'	3' RACE-PCR
ZDS- <i>EcoRI</i> F	5' CGGAATTC ATGGCTTCTTGGGTCTTTTCC 3'	PCR (ORF completa)
ZDS- <i>XhoI</i> R	5' CCGCTCGAG CTAAACAAGACTAAGCTTGTC 3'	PCR (ORF completa)
T7 F	5' TTAATACGACTCACTATAGG 3'	Secuenciación
T7 R	5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'	Secuenciación
	B=C, G, T; Y=C, T; V= A, C, G; N= A, T, C, G; W=A, T; M=C, A	

3.2. Oligonucleótidos para la clonación del gen β -*lcy-Fc*

Los cebadores degenerados Lcy- β DegF y Lcy- β DegR (Tabla 4) fueron diseñados utilizando el programa Primer Premier 5.0 (Biosoft International), de acuerdo a los motivos conservados de otras secuencias codificantes anotadas en la base de datos del NCBI como β -licopeno ciclasa. Los cebadores específicos LCY-Fc1, LCY-Fc2, LCY-Fc3 LCY-Fc4 y LCY-Fc5 fueron diseñados utilizando el programa Primer Premier 5.0 a partir de la secuencia interna del gen β -*lcy-Fc* (Tabla 4).

Finalmente, los cebadores Lcy- β *NdeI* F y Lcy- β *SacI* R fueron diseñados en las regiones flanqueantes del gen β -*lcy-Fc* y se les añadió además, las dianas de restricción *NdeI* y *SacI* para facilitar su posterior clonaje (Tabla 4). Los oligonucleótidos específicos del sistema pET, T7 F y T7 R, se obtuvieron de Novagen (Tabla 4).

Tabla 4. Cebadores utilizados para la amplificación del gen *β-lcy-Fc*. Nota: F, forward; R, reverse; ORF, open reading frame.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador	Aplicación
LCY-β DegF	5' TGGCCHAAYAATTAYGGWGTGGTGG 3'	RT-PCR
LCY-β DegR	5' ATATCCATDCCAAAASAGWAG 3'	RT-PCR
LCY-Fc1	5' TCCCACCCATTGCCATCACACTT 3'	5' RACE-PCR
LCY-Fc2	5' GGTGACCCTCAACTTCAGCCAAAA 3'	5' RACE-PCR
LCY-Fc3	5' GCCTCTCCCTATTGACACGCCCAT 3'	5' RACE-PCR
LCY-Fc4	5' GGGAAATGAGCCTTACTTGCGAG 3'	3' RACE-PCR
LCY-Fc5	5' TGGAGGTGAAGAAGAGGATGGTTGC 3'	3' RACE-PCR
LCY-β <i>Nde</i> I F	5' GGAATTC ATGGGTACTCTTCCATATCCA 3'	PCR (ORF completa)
LCY-β <i>Sac</i> I R	5' CGAGCTC TAAATGGTTTCAAGTGCCAAAT 3'	PCR (ORF completa)
T7 F	5' TTAATACGACTCACTATAGG 3'	Secuenciación
T7 R	5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'	Secuenciación
	H=A, C; Y=C, T; W=A, T; D=A, G and S=C, G	

3.3. Cebadores para la clonación de genes de carotenogénesis en el vector pGAPZaA

Los cebadores utilizados para amplificar las secuencias codificantes de los genes *crtE*, *crtB* y *crtI* de *E. uredoovora* se diseñaron a partir de los extremos de cada gen, agregando las dianas de restricción *Sfu*I en el extremo 5' seguida de la secuencia consenso de Kozak (ATGG) que incluyó el codón de inicio y *Eco*RI en el extremo 3' inmediatamente después del codón de terminación de cada gen (Tabla 5).

Tabla 5. Cebadores utilizados para amplificación por PCR, secuenciación y clonación de los diferentes genes de carotenogénesis.

Aplicación	Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5' - 3')
PCR	<i>crtE</i> Forward	5' AACTATTTCGAAACGATGG CAGTCTGCGCAAAA 3'
PCR	<i>crtE</i> Reverse	5' GGAATTC TAAACTGACGGCAGCG 3'
PCR	<i>crtB</i> Forward	5' AACTATTTCGAAACGATGG CAGTTGGCTCG 3'
PCR	<i>crtB</i> Reverse	5' GGAATTC CTAGAGCGGGCGCTGC 3'
PCR	<i>crtI</i> Forward	5' AACTATTTCGAAACGATGG CACCAACTACGG 3'
PCR	<i>crtI</i> Reverse	5' GGAATTC TCAAATCAGATCCTCCAG 3'
PCR	<i>crtL</i> Forward	5' AACTATTTCGAAACGATGG GTTACTCTTCCATATCC 3'
PCR	<i>crtL</i> Reverse	5' GCTCTAG ACTAAATGGTTTCAAGTGCCA 3'
PCR	<i>crtW</i> Forward	5' AACTATTTCGAAACGATGG CAGCACATGCCCTGCC 3'
PCR	<i>crtW</i> Reverse	5' GGAATTC TCATGCGGTGTCCCCC 3'
PCR	<i>crtZ</i> Forward	5' AACTATTTCGAAACGATGG CAAATTCCTGATCG 5'
PCR	<i>crtZ</i> Reverse	5' GGAATTC TCACGTGCGCTCCTGC 5'
Secuenciación	pGAP Forward 1	5' GTCCTATTTCAATCAATTGAA 3'
Secuenciación	pGAP Forward 2	5' AGATCTTTTTGTAGAAATGTC 3'
Secuenciación	AOX-1 Reverse	5' GCAAATGGCATTCTGACATCC 3'

La misma estrategia se utilizó para diseñar los cebadores para los genes *crtW* y *crtZ* de *A. aurantiacum*. Sin embargo para el gen *crtL*, ya que contenía el sitio de restricción *EcoRI* en el interior de su secuencia, se utilizó la diana *XbaI* para el cebador del extremo 3' del gen; en su extremo 5' al igual que el resto de los genes se diseñó con la diana *SfuI* seguida de la secuencia consenso de Kozak (ATGG) (Tabla 5). Para la secuenciación de los insertos clonados en el vector pGAPZ α A se empleó los cebadores específicos del sistema de expresión GAP (pGAP Forward 1 y AOX-1 Reverse) (Invitrogen). Para comprobar la correcta pauta de lectura se utilizó además, el cebador pGAP Forward 2, que coincidió con el comienzo (base 1) del plásmido pGAPZ α A (Tabla 5).

3.4. Oligonucleótidos para mutagénesis

Los oligonucleótidos para la mutación de sitios únicos (Tabla 6), fueron diseñados sobre la misma hebra y su tamaño fue de entre 25 y 45 pb. El punto de mutación se situó en el medio del oligonucleótido con 16-17 pb a cada lado. Estos oligonucleótidos contenían un mínimo del 40 % de GC con una temperatura de melting superior a 75 °C

Por último, los oligonucleótidos fueron sintetizados a una escala 0.01 μ M y para que no disminuyera la eficiencia de mutagénesis, fueron purificados por HPLC, evitando así el porcentaje de oligonucleótidos inacabados que siempre se producen en la síntesis y fueron fosforilados en su extremo 5'..

Tabla 6. Oligonucleótidos diseñados para realizar la mutagénesis dirigida de los genes *crtI*, *crtL* y del plásmido pGAPZ α A.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5' - 3')
SDM-pGAPZ α A* F	5' CACCGCCCGTTACCGTC <u>G</u> CTAGGAAATTTTACTC 3'
SDM-pGAPZ α A* R	5' GAGTAAAATTTTCTAG <u>C</u> GACGGTAACGGGCGGGTG 3'
SDM- <i>crtI</i> * Forward	5' CGTCTACAAGCTGCGGGTATCCCCGTCTTACTGC 3'
SDM- <i>crtI</i> * Reverse	5' GCAGTAAGACGGGGAT <u>A</u> CCCGCAGCTTGTAGACG 3'
SDM- <i>crtL</i> * Forward	5' CCAAAAACCCATCAAAG <u>G</u> TCTTCAAGAGCAAAGCA 3'

4. PLÁSMIDOS

pUC19 (Invitrogen). El vector de expresión pUC19 (Figura 11) contenía un gen de resistencia a ampicilina que permitió seleccionar transformantes. Los insertos clonados en la región poli-ligadora pueden ser expresados bajo el control del promotor *lac*, inducible por IPTG. Además, contiene el gen *lacZ* que permitió seleccionar por color las colonias recombinantes en un medio con X-Gal e IPTG (Yanisch-Perron *et al.*, 1985). Contiene un origen de replicación para *E. coli*.

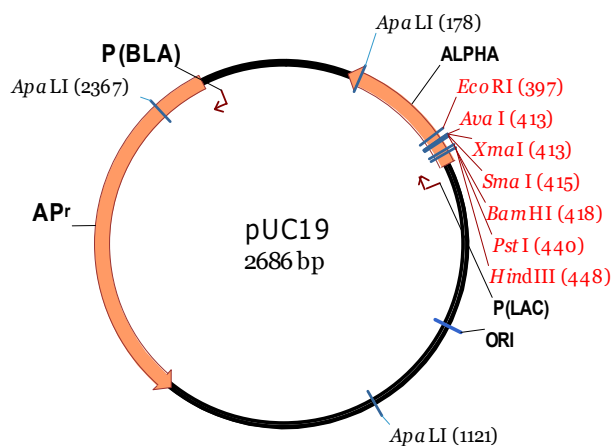


Figura 11. Dibujo esquemático del vector pUC19.

pCR Blunt II TOPO (Invitrogen). El vector pCR Blunt II TOPO (Figura 12) permitió una selección directa de los recombinantes por medio de la actuación de un gen letal (*ccdB*) de tal forma que tras sembrar las células transformantes en un medio selectivo aparecen solamente aquellas colonias que contenían inserto. Cuando se incluye el inserto en el vector, este gen es interrumpido y las células sobreviven y forman colonias.

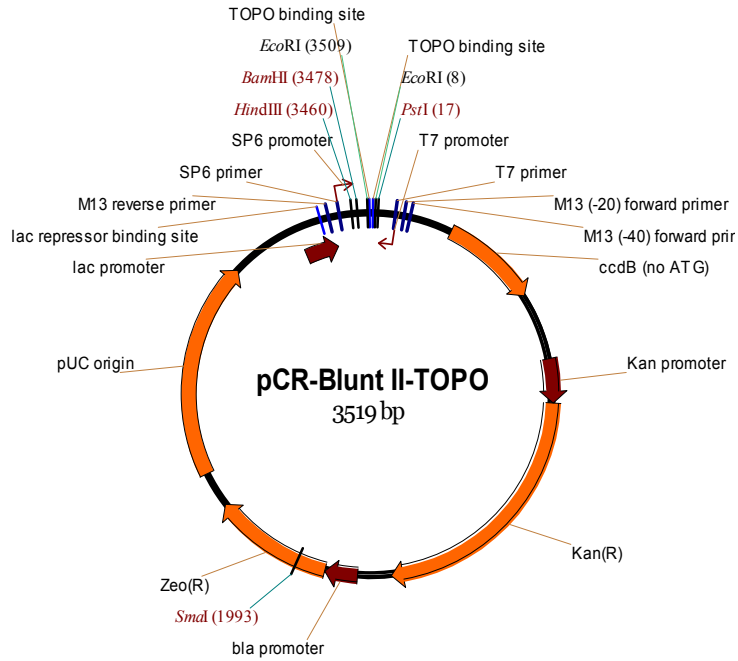


Figura 12. Dibujo esquemático del vector pCR Blunt II TOPO

pET21a (Novagen). El vector pET21a (Figura 13) contenía un gen de resistencia a ampicilina que permitió seleccionar los transformantes, la región de clonación/expresión es transcrita por la T7 RNA polimerasa.

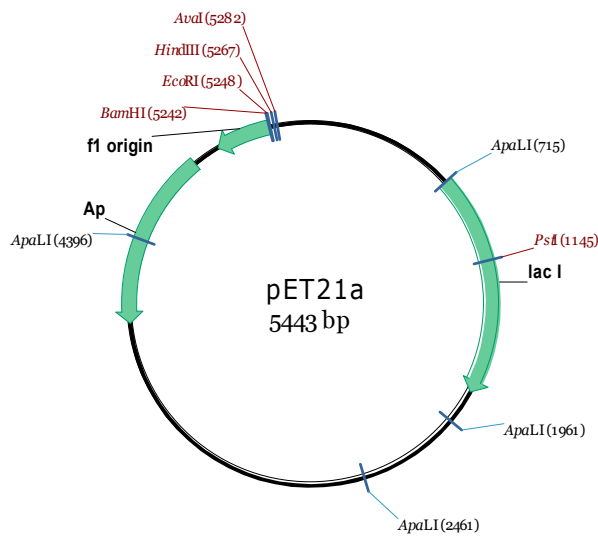


Figura 13. Dibujo esquemático del vector pET21a.

pACCRT-EBP (Linden *et al.*, 1993). Este plásmido contenía los genes *crtE* (GGPP sintetasa) y *crtB* (fitoeno sintetasa) de *E. uredovora* y además el gen *crtP* (fitoeno desaturasa) de *Synechococcus sp.* Las células transformadas con este plásmido producían la acumulación de ζ -caroteno. Este vector confirió resistencia a cloranfenicol y coloración amarillo claro a las colonias transformantes. Este plásmido fue amablemente cedido para la realización de este trabajo por el Prof. Gerhard Sandmann (J. W. Goethe Universität, Frankfurt, Germany).

pACCRT-EBR (Takaichi *et al.*, 1996). El plásmido pACCRT-EBR contenía los genes *crtE* (GGPP sintetasa), *crtB* (fitoeno sintetasa) de *E. uredovora* y además el gen *crtR* (fitoeno desaturasa) de *R. capsulatus*. Las células transformadas con este plásmido producían la acumulación de neurosporeno. Este vector confirió resistencia a cloranfenicol y coloración amarilla a los transformantes. Este plásmido fue amablemente cedido para la realización de este trabajo por el Prof. Misawa (Research Institute for Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural University, Japan).

pACCRT-EIB (Misawa y Shimada, 1998). El plásmido pACCRT-EIBI de 7.89 kb resultante de la inserción, en el sitio *EcoRV* del vector pACYC184, de un fragmento de 3.75 kb conteniendo los genes *crtE* (GGPP sintetasa), *crtB* (fitoeno sintetasa) y *crtI* (fitoeno desaturasa) de *E. uredovora*. Las células transformadas con este plásmido producían la acumulación de licopeno a partir de su contenido endógeno de isopentil pirofosfato. Confirió resistencia a cloranfenicol y coloración rojiza a los transformantes. Este plásmido fue amablemente cedido para la realización de este trabajo por el Prof. Misawa (Research Institute for Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural University, Japan).

pET21-zdsFc (Este estudio). El plásmido recombinante pET21-zdsFc (Figura 14) es el producto de la clonación de la secuencia del gen *zds* de *Ficus carica* en los sitios *EcoRI* y *XhoI* del vector de expresión pET21a. Contenía el gen de resistencia a ampicilina que permitió seleccionar los transformantes, la región de clonación/expresión es transcrita por la T7 RNA polimerasa.

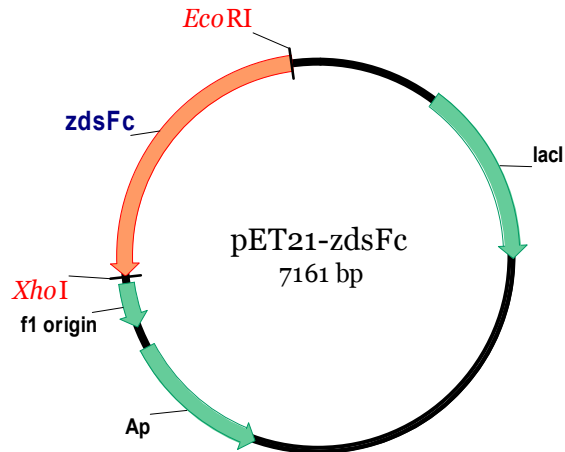


Figura 14. Dibujo esquemático del plásmido de expresión pET21-zdsFc.

pET21-Lyc β (Este estudio). El plásmido recombinante pET21-Lyc β (Figura 15) es el producto de la clonación de la secuencia del gen β -lcy-Fc de *Ficus carica* en los sitios *NdeI* y *SacI* del vector de expresión pET21a. Contiene el gen de resistencia a ampicilina que permitió seleccionar los transformantes, la región de clonación/expresión es transcrita por la T7 RNA polimerasa.

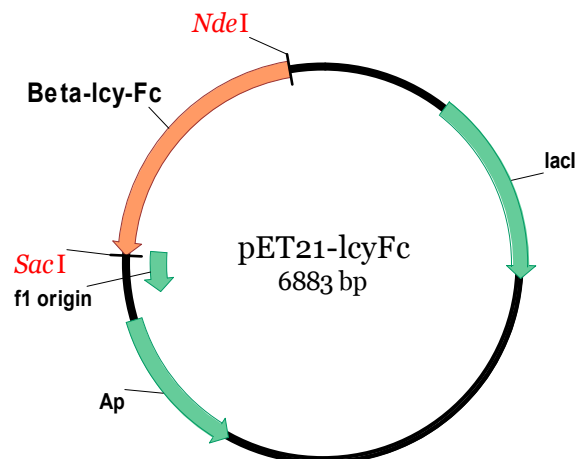


Figura 15. Dibujo esquemático del plásmido de expresión pET21-lcyFc.

pAK96K (Misawa *et al.*, 1995b). Este plásmido contenía los genes *crtW* (β -caroteno ketolasa) y *crtZ* (β -caroteno hidroxilasa) de *A. aurantiacum* clonados en pauta de lectura con el promotor *lac* del vector pBluescript II. Este plásmido fue amablemente cedido por el Prof. Misawa (Research Institute for Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural University, Japan) para la realización de este trabajo.

pGAPZ α A (Invitrogen). El plásmido pGAPZ α A (Figura 16. Tabla 7) es un vector de expresión integrativo para *P. pastoris* que contiene el origen de replicación de *E. coli*. Contiene un gen de resistencia a zeocina, que permitió seleccionar transformantes y el promotor *GAP* que permitió la expresión constitutiva del inserto clonado. Este vector contenía la secuencia del péptido señal del factor α de *S. cerevisiae* lo que permite la secreción de la proteína de fusión al exterior celular. El inserto debió estar en pauta de lectura con dicha secuencia. El vector incorpora la secuencia codificante para sitios de unión para un anticuerpo (Epitopo *myc*) y una cola de histidinas, lo cual facilita la purificación posterior de la proteína de fusión.

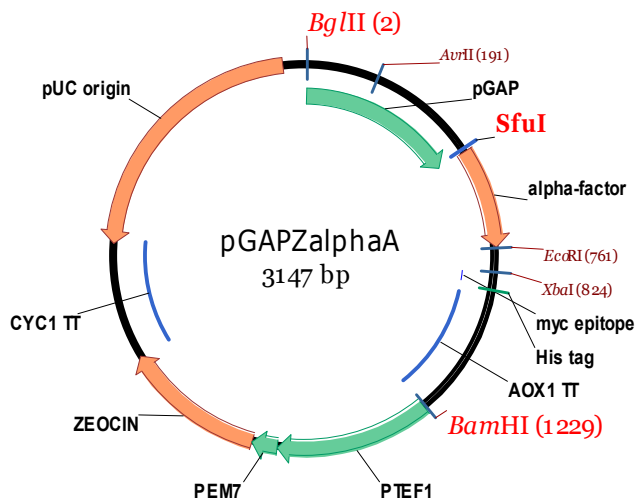


Figura 16. Dibujo esquemático del vector pGAPZ α A.

pGAPZA-EBI* (Este estudio). Vector de expresión integrativo resultante de la inserción de las secuencias codificantes de los genes *crtE* (GGPP sintetasa), *crtB* (fitoeno sintetasa) y *crtI* (fitoeno desaturasa) de *E. uredovora*, en el vector pGAPZ α A bajo el control del promotor constitutivo *GAP* y terminador *AOX-1* (Figura17. Tabla 7).

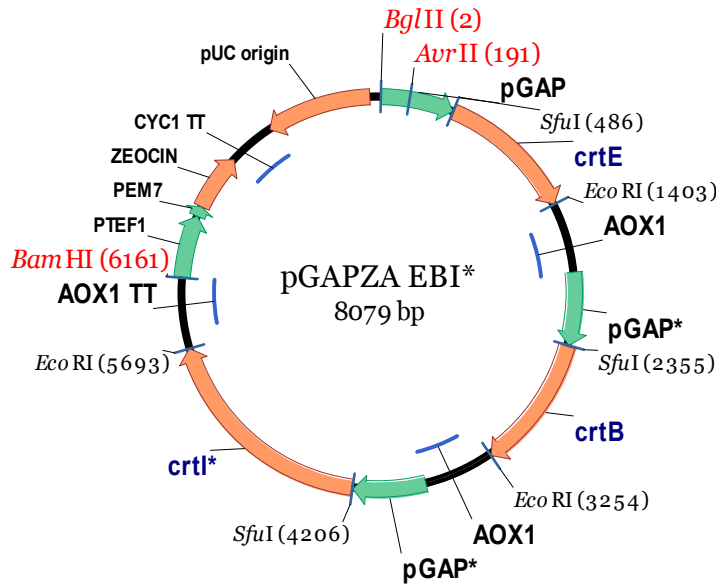


Figura 17. Dibujo esquemático del vector pGAPZA-EBI*

pGAPZA-EBI*L* (Este estudio). Vector de expresión integrativo obtenido mediante la inserción de las secuencias codificantes de los genes *crtE*, *crtB* y *crtI* de la bacteria *E. uredovora* y del gen licopeno β -ciclasa, *crtL* (β -lcy-Fc) de *F. carica* en el vector pGAPZAaA bajo el control del promotor constitutivo *GAP* y terminador *AOX-1* (Figura 18. Tabla 7).

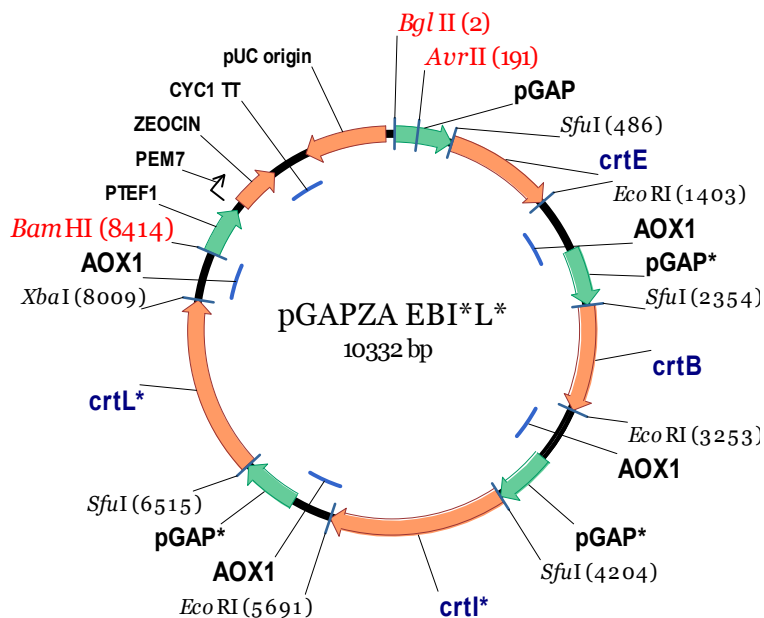


Figura 18. Dibujo esquemático del vector pGAPZA-EBI*L*

pGAPZA-WZ (Este estudio). Vector de expresión integrativo obtenido mediante la inserción de las secuencias codificantes de los genes *crtW* y *crtZ* de la bacteria *A. aurantiacum* en el vector pGAPZαA bajo el control del promotor constitutivo GAP y terminador AOX-1 (Figura 19. Tabla 7).

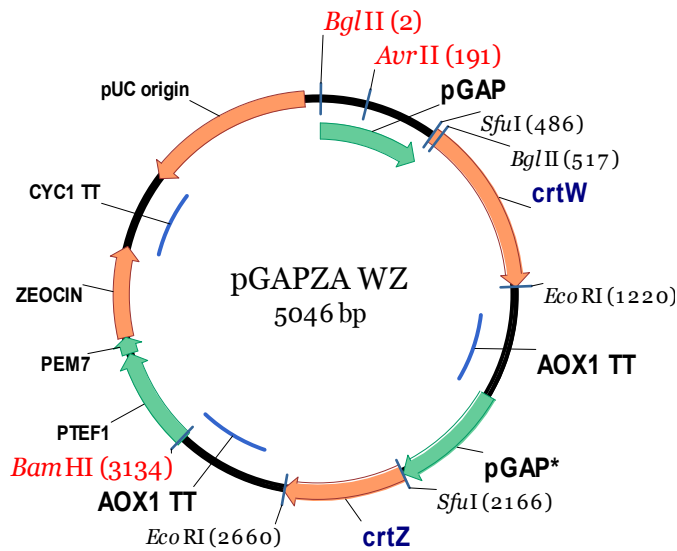


Figura 19. Dibujo esquemático del vector pGAPZA-WZ

Tabla 7. Resumen de los plásmidos usados y/o construidos en éste estudio para el clonaje y transformación de *P. pastoris*.

Plásmido	Descripción	Fuente
pACCRT-EIB	Plásmido para la expresión en <i>E. coli</i> de licopeno	(Misawa y Shimada, 1998)
pGAPZαA	Plásmido integrativo de <i>P. pastoris</i> (Zeo ^R)	(Invitrogen)
pET21-Lycβ	Gen licopeno beta-ciclasa clonado en pET21a	(Este estudio)
pGAPZαA*	Plásmido pGAPZαA desprovisto del sitio AvrII	(Este estudio)
pGAPZA-E	Gen <i>crtE</i> clonado en pGAPZA sin factor alfa	(Este estudio)
pGAPZA*-B	Gen <i>crtB</i> clonado en pGAPZA* sin factor alfa	(Este estudio)
pGAPZA*-I	Gen <i>crtI</i> clonado en pGAPZA* sin factor alfa	(Este estudio)
pGAPZA*-I*	Gen <i>crtI*</i> clonado en pGAPZA*; <i>crtI*</i> (mutante sin el sitio BamHI)	(Este estudio)
pGAPZA*-L	Gen <i>crtL</i> clonado en pGAPZA* sin factor alfa	(Este estudio)
pGAPZA*-L*	Gen <i>crtL*</i> clonado en pGAPZA*; <i>crtL*</i> (mutante sin el sitio BglIII)	(Este estudio)
pGAPZA-W	Gen <i>crtW</i> clonado en pGAPZA sin factor alfa	(Este estudio)
pGAPZA*Z	Gen <i>crtZ</i> clonado en pGAPZA* sin factor alfa	(Este estudio)
pGAPZA-EB	Genes <i>crtE</i> y <i>crtB</i> clonados en pGAPZA	(Este estudio)
pGAPZA-EBI*	Genes <i>crtE</i> , <i>crtB</i> y <i>crtI*</i> clonados en pGAPZA	(Este estudio)
pGAPZA-EBI*L*	Genes <i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI*</i> y <i>crtL*</i> clonados en pGAPZA	(Este estudio)
pGAPZA-WZ	Genes <i>crtW</i> y <i>crtZ</i> clonados en pGAPZA	(Este estudio)

5. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS

5.1. Extracción y purificación de RNA total desde tejido vegetal

5.1.1. Ruptura del tejido vegetal

Se machacó un trozo de hoja fresca en un mortero empleando N₂ líquido. Una vez reducido a polvo se introdujo en un homogenizador con tampón RLT (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen) preparado en el momento con 10 µL de β-mercaptoetanol por cada mL de tampón RLT.

5.1.2. Homogenización del tejido

La muestra de polvo machacado en tampón RLT se introdujo en una minicolumna Qiashredder spin column, (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen) colocada en un tubo colector de 2 mL. A continuación, se centrifugó 2 min a velocidad máxima empleando una centrífuga EBA 21 (Hettich Zentrifugen). Se desechó la minicolumna. Se centrifugó el tubo colector 3 min adicionales y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo.

5.1.3. Extracción de RNA

Se añadió 1 volumen de etanol al 70 % al sobrenadante obtenido en el apartado anterior y se mezcló inmediatamente con una pipeta. A continuación, se introdujo la mezcla anterior, incluyendo posibles precipitados que puedan formarse, en una mini columna (RNAeasy minicolumn, Quiagen) que se colocó en un tubo colector de 2 mL. Se centrifugó el tubo colector con la minicolumna 10 s a 14000 rpm empleando una centrífuga EBA 21 (Hettich Zentrifugen). Se desechó el tubo colector y se guardó la mini columna que contenía el RNA retenido en la matriz.

5.1.4. Lavado del RNA extraído

Se añadieron 700 µL de tampón RW1 (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen) a la minicolumna. La minicolumna se colocó en un tubo colector nuevo y se centrifugó 15 s a 14000 rpm empleando una centrífuga EBA 21 (Hettich Zentrifugen). Se transfirió la minicolumna a un tubo colector nuevo y se añadió 500 µL de tampón RPE (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen). Se

centrifugó 10 s a 14000 rpm empleando una centrífuga EBA 21 (Hettich Zentrifugen) y se desechó el líquido sobrenadante. Se volvió a lavar con 500 μ L de tampón RPE (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen) y esta vez se centrifugó 2 min a 14000 rpm. Finalmente, se situó la minicolumna en un vial nuevo y se centrifugó a velocidad máxima para eliminar cualquier resto de etanol. Una vez lavado el RNA, se procedió a su elución.

5.1.5. Elución de RNA

Se transfirió la minicolumna a un tubo colector de 1.5 mL estéril y libre de RNasas y se añadió 30-50 μ L de agua libre de RNasas (Invitrogen) a la minicolumna. Se centrifugó 1 min a 14000 rpm y se repitió el proceso usando el primer líquido eluido como eluyente, obteniendo, así, el RNA más concentrado. Las muestras de RNA puro se trataron con DNasa (Invitrogen) y fueron utilizadas en el mismo momento o se guardaron a -80 °C para su posterior utilización.

5.2. Extracción de DNA

5.2.1. Extracción de DNA genómico de *Ficus carica*

Para la extracción de DNA genómico se utilizó el kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit” (Promega). A partir de un trozo de tejido fresco, este se congeló en nitrógeno líquido y se trituró en un mortero hasta obtener un polvo fino, del cual se extrajo 40 mg y se introdujo en un tubo de 1.5 mL. Se añadió 600 μ L de Nuclei Lysis Solution (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega) y se aplicó vortex por 3 s para mezclar; a continuación se incubó a 65 °C por 15 min. Posteriormente se agregaron 3 μ L de RNasa (Invitrogen) al lisado celular, se mezcló invirtiendo el tubo 3-5 veces y se incubó a 37 °C por 15 min, luego se dejó a temperatura ambiente 5 min antes de proceder a la adición de 200 μ L de Protein precipitation solution (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega) y vortex a máxima velocidad por 20 s. Se centrifugó por 3 min a 16000 g. Se recuperó el sobrenadante que contenía el DNA y se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 mL y se adicionó 600 μ L de isopropanol a temperatura ambiente, se mezcló y centrifugó a 16000 g por 1 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el precipitado celular fue lavado con 600 μ L de Etanol 70 %, luego se centrifugó a 16000 g por 1 min y el precipitado celular se dejó secar al aire por 15 min.

Finalmente, el precipitado celular se resuspendió en un volumen final de 100 μ L de agua MilliQ. El DNA genómico se conservó a -20 °C hasta su utilización.

5.2.2. Extracción de DNA genómico de *Pichia pastoris*

Para la extracción del DNA genómico de las colonias transformantes de *P. pastoris* se utilizó el kit “Master Pure™ Yeast DNA Purification Kit” (Epicentre Biotechnologies) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El DNA genómico extraído se resuspendió en un volumen final de 35 μ L de agua MilliQ.

5.3 Amplificación de DNA. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) fueron realizadas generalmente en un volumen final de 50 μ L, la composición de la mezcla fue: 1X tampón de reacción, [(NH₄)₂SO₄ 160 mM; Tris-HCl, 670 mM pH 8.8; Tween-20 0.1 g/L], MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 0.1 mM, cebador sentido (5 μ M), cebador antisentido (5 μ M) y la enzima Accuzyme DNA polymerase (Bioline). Las condiciones de PCR fueron, en general, 94 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos 94 / (T° variable) / 72 °C durante 30 / 50 / 90 s, respectivamente, y un tiempo de extensión final a 72 °C durante 10 min.

La amplificación de las secuencias para su expresión en el sistema eucariota se realizaron en un volumen final de 50 μ L, la composición de la mezcla fue: 1X tampón de reacción [(NH₄)₂SO₄ 6 mM; Tris-HCl 100 mM pH 8.3; Tween-20 0.1 g/L], MgCl₂ 2 mM, dNTPs 0.1 mM], cebadores F y R 0.2 μ M y 1.25 U de la enzima de alta fidelidad, Prime STAR HS DNA Polymerase (Takara Biotechnology). Las condiciones de PCR fueron, en general, 98 °C durante 3 min, seguido de 30 ciclos, 98 / (T° variable) / 72 °C durante 10 / 5 - 10 / 90 s, respectivamente y un tiempo de extensión final a 72 °C durante 7 min.

5.3.1. Síntesis de cDNA

La amplificación por PCR del producto de la retrotranscripción de mRNA (RT-PCR), para el clonaje de los cDNA de los mensajeros de los genes en estudio, se realizó en una primera etapa utilizando el kit “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit” (Roche Applied Science). Para ello, se siguió las instrucciones del fabricante: La primera etapa del proceso

consiste en la síntesis de la primera cadena o hebra del cDNA mediante la acción de la transcriptasa reversa sobre el mRNA (RNA total). Se utilizó una mezcla de RNA (concentración final 1 µg), un cebador oligo(dT)₁₈ (2.5 µM), capaz de unirse a la cola poli(A) de la mayoría de los mensajeros eucariotas, tampón de reacción 1X (8 mM MgCl₂), inhibidor de RNasa (20 U), mezcla de deoxinucleótidos (1 mM) y 10 U de Transcriptasa reversa, en un volumen final de 20 µL.

La RT se incubó durante 30 min a 55 °C y finalmente, se inactivó la Transcriptasa reversa calentando la mezcla a 85 °C por 5 min.

5.3.2. Amplificación de la región interna

5.3.2.1. Amplificación de la región interna del gen ζ-caroteno desaturasa de *Ficus carica*

La RT-PCR fue llevada a cabo mediante el kit “RT-PCR AMV”. Para la amplificación se utilizó los cebadores degenerados ZDS DegF y ZDS DegR (Tabla 3).

La amplificación de estos fragmentos internos del cDNA del gen *zds-Fc* se realizó por PCR utilizando los antes mencionados oligonucleótidos y 2 µL del producto de la primera hebra de cDNA. La mezcla de reacción consistió en: tampón 1X, 0.2 mM de cada cebador, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 mM de cada deoxinucleótido y 1 U de Accuzyme DNA polimerasa siguiendo el siguiente programa: 94 °C por 2 min, 35 ciclos de 94 °C por 45 s; 49 °C por 1 min y 72 °C por 2 min; y un tiempo de extensión final de 72 °C por 10 min.

5.3.2.2. Amplificación de la región interna del gen licopeno β-ciclase de *Ficus carica*

Para la amplificación se utilizó los cebadores degenerados Lcy-β DegF y Lcy-β DegR (Tabla 4).

La amplificación de estos fragmentos internos del cDNA del gen *β-lcy-Fc* se realizó por PCR utilizando los antes mencionados oligonucleótidos y 2 µL de primera hebra de cDNA. La mezcla de reacción consistió en: Tampón 1X, 0.2 mM de cada cebador, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 mM de cada desoxinucleotido y 1 U de Accuzyme DNA polimerasa (Bioline). Las condiciones de la reacción fueron: 94 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de 94/49/72 °C durante 60/60/120 s, respectivamente, y un ciclo de 72 °C durante 10 min.

5.3.3. RACE-PCR

Los extremos 5' y 3' del gen *zds-Fc* fueron obtenidos mediante RACE-PCR. Se utilizó el kit "5'/3' RACE kit, 2nd Generation" (Roche Applied Science), los cebadores específicos ZDS-Fc1, ZDS-Fc2, ZDS-Fc3, ZDS-Fc4 y ZDS-Fc5 (Tabla 3) y la enzima de alta fidelidad, Accuzyme DNA Polymerase (Bioline). Para la amplificación de los extremos 5' y 3' del gen *β -lcy-Fc* se utilizó el mismo kit y la misma enzima, junto con los cebadores específicos Lcy-Fc1, Lcy-Fc2, Lcy-Fc3, Lcy-Fc4 y Lcy-Fc5 (Tabla 4).

5.3.3.1. Amplificación del extremo 5' del gen *zds-Fc*

Se sintetizó la primera hebra del cDNA utilizando un cebador interno específico (Fc1) (Figura 20, Tabla 3); mediante incubación con la desoxinucleotidil-terminal-transferasa y dATP, se construyó una cola poli(A) en el extremo 3' de la primera hebra del cDNA; la región faltante en el extremo 5' del gen, fue amplificada en una primera PCR con los cebadores ZDS-Fc2 (Tabla 3) y Oligo dT-Anchor Primer (Figura 20).

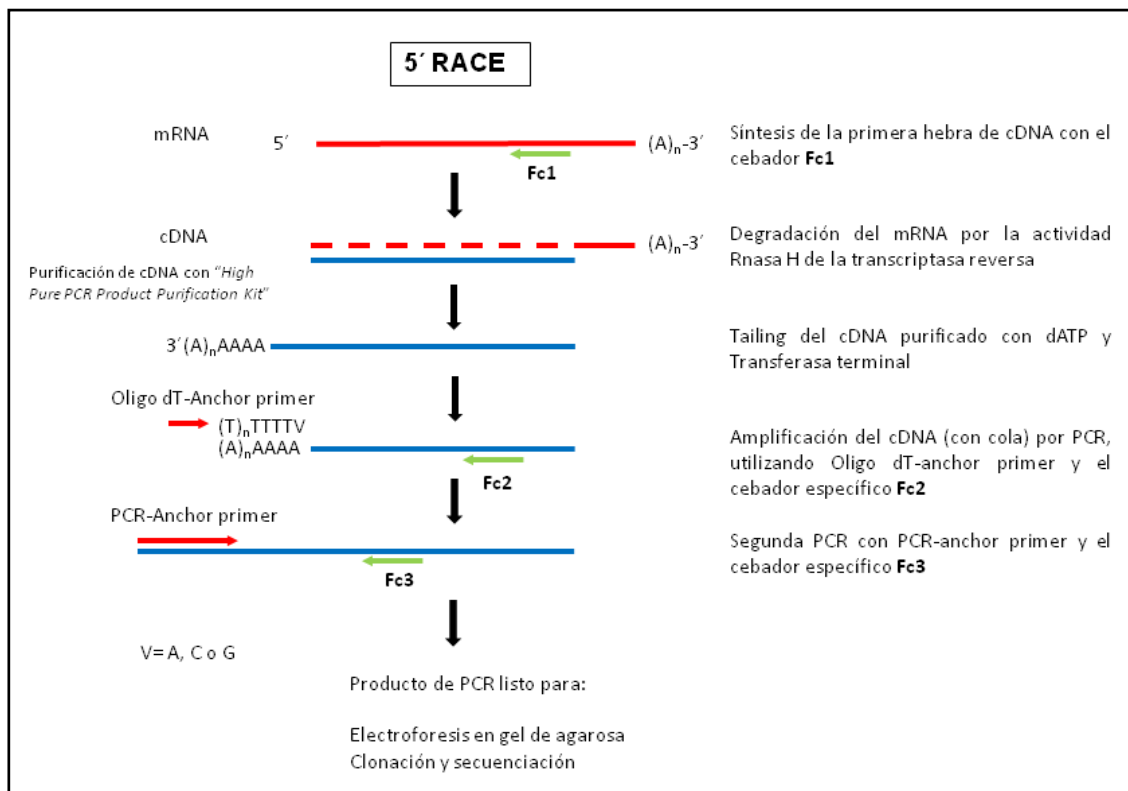


Figura 20. Esquema de la técnica RACE-PCR para la obtención del extremo 5'

El programa de amplificación utilizado fue: 1 ciclo a 94 °C por 2 min; 10 ciclos de 94 °C por 15 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 40 s; 25 ciclos de 94 °C por 15 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 40 s, incrementando el tiempo de extensión en 20 s en cada ciclo (*Ejemplo*. El tiempo de elongación de ciclo nº 11 es 40 s, en el ciclo 12 es 60 s, en el ciclo 13 es 80 s etc.) y un tiempo de extensión final de 72 °C por 7 min.

El producto de PCR amplificado se utilizó como molde (dilución 1:20) para una segunda amplificación por PCR utilizando los cebadores ZDS-Fc3 (Tabla 2) y PCR Anchor Primer (Figura 20).

El programa de amplificación para esta segunda PCR fue igual al anterior a excepción de la temperatura de hibridación que fue llevada a cabo a 60 °C. El producto de la PCR se purificó, se clonó en el vector pUC19 y su identidad se comprobó por secuenciación.

5.3.3.2. Amplificación del extremo 3' del gen *zds-Fc*

El extremo 3' del gen *zds-Fc* fue amplificado en dos reacciones de PCR secuenciales: primero, mediante el uso del cebador ZDS-Fc4 (Tabla 3) y de un oligo(dT), se amplificó el cDNA que contenía la región 3' del RNA: con la ayuda de la transcriptasa reversa y el oligo(dT), hibridado en la cola poli(A) del mensajero, se generó la primera hebra del cDNA.

A continuación, con el concurso del cebador procedente de la región interior ZDS-Fc5 (Tabla 3) y el cebador PCR Anchor primer (Figura 21), junto con Accuzyme DNA polymerase (Bioline) se amplificó la mitad 3' terminal del cDNA (Figura 21).

Para la PCR se utilizó las siguientes condiciones: 94 °C durante 2 min, seguido de 35 ciclos 94/67/72 °C durante 30/50/90 s, respectivamente. Por último, la reacción permaneció a 72 °C durante 10 min.

La identidad de la secuencia de DNA de los fragmentos amplificados se confirmó por secuenciación de los insertos clonados en el vector pUC19.

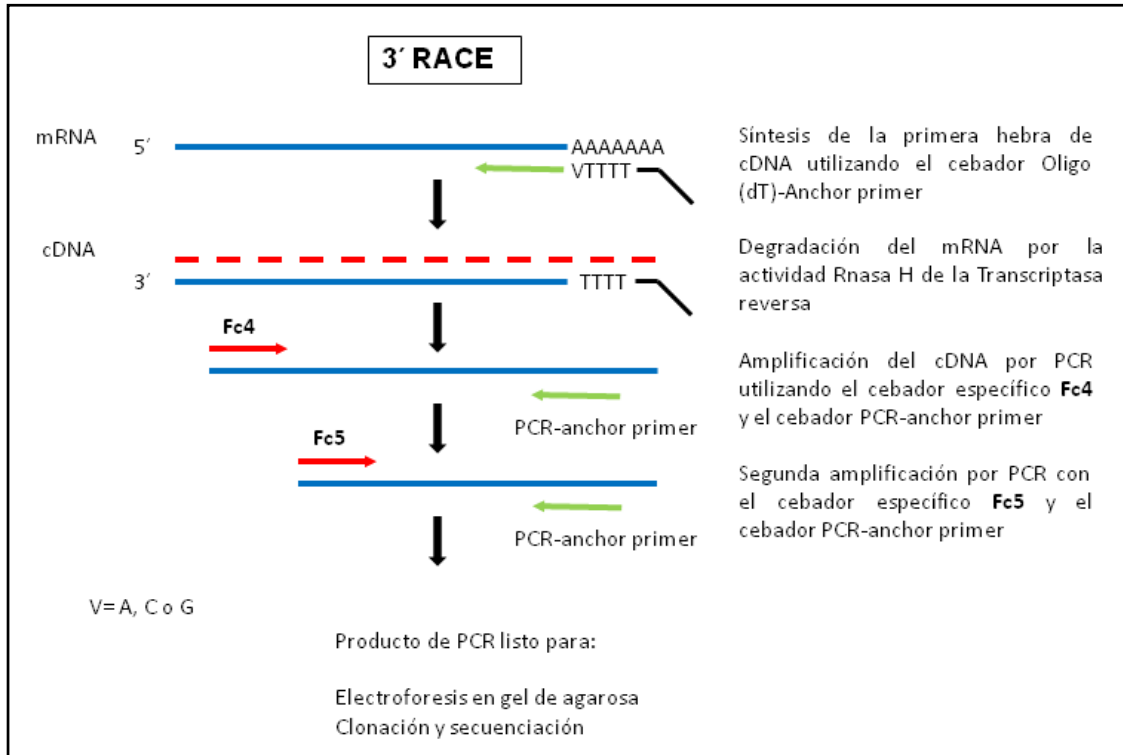


Figura 21. Esquema de la técnica RACE-PCR para la obtención del extremo 3'

5.3.3.3. Amplificación del extremo 5' del gen β -lcy-Fc

Para obtener el extremo 5' se utilizó el cebador LCY-Fc1 para la síntesis de la primera hebra de cDNA (Figura 20), mientras que la región faltante en el extremo 5' del gen, fue amplificada en una primera PCR con los cebadores LCY-Fc2 (Tabla 4) y Oligo dT-Anchor Primer (Figura 20). Las condiciones utilizadas fueron 94 °C durante 2 min, seguido de 10 ciclos 94/58/72 °C durante 15/30/40 s, respectivamente, seguido de 25 ciclos 94/58/72 °C durante 15/30/40 s, incrementándose el tiempo de extensión 20 s en cada ciclo. Por último, la reacción permaneció a 72 °C durante 7 min.

El producto de la reacción se utilizó como molde (dilución 1:20) para una segunda reacción de amplificación por PCR, utilizando los cebadores LCY-Fc3 (Tabla 4) y PCR Anchor Primer (Figura 20). El programa de amplificación para esta segunda PCR fue igual al anterior a excepción de la temperatura de hibridación que fue llevada a cabo a 60 °C. El producto de la PCR se purificó, se clonó en el vector pUC19 y su identidad se comprobó por secuenciación.

5.3.3.4. Amplificación del extremo 3' del gen β -*lcy-Fc*

El extremo 3' del gen β -*lcy-Fc* fue amplificado en dos reacciones de PCR secuenciales, utilizando los cebadores LCY-Fc4 y LCY-Fc5 (Tabla 4), respectivamente, y el cebador PCR Anchor primer (Figura 21). Las condiciones utilizadas fueron 94 °C durante 2 min, seguido de 35 ciclos 94/65/72 °C durante 30/50/60 s, respectivamente. Por último, la reacción permaneció a 72 °C durante 10 min. La identidad de la secuencia de DNA amplificado se confirmó por secuenciación de los insertos clonados en pUC19.

5.3.4. Amplificación del cDNA portador de la región codificante del gen *zds* de *Ficus carica*

La amplificación de la región codificante completa del gen *zds-Fc*, se realizó con los cebadores específicos ZDS-*EcoRI* F y ZDS-*XhoI* R (Tabla 3), a partir de cDNA sintetizado con el kit “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit” (Roche Applied Science). Las condiciones de PCR fueron: 1 ciclo a 95 °C por 3 min; 35 ciclos de 95 °C por 10 s, 57 °C por 10 s y 72 °C por 2 min; y un tiempo final de extensión a 72 °C por 10 min.

5.3.5. Amplificación del cDNA portador de la región codificante del gen β -*lcy* de *Ficus carica*

La amplificación de la región codificante completa del gen β -*lcy-Fc*, se realizó con los cebadores específicos LCY- β *NdeI* F y LCY- β *SacI* R (Tabla 4), a partir de cDNA sintetizado con el kit “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit” (Roche Applied Science). Las condiciones de PCR fueron: 1 ciclo a 95 °C por 3 min; 35 ciclos de 95 °C por 10 s, 59 °C por 10 s y 72 °C por 2 min ; y un tiempo final de extensión de 10 min a 72 °C.

5.3.6. Amplificación de los genes de carotenogénesis para su expresión en *Pichia pastoris*

Las secuencias de los genes *crtE*, *crtB* y *crtI*, fueron amplificadas desde el plásmido pACCRT-EIB (Misawa y Shimada, 1998), el cual contenía los genes de *E. uredovora crtE* (GGPP sintetasa), *crtB* (fitoeno sintetasa) y *crtI* (fitoeno desaturasa) que catalizan la síntesis de licopeno.

El gen *crtL* o β -*lcy-Fc*, fue amplificado desde el plásmido pET21-Lyc β , que contenía la secuencia del gen licopeno beta-ciclasa de *F. carica* (Araya-Garay *et al.*, 2011), que cataliza la conversión de licopeno a β -caroteno.

Los genes *crtW* y *crtZ*, fueron amplificados desde el plásmido pAK96K (Misawa *et al.*, 1995b), el cual contenía los genes *crtW* (β -caroteno ketolasa) y *crtZ* (β -caroteno hidroxilasa) de la bacteria marina *A. aurantiacum*, que catalizan la síntesis de astaxantina a partir de β -caroteno.

La amplificación de estos genes antes mencionados se llevo a cabo utilizando cebadores específicos para cada gen, que incluyeron en su extremo 5' la diana de restricción *SfuI*, seguida de la secuencia concenso optimizada de Kozak (ATGG) y el codón de inicio; y en el extremo 3' la diana de restricción *EcoRI* (Tabla 5). El único fragmento amplificado con una diana diferente fue el gen *crtL*, en el cual el cebador en el extremo 3' contenía la diana de restricción *XbaI* (Tabla 5).

5.3.7. Mutagénesis dirigida

La mutagénesis dirigida de sitio único de los genes *crtI* y *crtL*, se llevó a cabo mediante la utilización del kit “Site-directed mutagenesis” (Stratagene), siguiendo las recomendaciones del fabricante y utilizando los cebadores mutacionales SDM-*crtI** F (Forward) y R (Reverse); y SDM-*crtL** (Forward) F (Tabla 6).

Las PCRs fueron realizadas con la enzima Prime STAR HS DNA Polimerasa (Takara Biotechnology). Esto permitió generar los mutantes silenciosos, *crtI** y *crtL** desprovistos del sitio *BamHI* y *BglIII*, respectivamente.

El plásmido pGAPZ α A fue también mutado y generó el plásmido pGAPZ α A* desprovisto del sitio de restricción *AvrII*. Esta mutación silenciosa se llevó a cabo utilizando los cebadores SDM-pGAPZ α A* Forward y Reverse (Tabla 6). Todas las mutaciones realizadas fueron verificadas por secuenciación del DNA mutado.

El protocolo constó de tres pasos (Figura 22). El primer paso consistió en una PCR empleando como molde, ya fuese el plásmido pGAPZ α A (sin inserto), o el plásmido pGAPZ α A* con los genes *crtI* y *crtL* clonados y los cebadores específicos diseñados para cada mutación, además de una polimerasa suministrada por el kit (*Pfu* Turbo DNA polimerasa, Stratagene).

Durante la reacción en cadena de la polimerasa el vector superenrollado de doble hebra se desnaturalizó en una primera fase y los oligonucleótidos con las mutaciones se anillaron. A continuación, la polimerasa generó plásmidos de doble cadena con una hebra diferente a la otra en los cambios deseados y con mellas que fueron corregidas por la propia polimerasa.

En un segundo paso se digirió los productos de la amplificación con la nucleasa *DpnI*. Esta enzima digirió la hebra parental metilada y hemimetilada por lo que solo quedó los plásmidos monocatenarios.

Finalmente, en un tercer paso, estos plásmidos de cadena simple fueron introducidos en células *E. coli* ultra competentes XL10-Gold, Stratagene.

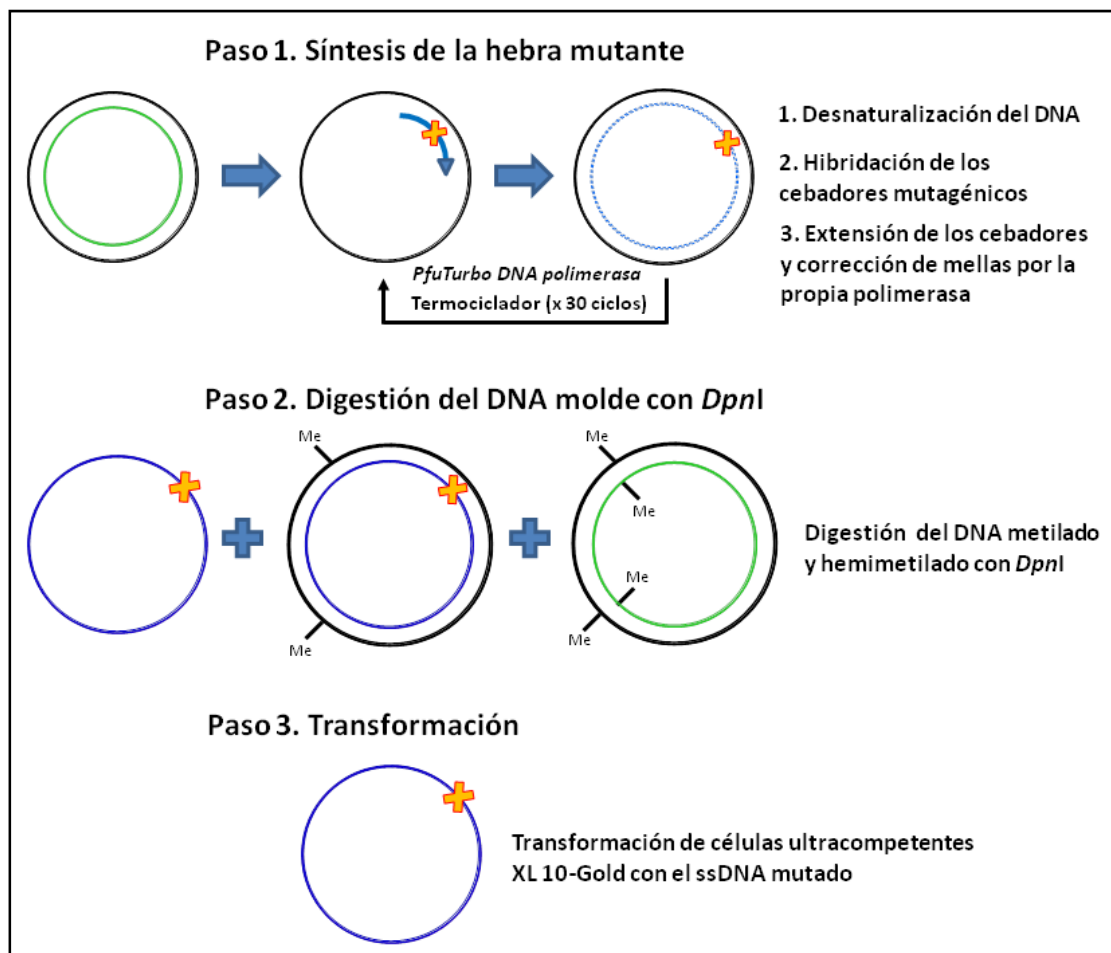


Figura 22. Procedimiento de mutagénesis dirigida.

5.4. Secuenciación

Las construcciones realizadas fueron comprobadas por secuenciación empleando servicios externos; Sistemas Genómicos (Valencia) o Secugen (Madrid).

5.4.1. Secuenciación de los insertos clonados en el vector pCR Blunt II TOPO

Para secuenciar los insertos clonados en el vector pCR Blunt II TOPO (Invitrogen), se envió a secuenciar el plásmido obtenido tras una extracción realizada con el kit “High Pure Plasmid isolation Kit” (Roche Applied Science). Se utilizó los oligonucleótidos universales SP6 y T7.

5.4.2. Secuenciación de los insertos clonados en el vector pUC19

En el caso de las construcciones realizadas en el vector pUC19, se envió a secuenciar el plásmido obtenido tras una extracción realizada con el kit “High Pure Plasmid isolation Kit” (Roche Applied Science). Se utilizó los oligonucleótidos universales M13 (-26) y M13 (-40).

5.4.3. Secuenciación de los insertos clonados en el vector pET21a

Para las construcciones realizadas en el vector pET21a, se envió a secuenciar el plásmido obtenido tras una extracción realizada con el kit “High Pure Plasmid isolation Kit” (Roche Applied Science). Para este vector se utilizó los oligonucleótidos específicos del sistema pET:

T7 promotor 5'-TAATACGACTCACTATAGG-3'

T7 terminator 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

5.4.4. Secuenciación de los insertos clonados en el vector pGAPZA

En el caso de las construcciones realizadas en el vector pGAPZA, se envió a secuenciar el plásmido obtenido tras una extracción realizada con el kit “High Pure Plasmid isolation Kit” (Roche Applied Science). Se utilizaron los oligonucleótidos específicos del sistema de expresión GAP:

pGAP Forward 1, 5'-GTCCCTATTTCAATCAATTGAA-3'

AOX-1 Reverse, 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

5.4.5. Secuenciación de los insertos mutados en el vector pGAPZA

En el caso de las mutaciones realizadas tanto en el vector pGAPZA como en los insertos clonados *crtI* y *crtL*, se envió a secuenciar el plásmido obtenido tras una extracción realizada con el kit “High Pure Plasmid isolation Kit” (Roche Applied Science) y se emplearon los oligonucleótidos:

pGAP Forward 1 5'-GTCCCTATTTCAATCAATTGAA-3'

pGAP Forward 2 5'-AGATCTTTTTTGTAGAAATGTC-3'

AOX-1 Reverse 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

5.5. Electroforesis de DNA

Las moléculas de DNA amplificadas en cada PCR, se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa. Normalmente, los geles se prepararon a una concentración de agarosa (Type II: Medium EEO, Sigma-Aldrich) entre 1 % y 2 %, en tampón TAE (Tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.002 M). El DNA se visualizó incorporando BrEt al gel a una concentración final de 1 mg/mL e iluminándolo con luz ultravioleta en un transiluminador, Gel Doc (BioRad). Las muestras de DNA a analizar se mezclaron en una proporción 4:1 (v/v) con una solución marcadora que contenía EDTA 25 mM, glicerol 50 % y azul de bromofenol 0.25 %. La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta horizontal durante un tiempo variable, según los requerimientos y a un voltaje de entre 70 y 110 V. Además, se utilizaron marcadores de peso molecular comerciales de tamaño conocido tales como 1 Kb ladder (Promega) o 2-Log DNA Ladder (New England BioLabs). Este último permitió además la cuantificación de las muestras de DNA.

5.6 Extracción y purificación de DNA a partir de geles de agarosa

Para purificar el producto amplificado mediante PCR se utilizó “Ilustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare). La muestra de ADN se cargó en un gel de agarosa al 1 %. La banda de tamaño esperado se recortó con una cuchilla y se depositó en un tubo Eppendorf de 1,5 mL, al que previamente se le registró su peso vacío y posteriormente con la banda recortada. Según la diferencia de peso se agregó 10 µL de Capture buffer (GE Healthcare) por cada 10 mg de gel. Se mezcló por inversión y se incubó a 60 °C hasta que la

agarosa se disolvió completamente. Posteriormente se transfirió la muestra a una columna GFX suministrada en el kit (MicroSpin column; GE Healthcare). Se incubó a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó por 30 s a 16.000 g. La matriz de la columna retuvo el ADN y tras un lavado con una solución suministrada por el kit y su posterior eliminación por centrifugación, se eluyó el ADN empapando la matriz con un volumen entre 10-50 μ L de tampón de elución (GE Healthcare).

5.7 Cuantificación de DNA

5.7.1 Determinación de la concentración de DNA mediante espectrofotometría

La cuantificación de la concentración de DNA se realizó mediante espectrofotometría. Para ello, se utilizó un espectrofotómetro Biophotometer (Eppendorf) empleando una cubeta de cuarzo de 20 μ L de capacidad. Como blanco para la medición se utilizó agua milliQ. Esta técnica tiene en cuenta que una unidad de D.O. a 260 nm equivale a 50 μ g de DNA por mL. También permitió estimar la pureza de las muestras teniendo en cuenta que la relación A_{260}/A_{280} debe ser mayor a 1.8.

5.7.2 Determinación de la concentración de DNA mediante electroforesis

Se cargó en un pocillo de un gel un estándar de pesos moleculares con concentraciones conocidas de DNA (2-Log DNA Ladder; New England BioLabs) y en los otros pocillos las muestras a analizar y se sometió a electroforesis. Tras 80 min a 80 V, se visualizó el DNA con luz ultravioleta y se comparó la intensidad de las bandas de DNA de concentración conocida con las bandas de DNA problema. Se construyó una curva de calibración con los valores en base a las bandas de concentración conocida y se realizó un análisis de intensidad por píxeles empleando un sistema de documentación de geles Gel Doc XR (BioRad) y el software Quantity One (BioRad).

5.7.3. Determinación de la concentración de DNA mediante espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (BioRad)

Para la medición de la concentración de los diferentes DNAs y también para RNA total se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (BioRad). La mayor ventajas de este equipo

radica en el pequeño volumen de muestra que se necesita (1-2 μL). Como muestra blanco se agregó 2 μL de agua MilliQ o el mismo tampón usado para resuspender el DNA. Las medidas se anotaron como ng/ μL de DNA o RNA. Además, se registró en cada caso la relación A_{260}/A_{280} que permitió estimar la pureza de las muestras.

5.8. Extracciones de DNA plasmídico

5.8.1. Extracción de DNA plasmídico empleando el kit “High Pure Plasmid Miniprep” (Roche Applied Science)

Se inoculó 5 mL de LB suplementado con el antibiótico adecuado para cada vector con una colonia aislada y se incubó a 37 °C con agitación (200 rpm) durante la noche. Al día siguiente se centrifugó el cultivo 4 min a 9000 rpm. Se eliminó el medio de cultivo y el concentrado celular se trató siguiendo las instrucciones del fabricante hasta la obtención del DNA plasmídico purificado el cual fue eluido con agua bidestilada (MilliQ) estéril en un volumen final de 75 μL . La concentración promedio del plásmido obtenido de este modo fue de 100 ng/ μL . Las muestras fueron conservadas a -20 °C hasta su utilización.

5.8.2. Extracción de DNA plasmídico empleando el kit “Miniprep Express Matrix” (Qbiogene)

El precipitado celular de un cultivo crecido toda la noche se resuspendió en 300 μL de tampón STET (sacarosa 8 g/L, triton X-100 5 g/L, EDTA 50 mM pH 8 y Tris- HCl 10 mM, pH 8). Se añadieron 25 μL de una solución de lisozima (10 mg/mL) y se incubó en hielo por 5 min. Se hirvió la muestra 90 s para desactivar la lisozima y se centrifugó a 4 °C, 10 min a 14000 rpm. Los restos celulares fueron retirados con un palillo. Se añadió 400 μL de Miniprep Express Matrix y se mezcló por inversión. Se centrifugó y eliminó el sobrenadante por aspiración con una bomba de vacío. Se lavó la resina que contenía el DNA con 500 μL de etanol 80 % resuspendiendo con la micropipeta. Se centrifugó y eliminó el etanol por aspiración, y se dejó secar al aire por 10 min. La resina se resuspendió en 75 μL de agua MilliQ y se centrifugó por 1 min a 14000 rpm.

Finalmente, se retiró 65 μL del sobrenadante que contenía el DNA plasmídico a un nuevo tubo. La concentración promedio del plásmido obtenido de este modo fue de 100 ng/ μL .

5.8.3. Extracción de DNA plasmídico empleando el kit “Plasmid Midiprep” (Qiagen)

Este protocolo diseñado para purificar más de 100 µg de DNA plasmídico a partir de cultivos de 100 mL de *E. coli* cultivado en LB suplementado con el antibiótico apropiado. El precipitado celular de 100 mL de cultivo se resuspendió en 4 mL de tampón P1 (Qiagen). Se añadieron 4 mL de tampón P2 (Qiagen) y se invirtió el vial de 4-6 veces para mezclar las soluciones y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se añadieron 4 mL de tampón P3 (Qiagen) pre-enfriado y se agitó el tubo de 4-6 veces y se incubó en hielo 15 min. Se centrifugó 30 min a 16000 rpm y se traspasó el sobrenadante a una columna “Qiagen-tip 100” por decantación. Se lavó la columna con tampón QC (Qiagen) con dos lavados de 10 mL. El DNA se eluyó con 5 mL de tampón QF (Qiagen) y se precipitó con 4 mL de isopropanol a temperatura ambiente. Se centrifugó 30 min a 13000 rpm. El precipitado celular obtenido se lavó con etanol 70 %. Se centrifugó por 15 min a 13000 rpm y se dejó secar al aire por 10 min. Finalmente el DNA plasmídico se resuspendió en 150 µL de agua MilliQ.

5.9. Ligación vector-inserto

5.9.1. Ligación de productos de PCR con extremos romos

Las reacciones de ligación en los plásmidos pUC19 y pCR-Blunt II-TOPO se llevaron a cabo para unir moléculas de DNA de extremos romos producidos por la polimerasa Accuzyme DNA Polymerase (Bioline). Para el caso de la ligación empleando el kit de clonación Zero Blunt Topo PCR Cloning (Invitrogen), se mezcló directamente el producto de PCR y el vector pCR-Blunt II-TOPO con agua y sales, tal como indicó el fabricante y se mantuvo la mezcla durante 15 min a temperatura ambiente.

En el caso del vector pUC19, una vez fosforilado el inserto y defosforilado el vector y cuantificadas ambas moléculas, se mezcló en una relación molar de 1:3 (vector:inserto). Así, partiendo de 100 ng de plásmido, la cantidad de inserto se calculó en función de su tamaño y de la relación molar deseada. La reacción de ligación se preparó en frío en un tubo de 0.5 mL y su composición fue calculada para cada tamaño específico de inserto y de vector.

Se empleó para cada reacción de ligación 3 U/µL de T4 DNA ligasa (Promega), 0.6 µL de PEG, para favorecer la ligación de extremos romos y 1 µL de tampón de la ligasa 1X, en un volumen final de 10 µL. La ligación se incubó a 15-16 °C toda la noche.

5.9.2. Ligación de productos de digestión

Los plásmidos pPET21a y pGAPZ α A, así como las secuencias génicas, fueron digeridos con las enzimas de restricción adecuadas para una clonación direccional y fueron purificados ya sea de la propia reacción enzimática o a partir de bandas en geles de agarosa, con el kit “High Pure PCR Product Purification Kit” (Roche Applied Sciences). Se utilizó las condiciones recomendadas por las distintas casas comerciales para cada enzima de restricción. La reacción de ligación se realizó utilizando 100 ng de plásmido, una cantidad equimolar del DNA a ligar, 1 μ L de tampón de ligación (Tris-HCl 200 mM pH 7.6, MgCl₂ 50 mM, DTT 50 mM), 5 U/ μ L de T4 DNA ligasa (Takara) y agua hasta un volumen final de 10 μ L. La reacción se incubó a 16 °C durante la noche o tres horas a temperatura ambiente.

6. CLONACIÓN DE DNA

6.1.1. Clonación de la región interna del gen *zds* de *Ficus carica* en el vector pCR Blunt II TOPO

El producto de PCR obtenido con los cebadores degenerados se clonó en vector pCR Blunt II TOPO, utilizando el kit “Zero Blunt TOPO PCR Cloning” (Invitrogen). Todas las construcciones de DNA fueron verificadas mediante secuenciación. En el caso de este vector, no fue necesaria la fosforilación del inserto ni la defosforilación del vector.

6.1.2. Clonación del extremo 5' y 3' del gen *zds-Fc* en el vector pUC19

El vector pUC19 digerido con la enzima de restricción *Sma*I (Promega) y el inserto también preparado con extremos romos fueron ligados empleando la T4 DNA ligasa (Takara) tal como se indicó en el apartado 5.9.1.

6.1.2.1. Fosforilación del inserto (DNA purificado)

El producto de PCR obtenido con la enzima Accuzyme DNA polimerasa se fosforiló utilizando la enzima T4 Polinucleótido Kinasa (Promega). Se siguió el siguiente procedimiento:

Inserto DNA (250 ng)	Según concentración
Tampón Kinasa 10X	4 ul
ATP 0,1 mM	2 ul
T4 Polinucleotido Kinasa (10-20 U)	2 ul
Agua destilada estéril	Aforar al volumen
Volumen final	40 ul

Se mezcló en un tubo estéril y se incubó por 30 min a 37 °C, para detener la reacción se agregó 2 µL de EDTA 0,5 M y se purificó con el kit comercial “Ilustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification” (GE Healthcare). Finalmente, se utilizó una alícuota 2 µL de la muestra purificada para cuantificar el DNA fosforilado puro en el Nanodrop ND-1000 (BioRad). La muestra se conservó a -20 °C.

6.1.2.2. Digestión y defosforilación del vector

El vector circular pUC19, se digirió con la enzima *SmaI* (Takara) que cortó al vector en un solo punto y dejó extremos romos. Se siguieron las instrucciones del fabricante. La mezcla de digestión se incubó 2 h a 30 °C, en un volumen final de 20 µL. Tras la digestión se purificó el vector lineal desde un gel de agarosa al 1 % con el kit comercial “Ilustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification” (GE Healthcare). El vector lineal purificado se sometió a la defosforilación de sus extremos lo cual evitó su recircularización sin inserto en el proceso de ligación. Se utilizó la enzima Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), (Promega). Se siguió las instrucciones del fabricante: se incubó 1 U de SAP por cada µg de DNA a 37 °C por 15 min en presencia de tampón de reacción 1X (Promega) en un volumen final de 50 µL. Transcurrido el tiempo de incubación, se inactivó la enzima SAP calentando la mezcla de reacción a 65 °C por 15 min. Finalmente, el vector lineal defosforilado, se purificó y se cuantificó con el Nanodrop ND-1000 (BioRad). La muestra se guardó a -20 °C hasta su utilización.

6.1.3. Clonación del cDNA portador de la región codificante correspondiente al gen *zds* de *Ficus carica* en el vector pET21a

Para la clonación del cDNA que contenía la región codificante completa correspondiente al gen *zds-Fc* se utilizó los cebadores específicos ZDS-*EcoRI* F y ZDS-*XhoI* R (Tabla 3), incluyendo el codón de inicio (ATG) y codón de terminación, con las dianas *EcoRI* y *XhoI* en

sus extremos, respectivamente, lo que facilitó la estrategia de clonación direccional. El producto de PCR se digirió con las endonucleasas *EcoRI* y *XhoI* (Takara) y se insertó en los sitios *EcoRI* y *XhoI* del vector pET21a, para convertirse en el vector de expresión pET21-zdsFc (Figura 14). La identidad de la secuencia de DNA de los fragmentos clonados, así como la pauta de lectura se confirmó por secuenciación.

6.2.1. Clonación de la región interna del gen licopeno β -ciclase de *Ficus carica* en vector pCR Blunt II TOPO

El producto de PCR obtenido se clonó en el vector pCR Blunt II TOPO, utilizando el kit “Zero Blunt TOPO PCR Cloning” tal como se indicó en el apartado 6.1.1.

6.2.2. Clonación del extremo 5' y 3' del gen β -lcy-Fc en el vector pUC19

La clonación del extremo 5' y 3' del gen β -lcy-Fc en el vector pUC19 se realizó de la misma forma que se indicó en el apartado 6.1.2.

6.1.3.1. Fosforilación del inserto (DNA purificado)

La fosforilación del inserto se llevó a cabo de la misma forma descrita en la sección 6.1.2.1.

6.1.3.2. Digestión y defosforilación del vector

La digestión y defosforilación del vector pUC19 se realizó de la misma forma descrita en la sección 6.1.2.2.

6.2.3. Clonación del cDNA portador de la región codificante correspondiente al gen β -lcy de *Ficus carica* en el vector pET21a

Para la clonación del cDNA que contenía la región codificante completa correspondiente al gen β -lcy-Fc se utilizó los cebadores específicos LCY- β *NdeI* F y LCY- β *SacI* R (Tabla 3), incluyendo el codón de inicio (ATG) y codón de terminación, con las dianas *NdeI* y *SacI* en sus extremos, respectivamente, lo que facilitó la estrategia de clonación direccional.

El producto de PCR se digirió con las endonucleasas *NdeI* y *SacI* (Takara y Promega, respectivamente) y fue insertado en los sitios *NdeI* y *SacI* del vector pET21a, para convertirse en el vector de expresión pET21-lyc β (Figura 15). La identidad de la secuencia de DNA de los fragmentos clonados, así como la pauta de lectura se confirmó por secuenciación.

6.3. Clonación de los genes de carotenogénesis en el vector pGAPZ α A

El DNA codificante para *crtE* amplificado con los cebadores específicos (Tabla 4), se digirió con las enzimas de restricción *SfuI* y *EcoRI* (New England BioLabs y Takara, respectivamente). El fragmento purificado se insertó en los sitios *SfuI* y *EcoRI* del plásmido pGAPZ α A. Se utilizó los mismos sitios para clonar los DNAs de los genes *crtB* y *crtI** en el plásmido pGAPZ α A* (Figura 23). El DNA codificante para *crtL** fue digerido, purificado y clonado direccionalmente en los sitios *SfuI* y *XbaI* del vector pGAPZ α A* (Figura 23). Los vectores de expresión resultantes fueron denominados como pGAPZA-E, pGAPZA*-B, pGAPZA*-I* y pGAPZA*-L*, respectivamente, todos ellos desprovistos del factor α del plásmido pGAPZ α A. En general la estrategia de clonación elegida se basó en preparar los fragmentos a unir con enzimas de restricción que reconocían diferentes dianas, pero producían regiones protuberantes idénticas; este fue el caso, de las endonucleasas *BamHI* y *BglII* (Takara), que reconocían, respectivamente, los sitios GGATCC y AGATCT, rompiendo el enlace entre la primera y la segunda base y produciendo, ambas, la misma secuencia monocatenaria GATC en el terminal 5'; se trata de dos endonucleasas diferentes que dan lugar a extremos compatibles. Además, es importante señalar que la unión de los fragmentos con extremos compatibles formados de esta manera, dan lugar a moléculas de DNA en las que se perdió la diana *BglII* usada para la preparación de los fragmentos de partida, recuperándose sólo la diana para *BamHI*. De esta manera, el fragmento de DNA comprendido entre los sitios *BamHI*–*BglII* del vector pGAPZA*-B se subclonó en el sitio *BamHI* del plásmido pGAPZA-E y generó el plásmido pGAPZA-EB (Figura 23). De forma similar, el fragmento entre las dianas *BamHI*–*BglII* del plásmido pGAPZA*-I* se subclonó en el sitio *BamHI* del plásmido pGAPZA-EB y generó el nuevo plásmido recombinante con la ruta de biosíntesis de licopeno pGAPZA-EBI* (Figura 23). Finalmente, el fragmento comprendido entre los sitios *BamHI*–*BglII* del plásmido pGAPZA*-L* se subclonó en el sitio *BamHI* del plásmido pGAPZA-EBI* y generó el plásmido recombinante con la ruta de biosíntesis de β -caroteno, pGAPZA-EBI*L* (Figura 23).

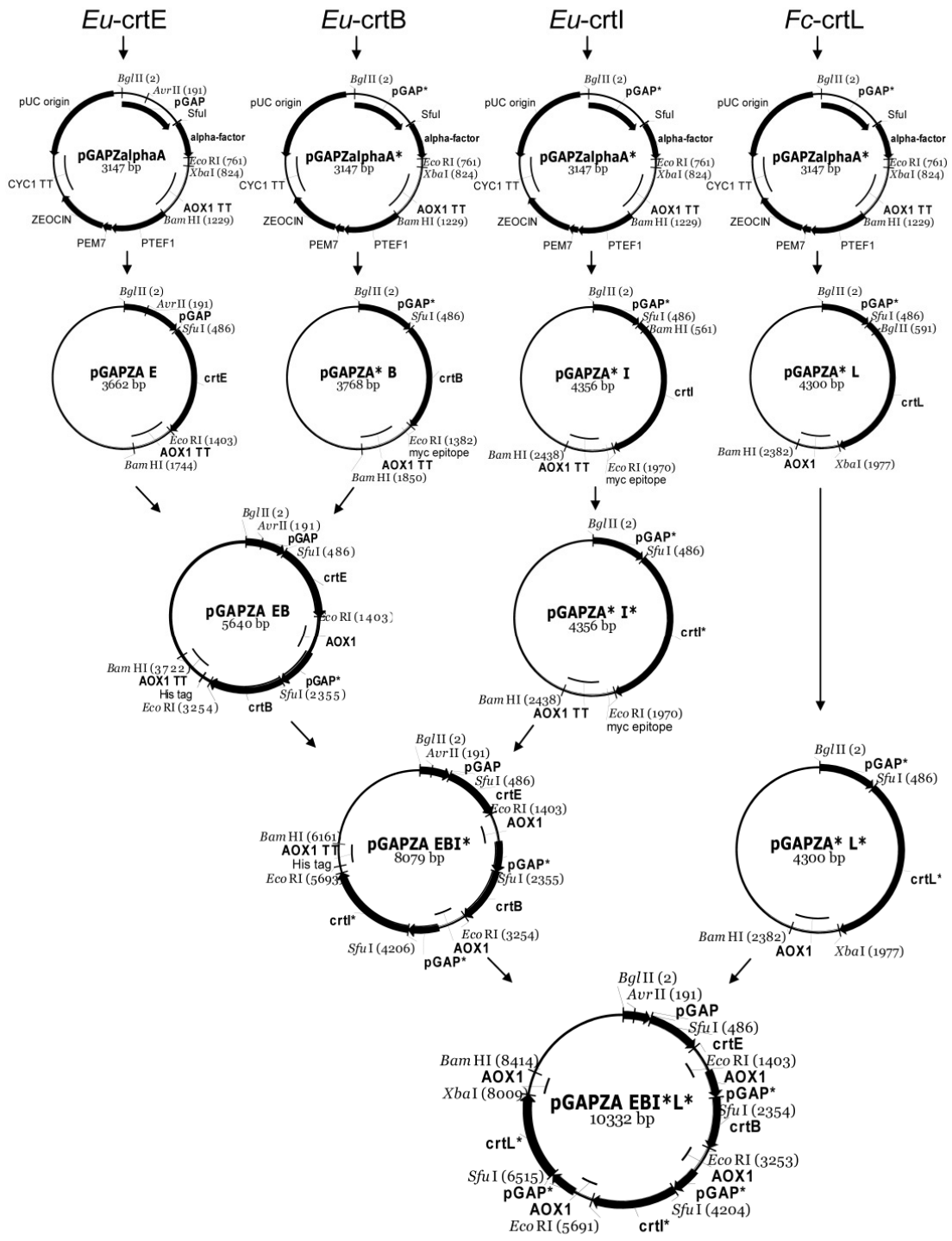


Figura 23. Diseño y construcción de los plásmidos pGAPZA-EBI* y pGAPZA-EBI*L*.

Por otro lado, pero siguiendo la misma estrategia anterior, el DNA codificante para el gen *crtW* se digirió con las enzimas de restricción *SfiI* y *EcoRI*, se purificó y se clonó en los sitios *SfiI* y *EcoRI* del plásmido pGAPZ α A. Los mismos sitios fueron utilizados para clonar la secuencia del gen *crtZ* en el plásmido pGAPZ α A* (Figura 24). Los vectores de expresión resultantes fueron denominados pGAPZA-W y pGAPZA*-Z, respectivamente, ambos desprovistos del factor α del plásmido pGAPZ α A (Figura 24).

Finalmente, el fragmento de DNA comprendido entre los sitios *BamHI*–*BglIII* del vector pGAPZA*-Z se subclonó en el sitio *BamHI* del plásmido pGAPZA-W y generó el plásmido pGAPZA-WZ (Figura 24).

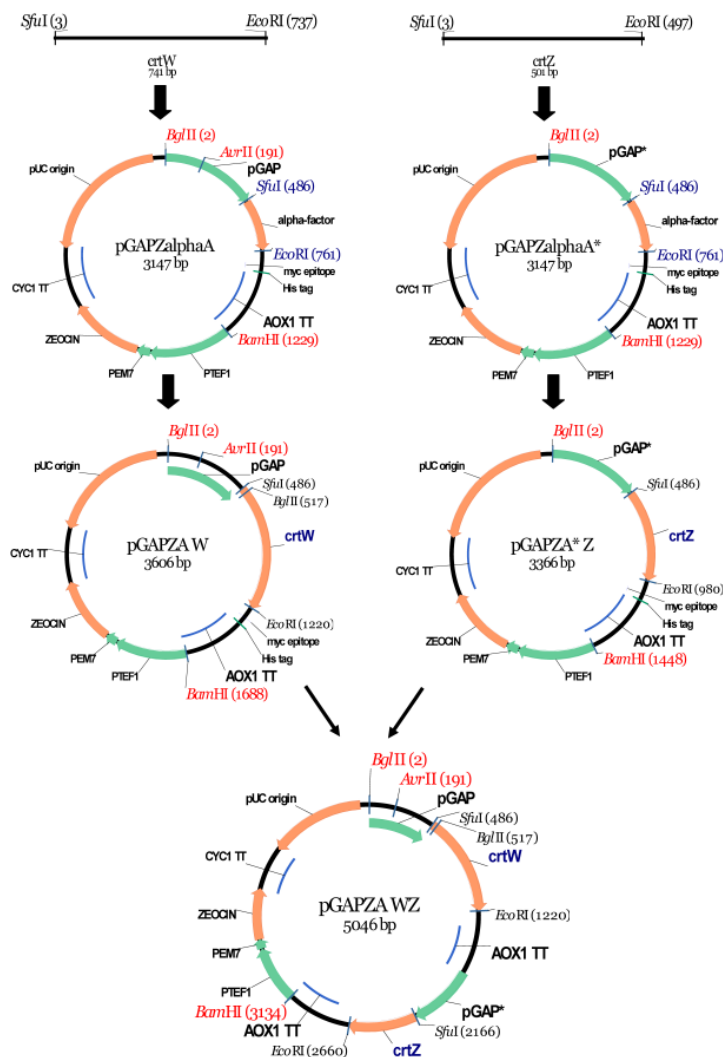


Figura 24. Diseño y construcción del vector de expresión pGAPZA-WZ

7. TÉCNICAS DE TRANSFORMACIÓN

7.1. Transformación de *Escherichia coli*

7.1.1. Células quimiocompetentes de *Escherichia coli*, método de Cl₂Rb

Para la preparación de células quimiocompetentes de *E. coli* (cepas comerciales), se utilizó el método de Cl₂Rb. Se inoculó un matraz de LB con *E. coli* y se cultivó toda la noche a 37 °C hasta que alcanzó la fase estacionaria. Al día siguiente, se transfirió 2 mL de este cultivo a un matraz con 100 mL de LB. Se cultivó durante 2-3 h a 37 °C y 200 rpm hasta que la D.O. a 550 nm alcanzó un valor de 0.3 - 0.4. El cultivo se enfrió 5 min en hielo. Se centrifugó a 8000 rpm a 4 °C. El sedimento se resuspendió en 30 mL de TfbI estéril frío. Se centrifugó a 8000 rpm a 4 °C durante 10 min. El concentrado celular se resuspendió en 4 mL de TfbII estéril. Finalmente, se repartió la suspensión en viales estériles con alícuotas de 100 µL cada uno. Cada tubo se congeló inmediatamente con N₂ líquido y fueron conservados a - 80 °C.

Para la preparación de células quimiocompetentes de las cepas de *E. coli* BL-EBP, BL-EBR, BL-EBI y BL-EBIL se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito.

A continuación se describen las soluciones empleadas:

TfbI

1.47 g de CH₃COOK

4.95 g de MnCl₂

6.05 g de Cl₂Rb

0.74 g de CaCl₂.6.H₂O

75 mL de glicerol

Se ajustó el pH a 5.8 con ácido acético glacial 0.2 M, se filtró a través de membranas de 0.22 µm y se guardó a 4 °C.

TfbII

10 mL de MOPS 100 mM, pH 7

1.6 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0.12 g de Cl_2Rb

18 mL de glicerol

Se filtró a través de membranas de 0.22 μm y se guardó a 4 °C en oscuridad.

MOPS (100 mM, pH 7)

2.09 g de MOPS

0.34 g de CH_3COONa

0.18 g de EDTA

Se ajustó el pH a 7, se enrasó hasta 100 mL con agua destilada y se filtró a través de membranas de 0.22 μm .

7.1.2. Células electrocompetentes de *Escherichia coli*

A partir de un cultivo de *E. coli* (cepa comercial) se sembró mediante triple estría una placa con medio LB-agar y se incubó a 37 °C durante la noche. Una colonia aislada procedente de la placa se inoculó en 20 mL de medio LB y se cultivó durante la noche a 37 °C con agitación 180 rpm. Al día siguiente 5 mL del pre-inóculo se añadió a un matraz de 1 L que contenía 500 mL de medio LB y se incubó a 37 °C en agitación hasta que alcanzó la fase exponencial. A partir de este punto todas las manipulaciones fueron realizadas en frío. Las células fueron centrifugadas 10 min a 1500 g, se descartó el sobrenadante y se lavó las células 2 veces con 400 mL de agua destilada enfriada a 4 °C, se centrifugó cada vez 10 min a 1500 g. A continuación se resuspendió en 10 mL de glicerol 10 % (4 °C) y se centrifugó 10 min a 1500 g. Finalmente, se resuspendió las células en 1 mL de glicerol 10 % (4 °C) y se distribuyó en alícuotas de 40 μL en tubos Eppendorf estériles. Los tubos se congelaron inmediatamente en N_2 líquido y se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su transformación.

7.1.3. Transformación de *Escherichia coli* por shok térmico

La transformación se llevó a cabo añadiendo la mezcla de la ligación (10 μ L) o el plásmido recombinante (100 ng en un volumen máximo de 10 μ L) a 100 μ L de las células quimiocompetentes e incubando la mezcla durante 30 min en hielo. Después se dió un choque de calor a 42 °C durante 45 s y se dejó enfriar en hielo por 2 min, luego se añadió 250 μ L de medio LB o SOC y se incubó durante 1 h a 37 °C con agitación (180 rpm). Finalmente las células se sembraron en placas Petri con medio LB-agar.

En los casos en que el plásmido utilizado contenía el gen *lacZ* para la α complementación, se añadió a las placas X-Gal (1 μ L/mL de una solución de 20 mg/mL en formamida) y el inductor IPTG, además del antibiótico adecuado. Para las transformaciones con el vector pET21a, no se agregó X-Gal y para las co-transformaciones con dos plásmidos o tres, las placas se suplementaron con ampicilina (50 μ g/mL) y cloranfenicol (34 μ g/mL). Para la expresión de carotenoides en *E coli* recombinantes los cultivos se incubaron por 48 h a 28 °C y en oscuridad.

7.1.4. Transformación de *Escherichia coli* por electroporación

A una alícuota de 40 μ L de células electrocompetentes descongelada en hielo se añadió el vector transformante (2 μ L de la ligación ó entre 50 y 100 ng de DNA plasmídico purificado, en un volumen máximo de 10 μ L). Esta mezcla se introdujo en una cubeta de 2 mm de separación de electrodos (BioRad) pre enfriada en hielo y se incubó 5 min. Posteriormente la cubeta se insertó en un aparato Bio-Rad Micropulser (BioRad) y fue sometida a un pulso eléctrico.

Las condiciones de electroporación utilizadas fueron: 125 μ F de conductancia, 200 Ω de resistencia y un voltaje de 2500 V. Tras el pulso eléctrico se añadió inmediatamente a la cubeta 1 mL de medio SOC a temperatura ambiente, se resuspendió las células transformadas y se transfirió a un tubo Eppendorf estéril, donde se incubó a 37 °C con agitación durante 1 h.

Finalmente, las células fueron sembradas en placas Petri con medio LB-agar que contenía X-Gal (1 μ L/mL de una solución de 20 mg/mL en formamida) y suplementado con ampicilina (50 μ g/mL).

7.2. Transformación de *Pichia pastoris*

Las células de *P. pastoris* X33 fueron crecidas en 5 mL de medio YPD a 30°C, con agitación rotatoria a 200 rpm toda la noche. Este cultivo se utilizó para inocular 500 mL de medio YPD que se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. El cultivo se centrifugó a 1500 g por 5 min a 4 °C se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 500 mL de agua esteril a 4 °C. Después se centrifugó por segunda vez y se resuspendió en 20 mL de sorbitol 1M frío (4 °C), se centrifugó por tercera vez y finalmente se resuspendió en 1 mL de sorbitol 1 M frío. Se conservó las células en hielo hasta su transformación.

Por otro lado, el plásmido recombinante pGAPZA-EBI* se linealizó con la enzima de restricción *AvrII* (New England BioLabs) y posteriormente se purificó y resuspendió en un volumen de 10 µL de agua MilliQ a una concentración final de 1000 ng/µL.

P. pastoris X33 se transformó con éste vector de expresión mediante electroporación. Se utilizó el electroporador Bio-Rad Micropulser (BioRad). Para esto, se mezcló 80 µL de células electrocompetentes con los 10 µL del vector lineal en una cubeta de electroporación de 0.2 cm (BioRad), se incubó en hielo 5 min y luego se aplicó un pulso de 1500 V, 200 Ω y 25 µF. Tras el cual se agregó inmediatamente 1 mL de sorbitol 1 M frío. El contenido de la cubeta se traspasó a un tubo falcon de 15 mL estéril y se incubó por 2 h a 30 °C sin agitación.

Las colonias transformantes, nombradas como Pp-EBI, fueron seleccionadas en placas con medio YPDS suplementado con Zeocina (100 µg/mL), (Invitrogen). Se incubó las placas a 30 °C hasta que las colonias fueron visibles (48–72 h), luego se incubó por 48-72 h a temperatura ambiente hasta que su coloración fue evidente.

Por su parte, el plásmido pGAPZA-EBI*L* se linealizó con la enzima *AvrII* y se integró en el DNA genómico de *P. pastoris* X-33 siguiendo el mismo procedimiento anterior. Las levaduras transformantes obtenidas fueron nombradas como Pp-EBIL.

Finalmente, el plásmido pGAPZA-WZ se linealizó con la enzima *AvrII*, pero se integró en el DNA genómico de la cepa recombinante de *P. pastoris* productora de β-caroteno (Pp-EBIL), siguiendo el mismo procedimiento anterior. La cepa recombinante obtenida de esta nueva integración se nombró como Pp-EBILWZ.

La integración de todos los genes heterólogos en el DNA genómico de las diferentes cepas de *P. pastoris* se comprobó por PCR, utilizando los cebadores específicos de cada gen y como molde el DNA genómico de cada clon seleccionado.

8. CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES

8.1.1. Determinación de la actividad ζ -caroteno desaturasa de la enzima ZDS

La actividad desaturasa de la enzima se determinó por ensayos de complementación heteróloga en las cepas recombinantes de *E. coli* BL-EBP y BL-EBR (Tabla 1). Estas cepas presentaron una coloración amarillo claro y amarillo oscuro, debido a la acumulación de ζ -caroteno y neurosporeno, respectivamente. Tanto *E. coli* BL-EBP como BL-EBR fueron co-transformadas con el plásmido pET21-zdsFc, lo cual generó las cepas *E. coli* BL-EBPZ y *E. coli* BL-EBRZ, respectivamente (Tabla 1).

Las células transformadas fueron seleccionadas en placas de LB suplementadas con los antibióticos cloranfenicol (34 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Además, las placas contenían 10 μL de una solución 100 mM de IPTG, el cual se añadió a las placas una hora antes de sembrar las células. Se incubó las células a 28 °C por 48 h en oscuridad y la actividad enzimática sobre los sustratos zeta-caroteno y neurosporeno se identificó por el cambio de color en las colonias recombinantes y se confirmó por análisis HPLC-PDA. Como control negativo se utilizó la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con el plásmido pET21a sin inserto y que no codifica ninguna proteína, mientras que como control positivo se utilizó las cepas de *E. coli* BL-EBP productora de zeta caroteno, la cepa BL-EBR productora de neurosporeno y la cepa recombinante BL-EBI productora de licopeno (Tabla 1).

8.1.2. Determinación de la actividad licopeno β -ciclase de la enzima β -LCY

La actividad enzimática LCY se determinó por ensayos de complementación heteróloga. Este tipo de ensayos, utilizados con éxito en otros trabajos (Cunningham *et al.*, 1993; Huguene *et al.*, 1995; Pecker *et al.*, 1996), se basó en las diferencias de coloración entre los distintos carotenoides, así el licopeno (sustrato de las LCYs) es rojo mientras que el β -caroteno (producto de la β -LCY) es naranja. La cepa BL-EBI se co-transformó con el plásmido pET21-lyc β y generó la cepa de *E. coli* BL-EBIL (Tabla 1). Las células transformadas fueron sembradas en placas de LB suplementadas con los antibióticos cloranfenicol (34 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Además las placas contenían 10 μL de una solución 100 mM de IPTG, el cual se añadió a las placas una hora antes de sembrar las células. Las células fueron incubadas a 28 °C por 48 h en oscuridad. Transcurrida la incubación, la actividad ciclase de la

enzima sobre el licopeno se identificó por el cambio de color en las colonias recombinantes (lo que permitió un rápido escrutinio visual de las colonias portadoras de genes que codifican proteínas funcionales). Como control negativo se utilizó la cepa *E. coli* BL21 (DE3) transformada con el plásmido pET21a sin inserto y que no codificaba ninguna proteína y la cepa recombinante BL-EBI productora de licopeno (Tabla 1).

8.1.3. Determinación de la actividad β -caroteno ketolasa y β -caroteno hidroxilasa en *Escherichia coli*

La actividad β -caroteno ketolasa y β -caroteno hidroxilasa de los genes *crtW* y *crtZ* contenidos en el vector pAK96K se determinó por ensayos de complementación heteróloga mediante la utilización de la cepa recombinante BL-EBIL (Tabla 1). La cepa BL-EBIL se co-transformó con el plásmido pAK96K y generó la cepa de *E. coli* BL-EBILWZ (Tabla 1).

Las células transformadas fueron sembradas en placas de LB suplementadas con los antibióticos cloranfenicol (34 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Además las placas contenían 10 μL de una solución 100 mM de IPTG, el cual se añadió a las placas una hora antes de sembrar las células. Se incubó las células a 28 °C por 48 h en oscuridad. Transcurrida la incubación, la actividad hidroxilasa y ketolasa de las enzimas sobre el β -caroteno se identificó por el cambio de color en las colonias recombinantes y se confirmó por análisis HPLC-PDA. Como control negativo se utilizó la cepa BL-EBIL productora de β -caroteno.

8.1.4. Determinación de la expresión de carotenoides en transformantes de *Pichia pastoris*

La actividad de las enzimas carotenogénicas en las cepas recombinantes Pp-EBI, Pp-EBIL y Pp-EBILWZ, se identificó por el cambio de color en las colonias recombinantes obtenidas de cada transformación y se confirmó por análisis HPLC-PDA. Como control negativo se utilizó la cepa de *P. pastoris* X33. Las colonias seleccionadas visualmente fueron cultivadas por 72 h a 30 °C con agitación rotatoria a 200 rpm, en 100 mL de medio YPD suplementado con 100 o 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Zeocina (Invitrogen). Se lavó los cultivos celulares con agua destilada y se centrifugó a 3000 rpm, por 15 min, a 4 °C. En cada caso se descartó la fase superior y el sedimento celular se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se liofilizó por 48 h a 0.1 mbar, a -50 °C (Telstar, Cryodos Lyophilizer).

9. ANÁLISIS DE PIGMENTOS

9.1. Extracción de carotenoides desde cultivos bacterianos

Las colonias aisladas de las diferentes cepas de *E. coli* productoras de carotenoides fueron sembradas en triple estría en medio LB-agar suplementado con 1 mM IPTG, ampicilina (50 µg/mL) y cloranfenicol (34 µg/mL) y se incubó a 28 °C en oscuridad durante 48 h.

Dos colonias aisladas de cada siembra fueron inoculadas en 5 mL de LB suplementado con 1 mM IPTG, ampicilina (50 µg/mL) y cloranfenicol (34 µg/mL) y se incubó durante 12 h a 37 °C con agitación (200 rpm). Diez µL de este precultivo se utilizó para inocular 20 mL de LB suplementado con 1 mM IPTG, ampicilina (50 µg/mL) y cloranfenicol (34 µg/mL). Este cultivo se incubó a 28 °C en oscuridad y con agitación (200 rpm) durante 48 h.

Una alícuota de 10 mL de este cultivo se centrifugó 5 min a 4000 g y el sedimento bacteriano se lavó dos veces con agua destilada. A continuación, el sedimento se resuspendió en 3 mL de acetona (Sigma) y se homogenizó con el vortex (10 min a 4 °C), luego se centrifugó a 13000 g durante 2 min a 4 °C. El sobrenadante se recuperó en un tubo falcon de 15 mL limpio, se secó en corriente de N₂ y el extracto se almacenó a -80 °C hasta día de su análisis por HPLC.

Para la extracción de carotenoides desde la cepa BL-EBILWZ el sedimento bacteriano se resuspendió en 3 mL de acetona (Sigma-Aldrich) y se homogenizó con el vortex (10 min a 4 °C) y luego el extracto en solución se combinó con 5 mL de hexano y 1 mL de fosfato potásico 0.1 mM. Esta mezcla se agitó con vortex para homogenizar y se centrifugó a 4500 rpm por 10 min para separar las fases. Se transfirió la fase superior que contenía los carotenoides a un nuevo tubo. Esta extracción se repitió hasta que el residuo celular quedó incoloro.

El extracto final en solución, se evaporó bajo corriente de N₂ y se conservó a -80 °C hasta su análisis por HPLC. Todas las manipulaciones fueron realizadas en frío y con luz baja, para prevenir la fotodegradación, isomerización u otros cambios estructurales en los carotenoides.

9.2. Extracción de carotenoides desde cepas transformantes de *Pichia pastoris*

Con el fin de maximizar la recuperación de carotenoides desde las cepas recombinantes de *P. pastoris*, se compararon varios métodos de ruptura celular:

- Tratamiento 1; Perlas de vidrio y agitación en vortex: A un tubo Falcon que contenía 50 mg de biomasa celular liofilizada se le agregó 0.2 g de perlas de vidrio (0.45 mm de diámetro) y 10 mL de acetona y se agitó en vortex por 10 min.
- Tratamiento 2; Ultrasonido: 50 mg de células liofilizadas disueltas en 10 mL de acetona fueron puestas en un baño con ultrasonido (Ultrasons 250, Selecta S.A.). Se realizó cuatro ciclos de sonicación de 40 W RMS, 20 kHz, 10 min, (Medeiros *et al.*, 2008).
- Tratamiento 3; Dimetil sulfoxido (DMSO): 50 mg de células liofilizadas fueron incubadas en 3 mL de DMSO (pre calentado a 55 °C) por 30 min, luego se agitó intensamente en vortex por 1 min y se dejó en reposo por 30 min. (Dos Santos da Fonseca *et al.*, 2011).
- Tratamiento 4; Mixto: 50 mg de células liofilizadas fueron incubadas en 3 mL de DMSO (pre calentado a 55 °C) por 30 min, luego se agitó con perlas de vidrio de 0.45 mm en un homogenizador Braun (MSK) en 6 ciclos de 30 s cada uno, se enfrió con CO₂ durante 1 min entre ciclos. Luego se dejó en reposo por 30 min y se sónico en un baño con hielo por 10 min.

Para todos los tratamientos de ruptura, la extracción de carotenos se realizó según lo descrito por (Bhataya *et al.*, 2009), con algunas modificaciones. A la suspensión celular de cada tratamiento se le añadió 10 mL de acetona y se sometió a vortex intenso por 5 min a 4 °C. Los extractos fueron luego combinados y particionados agregando un volumen de 10 % dietil éter, en éter de petróleo para facilitar la separación y remover la acetona disuelta, además se agregó a la mezcla, 1 mL de agua destilada y se agitó con vortex por 30 s seguido de centrifugación a 3000 g por 10 min. Se transfirió la fase superior que contenía los carotenoides a un nuevo tubo. Esta extracción se repitió hasta que el residuo celular quedó incoloro.

El extracto final en solución, se evaporó bajo corriente de N₂ y se conservó a -80 °C hasta su análisis por HPLC.

Para la extracción de xantofilas se utilizó un procedimiento mixto que incluyó la incubación con DMSO (previamente calentado a 55 °C) por 30 min y luego una fuerte agitación en presencia de perlas de vidrio de 0.45 mm, se empleó un homogenizador Braun (MSK), por 6 ciclos de 30 s cada uno, se enfrió con CO₂ durante 1 min entre ciclos. Posteriormente se mantuvo en reposo por 30 min. A esta suspensión celular se le agregaron 10 mL de acetona y se agitó con vortex por 5 min a 4 °C. Los extractos fueron entonces combinados con 5 mL de hexano y 1 mL de fosfato potásico 0.1 mM. Esta mezcla se agitó con vortex para homogenizar y se centrifugó a 4500 rpm por 10 min para separar las fases. Se transfirió la fase

superior que contenía los carotenoides a un nuevo tubo. Esta extracción se repitió hasta que el residuo celular quedó incoloro. El extracto final en solución, se evaporó bajo corriente de N₂ y se conservó a -80 °C hasta su análisis por HPLC. Todos los tratamientos y manipulaciones anteriores, fueron realizados en frío y en condiciones de baja luz para prevenir la fotodegradación, isomerización y cambios estructurales de los carotenoides.

9.3. Identificación y cuantificación de carotenoides mediante HPLC

Para el análisis por HPLC, se resuspendió las muestras secas en 2 mL de cloroformo:metanol:acetona (3:2:1, v/v) (pureza HPLC, Carlo Erba) y se filtró a través de filtros de policarbonato de 0.22 µm. La identificación y cuantificación de los carotenoides individuales se realizó por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector de fotodiodos (HPLC-PDA). La cromatografía se llevó a cabo en un sistema de cromatografía líquida Waters, se utilizó una columna C30 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) (YMC Europa GMBH). Los datos se adquirieron y procesaron con el paquete informático Empower2 (Waters). El volumen de muestra inyectada fue de 20 µL, el flujo de inyección en la columna se mantuvo a 1 mL/min y la temperatura de la columna se fijó a 25 °C.

Para la separación de los carotenoides se utilizó el gradiente ternario de elución de metanol (MeOH), agua (H₂O) y metil *tert*-butil éter (MTBE) que se detalla en la tabla 7.

Tabla 7. Gradiente de elución utilizado para la separación de carotenoides mediante HPLC. Los cambios de gradiente se realizaron de forma lineal.

Tiempo (min)	0	12	20	30	50	70	75
MTBE (Metil <i>tert</i> -butil éter)	5	5	14	25	50	75	5
H ₂ O (Agua)	5	0	0	0	0	0	5
MeOH (Metanol)	90	95	86	75	50	25	90

El detector de fotodiodos se programó para registrar las absorbancias cada 1 nm desde 250 nm hasta 600 nm a lo largo de toda la elución. Para cada muestra se obtuvo un cromatograma MaxPlot, en el que se presentó el tiempo frente a la absorbancia máxima en el rango de longitudes de onda registradas.

Los carotenoides fueron identificados por comparación del espectro y del tiempo de retención con los estándares disponibles o con los datos de espectros y tiempos de retención obtenidos en condiciones cromatográficas similares disponibles en la literatura (Rouseff *et al.*, 1996; Meléndez Martínez *et al.*, 2003; Rodrigo *et al.*, 2003; Rodrigo *et al.*, 2004) y para el caso de ζ -caroteno y neurosporeno, se utilizó los pigmentos extraídos desde las cepas recombinantes control (BL-EBP y BL-EBR), respectivamente.

En los cromatogramas MaxPlot los picos cromatográficos correspondientes a cada carotenoide fueron integrados en su λ máxima y su contenido se calculó utilizando una curva de calibrado comparada con las áreas de cada pico obtenidas en los cromatogramas. Se realizó una curva de calibrado o recta patrón para el β -caroteno (Sigma-Aldrich).

10. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE ACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Para inducir la expresión de proteínas heterólogas, se creció las cepas recombinantes de *E coli* BL21 (DE3) conteniendo los plásmidos pET21a, pET21-zds y pET21-lcy β en tubos con 5 mL de medio LB a 37 °C con agitación (180 rpm) toda la noche, luego se inoculó un matraz con 100 mL de LB suplementado con ampicilina (50 μ g/mL) con 2 mL de este precultivo. Se incubó a 37 °C hasta que alcanzó la fase exponencial de crecimiento (aproximadamente 3 h).

Se transfirió la mitad del volumen a otro matraz y se indujo el cultivo añadiendo IPTG a una concentración de 1 mM a uno de ellos y se continuó incubando ambos matraces por 4 h siguiendo las recomendaciones del manual del sistema pET21a (Novagen). Una vez transcurridas las 4 h se enfrió los matraces en hielo durante 5 min y se centrifugó el cultivo durante 5 min a 5000 g, a 4 °C.

El precipitado celular del cultivo se resuspendió en 0.25 del volumen total del cultivo con 20 mM Tris HCl pH 8 para lavar las células, luego se distribuyó el contenido en alícuotas de 1 mL; se centrifugó y se eliminó el sobrenadante de cada tubo. Finalmente, se congeló los tubos a -80 °C hasta su análisis.

Para romper las células y acceder al citoplasma se siguió un procedimiento mecánico utilizando un sonicador Sonifier II W 450 (Branson) y uno enzimático utilizando lisozima de huevo blanco de gallina (Fluka) o Benzonaza (Sigma-Aldrich).

Sonicación: El precipitado celular de los cultivos se resuspendió en un tampón de lisis (50mM Tris HCl pH 7.5, 125 mM NaCl, 5 mM DTT) frío y se enfrió la suspensión celular en hielo durante 10 min. Se sometió la suspensión celular a 10 pulsos de 10 s con intervalos de 30 s en hielo. La suspensión celular sonicada se centrifugó a velocidad máxima para precipitar los restos celulares.

Lisozima: Se resuspendió suavemente a temperatura ambiente el precipitado celular de los cultivos en tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl y 5 % Glicerol). Aproximadamente 7 mL de tampón por cada gramo de precipitado celular. A esta suspensión celular se le añadió 7.5 KU de lisozima (Takara) por mL de tampón de lisis. Se incubó en agitación a temperatura ambiente durante 20 min y se centrifugó a velocidad máxima para eliminar los restos celulares.

La electroforesis de proteínas en geles de acrilamida se realizó siguiendo la técnica descritas por Laemmli, (1970) utilizando una cubeta de electroforesis Mini Protean II (BioRad). El gel de resolución se preparó empleando un stock de acrilamida al 29 % y N,N'-methylenebisacrilamida al 1 %. Según la concentración de poliacrilamida deseada (Sambrook *et al.*, 1989) se mezcló en el gel de resolución, distintos volúmenes de esta solución, previamente desgaseada con 2.5 mL de Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8 y 100 μ L de SDS 10 g/L, para un volumen final de 10 mL. Antes de echar la mezcla en el formador de geles, se añadió 50 μ L de persulfato amónico 10 g/L preparado en el momento y 5 μ L TEMED (BioRad) para forzar la polimerización. Las muestras se prepararon en condiciones desnaturalizantes agregando a cada muestra 100 μ L de tampón fosfato salino (PBS) (NaCl 8g/L; KCl 0.2 g/L; Na₂HPO₄ 1.44 g/L; KH₂PO₄ 0.24 g/L) y 100 μ L de tampón 4X SDS (DTT 0.3 M; 1 mL de una solución de azul de bromofenol 10 g/L; Tris-HCl 50 mM, pH 6.8; SDS 20 g/L y glicerol al 10 % y), luego fueron solubilizadas calentando las muestras a 85 °C por 3 min. Inmediatamente se cargó 10 μ L de muestra en un gel de poliacrilamida preparado al 12 %. El gel se sometió a 120 V durante 1 h, se utilizó el tampón de electroforesis Tris-Glicina (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS, pH: 8.3). Para revelar las bandas se tiñó el gel con azul de Coomassie R-250 (BioRad) al 0.005 % disuelto en metanol al 40 % y ácido acético al 10 %, durante media hora. Se lavó con la misma solución sin colorante y se destiñó el gel con ácido acético al 10 % durante 12-16 h. El peso molecular de la proteína se estimó por comparación con el patrón de migración de las bandas del marcador de pesos moleculares Precision Plus Protein Standard (BioRad) utilizando el software Quantity One (BioRad).

11. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

11.1. Árboles filogenéticos

Las distancias evolutivas, en unidades de número de sustituciones por sitio, fueron estimadas usando el modelo más adecuado para las secuencias de los genes, zeta-caroteno desaturasa (*zds-Fc*) y licopeno beta-ciclasa (*β-lcy-Fc*) de *F. carica*.

Los modelos más adecuados fueron elegidos según su valor de BIC (Bayesian Information Criterion) utilizando el programa MEGA versión 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Los árboles filogenéticos fueron reconstruidos usando el modelo neighbor-joining (NJ) (Saitou and Nei, 1987). La fiabilidad de cada método fue estimada por los valores de BCL (Bootstrap confidence limits) (Saitou y Nei, 1987), la variación en la tasa de sustitución entre sitio y sitio se aproximó de acuerdo a la distribución gamma de cada modelo, y fueron obtenidas 1000 réplicas de árboles para llevar a cabo el test de “bootstrapping” de cada secuencia (Felsenstein, 1985).

Para el análisis de las secuencias de aminoácidos de los genes *zds-Fc* y *β-lcy-Fc* las distancias evolutivas fueron estimadas usando el modelo Jones-Taylor-Thornton (Nei y Kumar, 2000), con una distribución Gamma (G= 5).

Para el análisis filogenético sobre las secuencias nucleotídicas, se utilizó para *zds-Fc* el método Tamura 3-parameter con una distribución Gamma (G= 5) y para *β-lcy-Fc* el método Kimura 2-parameter con una distribución Gamma (G= 5).

Tanto la secuencia nucleotídica como aminoacídica de ZDS de *F. carica* se comparó con otras 22 secuencias homólogas de plantas, extraídas de la base de datos del GenBank y que codifican para zeta-caroteno desaturasa. De la misma manera, la secuencia nucleotídica y aminoacídica de β -LCY de *F. carica* se comparó con otras 19 secuencias homólogas de plantas, extraídas de la base de datos del GenBank y que codifican para licopeno beta-ciclasa.

En cada árbol filogenético se incluyó el gen zeta-caroteno desaturasa y licopeno beta-ciclasa de la microalga *D. salina* control externo.

11.2. Bioinformática

El software Vector NTI Advance 11 (Invitrogen) y el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.0.5.3, fueron utilizados tanto para el análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas, como para el alineamiento de las secuencias.

Primer premiere 5.0, se utilizó para el diseño de oligonucleótidos.

NCBI (National Center for Biotechnology Information), la base de datos del NCBI se utilizó para la búsqueda de secuencias en su base de datos. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

BlastN (Zhang *et al.*, 2000) y BlastP (Altschul *et al.*, 1997) (Standard protein-protein Basic Local Alignment Search Tool, NCBI), fueron utilizadas para la comparación de secuencias con aquellas depositadas en la base de datos. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

ChloroP 1.1 Prediction Server (Emanuelsson *et al.*, 1999) y TargetP 1.1 Server (Nielsen *et al.*, 1997; Emanuelsson *et al.*, 2000), fueron utilizados para la predicción de secuencias de localización en cloroplasto y punto de corte. <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP>

ProDom (Bru *et al.*, 2005), se utilizó para el reconocimiento de motivos en secuencias proteicas. <http://prodom.prabi.fr/prodom/current/html/home.php>

Chromas Pro 1.41 (Technelysium Pty. Ltd), se utilizó para el análisis de los cromatogramas de las secuencias.

Empower 2 (Waters), este programa se utilizó para adquisición y tratamiento de datos cromatográficos.

PSIpred (Jones, 1999), este programa se utilizó para la predicción del perfil de hidrofobicidad y de la estructura secundaria de secuencias proteicas. <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>

MEGA versión 5.0 (Tamura *et al.*, 2011), este programa se utilizó para la construcción de árboles filogenéticos.

PSORT (Nakai y Horton, 1999), programa utilizado para el reconocimiento de proteínas de cloroplastos. <http://psort.hgc.jp>

TMHMM, aplicación que se utilizó para la predicción de hélices transmembrana en proteínas. <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>

La aplicación "Graphical Codon Usage Analyser 2.0" (Fuhrmann *et al.*, 2004), se utilizó para el análisis del uso de codones de las secuencias.

RESULTADOS

1. Búsqueda, clonación y expresión heteróloga en *E.coli* del gen *zds* de *Ficus carica*

1.1. Clonación del gen zeta-caroteno desaturasa de *Ficus carica* (*zds-Fc*)

Después de analizar las secuencias de otras zeta-caroteno dasaturadas de plantas publicadas en las bases de datos, se identificaron las regiones conservadas de los genes que codifican para dichas enzimas. Sobre estas regiones, se diseñaron los cebadores degenerados ZDS DegF y ZDS DegR (Tabla 3), con los cuales, se amplificó la primera hebra de cDNA sintetizada por RT-PCR a partir ARN total de hojas de *F. carica*. Esta PCR generó un fragmento de cDNA de 567 pb (Figura 25A). Este fragmento se clonó en el vector pCR Blunt II TOPO y se expresó en *E. coli* One Shot Top10 tal como se detalla en materiales y métodos.

El análisis de la secuencia nucleotídica de este fragmento mostró que se trataba de una zona interna central del gen *zds-Fc*, con una alta homología (entre 80 %- 83 %), con otros genes de plantas que codificaban para zeta-caroteno desaturasa como los procedentes de las especies *Citrus unshiu* (*C. unshiu*) (AB072343.1), *Citrus maxima* (*C. maxima*) (EU798286.1), *Malus x domestica* (AF429983.1), *C. sinensis* (AJ319762.1), *Jatropha curcas* (*J. curcas*) (GQ337075.1), *Citrus x paradisi* (AF372617.1), *Fragaria x ananassa* (FJ795343.1), *C. papaya* (FJ812088.1) y *D. carota* (DQ192189.1), entre otros.

Empleando la técnica de la RACE-PCR fue posible obtener un fragmento de 727 pb que abarca la región 5'-codificante (Figura 25B) y un fragmento de 1318 pb de la región 3' del gen *zds-Fc* (Figura 25C) según la estrategia descrita en la Figura 25E.

Los fragmentos de ADN obtenidos mediante esta técnica compartían un área común que se superponía bien en el extremo 5' o bien en el extremo 3' con el fragmento interno del gen *zds-Fc*. Estos tres fragmentos de cDNA superpuestos permitieron conocer el cDNA completo del gen *zds-Fc* (2131 pb). Este cDNA contenía la región codificante completa del gen *zds-Fc*, en un marco de lectura abierto (ORF) de una longitud de 1746 pb (Figura 25D) con 197 nucleótidos en el extremo 5'-UTR (región no traducida) y 188 nucleótidos en el extremo 3'-UTR (Figura 25E).

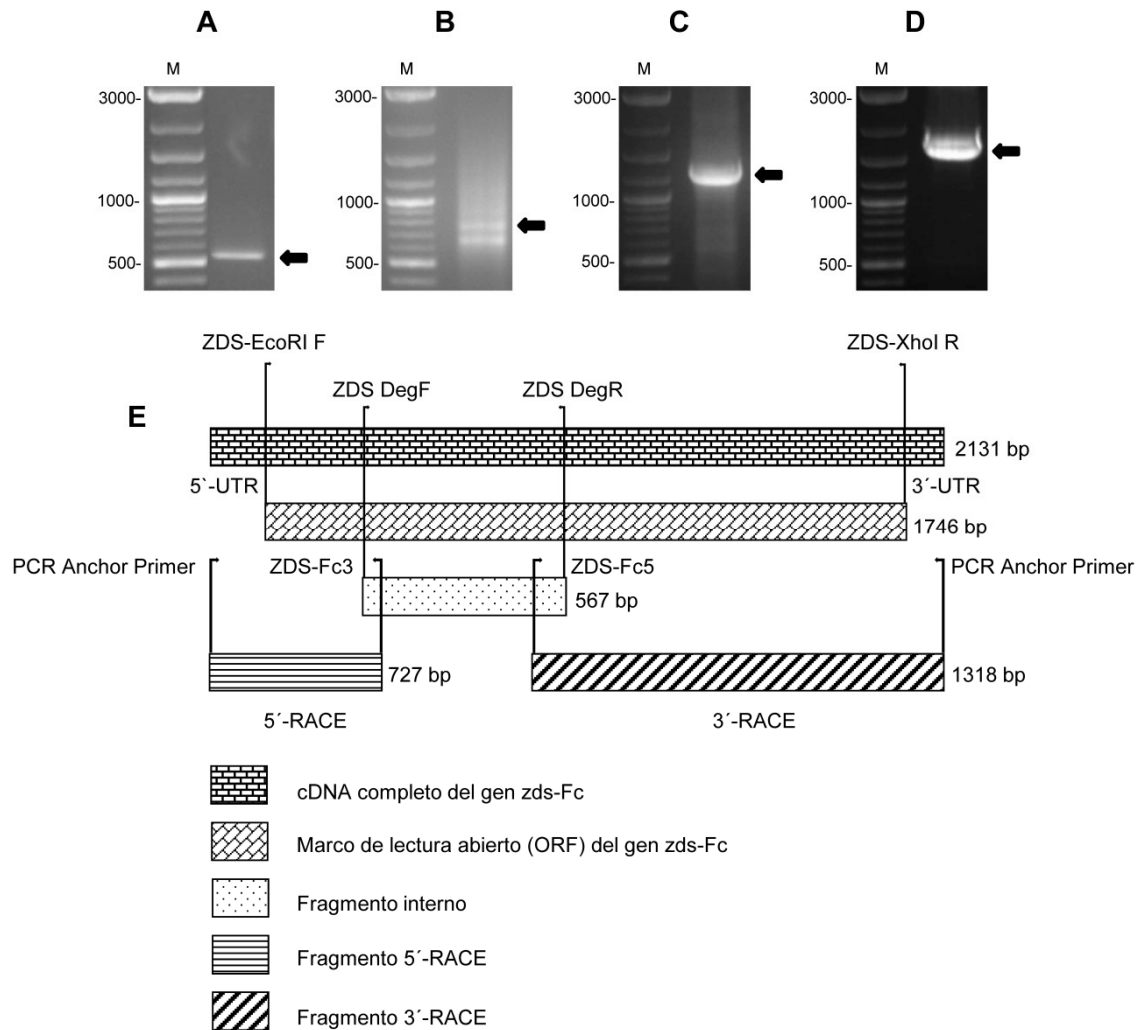


Figura 25. Estrategia de clonación del cDNA del gen *zds* de *Ficus carica*. A) Secuencia interna del gen *zds-Fc* amplificada con los cebadores ZDS DegF y ZDS DegR; B) Extremo 5' del gen *zds-Fc* obtenido por 5'-RACE; C) Extremo 3' del gen *zds-Fc* obtenido por 3'-RACE; D) Marco de lectura abierto del gen completo *zds-Fc* de *F. carica*; (E) Esquema de la estrategia RACE-PCR empleada para la obtención de los extremos del gen *zds-Fc*.

La región codificante completa del gen *zds-Fc* de 1746 pb se clonó en el vector de expresión pET21a mediante clonación dirigida para la correcta inserción del gen. La orientación y clonación del inserto de DNA en el vector se comprobó mediante digestión enzimática (Figura 26). Las construcciones plasmídicas obtenidas se clonaron en *E. coli* DH5 α .

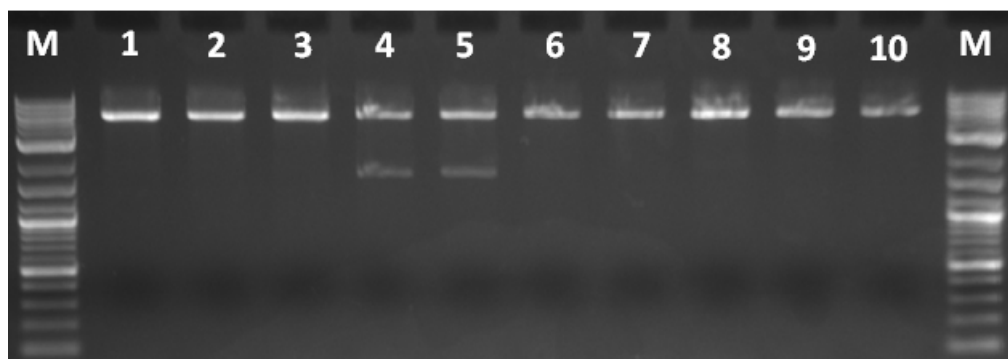


Figura 26. Digestión del vector pET21a con las endonucleasas *EcoRI* y *XhoI*.

La secuencia codificante de cDNA del gen *zds-Fc* (Figura 27) se depositó en la base de datos del GenBank (número de acceso JN896309).

1.2. Caracterización de la secuencia ZDS de *F. carica*

Se observó que el cDNA clonado codificaba para un polipéptido de 582 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 64 kD (GenBank número de acceso AEW70738.1).

Al comparar la secuencia polipeptídica de ZDS-Fc con otras secuencias publicadas de ζ -caroteno desaturasa, los programas ChloroP 1.1 y TargetP 1.1 predijeron en el extremo N-terminal del polipéptido de ZDS-Fc una secuencia de 43 aminoácidos de señalización celular en el cloroplasto, lo que concuerda con otras secuencias publicadas de ζ -caroteno desaturasa de plantas como *Zea mays* (*Z. Mays*), *A. thaliana*, *Narcissus tazetta* (*N. tazetta*) y *Triticum aestivum* (*T. aestivum*), de 30, 34, 42 y 32 aminoácidos de longitud, respectivamente (Al-Babili *et al.*, 1998; Matthews *et al.*, 2003; Cong *et al.*, 2009).

El programa PSORT predijo un posible sitio de ruptura del polipéptido localizado en el aminoácido 33 (Figura 27).

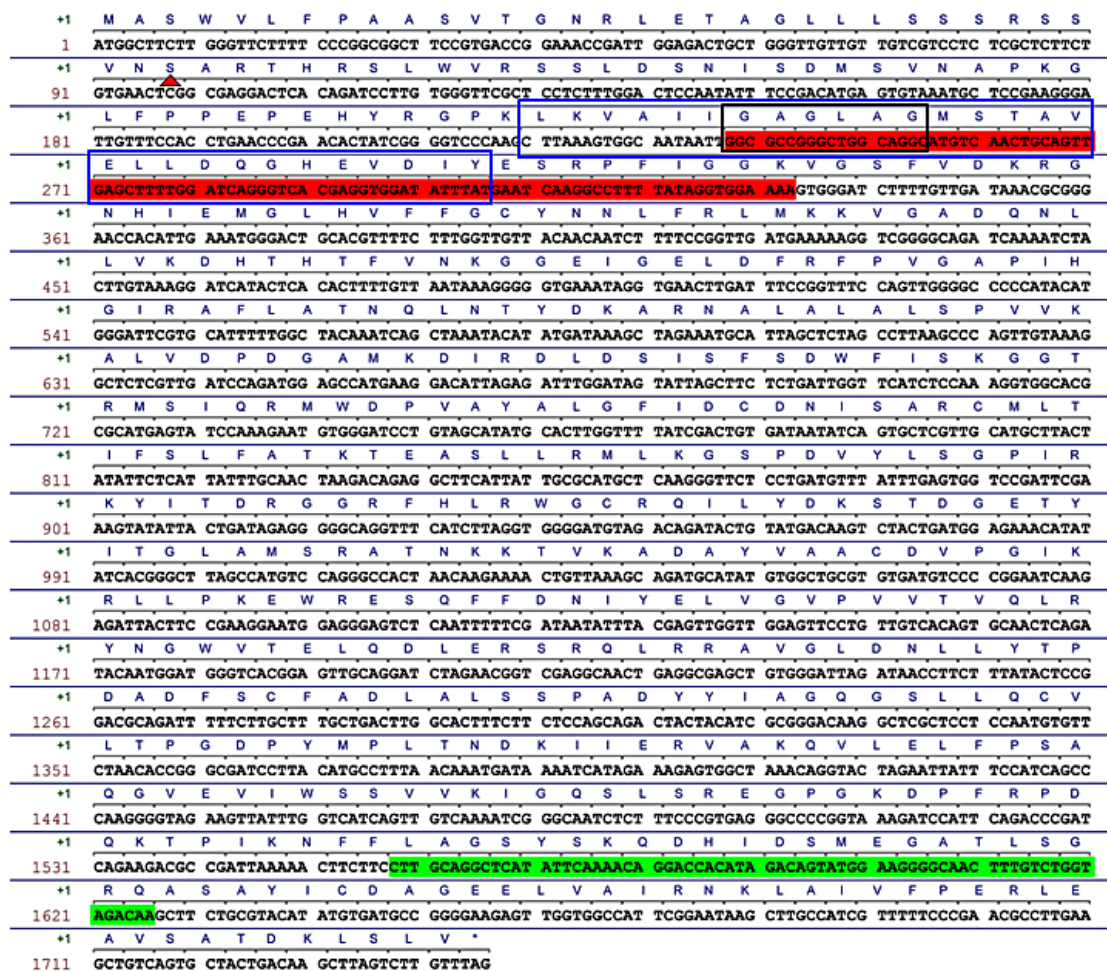


Figura 27. Características de la proteína ZDS de *F. carica*. Se indica con un triángulo el punto de corte más probable del péptido señal para la importación a plastidios. Las distintas regiones de interés, descritas como características de ZDSs vegetales, se señalan en la secuencia de ZDS-Fc como sitio de unión a dinucleótido y dominio conservado de unión a carotenoides (Yan *et al.*, 2011).

El análisis de motivos conservados realizado con el programa PSIPred sobre la secuencia de aminoácidos de ZDS-Fc, mostró la presencia de un dominio típico altamente conservado de unión a piridina dinucleótido (FAD) (Figura 27), y una estructura secundaria de β -hoja- α -hélice- β -hoja (Figura 28). Este motivo es también característico de otras ZDSs de plantas (Wirenga *et al.*, 1986; Matthews *et al.*, 2003).

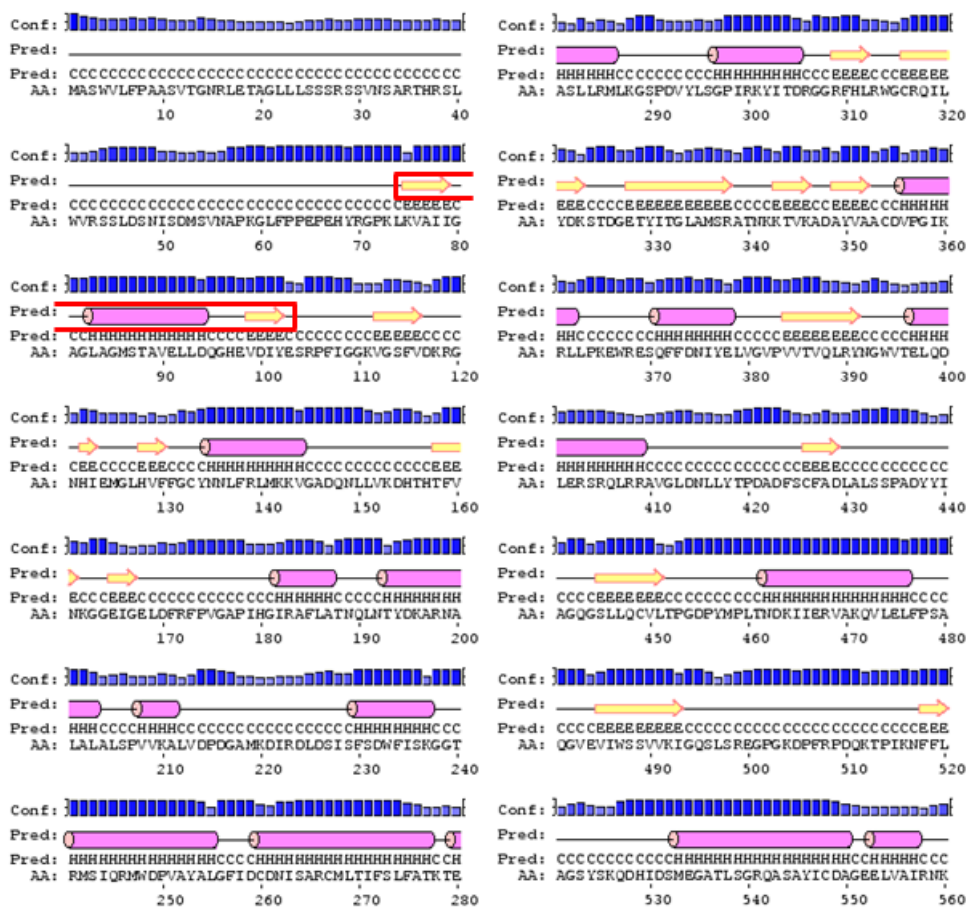


Figura 28. Predicción de la estructura secundaria de ZDS de *F. carica* realizada por el programa PSIPRED (Jones, 1999). Conf: Nivel de confianza de la predicción; Pred: Estructura secundaria inferida. Los números en la parte inferior indican las posiciones de los aminoácidos. Las líneas negras representan estructura de bobina, los cilindros rosa las hélices α y las flechas amarillas las láminas β . Se encuadra en rojo la estructura lámina β /hélice α /lámina β característica del dominio de unión a piridina dinucleótido (FAD). (Hugueney *et al.*, 1995; Cunningham *et al.*, 1996).

El grado de identidad de la secuencia del polipéptido de ZDS-Fc se obtuvo utilizando la herramienta BlastP (Altschul *et al.*,1997). Este análisis mostró que la enzima ZDS-Fc presentaba una identidad aminoacídica del 84 % (91 % de similitud) con *J. curcas*, 85 % (91 %) con *C. maxima*, 85 % (91 %) con *C. unshiu*, 84 % (91 %) con *C. sinensis*, 84 % (90 %) con *Malus x domestica*, 83 % (91 %) con *Fragaria x ananassa*, y 83 % (90 %) con *C. papaya*, entre otras. Además, esta herramienta detectó en la secuencia aminoacídica un dominio conservado denominado Rossmann-fold NAD(P)(+)-binding proteins, identificado en el GenBank como NADB Rossmann Superfamily (cl09931) (Figura 27).

1.3. Determinación de la actividad ζ -caroteno desaturasa de la enzima ZDS

Para la determinación de la actividad ζ -caroteno desaturasa de la enzima ZDS de *F. carica* se realizaron ensayos de complementación de color. Para esto, se construyeron las cepas recombinantes, *E. coli* BL-EBP, que acumulaba ζ -caroteno, *E. coli* BL-EBR, que acumulaba neurosporeno y *E. coli* BL-EBI (control positivo), capaz de acumular licopeno (Figura 29, Tabla 1).

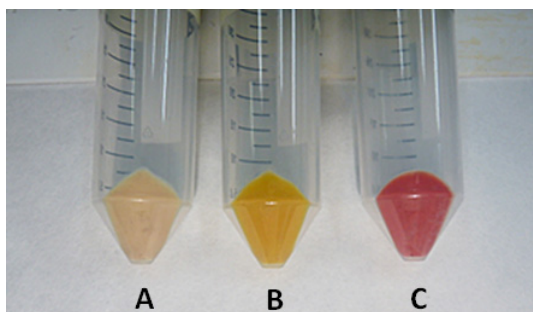


Figura. 29. Cepas recombinantes de *E. coli*. (A) BL-EBP; (B) BL-EBR; (C) BL-EBI.

Las cepas recombinantes de *E. coli* BL-EBP y *E. coli* BL-EBR fueron co-transformadas separadamente con el plásmido pET21-zds que codifica la proteína ZDS de *F. carica*. Esto originó dos nuevas cepas recombinantes que se denominaron como *E. coli* BL-EBPZ y *E. coli* BL-EBRZ, respectivamente (Tabla 1). Estas cepas mostraron variación en el color, entre las colonias control y las transformantes, lo cual indicó un cambio en la composición de carotenoides producto de la actividad desaturasa de la enzima ZDS (Figura 30).

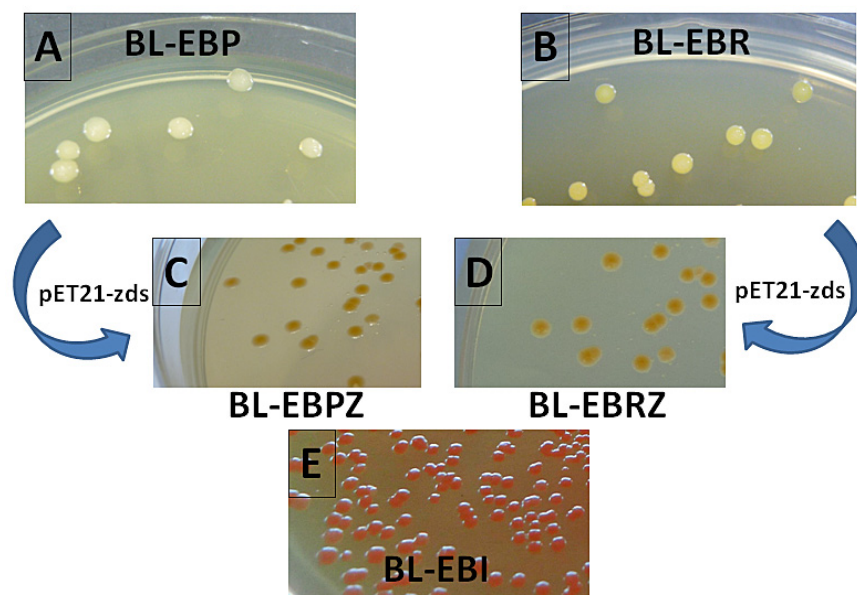


Figura 30. Análisis de complementación de color: (A) Cepa recombinante *E.coli* BL-EBP; (B) Cepa recombinante *E.coli* BL-EBR; (C) Cepa BL-EBP co-expresando el plásmido pET21-zds; (D) Cepa BL-EBR co-expresando el plásmido pET21-zds; (E) Control positivo, cepa BL-EBI.

1.4. Identificación de carotenoides por HPLC

1.4.1. Cepa BL-EBPZ

El análisis por HPLC confirmó, que los carotenoides presentes en los extractos bacterianos de las cepas control, *E. coli* BL-EBP, *E. coli* BL-EBR y *E. coli* BL-EBI, correspondían a ζ -caroteno (Figura 31A), neurosporeno (Figura 31B) y licopeno, respectivamente (Figura 31C).

En la cepa *E. coli* BL-EBPZ, se advirtió la presencia de dos nuevos compuestos que no aparecen en el cromatograma de la cepa control BL-EBP. El perfil de elución de HPLC para BL-EBPZ registró picos máximos de absorbancia a 416, 441 y 471 nm y tiempos de retención que se identificaron con el neurosporeno (Figura 31D) y picos máximos de absorbancia a 445, 472 y 504 nm y tiempos de retención que se identificaron con el licopeno (Figura 31D).

Esto confirmó, que la enzima funcional ZDS-Fc en *E. coli* BL-EBPZ era la responsable de catalizar la doble desaturación y por consiguiente de la conversión de ζ -caroteno en neurosporeno y licopeno.

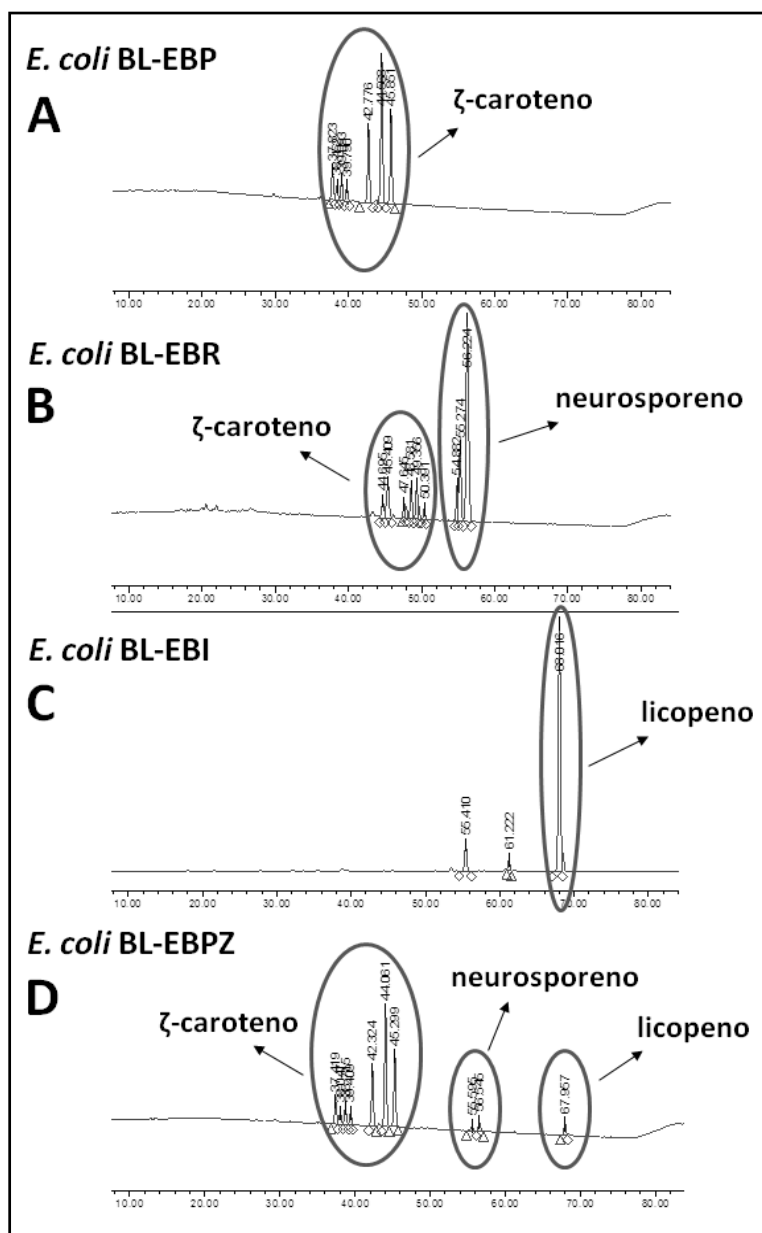


Figura 31. Cromatogramas de las cepas: (A) *E. coli* BL-EBP; (B) *E. coli* BL-EBR; (C) *E. coli* BL-EBI y (D) *E. coli* BL-EBPZ.

1.4.2. Cepa BL-EBRZ

El análisis por HPLC confirmó, que los carotenoides presentes en los extractos bacterianos de las cepas control, *E. coli* BL-EBR y *E. coli* BL-EBI, correspondían a neurosporeno (Figura 32A) y lycopeno (Figura 32B), respectivamente. En la cepa *E. coli* BL-EBRZ, como era de

esperar, solo se detectó un compuesto nuevo que no estaba presente en el cromatograma de la cepa control BL-EBR y cuyo espectro de absorción mostró los picos de máxima absorbancia a 445, 472 y 504 nm y un tiempo de retención típico del licopeno (Figura 32C), confirmando que la enzima funcional ZDS-Fc en *E. coli* BL-EBRZ es la responsable de catalizar el último paso de desaturación y por consiguiente de la conversión de neurosporeno en licopeno.

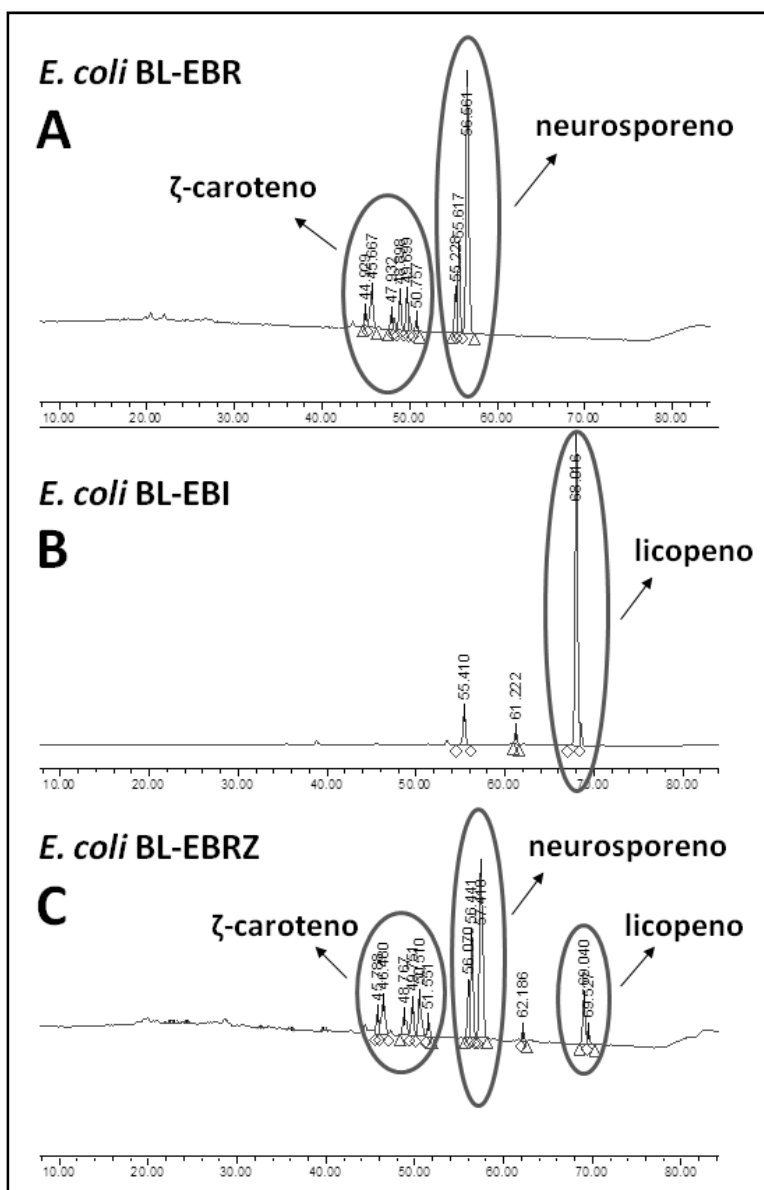


Figura 32. Cromatogramas de las cepas *E. coli* BL-EBR, *E. coli* BL-EBI y *E. coli* BL-EBRZ.

Resultados

Estos resultados confirmaron la identidad enzimática de ZDS de *F. carica* y su capacidad para actuar tanto sobre el ζ -caroteno como sobre el neurosporeno como sustrato, como era de esperar de una ZDS de planta.

El contenido estimado de ζ -caroteno en la cepa recombinante control BL-EBP fue de 201 $\mu\text{g/g}$ célula (peso seco) y no se detectó neurosporeno ni licopeno. El contenido estimado de neurosporeno en la cepa recombinante control BL-EBR fue de 215 $\mu\text{g/g}$ célula (peso seco) y no se detectó licopeno, pero sí ζ -caroteno.

El contenido estimado de carotenoides en la cepa recombinante de *E.coli* BL-EBPZ fue de 122, 34 y 11 $\mu\text{g/g}$ célula (peso seco) de ζ -caroteno, neurosporeno y licopeno, respectivamente. Mientras que el contenido estimado de neurosporeno y licopeno en la cepa recombinante *E.coli* BL-EBRZ fue de 186 y 13 $\mu\text{g/g}$ célula (peso seco), respectivamente.

El análisis por SDS-PAGE de la cepa de *E. coli* BL-ZDS (Figura 33) mostró la presencia de una banda con una masa molecular aproximado de 64 kD, la cual se observó sólo después de la inducción de las células de la cepa BL-ZDS con 1 mM de IPTG.

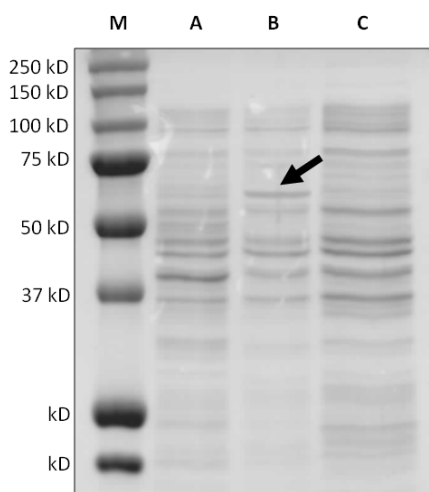


Figura 33. SDS/PAGE obtenido de la expresión con 1mM de IPTG de los cultivos celulares de *E. coli* BL-ZDS. M: Control negativo; Línea A: *E. coli* BL21 (DE3) transformada con el plásmido pET21a solo (sin inserto); Línea B: Cepa de *E. coli* BL-ZDS inducido con IPTG; Línea C: Cepa de *E. coli* BL-ZDS sin IPTG.

2. Búsqueda, clonación y expresión heteróloga en *E.coli* del gen β -*lcy* de *Ficus carica*

2.1. Clonación del gen licopeno β -ciclasa de *Ficus carica* (β -*lcy-Fc*)

Como primer paso, se analizaron las secuencias de otras licopeno beta-ciclasa de plantas publicadas en las bases de datos y se identificaron dos regiones conservadas en las secuencias nucleotídicas de sus genes. Sobre estas regiones, se diseñaron los cebadores degenerados LCY- β DegF y LCY- β DegR (Tabla 4), con los cuales, se amplificó la primera hebra de cDNA sintetizada por RT-PCR a partir RNA total de hojas de *F. carica*.

Esta estrategia permitió la separación electroforética de un producto de PCR para un clon parcial del gen β -*lcy-Fc*, de un tamaño de 914 pb correspondiente a la región interna del gen (Figura 34A). Este fragmento se clonó en el vector pCR Blunt II TOPO y se transformó en *E. coli* One Shot Top10 tal como se detalla en materiales y métodos.

El análisis de la secuencia nucleotídica de este fragmento demostró que se trataba de una zona interna central del gen *zds-Fc*, con una alta homología (74 % a 77 %), con otros genes de plantas que codifican para licopeno β -ciclasa tales como, *C. sinensis* (ABB72443), *A. deliciosa* (FJ427509), *Actinidia chinensis* (*A. chinensis*) (FJ427508), *L. esculentum* (X86452) y *C. papaya* (ABD91578), entre otros.

Los extremos 5' y 3' del gen β -*lcy-Fc* se obtuvieron a partir de la secuencia interna conocida mediante RACE-PCR. Usando los cebadores específicos LCY-Fc1, LCY-Fc2, LCY-Fc3 LCY-Fc4 y LCY-Fc5 fue posible obtener un fragmento de 420 pb que abarca la región 5'-codificante (Figura 34B) y un fragmento de 740 pb para la región 3' del gen β -*lcy-Fc* (Figura 34C) siguiendo la estrategia detallada en la Figura 34E.

Los fragmentos de ADN obtenidos por RACE-PCR compartían un área común que se superponía en el extremo 5' o 3' con el fragmento interno del gen β -*lcy-Fc*. Estos tres fragmentos de cDNA superpuestos permitieron reconstruir el cDNA completo del gen β -*lcy-Fc* con un tamaño de 1575 pb. Este cDNA contenía la región codificante completa del gen β -*lcy-Fc*, en un marco de lectura abierto (ORF) de una longitud de 1488 pb (Fig. 34D) con 22 nucleótidos en el extremo 5'-UTR (región no traducida) y 65 nucleótidos en el extremo 3'-UTR (Fig. 34E).

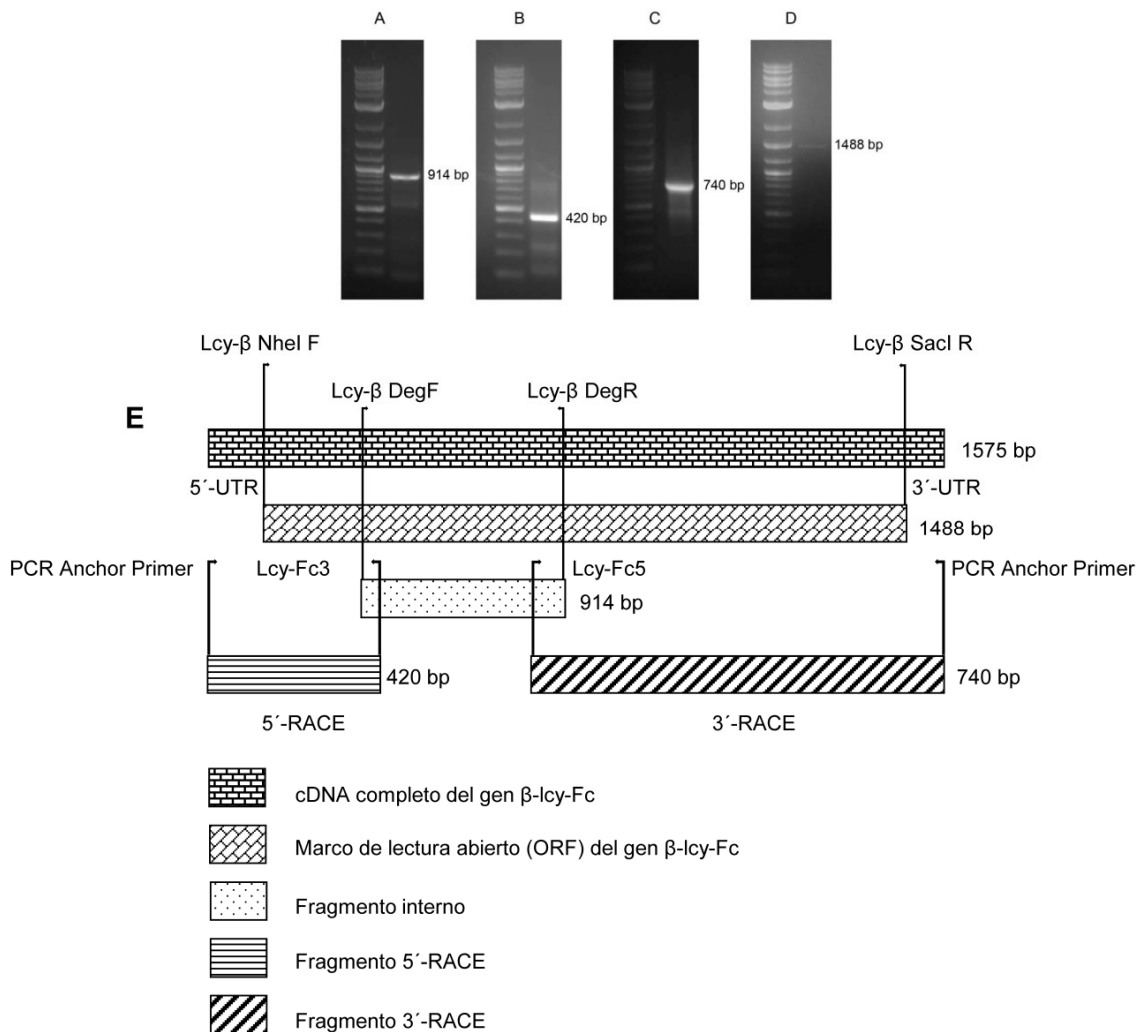


Figura 34. Estrategia de clonación del cDNA del gen β -lyc-Fc de *F. carica*. A) Secuencia interna del gen β -lyc-Fc amplificada con los cebadores Lcy-β DegF y Lcy-β DegR; B) Extremo 5' del gen β -lyc-Fc obtenido por 5'-RACE; C) Extremo 3' del gen β -lyc-Fc obtenido por 3'-RACE; D) Marco de lectura abierto del gen completo β -lyc-Fc de *F. carica*; (E) Esquema de la *zds-Fc* estrategia RACE-PCR empleada para la obtención de los extremos del gen β -lyc-Fc.

La región codificante completa del gen β -*lcy-Fc* de 1488 pb se clonó en el vector pET21a y se confirmó su inserción correcta y en pauta de lectura mediante digestión enzimática (Figura 35). Las construcciones plasmídicas obtenidas se emplearon para transformar células de *E. coli* DH5 α .

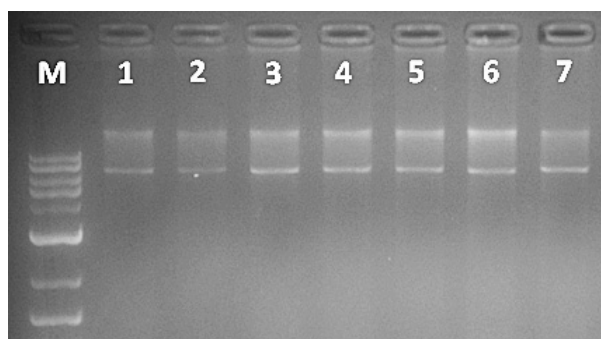


Figura 35. Digestión del vector pET21- $lcy\beta$ con las endonucleasa *SacI*.

La secuencia codificante de cDNA del gen β -*lcy-Fc* (Figura 36) se depositó en la base de datos del GenBank (número de acceso JF279547).

2.2. Caracterización de la secuencia β -LCY de *Ficus carica*

El cDNA completo de β -*lcy-Fc* de *F. carica* codificaba un polipéptido de 496 aminoácidos con un peso molecular estimado de 56 kD (GenBank número de acceso ADX36406.1).

Al comparar la secuencia polipeptídica de β -LCY-Fc con otras secuencias publicadas de β -licopeno ciclasa, los programas ChloroP 1.1 y TargetP 1.1 predijeron en extremo N-terminal del polipéptido de β -LCY-Fc una secuencia de señalización celular hacia cloroplasto de 36 aminoácidos.

El programa PSORT predijo un posible sitio de ruptura del polipéptido localizado en el aminoácido 36. Además se identificaron cuatro motivos típicos de ciclasas (Hugueney *et al.*, 1995; Cunningham *et al.*, 1996) y otros dominios descritos como esenciales para la actividad de β -LCY (Bouvier *et al.*, 1997) (Figura 36).

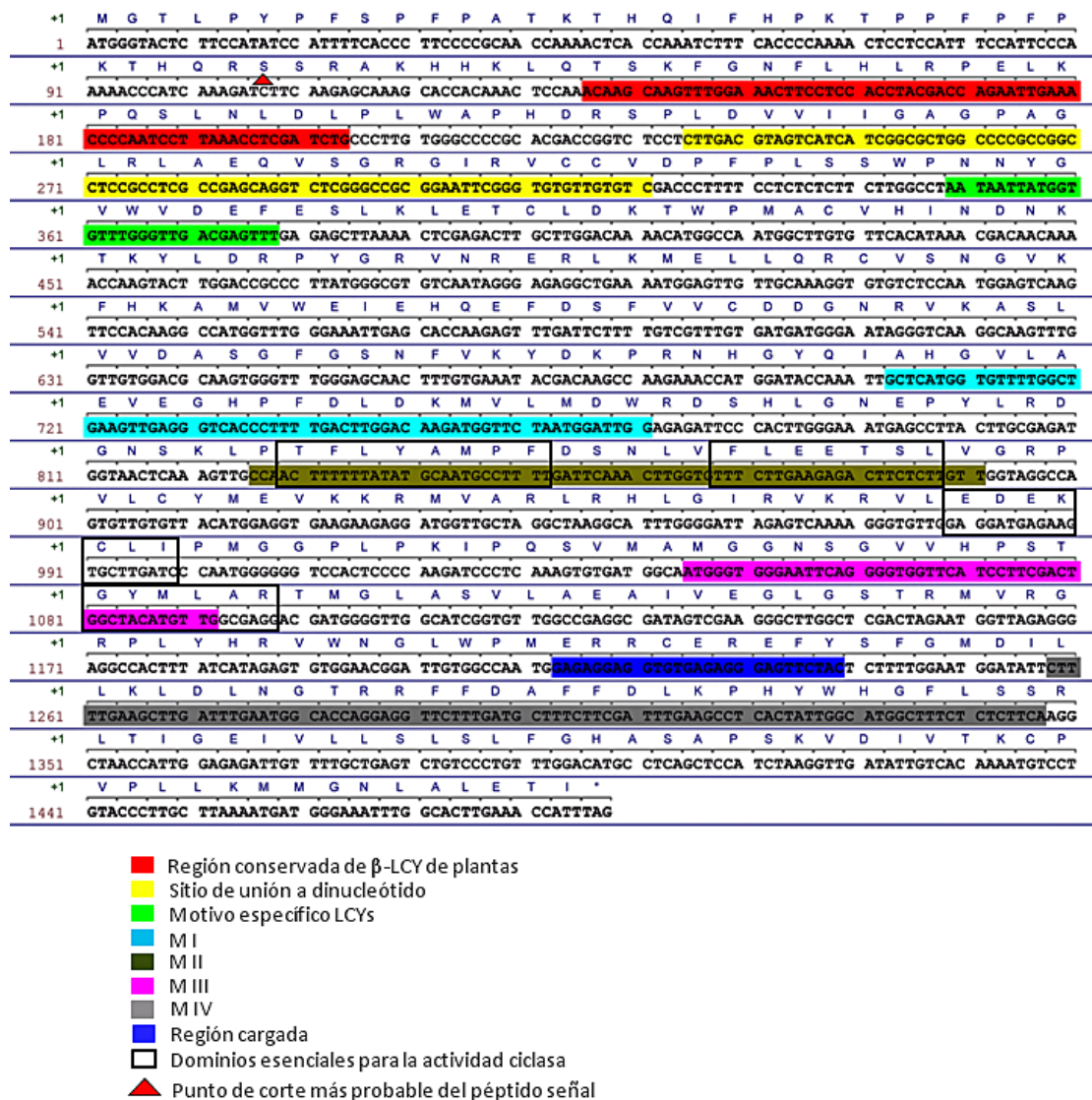


Figura 36. Características de la proteína licopeno β-ciclasa de *F. carica*. Se indica con una flecha el punto de corte más probable del péptido señal para la importación a plastidios. Las distintas regiones de interés, descritas como características de LCYs vegetales, se señalan en la secuencia de β-LCY-Fc como MI a MIV y ‘región cargada’ (Huguency *et al.*, 1995; Cunningham *et al.*, 1996), ‘sitio de unión a dinucleótido’ y ‘motivo β-ciclasa’. Los dominios descritos como esenciales para la actividad ciclasa se indican en cuadros grises (Bouvier *et al.*, 1997).

El análisis de motivos conservados realizado con el programa PSIPred sobre la secuencia de aminoácidos β -LCY-Fc, mostró la presencia de un dominio típico altamente conservado de unión a dinucleótidos DX4GXGXAX4A, con una estructura secundaria de β -hoja- α -hélice- β -hoja (Figura 37). Este motivo se encuentra presente en todas las β -LCYs de plantas (Wirenga *et al.*, 1986; Cunningham *et al.*, 1994).



Figura 37. Predicción de la estructura secundaria de β -LCY de *F. carica* realizada por el programa PSIPRED (Jones, 1999). Conf: Nivel de confianza de la predicción; Pred: Estructura secundaria inferida. Los números en la parte inferior indican las posiciones de los aminoácidos. Las líneas negras representan estructura de bobina, los cilindros rosa las hélices α y las flechas amarillas las láminas β . Se encuadra en rojo la estructura lámina- β /hélice- α /lámina- β característica del 'bolsillo' de unión a NADP/NADPH. (Hugueney *et al.*, 1995; Cunningham *et al.*, 1996).

El grado de identidad entre la secuencia del polipéptido de β -LCY-Fc fue obtenido mediante la herramienta BlastP (Altschul *et al.*, 1997). Este análisis mostró un porcentaje de identidad entre el 68 % y el 76 % con el resto de β -LCYs de plantas, localizándose la mayor parte de la variabilidad en el extremo amino-terminal.

La enzima β -LCY-Fc mostró una identidad de aminoácidos del 76 % (87 % de similitud) con *A. deliciosa*, 74 % (84 %) con *A. chinensis*, 73 % (83 %) con *C. sinensis* y 68 % (80 %) con *C. papaya*, entre otras. Además, esta herramienta identificó dos dominios conservados, uno perteneciente a la familia de proteínas Licopeno ciclasa (licopeno β y ϵ -ciclasas), señalada en el GenBank como pfam05834 y otro dominio denominado Rossmann-fold NAD(P)(+)-binding proteins, descrito en el GenBank como NADB Rossmann Superfamily (c109931) y que se encontró presente también para ZDS de *F. Carica*.

2.3. Determinación de la actividad licopeno β -ciclasa de la enzima β -LCY

Para el análisis de la actividad licopeno β -ciclasa de la proteína β -LCY de *F. carica* se realizaron ensayos de complementación de color.

La cepa *E. coli* BL-EBI, capaz de acumular licopeno, fue co-transformada con el plásmido pET21- β que codifica la proteína β -LCY de *F. carica*. Esto originó una nueva cepa recombinante que se denominó como *E. coli* BL-EBIL (Tabla 1). Cuando la cepa expresaba la proteína objeto de estudio mostró una variación de color (naranja) con respecto al control negativo (Figura 38). Este cambio de color de las colonias BL-EBIL indicaba una conversión de licopeno a β -caroteno producto de la actividad β -ciclasa de la enzima β -LCY.

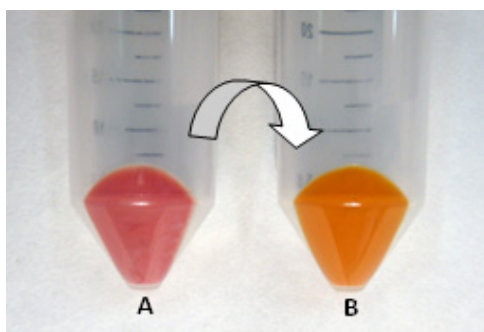


Figura 38. Análisis de complementación de color en transformantes de *E.coli* BL-EBI co-expresando distintos plásmidos. (A) Control negativo: pET21a sin inserto; (B) pET21- β .

Para comprobar la correcta co-expresión de ambos plásmidos en la cepa BL-EBIL, se realizó una digestión con la enzima de restricción *Xba*I de los plásmidos extraídos de una colonia naranja (Figura 39).

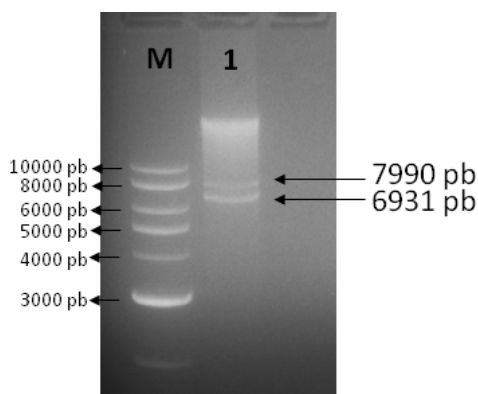


Figura 39. M: Marcador de peso molecular; 1: Digestión de los vectores de expresión pACCRT-EBI (7990 pb) y pET21-lcy β (6931 pb) con la endonucleasa *Xba*I.

2.4. Identificación de carotenoides por HPLC para β -LCY

Como control positivo fue utilizado el patrón comercial β -caroteno (Sigma-Aldrich) (Figura 40A). El análisis por HPLC de los carotenoides presentes en el cultivo de *E.coli* BL-EBI transformada con el plásmido pET21a sin inserto (control negativo), mostró la existencia de un único carotenoide, cuyo espectro de absorción registró tres picos de máxima absorbancia a 445, 472 y 504 nm y un tiempo de retención que coincidieron con los del licopeno. (Figura 40B).

El análisis de la composición de los carotenoides presentes en el cultivo de la cepa de *E.coli* BL-EBIL, reveló la existencia de un nuevo carotenoide cuyo espectro de absorción registró picos máximos de absorbancia a 425, 451 y 482 nm y un tiempo de retención de 42 min que coincidió con los del estándar β -caroteno (Figura 40C). La actividad β -LCY, evaluada como porcentaje de conversión de licopeno a β -caroteno presentó valores entre el 85 % y el 95 %. Los porcentajes medios de conversión fueron 90.35 ± 1.2 .

Es interesante destacar que en ninguno de los cultivos analizados se detectó la presencia de γ -caroteno, que resultaría de la β -ciclación de un único extremo de la molécula de licopeno. Además, al igual que para el gen *zds-Fc*, se observó que la cantidad de carotenoides fue mayor, cuando el crecimiento celular se llevó a cabo a 28 °C en oscuridad en lugar de 37 °C.

El contenido estimado de licopeno en los cultivos de la cepa control *E. coli* BL-EBI fue de 300 $\mu\text{g/g}$ célula (peso seco) y el contenido estimado de β -caroteno en los cultivos de la cepa *E. coli* BL-EBIL fue de 529 $\mu\text{g/g}$ célula (peso seco). Estos valores de producción son mayores a los obtenidos para otras cepas recombinantes de *E. coli* productoras de β -caroteno que contienen los genes *crtE*, *crtB*, *crtI* y *crtY* de *E. uredoovora* (Misawa *et al.*, 1995; Schnurr *et al.*, 1996), pero considerablemente menor comparados con los obtenidos para otras cepas de *E. coli* que además de los genes antes mencionados de *E. uredoovora*, portan el gen *ipi* de *H. pluvialis* que codifica para IPP isomerasa (Misawa and Shimada, 1998).

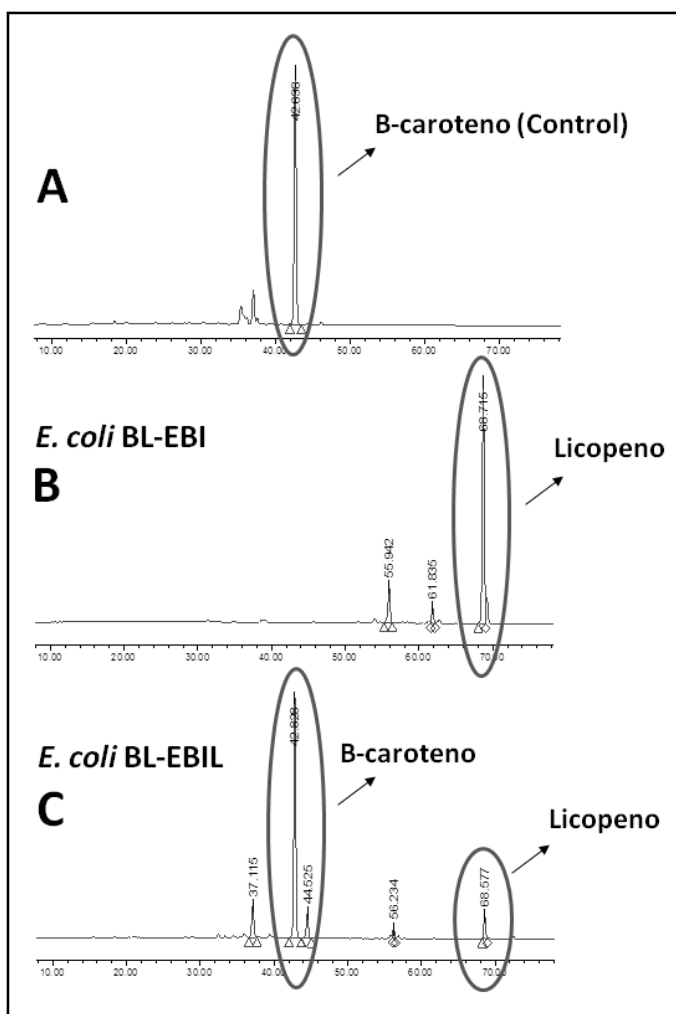


Figura 40. Cromatograma Max Plot de: (A) Patrón β -caroteno (Sigma); (B) Carotenoides presentes en los cultivos de *E.coli* BL-EBI transformados con el plásmido pET21a sin inserto (control negativo), Licopeno pico mayoritario; (C) Carotenoides presentes en los cultivos de *E. coli* BL-EBI co-transformados con el plásmido pET21-*lcy* β , Beta caroteno pico mayoritario.

El análisis por SDS/PAGE de la cepa de *E. coli* BL-LCY (Figura 41), mostró la presencia de una banda con una masa molecular aproximada de 56 kD, la cual se observó sólo después de la inducción de la cepa BL-LCY con 1 mM de IPTG.

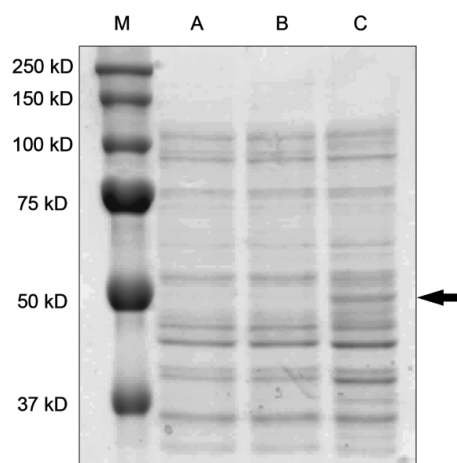


Figura 41. SDS/PAGE obtenido de la expresión con 1mM de IPTG de los cultivos celulares de *E. coli* BL-LCY. M: Control negativo; Línea A: *E. coli* BL21 (DE3) transformada con el plásmido pET21a solo (sin inserto); Línea B: cepa de *E. coli* BL-LCY sin IPTG; Línea C: Cepa de *E. coli* BL-LCY inducido con IPTG.

3. Análisis filogenético de ZDS y β -LCY

Se construyeron arboles filogenéticos para *zds-Fc* y *β -lcy-Fc* en base a sus secuencias nucleotídicas y polipeptídica, comparandolas con las secuencias de ZDS y β -LCY de otras especies disponibles en la base de datos del Gen Bank.

3.1. Árbol filogenético para ZDS

El árbol filogenético que se muestra en la figura 42, se infirió utilizando el modelo de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987), la distancia evolutiva se calculó utilizando el método de Jones-Taylor-Thornton (Nei y Kumar, 2000), el cual presentó los valores más bajos de BIC (Bayesian Information Criterion). La tasa de variación entre los sitios fue modelada con una

distribución Gamma ($G=5$) y asumiendo que una cierta fracción de los sitios son evolutivamente invariables.

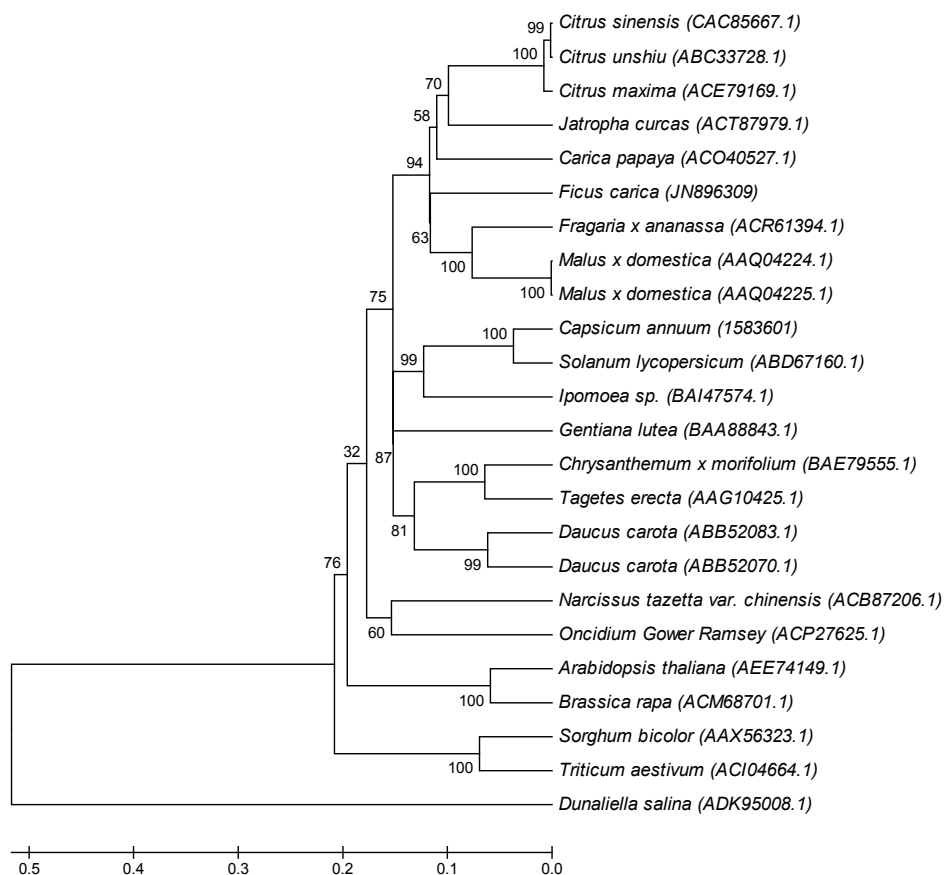


Figura 42. Árbol filogenético elaborado con MEGA a partir de las secuencias de aminoácidos de ZDS utilizando el modelo Neighbor-Joining con distancias Jones-Taylor-Thornton. Se realizaron 1000 réplicas, los valores en los nodos indican el porcentaje de remuestreo. El número de acceso de cada secuencia comparada se muestra entre paréntesis. Se utilizó como grupo externo *D. salina*.

El análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas (Figura 42), mostró que la secuencia de ZDS-Fc poseía un alto grado de homología con otras ζ -caroteno desaturasas de plantas y demostró claramente que la secuencia ZDS de *F. carica* (JN896309) se agrupaba mejor con las secuencias ZDS de *Fragaria x ananassa* (FJ795343.1), *Malus x domestica* (AF429983.1), *C. papaya* (FJ812088.1), *J. curcas* (GQ337075.1), *C. máximus* (EU798286.1), *C. sinensis* (AJ319762.1) y *C. unshiu* (DQ309869.1) que con otras ZDSs descritas.

La secuencia polipeptídica de la microalga marina *D. salina* codificante para ζ -caroteno desaturasa, se incluyó como control externo y tal como era de esperar aparece en una rama aislada.

El análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas (Figura 43), no mostro grandes variaciones en comparación con el realizado a partir de las secuencias protéicas.

La secuencia nucleotídica de la microalga marina *D. salina* codificante para ζ -caroteno desaturasa, se incluyó como control externo y aparecía en una rama aislada.

Finalmente, ambos análisis confirman que el gen *zds-Fc* es parte integral de la familia de las ZDSs.

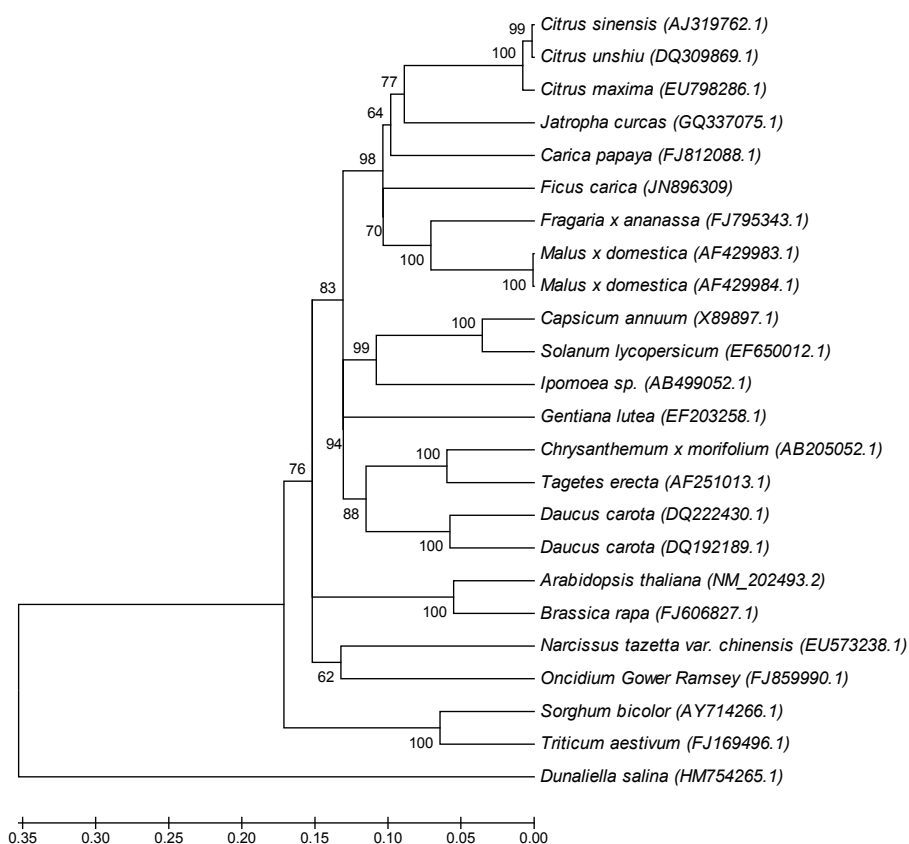


Figura 43. Árbol filogenético elaborado con MEGA a partir de las secuencias nucleotídicas de *zds* utilizando el modelo Neighbor-Joining con distancias Tamura 3-parameter. Se realizaron 1000 réplicas, los valores en los nodos indican el porcentaje de remuestreo. El número de acceso de cada secuencia comparada se muestra entre paréntesis. Se utilizó como grupo externo la secuencia de *D. salina*.

3.2. Árbol filogenético para β -LCY

El árbol filogenético que se muestra en la figura 44, se infirió utilizando el modelo de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987), la distancia evolutiva se calculó utilizando el modelo de Jones-Taylor-Thornton (Nei y Kumar, 2000), el cual presentó los valores más bajos de BIC (Bayesian Information Criterion). La tasa de variación entre los sitios fue modelado con una distribución Gamma ($G=5$) y asumiendo que una cierta fracción de los sitios son evolutivamente invariables. El análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas (Figura 44), mostró que la secuencia de β -LCY tiene una alta homología con otras licopeno β -ciclasas de plantas y demostró claramente que la secuencia β -LCY de *F. carica* (JF279547) aparecía más estrechamente relacionada con la secuencia β -LCY de *A. deliciosa* (ACJ66629.1), *A. chinensis* (ACJ66628.1) y *Crocus sativus* (ADA82242.1), que con otras β -LCYs. La secuencia polipeptídica de la microalga marina *D. salina* codificante para licopeno β -ciclasa se incluyó como control externo y tal como era de esperar, aparecía en una rama aislada.

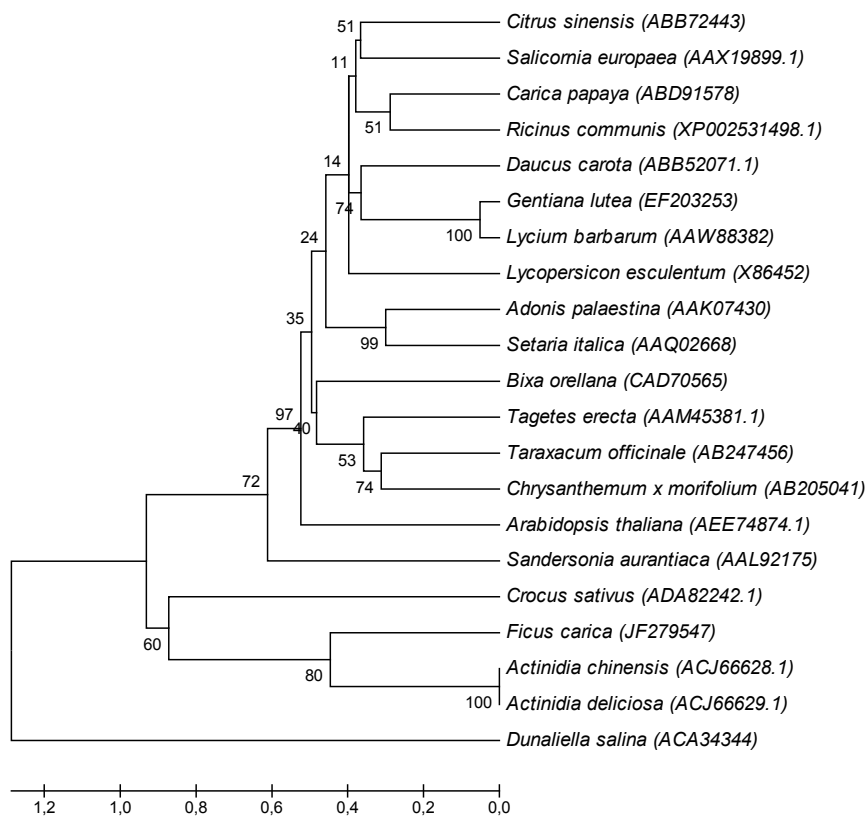


Figura 44. Árbol filogenético elaborado con MEGA a partir de las secuencias de aminoácidos de β -LCY utilizando el modelo Neighbor-Joining con distancias Jones-Taylor-Thornton.

El análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas (Figura 45), no mostro variaciones en comparación con el realizado a partir de aminoácidos. La secuencia nucleotídica de la microalga marina *D. salina* codificante para licopeno β -ciclasa, se incluyó como control externo y aparecía en una rama aislada. Finalmente, ambos análisis confirmaron que el gen β -*lcy-Fc* era parte integral de la familia de las β -LCYs.

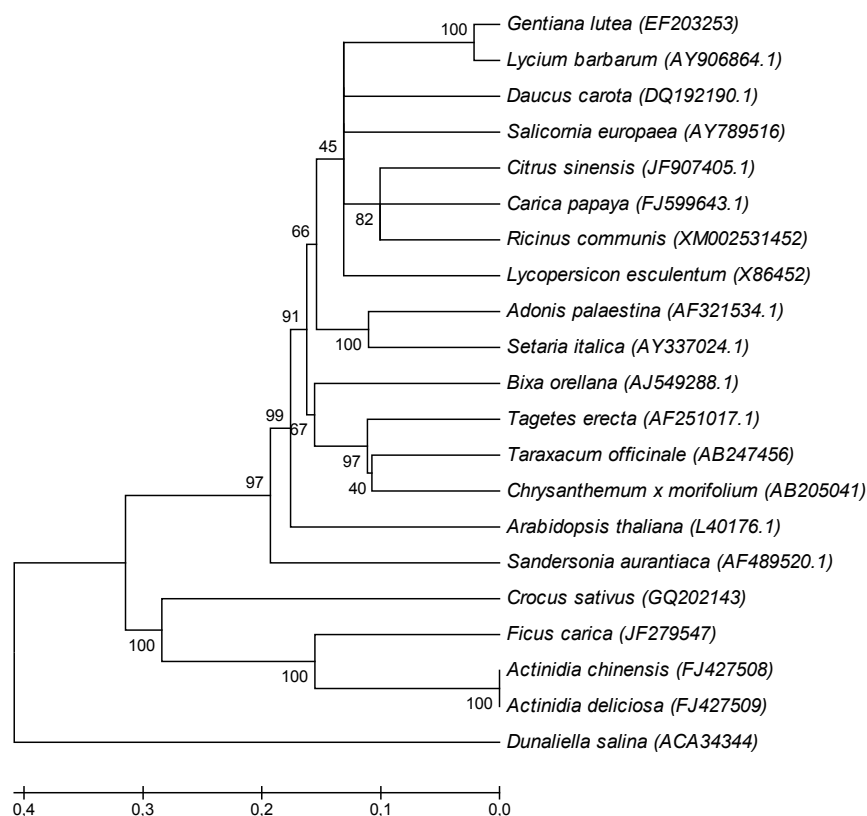


Figura 45. Árbol filogenético elaborado con MEGA a partir de las secuencias nucleotídicas de *lcy* utilizando el modelo Neighbor-Joining con distancias Kimura 2-parameter. Los valores en los nodos indican el porcentaje de remuestreo después de 1000 réplicas. El número de acceso de cada secuencia comparada se muestra entre paréntesis.

4. Actividad β -caroteno ketolasa y β -caroteno hidroxilasa de los genes *crtW* y *crtZ*

El análisis de la actividad β -caroteno ketolasa y β -caroteno hidroxilasa sobre la cepa sustrato BL-EBIL, se realizó mediante ensayo de complementación de color. La transformación de la

cepa *E. coli* BL-EBIL con el plásmido pAK96K dió como resultado la cepa BL-EBILWZ que presentó colonias de color rojo-naranja (Figura 46A). El cambio de color observado en las colonias transformadas de las colonias indicó un cambio en la composición de carotenoides. Como control negativo se utilizó la cepa BL-EBIL sin transformar (Figura 46B).

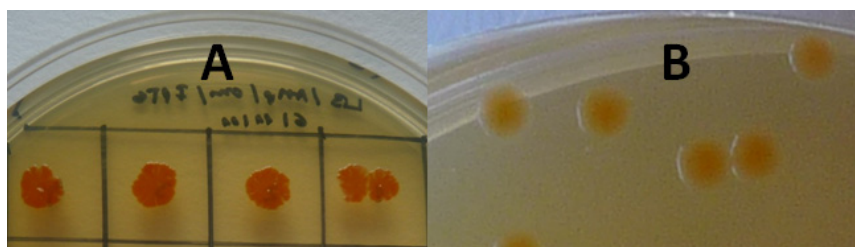


Figura 46. Color expresado por las colonias recombinantes: (A) Cepa de *E. coli* BL-EBILWZ; (B) Cepa de *E. coli* BL-EBIL.

La variación de color debido a la transformación secuencial de los carotenoides en las distintas cepas utilizadas en este trabajo fue más evidente cuando se observaron todas en conjunto (Figura 47).

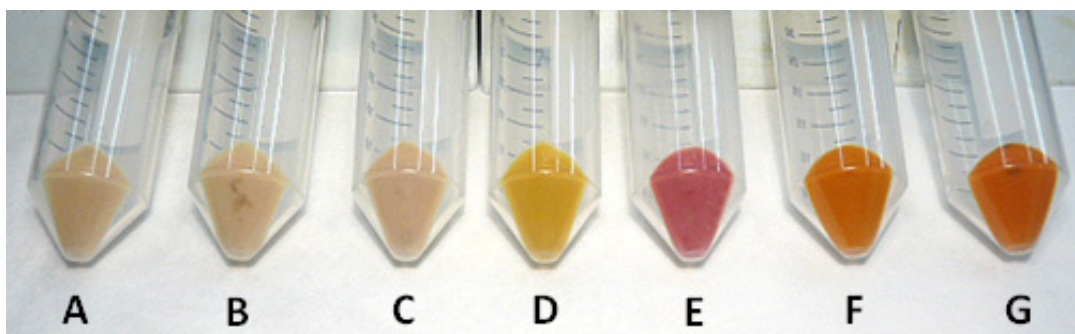


Figura 47. Cepas recombinantes de *E. coli* expresando diferentes genes de la ruta de carotenogénesis. (A) Cepa de *E. coli* BL21 (DE3); (B) Cepa de *E. coli* BL-EB; (C) Cepa de *E. coli* BL-EBP; (D) Cepa de *E. coli* BL-EBR; (E) Cepa de *E. coli* BL-EBI; (F) Cepa de *E. coli* BL-EBIL; (G) Cepa de *E. coli* BL-EBILWZ.

El análisis por HPLC confirmó, que los carotenoides presentes en el extracto bacteriano de la cepa control BL-EBIL correspondió a β -caroteno (Figura 48A). El perfil de elución de HPLC para la cepa de *E. coli* BL-EBILWZ, registró un pico, aunque en baja concentración, con un tiempo de retención de 23 min que se identificó como astaxantina (Figura 48B). Además, se identificaron otros carotenoides intermediarios como licopeno y β -caroteno, lo que indicó una conversión poco eficiente de los sustratos (Figura 48B).

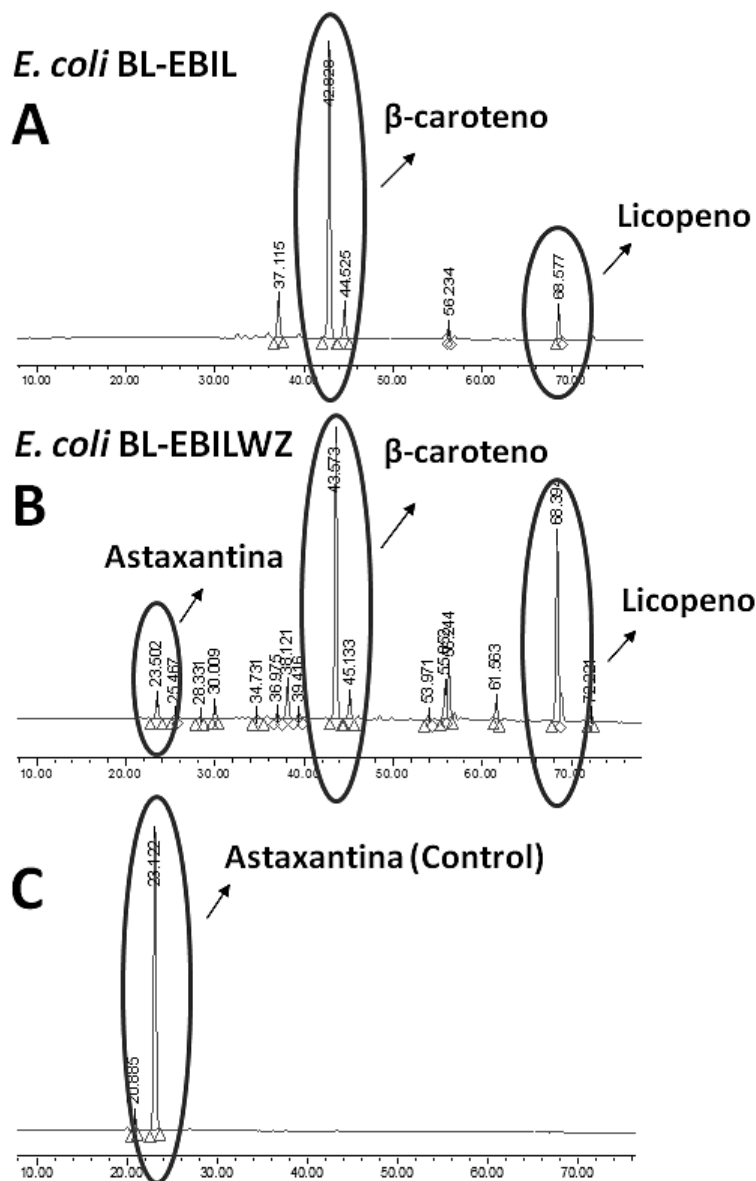


Figura 48. Cromatograma Max Plot de los carotenoides presentes en los cultivos de: (A) *E. coli* BL-EBIL; (B) *E. coli* BL-EBILWZ; (C) Patrón Astaxantina (Sigma).

5. Construcción de nuevas cepas de *Pichia pastoris* para la producción de licopeno, β -caroteno y astaxantina

Para crear cepas de *P. pastoris* productoras de carotenoides genéticamente estables, se diseñaron y construyeron diferentes plásmidos de expresión que fueron integrados en el DNA genómico de *P. pastoris*.

5.1. Construcción de plásmidos para dirigir la síntesis de licopeno

Ya que la integración en el locus GAP del DNA genómico de *P. pastoris* requería la linealización del vector en el sitio *AvrII*, para la estrategia de clonación elegida, el vector pGAPZ α A fue previamente mutado, generándose el mutante silencioso pGAPZ α A* el cual quedó desprovisto del sitio de restricción *AvrII*. El análisis de la correcta mutación del plásmido se realizó mediante digestión enzimática (Figura 50). Se observó que los clones R3 y R5 no eran digeridos por el enzima *AvrII*, luego la mutación había tenido lugar en el sitio correcto.

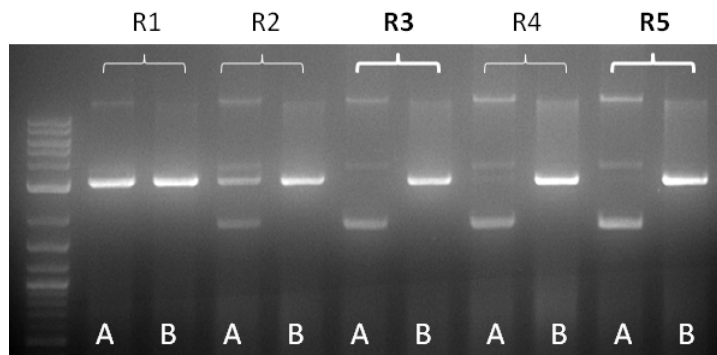


Figura 50. Digestión de 5 clones candidatos del vector mutado pGAPZA* con las endonucleasas de restricción: (A) *AvrII* y (B) *EcoRI*.

Los fragmentos de DNA con las secuencias codificantes de los genes *crtE* (909 pb), *crtB* (891 pb) y *crtI* (1479 pb) se obtuvieron mediante PCR a partir de las secuencias de *E. uredoovora* a partir del plásmido pACCRT-EIB (Misawa y Shimada, 1998) (Figura 51).

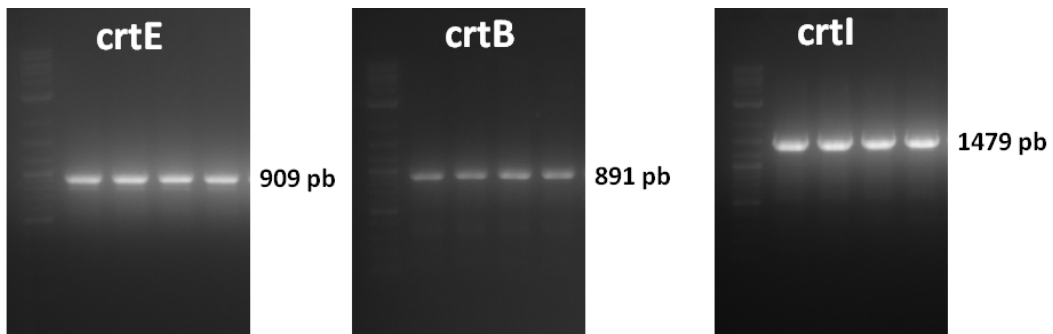


Figura 51. Electroforesis en gel de agarosa del producto de la amplificación por PCR de los genes *crtE*, *crtB* y *crtI* de *E. uredoovora* desde el plásmido pACCRT-EIB.

Estos fragmentos fueron ligados direccionalmente en los vectores, pGAPZaA (*crtE*) y pGAPZaA* (*crtB* y *crtI*). La correcta inserción de los fragmentos y su secuencia se confirmó mediante digestión enzimática y electroforesis (Figura 52). La secuenciación de los fragmentos permitió confirmar la correcta secuencia en los clones diseñados.

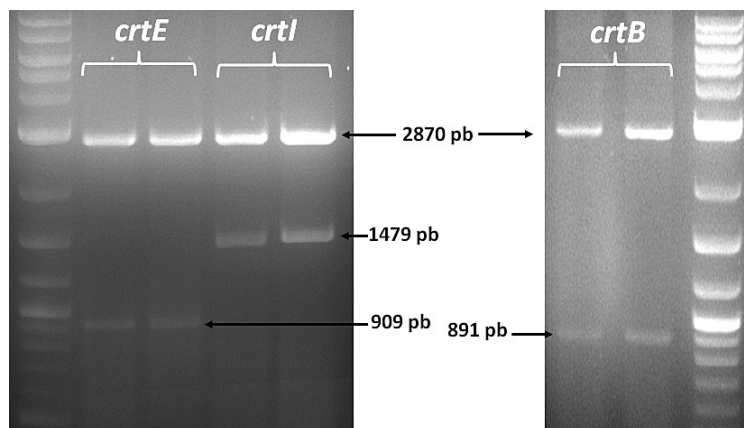


Figura 52. Doble digestión de los plásmidos pGAPZA-E, pGAPZA*-B y pGAPZA*-I con *SfiI* y *EcoRI*.

El vector de expresión pGAPZA*-I* se construyó insertando la secuencia codificante del gen fitoeno desaturasa (*crtI*) de 1479 pb en los sitios *SfuI* y *EcoRI* del vector mutado pGAPZαA* de 2870 pb. Una vez clonado, se procedió a eliminar el sitio de corte *BamHI* del gen *crtI*.

EL plásmido pGAPZA*-I* se clonó en la cepa de *E. coli* XL-10 Gold. Se comprobó la correcta eliminación del sitio de corte de *BamHI* de la secuencia del gen (Figura 53) mediante digestión enzimática y secuenciación.

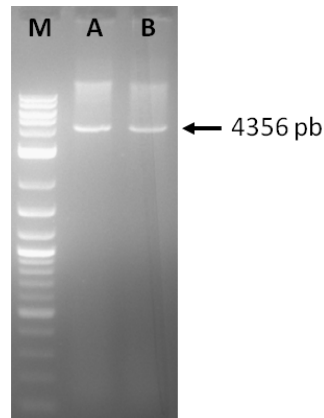


Figura 53. Digestión del clon candidato del vector pGAPZA*-I* con las endonucleasas: (A) *BamHI* y (B) *EcoRI*.

Se obtuvieron así los vectores pGAPZA-E (3662 pb), pGAPZA*-B (3768 pb) y pGAPZA*-I (4356 pb) y pGAPZA*-I* (4356 pb) que expresaban los genes *crtE*, *crtB*, *crtI* y *crtI** respectivamente, bajo el control del promotor constitutivo GAP y del terminador AOX-1.

El fragmento correspondiente al gen *crtB* y comprendido entre las dianas *BamHI* y *BglII* del plásmido pGAPZA*-B, fue subclonado en el sitio *BamHI* del plásmido pGAPZA-E.

La digestión inicial con *BamHI* y *BglII* del plásmido pGAPZA*-B originó dos fragmentos de un tamaño de 1850 pb y 1918 pb que aparecieron como una sola banda en un gel de agarosa, (Figura 54) por lo que fue necesario llevar a cabo una segunda digestión con la endonucleasa *SmaI* (Figura 55). Esta digestión permitió la clonación del fragmento *crtB* de 1850 pb del plásmido pGAPZA*-B en el sitio *BamHI* del plásmido pGAPZA-E.

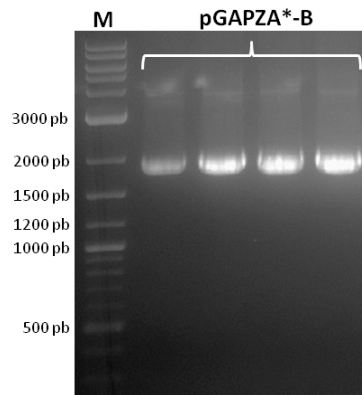


Figura 54. Fragmentos de tamaños semejantes producto de la digestión con *Bam*HI y *Bg*III del plásmido pGAPZA*-B.

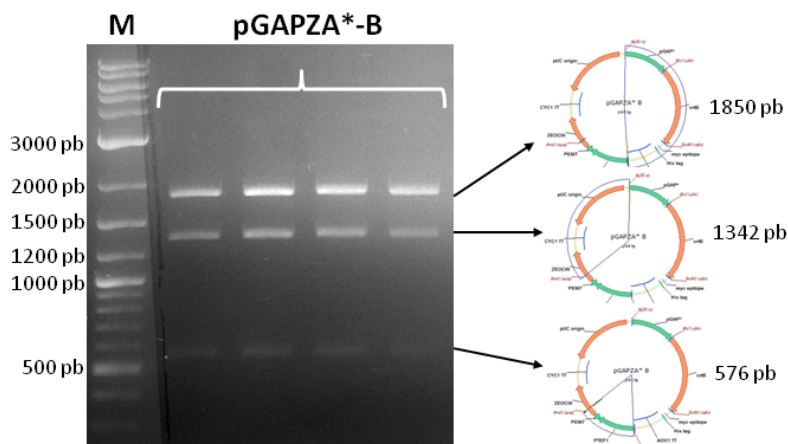


Figura 55. Digestión con la endonucleasa *Sma*I del plásmido pGAPZA*-B pre-digerido con las endonucleasas *Bam*HI y *Bg*III.

La construcción resultante (pGAPZA-EB) se clonó en *E. coli* Top 10. Se seleccionó un clon que portaba el inserto en la orientación correcta.

Paralelamente se realizó una digestión con *Bam*HI y *Bg*III del plásmido pGAPZA*-I* y se aisló el fragmento contenido entre los lugares de corte de estas enzimas (2438 pb) (Figura 56). El fragmento obtenido fue purificado a partir de geles de agarosa y subclonado en el sitio de corte *Bam*HI del vector pGAPZA-EB obteniéndose así la construcción pGAPZA-EBI*.

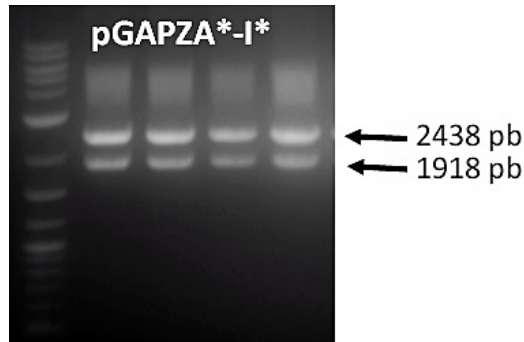


Figura 56. Digestión del vector pGAPZA*-I* con las endonucleasas *Bam*HI y *Bgl*II.

El plásmido pGAPZA-EBI* mostró un tamaño de 8079 pb, portando las secuencias codificantes de los genes *crtE*, *crtB* y *crtI** y con un sitio único de corte *Avr*II. El plásmido recombinante pGAPZA-EBI portaba, pues, la ruta de biosíntesis de carotenoides para inducir en la levadura *P. pastoris* X-33 la producción de licopeno (Figura 57).

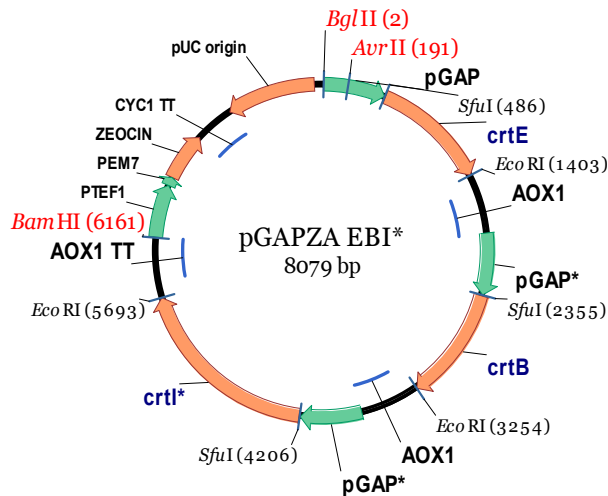


Figura 57. Plásmido recombinante pGAPZA-EBI* con la ruta de biosíntesis de carotenoides para inducir en la levadura *P. pastoris* X-33 la producción de licopeno.

5.2. Construcción de plásmidos para dirigir la síntesis de β -caroteno

El vector de expresión pGAPZA*-L* se construyó insertando la secuencia codificante del gen licopeno β -ciclase (*crtL*) de 1488 pb en los sitios *Sfu*I y *Xba*I del vector mutado pGAPZ α A* y una vez clonado en este vector se mutó el sitio *Bgl*II del gen *crtL*.

Para confirmar que el inserto mutado (*crtL**) clonado en el vector pGAPZA*-L* se correspondía con el tamaño del gen *crtL*, el vector pGAPZA*-L*, se realizó una doble digestión con las enzimas de restricción *SfuI* y *XbaI* (Figura 58) y secuenciación para comprobar que se había eliminado el sitio de corte de la enzima *BglIII*.

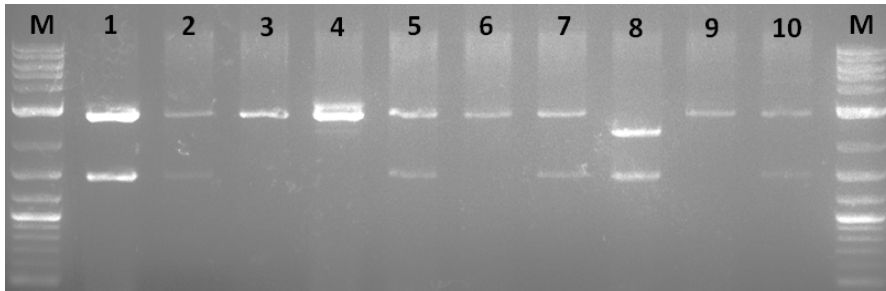


Figura 58. Digestión del vector pGAPZA*-L* con las endonucleasas *EcoRI* y *XbaI*.

El vector pGAPZA*-L* fue entonces digerido con las endonucleasas *BamHI* y *BglIII* y subclonado en el sitio *BamHI* del vector pGAPZA-EBI*. Finalmente, se obtuvo el plásmido recombinante pGAPZA-EBI*L* (10332 bp) con la ruta de biosíntesis de carotenoides para inducir en la levadura *P. pastoris* X-33 la producción de β -caroteno (Figura 59).

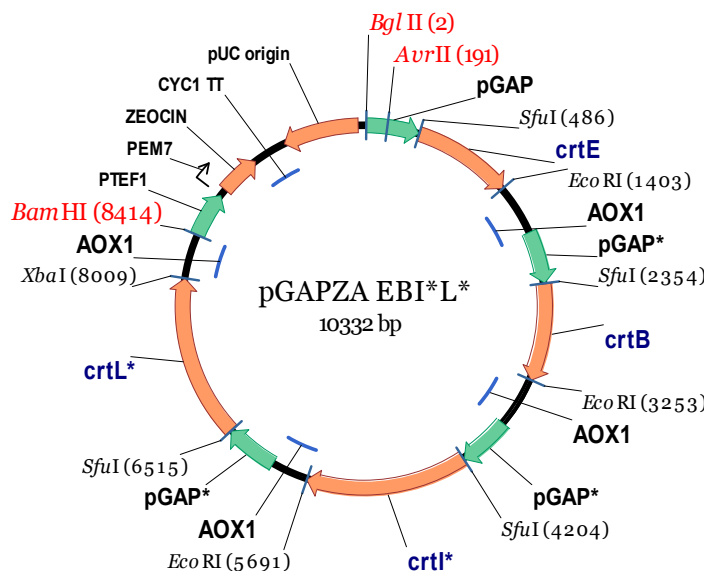


Figura 59. Plásmido recombinante pGAPZA-EBI*L* (10332 bp), diseñado y construido con la ruta de biosíntesis para la producción en *P. pastoris* X-33 de β -caroteno.

5.2. Construcción del plásmido para dirigir la síntesis de astaxantina

Los fragmentos de DNA con las secuencias codificantes para *crtW* y *crtZ* de la *A. aurantiacum* fueron amplificados por PCR a partir el plásmido pAK96K (Misawa *et al.*, 1995b) y tras su digestión con las enzimas *SfuI* y *EcoRI*, fueron ligados en los sitios *SfuI* y *EcoRI* de los vectores pGAPZαA (*crtW*) y pGAPZαA* (*crtZ*) bajo el control del promotor constitutivo GAP y del terminador AOX-1, generando los plásmidos de expresión pGAPZA-W y pGAPZA*-Z (Figura 60).

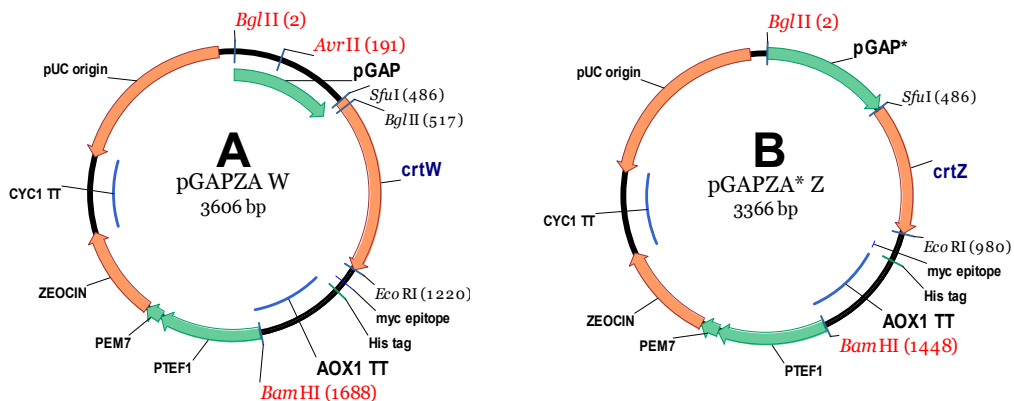


Figura 60. Plásmidos recombinantes; (A) Gen *crtW* de *A. aurantiacum* clonado en el plásmido pGAPZA; (B) Gen *crtZ* de *A. aurantiacum* clonado en el plásmido pGAPZA*.

El fragmento comprendido entre las dianas *BamHI* y *BglII* del plásmido pGAPZA*-Z, fue subclonado en el sitio *BamHI* del plásmido pGAPZA-W y se obtuvo el plásmido recombinante, pGAPZA-WZ (5046 bp) (Figura 61), con los genes carotenogénicos complementarios para inducir en la levadura Pp-EBIL (productora de β -caroteno) la producción de astaxantina.

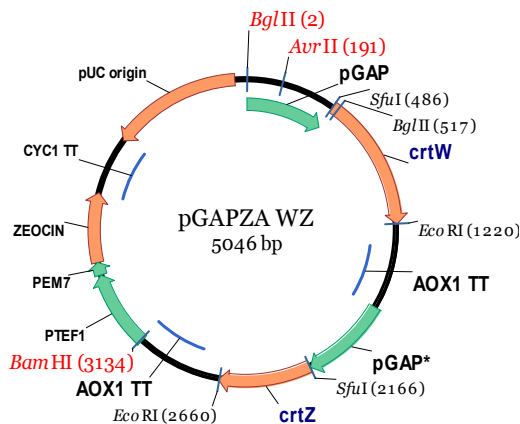


Figura 61. Plásmido recombinante pGAPZA-WZ.

Para comprobar el tamaño correcto de los vectores pGAPZA-W (3606 pb), pGAPZA*-Z (3366 pb) y pGAPZA-WZ (5046 bp), estos fueron digeridos con las endonucleasas *AvrII* y *BspHI*. Las tres construcciones presentaron un sitio único de corte en el vector y un tamaño que se corresponde con el esperado para cada plásmido (Figura 62).

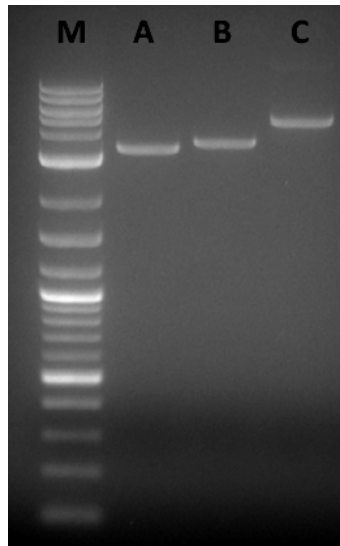


Figura 62. (M): Marcador de peso molecular; (A) Vector pGAPZA*-Z digerido con la enzima *BspHI*; (B) Vector pGAPZA-W digerido con la enzima *AvrII*; (C) Vector pGAPZA-WZ digerido con la enzima de restricción *AvrII*.

El análisis del uso de los codones de *P. pastoris* y las secuencias utilizadas mediante el programa Codon Usage Analyser 2.0 (Fuhrmann *et al.*, 2004) (Figura 63), mostró las mayores diferencias con las secuencias los genes *crtW* (β -caroteno ketolasa) y *crtZ* (β -caroteno hidroxilasa) de la bacteria marina *A. aurantiacum* y la menor diferencia fue con la secuencia de la planta *F. carica*, como era de esperar, al ser este un gen eucariota.

Los genes de la bacteria *E. uredovora* mostraron diferencias bajas comparadas con *A. aurantiacum* y en general ambas bacterias presentaron diferencias muy semejantes entre cada uno de sus genes.

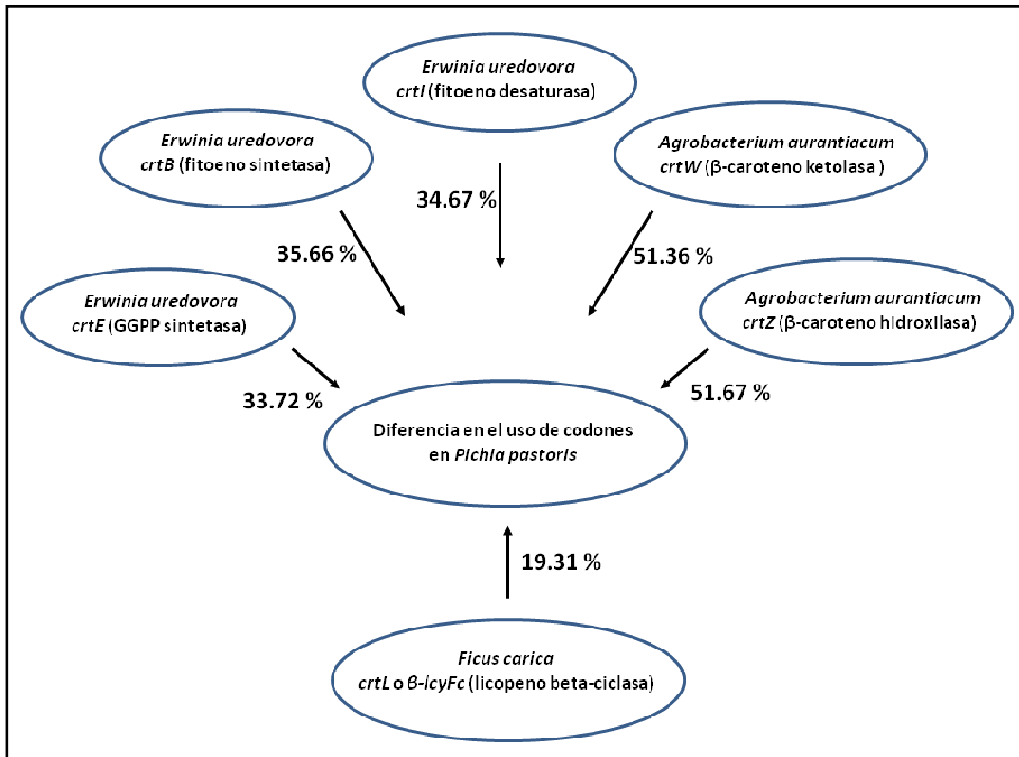


Figura 63. Diferencia en el uso de codones entre *P. pastoris*.

5.3. Selección y caracterización de clones recombinantes de *Pichia pastoris*

Las construcciones de DNA, conteniendo diferentes combinaciones de genes carotenogénicos fueron integrados en el DNA genómico de las cepas *P. pastoris* X-33 o de *P. pastoris* Pp-EBIL.

Los cultivos de las células no recombinantes (control negativo), presentaron el típico color blanco normal de la cepa X-33 (Fig. 64A). Sin embargo, el cultivo de la cepa Pp-EBI, resultante de la integración del plásmido pGAPZA-EBI* en el genoma de *P. pastoris* X-33, presentó un visible color rosa (Fig. 64B), mientras que el cultivo de la cepa Pp-EBIL recombinante, producto de la integración del plásmido pGAPZA-EBI*L* en el genoma de *P. pastoris* X-33 presentó color naranja (Fig. 64C).

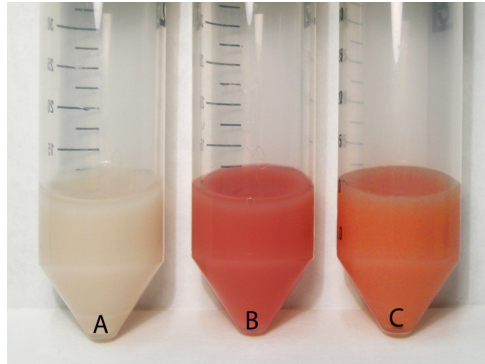


Figura 64. Cultivos celulares de *P. pastoris*. (A) Cepa de *P. pastoris* X-33 silvestre, no manipulada; (B) Levadura recombinante transformada con el plásmido pGAPZA-EBI*; (C) Levadura recombinante transformada con el plásmido pGAPZA-EBI*L*.

La integración del plásmido pGAPZA-WZ en la cepa Pp-EBIL, productora de β -caroteno, dió como resultado una nueva cepa recombinante que produce colonias de color rojo intenso la cual se denominó Pp-EBILWZ (Figura 65).

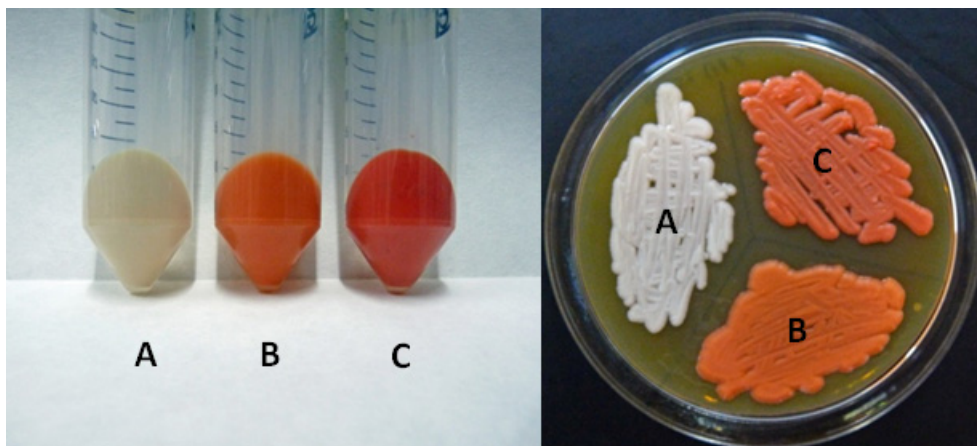


Figura 65. (A) Cepa silvestre de *P. pastoris* X-33; (B) Cepas recombinantes Pp-EBIL y (C) Pp-EBILWZ.

Los análisis realizados por PCR de las cepas Pp-EBI, Pp-EBIL y Pp-EBILWZ, confirmaron la presencia de 3, 4 y 6 genes en el DNA genómico de estas levaduras transformantes, respectivamente.

Las colonias transformantes Pp-EBIL, no presentaron diferencias apreciables en el crecimiento con respecto a la cepa silvestre X-33, sin embargo, la cepa Pp-EBILWZ mostro un crecimiento más lento bajo las mismas condiciones de cultivo (Figura 66).

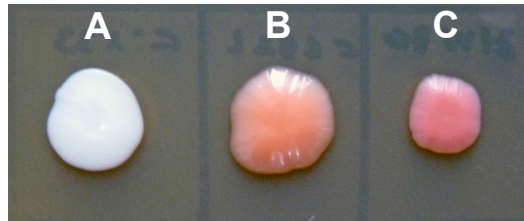


Figura 66. Diferencia de crecimiento entre cepas de *P. pastoris*. (A) Cepa X-33 silvestre; (B) Cepa recombinante Pp-EBIL; (C) Cepa recombinante Pp-EBILWZ.

5.4. Extracción de carotenoides y análisis por HPLC

Las concentraciones específicas de licopeno y β -caroteno obtenidas a partir de células rotas con el tratamiento 1, se encontró que eran similares a las obtenidas a partir de células de levadura tratadas por ultrasonidos. En ambos casos, la concentración de licopeno obtenido fue de 780 $\mu\text{g/g}$ célula (peso seco) y la concentración de β -caroteno fue de 210 $\mu\text{g/g}$ célula (peso seco). Los mejores resultados se obtuvieron con el tratamiento con DMSO, con el cual se obtuvo una concentración de 1141 $\mu\text{g/g}$ célula (peso seco) de licopeno y 339 $\mu\text{g/g}$ célula (peso seco) de β -caroteno. La concentración de astaxantina obtenida a partir de células Pp-EBILWZ, fue de 3.7 $\mu\text{g/g}$ célula (peso seco) de astaxantina. Además se observó la presencia de pequeñas cantidades de cantaxantina y ausencia de zeaxantina.

El análisis por HPLC-PDA de los carotenoides presentes en las colonias recombinantes, reveló que la cepa de *P. pastoris* X-33 transformada con el plásmido pGAPZA-EBI* era capaz de producir licopeno (Figura 67A). Mientras que la cepa naranja Pp-EBIL además de sintetizar licopeno, producía β -caroteno como pigmento mayoritario (Figura 67B). Finalmente, el análisis por HPLC-PDA de los carotenoides presentes en la cepa Pp-EBIL transformada con el plásmido pGAPZA-WZ, mostró que la cepa recombinante era capaz de sintetizar tanto los carotenos, licopeno y β -caroteno, como la xantófila astaxantina (Figura 67C).

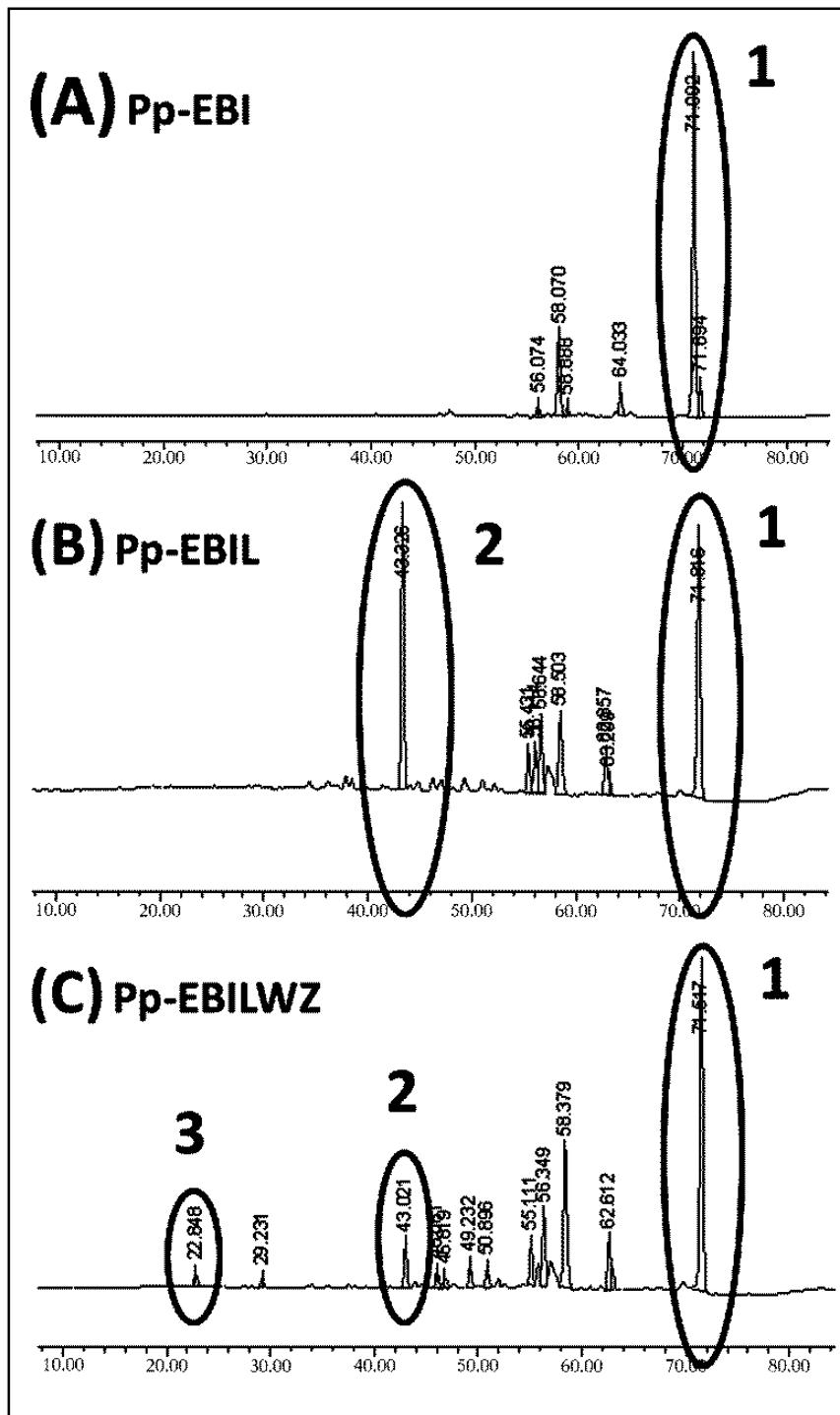


Figura 67. Cromatogramas de las cepas recombinantes de *P. pastoris*. (A) Pp-EBI; (B) Pp-EBIL y (C) Pp-EBILWZ. Pico 1: Licopeno, Pico 2: β -caroteno, Pico 3: Astaxantina.

Es interesante destacar, que durante los experimentos se observó, que en algunas cepas de Pp-EBIL, aunque mantenían la coloración y por consiguiente la producción de carotenoides, se perdía la resistencia al antibiótico y viceversa.

Este hecho fue utilizado como fuente de selección de transformantes. Se demostró que si se transformaban células en las que se mantenía la resistencia a la zeocina (100 µg/mL) pero perdían el color, las transformantes crecidas en medio con antibiótico al doble de la concentración (200 µg/mL), servía para realizar una selección por color más específica, ya que las colonias portadoras de secuencias codificantes en las que se expresaban las proteínas deseadas, crecían de color rojizo sobre un fondo de colonias blancas (Figura 68).

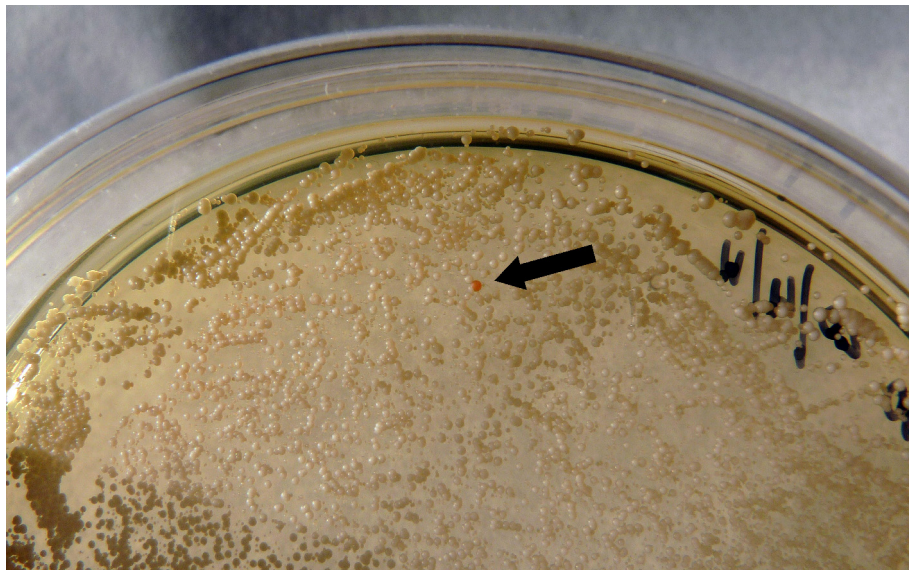


Figura 68. Colonia transformante de *P. pastoris* Pp-EBILWZ crecida en placa de YPDS con zeocina (200 µg/mL) de color rojizo sobre un fondo de células blancas.

DISCUSIÓN

La producción y la síntesis de nuevos carotenoides puede aumentar rápidamente con el uso de la tecnología del ADN recombinante, pero antes de esto, los genes para su biosíntesis deben ser clonados y caracterizados, a partir de plantas y/o microorganismos.

En este estudio, uno de los objetivos fue la clonación y expresión del gen ζ -caroteno desaturasa de *F. carica*.

La secuencia nucleotídica y la secuencia estimada del polipéptido de ZDS-Fc junto con otras ζ -caroteno desaturasa vegetales mostraron que compartían al menos tres características comunes demostrando que este tipo enzimático, ZDS, parece estar altamente conservada en plantas superiores (Cong *et al.*, 2009). Una característica común fue la presencia en el extremo N-terminal de un péptido señal de importación a plastidos, típico también de otras enzimas involucradas en la biosíntesis de carotenoides en plantas (Fraser y Bramley, 2004; Bouvier *et al.*, 2005; Sandmann *et al.*, 2006). También está conservado un dominio piridin dinucleótido típico de unión (FAD vinculante de dominio), con una estructura secundaria β -hoja/ α -hélice/ β -hoja (Wirenga *et al.*, 1986; Matthews *et al.*, 2003).

El dominio NADB que se encuentra en numerosas deshidrogenasas de rutas metabólicas como la glicólisis y muchas otras enzimas redox, presentó una región de unión conservada GXGXXG, en la cual se ha descrito que las dos primeras glicocolas participan en la unión NAD(P) y la tercera facilita el plegamiento de la α -hélice a hoja- β . Las proteínas de esta familia generalmente contienen un segundo dominio además del dominio NADB, el cual es responsable de la unión específica a un sustrato y cataliza una reacción enzimática particular.

Para el extremo C-terminal, el dominio propuesto por Yan *et al.*, (2011) como dominio de unión a carotenoides, apareció perfectamente conservado en la secuencia ZDS de *F. carica* al igual sucede en ZDSs vegetales tales como *C. papaya*, *C. unshiu*, *D. carota*, *A. thaliana* y *L. esculentum*.

Al comparar la relación evolutiva entre las secuencias de ZDSs, el árbol filogenético mostró que las secuencias nucleotídica y aminoacídica de ζ -caroteno desaturasa de *F. carica* se agrupaba correctamente como parte integral de la familia de ZDSs de plantas y apareció más estrechamente relacionada con otros árboles dicotiledóneas como *C. unshiu*, *J. curcas*, *C. papaya* y *Malus x domestica* que con el resto de ZDSs de plantas.

Además, contrariamente a lo esperado, las proteínas ZDSs de plantas monocotiledóneas como *N. tazetta* y *Oncidium Gower Ramsey* aparecían más estrechamente relacionadas con la

desaturasas de plantas dicotiledóneas como *A. thaliana* y *Brassica rapa* que con otras monocotiledóneas como *Sorghum bicolor* o *T. aestivum*. Esta agrupación no se mantenía cuando se llevaba a cabo el análisis nucleotídico en el que las secuencias de plantas monocotiledóneas aparecen mejor agrupadas entre ellas que con las dicotiledóneas. Esto podría tener su explicación debido a los cambios silentes de DNA a proteína.

Una vez identificada la secuencia y con el fin de construir una proteína de fusión y expresarla en *E. coli* se eligió el vector de expresión pET21a. La elección de este plásmido para la co-expresión de las proteínas carotenogénicas, se basó también en el análisis de los grupos de incompatibilidad. Los plásmidos de las cepas BL-EBP, BL-EBR y BL-EBI portan el replicón p15A proveniente del plasmido pACYC y derivados con un número entre 10-12 copias por célula, mientras que el plásmido pET21-zds, derivado de pET21a, porta el replicón pMB1 de la serie pBR, por lo que ambos plásmidos pertenecen a distintos grupos de incompatibilidad y pueden co-existir perfectamente ya que no comparten los mismos elementos replicativos. Sin embargo, cuando se transformó la cepa BL-EBIL con el plásmido pAK96K, fueron tres los vectores que co-existieron, dos de los cuales pertenecían al mismo grupo de incompatibilidad.

El vector pAK96K proviene del plásmido pBluescript el cual lleva el replicón ColE1 con igual número de copias por célula que pET21a (15-20), por lo que son incompatibles ya que comparten los mismos elementos replicativos y no coexisten en la misma célula en ausencia de presión selectiva; en efecto, en un primer momento, ambos compiten por la misma maquinaria de replicación y de reparto entre células hijas y, dado que se trata de fenómenos estocásticos, antes o después el número de moléculas de cada plásmido en una célula determinada se descompensará; a partir de aquí, el que se encuentre en mayor número de copias tendrá más probabilidad de interactuar con el complejo replicativo y, al cabo de varias generaciones, acabará siendo el único poblador de las células descendientes de aquella. Así los replicones ColE1 y pMB1 son incompatibles entre sí, pero cada uno de ellos es perfectamente compatible con el replicón p15A.

Con el fin de probar la actividad enzimática *in vivo* de nuestra proteína recombinante ZDS-Fc el ensayo se basó en las diferencias de coloración entre los distintos carotenoides. Se construyeron cinco cepas recombinantes de *E. coli* (BL-EBP, BL-EBR, BL-EBI, BL-EBPZ, y BL-EBRZ, (Tabla 1). Las dos primeras cepas bacterianas acumulaban ζ -caroteno y neurosporeno, respectivamente, mientras que BL-EBI acumulaba licopeno. Las dos últimas cepas (BL-EBPZ, y BL-EBRZ), que co-expresan nuestra proteína recombinante ZDS-Fc

fueron capaces de convertir el ζ -caroteno en neurosporeno y licopeno y el neurosporeno en licopeno, respectivamente.

Estos resultados nos permitieron demostrar que esta desaturasa de planta cataliza de manera eficiente los dos últimos pasos de desaturación de la ruta de biosíntesis de carotenoides que conducen a la producción de licopeno.

Continuando con la ruta de biosíntesis de carotenoides, la ciclación del licopeno es un paso clave en la síntesis y en la regulación de la composición de carotenoides en plantas (Cunningham, 2002; Bouvier *et al.*, 2005). El licopeno es el principal sustrato para la formación de los carotenoides cíclicos. En función de la enzima que actúe pueden producirse dos tipos de anillos en los extremos de la molécula de licopeno. La enzima licopeno β -ciclase (β -LCY) cataliza la introducción de dos anillos β - mientras que licopeno ε -ciclase (ε -LCY) cataliza la introducción de un anillo ε -. Generalmente, la enzima ε -LCY únicamente puede actuar sobre uno de los extremos del licopeno, generando δ -caroteno, mientras que β -LCY puede actuar sobre los dos extremos de la molécula o sobre el extremo lineal del δ - caroteno, produciendo β - y α -caroteno, respectivamente. Solamente en algunas especies de *L. sativa* se ha descrito la existencia de una ε -LCY capaz de introducir dos anillos ε - en ambos extremos de la molécula de licopeno, generándose lactucaxantina (Cunningham y Gantt, 2001).

En este trabajo se ha aislado, clonado y expresado la secuencia codificante completa de un gen con actividad licopeno β -ciclase, Este gen (*β -lcy-Fc*) fue clonado a partir de RNA total extraído de hojas frescas de *F. carica* y mediante ensayos de complementación heteróloga en *E.coli*, ha sido comprobada la funcionalidad de la correspondiente enzima.

El gen *β -lcy-Fc* presentó un marco de lectura abierto de 1488 pb que codifica un polipéptido de 496 aminoácidos. La secuencia protéica de β -LCY de *F. carica* fue entre un 68 % y un 76 % idéntica a las secuencias β -LCYs de otras plantas publicadas en las bases de datos y presentó en el extremo amino-terminal un péptido señal de importación a plastos. Este tipo de señales de importación se encuentran en todas las enzimas implicadas en la biosíntesis de carotenoides en plantas (Fraser y Bramley, 2004; Bouvier *et al.*, 2005; DellaPenna y Pogson, 2006; Howitt y Pogson, 2006; Sandmann *et al.*, 2006) y en el caso concreto de las β -LCYs, suele encontrarse en los primeros 50-100 aminoácidos de la secuencia (Hugueney *et al.*, 1995; Krubasik y Sandmann, 2000). Esta señal de importación a plastos, que no se encuentra en β -LCYs de bacterias ni de cianobacterias (Hugueney *et al.*, 1995), no parece esencial para la actividad catalítica β -LCY (Cunningham *et al.*, 1996). Sin embargo, podrían constituir

dominios implicados en la interacción enzima-sustrato y/o en la catálisis (Huguene *et al.*, 1995; Cunningham *et al.*, 1996; Bouvier *et al.*, 1997).

Según estudios previos, las β -LCYs de plantas poseen hélices α con localización transmembrana (Huguene *et al.*, 1995; Cunningham *et al.*, 1996). Sin embargo, y de acuerdo con los resultados de Inoue *et al.*, (2006), el paquete informático TMHMM no predijo localización transmembrana de ninguna de las hélices α del extremo carboxi-terminal de β -LCY de *F. carica*. Esta ausencia de hélices transmembrana sugiere que la enzima β -LCY no se encuentra anclada a la membrana y concuerda con los datos que indican que la asociación de β -LCY de algunas plantas a la membrana es solo periférica (Inoue *et al.*, 2006).

Dentro de esta secuencia, también fue posible identificar una región conservada de β -LCY de plantas, que se ha propuesto como esencial para la asociación de las β -LYCs a la membrana y también para su actividad catalítica (Beyer *et al.*, 1991; Huguene *et al.*, 1995).

Para el análisis *in vivo* de la actividad licopeno β -ciclasa de la proteína se realizaron ensayos de complementación de color. Este tipo de ensayos, utilizados con éxito en otros trabajos (Cunningham *et al.*, 1993; Huguene *et al.*, 1995; Pecker *et al.*, 1996), se basa en las diferencias de coloración entre los distintos carotenoides, así el licopeno (sustrato de las LCYs) es rojo mientras que el β -caroteno (producto de la β -LCY) es naranja.

Para llevar a cabo estos ensayos se transformó la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* con el plásmido pACCRT-EIB (Misawa y Shimada, 1998), generando una cepa productora de licopeno que se denominó BL-EBI. Las colonias de esta cepa presentaron, tras la incubación, coloración rojiza debido a la acumulación de licopeno. Posteriormente la misma cepa BL-EBI fue co-transformada con el plásmido pET21-lcy β portador de la región codificante correspondiente al gen licopeno β -ciclasa de *F. carica*, lo que resultó en colonias de color naranja. Este cambio de color de las colonias de *E. coli* BL-EBI portadora del plásmidos pET21-lcy β indicó conversión de licopeno a otros carotenoides. Mediante este razonamiento, en todos los ensayos exitosos de complementación de color, la actividad enzimática se hizo evidente por el cambio de color en los cultivos de *E. coli* recombinante, lo que se atribuyó a la transformación y acumulación de diferentes pigmentos.

En el análisis de los carotenoides presentes en los cultivos bacterianos de BL-EBI expresando β -LCY de *F. carica* se detectó β -caroteno y no se detectó γ -caroteno, que resultaría de la β -ciclación de un único extremo del licopeno, a pesar de la gran cantidad de licopeno acumulada en estas células. Esta observación indicaría que una molécula de licopeno, que es ciclada en

un extremo tiene una alta probabilidad de ser ciclada también en el otro extremo, indicando que β -LCY de *F. carica* es una proteína con actividad licopeno β -biciclasa. La posibilidad de que la proteína licopeno ciclasa funcione como un complejo homodimérico sería una explicación de este resultado (Gallagher *et al.*, 2003).

Nuestros ensayos indicaron que el gen β -*lcy-Fc* codifica proteínas funcionales capaces de ciclar el licopeno en ambos lados de la molécula con una tasa de conversión estimada del 90 %, que es semejante a lo que ocurre en otras β -LCYs de plantas descritas hasta ahora (Hugueney *et al.*, 1995; Rodrigo *et al.*, 2004; Ahrazem *et al.*, 2009; Alquezar *et al.*, 2009; Ampomah-Dwamena *et al.*, 2009).

El contenido estimado de β -caroteno en los cultivos de la cepa *E. coli* BL-EBIL fue de 529 μ g /g célula (peso seco). Este resultado fue mayor a los obtenidos para otras cepas recombinantes de *E. coli* productoras de carotenoides (Misawa *et al.*, 1995; Schnurr *et al.*, 1996; Misawa y Shimada, 1998), portadoras de los genes *crtE*, *crtB*, *crtI* y *crtY* de *E. uredovora* pero más bajo en comparación con el obtenido en cepas de *E. coli* portadoras de los genes de *E. uredovora*, y además del gen *ipi* de *H. pluvialis* que codifica para IPP isomerasa (Misawa y Shimada, 1998) en las que se obtuvieron concentraciones de 1310 μ g /g célula (peso seco).

Es interesante señalar que para otras plantas con fruto se han descrito dos genes que codifican β -LCYs funcionales: β -LCY y B (S1 β -LCY2) en tomate (*L. esculentum*) y β -LCY y CCS en pimiento (*C. annuum*) (Hugueney *et al.*, 1995; Bouvier *et al.*, 1997; Ronen *et al.*, 2000). Tanto en tomate como en pimiento uno de los genes β -LCY se expresa en tejidos cloro- y cromoplásticos (β -LCY), mientras que el otro (B y CCS) presenta una expresión específica de tejido cromoplástico (Deruere *et al.*, 1994; Hugueney *et al.*, 1995; Ronen *et al.*, 2000).

Así, para una mejor caracterización de los genes de carotenogénesis de *F. carica*, futuras investigaciones deberían estar centradas en la relación entre el contenido de carotenos y la abundancia del RNA mensajero de los genes de la ruta biosintética (Kato *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 2004), diferencias en la expresión génica en distintos estados de desarrollo de *F. carica* y en diferentes tejidos como raíces, hojas o frutos, así como la existencia de otros genes funcionales de *F. carica* que puedan codificar para isoformas de β -LCY o ZDS y que se expresen de forma diferencial y específica en algún tejido cromo- y/o cloroplástico.

Sobre la metodología de complementación de color utilizada en este estudio basada en la gran similitud bioquímica del citoplasma de *E. coli* con respecto a los plastos (Gallagher *et al.*, 2003), los ensayos de expresión heteróloga en *E. coli* fueron un excelente sistema para

identificar la actividad de proteínas carotenogénicas, (Cunningham *et al.*, 1993; Huguenev *et al.*, 1995; Cunningham *et al.*, 1996; Pecker *et al.*, 1996; Ronen *et al.*, 1999; Bouvier *et al.*, 2000; Ronen *et al.*, 2000; Cunningham y Gantt, 2001; Inoue *et al.*, 2006).

Sin embargo, existen algunos puntos críticos al momento de utilizar esta metodología como que en este sistema experimental, las enzimas no son ensambladas, procesadas ni modificadas transcripcionalmente del mismo modo en que lo serían en las células vegetales. Adicionalmente, existen una serie de factores que influyen claramente en los ensayos funcionales en *E.coli*, como el plásmido utilizado para la expresión, las condiciones de crecimiento e incluso la cepa de *E.coli* que se utilice (Wurtzel *et al.*, 1997). En este estudio se observó que la acumulación de carotenoides en todas las cepas recombinantes estudiadas era dependiente de la temperatura a la que las bacterias se cultivaron. Todas las cepas recombinantes acumularon mayor cantidad de pigmentos cuando se cultivaron a 28 °C en la oscuridad en vez de a 37 °C.

Para el gen β -lcy-Fc, al igual que para el gen *zds-Fc*, la elección del plásmido para la co-expresión de las proteínas carotenogénicas, se basó en el análisis de los grupos de incompatibilidad, así el plásmido contenido en la cepa BL-EBI lleva el replicón *p15A* con un número de copias por célula entre 10 y 12, mientras que pET21-lcy β lleva el replicón *pMB1* con un número de copias por célula entre 15 y 20. Esta combinación permitió la perfecta co-existencia de ambos plásmidos dentro de la misma cepa ya que no compartían los mismos elementos replicativos.

Finalmente, se puede concluir que el gen β -lcy-Fc codifica para una proteína licopeno β -ciclasa capaz de sintetizar β -caroteno, un pigmento de alto interés industrial y de gran importancia en la salud y la nutrición humana y animal.

En resumen podríamos decir que, aunque muchos estudios han demostrado con éxito un incremento en la producción de carotenoides aumentado el aporte de sustratos o mediante cultivos de cepas mutadas (Calo *et al.*, 1995_{bc}), han de tenerse en cuenta otros factores limitantes a la hora de unificar todas estas aproximaciones en un único sistema que permita una producción eficiente de diferentes isoprenoides en microorganismos y se convierta en una técnica biotecnológica madura (Giuliano *et al.*, 2008). Por ejemplo, condiciones energéticas, desajustes metabólicos causados por la disponibilidad limitada de sustratos, almacenamiento celular, el acúmulo de intermediarios tóxicos, limitado conocimiento sobre la regulación de la síntesis de carotenoides y alteraciones morfológicas por la necesidad de almacenar productos

lipofílicos en membranas dada la inexistencia de mecanismos naturales para el secuestro y acumulación de estos compuestos (Klein- Marcuschamer *et al.*, 2007).

Futuras aproximaciones para una producción de pigmentos a gran escala en sistemas bacterianos requerirán quizás, modificar la capacidad de almacenamiento de *E. coli* o bien dotar a las bacterias de proteínas de unión a carotenoides solubles como las presentes en bacterias fotosintéticas (Wu y Krogmann, 1997).

En esta investigación, también se quiso evaluar la expresión de genes de carotenogénesis en un huésped eucariota. Para esto, se evaluaron las diferentes opciones existentes y se decidió optar por la levadura metilotrófica *P. pastoris* ya que se trata de un microorganismo unicelular de rápido crecimiento y de bajo coste de cultivo tal como ocurre con algunas bacterias. Sin embargo *P. pastoris* es un microorganismo eucariota y por lo tanto, desarrolla muchos de los mecanismos de modificación post-traduccionales de los eucariotas superiores (Cregg *et al.*, 2000; Lin-Cereghino y Cregg, 2000). Por ello, muchas de las proteínas eucariotas expresadas en *P. pastoris* son plegadas, procesadas y ensambladas como moléculas funcionales cuando son sintetizadas por esta levadura (Cregg, 2007).

A diferencia de *E. coli*, *P. pastoris* exhibe un metabolismo de isoprenoides más eficiente, la temperatura de cultivo es más baja (30 °C en lugar de 37 °C) y es capaz de producir dos puentes disulfuro y glicosilación en las proteínas (Cregg *et al.*, 2009). Además, es capaz de acumular grandes cantidades de compuestos hidrofóbicos (Vik y Rine, 2001).

En comparación con *S. cerevisiae*, *P. pastoris* tiene una fuerte preferencia por el metabolismo de las vías respiratorias y por lo tanto, crece a altas densidades de células sin la acumulación de altos niveles de etanol, algo que por lo general ocurre en *S. cerevisiae* (Cereghino *et al.*, 2002). Otras ventajas de la utilización de *P. pastoris* para la expresión de proteínas heterólogas se encuentra en la sencillez de este sistema y la disponibilidad de promotores fuertes para dirigir la expresión de genes heterólogos además de la capacidad de este sistema eucariota de realizar modificaciones post-traduccionales.

La estrategia para la expresión de los diferentes genes de carotenogénesis en *P. pastoris* consistió en utilizar el vector pGAPZ α A. En este vector, las secuencias génicas fueron puestas bajo el control del promotor constitutivo GAP y se ubicaron flanqueando la señal de secreción extracelular del factor α de *S. cerevisiae* desde el sitio de restricción *Sfi*I hasta el sitio de clonación múltiple del plásmido, con lo cual esta señal de secreción se liberó del vector y los productos proteicos se mantuvieron en el interior celular.

Los plásmidos recombinantes construidos con las secuencias (*crtE*, *crtB* y *crtI**), (*crtE*, *crtB*, *crtI** y *crtL**) y (*crtE*, *crtB*, *crtI**, *crtL**, *crtW* y *crtZ*) fueron nombrados como pGAPZA-EBI para la síntesis de licopeno, pGAPZA-EBIL para la síntesis de β -caroteno y pGAPZA-EBILWZ para la síntesis de astaxantina, respectivamente.

Cada vector se integró en el genoma de *P. pastoris* mediante recombinación. Las colonias de levadura recombinante se cultivaron durante 72 h en medio YPDS con zeocina (100 μ g/mL) y posteriormente se sembraron en placas de agar no selectivo. Se observó que las células de las diferentes cepas no perdían su color incluso después de muchos pases por placas sin medio de selección, lo que indicó una alta estabilidad de las células de *P. pastoris* productoras de carotenoides, promoviéndose un proceso biotecnológico de contención genética. Resultados similares se obtuvieron para *S. cerevisiae* (Verwaal *et al.*, 2007), donde los niveles de producción de carotenoides eran más altos en las células que contienen los genes carotenogénicos integrado en su genoma.

Los genes responsables de la síntesis de carotenoides en *P. pastoris* fueron, geranilgeranil difosfato sintetasa (*crtE*) de *E. uredovora*, fitoeno sintetasa (*crtB*) de *E. uredovora*, fitoeno desaturasa (*crtI*) de *E. uredovora*, licopeno beta-ciclasa (*crtL*) de *F. carica*, beta caroteno ketolasa (*crtW*) de *A. aurantiacum* y beta caroteno hidroxilasa (*crtZ*) de *A. aurantiacum*.

El gen *crtE* codifica la síntesis de la enzima GGPP responsable de la conversión de IPP y DAMPP en Geranilgeranil pirofosfato. El IPP y DAMPP son los precursores de la vía de los carotenoides y otros compuestos isoprenoides y son el punto de partida sobre el cual comienzan a actuar los genes heterólogos integrados en el genoma de *P. pastoris*. Por lo tanto, esta proteína juega un papel importante al determinar la cantidad de GGPP disponible para empezar la ruta artificial de síntesis de carotenoides en estas levaduras.

Así, durante el desarrollo de esta investigación se ha logrado construir diferentes cepas recombinantes de *P. pastoris* genéticamente estables productoras de licopeno, β -caroteno y astaxantina, a partir de la cepa X-33 silvestre la cual, por sí sola no es capaz de sintetizar carotenoides y presenta el color blanco típico de esta levadura.

La expresión del conjunto de los tres (Pp-EBI) o cuatro (Pp-EBIL) genes por las levaduras recombinantes y sus valores altos de producción de licopeno y β -caroteno, indican que presumiblemente hasta éste punto hay suficiente transcripción de las proteínas durante el crecimiento celular y se ha considerado la posibilidad de que el flujo de carbono para la

biosíntesis de ergosterol ha sido parcialmente redirigido desde FPP a geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) para la producción de carotenoides.

La liofilización como pre-tratamiento de las células de levadura, disminuyó la cantidad de agua fuera de la célula, aumentando así la superficie de contacto con las soluciones usadas para la ruptura celular. Además, dado que los carotenoides son sustancias liposolubles, la ausencia de agua facilitó su extracción.

En este estudio hemos logrado con éxito la producción en cepas de *P. pastoris* de 1141 µg de licopeno, 339 µg de β-caroteno y 3.7 µg de astaxantina, por gramo de células de levadura (peso seco). Las cantidades obtenidas fueron tres veces mayor que las previamente descritas para la producción heteróloga de β-caroteno en *S. cerevisiae* (Yamano *et al.*, 1994; Misawa y Shimada, 1998), y con valores muy semejantes a los obtenidos por Ukibe *et al.*, (2009) utilizando los genes *crtI* y *crtYB* de *X. dendrorhous* con una producción de 390 µg de β-caroteno por gramo de células de levadura (peso seco). Por otro lado, la producción de licopeno de 1141 µg/g fue mayor que la de los recombinantes de *C. utilis* con 758 µg/g (Misawa y Shimada, 1998), pero más bajos en comparación con los obtenidos en cepas de *C. utilis* optimizadas metabólicamente, que fueron capaz de producir hasta 2890 µg de licopeno por gramo de células de levadura (peso seco).

La producción de astaxantina aunque baja comparada con la producción de β-caroteno de la cepa Pp-EBIL, nos ha permitido demostrar que es posible producir carotenoides oxigenados en *P. pastoris*. Sin embargo, la presencia de intermediarios metabólicos en la ruta de biosíntesis, indican que el flujo de carotenoides a través de la ruta no fue del todo eficiente. La cantidad de astaxantina obtenida en este estudio presentó valores más bajos a los obtenidos en *C. utilis* (Miura *et al.*, 1998) con valores de 400 µg/g, así como también a los reportados en *S. cerevisiae* (Ukibe *et al.*, 2009) con 29 µg/g y con una concentración muy semejante a la obtenida en *M. circinelloides* (Papp *et al.*, 2006) de 3 µg/g de células de levadura (peso seco). Además se observó que la cepa Pp-EBILWZ presentó una tasa de crecimiento menor que las demás cepas recombinantes de *P. pastoris* obtenidas en este estudio.

Estos valores bajos de astaxantina pueden ser atribuidos a un descenso del nivel de expresión de los genes debido a la diferencia en el particular uso de codones de la levadura *P. pastoris*, más aún tratándose de genes de tan variado origen. Este uso de codones parece estar relacionado con la disponibilidad intracelular de cada tRNA, cuya concentración es relativamente proporcional a la frecuencia de aparición de su codón complementario en la

población de secuencias codificantes. Cuanto mayor es el nivel de expresión de un gen, mayor es la frecuencia con que aparecen en la secuencia tripletes complementarios a los tRNAs más abundantes. Todo esto lleva a pensar que la velocidad de traducción y, por tanto, la acumulación del producto pueden resultar limitados cuando se trata de alcanzar altos niveles de expresión de genes extraños para la célula hospedadora, debido a que contengan tripletes no coincidentes con los utilizados mayoritariamente por ella.

Además, se debe considerar que los seis genes integrantes de esta ruta artificial están bajo el mismo promotor GAP, lo que podría suponer una sobrecarga metabólica para las células que los mantienen y una limitada disponibilidad de los factores de transcripción necesarios para la expresión adecuada de todas las proteínas de la ruta. Un efecto notable de este tipo de sobrecarga metabólica sería la disminución de la velocidad de crecimiento de las células, que coincide con lo observado para la cepa Pp-EBILWZ (Figura 66).

Sin embargo, en base a las mejoras realizadas en la producción de carotenoides en otros organismos, ya sea mediante sobreexpresión de genes, optimización de uso de codones o modificación de los genes integrantes de la ruta, consideramos que es posible aumentar los niveles de producción de carotenoides en varios órdenes de magnitud en cada una de nuestras cepas recombinantes. Un enfoque que podría ser utilizado es el indicado por Verwaal *et al.*, (2007) y Yuan *et al.*, (2006), que utiliza cultivos mutados y condiciones especiales de fermentación en grandes volúmenes. Esta estrategia ha funcionado bien para *X. dendrorhous* con un aumento notable en los niveles de producción de astaxantina (An *et al.*, 1989). Sin embargo, al contrario que *X. dendrorhous* y *S. cerevisiae* que ya contienen el gen que codifican la enzima GGPP sintetasa (*crtE* y *BTS1*), respectivamente (Jiang *et al.*, 1995; Martín *et al.*, 2008), en *P. pastoris* es necesario incluir este gen como base de cualquier ruta artificial que se pretenda implementar.

Finalmente, se ha logrado por primera vez en la levadura *P. pastoris* la producción de β -caroteno y astaxantina, aportando una fuente microbiológica alternativa para la biosíntesis de carotenoides, y futuro uso industrial.

CONCLUSIONES

- 1.- Se ha aislado y caracterizado de *Ficus carica* el gen β -*lcy-Fc* y mediante ensayos de complementación heteróloga en *E.coli* se ha demostrado que codifica una enzima con actividad β -licopeno ciclasa.
- 2.- Se ha expresado la proteína β -LCY en cultivos de *E.coli* recombinante y se ha comprobado que cataliza la ciclación de ambos extremos de la molécula de licopeno para formar β -caroteno.
- 3.- Se ha aislado y caracterizado de *Ficus carica* el gen *zds-Fc* y mediante ensayos de complementación heteróloga en *E.coli* se ha demostrado que codifica una enzima con actividad ζ -caroteno desaturasa.
- 4.- Se ha expresado la proteína ZDS-Fc en cultivos de *E.coli* recombinante y se ha comprobado que cataliza la desaturación de ζ -caroteno y neurosporeno para formar licopeno.
- 5.- Las células de *E.coli* modificadas genéticamente para la producción de carotenoides han demostrado ser un excelente sistema para la identificación de genes de carotenogénesis cuyos resultados pueden extrapolarse a sistemas vegetales como *Ficus carica*.
- 6.- Se ha logrado manipular genéticamente la cepa de *Pichia pastoris* X33 para producir el caroteno lineal licopeno.
- 7.- Se ha logrado manipular genéticamente la cepa de *Pichia pastoris* X33 para producir el caroteno bicíclico β -caroteno.
- 8.- Se ha logrado manipular genéticamente la cepa Pp-EBIL de *Pichia pastoris* productora de β -caroteno para producir la xantofila astaxantina.

BIBLIOGRAFÍA

Ajikumar PK, Tyo K, Carlsen S, Mucha O, Phon TH, Stephanopoulos G (2008). Terpenoids: opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. *Mol Pharm* 5:167-190.

Al Babili S, Huguene P, Schledz M, Welsch R, Frohnmeyer H, Laule O, Beyer P (2000). Identification of a novel gene coding for neoxanthin synthase from *Solanum tuberosum*. *FEBS Lett* 485(2-3):168-172.

Al Babili S, von Lintig J, Haubruck H, Beyer P (1996). A novel, soluble form of phytoene desaturase from *Narcissus pseudonarcissus* chromoplasts is Hsp70-complexed and competent for flavinylation, membrane association and enzymatic activation. *Plant J* 9(5): 601-612.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, and Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.

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

Armstrong GA, Hearst JE (1996). Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *F14SEBJ* 10:228-237.

Armenta-López R, Guerrero I, Huerta S (2004). Astaxanthin extraction from shrimp waste by lactic fermentation and enzymatic hydrolysis of the carotenoprotein complex. *J Food Sci* 67(3):1002-1006.

Arrach N, Fernandez-Martin R, Cerda-Olmedo E, Avalos J (2001). A single gene for lycopene cyclase, phytoene synthase, and regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:1687–1692.

Baroli I, and Niyogi KK (2000). Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355:1385-1394.

Bhataya A, Schmidt-Dannert C, Lee PC (2009). Metabolic engineering of *Pichia pastoris* X-33 for lycopene production. *Process Biochem* 44:1095-1102.

Blount JD, Metcalfe NB, Birkhead TR, Surai PF (2003). Carotenoid modulation of immune function and sexual attractiveness in zebra finches. *Science* 300(5616):25-127.

Botella Pavía P, y Rodríguez Concepción M (2006). Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiol Plant* 126(3):369- 381.

Bouvier F, Dogbo O, Camara B (2003a). Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment Bixin (Annato). *Science* 300:2089-2091.

Bouvier F, d'Harlingue A, Backhaus RA, Kumagai MH, Camara B (2000). Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog. *Eur J Biochem* 267(21):6346-6352.

Bouvier F, d'Harlingue A, Camara B (1997). Molecular analysis of carotenoid cyclase inhibition. *Arch Biochem Biophys* 346(1):53-64.

Bouvier F, Keller Y, d'Harlingue A, Camara B (1998). Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). *Biochim Biophys Acta* 1391(3):320-328.

Bouvier F, Suire C, Mutterer J, Camara B (2003b). Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: identification of the carotenoid dioxygenase *CsCCD* and *CsZCD* genes involved in *Crocus* secondary metabolite biogenesis. *Plant Cell* 15(1):47-62.

Bouvier F, Rahier A, Camara B (2005). Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog Lipid Res* 44(6):357-429.

Bramley P (2002). Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J Exp Bot* 53(377):2107-2113.

Britton G (1983). The biochemistry of natural pigments. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.

Britton G (1991). Carotenoids. En: Dey PM, Harborne JB, editores. Methods in plant Biochemistry. London: Academic Press; p. 473-518.

Britton G (1998). Overview of carotenoid biosynthesis. En: G. Britton, S. Liaaen Jensen, y H. Pfander (Eds.), Biosynthesis and Metabolism: 13-148. Basel: Birkhäuser Verlag.

Britton G (1995). Spectroscopy. En: G. Britton, S. Liaaen Jensen, y H. Pfander (Eds.), Biosynthesis and Metabolism: 13-62. Basel: Birkhäuser Verlag.

Britton G (1995). UV/Visible Spectroscopy. En: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H, editores. Carotenoids. Volume 1B: Spectroscopy: 13-62. Basel, Switzerland: Birkhäuser.

Britton G (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. FASEB J 9:1551-1558.

Brown P, Somerville C (2001). Progress in plant metabolic engineering. Proceedings National Academic of Sciences USA 98(16):8925-8927.

Busch M, Seuter A, Hain R (2002). Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. Plant Physiol 128:439-453.

Buxadó JA, Heynngnezz LE, Juiz AG, Tamayo G, Lima IR, Marshalleck HD, Mola EL (2004). Scale-up of processes to isolate the misstargeted rBm86 protein from *Pichia pastoris*. Afr J Biotechnol 11:599-605.

Buzzini P, Rubinstein L, Martini A (2001). Production of yeast carotenoids by using agro-industrial by-products. Agro-Food-Industry Hi-Tech 7-10.

Carrie C, Murcha MW, Millar AH, Smith SM, and Whelan J (2007). Nine 3-ketoacyl-CoA thiolases (KATs) and acetoacetyl-CoA thiolases (ACATs) encoded by five genes in

Arabidopsis thaliana are targeted either to peroxisomes or cytosol but not to mitochondria. *Plant Mol Biol* 63:97-108.

Calo P, de Miguel T, Sieiro C, Velázquez JB, Villa TG (1995_a). Ketocarotenoids in halobacteria: 3-hydroxy-echinenone". *Journal of Applied Bacteriology* (79):282-285.

Calo P, de Miguel T, Velázquez JB, Villa TG (1995_b). Mevalonic acid increases trans-astaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnology Letters* (17):575-578.

Calo P, Velásquez JB, Sieiro C, Blanco P, Longo E, Villa TG (1995_c). Análisis of astaxanthin and other carotenoids from several *Phaffia rhodozyma* mutants. *J Agric Chem* (43):1396-1399.

Calo P, y Villa TG (1995). The yeast *Phaffia rhodozyma* as an industrial source of astaxanthin. *Microbiología SEM* (11):386-388.

Casas A, Mallent D (1988). El color de los frutos cítricos. I. Generalidades. II. Factores que influyen en el color. Influencia de la especie, de la variedad y de la temperatura. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 28(2):184-201.

Cereghino GP, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*: heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol* 13(4):329–332.

Cerullo G, Polli D, Lanzani G, Silvestri S, Hashimoto H, Codgell R (2002). Photosynthetic Light Harvesting by carotenoids: Detection of an Intermediate Excited State. *Science Col* 298: 2395-2398.

Chamovitz, D, Misawa N, Sandmann G, Hirschberg J (1992). Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of a cyanobacterial gene coding for phytoene synthase, a carotenoid biosynthesis enzyme. *FEBS Lett* 296(3):305-10.

Christen WG, Manson JE, Glynn RJ, Gaziano JM, Sperduto RD, Buring, JE, and Hennekens CH (2003). A randomized trial of beta carotene and age-related cataract in US physicians. *Arch Ophthalmol* 121, 372-378.

Cong L, Wang C, Li Z, Chen L, Yang G, Wang Y, He G (2009). cDNA cloning and expression analysis of wheat (*Triticum aestivum* L.) phytoene and zeta-carotene desaturase genes. *Mol Biol Rep*. Doi:10.1007/s11033-009-9922-7.

Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol* 16:23-52.

Croteau R, Kutchan T, and Lewis (2000). Natural products (secondary metabolites). In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, B. Buchanan, W. Gruissem and R. Jones, eds. (Rockville, M.D.: American Society of Plant Biologists) 1250-1268.

Cunningham FX (2002). Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants. *Pure and Appl Chem* 74:1409-1417.

Cunningham FX, Chamovitz D, Misawa N, Gantt E, Hirschberg J (1993). Cloning and functional expression in *Escherichia coli* of a cyanobacterial gene for lycopene cyclase, the enzyme that catalyzes the biosynthesis of β -carotene. *FEBS Lett* 328(1-2):130-138.

Cunningham FX, Gantt E (2001). One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene ϵ -cyclases. *Proc.Natl Acad Sci USA* 98(5):2905-2910.

Cunningham FX, Gantt E. (1998). Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:557-589.

Cunningham FX, Pogson BJ, Sun Z, McDonald KA, DellaPenna D, Gantt E (1996). Functional analysis of the β and ϵ lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* 8(9):1613-1626.

DellaPenna D, Pogson BJ (2006). Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annu Rev Plant Biol* 57(1):711-738.

de Miguel T, Sieiro C, Poza M, Villa TG (2000). Isolation and taxonomic study of a new canthaxanthin-containing bacterium, *Gordonia jacobaea* MV-1 sp. *International Microbiology* (3):107-111.

Demmig Adams B, Gilmore AM, Adams W (1996). Carotenoids. *In vivo* functions of carotenoids in higher plants. *FASEB J* 10(4):403-412.

Diretto G, Welsch R, Tavazza R, Mourgues F, Pizzichini D, Beyer P, Giuliano G (2007). Silencing of β -carotene hydroxylase increases total carotenoid and β -carotene levels in potato tubers. *BMC Plant Biol* 7:1-11.

Disch A, Hemmerlin A, Bach TJ, and Rohmer M (1998). Mevalonate-derived isopentenyl diphosphate is the biosynthetic precursor of ubiquinone prenyl side chain in tobacco BY-2 cells. *Biochem J* 331(2):615-621.

Dorgan JF, Sowell A, Swanson CA, Potischman N, Miller R, Schussler N, and Stephenson HE Jr. (1998). Relationships of serum carotenoids, retinol, alpha-tocopherol, and selenium with breast cancer risk: results from a prospective study in Columbia, Missouri (United States). *Cancer Causes Control* 9:89-97.

Eonseon J, Polle JEW, Lee HK, Hyun SM, Chang M (2003). Xanthophylls in Microalgae: From Biosynthesis to Biotechnological Mass Production and Application. *Microbiol Biotechnol* 13(2):165-174.

Felsenstein J (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:83-791.

Frank H, Cogdell RJ (1993). Photochemistry and function of carotenoids in photosynthesis. En: Young A, Britton G, editores. *Carotenoids in photosynthesis*. London: Chapman & Hall. p. 253-326.

Fraser PD, and Bramley P (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* 43(3):228-265.

Fraser PD, Kiano JW, Truesdale MR, Schuch W, Bramley P (1999). Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit. *Plant Mol Biol* 40(4):687-698.

Fraser PD, Romer S, Shipton CA, Mills PB, Kiano JW, Misawa N, Drake RG, Schuch W, Bramley P (2002). Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruitspecific manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(2):1092-1097.

Fray RG, Wallace A, Fraser PD, Valero D, Hedden P, Bramley PM, Grierson D (1995). Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *Plant J* 8:693-701.

Frengova GI, Simova D, Beshkova DM (2003). Carotinoid production by lactose-negative yeasts co-cultivated with lactic acid bacteria in whey ultrafiltrate. *Zeitschrift für Naturforschung* 58:562–567.

Fuhrmann M, Hausherr A, Ferbitz L, Schödl T, Heitzer M, Hegemann P (2004). Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Clamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Mol Biol* 55:869-881.

Gallagher CE, Cervantes M, Wurtzel ET (2003). Surrogate biochemistry: use of *Escherichia coli* to identify plant cDNAs that impact metabolic engineering of carotenoid accumulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 60(6):713-719.

Galpaz N, Ronen G, Khalfa Z, Zamir D, Hirschberg J (2006). A chromoplast-specific carotenoid biosynthesis pathway is revealed by cloning of the tomato *white-flower* locus. *Plant Cell* 18(8):1947-1960.

Gerjets T, Sandmann G (2006). Ketocarotenoid formation in transgenic potato. *Journal of Experimental Botany* 57(14):3639-3645.

Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ and Willett WC (1995). Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in men. *Ann Intern Med* 122:327-334.

Giovannucci E (1999). Tomatoes, tomato-based products, lycopene and cancer: a review of the epidemiological literature. *Journal of the National Cancer Institute* 91:317-331.

Giuliano G, Tavazza R, Diretto G, Beyer P, Taylor MA (2008). Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Biotechnol* 26:139-145.

Goodwin TW (1980). *The Biochemistry of the Carotenoids, Vol. 1: Plants*, pp. 1-377, Chapman and Hall, New York.

Goodwin TW (1983). Developments in carotenoid biochemistry over 40 years. *Biochem.Soc.Trans* 11(5):473-483.

Granado F, Olmedilla B, Blanco I, Rojas-Hidalgo E (1992). "Carotenoid composition in raw and cooked spanish vegetables". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40(1):2135-2140.

Grassmann J, Hippeli S, Elstre EF (2002). "Plant's defence mechanism and its benefits for animal and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress". *Plant Physiology and Biochemistry* 40:471-478.

Grossman AR, Lohr M, Im CS (2004). *C. reinhardtii* in the landscape of pigments. *Annu Rev Genet* 38:119-73.

Gross J (1987). *Pigments in fruits*. London: Academic Press.

Harker M, and Bramley P (1999). Expression of prokaryotic 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphatases in *Escherichia coli* increases carotenoid and ubiquinone biosynthesis. *FEBS Lett* 448(1):115-119.

- Hirschberg J, Cohen M, Harker M, Lotan T, Mann V, Pecker I (1997). Molecular genetics of the carotenoid biosynthesis pathway in plants and algae. *Pure Appl Chem* 69(10):2151-2158.
- Hirschberg J (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol* 4(3):210-218.
- Hodgson RW (1948). Horticultural varieties of citrus. En: H. J. Webber y L. D. Batchelor (Eds.), *The citrus industry*: Univ of California Press.
- Hosotani K, Kitagawa M (2003). Improved simultaneous determination method of β -carotene and retinol with saponification in human serum and rat liver. *Journal of Chromatography* 791:305-313.
- Howitt CA, and Pogson BJ (2006). Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant Cell and Environment* 29(3):435-445.
- Huang JC, Chen F, Sandmann G (2006). Stress-related differential expression of multiple β -carotene ketolase genes in the unicellular green alga *H. pluvialis*. *J Biotechnol* 122:176-185.
- Hugueney P, Badillo A, Chen H-C, Klein A, Hirschberg J, Camara B, Kuntz M (1995). Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts. *Plant J* 8(3):417-424.
- Hugueney P, Romer S, Kuntz M, Camara B (1992). Characterization and molecular cloning of a flavoprotein catalyzing the synthesis of phytofluene and ζ -carotene in *Capsicum* chromoplasts. *Eur J Biochem* 209(1):399-407.
- Hundle B, Alberti M, Nievelstein V, Beyer P, Kleinig H, Armstrong GA, Burke DH, Hearst JE (1994). Functional assignment of *Erwinia herbicola* Eho10 carotenoid genes expressed in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 245(4):406-416.

Hundle BS, Beyer P, Kleinig H, Englert G, Hearst JE (1991). Carotenoids of *Erwinia herbicola* and an *Escherichia coli* HB101 strain carrying the *Erwinia herbicola* carotenoid gene cluster. *Photochem Photobiol* 54(1):89-93.

Inoue K (2004). Carotenoid hidroxylasyon -P450 finally! *Trends Plant Sci* 9(11):515-517.

Johnson EA, Villa TG, Lewis MJ (1980). *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin sources in salmonid diet. *Aquaculture* 20:123-34.

Johnson EA, Villa TG, Lewis MJ (1979). Lysis of the cell walls of the yeast *Phaffia rhodozyma* by a lytic enzyme complex from *Bacillus circulans* WL-12. *J Appl Biochem* (1): 273-282.

Johnson EA, Villa TG, Lewis MJ Phaff HJ (1978). Simple method for isolation of astaxanthin from the basidiomycetous *Phaffia rhodozyma*. *J Appl Env Microbiol* (35):1555-1559.

Kimura M, Rodríguez-Amaya DB (2002). A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. *Food Chemistry* 78:389-398.

Klee H (2008). Plant biology: Hormones branch out. *Nature* 455:176-177.

Kohlmeier L (1995). Epidemiology of anticarcinogens in food. *Adv Exp Med Biol* 369:125-139.

Krinsky NI (1993). Actions of carotenoids in biological systems. *Annual Review of Nutrition* 13:561-587.

Kritchevsky SB (1999). β -carotene, carotenoids and the prevention of coronary heart disease. *Journal of Nutrition* 129:5-8.

Kula MR (1990). Trends and future prospects of aqueous two-phase extraction. *Bioseparation* 1:181-189.

Kuntz M, Romer S, Suire C, Huguency P, Weil JH, Schantz R, Camara B (1992). Identification of a cDNA for the plastid-located geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annuum* - Correlative increase in enzyme-activity and transcript level during fruit ripening. *Plant J* 2(1):25-4.

Landrum JT, Bone R A (2001). Lutein, Zeaxanthin and the Macular Pigment. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 385:28-40.

Lange BM, Wildung MR, McCaskill D, and Croteau R (1998). A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2100-2104.

Lange BM, and Ghassemian M (2003). Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant Mol Biol* 51:925-948.

Lange N, Steinbüchel A (2011). β -carotene production by *Saccharomyces cerevisiae* with regard to plasmid stability and culture media. *Appl Microbiol Biotechnol* 91:1611-1622.

Leivar P, Gonzalez VM, Castel S, Trelease RN, Lopez-Iglesias C, Arro M, Boronat A, Campos N, Ferrer A, Fernandez-Busquets X (2005). Subcellular localization of *Arabidopsis* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Plant Physiol* 137:57-69.

Lewinsohn E, Sitrit Y, Bar E, Azulay Y, Ibdah M, Meir A, Yosef E, Zamir D, Tadmor Y (2005a). Not just colors-carotenoid degradation as a link between pigmentation and aroma in tomato and watermelon fruit. *Trends in Food Science and Technology* 16(9):407-415.

Linden H (1991). Functional complementation in *Escherichia coli* of different phytoene desaturase genes and analysis of accumulated carotenoids. *Z Naturforsch* 46(c):1045-1051.

Linden H, Misawa N, Saito T, Sandmann G (1994). A novel carotenoid biosynthesis gene coding for ζ -carotene desaturase: functional expression, sequence and phylogenetic origin. *Plant Mol Biol* 24(2):369-79.

Linden H (1999). Carotenoid hydroxylase from *Haematococcus pluvialis*: cDNA sequence, regulation and functional complementation. *Biochim Biophys Acta* 1446(3):203-12.

Liu YS, Wu JY, Ho KP (2006). Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. *Biochem Eng J* 27:331-335.

Lohr M, Im Ch-S, Grossman A (2005). Genome-Based Examination of Chlorophyll and Carotenoid Biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physio* 138:490-515.

Lorenz RT, Cysewski GR (2000). Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.* 18:433-435.

Lotan T, Hirschberg J (1995). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding β -C-4-oxygenase, that converts β -carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. *FEBS Lett* 364(2):125-128.

McCarthy SS, Kobayashi MC, Niyogi KK (2004). White Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* Are Defective in Phytoene Synthase. *Genetics* 168(3):1249-1257.

Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22:249-270.

Mcgarvey D, Croteau R (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell* 7(7):1015-1026.

Math SK, Hearst JE, Poulter CD (1992). The *crtE* gene in *Erwinia herbicola* encodes geranylgeranyl diphosphate synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(15):6761-4.

Meléndez-Martínez AJ, Britton G, Vicario IM, Heredia FJ (2007). Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. *Food Chem* 101:1145-1150.

Meléndez-Martínez AJ, Vicario IM, Heredia FJ (2004). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Arch Latinoam Nutr* 54(2):149-155.

Meléndez-Martínez AJ, Vicario IM, Heredia FJ (2003). A routine high-performance liquid chromatography method for carotenoid determination in ultrafrozen orange juices. *J Agric Food Chem* 51:4219-4224.

Merchant S, Sawaya MR (2005). The light reactions: A guide to recent acquisitions for the picture gallery. *Plant Cell* 17(3):648-663.

Misawa N, Nakagawa M, Kobayashi K, Yamano S, Izawa Y, Nakamura K, Harashima K (1990). Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172(12):6704-12.

Misawa N, Yamano S, Linden H, de Felipe MR, Lucas M, Ikenaga H, Sandmann G (1993). Functional expression of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthesis gene *crtI* in transgenic plants showing an increase of beta-carotene biosynthesis activity and resistance to the bleaching herbicide norflurazon. *Plant J* 4:833-840.

Misawa N, Satomi Y, Kondo K, Yokoyama A, Kajiwara S, Saito T, Ohtani T, Miki W (1995b) Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J Bacteriol* 177:6575-6584.

Misawa N, and Shimada H (1998). Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. *Journal of Biotechnology* 59(3):169-181.

Misawa N, Truesdale MR, Sandmann G, Fraser PD, Bird C, Schuch W, and Bramley P. M (1994). Expression of a tomato cDNA coding for phytoene synthase in *Escherichia coli*, phytoene formation *in vivo* and *in vitro*, and functional analysis of the various truncated gene products. *J Biochem (Tokyo)* 116(5):980-985.

Miura Y, Kondo K, Saito T, Shimada H, Fraser PD, Misawa N (1998). Production of the carotenoid lycopene, beta-carotene, and astaxanthin in the food yeast *Candida utilis*. *Appl Environ Microbiol* 64(4):1226-1229.

Nambara E, and Marion-Poll A (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol* 56:165-185.

Norris SR, Barrette TR, DellaPenna D (1995). Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant Cell*. 7:2139-2149.

North HM, De Almeida A, Boutin JP, Frey A, To A, Botran L, Sotta B, Marion-Poll A (2007). The *Arabidopsis* ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *Plant J* 50:810-24.

O'Neil CA, Schwartz SJ (1992). Review: chromatographic analysis of cis/trans carotenoid isomers. *Journal of Chromatography* 624:235-252.

Olson JA (1993). Molecular actions of carotenoids. In *Carotenoids in Human Health*. Annuals of the New York Academy of Sciences (Canfield LM, Krinsky N, Olson JA eds) Vol. 691, pp. 156-166, New York Academy of Sciences, New York.

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

Pecker I, Chamovitz D, Linden H, Sandmann G, Hirschberg J (1992). A single polypeptide catalyzing the conversion of phytoene to zeta-carotene is transcriptionally regulated during tomato fruit ripening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4962-4966.

Pecker I, Chamovitz D, Linden H, Sandmann G, and Hirschberg J (1992). A single polypeptide catalyzing the conversion of phytoene to β -carotene is transcriptionally regulated during tomato fruit ripening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(11):4962-4966.

Penfold RJ, and Pemberton JM (1994). Sequencing, chromosomal inactivation, and functional expression in *Escherichia coli* of *ppsR*, a gene which represses carotenoid and bacteriochlorophyll synthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 176(10):2869-76.

Ralley L, Enfissi EMA, Misawa N, Schuch W, Bramley PM, Fraser PD (2004). Metabolic engineering of ketocarotenoid formation in higher plants. *The Plant Journal* (39):477-486.

Richmond A (2000). Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view. *J App Phycol* 12:441-451.

Rodríguez Concepción M, and Boronat A (2002). Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol* 130(3):1079-1089.

Rohdich F, Bacher A, and Eisenreich W (2005) Isoprenoid biosynthetic pathways as anti-infective drug targets. *Biochem Soc Trans* 33:785-791.

Rohmer M (1999). The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep* 16:565-574.

Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahn H (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria - A novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J* 295:517-524.

Roberts SC (2007). Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nat Chem Biol* 3:387-395.

Rodríguez-Bernaldo de Quirós, López-Hernández J, Simal-Lozano J (2001). Determination of carotenoids and liposoluble vitamins in sea urchin (*Paracentrotus lividus*) by high performance liquid chromatography. *Eur Food Res Technol* 212:687-690.

Romer S, Fraser PD, Kiano JW, Shipton CA, Misawa N, Schuch W, and Bramley PM (2000). Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants. *Nat Biotechnol* 18:666-669.

Ronen G, Goren CL, Zamir D, Hirschberg J (2000). An alternative pathway to β -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of *beta* and *old-gold* color mutations in tomato. Proc Natl Acad Sci USA 97(20):11102-11107.

Sambrook JF, Russell DW, Maniatis T (2000). Molecular cloning: A laboratory manual, third edition. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Saitou N, y Nei M (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstruction of phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4:406-425.

Sandmann G (2001). Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. Arch Biochem Biophys 385(1):4-12.

Sandmann G (2002). Molecular evolution of carotenoid biosynthesis from bacteria to plants. Physiol Plant 116(4):431-440.

Sandmann G (1998). *in* The Phototrophic Prokaryotes (Pescheck GA, Löllehard W, and Schmetterer G, Eds.) pp. 799–803, Kluwer Academic, New York.

Sandmann G (1994). Phytoene desaturase - Genes, enzymes and phylogenetic aspects. J Plant Physiol 143(4-5):444-447.

Sandmann G (1994). Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. Eur J Biochem 223(1):7-24.

Sandmann G (1993). Carotenoid analysis in mutants from *Escherichia coli* transformed with carotenogenic gene cluster and *Scenedesmus obliquus* mutant C-6D. Methods Enzymol 214:341-347.

Sandmann G, and Misawa N (1992). New functional assignment of the carotenogenic genes *crtB* and *crtE* with constructs of these genes from *Erwinia* species. FEMS Microbiol Lett 69(3):253-257.

Sandmann G, Woods WS, and Tuveson RW (1990). Identification of carotenoids in *Erwinia herbicola* and in a transformed *Escherichia coli* strain. FEMS Microbiol Lett 59(1-2):77-82.

Sandmann G, Romer S, Fraser PD (2006). Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. Metab Eng 8(4):291-302.

Sanz C, Velayos A, Álvarez MI, Benito EP, Eslava AP (2011). Functional Analysis of the *Phycomyces* carRA Gene Encoding the Enzymes Phytoene Synthase and Lycopene Cyclase. PLoS ONE 6(8): e23102. doi:10.1371/

Schledz M, al Babili S, von Lintig J, Haubruck H, Rabbani S, Kleinig H, Beyer P (1996). Phytoene synthase from *Narcissus pseudonarcissus*: functional expression, galactolipid requirement, topological distribution in chromoplasts and induction during flowering. Plant J 10(5):781-792.

Schmidt-Dannert C, Umeno D, Arnold FH (2000). Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways. Nat Biotechnol 18(7):750-753.

Schiedt K, and Liaaen-Jensen S (1995). Isolation and analysis. En: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H, editores. Carotenoids. Volume 1A: Isolation and analysis. Basel, Switzerland: Birkhäuser; p. 81-108.

Schwartz SH, Qin X, Loewen MC (2004). The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. J Biol Chem 279(45):46940-46945.

Seybold C, Fröhlich K, Bitsch R, Otto K, Böhm V (2004). Changes in contents of carotenoids and vitamin E during tomato processing. J Agric Food Chem 52(23):7005-7010.

Shewmaker CK, Sheehy JA, Daley M, Colburn S, Ke DY (1999). Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. Plant J 20:401-412.

Sieiro C, Poza M, de Miguel T, Villa TG (2003). Genetic basis of microbial carotenogenesis. *International Microbiol* (6):11-16.

Slattery ML, Benson J, Curtin K, Ma K.-N, Schaeffer D, Potter JD (2000). Carotenoids and colon cancer. *American Journal of Clinical Nutrition* 71:575-582.

Snodderly DM (1995). Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am J Clin Nutr* 62(6):1448S-1461.

Stalberg K, Lindgren O, Ek B, Hoglund AS (2003). Synthesis of ketocarotenoids in the seed of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 36(6):771- 779.

Su Q, Rowley KG, Balazs NDH (2002). Carotenoids: separation methods applicable to biological samples. *Journal of Chromatography* 781:393-418.

Tian L, and DellaPenna D (2001). Characterization of a second carotenoid β - hydroxylase gene from *Arabidopsis* and its relationship to the LUT1 locus. *Plant Mol Biol* 47(3):379-388.

Tian L, Magallanes Lundback M, Mutterer J, DellaPenna D (2003). Functional analysis of β and ϵ ring carotenoid hydroxylases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:1320-1333.

Tswett M (1911). Uher den makro- und mikrochemischen Nachweis des Carotins. *Bert Dtsch Bot Ges* 29: 630-636.

Ukibe K, Hashida K, Yoshida N, Takagi H (2009). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for astaxanthin production and oxidative stress tolerance. *Appl Environ Microbiol* doi:10.1128/AEM.01249-09

van den Berg H, Faulks R, Granado HF, Hirschberg J, Olmedilla B, Sandmann G, Southon S, Stahl W (2000). The potential for the improvement of carotenoid levels in food and the likely systemic effects. *J Sci Food Agric* 80(7):880-912.

Van Poppel G, Goldbohm RA (1995). Epidemiological evidence for β -carotene and cancer prevention. *American Journal of Clinical Nutrition* 62:1493-1503.

Velayos A, Eslava AP, Iturriaga EA (2000). A bifunctional enzyme with lycopene cyclase and phytoene synthase activities is encoded by the *carRP* gene of *Mucor circinelloides*. *Eur J Biochem* 267:5509-5519.

Velayos A, Papp T, Aguilar-Elena R, Fuentes-Vicente M, Eslava AP, Iturriaga EA, Alvarez MI (2003). Expression of the *carG* gene, encoding geranylgeranyl pyrophosphate synthase, is up-regulated by blue light in *Mucor circinelloides*. *Curr Genet* 43(2):112-120.

Verdoes J, Krubasik P, Sandmann G, van Ooyen M (1999). Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Molec General Genet* 262:453-461.

Verwaal R, Wang J, Meijnen J-P, Visser H, Sandmann G, van den Berg JA, 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(13):4342-4350.

Vik A, and Rine J (2001). Upc2p and Ecm22p, dual regulators of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21(19):6395-6405.

Vishnevetsky M, Ovadis M, and Vainstein A (1999a). Carotenoid sequestration in plants: the role of carotenoid-associated proteins. *Trends Plant Sci* 4:232-235.

Viveiros M, Krubasik P, Sandmann G, Houssaini-Iraqi M (2000). Structural and functional analysis of the gene cluster encoding carotenoid biosynthesis in *Mycobacterium aurum*. *FEMS Microbiol Lett* 187:95-101.

Weedon BCL, and Moss GP (1995). Structure and nomenclature. En: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H, editores. *Carotenoids*. Volume 1A: Isolation and analysis. Basel, Switzerland: Birkhäuser; p. 27-70.

Withers ST, and Keasling JD (2007). Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules. *Appl Microbiol Biotechnol* 73:980-990.

Woodall AA, Britton G, Jackson MJ (1997). Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: Relationship between carotenoid structure and protective ability. *Biochimica Biophysica Acta* 1336:575-586.

Woodall A, Lee S, Weesie R, Jackson M, Britton G (1997). Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity. *Biochim Biophys Acta* 1336:33-42.

Yamamoto S, Ishii T, Nakagawa M, Ikenaga H, Misawa N (1994). Metabolic engineering for production of beta-carotene and lycopene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 58(6):1112-1114.

Yan P, Gao XZ, Shen WT, Zhou P (2011). Cloning and expression analysis of phytoene desaturase and ζ -carotene desaturase genes in *Carica papaya*. *Mol Biol Rep* 38:785-791.

Ye X, Al-Babili S, Klott A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I (2000). Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287:303-305.

Young AJ, Phillip D, Ruban AV, Horton P, Frank HA (1997). The xanthophyll cycle and carotenoid-mediated dissipation of excess excitation energy in photosynthesis. *Pure Appl Chem* 69(10):2125-2130.

Yuan LZ, Rouviere PE, LaRossa RA, Suh W (2006). Chromosomal promoter replacement of the isoprenoid pathway for enhancing carotenoid production in *E. coli* *Metab Eng* 8(1):79-90.

Zeevaart JAD, and Creelman RA (1988). Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39:439-473.

Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7(1-2):203-214.

ANEXO

Parte de los resultados presentados en esta tesis han sido objeto de las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

PUBLICACIONES

Araya-Garay JM, Feijoo-Siota L, Veiga-Crespo P, Villa TG (2011) cDNA cloning of a novel gene codifying for the enzyme lycopene β -cyclase from *Ficus carica* and its expression in the *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 92:769-777.

Araya-Garay JM, Feijoo-Siota L, Rosa-dos-Santos F, Veiga-Crespo P, Villa TG (2012) Construction of new *Pichia pastoris* X-33 strains for production of lycopene and β -carotene. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93:2483-2492.

Araya-Garay JM, Ageitos JM, Vallejo JA, Veiga-Crespo P, Sánchez-Pérez A, Villa TG (2012) Construction of a novel *Pichia pastoris* strain for production of xanthophylls. (Aceptado en AMB Express).

Araya-Garay JM, Feijoo-Siota L, Veiga-Crespo P, Sánchez-Pérez A, Villa TG (2012) Cloning and functional expression of ζ -carotene desaturase, a novel carotenoid biosynthesis gene from *Ficus carica*. (En revision en *Molecular Genetics and Genomics*).

COMUNICACIONES A CONGRESOS

III Congreso de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana, Alcalá, 17-19 de Noviembre de 2010. “Clonación y expresión heteróloga en *E. coli* de un nuevo gen que codifica una enzima con actividad licopeno β -ciclase”. José Miguel Araya-Garay; P. Veiga Crespo; L. Blasco Otero; T. González Villa. Universidad de Santiago de Compostela, Departamento de Microbiología y Parasitología, Avenida de las Ciencias s/n Campus Sur. CP: 15782.

XXIII Congreso nacional de Microbiología, Salamanca, 11-14 de julio de 2011. “Ingeniería metabólica en *Pichia pastoris* X-33 para la producción de Licopeno y β -caroteno”. José Miguel Araya-Garay; José Luis Rodríguez; Patricia Veiga Crespo; Tomás González Villa. Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Santiago de Compostela. Avenida de las Ciencias s/n Campus Vida, CP: 15782, Santiago de Compostela, España.

cDNA cloning of a novel gene codifying for the enzyme lycopene β -cyclase from *Ficus carica* and its expression in *Escherichia coli*

José Miguel Araya-Garay · Lucía Feijoo-Siota · Patricia Veiga-Crespo · Tomás González Villa

Received: 29 April 2011 / Revised: 4 July 2011 / Accepted: 14 July 2011 / Published online: 27 July 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Lycopene beta-cyclase (β -LCY) is the key enzyme that modifies the linear lycopene molecule into cyclic β -carotene, an indispensable carotenoid of the photosynthetic apparatus and an important source of vitamin A in human and animal nutrition. Owing to its antioxidant activity, it is commercially used in the cosmetic and pharmaceutical industries, as well as an additive in foodstuffs. Therefore, β -carotene has a large share of the carotenoidic market. In this study, we used reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE)-PCR to obtain and clone a cDNA copy of the gene *Lyc- β* from *Ficus carica* (*Lyc- β Fc*), which codes for the enzyme lycopene β -cyclase (β -LCY). Expression of this gene in *Escherichia coli* produced a single polypeptide of 56 kDa of weight, containing 496 amino acids, that was able to cycle both ends of the lycopene chain. Amino acid analysis revealed that the protein contained several conserved plant cyclase motifs. β -LCY activity was revealed by heterologous complementation analysis, with lycopene being converted to β -carotene as a result of the enzyme's action. The β -LCY activity of the expressed protein was confirmed by high-performance liquid chromatography (HPLC) identification of the β -carotene. The lycopene to β -carotene conversion rate was 90%. The experiments carried out in this work showed that β -LYC is the enzyme responsible for

converting lycopene, an acyclic carotene, to β -carotene, a bicyclic carotene in *F. carica*. Therefore, by cloning and expressing β -LCY in *E. coli*, we have obtained a new gene for β -carotene production or as part of the biosynthetic pathway of astaxanthin. So far, this is the first and only gene of the carotenoid pathway identified in *F. carica*.

Keywords *Ficus carica* · Lycopene β -cyclase · cDNA · β -Carotene

Introduction

Carotenoids are one of the most diverse and widely distributed groups of natural pigments. They are synthesized by all photosynthetic and many nonphotosynthetic organisms, including bacteria, fungi, algae, and higher plants (D'Ambrosio et al. 2004). They are responsible for the color of fruits and flowers, providing distinct yellow, orange, and red colors, serve as precursors to the plant hormone abscisic acid and thus contributing substantially to plant–animal communication (DellaPenna and Pogson 2006; Hirschberg 2001). In addition, the colors of many carotenoid-accumulating fruits and flowers also contribute to an increase in their economic value (Fraser and Bramley 2004; Rodríguez Concepción 2006).

Carotenoid pigments in the chloroplast of the green tissues function to block the highlight lethal effects of oxygen and free radicals resulting from the transfer of electrons from triplet chlorophyll to molecular oxygen (Frank and Cogdell 1993; Pecker et al. 1996). Carotenoid pigments are synthesized in the isoprenoid biosynthetic pathway within the chloroplasts of plants. Moreover, carotenoids represent essential structural components of the light-harvesting antenna and reaction centre complexes (Horton et al. 1996).

J. M. Araya-Garay · L. Feijoo-Siota · P. Veiga-Crespo · T. G. Villa
Department of Microbiology,
University of Santiago de Compostela,
15782 Santiago de Compostela, Spain

P. Veiga-Crespo · T. G. Villa (✉)
School of Biotechnology, University of Santiago de Compostela,
15782 Santiago de Compostela, Spain
e-mail: tomas.gonzalez@usc.es

The biosynthetic pathway of carotenoids is highly complex. The first step is the condensation of two molecules of geranyl geranyl pyrophosphate (GGPP) to originate the C₄₀ molecule phytoene (Park et al. 2002). This two-step reaction is catalyzed by phytoene synthase (PSY) a single soluble enzyme (Fig. 1). Two sequential desaturations in the phytoene molecule result in the formation of the first phytofluene and then ζ-carotene. Both of these reactions are carried out by phytoene desaturase (PDS). Two additional desaturations yield the symmetrical red carotenoid pigment lycopene (Britton 1998; Sandmann 1994).

In higher plants, the cyclization of lycopene can occur in two different manners, originating either ε-carotene or β-carotene, according to the type of rings on the ends of the molecule (Bouvier et al. 2005; Cunningham 2002). These reactions are catalyzed by two different enzymes ε-LCY and β-LCY, respectively. β-LCY acts sequentially on both ends of lycopene, originating β-carotene as a final product and γ-carotene as an intermediate (Cunningham et al. 1994; Huguency et al. 1995). However, ε-LCY can only act on one end of the lycopene molecule, producing δ-carotene (Bouvier et al. 2005; Fraser and Bramley 2004; Hirschberg 2001), which then is converted to α-carotene through a single β-ring addition catalyzed by β-LCY (Cunningham et al. 1996; Hirschberg et al. 1997; Tian et al. 2003) (Fig. 1).

Most carotenoids are produced by chemical synthesis, due to the low productivity of biological systems. But,

because of changing consumer perceptions, primarily in Europe, the natural sources of carotenoids are rapidly gaining economical importance (Rodney 1994). β-Carotene is still the most prominent carotenoid used in foodstuffs and supplements and has the largest share of the carotenoidic market.

Ficus carica L., a deciduous tree belonging to the Moraceae family, is one of the earliest cultivated fruit trees. Today, fig is an important crop worldwide for dry and fresh consumption (Solomon et al. 2006). On the basis of the Dietary Reference Intakes (DRI) data, published by Food and Nutrition Board of the U.S. Institute of Medicine, and the nutrient composition of dried figs (Vinson et al. 2005), they can be demonstrated to be a superior source of minerals, vitamins, amino acids, crude fibers, polyphenols, and several carotenoids, including lycopene, β-carotene, lutein, and α-carotene (Lianju et al. 2003; Vinson 1999; Vinson et al. 2005), with lycopene being the most abundant carotenoid, followed by β-carotene and lutein. Figs contain all major carotenoids appearing in human plasma (Su et al. 2002). However, until now no gene has been described in the biosynthetic pathway of carotenoids in this species.

The purpose of this study was to isolate and clone the full-length cDNA for Lyc-β gene from *F. carica* (Lyc-β Fc), and to analyze the amino acid sequence of this enzyme, as it could prove very useful for futures studies in metabolic engineering to create new biological systems able to produce high levels of natural β-carotene or serve as an intermediary in the path to produce other carotenoids such as xanthophyll astaxanthin.

Materials and methods

Bacteria and plasmids used in this work

Polymerase chain reaction (PCR)-amplified fragments were cloned into the plasmid pCR Blunt II TOPO (Invitrogen), and the DNA constructs obtained were transformed into *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen). Transformed *E. coli* TOP10 cells were grown in LB medium at 37 °C for 12 h. Kanamycin (50 μg/ml) was employed for selection of transformants.

Plasmid derived from pACYC184 was pACCRT-EIB (Misawa and Shimada 1998), which harbors the *Erwinia uredovora crtE* (GGPP synthase), *crtB* (phytoene synthase), and *crtI* (phytoene desaturase) genes and mediates the formation of lycopene, was a present from Prof. Misawa (Research Institute for Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural University, Japan). This plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) to achieve *E. coli* BL-pACC, a strain of able to produce lycopene and used for color complementation assays (Table 1). Transformed *E.*

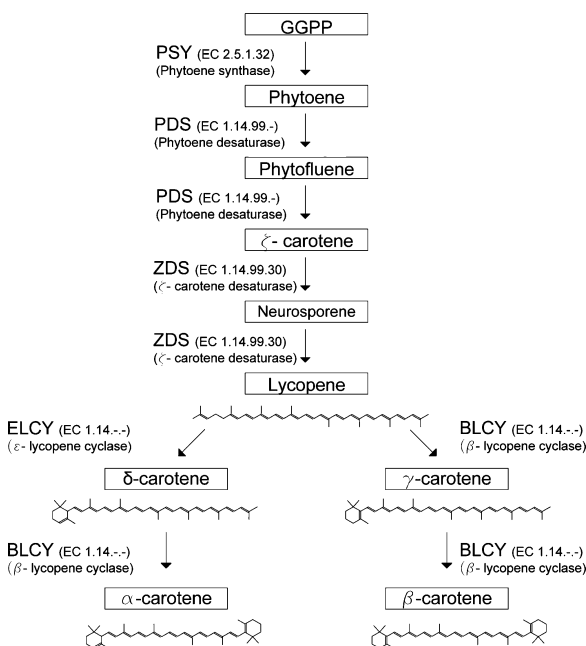


Fig. 1 Schematic diagram of the early steps in the carotenoid biosynthetic pathway in plants

Table 1 Characteristics and carotenoid contents of the *E. coli* transformants used in this study

<i>E. coli</i> strain	Plasmid(s)	Gene(s)	Source	Enzyme common name	Substrates	Product	GenBank accession no.
<i>E. coli</i> BL-pACC	pACCRT-EBI	Eu-crt E	<i>Erwinia uredovora</i>	GGPP synthase	FPP/GPP	GGPP	D90087
		Eu-crt B	<i>Erwinia uredovora</i>	Phytoene synthase	GGPP	Phytoene	D90087
		Eu-crt I	<i>Erwinia uredovora</i>	Phytoene desaturase	Phytoene	Lycopene	D90087
	pET21-Lyc β	Lyc- β Fc	<i>Ficus carica</i>	Lycopene beta-cyclase	ζ -carotene	Lycopene	D90087
					Neurosporene	Lycopene	D90087
<i>E. coli</i> BFc-pACC	pET21-Lyc β	Lyc- β Fc	<i>Ficus carica</i>	Lycopene beta-cyclase	Lycopene	β -carotene	JF279547
					γ -carotene	β -carotene	JF279547
					δ -carotene	α -carotene	JF279547
<i>E. coli</i> BLFc-pACC	pACCRT-EBI	Eu-crt E	<i>Erwinia uredovora</i>	GGPP synthase	FPP/GPP	GGPP	D90087
		Eu-crt B	<i>Erwinia uredovora</i>	Phytoene synthase	GGPP	Phytoene	D90087
		Eu-crt I	<i>Erwinia uredovora</i>	Phytoene desaturase	Phytoene	Lycopene	D90087
					ζ -carotene	Lycopene	D90087
					Neurosporene	Lycopene	D90087
	pET21-Lyc β	Lyc- β Fc	<i>Ficus carica</i>	Lycopene beta-cyclase	Lycopene	β -carotene	JF279547
					γ -carotene	β -carotene	JF279547
					δ -carotene	α -carotene	JF279547

coli BL21 (DE3) cells were grown in LB medium at 28 °C for 48 h in the darkness, to maximize carotenoid production. Chloramphenicol (34 μ g/ml) was employed for selection of *E. coli* BL-pACC transformants.

The pET21a (Novagen, Cambridge, UK) expression vector contained the complete ORF (open reading frame) of the gene Lyc- β Fc (pET21-Lyc β) was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen) to achieve *E. coli* BFc-pACC (Table 1). Transformed *E. coli* BL21 (DE3) cells were grown in LB medium at 28 °C in the presence of ampicillin (50 μ g/ml) for 48 h when β -LCY enzyme expression was anticipated. Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added (1 mM) at the end of the logarithmic growth phase.

Cloning of the lycopene β -cyclase gene from *F. carica*

Total RNA was isolated from 60 mg of fresh leaf from *F. carica*, using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), as recommended by the manufacturer.

The first cDNA strand was synthesized using the reverse transcription (RT)-PCR AMV kit (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). Degenerate primers Lyc- β Deg F and Lyc- β Deg R (Table 1), used to carry out RT-PCR, were designed using Primer Premier 5.0 (Biosoft International), according to conserved motifs of other Lyc- β sequences deposited in the GenBank Database. Specific cDNA amplification was carried out by PCR using the above-mentioned oligonucleotide primers and 2 μ l of first-strand cDNA. The reaction mixture contained polymerase buffer, 0.2 mM of each primer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each

deoxynucleotide, and 1 unit of Accuzyme DNA polymerase (Bioline, Taunton, MA).

PCR reactions to amplify the internal fragment of Lyc- β Fc were carried out using the following program: 94 °C for 2 min, 35 cycles of 94 °C for 45 s; 49 °C for 1 min and 72 °C for 2 min; and a final extension of 72 °C for 2 min. The PCR product was cloned into the pCR Blunt II TOPO vector (Invitrogen) using the Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen). DNA inserts were then sequenced.

RACE-PCR

The 5' and 3' ends of Lyc- β Fc were obtained by rapid amplification of cDNA ends (RACE)-PCR, using the 5'/3' RACE kit, 2nd Generation (Roche Applied Science). The primers Lyc- β Fc1, Lyc- β Fc2, Lyc- β Fc3, Lyc- β Fc4, and Lyc- β Fc5 (Table 2) were designed for the RACE-PCR. The amplification was carried out with 1 unit of Accuzyme DNA Polymerase. Lyc- β Fc1 was the primer used for first strand cDNA synthesis. The missing 5' region of the gene was obtained in a PCR containing Lyc- β Fc2 and Oligo dT-Anchor primer as primers, and incubated as follows: 1 cycle at 94 °C for 2 min; 10 cycles of 94 °C for 15 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 40 s; 25 cycles of 94 °C for 15 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 40 s and increasing the elongation time by 20 s in each subsequent cycle; and a final extension cycle of 72 °C for 7 min. The resulting DNA product was then used as the template (dilution 1:20) in a subsequent PCR, with Lyc- β Fc3 and the PCR anchor primer as primers. This second PCR was incubated as described above, except for the primer annealing step that was increased to 60 °C.

Table 2 PCR primers used in this study (sequence is written 5' to 3')

Technique	Primer	Primer sequence
RT-PCR	Lyc- β DegF	5' TGGCCHAAYAATTAYGGWGTGG 3'
RT-PCR	Lyc- β DegR	5' ATATCCATDCCAAAASAGWAG 3'
5' RACE-PCR	Lyc- β SP1	5' TCCCACCCATTGCCATCACACTT 3'
5' RACE-PCR	Lyc- β SP2	5' GGTGACCCTCAACTTCAGCCAAAA 3'
5' RACE-PCR	Lyc- β SP3	5' GCCTCTCCCTATTGACACGCCCAT 3'
3' RACE-PCR	Lyc- β SP4	5' CGGGGTACCCCGGGGAAATGAGCCTTACTTGCGAG 3'
3' RACE-PCR	Lyc- β SP5	5' CGGGGTACCCCGTGGAGGTGAAGAAGAGGATGGTTGC 3'
PCR (ORF)	Lyc- β <i>NheI</i> F	5' GGAATTC CATATGGGTACTCTCCATATCCA 3'
PCR (ORF)	Lyc- β <i>SacI</i> R	5' CGAGCTC CTAAATGGTTTCAAGTGCCAAAT 3'

H = A, C; Y = C, T; W = A, T; D = A, G; S = C, G

F forward, R reverse, ORF open reading frame

To obtain the 3' end of Lyc- β Fc, we carried out two sequential PCR reactions, using the Lyc- β Fc4 and Lyc- β Fc5 primers, respectively, and the PCR anchor primer. The DNA fragments obtained were then sequenced.

From the sequences obtained above, we designed PCR primers Lyc- β *NdeI* F and Lyc- β *SacI* R to amplify the complete gene Lyc- β Fc coding region. We added restriction sites *NdeI* and *SacI*, respectively, (Table 2) at the 5' and 3' end of the primers to facilitate future DNA cloning. The PCR conditions were: 1 cycle at 94 °C for 3 min; 35 cycles of 94 °C for 45 s, 54 °C for 60 s and 72 °C for 2 min; and a final extension at 72 °C for 10 min. The resulting PCR product was cloned into a pET21a vector, thus obtaining the expression plasmid pET21-Lyc β (Table 1).

Determination of lycopene cyclase enzymatic activity

The lycopene cyclase enzyme activity was determined by color complementation assays using the strain *E. coli* BL-pACC as a start point (Table 1). This strain displays a red coloration due to lycopene accumulation.

E. coli BL-pACC was co-transformed with the plasmid pET21-Lyc β to achieve *E. coli* BLFc-pACC. This strain displays an orange coloration due to the accumulation of specific carotenoid, providing an easily screenable phenotype. Co-transformed cells were plated on LB agar plates containing chloramphenicol (34 μ g/ml) and ampicillin (50 μ g/ml), and spread with 10 μ l of a 100 mM aqueous solution of Isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG) 1 h before the cells were plated. The plates were incubated at 28 °C for 48 h in the darkness, to maximize carotenoid production. *E. coli* BL-pACC transformed with the plasmid pET21a was used as the negative control. After incubation, the cyclase activity on the lycopene molecule was identified by the color of the bacterial colonies; a red color meant no cyclase activity, whereas an orange/yellow resulted from the enzymatic activity.

HPLC analysis of carotenoids

E. coli BLFc-pACC (Table 1) was grown over night in LB broth supplemented with chloramphenicol (34 μ g/ml) and ampicillin (50 μ g/ml) at 37 °C with agitation (200 rpm). The culture was then incubated for another 48 h at 28 °C in the darkness with agitation (200 rpm) after adding isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (1 mM). After incubation, the cells were centrifuged (4,000 \times g for 5 min), and the bacterial pellet washed twice with deionized water, re-suspended in acetone (Sigma) and homogenized by vortexing (10 min at 4 °C). After a new centrifugation (13,000 \times g, 2 min, 4 °C), the supernatant was recovered and dried down under a N₂ flow, and kept at -80 °C until high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis. All operations were carried out on ice under dim light to prevent photo-degradation, isomerizations, and structural changes of the carotenoids. The samples were prepared for HPLC by dissolving the dried residues in 2 ml of chloroform/methanol/acetone (3:2:1 v/v/v) and filtered through polycarbonate 0.22- μ m filter. The HPLC device used was equipped with a photodiode array detector and was controlled by the Empower2 software program. A C₃₀ carotenoid column (250 \times 4.6 mm, 5 μ m; YMC Europa) was used, and the mobile phase was as follows: A, methyl *tert*-butyl ether; B, water; C, methanol. The linear ternary gradient elution program was performed as follows: initially, A/B/C (5:5:90); then 0–12 min, A/B/C (5:0:95); 12–20 min, A/B/C (14:0:86); 20–30 min, A/B/C (25:0:75); 30–50 min, A/B/C (50:0:50); 50–70 min, A/B/C (75:0:25); and finally back to A/B/C (5:5:90) for re-equilibration. The flow rate was maintained at 1 ml/min, the temperature at 24 °C and the sample volume was 20 μ l. Carotenoids were identified by comparing their HPLC retention time and color with standard compounds or with reported data. The β -carotene and lycopene standards were obtained

from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) as described (Melendez Martinez et al. 2003; Rodrigo et al. 2004). The photodiode array detector was set to scan from 250 to 540 nm throughout all of the elution profile. For each elution, a Maxplot chromatogram was obtained, which plots each carotenoid peak at its corresponding maximum absorbance wavelength. Quantitative analysis was done by calculating peak areas of the chromatogram using a calibration curve obtained with a β -carotene standard.

Protein electrophoresis (SDS-PAGE)

E. coli BL21 (DE3) transformed with either pET21a or pET21-Lyc β was grown at 37 °C, with agitation (180 rpm), until it reached an OD of 0.5–1. The cultures were then induced by addition of 1 mM IPTG. After four hours incubation, samples were taken and according to the instructions provide in the pET21a system manual (Novagen). Prior to polyacrylamide gel electrophoresis, the samples were incubated at 85 °C for 3 min in solubilization buffer containing 2.5% (w/v) SDS, 125 mM dithiothreitol, 25% (v/v) glycerol and 112.5 mM Tris-HCl, pH 6.8. The protein samples were then loaded onto a 12% polyacrylamide gel and separated on a Mini Protean II cell (Bio-Rad, Hercules, CA), according to the method of Laemmli (1970). The gel was run at 120 V for 1 h, using Tris-Glycine buffer (25 mM Tris; 192 mM Glycine; 0.1% SDS; pH: 8.3). The molecular weight of the proteins was determined using Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad) and the software Quantity One (Bio-Rad).

Bioinformatic analyses

Vector NTI Advance 9.0 software (Invitrogen) and BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.5.3, were used to analyze the nucleotide and deduced amino acid sequences, and for sequence alignment, respectively. The NCBI database was searched for plant β -LYC sequences using the BLAST software (Altschul et al. 1990).

The ChloroP 1.1 Prediction Server program (Emanuelsson et al. 1999) was used to identify the β -LYC signal/sorting peptide. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA version 3.1 package program (Kumar et al. 2004). Data were analyzed by neighbor-joining method. The reliability of the neighbor-joining tree (Saitou and Nei 1987) was estimated by calculating bootstrap confidence limits (BCL) (Peelman et al. 2003) based on 1,000 replicates. The Gen Bank accession numbers of the nucleotides used in the analysis are shown in Fig. 4. Subcellular sorting was predicted by PSORT Web server (Nakai and Horton 1999) for analyzing and predicting protein-sorting signals at the Institute for Molecular and Cellular Biology (Osaka, Japan). Finally, PSIPred v3.0 (Jones 1999), was used for hydrophobicity and for protein secondary structure predictions.

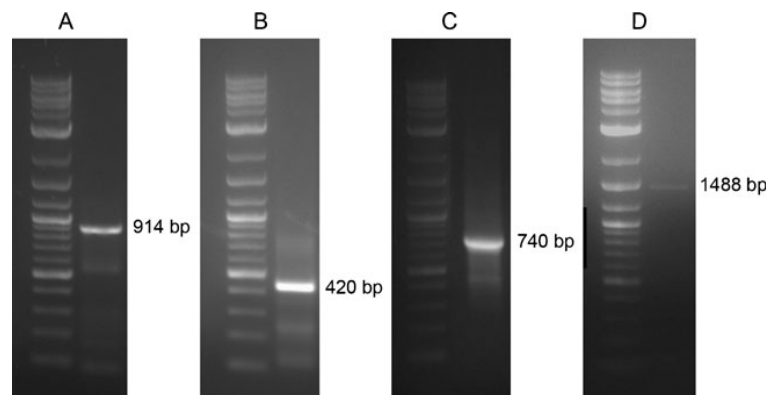
Results

Lyc- β Fc cDNA sequence

We obtained, by RT-PCR, a single 914 bp PCR product using the conserved sequences-based primers Lyc- β Deg F and Lyc- β Deg R (Fig. 2a). By sequence analyses, the amplicon displayed a high similarity (74–77%) to other plant lycopene-cyclase genes, such as those from *Citrus sinensis* (ABB72443), *Actinidia deliciosa* (FJ427509), *Actinidia chinensis* (FJ427508), *Lycopersicon esculentum* (X86452), and *Carica papaya* (ABD91578).

We had to resort to RACE-PCR to obtain the sequences of the 5' and 3' ends of Lyc- β Fc. The 5' end of the gene was amplified as a 420-bp fragment (Fig. 2b), whereas a fragment of 740 bp (Fig. 2c) represented the 3' end of the gene. Both new sequences overlapped the known internal sequence of the gene. Finally, the complete sequence of the Lyc- β Fc cDNA from *F. carica* could be determined (JF279547). The complete ORF **of the gene had a length

Fig. 2 Isolation of the full-length Lyc- β cDNA from *Ficus carica*. **a** Fragment of the Lyc- β Fc cDNA internal sequence, amplified with the primer pair Lyc- β DegF and Lyc- β DegR. **b** The 5' end of the Lyc- β Fc cDNA, isolated by 5'-RACE. **c** The 3' end of the Lyc- β Fc cDNA, isolated by 3'-RACE. **d** Open reading frame of the full-length Lyc- β Fc cDNA from *F. carica*



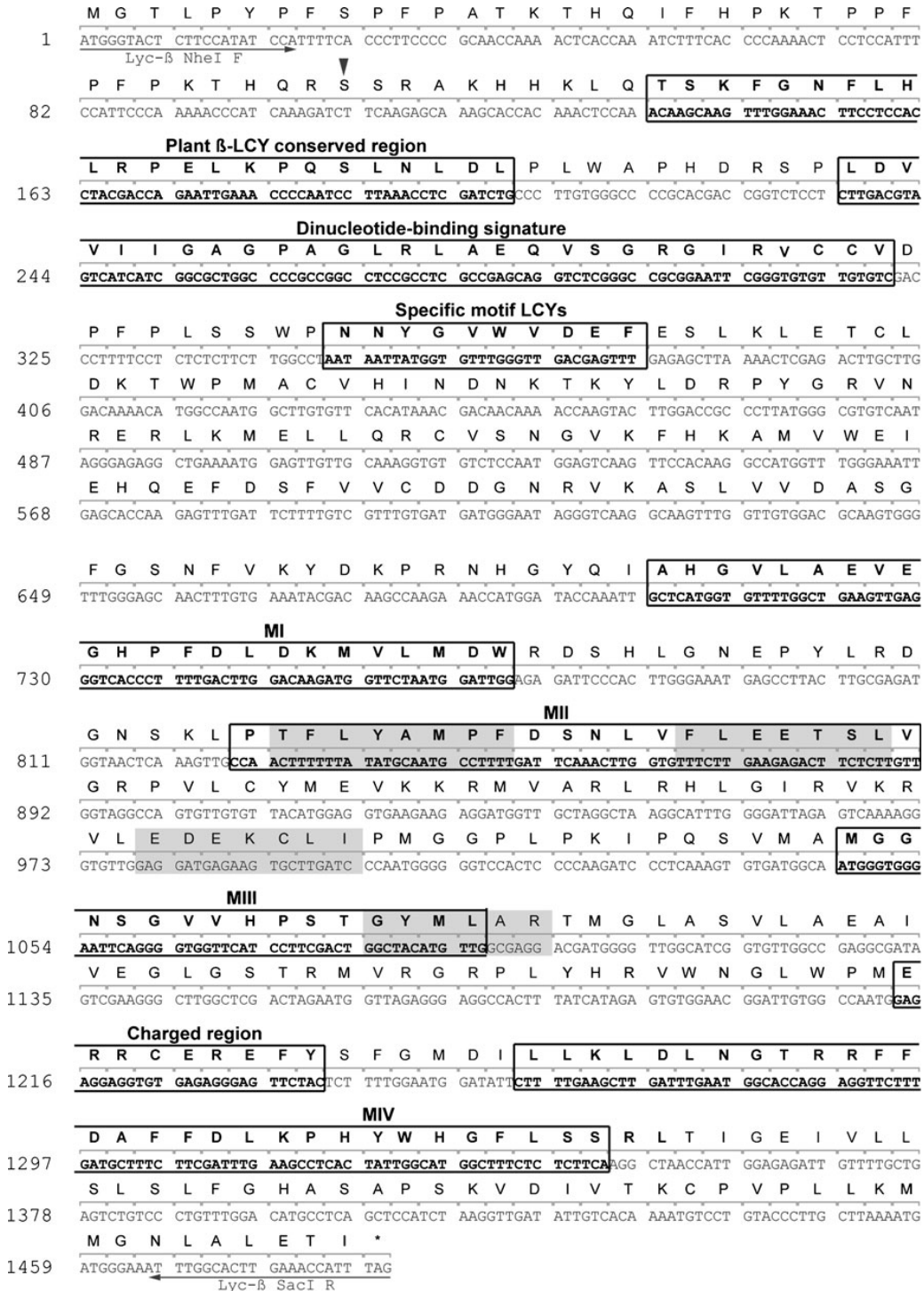


Fig. 3 Characteristics of the *F. carica* beta lycopene cyclase protein. The most likely points for chloroplast precursor cleavage are indicated with an arrow. Characteristic regions of the plant LCYs are indicated by open boxes, the dinucleotide binding signature, cyclase motifs (M)

I to IV, and charged region (Cunningham et al. 1996; Huguency et al. 1995). Domains described as essential for β-LCY activity are boxed in gray (Bouvier et al. 1997)

of 1,488 bp (Fig. 2d), and the predicted amino acid sequence specified a polypeptide of 496 amino acids in length. This was the amplicon co-expressed in *E. coli* BL-pACC.

Several featured structures of interest were found when the predicted *F. carica* Lyc- β Fc sequence was compared and aligned with other lycopene β -cyclases (Fig. 3). Data analysis, with the PSORT program, predicted a plastid location for the β -LCY protein, with a predicted transit peptide of 36 bp (Fig. 3). β -LCY from *F. carica* contains the specific highly conserved LCY motif, characteristic of this kind of enzymes in higher plants. The analysis of conserved motifs along the amino acid sequences showed the presence of a dinucleotide-binding signature, typically DX₄GXGXAX₄A, with a secondary structure of β sheet– α -helix loop– β sheet. This motif is referred to as the “dinucleotide binding fold” that is present in all plant β -LCYs (Cunningham et al. 1994; Wirenga et al. 1986) (Fig. 3). Other than that, the rest of the essential motifs for cyclase activity were present in the β -LCY of *F. carica* (Bouvier et al. 1997; Cunningham et al. 1996).

β -LYC Fc expression and characterization

When the *E. coli* BL21 (DE3)-expressed pET21-Lyc β was analyzed by SDS/PAGE, a protein of 56 kDa of molecular weight could be observed. This band only appeared in the cells expressing the construct and after the induction of the plasmid with IPTG (1 mM), but not in the negative controls. However, studies were not performed on tissue differential expression or at different stages of plant development.

The Neighbor-Joining test showed a high homology of the expressed protein with lycopene β -cyclase genes of plants. The marine microalgae *Dunaliella salina* was used as an outgroup and appears in an isolated branch. The position of the sequence from *F. carica* was more closely related to *A. deliciosa* and *A. chinensis* than to other β -LCYs so far examined (Fig. 4).

Color complementation assays were used to analyze the enzymatic activity of β -LYC. These tests are based on the color differences between the carotenoids; lycopene is red, whereas β -carotene is orange/yellow. When *E. coli* BL-pACC was co-transformed with pET21-Lyc β , and β -LYC expression induced, the color of the bacterial colonies turned from red to orange/yellow, thus indicating a variation in the carotenoid composition from lycopene to β -carotene (Fig. 5). The negative controls did not show changes in their colors.

Carotenoid identification and quantification by HPLC

The analyses of carotenoids present in the negative controls showed that the initial pigment in the cells was lycopene, whereas the pigment after β -LYC expression of *E. coli* BLFc-pACC corresponded to β -carotene. This strongly suggested the ability of β -LYC to act on both ends of the

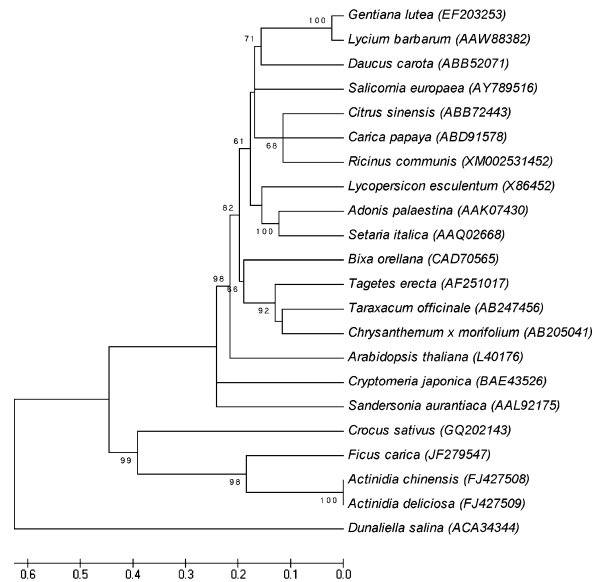


Fig. 4 Phylogenetic tree generated based on alignment of nucleotide sequence of different β -LCYs. The tree was inferred using the Neighbor-Joining method. The Bootstrap values on the nodes indicate the number of times that each group occurred with 1,000 replicates. The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method (Kimura 1980) and are in the units of the number of base substitutions per site. The rate variation among sites was modelled with a gamma distribution (shape parameter = 1). Accession numbers of nucleotide sequences are in *parenthesis*

lycopene molecule as expected from a β -cyclase activity. We did not observe accumulation of the monocyclic species γ -carotene in cultures of *E. coli* BLFc-pACC. This is consistent with studies conducted so far, claiming that all known β -cyclases, except one recently discovered in a marine bacterium (Teramoto et al. 2003), create rings at both ends of lycopene to form β -carotene via γ -carotene (Daisuke et al. 2005; Sandmann et al. 1990).

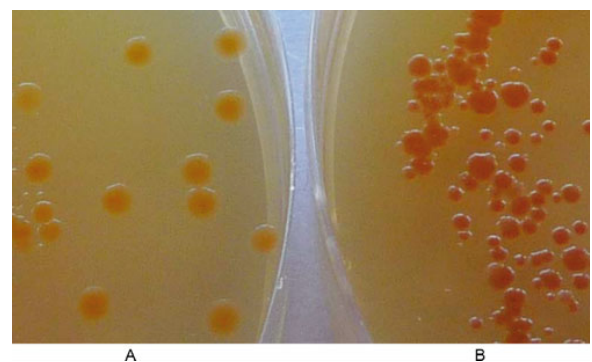


Fig. 5 Complementation color analysis. **a** *E. coli* BL-pACC transformed with pET21-Lyc β . **b** Negative control: *E. coli* BL-pACC expressing pET21a, without Lyc- β gene

The β -carotene content of the recombinant *E. coli* BLFc-pACC was $529 \mu\text{g/g}^{-1}$ of dry weight cells and the β -cyclase activity, defined as the percentage of lycopene/ β -carotene conversion rate, was 91%. These results show higher values of beta carotene production compared with those obtained in other recombinant *E. coli* strains (Misawa et al. 1995; Misawa and Shimada 1998; Schurr et al. 1996), but lower than other *E. coli* strains carrying the exogenous *ipi* gene for IPP isomerase (Misawa and Shimada 1998).

In addition, we observed that *E. coli* BLFc-pACC transformant varies for level of pigmentation. When grown on plates at 28 °C in the darkness, it showed the highest accumulation of pigment.

Discussion

β -Carotene is still the most prominent carotenoid on the market; however, most carotenoids are still produced by chemical synthesis, due to the low productivity of the biological systems (Rodney 1994). One way to increase the productivity of carotenoid synthesis would be the use of recombinant DNA technology, but before this technology can be used, the carotenoid biosynthetic genes need to be isolated and characterized.

In this study, we were able to clone and identify the complete sequence encoding the lycopene cyclase enzyme from *F. carica*, and to carry out its heterologous expression in *E. coli*. The molecular mass of the newly expressed protein, as isolated from the soluble cytoplasmic fraction, was 56 kDa, which corresponded to the expected mass calculated from the gene sequence.

The amino acid sequence of the ORF, displayed high similarity with the β -LCYs from other plants. Thus, the presence in the N-terminal end of the signal peptide for plastid importation is typical of all the enzymes involved in the biosynthesis of carotenoids in plants (Bouvier et al. 2005; Fraser and Bramley 2004; Sandmann et al. 2006) and, as expected, is not present in the β -LCYs from bacteria or cyanobacteria (Hugueney et al. 1995). Within this region, it was possible to identify the “Plant β -LCY conserved region,” that has been proposed as essential for the association of β -LYC to the membrane and for its catalytic activity (Beyer et al. 1991; Hugueney et al. 1995).

Lycopene is the primary substrate for the formation of cyclic carotenoids in plants. The conversion of lycopene to β -carotene requires that a cycling reaction occurs at both ends of the symmetrical lycopene. The analysis of carotenoids showed the presence of β -carotene, and we were unable to observe accumulation of the monocyclic γ -carotene in cultures containing pACCRT-EIB and pET21-Lyc β , even though a substantial amount of lycopene

accumulated in these cells. This observation indicates that any molecule of lycopene which is cycled at one end has high probability of being cycled at the other end as well. The possibility that lycopene cyclase operates as a homodimeric complex would be one explanation for this result (Gallagher et al. 2003). Our result demonstrated that a single plant enzyme efficiently catalyze sequentially both cyclization steps like others plants β -LCYs described so far (Ahrazem et al. 2009; Alquezar et al. 2009; Ampomah-Dwamena et al. 2009; Hugueney et al. 1995; Rodrigo et al. 2004).

On the other hand, the heterologous expression of biosynthetic pathways in *E. coli* continues to be a powerful approach for developing metabolic engineering applications in plants. The utility of the bacterial system lies in its inherent similarity to the biochemistry of the plant plastid (Gallagher et al. 2003).

It can therefore be concluded that the Lyc- β Fc gene encodes for a lycopene β -cyclase, capable of synthesizing β -carotene, a pigment of high industrial interest and of great importance in health and human and animal nutrition.

Acknowledgements J. A.-G. is the recipient of an AECID scholarship from the Spanish Foreign Affairs Ministry. The authors thank Dr. Norihiko Misawa (Research Institute for Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural University) for the gift of plasmid pACCRT-EIB.

References

- Ahrazem O, Rubio-Moraga A, Castillo R, Gomez-Gomez L (2009) The expression of chromoplast-specific lycopene beta cyclase gene is involved in the high production of saffron's apocarotenoid precursors. *J Exp Bot* 61(1):105–119. doi:10.1093/jxb/erp283
- Alquezar B, Zacarias L, Rodrigo MJ (2009) Molecular and functional characterization of a novel chromoplast-specific lycopene β -cyclase from *Citrus* and its relation to lycopene accumulation. *J Exp Bot* 60(6):1783–1797. doi:10.1093/jxb/erp048
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3):403–410
- Ampomah-Dwamena C, McGhile T, Wibisono R, Montefiori M, Hellens RP, Allan AC (2009) The kiwifruit lycopene beta-cyclase plays a significant role in carotenoid accumulation in fruit. *J Exp Bot* 60(13):3765–3779. doi:10.1093/jxb/erp218
- Beyer P, Kröncke U, Niewelstein V (1991) On the mechanism of the lycopene isomerase/cyclase reaction in *Narcissus pseudonarcissus* L. chromoplasts. *J Biol Chem* 266(26):17072–17078
- Bouvier F, d'Harlingue A, Camara B (1997) Molecular analysis of carotenoid cyclase inhibition. *Arch Biochem Biophys* 346(1):53–64
- Bouvier F, Rahier A, Camara B (2005) Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog Lipid Res* 44(6):357–429
- Britton G (1998) Overview of carotenoid biosynthesis. In: Britton G, Liaaen-Jensen S and Pfander H (eds) *Carotenoids: biosynthesis and metabolism*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, pp 13–147
- Cunningham FX (2002) Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants. *Pure Appl Chem* 74:1409–1417

- Cunningham FX, Sun Z, Chamovitz D, Hirschberg J, Gantt E (1994) Molecular structure and enzymatic function of lycopene cyclase from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942. *Plant Cell* 6:1107–1121
- Cunningham FX, Pogson B, Sun Z, McDonald KA, DellaPenna D, Gantt E (1996) Functional analysis of the β and ϵ lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* 8(9):1613–1626
- D'Ambrosio C, Giorio G, Marino I, Merendino A, Petrozza A, Salfi L, Stigliani A, Cellini F (2004) Virtually complete conversion of lycopene into beta-carotene in fruits of tomato plants transformed with the tomato lycopene beta cyclase (tlyc-b) cDNA. *Plant Sci* 166:207–214. doi:10.1016/j.plantsci.2003.09.015
- Daisuke U, Alexander VT, Frances HA (2005) Diversifying carotenoid biosynthetic pathways by directed evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* 69(1):51–78. doi:10.1128/MMBR.69.1.51-78.2005
- DellaPenna D, Pogson BJ (2006) Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annu Rev Plant Biol* 57(1):711–738
- Emanuelsson O, Nielsen H, Von Heijne G (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci* 8(5):978–984
- Frank H, Cogdell RJ (1993) Photochemistry and function of carotenoids in photosynthesis. In: Young AJ, Britton G (eds) *Carotenoids and photosynthesis*. Chapman & Hall, London, pp 253–326
- Fraser PD, Bramley P (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* 43(3):228–265
- Gallagher CE, Cervantes M, Wurtzel ET (2003) Surrogate biochemistry: use of *Escherichia coli* to identify plant cDNAs that impact metabolic engineering of carotenoid accumulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 60(6):713–719
- Hirschberg J (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol* 4(3):210–218
- Hirschberg J, Cohen M, Harker M, Lotan T, Mann V, Pecker I (1997) Molecular genetics of the carotenoid biosynthesis pathway in plants and algae. *Pure Appl Chem* 69(10):2151–2158
- Horton P, Ruban AV, Walters RG (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:655–684
- Hugueney P, Badillo A, Chen HC, Klein A, Hirschberg J, Camara B, Kuntz M (1995) Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts. *Plant J* 8(3):417–424
- Jones DT (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* 292:195–202
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111–120
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings Bioinf* 5:150–163
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London, UK)* 227:680–685
- Lianju W, Weibin J, Kai M, Zhifeng L, Yelin W (2003) The production and research of fig (*Ficus carica* L.) in China. *Acta Horticult* 605:191–196
- Melendez Martinez AJ, Vicario IM, Heredia FJ (2003) A routine high-performance liquid chromatography method for carotenoid determination in ultrafrozen orange juices. *J Agric Food Chem* 51:4219–4224
- Misawa N, Satomi Y, Kondo K, Yokoyama A, Kajiwarra S, Saito T, Ohtanai T, Miki W (1995) Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J Bacteriol* 177:6575–6584
- Misawa N, Shimada H (1998) Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. *J Biotechnol* 59(3):169–181
- Nakai K, Horton P (1999) PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* 24(1):34–35
- Park H, Kreunen SS, Cuttriss AJ, DellaPenna D, Pogson BJ (2002) Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation and photomorphogenesis. *Plant Cell* 14:321–332
- Pecker I, Gabbay R, Cunningham FX, Hirschberg J (1996) Cloning and characterization of the cDNA for lycopene beta-cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Mol Biol* 30:807–819
- Peelman F, Labeur C, Vanloo B, Roosbeek S, Devaud C, Duverger N, Deneffe P, Rosier M, Vandekerckhove J, Rosseneu M (2003) Characterization of the ABCA transporter subfamily: identification of prokaryotic and eukaryotic members, phylogeny and topology. *J Mol Biol* 325:259–274
- Rodney AL (1994) Production of carotenoids by recombinant DNA technology. *Pure Appl Chem* 5(66):1057–1062
- Rodrigo MJ, Marcos JF, Zacarias L (2004) Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. *J Agric Food Chem* 52(22):6724–6731
- Rodríguez Concepción M (2006) Early steps in isoprenoid biosynthesis: multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells. *Phytochem Rev* 1(5):1–15
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
- Sandmann G (1994) Phytoene desaturase — genes, enzymes and phylogenetic aspects. *J Plant Physiol* 143(4–5):444–447
- Sandmann G, Woods WS, Tuveson RW (1990) Identification of carotenoids in *Erwinia herbicola* and in a transformed *Escherichia coli* strain. *FEMS Microbiol Lett* 59(1–2):77–82
- Sandmann G, Romer S, Fraser PD (2006) Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. *Metab Eng* 8(4):291–302
- Schurr G, Misawa N, Sandmann G (1996) Expression, purification and properties of lycopene cyclase from *Erwinia uredovora*. *Biochem J* 315:869–874
- Solomon A, Golubowicz S, Yablucwicz Z, Grossman S, Bergman M, Gottlieb HE, Altman A, Kerem Z, Flaishman MA (2006) Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). *J Agric Food Chem* 54:7717–7723
- Su Q, Rowley KG, Itsiopoulos C, O'Dea K (2002) Identification and quantitation of major carotenoids in selected components of the Mediterranean diet: green leafy vegetables, figs and olive oil. *Eur J Clin Nutr* 56:1149–1154
- Teramoto M, Takaichi S, Inomata Y, Ikenaga H, Misawa N (2003) Structural and functional analysis of a lycopene beta-monocyclase gene isolated from a unique marine bacterium that produces myxol. *FEBS Lett* 545:120–126
- Tian L, Magallanes-Lundback M, Musetti V, DellaPenna D (2003) Functional analysis of β - and ϵ -ring carotenoid hydroxylases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:1320–1332
- Vinson JA (1999) The functional food properties of figs. *Cereal Foods World* 4:82–87
- Vinson JA, Zubik L, Bose P, Samman N, Proch J (2005) Dried fruits: excellent *in vitro* and *in vivo* antioxidants. *J Am Coll Nutr* 24:44–50
- Wirenga RK, Terpstra P, Hol WG (1986) Prediction of the occurrence of the ADP-binding β/β -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J Mol Biol* 187:101–107

Construction of new *Pichia pastoris* X-33 strains for production of lycopene and β -carotene

J. M. Araya-Garay · L. Feijoo-Siota ·
F. Rosa-dos-Santos · P. Veiga-Crespo · T. G. Villa

Received: 8 October 2011 / Revised: 12 November 2011 / Accepted: 14 November 2011 / Published online: 9 December 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract In this study, we used the non-carotenogenic yeast *Pichia pastoris* X33 as a receptor for β -carotene-encoding genes, in order to obtain new recombinant strains capable of producing different carotenoidic compounds. We designed and constructed two plasmids, pGAPZA-EBI* and pGAPZA-EBI*L*, containing the genes encoding lycopene and β -carotene, respectively. Plasmid pGAPZA-EBI*, expresses three genes, crtE, crtB, and crtI*, that encode three carotenogenic enzymes, geranylgeranyl diphosphate synthase, phytoene synthase, and phytoene desaturase, respectively. The other plasmid, pGAPZA-EBI*L*, carried not only the three genes above mentioned, but also the crtL* gene, that encodes lycopene β -cyclase. The genes crtE, crtB, and crtI were obtained from *Erwinia uredovora*, whereas crtL* was cloned from *Ficus carica* (JF279547). The plasmids were integrated into *P. pastoris* genomic DNA, and the resulting clones Pp-EBI and Pp-EBIL were selected for either lycopene or β -carotene production and purification, respectively. Cells of these strains were investigated for their carotenoid contents in YPD media. These carotenoids produced by the recombinant *P. pastoris* clones were qualitatively and quantitatively analyzed by high-resolution liquid chromatography, coupled

to photodiode array detector. These analyses confirmed that the recombinant *P. pastoris* clones indeed produced either lycopene or β -carotene, according to the integrated vector, and productions of 1.141 μ g of lycopene and 339 μ g of β -carotene per gram of cells (dry weight) were achieved. To the best of our knowledge, this is the first time that *P. pastoris* has been genetically manipulated to produce β -carotene, thus providing an alternative source for large-scale biosynthesis of carotenoids.

Keywords *Pichia pastoris* X-33 · Carotenoids · Lycopene · β -carotene

Introduction

We have previously reported (Araya-Garay et al. 2011) the production of β -carotene by an *Escherichia coli* clone containing a plasmid coding for the carotenoid, thus not integrated into the bacterial chromosome. Here, we wanted to explore the possibility of integrating the recombinant genes into a eukaryotic microorganism, such as *Pichia pastoris*, since there are many industrial facilities worldwide for *Saccharomyces cerevisiae* that could be easily adapted to grow *P. pastoris*.

Carotenoids are one of the most diverse and widely distributed class of pigments in nature with a high number of biotechnological applications (Fraser and Bramley 2004; Lee et al. 2003). They are synthesized by all photosynthetic, and many non-photosynthetic, organisms including bacteria, fungi, algae, and higher plants (D'Ambrosio et al. 2004; Fraser et al. 2000). Carotenoids have a variety of biological functions, such as being responsible for the color of flowers and fruits, harvesting light (Siefermann 1987), being photoprotectors (Krinsky 1994), and also as precursors of plant hormones (Sandmann 2001).

J. M. Araya-Garay · L. Feijoo-Siota · P. Veiga-Crespo · T. G. Villa
Department of Microbiology,
University of Santiago de Compostela,
Santiago de Compostela, Spain

P. Veiga-Crespo · T. G. Villa (✉)
School of Biotechnology, University of Santiago de Compostela,
15782 Santiago de Compostela, Spain
e-mail: tomas.gonzalez@usc.es

F. Rosa-dos-Santos
Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology,
University of Santiago de Compostela,
Santiago de Compostela, Spain

In general, the synthesis of carotenoids (Fig. 1) involves the condensation of two molecules of the C_{20} precursor, geranylgeranyl diphosphate, to yield the first C_{40} hydrocarbon, the phytoene. This is followed by a series of sequential desaturations of phytoene to produce ζ -carotene, neurosporene, and, finally, lycopene (Sandmann 1994). Most of the carotenoid end products that accumulate in different plant species are cyclic carotenoids, carrying either two β -ionone rings or one β -ionone ring and one ϵ -ionone ring. They all originate from the cyclization of lycopene by two different enzymes, lycopene β -cyclase and lycopene ϵ -cyclase, originating from two different genes (Araya-Garay et al. 2011).

Carotenoids such as β -carotene and astaxanthin have many industrial applications, namely, food colorants, animal feed supplements, nutraceuticals, and cosmetic and pharmaceutical purposes. The current industrial demand for these products cannot be met by either synthetic or natural sources (Bhosale 2004). For commercial production, most carotenoids are generated by chemical synthesis, due to the low productivity of biological systems. However, consumer perception is changing, and demand for natural carotenoids is rising (Rodney 1994). β -carotene is still the most commonly used carotenoid in foodstuffs and supplements, and it has the largest carotenoid market share (Cheng 2006; Lee et al. 2003). Microorganisms offer a real alternative for economical bioproduction of carotenoids, as opposed to chemical synthesis (Bazzini et al. 2001; Frengova et al. 2003).

In recent years, a number of keto-carotenogenic genes from different microorganisms have been characterized (Schmidt-Dannert et al. 2000), opening the door to improving carotenoid

production by molecular engineering (Sandmann 2001). Carotenoid biosynthesis was successfully achieved in colorless organisms, such as *E. coli*, by transforming them with heterologous carotenogenic genes. (Araya-Garay et al. 2011; Lee et al. 2003; Misawa et al. 1995; Schmidt-Dannert et al. 2000; Steiger and Sandmann 2004; Wang et al. 1999). As opposed to *E. coli*, yeasts exhibit an efficient isoprenoid metabolism and are capable of accumulating large quantities of hydrophobic compounds, such as ergosterol, in their membranes (Vik and Rine 2001). Furthermore, many yeast species are considered generally recognized as safe organisms status by the US Food and Drug Administration. Although metabolic engineering of recombinant yeasts for carotenoid production has not yet been fully explored, the few published examples are quite promising, such as those for *S. cerevisiae* (Lange and Steinbüchel 2011; Ukibe et al. 2009; Verwaal et al. 2007; Yamamoto et al. 1994), *Candida utilis* (Misawa and Shimada 1998; Miura et al. 1998; Shimada et al. 1998), *P. pastoris* (Bhataya et al. 2009), and the filamentous fungus *Mucor circinelloides* (Papp et al. 2006). All the above-mentioned microorganisms were successfully engineered to produce either lycopene, β -carotene, or astaxanthin by diverting the ergosterol pathway with carotenogenic genes derived from *Erwinia uredovora*, *Agrobacterium aurantiacum*, or *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

P. pastoris is a methylotrophic yeast which has been widely used as a host organism to produce a variety of heterologous proteins for both research and industrial purposes (Lin Cerreghino and Cregg 2000; Macauley-Patrick et al. 2005). However, studies focused on the production of carotenoids are still scarce. In order to convert *P. pastoris* into a lycopene and β -carotene-producing organism, the precursor of these carotenoids geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPP), the basic building block of carotenoids, must be introduced into the yeast; whereas *X. dendrorhous* and *S. cerevisiae* already contain the genes that encode a GGPP synthase (*crtE* and *BTS1*), respectively (Jiang et al. 1995; Martín et al. 2008). So, since *P. pastoris* is able to produce farnesyl diphosphate (FPP) and to convert it into GGPP by heterologous expression of the appropriate gene, this indicates that *P. pastoris* has the potential to produce carotenoids. In this paper, the genes for lycopene and β -carotene biosynthesis were introduced into the *P. pastoris* genome, using pGAPZ α A expression vectors, generating yeast clones that produced either lycopene or β -carotene, depending on the recombinant gene used.

Cell disruption is the key step in the production and purification of intracellular compounds and it has important effects on their recovery and quality (Becerra et al. 2001; Buxadó et al. 2004), as well as for analytical aims. Because of its larger size and different cell wall structure, disruption of the ascomycetous yeasts cell wall is generally easier than that of other microorganism, such as bacteria. Different

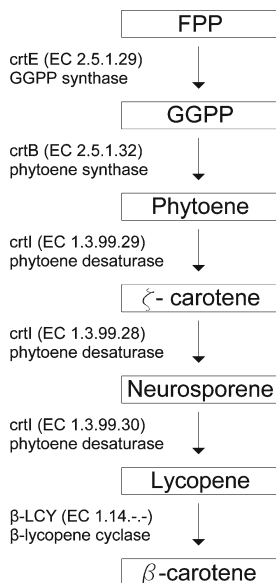


Fig. 1 Overview of the β -carotene biosynthetic pathway engineered in the recombinant *P. pastoris*, as described in this work

methods, such as mechanical, chemical, or enzymatic, can be used to disrupt cell walls; the best method depends on both the yeast characteristics (culture time, specific growth rate, and so on) and the target substance (Kula 1990; Liu et al. 2006). In this study, we have tested several extraction and purification methods in order to maximize lycopene and β -carotene recovery from the recombinant *P. pastoris* clones we generated.

Materials and methods

Genes and plasmids

E. coli–*Pichia* shuttle plasmid pGAPZ α A and wild type *P. pastoris* X-33 were purchased from Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA). *E. coli* TOP10 cells were grown in low salt Luria Bertani Broth (LB) medium at 37°C for 12 h, and clones containing plasmid pGAPZ α A were selected using Zeocin (25 μ g/ml; Invitrogen). pGAPZ α A* (a mutant pGAPZ α A missing an AvrII site) was generated by site-directed mutagenesis (SDM, as described below). Genes crtE, crtB, and crtI* (a mutant crtI lacking a BamHI site, see below) were amplified from the plasmid crtEBI (Misawa and Shimada 1998), which harbors the *E. uredoovora* crtE (GGPP synthase), crtB (phytoene synthase), and crtI (phytoene desaturase) genes and mediates the formation of lycopene. This plasmid was a gift from Prof. Misawa (Research Institute for Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural University, Japan). Amplification of the above-mentioned genes was carried out using 5' primers that contained an SfuI site, followed by an optimized Kozak consensus sequence (ATGG) and a start codon, and 3' primers containing an EcoRI restriction site (Table 1). The gene crtL* (a mutant crtL lacking a BglII site, see below) was amplified from the plasmid pET21-Lyc β , containing the gene sequence from *Ficus carica* (Araya-Garay et al. 2011). This PCR amplification was carried out using 5' primers that contained an SfuI restriction site, followed by an optimized Kozak consensus sequence (ATGG) and a start codon, and 3' primers containing an XbaI restriction site (Table 1).

All DNA ligations were carried out with T4 DNA ligase (New England Bio labs, Beverly, MA), as recommended by the manufacturer. The ligated DNA plasmids were then transformed into chemically competent *E. coli* Top10 (Invitrogen) and grown on low salt Luria–Bertani media (0.5% yeast extract, 1% tryptone, and 0.5% NaCl) plates containing 25 mg/ml Zeocin (Invitrogen). The plates were then incubated overnight at 37°C and recombinant colonies selected and grown overnight in low salt LB media containing 25 mg/ml Zeocin (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Site-directed mutagenesis

Site-directed mutagenesis (Quick change, Stratagene, La Jolla, CA) of the genes crtI and crtL was carried out, as recommended by the manufacturer, using mutational primers SDM-crtI* forward and reverse and SDM-crtL* forward and reverse, respectively. PCR was carried out with Acuzyme DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA). This allowed us to generate a silent mutant crtI*, which did not contain the BamHI site, and a crtL* lacking the BglII site, respectively (Table 1). The plasmid pGAPZ α A was mutated to generate pGAPZ α A*, which did not contain the AvrII site. This silent mutation was carried out using the primers SDM-pGAPZ α A* forward and SDM-pGAPZ α A* reverse (Table 1). All DNA mutations were verified by DNA sequencing.

Construction of lycopene and β -carotene expression vectors for carotenoid synthesis

The DNA coding for crtE was inserted into the SfuI and EcoRI sites of plasmid pGAPZ α A, and the same restriction sites were used for inserting crtB and crtI* DNAs into pGAPZ α A*. On the other hand, the DNA coding for crtL* was ligated into the SfuI and XbaI sites of pGAPZ α A*. The resulting expression vectors were denominated pGAPZA-E, pGAPZA*-B, pGAPZA*-I*, and pGAPZA*-L*, lacking the alpha factor, respectively (Fig. 2). The BamHI–BglII DNA fragment from pGAPZA*-B was subcloned into the BamHI site of pGAPZA-E to generate the pGAPZA-EB plasmid (Fig. 2). Similarly, the BamHI–BglII fragment from pGAPZA*-I* was subcloned into the BamHI site of pGAPZA-EB to generate the lycopene pathway plasmid pGAPZA-EBI* (Fig. 2). Finally, the BamHI–BglII fragment from pGAPZA*-L* was subcloned into the BamHI restriction site in plasmid pGAPZA-EBI* to generate the beta carotene pathway plasmid, pGAPZA-EBI*L* (Fig. 2). All plasmids constructed and used in this study are shown in Table 2.

Transformation of *P. pastoris* and selection of carotenoid-producing clones

P. pastoris cells were grown in 5 ml of yeast extract–peptone–glucose (YPD) medium and incubated at 30°C, in a rotary shaker at 200 rpm, overnight. This culture was used to inoculate 500 ml of YPD medium incubated as above, until it reached the exponential phase. The culture was then centrifuged at 1,500 \times g for 5 min at 4°C, and the cells were suspended in 500 ml of sterile water, at 4°C. After a second centrifugation and suspension in 20 ml of cool 1 M sorbitol, the cells were finally suspended in 1 ml of cool 1 M sorbitol.

Table 1 Oligonucleotide primers used in this study for the purpose of PCR-amplification, mutation, or sequencing

Technique	Primer	Description	Primer sequence
PCR	Eu-crtE Forward	crtE with a Kozak sequence and SfuI restriction site	5' AACTATTTTCGAAACGATGGCAGTCTGCGCAAAA 3'
PCR	Eu-crtE reverse	crtE and EcoRI restriction site	5' GGAATTCTTAACTGACGGCAGCG 3'
PCR	Eu-crtB forward	crtB with a Kozak sequence and SfuI restriction site	5' AACTATTTTCGAAACGATGGCAGTTGGCTCG 3'
PCR	Eu-crtB reverse	crtB and EcoRI restriction site	5' GGAATTCCTAGACGGGGCGTGC 3'
PCR	Eu-crtI forward	crtI with a Kozak sequence and SfuI restriction site	5' AACTATTTTCGAAACGATGGCACCAACTACGG 3'
PCR	Eu-crtI reverse	crtI and EcoRI restriction site	5' GGAATTCTCAAATCAGATCCTCCAG 3'
PCR	Fc-crtL forward	crtL with a Kozak sequence and SfuI restriction site	5' AACTATTTTCGAAACGATGGGTACTCTTCCATATCC 3'
PCR	Fc-crtL reverse	crtL and XbaI restriction site	5' GCTCTAGACTAAATGGTTTCAAGTGCCA 3'
Site-directed mutagenesis	SDM-pGAPZαA* forward	Removal of AvrII site in pGAPZαA	5' CACCGCCCGTTACCGTCGCTAGGAAATTTTACTC 3'
Site-directed mutagenesis	SDM-pGAPZαA* reverse	Removal of AvrII site in pGAPZαA	5' GAGTAAAATTTCTAGCGACGGTAACGGGCGGTG 3'
Site-directed mutagenesis	SDM-crtI* forward	Removal of BamHI site in crtI	5' CGTCTACAAGCTGCGGGTATCCCCGTCTTACTGC 3'
Site-directed mutagenesis	SDM-crtI* reverse	Removal of BamHI site in crtI	5' GCAGTAAGACGGGGATACCCGCAGCTTGTAGACG 3'
Site-directed mutagenesis	SDM-crtL* forward	Removal of BglII site in crtL	5' CCAAAAACCCATCAAAGGTCTTCAAGAGCAAAGCA 3'
Sequencing	pGAP forward 1	Sequencing of cloning fragment	5' GTCCCTATTTCAATCAATTGAA 3'
Sequencing	pGAP forward 2	Sequencing of cloning fragment (star of pGAPZA)	5' AGATCTTTTTTGTAGAAATGTC 3'
Sequencing	AOX-1 reverse	Sequencing of cloning fragment	5' GCAAATGGCATTCTGACATCC 3'

The table also includes a short description of the DNA sequences included in the primers

The pathway plasmid pGAPZA-EBI* was linearized with AvrII restriction enzyme (New England BioLabs). *P. pastoris* X-33 was transformed with this expression plasmid by electroporation, using a Bio-Rad Micropulser (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). The electroporation was carried out at 1,500 V, 200 Ω, and 25 μF pulse. *P. pastoris* transformants were then selected on YPDS (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, and 1 M sorbitol) plates, supplemented with Zeocin (100 mg/ml) (Invitrogen, Carlsbad, CA). The plates were incubated at 30°C until colonies were visible (48–72 h), transferred to room temperature, and incubated for 48–72 h. Gene integration into the *P. pastoris* genome was investigated by PCR, using *P. pastoris* genomic DNA extracted with the Master Pure™ Yeast DNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI). The plasmid pGAPZA-EBI*L* was linearized with AvrII and transformed into *P. pastoris* X-33, as described above.

Culture and harvest of *P. pastoris*

Red (Pp-EBI) and orange (Pp-EBIL) *P. pastoris* colonies, obtained in YPDS agar plates, were selected and grown, for 72 h at 30°C and 200 rpm, in 100 to 500 ml of YPD (yeast extract 1%, peptone 2%, and glucose 2%) media containing 100 mg/ml Zeocin (Invitrogen, Carlsbad, CA). The cell

culture was harvested and washed with distilled water, as described before, and the cells were transferred into 50 ml polypropylene centrifuge tubes and centrifuged at 3,000 rpm, for 15 min, at 4°C. The upper layer was then discarded and the cells snap-frozen at –80°C and lyophilized over 48 h at 0.1 mbar (Telstar, Cryodos Lyophilizer).

Extraction of carotenoids

We tried a number of cell-disruption methods in order to maximize the recovery of lycopene and β-carotene from the recombinant *P. pastoris* cells (Pp-EBI and Pp-EBIL), as described below.

1. Treatment 1: Glass pearls in vortex shaker: A flask containing 50 mg of lyophilized cell biomass was placed in a vortex shaker with 0.2 g of glass pearls (0.45 mm diameter) and 10 ml of acetone and shaken for 10 min.
2. Treatment 2: Ultrasonic waves: 50 mg of lyophilized yeast cells and 10 ml of acetone were placed in a sonicator bath (Ultrasons 250, Selecta S.A.) and 4 cycles of ultrasound (40 W RMS, 20 kHz, 10 min) applied (Medeiros et al. 2008).
3. Treatment 3: Dimethyl sulfoxide (DMSO): Prior to extraction, 50 mg of lyophilized yeast cells was incubated

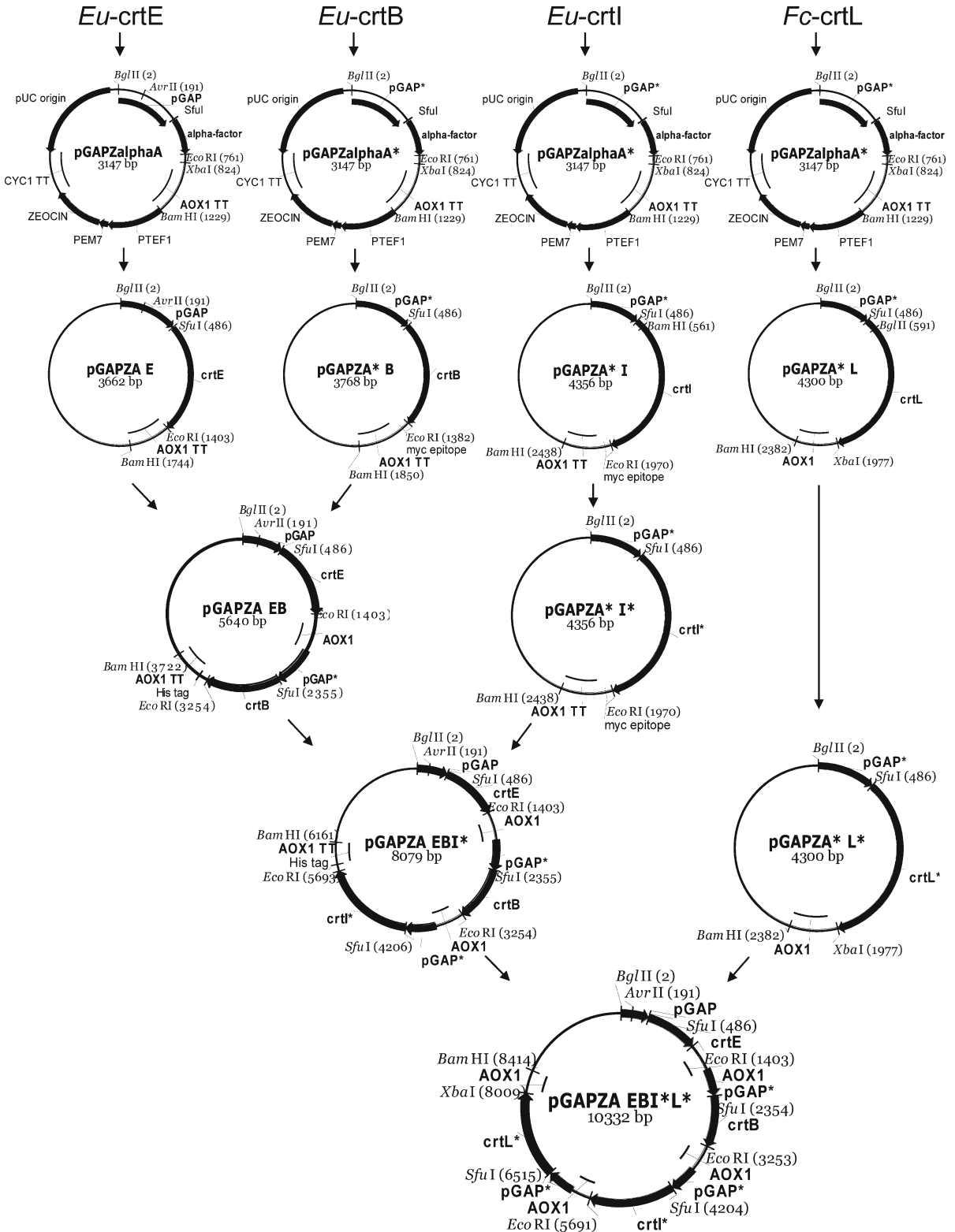


Fig. 2 Design for construction of the plasmids pGAPZA-EBI* and pGAPZA-EBI*L*

Table 2 Summary of the DNA plasmids used and/or constructed in this study

Plasmid	Description	Source or reference
pACCRT-EIB	<i>E. coli</i> lycopene expression plasmid	Misawa and Shimada 1998
pGAPZαA	<i>Pichia</i> integrative plasmid, zeocin ^R	Invitrogen
pGAPZαA*	pGAPZαA devoid of AvrII site	This study
pGAPZA-E	crtE in pGAPZA without alpha factor	This study
pGAPZA*-B	crtB in pGAPZA* without alpha factor	This study
pGAPZA*-I	crtI in pGAPZA* without alpha factor	This study
pGAPZA*-I*	crtI* in pGAPZA*; crtI* is a mutant crtI devoid of unique BamHI site	This study
pGAPZA*-L	crtL in pGAPZA* without alpha factor	This study
pGAPZA*-L*	crtL* in pGAPZA*; crtL* is a mutant crtL devoid of unique BglII site	This study
pGAPZA-EB	crtE and crtB in pGAPZA	This study
pGAPZA-EBI*	crtE, crtB, and crtI* in pGAPZA: lycopene production	This study
pGAPZA-EBI*L*	crtE, crtB, crtI*, and crtL* in pGAPZA: β-carotene production	This study

in 3 ml of DMSO, pre-warmed at 55°C for 30 min, shook strongly for 1 min, and then, maintained for an extra 30 min without shaking (dos Santos da Fonseca et al. 2011).

For all three treatments, carotenoid extraction was carried out as previously described (Bhataya et al. 2009), with slight modifications. Residual cell suspension, from each of the above treatments, was extracted with 10 ml of acetone and vortexed for 5 min at 4°C. Extracts were then combined and partitioned, with an equal volume of 10% diethyl ether, in petroleum ether, to facilitate the separation and remove the dissolved acetone. After that, 1 ml distilled water was added to the mix, followed by vortexing for 30 s and centrifugation at 3,000×g for 10 min, and the extraction was repeated until both the supernatant and residual cell pellet were colorless. This crude solvent extract was then evaporated, under a stream of N₂ flow, and kept at -80°C for high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis. All above treatments were carried out on ice and under dim light conditions, to prevent photodegradation, isomerization, and structural carotenoid changes.

HPLC analysis of carotenoids

Carotenoid samples were prepared for HPLC by dissolving the dried residues in 2 ml of chloroform–methanol–acetone (3:2:1 v/v/v) and filtering them through polycarbonate 0.22 μm filters. The HPLC device used was equipped with a photodiode array detector and was controlled by the Empower2 software program. A C₃₀ carotenoid column (250×4.6 mm, 5 μm; YMC Europe) was used and the mobile phase was as follows: A, methyl *tert*-butyl ether; B, water; and C, methanol. The linear ternary gradient elution program was as follows: Initially A–B–C (5:5:90); then A–B–C (5:0:95) from 0 to 12 min; A–B–C (14:0:86) for 12–20 min; A–B–C (25:0:75) from 20 to 30 min;

A–B–C (50:0:50), 30–50 min; A–B–C (75:0:25), 50–70 min; and, finally, A–B–C (5:5:90) for re-equilibration. The HPLC flow rate was maintained at 1 ml/min, at 24°C, and the sample volume was 20 μl. Carotenoids were identified by comparing their HPLC retention time and color with standard compounds or with reported data, as described (Melendez Martinez et al. 2003; Rodrigo et al. 2004). The β-carotene and lycopene standards were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). The HPLC photodiode array detector was set to scan from 250 to 540 nm throughout all of the elution profile. For each of the above elutions, a Maxplot chromatogram was obtained; this plots each carotenoid peak at its corresponding maximum absorbance wavelength. Quantitative analysis was carried out by calculating the chromatogram peak areas and comparing them to a calibration curve obtained with a β-carotene standard.

Results

Construction of plasmids directing the synthesis of lycopene and β-carotene

FPP is the central isoprenoid pathway intermediate (Lee et al. 2008; Schmidt-Dannert et al. 2006) where heterologously expressed carotenogenic enzymes act on to produce carotenoids such as lycopene and β-carotene. DNA fragments carrying the sequences coding for crtE, crtB, and crtI were PCR amplified from the plasmid pACCRT-EIB (Misawa and Shimada 1998) and, after digestion with the appropriate restriction enzymes, were ligated into the SfuI and EcoRI sites of the pGAPZαA expression vector, under the control of GAP constitutive promoter.

To create genetically stable carotenoid-producing *P. pastoris* cells, we constructed and designed expression plasmids that allowed for integration of the DNA sequences into the

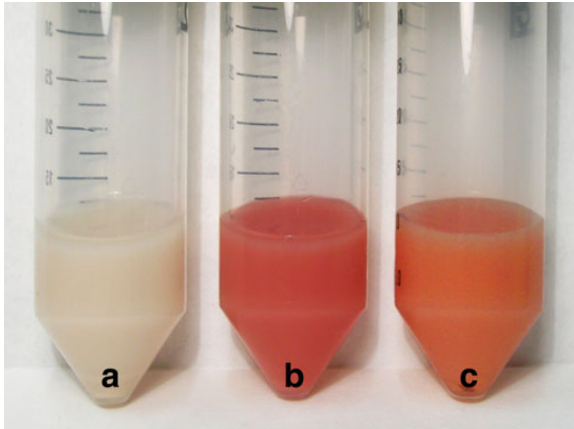


Fig. 4 *P. pastoris* X-33 cell cultures. Non-transgenic culture (a); Recombinant yeast cells harboring the plasmid pGAPZA-EBI* (b); Recombinant yeast cells harboring the plasmid pGAPZA-EBI*L* (c)

to a photodiode array detector. These analyses revealed that the *P. pastoris* strains carrying pGAPZA-EBI* plasmid (Pp-EBI) synthesized lycopene, whereas the yeast strains harboring the pGAPZA-EBI*L* plasmid (Pp-EBIL) produced β -carotene. We did not observe any rest of lycopene in cultures of Pp-EBIL strain after HPLC analyses.

Discussion

In the present work, we have succeeded in constructing genetically stable lycopene- and β -carotene-producing *P. pastoris* strains. We achieved this by introducing the metabolic abilities, mediated by either three crt genes (crtE, crtB, and crtI*) or four genes (crtE, crtB, crtI*, and crtL*), respectively. These gene constructs contained both the constitutive GAP promoter and the AOX-1 terminator. The resulting integrative plasmids were named pGAPZA-EBI* (Fig. 3a) and carried three crt genes required for the synthesis of lycopene. The expression unit for the crtL* gene, responsible for the conversion of lycopene to β -carotene (Araya et al. 2011), was constructed by inserting the crtL* expression unit, 2.4-kb BglII-BamHI derived from plasmid pGAPZA*, into an 8-kb BamHI fragment from plasmid pGAPZA-EBI*-L* (Fig. 2). The resulting pGAPZA-EBI*L* β -carotene-expressing plasmid (Fig. 3b) was then integrated into the yeast genomic DNA, and this resulted in the production of yeast cells with an orange color. Yeast recombinant colonies were grown overnight in YPD medium and subsequently streaked onto nonselective agar plates. Less than 0.5% of the cells thus originated lost their orange color after 3 days of incubation, indicating that the stability of carotenoid-producing *P. pastoris* cells is greatly enhanced by genomic integration of the genes. Similar results were obtained with *S. cerevisiae* (Verwaal et al. 2007),

where carotenoid production levels were higher in cells containing the carotenogenic genes integrated in their genome. The expression of the set of either the three or four crt genes by the recombinant yeast does indeed indicate that there are enough transcripts and presumably proteins during cell growth. We have considered the possibility that the carbon flow for the biosynthetic pathway of ergosterol has been partially redirected from FPP to geranylgeranyl pyrophosphate, for subsequent carotenoid production, and we have succeeded in constructing yeast strains producing up to 1.141 μg lycopene and 339 μg β -carotene per gram of yeast cells [dry weight (dw)]. The obtained amounts are three fold higher than those previously reported for heterologous β -carotene production in *S. cerevisiae* (Misawa and Shimada 1998; Yamano et al. 1994), as well as the reported heterologous β -carotene production in *S. cerevisiae* (Ukibe et al. 2009), using the crtI and crtYB genes from *X. dendrorhous* (390 $\mu\text{g}/\text{g}^{-1}$ per dw). However, in the recent report for β -carotene production in *S. cerevisiae* (Lange and Steinbüchel 2011), using the episomal plasmid carrying the crtE, crtI, and crtYB genes from *X. dendrorhous* with the additional gene of the mevalonate kinase from *Staphylococcus aureus*, the obtained amounts of β -carotene were four times higher than our results from Pp-EBIL.

The lycopene production from Pp-EBI of 1.141 $\mu\text{g}/\text{g}$ of yeast cells (dw) was higher than that for recombinant *C. utilis* (758 $\mu\text{g}/\text{g}^{-1}$ per dw; Misawa and Shimada et al. 1998), even when taking into account a further metabolically optimized *C. utilis* strain, claimed to produce up to 2.890 $\mu\text{g}/\text{g}$ of yeast cells (dw). We expect that the recombinant *P. pastoris* strains shown here will yield even higher β -carotene levels when further metabolic optimization is undertaken. An approach that could be used is that reported by Verwaal et al. (2007) and Yuan et al. (2006), which use mutated cultures and special fermenting conditions in large volumes. This strategy has worked well for *X. dendrorhous*, resulting in increases in astaxanthin production levels (An et al. 1989), as well as for *S. cerevisiae* for β -carotene production (Lange and Steinbüchel 2011).

As opposed to *E. coli*, *P. pastoris* exhibits an efficient isoprenoid metabolism and lower production temperature (30°C instead of 37°C) and is capable of producing both disulfide bonds and glycosylation of proteins (Cregg et al. 2009), as well as being capable of accumulating large quantities of hydrophobic compounds (Vik and Rine 2001). Compared to *S. cerevisiae*, most of the genetic manipulations used in *P. pastoris* are similar, but *P. pastoris* has a strong preference for respiratory metabolism and, therefore, grows at high cell densities without the accumulation of high levels of ethanol, an event that usually occurs in *S. cerevisiae* (Cereghino et al. 2002).

Other advantages of using *P. pastoris* for protein expression reside on the simplicity of this system, the availability

of strong promoters to drive heterologous gene expression, and the ability of this system to preform eukaryotic posttranslational modifications (Cregg et al. 2000; Lin-Cereghino and Cregg 2000). Finally, this is the first time that the non-carotenogenic yeast species *P. pastoris* has been metabolically engineered, by heterologously expressing β -carotene pathway enzymes, to produce lycopene and β -carotene, and this set the ground for further development towards the biotechnological production of other carotenoids with industrial application.

Acknowledgments J. M. A-G. is the recipient of an AECID scholarship from the Spanish Foreign Affairs Ministry. The authors thank Dr. Norihiko Misawa (Research Institute for Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural University) for the gift of plasmid pACCRT-EIB and both the Faculty of Pharmacy and School of Biotechnology for their support throughout this project. The authors also wish to thank Dr. Angeles Sánchez-Pérez, the University of Sydney, for critically reading and editing the English manuscript.

References

- An GH, Shuman DB, Johnson EA (1989) Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl Environ Microbiol* 55:116–124
- Araya-Garay JM, Feijoo-Siota L, Veiga-Crespo P, Villa TG (2011) cDNA cloning of a novel gene codifying for the enzyme lycopene β -cyclase from *Ficus carica* and its expression in the *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 92:769–777. doi:10.1007/s00253-011-3488-8
- Becerra M, Belmonte ER, Cerdán ME, Siso MIG (2001) Extraction of intra cell proteins from *Kluyveromyces lactis*. *Food Technol Biotechnol* 39:135–139
- Bhataya A, Schmidt-Dannert C, Lee PC (2009) Metabolic engineering of *Pichia pastoris* X-33 for lycopene production. *Process Biochem* 44:1095–1102
- Bhosale P (2004) Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 63:351–361
- Buxadó JA, Heynngnezz LE, Juiz AG, Tamayo G, Lima IR, Marshalleck HD, Mola EL (2004) Scale-up of processes to isolate the misstar-gated rBm86 protein from *Pichia pastoris*. *Afr J Biotechnol* 11:599–605
- Buzzini P, Rubinstein L, Martini A (2001) Production of yeast carotenoids by using agro-industrial by-products. *Agro Food Ind Hi-Tech* 12:7–10
- Cereghino GP, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*: heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol* 13(4):329–332
- Cheng Q (2006) Structural diversity and functional novelty of new carotenoid biosynthesis genes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33(7):552–559
- Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR (2000) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol* 16:23–52
- Cregg JM, Tolstorukov I, Kusari A, Sunga J, Madden K, Chappell T (2009) Expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Meth Enzymol* 463:169–189. doi:10.1016/S0076-6879(09)63013-5
- D'Ambrosio C, Giorio G, Marino I, Merendino A, Petrozza A, Salfi L, Stigliani A, Cellini F (2004) Virtually complete conversion of lycopene into beta-carotene in fruits of tomato plants transformed with the tomato lycopene beta cyclase (tley-b) cDNA. *Plant Sci* 166:207–214. doi:10.1016/j.plantsci.2003.09.015
- dos Santos RA, da Silva R, Kalil S, Veiga A, de Fernandes J (2011) Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. *Afr J Biotechnol* 10(7):1165–1171
- Fraser PD, Bramley P (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* 43(3):228–265
- Fraser PD, Pinto MES, Holloway DE, Bramley PM (2000) Application of high performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids. *The Plant J* 24:551–558
- Frengova GI, Simova D, Beshkova DM (2003) Carotenoid production by lactose-negative yeasts co-cultivated with lactic acid bacteria in whey ultrafiltrate. *Zeitschrift für Naturforschung* 58:562–567
- Jiang Y, Proteaus P, Poulters D, Ferro-Novick S (1995) Bts1 encodes a geranylgeranyl diphosphate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 270(37):21793–21799
- Krinsky NI (1994) The biological properties of carotenoids. *Pure Appl Chem* 66:1003–1010
- Kula MR (1990) Trends and future prospects of aqueous two-phase extraction. *Bioseparation* 1:181–189
- Lange N, Steinbüchel A (2011) β -carotene production by *Saccharomyces cerevisiae* with regard to plasmid stability and culture media. *Appl Microbiol Biotechnol* 91:1611–1622
- Lee PC, Momen AZR, Mijts BN, Schmidt-Dannert C (2003) Biosynthesis of structurally novel carotenoids in *Escherichia coli*. *Chem Biol* 10(5):453–462
- Lee PC, Salomon C, Mijts B, Schmidt-Dannert C (2008) Biosynthesis of ubiquinone compounds with conjugated prenyl side chains. *Appl Environ Microbiol* 74(22):6908–6917
- Lin Cereghino J, Cregg JM (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 24:45–66
- Liu YS, Wu JY, Ho KP (2006) Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. *Biochem Eng J* 27:331–335
- Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22:249–270
- Martin J, Gudiña E, Barredo J (2008) Conversion of β -carotene into astaxanthin: two separate enzymes or a bifunctional hydroxylase-ketolase protein? *Microbial Cell Factories* 7:3. doi:10.1186/1475-2859-7-3
- Medeiros FO, Alves FG, Lisboa CR, Martins DS, Burkert CAV, Kalil SJ (2008) Ultrasonic waves and glass pearls: a new method of extraction of beta-galactosidase for use in laboratory. *Quim Nova* 31:336–339
- Meléndez Martínez AJ, Vicario IM, Heredia FJ (2003) A routine high-performance liquid chromatography method for carotenoid determination in ultrafrozen orange juices. *J Agric Food Chem* 51:4219–4224
- Misawa N, Shimada H (1998) Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. *J Biotechnol* 59(3):169–181
- Misawa N, Satomi Y, Kondo K, Yokoyama A, Kajiwara S, Saito T, Ohtani T, Miki W (1995) Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J Bacteriol* 177:6575–6584
- Miura Y, Kondo K, Saito T, Shimada H, Fraser PD, Misawa N (1998) Production of the carotenoid lycopene, beta-carotene, and astaxanthin in the food yeast *Candida utilis*. *Appl Environ Microbiol* 64(4):1226–1229

- Papp T, Velayos A, Bartók T, Eslava AP, Vágvölgyi C, Iturriaga E (2006) Heterologous expression of astaxanthin biosynthesis genes in *Mucor circinelloides*. *Appl Microbiol Biotechnol* 69:526–531
- Rodney AL (1994) Production of carotenoids by recombinant DNA technology. *Pure Appl Chem* 5(66):1057–1062
- Rodrigo MJ, Marcos JF, Zacarías L (2004) Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. *J Agric Food Chem* 52(22):6724–6731
- Sandmann G (1994) Phytoene desaturase—genes, enzymes and phylogenetic aspects. *J Plant Physiol* 143(4–5):444–447
- Sandmann G (2001) Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: strategies, problems and achievements. *Trends Plant Sci* 6:14–17
- Schmidt-Dannert C, Umeno D, Arnold FH (2000) Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways. *Nat Biotechnol* 18(7):750–753
- Schmidt-Dannert C, Lee PC, Mijts BN (2006) Creating carotenoid diversity in *E. coli* cells using combinatorial and directed evolution strategies. *Phytochem Rev* 5(1):67–74
- Shimada H, Kondo K, Fraser PD, Miura Y, Saito T, Misawa N (1998) Increased carotenoid production by the food yeast *Candida utilis* through metabolic engineering of the isoprenoid pathway. *Appl Environ Microbiol* 64(7):2676–2680
- Siefermann-Harms D (1987) The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiol Plant* 69(3):561–568
- Steiger S, Sandmann G (2004) Cloning of two carotenoid ketolase genes from *Nostoc punctiforme* for the heterologous production of canthaxanthin and astaxanthin. *Biotechnol Lett* 26:813–817
- Ukibe K, Hashida K, Yoshida N, Takagi H (2009) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for astaxanthin production and oxidative stress tolerance. *Appl Environ Microbiol*. doi:10.1128/AEM.01249-09
- Verwaal R, Wang J, Meijnen J-P, Visser H, Sandmann G, van den Berg JA, 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(13):4342–4350
- Vik A, Rine J (2001) Upc2p and Ecm22p, dual regulators of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21(19):6395–6405
- Wang C-W, Oh M-K, Liao JC (1999) Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 62:235–241
- Yamamoto S, Ishii T, Nakagawa M, Ikenaga H, Misawa N (1994) Metabolic engineering for production of beta-carotene and lycopene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 58(6):1112–1114
- Yuan LZ, Rouviere PE, LaRossa RA, Suh W (2006) Chromosomal promoter replacement of the isoprenoid pathway for enhancing carotenoid production in *E. coli*. *Metab Eng* 8(1):79–90