



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Biosíntesis de lípidos neutros en la levadura *Rhodotorula mucilaginosa*
M94C9: un análisis de caracterización fisiológica y expresión génica**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Miguel Ángel Rosas Paz

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

Dr. James Enrique González Flores

Facultad de Ciencias, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez

Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Javier Andrés Juárez Díaz

Facultad de Ciencias, UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Biosíntesis de lípidos neutros en la levadura *Rhodotorula mucilaginosa*
M94C9: un análisis de caracterización fisiológica y expresión génica**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Miguel Ángel Rosas Paz

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
Dr. James Enrique González Flores
Facultad de Ciencias, UNAM

COMITÉ TUTOR:
Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez
Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Javier Andrés Juárez Díaz
Facultad de Ciencias, UNAM

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
OFICIO: CGEP/CPCB/FC/0760/2023

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **28 de agosto de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del estudiante **ROSAS PAZ MIGUEL ÁNGEL** con número de cuenta **314184069** con la tesis titulada **“Biosíntesis de lípidos neutros en la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* M94C9: un análisis de caracterización fisiológica y expresión génica”**, realizada bajo la dirección del **DR. JAMES ENRIQUE GONZÁLEZ FLORES**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: **DR. ANTONIO CALVIN PEÑA DÍAZ**
Vocal: **DRA. LUCERO ROMERO AGUILAR**
Vocal: **DRA. CLAUDIA ANDREA SEGAL KISCHINEVZKY**
Vocal: **DR. SALVADOR URIBE CARVAJAL**
Secretario: **DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ**

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 20 de septiembre de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA

c. c. p. Expediente del alumno

AGNS/AAC/GEMF/EARR/mnm



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1° Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

Agradecimientos institucionales

Se agradece la ayuda del Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por la oportunidad de crecimiento académico y profesional brindada.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), por el apoyo brindado para obtener una beca para realizar actividades académicas de larga duración, Guadalajara, Jalisco.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT, México), por el apoyo económico otorgado durante la realización del proyecto de maestría. Número de becario: 966189

A los miembros de mi comité tutor: el **Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez** de la Facultad de Medicina, UNAM y el **Dr. Javier Andrés Juárez Díaz** de la Facultad de Ciencias, UNAM por sus contribuciones, sugerencias, enseñanzas y comentarios durante la realización del proyecto. Y al **Dr. James Enrique González Flores** por su asesoría, enseñanzas, apoyo y confianza brindada durante todo este tiempo.

Agradecimientos a título personal

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica del Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM, bajo la tutoría del **Dr. James Enrique González Flores**, a quien se le agradece por su excelente labor como tutor.

Se agradece a la **Dra. Claudia Segal Kischinevzky** por la colaboración con su grupo de investigación y por toda la retroalimentación brindada durante el desarrollo de esta investigación.

Se agradece a la **Dra. Lucero Romero Aguilar** de la Facultad de Medicina de la UNAM por el apoyo brindado para preparar las muestras de microscopía confocal, determinación del índice lipídico, citometría de flujo y determinación de actividad enzimática. Al **Dr. Miguel Tapia Rodríguez** del Instituto de Investigaciones Biomédicas por su apoyo técnico en la unidad de microscopía confocal. Al **Dr. Jose Carlos Campero Basaldua** por su apoyo brindado en la implementación del NuSA en *Rhodotorula mucilaginosa* M94C9 y por facilitar diferentes reactivos útiles para la parte experimental del proyecto.

Se agradece al **Dr. Marcelo Baeza Cancino** de la Universidad de Chile, por donar la cepa *R. mucilaginosa* M94C9 al Laboratorio, lo cual permitió iniciar el desarrollo del trabajo que aquí se describe.

Se agradece a la **Q. Viviana Escobar Sánchez** y a la **M. en C. Ana Paulina Mendoza von der Borch** por los protocolos de crecimiento, medios y todo el apoyo técnico que le brindó al proyecto.

Se agradece a la **Dra. Georgina Coral Sandoval Fabian** por permitir y facilitar la estancia en el Laboratorio de Innovación en Bioenergéticos y Bioprocesos Avanzados (LIBBA), Unidad de Biotecnología Industrial en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ), donde se realizaron los experimentos para determinar el potencial biotecnológico de *R. mucilaginosa*. También se reconoce y agradece el apoyo técnico brindado por el **M. en B. Carlos Antonio González Juárez** y por el **M. en C. David Alejandro Torres Añorve**.

Se agradece el apoyo del **Dr. Mohammed El Hafidi** del Departamento de Biomedicina Cardiovascular, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, en procesar muestras para la obtención del perfil de ácidos grasos.

Se reconoce y agradece el apoyo del **Biól. Alberto Zamora Bello** por el apoyo en la realización del proyecto. También a la **M. en C. Ileana de la Fuente Colmenares** por su apoyo y asesoría en el montaje de algunas técnicas del proyecto.

Se agradece a los miembros de mi Jurado de Grado conformado por el **Dr. Antonio Calvin Peña Díaz**, la **Dra. Lucero Romero Aguilar**, la **Dra. Claudia Segal Kischinevzky**, el **Dr. Salvador Uribe Carvajal** y al **Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez** por la revisión, comentarios y correcciones a este trabajo de tesis

El trabajo realizado fue financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM, donativo PAPIIT **IA208820** y **IA204923**. Asimismo, se agradece a la dirección de la Facultad de Ciencias-UNAM y a los Grupos Interdisciplinarios de Investigación GII-UNAM, por el apoyo otorgado en el marco del proyecto: "Intensificación de los procesos para la obtención de biocompuestos a partir de agua residual" – Proyecto GII **3307** del Instituto de Ingeniería de la UNAM.

A continuación, quiero expresar mi agradecimiento a quienes han sido parte fundamental de esta etapa de mi vida. Durante estos dos años, su apoyo ha sido invaluable y quiero agradecerles de todo corazón.

En primer lugar, quiero agradecer a mi mamá, a quien también le dedico esta tesis. Mamá, agradezco mucho todo el amor, apoyo, consejos y cuidados que me has brindado. También quiero extender mi agradecimiento a mi padre, a mi abuelita Mamá Mari, y a mis hermanos Dani, Fredi y Diana. Compartir esta hermosa y a veces caótica vida a su lado ha sido un privilegio que valoro profundamente. Los quiero con todo mi corazón.

A mi compañera de vida, Diana Ramos (*Mapacha Coonie*), quiero agradecerte de todo corazón por el apoyo incondicional que me has brindado. Tu amor, consejos, chismes, las comidas compartidas y las salidas juntos han sido una parte muy importante en este camino. Gracias por ser mi compañera en esta travesía. Un futuro brillante nos espera.

A mis amigas y amigos que estuvieron presentes en esta etapa de mi vida. A Gaby porque por alguna razón debo agradecerle. A Aurora porque me acompañó a hacer el examen psicométrico. A los panas Josué y Giovani por las tardes de andar manqueando, las comidas en el jale y por ser unos estupendos amigos. A Alejandro, por hacer mi estancia en Guadalajara más agradable y por demostrar ser un gran amigo a pesar de la distancia.

A James, por guiarme y apoyarme durante esta etapa de mi formación. A Alberto por enseñarme a hacer experimentos, por sus enriquecedoras pláticas y por jugar Xbox conmigo en el laboratorio. A Diana Villarreal por su compañía en el laboratorio. A Claudia y a Viviana por todo su apoyo en mi formación. A todas y todos los del laboratorio que llegaron para ayudarme a experimentar una pequeña faceta como “instructor”.

A mis *poyos*, a Molly y a Perry, les agradezco nuevamente por estar con nosotros y alegrar la casa con sus cánticos y ladridos. Perry, como me gustaría que todavía estuvieras aquí.

A *Rhodotorula mucilaginosa* M94C9 y a la vida por siempre asombrarme.

Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
1.1. Las levaduras oleaginosas.....	3
1.2. Biosíntesis de lípidos <i>de novo</i> : acumulación de lípidos neutros bajo limitación de nitrógeno en levaduras.....	4
1.2.1. Enzimas y genes involucrados en la síntesis de lípidos neutros en levaduras oleaginosas.....	7
1.2.2. Gotas lipídicas: biogénesis y relevancia.....	11
1.3. Importancia de la producción de triacilgliceroles en las levaduras oleaginosas.....	13
1.4. La levadura antártica <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> M94C9.....	15
2. Justificación.....	17
3. Hipótesis.....	18
4. Objetivo general.....	19
5. Objetivos particulares.....	19
6. Materiales y métodos.....	20
6.1. Cepa de levadura.....	20
6.2. Condiciones de crecimiento.....	20
6.3. Determinación de crecimiento y biomasa.....	21
6.4. Ensayo de viabilidad.....	22
6.5. Determinación del índice lipídico.....	22
6.6. Ensayos de citometría de flujo.....	23
6.7. Detección de cuerpos lipídicos por microscopía confocal.....	23
6.8. Determinación del perfil de ácidos grasos.....	23
6.9. Ensayo de actividad específica de ATP-citrato liasa.....	24
6.9.1. Extracción y cuantificación de proteínas.....	24
6.9.2. Determinación de la actividad específica de la Acl.....	24
6.10. Extracción de ácidos nucleicos.....	25
6.10.1. Extracción de DNA.....	25
6.10.2. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	25
6.11. Cuantificación de la transcripción mediante RT-qPCR.....	26
6.12. Identificación in silico de <i>RmACL</i>	28
6.13. Diseño de oligonucleótidos para el ensayo de escaneo de nucleosomas.....	28
6.14. Ensayo de escaneo de nucleosomas (NuSA).....	29
6.15. Extracción de lípidos.....	30
6.16. Análisis de conversión de TAG a FAEEs.....	31
7. Resultados.....	32

7.1. El crecimiento y la acumulación de biomasa de <i>R. mucilaginosa</i> M94C9 están limitados por la disponibilidad de nitrógeno.....	32
7.2. La limitación de nitrógeno no ejerce efectos negativos sobre la viabilidad.....	33
7.3. <i>R. mucilaginosa</i> M94C9 acumula lípidos en limitación e inanición de nitrógeno.....	34
7.4. Los cuerpos lipídicos son de mayor tamaño en las condiciones lipogénicas.....	36
7.5. El perfil de ácidos grasos revela la producción de C18:1, C16:0, C18:2 y C18:0.....	38
7.6. Análisis de la expresión genética de <i>RmACL</i> y actividad enzimática de la Acl.....	39
7.7. Determinación del arreglo nucleosómico de la región intergénica 5' UTR del gen <i>RmACL</i>	41
7.8. Análisis de la expresión genética de los genes involucrados en la vía de síntesis de lípidos.....	43
7.9. La reacción de transesterificación del aceite muestra una alta eficiencia de conversión de TAGs a FAEEs.....	44
7.10. Exploración del potencial biotecnológico de la producción de carotenoides en <i>R. mucilaginosa</i> M94C9.....	46
8. Discusión.....	48
8.1. La disponibilidad de nitrógeno ejerce un efecto en el crecimiento y la acumulación de biomasa, pero no en la viabilidad de <i>R. mucilaginosa</i> M94C9.....	48
8.2. <i>R. mucilaginosa</i> M94C9 es una levadura oleaginosa.....	49
8.3. Expresión y actividad de la ATP-citrato liasa de <i>R. mucilaginosa</i> M94C9 en condiciones de limitación de nitrógeno.....	50
8.4. El gen <i>RmACL</i> tiene poca ocupación de nucleosomas en su región promotora.....	52
8.5. Inducción de la expresión de los genes involucrados en la lipogénesis de <i>R. mucilaginosa</i> M94C9 en condiciones de limitación de nitrógeno.....	53
8.6. El aceite de <i>R. mucilaginosa</i> M94C9 es convertido eficientemente en biodiésel.....	54
8.7. La acumulación de lípidos neutros en <i>R. mucilaginosa</i> M94C9 se acompaña de la producción de carotenoides.....	56
9. Conclusiones.....	58
10. Perspectivas.....	59
11. Referencias bibliográficas.....	60
12. Anexo.....	79

Lista de figuras

- Figura 1.** Esquema representativo del metabolismo y la producción de triacilgliceroles en levaduras oleaginosas en condiciones de limitación de nitrógeno.
- Figura 2.** Esquema ilustrativo de la síntesis de malato a partir del oxalacetato producido por la Acl.
- Figura 3.** Esquema de la biogénesis de las gotas lipídicas en levaduras.
- Figura 4.** Relevancia de la acumulación de triacilgliceroles en levaduras oleaginosas.
- Figura 5.** Reacción de transesterificación.
- Figura 6.** Colonias de *Rhodotorula mucilaginosa* M94C9 cultivadas en medio rico sólido.
- Figura 7.** Disposición de los oligonucleótidos diseñados para el ensayo de escaneo de nucleosomas en el gen de *RmACL*.
- Figura 8.** Curva de crecimiento y acumulación de biomasa de *R. mucilaginosa* M94C9 variando la relación carbono/nitrógeno.
- Figura 9.** Prueba de viabilidad por goteo de *R. mucilaginosa* M94C9 cultivada en medios con diferentes concentraciones de nitrógeno durante la fase estacionaria.
- Figura 10.** Dinámica de la acumulación de las gotas lipídicas en *R. mucilaginosa* M94C9 cultivada en C/N₄₀ y -N durante diferentes intervalos de tiempo.
- Figura 11.** Detección de cuerpos lipídicos mediante microscopía confocal.
- Figura 12.** Perfil de ácidos grasos de *R. mucilaginosa* M94C9 cultivada a las 0 y 48 h en C/N₄₀.
- Figura 13.** Expresión génica de *RmACL* y actividad enzimática de la Acl en condiciones con diferentes concentraciones de nitrógeno.
- Figura 14.** Protección relativa del gen *RmACL* durante la fase logarítmica (18 h) en C/N₄₀.
- Figura 15.** Comparación de la expresión relativa de distintos genes involucrados en la vía de síntesis de lípidos en limitación e inanición de nitrógeno.
- Figura 16.** Cuantificación de lípidos de *R. mucilaginosa* M94C9 y TLC de muestras de aceite tratadas con la lipasa 435 Novozymes (reacción de transesterificación).

- Figura 17** Análisis cualitativo de la producción de carotenoides en medios con diferente disponibilidad de nitrógeno.
- Figura 18** Comparación de la expresión relativa de distintos genes involucrados en la vía de síntesis de carotenoides en limitación e inanición de nitrógeno.
- Figura 19** Hipótesis sobre el posicionamiento de los nucleosomas en el promotor del gen *RmACL* en condiciones de limitación de nitrógeno.
- Figura 1S** Foto representativa de la separación de nucleosomas mediante gel de electroforesis.

Lista de tablas

- Tabla 1.** Composición de los medios de cultivo.
- Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de qPCR.
- Tabla 3.** Perfil de ácidos grasos de *R. mucilaginosa* M94C9 a 0 h y 48 h en medio C/N₄₀.
- Tabla 4.** Acumulación de lípidos en diferentes cepas de *R. mucilaginosa*
- Tabla 1S** Oligonucleótidos diseñados para NuSA de *RmACL*.

Tabla de abreviaturas

Abreviatura	Significado
-N	Condición de inanición de nitrógeno
5' UTR	5' <i>untranslated region</i> , región 5' no codificante
Ac	Aconitasa
<i>ACCI</i>	Gen que codifica para la acetil-CoA carboxilasa
Acc1	Acetil-CoA carboxilasa
<i>ACL</i>	Gen que codifica para la ATP-citrato liasa
Acl	ATP-citrato liasa
ACP	Proteína transportadora de acilo
AMPD	AMP-desaminasa
ARA	Ácido araquidónico
AT	Aciltransferasa
BODIPY 493/503	4, 4-difluoro-1, 3, 5, 7, 8-pentametil-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indaceno
C/N	Relación carbono/nitrógeno
C/N₁₂₀₀	Relación carbono/nitrógeno de 1200:1
C/N₂₄₀₀	Relación carbono/nitrógeno de 2400:1
C/N₄₀	Relación carbono/nitrógeno de 40:1
<i>CARO</i>	Gen que codifica para la carotenoide dioxigenasa
<i>CARI</i>	Gen que codifica para la fitoeno desaturasa
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CO₂	Dióxido de carbono
CoA	Coenzima A
DAG	Diacilglicerol
DEPC	Dietilpirocarbonato
<i>DGAI</i>	Gen que codifica para la diacilglicerol aciltransferasa
Dga1	Diacilglicerol aciltransferasa
DH	Deshidratasa
DHA	Ácido docosahexaenoico
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
EnR	Enoil reductasa
EPA	Ácido eicosapentaenoico

FAEEs	Ésteres etílicos de ácidos grasos, <i>fatty acid ethyl esters</i>
FAMEs	Ésteres metílicos de ácidos grasos, <i>fatty acid methyl esters</i>
FAS1	Gen que codifica para la ácido graso sintetasa 1
Fas1	Ácido graso sintetasa 1
FAS2	Gen que codifica para la ácido graso sintetasa 2
Fas2	Ácido graso sintetasa 2
FFA	Ácidos grasos libres, <i>free fatty acids</i>
FIT	Proteínas transmembranales inductoras del almacenamiento de grasa, <i>fat storage-inducing transmembrane</i>
G3P	Gliceraldehído-3-fosfato
gDNA	DNA genómico
GLA	Ácido γ -linolénico
GPAT	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa
Idh	Isocitrato deshidrogenasa
IMP	Inosin monofosfato
KR	Cetoacil reductasa
KS	Cetoacil sintasa
LA	Ácido linoleico
LDs	Gotas lipídicas, <i>lipid droplets</i>
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPAAT	Ácido lisofosfatídico aciltransferasa
Mae	Enzima málica
MAG	Monoacilglicerol
MPT	Malonil palmitoil transferasa
NuSA	Ensayo de escaneo de nucleosomas, <i>nucleosome scanning assay</i>
ORF	Marco abierto de lectura, <i>Open reading frame</i>
OY	Levaduras oleaginosas, <i>Oleaginous yeast</i>
PA	Ácido fosfatídico
Pah1	Ácido fosfatídico fosfatasa
PPT	Fosfopanteteína transferasa
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados, <i>polyunsaturated fatty acids</i>
RE	Retículo endoplasmático
RmACCI	Gen que codifica para la acetil-CoA carboxilasa en <i>R. mucilaginosa</i>
RmACL	Gen que codifica para la ATP-Citrato liasa en <i>R. mucilaginosa</i>
RmACT1	Gen que codifica para la actina 1 en <i>R. mucilaginosa</i>

<i>RmDGA</i>	Gen que codifica para la diacilglicerol aciltransferasa 1 en <i>R. mucilaginosa</i>
<i>RmFAS1</i>	Gen que codifica para la ácido graso sintetasa 1 en <i>R. mucilaginosa</i>
<i>RmFAS2</i>	Gen que codifica para la ácido graso sintetasa 2 en <i>R. mucilaginosa</i>
SE	Esteres de estero, <i>sterol esters</i>
TAGs	Triacilgliceroles
TLC	Cromatografía de capa fina, <i>thin layer chromatography</i>
YNB	<i>Yeast nitrogen base</i>

Resumen

Rhodotorula mucilaginosa M94C9 es una levadura aislada en la Antártida, con un potencial biotecnológico poco explorado. Este trabajo estudia la acumulación de lípidos neutros con un enfoque fisiológico y de expresión genética en condiciones de crecimiento con diferentes relaciones de carbono/nitrógeno (C/N). Adicionalmente, este estudio brinda un acercamiento al potencial biotecnológico de esta levadura, evaluando la síntesis de lípidos como materia prima para la producción de biodiésel. Los resultados muestran que el crecimiento y la acumulación de biomasa dependen de la disponibilidad de nitrógeno en el medio, sin afectar la viabilidad celular. Asimismo, esta levadura es capaz de acumular 1.81 g/L de lípidos, lo cual representa el 46.5 % de su peso seco en condiciones de limitación de nitrógeno. En esta condición, *R. mucilaginosa* acumula ácido oleico, ácido esteárico, ácido palmítico y ácido linolénico. La conversión de triacilgliceroles a ácidos grasos etil esterificados (biodiésel) es de aproximadamente 93%. Como se esperaba, algunos de los genes involucrados en la vía de síntesis de lípidos (*RmACL*, *RmACCI*, *RmFAS1*, *RmFAS2* y *RmDGAI*) y de la síntesis de carotenoides (*CAR0* y *CAR2*) se sobreexpresan en la condición de limitación e inanición de nitrógeno. Asimismo, se observó que la actividad de la ATP-citrato liasa (Acl) disminuye con la limitación de nitrógeno y mientras las células entran en la fase lipogénica. Los ensayos de expresión y actividad de la Acl sugieren una disminución en su expresión y actividad, a medida que las células ingresan en la fase lipogénica. A partir de esto, se plantea la hipótesis de una regulación transcripcional mediada por la remodelación de la cromatina. En conclusión, las condiciones evaluadas inducen la lipogénesis en *R. mucilaginosa* M94C9, lo que tiene relevancia tanto en el ámbito de la ciencia básica como en términos de la producción de lípidos de interés para diversas industrias.

Abstract

Rhodotorula mucilaginosa M94C9 is an Antarctic yeast with relatively unexplored biotechnological potential. This study investigates the accumulation of neutral lipids with a physiological and gene expression-focused approach under different carbon/nitrogen ratio (C/N) growth conditions. Additionally, this research sheds light on the biotechnological potential of this yeast by evaluating lipid synthesis as a raw material for biodiesel production. Results demonstrate that growth and biomass accumulation can be influenced by nitrogen availability in the medium, without affecting cellular viability. Furthermore, this yeast is capable of accumulating 1.81 g/L of lipids, representing 46.5% of its dry weight under nitrogen limitation conditions. In this scenario, *R. mucilaginosa* M94C9 accumulates oleic acid, stearic acid, palmitic acid, and linolenic acid. The conversion of triacylglycerols to methyl-esterified fatty acids (biodiesel) is approximately 93%. As expected, some of the genes involved in the lipid synthesis pathway (*RmACL*, *RmACCI*, *RmFAS1*, *RmFAS2*, and *RmDGAI*) and carotenoid synthesis (*CAR0* and *CAR2*) are overexpressed under nitrogen limitation and starvation conditions. Furthermore, it was observed that the activity of ATP-citrate lyase decreases as cells experience nitrogen limitation and progress toward the lipogenic phase. Expression and activity assays of Acl suggest a reduction in both its expression and activity as cells enter the lipogenic phase. Based on this, the hypothesis of transcriptional regulation mediated by chromatin remodeling is proposed. In conclusion, the evaluated conditions induce lipogenesis in *R. mucilaginosa* M94C9, which is relevant in both the realm of basic science and in terms of lipid production of interest to various industries.

1. Introducción

El petróleo juega un papel fundamental como fuente primaria de productos industriales que satisfacen diversas necesidades humanas, tales como combustibles, polímeros y una amplia gama de productos químicos (Beopoulos y Nicaud, 2012; Szczepańska, *et al.*, 2022). Sin embargo, debido a la creciente preocupación por las consecuencias ambientales asociadas a su uso, es crucial buscar alternativas sostenibles que aseguren un suministro adecuado de recursos energéticos e insumos sin alterar el equilibrio ambiental (Ramanjaneyulu y Reddy, 2019; Szczepańska, *et al.*, 2022).

En respuesta a esta necesidad se han desarrollado productos derivados de aceites vegetales como alternativas viables de materia prima para la producción de combustibles y oleoquímicos. No obstante, el uso de vegetales como alimento, el cambio de uso de suelo y la deforestación presentan desafíos significativos debido a las implicaciones técnicas y éticas asociadas a estas prácticas (Bandhu, *et al.*, 2020). En este contexto, los microorganismos oleaginosos, entre ellos las levaduras, emergen como fuentes alternativas de energía y materias primas con amplio potencial para diversos productos. Esto se atribuye a su capacidad para sintetizar lípidos, empleados tanto en la producción de biocombustibles como en otros productos oleoquímicos de amplio uso en múltiples sectores industriales (Ageitos, *et al.*, 2011; Beopoulos y Nicaud, 2012; Papanikolaou, 2012). Estas características posicionan a estos microorganismos como una opción viable para solventar demandas en materia energética y de insumos con un enfoque sostenible y amigable con el entorno ambiental (Probst, *et al.*, 2016; Vasconcelos, *et al.*, 2019; Patel, *et al.*, 2020). Sin embargo, para mejorar el atractivo industrial y la viabilidad económica de microorganismos como las levaduras oleaginosas, se requiere investigar sobre aquellas capaces de crecer hasta altas densidades celulares y acumular grandes cantidades de lípidos en condiciones de cultivo con bajo costo (Abeln y Chuck, 2021).

1.1. Las levaduras oleaginosas

Las levaduras oleaginosas, también conocidas como OYs (*oleaginous yeast*), son un grupo de microorganismos capaces de almacenar al menos el 20% de su peso celular seco en forma de lípidos neutros (Salvador López, *et al.*, 2022). Los lípidos neutros son moléculas hidrofóbicas que carecen de grupos cargados, lo que las hace inadecuadas para formar parte de los componentes de las diferentes membranas biológicas (Athenstaedt, 2010; Czabany, *et al.*, 2007). Entre los lípidos neutros sintetizados por las OYs, los triacilglicerol (TAGs) son los predominantes, representando entre el 70-80% del total, mientras que los monoacilglicerol (MAG), diacilglicerol (DAG), ácidos grasos libres (FFA) y ésteres de esterol (SE, *sterol esters*) están presentes en menor cantidad (Athenaki, *et al.*, 2018).

Dentro de las levaduras, se han identificado más de 160 especies que muestran la capacidad de acumulación de lípidos (Poontawee, *et al.*, 2023). Entre las más estudiadas y

prometedoras se encuentran cepas pertenecientes a los géneros *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* y *Lipomyces* (Vasconcelos, *et al.*, 2019). Las especies más estudiadas son *Cutaneotrichosporon oleaginous*, *Y. lipolytica*, *R. toruloides* y *Lipomyces starkeyi* (Abeln y Chuck, 2021; Spagnuolo, *et al.*, 2019). Estos microorganismos ofrecen numerosas ventajas frente a otras alternativas utilizadas en aplicaciones similares (p. ej. microalgas, bacterias, etc.); destacan por (i) su capacidad de crecimiento rápido; (ii) su adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales; (iii) su nulo requerimiento de fuentes de luz; (iv) su capacidad para utilizar fuentes de carbono diversas y renovables; (v) su capacidad de producir biomasa en espacios limitados; y (vi) pueden ser manipuladas genéticamente con facilidad debido a la amplia disponibilidad de herramientas genéticas (Lamers *et al.*, 2016; Khot *et al.*, 2020; Shaigani *et al.*, 2021; Wen y Al-Makishah, 2022; López *et al.*, 2022; Poontawee *et al.*, 2023). Debido a estas características, estas levaduras son consideradas como fuentes microbianas viables para la producción de materia prima para oleoquímicos y biocombustibles (Shaigani *et al.*, 2021).

1.2. Biosíntesis de lípidos *de novo*: acumulación de lípidos neutros bajo limitación de nitrógeno en levaduras

La capacidad de las OYs para acumular grandes cantidades de lípidos ha sido profusamente estudiada debido a su relevancia en aplicaciones biotecnológicas (Arhar *et al.*, 2021). Se ha observado que la acumulación de lípidos puede ser estimulada bajo diferentes condiciones de estrés, incluyendo la limitación de fosfato, azufre, así como la ausencia de ciertos iones metálicos necesarios para una función enzimática adecuada (Silverman *et al.*, 2016).

En la mayoría de los estudios que buscan aumentar la síntesis de TAGs en las levaduras oleaginosas, se utilizan condiciones de limitación de nitrógeno junto con una fuente de carbono abundante, lo que resulta en una alta relación carbono/nitrógeno (C/N) (Papanikolaou y Aggelis, 2011). Esta relación C/N alta provoca cambios significativos en el metabolismo de las OYs, favoreciendo la acumulación de lípidos neutros como respuesta al estrés nutricional inducido (Calvey *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019). Durante la fase estacionaria de crecimiento en las levaduras oleaginosas, se intensifica la producción y acumulación de TAGs, así como la síntesis concomitante de esteroides y SE (Gientka *et al.*, 2017; Hardman *et al.*, 2017). Como resultado de estos cambios metabólicos, los lípidos neutros se acumulan y se depositan en compartimentos intracelulares conocidos como gotas lipídicas (LDs, *lipid droplets*) (Fakas, 2016).

En condiciones de crecimiento con relaciones altas de carbono/nitrógeno (C/N), las OYs asimilan el exceso de fuente de carbono y lo transforman en lípidos de almacenamiento (Ratledge y Wynn, 2002) (**Figura 1**). La limitación de nitrógeno en el medio durante estas condiciones provoca la disminución de la concentración intramitocondrial de AMP (adenosín monofosfato), que se convierte en inosina monofosfato (IMP) y iones de amonio (NH_4^+) a través de la actividad de una AMP-desaminasa (AMPD) (Dourou *et al.*, 2018). El amonio resultante de esta escisión proporciona una fuente de nitrógeno complementaria necesaria para la síntesis de

componentes celulares después de la limitación de nitrógeno extracelular (Ratledge y Wynn, 2002).

La disminución de la concentración de AMP mitocondrial, debido a la actividad de las AMPD, no solo afecta la relación ATP/AMP (adenosín trifosfato/adenosín monofosfato) y el balance de energía celular, sino que también influye en la actividad de una enzima clave del ciclo de Krebs, la isocitrato deshidrogenasa (Idh), encargada de convertir al isocitrato en α -cetoglutarato (Ratledge y Wynn, 2002; Wynn *et al.*, 2001). La Idh es alostéricamente activada por el AMP (Papanikolaou, 2012), y al existir niveles bajos de AMP en la mitocondria, no se activa, lo que provoca una alteración en el ciclo de Krebs, que a su vez conduce a que el isocitrato no sea convertido en α -cetoglutarato (Chattopadhyay y Maiti, 2021a; Kamineni y Shaw, 2020). Por lo tanto, la falta de actividad de la Idh es el inicio de la lipogénesis (Dourou *et al.*, 2018).

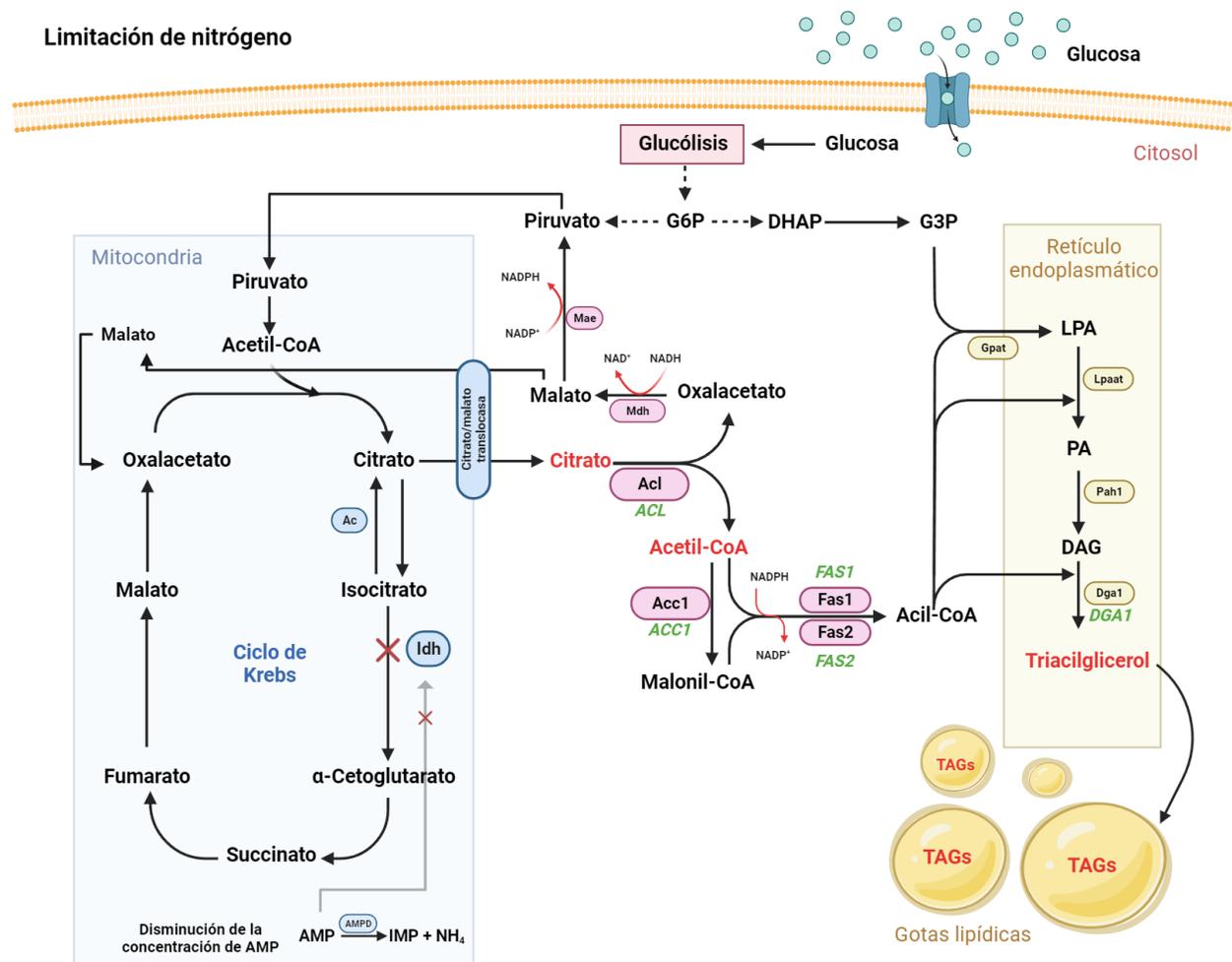


Figura 1. Esquema representativo del metabolismo y la producción de triacilgliceroles en levaduras oleaginosas en condiciones de limitación de nitrógeno. El esquema presenta una condición de crecimiento, cuya composición consta de una abundante fuente de carbono (ej. glucosa) y la ausencia de una fuente de nitrógeno extracelular; es decir, una relación C/N alta. En letras de color negro se señalan

los metabolitos que participan en la biosíntesis de triacilglicerol (TAGs). Las letras de color rojo señalan metabolitos clave dentro de la vía. Las abreviaturas que corresponden a las distintas moléculas son: adenosín monofosfato (AMP), glucosa-6-fosfato (G6P), glicerol-3-fosfato (G3P), dihidroxiacetona fosfato (DHAP), ácido lisofosfatídico (LPA), ácido fosfatídico (PA), diacilglicerol (DAG). Las abreviaturas que corresponden a las enzimas son: la ácido graso sintetasa 1 y 2 (Fas1/Fas2), ácido lisofosfatídico aciltransferasa (LPAAT), ácido fosfatídico fosfatasa (Pah1), aconitasa (Ac), adenosín monofosfato-deaminasa (AMPD), isocitrato deshidrogenasa (Idh), inosina monofosfato (IMP), iones amonio (NH^+), ATP-citrato liasa (Acl), acetyl-CoA carboxilasa (Acc1), diacilglicerol aciltransferasa (Dga1), enzima málica (Mae), glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) y malato deshidrogenasa (Mdh). Todas se encuentran señaladas dentro de óvalos cuyo color se estableció en función del organelo en donde actúan: mitocondria (azul), citosol (morado) y retículo endoplasmático (amarillo). Los genes codificantes para algunas proteínas de la vía se esquematizan con letras verdes. Las flechas negras indican el flujo del metabolismo. Las flechas punteadas indican pasos no esquematizados. La flecha gris indica la ausencia de interacción entre el AMP y la Idh. Adaptado de Patel y colaboradores (2016). Ilustración realizada en Biorender.

Cuando la Idh no se activa, el isocitrato se acumula dentro de la mitocondria y es convertido posteriormente en citrato mediante la acción de la aconitasa (Ac); cuando alcanza una concentración umbral, se exporta al citosol a través de un antiportador que intercambia moléculas de citrato por moléculas de malato (Abeln y Chuck, 2021; Evans *et al.*, 1983; Zhu *et al.*, 2012).

En el citosol entra en juego una de las enzimas clave en la vía de síntesis de lípidos, la ATP-citrato liasa (Acl). Si bien su presencia no confiere oleaginosidad, se ha encontrado que la mayoría de microorganismos oleaginosos la poseen (Fakankun *et al.*, 2021). Esta enzima cataliza la conversión de citrato en acetyl-CoA y oxalacetato (Boulton y Ratledge, 1981; Chen *et al.*, 2014; Hynes y Murray, 2010). El oxalacetato producido en esta reacción es posteriormente convertido a malato por la malato deshidrogenasa (Mdh), que cataliza la conversión reversible de oxalacetato y malato utilizando el sistema de coenzimas NAD/NADH (Minárik *et al.*, 2002). El malato resultante puede seguir dos vías; la primera de ellas es una descarboxilación oxidativa que lo convierte en piruvato y CO_2 con la reducción concomitante de NADP^+ mediante la enzima málica (Mae) (Zhang *et al.*, 2013) (**Figura 2**). Este proceso es clave para la biosíntesis de ácidos grasos al proveer la energía reductora en forma de NADPH, necesaria para reducir los grupos acetyl en la creciente cadena de ácidos grasos (Ratledge, 2014). Otras fuentes de poder reductor durante este fenómeno son las reacciones de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa de la vía de las pentosas fosfato (Romero-Aguilar, *et al.*, 2017; Wasylenko *et al.*, 2015). La otra ruta que puede seguir el malato es su transporte a la mitocondria y su posterior conversión a oxalacetato, que a su vez puede convertirse nuevamente en citrato. Esto genera un sistema de retroalimentación que permite la síntesis de nuevas moléculas de citrato, que son expulsadas al citosol para ser escindidas por la Acl (Zhao *et al.*, 2016).

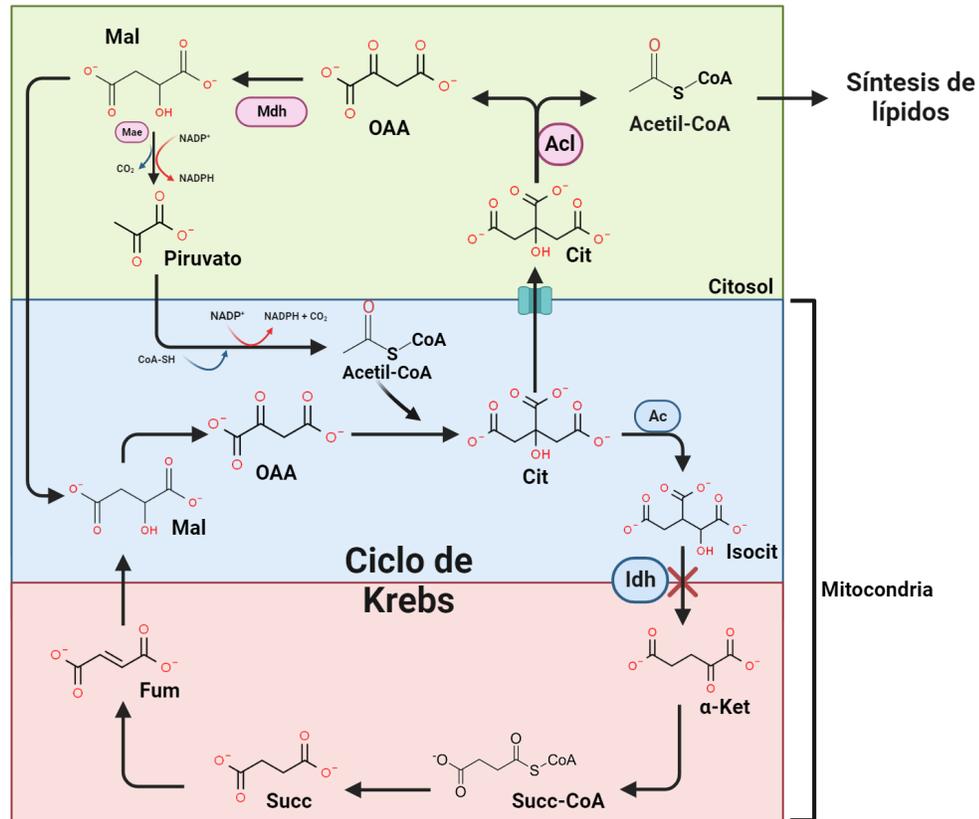


Figura 2. Esquema ilustrativo de la síntesis de malato a partir del oxalacetato producido por la Acl. El esquema muestra las reacciones químicas que permiten la formación de moléculas de malato que es utilizado para sintetizar moléculas de citrato dentro de la mitocondria. Las abreviaturas que corresponden a metabolitos son: malato (Mal), oxalacetato (OAA), citrato (Cit), isocitrato (Isocit), α -cetoglutarato (α -Ket), succinil-CoA (Succ-CoA), succinato (Succ) y fumarato (Fum). Las abreviaturas de las enzimas corresponden a: enzima málica (Mae), malato deshidrogenasa (Mdh), ATP-citrato liasa (Acl), aconitasa (Ac) e isocitrato deshidrogenasa (Idh). Los óvalos azules representan enzimas de la mitocondria y los óvalos rosados enzimas del citosol. En rojo y azul se representa a la mitocondria. El rectángulo de color rojo indica reacciones del ciclo de Krebs que no se llevan a cabo por la ausencia de actividad de Idh, mientras que el rectángulo de color azul indica las reacciones que permanecen activas. El rectángulo de color verde indica la formación de malato a partir de oxalacetato en el citosol y su posterior exportación a la mitocondria. Ilustración realizada en Biorender.

La acetil-CoA representa un nodo clave en el metabolismo debido a su intersección con muchas vías metabólicas y procesos biológicos regulatorios fundamentales para mantener la viabilidad de las células (p. ej. ciclo de Krebs, acetilación de histonas, etc.) (Shi y Tu, 2015). Por lo tanto, su producción resulta crucial en la homeostasis celular. La acetil-CoA sintetizada por Acl se convierte en malonil-CoA por la acetil-CoA carboxilasa (Acc1) (Sato *et al.*, 2021). Después, el complejo multiproteico de ácidos grasos sintasas 1 y 2 (Fas1, Fas2) sintetiza acil-CoA de cadena larga a partir de acetil-CoA y malonil-CoA utilizando NADPH como agente reductor (Cui *et al.*, 2016). A continuación, el acil-CoA se une a moléculas de glicerol 3-fosfato en las membranas del retículo endoplásmico (RE) para formar ácido lisofosfatídico (LPA) (Mota

et al., 2022). El LPA recibe la adición de otra molécula de acil-CoA para producir ácido fosfatídico (PA). El PA se convierte en DAG mediante la acción de Pah1 y, finalmente, el DAG recibe una última acilación mediada por Dga1 (diacilglicerol aciltransferasa 1) para formar los TAGs (Kamineni y Shaw, 2020). La síntesis de TAGs se lleva a cabo entre las membranas del RE, que al alcanzar una concentración umbral, son transportados a las LDs, organelos con una monocapa lipídica (Caporusso *et al.*, 2021; Fabiszewska *et al.*, 2022).

1.2.1. Enzimas y genes involucrados en la síntesis de lípidos neutros en levaduras oleaginosas

Como se pudo observar en la sección anterior, diferentes enzimas participan en conjunto para llevar a cabo la síntesis de lípidos en condiciones con relaciones altas de C/N. En esta sección se describen más a fondo algunos aspectos generales de las enzimas Acl, Acc1, Fas1/Fas2 y Dga1, que son las estudiadas en este trabajo.

- **ATP-citrato liasa:** la ATP-citrato liasa, también referida como Acl es una enzima citosólica y nuclear dependiente de ATP y de coenzima A (CoA) que cataliza la conversión del citrato en acetil-CoA y oxalacetato (Chen *et al.*, 2014); se encuentra ampliamente distribuida en diferentes reinos de la vida como animales, plantas y en la mayoría de los hongos filamentosos, pero está ausente en levaduras que no acumulan cantidades significativas de lípidos como *Saccharomyces cerevisiae* (Hynes y Murray, 2010). En levaduras como *Y. lipolytica*, esta enzima se encuentra codificada por dos genes (*ACL1* y *ACL2*), mientras que en otras levaduras como *R. toruloides* se encuentra codificada por un solo gen (*ACL*) (Zhu *et al.*, 2012)

En la industria que emplea TAGs como materia prima para la producción de oleoquímicos, la Acl de las levaduras ha ganado importancia debido a su participación en la vía de síntesis de lípidos *de novo*, (Fakas, 2016). Esto se debe a que la Acl se ha relacionado directamente con el fenómeno de la oleaginosidad, pues suministra gran parte de la acetil-CoA utilizada para la progresión de la lipogénesis (Boulton y Ratledge, 1981; Diwan y Gupta, 2022). De hecho, algunos trabajos dirigidos a evaluar la producción de lípidos de distintas levaduras, se han enfocado en evaluar la actividad de la Acl, principalmente cuando el medio de cultivo posee baja disponibilidad de nitrógeno, pues se sabe que en estas condiciones las levaduras producen altas cantidades de lípidos (Blazcek *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014).

Anteriormente se ha señalado que en organismos oleaginosos como *Y. lipolytica* se observa un incremento en la actividad de la Acl durante la fase de acumulación de lípidos (Ochoa-Estopier y Guillouet, 2014). Esto también se ha reportado en *R. toruloides*, en cuyo caso se encontró que el gen *ACL1* tiene una expresión alta cuando la levadura crece en limitación de nitrógeno (5 y 0.2 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄) (Zhu *et al.*, 2012). Asimismo, otros estudios han mostrado que la eliminación de *ACL1/2* en *Y. lipolytica* regularmente conlleva a una disminución de la síntesis de ácidos grasos y, por consiguiente, de triacilgliceroles (Dulermo *et al.*, 2015; Sato *et al.*, 2021; Tang *et al.*,

2013; Yuzbasheva *et al.*, 2020). Por otro lado, sobreexpresar *ACL1/2* en hongos filamentosos como *Aspergillus oryzae* ocasiona un incremento en la producción de ácidos grasos de hasta 9.2 veces (Tamano *et al.*, 2015). Un experimento de sobreexpresión heteróloga de *ACL* de *Mus musculus* en *Y. lipolytica* aumentó considerablemente la acumulación de lípidos (efecto adjudicado principalmente a la afinidad de las enzimas) (Zhang *et al.*, 2014), pero la sobreexpresión de *ACL1/2* endógena de *Y. lipolytica* no afecta significativamente la acumulación de lípidos (Blazeck *et al.*, 2014; Tamano *et al.*, 2015). Por lo tanto, el efecto de la intromisión de la Acl en el metabolismo de los lípidos depende de la especie (Jeziarska *et al.*, 2020). Es importante señalar que, aunque la ausencia de la Acl en general significa que una levadura no es oleaginoso, su presencia no se correlaciona necesariamente con la oleaginosidad (Fakankun *et al.*, 2021).

La Acl está estrechamente relacionada con la regulación epigenética, ya que esta enzima es una de las principales proveedoras de la acetil-CoA utilizada para la acetilación de las histonas en el núcleo (otra enzima implicada en este proceso es la acetil-CoA sintetasa (Acs), que produce acetil-CoA a partir de acetato) (Chypre *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2016). Este fenómeno ha sido particularmente estudiado en células de mamíferos, donde la Acl es comúnmente asociada a enfermedades relacionadas con la obesidad y cáncer (Icard *et al.*, 2020). En células HeLa, por ejemplo, se ha observado que la Acl participa activamente produciendo acetil-CoA para acetilar histonas en respuesta al daño en doble cadena en el DNA. Las histonas acetiladas permiten el reclutamiento de proteínas reparadoras de DNA como BRCA1. La carencia de la Acl, y por lo tanto la baja disponibilidad de acetil-CoA, lleva a la muerte celular (Sivanand *et al.*, 2017). Por otro lado, en el hongo filamentoso *Gibberella zeae*, la eliminación de *ACL1/2* resultó en la reducción de los niveles de acetilación de las histonas, lo que evidencia su papel importante en la remodelación de la cromatina (Chen *et al.*, 2014; Son *et al.*, 2011).

Aunque en animales, plantas y algunos hongos se ha reportado la participación de la Acl como proveedora de la acetil-CoA empleada para la acetilación de las histonas (Xu *et al.*, 2023), es escasa la información disponible sobre el papel de esta enzima en la regulación epigenética en levaduras oleaginosas. De hecho, en levaduras se ha reportado un papel predominante de la Acs para proveer la acetil-CoA usada para acetilar histonas (Galdieri *et al.*, 2014). La mayoría de los trabajos donde se informa este hecho están basados en *S. cerevisiae*, levadura que carece de Acl (Bradshaw, 2021).

- **Acetil-CoA carboxilasa 1:** la acetil-CoA carboxilasa (Acc1) es una enzima que convierte la acetil-CoA en malonil-CoA, un precursor esencial para la síntesis de metabolitos de gran interés biotecnológico, como flavonoides, estilbenoides, policétidos y ácidos grasos (Pereira *et al.*, 2022). En *S. cerevisiae*, esta enzima está codificada por dos genes: *ACC1*, que expresa la forma citoplasmática de Acc1, y *ACC2*, la forma mitocondrial de la enzima Acc2 (Hasslacher *et al.*, 1993; Hoja *et al.*, 2004; Wei y Tong, 2015).

Acc1 cataliza el primer paso de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga en dos reacciones secuenciales. En la primera reacción, la biotina, unida a una proteína

transportadora, se carboxila con la ayuda de ATP y bicarbonato como fuente de CO₂. En la segunda reacción, el grupo carboxilo se transfiere de la biotina hacia la acetil-CoA, generando malonil-CoA (Frantom y Blanchard, 2010). En levaduras como *Y. lipolytica*, la sobreexpresión del gen *ACCI* fomenta significativamente la acumulación de lípidos (Chaturvedi *et al.*, 2021, 2022; Ghogare *et al.*, 2020; Gross *et al.*, 2019; Zeng *et al.*, 2018). Por otro lado, en *S. cerevisiae*, la represión de dicho gen resulta en una disminución en el crecimiento y la proliferación celular en el momento que agota las reservas de lípidos intracelulares (Gross *et al.*, 2019).

- **Sintasas de ácidos grasos 1 y 2:** la sintasa de ácidos grasos (Fas) es una enzima esencial en la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga a partir de acetil-CoA y malonil-CoA (Zhao, 2009). Se reconocen dos tipos principales de Fas: Fas II, presente en procariontes, plantas y mitocondrias; y Fas I, que se encuentra en animales, hongos y levaduras (Sijtsma *et al.*, 1998). En las levaduras, Fas I se localiza en el citosol y está compuesta por dos subunidades, Fas1 (Fas β) y Fas2 (Fas α), dispuestas en un complejo macromolecular $\alpha\beta_6$, codificadas por *FAS1* y *FAS2* (Fischer *et al.*, 2020; Xue *et al.*, 2018). Cada monómero de Fas I contiene ocho dominios catalíticos distintos a partir del N-terminal de cada subunidad. Fas α incluye los dominios de proteína transportadora de acilo (ACP), cetoacil reductasa (KR) dependiente de NADPH, cetoacil sintasa (KS) y fosfopanteteína transferasa (PPT); mientras que FAS β presenta los dominios acil transferasa (AT), enoil reductasa (EnR) dependiente de NADPH, deshidratasa (DH) y malonil palmitoil transferasa (MPT) (Rigouin *et al.*, 2018; Shpilka *et al.*, 2015; W. Zhao, 2009).

La síntesis de los ácidos grasos comienza con la producción de acetil-ACP a partir de acetil-CoA y ACP, mediada por AT (Zhou *et al.*, 2014). Además, se forma malonil-ACP tras la transferencia de un residuo de malonilo de la malonil-CoA a ACP mediante MPT (Jenni *et al.*, 2006). Posteriormente, la acetil-ACP y malonil-ACP se condensan mediante KS para producir β -cetoacil-ACP, que es modificado por una cascada de tres reacciones (reducción - deshidratación - reducción), llevada a cabo por KR, DH y EnR (Heil *et al.*, 2019; Leibundgut *et al.*, 2008). Estas reacciones eliminan al átomo de oxígeno restante y el doble enlace carbono-carbono, formando un acil-ACP saturado (Heil *et al.*, 2019; Xue *et al.*, 2018). Luego, el acil-ACP se convierte en el sustrato para la adición de malonil-ACP descarboxilado por MPT para elongar la cadena (Zhu *et al.*, 2017). La cadena de acilo extendida se puede alargar aún más ejecutando cíclicamente el mismo conjunto de reacciones hasta obtener la longitud requerida, que en levaduras consiste principalmente en ácidos grasos C16 (palmitoil-CoA) y C18 (estearoil-CoA) (Heil *et al.*, 2019; Sijtsma *et al.*, 1998; Silverman *et al.*, 2016). Los productos del complejo Fas, palmitato y estearato, se activan con la CoA para dar palmitoil-CoA y estearil-CoA, los cuales son transportados al RE, donde se utilizan para la producción de TAGs. Alternativamente, estos productos pueden ser sometidos a

modificaciones como saturación-desaturación o carboxilación-descarboxilación antes de dirigirse a la síntesis de TAGs (Adrio, 2017).

El complejo Fas I desempeña un papel crucial no sólo en la síntesis de lípidos neutros, sino también como la principal fuente de ácidos grasos de cadena larga necesarios para la formación de las membranas biológicas. Por lo tanto, su ausencia o inhibición resulta en la formación de cepas auxotróficas de ácidos grasos, cuyo fenotipo no solo se caracteriza por una escasez de lípidos neutros, sino que también se considera letal (Chayakulkeeree *et al.*, 2007; DeJarnette *et al.*, 2021; Pan *et al.*, 2018; Tehlivets *et al.*, 2007). La sobreexpresión de los genes *FAS1/FAS2* produce levaduras capaces de acumular mayores cantidades de lípidos neutros (Guo *et al.*, 2019; Yamada *et al.*, 2017).

- **Diacilglicerol aciltransferasa 1:** uno de los últimos pasos en la ruta de síntesis de lípidos *de novo* es la síntesis de los TAG (Papanikolaou y Aggelis, 2011). En las levaduras, los TAG pueden ser sintetizados por dos enzimas diferentes localizadas en la membrana del RE: Lro1 y Dga1 (Dga1 también se encuentra en la membrana de las LDs) (Choudhary y Schneiter, 2020; Müllner y Daum, 2004). Estas enzimas llevan a cabo la síntesis de TAG de manera distinta: Lro1 es una triacilglicerol sintasa independiente de acil-CoA que utiliza fosfolípidos como donantes del grupo acilo, mientras que Dga1 requiere acil-CoA como sustrato para la acilación del DAG (Athenstaedt, 2010). Otra diferencia sustancial de estas enzimas es su participación durante diferentes fases del crecimiento, siendo la actividad de Lro1 la más prominente en la fase de crecimiento exponencial, mientras que Dga1 contribuye significativamente a la síntesis de TAG durante la fase estacionaria (Wang, 2015).

Es evidente que ambas enzimas participan en la síntesis de TAG. Sin embargo, en respuesta al estrés causado por la deprivación de nutrientes, como el nitrógeno, parece que Dga1 desempeña un papel más destacado, mientras que Lro1 se limita principalmente a la remodelación de los fosfolípidos de la membrana (Kamisaka *et al.*, 2013; Oelkers *et al.*, 2002; Sandager *et al.*, 2002).

Además, en las levaduras, la eliminación del gen *DGAI*, que codifica para la enzima Dga1, provoca la formación de gotas lipídicas anormales (Wang, 2015). Si se eliminan simultáneamente los genes *DGAI*, *LRO1*, *ARE1* y *ARE2* (involucrados en la síntesis de LDs al proveer los TAG y SE), la capacidad de sintetizar TAG y, por ende, las LDs se pierden por completo (Choudhary y Schneiter, 2020; Kamisaka *et al.*, 2013; Wang, 2015). Por lo tanto, la formación de gotas lipídicas está estrechamente relacionada con la actividad de estas enzimas responsables de la síntesis de TAG (Choudhary y Schneiter, 2020; Sorger y Daum, 2003; Wang, 2015).

1.2.2. Gotas lipídicas: biogénesis y relevancia

Las gotas lipídicas (LDs, *lipid droplets*) son organelos de una monocapa de fosfolípidos que se originan a partir de la membrana del RE (Klug *et al.*, 2021). Algunos reportes señalan que

además se pueden producir dentro del núcleo a partir de la membrana nuclear interna (Fujimoto, 2022). Estas estructuras celulares se componen principalmente de un núcleo hidrofóbico central que contiene lípidos neutros, como TAG, SE y otros tipos de lípidos, rodeados por una monocapa de lípidos recubierta de diferentes proteínas funcionales y estructurales (Jarc y Petan, 2019; Nettekrock y Bohnert, 2020; Olzmann y Carvalho, 2019).

Las LDs tienen una función primordial como reservorio de lípidos (Cottier y Schneiter, 2021). Sin embargo, su función no se limita al almacenamiento, sino que también están involucradas en diversos procesos dinámicos (Jarc y Petan, 2019). Estos incluyen el transporte de lípidos a otros organelos (poseen una relación estrecha con la mitocondria, vacuolas y lisosomas), la biogénesis de membranas, protección contra la lipotoxicidad, el almacenamiento y degradación de proteínas y la autofagia (Choudhary y Schneiter, 2020; Jarc y Petan, 2019; Zhu *et al.*, 2015). En consecuencia, las gotas lipídicas se consideran organelos altamente dinámicos y metabólicamente activos, especializados en la regulación de la homeostasis de los lípidos celulares (Wang, 2015).

La biogénesis de las LDs se induce en respuesta a diversos estímulos que involucran desequilibrios energéticos y redox, como la presencia de grandes cantidades de lípidos, estrés oxidante y limitación o privación de nutrientes (Jarc y Petan, 2019). Como se mencionó anteriormente, en las levaduras oleaginosas, la lipogénesis mediada por la limitación de nitrógeno conduce a la acumulación de lípidos neutros en las LDs.

El proceso de formación de las gotas lipídicas (LDs) en levaduras comienza con el fenómeno de nucleación, en el cual se producen modificaciones estructurales en el RE debido a la síntesis creciente de TAG y SE por las enzimas Dgal y Are1 (esterol aciltransferasa 1) (Cottier y Schneiter, 2021; Nettekrock y Bohnert, 2020; Thiam y Forêt, 2016) (**Figura 3**). A medida que aumenta la concentración de lípidos neutros, se forman cúmulos de TAG/SE dentro de la membrana del RE (Olzmann y Carvalho, 2019; Schepers y Behl, 2021). Posteriormente, la acumulación y expansión de estos cúmulos oleosos conducen a la gemación de las gotas lipídicas (Walther *et al.*, 2017). El fenómeno en el que se forman las LDs nacientes parece depender de la tensión de la membrana, su asimetría y otros fenómenos regulados aún no descritos, que imponen la dirección hacia el citosol (Chorlay *et al.*, 2019; Olzmann y Carvalho, 2019; Thiam y Forêt, 2016). Las LDs nacientes permanecen unidas al RE a través de un puente que conecta la bicapa de fosfolípidos del RE con la monocapa que cubre al núcleo de lípidos neutros de la LD (Graef, 2018). En levaduras, la gemación de las gotitas de lípidos es facilitada por proteínas como la seipina Sei1, un complejo proteico transmembranal del RE que interactúa con la proteína Ldb16 (proteína de baja unión a colorantes 16, *low dye binding protein 16*) del RE (Chapman *et al.*, 2019; Klug *et al.*, 2021). Sei1 interactúa con los TAG de los cúmulos oleosos en las valvas de la membrana y promueve su aglutinación dentro de las LDs de manera similar a las seipinas en mamíferos (Graef, 2018). Además, las proteínas Scs3 e Yft2, conocidas como proteínas transmembranales inductoras del almacenamiento de grasa (FIT, *fat storage-inducing transmembrane*), también contribuyen a la acumulación de TAG dentro de las LDs nacientes en las levaduras al interactuar con estos lípidos (Graef, 2018; Renne *et al.*, 2020) Sin embargo, el

mecanismo exacto de cómo FIT participa en la formación de las LDs aún no está completamente comprendido (Wang *et al.*, 2022). Finalmente, la proteína Pet10 (perilipina 10) facilita la formación de LDs del RE, posiblemente promoviendo la gemación al alterar el equilibrio de tensión entre las membranas (Gao *et al.*, 2017). Pet10 interactúa funcionalmente con la seipina y las proteínas FIT, uniendo las LDs nacientes en una etapa temprana, lo que afecta su tasa de formación y morfología (Graef, 2018). Finalmente, las LDs se disocian del RE en un proceso pobremente definido, luego pueden seguir diferentes destinos que incluyen la fusión LDs-LDs o la descomposición vía autofágica (Chapman *et al.*, 2019).

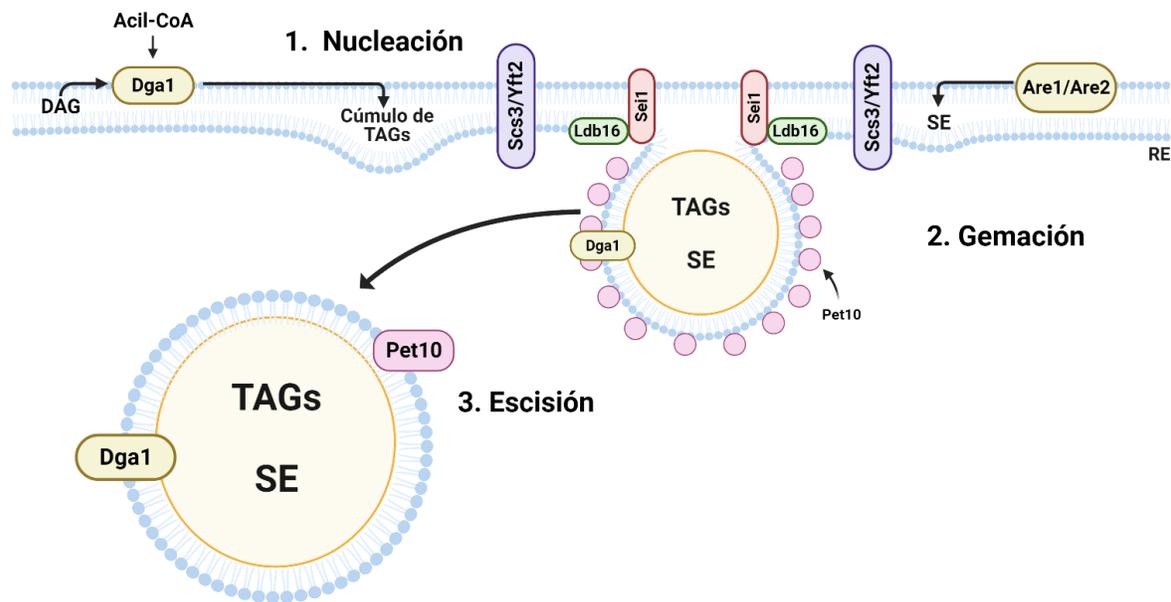


Figura 3. Esquema de la biogénesis de las gotas lipídicas en levaduras. La biogénesis de las gotas lipídicas (LDs) tiene lugar en las membranas del retículo endoplásmico (RE), y depende en primera instancia de la acumulación de lípidos neutros. Al menos tres pasos se pueden diferenciar, que son: 1. nucleación, 2. gemación y 3. escisión. Las abreviaturas que corresponden a enzimas son: diacilglicérol aciltransferasa 1 (Dga1), proteínas transmembranales inductoras del almacenamiento de grasa (FIT, Scs3 e Yft2), seipina 1 (Sei1), esterol aciltransferasa 1/2 (Are1/Are2), proteína de baja unión a colorantes 16 (Ldb16), perilipina 10 (Pet10). Las abreviaturas de metabolitos corresponden a: triacilglicérols (TAG), diacilglicérol (DAG), ésteres de esterol (SE). RE corresponde al retículo endoplásmico. Figura basada en Nettebrock y Bohnert (2020), Walther, et al. (2017) y Choudhary y Schneiter (2020). Ilustración realizada en Biorender.

1.3. Importancia de la producción de triacilglicérols en las levaduras oleaginosas

La acumulación de TAG en OYs tiene implicaciones desde distintas perspectivas (**Figura 4**). Desde el punto de vista biológico, los TAG almacenados en las LDs cumplen diferentes roles (Müllner y Daum, 2004):

1. Proporcionan los ácidos grasos utilizados para la producción de energía durante la inanición de fuentes de carbono (mediante la β -oxidación de ácidos grasos) (Renne *et al.*, 2020).
2. Su acumulación representa un mecanismo de protección frente a los efectos lipotóxicos de los diversos FFAs. Estos FFAs pueden comportarse como detergentes que comprometen la integridad de las membranas, o bien pueden unirse a especies lipídicas que en concentraciones elevadas resultan citotóxicas. De esta forma, el almacenamiento de ácidos grasos en forma de TAG dentro de las LD previene las consecuencias perjudiciales asociadas a los ácidos grasos y sus compuestos derivados (Olmann y Carvalho, 2019).
3. Proporcionan los bloques de construcción (ácidos grasos) que pueden ser empleados como precursores de los lípidos que se utilizan para la biogénesis de las membranas durante la biogénesis de organelos o células (Barbosa y Siniosoglou, 2020).

Además de desempeñar roles biológicos relevantes, los lípidos neutros producidos por las OYs tienen diferentes aplicaciones biotecnológicas que van desde la producción de biocombustibles, oleoquímicos y nutracéuticos (Bandhu *et al.*, 2020). Algunas de estas aplicaciones son señaladas en la **figura 3**.

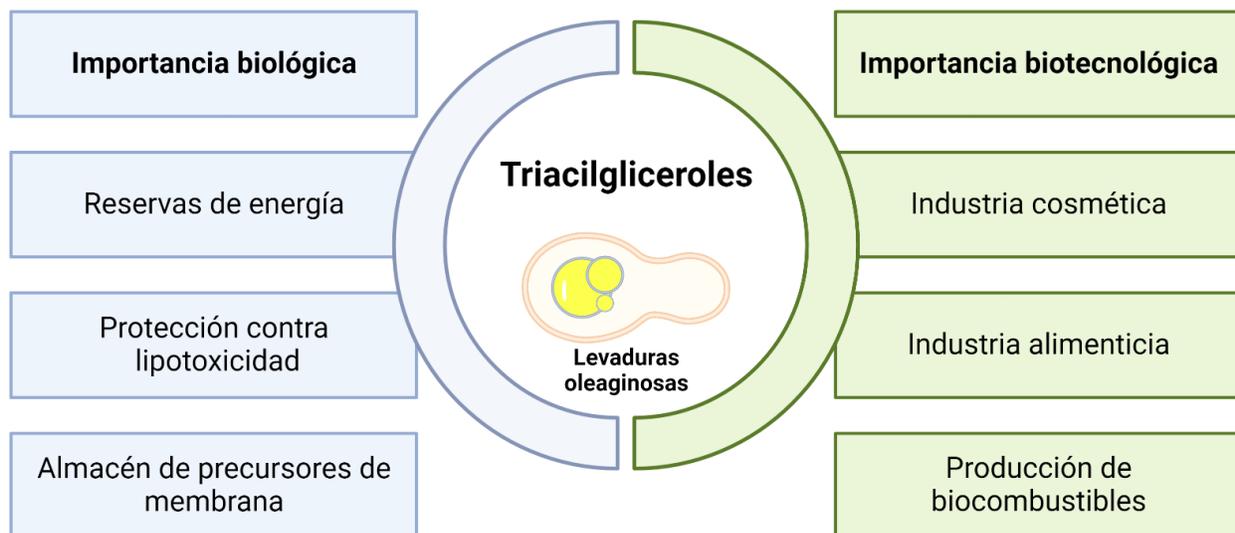


Figura 4. Relevancia de la acumulación de triacilgliceroles en levaduras oleaginosas. Esquema que resume algunas de las implicaciones de la producción de triacilgliceroles en levaduras oleaginosas. Ilustración realizada en Biorender.

Una de las principales aplicaciones de los lípidos neutros producidos por las OYs es la producción de biocombustibles de tercera generación como el biodiésel, pues su perfil lipídico es similar al de los aceites vegetales (Abeln y Chuck, 2021; Vasconcelos *et al.*, 2019). Los aceites de las OYs están compuesto principalmente de ácido mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3),

cuya abundancia relativa juega el papel principal en la determinación de su uso final (Bandhu *et al.*, 2020). Debido a su alto contenido de ácido oleico, las levaduras oleaginosas presentan un perfil lipídico favorable para la producción de biodiésel (Vasconcelos *et al.*, 2019). El biodiésel se obtiene mediante una reacción química llamada transesterificación, en la que los TAG se separan mediante alcoholólisis con un alcohol, generalmente metanol o etanol, para formar ácidos grasos esterificados (FAMEs o FAEEs, *fatty acid methyl/ethyl esters*) y glicerol (Areesirisuk *et al.*, 2015; Shimada *et al.*, 2002) (**Figura 5**). Los FAMEs y los FAEEs son lo que comúnmente llamamos biodiésel, y la reacción de transesterificación puede llevarse a cabo con ayuda de un catalizador que puede ser un catalizador químico, o lipasas (Kalita *et al.*, 2022).

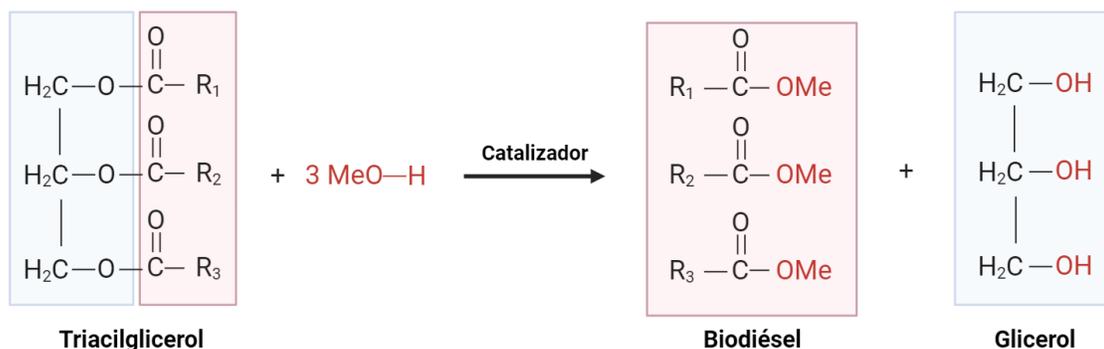


Figura 5. Reacción de transesterificación. Alcoholólisis mediada por metanol. La reacción también puede realizarse utilizando otros alcoholes (p. ej. etanol) como donadores del grupo alquilo. Basado en Karlita *et al.* (2022).

El biodiésel tiene numerosas ventajas sobre otros combustibles. Es biodegradable, compatible con motores existentes y produce menos emisiones de gases contaminantes como el CO₂ (Chattopadhyay y Maiti, 2021a; Roberts y Patterson, 2014). No obstante, también presenta algunas desventajas, como su mayor costo y la emisión de mayores cantidades de óxidos de nitrógeno (NO_x, gases reactivos provenientes del nitrógeno) en comparación con el diésel convencional (Neupane, 2022). Los NO_x en el biodiesel se forman durante el proceso de combustión, cuando se alcanzan altas temperaturas en los motores diésel. En altas temperaturas el oxígeno y el nitrógeno del aire, así como el oxígeno del biodiesel reaccionan para formar distintos compuestos NO_x, como el NO (óxido de nitrógeno) y el NO₂ (dióxido de nitrógeno), lo que contribuye a la contaminación atmosférica (Jaichandar y Annamala, 2011).

Los lípidos de las OYs tienen múltiples aplicaciones más allá de la producción de biodiésel; por ejemplo, los ácidos grasos que conforman los TAG se utilizan como agentes aromatizantes y como aditivos alimentarios (Chattopadhyay y Maiti, 2021a). Algunos de estos ácidos grasos, como el pentadecanoico, palmítico, margárico, esteárico, oleico, linoleico y behénico, confieren el sabor característico de los embutidos (Chattopadhyay y Maiti, 2021).

Por otro lado, algunas OYs son capaces de sintetizar ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFAs, *polyunsaturated fatty acids*), algunos de los cuales no pueden ser

sintetizados por mamíferos (Bandhu *et al.*, 2020; Vasconcelos *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2022). Estos incluyen al ácido linoleico (LA), ácido γ -linolénico (GLA), ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), que pertenecen a los ácidos grasos ω 3 y ω 6 (Chattopadhyay y Maiti, 2021a; Zhang *et al.*, 2022). Los PUFAs son precursores de sustancias bioactivas y poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antienvjecimiento que ofrecen beneficios en la prevención y tratamiento de enfermedades como las cardiovasculares, el cáncer y la hipertensión, entre otras (Zhang *et al.*, 2022).

1.4. La levadura antártica *Rhodotorula mucilaginosa* M94C9

En las últimas décadas, diversas levaduras no convencionales han emergido como posibles candidatas para la producción de lípidos neutros, destacando las pertenecientes al género *Rhodotorula*, como *R. toruloides* y *R. graminis* (Lyman *et al.*, 2019; Poontawee *et al.*, 2023). Estas levaduras han atraído un gran interés debido a su capacidad para acumular lípidos (Chattopadhyay y Maiti, 2021). Por ejemplo, *R. glutinis* cultivada en condiciones de limitación de nitrógeno es capaz de acumular hasta el 47% de su peso en lípidos, con una acumulación estimada de 7 g/L (Maza *et al.*, 2020). Sin embargo, los atributos de las levaduras pertenecientes al género *Rhodotorula* no sólo se limitan a la acumulación de lípidos, sino que también son capaces de sintetizar otros compuestos valiosos, como los carotenoides, pigmentos naturales con propiedades antioxidantes (Cheng y Yang, 2016; Frengova y Beshkova, 2009; Hernández-Almanza *et al.*, 2014). Los carotenoides más comunes sintetizados naturalmente por *Rhodotorula sp.*, son el β -caroteno, el γ -caroteno y el toruleno (correspondientes a la clase de los carotenos), y la torularhodina (Mata-Gómez *et al.*, 2014). Además, estas levaduras tienen la capacidad de producir enzimas de interés biotecnológico con aplicaciones en diversas industrias, como lipasas, timina hidroxilasa, invertasa, tanasa, poligalacturonasa y fenilalanina amoniaco liasa (Kot *et al.*, 2016; Mussagy *et al.*, 2022). Estos descubrimientos han ampliado significativamente el potencial biotecnológico de las levaduras de este género, trascendiendo su papel tradicional en la acumulación de lípidos y abriendo nuevas oportunidades en diferentes campos de aplicación (Lyman *et al.*, 2019).

Entre las especies de levadura de los basidiomicetos, *Rhodotorula mucilaginosa* destaca como una de las más ubicuas en el planeta, encontrándose en diversos ambientes terrestres y acuáticos, así como en una amplia gama de sustratos (Sampaio, 2011). En la actualidad, ha sido objeto de intensos estudios debido a sus destacadas capacidades para la producción de carotenoides, lípidos, enzimas y su potencial como organismo para la biorremediación (Abdel-Wahab *et al.*, 2023). Algunos estudios han mostrado que puede producir carotenoides entre 3.72 mg/L hasta 1.13 g/L (da Silva *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2022). No obstante, los rendimientos son bajos en comparación con otras levaduras productoras de carotenoides como *Blakeslea trispora* (1,870 mg/L) (He *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2022). La acumulación de lípidos en *R. mucilaginosa*, ha sido extensamente investigada, pues esta especie ha demostrado su capacidad para adaptarse a diversas condiciones ambientales y acumular biomasa y lípidos a partir de una amplia gama de fuentes de carbono y nitrógeno (Li *et al.*, 2022). Es relevante

resaltar que en estos estudios, la limitación de nitrógeno ha sido ampliamente utilizada como condición de investigación para observar cambios importantes en la acumulación de lípidos (Banerjee *et al.*, 2020; Bansal *et al.*, 2020; da Silva *et al.*, 2020; Enshaeieh *et al.*, 2015; Gientka *et al.*, 2017; Kot *et al.*, 2019a; Prabhu *et al.*, 2019; Tsai *et al.*, 2022).

La cepa *R. mucilaginosa* M94C9 (**Figura 6**) fue aislada a partir de muestras de suelo en la Isla Nevada, ubicada en el archipiélago de las Islas Shetland del Sur, en la Antártica, en el año 2014 por el grupo de investigación liderado por el Dr. Marcelo Baeza de la Universidad de Chile. En el 2016, Troncoso y colaboradores caracterizaron esta cepa, demostrando su capacidad para producir compuestos que inhiben o afectan el crecimiento de otras levaduras. A pesar de estos primeros estudios, existe una limitada investigación centrada en la cepa M94C9 desde entonces. En consecuencia, la información disponible sobre su capacidad de acumulación de lípidos, incluyendo carotenoides, bajo condiciones de limitación e inanición de nitrógeno, continúa siendo escasa. Comprender el fenómeno de síntesis y acumulación de lípidos en la levadura antártica *R. mucilaginosa* M94C9 no solo permitirá entender este proceso específico en dicha cepa, sino que también proporcionará información valiosa para diseñar estrategias que potencien la síntesis de lípidos utilizando esta levadura. Por lo tanto, un estudio detallado de los mecanismos y la regulación de la síntesis lipídica en esta cepa ayudará a identificar los factores clave involucrados en el proceso y a determinar las condiciones óptimas para la producción de lípidos a gran escala.



Figura 6. Colonias de *R. mucilaginosa* M94C9 cultivadas en medio rico sólido.

2. Justificación

R. mucilaginosa es una levadura oleaginosa de interés en ciencia básica y aplicada, debido a su capacidad de acumular lípidos. Aunque se tiene conocimiento sobre diversas cepas de esta especie, la información disponible sobre la cepa M94C9 y la acumulación de lípidos y su perfil de expresión de la vía de síntesis de lípidos *de novo*, continúa siendo limitada. Además, hasta la fecha no existen estudios que exploren el potencial biotecnológico para la producción de biocombustibles empleando los lípidos de esta cepa como materia prima.

3. Hipótesis

La levadura *R. mucilaginosa* M94C9 acumulará más lípidos al cultivarla con limitación de nitrógeno. Bajo estas condiciones, los genes involucrados en la vía de síntesis de lípidos se encontrarán transcripcionalmente activos. Asimismo, los lípidos neutros producidos por la cepa M94C9 en estas condiciones pueden ser útiles para la producción de biocombustibles como el biodiésel.

4. Objetivo general

- Evaluar la producción de lípidos neutros y el perfil de expresión de genes de la lipogénesis de la levadura antártica *R. mucilaginosa* M94C9.

5. Objetivos particulares

- Analizar el crecimiento, la biomasa y la viabilidad de cultivos en diferentes condiciones de disponibilidad de nitrógeno (condiciones lipogénicas).
- Evaluar la acumulación de lípidos neutros y el perfil de ácidos grasos en las condiciones establecidas como lipogénicas.
- Determinar el perfil de expresión de algunos genes que participan en la lipogénesis.
- Explorar el potencial biotecnológico de la conversión de triacilgliceroles a ésteres metílicos de ácidos grasos (biodiésel).

6. Materiales y métodos

6.1. Cepa de levadura

En este trabajo se utilizó a *R. mucilaginosa* M94C9, una cepa colectada e identificada en el año 2014 a partir de muestras de suelo provenientes de la isla Litchfield, en el Archipiélago Shetland del Sur en la Antártica por el grupo de trabajo del Dr. Marcelo Baeza Cancino de la Universidad de Chile (Troncoso *et al.*, 2017). Esta cepa fue donada al grupo del Laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Facultad de Ciencias, UNAM.

6.2. Condiciones de crecimiento

Se sabe que cuando las levaduras oleaginosas se enfrentan a una escasez o falta de nitrógeno y disponen de una fuente de carbono abundante, acumulan lípidos (Papanikolaou y Aggelis, 2011). También se ha establecido que la acumulación de lípidos puede variar en función de la relación carbono/nitrógeno (C/N) en el medio (Bardhan *et al.*, 2020). Tomando en consideración esta información, se diseñaron condiciones de cultivo con diferentes relaciones C/N variando la concentración de la fuente de nitrógeno (sulfato de amonio, $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$). Se prepararon medios de cultivo con una relación C/N de 40:1 (C/N_{40}), la cual ha mostrado favorecer la lipogénesis en *R. mucilaginosa* (Bardhan *et al.*, 2020).

Para los fines de este trabajo, se utilizó exceso de glucosa (10 %) como la fuente de carbono y se varió la fuente de nitrógeno hasta obtener la relación C/N deseada. La concentración de la fuente de nitrógeno de la condición con relación C/N_{40} se disminuyó 30 y 60 veces para las condiciones establecidas como limitadas (C/N_{1200} y C/N_{2400}), y se disminuyó totalmente en la condición designada como inanición de nitrógeno (-N). La relación C/N de los medios C/N_{40} , C/N_{120} y C/N_{2400} se obtuvo utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{C/N} = \frac{m_C \left(\frac{n_C (12.01)}{MW_C} \right)}{m_N \left(\frac{n_N (14.01)}{MW_N} \right)}$$

donde m corresponde a la masa en gramos de la fuente de carbono o de nitrógeno utilizada, n_C es el número de átomos de carbono en la fuente de carbono, n_N es el número de átomos de nitrógeno en la fuente de nitrógeno, MW corresponde al peso molecular de la fuente de carbono o nitrógeno. El peso atómico de la fuente de carbono y de nitrógeno es de 12.01 y 14.01, respectivamente. Para proporcionar a las células algunos nutrientes esenciales para su crecimiento, el medio se suplementó con Yeast Nitrogen Base sin fuentes de nitrógeno (YNB). De esta forma, se diseñaron las condiciones de crecimiento con las composiciones de la **Tabla 1**.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo

Condición	Glucosa (10 %)	YNB	(NH ₄) ₂ SO ₄ .
C/N _{40:1}	100 g L ⁻¹ de glucosa	1X (0.17%)	5 g L ⁻¹
C/N _{1200:1}	100 g L ⁻¹ de glucosa	1X (0.17%)	0.16 g L ⁻¹
C/N _{2400:1}	100 g L ⁻¹ de glucosa	1X (0.17%)	0.08 g L ⁻¹
-N	100 g L ⁻¹ de glucosa	1X (0.17%)	0 g L ⁻¹

Para todos los experimentos, los inóculos de *R. mucilaginosa* M94C9 se prepararon a partir de colonias frescas cultivadas en medio YPD sólido (extracto de levadura 1%, peptona de caseína 2%, dextrosa 2% y agar 2 %). A partir del medio sólido se tomó una asada y se inoculó un matraz con 25 mL de YPD líquido (extracto de levadura 1%, peptona 2% y dextrosa 2%) y se incubó durante 16 h a 28 °C a 180 revoluciones por minuto (rpm). Los pre-inóculos (tiempo 0h) se lavaron con 10 mL de agua destilada estéril y se suspendieron en 10 mL de agua destilada estéril. A partir de estos, se inocularon matraces de 250 mL con 50 mL de los medios descritos en la **tabla 1** a una densidad óptica (DO) inicial de 0.05 con ayuda de un espectrofotómetro (Beckman Coulter DU 640). Los matraces se incubaron a 28 °C y 180 rpm durante 72 h. Para cada experimento se realizaron tres réplicas biológicas.

6.3. Determinación de crecimiento y biomasa

Para evaluar el crecimiento de *R. mucilaginosa* M94C9 en las condiciones seleccionadas, se monitoreó la densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) de cada muestra en diferentes intervalos durante tres días. Para ello, se tomaron alícuotas en los respectivos tiempos y se determinó su DO_{600nm} con ayuda de un espectrofotómetro. Para complementar lo observado en la curva de crecimiento, se determinó la biomasa por peso seco (g/L). Las células cultivadas en los diferentes medios se separaron en alícuotas (dependiendo de la DO_{600 nm} se tomaron alícuotas de 1, 10 ó 50 mL) cada 24 h durante tres días. Las células se centrifugaron a 3000 rpm. Luego, las células sedimentadas se suspendieron en agua destilada 1:1 (p/v) y se transfirieron a charolas de aluminio pre-pesadas. Posteriormente, las charolas se deshidrataron con calor a 70 °C en un horno durante 72 h. Finalmente, las charolas se pesaron y se determinó el peso seco. A partir de estos datos se calculó la producción de biomasa correspondiente al peso seco de las células. Cada experimento se realizó por triplicado.

6.4. Ensayo de viabilidad

Para evaluar si *R. mucilaginosa* M94C9 continuaba siendo viable después de crecer en las condiciones de cultivo limitadas en nitrógeno, se decidió realizar un ensayo de viabilidad por goteo, comparando las levaduras cultivadas en las condiciones más contrastantes (C/N40 y -N). Para tal efecto se creció a las levaduras durante 24 y 72 h en medio C/N40 y -N. Adicionalmente se les comparó con levaduras provenientes de un preinóculo en YPD (cultivo semilla). Se tomaron alícuotas de 1 mL, se determinó la DO_{600nm} de cada muestra y se ajustaron a un valor de 0.5 en un volumen final de 1 mL. Posteriormente se tomaron 200 μ L de las células suspendidas y se colocaron en una placa de 96 pozos estéril. A partir de la muestra que se colocó en la placa, se realizaron diluciones seriadas (1:10). Finalmente, las muestras diluidas se sembraron en cajas Petri con medio YPD sólido. Todos los experimentos se realizaron en esterilidad. Las cajas se incubaron a 28 °C durante tres días y posteriormente se refrigeraron a 4 °C durante 15 días. El crecimiento de las colonias se fotografió a los 3, 5 y 15 días.

6.5. Determinación del índice lipídico

Para evaluar el valor relativo del contenido de lípidos neutros en las células cultivadas en distintos medios, se realizó un análisis basado en la detección de fluorescencia relativa (intensidad de fluorescencia/densidad óptica) del colorante BODIPY 493/503 (4, 4-difluoro-1, 3, 5, 7, 8-pentametil-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indaceno), utilizando placas de 96 pozos con ayuda de un espectrofluorímetro. Se tomaron alícuotas de *R. mucilaginosa* (aproximadamente 1×10^6 células) crecida en el cultivo semilla (tiempo 0) y de los medios C/N₄₀ y -N durante 24, 48 y 72 h, estas alícuotas se depositaron en tubos de 1.5 mL. Las muestras se lavaron dos veces con agua destilada. Al finalizar el segundo lavado, las células se suspendieron en un volumen de 1 mL y se añadió a cada tubo 110 μ L de formaldehído (37 %). Después los tubos se agitaron con ayuda de un vórtex durante 15 min. Pasados los 15 min las muestras se lavaron dos veces con agua destilada para retirar el excedente de formaldehído y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Para el ensayo del índice lipídico se añadieron 5 μ L de la suspensión celular fijada previamente con formaldehído (1 %) a 200 μ L de amortiguador de lectura (5 μ M de BODIPY 493/503 y 500 mM de yoduro de potasio [KI]) en una placa negra de 96 pozos con fondo claro. Los parámetros utilizados para medir la fluorescencia fueron 480 nm para la excitación y 510 nm para la emisión, se utilizó un filtro de corte a 495 nm. En paralelo, para cada lectura de fluorescencia se determinó la cantidad de células midiendo la absorbancia a 600 nm. Cada muestra se leyó cinco veces añadiendo alícuotas posteriores de 5 μ L de la suspensión celular fijada con formaldehído al mismo pozo. La lectura del blanco se obtuvo al incubar el amortiguador de lectura durante 15 min a 30 °C antes de agregar células. Los datos obtenidos se analizaron evaluando la linealidad de las mediciones de fluorescencia y absorbancia. A partir de la regresión lineal de la curva se determinó la fluorescencia relativa por el valor de la absorbancia celular, que se denominó índice lipídico (Romero-Aguilar *et al.*, 2018).

6.6. Ensayos de citometría de flujo

Para corroborar la detección de los lípidos neutros, se utilizó un ensayo de citometría de flujo con el colorante BODIPY 493/503. Para ello, se tomaron células del cultivo semilla (tiempo 0) y de los medios C/N₄₀ y -N. Las células se colectaron a las 18, 48 y 72 h, se fijaron como se indicó previamente y se suspendieron en una concentración final de 1×10^6 células mL⁻¹. Posteriormente se centrifugaron, se retiró el sobrenadante y se incubaron con 200 µL de amortiguador de lectura (5 µM de BODIPY 493/503 y 500 mM de KI) (15 min, temperatura ambiente, en la oscuridad). Al finalizar el tiempo de incubación, las células se lavaron dos veces con agua destilada y se suspendieron en 500 µL de agua. Las células se agitaron en vórtex para evitar la formación de cúmulos, y se procesaron en el citómetro de flujo MACSQUANT Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Alemania). Para cada condición se adquirieron 20,000 eventos. Los datos se analizaron utilizando el software FlowJo V. 10.8.1.

6.7. Detección de cuerpos lipídicos por microscopía confocal

Para seguir la dinámica de acumulación de cuerpos lipídicos en las condiciones más contrastantes (C/N₄₀ y -N), se observaron las células mediante microscopía confocal. Para ello, las muestras fijadas correspondientes a las 48 h se incubaron con 3 µM de BODIPY 493/503 durante 10 min, se lavaron dos veces con agua destilada, y se les montó en portaobjetos Silane-Prep (Sigma Co.), donde se tiñeron con Calcofluor White 100 ng/mL. Las muestras fueron fotografiadas con un microscopio confocal (Zeiss LSM5 Pascal, Carl Zeiss GmbH, Gotinga, Alemania) con una inmersión en aceite y objetivo 100 × N.A. 1.3. Se utilizaron márgenes de detección de 493–503 para BODIPY 493/503 y 300/412 para Calcofluor White. Los cuerpos lipídicos en las imágenes se analizaron con el software ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Maryland, EE. UU, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997 – 2016).

6.8. Determinación del perfil de ácidos grasos

Para determinar el perfil de ácidos grasos de *R. mucilaginosa* M94C9, se tomaron células del cultivo semilla (0 h) y las células cultivadas en medio C/N₄₀ a las 48 h de crecimiento en matraces de 50 mL. Posteriormente, las células se colectaron, se lavaron y se concentraron en un pellet dentro de un microtubo de 1.5 mL. El perfil se realizó en colaboración con el Dr. Mohammed El Hafidi siguiendo los métodos descritos por Folch *et al.* (1957) y El Hafidi *et al.* (2001). Brevemente, los lípidos totales se extrajeron a partir de 10 mg de homogeneizado de levadura en presencia de 50 µg de ácido heptadecanoico como estándar interno, utilizando cloroformo-metanol (2:1, v/v) con 0.002% de butilhidroxitolueno (BHT). Los lípidos se transesterificaron a FAMES calentando a 80 °C durante 2 horas con metanol, que contenía un 2% de H₂SO₄ concentrado y 0.005% de BHT. Los FAMES se separaron e identificaron mediante cromatografía de gases en un cromatógrafo Shimadzu, equipado con una columna capilar de sílica fundida de 25 m x 0.25 mm de diámetro interno, recubierta con DB-FATWAX (espesor de

película 0.25 μm). La concentración y composición de los FAMES se evaluaron mediante cromatografía de gases.

Por último, se calculó el contenido de ácidos grasos mediante una normalización con respecto a la proteína total. Para este propósito, las concentraciones de proteínas (expresadas en mg de proteína/mL) de los extractos crudos se determinaron utilizando el método de Bradford descrito por de la Fuente-Colmenares (2017). Estas concentraciones se estimaron mediante una regresión lineal basada en una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) con valores entre 0.05 mg/mL y 0.75 mg/mL.

6.9. Ensayo de actividad específica de ATP-citrato liasa

La actividad específica de la Acl de *R. mucilaginosa* M94C9 se determinó siguiendo el protocolo establecido por Romero-Aguilar *et al.* (2017). Para tal efecto, se recolectaron muestras de *R. mucilaginosa* M94C9 (peso húmedo entre 1 y 1.5 g). Estas muestras fueron colectadas del cultivo semilla (0 h) y de cultivos en los medios C/N₄₀ y -N a las 18 y 48 h.

6.9.1. Extracción y cuantificación de proteínas

Para obtener el extracto crudo de proteínas, las células colectadas se resuspendieron en una relación 1:1 p/v en un buffer de lisis constituido por los siguientes reactivos: KH₂PO₄ 50 mM, EDTA 5 mM, HEPES 30 mM pH 7.0, PMSF 1 mM y glicerol al 20 % y microperlas de vidrio. Las células se rompieron en un Mini Bead-Beater durante cinco ciclos de ruptura con duración de 30 segundos (s) cada uno. Una vez finalizados los ciclos de ruptura, los homogeneizados se transfirieron a tubos de 1.5 mL y se centrifugaron a 10,000 rpm a 4 °C durante 6 minutos. Luego, la fase superior se separó y se centrifugó a 30,000 rpm durante 1 h para obtener un extracto clarificado. La fase superior se recuperó en tubos de 1.5 mL. La cuantificación de las proteínas de la muestra se determinó mediante el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Para ello, se preparó una solución de 1 mg/mL de BSA (albúmina sérica bovina) a partir de la que se construyó una curva estándar en el rango de 5 a 100 μg de proteína.

6.9.2. Determinación de la actividad específica de la Acl

La actividad específica se determinó midiendo la oxidación de NADPH a 340 nm a 25 °C. Este método se basa en la detección del cambio de absorbancia a 340 nm provocado por la oxidación del NADH cuando el oxalacetato es convertido a malato por la malato deshidrogenasa (Mdh). La mezcla de reacción para determinar la actividad de la Acl fue la siguiente: tricina-KOH 130 mM pH 7.5, MgCl₂ 6 mM, DTT 1 mM, citrato de sodio 1 mM, NADH 0.15 mM, CoA 0.40 mM, 12 unidades de Mdh y 20 μL de extracto de proteína. Para medir la actividad enzimática, la mezcla de reacción se incorporó en una celda de plástico PMMA UV, se agitó suavemente y se registró su absorbancia a 340 nm utilizando un espectrofotómetro (Agilent 8433) durante 30 s. Luego, se añadió ATP 6.6 mM para dar inicio a la reacción, y se continuó registrando la lectura de manera ininterrumpida. La absorbancia se registró hasta transcurrir un lapso de 200 s. La unidad de

actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima capaz de catalizar el consumo de 1 μmol de NADH por minuto (coeficiente de extinción molar del NADH, 6.23). Se realizaron triplicados para cada condición.

6.10. Extracción de ácidos nucleicos

6.10.1. Extracción de DNA

Para extraer DNA genómico (gDNA), se inoculó una colonia de *R. mucilaginosa* M94C9 en medio YPD y se incubó a 28 °C y 180 rpm durante 16-18 h. Posteriormente, el medio se centrifugó a 3000 rpm durante 3 minutos. El pellet se lavó 2 veces con agua bidestilada y se depositó en tubos de 1.5 mL. Luego, se agregaron 300 μL de una mezcla amortiguadora compuesta de: Tritón X-100 2 %, SDS 1 %, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y EDTA 1 mM pH 8.0. Se añadió 200 μL de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (PCI) (25:24:1) y 300 μL de perlas de vidrio. Posteriormente, los tubos con las muestras se agitaron con un vórtex a máxima velocidad durante 4 minutos. Después, los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm durante 5 minutos. Luego, se separó la fase acuosa y se transfirió a un tubo nuevo con cloroformo. El tubo que contenía la fase acuosa y el cloroformo se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min y al término, la fase acuosa se transfirió a otro tubo con 1 mL de etanol absoluto frío, se mezcló y se dejó precipitar 30 min a -20 °C. Al finalizar, el tubo se centrifugó una vez más y se retiró el sobrenadante. El pellet resultante se resuspendió en 400 μL de un buffer compuesto por Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y EDTA 1 mM pH 8.0 con 1.5 μL de RNAsa A 20 mg/mL y se incubó a 37 °C durante 30 minutos, tras lo cual se agregaron 40 μL de acetato de sodio 3 M pH 5.2 más 1 mL de etanol absoluto y se dejó precipitar toda la noche. Finalmente, la muestra se centrifugó y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente, para ser hidratado con 50 μL de agua. Las muestras de gDNA se cuantificaron en un nanospectrofotómetro (NanoPhotometer™ Pearl, IMPLLEN) (A260 nm).

6.10.2. Extracción de RNA y síntesis de cDNA

La extracción de RNA total se basó en el protocolo descrito por Ochoa-Gutiérrez *et al.* (2022) y se realizó tomando alícuotas de 1-1.5 $\text{DO}_{600\text{ nm}}$ de *R. mucilaginosa* M94C9 del cultivo semilla y células cultivadas en medio C/N₄₀ y -N en diferentes tiempos de crecimiento (18 y 48 h). Se colectaron células por centrifugación, se lavaron dos veces con agua tratada con dietilpicrocarbonato (DEPC) y se resuspendieron en 1 mL de una solución amortiguadora AE (Acetato de sodio 50 mM, EDTA 10 mM). Posteriormente, las células se transfirieron a un tubo de 2 mL con 450 μL de microperlas de vidrio, 450 μL de fenol de pH 4.5 y 40 μL de SDS 10 % y se mezclaron vigorosamente con vórtex. Posteriormente, la mezcla se incubó durante 5 min a 65 °C y se agitó durante 30 segundos. Este paso se repitió dos veces. Después, la suspensión se enfrió a -70 °C durante 3 min y luego se centrifugó durante 5 min a 14,000 rpm para separar las fases acuosa y fenólica. La fase acuosa superior se transfirió a un tubo de nuevo y se trató dos veces con 500 μL de fenol pH 4.5, y una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) en

ciclos de agitar, centrifugar y transferir. A continuación, la fase acuosa se extrajo con 500 μL cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Luego, para precipitar el RNA se añadió 50 μL de acetato de sodio 3 M y 1250 μL de etanol absoluto frío a la muestra, se mezcló por inversión y se dejó precipitar por 24 h a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pasado el tiempo de precipitación, la muestra se centrifugó a 14,000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. Finalmente, se descartó el sobrenadante y el pellet resultante se lavó con etanol al 75 % dos veces. El pellet se secó al aire y posteriormente, se hidrató con agua. La integridad del RNA se evaluó mediante la cuantificación de las relaciones por espectrofotometría ($A_{260_{\text{nm}}}$) y mediante electroforesis en un gel de agarosa con formaldehído desnaturalizante.

El RNA total se trató posteriormente con DNAsa para eliminar cualquier gDNA contaminante. Para ello, se digirieron 2 μg de RNA total con RQ1 RNase-Free DNAsa (Promega, Madison, WI, EE. UU.) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. La reacción se detuvo con la solución STOP (Promega) incubando las muestras 10 min a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuación, las reacciones de síntesis de DNA complementario (cDNA) se realizaron con ayuda del kit de síntesis de cDNA RevertAid H Minus First Strand (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) Para la síntesis de cDNA, se trataron 500 ng de RNA total en una mezcla que incluye Primer Oligo (dt) y agua inyectable que se incubó por 5 min a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los siguientes pasos de la reacción se realizaron conforme lo indica el proveedor.

6.11. Cuantificación de la transcripción mediante RT-qPCR

La cuantificación de transcritos de los distintos genes de interés se llevó a cabo mediante la reacción de RT-qPCR. Las muestras de cDNA correspondientes al RNA total de *R. mucilaginosa* M94C9 provenientes del cultivo semilla (tiempo 0) y de células cultivadas en medios C/N₄₀ y -N durante 18 y 42 h se diluyeron 1:5 v/v en agua. Las reacciones de qPCR se prepararon con el kit KAPA SYBR Fast kit (Roche) y se corrieron en un termociclador de tiempo real Corbett Research Rotor-Gene 6000 (Qiagen) siguiendo el programa: 94°C durante 5 minutos (1 ciclo), 95°C durante 10 segundos, 58°C durante 20 segundos y 72°C durante 20 segundos (35 ciclos). Se determinó la expresión relativa de los genes *RmACL*, *RmACCI*, *RmFAS1*, *RmFAS2* y *RmDGAI*, de la vía de síntesis de lípidos, y de los genes *CAR0* y *CAR1* de la vía de síntesis de carotenoides. La expresión relativa se determinó utilizando los oligonucleótidos enlistados en la **tabla 2**.

Los datos se analizaron mediante cuantificación por una curva estándar en la que se utilizó al gen *RmACT1* como constitutivo o de referencia. Para cada gen se construyó una curva estándar a partir de diluciones seriales de gDNA con una concentración inicial de 20 ng/ μL , siguiendo un factor de dilución 1:5. Se realizaron triplicados biológicos y duplicados técnicos para cada muestra.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de qPCR

Genes	Nombre del primer	Secuencia	Tamaño (pb)	Referencia
<i>RmACT1</i>	<i>RmACT1Fw</i>	5'-AAG GTC AAC CGC GAG AAG AT-3'	72	Este trabajo
	<i>RmACT1Rv</i>	5'-AGC GTA CAG CGA GAG GAC-3'		
<i>RmACL</i>	<i>RmACLFw</i>	5'-GGC ATG TCG AAC GAG CTG AA-3'	92	Zamora-Bello, 2023
	<i>RmACLRv</i>	5'-AGG TGG TCG ATG AAG GTG GT-3'		
<i>RmACC1</i>	<i>RmACC1Fw</i>	5'-GGC ATG TCG AAC GAG CTG AA-3'	126	Zamora-Bello, 2023
	<i>RmACC1Rv</i>	5'-TCT TCG AGG ACG ATG CGG AT-3'		
<i>RmFAS1</i>	<i>RmFAS1Fw</i>	5'-TAT CAC CGA CCC GTA TGA GC-3'	108	Zamora-Bello, 2023
	<i>RmFAS1Rv</i>	5'-GTC GCG GAA CAT CTT CGA GA-3'		
<i>RmFAS2</i>	<i>RmFAS2Fw</i>	5'-TTC TCC GCC ACC TTC TTG CA-3'	104	Zamora-Bello, 2023
	<i>RmFAS2Rv</i>	5'-GTC TTG GCG AGG AAG TAG GA-3'		
<i>RmDGA1</i>	<i>RmDGA1Fw</i>	5'-TCT CAT CGT CGC CTA CCT CA-3'	123	Zamora-Bello, 2023
	<i>RmDGA1Rv</i>	5'-ACT GGG TAG TAC CCG GCA AA-3'		
<i>RmCAR1</i>	<i>RmCAR1F</i>	5'- CGG TCC CTC GCT CTA CCT CA-3'	131	Landolfo, <i>et al.</i> , 2018
	<i>RmCAR1R</i>	5'-CCT TGT CCG GGA AGA CGA TG-3'		
<i>RmCAR0</i>	<i>RmCAR0F</i>	5'-CCG TCG GGT ACT ACA GTC TC-3'	163	Landolfo, <i>et al.</i> , 2018
	<i>RmCAR0R</i>	5'-TAG CTC AGA TAT GGC GGC AA-3'		

6.12. Identificación *in silico* de *RmACL*

La identificación *in silico* de la secuencia del gen *RmACL* que codifica para ATP-citrato liasa (Acl) en *R. mucilaginosa* se llevó a cabo mediante un análisis de BLAST. Se emplearon las bases de datos de GenBank del NCBI y MycoCosm de Joint Genome Institute (JGI) como las principales fuentes de información. Para ello se recabaron las secuencias de aminoácidos de la Acl correspondientes a *R. toruloides* y *Y. lipolytica* depositadas en GenBank. Posteriormente se llevó a cabo un BLASTP contra la base de datos de *R. mucilaginosa* en MycoCosm, obteniendo así los respectivos porcentajes de identidad. A partir de este análisis se obtuvo la secuencia de aminoácidos de la Acl de *R. mucilaginosa* (Id: 683649). Después de obtener la secuencia de aminoácidos se recuperó la secuencia de DNA correspondiente en MycoCosm. Una vez obtenida la secuencia del gen, se identificó la región 5' UTR (región no traducida 5', *Untranslated Region*) y el ORF (marco abierto de lectura, *Open Reading Frame*) (<https://mycoCosm.jgi.doe.gov/cgi-bin/DispTranscript?db=Rhomuc1yid=683649yuseCoords=1>).

6.13. Diseño de oligonucleótidos para el ensayo de escaneo de nucleosomas

A partir de la secuencia de nucleótidos identificada, se diseñaron los oligonucleótidos utilizados para el ensayo de escaneo de nucleosomas (nucleosome scanning assay, NuSA). Para el diseño, se siguieron los criterios señalados por Infante y colaboradores (2012). Brevemente, se establecieron coordenadas a partir del sitio de inicio de la traducción a lo largo de un eje que comprende la región 5' UTR, así como parte del ORF de *RmACL*. Hacia la región 5' UTR las coordenadas se establecieron como negativas (-600 pb), mientras que río abajo del ATG las coordenadas corresponden a positivas (+400 pb). El primer nucleótido de la región codificante (ATG) corresponde a la coordenada +1 pb. Los oligonucleótidos se diseñaron con una longitud de entre 18 a 24 pb con una T_M de 58.5 °C con ayuda de la herramienta web OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>). Los amplicones tienen longitudes que van desde los 88 pb a 120 pb. Se diseñaron 22 pares de oligonucleótidos (**Tabla S1**, suplementarios) dispuestos tal como se indica en la **figura 7**.

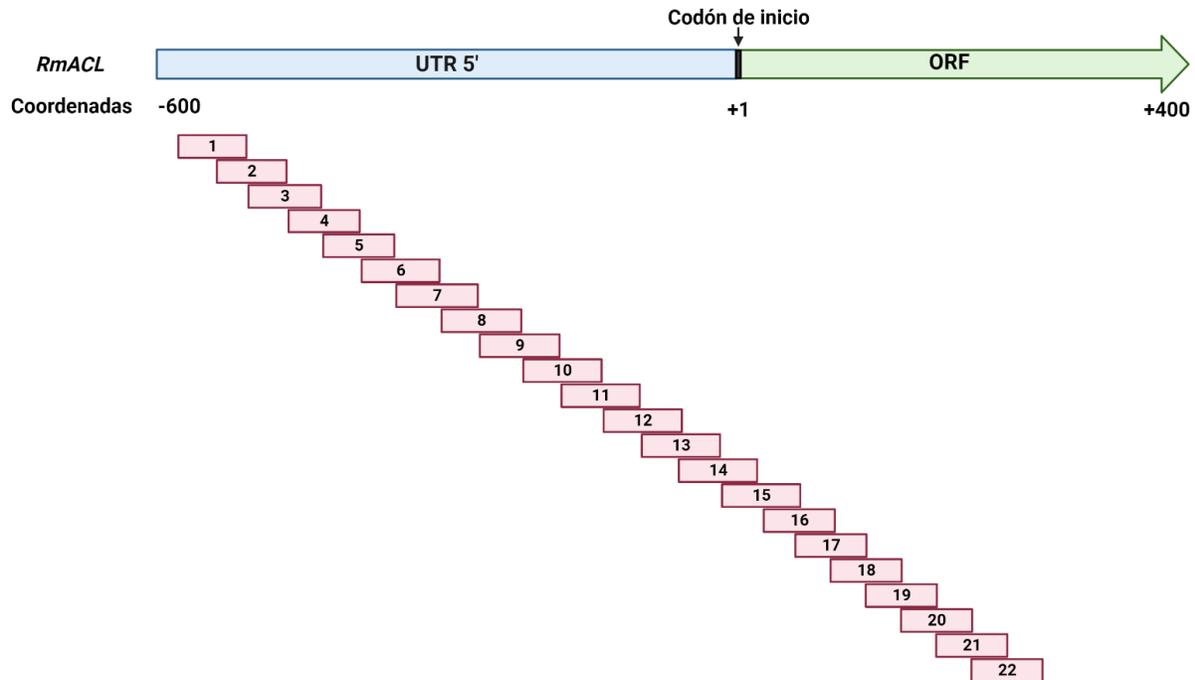


Figura 7. Disposición de los oligonucleótidos diseñados para el ensayo de escaneo de nucleosomas en el gen de *RmACL*. El rectángulo azul señala una región del UTR 5' de *RmACL* (-600 pb), mientras que el rectángulo verde marca un fragmento de la región codificante (+400 pb). La coordenada +1 se indica como el ATG del ORF de *RmACL*. En rectángulos rojos se indican los amplicones que se generan a lo largo del gen *RmACL* (1-22 amplicones) mediante qPCR.

Para determinar la protección relativa de los nucleosomas en el gen *RmACL* se utilizó al gen *RmVCXI* como control. Para ello se diseñaron los oligonucleótidos de *RmVCXI* (**Tabla S1**) a partir de la secuencia de *Vcx1* depositada en MycoCosm (<https://mycoCosm.jgi.doe.gov/cgi-bin/dispGeneModel?db=Rhomuc1&tid=706724>). El gen *VCXI* codifica un canal transportador de calcio/sodio y se ha definido que este gen posee un nucleosoma posicionado entre la coordenada +100 y +200 después del ATG, lo que permite utilizarlo como gen de referencia (González, *et al.*, 2017).

6.14. Ensayo de escaneo de nucleosomas (NuSA)

Los experimentos de NuSA se realizaron con base en lo descrito previamente por Infante *et al.* (2012). Para ello, *R. mucilaginosa* M94C9 se creció en YPD y C/N₄₀ a 1-1.5 de DO_{600nm} durante 18 h. Las células se trataron con formaldehído al 37% (concentración final al 1%) durante 20 min a temperatura ambiente con agitación constante, después se les adicionó glicina (concentración final de 125 mM) y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente, sin agitación. Las células se colectaron por centrifugación, se lavaron 2 veces con 20 mL de una solución salina fría tamponada con Tris, y después se incubaron en buffer Z2 (Sorbitol 1 M,

Tris-Cl pH 7.4 50 mM, β -mercaptoetanol 10 mM) con 50 U de zimoliasa durante 24 h a 30 °C. Los esferoplastos se colectaron por centrifugación durante 5 min (3000 rpm) y se resuspendieron en 1.5 mL de buffer NPS (espermidina 0.5 mM, NP-40 0.075%, NaCl 50 mM, Tris pH 7.4 10 mM, MgCl₂ 5 mM, CaCl₂ 1 mM y β -mercaptoetanol 1 mM). Luego, a 600 μ L de las muestras se les agregó 25 U de MNasa (Nucleasa S7 de Roche) durante 30, 45 o 60 min a 37 °C. La reacción de la digestión se detuvo con 12 μ L de la solución STOP (EDTA 50 mM y SDS 1%), se trataron con 10 μ L de proteinasa K 10 mg/mL a 65 °C durante toda la noche. El DNA se extrajo y trató con RNasa A siguiendo los métodos descritos anteriormente. Posteriormente, las muestras de DNA digeridas se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2 % (**Figura 1S**). Las bandas monosomales (fragmentos de DNA de un tamaño aproximado de 150 pb) se cortaron y purificaron con el kit Wizard SV Gel Clean-Up System (Promega, REF A9282).

Las muestras de DNA purificadas se diluyeron en agua a 1:30 y se utilizaron en las reacciones de PCR cuantitativa (qPCR) para medir la protección de MNasa relativa de cada muestra en el promotor de *RmACL*. El análisis de qPCR se realizó en un termociclador de tiempo real Corbett Research Rotor-Gene 6000 (Qiagen). Para cada reacción se utilizó SYBR Green (KAPA SYBR Fast kit Roche) como señal de detección. El programa de qPCR se describe a continuación: 94 °C durante 5 m (1 ciclo), 94 °C por 15 s, 58 °C durante 20 segundos y 72 °C durante 20 segundos (35 ciclos). La protección relativa se determinó al dividir el valor obtenido de cada reacción con el valor obtenido de la región del gen control *VCXI* de *R. mucilaginosa* M94C9. Todos los ensayos de protección de nucleosomas se representan como el promedio y error estándar de al menos dos réplicas biológicas independientes, donde cada réplica biológica implica dos réplicas técnicas.

6.15. Extracción de lípidos

Para estudiar el potencial de los triacilgliceroles (TAGs) de *R. mucilaginosa* M94C9 y evaluar su utilización en la producción de biodiésel, se empleó la metodología descrita por Vargas-Sánchez (2019). Para este propósito, se cultivó la levadura *R. mucilaginosa* M94C9 en un medio de cultivo lipogénico, que se utiliza en la industria de producción de lípidos. Este medio líquido tiene una relación C/N₈₀ y se encuentra constituido de la siguiente forma: glucosa 23 g L⁻¹, peptona 0.3 g L⁻¹, extracto de levadura 0.5 g L⁻¹, KH₂PO₄ 7 g L⁻¹, Na₂HPO₄·7H₂O 2 g L⁻¹ y MgSO₄ 1.5 g L⁻¹ (Niehus *et al.*, 2018). A partir de colonias frescas cultivadas en medio sólido YPD se realizó un preinóculo tomando una azada que se depositó en un matraz con 25 mL de YPD líquido. Transcurridas 16 h, las células se lavaron y se inocularon a una DO_{600 nm} de 0.1 en matraces bafleados con 500 mL del medio C/N₈₀. Los matraces se incubaron durante 72 h a 180 rpm a 30 °C. Las células se colectaron y se lavaron dos veces con agua destilada. Para la extracción de lípidos, se utilizó una solución de HCl y una mezcla de cloroformo-metanol. Las células se colocaron en tubos de 400 mL, que estaban previamente secados y pesados, después se centrifugaron para separar el sobrenadante y se lavaron un par de veces. Se agregó aproximadamente 100 mL de HCl 4M y los tubos se colocaron en un agitador orbital a 60°C a 220 rpm durante 6 horas. Después de la agitación, se añadió una mezcla de cloroformo y metanol

en una proporción de 1:1, y los tubos se agitaron nuevamente durante 2 horas. Finalmente, los tubos se centrifugaron y se retiró la fase superior acuosa y los restos de biomasa. Los tubos se colocaron en un horno a 70 °C durante 48 horas para facilitar la evaporación de los solventes restantes. La cantidad de lípidos se determinó gravimétricamente y se calculó el contenido de lípidos totales por peso seco. Para cada condición se realizó un triplicado.

6.16. Análisis de conversión de TAG a FAEEs

Para determinar cualitativamente el tipo de lípidos presentes en el aceite obtenido y validar la conversión de TAG a FAEEs, se realizó una cromatografía de capa fina (Thin Layer Chromatography, TLC). Para ello se hizo una reacción de transesterificación de acuerdo con Rivera *et al.* (2009). Para esta reacción se utilizó la lipasa 435 inmovilizada de Novozymes como catalizador para la producción de biodiésel. Para ello, se disolvieron 0.3 g de la muestra de aceite *R. mucilaginoso* M94C9 en 1.2 g de etanol (p/p) y se colocaron en un vial de vidrio. Además, se añadieron 0.1 g de 435 Novozymes. La reacción se realizó a 45 °C y 300 rpm de agitación magnética durante 48 h.

Para realizar la técnica de TLC, 0.1 mg del aceite se diluyeron en 100 µL de hexano grado ACS (*American Chemical Society*). Se colocó el volumen correspondiente a 2 y 3 µL y una mezcla de estándares que contenía monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, ácido oleico y metil oleato en una placa de TLC (Silica gel on TLC AL fols). Después, la placa se colocó en una cámara cromatográfica donde se depositaron 25 mL de una fase móvil compuesta por una fase 85:15:1 v/v de hexano, éter etílico: ácido acético. Después de que la muestra corrió por la placa de TLC, se reveló utilizando yodo.

7. Resultados

7.1. El crecimiento y la acumulación de biomasa de *R. mucilaginosa* M94C9 están limitados por la disponibilidad de nitrógeno

Para determinar la capacidad de *R. mucilaginosa* M94C9 de crecer y acumular biomasa en condiciones de limitación de nitrógeno, se realizaron curvas de crecimiento y se determinó la acumulación de biomasa de células cultivadas en medio mínimo con diferentes concentraciones de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Tabla 1). Se encontró un efecto en el crecimiento que depende de la concentración de nitrógeno disponible en el medio de cultivo, de tal manera que al decrecer la disponibilidad de nitrógeno en el medio, el crecimiento se reduce (Figura 8). En la figura 8A se observa que cuando *R. mucilaginosa* es cultivada en C/N_{40} alcanza la mayor densidad óptica (10) observada en las condiciones evaluadas después de 72 h de crecimiento. En esta condición las células han alcanzado la fase estacionaria. Mientras que en C/N_{1200} y C/N_{2400} se observa que el crecimiento se redujo entre 5 y 10 veces en comparación con las células cultivadas en C/N_{40} . La ausencia de nitrógeno en el medio, -N, provocó que las divisiones celulares cesaran más temprano en el tiempo y que la $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ máxima llegara a entre 0.25 y 0.26. En esta condición (y en C/N_{1200} y C/N_{2400}) la fase estacionaria se alcanzó más temprano (24 h).

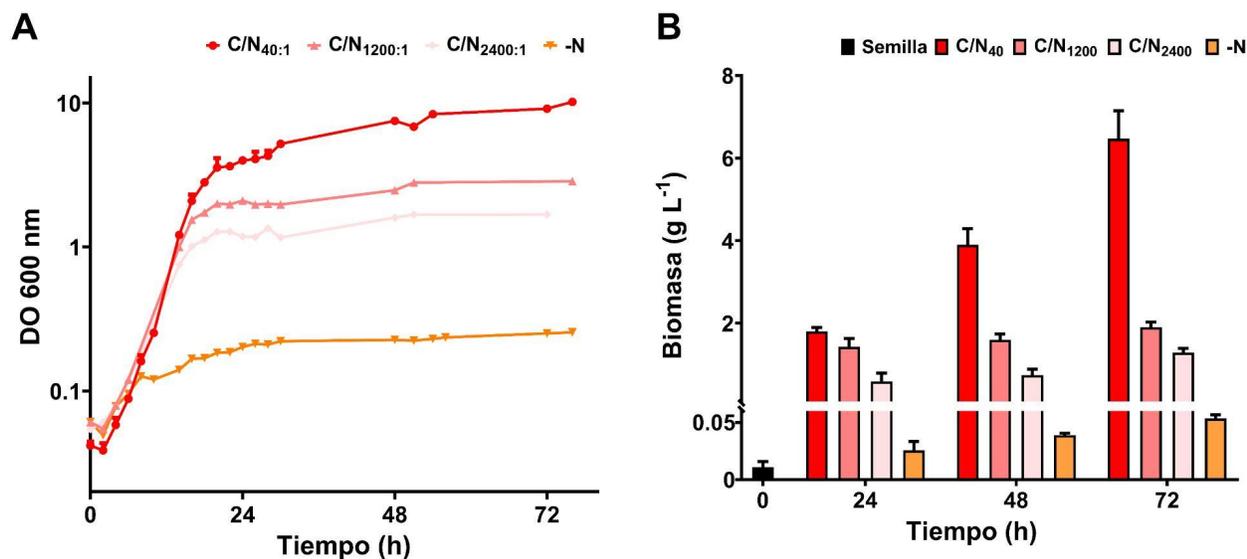


Figura 8. Curva de crecimiento y acumulación de biomasa de *R. mucilaginosa* M94C9 variando la relación carbono/nitrógeno. Las colonias cultivadas en placas de YPD refrigeradas se utilizaron para inocular medio rico durante la noche (semilla). Luego, el cultivo semilla se inoculó en diferentes proporciones de C/N (glucosa/amonio) en medio mínimo (MM) de la siguiente manera: 40:1 (0.5 % p/v de amonio), 1200:1 (0.016 % p/v de amonio), 2400:1 (0.008 % p/v de amonio) y -N (sin amonio). **A)** Las células se recogieron en MM C/N_{40} , MM C/N_{1200} , MM C/N_{2400} o MM -N y se siguieron las curvas de crecimiento durante más de 70 h. **B)** En estas condiciones, las células se recogieron a las 0, 24, 48 y 72 h para calcular el peso seco de la biomasa. N = 3, y los datos son la media \pm desviación estándar (DE).

Para corroborar lo observado en la curva de crecimiento, se determinó la biomasa por peso seco en las células cultivadas en las cuatro condiciones, partiendo de la biomasa inicial en el tiempo 0 h (**Figura 8B**). Al igual que en la curva de crecimiento, se observa que la disponibilidad de nitrógeno tiene un efecto en la producción de biomasa, ya que se reduce conforme decrece la concentración de nitrógeno en el medio. En C/N₄₀ se alcanzó una biomasa de hasta 6.5 g L⁻¹ a las 72 h de crecimiento, mientras que en -N se obtiene una biomasa de 0.05 g L⁻¹. En -N hay acumulación de biomasa más alta que la biomasa inicial a 0 h (0.0107 g L⁻¹). Así pues, *R. mucilaginosa* crece y acumula biomasa cuando es cultivada en limitación de nitrógeno, mientras que cuando es cultivada en inanición de nitrógeno, su crecimiento es bajo y acumula poca biomasa. Este resultado muestra que la disponibilidad de nitrógeno en el medio afecta al crecimiento y la producción de biomasa. Para fines prácticos, se seleccionaron las condiciones C/N₄₀ y -N como medios contrastantes en la producción de biomasa, los cuales se evaluaron para los siguientes experimentos.

7.2. La limitación de nitrógeno no ejerce efectos negativos sobre la viabilidad

Con el fin de evaluar si crecer bajo limitación o inanición de nitrógeno provoca la muerte de las células de levadura durante la inducción de la lipogénesis, se llevaron a cabo pruebas de viabilidad por goteo partiendo de células cultivadas en C/N₄₀ y -N durante la 24 y 72 h de crecimiento. Estas condiciones se seleccionaron por ser las más contrastantes. Los goteos se realizaron colocando diluciones seriadas 1:10 en medios YPD sólidos y se compararon con goteos de células provenientes del cultivo semilla (**Figura 9**). Como se puede observar, *R. mucilaginosa* cultivada por 24 y 72 h es viable cuando crece en C/N₄₀ (parte superior del panel) y -N (parte inferior del panel), ya que el crecimiento es similar si se compara con las células provenientes del cultivo semilla (tiempo 0 h) (**Figura 9a**). Conforme se realizan las diluciones seriales, no se observa una disminución significativa en la viabilidad. Las **figuras 9B** y **9C** muestran el seguimiento de la misma placa de la **figura 9A** con la finalidad de destacar el cambio de coloración con el paso del tiempo.

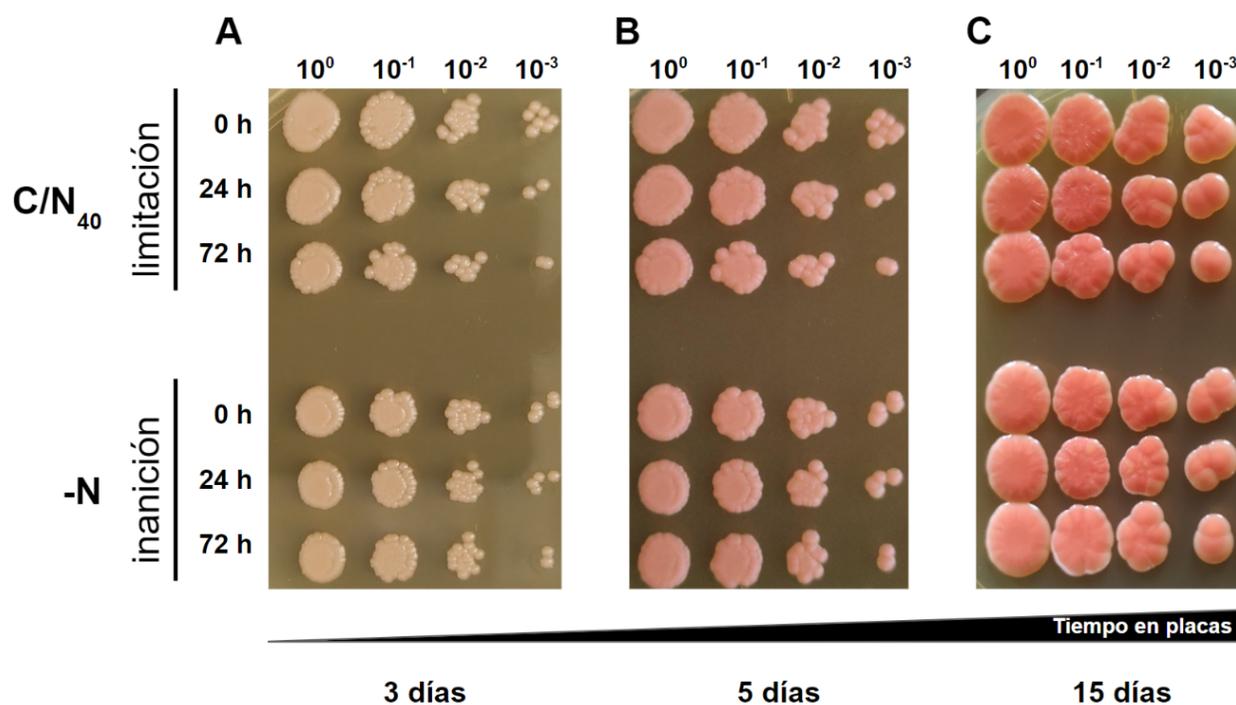


Figura 9. Prueba de viabilidad por goteo de *R. mucilaginosa* M94C9 cultivada en medios con diferentes concentraciones de nitrógeno durante la fase estacionaria. El tiempo 0 h corresponde a células provenientes del cultivo semilla. Se colectaron células cultivadas en medio C/N₄₀ y -N a las 24 y 48 h. A partir de una alícuota con DO_{600 nm} 0.5 se realizaron diluciones seriales 1:10. Las cajas se incubaron a 28 °C durante tres días, posteriormente se trasladaron a 4 °C donde permanecieron durante 15 días. Se observa la típica coloración rojiza de *R. mucilaginosa*.

7.3. *R. mucilaginosa* M94C9 acumula lípidos en limitación e inanición de nitrógeno

Una vez establecidas las condiciones de cultivo para el estudio y confirmada la viabilidad de las células cultivadas en dichas condiciones, se procedió a evaluar la capacidad de *R. mucilaginosa* para acumular lípidos en las mismas condiciones. Para ello, se cuantificó la producción de LDs empleando la sonda fluorescente BODIPY 493/503 mediante un enfoque multiparamétrico que combina tres técnicas diferentes: índice lipídico, citometría de flujo y microscopía confocal.

El índice lipídico es una técnica que permite monitorear la acumulación de lípidos neutros dentro de LDs sin la necesidad de extraer los lípidos. Esta técnica se basa en la detección de la fluorescencia relativa del colorante BODIPY 493/503, el cual muestra afinidad específica hacia los lípidos neutros (Romero-Aguilar *et al.*, 2018). Ya se ha descrito que la acumulación de lípidos se intensifica durante la fase estacionaria de crecimiento (Maza *et al.*, 2020). Por esta razón, el ensayo se realizó cuantificando la fluorescencia emitida en levaduras cultivadas en C/N₄₀ y -N durante la fase estacionaria de crecimiento (24, 48 y 72 h). Adicionalmente se procesaron muestras del tiempo 0 h (**Figura 10A**).

El índice lipídico sugiere que *R. mucilaginosa* acumula más lípidos neutros cuando es

cultivada en limitación e inanición de nitrógeno en contraste con las células colectadas a las 0 h (**Figura 10A**). Las células cultivadas en -N presentaron el índice lipídico más alto entre las condiciones evaluadas. La máxima acumulación de lípidos en -N se alcanzó a las 48 h de crecimiento. La acumulación de lípidos en C/N₄₀ es un poco menor que en -N, pero se observa que la tendencia es a aumentar la acumulación con el paso del tiempo.

Para confirmar el aumento de los lípidos neutros observados mediante el índice lipídico, se optó por realizar un ensayo de citometría de flujo empleando BODIPY 493/503 (**Figura 10B**). Para ello se colectaron muestras a las 0, 48 y 72 h de células cultivadas en los medios C/N₄₀ y -N. Se incluyeron también muestras colectadas a las 18 h con la finalidad de estudiar la acumulación de lípidos durante la fase de crecimiento exponencial o pre estacionaria.

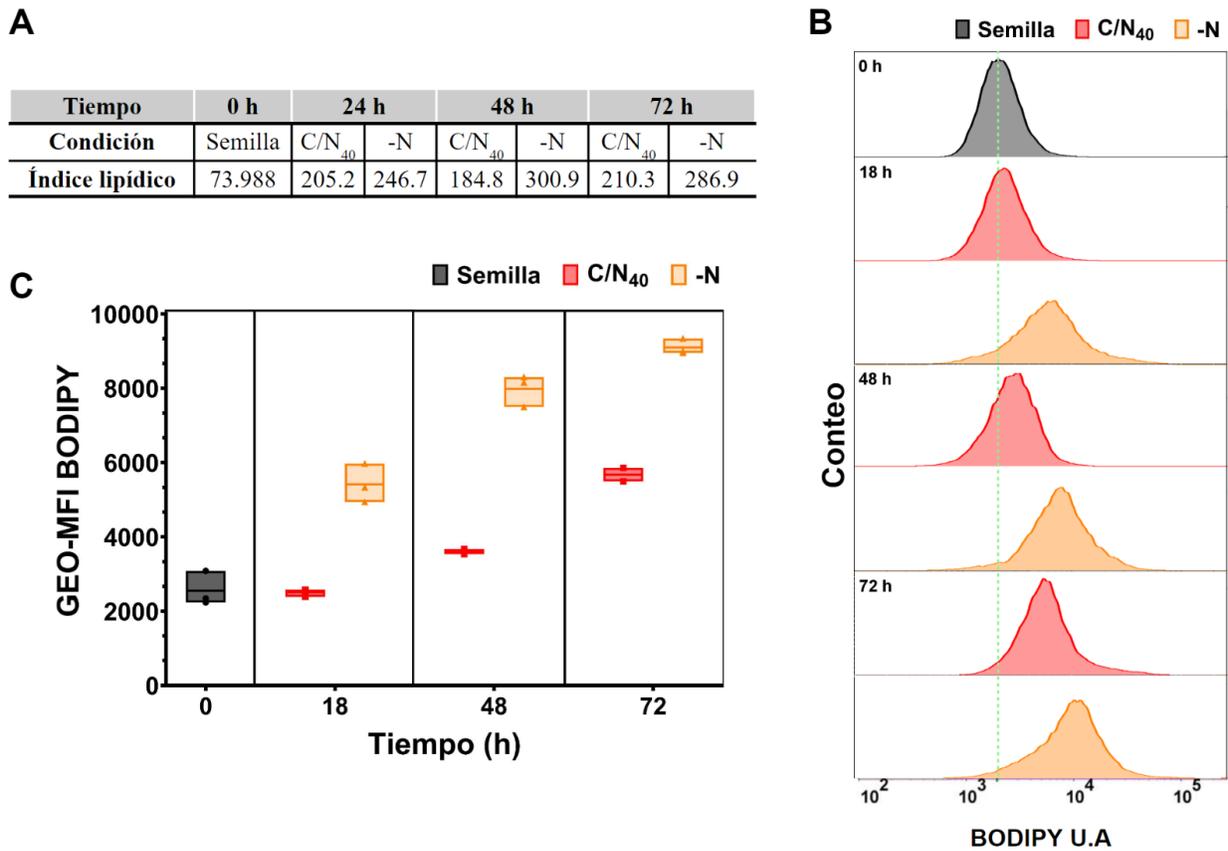


Figura 10. Dinámica de la acumulación de las gotas lipídicas en *R. mucilaginosa* M94C9 cultivada en C/N₄₀ y -N durante diferentes intervalos de tiempo. A) Determinación del índice lipídico en distintos intervalos de tiempo con el colorante BODIPY 493/503. B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo. En color negro, rojo y naranja se muestran los histogramas que expresan el parámetro de medición fluorescencia relativa de BODIPY 493/503 en el eje x y el número de eventos (conteo de células) en el eje y. El histograma muestra el desplazamiento del eje x, lo cual indica el aumento de la fluorescencia. C) Media geométrica de la intensidad de fluorescencia del colorante BODIPY (GEO-MFI-BODIPY) en las diferentes condiciones y tiempos. Se observa que en inanición de nitrógeno la fluorescencia es mayor que en limitación de nitrógeno, n = 3.

Este ensayo revela que el contenido de lípidos en las células cultivadas en C/N₄₀ durante el crecimiento exponencial (18 h) es similar al de la fase inicial de crecimiento (0 h) (**Figura 10B**). Sin embargo, a medida que las células de C/N₄₀ se aproximan a la fase estacionaria (48 h y 72 h), se observa un incremento en la fluorescencia, indicando un aumento en el contenido de lípidos. Por otro lado, también se puede observar que las células cultivadas en condiciones de inanición de nitrógeno (-N) presentan una mayor fluorescencia desde la etapa temprana de crecimiento (18 h), y esta intensidad aumenta hacia la fase estacionaria (48 h y 72 h). En la **figura 10C** se representa la media geométrica de la intensidad de fluorescencia de BODIPY 493/503 (GEO-MFI-BODIPY). La GEO-MFI-BODIPY permite calcular el valor típico de intensidad de fluorescencia de una población de células y es útil para evidenciar la tendencia de la distribución de la fluorescencia (Wu *et al.*, 2016). La **figura 10C** evidencia la tendencia de acumulación de lípidos en las células cultivadas en C/N₄₀ que puede observarse desde las 48 h de crecimiento. En esta condición, *R. mucilaginosa* alcanzó una GEO-MFI-BODIPY máxima de 5800 a las 72 h. Las células cultivadas en medio -N mostraron un aumento en la GEO-MFI-BODIPY desde las 18 h de crecimiento (5800), y a las 72 h el valor de la GEO-MFI-BODIPY (9000) fue el más grande

Estos resultados indican que en limitación e inanición de nitrógeno se induce la lipogénesis en *R. mucilaginosa*; no obstante, la acumulación de lípidos es más intensa en las células provenientes del medio -N, ya que desde las 18 h de cultivo se pudo apreciar un mayor contenido lipídico. Así pues, la tendencia mostrada por el índice lipídico es corroborada por citometría de flujo: *R. mucilaginosa* sintetiza una mayor cantidad de lípidos neutros cuando es cultivada en C/N₄₀ y -N durante la fase estacionaria de crecimiento. No obstante, el crecimiento de las células en el medio -N es menor.

7.4. Los cuerpos lipídicos son de mayor tamaño en las condiciones lipogénicas

Para observar la acumulación de lípidos neutros dentro de LDs se realizó un ensayo de microscopía confocal mediante la detección de BODIPY 493/503 (**Figura 11**). Para el ensayo también se utilizó el colorante Calcofluor-White para teñir la pared celular de *R. mucilaginosa*. Se colectaron muestras de *R. mucilaginosa* M94C9 cultivadas a las 0 h y 48 h en los medios C/N₄₀ y -N. Estas células se lavaron, fijaron con formaldehído e incubaron en una solución con KI y BODIPY 493/503. Posteriormente, las muestras se depositaron en un portaobjetos Silane-Prep (Sigma Co.) donde se les añadió Calcofluor White. Las preparaciones fueron visualizadas en el microscopio confocal como se describe en métodos. El análisis de microscopía confocal permitió observar pequeñas LDs que se forman en el espacio intracelular de *R. mucilaginosa* M94C9 en el tiempo 0 h (**Figura 11**, primera fila). En medio C/N₄₀ y -N se observó que las LDs aumentan de tamaño a las 48 h de cultivo (**Figura 11**, segunda y tercera fila). La micrografía de empalme (Merge) reveló que las LDs ocupan gran parte del citosol de las células cultivadas en condiciones lipogénicas. Por lo tanto, la biosíntesis de cuerpos lipídicos puede ser observada durante la fase estacionaria (48 h) de *R. mucilaginosa* M94C9 cuando es cultivada en medios con limitación de nitrógeno. Esto corrobora lo observado en los ensayos anteriores.

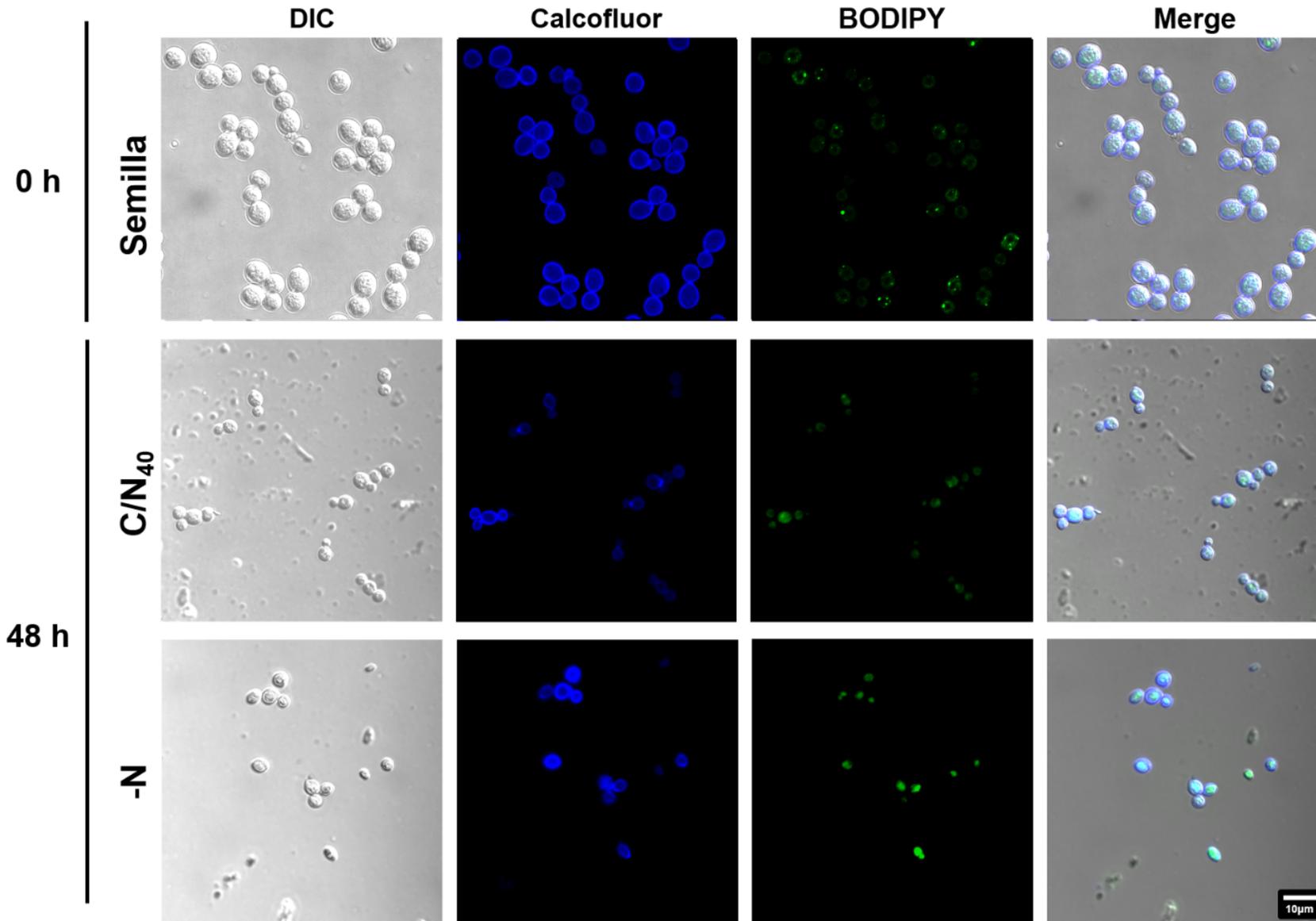


Figura 11. Detección de cuerpos lipídicos mediante microscopía confocal. El análisis revela que las LDs se fusionan y aumentan de tamaño en los medios C/N₄₀ y -N. Las células para tinción de lípidos neutros en el cultivo semilla y las condiciones C/N₄₀ o -N se colectaron a las 0 y 48 h. De izquierda a derecha: contraste de interferencia diferencial (DIC), Calcofluor, BODIPY y empalme de las señales de Calcofluor y Bodipy. Las barras de escala representan 10 µm.

7.5. El perfil de ácidos grasos revela la producción de C18:1, C16:0, C18:2 y C18:0

Con el fin de evaluar los ácidos grasos presentes en los triacilglicérols producidos por *R. mucilaginosa*, se determinó el perfil de ácidos grasos utilizando GC-MS. Debido a la poca producción de biomasa de células cultivadas en medio de inanición de nitrógeno (-N), se decidió obtener el perfil de ácidos grasos utilizando células colectadas en los tiempos 0 h y 48 h en medio con relación carbono/nitrógeno de 40 (C/N₄₀).

El perfil de ácidos grasos permitió identificar que la composición de ácidos grasos de *R. mucilaginosa* M94C9 se enriquece con ácido oleico (C18:1), ácido palmítico (C16:0), ácido linoleico (C18:2) y ácido esteárico (C18:0) a las 0 y 48 h en medio C/N₄₀ (**Tabla 3**). En ambas condiciones estudiadas el porcentaje más alto fue de C18:1 (54.4 y 60.8 %), seguido de C16:0 (19.2 y 20.7 %), C18:2 (9.7 y 6.6 %) y finalmente por C18:0 (8.3 y 5.3 %).

Tabla 3. Perfil de ácidos grasos de *R. mucilaginosa* M94C9 a 0 h y 48 h en medio C/N₄₀

Condición	Porcentaje de ácidos grasos (%)											
	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1		C17:0	C18:1		C18:2	γC18:3	αC18:3	C20:0
				n-9		C18:0	n-9	n-6		n-6	n-3	
0h	1.2	1.0	19.2	0.4	0.5	8.3	54.4	9.7	0.4	4.6	0.5	
48 h	1.3	0.5	20.7	0.6	0.1	5.3	60.8	6.6	0.1	3.7	0.4	

Por otro lado, la cuantificación de ácidos grasos en ng/mg de proteína revela que la cantidad de ácidos grasos se incrementa a las 48 h en C/N₄₀ con respecto al tiempo 0 h (**Figura 12**). Los incrementos más notables corresponden a C18:1, C16:0, C18:0, C18:2 e incluso C18:n3. Tan solo con respecto al ácido oleico se percibe un incremento de 3.3 veces a las 48 h en C/N₄₀ (**Figura 12**). Mientras que el ácido palmítico, linoleico y esteárico exhiben un incremento de 3.2, 2, y 1.9 veces más, respectivamente. Otros ácidos como el C16:1, C14:0 y el αC18:3 n-3 muestran un incremento considerable, no obstante, representan un porcentaje mínimo de los ácidos grasos acumulados en las condiciones experimentales (**Tabla 4**).

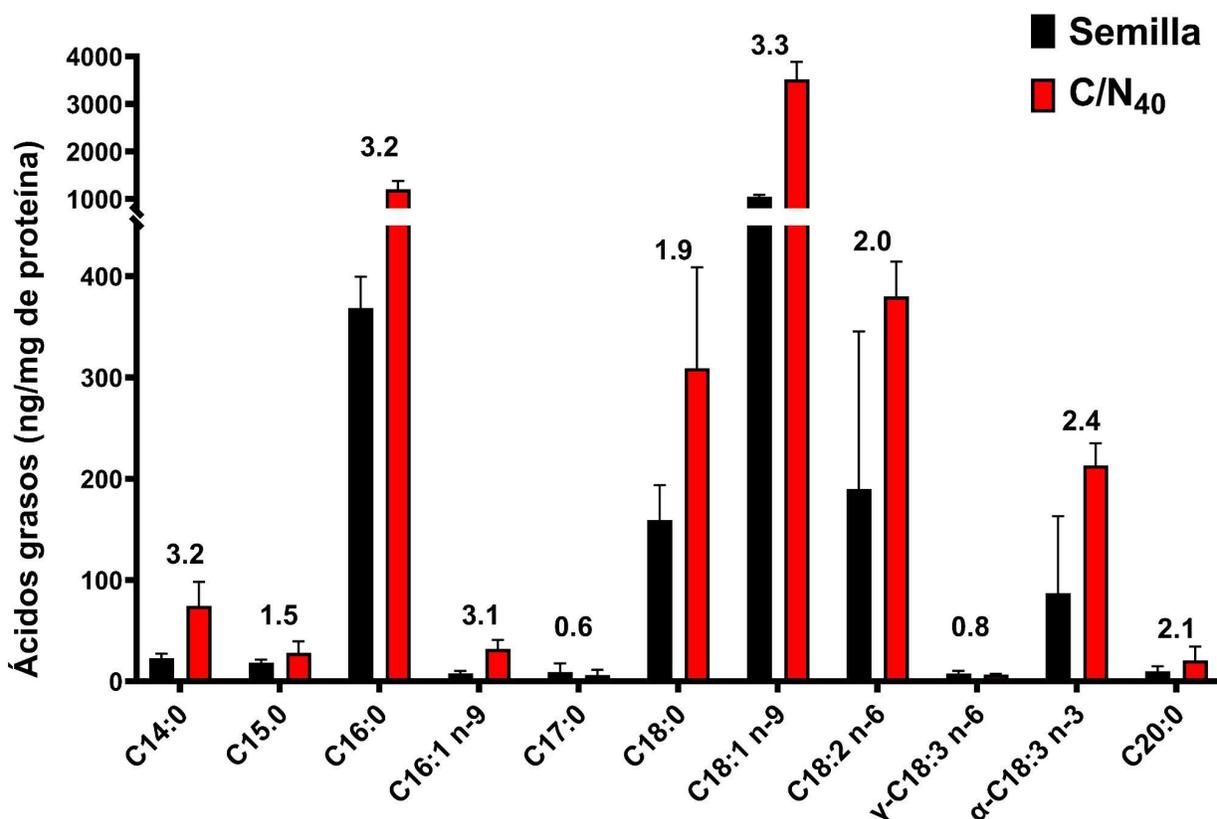


Figura 12. Perfil de ácidos grasos de *R. mucilaginosa* M94C9 cultivada a las 0 y 48 h en C/N₄₀. A) Comparación de la cantidad de ácidos grasos (ng/mg de proteína) entre el cultivo semilla (0 h) (barras negras) y la fase estacionaria (48 h) (barras rojas) en C/N₄₀. Los números sobre las barras indican el porcentaje de cambio entre las células provenientes del cultivo semilla y células cultivadas durante 48 h en C/N₄₀. El porcentaje de cada ácido graso se indica mediante C14:0 (ácido mirístico), C15:0 (ácido pentadecanoico), C16:0 (ácido palmítico), C17:0 (ácido heptadecanoico), C18:0 (ácido esteárico), C18:1 n-9 (ácido oleico), C18:2 n-6 (ácido linoleico), γ-C18:3 n-6 (ácido γ-linolénico), α-C18:3 n-3 (ácido α-linolénico) y C20:0 (ácido araquidónico).

7.6. Análisis de la expresión genética de *RmACL* y actividad enzimática de la Acl

La ATP-citrato liasa es considerada una enzima clave dentro de la vía de síntesis de lípidos. Previamente se ha descrito que su actividad se asocia a la acumulación de lípidos en condiciones de limitación de nitrógeno en levaduras oleaginosas (Papanikolaou y Aggelis, 2011). Por lo tanto, es imperativo evaluar la expresión de este gen en *R. mucilaginosa* y relacionar su expresión con el fenómeno de acumulación de lípidos en las condiciones estudiadas.

Para poder analizar el perfil de expresión del gen *RmACL* de *R. mucilaginosa* M94C9 se extrajo RNA total de células cultivadas durante 0, 18 y 48 h en medios C/N₄₀ y -N. La integridad de los RNA se comprobó mediante un gel desnaturante, posteriormente la muestra fue tratada con DNasa y finalmente convertida a cDNA. La cuantificación de la expresión genética se realizó mediante qPCR por el método de curva estándar y los datos se normalizaron contra el gen *ACT1* como se describe en métodos. El análisis de expresión del gen *RmACL* muestra aumento de la expresión en las condiciones lipogénicas (C/N₄₀ y -N) en comparación con el tiempo 0, en

cuyo caso se observa expresión baja (**Figura 13A**). En C/N₄₀ se observa un aumento en la expresión en el transcurso de 18 a 48 h, lo que coincide con la inducción de la lipogénesis observada previamente en este trabajo. Por otro lado, en -N se puede observar lo contrario; la expresión de *RmACL* es mayor a las 18 h de crecimiento y se reduce a las 48 h de cultivo.

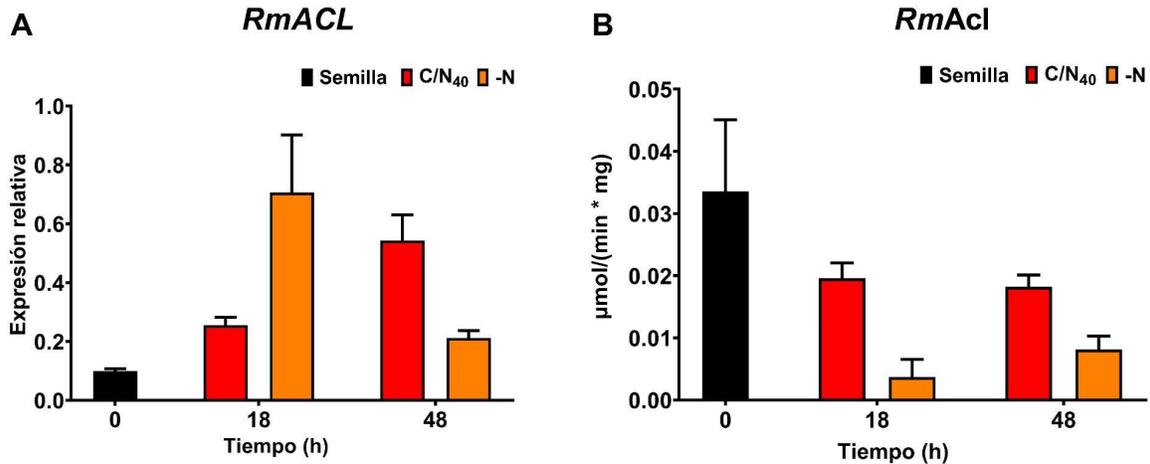


Figura 13. Expresión génica de *RmACL* y actividad enzimática de la Acl en condiciones con diferentes concentraciones de nitrógeno. El RNA y los extractos de proteína provienen de las células del cultivo semilla (0 h) y de células cultivadas en C/N₄₀ o -N durante 18 h y 48 h. El RNA total fue usado para analizarlo mediante RT-qPCR, mientras que el extracto de proteínas para determinar la actividad de la ATP-citrato liasa (Acl). Los datos obtenidos de las transcripciones se normalizaron frente al nivel de expresión del gen de actina (*RmACT1*). **A)** Muestra los datos de expresión en el gráfico de barras a las 0 h (semilla, barras negras), 18 y 72 h de cultivo en C/N₄₀ (barras rojas) o -N (barras naranjas). **B)** Muestra los datos de actividad específica de la Acl en el gráfico de barras a las 0 h (semilla, barras negras), 18 y 72 h de cultivo en C/N₄₀ (barras rojas) o -N (barras naranjas). Las barras de error indican la desviación estándar (DE) de al menos cuatro réplicas biológicas y dos réplicas técnicas (N = 8).

Para evaluar si existe correlación entre el perfil de expresión de *RmACL* y la actividad enzimática de la Acl, se determinó la actividad específica de la Acl de *R. mucilaginosa* cultivada en medio C/N₄₀ y -N durante el tiempo 0, la fase exponencial de crecimiento (18 h) y la fase estacionaria (48 h). El método se basa en la detección del cambio de la absorbancia a 340 nm por la oxidación del NADH cuando el oxalacetato formado por la Acl es reducido a malato por la malato deshidrogenasa. El ensayo revela que *RmACL* se encuentra más activa en los tiempos 0, 18 y 48 h cuando *R. mucilaginosa* crece en C/N₄₀ (**Figura 13B**). Por otro lado, en medio -N se observa que la actividad de la Acl tanto en la fase exponencial como en la fase estacionaria, es baja. Así pues, el perfil de expresión de *RmACL* es opuesto a la actividad enzimática durante etapas tempranas de crecimiento (0 o 18 h), mientras que en fase estacionaria (48 h) es similar en ambas condiciones (C/N₄₀ o -N).

7.7. Determinación del arreglo nucleosómico de la región intergénica 5' UTR del gen *RmACL*

Varios estudios coinciden en que la expresión del gen *ACL* aumenta durante la lipogénesis inducida por la limitación de nitrógeno en las OYs. Los resultados del análisis de la expresión del gen *RmACL* muestran que este gen está activo a nivel transcripcional en las primeras etapas de crecimiento de la levadura bajo las condiciones de estudio. Para determinar el papel de la estructura de la cromatina en la regulación diferencial de la expresión de *RmACL*, se llevó a cabo, de manera preliminar, un análisis del posicionamiento de los nucleosomas en el promotor del gen en células obtenidas tanto del cultivo semilla (0 h) como de células cultivadas durante 18 h en el medio C/N₄₀. A partir de los cultivos mencionados, se realizaron ensayos de escaneo de nucleosomas (NuSA) como describe González, *et al.* (2017), que consisten en tratar células con formaldehído, digerir la pared para obtener los esferoplastos e incubarlos con MNasa para separar las regiones de DNA no protegidas por nucleosomas. Posteriormente, se aislaron fragmentos de DNA de aproximadamente 150 pb, que corresponden a los mononucleosomas (ver **figura S1**), como se describe en materiales y métodos. El DNA obtenido se utilizó para evaluar la protección relativa en cada promotor bajo ambas condiciones mediante ensayos de qPCR. La cuantificación se basó en la relación entre el DNA digerido por MNasa y el DNA no digerido en la región protegida del gen control *RmVCXI*. Utilizando este enfoque, se identificaron picos de protección relativa contra la MNasa, así como la región libre de nucleosomas (NFR) en el promotor de *RmACL*. De esta forma, se logró obtener la protección relativa del promotor de *RmACL* (**Figura 14**).

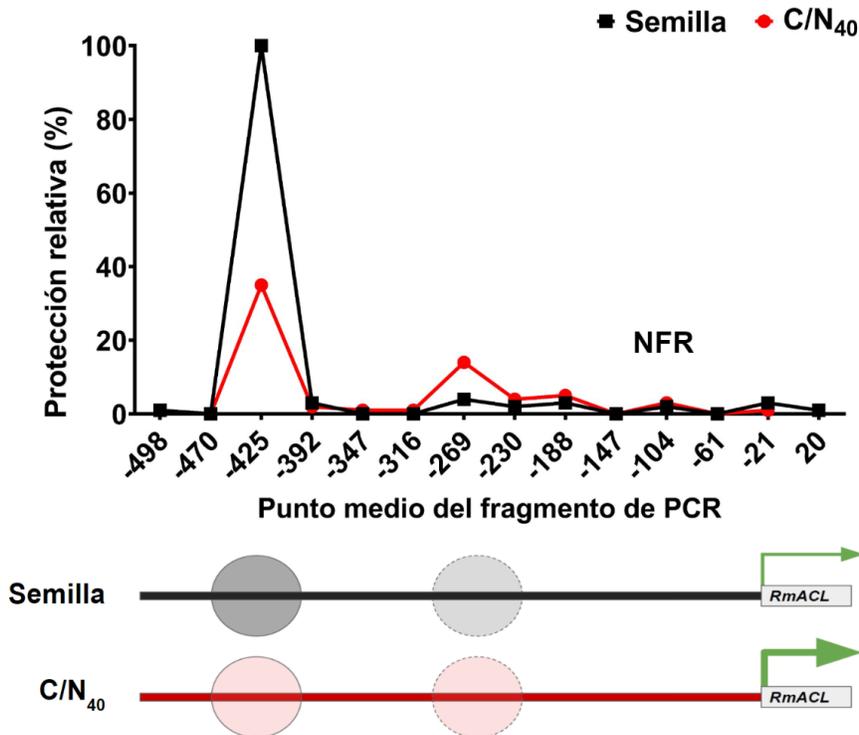


Figura 14. Protección relativa del gen *RmACL* durante la fase logarítmica (18 h) en C/N_{40} . El ensayo de escaneo de nucleosomas (NuSA) se llevó a cabo en células provenientes del cultivo semilla (0 h) y las cultivadas en medio C/N_{40} para determinar la protección relativa del gen *RmACL*. El DNA mononucleosómico se preparó y analizó mediante qPCR usando oligonucleótidos que se sobreponen uno enseguida del otro cada 50 pb aproximadamente, cubriendo el UTR 5' del gen *RmACL*. La protección relativa a MNasa de cada muestra se calculó con el valor obtenido de la región del gen control *RmVCXI*. Cada punto en la gráfica corresponde al punto medio de cada producto de PCR desde la coordenada -498 hasta la coordenada +20. La región desprovista de nucleosomas se denota como NFR. El esquema inferior a la gráfica representa las regiones estudiadas del gen, que indica la presencia de nucleosomas con óvalos negros (0 h) y rojos (C/N_{40} cultivadas durante 18 h). La intensidad de las flechas verdes indica el nivel de expresión del gen en las respectivas condiciones (mayor intensidad indica mayor expresión). Los datos corresponden a 2 réplicas biológicas con 2 réplicas técnicas (n=4).

El análisis de NuSA (**Figura 14**) revela que la presencia de nucleosomas en el promotor de *RmACL* es relativamente escasa. Durante el período estudiado (0 y 18 h), se identificaron dos nucleosomas posicionados en la región promotora de *RmACL*: uno cerca de las coordenadas -425 y otro en la coordenada -269. Es relevante mencionar que esta región parece estar más protegida a las 0 h de cultivo. Estos nucleosomas se han denominado como -2 y -1, respectivamente, debido a su proximidad al codón de inicio (ATG). Río arriba del nucleosoma -1, se observa una región libre de nucleosomas (NFR) que se extiende en dirección al ATG. Esta observación sugiere que la expresión de *RmACL* podría estar regulada mediante la remodelación de la cromatina. Para validar esta hipótesis, sería necesario llevar a cabo estudios en condiciones en las que la expresión de *RmACL* esté disminuida (p. ej. 48 h en -N). Sin embargo, es importante destacar que esto se encuentra más allá del alcance del presente trabajo.

7.8. Análisis de la expresión genética de los genes involucrados en la vía de síntesis de lípidos

Otros genes importantes dentro de la vía de síntesis de lípidos son: *ACCI* (síntesis del precursor malonil-CoA a partir de la acetil-CoA), *FAS1/FAS2* (síntesis de palmitato y estearato activados por CoA) y *DGAI* (síntesis de TAGs). La expresión al alza de estos genes en condiciones de limitación de nitrógeno ha sido reportada previamente (Zhu, *et al.*, 2012).

Para evaluar los cambios en la expresión de estos genes involucrados en la vía de síntesis de lípidos, se estudió la expresión en células colectadas a los tiempos 0, 18 y 48 h en medio C/N₄₀ y -N.

El perfil de expresión revela que la expresión de la mayoría de los genes aumenta después de las 18 h de crecimiento en las condiciones lipogénicas (**Figura 15**). Es importante señalar que aquellas células cultivadas en medio C/N₄₀ exhiben un aumento en su expresión genética a partir de las 18 h de crecimiento, pero el incremento es más evidente a las 48 h de cultivo (**Figura 15A-D**). Por otro lado, las células provenientes del medio -N muestran mayor expresión a las 18 h de crecimiento, pero también presentan reducción de la expresión hacia las 48 h (**Figura 15A-C**). La expresión del gen *RmDGAI* parece ser la única excepción a este patrón, ya que su expresión a las 48 h no muestra una reducción en comparación a las 18 h. Estos resultados coinciden con lo observado mediante el índice lipídico, citometría de flujo y microscopía confocal, donde se demostró que la lipogénesis se induce desde las 18 h y se intensifica a las 48 h de crecimiento. Asimismo, destacan la expresión sostenida de *RmDGAI* desde las 18 h de crecimiento hasta las 48 h en ambas condiciones lipogénicas.

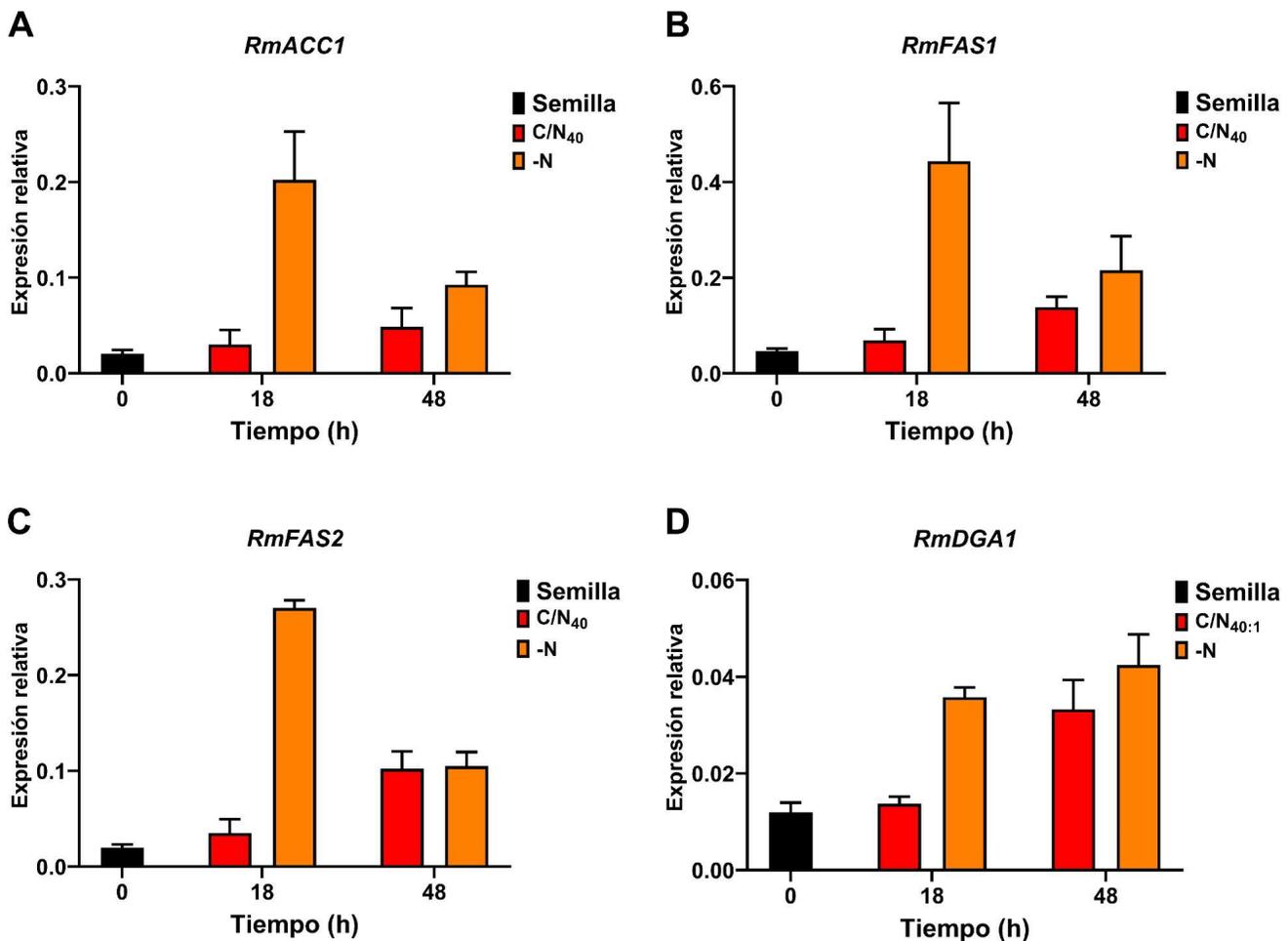


Figura 15. Comparación de la expresión relativa de distintos genes involucrados en la vía de síntesis de lípidos en limitación e inanición de nitrógeno. Se extrajo el RNA total de las células del cultivo semilla (0 h) y de células cultivadas en C/N₄₀ o -N durante 18 h y 48 h para analizarlos mediante RT-qPCR. Los datos obtenidos de las transcripciones se normalizaron frente al nivel de expresión del gen de actina (*RmACT1*). Los datos de expresión se muestran en gráficos de barras, donde las 0 h (semilla, barras negras), 18 h y 72 h de cultivo en C/N₄₀ (barras rojas) o -N (barras naranjas). **A)** Expresión relativa de *RmACC1*. **B)** Expresión relativa de *RmFAS1*. **C)** Expresión relativa de *RmFAS2*. **D)** Expresión relativa de *RmDGA1*. Las barras de error indican la desviación estándar (DE) de al menos cuatro réplicas biológicas y dos réplicas técnicas (N = 8).

7.9. La reacción de transesterificación del aceite muestra una alta eficiencia de conversión de TAGs a FAEEs

Con la finalidad de establecer un enfoque para evaluar el potencial biotecnológico de *R. mucilaginosa* M94C9 en la producción de lípidos aptos para la generación de biodiésel, se cultivaron células en un medio lipogénico utilizado a escala industrial (Niehus, *et al.*, 2018). El medio de cultivo fue definido como C/N₈₀, el cual está constituido por los siguientes componentes: 23 g L⁻¹ glucosa, 0.3 g L⁻¹ peptona, 0.5 g L⁻¹ extracto de levadura, 7 g L⁻¹ KH₂PO₄,

2 g L⁻¹ Na₂HPO₄·7H₂O y 1.5 g L⁻¹ MgSO₄. Se extrajeron los lípidos de las células cultivadas durante 72 h. El aceite extraído fue tratado con la lipasa comercial 435 Novozymes durante 48 h a temperatura constante de 45 °C. La cantidad de lípidos totales se determinó por métodos gravimétricos y se normalizó por peso seco. De esta forma, se encontró que *R. mucilaginosa* M94C9 produce cerca de 1.81 g L⁻¹ de lípidos en la condición evaluada (**Figura 16A**).

Para comprobar la conversión de TAGs a ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEEs), se realizó un ensayo de cromatografía de capa fina (TLC). Se compararon muestras de aceite al inicio de la reacción (0 h de reacción) y al finalizar la reacción (48 h de reacción) (**Figura 16B**). También se colocó una mezcla de estándares que contenía monoacilgliceroles (MAGs), diacilgliceroles (DAGs), triacilgliceroles (TAGs), ácido oleico y metil oleato.

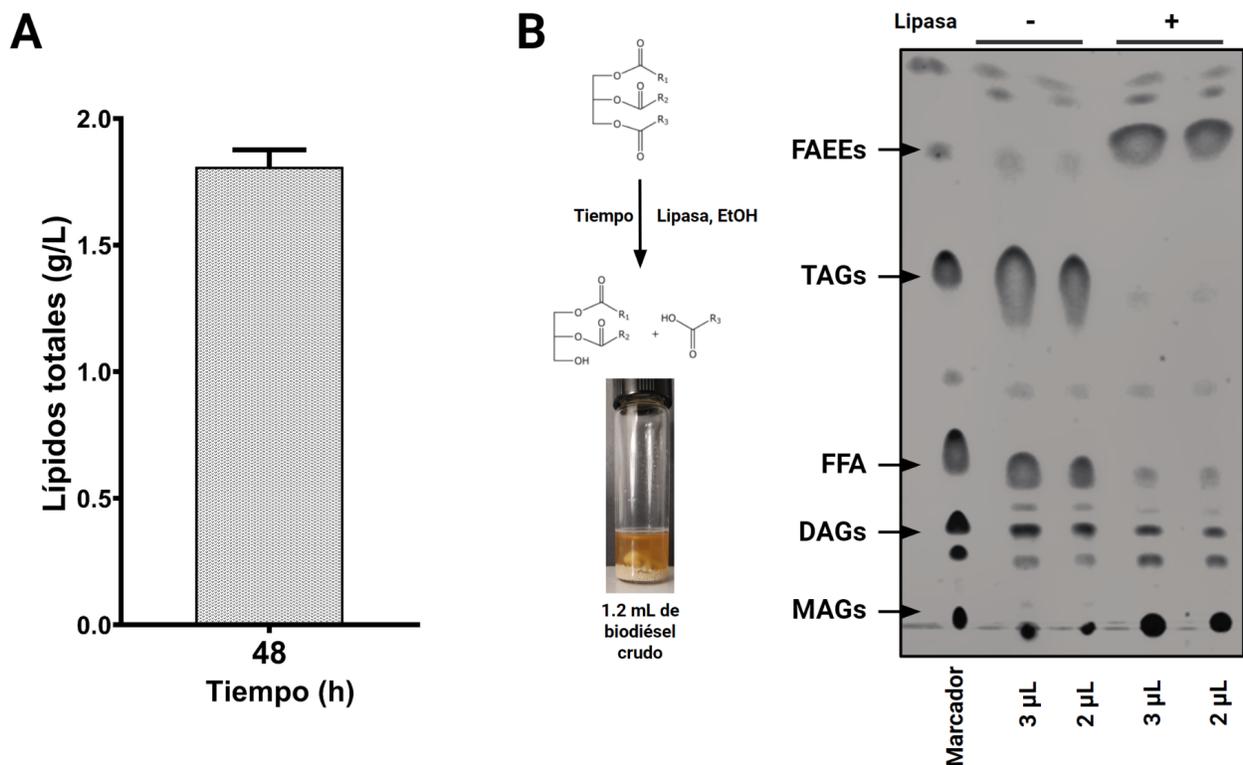


Figura 16. Cuantificación de lípidos de *R. mucilaginosa* M94C9 y TLC de muestras de aceite tratadas con la lipasa 435 Novozymes (reacción de transesterificación). Las células fueron cultivadas en una condición lipogénica (C/N₈₀) empleada en la industria y sus lípidos fueron extraídos a las 48 h de crecimiento utilizando una mezcla de HCl y cloroformo. Los lípidos se determinaron por peso seco. Después, la muestra de aceite fue transesterificada durante 48 h utilizando la lipasa 435 Novozymes y etanol para la alcoholólisis de triacilgliceroles. Para validar la conversión de TAGs a FAEEs se llevó a cabo una cromatografía de capa fina (TLC). **A**) Lípidos totales por peso seco a las 48 h. **B**) TLC de las muestras de aceite en diferentes intervalos de la reacción. La primera columna representa un marcador. La segunda y tercera columna son muestras de aceite al tiempo 0 h de la reacción de transesterificación (2 y 3 uL). La cuarta y quinta columna son muestras de aceite después de 48 h de reacción (2 y 3 uL). Se observa que el contenido de TAGs al tiempo 0 h de reacción es convertido a FAEEs a las 48 h.

La TLC de la **Figura 16B** revela que el aceite extraído posee una amplia variedad de lípidos que incluyen MAGs, DAGs, FFA, TAGs y FAEEs en menor proporción. Después de 48 h de reacción la mayoría de los TAGs encontrados en la muestra de aceite al inicio (**Figura 16B**, columna 2 y 3) se convirtieron en FAEEs al término de la reacción (**Figura 16B**, columna 4 y 5). Esto muestra, al menos cualitativamente, que el porcentaje de conversión de TAGs a FAEEs fue alto. Se estima que el porcentaje de conversión de TAGs a FAEEs es de al menos 93 %. Este resultado indica que los triacilgliceroles producidos por *R. mucilaginosa* pueden ser convertidos a biodiésel con una eficiencia alta. Sin embargo, es importante destacar que la evaluación de otros parámetros del combustible se encuentra más allá del alcance de este trabajo.

7.10. Exploración del potencial biotecnológico de la producción de carotenoides en *R. mucilaginosa* M94C9

En las condiciones lipogénicas investigadas en este estudio, se ha demostrado que *R. mucilaginosa* M94C9 es capaz de producir lípidos, especialmente durante la fase de crecimiento cercana a la estacionaria. Además, se pudo observar la acumulación de carotenoides que es una característica distintiva de las levaduras pertenecientes al género *Rhodotorula*. Por lo tanto, resultó de interés investigar la acumulación de carotenoides en las condiciones lipogénicas estudiadas (C/N₄₀ y -N).

La primera aproximación que se realizó fue determinar cualitativamente la acumulación de carotenoides en las condiciones lipogénicas establecidas (**Figura 17**). Para ello, se colectaron células cultivadas durante 0, 18, 24, 48 y 72 h en medio C/N₄₀ y -N.

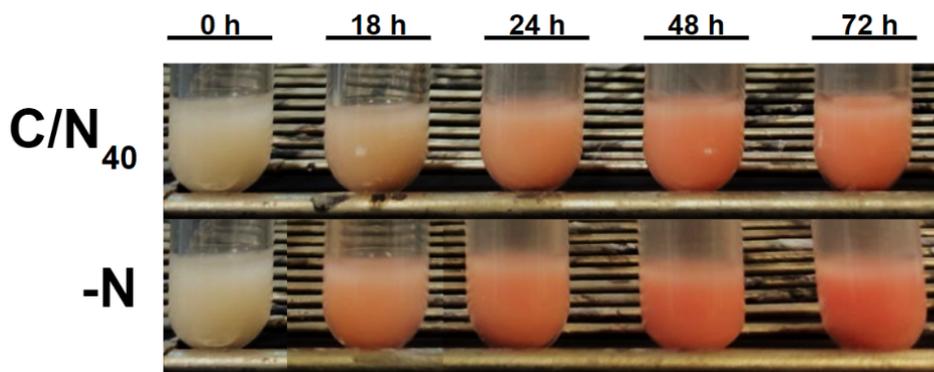


Figura 17. Análisis cualitativo de la producción de carotenoides en medios con diferente disponibilidad de nitrógeno. Muestras de células del cultivo semilla (0 h) y células cultivadas en medio C/N₄₀ y -N fueron colectadas en diferentes intervalos (0, 18, 24, 48 y 72 h). Se observa que en ambas condiciones lipogénicas hay un incremento en la producción de carotenoides con respecto al tiempo 0 h. La producción es más intensa en aquellas células cultivadas en el medio -N.

Como se puede observar en la **figura 17**, la coloración de las células aumenta a medida que transcurre el tiempo; las provenientes del tiempo 0 h exhiben una coloración blanquecina. Cuando se cultivan en condiciones de limitación o inanición de nitrógeno, aparece una

coloración que va desde un tono rosado hasta un tono rojizo. Al igual que con la acumulación de lípidos, se observó un aumento en la intensidad de la coloración en las células cultivadas en la condición -N a partir de las 18 horas de cultivo. La intensidad de la coloración en C/N₄₀ fue más evidente a las 48 h. Por lo tanto, la evidencia sugiere que la síntesis de carotenoides también se potencia en condiciones de limitación e inanición de nitrógeno.

Una vez confirmada cualitativamente la acumulación de carotenoides en las condiciones lipogénicas, se investigó la expresión de los genes involucrados en la vía de síntesis de carotenoides. Para ello, se utilizaron los oligonucleótidos previamente reportados para los genes *CARO* y *CARI* en el estudio realizado por Landolfo y colaboradores (2018). Estos genes codifican para la carotenoide dioxigenasa y la fitoeno desaturasa, respectivamente. La carotenoide dioxigenasa desempeña un papel importante en la vía de síntesis de carotenoides al mantener la homeostasis de la acumulación de carotenoides en la célula, evitando posibles daños causados por un exceso de carotenoides. Por otro lado, la fitoeno desaturasa está involucrada en la síntesis de β -caroteno.

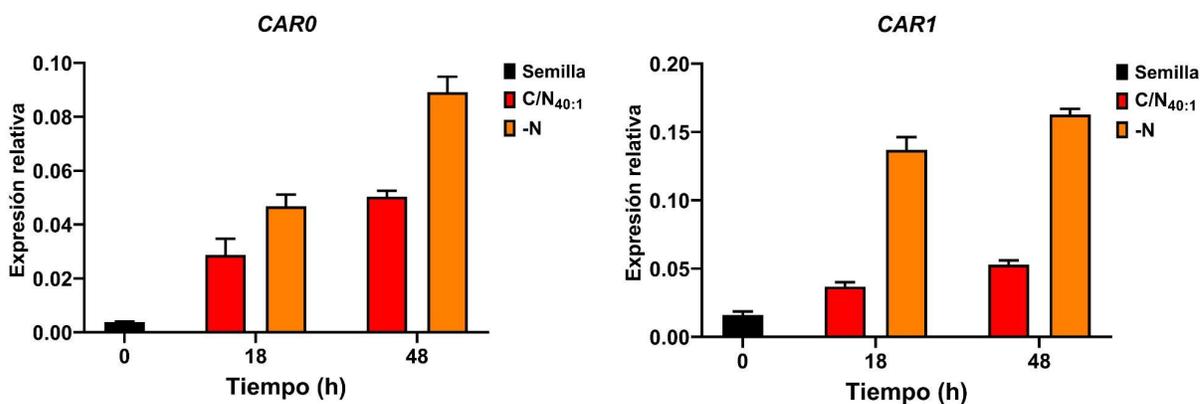


Figura 18. Comparación de la expresión relativa de distintos genes involucrados en la vía de síntesis de carotenoides en limitación e inanición de nitrógeno. A) Expresión relativa de *RmCARO*. B) Expresión relativa de *RmCARI*. El análisis de expresión permite evidenciar que en las condiciones lipogénicas se expresan los genes involucrados en la vía de síntesis de carotenoides.

El perfil de expresión de *CARO* (codificante para la carotenoide dioxigenasa) y *CARI* (codificante para la licopeno desaturasa) muestra que ambos genes aumentan en las condiciones lipogénicas estudiadas (**Figura 18**). En primer lugar, se observa que en el tiempo 0 h la expresión de *CARO* y *CARI* es baja (**Figura 18A-B**); esto correlaciona con la coloración mostrada en la **figura 17**. Por otro lado, en ambas condiciones lipogénicas se observa un aumento en la expresión de estos genes a las 48 h con respecto a las 18 h. Se destaca que el gen *CARO* muestra un aumento significativo de su expresión a las 48 h de cultivo en ambas condiciones lipogénicas, siendo en el medio -N donde se observó un incremento más pronunciado (**Figura 18A**). Por otro lado, se observó que la expresión de *CARI* en el medio C/N₄₀ mostró un aumento a las 18 y 48 h en comparación con el tiempo 0 h (**Figura 18B**). Sin

embargo, la expresión de este gen fue significativamente más alta en la condición de limitación de nitrógeno (-N) en los mismos intervalos de tiempo. El aumento en la expresión de *CAR0* y *CAR2* se correlaciona con el aumento en la producción de pigmentos detectados con anterioridad.

8. Discusión

8.1. La disponibilidad de nitrógeno ejerce un efecto en el crecimiento y la acumulación de biomasa, pero no en la viabilidad de *R. mucilaginosa* M94C9

Con anterioridad se ha señalado que bajo limitación de nitrógeno muchos organismos oleaginosos cambian sus patrones de almacenamiento de carbono a favor de la acumulación de lípidos neutros, siendo esta la actividad metabólica predominante bajo dicho estrés nutricional (Calvey *et al.*, 2016; X. Wang *et al.*, 2019). Sin embargo, la acumulación de lípidos no es un fenómeno aislado de los demás procesos biológicos presentes en la célula, pues al menos en estas condiciones las células deben lidiar con la limitación de una fuente de nitrógeno. El nitrógeno es un nutriente esencial para la síntesis de varias biomoléculas que incluyen nucleótidos, aminoácidos, poliaminas, glutatión y muchos otros compuestos biológicos críticos (Kurmi y Haigis, 2020). Por lo tanto, su disponibilidad es esencial para la síntesis de moléculas más complejas, el crecimiento y la acumulación de biomasa (Yaakob *et al.*, 2021).

Se ha reportado que, en respuesta a la limitación de nutrientes como el nitrógeno, las levaduras sufren un arresto del ciclo celular y entran en un estado reversible de reposo denominado quiescencia o G_0 , generalmente en la fase G_1 temprana del ciclo celular. Este fenómeno se asocia también con la fase estacionaria (An *et al.*, 2014; Gasch y Werner-Washburne, 2002; Laporte *et al.*, 2011; Makarenko *et al.*, 2020; Su *et al.*, 1996). Como consecuencia, se presenta una reducción de la síntesis de proteínas, acumulación de glucógeno y otras moléculas de almacenamiento (lípidos), expresión de un conjunto de genes, inducción de autofagia, etc. (Kamada *et al.*, 2004). Asimismo las células dejan de proliferar y su tamaño no incrementa (Su *et al.*, 1996).

Los resultados obtenidos a partir de la curva de crecimiento y la acumulación de biomasa (**Figura 8**) indican que la limitación de nitrógeno provoca la reducción de la proliferación y el crecimiento de *R. mucilaginosa* M94C9. En C/N_{40} la presencia de nitrógeno permite que las células proliferen y crezcan adecuadamente incluso después de las 48 h; de hecho, cerca de las 72 h de crecimiento se hace evidente la reducción en el crecimiento y cese de las divisiones celulares. Esto se debe muy probablemente a que la fuente de nitrógeno se agotó y las células entraron en un estado quiescente propio de la fase estacionaria (Sun y Gresham, 2021). Este fenómeno también puede ser observado en las células cultivadas en C/N_{1200} y C/N_{2400} , en las que se observa que incluso la biomasa no continúa incrementando. Por otro lado, las células cultivadas en -N entraron en quiescencia más temprano, en cuyo caso se observa que las

divisiones celulares se detienen desde etapas tempranas de crecimiento (cerca de las 24 h de crecimiento).

También se ha reportado que las células arrestadas en G_0 pueden sobrevivir durante meses en un medio de cultivo con limitación o inanición de nitrógeno, lo que denota una gran capacidad de resistencia al estrés (Sajiki *et al.*, 2013). La capacidad de estas células para retomar el ciclo celular y entrar en mitosis es una de las principales diferencias del estado quiescente y un estado senescente (reposo no proliferativo) (Sun y Gresham, 2021). Nuestros resultados de viabilidad sugieren que *R. mucilaginosa* M94C9 puede recuperar su estado proliferativo después de ser cultivada en limitación (C/N_{40}) e inanición de nitrógeno (-N) hasta 72 h (**Figura 9**). Esto muestra la capacidad de la levadura para resistir el estrés por deprivación nutricional de nitrógeno como respuesta adaptativa y así volver al ciclo celular en condiciones más adecuadas (p. ej. la abundancia de nutrientes en el medio YPD) (Roche *et al.*, 2017).

8.2. *R. mucilaginosa* M94C9 es una levadura oleaginosa

La acumulación de lípidos *de novo* en las OYs es promovida por un desequilibrio en su metabolismo debido a la falta de algunos nutrientes en el medio de crecimiento (Robles-Iglesias *et al.*, 2023). Algunos de ellos pueden ser fosfato, zinc, hierro, manganeso o magnesio (Kolouchová *et al.*, 2016). Particularmente se ha señalado que en condiciones con limitada disposición de nitrógeno y con una abundante fuente de carbono, es decir, con relaciones de C/N altas, la acumulación puede mejorar sustancialmente (Poontawee *et al.*, 2023). Las relaciones C/N altas ocasionan un cambio en el flujo metabólico que detiene el crecimiento y favorece la producción de lípidos que finalmente son depositados dentro de LDs

Con la finalidad de explorar la acumulación de lípidos en *R. mucilaginosa* M94C9, en este trabajo se utilizaron condiciones con C/N variable que fueron establecidas en función de la concentración de nitrógeno variable. En concordancia con los resultados obtenidos en la **figura 8**, a medida que la concentración de nitrógeno decrece, el crecimiento se detiene. No obstante, como se indica en la **tabla 3**, el contenido de lípidos incrementa en función de la limitación de nitrógeno en el medio. Las levaduras quiescentes provenientes del medio -N (en inanición de nitrógeno), acumularon una mayor cantidad de lípidos, en contraste con las provenientes del cultivo semilla (medio rico YPD) y del medio C/N_{40} . Este resultado concuerda con lo informado por Lopes *et al.*, (2020) en el que las proporciones C/N más altas dieron como resultado un contenido de lípidos más alto, pero crecimiento más bajo.

En -N y C/N_{40} , la acumulación de lípidos es más alta después de las 48 h de crecimiento en la fase estacionaria (**Figura 10**). Se ha establecido que la acumulación de lípidos en las OYs se intensifica durante la fase estacionaria de crecimiento (fase quiescente) en condiciones con limitación de nitrógeno (Hapala *et al.*, 2020; Wusnah *et al.*, 2023). Durante la fase estacionaria se puede observar el incremento en el tamaño de las LDs en las OYs (Patel *et al.*, 2017). Por ello, cuando las células entraron en quiescencia en las condiciones -N y C/N_{40} se pudo observar que las LDs marcadas con la sonda fluorescente BODIPY 493/503 aumentaron de tamaño, si son

comparadas con las LDs de las células provenientes del cultivo semilla (**Figura 11**). Esto confirma la acumulación de lípidos durante esta etapa de crecimiento.

Se ha establecido que las levaduras oleaginosas poseen la capacidad de exhibir perfiles de ácidos grasos (FA) con composiciones diversas. Estas composiciones están fuertemente influenciadas por las condiciones de crecimiento, incluyendo la fuente de carbono y nitrógeno, así como la especie de levadura involucrada (Alokiah *et al.*, 2014; Klug y Daum, 2014). Esta variabilidad conlleva a notables diferencias en las composiciones entre distintas levaduras.

En las levaduras oleaginosas, la síntesis de FA *de novo* se caracteriza principalmente por la presencia predominante de ácido oleico (C18:1), seguido del palmítico (C16:0), linoleico (C18:2), esteárico (C18:0) y palmitoleico (C16:1), lo que resulta en una mayor concentración de FA insaturados (Papanikolaou y Aggelis, 2011). Es relevante señalar que esta composición de FA insaturados (principalmente C18:1 y C:18:2) puede provocar la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), por lo que las células los contienen en forma de TAGs dentro de las LDs (Eisenberg y Büttner, 2014). Los resultados del perfil lipídico obtenidos se alinean con lo reportado en la literatura (Papanikolaou y Aggelis, 2011). Específicamente, en las condiciones bajo las que se realizó el análisis del perfil (Cultivo semilla y C/N₄₀), los porcentajes más destacados corresponden a C18:1 (54.4% y 60.8%) y C16:0 (19.2% y 20.7%) (ver **tabla 4**). De hecho, como se muestra en la **tabla 4**, los porcentajes de ácidos grasos presentes en *R. mucilaginosa* M94C9 son similares en ambas condiciones de estudio. Sin embargo, la **figura 12** revela un aumento en la concentración de estos ácidos grasos. Los incrementos más notables se observan en C18:1, C16:0, C18:0, C18:2 e incluso C18:n3. Es interesante notar que el ácido C18:1 experimenta un aumento de 3.3 veces a las 48 h en la condición C/N₄₀ (**Figura 12**). En el caso de los ácidos C16:0, C18:2 y C18:0, los incrementos son de 3.2, 2 y 1.9 veces respectivamente. Esto indica nuevamente que las células cultivadas en la condición C/N₄₀ están experimentando lipogénesis.

8.3. Expresión y actividad de la ATP-citrato liasa de *R. mucilaginosa* M94C9 en condiciones de limitación de nitrógeno

La reducción de los niveles de AMP mitocondrial afecta la activación de la enzima Idh y desencadena una serie de eventos que llevan a la producción mediada por la Acl de acetyl-CoA, que es fundamental para la síntesis de lípidos a través de la Acc1, Fas1/Fas2 y Dga1. Diversos trabajos han estudiado la relevancia de las diferentes enzimas que participan en la síntesis de lípidos *de novo* en condiciones de limitación de nitrógeno en OY (Gross *et al.*, 2019; Hamid *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2019; Sato *et al.*, 2021; Shpilka *et al.*, 2015; Tehlivets *et al.*, 2007). La mayoría de estos trabajos coinciden en el papel principal que desempeñan la Acl, Acc1, Fas1/Fas2 y Dga1. Algunos otros trabajos incluyen también a la Me, Pah1, Mdh, Idh, entre otras, aunque no fueron estudiadas en este trabajo.

La Acl es la primera enzima en la vía de síntesis de lípidos, y se encarga de producir acetyl-CoA a partir de citrato. Asimismo, aunque en levaduras no convencionales no se ha

reportado la relación de la Acl con la regulación epigenética, en otros organismos como hongos filamentosos y mamíferos, esta enzima es responsable de proveer gran parte de la acetil-CoA utilizada para acetilar histonas en el núcleo (Zach, 2015). Por lo que su papel podría ir más allá de la síntesis de lípidos.

En *Y. lipolytica* y *L. starkeyi* se ha reportado que la expresión de *ACL* en condiciones de limitación de nitrógeno varía dependiendo de la fase de crecimiento en que se encuentren las células. Durante la fase exponencial o proliferativa, las células exhiben una mayor transcripción del gen *ACL*, mientras que en la fase estacionaria o de quiescencia (coincidente con la fase de acumulación de lípidos), la expresión de *ACL* decrece (Liu *et al.*, 2019; Sato *et al.*, 2021). Los resultados indican que cuando *R. mucilaginosa* M94C9 es cultivada en limitación de nitrógeno (C/N₄₀), la transcripción de *RmACL* es alta mientras las células se encuentran en proliferación (fase exponencial, 18 h) y aumenta hacia la fase de acumulación de lípidos (48 h) (**Figura 13A**). Es probable que a las 72 h, durante la fase de crecimiento estacionaria, en esta condición se inicie un descenso en la expresión de *RmACL*. Este fenómeno es similar al observado en las células cultivadas en inanición de nitrógeno (-N). En ese contexto, se constató un aumento en la expresión de *RmACL* justo antes de entrar en quiescencia y lipogénesis a las 18 h, seguido de una disminución en la expresión a las 48 h durante la etapa estacionaria y la lipogénesis. Aunque en otros trabajos realizados en levaduras del género *Rhodotorula* no se ha reportado un descenso en la expresión de *ACL* hacia la fase lipogénica, sí se ha reportado el incremento en la expresión de este gen en condiciones de limitación de nitrógeno tanto en *R. toruloides* como en *R. mucilaginosa* (Bommareddy *et al.*, 2017; Sailwal *et al.*, 2023; Zhu *et al.*, 2012), lo que coincide con los resultados obtenidos.

La actividad enzimática de la Acl es otro aspecto relevante sobre el estudio de la lipogénesis en levaduras oleaginosas en limitación de nitrógeno. De hecho, la detección de la actividad de esta enzima, combinada con la acumulación de lípidos que supera el 20% de la biomasa total, constituyen los criterios prioritarios para la clasificación de una levadura como oleaginosa (Boulton y Ratledge, 1981). Los resultados indican que la actividad específica de la Acl en *R. mucilaginosa* M94C9 es más alta en las células provenientes del cultivo semilla y de las células cultivadas en C/N₄₀ a las 18 y 48 h de crecimiento, mientras que en -N la actividad específica fue más baja (**Figura 13B**). Estos resultados coinciden con estudios en *Cunninghamella* sp. donde se evaluó la Acl en condiciones de limitación de nitrógeno (Hamid *et al.*, 2011; Shuib *et al.*, 2014). En estos estudios se reportó que la actividad de la Acl es alta en las primeras etapas de crecimiento (fase exponencial), pero decrece conforme las células se aproximan a la fase lipogénica. En *Y. lipolytica* también se reportó este fenómeno (Wang *et al.*, 2023). La alta actividad de la Acl en el cultivo semilla y en C/N₄₀ podría explicarse por su relevancia para la generación de biomasa y el crecimiento de las células en estas condiciones. Al igual que en células fúngicas y células cancerígenas, la Acl aporta gran parte de la acetil-CoA necesaria para el crecimiento y proliferación celular, así como para la regulación epigenética (Sato *et al.*, 2021; Zaidi *et al.*, 2012). Tanta es la relevancia de la Acl para estos fenómenos, que su eliminación provoca el arresto de las células en un estado quiescente no proliferativo (Hynes y

Murray, 2010; Zaidi *et al.*, 2012). En cuanto a la actividad de la Acl de las células cultivadas en inanición de nitrógeno, la baja actividad puede ser provocada debido a que el flujo de la acetil-CoA dejó de ser enviado a la vía de proliferación y crecimiento celular, enfocándose en gran medida a la síntesis de lípidos tal y como sugieren en Wang *et al.* (2023), o incluso por el efecto inhibitorio de los ácidos grasos sobre el complejo Fas como a la Acl (Fabiszewska *et al.*, 2019). Pese a esta baja actividad, parece ser que la actividad enzimática es suficiente para permitir la acumulación de lípidos en la condición de inanición, de igual manera que las levaduras que fueron reportadas por Boulton y Ratledge (1981). Por ejemplo, *Candida curvata* con una actividad específica de 0.007 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg}$ de proteína) es capaz de acumular hasta el 33.7% de su biomasa en forma de lípidos. En este sentido, la actividad de Acl y su participación en la vía de síntesis de lípidos podría ser regulada post transcripcionalmente (Pomraning *et al.*, 2016).

8.4. El gen *RmACL* tiene poca ocupación de nucleosomas en su región promotora

El genoma de las células eucariontes adopta una disposición altamente organizada, conocida como cromatina, la cual se estructura en una serie de unidades fundamentales llamadas nucleosomas (unidades conformadas por octámeros de histonas alrededor de las que el DNA da dos vueltas) (Kujirai y Kurumizaka, 2020; Lai y Pugh, 2017). Dado que una gran parte del DNA se encuentra asociado a estos nucleosomas, tiende a quedar inaccesible para diversas proteínas, como la polimerasa (Small *et al.*, 2014; Zhao y Bierhoff, 2017). Por lo tanto, la presencia de los nucleosomas tiene efectos significativos en procesos como la transcripción, replicación, reparación y recombinación del DNA. Los cambios en el posicionamiento de los nucleosomas se han relacionado con modulaciones en los niveles de expresión genética, de tal manera que si la región promotora de un gen se encuentra desprovista de nucleosomas, su expresión se induce. En el caso contrario, una región promotora enriquecida de nucleosomas, tendrá menor tasa de expresión (Escobar *et al.*, 2019; Lai y Pugh, 2017; Lee *et al.*, 2004).

El análisis preliminar de la organización de la cromatina del gen *RmACL* mostró que la región promotora ubicada en la región UTR 5' se encuentra desprovista de nucleosomas en células provenientes del cultivo semilla (0 h) y en células cultivadas en medio C/N₄₀ (18) (**Figura 14**). Esto concuerda con el perfil de expresión del gen en estas condiciones, en donde se observó que la expresión del gen aumentaba. Por lo tanto, existe una correlación entre la expresión al alza del gen *RmACL* y la baja densidad de nucleosomas a lo largo de su región promotora, lo que podría indicar que su expresión podría regularse mediante remodelación de la cromatina.

De acuerdo con los perfiles de expresión y protección relativa de los nucleosomas, se propone la hipótesis representada en la **figura 19**. En esta hipótesis, se sugiere que en condiciones en las cuales se ha detectado una mayor expresión de *RmACL* (como en el cultivo semilla y en el cultivo C/N₄₀ a las 18 h), la región promotora del gen estará mayormente desprovista de nucleosomas. En contraste, en la condición en la que se ha observado una menor

expresión de *RmACL* y una actividad de Acl reducida, se espera encontrar una mayor ocupación de nucleosomas en el promotor del gen. Para confirmar esta hipótesis, se plantean experimentos futuros que incluyan la caracterización del perfil de nucleosomas en la condición de limitación de nitrógeno a las 18 y a las 48 h. Estos experimentos nos permitirán obtener una comprensión más completa sobre cómo la dinámica de la cromatina puede influir en la regulación de la expresión de *RmACL* en diferentes condiciones.

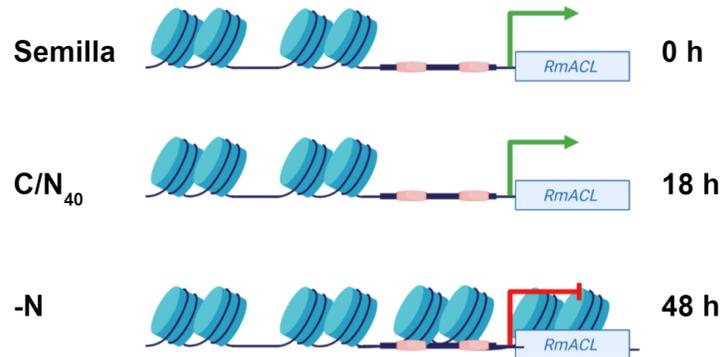


Figura 19. Hipótesis sobre el posicionamiento de los nucleosomas en el promotor del gen *RmACL* en condiciones de limitación de nitrógeno. En condiciones con mayor limitación de nitrógeno (-N), se propone que el promotor del gen *RmACL* muestra un patrón de organización caracterizado por una mayor densidad de nucleosomas en comparación con condiciones de mayor disponibilidad de nitrógeno (0 y 48 h en el medio C/N₄₀). Esta mayor ocupación nucleosómica podría estar asociada con una disminución en la expresión del gen *RmACL* y la actividad de la enzima Acl. Se espera que investigaciones futuras confirmen esta hipótesis y proporcionen una comprensión más profunda de cómo la estructura de la cromatina influye en la regulación de la expresión génica en situaciones de limitación de nitrógeno.

8.5. Inducción de la expresión de los genes involucrados en la lipogénesis de *R. mucilaginosa* M94C9 en condiciones de limitación de nitrógeno

De manera similar al patrón de expresión de *RmACL*, se encontró un aumento en la actividad de otros genes relacionados con la síntesis de lípidos neutros *de novo*, tales como *RmACCI*, *RmFAS1*, *RmFAS2* y *RmDGAI*, en las condiciones lipogénicas estudiadas. En realidad, exceptuando a *RmDGAI*, todos estos genes siguen un patrón de incremento en su expresión durante la fase exponencial (18 h) hasta las 48 horas en el medio C/N₄₀ (Figura 15A-C). También, muestran una alta expresión a las 18 h en el medio sin nitrógeno (-N), seguida de una reducción a las 48 h. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura (Fabiszewska *et al.*, 2022; Hamid *et al.*, 2011; Sato *et al.*, 2021; Shuib *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2012). Es importante señalar que la reducción en la cuantificación de los RNAs mensajeros de estos genes e incluso de *RmACL* a las 48 h en la condición de inanición de nitrógeno podría estar relacionada con el arresto en la fase G₀ del ciclo celular provocado por la ausencia de nitrógeno (Tesnière *et al.*, 2018). Si bien durante este estado la transcripción de los genes no se disminuye completamente, es un hecho que se reduce drásticamente manteniéndose en niveles bajos (Makarenko *et al.*, 2020; Roche *et al.*, 2017). Asimismo, durante este estado de reposo las células pueden entrar en el proceso autofágico para el reciclaje de macromoléculas, entre las que

se encuentran los ácidos nucleicos como el RNA (Sajiki *et al.*, 2013). La autofagia desempeña un papel crucial en las levaduras oleaginosas (y en general en todos los organismos), ya que determina el destino de los cuerpos lipídicos producidos y también actúa como una fuente significativa de nitrógeno. Esta capacidad resulta especialmente importante para contrarrestar la carencia de nitrógeno en el entorno (Kohda *et al.*, 2007). Así, la autofagia se convierte en un proceso esencial para preservar la estabilidad de nutrientes clave, como el nitrógeno, en situaciones de estrés. De hecho, el complejo Fas es preferencialmente degradado durante la autofagia (Shpilka *et al.*, 2015). Así, al llegar a las 48 horas de crecimiento en el medio carente de nitrógeno (-N), es probable que las moléculas de RNA estén experimentando un proceso de reciclaje. Además, en relación con la actividad de la enzima *RmAcl*, el flujo de la acetil-CoA está dirigido hacia la ruta de síntesis de lípidos en estas circunstancias. Este direccionamiento podría llevar a una disminución en la acetilación de las histonas y, por ende, a una posible disminución en la activación de los genes (Roche *et al.*, 2017). Este último aspecto está vinculado con hallazgos previos en relación con estos genes, los cuales requieren ser activados mediante acetilación antes de ser transcritos (Tehlivets *et al.*, 2007). Así pues, los resultados obtenidos para *RmACCI*, *RmFAS1* y *RmFAS2* concuerdan con lo reportado en la literatura.

Por otro lado, la diferencia de *RmDGAI* subyace en su expresión sostenida al alza a las 48 h de crecimiento en medio -N (**Figura 15D**). La expresión aumentada en condiciones lipogénicas y la expresión constitutiva de este gen en la condición de deficiencia de nitrógeno (-N) podrían estar vinculadas a la relevancia de *Dga1* en la creación y el mantenimiento de los LDs, así como en la autofagia (Athenstaedt, 2011; D. Li *et al.*, 2015). Se ha reportado que la síntesis de TAG resulta crucial para el correcto reclutamiento de proteínas Atg (que participan en la biogénesis del autofagosoma). Esta conexión ha sido establecida mediante experimentos que incluyeron la eliminación de los genes *DGAI* y *LROI* (ambos responsables de codificar enzimas implicadas en la síntesis de TAG) (Li *et al.*, 2015). Se observó que la falta de dichos genes impedía que las células de levadura pudieran generar tanto LDs como estructuras autofágicas, lo que destaca el papel importante de *DGAI* aún en la fase lipogénica.

8.6. El aceite de *R. mucilaginosa* M94C9 es convertido eficientemente en biodiésel

La producción de biodiésel representa una de las principales aplicaciones de los lípidos neutros generados por las OYs (Caporusso *et al.*, 2021). Para establecer un proceso estandarizado de producción de biodiésel a partir de una levadura en particular, es crucial investigar los parámetros de cultivo que aseguren tanto la acumulación efectiva de lípidos como un crecimiento óptimo (Lopes *et al.*, 2020). En este contexto, se evaluó una condición lipogénica previamente documentada en la literatura que se ha identificado como capaz de potenciar la síntesis de lípidos en levaduras oleaginosas (Niehus *et al.*, 2018). Mediante la implementación de esta condición de cultivo, se logró extraer 1.8 g L⁻¹ de lípidos totales (**Figura 16A**), equivalente al 46% de la biomasa total de la cepa *R. mucilaginosa* M94C9. Este porcentaje de lípidos acumulados destaca de manera concluyente que *R. mucilaginosa* M94C9 puede ser clasificada como una levadura oleagínica (Salvador López *et al.*, 2022). En comparación con informes

recientes acerca de la acumulación de lípidos en otras cepas de *R. mucilaginosa*, la cantidad de lípidos obtenida en esta investigación se compara a la conseguida en los estudios de Banerjee et al. (2020) y Tsai et al. (2022), quienes también llevaron a cabo sus cultivos en matraces (**Tabla 4**).

Tabla 4. Acumulación de lípidos en diferentes cepas de *R. mucilaginosa*

Cepa	Método	Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno (limitación)	Cantidad de lípidos (g/L)	Referencia
<i>R. mucilaginosa</i> IIP32 MTCC 25056	Biorreactor	Glicerol	Sulfato de amonio	5.6	(Bansal et al., 2020)
<i>R. mucilaginosa</i>	Matraz	Hidrolizado de bagazo	Sulfato de amonio	0.54	(da Silva et al., 2020)
<i>R. mucilaginosa</i> BCRC 22360	Matraz	Glucosa	Sulfato de amonio y extracto de levadura	1.5	(Tsai et al., 2022)
<i>R. mucilaginosa</i> ATCC 66034	Matraz	Glicerol	Aguas residuales de papa	15	(Kot et al., 2019b)
<i>R. mucilaginosa</i>	Biorreactor	Glucosa	Peptona	0.25	(Prabhu et al., 2019)
<i>R. mucilaginosa</i>	Matraz	Glucosa	Sulfato de amonio	10.97	(Enshaeieh et al., 2015)
<i>R. mucilaginosa</i> RMIIP32	Matraz	Hidrolizado de maíz rico en xilosa	Sulfato de amonio	1.83	(Banerjee et al., 2020)
<i>R. mucilaginosa</i> ATCC 66034	Matraz	Glucosa	Peptona y extracto de levadura	9.05	(Gientka et al., 2017)
<i>R. mucilaginosa</i> ATCC 66034	Matraz	Glicerol	Peptona y extracto de levadura	3.24	(Gientka et al., 2017)

Con la perspectiva de producir biodiésel a partir de los lípidos neutros producidos por *R. mucilaginosa* M94C9 se realizó una reacción de transesterificación siguiendo las indicaciones de Rivera, *et al.* (2009) haciendo uso de la lipasa comercial 435 de Novozymes. Esta enzima tiene la capacidad de favorecer la ruptura de los enlaces éster de los TAG, DAG y MAG evitando el incremento de DAG y MAG (Ortiz *et al.*, 2019). El TLC de la **figura 16B** indica que después de 48 h de reacción, gran parte del contenido de TAG es convertido a FAEEs con un rendimiento aproximado del 93%. Esto indica que los TAG producidos por *R. mucilaginosa* M94C9 pueden ser útiles para la producción de biodiésel. El rendimiento de conversión de TAGs a biodiésel obtenido es alto y similar a otros rendimientos reportados en diferentes trabajos que emplearon lipasas inmovilizadas como catalizadores en la reacción de transesterificación (Sandoval *et al.*, 2017).

8.7. La acumulación de lípidos neutros en *R. mucilaginosa* M94C9 se acompaña de la producción de carotenoides

Como previamente se ha señalado, las levaduras del género *Rhodotorula* poseen la sorprendente capacidad de sintetizar lípidos neutros, al mismo tiempo que sobresalen en la producción de carotenoides, entre ellos el β -caroteno, toruleno y torularrodina (Hernández-Almanza *et al.*, 2014). Estos carotenoides, como pigmentos, no sólo desempeñan un papel crucial como precursores de la vitamina A (β -caroteno), sino también como agentes fotoprotectores y antioxidantes de importancia biológica (Frengova y Beshkova, 2009; Lopes *et al.*, 2020). Esto confiere a los carotenoides una relevancia en múltiples ámbitos como la medicina, la industria, la alimentación y la farmacología (Dyaa *et al.*, 2022).

La síntesis de carotenoides en estas levaduras ha sido objeto de extensos estudios, revelando que se encuentra fuertemente influenciada por las condiciones de cultivo. Estas condiciones abarcan factores tales como el pH, la temperatura (a 20 °C y 28 °C), la intensidad de la irradiación lumínica, la agitación y la tasa de aireación (Kot *et al.*, 2016). Asimismo, se ha observado que la relación C/N del medio ejerce una influencia fundamental en la acumulación de carotenoides (Li *et al.*, 2022; Peng *et al.*, 2021). Cabe resaltar que este último aspecto adquiere especial importancia en el contexto de nuestras condiciones experimentales, ya que se ha constatado que la síntesis de lípidos *de novo* y la producción de carotenoides, como componentes del metabolismo secundario, comparten un metabolito clave: la acetil-coA (Li *et al.*, 2022).

Las observaciones sobre el aumento en la coloración de *R. mucilaginosa* M94C9 (**Figura 17**) revelan que en ambas condiciones (C/N₄₀ y -N), a medida que las células se acercan a la fase estacionaria, la intensidad de la coloración aumenta. Esto concuerda con lo anteriormente documentado, donde la acumulación de pigmentos en la mayoría de las levaduras comienza en la fase logarítmica tardía y persiste durante la fase estacionaria, justificando así la menor coloración en las células del cultivo semilla (Sadat Naghavi *et al.*, 2013). De hecho, esto explica el perfil de expresión de los genes *RmCAR0* y *RmCAR1* que mostraron un aumento en la expresión durante las 18 h de cultivo y que posteriormente se intensificó hacia las 48 h en la fase de crecimiento

estacionaria (**Figura 18A-B**). El gen *RmCAR0* desempeña un papel crucial al codificar a la carotenoide dioxigenasa, responsable de llevar a cabo una escisión oxidativa altamente selectiva de los carotenoides. Esta reacción conduce a la formación de apocarotenoides, cuyos derivados son componentes esenciales de vías de señalización intracelular (Harrison y Bugg, 2014; Landolfo *et al.*, 2018). Por otro lado, el gen *RmCARI* tiene como producto a la fitoeno desaturasa, una enzima de relevancia en la conversión de moléculas de fitoeno en licopeno. Cabe destacar que el licopeno actúa como precursor fundamental en la biosíntesis del β -caroteno y de la torularrodina (Z. Li *et al.*, 2022). Siguiendo un patrón similar al observado en el trabajo de Landolfo *et al.* (2018), la expresión de estos genes aumenta de manera notable a medida que las células se acercan a la fase estacionaria del ciclo de crecimiento.

A pesar de que existe consenso en que relaciones C/N elevadas conducen a rendimientos elevados de lípidos, todavía existen discrepancias con respecto a su influencia en la producción de carotenoides. Algunos estudios sugieren una correlación positiva entre la relación C/N y la producción de carotenoides, mientras que otros autores sostienen una relación inversa (Braunwald *et al.*, 2013). Nuestras observaciones indican que la acumulación de carotenoides es mayor en las células cultivadas en medio -N, donde la relación C/N puede considerarse alta. Esto respalda la idea de que los carotenoides se acumulan en mayores cantidades en condiciones con relaciones C/N elevadas. En concordancia con lo planteado por Braunwald *et al.* (2013), es posible la co-producción de lípidos y carotenoides de manera simultánea.

9. Conclusiones

La disponibilidad de nitrógeno tiene una influencia en el crecimiento de la levadura antártica *R. mucilaginosa* M94C9 en los medios estudiados. A medida que la concentración de nitrógeno disminuye, el crecimiento y acumulación de biomasa decrementa. Sin embargo, la viabilidad de las células no se afecta incluso después de 72 h de crecimiento en medios con diferente disponibilidad de nitrógeno.

Las condiciones estudiadas estimulan la síntesis y acumulación de triacilgliceroles en *R. mucilaginosa* M94C9 hacia la fase estacionaria. Esto se evidencia por el aumento en la fluorescencia del colorante BODIPY y el incremento de las gotas lipídicas observadas mediante microscopía confocal. Aunque en las condiciones estudiadas se observó el aumento de los lípidos, es importante señalar que en inanición de nitrógeno (-N), la acumulación es incluso mayor. No obstante, este aumento significativo en los lípidos se da a costa de la acumulación de biomasa. Por lo tanto, considerando la necesidad de rendimientos de biomasa y acumulación de lípidos en la industria del biodiésel, la condición con nitrógeno (C/N₄₀) podría ser más rentable.

En estas condiciones *R. mucilaginosa* M94C9 produce ácido oleico, ácido esteárico, ácido palmítico y ácido linolénico. La expresión de los genes involucrados en la vía de síntesis de lípidos coincide con el aumento en el contenido lipídico de las células en condiciones lipogénicas, mientras que la actividad de la Acl disminuye conforme las células entran en lipogénesis. El mapeo de nucleosomas sugiere que la regulación transcripcional del gen *RmACL* podría estar influenciada por la presencia de nucleosomas en la región promotora del gen.

Los triacilgliceroles producidos por la cepa M94C9 en condiciones lipogénicas para fines industriales muestran una alta eficiencia de conversión a FAEEs (ésteres etílicos de ácidos grasos) después de 48 h de reacción con una lipasa comercial 435 Novozymes. Sin embargo, se requieren otros estudios para evaluar los parámetros de eficiencia del combustible.

La síntesis de lípidos en *R. mucilaginosa* M94C9 está acompañada por la síntesis de carotenoides en las condiciones lipogénicas. Esto se ha corroborado mediante métodos cualitativos y de cuantificación de la expresión de los genes involucrados, que han mostrado un aumento en sus niveles en los tiempos estudiados. Sin embargo, se requiere una caracterización cuantitativa adicional para estudiar el potencial biotecnológico de esta cepa.

10. Perspectivas

Las condiciones de limitación de nitrógeno estudiadas en este trabajo estimulan la síntesis de lípidos neutros en la levadura antártica *R. mucilaginosa* M94C9. Sin embargo, también representan una condición de estrés en la que diversas vías metabólicas y genes se ven involucrados para hacer frente a dicho estrés. Un enfoque novedoso para explorar la complejidad de la expresión génica en estas condiciones es la transcriptómica, que permitirá identificar los genes que se encuentran expresados o reprimidos en estas condiciones de estrés. Este enfoque proporcionará un mejor conocimiento de los fenómenos relacionados con la acumulación de lípidos en *R. mucilaginosa*. Por lo tanto, se sugiere realizar RNA-seq con la finalidad de adquirir un panorama más completo sobre la expresión génica en limitación e inanición de nitrógeno.

Por otro lado, es posible explorar más a fondo el potencial biotecnológico de *R. mucilaginosa* M94C9, incluyendo el rendimiento y otras propiedades asociadas al biodiésel producido a partir de esta cepa. Es posible también investigar en mayor detalle la acumulación de carotenoides en las condiciones lipogénicas estudiadas en este trabajo.

Esta investigación proporcionó un primer acercamiento a la comprensión del panorama nucleosómico en el promotor del gen *RmACL*. Se plantea la continuación de esta línea de investigación que sería el primer mapeo de nucleosomas en *R. mucilaginosa*, lo que permitirá profundizar en la regulación transcripcional de este gen en las condiciones estudiadas en este trabajo.

11. Referencias bibliográficas

1. Abdel-Wahab, M. A., Elgorban, A. M. y Bahkali, A. H. (2023). Single cell oil of oleaginous marine microbes from Saudi Arabian mangroves as a potential feedstock for biodiesel production. *Journal of King Saud University-Science*, 35(4), 102615. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2023.102615>
2. Abeln, F. y Chuck, C. J. (2021). The history, state of the art and future prospects for oleaginous yeast research. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 221. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01712-1>
3. Adrio, J. L. (2017). Oleaginous yeasts: Promising platforms for the production of oleochemicals and biofuels: Microbial Production of Oleochemicals and Biofuels. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(9), 1915-1920. <https://doi.org/10.1002/bit.26337>
4. Ageitos, J. M., Vallejo, J. A., Veiga-Crespo, P. y Villa, T. G. (2011). Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(4), 1219-1227. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3200-z>
5. Alokiah, B., Alhajali, A. y Yaziji, S. (2014). Identification of some Yeasts by Fatty Acid Profiles. *Polish Journal of Microbiology*, 63(4), 467-472. <https://doi.org/10.33073/pjm-2014-063>
6. An, Z., Tassa, A., Thomas, C., Zhong, R., Xiao, G., Fotedar, R., Tu, B. P., Klionsky, D. J. y Levine, B. (2014). Autophagy is required for G1/G0 quiescence in response to nitrogen starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy*, 10(10), 1702-1711. <https://doi.org/10.4161/auto.32122>
7. Areesirisuk, A., Chiu, C. H., Yen, T. B., Liu, C. H. y Guo, J. H. (2015). A novel oleaginous yeast strain with high lipid productivity and its application to alternative biodiesel production. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51(4), 411-418. <https://doi.org/10.1134/S0003683815030035>
8. Arhar, S., Gogg-Fassolter, G., Ogrizović, M., Pačnik, K., Schwaiger, K., Žganjar, M., Petrovič, U. y Natter, K. (2021). Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the accumulation of high amounts of triacylglycerol. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 147. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01640-0>
9. Athenaki, M., Gardeli, C., Diamantopoulou, P., Tchakouteu, S. S., Sarris, D., Philippoussis, A. y Papanikolaou, S. (2018). Lipids from yeasts and fungi: physiology, production and analytical considerations. *Journal of Applied Microbiology*, 124(2), 336-367. <https://doi.org/10.1111/jam.13633>
10. Athenstaedt, K. (2010). Neutral Lipids in Yeast: Synthesis, Storage and Degradation. En K. N. Timmis (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 471-480). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_35

11. Athenstaedt, K. (2011). *YALI0E32769g* (DGA1) and *YALI0E16797g* (LRO1) encode major triacylglycerol synthases of the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811(10), 587-596. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2011.07.004>
12. Bandhu, S., Srivastava, A., Ghosh, D. y Chaudhuri, T. K. (2020). Yeast Single Cell Oils from Bioresources: Current Developments in Production and Applications. *Current Sustainable/Renewable Energy Reports*, 7(4), 109-120. <https://doi.org/10.1007/s40518-020-00160-6>
13. Banerjee, A., Sharma, T., Nautiyal, A. K., Dasgupta, D., Hazra, S., Bhaskar, T. y Ghosh, D. (2020). Scale-up strategy for yeast single cell oil production for *Rhodotorula mucilaginosa* IPL32 from corn cob derived pentosan. *Bioresource Technology*, 309, 123329. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123329>
14. Bansal, N., Dasgupta, D., Hazra, S., Bhaskar, T., Ray, A. y Ghosh, D. (2020). Effect of utilization of crude glycerol as substrate on fatty acid composition of an oleaginous yeast *Rhodotorula mucilaginosa* IPL32: Assessment of nutritional indices. *Bioresource Technology*, 309, 123330. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123330>
15. Barbosa, A. D. y Siniossoglou, S. (2020). New kid on the block: lipid droplets in the nucleus. *The FEBS Journal*, 287(22), 4838-4843. <https://doi.org/10.1111/febs.15307>
16. Bardhan, P., Gupta, K., Kishor, S., Chattopadhyay, P., Chaliha, C., Kalita, E., Goud, V. V. y Mandal, M. (2020). Oleaginous yeasts isolated from traditional fermented foods and beverages of Manipur and Mizoram, India, as a potent source of microbial lipids for biodiesel production. *Annals of Microbiology*, 70(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01562-z>
17. Beopoulos, A. y Nicaud, J.-M. (2012). Yeast: A new oil producer? *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 19(1), Article 1. <https://doi.org/10.1051/ocl.2012.0426>
18. Blazeck, J., Hill, A., Liu, L., Knight, R., Miller, J., Pan, A., Otopal, P. y Alper, H. S. (2014). Harnessing *Yarrowia lipolytica* lipogenesis to create a platform for lipid and biofuel production. *Nature Communications*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms4131>
19. Bommareddy, R. R., Sabra, W. y Zeng, A.-P. (2017). Glucose-mediated regulation of glycerol uptake in *Rhodospiridium toruloides*: Insights through transcriptomic analysis on dual substrate fermentation. *Engineering in Life Sciences*, 17(3), 282-291. <https://doi.org/10.1002/elsc.201600010>
20. Boulton, C. A. y Ratledge, C. (1981). Correlation of Lipid Accumulation in Yeasts with Possession of ATP: Citrate Lyase. *Microbiology*, 127(1), 169-176. <https://doi.org/10.1099/00221287-127-1-169>

21. Bradshaw, P. C. (2021). Acetyl-CoA Metabolism and Histone Acetylation in the Regulation of Aging and Lifespan. *Antioxidants*, 10(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/antiox10040572>
22. Braunwald, T., Schwemmlin, L., Graeff-Hönninger, S., French, W. T., Hernandez, R., Holmes, W. E. y Claupein, W. (2013). Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(14), 6581-6588. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5005-8>
23. Calvey, C. H., Su, Y.-K., Willis, L. B., McGee, M. y Jeffries, T. W. (2016). Nitrogen limitation, oxygen limitation, and lipid accumulation in *Lipomyces starkeyi*. *Bioresource Technology*, 200, 780-788. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.104>
24. Caporusso, A., Capece, A. y De Bari, I. (2021). Oleaginous Yeasts as Cell Factories for the Sustainable Production of Microbial Lipids by the Valorization of Agri-Food Wastes. *Fermentation*, 7(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/fermentation7020050>
25. Chapman, K. D., Aziz, M., Dyer, J. M. y Mullen, R. T. (2019). Mechanisms of lipid droplet biogenesis. *Biochemical Journal*, 476(13), 1929-1942. <https://doi.org/10.1042/BCJ20180021>
26. Chattopadhyay, A. y Maiti, M. K. (2021a). Chapter One - Lipid production by oleaginous yeasts. En G. M. Gadd & S. Sariaslani (Eds.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 116, pp. 1-98). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2021.03.003>
27. Chaturvedi, S., Bhattacharya, A., Rout, P. K., Nain, L. y Khare, S. K. (2022). An Overview of Enzymes and Rate-Limiting Steps Responsible for Lipid Production in Oleaginous Yeast. *Industrial Biotechnology*, 18(1), 20-31. <https://doi.org/10.1089/ind.2021.0003>
28. Chaturvedi, S., Gupta, A. K., Bhattacharya, A., Dutta, T., Nain, L. y Khare, S. K. (2021). Overexpression and repression of key rate-limiting enzymes (acetyl CoA carboxylase and HMG reductase) to enhance fatty acid production from *Rhodotorula mucilaginosa*. *Journal of Basic Microbiology*, 61(1), 4-14. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000407>
29. Chayakulkeeree, M., Rude, T. H., Toffaletti, D. L. y Perfect, J. R. (2007). Fatty Acid Synthesis Is Essential for Survival of *Cryptococcus neoformans* and a Potential Fungicidal Target. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10), 3537-3545. <https://doi.org/10.1128/aac.00442-07>
30. Chen, H., He, X., Geng, H. y Liu, H. (2014). Physiological characterization of ATP-citrate lyase in *Aspergillus niger*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(4), 721-731. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1418-3>
31. Cheng, Y.-T. y 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>

32. Chorlay, A., Monticelli, L., Veríssimo Ferreira, J., Ben M'barek, K., Ajjaji, D., Wang, S., Johnson, E., Beck, R., Omrane, M., Beller, M., Carvalho, P. y Rachid Thiam, A. (2019). Membrane Asymmetry Imposes Directionality on Lipid Droplet Emergence from the ER. *Developmental Cell*, 50(1), 25-42.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.05.003>
33. Choudhary, V. y Schneider, R. (2020). Lipid droplet biogenesis from specialized ER subdomains. *Microbial Cell*, 7(8), 218-221. <https://doi.org/10.15698/mic2020.08.727>
34. Chypre, M., Zaidi, N. y Smans, K. (2012). ATP-citrate lyase: A mini-review. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 422(1), 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.144>
35. Cottier, S. y Schneider, R. (2021). Lipid droplets form a network interconnected by the endoplasmic reticulum through which their proteins equilibrate. *Journal of Cell Science*, 135(5), jcs258819. <https://doi.org/10.1242/jcs.258819>
36. Cui, W., Liang, Y., Tian, W., Ji, M. y Ma, X. (2016). Regulating effect of β -ketoacyl synthase domain of fatty acid synthase on fatty acyl chain length in de novo fatty acid synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(3), 149-155. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.12.002>
37. Czabany, T., Athenstaedt, K. y Daum, G. (2007). Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1771(3), 299-309. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.07.001>
38. da Silva, J., Honorato da Silva, F. L., Santos Ribeiro, J. E., Nóbrega de Melo, D. J., Santos, F. A. y Lucena de Medeiros, L. (2020). Effect of supplementation, temperature and pH on carotenoids and lipids production by *Rhodotorula mucilaginosa* on sisal bagasse hydrolyzate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 30, 101847. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101847>
39. de la Fuente Colmenares, I. (2017). *Análisis de la expresión de catalasas de Debaryomyces hansenii en Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México
40. DeJarnette, C., Meyer, C. J., Jenner, A. R., Butts, A., Peters, T., Cheramie, M. N., Phelps, G. A., Vita, N. A., Loudon-Hossler, V. C., Lee, R. E. y Palmer, G. E. (2021). Identification of Inhibitors of Fungal Fatty Acid Biosynthesis. *ACS Infectious Diseases*, 7(12), 3210-3223. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00404>
41. Diwan, B. y Gupta, P. (2022). Key media microsupplements for boosting *de novo* lipogenesis in an oleaginous yeast isolate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 134(2), 95-104. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.03.008>
42. Dourou, M., Aggeli, D., Papanikolaou, S. y Aggelis, G. (2018). Critical steps in carbon metabolism affecting lipid accumulation and their regulation in oleaginous microorganisms.

Applied Microbiology and Biotechnology, 102(6), 2509-2523.
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-8813-z>

43. Dulermo, T., Lazar, Z., Dulermo, R., Rakicka, M., Haddouche, R. y Nicaud, J.-M. (2015). Analysis of ATP-citrate lyase and malic enzyme mutants of *Yarrowia lipolytica* points out the importance of mannitol metabolism in fatty acid synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(9), 1107-1117. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.04.007>
44. Dyaa, A., Soliman, H., Abdelrazak, A., Samra, B. N., Khojah, E., Ahmed, A. F., El-Esawi, M. A. y Elsayed, A. (2022). Optimization of Carotenoids Production from *Rhodotorula* sp. Strain ATL72 for Enhancing Its Biotechnological Applications. *Journal of Fungi*, 8(2), 160. <https://doi.org/10.3390/jof8020160>
45. Eisenberg, T. y Büttner, S. (2014). Lipids and cell death in yeast. *Fems Yeast Research*, 14(1), 179-197. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12105>
46. El Hafidi, M., Cuéllar, A., Ramírez, J. y Baños, G. (2001). Effect of sucrose addition to drinking water, that induces hypertension in the rats, on liver microsomal $\Delta 9$ and $\Delta 5$ -desaturase activities. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 12(7), 396-403. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(01\)00154-1](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(01)00154-1)
47. Enshaeieh, M., Abdoli, A. y Madani, M. (2015). Single Cell Oil (SCO) Production by *Rhodotorula mucilaginosa* and Its Environmental Benefits. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 17(2), 387-400.
48. Escobar, T. M., Oksuz, O., Saldaña-Meyer, R., Descostes, N., Bonasio, R. y Reinberg, D. (2019). Active and Repressed Chromatin Domains Exhibit Distinct Nucleosome Segregation during DNA Replication. *Cell*, 179(4), 953-963.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.009>
49. Evans, C. T., Scragg, A. H. y Ratledge, C. (1983). Regulation of citrate efflux from mitochondria of oleaginous and non-oleaginous yeasts by adenine nucleotides. *European Journal of Biochemistry*, 132(3), 609-615. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07407.x>
50. Fabiszewska, A., Misiukiewicz-Stępień, P., Paplińska-Goryca, M., Zieniuk, B. y Białecka-Florjańczyk, E. (2019). An Insight into Storage Lipid Synthesis by *Yarrowia lipolytica* Yeast Relating to Lipid and Sugar Substrates Metabolism. *Biomolecules*, 9(11), 685. <https://doi.org/10.3390/biom9110685>
51. Fabiszewska, A., Paplińska-Goryca, M., Misiukiewicz-Stępień, P., Wołoszynowska, M., Nowak, D. y Zieniuk, B. (2022). Expression Profile of Selected Genes Involved in Storage Lipid Synthesis in a Model Oleaginous Yeast Species *Yarrowia lipolytica*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1041. <https://doi.org/10.3390/ijms23031041>

52. Fakankun, I., Fristensky, B. y Levin, D. B. (2021). Genome Sequence Analysis of the Oleaginous Yeast, *Rhodotorula diobovata*, and Comparison of the Carotenogenic and Oleaginous Pathway Genes and Gene Products with Other Oleaginous Yeasts. *Journal of Fungi*, 7(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/jof7040320>
53. Fakas, S. (2016). Lipid biosynthesis in yeasts: A comparison of the lipid biosynthetic pathway between the model nonoleaginous yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the model oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Engineering in Life Sciences*, 17(3), 292-302. <https://doi.org/10.1002/elsc.201600040>
54. Fischer, M., Joppe, M., Mulinacci, B., Vollrath, R., Konstantinidis, K., Kötter, P., Ciccarelli, L., Vonck, J., Oesterhelt, D. y Grininger, M. (2020). Analysis of the co-translational assembly of the fungal fatty acid synthase (FAS). *Scientific Reports*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57418-8>
55. Folch, J., Lees, M. y Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.
56. Frantom, P. A. y Blanchard, J. S. (2010). Bisubstrate Analog Inhibitors. En *Comprehensive Natural Products II* (pp. 689-717). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00679-1>
57. Frengova, G. I. y Beshkova, D. M. (2009). Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(2), 163. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0492-9>
58. Fujimoto, T. (2022). Nuclear lipid droplets – how are they different from their cytoplasmic siblings? *Journal of Cell Science*, 135(5), jcs259253. <https://doi.org/10.1242/jcs.259253>
59. Galdieri, L., Zhang, T., Rogerson, D., Lleshi, R. y Vancura, A. (2014). Protein Acetylation and Acetyl Coenzyme A Metabolism in Budding Yeast. *Eukaryotic Cell*, 13(12), 1472-1483. <https://doi.org/10.1128/ec.00189-14>
60. Gao, Q., Binns, D. D., Kinch, L. N., Grishin, N. V., Ortiz, N., Chen, X. y Goodman, J. M. (2017). Pet10p is a yeast perilipin that stabilizes lipid droplets and promotes their assembly. *The Journal of Cell Biology*, 216(10), 3199-3217. <https://doi.org/10.1083/jcb.201610013>
61. Gasch, A. P. y Werner-Washburne, M. (2002). The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Functional & Integrative Genomics*, 2(4-5), 181-192. <https://doi.org/10.1007/s10142-002-0058-2>
62. Ghogare, R., Chen, S. y Xiong, X. (2020). Metabolic Engineering of Oleaginous Yeast *Yarrowia lipolytica* for Overproduction of Fatty Acids. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01717>

63. Gientka, I., Gadaszewska, M., Błażej, S., Kieliszek, M., Bzducha-Wróbel, A., Stasiak-Różańska, L. y Kot, A. M. (2017). Evaluation of lipid biosynthesis ability by *Rhodotorula* and *Sporobolomyces* strains in medium with glycerol. *European Food Research and Technology*, 243(2), 275-286. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2742-9>
64. Graef, M. (2018). Lipid droplet-mediated lipid and protein homeostasis in budding yeast. *FEBS Letters*, 592(8), 1291-1303. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12996>
65. Gross, A. S., Zimmermann, A., Pendl, T., Schroeder, S., Schoenlechner, H., Knittelfelder, O., Lamplmayr, L., Santiso, A., Aufschneider, A., Waltenstorfer, D., Ortonobes Lara, S., Stryeck, S., Kast, C., Ruckstuhl, C., Hofer, S. J., Michelitsch, B., Woelflingseder, M., Müller, R., Carmona-Gutierrez, D. y Eisenberg, T. (2019). Acetyl-CoA carboxylase 1-dependent lipogenesis promotes autophagy downstream of AMPK. *Journal of Biological Chemistry*, 294(32), 12020-12039. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.007020>
66. Guo, M., Cheng, S., Chen, G. y Chen, J. (2019). Improvement of lipid production in oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* by ultraviolet mutagenesis. *Engineering in Life Sciences*, 19(8), 548-556. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800203>
67. Hamid, A. A., Mokhtar, N. F., Taha, E. M., Omar, O. y Yusoff, W. M. W. (2011). The role of ATP citrate lyase, malic enzyme and fatty acid synthase in the regulation of lipid accumulation in *Cunninghamella* sp. 2A1. *Annals of Microbiology*, 61(3), 463-468. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0159-4>
68. Hapala, I., Griac, P. y Holic, R. (2020). Metabolism of Storage Lipids and the Role of Lipid Droplets in the Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Lipids*, 55(5), 513-535. <https://doi.org/10.1002/lipd.12275>
69. Hardman, D., McFalls, D. y Fakas, S. (2017). Characterization of phosphatidic acid phosphatase activity in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* and its role in lipid biosynthesis. *Yeast*, 34(2), 83-91. <https://doi.org/10.1002/yea.3216>
70. Harrison, P. J. y Bugg, T. D. H. (2014). Enzymology of the carotenoid cleavage dioxygenases: Reaction mechanisms, inhibition and biochemical roles. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 544, 105-111. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.10.005>
71. Hasslacher, M., Ivessa, A. S., Paltauf, F. y Kohlwein, S. D. (1993). Acetyl-CoA carboxylase from yeast is an essential enzyme and is regulated by factors that control phospholipid metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 268(15), 10946-10952. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)82077-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)82077-4)
72. He, Z., Wang, S., Yang, Y., Hu, J., Wang, C., Li, H., Ma, B. y Yuan, Q. (2017). β -Carotene production promoted by ethylene in *Blakeslea trispora* and the mechanism involved in metabolic responses. *Process Biochemistry*, 57, 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.02.028>

73. Heil, C. S., Wehrheim, S. S., Paithankar, K. S. y Grininger, M. (2019). Fatty Acid Biosynthesis: Chain-Length Regulation and Control. *ChemBioChem*, 20(18), 2298-2321. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800809>
74. Hernández-Almanza, A., Cesar Montanez, J., Aguilar-González, M. A., Martínez-Ávila, C., Rodríguez-Herrera, R. y Aguilar, C. N. (2014). *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. *Food Bioscience*, 5, 64-72. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.11.007>
75. Hoja, U., Marthol, S., Hofmann, J., Stegner, S., Schulz, R., Meier, S., Greiner, E. y Schweizer, E. (2004). HFA1 Encoding an Organelle-specific Acetyl-CoA Carboxylase Controls Mitochondrial Fatty Acid Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(21), 21779-21786. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401071200>
76. Hynes, M. J. y Murray, S. L. (2010). ATP-citrate lyase is required for production of cytosolic acetyl coenzyme A and development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, 9(7), 1039-1048. <https://doi.org/10.1128/EC.00080-10>
77. Icard, P., Wu, Z., Fournel, L., Coquerel, A., Lincet, H. y Alifano, M. (2020). ATP citrate lyase: A central metabolic enzyme in cancer. *Cancer Letters*, 471, 125-134. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.12.010>
78. Infante, J. J., Law, G. L. y Young, E. T. (2012). Analysis of Nucleosome Positioning Using a Nucleosome-Scanning Assay. En R. H. Morse (Ed.), *Chromatin Remodeling: Methods and Protocols* (pp. 63-87). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-477-3_5
79. Jaichandar, S. y Annamalai, K. (2011). The status of biodiesel as an alternative fuel for diesel engine—an overview. *Journal of Sustainable Energy & Environment*, 2(2), 71-75.
80. Jarc, E. y Petan, T. (2019). Lipid Droplets and the Management of Cellular Stress. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 92(3), 435-452.
81. Jenni, S., Leibundgut, M., Maier, T. y Ban, N. (2006). Architecture of a Fungal Fatty Acid Synthase at 5 Å Resolution. *Science*, 311(5765), 1263-1267. <https://doi.org/10.1126/science.1123251>
82. Jezierska, S., Claus, S. y Van Bogaert, I. N. A. (2020). Identification and importance of mitochondrial citrate carriers and ATP citrate lyase for glycolipid production in *Starmerella bombicola*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(14), 6235-6248. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10702-z>
83. Kalita, P., Basumatary, B., Saikia, P., Das, B. y Basumatary, S. (2022). Biodiesel as renewable biofuel produced via enzyme-based catalyzed transesterification. *Energy Nexus*, 6, 100087. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100087>

84. Kamada, Y., Sekito, T. y Ohsumi, Y. (2004). Autophagy in Yeast: ATOR-Mediated Response to Nutrient Starvation. En G. Thomas, D. M. Sabatini y M. N. Hall (Eds.), *TOR* (Vol. 279, pp. 73-84). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-18930-2_5
85. Kamineni, A. y Shaw, J. (2020). Engineering triacylglycerol production from sugars in oleaginous yeasts. *Current Opinion in Biotechnology*, 62, 239-247. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.022>
86. Kamisaka, Y., Kimura, K., Uemura, H. y Yamaoka, M. (2013). Overexpression of the active diacylglycerol acyltransferase variant transforms *Saccharomyces cerevisiae* into an oleaginous yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(16), 7345-7355. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4915-9>
87. Khot, M., Raut, G., Ghosh, D., Alarcón-Vivero, M., Contreras, D. y Ravikumar, A. (2020). Lipid recovery from oleaginous yeasts: Perspectives and challenges for industrial applications. *Fuel*, 259, 116292. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116292>
88. Klug, L. y Daum, G. (2014). Yeast lipid metabolism at a glance. *FEMS Yeast Research*, 14(3), 369-388. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12141>
89. Klug, Y. A., Deme, J. C., Corey, R. A., Renne, M. F., Stansfeld, P. J., Lea, S. M. y Carvalho, P. (2021). Mechanism of lipid droplet formation by the yeast Sei1/Ldb16 Seipin complex. *Nature Communications*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26162-6>
90. Kohda, T. A., Tanaka, K., Konomi, M., Sato, M., Osumi, M. y Yamamoto, M. (2007). Fission yeast autophagy induced by nitrogen starvation generates a nitrogen source that drives adaptation processes. *Genes to Cells*, 12(2), 155-170. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01041.x>
91. Kolouchová, I., Mařátková, O., Sigler, K., Masák, J. y Řezanka, T. (2016). Lipid accumulation by oleaginous and non-oleaginous yeast strains in nitrogen and phosphate limitation. *Folia Microbiologica*, 61(5), 431-438. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0454-y>
92. Kot, A. M., Błażej, S., Kieliszek, M., Gientka, I. y Bryś, J. (2019). Simultaneous Production of Lipids and Carotenoids by the Red Yeast *Rhodotorula* from Waste Glycerol Fraction and Potato Wastewater. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 189(2), 589-607. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03023-z>
93. Kot, A. M., Błażej, S., Kurcz, A., Gientka, I. y Kieliszek, M. (2016). *Rhodotorula glutinis*—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(14), 6103-6117. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7611-8>
94. Kujirai, T. y Kurumizaka, H. (2020). Transcription through the nucleosome. *Current Opinion in Structural Biology*, 61, 42-49. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.10.007>

95. Kurmi, K. y Haigis, M. C. (2020). Nitrogen Metabolism in Cancer and Immunity. *Trends in Cell Biology*, 30(5), 408. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.02.005>
96. Lai, W. K. M. y Pugh, B. F. (2017). Understanding nucleosome dynamics and their links to gene expression and DNA replication. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 18(9), 548-562. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.47>
97. Lamers, D., van Biezen, N., Martens, D., Peters, L., van de Zilver, E., Jacobs-van Dreumel, N., Wijffels, R. H. y Lokman, C. (2016). Selection of oleaginous yeasts for fatty acid production. *BMC Biotechnology*, 16(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0276-7>
98. Landolfo, S., Ianiri, G., Camiolo, S., Porceddu, A., Mulas, G., Chessa, R., Zara, G. y Mannazzu, I. (2018). CAR gene cluster and transcript levels of carotenogenic genes in *Rhodotorula mucilaginosa*. *Microbiology*, 164(1), 78-87. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000588>
99. Laporte, D., Lebaudy, A., Sahin, A., Pinson, B., Ceschin, J., Daignan-Fornier, B. y Sagot, I. (2011). Metabolic status rather than cell cycle signals control quiescence entry and exit. *Journal of Cell Biology*, 192(6), 949-957. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009028>
100. Lee, C.-K., Shibata, Y., Rao, B., Strahl, B. D. y Lieb, J. D. (2004). Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. *Nature Genetics*, 36(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/ng1400>
101. Leibundgut, M., Maier, T., Jenni, S. y Ban, N. (2008). The multienzyme architecture of eukaryotic fatty acid synthases. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(6), 714-725. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.09.008>
102. Li, D., Song, J.-Z., Li, H., Shan, M.-H., Liang, Y., Zhu, J. y Xie, Z. (2015). Storage lipid synthesis is necessary for autophagy induced by nitrogen starvation. *FEBS Letters*, 589(2), 269-276. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.11.050>
103. Li, Z., Li, C., Cheng, P. y Yu, G. (2022). *Rhodotorula mucilaginosa*—alternative sources of natural carotenoids, lipids, and enzymes for industrial use. *Heliyon*, 8(11), e11505. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11505>
104. Liu, H., Marsafari, M., Deng, L. y Xu, P. (2019). Understanding lipogenesis by dynamically profiling transcriptional activity of lipogenic promoters in *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(7), 3167-3179. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09664-8>
105. Lopes, H. J. S., Bonturi, N., Kerkhoven, E. J., Miranda, E. A. y Lahtvee, P.-J. (2020). C/N ratio and carbon source-dependent lipid production profiling in *Rhodotorula toruloides*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(6), 2639-2649. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10386-5>

106. Lowry, Oliver H., Rosebrough, Nira J., Farr, A. L. y Randall, Rose J. (1951). PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
107. Lyman, M., Urbin, S., Strout, C., Rubinfeld, B., Lyman, M., Urbin, S., Strout, C. y Rubinfeld, B. (2019). The Oleaginous Red Yeast *Rhodotorula/Rhodospiridium*: A Factory for Industrial Bioproducts. En *Yeasts in Biotechnology*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84129>
108. Makarenko, R., Denis, C., Francesconi, S., Gangloff, S. y Arcangioli, B. (2020). Nitrogen starvation reveals the mitotic potential of mutants in the S/MAPK pathways. *Nature Communications*, 11, 1973. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15880-y>
109. Mata-Gómez, L. C., Montañez, J. C., Méndez-Zavala, A. y Aguilar, C. N. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-12>
110. Maza, D. D., Viñarta, S. C., Su, Y., Guillamón, J. M. y Aybar, M. J. (2020). Growth and lipid production of *Rhodotorula glutinis* R4, in comparison to other oleaginous yeasts. *Journal of Biotechnology*, 310, 21-31. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.01.012>
111. Minárik, P., Tomásková, N., Kollárová, M. y Antalík, M. (2002). Malate dehydrogenases--structure and function. *General Physiology and Biophysics*, 21(3), 257-265.
112. Mota, M. N., Múgica, P. y Sá-Correia, I. (2022). Exploring Yeast Diversity to Produce Lipid-Based Biofuels from Agro-Forestry and Industrial Organic Residues. *Journal of Fungi*, 8(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/jof8070687>
113. Müllner, H. y Daum, G. (2004). Dynamics of neutral lipid storage in yeast. *Acta Biochimica Polonica*, 51(2), Article 2. https://doi.org/10.18388/abp.2004_3574
114. Mussagy, C. U., Ribeiro, H. F., Santos-Ebinuma, V. C., Schuur, B. y Pereira, J. F. B. (2022). *Rhodotorula sp.*-based biorefinery: a source of valuable biomolecules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(22), 7431-7447. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12221-5>
115. Nettebrock, N. T. y Bohnert, M. (2020). Born this way – Biogenesis of lipid droplets from specialized ER subdomains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(1), 158448. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.04.008>
116. Neupane, D. (2022). Biofuels from Renewable Sources, a Potential Option for Biodiesel Production. *Bioengineering*, 10(1), 29. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10010029>
117. Niehus, X., Casas-Godoy, L., Vargas-Sánchez, M. y Sandoval, G. (2018). A Fast and Simple Qualitative Method for Screening Oleaginous Yeasts on Agar. *Journal of Lipids*, 2018, e5325804. <https://doi.org/10.1155/2018/5325804>

118. Ochoa-Estopier, A. y Guillouet, S. E. (2014). D-stat culture for studying the metabolic shifts from oxidative metabolism to lipid accumulation and citric acid production in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biotechnology*, 170, 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.11.008>
119. Ochoa-Gutiérrez, D., Reyes-Torres, A. M., de la Fuente-Colmenares, I., Escobar-Sánchez, V., González, J., Ortiz-Hernández, R., Torres-Ramírez, N. y Segal-Kischinevzky, C. (2022). Alternative CUG Codon Usage in the Halotolerant Yeast *Debaryomyces hansenii*: Gene Expression Profiles Provide New Insights into Ambiguous Translation. *Journal of Fungi*, 8(9), 970. <https://doi.org/10.3390/jof8090970>
120. Oelkers, P., Cromley, D., Padamsee, M., Billheimer, J. T. y Sturley, S. L. (2002). The DGA1 Gene Determines a Second Triglyceride Synthetic Pathway in Yeast *. *Journal of Biological Chemistry*, 277(11), 8877-8881. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111646200>
121. Olzmann, J. A. y Carvalho, P. (2019). Dynamics and functions of lipid droplets. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0085-z>
122. Ortiz, C., Luján Ferreira, M., Barbosa, O., Santos, J. C. S. dos, C. Rodrigues, R., Berenguer-Murcia, Á., E. Briand, L. y Fernandez-Lafuente, R. (2019). Novozym 435: the “perfect” lipase immobilized biocatalyst? *Catalysis Science & Technology*, 9(10), 2380-2420. <https://doi.org/10.1039/C9CY00415G>
123. Pan, J., Hu, C. y Yu, J.-H. (2018). Lipid Biosynthesis as an Antifungal Target. *Journal of Fungi*, 4(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/jof4020050>
124. Papanikolaou, S. (2012). Oleaginous Yeasts: Biochemical Events Related with Lipid Synthesis and Potential Biotechnological Applications. *Fermentation Technology*, 01(01). <https://doi.org/10.4172/2167-7972.1000e103>
125. Papanikolaou, S. y Aggelis, G. (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(8), 1031-1051. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100014>
126. Patel, A., Karageorgou, D., Rova, E., Katapodis, P., Rova, U., Christakopoulos, P. y Matsakas, L. (2020). An Overview of Potential Oleaginous Microorganisms and Their Role in Biodiesel and Omega-3 Fatty Acid-Based Industries. *Microorganisms*, 8(3), 434. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030434>
127. Patel, A., Pruthi, V. y Pruthi, P. A. (2017). Synchronized nutrient stress conditions trigger the diversion of CDP-DG pathway of phospholipids synthesis towards de novo TAG synthesis in oleaginous yeast escalating biodiesel production. *Energy*, 139, 962-974. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2017.08.052>
128. Peng, T., Fakankun, I. y Levin, D. B. (2021). Accumulation of neutral lipids and carotenoids of *Rhodotorula diobovata* and *Rhodospiridium babjevae* cultivated under

- nitrogen-limited conditions with glycerol as a sole carbon source. *FEMS Microbiology Letters*, 368(18), fnab126. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab126>
129. Pereira, H., Azevedo, F., Domingues, L. y Johansson, B. (2022). Expression of *Yarrowia lipolytica* acetyl-CoA carboxylase in *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on in-vivo accumulation of Malonyl-CoA. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 779-787. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.01.020>
 130. Pomraning, K. R., Kim, Y.-M., Nicora, C. D., Chu, R. K., Bredeweg, E. L., Purvine, S. O., Hu, D., Metz, T. O. y Baker, S. E. (2016). Multi-omics analysis reveals regulators of the response to nitrogen limitation in *Yarrowia lipolytica*. *BMC Genomics*, 17(1), 138. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2471-2>
 131. Poontawee, R., Lorliam, W., Polburee, P. y Limtong, S. (2023). Oleaginous yeasts: Biodiversity and cultivation. *Fungal Biology Reviews*, 44, 100295. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2022.11.003>
 132. Prabhu, A. A., Gadela, R., Bharali, B., Deshavath, N. N. y Dasu, V. V. (2019). Development of high biomass and lipid yielding medium for newly isolated *Rhodotorula mucilaginosa*. *Fuel*, 239, 874-885. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.11.088>
 133. Probst, K. V., Schulte, L. R., Durrett, T. P., Rezac, M. E. y Vadlani, P. V. (2016). Oleaginous yeast: a value-added platform for renewable oils. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(5), 942-955. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1064855>
 134. Ramanjaneyulu, G. y Reddy, B. R. (2019). Chapter 21 - Emerging Trends of Microorganism in the Production of Alternative Energy. En V. Buddolla (Ed.), *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry* (pp. 275-305). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816328-3.00021-0>
 135. Ratledge, C. (2014). The role of malic enzyme as the provider of NADPH in oleaginous microorganisms: a reappraisal and unsolved problems. *Biotechnology Letters*, 36(8), 1557-1568. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1532-3>
 136. Ratledge, C. y Wynn, J. P. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, 51, 1-51. [https://doi.org/10.1016/s0065-2164\(02\)51000-5](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(02)51000-5)
 137. Renne, M. F., Klug, Y. A. y Carvalho, P. (2020). Lipid droplet biogenesis: A mystery “unmixing”? *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 108, 14-23. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2020.03.001>
 138. Rigouin, C., Croux, C., Borsenberger, V., Ben Khaled, M., Chardot, T., Marty, A. y Bordes, F. (2018). Increasing medium chain fatty acids production in *Yarrowia lipolytica* by metabolic engineering. *Microbial Cell Factories*, 17, 142. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0989-5>

139. Rivera, I., Villanueva, G. y Sandoval, G. (2009). Biodiesel production from animal grease wastes by enzymatic catalysis. *Grasas y Aceites*, 60(5), Article 5. <https://doi.org/10.3989/gya.021409>
140. Roberts, L. G. y Patterson, T. J. (2014). Biofuels. En P. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)* (pp. 469-475). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.01054-X>
141. Robles-Iglesias, R., Naveira-Pazos, C., Fernández-Blanco, C., Veiga, M. C. y Kennes, C. (2023). Factors affecting the optimisation and scale-up of lipid accumulation in oleaginous yeasts for sustainable biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 171, 113043. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.113043>
142. Roche, B., Arcangioli, B. y Martienssen, R. (2017). Transcriptional reprogramming in cellular quiescence. *RNA Biology*, 14(7), 843-853. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1327510>
143. Romero-Aguilar, L. R., Pardo, J. P., Lomelí, M. M., Bocardo, O. I. L., Juárez Oropeza, M. A. y Guerra Sánchez, G. (2017). Lipid droplets accumulation and other biochemical changes induced in the fungal pathogen *Ustilago maydis* under nitrogen-starvation. *Archives of Microbiology*, 199(8), 1195-1209. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1388-8>
144. Romero-Aguilar, L., Montero-Lomeli, M., Pardo, J. P. y Sánchez, G. G. (2018). Lipid Index Determination by Liquid Fluorescence Recovery in the Fungal Pathogen *Ustilago Maydis*. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 134, e57279. <https://doi.org/10.3791/57279>
145. Sadat Naghavi, F., Hanachi, P., Soudi, M. R., Saboora, A. y Ghorbani, A. (2013). Evaluation of the Relationship between the Incubation Time and Carotenoid Production in *Rhodotorula slooffiae* and *R. mucilaginosa* Isolated from Leather Tanning Wastewater. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16(10), 1114-1118.
146. Sailwal, M., Mishra, P., Bhaskar, T., Pandey, R. y Ghosh, D. (2023). Time-resolved transcriptomic profile of oleaginous yeast *Rhodotorula mucilaginosa* during lipid and carotenoids accumulation on glycerol. *Bioresource Technology*, 384, 129379. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129379>
147. Sajiki, K., Pluskal, T., Shimanuki, M. y Yanagida, M. (2013). Metabolomic Analysis of Fission Yeast at the Onset of Nitrogen Starvation. *Metabolites*, 3(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/metabo3041118>
148. Salvador López, J. M., Vandeputte, M. y Van Bogaert, I. N. A. (2022). Oleaginous yeasts: Time to rethink the definition? *Yeast*, 39(11-12), 553-606. <https://doi.org/10.1002/yea.3827>

149. Sampaio, J. P. (2011). Chapter 155 - *Rhodotorula* Harrison (1928). En C. P. Kurtzman, J. W. Fell y T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts (Fifth Edition)* (pp. 1873-1927). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00155-5>
150. Sandager, L., Gustavsson, M. H., Ståhl, U., Dahlgvist, A., Wiberg, E., Banas, A., Lenman, M., Ronne, H. y Stymne, S. (2002). Storage Lipid Synthesis Is Non-essential in Yeast *. *Journal of Biological Chemistry*, 277(8), 6478-6482. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109109200>
151. Sandoval, G., Casas-Godoy, L., Bonet-Ragel, K., Rodrigues, J., Ferreira-Dias, S. y Valero, F. (2017). Enzyme-Catalyzed Production of Biodiesel as Alternative to Chemical-Catalyzed Processes: Advantages and Constraints. *Current Biochemical Engineering*, 4(2), 109-141.
152. Sato, R., Ara, S., Yamazaki, H., Ishiya, K., Aburatani, S. y Takaku, H. (2021). Citrate-Mediated Acyl-CoA Synthesis Is Required for the Promotion of Growth and Triacylglycerol Production in Oleaginous Yeast *Lipomyces starkeyi*. *Microorganisms*, 9(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081693>
153. Schepers, J. y Behl, C. (2021). Lipid droplets and autophagy—links and regulations from yeast to humans. *Journal of Cellular Biochemistry*, 122(6), 602-611. <https://doi.org/10.1002/jcb.29889>
154. Shaigani, P., Awad, D., Redai, V., Fuchs, M., Haack, M., Mehlmer, N. y Brueck, T. (2021). Oleaginous yeasts- substrate preference and lipid productivity: a view on the performance of microbial lipid producers. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 220. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01710-3>
155. Shi, L. y Tu, B. P. (2015). Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences. *Current Opinion in Cell Biology*, 33, 125-131. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.003>
156. Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A. y Tominaga, Y. (2002). Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17(3), 133-142. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(02\)00020-6](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(02)00020-6)
157. Shpilka, T., Welter, E., Borovsky, N., Amar, N., Shimron, F., Peleg, Y. y Elazar, Z. (2015). Fatty acid synthase is preferentially degraded by autophagy upon nitrogen starvation in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(5), 1434-1439. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409476112>
158. Shuib, S., Wan Nawi, W. N. N., Taha, E. M., Omar, O., Abdul Kader, A. J., Kalil, M. S. y Abdul Hamid, A. (2014). Strategic Feeding of Ammonium and Metal Ions for Enhanced GLA-Rich Lipid Accumulation in *Cunninghamella bainieri* 2A1. *The Scientific World Journal*, 2014, 173574. <https://doi.org/10.1155/2014/173574>

159. Sijtsma, L., Springer, J., Meesters, P. a. E. P., Swaaf, M. E. de y Eggink, G. (1998). Recent advances in fatty acid synthesis in oleaginous yeasts and microalgae. En *Recent Research Developments in Microbiology* 2 (pp. 219-232). <https://research.wur.nl/en/publications/recent-advances-in-fatty-acid-synthesis-in-oleaginous-yeasts-and->
160. Silverman, A. M., Qiao, K., Xu, P. y Stephanopoulos, G. (2016). Functional overexpression and characterization of lipogenesis-related genes in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(8), 3781-3798. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7376-0>
161. Sivanand, S., Rhoades, S., Jiang, Q., Lee, J. V., Benci, J., Zhang, J., Yuan, S., Viney, I., Zhao, S., Carrer, A., Bennett, M. J., Minn, A. J., Weljie, A. M., Greenberg, R. A. y Wellen, K. E. (2017). Nuclear Acetyl-CoA Production by ACLY Promotes Homologous Recombination. *Molecular Cell*, 67(2), 252-265.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.008>
162. Small, E. C., Xi, L., Wang, J.-P., Widom, J. y Licht, J. D. (2014). Single-cell nucleosome mapping reveals the molecular basis of gene expression heterogeneity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(24), E2462-E2471. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400517111>
163. Son, H., Lee, J., Park, A. R. y Lee, Y.-W. (2011). ATP citrate lyase is required for normal sexual and asexual development in *Gibberella zeae*. *Fungal Genetics and Biology*, 48(4), 408-417. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.01.002>
164. Sorger, D. y Daum, G. (2003). Triacylglycerol biosynthesis in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(4), 289-299. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1212-4>
165. Spagnuolo, M., Yaguchi, A. y Blenner, M. (2019). Oleaginous yeast for biofuel and oleochemical production. *Current Opinion in Biotechnology*, 57, 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.011>
166. Su, S. S. Y., Tanaka, Y., Samejima, I., Tanaka, K. y Yanagida, M. (1996). A nitrogen starvation-induced dormant G0 state in fission yeast: the establishment from uncommitted G1 state and its delay for return to proliferation. *Journal of Cell Science*, 109(6), 1347-1357. <https://doi.org/10.1242/jcs.109.6.1347>
167. Sun, S. y Gresham, D. (2021). Cellular quiescence in budding yeast. *Yeast*, 38(1), 12-29. <https://doi.org/10.1002/yea.3545>
168. Szczepańska, P., Hapeta, P. y Lazar, Z. (2022). Advances in production of high-value lipids by oleaginous yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology*, 42(1), 1-22. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1922353>
169. Tamano, K., Bruno, K. S., Koike, H., Ishii, T., Miura, A., Umemura, M., Culley, D. E., Baker, S. E. y Machida, M. (2015). Increased production of free fatty acids in *Aspergillus*

- oryzae* by disruption of a predicted acyl-CoA synthetase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(7), 3103-3113. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6336-9>
170. Tang, X., Feng, H. y Chen, W. N. (2013). Metabolic engineering for enhanced fatty acids synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 16, 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.01.003>
171. Tehlivets, O., Scheuringer, K. y Kohlwein, S. D. (2007). Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1771(3), 255-270. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.07.004>
172. Tesnière, C., Pradal, M., Bessière, C., Sanchez, I., Blondin, B. y Bigey, F. (2018). Relief from nitrogen starvation triggers transient destabilization of glycolytic mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Molecular Biology of the Cell*, 29(4), 490-498. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-01-0061>
173. Thiam, A. R. y Forêt, L. (2016). The physics of lipid droplet nucleation, growth and budding. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(8, Part A), 715-722. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.04.018>
174. Troncoso, E., Barahona, S., Carrasco, M., Villarreal, P., Alcaíno, J., Cifuentes, V. y Baeza, M. (2017). Identification and characterization of yeasts isolated from the South Shetland Islands and the Antarctic Peninsula. *Polar Biology*, 40(3), 649-658. <https://doi.org/10.1007/s00300-016-1988-9>
175. Tsai, S.-Y., Yu, H.-T. y Lin, C.-P. (2022). The Potential of the Oil-Producing Oleaginous Yeast *Rhodotorula mucilaginosa* for Sustainable Production of Bio-Oil Energy. *Processes*, 10(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/pr10020336>
176. Vargas-Sánchez, M. (2019). Producción de lípidos microbianos con levaduras oleaginosas a escala semi-piloto para bio-refinería. Tesis de licenciatura. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ)
177. Vasconcelos, B., Teixeira, J. C., Dragone, G. y Teixeira, J. A. (2019). Oleaginous yeasts for sustainable lipid production—from biodiesel to surf boards, a wide range of “green” applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(9), 3651-3667. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09742-x>
178. Walther, T. C., Chung, J. y Farese, R. V. (2017). Lipid Droplet Biogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 33, 491-510. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100616-060608>
179. Wang, C.-W. (2015). Lipid droplet dynamics in budding yeast. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(14), 2677-2695. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1903-5>

180. Wang, G., Chen, A., Wu, Y., Wang, D., Chang, C. y Yu, G. (2022). Fat storage-inducing transmembrane proteins: beyond mediating lipid droplet formation. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 27(1), 98. <https://doi.org/10.1186/s11658-022-00391-z>
181. Wang, R., Xin, F., Chang, Y., Dang, W., Zhang, H. y Song, Y. (2023). The Enzymatic Role of Lipid Metabolism in *Yarrowia lipolytica* Grown on Glycerol. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 19(2), 128-137. <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2023.128.137>
182. Wang, X., Fosse, H. K., Li, K., Chauton, M. S., Vadstein, O. y Reitan, K. I. (2019). Influence of Nitrogen Limitation on Lipid Accumulation and EPA and DHA Content in Four Marine Microalgae for Possible Use in Aquafeed. *Frontiers in Marine Science*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2019.00095>
183. Wasylenko, T. M., Ahn, W. S. y Stephanopoulos, G. (2015). The oxidative pentose phosphate pathway is the primary source of NADPH for lipid overproduction from glucose in *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering*, 30, 27-39. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.02.007>
184. Wei, J. y Tong, L. (2015). Crystal structure of the 500-kDa yeast acetyl-CoA carboxylase holoenzyme dimer. *Nature*, 526(7575), Article 7575. <https://doi.org/10.1038/nature15375>
185. Wen, Z. y Al Makishah, N. H. (2022). Recent advances in genetic technology development of oleaginous yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(17), 5385-5397. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12101-y>
186. Wu, Y.-J., Wang, H., Liang, J.-H., Miao, Y., Liu, L., Qiu, H.-R., Qiao, C., Wang, R. y Li, J.-Y. (2016). Using the geometric mean fluorescence intensity index method to measure ZAP-70 expression in patients with chronic lymphocytic leukemia. *OncoTargets and therapy*, 9, 797-805. <https://doi.org/10.2147/OTT.S94613>
187. Wusnah, W., Akbar, M. D., Supardan, M. D., Haryani, S. y Yunardi, Y. (2023). An overview of the potential utilisation of oleaginous yeast for biodiesel feedstock and wastewater treatment. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1182(1), 012018. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1182/1/012018>
188. Wynn, J. P., Hamid, A. A., Li, Y. y Ratledge, C. (2001). Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. *Microbiology (Reading, England)*, 147(Pt 10), 2857-2864. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-10-2857>
189. Xu, Q., Yue, Y., Liu, B., Chen, Z., Ma, X., Wang, J., Zhao, Y. y Zhou, D.-X. (2023). ACL and HAT1 form a nuclear module to acetylate histone H4K5 and promote cell proliferation. *Nature Communications*, 14(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39101-4>

190. Xue, S.-J., Chi, Z., Zhang, Y., Li, Y.-F., Liu, G.-L., Jiang, H., Hu, Z. y Chi, Z.-M. (2018). Fatty acids from oleaginous yeasts and yeast-like fungi and their potential applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(7), 1049-1060. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1428167>
191. Yaakob, M. A., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A., Aswathnarayana Gokare, R. y Ambati, R. R. (2021). Influence of Nitrogen and Phosphorus on Microalgal Growth, Biomass, Lipid, and Fatty Acid Production: An Overview. *Cells*, 10(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/cells10020393>
192. Yamada, R., Yamauchi, A., Kashihara, T. y Ogino, H. (2017). Evaluation of lipid production from xylose and glucose/xylose mixed sugar in various oleaginous yeasts and improvement of lipid production by UV mutagenesis. *Biochemical Engineering Journal*, 128, 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.09.010>
193. Yuzbasheva, E. Y., Yuzbashev, T. V., Vinogradova, E. B., Kosikhina, I. M., Taratynova, M. O., Dementev, D. A., Solovyev, A. I., Egorova, D. A. y Sineoky, S. P. (2020). Inactivation of *Yarrowia lipolytica* *YIACL2* gene Coding Subunit of ATP Citrate Lyase Using CRISPR/Cas9 System. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 56(9), 885-892. <https://doi.org/10.1134/S0003683820090112>
194. Zach, R. (2015). *Connections between intermediary metabolism and acetylation of histones*. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/63513>
195. Zaidi, N., Royaux, I., Swinnen, J. V. y Smans, K. (2012). ATP Citrate Lyase Knockdown Induces Growth Arrest and Apoptosis through Different Cell- and Environment-Dependent Mechanisms. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(9), 1925-1935. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-0095>
196. Zamora-Bello, A. (2023). Limitación de nitrógeno en la levadura *Rhodotorula mucilaginosa*: gotas lipídicas y perfil de expresión de genes de la vía de síntesis de lípidos neutros. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México
197. Zeng, S., Liu, H., Shi, T., Song, P., Ren, L., Huang, H. y Ji, X. (2018). Recent Advances in Metabolic Engineering of *Yarrowia lipolytica* for Lipid Overproduction. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120(3), 1700352. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700352>
198. Zhang, H., Zhang, L., Chen, H., Chen, Y. Q., Chen, W., Song, Y. y Ratledge, C. (2014). Enhanced lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica* by over-expression of ATP:citrate lyase from *Mus musculus*. *Journal of Biotechnology*, 192, 78-84. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.10.004>
199. Zhang, H., Zhang, L., Chen, H., Chen, Y. Q., Ratledge, C., Song, Y. y Chen, W. (2013). Regulatory properties of malic enzyme in the oleaginous yeast, *Yarrowia lipolytica*, and its non-involvement in lipid accumulation. *Biotechnology Letters*, 35(12), 2091-2098. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1302-7>

200. Zhang, X.-Y., Li, B., Huang, B.-C., Wang, F.-B., Zhang, Y.-Q., Zhao, S.-G., Li, M., Wang, H.-Y., Yu, X.-J., Liu, X.-Y., Jiang, J. y Wang, Z.-P. (2022). Production, Biosynthesis, and Commercial Applications of Fatty Acids From Oleaginous Fungi. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2022.873657>
201. Zhao, L., Cánovas-Márquez, J. T., Tang, X., Chen, H., Chen, Y. Q., Chen, W., Garre, V., Song, Y. y Ratledge, C. (2016). Role of malate transporter in lipid accumulation of oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), 1297-1305. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7079-y>
202. Zhao, W. (2009). Fatty Acid Synthase. En M. Schwab (Ed.), *Encyclopedia of Cancer* (pp. 1097-1099). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-47648-1_2131
203. Zhao, Z. y Bierhoff, H. (2017). Nucleosome Positioning Assay. *Bio-protocol*, 7(10), e2285. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2285>
204. Zhou, Y. J., Buijs, N. A., Siewers, V. y Nielsen, J. (2014). Fatty Acid-Derived Biofuels and Chemicals Production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2014.00032>
205. Zhu, Z., Ding, Y., Gong, Z., Yang, L., Zhang, S., Zhang, C., Lin, X., Shen, H., Zou, H., Xie, Z., Yang, F., Zhao, X., Liu, P. y Zhao, Z. K. (2015). Dynamics of the Lipid Droplet Proteome of the Oleaginous Yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Eukaryotic Cell*, 14(3), 252-264. <https://doi.org/10.1128/ec.00141-14>
206. Zhu, Z., Zhang, S., Liu, H., Shen, H., Lin, X., Yang, F., Zhou, Y. J., Jin, G., Ye, M., Zou, H. y Zhao, Z. K. (2012). A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Nature Communications*, 3, 1112. <https://doi.org/10.1038/ncomms2112>
207. Zhu, Z., Zhou, Y. J., Krivoruchko, A., Grininger, M., Zhao, Z. K. y Nielsen, J. (2017). Expanding the product portfolio of fungal type I fatty acid synthases. *Nature Chemical Biology*, 13(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2301>

12. Anexos

Tabla 1S. Oligonucleótidos diseñados para NuSA de *RmACL*.

Nombre	Secuencia 5' - 3'	Punto medio (coordenada del promotor)	Inicio 5' - 3'	Tamaño (pb)
1RmACLFw	ACG CAA CGC AGT ACA CCC	-584	-638	108
1RmACLRv	TGC TCA TCC TCG TGC GAC		-530	
2RmACLFw	AGG TTA GTG TTC GGT GAC CA	-546	-592	92
2RmACLRv	TAC TGA CAT CTG CGG CTA TC		-500	
3RmACLFw	GTC GCA CGA GGA TGA GCA	-499	-548	99
3RmACLRv	TTG GCA CTC ATG CGA TGT GT		-449	
4RmACLFw	GAT AGC CGC AGA TGT CAG TA	-471	-519	97
4RmACLRv	CGA TCT GCA AGG CGA GAC		-422	
5RmACLFw	ACA CAT CGC ATG AGT GCC AA	-425	-469	88
5RmACLRv	ACC GGC CTG TTC AGG TTG		-381	
6RmACLFw	GTC TCG CCT TGC AGA TCG	-393	-440	95
6RmACLRv	CTT CAA GGA GCG TAG TAA ATA C		-345	
7RmACLFw	CAA CCT GAA CAG GCC GGT	-348	-399	103
7RmACLRv	CCG TTA CGA GGA CCT TAC AT		-296	
8RmACLFw	GTA TTT ACT ACG CTC CTT GAA G	-316	-367	102
8RmACLRv	CAC AGG CCA GCT CTC AAC		-265	
9RmACLFw	ATG TAA GGT CCT CGT AAC GG	-270	-316	93
9RmACLRv	GCC ATC AGA CCG CCA TCT		-223	

10RmACLFw	GTT GAG AGC TGG CCT GTG	-230	-283	106
10RmACLRv	AAA GTG TGC TAC GCA GCT TC		-177	
11RmACLFw	AGA TGG CGG TCT GAT GGC	-188	-241	106
11RmACLRv	CAT ACT CTA TCA AAC TGC ATG C		-135	
12RmACLFw	GAA GCT GCG TAG CAC ACT TT	-148	-197	99
12RmACLFw	CAC GTC CCA ACT CGC TCT		-98	
13RmACLFw	GCA TGC AGT TTG ATA GAG TAT G	-105	-157	105
13RmACLRv	ACT CAC TCG ACA CGA CAA AC		-52	
14RmACLFw	AGA GCG AGT TGG GAC GTG	-62	-116	109
14RmACLRv	CTG AGC CGC TAA AGG GTA TA		-7	
15RmACLFw	GTT TGT CGT GTC GAG TGA GT	-22	-72	101
15RmACLRv	AGA ATG CGA GCT TAC GGC TT		+29	
16RmACLFw	TAT ACC CTT TAG CGG CTC AG	20	-26	92
16RmACLRw	CAA CCC CGT TAG CGG ACT		+66	
17RmACLFw	AAG CCG TAA GCT CGC ATT CT	56	+10	92
17RmACLRv	ATG GGT CGA CCG TGG GAT		+102	
18RmACLFw	AGT CCG CTA ACG GGG TTG	98	+49	98
18RmACLRv	CTC GAG AGC GTG CAC AGT		+147	
19RmACLFw	ATC CCA CGG TCG ACC CAT	134	+85	97
19RmACLRv	AAC GAG GAG CTT GGC GTC		+182	
20RmACLFw	ACT GTG CAC GCT CTC GAG	177	+129	95
20RmACLRv	GGC TTT GGT GCC GAC GTT		+224	

21RmACLFw	GAC GCC AAG CTC CTC GTT	218	+165	106
21RmACLRv	ACC TGA GCG ACC TTG ACG		+271	
22RmACLFw	AAC GTC GGC ACC AAA GCC	258.5	+206	105
22RmACLRv	GGA TCG AAA GAG AGA GGA AC		+311	
1VCX1RmFw	GAC TTT GCC GCC TCC TCA	NA	+103	
1VCX1RmRv	CTC TCT TGC TTG CCA GCG		+205	100

NA: no aplica

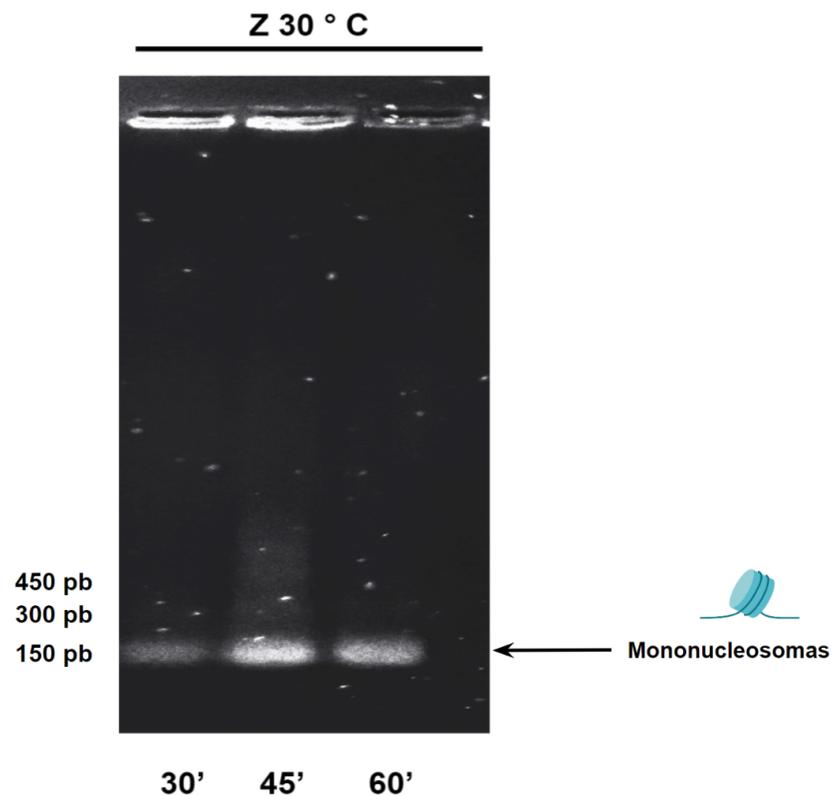


Figura 1S. Foto representativa de la separación de nucleosomas mediante gel de electroforesis. Las bandas de mononucleosomas fueron obtenidas a partir de muestras de DNA digeridas con MNasa durante 30, 45 o 60 min. Se obtuvieron las células de *R. mucilaginosa* M94C9 del cultivo semilla (0 h), lavadas y fijadas con formaldehído como se describe en métodos. Posteriormente fueron tratadas con zimoliasa durante 24 h a 30° C. Luego, las células fueron tratadas con MNasa para después extraer el DNA. Finalmente, las muestras digeridas se corrieron en un gel de agarosa al 2% y se separaron las bandas mononucleosómicas de un tamaño aproximado a 150 pb.