



Vigilada Mineducación

Clonación del gen *crtl*, procedente de *Rhodotorula mucilaginosa* EA-BIO010 en cepas de *Escherichia coli* TOP10, mediante técnicas de ingeniería genética.

Manuel Ospina-Mejía¹

Tesis de pregrado

Asesores, docentes

Laura Sierra-Zapata²

Diego Fernando Villanueva-Mejía³

1: Tesista. Estudiante del Pregrado en Biología, Escuela de Ciencias Aplicadas e Ingenierías, Universidad EAFIT.

2: PhD. En Ingeniería y Bioprocesos. Codirector de la tesis. Grupo de Investigación CIBIOP; Área de Sistemas Naturales y Sostenibilidad; Escuela de Ciencias Aplicadas e Ingeniería, Universidad EAFIT

3: PhD. En Biotecnología. Director de la tesis. Grupo de Investigación CIBIOP; Área de Sistemas Naturales y Sostenibilidad; Escuela de Ciencias Aplicadas e Ingeniería, Universidad EAFIT

UNIVERSIDAD EAFIT

ESCUELA DE CIENCIAS APLICADAS E INGENIERIA

BIOLOGÍA

MEDELLÍN

2023

Resumen.

Las especies reactivas de oxígeno son moléculas inestables que contienen oxígeno y reaccionan fácilmente con otras moléculas de la célula donde generan daños sobre las moléculas lipídicas, las proteínas y el ADN. Para combatirlos, se han identificado antioxidantes como el betacaroteno, producido por organismos como *Blakeslea trispora*, *Dunalliella salina*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, entre otros. No obstante, el betacaroteno es producido en bajas cantidades en comparación con otros antioxidantes por cepas de levaduras como *R. mucilaginosa*. Cabe agregar que muchas de las metodologías empleadas hoy en día para la extracción de antioxidantes de plantas o microorganismos son ineficientes, costosas y no son sostenibles medioambientalmente. Las levaduras del género *Rhodotorula* se convierten entonces en candidatas promisorias para producir betacaroteno, ya que se ha demostrado que su clúster productor de betacaroteno puede ser expresado de forma heteróloga en otros organismos para optimizar su producción. Por lo anterior, este proyecto pretendió establecer la primera etapa de la metodología para la producción heteróloga del clúster biosintético de *Rhodotorula mucilaginosa* EA-BIO010 en cepas de *E. coli* TOP10, comenzando con la clonación del gen *crtl*. Este nuevo microorganismo recombinante podrá emplearse en un futuro para la producción de sostenible y eficiente de betacarotenos y aportar a la creación de procesos biológicos de producción de antioxidantes para uso industrial.

Planteamiento del problema.

Hoy en día se han evidenciado los efectos que generan altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células humanas, donde este, mediante la producción del péptido tóxico β -amiloide, la activación de oncogenes y la activación de quinasas y factores NF-kappa B y AP-1, facilitan el desarrollo de Alzheimer, cáncer y procesos de inflamación pulmonar entre otros padecimientos (Pham-Huy & Pham-Huy, 2008). Por lo anterior, la investigación en antioxidantes ha cobrado interés para investigadores, y organizaciones de la industria en los últimos años. Existen aproximadamente 700 especies moleculares identificadas, entre ellas betacaroteno, alfa-caroteno, zeaxantina, betacriptoxantina y luteína, que son interesantes debido a sus capacidades para combatir el cáncer, procesos inflamatorios, entre otros, motivo por el cual han sido un ingrediente de uso común y recurrente en la industria cosmética, nutracéutica, entre otras (Stefan-van Staden et al., 2019).

Sin embargo, se sabe que, en términos de producción, los carotenoides provenientes de la química sintética son menos costosos que aquellos de producción natural. Ejemplos para ilustrar lo anterior es el valor de la astaxantina sintética (~ USD1000/Kg) y el de la astaxantina producida por *Hematococcus pluvialis* (USD2500-7000/Kg), incluso los betacarotenos sintéticos tienen menor valor, alrededor de USD343.54-499.59/Kg (Silva Igreja et al., 2021). En el caso de las plantas, estas sufren de bajo rendimiento productivo de carotenoides debido a restricciones como la geografía, abriéndole paso al uso de microorganismos como biofábricas (Papadaki et al., 2021).

Dentro de los métodos modernos empleados para la obtención de carotenoides, la extracción súper crítica (SCE) es hasta ahora el más sostenible medioambientalmente y más empleado para esta actividad (Saini et al., 2022). Este método se emplea generalmente para la obtención de carotenoides de frutas y su rendimiento es bajo para metabolitos polares; respecto a los microorganismos, normalmente se incurre en varios métodos de disrupción física para la destrucción de la pared celular y también se emplean debido a la asociación que tienen los carotenoides con lípidos, proteínas y otros compuestos, haciendo así la obtención de estos metabolitos un proceso tedioso y más costoso (Saini et al., 2022). Adicionalmente, la extracción por medio de DMSO es el método más empleado para la obtención de carotenoides de microorganismos ya que es eficiente para la obtención de antioxidantes, pero implica el uso de solventes tóxicos los cuales presentan un riesgo para el medio ambiente y la salud, así como también lo son los métodos que emplean la química sintética (Musa et al., 2011; Macias et al., 2017). Asimismo, los sustratos empleados para promover la producción de antioxidantes en microorganismos son costosos (Malisorn & Suntornsuk, 2009; Cheng & Yang, 2016; Liu et al., 2021). Los métodos anteriormente mencionados no son eficientes para la obtención de carotenoides (S. Gan et al., 2022a), incluso los empleados para obtener antioxidantes de levaduras, los cuales han sido declarados ineficientes al obtenerlos directamente de fermentaciones con cepas nativas, así estas sean de interés biotecnológico (Moliné et al., 2012).

Respecto a la producción de antioxidantes por parte de levaduras, los cultivos de *Rhodotorula mucilaginosa* en condiciones estándar producen un máximo de 819.23 +/- 8.52 µg/g carotenoides en un lapso de 120 horas (Sharma & Ghoshal, 2021), entre ellos, el betacaroteno, el gamacaroteno, toruleno y torularhodina tienen una producción de 103-250 µg/g (Silva Igreja et al., 2021). Se ha evaluado la capacidad de producción de *R. mucilaginosa* en diferentes tipos de medios (tabla S1) y en medio no optimizados con diferentes tiempos de crecimiento (tabla S2). Es importante resaltar el hecho de que la producción general de carotenos y de betacarotenos de *R. mucilaginosa* está debajo de los 32mg/g producidos por *Rhodotorula glutinis*, la cual es considerada una producción decente de

carotenoides usado en general en las diversas industrias (Tang et al., 2019). En ese mismo orden de ideas, los costos de compra de los betacarotenos se pueden ver en el caso de Brasil en el 2013, donde pagó USD 38'929,505 por 3'781,376 Kg de carotenoides en importaciones, siendo este país uno de los principales compradores de carotenos (Silva Igreja et al., 2021). Lo anterior ilustra la ineficiencia de producción de betacarotenos de *R. mucilaginosa* y la dificultad que presenta para lograr producciones comerciales y suplir la demanda del mercado, realizando al mismo tiempo procesos sostenibles medioambientalmente.

Dado los problemas previamente planteados, relacionados con la ineficiencia de producción de betacarotenos en *R. mucilaginosa*, esta investigación se enfocó en la clonación del gen *crtl* de la cepa *R. mucilaginosa* EA-BIO010 en *Escherichia coli*, como punto de partida de un programa de investigación que busca la clonación del clúster biosintético completo. Se pretende generar un organismo recombinante piloto basado en la clonación del gen *crtl* y así, en un futuro cercano, producir de forma eficiente y biotecnológica, dichos antioxidantes de interés comercial y de química verde mediante ingeniería metabólica. En ese mismo orden de ideas, se plantea la pregunta de investigación: ¿Es posible clonar y expresar heterológicamente el gen *crtl* de *R. mucilaginosa* en *E. coli* como célula huésped y biofábrica piloto?

Justificación del proyecto.

El presente proyecto se enfoca en la generación de un organismo recombinante mediante ingeniería genética, empleando el gen *crtl* involucrado en el clúster biosintético productor de carotenos de *Rhodotorula mucilaginosa* EA-BIO010 y expresándolo en células de *E. coli*. Es importante recalcar que la ingeniería genética y biotecnología tienen un impacto significativo y diverso en nuestra sociedad. Uno de estos ejemplos son las nuevas técnicas de fitomejoramiento en plantas (NPBTs) vistos en especies de papa, algodón, canola, entre otras, las cuales han permitido una reducción en el uso de herbicidas y pesticidas en la agricultura del 8.3% (775.4 millones de Kg), reduciendo así el impacto ambiental en un 18.5% (Tyczewska et al., 2023). Otro caso es el uso de *E. coli* para la producción de somatotropina, hormona encontrada en la leche bovina. Este avance permitió el incremento en la producción de dicha hormona entre un 10-12% sin la necesidad de aumentar los sacrificios bovinos (Ranjha et al., 2022). Además, considerando lo anterior, este proyecto aportará conocimiento sobre el uso de nuevas biotecnologías que podrán ser empleadas en diferentes industrias para la obtención de diversos metabolitos de interés a través de métodos regenerativos y se espera que dé luces sobre los

primeros pasos para realizar la clonación del clúster biosintético de *R. mucilaginosa* EA-BIO010.

Hipótesis: La producción de la fitoeno deshidrogenasa derivado del gen *crtl* en *E. coli* TOP10 está asociado al proceso de expresión heteróloga realizado mediante ingeniería genética.

Objetivo General: Amplificar los genes nativos del clúster biosintético de *R. mucilaginosa* EA-BIO010 en *E. coli* TOP10 y clonar al menos uno de ellos, mediante técnicas de Ingeniería genética.

Objetivos específicos:

1. Obtener ADN genómico de *R. mucilaginosa* EA-BIO010
2. Amplificar los genes nativos involucrados en el clúster biosintético para betacarotenos en *R. mucilaginosa* EA-BIO010 mediante PCR convencional.
3. Clonar el gen *crtl* procedente de *R. mucilaginosa* EA-BIO010 en células de *E. coli* TOP10, mediante técnicas de ingeniería genética.
4. Determinar la efectividad del proceso de clonación de uno de los genes nativos de *R. mucilaginosa* EA-BIO010 en células recombinantes de *E. coli* TOP10

Marco Teórico

El estrés oxidativo hace referencia a niveles elevados de radicales de oxígeno (ROS) que pueden generar daños a los lípidos, proteínas y ADN (Kasote et al., 2015); dentro de los ROS más destacados se encuentran los radicales de aniones de superóxidos, radicales hidroxilos y radicales de peróxido de hidrógeno. En el caso de las plantas, estas producen ROS como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), superóxido (O_2) y óxido nítrico (NO^*) en ubicaciones intracelulares como el fotosistema I (PSI) y fotosistema II (PSII) de la membrana del cloroplasto, membrana y matriz celular del peroxisoma; ubiquinona y los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones en la membrana mitocondrial (ETC) (Kasote et al., 2015) y en el caso de las células humanas estos son subproductos de la mitocondria, los cuales pueden desencadenar Alzheimer a través de la producción del péptido tóxico β -amiloide, cáncer mediante la activación de oncogenes, inflamación pulmonar mediante la activación de quinasas y factores NF-kappa B y AP-1, entre otras (Pham-Huy & Pham-Huy, 2008). Para ello, los organismos han desarrollado defensas contra estas moléculas como el superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), glutatión, tioredoxina, vitamina C y vitamina (Yang et al., 2017), todas estas moléculas conocidas bajo el término de “antioxidantes”.

Las moléculas antioxidantes son producidas y obtenidas para uso industrial de organismos fotoautótrofos como las plantas, micro y macroalgas, insectos, bacterias y hongos. Donde en las plantas, estos juegan un rol fundamental en la fotosíntesis oxigénica, foto protección y rutas de señalización (Saini et al., 2022). Estos también pueden ser encontrados en peces, ganado, huevo, cereales (Crupi et al., 2023). Por otro lado, estos pueden ser obtenidos también mediante diversas metodologías como la síntesis química, extracción de plantas, métodos físicoquímicos y biosíntesis microbiológica (Bogacz-Radomska & Harasym, 2018; Meléndez-Martínez et al., 2022). Hoy en día, los antioxidantes son ampliamente usados en la industria de alimentos y de salud debido a sus beneficios como la reducción de riesgo para desarrollar cáncer cervical, de ovarios, colorrectal, de mama, de próstata, entre otros; así como también previene enfermedades cardiovasculares y desórdenes óseos, oculares y epidérmicos cuando estos son consumidos (Meléndez-Martínez et al., 2022; Metibemu & Ogungbe, 2022). Entre los compuestos antioxidantes más empleados a nivel comercial, se encuentran los carotenos, los cuales generan pigmentaciones rojas y naranjadas en los diferentes órganos de una planta, y pueden ser encontrados también en bacterias, levaduras, algas y animales (Saini & Young-Soo, 2017). Molecularmente, estos compuestos antioxidantes de la familia química de carotenos consisten en esqueletos de hidrocarburo con instauraciones y sin átomos de oxígeno derivados del isopreno como el betacaroteno producido por levaduras, a diferencia del grupo de los xantófilos que sí contienen oxígeno (Figura 1 y Figura 2). Además, se han identificado al menos 700 especies moleculares de carotenos y es gracias a la diversidad en su estructura molecular que estas moléculas se aplican en diversas industrias, tales como en la nutricional, donde se ha evidenciado que el consumo de betacarotenos encontrado en frutas y verduras verdes como en la zanahoria, el insumo de suplementos dietarios y su aplicación como aditivos y suplementos nutricionales en las comidas, reduce la incidencia de enfermedades crónicas, tales como las enfermedades cardiovasculares, colitis ulcerativa, síndrome de colon irritable, entre otras. (Rezaeeyan et al., 2017;(C. Liu et al., 2021); Rocha et al., 2023). En la industria farmacéutica se ha observado que el uso de carotenoides, han demostrado la capacidad de reducir el número de células cancerígenas, prometiendo ser una alternativa a la radio y quimioterapia (Metibemu & Ogungbe, 2022). La industria cosmética también implementa moléculas como los carotenoides para combatir el envejecimiento, la protección de rayos UV (naturales y artificiales), el daño en la piel por bronceo excesivo, fotocarcinogénesis, entre otros, con productos que contienen carotenoides como la CREMA BIO CAROTENO® (Cosméticos Cies) (Meléndez-Martínez et al., 2021). Dentro de los carotenos, las especies moleculares más empleadas se encuentran el betacaroteno, alfa-caroteno, zeaxantina, betacriptoxantina y luteína- Se reporta, entre otros beneficios, la capacidad que tienen estas de combatir el envejecimiento de la piel debido a la

absorción de los rayos UV provenientes del sol, por lo cual han sido un ingrediente de uso común y recurrente en la industria cosmética (Stefan-van Staden et al., 2019).

Figura 1. Estructura molecular del isopreno (C₅H₈).

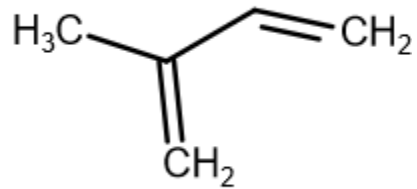


Figura 1. Ilustración personal basada en PubChem Isoprene (2022).

Figura 2. Estructura molecular del betacaroteno (C₄₀H₅₆) y cepa productora *R. mucilaginosa EA-BIO010*.

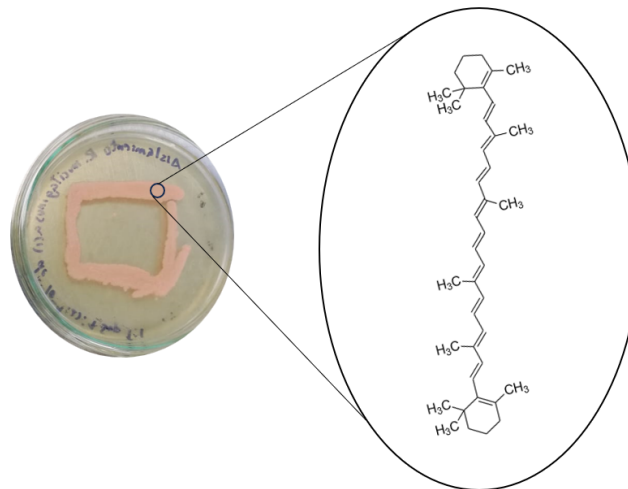


Figura 2. Ilustración personal de la molécula betacaroteno basada en PubChem Betacarotene (2022a), antioxidante producido por cepas de *Rhodotorula mucilaginosa* EA-BIO010 (foto propia del autor) y se evidencia una coloración naranja, característica propia de este metabolito.

En el mercado internacional, los carotenoides representaron una producción de \$1.5USD billones en 2014 con un crecimiento del 2.3% anual donde el betacaroteno, astaxantina y luteína ocupan el 60% del mercado mundial. Es importante recalcar que el 90% de los métodos empleados para la producción de carotenos usados en las diversas industrias, presentan evidencia de tener contraindicaciones para la salud humana. Existen diversos reportes donde se ha comprobado que algunos de los solventes empleados para la síntesis química de carotenoides, como el petróleo, puede conllevar al desarrollo de hemorragias internas, intoxicación del sistema nervioso central (SNC), malformaciones craneales y defectos cardíacos una vez este es inhalado; el dimetil-éter, otro solvente ampliamente usado en la producción sintética de carotenoides, también genera intoxicación por inhalación (Parasuraman et al., 2014). Otros de los compuestos empleados para la producción sintética de carotenoides, es la trifenilfosfina, reactivo derivado de las reacciones de Wittig y compuestos de Grignard (Bogacz-Radomska & Harasym, 2018), la cual puede ser absorbida por inhalación o ingesta y generar tos, irritación, enrojecimiento y dolor epidérmico y funciona como neurotoxina (PubChem, 2023).

Además, se ha evidenciado el desarrollo de crecimientos malignos cancerígenos en individuos con alta ingesta de betacarotenos de origen sintético (Ribeiro et al., 2011);(François et al., 2020). En el caso de los betacarotenos, aquellos producidos sintéticamente mediante condensación de enol-éter (figura S1) o condensación de Wittig, se dice de que carecen de los beneficios de salud que deben contener estas moléculas en su estado natural, al ser producidas por microorganismos y plantas (Woutersen et al., 1999; Ribeiro, et al., 2011; Bogacz-Radomska & Harasym, 2018). Por otro lado, hoy en día ha aumentado la demanda por una producción más sostenible medioambientalmente y natural de los carotenoides debido a los efectos negativos para la salud y bajo rendimiento en su obtención (Saini & Young-Soo, 2017;Hoang et al., 2021). Adicionalmente, los carotenos alcanzaron los USD1.4 billones en el 2019 y los betacarotenos ocuparon el primer lugar de comercialización con un 23.2% en el mercado de carotenoides a nivel global (Saini et al., 2022). Además, en el año 2021 logró alcanzar la cifra de USD2.05 billones y se estima que estén valorados alrededor de los 2 billones de USD para el año 2022 y alrededor de USD2.94 billones para el 2026 (Tang, Wang, et al., 2019; Wargala et al., 2021). Dentro de los antioxidantes, son la cantaxantina, astaxantina y el betacaroteno son las moléculas más usadas en el mercado y las cuales proveen de mayor valor agregado comercial (C. Liu et al., 2021). Por otro lado, la producción de antioxidantes de origen vegetal está limitada a la variabilidad climática, estacional y

geográfica; bajo contenido de estos metabolitos a nivel celular, tiempo de crecimiento de las plantas y el requerimiento de áreas considerables de cultivación (Jong Kook et al, 2010; Donhowe & Kong, 2014; Mata-Gómez et al., 2014; Silva Igreja et al., 2021). Es por lo anterior que se hace urgente comenzar a migrar a tecnologías sostenibles, eficientes y que estén basadas en fuentes biológicas o recursos renovables (Mata-Gómez et al., 2014).

Asimismo, la obtención natural de antioxidantes en general es limitada debido a su bajo rendimiento respecto a su producción en plantas y los costos significativos asociados a estos procesos como se puede observar en la tabla S3 y figura S2 (Saini & Young-Soo, 2017). Debido a lo anterior, los microorganismos emergen como una alternativa con capacidades metabólicas para producir antioxidantes de tipo carotenoides, que puedan usarse para fines diversos como en productos nutracéuticos, producción de bebidas alcohólicas fermentadas y ácidos orgánicos. Algunos de estos microorganismos son productores naturales de carotenoides, y otros son modificados genéticamente para lograr este fin, como puede verse en las tablas S4 y S5 (Rai et al., 2019; Almeida et al., 2017). Entre las especies de levaduras destacadas por su capacidad de producción de antioxidantes se destacan *Rhodotorula mucilaginosa* y *Clavispora* sp. (Dominique & Nguyen, 1997; Isaacs & Gregory, 2012; Mata-Gómez et al., 2018; Allahkarami et al., 2021).

Para la obtención de los betacarotenos de los microorganismos, se emplean algunas técnicas como la congelación y maceración con tierras diatomeas, extracción con dimetilsulfóxido (DMSO), lisis enzimática y ondas ultrasónicas; liofilizado, congelación con N₂ y maceración; extracción con acetona y éter de petróleo, extracción con ácido (HCl) y acetona; extracción asistida por microondas (MAE); extracción con mix de acetona, etanol, hexano; extracción asistida con ultrasonicación (UAE); métodos de ruptura física y extracción, extracción presurizada con líquidos (PLE) con CO₂ supercrítico (SCE) (Jong Kook et al., 2010; Mata-Gómez et al., 2018; Zhang et al., 2018; Liu et al., 2021; Saini et al., 2022;). Existen otras formas de obtener los carotenoides como lo son la extracción convencional con solventes químicos, el cual es el más común, pero representa una inversión elevada de tiempo y energía, lo convierte en un proceso ineficiente, sumado al hecho de que los antioxidantes polares y no polares se encuentran usualmente mixtos lo que hace aún más complejo elegir una metodología para la extracción de alguno de ellos en específico (Gullón et al., 2019; Liu et al., 2021). Además, como se reportó previamente, pueden quedar trazas de los solventes que generan condiciones adversas de salud en un usuario final de los productos donde están formulados dichos antioxidantes. Las metodologías modernas como la UAE, PLE y SCE son más limpias debido a la reducción de energía y al uso combinado de solventes orgánicos (Cendrowski et al., 2020).

En el caso de *R. mucilaginosa*, se ha logrado identificar los genes responsables para la obtención de betacarotenos, los cuales son el licopeno ciclasa (*crtY*), fitoeno desaturasa (*crtI*), licopeno ciclasa/fitoeno sintasa (*crtB*) y el isopentil-difosfato delta-isomerasa como puede observarse en la figura S3. Allí, se observa que el *crtY* y *crtB* usualmente están yuxtapuestos y codifican para una proteína bifuncional que hace de veces de licopeno ciclasa y fitoeno ciclasa (Han Ming et al., 2017; Wei, et al., 2019). Es importante considerar que los genes *crtY*, *crtB* y *crtI*, tienen una homología desde el 65% con los genes biosintéticos de *Rhodotorula toruloides* los cuales son CAR2, para el *crtY* y *crtB* y CAR1 para el *crtI* (Figura 3) (Gan et al., 2017; Landolfo et al., 2018), y estos tienen como número de acceso a su CDS en NCBI KY937965, KY937966 y KY937964 respectivamente (Landolfo et al., 2019). Los genes de *R. mucilaginosa* descritos anteriormente, fueron elucidados mediante sintonía empleando cepas de *R. toruloides* y *R. mucilaginosa* para poder sintetizar de esta manera los *primers* apropiados y amplificar el clúster biosintético de *R. mucilaginosa* encontrado en la ruta metabólica del mevalonato (MVA) (Landolfo et al., 2018; Gan et al., 2022).

La ruta MVA tiene la capacidad de producir isoprenoides, en la cual, el acetil-CoA se convierte en isopentil difosfato (IPP) y dimetilalil difosfato (DMAPP), donde estos últimos se condensan para producir geranil difosfato y farnesil difosfato (FPP), y esta última enzima es considerada el precursor universal para los terpenoides (Yang et al., 2021). Es en esta ruta en la cual se pueden encontrar los genes *crtI*, *crtY* y *crtB* (Landolfo et al., 2018). Asimismo, el gen *crtI* es de interés biotecnológico debido a que este puede ser mutado para generar plantas mutantes resistentes a diversos pesticidas como el norflurazon (Molina-Márquez et al., 2019). Se ha evidenciado, además, que este gen produce una proteína asociada a la membrana que emplea la flavina adenina nucleótida (FAD) como co-factor redox en plantas, mediante el cual se transportan electrones y permiten la eventual desaturación de carotenoides; en el caso de las bacterias y los hongos, este gen cataliza la conversión del fitoeno al licopeno en la ruta MVA y se ha determinado que carece de homología con el gen *crtI* encontrado en plantas, sugiriendo que este evolucionó de forma independiente (Molina-Márquez et al., 2019). Las reacciones metabólicas a las cuales es sometido el fitoeno para su desaturación y producir licopeno, son cuatro, las primeras dos son llevadas a cabo por la fitoeno desaturasa (producida por el gen *crtI*) y la desaturasa ξ -caroteno (ZDS), seguido de dos isomerizaciones complementarias por la isomerasa 15-*cis*- ζ -caroteno (ZISO) y la carotenoide isomerasa (CRTISO), teniendo como finalidad la producción del licopeno, precursor del betacaroteno (Wang et al., 2020).

Figura 3. Ruta metabólica del mevalonato (MVA) de carotenoides en *R. mucilaginosa* y *R. toruloides*.

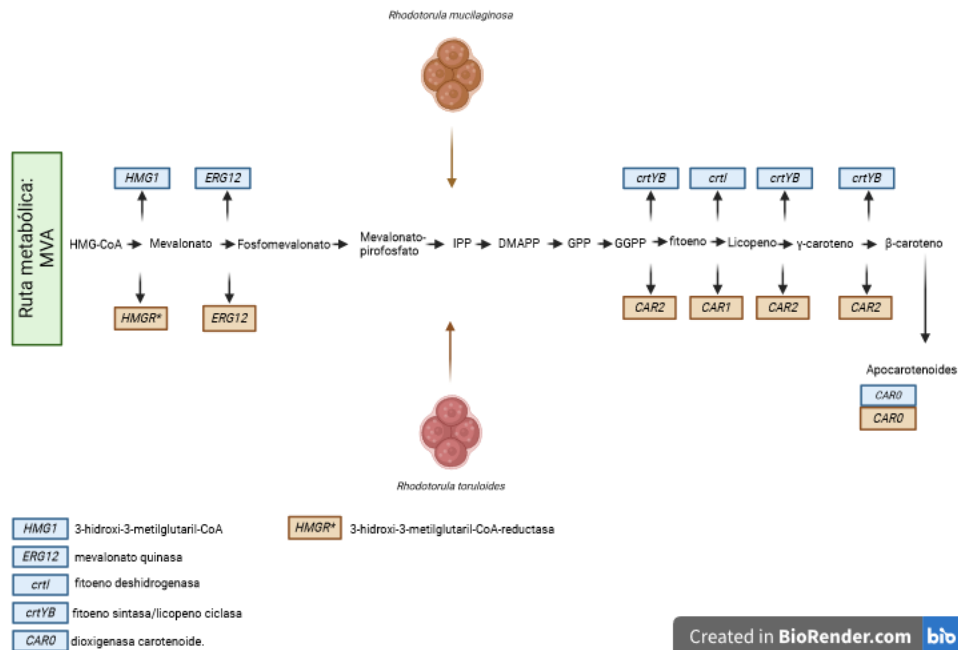


Figura 3. Ilustración personal respecto a la comparación de las rutas metabólicas para la producción de carotenoides con los genes de *R. mucilaginosa* (rectángulos azules) de interés en el estudio y sus genes homólogos (rectángulos marrones) correspondientes a *R. toruloides*. Los rectángulos azules y marrones en la parte inferior de la imagen, corresponden a las enzimas que estos producen. Ilustración basada en Landolfo et al. (2018) y Liu et al. (2021).

En la ingeniería genética para la producción de betacarotenos, se ha propuesto a *Escherichia coli* (*E. coli*) como una cepa huésped ideal para la producción de estos, debido a su alta tasa de crecimiento, las herramientas disponibles para realizar ingeniería metabólica en este microorganismo y a las evidencias relacionadas a su capacidad para producir otros carotenoides como el licopeno, astaxantina y la zeaxantina (Yang & Guo, 2014). Asimismo, *E. coli* cuenta con la ruta metabólica del metileritriol fosfato (MEP), la cual genera productos precursores para la producción de carotenoides a partir del gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y el piruvato, ya que estos se convierten en isopentenil difosfato (IPP) y dimetilalil difosfato (DMAPP) con la ayuda de cofactores como la citidina trifosfato y la nicotinamida de adenina dinucleótida fosfato reducido (NADPH). Lo anterior, facilita la sobreexpresión de enzimas clave de la ruta MEP, estrategia que ha evidenciado ser efectiva para la producción de betacarotenos (Yuanqing et al., 2020). A pesar de ellos, la ruta metabólica MEP ha demostrado tener un bajo flujo metabólico en procesos de ingeniería genética y, por ende, su eficiencia productiva es baja, por lo que se recomienda introducir de forma heteróloga la ruta metabólica MVA en *E. coli*, ya que

esta ruta también produce IPP y DMAPP y es más eficiente en la producción de carotenoides (Wang et al., 2020; Zeng & Dehesh, 2021; Ren et al., 2023).

Considerando lo planteado anteriormente, este proyecto busca sentar las bases metodológicas y procedimentales para generar una alternativa de producción biotecnológica de carotenoides de *R. mucilaginosa*, aportando al desarrollo de bioprocesos y tecnologías más sostenibles y eficientes en términos de la producción de betacarotenos. Esto se realizará a través de procesos de ingeniería genética y metabólica en *E. coli* TOP10 partiendo de genes del microorganismo silvestre *R. mucilaginosa* EA-BIO010.

Metodología.

Verificación *in silico* del producto a amplificar de los *primers*.

Para la verificación del tamaño y especificidad del producto PCR de los *primers* sintetizados, se usó la herramienta BLAST primers de NCBI.

Obtención de ADN genómico de la levadura *R. mucilaginosa*.

Se sembró con asa circular metálica una muestra de *R. mucilaginosa* EA-BIO010 por triplicado en cajas Petri de 25mL con medio YMA y se dejaron incubando a 30°C por cinco días. Posteriormente, por cada caja Petri se prepararon erlenmeyers de 500mL con 70mL de medio de cultivo YMB y se inocularon colonias provenientes de las cajas Petri con asa circular estéril. Los tres erlenmeyers se dejaron en plataformas de *shakers* a 100rpm y 27°C durante 12 horas para llevar a cabo la extracción de ADN al siguiente día. Posteriormente, se usó el protocolo anexo para la extracción de ADN genómico de plantas y se adaptó para hongos, de manera tal, que se modificó el protocolo mediante la omisión del buffer CTAB (ver anexo 1).

Determinación de la presencia de ADN genómico de *Rhodotorula mucilaginosa* EA-BIO010.

Una vez obtenido el ADN en los pasos anteriores, se corrió un gel de electroforesis de cama pequeña (250mL) con 0.8% de agarosa y se empleó el *Purple Loading Dye* del laboratorio *England BioLabs* para cargar las muestras de ADN a los pozos y un Ladder de 10Kpb.

Obtención de *primers*.

Para lograr amplificar los genes de interés, se usó como referencia las secuencias de *primers* reportados por Landolfo et al. (2018), para esto, referirse a la tabla S6.

Amplificación de clúster biosintético de betacarotenos de *R. mucilaginosa* EA-BIO010.

Se implementó el protocolo de PCR modificado establecido por Landolfo et al. (2018). Además, se sintetizaron los *primers* tanto *forward* como *reverse* para los genes *HMG1*, *ERG12*, *CAR0*, *crtI* y *crtYB* con la empresa AM LTDA®, Medellín, Colombia. Se identificaron los tamaños de los productos de PCR de los *primers* sintetizados usando la herramienta de BLASTn de NCBI, usando como referencia el tamaño de los amplicones obtenidos por Landolfo et al (2018). Para la amplificación del clúster, primero los *primers* debieron ser preparados. 30nmol de *primers*, se resuspendieron en 300uL de agua libre de DNAsas estéril (se agregó al eppendorff en el que llegan; a esto se le llama stock madre). De esta manera, se obtiene un stock madre de *primers* a 100nMol. Finalmente, en un tubo eppendorff nuevo se agregaron 90uL de agua estéril y 10uL del stock madre obtenido de *primers* y quedaron listos para ser usados. Luego, se llevó a cabo un proceso de estandarización de PCR para cada gen (ver anexo 2) usando el ADN genómico extraído de *R. mucilaginosa* EA-BIO010.

Sensibilidad de *Escherichia coli* TOP10 contra el antibiótico bleomicina.

Para esta fase metodológica, se empleó el método modificado de Xu et al. (2012) y Elbing & Brent (2019), mediante el cual, se realizaron diluciones seriadas en tubos falcon de 15mL con medio Luria Bertani líquido (LB-L) con una relación 10:1 partiendo de una dilución de 10×10^{-1} con el inóculo de una colonia de *E. coli* TOP10 hasta llegar a la dilución 10×10^{-7} , luego sembraron 12 cajas petri con medio Luria bertani sólido (LB), donde a tres de ellas se les agregó 0,8uM del antibiótico bleomicina, a otras tres 5uM, a otras tres 10uM y las últimas tres fueron controles positivos, los cuales constaban del crecimiento de *E. coli* TOP10 en medio sólido sin antibiótico. Se usó la dilución 10×10^{-6} para inocular las *E. coli* TOP10 provenientes de los tubos falcon a los medios con tratamiento de antibiótico, debido a que en esta dilución se presentaban colonias contables (~120 colonias), en las anteriores a esta no era posible realizar conteo de UFCs debido al crecimiento excesivo y contiguo de colonias, y la dilución 10×10^{-7} presentó escasamente 10 colonias, número el cual no sería viable para evaluar la concentración de inhibición del antibiótico para así seleccionar las células de *E. coli* TOP10 transformantes en ensayos posteriores.

Preparación de células competentes de *E. coli* TOP10 para inserción del clúster biosintético de betacarotenos.

Para este paso, se siguió el protocolo anexado (ver anexo 3) y los protocolos empleados por Xu et al. (2012) y Elbing & Brent (2019). Para esto, se sembró *E. coli* TOP10 en medio LB y se incubó a 37°C x 17hrs. Luego, estas fueron trasladadas a erlenmeyer con 100mL de medio LB-L y se incubaron a 37°C x 3hrs. Se agregaron

45mL de medio con *E. coli* TOP10 a tubo falcon de 50mL. Este fue centrifugado a 2700g x 10min x 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con solución de trabajo CaCl₂-MgCl₂. Se repitió el mismo paso de centrifugación anterior, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células con solución fría de CaCl₂-Glicerol y se guardaron las células competentes a -80°C hasta su futuro uso.

Preparación de vector de expresión y reacción de ligación.

Para la digestión del vector, se emplearon tubos eppendorf de 1.5mL, se agregó 5uL de buffer EcoRI, 0.5uL de enzima EcoRI y 2uL del vector PICZ-α A (40ng). Posteriormente, se incubó la mezcla a 37°C x 2hrs. Para el proceso de ligación, se emplearon tubos eppendorf de 1.5mL, se agregó 1uL de ADN-ligasa T4, 3uL de producto de PCR del gen *crtI*, 1uL de buffer de ligasas y 1uL del vector PICZ-α A digerido del paso anterior. El vector puede verse en la figura S4.

Generación de células transformantes de *E. coli* TOP10.

Para este procedimiento se siguió el protocolo anexado (Ver anexo 3). Además, como agente de selección, se empleó el antibiótico bleomicina (obtenido de FarmaListo Colombia), la selección de este antibiótico radica en la presencia del gen de resistencia de bleomicina presente en el vector PICZ-α A.

Determinación de la presencia del plásmido con el inserto en las células transformantes de *E. coli* TOP10 mediante MiniPrep.

Para determinar la presencia del vector de expresión PICZ-α A en las células transformantes de *E. coli* TOP10 y determinar el éxito de la clonación, se empleó el protocolo de MiniPrep de QIAGEN (ver anexo 4). Para así, mediante electroforesis de gel de agarosa, determinar la presencia del vector con el gen *crtI*.

Resultados.

Verificación *in silico* del producto a amplificar de los *primers*.

Para confirmar que los *primers* sintetizados amplifican los genes de interés, se llevó a cabo un Primer-blast en la página de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?>). Los resultados evidenciaron que dichas secuencias obtenidas del proveedor amplifican los genes de interés (figuras S5-S9). Los únicos *primers* que evidenciaron capacidad para amplificar algo más que el gen para el cual estaba diseñado, fueron los correspondientes al gen *crtYB*.

Determinación de la presencia de ADN genómico de *Rhodotorula mucilaginosa* EA-BIO010.

Se logró obtener ADN genómico de *R. mucilaginosa* EA-BIO010 (figura 4) con el protocolo anexo (ver anexo 1). Se comprobó primero la viabilidad del protocolo llevando a cabo el procedimiento con solo 3 muestras de una caja Petri, provenientes de una cepa de *R. mucilaginosa* EA-BO010. Luego, una vez se comprobó la viabilidad del protocolo, se extrajo el ADN genómico 7 réplicas de *R. mucilaginosa* EA-BIO010 y se llevó a cabo la cuantificación de ADN presente en las muestras usando NanoDrop™2000, en donde se evidenció la presencia de material genético correspondiente al ADN y se detectó la presencia de contaminantes en las muestras. También se comprobó la integridad de este mediante gel de electroforesis de 1.2% x 65V x 100min (tabla 1, figura 4 y figura 5) en donde el ADN genómico de *R. mucilaginosa* EA-BIO010 presentó un tamaño superior a 10Kpb, lo que sugiere que dicha muestra genómica en el gel de electroforesis sí corresponde al microorganismo de interés, ya que este tiene un tamaño genómico entre los 15Kpb-20Kpb.

Tabla 1. Pureza y cantidad del ADN genómico de *R. mucilaginosa* EA-BIO010.

| # | Sample ID | User name | Date and Time | Nucleic Acid Conc. | Unit | A260 | A280 | 260/280 | 260/230 | Sample Type | Factor |
|---|-----------|-----------|--------------------------|--------------------|-------|--------|--------|---------|---------|-------------|--------|
| 1 | BLANCO | BioAdmin | 17/04/2023 3:26:43 p. m. | -0,3 | ng/μl | -0,007 | -0,016 | 0,42 | 0,28 | DNA | 50,00 |
| 2 | R1 | BioAdmin | 17/04/2023 3:31:58 p. m. | 59,3 | ng/μl | 1,185 | 0,582 | 2,03 | 1,13 | DNA | 50,00 |
| 3 | R1a | BioAdmin | 17/04/2023 3:32:27 p. m. | 58,2 | ng/μl | 1,165 | 0,572 | 2,04 | 1,12 | DNA | 50,00 |
| 4 | R2 | BioAdmin | 17/04/2023 3:34:12 p. m. | 45,6 | ng/μl | 0,912 | 0,455 | 2,00 | 0,58 | DNA | 50,00 |
| 5 | R2a | BioAdmin | 17/04/2023 3:35:00 p. m. | 269,4 | ng/μl | 5,387 | 2,750 | 1,96 | 1,38 | DNA | 50,00 |
| 6 | R2b | BioAdmin | 17/04/2023 3:35:47 p. m. | 187,3 | ng/μl | 3,746 | 1,929 | 1,94 | 1,22 | DNA | 50,00 |
| 7 | R3 | BioAdmin | 17/04/2023 3:37:48 p. m. | 525,4 | ng/μl | 10,508 | 5,112 | 2,06 | 1,63 | DNA | 50,00 |
| 8 | R3a | BioAdmin | 17/04/2023 3:38:08 p. m. | 751,0 | ng/μl | 15,020 | 7,446 | 2,02 | 1,72 | DNA | 50,00 |

Tabla 1. Concentraciones del ADN en prueba previa del protocolo de extracción. El "Sample ID" son nombres arbitrarios dados a las muestras extraídas obtenidas de *R. mucilaginosa* EA-BIO010. Los valores correspondientes a la columna 260/280 se ubican entre los valores 1.90 y 2.01, el cual es un rango aceptable para indicar que en las muestras hay presencia de ADN y no ARN. Los valores 260/230 oscilan entre 1.10 y 1.72, lo cual indica que hay presencia de compuestos probablemente fenólicos contaminantes en las muestras.

Figura 4. Curvas de absorción del ADN genómico de *R. mucilaginosa* EA-BIO010.

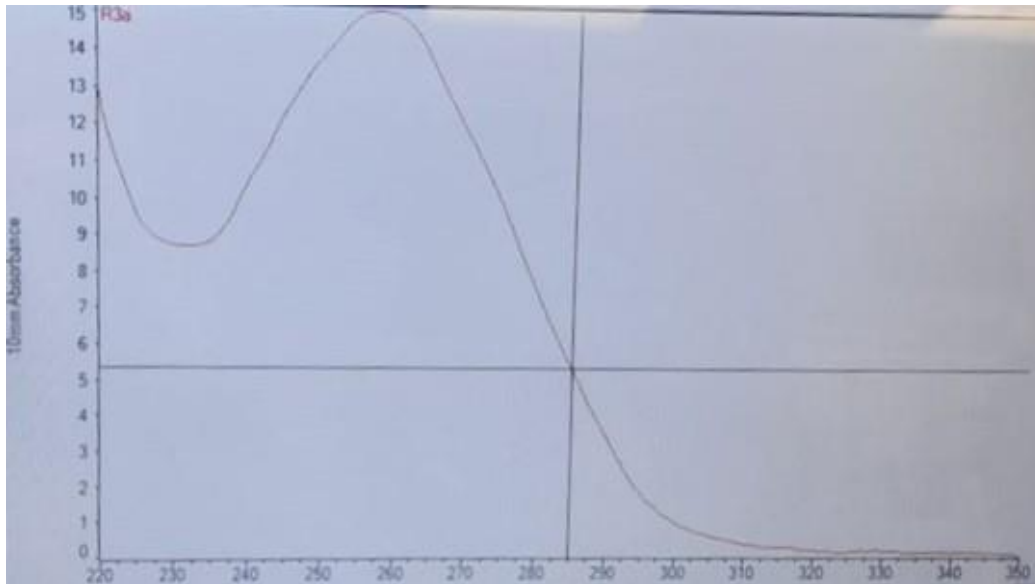


Figura 4. Ejemplo ilustrativo de los resultados obtenidos en NanoDrop del ADN genómico extraído de *R. mucilaginosa* EA-BIO010. Los ejes de la curva son absorbancia 10mm (Eje Y) y Longitud de onda nm (Eje X). La presencia de ADN en muestras de NanoDrop, se evidencian mediante picos a los 260nm en el eje X, tal y como se representa en esta figura.

Figura 5. Gel de electroforesis de ADN genómico de *R. mucilaginosa* EA-BIO010.

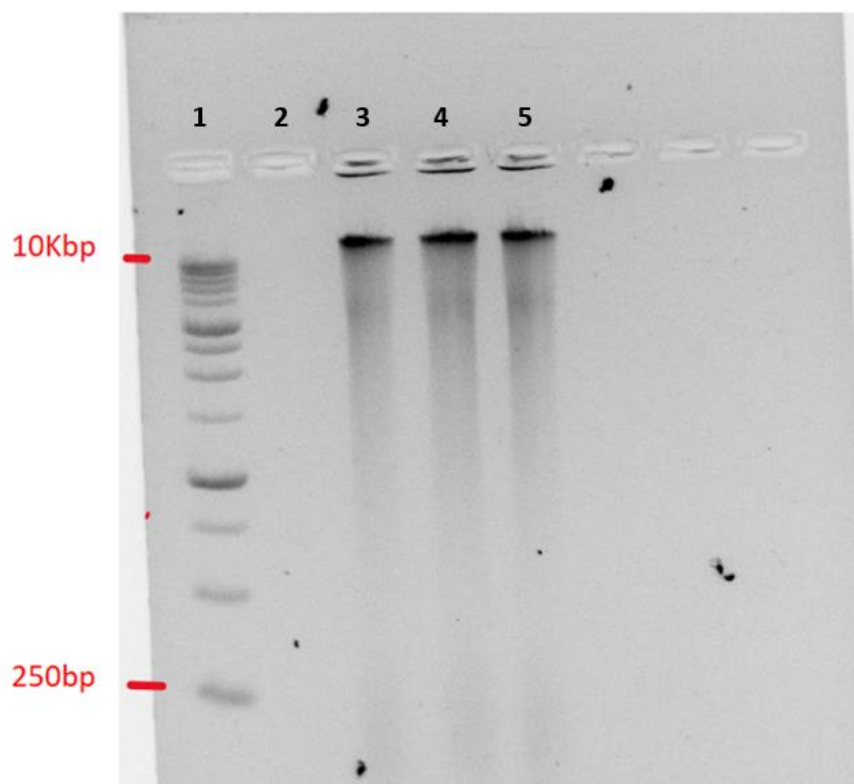


Figura 5. Electroforesis de gel de agarosa al 0.8%. Los pozos tienen el siguiente orden: pozo 1: Ladder de 10Kpb, pozos 3-5 contienen muestras de ADN genómico de *R. mucilaginosa* EA-BIO010.

Obtención de *primers*.

Los *primers* fueron sintetizados a través de AM LTDA® usando como referencia las secuencias reportadas por Landolfo et al. (2018).

Amplificación de clúster biosintético de betacarotenos de *R. mucilaginosa* EA-BIO010.

Estandarización de temperatura de *annealing* en la PCR para comprobar la presencia de genes de interés.

Se llevó a cabo una estandarización del protocolo de PCR para cada gen (*crtI*, *crtYB*, *HMG1* y *ERG12*), en donde se varió la temperatura de *annealing* de cada gen en 10°C, obteniendo así un rango de temperatura de *annealing* de 65°C-55°C y así identificar a qué temperatura se evidenciaba amplicones del tamaño reportados en literatura. El protocolo puede ser accedido en el material anexo. Una vez se llevó a cabo la estandarización, se logró determinar la temperatura a la cual amplificaba cada gen en un tamaño aproximado a lo reportado en Landolfo et al. (2018) mediante gel de agarosa al 1.2% x 75V x 55mins. Los tamaños y temperaturas fueron: *HMG1* = 65°o 55° con un tamaño de ~190pb, *CAR0* = 61.3°C con un tamaño variable, *crtI* = 65°C con un tamaño de ~150pb y *crtYB* = 63°C con

un tamaño de ~180pb. Los productos de PCR de cada gen pueden observarse en las figuras 6a-d.

Figura 6a. Amplicones del gen CAR0.

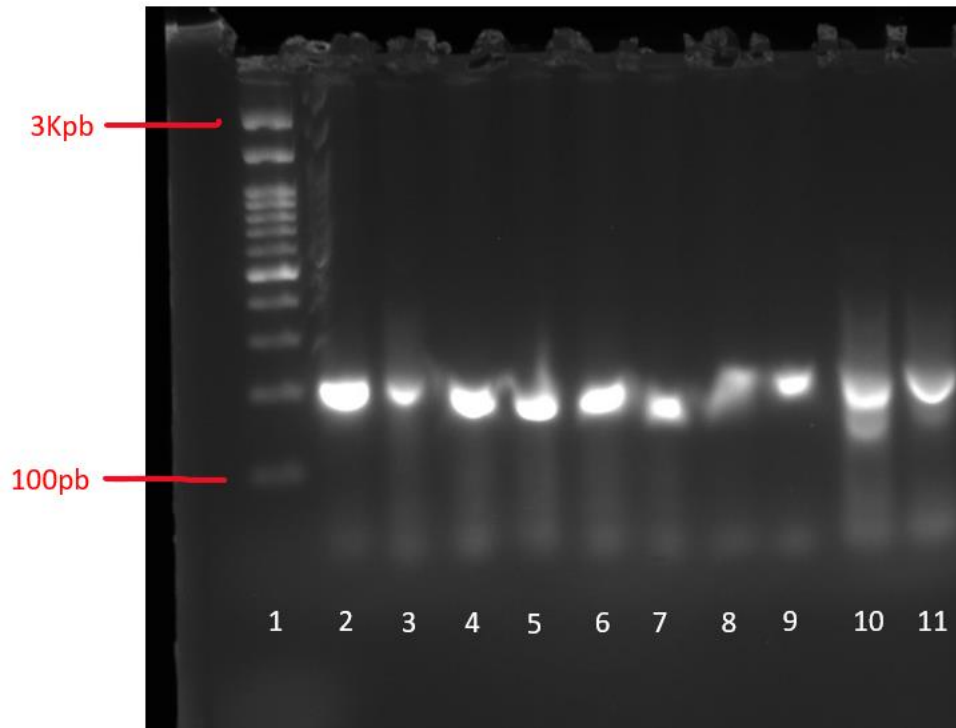


Figura 6a. Gel de electroforesis de agarosa de bajo punto de fusión al 3.5%. Los pozos tienen el siguiente orden: pozo 1: Ladder de 3Kpb, pozos 2-9: contienen amplicones del gen CAR0. Los pozos 10 y 11 corresponden a las muestras control del máster mix.

Figura 6b. Amplicones del gen *crtl*.

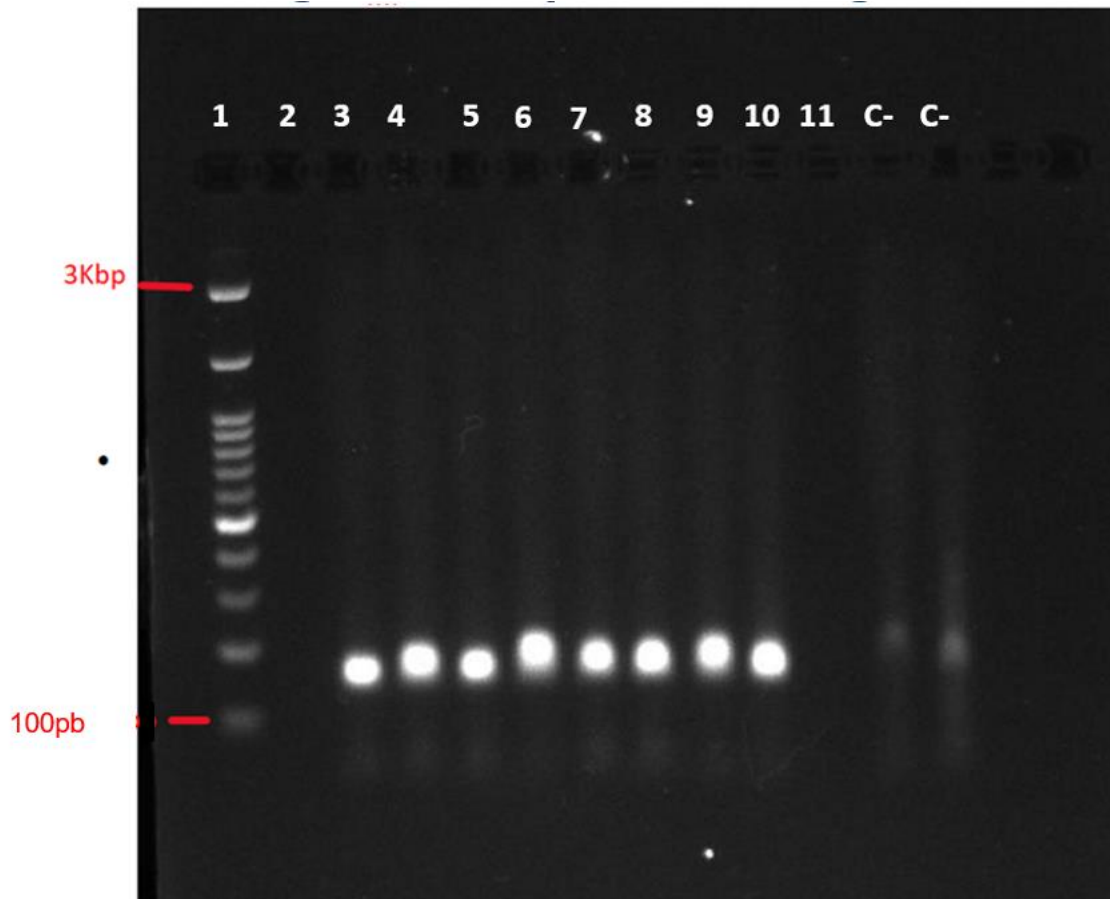


Figura 6b. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% del gen *crtI*. Las muestras en cada pozo de izquierda a derecha son las siguientes: pozo 1: Ladder de 3Kbp, pozos 3-10 contienen amplicones del gen *CAR1* de *R. mucilaginosa* y los pozos 12 y 13 corresponden a las muestras control del máster mix. Las muestras presentan un tamaño de ~150pb.

Figura 6c. Amplicones del gen *crtYB*.

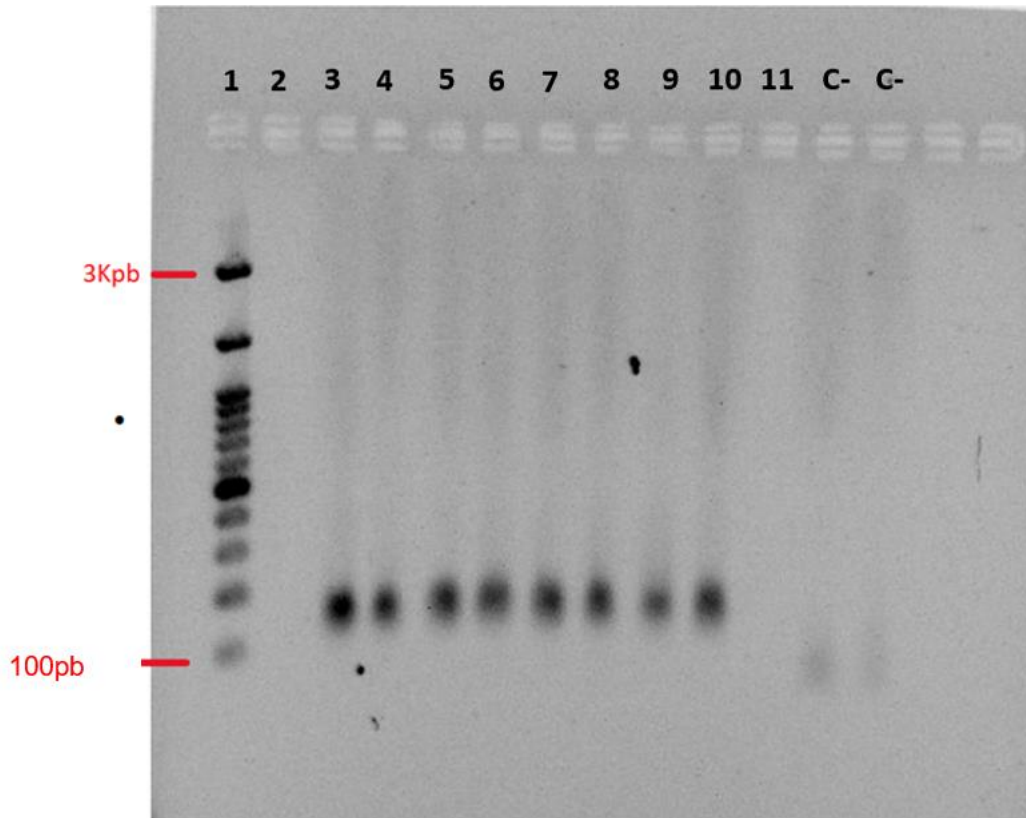


Figura 6c. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% del gen *crtYB*. Las muestras en cada pozo de izquierda a derecha son las siguientes: pozo 1: Ladder de 3Kpb, pozos 3-10: contienen amplicones del gen *crtYB* de *R. mucilaginosa* y pozos 12 y 13: corresponden a las muestras control del máster mix (controles negativos; C-). Las muestras presentan un tamaño de ~180pb.

Figura 6d. Amplicones para genes HMG1 y ERG12.

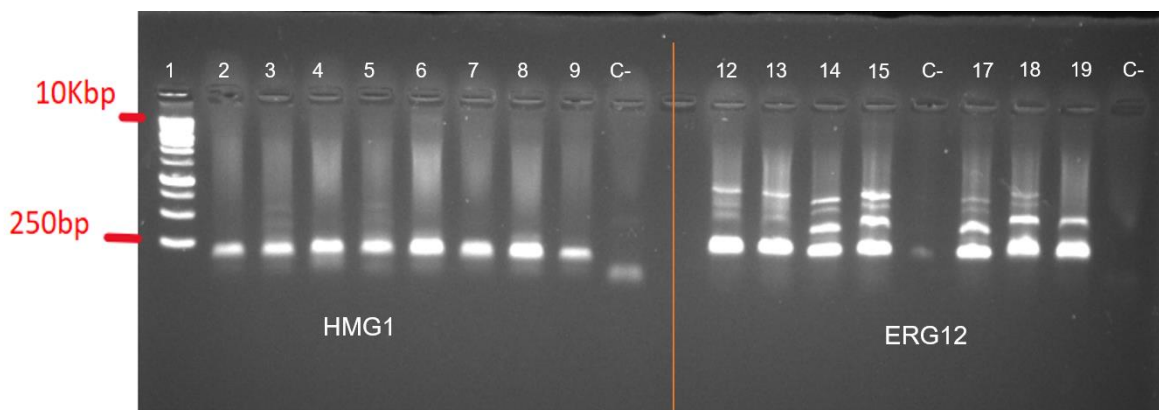


Figura 6d. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% del gen *HMG1* y *ERG12*. Las muestras en cada pozo de izquierda a derecha son las siguientes: pozo 1: Ladder de 10Kpb, pozos 2-9: contienen amplicones del gen *HMG1*, pozo 10: control negativo correspondiente al máster mix. Los pozos 13-16: amplicones del gen *ERG12*, pozo 16: control negativo correspondiente al máster mix, pozos 18-20: amplicones gen *ERG12* y pozo 20: control negativo correspondiente al máster mix. Las muestras para el gen *HMG1* muestran un tamaño de ~190 y para los amplicones del gen *ERG12* de tamaños variables.

Sensibilidad de *Escherichia coli* TOP10 contra el antibiótico bleomicina.

Los resultados de la curva de sensibilidad de *E. coli* TOP10 contra el antibiótico bleomicina, evidenciaron un efecto pronunciado del antibiótico en cada tratamiento en medio LB (figuras 7 y 8). Las colonias presentaron pureza y ausencia de contaminación. Este ensayo nos permitió identificar a qué concentraciones del antibiótico es posible elegir las *E. coli* TOP10 transformantes una vez se haya insertado el vector PICZ- α A. Las tinciones de gram para la verificación de que la bacteria allí presente fuese *E. coli*, están en el material suplementario (figura S10).

Figura 7. Crecimiento de colonias en cajas petri con tratamiento de bleomicina.

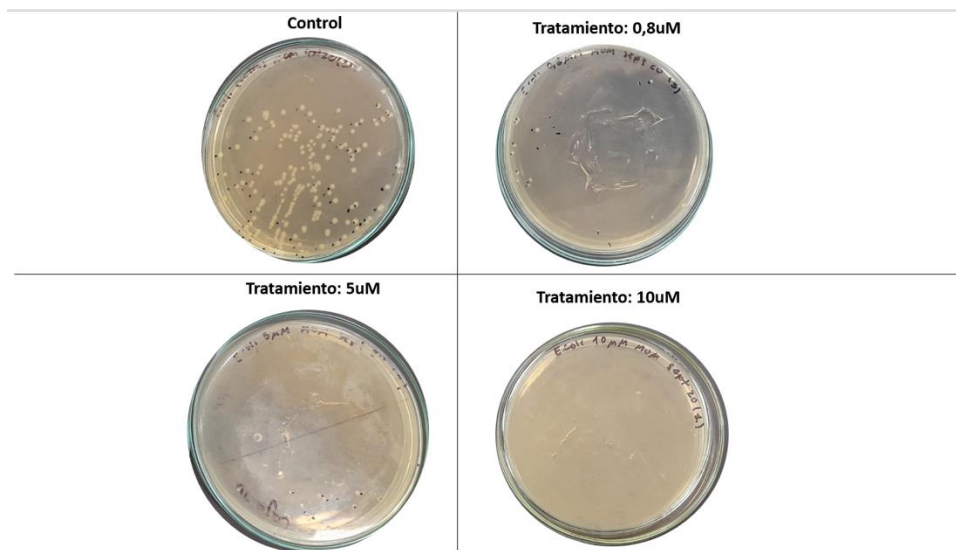


Figura 7. Crecimiento de colonias en cajas petri con medio LB donde se evidenció el crecimiento de 129 colonias en el control, 20 colonias en el tratamiento con bleomicina al 0,8uM, 17 colonias en el tratamiento con bleomicina al 5uM y 0 colonias en el tratamiento con bleomicina al 10uM.

Figura 8. Curva de sensibilidad para células de *E. coli* TOP10.

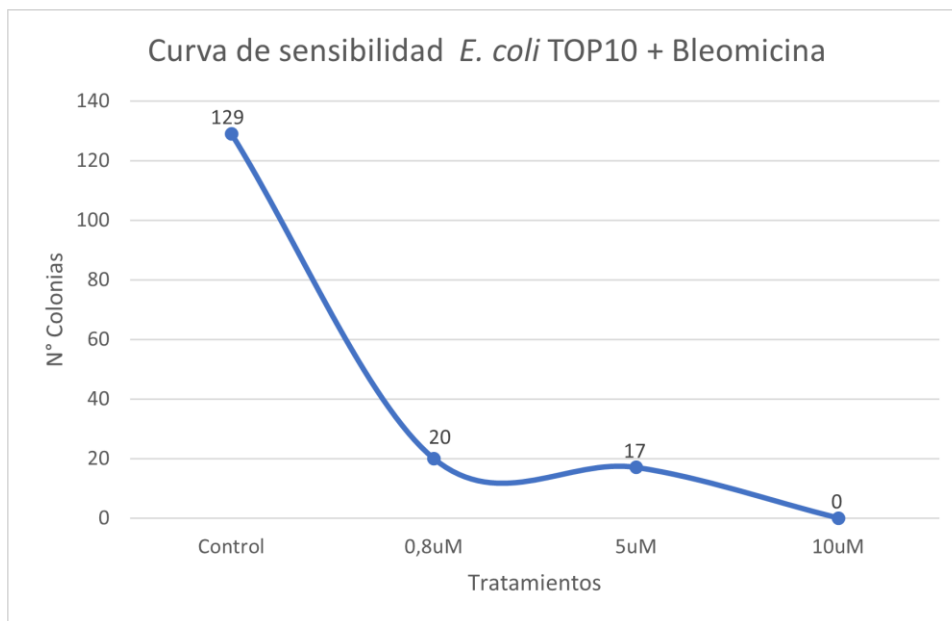


Figura 8. Curva de sensibilidad de *E. coli* TOP10 respecto al antibiótico bleomicina. Se evidencia una disminución del crecimiento de colonias en los diferentes tratamientos después de un período de incubación de 17 hrs a 37°C. De izquierda a derecha, el primer punto corresponde al control, donde colonias de *E. coli* TOP10 crecieron en medio LB sin bleomicina, el segundo punto corresponde a colonias de *E. coli* TOP10 en medio LB con tratamiento de bleomicina al 0.8uM, el tercer punto corresponde a colonias de *E. coli* TOP10 en medio LB con tratamiento de bleomicina al 5uM y el último punto, corresponde a colonias de *E. coli* TOP10 en medio LB con tratamiento de bleomicina al 10uM.

Preparación de células competentes de *E. coli* TOP10 para inserción del clúster biosintético de betacarotenos.

Una vez empleado el protocolo modificado Elbing & Brent (2019), se logró obtener células competentes de *E. coli* TOP10 (figura 9) donde dichas células sembradas tuvieron un período de incubación de 24hrs a 37°C. Estas crecieron exitosamente en medio LB luego de haber sido preservadas en crioviales para esta investigación y futuras investigaciones. El protocolo puede ser accedido mediante el material anexo. Las tinciones de gram para la verificación de que la bacteria allí presente fuese *E. coli*, están en el material suplementario (figura S11).

Figura 9. Células competentes de *E. coli* TOP10.

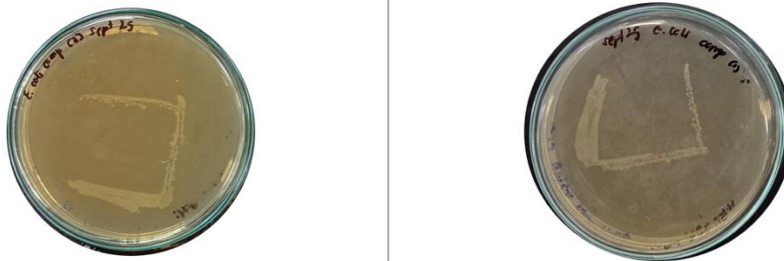


Figura 9. Dos réplicas de sembrado de *E. coli* TOP10 luego de emplear los protocolos modificados previamente mencionados, se puede ver un claro crecimiento bacteriano sin contaminación. Estas células crecieron en 25mL de medio LB sin presión de selección en un período de incubación de 24hrs.

Generación de células transformantes de *E. coli* TOP10.

Se llevó a cabo la generación de células transformantes de *E. coli* TOP10 mediante el protocolo implementado anexo. El protocolo constaba de células muestra (células transformantes en medio LB + bleomicina), control de transformación (células competentes sin plásmido con medio LB + bleomicina) y control de viabilidad (células competentes en medio LB sin vector de expresión y sin bleomicina). Se logró evidenciar crecimiento de colonias en las cajas petri correspondiente a las células muestra y al control de viabilidad. En el control de transformación no creció ningún microorganismo (Fig. 10). Además, se logró determinar mediante tinción de gram que las colonias presentes en las cajas Petri de las transformantes y viabilidad, eran bacilos gram negativos (figura S12).

Figura 10. Células transformantes de *E. coli* TOP10.

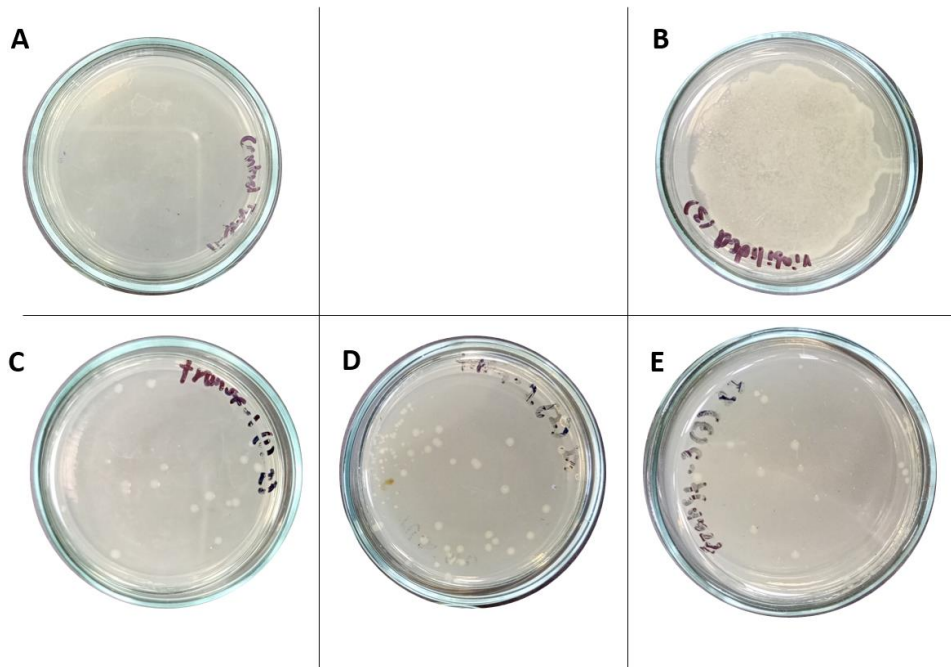


Figura 10. Las cajas A y B corresponden a réplicas correspondientes a los controles de transformación y viabilidad respectivamente. En A hay ausencia de crecimiento de *E. coli* TOP10 y en B sí hay crecimiento. Las cajas petri C, D y E son réplicas representativas de las *E. coli* TOP10 transformantes creciendo en medio LB+bleomicina con vector PICZ- α A + ctrl, en las cuales se observa crecimiento de colonias en medio LB con tratamiento de bleomicina al 10uM.

Determinación de la presencia del plásmido con el inserto en las células transformantes de *E. coli* TOP10.

Obtención del vector PICZ- α A presente en las células transformantes de *E. coli* TOP10.

Luego de incubar por 24hrs a 37°C en 5mL de LB-L con tratamiento de bleomicina a 10uM células transformadas de *E. coli* TOP10, se llevó a cabo el protocolo de MiniPrep de la Universidad EAFIT para la obtención del vector. Se logró evidenciar la presencia de material genético correspondiente al vector de PICZ- α . A pesar de lo anterior, no se logró determinar el éxito de la clonación debido a que el tamaño de las muestras obtenidas por MiniPrep era menor en comparación con el tamaño del vector sin inserto (figura 11).

Figura 11. Gel de electroforesis de MiniPrep.

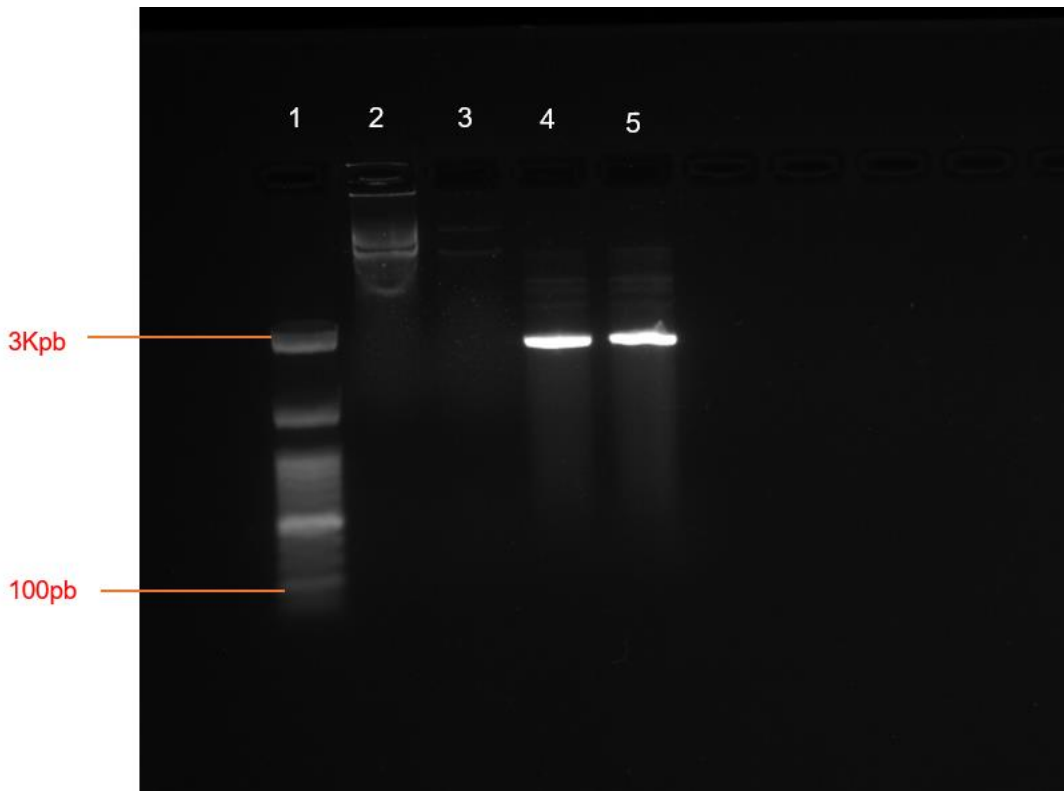


Figura 11. Gel de electroforesis de agarosa al 1%. En la imagen se pueden ver los pozos 1: ladder 3Kpb, pozo 2: plásmido PICZ- α A sin inserto, pozo 3: pozo 2: plásmido PICZ- α A sin inserto y digerido con EcoRI y pozos 4 y 5: plásmidos recuperados de células transformantes de *E. coli* TOP10 crecidas en medio LB + bleomicina. Se evidencia un tamaño del plásmido PICZ- α A de aproximadamente 3.25Kpb, concordando con el tamaño estipulado por la casa comercial, este también muestra dos bandas, donde la superior sugiere la presencia de plásmido súper enrollado, y la banda inferior a plásmido circular. En las muestras se evidencian dos bandas, donde las superior son de tamaño aproximado de 3Kpb y las inferiores a 2.9Kpb.

Discusión

Durante el trabajo, se logró determinar la pureza y calidad del ADN genómico de *R. mucilaginosa* EA-BIO010. Este ha sido reportado en literatura con un es de ~19Mbp probablemente por la presencia de mutaciones en el genoma del organismo, ya que autores como Gan et al. (2017), reportan un tamaño de 19Mbp y Tang et al. (2019), reportan un tamaño de 19.03Mpb. En relación con los resultados del proyecto, se sugiere que el genoma de *R. mucilaginosa* EA-BIO010 es mayor a 10Kpb, lo cual da un buen indicador de que el genoma obtenido es del microorganismo de interés. Además, los resultados de NanoDrop evidenciaron curvas buenas de ADN en términos de cantidades y su calidad. Aunque, respecto a la pureza, la mayoría de las muestras presentaron valores ligeramente por encima de 2.0 en las relaciones 260/280, lo cual indica que probablemente había poca presencia ARN en las muestras y la relación 260/230 inferiores a 2.0, lo que indica que había presencia de agentes orgánicos empleados para la extracción de ADN (i.e fenoles). Sin embargo, para realizar procedimientos de PCR, el ADN no tiene que estar

completamente puro y puede haber cierta cantidad de contaminantes en las muestras, siempre y cuando estas no sean superiores a 2.0 en la relación 260/280.

Los tamaños de los productos de PCR de los genes *crtI*, *crtYB*, *HMG1* y *ERG12* pudieron ser predichos con la plataforma de Primer-BLAST de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) esta evaluación *in silico* evidenció la especificidad de los *primers* sintetizados para amplificar los genes de interés. Para el gen *crtYB*, sí se evidenció que estos *primers* podrían amplificar otro tipo de producto o diferente al gen de interés, pero lo que permitió continuar con la investigación es el tamaño que reportó, el cual corresponde a un tamaño similar determinado por Landolfo et al. (2018). Hay que considerar que los *primers* empleados tienen la misma secuencia que aquellos de la autora previamente citada, pero existe una diferencia, la cual radica en el hecho de que en el estudio de Landolfo et al. (2018). los *primers* fueron empleados en un protocolo de qRT-PCR, mientras que la PCR llevada a cabo en este estudio fue convencional. Algunos estudios demuestran que usar *primers* de qRT-PCR en PCR convencional o viceversa, pueden arrojar resultados diferentes (Bastien et al., 2008), hecho que respalda los tamaños de amplicones obtenidos en este estudio, los cuales muestran que los productos PCR para cada gen son ligeramente de mayor tamaño que aquellos reportados por Landolfo et al. (2018). El éxito de los *primers* en este estudio radica en el hecho de que estos fueron creados usando como referencia aquellos usados para amplificar el clúster biosintético de *R. toruloides*, donde los genes involucrados en dicho clúster en *R. mucilaginosa* tienen una homología de más del 65% con los genes involucrados en *R. toruloides*, tal y como se observa en la sintonía llevada a cabo por Han Ming et al. (2017). Es importante resaltar el resultado de PCR del gen *ERG12*, el cual no se logró obtener una temperatura de *annealing* en donde se obtuvieran amplicones de los tamaños reportados *in silico* o en literatura. Lo que se piensa al respecto es que los *primers* para este gen se contaminaron en algún momento durante su manipulación, ya que de acuerdo a los resultados *in silico*, estos *primers* no deberían de amplificar ningún otro tipo de secuencia, cosa que no se observó en este estudio. Sin embargo, otros estudios como el de Tang et al. (2019), al llevar a cabo un análisis de sintonía genómica, sus resultados arrojaron una homología de apenas el 26% entre los genes involucrados en el clúster biosintético de *R. mucilaginosa* y *R. toruloides*, esto también podría dar indicios del por qué los tamaños fueron ligeramente diferentes a aquellos reportados en literatura como se mencionó anteriormente. Pero los resultados de Tang et al. (2019) y Gan et al. (2017) abren las puertas a una nueva discusión, en donde probablemente la metodología, la exposición de las cepas de trabajo a un medio ambiente específico, mutaciones, entre otras, repercutan en la homología de los genes en dicho clúster.

La estandarización de PCR se llevó a cabo para cada gen, con el objetivo de conocer los posibles amplicones que podrían obtenerse en un rango de temperatura en el paso de *annealing*. Durante esta experimentación, se realizaron pruebas PCR para 8 reacciones de cada gen y se corrió gel de electroforesis para cada uno de ellos. Se pudo evidenciar que, en cada gen, a las diferentes temperaturas de *annealing* dentro del gradiente de 65-55°C, las bandas de los amplicones tenían tamaños ligeramente diferentes, lo cual demuestra que la temperatura sí es un factor fundamental para la obtención de amplicones de interés y permitió determinar la temperatura de *annealing* que más aproxima el tamaño del producto de PCR al reportado en literatura en este estudio. Además, algunas de las bandas de las PCR parecían estar más difuminadas que otras lo cual podría indicar que el *ladder* o el buffer de carga del gen, habrían superado su vida útil, pero no presentó ser ningún obstáculo para poder determinar el tamaño de cada gen. También se pudo evidenciar que los pozos en los cuales están ubicadas las muestras presentan un contraste mayor que sus *ladder* (visualmente parecen estar más concentrados) y este contraste variaba entre los genes. Esto puede ser debido a que cada muestra genómica obtenida de *R. mucilaginosa* EA-BIO010 tenía una cantidad diferente de ADN (Tabla 1.), y que, a pesar de diluir aquellas que estuviesen por encima de los 120ng/uL, pudo haber generado este efecto, pero esto tampoco fue un impedimento para determinar el tamaño de los genes. Adicionalmente, algunos genes como el ERG12 y el CAR0 presentaban variaciones en sus tamaños incluso después de la estandarización, esto podría darse por posible contaminación durante la preparación durante el mix ya que, como se observa en el gel de electroforesis del gen CAR0, incluso en los controles se evidenció la amplificación de material genético, lo cual no debió de haber sido así.

Respecto a la generación de células competentes de *E. coli* TOP10, se logró ejecutar el protocolo sin ningún obstáculo, pero sí se tuvieron contaminaciones la primera vez que se intentó aplica el protocolo. Esto conllevó la repetición del protocolo una segunda vez, y son los resultados que están evidenciados en este manuscrito. La manera mediante la cual se determinó la presencia de contaminación fue llevando a cabo tinciones de gram en el cultivo original en medio LB, en las muestras en medio LB-L, y en las células competentes sembradas luego de haber sido congeladas en crioviales a -80°C, donde en cada paso se observaron bacilos gram negativos, sugiriendo que el microorganismo presente era en efecto *E. coli* TOP10.

Un proceso de control de contaminación similar fue empleado para el análisis de la curva de sensibilidad de *E. coli* TOP10, en donde se realizó la tinción de gram en las cepas de *E. coli* TOP10 sembradas en medio LB, en las sembradas en LB-L y en las colonias que lograron crecer en cada uno de los tratamientos. En cada tinción el resultado fue el mismo: bacilos gram negativos, esto sugiere que las células

presentes en las muestras sí eran *E. coli* y no contaminación. La determinación de las cantidades empleadas del antibiótico bleomicina para cada tratamiento se logró evaluando las cantidades implementadas por Xu et al. (2012) y de Elbing & Brent (2019), en donde los primeros evaluaron el crecimiento de cepas nativas y mutantes de *E. coli* en medios que contenían diferentes cantidades del antibiótico bleomicina, y los segundos determinan la manera metodológica de llevar a cabo las diluciones para la obtención de colonias de *E. coli*. En el caso de Xu et al. (2012), se logró determinar que las cepas nativas de *E. coli* eran más resistentes a la bleomicina, por lo que la inhibición del crecimiento se dio a los 8uM y valores inferiores a este no demostraron tener un efecto determinante en donde se pudiese concluir que no había crecimiento de colonias del microorganismo. Por lo anterior, en este proyecto se usaron las cantidades de 0,8uM, 5uM y 10uM, ya que de esta manera se toman valores inferiores a 8uM y uno superior al mismo, ya que nunca se debe suponer que los resultados serán exactamente iguales en condiciones que son probablemente diferentes.

Autores como Araya-Garay et al. (2012) han logrado llevar a cabo procesos de transformación en *Pichia pastoris* para que este produzca de forma heteróloga los carotenoides licopeno y betacaroteno mediante la clonación de los genes *crtE*, *crtB* y *crtl* plásmidos creados por ellos mismos, donde el gen *crtE* pertenece a la especie *Erwinia uredovora*. Además, para llevar a cabo dicha expresión heteróloga, lograron clonar exitosamente cepas de *E. coli* con el plásmido pGAPZ- α A usando como marcador de selección el antibiótico zeocina. Otro caso exitoso de clonación fue el de Nishizaki et al. (2007), donde estos autores lograron la producción heteróloga de zeaxantina con los genes *crtE*, *crtX*, *crtY*, *crtl* y *crtB* provenientes de *E. uredovora* en *E. coli*. Dados estos antecedentes, y comparándolo con el presente proyecto, se logró llevar a cabo la clonación del gen *crtl* en el plásmido PICZ- α A sin necesidad de crear nuevos vectores para la expresión del gen, empleando como marcador de selección el antibiótico bleomicina en cepas de *E. coli* TOP10, solo que, en nuestro caso, solo se usó el gen *crtl* y establecimos los primeros pasos para su clonación exitosa. Cabe recalcar que, en este proyecto, no fue necesario el crecimiento en medio LB con baja sal, gracias a que el antibiótico de bleomicina no tiene este requisito como la zeocina.

Para lograr las cepas transformantes de *E. coli* TOP10, se siguió el protocolo de la Universidad EAFIT, el cual consta en emplear choque térmico para la generación de cepas transformantes de *E. coli* TOP10. Otros estudios emplean técnicas de mutagénesis en cepas nativas de *R. mucilaginosa*, como el uso del nitrito de sodio (NaNO_3) en combinación con rayos UV como en el estudio de Wang et al. (2017) con el fin de optimizar la producción de carotenoides. Estas últimas dos técnicas presentan un reto y está relacionado con la aleatoriedad asociada a la mutación no dirigida, ya que de esta manera no se tiene control sobre qué genes o qué rutas

metabólicas están siendo afectadas para lograr el objetivo. Razón por la cual este proyecto mediante la clonación del gen *crtl* en cepas de *E. coli* TOP10 para sentar los primeros pasos de la clonación del clúster biosintético de betacarotenos proveniente de *R. mucilaginosa*, presenta una posibilidad de lograr el mismo acometido sin someter las cepas nativas productoras de carotenoides a procesos de mutagénesis.

El proceso de expresión del gen *crtl* no se logró llevar a cabo para determinar de forma concluyente su presencia en las células transformantes de *E. coli* TOP10. Es importante resaltar que no se puede determinar con precisión si aquel material genético en la figura 11 corresponde al vector de interés. Por otro lado, el hecho de que cepas de *E. coli* TOP10 crecieran en medio LB + bleomicina con una concentración de 10uM, donde estas células veían un crecimiento inhibido previo al protocolo de generación de transformantes en medio LB sin antibiótico, es un indicador que sugiere que dicho vector fue insertado correctamente en el microorganismo. Otros factores como el porcentaje de agarosa, el tiempo de corrida del gel, y el voltaje pudieron ser determinantes para permitir el flujo del material genético en el gel, lo que podría explicar el por qué el plásmido presenta bandas de mayor tamaño que las muestras de las células transformantes, por lo que no es posible determinar de forma concluyente que el gen *crtl* esté presente o no en el vector.

La obtención de dicho plásmido se realizó de dos maneras: con kit de MiniPrep y de forma química o convencional, donde el método que mejor resultados arrojó fue el kit, ya que, mediante el método convencional, no se lograban ver bandas en los pozos donde se agregaban las muestras, y solo se evidenciaba la presencia del plásmido y tomaba aproximadamente 5 horas de ejecución. Mientras que, con el kit, se evidenciaron bandas de material genético y su tiempo de ejecución fue de aproximadamente 20 minutos. En materia del gel de electroforesis en agarosa, se hicieron pruebas con diferentes porcentajes de agarosa (1.2%, 1% y 2.5%) donde el gel que mejor resolución brindaba fue el de 1%, tal y como es recomendado en el protocolo establecido por Woronowicz (s.f) (ver anexo 5) donde el autor recomienda que, para correr geles de electroforesis con agarosa y obtener una buena resolución de plásmidos de tamaños por iguales o superiores a 1Kpb, se pueden usar geles de 1% de agarosa.

Conclusiones.

Se logró extraer el ADN genómico de *R. mucilaginosa* EA-BIO010 mediante métodos químicos y comprobar su presencia en gel de electroforesis de agarosa al 1.2%. Adicionalmente, se logró obtener la síntesis de los *primers* para los genes

crtl, *crtYB*, *HMG1* y *ERG12* y su consecuente amplificación mediante PCR convencional y confirmación de su tamaño reportado de acuerdo con la literatura, mediante gel de electroforesis al 1.2%.

Por otro lado, se logró generar clones transformantes de *E. coli* TOP10 con los protocolos implementados, donde se pudo evidenciar de forma visual la inserción del vector PICZ- α A gracias al crecimiento de colonias bacterianas en medio LB + bleomicina a 10uM. Finalmente, no se logró llevar a cabo la evaluación de la expresión del gen *crtl* en clones de *E. coli* TOP10. Es de esta manera, que el proyecto deja las puertas abiertas a su continuidad en un futuro y evaluar la expresión de este gen, así como también sienta los primeros pasos para la clonación y expresión del resto de los genes pertenecientes al clúster biosintético de *R. mucilaginosa*. (Stefan-van Staden et al., 2019)

REFERENCIAS:

- Allahkarami, S., Sepahi, A. A., Hosseini, H., & Razavi, M. R. (2021). Isolation and identification of carotenoid-producing *Rhodotorula* sp. from Pinaceae forest ecosystems and optimization of in vitro carotenoid production. *Biotechnology Reports*, 32. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00687>
- Araya-Garay, J. M., Feijoo-Siota, L., Rosa-Dos-Santos, F., Veiga-Crespo, P., & Villa, T. G. (2012). Construction of new *Pichia pastoris* X-33 strains for production of lycopene and β -carotene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(6), 2483–2492. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3764-7>
- Bogacz-Radomska, L., & Harasym, J. (2018a). β -Carotene-properties and production methods. In *Food Quality and Safety* (Vol. 2, Issue 2, pp. 69–74). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy004>
- Bogacz-Radomska, L., & Harasym, J. (2018b). β -Carotene-properties and production methods. In *Food Quality and Safety* (Vol. 2, Issue 2, pp. 69–74). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy004>
- Carlos Mata-Gómez, L., César Montañez, J., Méndez-Zavala, A., & Aguilar, C. N. (2014). *Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview*. <http://www.microbialcellfactories.com/content/13/1/12>
- Cendrowski, A., Krasniewska, K., Przybył, J. L., Zielinska, A., & Kalisz, S. (2020). Antibacterial and Antioxidant Activity of Extracts from Rose Fruits (*Rosa rugosa*). *Molecules*, 25(6). <https://doi.org/10.3390/molecules25061365>
- Cheng, Y. T., & Yang, C. F. (2016). Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 61, 270–275. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2015.12.027>
- Crupi, P., Faienza, M. F., Naeem, M. Y., Corbo, F., Clodoveo, M. L., & Muraglia, M. (2023). Overview of the Potential Beneficial Effects of Carotenoids on Consumer

- Health and Well-Being. In *Antioxidants* (Vol. 12, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox12051069>
- Donhowe, E. G., & Kong, F. (2014). Beta-carotene: Digestion, Microencapsulation, and In Vitro Bioavailability. In *Food and Bioprocess Technology* (Vol. 7, Issue 2, pp. 338–354). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1244-z>
- Elbing, K. L., & Brent, R. (2019). Recipes and Tools for Culture of Escherichia coli. *Current Protocols in Molecular Biology*, 125(1). <https://doi.org/10.1002/cpmb.83>
- François, J. M., Rymowicz, W., Nikel, P. I., Luis Martinez, J., Jacobsen, I. H., & Ledesma-Amaro, R. (2020). Recombinant β -Carotene Production by *Yarrowia lipolytica* – Assessing the Potential of Micro-Scale Fermentation Analysis in Cell Factory Design and Bioreaction Optimization. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00029>
- Gan, H. M., Thomas, B. N., Cavanaugh, N. T., Morales, G. H., Mayers, A. N., Savka, M. A., & Hudson, A. O. (2017). Whole genome sequencing of *Rhodotorula mucilaginosa* isolated from the chewing stick (*Distemonanthus benthamianus*): insights into *Rhodotorula* phylogeny, mitogenome dynamics and carotenoid biosynthesis. <https://doi.org/10.7717/peerj.4030>
- Gan, S., Liang, S., Zou, Q., & Shangid, C. (2022a). Optimization of carotenoid extraction of a halophilic microalgae. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270650>
- Gan, S., Liang, S., Zou, Q., & Shangid, C. (2022b). Optimization of carotenoid extraction of a halophilic microalgae. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270650>
- Hoang, H. T., Moon, J. Y., & Lee, Y. C. (2021). Natural antioxidants from plant extracts in skincare cosmetics: Recent applications, challenges and perspectives. In *Cosmetics* (Vol. 8, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8040106>
- Isaacs, E. J., & Gregory, E. (2012). Antioxidant for use in cosmetic, medicated and pharmaceutical preparations. 2(12). <https://patents.google.com/patent/US8221746>
- Kook, J. K., Kim, J. I., Lee, N. K., Hahm, Y. T., Baik, M. Y., & Kim, B. Y. (2010). Extraction of β -Carotene Produced from Yeast *Rhodospiridium* sp. and Its Heat Stability. *Food Sci. Biotechnol.*, 19(1), 263–266.
- Kasote, D. M., Katyare, S. S., Hegde, M. V., & Bae, H. (2015). Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *International Journal of Biological Sciences*, 11(8), 982–991. <https://doi.org/10.7150/ijbs.12096>
- Landolfo, S., Chessa, R., Zara, G., Zara, S., Budroni, M., & Mannazzu, I. (2019). *Rhodotorula mucilaginosa* c2.5t1 modulates carotenoid content and car genes transcript levels to counteract the pro-oxidant effect of hydrogen peroxide. *Microorganisms*, 7(9). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090316>
- Landolfo, S., Ianiri, G., Camiolo, S., Porceddu, A., Mulas, G., Chessa, R., Zara, G., & Mannazzu, I. (2018). CAR gene cluster and transcript levels of carotenogenic genes in *Rhodotorula mucilaginosa*. *Microbiology (United Kingdom)*, 164(1), 78–87. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000588>

- Liu, C., Hu, B., Cheng, Y., Guo, Y., Yao, W., & Qian, H. (2021). Carotenoids from fungi and microalgae: A review on their recent production, extraction, and developments. In *Bioresource Technology* (Vol. 337). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125398>
- Liu, S., Zhang, M., Ren, Y., Jin, G., Tao, Y., Lyu, L., Zhao, Z. K., & Yang, X. (2021). Engineering *Rhodospiridium toruloides* for limonene production. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-021-02094-7>
- Macias, V. E. N., Aguilar, O., & Aguilar, M. (2017). Carotenoids extraction from *Rhodotorula glutinis* cells using various techniques: A comparative study Sistema Superparamagnético Nanoestructurado Recubierto de Quitosán para Inmovilización de Microorganismos View project Functional Ceramic Porous Materials View project SEE PROFILE. In *Article in Indian Journal of Experimental Biology*. <https://www.researchgate.net/publication/318661893>
- Malisorn, C., & Suntornsuk, W. (2009). Improved β -carotene production of *Rhodotorula glutinis* in fermented radish brine by continuous cultivation. *Biochemical Engineering Journal*, 43(1), 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.08.005>
- Meléndez-Martínez, A. J., Mandić, A. I., Bantis, F., Böhm, V., Borge, G. I. A., Brnčić, M., Bysted, A., Cano, M. P., Dias, M. G., Elgersma, A., Fikselová, M., García-Alonso, J., Giuffrida, D., Gonçalves, V. S. S., Hornero-Méndez, D., Kljak, K., Lavelli, V., Manganaris, G. A., Mapelli-Brahm, P., ... O'Brien, N. (2022). A comprehensive review on carotenoids in foods and feeds: status quo, applications, patents, and research needs. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 62, Issue 8, pp. 1999–2049). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1867959>
- Metibemu, D. S., & Ogungbe, I. V. (2022). Carotenoids in Drug Discovery and Medicine: Pathways and Molecular Targets Implicated in Human Diseases. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 18). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27186005>
- Molina-Márquez, A., Vila, M., Vigar, J., Borrero, A., & León, R. (2019). metabolites The Bacterial Phytoene Desaturase-Encoding Gene (CRTI) is an Efficient Selectable Marker for the Genetic Transformation of Eukaryotic Microalgae. *Metabolites*, 9(49). <https://doi.org/10.3390/metabo9030049>
- Moliné, M., Libkind, D., & van Broock, M. (2012). Production of Torularhodin, Torulene, and B-Carotene by *Rhodotorula* Yeasts. *Methods in Molecular Biology*, 898(June), 153–159. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-918-1>
- Musa, K. H., Abdullah, A., Jusoh, K., & Subramaniam, V. (2011). Antioxidant Activity of Pink-Flesh Guava (*Psidium guajava* L.): Effect of Extraction Techniques and Solvents. *Food Analytical Methods*, 4(1), 100–107. <https://doi.org/10.1007/s12161-010-9139-3>
- Nishizaki, T., Tsuge, K., Itaya, M., Doi, N., & Yanagawa, H. (2007). Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in *Escherichia coli* by ordered gene assembly in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4), 1355–1361. <https://doi.org/10.1128/AEM.02268-06>

- Papadaki, E., Th Mantzouridou, F., & Melendez-Martinez, J. (2021). *Natural β -Carotene Production by Blakeslea trispora Cultivated in Spanish-Style Green Olive Processing Wastewaters*. <https://doi.org/10.3390/foods10020327>
- Parasuraman, S., Ping, W., Raj, P., Sujithra, J., Syamitra, B., Yeng, W., Dhanaraj, S., & Muralidharan, S. (2014). Evaluation of sub-chronic toxic effects of petroleum ether, a laboratory solvent in Sprague-Dawley rats. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 5(4), 89. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.141943>
- Pham-Huy, L. A., & Pham-Huy, C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2), 89–96.
- Ranjha, M. M. A. N., Shafique, B., Khalid, W., Nadeem, H. R., Mueen-ud-Din, G., & Khalid, M. Z. (2022). Applications of Biotechnology in Food and Agriculture: a Mini-Review. In *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences* (Vol. 92, Issue 1, pp. 11–15). Springer. <https://doi.org/10.1007/s40011-021-01320-4>
- Ren, J., Shen, J., Thai, T. D., Kim, M. G., Lee, S. H., Lim, W., & Na, D. (2023). Evaluation of Various Escherichia coli Strains for Enhanced Lycopene Production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(7), 973–979. <https://doi.org/10.4014/jmb.2302.02003>
- Rezaeeyan, Z., Safarpour, A., Amoozegar, M. A., Babavalian, H., & Tebyanian, H. (2017). Original article : HIGH CAROTENOID PRODUCTION BY A HALOTOLERANT BACTERIUM , KOCURIA SP . STRAIN QWT-12 AND ANTICANCER. *EXCLI Journal*, 16, 840–851. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.17179/excli2017-218>
- Ribeiro, B. D., Barreto, D. W., & Coelho, M. A. Z. (2011). Technological Aspects of β -Carotene Production. In *Food and Bioprocess Technology* (Vol. 4, Issue 5, pp. 693–701). <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0545-3>
- Rocha, H. R., Coelho, M. C., Gomes, A. M., & Pintado, M. E. (2023). Carotenoids Diet: Digestion, Gut Microbiota Modulation, and Inflammatory Diseases. In *Nutrients* (Vol. 15, Issue 10). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/nu15102265>
- Saini, R. K., Prasad, P., Lokesh, V., Shang, X., Shin, J., Keum, Y. S., & Lee, J. H. (2022). Carotenoids: Dietary Sources, Extraction, Encapsulation, Bioavailability, and Health Benefits—A Review of Recent Advancements. In *Antioxidants* (Vol. 11, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox11040795>
- Saini, R. K., & Young-Soo, K. (2017). Progress in Microbial Carotenoids Production. *Indian Journal of Microbiology*, 57(1), 129–130. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0637-x>
- Sharma, R., & Ghoshal, G. (n.d.). Characterization and cytotoxic activity of pigment extracted from Rhodotorula mucilaginosa to assess its potential as bio-functional additive in confectionary products. *Journal of Food Science and Technology*, 58. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04775-x>
- Silva Igreja, W., De Andrade Maia, F., Lopes, A. S., & Campos Chisté, R. (2021). *Molecular Sciences Biotechnological Production of Carotenoids Using Low Cost-*

Substrates Is Influenced by Cultivation Parameters: A Review.
<https://doi.org/10.3390/ijms22168819>

- Stefan-van Staden, R. I., Moscalu-Lungu, A., & van Staden, J. F. (2019). Determination of β -carotene in soft drinks using a stochastic sensor based on a grapheme-porphyrin composite. *Electrochemistry Communications*, 109(October), 106581.
<https://doi.org/10.1016/j.elecom.2019.106581>
- Tang, W., Wang, Y., Zhang, J., Cai, Y., & He, Z. (2019). Biosynthetic pathway of carotenoids in rhodotorula and strategies for enhanced their production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 507–517.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1901.01022>
- Tang, W., Yue, W., Jun, Z., Yali, C., & Zengguo, H. (2019). Biosynthetic pathway of carotenoids in rhodotorula and strategies for enhanced their production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 507–517.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1901.01022>
- Tyczewska, A., Twardowski, T., & Woźniak-Gientka, E. (2023). Agricultural biotechnology for sustainable food security. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 41, Issue 3, pp. 331–341). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.12.013>
- Wang, Q., Liu, D., Yang, Q., & Wang, P. (2017). Enhancing carotenoid production in *Rhodotorula mucilaginosa* KC8 by combining mutation and metabolic engineering. *Annals of Microbiology*, 67(6), 425–431. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1274-2>
- Wang, Z., Sun, J., Yang, Q., & Yang, J. (2020). Metabolic engineering *Escherichia coli* for the production of lycopene. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 14). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/molecules25143136>
- Wargala, E., Sławska, M., Zalewska, A., & Toporowska, M. (2021). Health Effects of Dyes, Minerals, and Vitamins Used in Cosmetics. *Women*, 1(4), 223–237.
<https://doi.org/10.3390/women1040020>
- Wei, J., Weiming, F., Tianle, G., Tao, L., Zhenming, Y., Huihui, G., Lulu, W., Han, Y., & Jian-Dong, J. (2020). Analgesic Mechanism of Sinomenine against Chronic Pain. *Pain Research and Management*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1876862>
- Woutersen, R. A., Wolterbeek, A. P. M., Appel, M. J., Van Den Berg, H., Goldbohm, R. A., & Feron, V. J. (1999). Safety evaluation of synthetic β -carotene. In *Critical Reviews in Toxicology* (Vol. 29, Issue 6, pp. 515–542). CRC Press LLC.
<https://doi.org/10.1080/10408449991349267>
- Yang, W., Yanping, W., Yuanyuan, W., Han, X., Xiaoqiang, M., Donygyou, Y., Yibing, W., & Weifen, L. (2017). Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients*, 9(5).
<https://doi.org/10.3390/nu9050521>
- Zeng, L., & Dehesh, K. (2021). The eukaryotic MEP-pathway genes are evolutionarily conserved and originated from Chlamydia and cyanobacteria. *BMC Genomics*, 22(1).
<https://doi.org/10.1186/s12864-021-07448-x>

Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. In *Chinese Medicine (United Kingdom)* (Vol. 13, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>