



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación de la biosíntesis de cuerpos lipídicos
y ácidos grasos en la levadura antártica
Rhodotorula laryngis

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

Miguel Ángel Rosas Paz

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. James Enrique González Flores

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2021





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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Rosas

Paz

Miguel Ángel

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

314184069

2. Datos del tutor

Dr.

James Enrique

González

Flores

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Lucero

Romero

Aguilar

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Alejandro

Flores

Alanis

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Nayeli

Torres

Ramírez

6. Datos del sinodal 4

Dra.

Claudia Andrea

Segal

Kischinevsky

7. Datos del trabajo escrito

Evaluación de la biosíntesis de cuerpos lipídicos y ácidos grasos en la levadura antártica
Rhodotorula laryngis

81 páginas

2021

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.

Agradezco a la Dra. Claudia Segal Kischinevzky por permitirme trabajar junto a su grupo de investigación y por toda la retroalimentación brindada durante el desarrollo de este escrito.

Agradezco a la Dra. Lucero Romero Aguilar de la Facultad de Medicina por el apoyo brindado a este trabajo en la preparación de muestras en microscopía confocal, determinación del índice lipídico y la citometría de flujo. Al QFB. Oscar Iván Luqueño Bocardo por el perfil de ácidos grasos y al Dr. Miguel Tapia Rodríguez del Instituto de Investigaciones Biomédicas por su apoyo técnico en la unidad de microscopía confocal.

Agradezco al Dr. Marcelo Enrique Baeza Cancino por donar la cepa *Rhodotorula laryngis* M2222C8 al Laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Facultad de Ciencias de la UNAM, lo cual permitió el desarrollo del trabajo que aquí se describe.

Agradezco a la Química Viviana Escobar Sánchez, la Dra. María de los Ángeles Cancino Rodezno y la M. en C. Ana Paulina Mendoza von der Borch por los protocolos de crecimiento, medios y todo el apoyo técnico que le brindaron al proyecto.

Agradecemos al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT/DGAPA/UNAM IA208820 y IN225320) por otorgar los financiamientos para desarrollar esta investigación y las becas de titulación de licenciatura otorgadas (Folios: 120920 y 169120).

Agradecimientos

Agradezco a mi familia, quienes han estado conmigo durante toda mi vida y quienes me han apoyado en todo a pesar de las circunstancias.

A mi madre, a quien prácticamente le debo todo. Mami, todo lo que soy te lo debo a ti. Siempre agradeceré el esfuerzo que pusiste de tu parte para darnos el mejor estilo de vida posible. Asimismo, siempre te agradeceré por arroparme, por consolarme y por cuidarme. Siempre agradeceré haber tenido la fortuna de ser tu hijo.

A mi papá, quien ,a pesar de todo, siempre ha procurado brindarnos lo más que ha podido. A mi abuelita *Mamá Mari*, por ser mi segunda madre y por procurarnos tanto durante todo este tiempo. A mi hermano Daniel, por siempre brindarme sus consejos de hermano mayor. A mi hermano Alfredo, compañero de juegos y quien, a su manera, siempre me ha apoyado incondicionalmente. A mi hermana Diana, quien ha sido mi confidente, consejera, correctora de estilo, compañera de baile y de juegos. Palabras sobran para decir cuánto los amo.

A James, quien me adoptó académicamente cuando más perdido me encontraba. Gracias por brindarme el apoyo que necesitaba para poder sacar adelante este trabajo y por brindarme tu experiencia y sabiduría durante mi formación.

A Claudia Segal y a los miembros del Laboratorio de Biología Molecular y Genómica por permitirme trabajar junto a ellos y transmitirme su conocimiento durante los seminarios.

A mis sinodales, quienes revisaron, sugirieron y corrigieron este trabajo. Sus sugerencias fueron invaluable para poder completar este escrito.

A las personas que más influenciaron para bien en mi manera de pensar y de vivir durante los últimos años: Fer (*Señorita Diatomea*) y Gaby. A la *Señorita Diatomea* porque el ser renegados nos unió. Le agradezco por ser la primera persona en estar conmigo cuando todo se me derrumbó, por las charlas con deliciosas bebidas, por todo lo que me ha enseñado, por llevarme a la muerte con las clases que nos eligió y por los consejos invaluable que me ha

otorgado. A Gaby, porque junto con Fer me ha ayudado a concientizar sobre muchas cosas que había evitado e ignorado durante toda mi vida. Le agradezco por brindarme su apoyo, por escucharme a pesar de estar más dormida que despierta, por las tonterías espontáneas que sin querer hacemos, por aconsejarme, enseñarme y ayudarme a tomar mejores decisiones. De hecho, gracias a Fer y Gaby terminé en el laboratorio, así que una razón más para agradecerles.

A la Dra. Teresa y Alicia del Laboratorio de Botánica Estructural por permitirme trabajar con su material de laboratorio y con su equipo de trabajo. Por brindarme su experiencia y conocimientos con los que encontrar mi propio nicho.

A Patricia Rivera, por ser una gran maestra. Por tomarse la molestia de instruirme con su vasto conocimiento, por dejarme experimentar con sus muestras, por aconsejarme cuando las dudas existenciales atacaban y por ser un gran modelo a seguir.

A mis amigas y amigos más cercanos, quienes me han aportado mucho con las vivencias que he tenido junto a ellos. A las personas que alguna vez estuvieron y que de una u otra forma cambiaron mi vida.

A mis profesores de taller Pepe, Pablo y Mario, por todo el conocimiento y experiencia personal que nos han compartido a lo largo del curso. A Adhemar, por ser un buen ser humano y por ser un excelente modelo a seguir.

A mis *Poyos*, Perry y a Molly y a los que ya no están, por haber sido unos excelentes compañeros y por ser emplumadas y peludas formas de amor.

A Alexandra Elbakyan y su poderosísima herramienta Sci-Hub. Sin duda, mucho de este trabajo pudo haber sido más difícil sin su ayuda.

A lo que sea que llamemos *vida*, que siempre nos asombrará y motivará a intentar escudriñar los grandes misterios que guarda.

Contenidos

Resumen	1
Lista de abreviaturas	2
Lista de figuras	4
Lista de tablas	4
1. Introducción	6
1.1 Biocombustibles: una alternativa a los combustibles fósiles	6
1.2 La importancia de la producción de biocombustibles de tercera generación	8
1.3 Levaduras oleaginosas: una alternativa en la producción de biodiésel	11
1.4 Condiciones de cultivo que promueven la producción de lípidos en levaduras oleaginosas	14
1.4.1 Cultivo de levaduras oleaginosas bajo condiciones limitadas de nitrógeno: síntesis de triacilgliceroles y cuerpos lipídicos	15
1.4.2 Genes y vías metabólicas de la biosíntesis de TAG bajo condiciones de inanición de nitrógeno	17
1.5 Levaduras adaptadas al frío	22
1.6 El caso particular de las levaduras antárticas: la importancia de la producción de TAG	24
1.7 <i>Rhodotorula laryngis</i> : una levadura oleaginosa que se encuentra en ambientes fríos	26
2. Antecedentes e interpretación de datos	28
2.1 Condiciones de cultivo	28
2.2 <i>R. laryngis</i> acumula biomasa celular en medio rico con glicerol como fuente de carbono	29
2.2 <i>R. laryngis</i> sintetiza cuerpos lipídicos en condiciones limitadas de nitrógeno	31
2.3 <i>R. laryngis</i> acumula cuerpos lipídicos a las 72 h de cultivo en medio mínimo con glicerol sin nitrógeno	33
2.4 Perfil de ácidos grasos de <i>R. laryngis</i> bajo la condición lipogénica utilizando glucosa o glicerol como única fuente de carbono	35
3. Justificación	38
4. Hipótesis	39

5. Objetivo general	40
6. Objetivos particulares	41
7. Materiales y métodos	42
7.1 Determinación de las características de calidad del biodiésel de acuerdo a los datos descritos	42
8. Resultados y discusión	43
8.1 Acumulación de biomasa de <i>R. laryngis</i>	44
8.2 La inanición de nitrógeno en presencia de glicerol estimula la acumulación de lípidos en <i>R. laryngis</i>	47
8.3 <i>R. laryngis</i> acumula ácido esteárico, ácido oleico y ácido palmítico en presencia de glucosa o glicerol como fuente de carbono	49
8.4 El biodiésel producido a partir de <i>R. laryngis</i> sería estable a la oxidación y al almacenamiento prolongado	52
9. Conclusiones	55
10. Perspectivas	57
11. Referencias	58

Resumen

Los combustibles derivados del petróleo, como principal medio para satisfacer las demandas de energía mundial, resultan poco viables en la actualidad debido a los estragos ambientales que ha causado su uso excesivo. A la par, los biocombustibles se postulan como una opción viable porque son renovables y emiten una menor cantidad de gases de efecto invernadero. La utilización de levaduras oleaginosas como fábricas celulares para la síntesis de lípidos representa una promesa que podría solucionar la producción de biocombustibles como el biodiésel, ya que estos microorganismos pueden acumular más del 20% de su peso seco en forma de lípidos. Sin embargo, el uso de levaduras oleaginosas como materia prima para la producción de biodiésel aún no es del todo una realidad, principalmente debido al excesivo costo que se requiere para generar biomasa microbiana a partir de cultivos que contienen glucosa. Este estudio evaluó la biosíntesis de los cuerpos lipídicos (LB) y ácidos grasos en la levadura *Rhodotorula laryngis* M222C8 a partir de datos experimentales proporcionados por el laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Facultad de Ciencias de la UNAM durante 2020.

R. laryngis M222C8 es una cepa oleaginosa poco explorada que fue aislada del suelo de la Antártica. En el presente estudio se analizaron los datos crudos de la cuantificación de la producción de LB con la sonda fluorescente BODIPY mediante un enfoque multiparamétrico que combina índice lipídico (IL), citometría de flujo y microscopía confocal. A partir del análisis de los datos, se determinó que *R. laryngis* tienen alta capacidad de síntesis y acumulación de LB cuando las células son cultivadas en medio mínimo con glicerol como fuente de carbono en condiciones de inanición de nitrógeno (MM-N+Gly). Asimismo, el análisis del perfil de ácidos grasos reveló que el ácido esteárico (34 %), el ácido oleico (32 %) y el ácido palmítico (29 %) son los más abundantes a las 72 h de cultivo. Finalmente, la determinación de las características del biodiésel con base en el perfil lipídico reveló los siguientes valores: índice de yodo (IV) (31.34 g yodo / 100 g), número de cetano (CN) (28.20) y grado de insaturación (DU) (34 %) en MM-N+Gly, sugiriendo que el biodiésel que se produzca a partir de los ácidos grasos de *R. laryngis* podría ser estable a la oxidación y almacenado por periodos prolongados, aunque con propiedades de ignición no apropiadas. Estos resultados permitieron concluir que *R. laryngis* es una levadura con alta capacidad de biosíntesis de LB en condiciones de inanición por fuente de nitrógeno y la utilización de una fuente de carbono no fermentable como el glicerol. Por lo tanto, *R. laryngis* es una levadura oleaginosa que podría resultar interesante como materia prima para la producción de biodiésel. Sin embargo, se requerirán otros estudios adicionales que permitan optimizar el crecimiento y evaluar la producción de biomasa bajo distintas condiciones de cultivo, lo cual podría incrementar el rendimiento de la biosíntesis de LB y la producción de ácidos grasos con valor comercial para la industria energética.

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
ACC	Acetil-CoA-carboxilasa
ACL	ATP-citrato liasa
ACO	Aconitasa
AMP	Adenosín monofosfato
AMPD	AMP-desaminasa
ASTM	Sociedad Americana de Pruebas y Materiales
C16:0	Ácido palmítico (ácido hexadecanoico)
C18:0	Ácido esteárico (ácido octadecanoico)
C18:1	Ácido oléico (ácido 9-octadecanoico)
CN	Número de cetano
DAG	Diacilglicerol
DB	Enlace doble
DGAT	Diacilglicerol aciltransferasa
DO	Densidad óptica
DU	Grado de insaturación
ECS	European Committee for Standardization
FA	Ácido graso
FAME	Ácidos grasos metil esterificados
GC – MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
HCO₃⁻	Bicarbonato
h	Horas
ICDH	Deshidrogenasa de isocitrato
IL	Índice lipídico
IMP	Inosina monofosfato
IV	Índice de yodo

LB	Cuerpos lipídicos
LFR	Ensayo de recuperación de fluorescencia líquida
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPAAT	LPA aciltransferasa
GEI	Gases de efecto invernadero
GPAT	Glicerol 3-fosfato aciltransferasa
ME	Enzima mállica
MM-N+Gly	Medio mínimo sin nitrógeno + glicerol
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
OY	Levaduras oleaginosas
PA	Ácido fosfatídico
PAP	Fosfatidato fosfatasa
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
RE	Retículo endoplásmico
rpm	Revoluciones por minuto
SV	Valor de saponificación
TCA	Ciclo del ácido tricarboxílico
TC_{máx}	Temperatura máxima de crecimiento
TC_{mín}	Temperatura mínima de crecimiento
TC_{ópt}	Temperatura óptima de crecimiento
TAG	Triacilgliceroles
UFA	Ácidos grasos insaturados
YNB	Base de nitrógeno de levadura
YPD	Extracto de levadura + peptona + dextrosa

Lista de figuras

- Figura 1.** Clasificación de los biocombustibles de acuerdo a la materia orgánica utilizada para su producción.
- Figura 2.** Micrografía de la levadura oleaginosa *Cryptococcus curvatus*.
- Figura 3.** Síntesis de lípidos *de novo* bajo condiciones de limitación de nitrógeno.
- Figura 4.** Clasificación de las levaduras según su crecimiento y temperatura.
- Figura 5.** Cambios en la composición de la membrana celular en respuesta al frío.
- Figura 6.** Cinética de crecimiento y acumulación de biomasa de *R. laryngis* en medio rico y medio mínimo con glicerol.
- Figura 7.** Índice lipídico y micrografías de fluorescencia de *R. laryngis* en medio mínimo con glicerol y sin nitrógeno.
- Figura 8.** Detección y cuantificación de cuerpos lipídicos mediante microscopía confocal y citometría de flujo.
- Figura 9.** Perfil de ácidos grasos de *R. laryngis* en medio mínimo sin nitrógeno y variando la fuente de carbono.

Lista de tablas

- Tabla 1.** Comparación de la eficiencia de producción de biodiésel dependiente del cultivo a partir de aceites vegetales y microalgas.
- Tabla 2.** Densidad óptica y biomasa de *R. laryngis* a 120 y 144 h de crecimiento en medio YP+Gly y MM-N+Gly.
- Tabla 3.** Cantidad de biomasa y lípidos que generan distintas levaduras oleaginosas cultivadas con diferentes sustratos.

- Tabla 4.** Perfil lipídico de diferentes levaduras.
- Tabla 5.** Influencia de la estructura de los ácidos grasos en los parámetros de rendimiento de biocombustibles.
- Tabla 6.** Estimación de las propiedades del biodiésel con base en el perfil de ácidos grasos de *R. laryngis*.

1. Introducción

La creciente falta de viabilidad de los combustibles fósiles debido a su escasez en un futuro y a su relación con la degradación ambiental, pone de manifiesto la urgente necesidad de buscar fuentes de energía alternativas para satisfacer nuestras necesidades energéticas en las próximas décadas (Alam, *et al.*, 2015; Lee y Lavoie, 2013; Leong, *et al.*, 2018). En consecuencia, se han tratado de buscar distintas opciones para contrarrestar dichas exigencias sin generar un impacto ambiental similar al ocasionado por el uso de combustibles derivados del petróleo. En este sentido, los biocombustibles se perfilan como una opción atractiva para la generación de energía, pues a diferencia de los combustibles fósiles, provienen de recursos renovables, son biodegradables y su emisión de gases de efecto invernadero (GEI) es baja (Bajpai, 2019).

1.1 Biocombustibles: una alternativa a los combustibles fósiles

Los biocombustibles son sustancias químicas generadas a partir de procesos biológicos que pueden incluir la producción de biomasa de organismos vivos (Rodionova, *et al.*, 2017). Dependiendo del origen de su materia prima, se clasifican de la siguiente manera: (i) primarios, si provienen de materiales orgánicos no procesados (p. ej. leña y astillas), y (ii) secundarios, si provienen de materiales orgánicos con algún grado o tipo de procesamiento (p. ej. el bioetanol y el biodiésel) (**Figura 1**) (Alam, *et al.*, 2012; Leong, *et al.*, 2018). Los biocombustibles secundarios se subdividen en tres categorías diferentes basadas en el tipo de tecnología de procesamiento, materia prima o nivel de desarrollo; estos pueden ser de primera, de segunda y de tercera generación (Castillo-Vázquez, *et al.*, 2011; Singh y Nigam, 2011). Para la fabricación de biocombustibles de primera generación se emplea como sustrato productos directos de cultivos

alimentarios (p. ej., semillas, granos o azúcar), mientras que los de segunda generación se producen a partir de desechos de cultivos alimentarios (p. ej., biomasa y lignocelulósica) (Nigam y Singh, 2011). La elaboración de biocombustibles de tercera generación depende de una materia prima que proviene de los procesos metabólicos de microorganismos como bacterias, algas y levaduras (Dragone, *et al.*, 2010; Picazo-Espinoza, *et al.*, 2011).

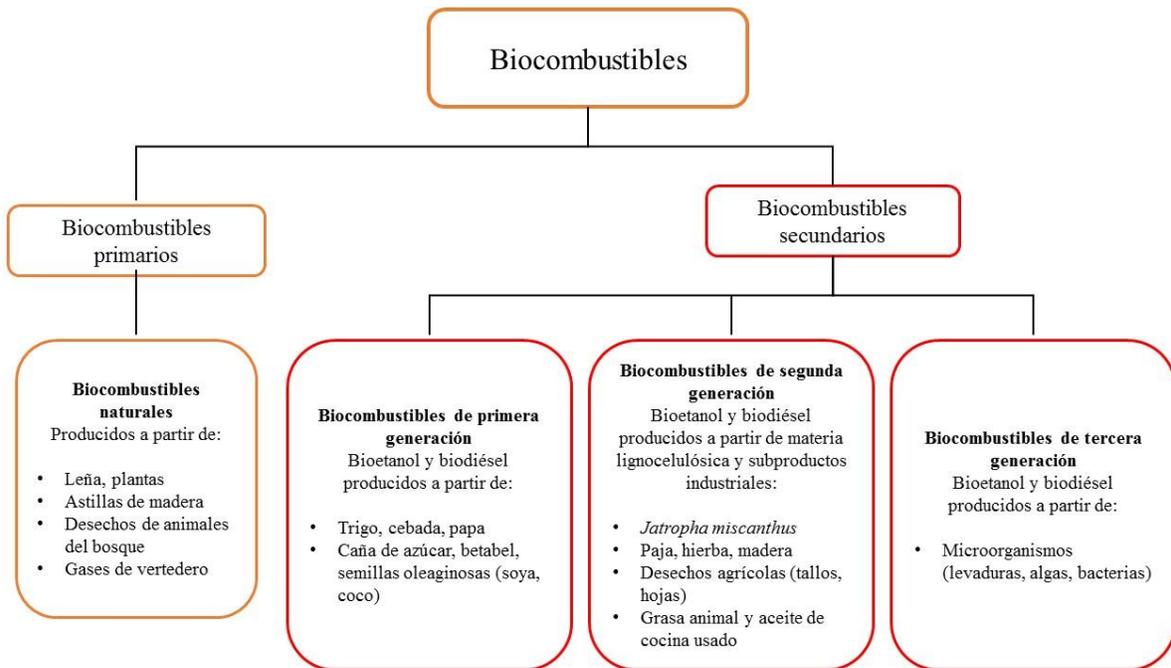


Figura 1. Clasificación de los biocombustibles de acuerdo a la materia orgánica utilizada para su producción. Esquema modificado de Alam y colaboradores (2015).

Los biocombustibles pueden ofrecer grandes beneficios por su naturaleza y se les ha vislumbrado como la mejor alternativa para sustituir de manera gradual a los combustibles fósiles. Sin embargo, la creciente demanda mundial de biocombustibles y las dificultades asociadas a su producción, dejan en claro la necesidad de explorar las distintas tecnologías de biocombustibles secundarios para encontrar aquellas que resulten más rentables (Love y Bryant, 2017).

1.2 La importancia de la producción de biocombustibles de tercera generación

El uso de las distintas tecnologías para producir biocombustibles varía geográficamente, es decir, cada país desarrolla y aprovecha técnicas según sus propios recursos naturales y capacidades tecnológicas. Por ejemplo, países como Estados Unidos, China y Brasil han desarrollado biocombustibles de primera y segunda generación, ya que cuentan con grandes extensiones de tierra para el cultivo de plantas que fungen como materia prima para la elaboración de biocombustibles de primera y segunda generación (Fernández-Linares, *et al.*, 2012). Sin embargo, los biocombustibles de tercera generación parecen contribuir de mejor manera a la reducción del impacto ambiental que los de primera y segunda generación. Es por eso que algunos países como Estados Unidos y los de la Unión Europea muestran cada vez más interés en el desarrollo de este tercer tipo de tecnología (Gambelli, *et al.*, 2017; Lackner, 2015; Nigam y Singh, 2011; Valdés-Rodríguez y Palacios-Wassenaar, 2016).

Los biocombustibles de tercera generación se basan en el uso de microorganismos como algas, bacterias y levaduras que bioprocesan residuos orgánicos agrícolas, urbanos e industriales para generar metabolitos útiles como materia prima (Nigam y Singh, 2011; Bajpai, 2019; Picazo-Espinoza, *et al.*, 2011). Algunas ventajas que presentan los biocombustibles de tercera generación sobre los de primera y segunda son las siguientes: (i) no hay una competencia polémica entre cultivar alimentos o cultivar materia prima para biocombustibles, (ii) no requieren insumos tales como fertilizantes, herbicidas e insecticidas, y (iii) no requieren enzimas para fermentar la materia lignocelulósica (Alam, *et al.*, 2012; Alam, *et al.*, 2015; Bajpai, 2019; Lackner, 2015). Por lo tanto, los biocombustibles de tercera generación parecen ser un recurso

energético alternativo viable debido a que carecen de los inconvenientes que aquejan a los otros tipos de biocombustibles, lo cual ha motivado a que diversas investigaciones se centren en desarrollar y optimizar su producción (Picazo-Espinoza, *et al.*, 2011; Behera, *et al.*, 2015; Nigam y Singh, 2011).

Se ha propuesto que los biocombustibles que se obtienen a partir de microorganismos, serán los únicos biocombustibles renovables con potencial para desplazar por completo a los combustibles derivados del petróleo (Ullah, *et al.*, 2014). Esta propuesta optimista se basa en estudios comparativos de producción de biodiésel a partir de sustratos obtenidos de distintas fuentes orgánicas (Gambelli, *et al.*, 2017). Se ha demostrado que la producción de biodiésel a partir de lípidos de microalgas puede alcanzar valores aproximados de entre 58,700 y 140,000 litros por hectárea (L/ha) por año, mientras que los aceites vegetales de plantas como la palma sólo son capaces de producir 5,950 L/ha al año (Chisti, 2007; Ullah, *et al.*, 2014; Singh, *et al.*, 2019). Lo anterior pone en evidencia que los microorganismos son capaces de producir varias veces más biocombustible que los aceites vegetales en una superficie menor de tierra (**Tabla 1**). Bajo este panorama, se ha reportado que el uso de biocombustibles producidos a partir de microorganismos podría satisfacer las demandas de combustibles de mejor manera en comparación con las tecnologías basadas en cultivos de plantas como materia prima (Singh, *et al.*, 2019). Este último aspecto es de particular importancia para países como México debido a la nula capacidad de mantener grandes extensiones de cultivo de plantas oleaginosas sin comprometer la alimentación de la población y la deforestación de selvas y bosques (Valdés-Rodríguez y Palacios-Wassenaar, 2016).

Tabla 1. Comparación de la eficiencia de producción de biodiésel dependiente del cultivo a partir de aceites vegetales y microalgas.

Fuente biológica	Biodiésel L/ha/año	Área para producir el equivalente a la demanda global de petróleo (ha)
Algodón	325	15,002
Soya	446	10,932
Semillas de mostaza	572	8,524
Girasol	952	5,121
Canola	1,190	4,097
Jatropha	1,892	2,577
Aceite de palma	5,950	819
Microalgas (10 gm ⁻² día ⁻¹ a 30 % TAG)	12,000	406
Microalgas (50 gm ⁻² día ⁻¹ a 50 % TAG)	98,500	49

Tabla adaptada de Ullah y colaboradores (2014).

México es un país productor y exportador de petróleo (hecho que representa una gran parte del sustento económico del país) lo que ha generado una dependencia para la elaboración de combustibles (Fernández-Linares, *et al.*, 2012). Actualmente, en México se han desarrollado distintos tipos de energías alternativas tales como: energía eólica, geotérmica, solar, entre otras; sin embargo, para poder mitigar el impacto ocasionado por el uso de los combustibles fósiles es necesario implementar nuevas tecnologías de energía alternativa (Lee y Lavoie, 2013). Por lo tanto, México requiere invertir más en investigaciones que permitan desarrollar biocombustibles, y así atenuar los efectos negativos de los combustibles fósiles, así como evitar problemas energéticos y ambientales durante el siglo XXI (Valdés-Rodríguez y Palacios-Wassenaar, 2016). En este sentido, los biocombustibles de tercera generación podrían representar un soporte en la producción de energías durante la transición a tecnologías más viables (Singh, *et al.*, 2019). Afortunadamente, instituciones como UABC, CIBNOR, CICY, UNAM, INECOL, CICE-SE,

CINVESTAV, CIATEJ, UADEC, entre otras, comenzaron a realizar estudios relacionados con el desarrollo de biocombustibles de tercera generación. Sus investigaciones se han centrado principalmente en la identificación y optimización de microorganismos cuya capacidad de producción de materia prima cumpla con los requerimientos que demanda la producción de biocombustibles (Sandoval, 2010; Riegelhaupt, *et al.*, 2016; Valdés-Rodríguez y Palacios-Wassenaar, 2016).

1.3 Levaduras oleaginosas: una alternativa en la producción de biodiésel

El biodiésel es uno de los combustibles que se pueden producir bajo la tecnología de biocombustibles de tercera generación, al igual que el bioetanol, el biohidrógeno, entre otros (Bajpai, 2019). El biodiésel es un biocombustible que ha ganado relevancia debido a que representa uno de los principales sustitutos de los combustibles empleados para el sector transporte, siendo que este sector es responsable de hasta un 23 % de las emisiones de gases de efecto invernadero global (Ullah, *et al.*, 2014; Sims, *et al.*, 2014). De hecho, a diferencia de los combustibles usados por el sector transporte como el diésel fósil, el biodiésel produce menor cantidad de gases de efecto invernadero (MacGrogan, *et al.*, 2015).

Para la producción de biodiésel es necesario el empleo de ácidos grasos metil esterificados (FAME), los cuales se obtienen a partir de la transesterificación de los triacilglicéridos (TAG). Los TAG son sintetizados mayoritariamente por algunos organismos oleaginosos como las plantas, bacterias, levaduras y microalgas, siendo estas últimas las que mayor predominancia tienen en cuanto a su utilización como materia prima para la producción de biocombustibles de tercera generación (Kumar, *et al.*, 2018). Actualmente, el estudio de las

microalgas como una fuente de materia prima para la producción de biodiésel lidera las investigaciones del campo; sin embargo, las levaduras exhiben cualidades que las hacen más atractivas industrialmente, por ejemplo: (i) no requieren luz para obtener energía, (ii) sus tiempos de duplicación son cortos y pueden alcanzar densidades celulares altas en poco tiempo, (iii) son fáciles de cultivar en medios controlados, (iv) tienen la capacidad de producir otros metabolitos de importancia biotecnológica, (v) son fáciles de escalar en bioprocesos. En el contexto de la producción de biodiésel, algunas levaduras tienen la capacidad de generar y almacenar grandes cantidades de lípidos (Ageitos, *et al.*, 2011; Beopoulos y Nicaud, 2012). Por lo tanto, las levaduras representan una alternativa atractiva para la industria productora de biodiésel.

Con el fin de mantener la homeostasis celular, las levaduras sintetizan lípidos que usan para (i) construir membranas, (ii) sintetizar segundos mensajeros y (iii) generar moléculas de almacenamiento de energía (Jarc y Petan, 2019). Aunque las levaduras son capaces de sintetizar y acumular lípidos, son pocas las especies capaces de acumular una cantidad considerable de lípidos para la producción de biodiésel (Donot, *et al.*, 2014). Para este fin se suelen emplear levaduras oleaginosas (OY, por sus siglas en inglés *oily yeast*) (Tanimura, *et al.*, 2014). Estos microorganismos tienen la capacidad de producir más del 20 % de su biomasa total en forma de lípidos, principalmente en TAG (Shields-Menard, *et al.*, 2018). Por ejemplo, levaduras oleaginosas como *Yarrowia lipolytica*, pueden acumular más de un 30 % de su biomasa seca en forma de lípidos (Fakas, 2017). Otras especies como *Cryptococcus curvatus*, son capaces de acumular más del 40 % de biomasa en lípidos (Holdsworth, *et al.*, 1988) (**Figura 2**). Mientras

que la levadura convencional *Saccharomyces cerevisiae* (no oleaginosa), sólo produce hasta un 10% de su biomasa seca en forma de lípidos (Ferreira, *et al.*, 2018; Teixeira, *et al.*, 2018).

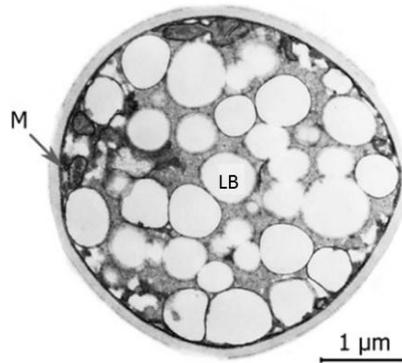


Figura 2. Micrografía de la levadura oleaginosa *Cryptococcus curvatus*. En la imagen se pueden observar las mitocondrias (M) y los cuerpos lipídicos (LB). Imagen modificada de Holdsworth y colaboradores (1988).

Actualmente, se han descrito y estudiado alrededor de setenta levaduras oleaginosas. Las especies que destacan son *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula glutinis*, *R. graminis*, *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus albidus*, *Rhodospiridium toruloides* y algunas que pertenecen al género *Lipomyces* (Sitepu, *et al.*, 2014). Varios estudios han demostrado que bajo distintas condiciones de cultivo algunas levaduras oleaginosas producen hasta un 80 % de su biomasa en forma de lípidos (Ageitos, *et al.*, 2011). Por esta razón, las investigaciones de cultivos de OY bajo condiciones que propicien la formación y acumulación de lípidos incrementó significativamente en los últimos años (Shi, *et al.*, 2017).

1.4 Condiciones de cultivo que promueven la producción de lípidos en levaduras oleaginosas

Las levaduras oleaginosas pueden acumular lípidos a partir de dos vías generales: (i) la vía de acumulación de lípidos *ex novo* que involucra la asimilación de ácidos grasos y lípidos en general del medio de cultivo para acumularlos y modificarlos dentro de la célula, y (ii) la vía de síntesis de lípidos *de novo* a partir de los precursores acetil-CoA y malonil-CoA (Beopoulos y Nicaud, 2012). Los lípidos acumulados y producidos a partir de estas dos vías generalmente fungen como precursores biosintéticos de otros lípidos (p. ej. lípidos de membrana), o bien como un reservorio de energía almacenada principalmente en forma de TAG, lo que previene los efectos tóxicos de los ácidos grasos libres (lipoperoxidación) (Fakas, 2017). En cuanto a la vía de síntesis de lípidos *de novo*, en particular, las OY producen cierta cantidad de lípidos cuando se encuentran en condiciones óptimas de crecimiento (Shi, *et al.*, 2017). Sin embargo, la síntesis de lípidos en condiciones óptimas de crecimiento celular es mínima y no es útil para fines industriales, por lo que se suelen probar distintas condiciones de crecimiento que permitan optimizar la producción de lípidos.

Las levaduras oleaginosas tienen la capacidad de producir una mayor cantidad y variedad de lípidos *de novo* bajo diferentes condiciones de crecimiento, como las altas o bajas temperaturas, los cambios de pH, la alta salinidad y el estrés por privación de nutrientes (Shi, *et al.*, 2017; Jeennor, *et al.*, 2006; Donot, *et al.*, 2014; Chen, *et al.*, 2013; Ma, *et al.*, 2009). Por ejemplo, a baja temperatura algunas levaduras oleaginosas son capaces de generar una mayor cantidad de lípidos con altas proporciones de ácidos grasos insaturados, lo cual se correlaciona directamente con el aumento de la fluidez de membrana en respuesta al frío (Gibson, *et al.*, 2007;

Jin, *et al.*, 2019). Por otro lado, en cultivos con un alto contenido de oxígeno disuelto se incrementa la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), debido a que el oxígeno es un elemento necesario para que las desaturasas, enzimas responsables de introducir dobles enlaces, actúen sobre los ácidos grasos (Jin, *et al.*, 2019). En contraste a esto, Davies y colaboradores (1990) mencionan que la acumulación de PUFA se reduce en la levadura *Apiotrychum curvatum* en condiciones de cultivo con un bajo contenido de oxígeno. Por esta razón, Sitepu y colaboradores (2014) señalan que el efecto particular del oxígeno disuelto para la síntesis de lípidos puede variar entre especies. Por otro lado, el estrés nutricional puede provocar que las levaduras oleaginosas produzcan una mayor cantidad de lípidos (Beopoulos y Nicaud, 2012). El estrés por la falta de nitrógeno es una de las condiciones de cultivo más eficientes para incrementar la producción de lípidos en levaduras oleaginosas (Kolouchová, *et al.*, 2016; Yang y Hu, 2019; Sitepu, *et al.*, 2013).

1.4.1 Cultivo de levaduras oleaginosas bajo condiciones limitadas de nitrógeno: síntesis de triacilgliceroles y cuerpos lipídicos

Las levaduras producen una mayor cantidad de lípidos cuando el nitrógeno del medio comienza a escasear y la fuente de carbono es abundante (Mukhtar, *et al.*, 2018). Cuando las células se quedan sin nitrógeno, el exceso de fuente de carbono continúa siendo asimilado por las células y es transformado en lípidos de almacenamiento (Ratledge y Wynn, 2002). En condiciones de limitación de nitrógeno, las células intensifican la glucólisis y canaliza algunos metabolitos del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) hacia la síntesis de ácidos grasos, principalmente el citrato. El desbalance en la disponibilidad de nitrógeno es sobrellevado mediante (i) regulación

ascendente de genes involucrados en la asimilación y transporte de fuentes de nitrógeno y genes que participan en la degradación y reciclaje de proteínas o compuestos nitrogenados, y (ii) la disminución en la biosíntesis de proteínas y macromoléculas (Zhu, *et al.*, 2012; Romero-Aguilar, *et al.*, 2017). En consecuencia, aumentan los niveles de síntesis y acumulación de lípidos intracelulares (Ratledge, 2004).

En levaduras oleaginosas, el almacenamiento del exceso de lípidos se lleva a cabo en compartimentos intracelulares denominados cuerpos o gotas lipídicas (LB por su siglas en inglés *Lipid Bodies*) (Ageitos, *et al.*, 2011). Los LB son orgánulos importantes con una variedad de funciones celulares, ya que se relacionan con organelos como: (i) el retículo endoplásmico, donde actúan como amortiguadores que no sólo secuestran el exceso de ácidos grasos libres, sino que también secuestran proteínas desplegadas o mal plegadas del RE y las transportan a vacuolas especializadas para su degradación (Jarc y Petan, 2019); (ii) las mitocondrias, donde permiten un suministro eficiente de ácidos grasos para una producción óptima de energía; (iii) los peroxisomas, donde se lleva a cabo una transferencia de lípidos para la degradación de los ácidos grasos de cadena larga y de cadena ramificada (Binns, *et al.*, 2006; Lodhi y Semenkovich, 2016), entre otros organelos. Así pues, los LB actúan como centros que coordinan las vías de absorción, distribución, almacenamiento y uso de lípidos en la célula (Jarc y Petan, 2019). Los LB almacenan principalmente triacilgliceroles (TAG), lípidos formados por una molécula de glicerol al cual se encuentran esterificados tres ácidos grasos, de los cuales el ácido palmítico (C16:0), el ácido esteárico (C18:0) y el ácido oleico (C18:1) son los más comunes (Ratray, *et al.*, 1975; Sitepu, *et al.*, 2014), siendo estos los ácidos grasos más utilizados en la producción de biodiésel (Sargeant, *et al.*, 2017). En la mayoría de las levaduras, cuando la disponibilidad de nitrógeno es

un factor limitante en el medio, los LB comienzan a formarse al final de la fase de crecimiento exponencial, con un desarrollo más intenso durante la fase estacionaria (Gientka, *et al.*, 2017).

Los cuerpos lipídicos son orgánulos derivados del retículo endoplásmico (RE) conformados por un núcleo hidrofóbico central de lípidos neutros que están rodeados por una capa de fosfolípidos y proteínas (Jarc y Petan, 2019). Los LB se forman cuando los TAGs se sintetizan entre las dos valvas de la membrana del RE mediante la adición secuencial de ácidos grasos a una columna central de glicerol. Al alcanzar una concentración crítica, los lípidos neutros del RE se nuclean (se separan y fusionan), formando estructuras similares a gotas de grasa en el citosol (Renne, *et al.*, 2020). Los TAGs se forman a través de la acilación consecutiva del glicerol-3-fosfato mediante tres aciltransferasas (Ageitos, *et al.*, 2011). El glicerol 3-fosfato es acilado por la glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) produciendo ácido lisofosfatídico (LPA), el cual posteriormente es acilado por la LPA aciltransferasa (LPAAT) para producir ácido fosfatídico (PA) (Renne, *et al.*, 2020). Posteriormente, el PA es desfosforilado por tres isoenzimas fosfatidato fosfatasa (PAP) para producir diacilglicerol (DAG) (Ageitos, *et al.*, 2011). Los últimos pasos de la lipogénesis de novo en levaduras oleaginosas varía en diferentes cepas y muestran dependencia de acil-CoA que se une con la cadena principal de DAG por una diacilglicerol aciltransferasas (DGAT) que finalmente forma TAGs (Patel, *et al.*, 2016).

1.4.2 Genes y vías metabólicas de la biosíntesis de TAG bajo condiciones de inanición de nitrógeno

En condiciones de cultivo donde la fuente de carbono es abundante y la fuente de nitrógeno es escasa o nula, las levaduras no oleaginosas cesan su crecimiento o asimilan el sustrato de carbono para producir otros metabolitos, mientras que las levaduras oleaginosas comienzan a

acumular una mayor cantidad de lípidos bajo esas condiciones (**Figura 3**) (Ratledge, 2004). Por lo tanto, la disponibilidad del nitrógeno es un regulador clave en la acumulación de ácidos grasos en los microorganismos oleaginosos (Chang, *et al.*, 2019).

Cuando una levadura tiene baja disponibilidad de nitrógeno, la enzima AMP-desaminasa (AMPD) descompone el adenosín monofosfato (AMP) en inosina monofosfato (IMP) y en iones amonio (NH_4^+), lo cual permite obtener nitrógeno (Papanikolaou y Aggelis, 2011).



La disminución en la concentración de AMP a nivel celular inhibe a la isocitrato deshidrogenasa (ICDH, enzima clave en el ciclo de Krebs que cataliza conversión del isocitrato a α -cetoglutarato) (Chang, *et al.*, 2019; Ratledge, 2002). La inhibición de la actividad de la ICDH, provoca una acumulación de isocitrato en la matriz mitocondrial (Ageitos, *et al.*, 2011). El isocitrato es transformado a citrato por medio de la aconitasa (ACO) (Ratledge, 2004). Después, el citrato es transportado desde la matriz mitocondrial hacia el citosol por la lanzadera malato/citrato, que permite un intercambio entre malato citosólico por citrato mitocondrial (Evans, *et al.*, 1983). El malato que entra a la matriz mitocondrial sufre una serie de reacciones bioquímicas que lo convierten en nuevas moléculas de citrato, manteniendo así constante la concentración de citrato mitocondrial (Ageitos, *et al.*, 2011). Una vez que el citrato ha sido transportado al citosol, es escindido por la ATP-citrato liasa (ACL), produciendo oxaloacetato y acetil-CoA, este último precursor de la síntesis *de novo* de los lípidos y del mevalonato. La ATP-CL es una enzima que está ampliamente presente en hongos, pero que se encuentra ausente en algunos miembros de Saccharomycotina como *Saccharomyces cerevisiae* (Tang, *et al.*, 2013).

Esta enzima se ha relacionado directamente con la capacidad de acumular lípidos intracelulares (Boulton y Ratledge, 1981). Una vez formado el acetil-CoA en el citoplasma, este se carboxila para formar malonil-CoA, una reacción irreversible catalizada por la acetil-CoA-carboxilasa (ACC), que requiere ATP y HCO_3^- (Sargeant, *et al.*, 2017). La biosíntesis de ácidos grasos *de novo* requiere de poder reductor proporcionado por la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH). La reacción catalizada por la enzima málica (ME) y las reacciones de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, de la vía de las pentosas son las principales productoras de poder reductor (Romero-Aguilar, *et al.*, 2017; Wasylenko, *et al.*, 2015).

En la mayoría de los microorganismos y en las plantas, ACL se compone de dos subunidades, codificadas por los genes *ACL1* y *ACL2* (p. ej. *Yarrowia lipolytica*), mientras que en los animales y en la levadura basidiomiceta *Rhodotorula gracilis*, *ACL* está codificada por un solo gen. (Dulermo, *et al.*, 2015).

Los cuerpos lipídicos son orgánulos derivados del retículo endoplásmico (RE) conformados por un núcleo hidrofóbico central de lípidos neutros que están rodeados por una capa de fosfolípidos y proteínas (Jarc y Petan, 2019). Los LB se forman cuando los TAG se sintetizan entre las dos valvas de la membrana del RE mediante la adición secuencial de ácidos grasos a una columna central de glicerol. Al alcanzar una concentración crítica, los lípidos neutros del RE se nuclean (se separan y fusionan), formando estructuras similares a gotas de grasa en el citosol (Renne, *et al.*, 2020). Los TAG se forman a través de la acilación consecutiva del glicerol-3-fosfato mediante tres aciltransferasas (Ageitos, *et al.*, 2011). El glicerol 3-fosfato

es acilado por la glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) produciendo ácido lisofosfatídico (LPA), el cual posteriormente es acilado por la LPA aciltransferasa (LPAAT) para producir ácido fosfatídico (PA) (Renne, *et al.*, 2020). Posteriormente, el PA es desfosforilado por tres isoenzimas fosfatidato fosfatasa (PAP) para producir diacilglicerol (DAG) (Ageitos, *et al.*, 2011). Los últimos pasos de la lipogénesis *de novo* en levaduras oleaginosas varían en diferentes cepas y muestran dependencia de acil-CoA que se une con la cadena principal de DAG por una diacilglicerol aciltransferasas (DGAT) que finalmente forma TAG (Patel, *et al.*, 2016).

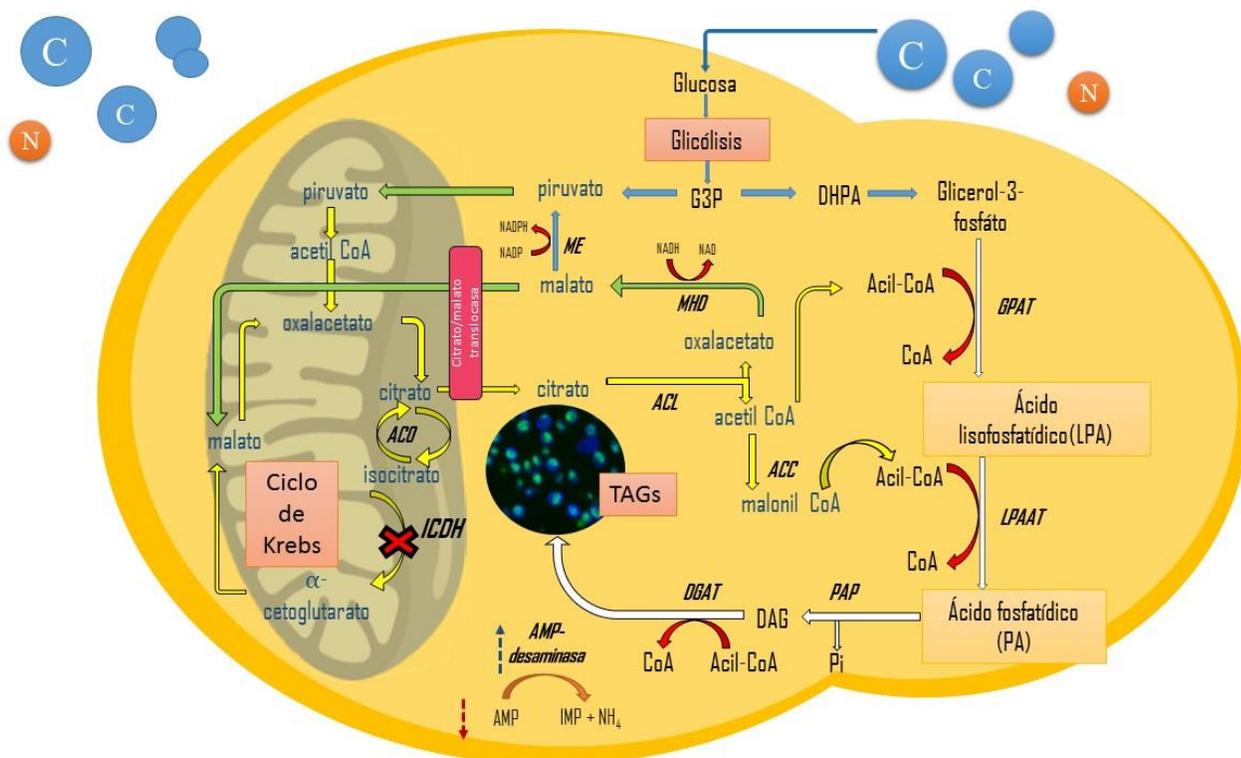


Figura 3. Síntesis de lípidos *de novo* bajo condiciones de limitación de nitrógeno. Metabolismo y producción de triacilglicerol (TAG) en levaduras oleaginosas. En letras azules se señalan los metabolitos involucrados en el flujo de citrato y malato como precursores de acetil-CoA y malonil CoA para lipogénesis *de novo*. En letras de color negro se señalan los metabolitos que participan en la biosíntesis de triacilglicerol. Las abreviaturas que corresponden a moléculas o metabolitos son: carbono (C), nitrógeno (N), adenosín monofosfato (AMP), gliceraldehído 3-fosfato (G3P), dihidroxiacetona fosfato (DHAP), ácido lisofosfatídico (LPA), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilinositol (PI), diacilglicerol (DAG), diacilglicerol y aciltransferasa (DGAT). Las abreviaturas que corresponden a enzimas son: adenosín monofosfato-deaminasa (AMP-desaminasa) deshidrogenasa de isocitrato (ICDH), aconitasa (ACO), ATP-citrato liasa (ACL), acetil-CoA carboxilasa (ACC), enzima málica (ME), malato deshidrogenasa (MHD) y fosfatidato fosfatasa (PAP). Todas las enzimas se encuentran resaltadas en negritas y cursivas. Las flechas roja y azul punteadas indican disminución o aumento, respectivamente. Las flechas amarillas abarcan los pasos catalíticos involucrados en la vía de síntesis de acetil-CoA y malonil-CoA a partir de citrato. Las flechas verdes señalan la vía de reingreso del malato a la mitocondria (gris). Las flechas azules señalan la asimilación de la fuente de carbono y parte de la glicólisis. Las flechas blancas indican la síntesis de TAG. Adaptado de Patel y colaboradores (2016).

1.5 Levaduras adaptadas al frío

Como se mencionó en la sección anterior, existen distintas condiciones fisiológicas en las que los microorganismos pueden producir una mayor o menor cantidad de lípidos, siendo las temperaturas bajas uno de los factores considerados con gran influencia sobre este proceso. El frío es una de las condiciones ambientales predominantes en el planeta Tierra. Casi el 80 % de los ecosistemas del planeta son fríos, entre ellos destacan los suelos del permafrost, los glaciares, las aguas de las profundidades, el Ártico y la Antártica (Buzzini y Margesin, 2014). Algunos ecosistemas, además de las bajas temperaturas, exhiben otros factores limitantes asociados al frío, como baja disponibilidad de agua y nutrientes, alta presión hidrostática, estrés oxidante y alta irradiación solar, haciendo que estos hábitats sean muy extremos para la vida. Sin embargo, muchos microorganismos son capaces de sobrevivir bajo las condiciones frías y agrestes que presentan estos ecosistemas (Shivaji y Prasad, 2009). Los microorganismos capaces de sobrevivir a bajas temperaturas son comúnmente denominados “*psicrófilos*”. Los microorganismos psicrófilos o psicrófilos obligados se caracterizan por tener la capacidad de crecer a una temperatura mínima ($TC_{\text{mín}}$) de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, teniendo una temperatura óptima de crecimiento ($TC_{\text{ópt}}$) de $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una temperatura máxima de crecimiento ($TC_{\text{máx}}$) de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Además, se ha considerado que los organismos psicrófilos sólo pueden vivir en hábitats que permanentemente están fríos (Russel, 2016). Otros microorganismos que también pueden crecer en temperaturas de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ son los denominados psicrotolerantes o psicrófilos facultativos, cuya temperatura de crecimiento óptima se encuentra entre los 20 y $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y, a diferencia de los microorganismos psicrófilos, los psicrotolerantes pueden proliferar en ambientes que tienen bajas temperaturas fluctuantes (Buzzini y Margesin, 2014). Por lo tanto, un organismo psicrófilo puede

vivir en sitios con intervalos de temperatura de crecimiento restringidos, mientras que los microorganismos psicrotolerantes pueden crecer en sitios con intervalos de temperatura más amplios (Figura 4).

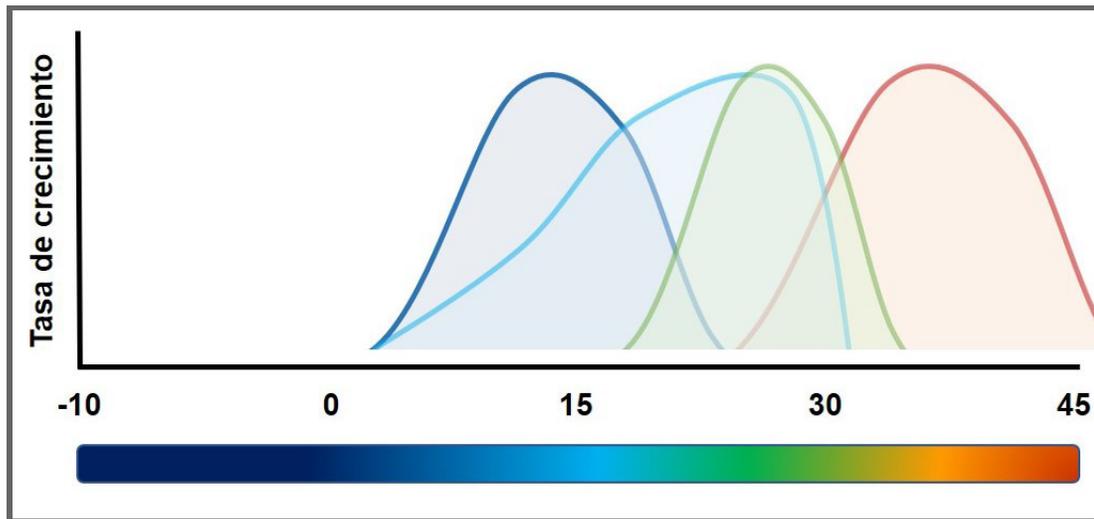


Figura 4. Clasificación de las levaduras según su crecimiento y temperatura. La curva de crecimiento de las levaduras psicrófilas se indica en azul oscuro ($TC_{\text{mín}} = 0\text{ }^{\circ}\text{C}$, $TC_{\text{ópt}} = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $TC_{\text{máx}} = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$), las psicrotolerantes en azul claro ($TC_{\text{mín}} = 0\text{ }^{\circ}\text{C}$, $TC_{\text{ópt}} = 20 - 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $TC_{\text{máx}} \geq 30\text{ }^{\circ}\text{C}$), las mesófilas en verde ($TC_{\text{mín}} \geq 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $TC_{\text{ópt}} = 20 - 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $TC_{\text{máx}} \geq 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) y las termotolerantes en naranja ($TC_{\text{mín}} = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $TC_{\text{ópt}} = 35 - 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $TC_{\text{máx}} \geq 40\text{ }^{\circ}\text{C}$). Tomado de González *et al.*, (2020).

Las levaduras adaptadas al frío son microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes con altas capacidades de adecuación, las cuales responden a diferentes factores de estrés (Villarreal, *et al.*, 2018; Buzzini y Margesin, 2014; Zlatanov, *et al.*, 2010). Las levaduras psicrófilas y psicrotolerantes tienen una amplia heterogeneidad de funciones biológicas que las hacen atractivas para la biotecnología, entre ellas destaca su capacidad de sintetizar: (i) proteínas de choque térmico, (ii) proteínas anticongelantes, (iii) enzimas clave que modulan su actividad a bajas temperaturas y (iv) compuestos foto-protectores como los carotenoides y las micosporinas (Buzzini y Margesin, 2014; Moliné, *et al.*, 2014). Asimismo, estos microorganismos tienen un mecanismo conservado para la síntesis de lípidos que modulan la fluidez de la membrana en

respuesta al frío. Los estudios han demostrado que el transporte de nutrientes se afecta cuando disminuye la fluidez de la membrana a bajas temperaturas (Gunde-Cimerman, *et al.*, 2014). Se ha observado que las levaduras aumentan la síntesis de ácidos grasos insaturados (UFAs) en respuesta al frío, mediante la inducción de la expresión del gen *OLE1*, que codifica para la enzima ácido graso desaturasa (OLE1). La actividad de OLE1 está directamente relacionada con el aumento en el nivel de insaturación de los ácidos grasos que componen la membrana celular, lo cual incrementa su fluidez (**Figura 5**) (Schade, *et al.*, 2004; Haas, 2014).

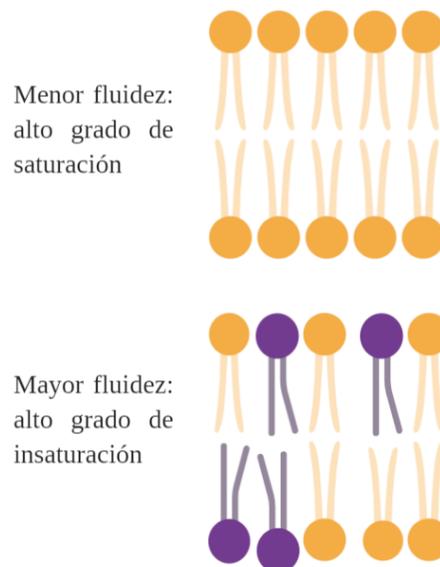


Figura 5. Cambios en la composición de la membrana celular en respuesta al frío. Las levaduras promueven la formación de ácidos grasos insaturados en respuesta a las bajas temperaturas. En condiciones de frío, los fosfolípidos de la membrana celular se componen mayoritariamente por ácidos grasos insaturados (morado) haciéndola más fluida y menos rígida facilitando el flujo de nutrientes. Elaboración personal.

1.6 El caso particular de las levaduras antárticas: la importancia de la producción de TAG

La Antártica es un continente que cuenta con una superficie aproximada de 14 millones de Km².

Una de las principales particularidades de este continente es que es considerado uno de los ambientes más extremos de la Tierra, con temperaturas menores a los -15 °C durante el verano y

temperaturas menores a los -40 °C durante el invierno; de hecho, al interior del continente se registró una temperatura mínima histórica de -89.6 °C (Brito, 2020). Asimismo, la Antártica cuenta con alta sequedad, fuertes vientos y nevadas, alto índice de radiación ultravioleta, limitación de nutrientes, y ciclos de congelación y descongelación bastante pronunciadas. Por lo tanto, los microorganismos que habitan en la Antártica están sometidos a múltiples presiones de selección (Zlatanov, *et al.*, 2001; Shivaji y Prasad, 2009). La distintiva capacidad de los microorganismos antárticos de crecer y metabolizar bajo condiciones tan agrestes, resulta motivante para la academia e investigadores que tienen interés en desarrollar aplicaciones biotecnológicas (Rossi, *et al.*, 2009; Viñarta, *et al.*, 2016; Thomas-Hall, *et al.*, 2010; Ruisi, *et al.*, 2007; Zlatanov, *et al.*, 2010).

Desde hace muchos años, a la Antártica se le ha considerado una reserva natural que alberga biodiversidad microbiana inexplorada con potencial biotecnológico (Buzzini y Margesin, 2014). Para el caso de las levaduras antárticas, las investigaciones se han enfocado a estudiar las respuestas adaptativas a condiciones ambientales de la región, tales como el frío extremo y la alta irradiación solar (Rossi, *et al.*, 2009; Villarreal, *et al.*, 2015). Otras investigaciones han sido enfocadas a identificar enzimas útiles en la biorremediación de hábitats que se encuentran en lugares fríos (Martorell, *et al.*, 2017) En cuanto a investigaciones sobre producción de TAG, algunas de estas levaduras antárticas han sido evaluadas y se han encontrado resultados favorables y prometedores para la producción de biocombustible (Viñarta, *et al.*, 2016). Particularmente, las levaduras antárticas del género *Rhodotorula* como *R. glutinis* (R4 y R48), *R. glacialis* (R15) y *R. laryngis* (R32 y R35) presentan la mayor producción y acumulación de

lípidos con alto contenido de ácidos oleico y linoleico, lo cual las ha hecho atractivas como productoras de materia prima para la producción de biocombustibles (Viñarta, *et al.*, 2016).

1.7 *Rhodotorula laryngis*: una levadura oleaginosa que se encuentra en ambientes fríos

Rhodotorula laryngis (a veces referida por su sinonimia *Cystobasidium laryngis*) es una levadura morfológicamente similar a la levadura roja *Rhodotorula mucilaginosa* (Sampaio, 2011), que se encuentra distribuida ampliamente en ambientes fríos, tanto acuáticos (agua de glaciares, ríos de agua de deshielo, lagos y lagunas de gran altitud) como terrestres (filoplano de los árboles *Nothofagus*, suelo antártico; sedimentos y hielo de los glaciares) de lugares como los Alpes, la Patagonia y la Antártica (Amaretti, *et al.*, 2014; De García *et al.*, 2007; Libkind, *et al.*, 2009; Arenz, *et al.*, 2006; Turchetti, *et al.*, 2013). *R. laryngis* también se encuentra en superficies de frutas como la pera y la nectarina, e incluso se ha hallado en frotis laríngeos humanos, de donde fue aislada por primera vez (Lutz, *et al.*, 2012; Janisiewicz, *et al.*, 2010; Sampaio, 2011). Además, se han encontrado algunas cepas de ambientes salinos, tales como el mar muerto (Butinar, *et al.*, 2005).

R. laryngis es una levadura psicrófila facultativa que tiene potencial biotecnológico en términos de enzimas activas en frío, pero su metabolismo ha sido poco explorado (Rossi, *et al.*, 2009; Amaretti, *et al.*, 2014). Los estudios en *R. laryngis* comprenden varias vertientes, de las cuales destacan: (i) investigaciones de resistencia a la radiación UV mediante la síntesis de compuestos fotoprotectores como los carotenoides y micospirinas (Villarreal, *et al.*, 2015; Vaz, *et al.*, 2011), (ii) síntesis de lipasas extracelulares (Brandão, *et al.*, 2011; Carrasco, *et al.*, 2012;

Martorell, *et al.*, 2017), y (iii) producción de ácidos grasos con valor comercial (Villarreal, *et al.*, 2018).

Aunque *R. laryngis* ha sido aislada de distintos hábitats, la mayoría de los estudios están centrados en investigar aspectos fisiológicos con potencial biotecnológico de cepas provenientes de la Antártica. En la última década, se evaluó las capacidades de síntesis de ácidos grasos como respuesta al frío en las cepas *R. laryngis* DBVPG 4765 y DBVPG 4772 provenientes de la Antártica (Rossi, *et al.* 2009; Villarreal, *et al.* 2018). En el estudio de Viñarta y colaboradores (2016) se destaca que *R. laryngis* R32 es una levadura oleaginosa con potencial biotecnológico que podría ser de gran utilidad para el ámbito de la producción de biocombustibles. Sin embargo, se requieren estudios que aborden o exploren las condiciones fisiológicas en las que *R. laryngis* podría incrementar la síntesis de lípidos de manera rentable. Asimismo, será necesario investigar su capacidad de crecimiento y producción de ácidos grasos usando subproductos industriales de bajo costo en los cultivos como el glicerol, el cual es un desecho en la producción de diésel.

2. Antecedentes e interpretación de datos

En enero del año 2014, el grupo de trabajo encabezado por el Dr. Marcelo Baeza de la Universidad de Chile, recopiló muestras de suelo de la isla Litchfield del Archipiélago Shetland del Sur, en la Antártica (Troncoso, *et al.*, 2016). A partir de dichas muestras de suelo, se aisló e identificó la levadura *Rhodotorula laryngis* M2222C8 que posteriormente fue donada al grupo del Laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Facultad de Ciencias, UNAM.

En el laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Facultad de Ciencias y el laboratorio de levaduras de la Facultad de Medicina de la UNAM se realizaron distintos experimentos durante 2019 con el fin de explorar las características de la levadura *Rhodotorula laryngis* M2222C8 y conocer su potencial biotecnológico. De esta forma, se obtuvieron datos crudos que se describen por primera vez en esta tesis, lo cual representa el eje medular de este trabajo junto con el análisis e interpretación de los datos.

2.1 Condiciones de cultivo

Para la obtención de los datos presentados, la cepa M2222C8 fue cultivada en 100 mL de medio rico (YPD, 1 % de extracto de levadura, 2 % de peptona bacto y 2 % de glucosa) durante 16-24 h a 180 rpm y 28 °C. Dichos cultivos fueron usados como preinóculos, los cuales representaron el tiempo 0 h. Posteriormente, las células fueron inoculadas en medio rico (YP) con glicerol (+Gly) (YP+Gly, 0.5 % de extracto de levadura, 1 % de peptona bacto y 10 % de glicerol) o en medio mínimo (MM) sin nitrógeno (-N) con glicerol (+Gly) (MM-N+Gly, 0.17 % de YNB sin fuente de nitrógeno y 10 % de glicerol).

2.2 *R. laryngis* acumula biomasa celular en medio rico con glicerol como fuente de carbono

El primer antecedente presentado corresponde tanto a la estimación del crecimiento como a la estimación de biomasa de *R. laryngis* en presencia de una fuente de carbono alterna no fermentable y económica como el glicerol. Para esto se inocularon células en medios de 50 mL con glicerol (YP+Gly) y medio mínimo sin nitrógeno con glicerol como única fuente de carbono (MM-N+Gly) a una densidad óptica (DO_{600}) de 0.05. En ambos medios, se midió la DO_{600} y se determinó el peso seco ($g L^{-1}$) cada 24 h durante 5 o 6 días. Las curvas de crecimiento fueron graficadas en el programa Prism versión 5.00 (<https://www.graphpad.com/scientific-software/>). Los experimentos fueron repetidos dos veces (**Figura 6**). Para la determinación de biomasa, las células crecidas en medio YP+Gly o MM+Gly fueron separadas en alícuotas (dependiendo de la DO_{600} se tomaron alícuotas de 1, 10 o 50 mL) cada 24 h. Las células fueron centrifugadas a 3000 rpm. Luego, las células sedimentadas se resuspendieron 1:1 (p/v) en agua destilada y fueron colocadas en tubos de 1.5 mL pre-pesados y deshidratadas con calor a 70 °C durante 72 h (Romero-Aguilar, *et al.*, 2020). Después, las muestras fueron pesadas y se calculó la producción de biomasa correspondiente al peso seco de las células. De esta forma, se obtuvo la **Figura 6**.

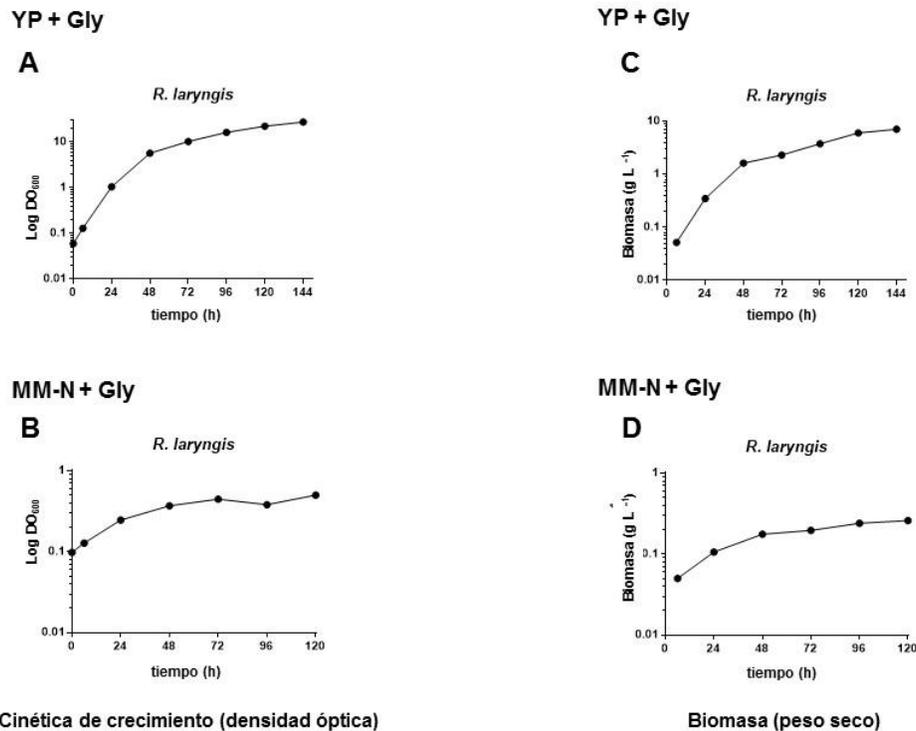


Figura 6. Cinética de crecimiento y acumulación de biomasa de *R. laryngis* en medio rico y medio mínimo con glicerol. A) Crecimiento de *R. laryngis* en medio rico con glicerol como fuente de carbono (YP+Gly). B) Crecimiento de *R. laryngis* en medio mínimo sin nitrógeno con glicerol (MM-N+Gly). C) Acumulación de biomasa en medio YP+Gly. D) Acumulación de biomasa en medio MM-N+Gly. La cinética de crecimiento y la acumulación de biomasa se siguieron por 120 o 144 h. Datos representativos de dos réplicas biológicas.

En la **Figura 6A** se puede observar que en medio YP+Gly, *R. laryngis* alcanzó una densidad óptica mayor a 20 (entre 28 y 30) en 144 h, lo cual equivale a 6.8 g L^{-1} de biomasa partiendo de una DO_{600} inicial de 0.05 (**Figura 6C**). Por otro lado, en medio MM-N+Gly, *R. laryngis* alcanzó a duplicarse dos veces en 120 h con una biomasa de 0.25 g L^{-1} partiendo de 0.05 de DO_{600} (**Figura 6B y 6C**). Por lo tanto, *R. laryngis* es una levadura capaz de crecer y acumular biomasa al cultivarse en medio rico con glicerol como fuente de carbono. Sin embargo, *R. laryngis* tiene un crecimiento lento en medio MM-N+Gly con una escasa producción de biomasa,

haciendo evidente que la falta de nitrógeno u otros elementos en el medio afectan su crecimiento y la producción de biomasa.

2.2 *R. laryngis* sintetiza cuerpos lipídicos en condiciones limitadas de nitrógeno

El siguiente antecedente presentado corresponde a la evaluación del valor relativo del contenido de lípidos neutros en las células, el cual se realizó a partir de 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) (**Figura 7**). Esta técnica permite seguir la dinámica de la acumulación de lípidos neutros en hongos levaduriformes como *Ustilago maydis* y *Saccharomyces cerevisiae* sin la necesidad de extraer los lípidos (Romero-Aguilar, *et al.*, 2018). En esta técnica el colorante BODIPY, altamente específico para unirse a lípidos neutros, permite la obtención del cociente entre la intensidad de fluorescencia y la densidad óptica, el cual se denomina como índice lipídico (IL). Para obtener el IL, se utilizó una suspensión celular previamente fijada con formaldehído (3.5 %), un amortiguador de lectura (5 μ M de BODIPY y 500 mM de yoduro de potasio (KI)) y una placa negra con fondo claro de 96 pozos. Los parámetros utilizados para medir la fluorescencia fueron 480 nm para la excitación, y 510 nm para la emisión. En paralelo a cada lectura de fluorescencia, se determinó la DO 600nm. Cada muestra se leyó cinco veces añadiendo alícuotas 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 al evaluar la linealidad de las mediciones de fluorescencia y absorbancia.

Los datos fueron seleccionados para $R^2 \geq 0.9$ (Romero-Aguilar, *et al.*, 2017; Romero-Aguilar, *et al.*, 2018).

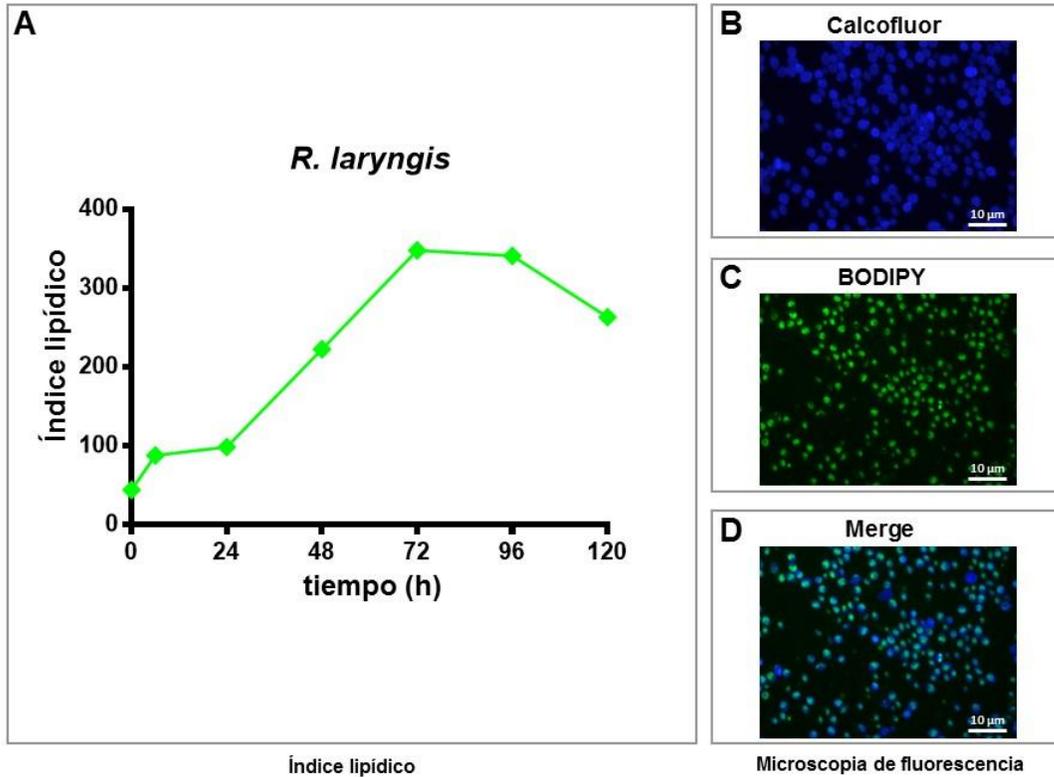


Figura 7. Índice lipídico y micrografías de fluorescencia de *R. laryngis* en medio mínimo con glicerol y sin nitrógeno. Las células fueron crecidas en medio mínimo con glicerol sin nitrógeno (MM-N+Gly) durante 120 h. A) Índice lipídico a las 0, 6, 24, 48, 72, 96 y 120 h de cultivo en MM-N+Gly. B) Micrografías de fluorescencia usando Calcofluor, o C) BODIPY. D) Superposición de las imágenes B y C.

El IL fue determinado a las 0, 6, 24, 48, 72, 96 y 120 h de crecimiento. Con el IL (**Figura 7A**) se determinó que la máxima acumulación de LB en células cultivadas en MM-N+Gly es a las 72 h. Esto fue corroborado por microscopía de fluorescencia utilizando los colorante BODIPY y calcofluor, que revelaron la formación de LB que abarcaron gran parte del espacio intracelular (**Figura 7B-D**). El calcofluor se fija en la pared celular (**Figura 7B**), mientras que el BODIPY permite identificar los LB de manera definida (**Figura 7C**). El empalme de la **figura**

7B y 7C permite co-localizar los LB en el citosol de *R. laryngis* (**Figura 7D**). Por lo tanto, la máxima capacidad de síntesis de LB de *R. laryngis* se observó a las 72 h de cultivo en medio mínimo que contienen glicerol como única fuente de carbono en la condición sin nitrógeno.

2.3 *R. laryngis* acumula cuerpos lipídicos a las 72 h de cultivo en medio mínimo con glicerol sin nitrógeno

Los resultados anteriores mostraron que *R. laryngis* tiene un incremento máximo de fluorescencia relativa a las 72 h de cultivo en medio MM-N+Gly. Para observar la acumulación de LB bajo estas condiciones y obtener imágenes de mayor calidad, se obtuvieron imágenes de microscopía confocal a las 0 y 72 h (**Figura 8A**). Para detectar los LB, se incubaron 2 μ L de células con 2 μ M de BODIPY, durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron, se montaron en portaobjetos SilanePrep (Sigma Co.) y se obtuvieron imágenes en un microscopio confocal (Zeiss LSM5 Pascal, Carl Zeiss GmbH, Göttingen, Alemania) con una inmersión en aceite 100 \times N.A. 1.3 objetivo (Romero -Aguilar, *et al.*, 2020). Las longitudes de onda utilizadas o filtro se describen en Romero-Aguilar y colaboradores (2017). Las imágenes se analizaron con el software ImageJ.

Para corroborar el incremento de los lípidos neutros acumulados en los LB de las células cultivadas en el tiempo 0 y a las 72 h en MM-N+Gly, se realizó un análisis de citometría de flujo en ambas condiciones (**Figura 8B**). La identificación de lípidos neutros en *R. laryngis* se llevó a cabo mediante la detección del colorante BODIPY. Las células cultivadas en medio MM-N+Gly fueron recolectadas a las 0 y 72 h, luego fueron fijadas con formaldehído al 4 % durante 15 min a temperatura ambiente y lavadas dos veces con una solución de NaCl al 0.9 %. Las células se

resuspendieron a una concentración final de 5×10^6 células / mL, se incubaron con el colorante BODIPY durante 10 min a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces con NaCl al 0.9 % y se sonicaron brevemente en un sistema ultrasónico compacto de alto rendimiento (Fisher Scientific FS3). Las células se observaron mediante microscopía antes de la adquisición para confirmar la rotura de agregados celulares. Por condición, se adquirieron 20,000 eventos con el citómetro de flujo MACSQUANT Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Alemania). Se analizaron cuatro muestras de cultivos independientes para cada condición. Los datos se analizaron utilizando el software FlowJo V. 10.5.3.

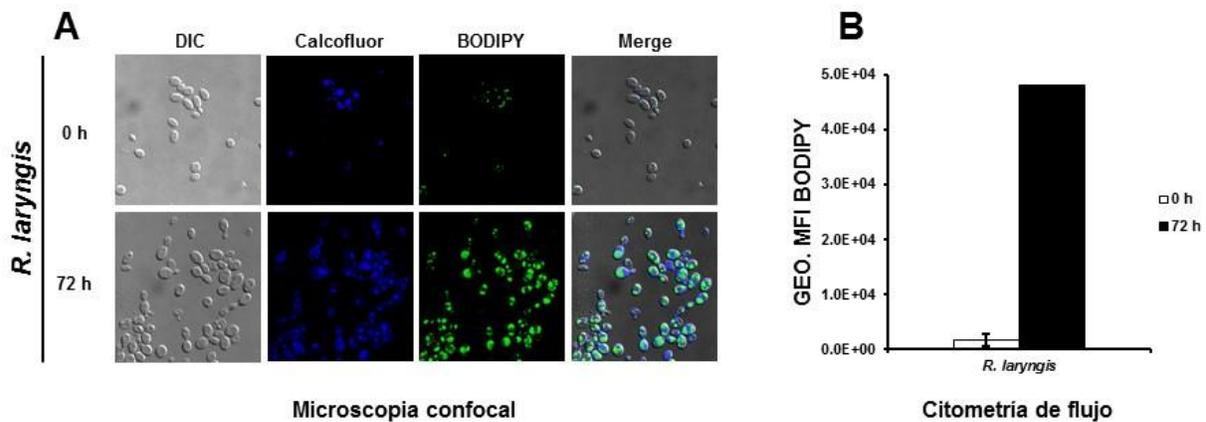


Figura 8. Detección y cuantificación de cuerpos lipídicos mediante microscopía confocal y citometría de flujo. A) Micrografías confocales de *R. laryngis* cultivada en medio mínimo sin nitrógeno con glicerol como única fuente de nitrógeno (MM-N+Gly) a las 0 h (control) y 72 h. En las imágenes verticales se observan las células con la luz transmitida (DIC), la pared celular teñida con calcoflúor o los cuerpos lipídicos (LB) teñidos con BODIPY. La acumulación de LB en el interior celular puede observarse al sobreponer las imágenes de DIC, Calcoflúor y BODIPY (Merge). B) Se obtuvo la media geométrica de fluorescencia (GEO.MFI BODIPY) mediante citometría de flujo a las 0 h (barra blanca) y 72 h (barra negra) de los cultivos celulares crecidos en medio MM-N+Gly. Las imágenes de microscopía confocal y los datos de citometría de flujo son representativos de 2 réplicas biológicas.

El análisis de microscopía confocal permitió observar pequeños LB que se forman en el espacio intracelular de *R. laryngis* en el tiempo 0 h, que corresponde a las células crecidas en medio rico YPD (preinóculo) durante 16 h (**Figura 8A**, panel superior). En medio MM-N+Gly, se observó que los LB aumentan de número y tamaño a 72 h de cultivo (**Figura 8A**, panel inferior). La micrografía de empalme (Merge) reveló que los LB ocupan más del 50 % del citosol de *R. laryngis* (**Figura 8A**, panel inferior). Por lo tanto, el metabolismo de síntesis de lípidos neutros en *R. laryngis* tiene su máxima acumulación de LB a las 72 h de cultivo bajo condiciones de inanición de nitrógeno en presencia de glicerol como única fuente de carbono.

La media geométrica de la intensidad de fluorescencia (GEO-MFI-BODIPY) de las células cultivadas en el tiempo 0 h fue menor a $0.2E + 04$ (**Figura 8B**). En cambio, cuando las células son cultivadas en medio MM-N+Gly durante 72 h se obtiene un valor aproximado de $4.8E + 04$ de GEO-MFI-BODIPY, indicando que los niveles de lípidos neutros aumentan 24 veces a las 72 h con respecto al control (tiempo 0 h). Por lo tanto, los datos de citometría de flujo refuerzan y demuestran que *R. laryngis* es capaz de sintetizar lípidos neutros y que se acumulan en los LB en medio MM-N+Gly a las 72 h de crecimiento (condición lipogénica).

2.4 Perfil de ácidos grasos de *R. laryngis* bajo la condición lipogénica utilizando glucosa o glicerol como única fuente de carbono

Una vez validada la síntesis de lípidos neutros y la acumulación de LB en *R. laryngis* en medio MM-N+Gly a las 72 h (condición lipogénica), se determinó el porcentaje del perfil de ácidos grasos mediante cromatografía de gases en la condición lipogénica utilizando glicerol (MM-N+Gly) o glucosa (MM-N+Glu) como única fuente de carbono (**Figura 9**). La

composición de ácidos grasos libres fue analizada mediante GC – MS (cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas) (Hewlett Packard 5890 – Hewlett Packard 5972) de acuerdo a Romero-Aguilar y colaboradores (2017). Después de la extracción de lípidos, se realizó la transesterificación de los ácidos grasos utilizando metanol anhidro en condiciones ácidas. Se añadió una muestra de 500 µL de lípidos a 2 mL de una mezcla anhidra de benceno / metanol (1:1, v/v) y 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado, y se incubó a 30 °C durante 16 h. La reacción se detuvo agregando 2 mL de agua. Posteriormente, se realizó dos veces una extracción orgánica con hexano. El disolvente se evaporó en atmósfera de nitrógeno. Las condiciones del análisis GC-MS fueron: inyector 270 °C, flujo dividido 15 mL / min, columna capilar (25 m, 0.20 mmd) recubierta con metilsiloxano (0.33 µm de espesor, Hewlett Packard) y helio como gas portador (presión de columna 244 kPa). La temperatura inicial fue de 170 °C y aumentó a 200 °C en 3 min y a una temperatura final de 240 °C (velocidad 2 °C / min) con un tiempo de análisis total de 23 min. Se utilizó una energía de ionización de 70 eV para el detector de masas. Las muestras secas se resuspendieron en 40 µL de hexano puro y se inyectaron 0.4 µL.

Finalmente, el análisis de los datos correspondientes al perfil de ácidos grasos de *R. laryngis* reveló que los ácidos grasos más abundantes en ambas condiciones fueron el ácido palmítico (C16:0), el ácido esteárico (C18:0) y el ácido oleico (C18:1) (**Figura 9**). El porcentaje de estos ácidos grasos fue variable en cada caso, aunque el más predominante fue el ácido esteárico en ambos medios. En medio MM-N+Gly, se observó un mayor porcentaje de ácido oleico (32 %) en comparación a las células que fueron cultivadas en medio MM-N+Glu (24 %). El porcentaje de ácido esteárico fue similar en las células que fueron cultivadas en medio MM-N+Glu (37 %) y medio MM-N+Gly (35 %), mientras que el porcentaje de ácido palmítico

en medio MM-N+Glu fue de 36 % y en medio MM-N+Gly de 29 %. También se observó un pequeño aumento en el porcentaje del ácido heptadecanoico en medio MM-N+Gly (1.8 %) en comparación con las células que fueron crecidas en MM-N+Glu (0.34 %). Por lo tanto, el perfil de ácidos grasos de *R. laryngis* es similar en ambas condiciones, indicando que la fuente de carbono (glucosa o glicerol) no afecta la composición de los ácidos grasos sintetizados. Sin embargo, se observó que el ácido oleico está más enriquecido en las células que crecieron en glicerol como única fuente de carbono.

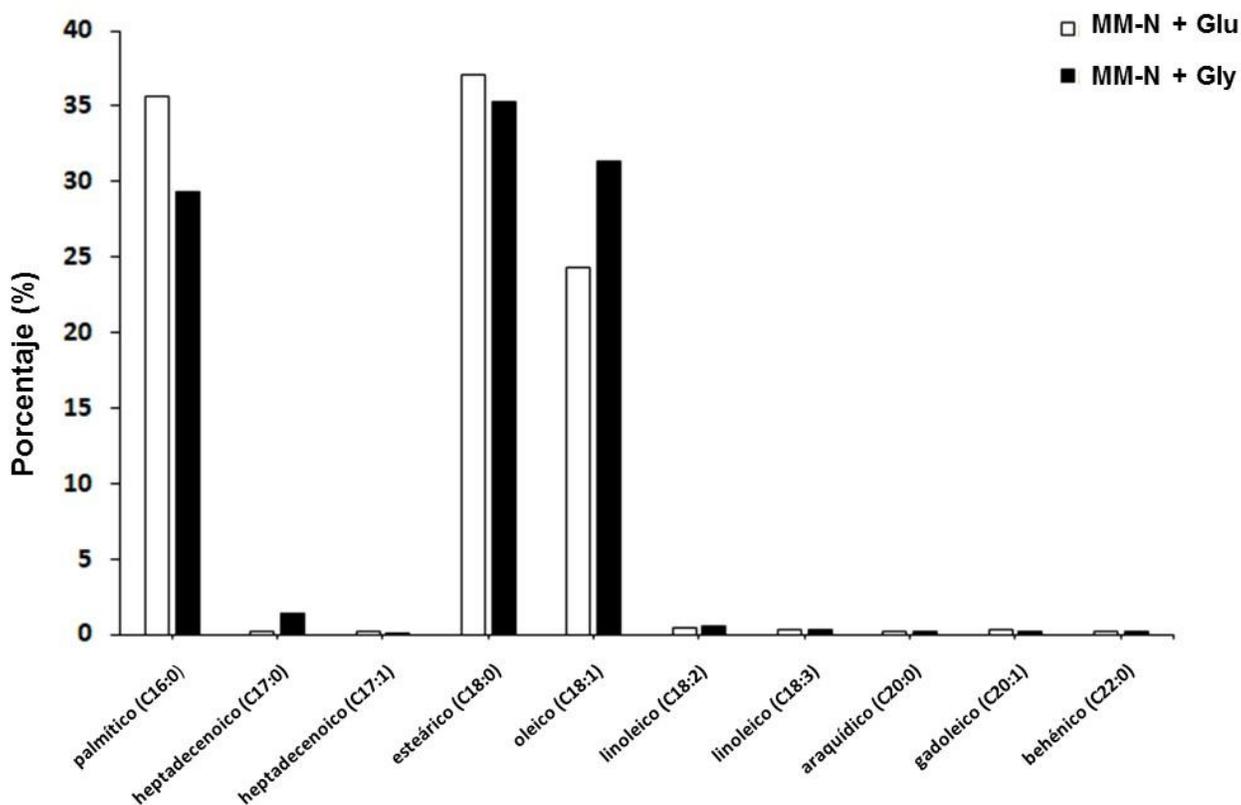


Figura 9. Perfil de ácidos grasos de *R. laryngis* en medio mínimo sin nitrógeno y variando la fuente de carbono. Porcentaje de los ácidos grasos de las células que fueron crecidas en medio mínimo sin nitrógeno con glucosa (MM-N+Glu, barras negras) o glicerol (MM-N+Gly) como fuente de carbono.

3. Justificación

El mayor reto en el tema de la producción de biocombustibles de manera rentable a partir de hongos es la identificación de levaduras oleaginosas capaces de generar grandes cantidades de biomasa celular que contengan altos niveles de ácidos grasos de cadena larga en forma de triacilgliceroles almacenados en cuerpos lipídicos celulares. A pesar de que se han identificado algunas levaduras oleaginosas con potencial biotecnológico para la producción de biocombustibles como el biodiésel, actualmente se requiere optimizar las condiciones de crecimiento celular que permitan incrementar la biomasa y mantengan la lipogénesis activa.

La levadura antártica *Rhodotorula laryngis* M2222C8 ha sido poco explorada; además, los estudios sobre su viabilidad como fábrica celular de lípidos para la producción de biodiésel son prácticamente escasos. Por lo tanto, es importante evaluar la capacidad de biosíntesis de cuerpos lipídicos y ácidos grasos de *R. laryngis* M2222C8 en cultivos que contienen glicerol como fuente de carbono pero sin nitrógeno, una condición de cultivo económica que activa la vía de síntesis de lípidos *de novo*.

4. Hipótesis

La levadura antártica *Rhodotorula laryngis* M2222C8 sintetizará y acumulará grandes cantidades de cuerpos lipídicos y ácidos grasos cuando sea cultivada bajo estrés nutricional por la falta de nitrógeno y la utilización de glicerol como fuente de carbono.

5. Objetivo general

Evaluar la biosíntesis de los cuerpos lipídicos y la producción de ácidos grasos en la levadura antártica *Rhodotorula laryngis* M2222C8.

6. Objetivos particulares

- ❖ Analizar e interpretar los datos de la cinética de crecimiento y la biomasa de *R. laryngis* en medio mínimo sin nitrógeno utilizando glicerol como fuente de carbono.
- ❖ Determinar el contenido de cuerpos lipídicos mediante el análisis de los datos de índice lipídico, microscopía confocal y citometría de flujo en la condición lipogénica en diferentes intervalos de tiempo.
- ❖ Analizar e interpretar los datos del perfil de ácidos grasos que se obtuvo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en la condición lipogénica.
- ❖ Proponer las características de calidad del biodiésel con base en el perfil lipídico.

7. Materiales y métodos

7.1 Determinación de las características de calidad del biodiésel de acuerdo a los datos descritos

Las propiedades del biodiésel como el valor de saponificación (SV), el índice de yodo (IV), el número cetano (CN) y el grado de insaturación (DU) se determinaron como se indica en Wu y colaboradores (2014) y Patel y colaboradores (2016) para *R. laryngis* cultivada en medio MM-N+Gly y MM-N+Glu:

$$(1) \quad SV = \sum 560(\%FA)/M$$

donde %FA es el porcentaje de cada ácido graso (FA) y M es la masa molecular de cada ácido graso.

$$(2) \quad IV = \sum 254(DB) (\%FA)/M$$

donde DB es el número de enlaces dobles en la cadena de ácido graso.

$$(3) \quad CN = 46.3 + 5458/SV - (0.255 * IV)$$

$$(4) \quad DU = MUFA + (2 * PUFA)$$

donde ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) es el contenido total de monoinsaturaciones y PUFA el contenido total de poliinsaturaciones.

8. Resultados y discusión

En la última década se comenzó a evaluar la capacidad de la levadura *R. laryngis* para sintetizar lípidos intracelulares, los trabajos más relevantes han sido: (i) el realizado por Rossi y colaboradores en 2009, y (ii) Viñarta y colaboradores en 2016. En este último, se destacó por primera vez la capacidad de *R. laryngis* para producir lípidos con un uso biotecnológico potencial. Sin embargo, *R. laryngis* ha sido poco explorada y son escasas las investigaciones enfocadas a la optimización de la biosíntesis de lípidos y la producción de biomasa con fines biotecnológicos.

Existen distintas características que permiten evaluar la efectividad de un microorganismo para producir algún metabolito de interés. En el caso particular de la producción de lípidos a partir de levaduras, se debe considerar que estas sean oleaginosas, es decir que acumulen más del 20 % de su biomasa en forma de lípidos (Leong, *et al.*, 2018). También es importante considerar que la levadura oleaginosa seleccionada tenga la capacidad de acumular ácidos grasos de la composición que se requiera para el fin comercial.

En el tema de las levaduras oleaginosas y los biocombustibles, algunos estudios consideran evaluar parámetros como el contenido de lípidos totales (g L^{-1}), el porcentaje de lípidos (%), el incremento de biomasa (g L^{-1}), la productividad lipídica ($\text{g L}^{-1}/\text{día}$), el índice lipídico (fluorescencia/biomasa), el porcentaje del perfil de los ácidos grasos (%), la generación de cuerpos lipídicos (microscopía de fluorescencia), entre otros (Patel, *et al.*, 2016; Polburee, *et al.*, 2016; Huang, *et al.*, 2016; Romero-Aguilar, *et al.*, 2018). En este trabajo se consideraron los siguientes parámetros para evaluar la capacidad de producción de lípidos neutros en la levadura

antártica *R. laryngis* M2222C8: (i) aumento de la densidad óptica, (ii) incremento de la biomasa, (iii) índice lipídico en diferentes tiempos de cultivo, (iv) generación de cuerpos lipídicos en distintos intervalos, y (v) porcentaje del perfil de ácidos grasos.

8.1 Acumulación de biomasa de *R. laryngis*

La glucosa es una de las fuentes de carbono más utilizadas en los cultivos de levaduras y otros microorganismos; sin embargo, usar esta fuente en los cultivos microbianos para la síntesis de lípidos resulta costoso para la industria del biodiésel (Huang, *et al.*, 2013). Por lo tanto, encontrar fuentes de carbono alternativas que permitan generar rendimiento tanto de biomasa como de lípidos resultaría beneficioso para el tema de biocombustibles.

Algunos trabajos han explorado la capacidad de distintas levaduras para crecer y generar biomasa y lípidos empleando diversas fuentes de carbono. Algunos de ellos han propuesto utilizar glicerol como fuente de carbono, ya que abarataría enormemente el costo de la producción de biomasa y lípidos (Taccari, *et al.*, 2012). En el presente estudio, en cuanto a crecimiento se refiere, en la **Figura 6B** se puede observar que *R. laryngis* casi no tiene crecimiento celular cuando se cultivó en MM-N+Gly, por lo que difícilmente se pudo diferenciar con exactitud las fases de crecimiento. Por otro lado, las levaduras crecidas en medio rico alcanzaron una densidad óptica (DO_{600}) de 20. Este hecho cobra relevancia en cuanto a producción de lípidos, ya que algunos estudios consideran y mencionan que la mayor acumulación de triacilgliceroles (TAG) en levaduras oleaginosas puede ocurrir durante la fase estacionaria (entre 24 y 72 h de cultivo), cuando se alcanza la densidad óptica máxima y se agota la fuente de nitrógeno (Enshaeieh, *et al.*, 2013). Con respecto a nuestros resultados, el

crecimiento de *R. laryngis* disminuye cuando se empleó glicerol como fuente de carbono en ausencia de nitrógeno. Este fenómeno es común pero no el más predominante en levaduras que crecen en medios con glicerol como fuente de carbono (Taccari, *et al.*, 2009).

Particularmente, para la generación de biomasa, como se puede observar en la **Tabla 3**, cuando se usan distintas fuentes de carbono el rendimiento en la producción puede ser muy heterogéneo. Aunque en medios ricos con glicerol como fuente de carbono, la producción de biomasa puede llegar a ser más alta en comparación a cultivos basados en glucosa (Taccari, *et al.*, 2009), cuando se emplean medios limitados de nitrógeno con glicerol algunos estudios presentan rendimientos más bajos. Por ejemplo, las levaduras *Rhodospiridium babjevae* y *Rhodospiridium diobovatum* producen entre 9.9 y 14.1 g L⁻¹ de biomasa en condiciones limitadas de nitrógeno utilizando 430 mM (4.3 %) de glicerol como fuente de carbono, siendo en este caso una acumulación de biomasa menor si se compara con las mismas cepas crecidas en presencia de glucosa (14.43 y 16.45 g L⁻¹ de biomasa) (Munch, *et al.*, 2015). Otras levaduras como *Y. lipolytica* logran acumular hasta 12 g L⁻¹ de biomasa en medio mínimo empleando 440 mM (4.4 %) de glicerol como fuente de carbono, una cantidad equiparable de biomasa si esta levadura es cultivada con una combinación de dextrosa y glicerol (12 g L⁻¹) (Sestric, *et al.*, 2014). La limitada acumulación de biomasa en condiciones de cultivo ricas en glicerol puede ser un indicativo de la regulación relativamente deficiente en las enzimas que están implicadas en los pasos metabólicos primarios de la asimilación del glicerol (p. ej., la glicerol cinasa y la 3-P-glicerol deshidrogenasa), que hacen que esta fuente de carbono tenga un rendimiento de conversión menor que otros sustratos (Papanikolaou y Aggelis, 2011).

Tabla 3. Cantidad de biomasa y lípidos que generan distintas levaduras oleaginosas cultivadas con diferentes sustratos.

Especie	Sustrato	Biomasa (g L⁻¹)	Contenido lipídico (% de peso seco)	Lípidos (g L⁻¹)	Referencia
<i>Apiotrichum curvatus</i>	Suero	85	35	29.75	Yang, <i>et al.</i> , 2019
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Glucosa	104.1	82.7	86.09	
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Celobiosa	28	50	14	
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Celobiosa y xilosa	31.5	55	17.3	
<i>Rhodospiridium babjevae</i>	Glicerol	9.9	34.9	-	Munch, <i>et al.</i> , 2015
<i>Rhodospiridium diobovatum</i>	Glicerol	14.1	63.7	-	
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Glucosa	106.5	67.5	71.89	Yang, <i>et al.</i> , 2019
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Almidón de aguas residuales	60	30	18	
<i>Rhodotorula laryngis</i>	Glucosa	8	42	5	Viñarta, <i>et al.</i> , 2016
<i>Rhodotorula laryngis</i>	Glucosa	11	38	2	Viñarta, <i>et al.</i> , 2016
<i>Trichosporon cutaneum</i>	Glucosa	22.9	52.4	12	Yang, <i>et al.</i> , 2019
<i>Trichosporon cutaneum</i>	Xilosa	21.2	46.5	9.9	
<i>Trichosporon fermentans</i>	Glucosa	28.1	62.4	17.5	
<i>Trichosporon fermentans</i>	Melaza y glucosa	27.9	52.7	14.7	
<i>Trichosporon fermentans</i>	Hidrolizado de paja de arroz	28.6	40.1	11.5	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Glucosa	9.3	24.70	2.3	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Hidrolizado de salvado de arroz	10.8	48.0	5.16	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Hidrolizado de caña de azúcar	11.4	58.5	6.68	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Glicerol	4.7	22.30	1.050	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Glicerol	12	31	-	Sestric, <i>et al.</i> , 2014

Tabla adaptada de Yang y colaboradores (2019).

Nuestros resultados sugieren que en condiciones de inanición de nitrógeno y en presencia de glicerol al 10 % (1M) como única fuente de carbono (MM-N+Gly), *R. laryngis* acumula una menor cantidad de biomasa que en la condición de cultivo del medio rico con glicerol (YP+Gly). La cantidad de biomasa acumulada de *R. laryngis* en MM-N+Gly es de aproximadamente 0.25 g L⁻¹, mientras que en medio YP+Gly, *R. laryngis* acumula mayores cantidades de biomasa (6.8 g L⁻¹). Esto hace sentido si se contempla que durante la inanición de nitrógeno, las células cesan su crecimiento y comienzan a almacenar el exceso de carbono (Papanikolaou y Aggelis, 2011).

Aunque *R. laryngis* es capaz de acumular biomasa en medio rico en presencia de glicerol al 10 %, su valor de acumulación resulta bajo al compararlo con los valores de acumulación de biomasa (entre 8 y 11 g L⁻¹ de biomasa, en medios basados en glucosa y limitados de nitrógeno) de *R. laryngis* R32 que se obtuvieron en el trabajo de Viñarta y colaboradores (2016).

8.2 La inanición de nitrógeno en presencia de glicerol estimula la acumulación de lípidos en *R. laryngis*

La limitación de nitrógeno en relación con el carbono ha sido la condición de cultivo ideal para explorar la capacidad de los microorganismos para acumular lípidos (Easterling, *et al.*, 2009). La activación de la acumulación de los TAG se debe a la limitada asimilación de carbono cuando la relación carbono/nitrógeno (C/N) es alta. Bajo esta condición, las actividades metabólicas celulares se canalizan hacia la acumulación de lípidos en lugar de generar biomasa celular (Yook, *et al.*, 2016). Considerando que nuestro medio de cultivo contenía glicerol como fuente de carbono y ninguna fuente de nitrógeno, la proporción de C/N que se utilizó fue de 10/0 (%). El efecto de esta relación se ve reflejado en la activación de la acumulación de TAG, la cual se

puede observar en el índice lipídico (IL) (**Figura 7A**). El IL reveló que la mayor acumulación de TAG intracelulares en *R. laryngis* se puede detectar a las 72 h de cultivo en medio MM-N+Gly. Este resultado fue corroborado por microscopía de fluorescencia, microscopía confocal y citometría de flujo (**Figura 7B-D** y **Figura 8**), con los cuales se pudo observar la acumulación de los cuerpos lipídicos (LB), tal y como lo demostraron Romero-Aguilar y colaboradores (2020) en el hongo *Ustilago maydis*. Los datos demuestran diferencias en la acumulación de TAG por *R. laryngis* entre los cultivos MM-N+Gly y YP+Gly (datos no mostrados). Si bien es difícil asegurar que la mayor acumulación de lípidos sea debido al cultivo con glicerol, nitrógeno o ambos en conjunto, sí puede afirmarse que la levadura *R. laryngis* cultivada con glicerol e inanición de nitrógeno acumula más lípidos en las condiciones experimentales de MM-N+Gly que los cultivos cultivados en YP+Gly.

Las propiedades de acumulación de lípidos de *R. laryngis* han sido poco exploradas (Rossi, *et al.*, 2009; Viñarta, *et al.*, 2016). De hecho, su cultivo con una fuente de carbono basada en glicerol no se ha estudiado. Se ha demostrado que *R. laryngis* es una levadura que acumula entre 38 y 42 % de lípidos totales por biomasa (valores con los que fue reportada como una levadura oleaginoso), lo cual equivale a entre 2 y 5 g L⁻¹. En el trabajo de Viñarta y colaboradores (2016) se utilizaron medios de cultivo con relaciones relativamente altas de C/N (entre 40 y 110) con glucosa como fuente de carbono, sugiriendo que se requerirá cambiar los parámetros de la relación C/N que se usó en el presente trabajo o utilizar glucosa como fuente de carbono para optimizar la producción de lípidos.

8.3 *R. laryngis* acumula ácido esteárico, ácido oleico y ácido palmítico en presencia de glucosa o glicerol como fuente de carbono

Las propiedades del biodiésel y la composición de ácidos grasos que pueden tener los TAG dependen en gran medida del tipo de materia prima usada para su producción, es decir, la fuente de carbono empleada en los cultivos (Zhang et al., 2016; Sitepu, *et al.*, 2013). Debido a la gran variabilidad de sustratos y condiciones empleadas en diferentes estudios, es común encontrar perfiles de ácidos grasos diversos, independientemente de la afiliación taxonómica (p. ej. *Y. lipolytica*) (Sitepu, *et al.*, 2013) (**Tabla 4**). En el perfil lipídico de *R. laryngis* en medio rico y mínimo se observó variabilidad (**Figura 9**).

Tabla 4. Perfil lipídico de distintas especies de levaduras

Especie	Sustrato	C16:0	C18:0	C18:1	Referencia
<i>Debaryomyces etcellsii</i>		18.4±0.1	38.8±0.2	27.3±0.3	Romero-Aguilar, <i>et al.</i> , 2016
<i>Cryptococcus sp SM5S05</i>		22.5-23	56.7-57.5	6.9-7.7	
<i>Picchia pastoris</i>		12	40	22	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		12	40	NR	
<i>Rhodotorula toruloides CBS14</i>		21.6±0.2	50±0.4	11±0.4	
<i>Rhodotorula gracilis</i>		21.8	56.1	5.1	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	YPD	22.1	52.5	11.5	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Medio adicionado con ácido oleico	4.1	77	6.6	
<i>Rhodotorula laryngis</i> DBVPG 4765 (T4° C)	Glucosa	26	1.2	39.4	Rossi, <i>et al.</i> , 2009
<i>Rhodotorula laryngis</i> DBVPG 4765 (T18° C)	Glucosa	23.3	2.1	45.8	
<i>Rhodotorula laryngis</i> DBVPG 4765 (T30° C)	Glucosa	20.4	4.6	51.1	
<i>Rhodotorula laryngis</i> DBVPG 4772 (T4° C)	Glucosa	22.6	7.9	41.6	
<i>Rhodotorula laryngis</i> DBVPG 4772 (T18° C)	Glucosa	29.1	1.4	44.8	
<i>Rhodotorula laryngis</i> DBVPG 4772 (T30° C)	Glucosa	26.3	5.5	41.4	

NR: no reportado. Tabla adaptada de Romero y colaboradores (2016)

Los porcentajes en los perfiles de ácidos grasos de *R. laryngis* crecida en medio MM-N+Glu o MM-N+Gly son similares, los ácidos grasos más abundantes en MM-N+Gly son ácido esteárico (34 %), ácido oleico (32 %) y ácido palmítico (29 %). Anteriormente, en el trabajo de Rossi y colaboradores (2009), se estudió el perfil lipídico de *R. laryngis* en medio rico con glucosa como fuente de carbono. El análisis de datos que se presenta en este trabajo muestra que *R. laryngis* es capaz de producir ácido palmítico (20 - 29 %), ácido esteárico (1 - 7.9 %) y

ácido oleico (39 - 51 %). Al comparar nuestros resultados de medio MM-N+Glu con los previamente descritos, encontramos que los porcentajes de ácido palmítico son similares (29 vs 20 - 29 %), mientras que los porcentajes de ácido oleico son inferiores (32 vs 39 - 51 %) en nuestro trabajo. En cuanto a los porcentajes de ácido esteárico, en nuestro perfil lipídico se obtuvo un valor mayor (34 vs 1 - 7.9 %). Por lo tanto, *R. laryngis* es capaz de producir TAG con una composición de ácidos grasos muy similar a la deseable (una alta proporción de 18:1, ácido oleico) bajo estrés nutricional por la falta de nitrógeno en presencia de glucosa o glicerol como única fuente de carbono. La alta producción de ácido oleico y la baja proporción de ácidos grasos poliinsaturados, son características deseables que deben tener los aceites empleados para la producción de biodiésel, debido a que sus capacidades estructurales se relacionan con las especificaciones químicas buscadas para producir biodiésel (**Tabla 5**) (Sitepu, *et al.*, 2013; Ramos, *et al.*, 2009). En cuanto a la alta producción de ácido oleico, *R. laryngis* podría resultar ser una opción atractiva para la producción de biodiésel. Un aspecto interesante sobre el trabajo de Rossi y colaboradores (2009), es que el contenido de ácidos grasos también es sensible a las variaciones de temperatura, principalmente influenciado por la psicotolerancia de *R. laryngis*. No obstante, para la obtención de los datos analizados, la temperatura no fue un parámetro relevante, aunque es aproximada a la temperatura de 30 °C que Rossi y colaboradores (2009) usaron para sus ensayos.

Tabla 5. Influencia de la estructura de los ácidos grasos en los parámetros de rendimiento de biocombustibles.

Medio	Índice de cetano (calidad de ignición: mayor es mejor)	Punto de fusión (menor es mejor)	Estabilidad a la oxidación (mayor es mejor)	Viscosidad cinemática (menor es mejor)	Calor de combustión
Longitud de la cadena	Larga es mejor	Corta es mejor	NR	Corto es mejor	Largo es mejor
Grado de saturación	Saturada es mejor	Insaturada es mejor	Saturado es mejor	Insaturado es mejor	NR
Ramificaciones	NR	Ramificado es mejor	NR	NR	NR

NR: no es relevante. Tabla obtenida de Romero-Aguilar, *et al.*, (2016).

8.4 El biodiésel producido a partir de *R. laryngis* sería estable a la oxidación y al almacenamiento prolongado

A partir del análisis del perfil lipídico de *R. laryngis* se determinaron los valores referentes a algunas de las propiedades comúnmente utilizadas para evaluar la calidad del biodiésel como son: (i) el valor de saponificación (SV), (ii) el índice de yodo (IV), (iii) el número de cetano (CN) y (iv) el grado de insaturación (DU), de acuerdo con lo reportado previamente (Wu, *et al.*, 2014; Patel, *et al.*, 2016). El análisis resumido se muestra en la **Tabla 6**. Los datos obtenidos en ambos medios (glucosa y glicerol) revelaron que no existen diferencias sustanciales, siendo SV y CN muy parecidos entre sí. Por otro lado, los valores referentes a IV y DU fueron los más disímiles entre los dos medios empleados (MM-N+Gly y MM-N+Glu). Los valores más altos en la estimación de las propiedades del biodiésel se obtuvieron en la condición de medio mínimo con glicerol.

Se puede observar que el IV es menor con respecto a los valores máximos estandarizados por la norma ASTM (American Society for Testing and Materials) D6751 y la norma Europea

para Biodiésel (European Committee for Standardization, ECS) 14214; 120 g yodo / 100 g para IV (Knothe, 2010; Patel, *et al.*, 2016). Asimismo, el valor de CN es bajo con respecto al valor mínimo estandarizado por las mismas normas (CN de 47 para la ASTM y 51 para la ECS). En resumen, los ácidos grasos sintetizados y acumulados por *R. laryngis* en medio MM-N+Gly y MM-N+Glu presentan propiedades de rendimiento similares para la producción de biodiésel.

Tabla 6. Estimación de propiedades del biodiésel con base al perfil de ácidos grasos de *R. laryngis*.

Medio	SV	IV (g yodo / 100 g)	CN	DU (%)
MM-N+Gly	203.042	31.34	28.22	34
MM-N+Glu	204.393	24.16	26.93	27

Los perfiles de ácidos grasos de levaduras oleaginosas pueden variar de manera significativa, es por ello que las propiedades del biodiésel pueden ser muy heterogéneas y por lo tanto se han establecido algunas propiedades con las que se puede evaluar su calidad (Patel, *et al.*, 2016), por ejemplo, el número de cetano, el punto de fusión, la estabilidad oxidativa, la viscosidad cinemática y el calor de combustión. Estas propiedades en el biodiésel deben ser evaluadas y cumplir con las normas oficiales que establece la ASTM (Knothe, 2008). La mayoría de estas propiedades están relacionadas con las características químicas de los ácidos grasos, entre ellas destaca la longitud de la cadena, el grado de insaturación y el número de ramificaciones (**Tabla 5**) (Sitepu, *et al.*, 2013).

La insaturación de ácidos grasos se puede estimar mediante el índice de yodo (IV). Un IV alto provoca una tasa mayor de polimerización de glicéridos, lo cual aumenta el espesor del combustible, provocando la formación de depósitos sólidos en el sistema de combustible del

motor, que afecta negativamente los patrones de rociado de los inyectores de combustible (Shunmugam, *et al.*, 2019). Por lo tanto, es deseable un IV bajo para la producción de biodiésel (Ramos, *et al.*, 2009). Según la Norma Europea para Biodiésel (ECS), un biocombustible no debe sobrepasar el umbral de 120 g yodo / 100 g, por lo tanto, el IV de los ácidos grasos sintetizados por *R. laryngis* en ambas condiciones (MM-N+Gly y MM-N+Glu) está dentro de los parámetros permitidos (31.34 y 24.16 g de yodo / 100 g, respectivamente). Ahora bien, el DU describe la estabilidad a la oxidación, influyendo en la viabilidad del almacenamiento prolongado del combustible (Patel, *et al.*, 2016). Es deseable un DU bajo para que el biocombustible sea más estable. En nuestro análisis se calculó que el valor DU de los ácidos grasos sintetizados por *R. laryngis* en glicerol o glucosa como fuente de carbono sin nitrógeno es bajo (34 o 27 %, respectivamente). Por lo tanto, el biodiésel que se puede producir con *R. laryngis* es estable al almacenamiento prolongado y a la oxidación.

No obstante, los CN fueron las únicas características de rendimiento cuyos valores estuvieron fuera del rango estandarizado tanto por la ASTM como por la ECS. El NC de los ácidos grasos sintetizados de *R. laryngis* en MM-N+Gly fue de 28.22, mientras que en MM-N+Glu fue 26.93. Las normas ASTM y ECS permiten un mínimo de NC de 47 y 51, respectivamente (Knothe, 2010). El CN es un parámetro de calidad relacionado con el tiempo de retardo de encendido y la calidad de combustión. De hecho, cuanto mayor es el CN, mejores son las propiedades de ignición de un combustible (Meher, *et al.*, 2006). Por lo tanto, las propiedades de ignición de un combustible basado en los ácidos grasos sintetizados por *R. laryngis* en las condiciones estudiadas no es óptima para el CN.

9. Conclusiones

Rhodotorula laryngis puede cultivarse en condiciones de inanición de nitrógeno en presencia de una fuente de carbono no fermentable como glicerol. Bajo esta condición de cultivo se observó que *R. laryngis* crece lento en comparación con las células que crecen en medio rico con glicerol.

La acumulación de biomasa de *R. laryngis* en medio MM-N+Gly (0.25 g L^{-1}) es 30 veces menor que en medio YP+Gly (6.8 g L^{-1}). El nulo crecimiento de *R. laryngis* en medio MM-N+Gly es un efecto que frecuentemente se observa en los cultivos de levaduras cuya fuente de carbono es glicerol o por la falta de nitrógeno.

El índice lipídico de *R. laryngis* incrementa en medio MM-N+Gly, este aumento está correlacionado con el contenido LB. La acumulación de lípidos neutros se comienza a observar a las 24 h de cultivo en medio MM-N+Gly, el punto máximo de acumulación se detecta a las 72 h. Lo anterior se apoya con micrografías de fluorescencia, donde se evidencia que los LB ocupan más del 50 % del espacio citosólico de la célula.

La detección de LB mediante microscopía confocal confirmó que hay un incremento en la producción y acumulación de TAG cuando *R. laryngis* se cultiva en MM-N+Gly (72 h) en contraste con las células que se cultivaron en medio YP+Gly. En medio MM-N+Gly en el tiempo 0 h se observan LB diminutos y escasos, mientras que a las 72 h de cultivo en se observan LB grandes y abundantes.

La citometría de flujo permitió evaluar la media geométrica de la intensidad de fluorescencia de *R. laryngis* cuando crece en medio MM-N+Gly, confirmando que los LB se acumulan 5 veces más que en las células cultivadas en medio rico.

El perfil de ácidos grasos de *R. laryngis* reveló que esta levadura es capaz de producir grandes cantidades de ácido oleico (32 %) en la condición lipogénica (MM-N+Gly). Este aspecto es de particular interés para la industria de los biocombustibles porque la composición más deseable para producir biodiésel es una alta proporción de ácidos grasos C18:1.

La evaluación de los parámetros de calidad de biodiésel revelaron que un biocombustible elaborado usando lípidos producidos por *R. laryngis* puede ser estable a la oxidación y almacenado prolongadamente debido a su bajo índice de yodo IV y DU. Sin embargo, las propiedades de ignición del combustible no son óptimas dado su bajo CN.

Las condiciones de cultivo utilizadas en este trabajo solamente podrían funcionar para identificar levaduras oleaginosas; sin embargo, para producir grandes cantidades de LB y biomasa se puede optimizar el cultivo empleando parámetros distintos en base a una relación de C/N. De esta forma, se podría encontrar un mejor rendimiento en los parámetros de producción de LB y biomasa en *R. laryngis*, empleando sustratos económicos como el glicerol.

10. Perspectivas

Quedan pendientes algunos aspectos interesantes que pueden ser abordados en estudios futuros:

- Mejorar el rendimiento de acumulación de biomasa y lípidos neutros modificando los parámetros de la relación C/N. Se propone evaluar el crecimiento de *R. laryngis* en distintas concentraciones de glicerol (1, 5 y 10 %), así como de nitrógeno (0.05, 0.1 y 0.25 g L⁻¹).
- Un punto importante en los bioprocesos es el aprovechamiento máximo de la fuente de carbono. Se propone evaluar el consumo de glicerol a medida que se acumulan la biomasa celular y los LB.
- La capacidad para generar biomasa y producir ácidos grasos con propiedades peculiares es una de las características principales que se consideran en una levadura oleaginosa para fungir como materia prima en la elaboración de biocombustibles. En este trabajo queda pendiente determinar el porcentaje de lípidos totales por biomasa seca de *R. laryngis* cuando se crece en medio MM-N+Gly.
- Determinar la actividad de las enzimas involucradas en los procesos de síntesis y acumulación de TAG en medio MM-N+Gly. Lo anterior puede ser un punto de partida importante para identificar las vías metabólicas que influyen en la biosíntesis de cuerpos lipídicos y la producción de ácidos grasos de la levadura antártica *R. laryngis* en la condición lipogénica.

11. Referencias

1. Ageitos JM, Vallejo JA, Veiga-Crespo P y Villa TG (2011) Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 4:1219–1227.
2. Alam F, Date A, Rasjidin R, Mobin S, Moria H y Baqui A (2012) Biofuel from Algae- Is It a Viable Alternative?. *Procedia Engineering*. 49:221–227.
3. Alam F, Mobin S y Chowdhury H (2015) Third generation biofuel from Algae. *Procedia Engineering*. 105:763-768.
4. Amaretti A, Simone M, Quartieri A, Masino F, Raimondi S, Leonardi A y Rossi M (2014) Isolation of Carotenoid-producing Yeasts from an Alpine Glacier. *Chemical Engineering Transactions*. 38:217-222.
5. Arenz BE, Held BW, Jurgens JA, Farrell RL y Blanchette RA (2006) Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. *Soil Biology and Biochemistry*. 38:3057-3064.
6. Bajpai P (2019) Third Generation Biofuels. *Springer Nature Singapore Pte Ltd*. pp 87.
7. Beopoulos A y Nicaud JM (2012) Yeast: A new oil producer?. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*. 1:22-28.
8. Behera S, Singh R, Arora R, Sharma NK, Shukla M y Kumar S (2015) Scope of algae as third generation biofuels. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2:1-13.
9. Binns D, Januszewski T, Chen Y, Hill J, Markin VS, Zhao Y, Gilpin C, Chapman KD, Anderson RGW y Goodman JM (2006) An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies. *The Journal of cell biology*. 173:719-731.

10. Boulton CA y Retledge C (1981) Correlation of lipid accumulation in yeasts with possession of ATP: citrate lyase. *Microbiology*. 127:169-176.
11. Brandão LR, Libkind D, Vaz AB, Espírito-Santo LC, Moliné M, de García V, van Broock M y Rosa CA (2011) Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. *FEMS microbiology ecology*. 76:1-13.
12. Brito SJ (2020) Sistema enzimático antioxidante de la levadura antártica *Rhodotorula mucilaginosa* M94C9 y adaptación al frío en levaduras; un estudio bioquímico y bioinformático-comparativo (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias.
13. Butinar L, Santos S, Spencer-Martins I, Oren A y Gunde-Cimerman N (2005) Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS microbiology letters*. 244:229-234.
14. Buzzini P y Margesin R (2014) Cold-adapted Yeasts. Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance: A lesson from the cold and a challenge for the XXI century. En Buzzini P y Margesin R (eds) *Cold Adapted yeasts*. Springer. pp 3-22.
15. Castillo-Vázquez N, Siqueiros T y Rascón-Cruz Q (2011) Biocombustibles: estrategias limpias para combatir la crisis energética. *TecnoCiencia*. 2:61-66.
16. Carrasco M, Rozas JM, Barahona S, Alcaíno J, Cifuentes V y Baeza M (2012) Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. *BMC microbiology*. 12:251-260

17. Chang L, Tang X, Lu H, Zhang H, Chen YQ, Chen H y Chen W (2019) Role of Adenosine Monophosphate Deaminase during Fatty Acid Accumulation in Oleaginous Fungus *Mortierella alpina*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 67:9551-9559.
18. Chen XF, Huang C, Yang XY, Xiong L, Chen XD y Ma LL (2013) Evaluating the effect of medium composition and fermentation condition on the microbial oil production by *Trichosporon cutaneum* on corncob acid hydrolysate. *Bioresource Technology*. 143:18–24
19. Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*. 25:294-306.
20. De García V, Brizzio S, Libkind D, Buzzini P y Van Broock M (2007) Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiology Ecology*. 59:331-341.
21. Donot F, Fontana A, Baccou JC, Strub C y Schorr-Galindo S (2014) Single cell oils (SCOs) from oleaginous yeasts and moulds: Production and genetics. *Biomass and Bioenergy*. 68:135–150.
22. Dragone G, Fernandes B, Vicente AA y Teixeira JA (2010) Third generation biofuels from microalgae. En: Mendez-Vilas A (ed) Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. *Formatex*. 1355–1366
23. Dulermo T, Lazar Z, Dulermo R, Rakicka M, Ramedane H 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*. 9:1107-1117.

24. Easterling ER, French WT, Hernández R y Licha M (2009) The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology*. 100:356-361.
25. Enshaeieh M, Abdoli A, Nahvi I y Madani M (2013) Medium optimization for biotechnological production of single cell oil using *Candida gali* and *Yarrowia lipolytica* M7. *Journal of cell and molecular research*. 5:17-23.
26. Evans CT, Scragg AH y Ratledge (1983) Regulation of Citrate Efflux from Mitochondria Oleaginous and Non-Oleaginous Yeasts by Adenine Nucleotides. *European journal of biochemistry*. 132:609-615.
27. Fakas S (2017) 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*. 3:292-302.
28. Fernández-Linares LC, Montiel-Montoya J, Millán-Oropeza A y Badillo-Corona JA (2012) Producción de biocombustibles a partir de microalgas. *Ra Ximhai*. 8:101-15.
29. Ferreira R, Teixeira PG, Gossing M, David F, Siewers V y Nielsen J (2018) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for overproduction of triacylglycerols. *Metabolic engineering communications*. 6:22-27.
30. Gambelli D, Alberti F, Solfanelli F, Vairo D y Zanolli R (2017) Third generation algae biofuels in Italy by 2030: A scenario analysis using Bayesian networks. *Energy Policy*. 103:165-178.

31. Gibson BR, Lawrence SJ, Leclaire JP, Powell CD y Smart KA (2007). Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS microbiology reviews*. 31:535-569.
32. Gientka I, Gadaszewska M, Błazejak S, Kieliszek M, Bzducha-Wróbel A, Stasiak-Rózańska L y Kot AM (2017) Evaluation of lipid biosynthesis ability by *Rhodotorula* and *Sporobolomyces* strains in medium with glycerol. *European Food Research and Technology*. 243:275-286.
33. González J, Romero-Aguilar L, Matus-Ortega G, Pardo JP, Flores-Alanis A Segal-Kischinevzky C (2020) Levaduras adaptadas al frío: el tesoro biotecnológico de la Antártica. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 23:1-14
34. Gunde-Cimerman N, Plemenitaš A y Buzzini P (2014) Changes in lipids composition and fluidity of yeast plasma membrane as response to cold. En Buzzini P y Margesin R (eds) *Cold Adapted yeasts*. Springer. 225-242.
35. Haas K (2014) Role of Sterol Metabolism and Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation of Proteins in Cold Adaptation of Yeasts. En Buzzini P y Margesin R (eds) *Cold Adapted yeasts*. Springer. 281-293.
36. Holdsworth JE, Veenhuis M, Ratledge C (1988) Enzyme activities in oleaginous yeasts accumulating and utilizing exogenous and endogenous lipids. *J Gen Microbiol* 134:2907–2915.
37. Huang C, Chen XF, Xiong L, Ma LL y Chen Y (2013) Single cell oil production from low-cost substrates: the possibility and potential of its industrialization. *Biotechnology advances*. 31:129-139.

38. Huang XF, Liu JN, Lu LJ, Peng KM, Yang GX y Liu J (2016) Culture strategies for lipid production using acetic acid as sole carbon source by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*. 206:141-149.
39. Janisiewicz WJ, Kurtzman CP y Buyer JS (2010) Yeasts associated with nectarines and their potential for biological control of brown rot. *Yeast*. 27:389-398.
40. Jarc E y Petan T (2019) Focus: Organelles: Lipid Droplets and the Management of Cellular Stress. *The Yale journal of biology and medicine*. 92:435-452.
41. Jeennor S, Laoteng K, Tanticharoen M y Cheevadhanarak S (2006) Comparative fatty acid profiling of *Mucor rouxii* under different stress conditions. *FEMS Microbiol. Lett*. 259:60–66.
42. Jin M, Zhai R, Xu Z, y Wen Z (2019) Production of High-Value Polyunsaturated Fatty Acids Using Microbial Cultures. En Balan V (2019) Microbial Lipid Production. *Humana press*. pp 229-248.
43. Kitcha S y Cheirsilp B (2011) Screening of oleaginous yeasts and optimization for lipid production using crude glycerol as a carbon source. *Energy Procedia*. 9:274-282.
44. Knothe G (2010) Calidad del combustible biodiésel y la norma astm. *Revista Palmas*. 31:162-171.
45. Kolouchová I, Maťátková 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*. 61:431-438.
46. Kumar A, Kushal S, Saraf SA y Singh JS (2018) Microbial biofuels: A solution to carbon emissions and energy crisis. *Front Biosci-Landmrk*. 23:1789-1802.

47. Lackner M (2015) 3rd-Generation Biofuels: Bacteria and Algae as Sustainable Producers and Converters. *Handbook of Climate Change Mitigation and Adaptation*. 1–32.
48. Lee RA y Lavoie JM (2013) From first-to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. *Animal Frontiers*. 3:6-11.
49. Leong WH, Lim JW, Lam M, Uemura Y y Ho YC (2018) Third generation biofuels: a nutritional perspective in enhancing microbial lipid production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 91:950–961.
50. Libkind D, Moliné M, Sampaio JP y Van Broock M (2009) Yeasts from high-altitude lakes: influence of UV radiation. *FEMS microbiology ecology*. 69:353-362.
51. Lodhi IJ y Semenkovich CF (2014) Peroxisomes: a nexus for lipid metabolism and cellular signaling. *Cell metabolism*. 19:380-392.
52. Love J y Bryant JA (Eds.) (2017) Biofuels and bioenergy. *John Wiley & Sons*. 227-240.
53. Lutz MC, Lopes CA, Sosa MC y Sangorrín MP (2012) A new improved strategy for the selection of cold-adapted antagonist yeasts to control postharvest pear diseases. *Biocontrol Science and Technology*. 22:1465-1483.
54. Ma L, Xing D, Wang H, Wang X y Xue D (2009) Effect of culture conditions on cell growth and lipid accumulation of oleaginous microorganism. *Sheng wu gong cheng xue bao= Chinese journal of biotechnology*. 25: 55-59.
55. Martorell MM, Ruberto LAM, Fernández PM, Castellanos de Figueroa LI y Mac Cormack WP (2017) Bioprospection of cold-adapted yeasts with biotechnological potential from Antarctica. *Journal of Basic Microbiology*. 6:504–516.

56. MacGrogan AS, Williamson G H, Curto JW y Giambrone MD (2015) A Comparative Analysis of biodiesel and Diesel Emissions. A Major Qualifying Project Report Submitted to the Faculty of the Worcester Polytechnic Institute. E-project-042815-163944. Disponible en línea en: https://web.wpi.edu/Pubs/E-project/Available/E-project-042815-163944/unrestricted/Biodiesel_MQP_FINAL.pdf
57. Meher LC, Sagar DV y Naik SN (2006) Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renewable and sustainable energy reviews*. 10:248-268.
58. Moliné M, Libkind D, De Garcia V y Giraudo MR (2014) Production of pigments and photo-protective compounds by cold-adapted yeasts. En Buzzini P y Margesin R (eds) Cold Adapted yeasts. *Springer*. 193-224.
59. Munch G, Sestric R, Sparling R, Levin DB y Cicek N (2015) Lipid production in the under-characterized oleaginous yeasts, *Rhodospiridium babjevae* and *Rhodospiridium diobovatum*, from biodiesel-derived waste glycerol. *Bioresource Technology*. 185:49-55.
60. Mukhtar H, Suliman SM, Shabbir A, Mumtaz MW, Rashid U y Rahimuddin SA (2018) Evaluating the Potential of Oleaginous Yeasts as Feedstock for biodiesel Production. *Protein and peptide letters*. 25:195-201.
61. Nigam PS y Singh A (2011) Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in energy and combustion science*. 37:52-68.
62. 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*, 113:1031-1051.

63. Patel A, Arora N, Sartaj K, Pruthi V y Pruthi PA (2016) Sustainable biodiesel production from oleaginous yeasts utilizing hydrolysates of various non-edible lignocellulosic biomasses. *Renewable and sustainable energy reviews*. 62:836-855.
64. Picazo-Espinosa R, González-López J y Manzanera M (2011) Bioresources for third-generation biofuels. *Biofuel's Engineering Process Technology*. 6:115-133.
65. Polburee P, Yongmanitchai W, Honda K, Ohashi T, Yoshida T, Fujiyama K y Limtong S (2016) Lipid production from biodiesel-derived crude glycerol by *Rhodospiridium fluviale* DMKU-RK253 using temperature shift with high cell density. *Biochemical Engineering Journal*. 112:208-218.
66. Raimondi S, Rossi M, Leonardi A, Bianchi MM, Rinaldi T y Amaretti A (2014) Getting lipids from glycerol: new perspectives on biotechnological exploitation of *Candida freyschussii*. *Microbial cell factories*. 13:83-94.
67. Ramos MJ, Fernández CM, Casas A, Rodríguez L y Pérez Á (2009) Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource technology*. 100:261-268.
68. Ratledge C (2004) Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*. 11:807-815.
69. Ratledge C y Wynn JP (2002) The Biochemistry and Molecular Biology of Lipid Accumulation in Oleaginous Microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*. 51:1-52.
70. Rattray JB, Schibeci A y Kidby DK (1975) Lipids of yeasts. *Bacteriological Reviews*. 39:197-231.

71. Renne MF, Klug YA y Carvalho P (2020) Lipid droplet biogenesis: A mystery “unmixing”?. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 108:12-23.
72. Riegelhaupt E, Odenthal J y Janeiro L (2016) Diagnóstico de la situación actual del biodiésel en México y escenarios para su aprovechamiento. *Informe Final (CONFIDENCIAL red Mexicana de Bioenergía. Ecofys 2016 por orden de: Banco Interamericano de Desarrollo para SENER)*. pp 1-129.
73. Rodionova MV, Poudyal RS, Tiwari I, Voloshin RA, Zharmukhamedov SK, Nam HG, Zayadan BK, Bruce BD, Hou HJM y Allakhverdiev SI (2017) Biofuel production: Challenges and opportunities. *International Journal of Hydrogen Energy*. 42:8450-8461.
74. Romero-Aguilar L, Sánchez GG, Pardo JP y Bocardo OI (2017) Cuerpos lipídicos: Organelos metabólicamente activos. *Revista de Educación Bioquímica*. 35:115-124.
75. Romero-Aguilar L, Pardo JP, Lomelí MM Bocardo OIL, Oropeza MAJ y Sánchez GG (2017) Lipid droplets accumulation and other biochemical changes induced in the fungal pathogen *Ustilago maydis* under nitrogen-starvation. *Archives of microbiology*. 199: 1195-1209.
76. Romero-Aguilar,L, Montero-Lomeli M, Pardo JP y Guerra-Sánchez G (2018) Lipid index determination by liquid fluorescence recovery in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 134:57279.
77. Romero-Aguilar L, Guerra-Sánchez G, Tenorio EP, Tapia-Rodríguez M, Matus-Ortega G, Flores-Herrera O, González J y Pardo JP (2020) Rapamycin induces morphological and physiological changes without increase in lipid content in *Ustilago maydis*. *Archives of Microbiology*. 3:1211–1221.

78. Rossi M, Buzzini P, Cordisco L, Amaretti A, Sala M, Raimondi S, Ponzoni C, Pagnoni UM y Matteuzzi D (2009) Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts. *FEMS microbiology ecology*. 69:363-372.
79. Ruisi S, Barreca D, Selbmann L, Zucconi L, y Onofri S (2007) Fungi in Antarctica. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 6:127-141.
80. Russell NJ (2006) Antarctic microorganisms: coming in from the cold. *Culture*. 27:1-4.
81. Sampaio JP (2011) *Rhodotorula* Harrison (1928) En Kurtzman CP, Fell JW y Boekhout T (Eds.) The yeasts, a taxonomic study, *Elsevier, Amsterdam*. pp 1873-1927
82. Sandoval G (2010) Biocombustibles Avanzados en México. Estado actual y perspectivas. Cuadernos temáticos sobre Bioenergía. *Red Mexicana de Bioenergía AC*. pp 1-36.
83. Sargeant LA, Jenkins R W y Chuck CJ (2017) Lipid-based biofuels from oleaginous microbes. En Love J y Bryant JA (Eds.) Biofuels and bioenergy. *John Wiley & Sons*. pp. 227-240.
84. Schade B, Jansen G, Whiteway M, Entian KD y Thomas DY (2004) Cold adaptation in budding yeast. *Molecular Biology of the Cell*. 15:5492-5502.
85. Sestric R, Munch G, Cicek N, Sparling R y Levin DB (2014) Growth and neutral lipid synthesis by *Yarrowia lipolytica* on various carbon substrates under nutrient-sufficient and nutrient-limited conditions. *Bioresource Technology*. 164:41-46.
86. Shi K, Gao Z, Shi TQ, Song P, Ren LJ, Huang H y Ji XJ (2017) Reactive oxygen species-mediated cellular stress response and lipid accumulation in oleaginous

microorganisms: the state of the art and future perspectives. *Frontiers in microbiology*. 8:793-802.

87. Shivaji S y Prasad GS (2009) Antarctic Yeasts: Biodiversity and Potential Applications. En Satyanarayana T y Kunze G (Eds.) *Yeast biotechnology: diversity and applications*. *Springers*. 78:3–18.
88. Sims R, Schaeffer R, Creutzig F, Cruz-Núñez F, D'Agosto M, Dimitriu D, Figueroa MJ, Meza L, Kobayashi, Lah, McKinnon, Newman, Ouyang, Schauer JJ, Sperling D y Tiwari G (2014) Transport. En Edenhofer O, Pichs-Madruga R, Sokona Y, Farahani E, Kadner S, Seyboth K, Adler A, Baum I, Brunner S, Eickemeier P, Kriemann B, Savolainen J, Schlömer S, von Stechow C, Zwickel T y Minx JC (eds) *Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. *Cambridge University Press*. pp 10-25.
89. Shields-Menard SA, Amirsadeghi M, French WT y Boopathy R (2018) A review on microbial lipids as a potential biofuel. *Bioresource Technology*. 259:451–460.
90. Singh A, Olsen SI y Nigam PS (2011) A viable technology to generate third-generation biofuel. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 86:1349-1353.
91. Singh S, Pereira APA y Verma JP (2019) Research and Production of Third-Generation Biofuels. *Bioprocessing for Biomolecules Production*. 401–416.
92. Sitepu IR, Sestric R, Ignatia L, Levin D, German JB, Gillies L, Almada LAG y Boundy-Mills KL (2013) Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty

- acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. *Bioresource Technology*. 144:360–369.
93. Sitepu IR, Garay LA, Sestric R, Levin D, Block DE, German JB y Boundy-Mills KL (2014) Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnology advances*. 32:1336-1360.
94. Shunmugam S, Gayathri M y Muralitharan G (2019) Assessment of Fuel Quality Parameters and Selection of Bacteria Using PROMETHEE–GAIA Algorithm. En Balan V (2019) Microbial Lipid Production. *Humana press*. pp 215-229.
95. Taccari M, Canonico L, Comitini F, Mannazzu I y Ciani M (2012) Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. *Bioresource Technology*. 110:488-495.
96. Tang X, Feng H y Chen WN (2013) Metabolic engineering for enhanced fatty acids synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic engineering*. 16:95-102.
97. Tanimura A, Takashima M, Sugita T, Endoh R, Kikukawa M, Yamaguchi S, Sakuradani E, Ogawa J y Shima J (2014) Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production. *Bioresource Technology*. 153:230–235
98. Teixeira PG, David F, Siewers V y Nielsen J (2018) Engineering lipid droplet assembly mechanisms for improved triacylglycerol accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*, 18:1-23
99. Thomas-Hall S, Turchetti B, Buzzini P, Branda E, Boekhout T, Theelen B y Watson K (2010) Cold-adapted yeasts from Antarctica and the Italian Alps—description of three

- novel species: *Mrakia robertii* sp. nov., *Mrakia blollopis* sp. nov. and *Mrakiella niccombsii* sp. nov. *Extremophiles*. 1:47-59.
100. Troncoso E, Barahona S, Carrasco M, Villarreal P, Alcaíno J, Cifuentes V y Baeza M. (2016) Identification and characterization of yeasts isolated from the South Shetland Islands and the Antarctic Peninsula. *Polar Biology*. 40:649–658.
101. Turchetti B, Goretti M, Branda E, Diolaiuti G, D'Agata C, Smiraglia C, Onofri A y Buzzini P (2013) Influence of abiotic variables on culturable yeast diversity in two distinct Alpine glaciers. *FEMS microbiology ecology*. 86:327-340.
102. Ullah K, Ahmad M, Sharma VK, Lu P, Harvey A, Zafar M, Sultana S y Anyanwu CN (2014) Algal biomass as a global source of transport fuels: Overview and development perspectives. *Progress in Natural Science: Materials International*. 24:329-339.
103. Valdés-Rodríguez OA y Palacios-Wassenaar OM (2016) Evolución y situación actual de plantaciones para biocombustibles: perspectivas y retos para México. *Agroproductividad*. 9:33-41.
104. Vaz AB, Rosa LH, Vieira ML, Garcia VD, Brandão LR, Teixeira LC, Moliné M, Libkind D, van Broock M y Rosa CA (2011) The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42:937-947.
105. Villarreal P, Carrasco M, Barahona S, Alcaíno J, Cifuentes V y Baeza M (2016). Tolerance to ultraviolet radiation of psychrotolerant yeasts and analysis of their carotenoid, mycosporine, and ergosterol content. *Current microbiology*. 72:94-101.

106. Villarreal P, Carrasco M, Barahona S, Alcaíno J, Cifuentes V y Baeza M (2018) Antarctic yeasts: analysis of their freeze-thaw tolerance and production of antifreeze proteins, fatty acids and ergosterol. *BMC microbiology*. 1:66-76
107. Viñarta SC, Angelicola MV, Barros JM, Fernandez PM, Mac Cormak W, Aybar MJ y De Figueroa LI (2016) Oleaginous yeasts from Antarctica: screening and preliminary approach on lipid accumulation. *Journal of basic microbiology*. 12:1360-1368.
108. Wasylenko TM, Ahn WS 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.
109. Wu H y Miao X (2014) Biodiesel quality and biochemical changes of microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* in response to nitrate levels. *Bioresource technology*. 170:421-427.
110. Yang Y y Hu B (2019) Investigation on the cultivation conditions of a newly isolated fusarium fungal strain for enhanced lipid production. *Applied biochemistry and biotechnology*. 187:1220-1237.
111. Yang Y, Heidari F y Hu B (2019) Fungi (Mold)-Based Lipid Production. En: Balan V (ed) Microbial Lipid Production. *Humana*. pp 51-90.
112. Yook S, Sanchez RS, Ha JH y Park JM (2016) Effects of the ratio of carbon to nitrogen concentration on lipid production by bacterial consortium of sewage sludge using food wastewater as a carbon source. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 33:1805-1812.

113. Zhang C, Hui X, Lin Y y Sung CJ (2016) Recent development in studies of alternative jet fuel combustion: Progress, challenges, and opportunities. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 54:120-138.
114. Zhu Z, Zhang S, Liu H, Shen H, Lin X, Yang F, Zhou Y, Jin G, Ye M, Zou H y Zhao ZK (2012) A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Nature communications*. 3:1-12.
115. Zlatanov M, Pavlova K y Grigorova D (2001) Lipid composition of some yeast strains from Livingston Island, Antarctica. *Folia Microbiologica*. 5:402–406.
116. Zlatanov M, Pavlova K, Antova G, Angelova-Romova M, Georgieva K y Rousenova-Videva S (2010) Biomass Production by Antarctic Yeast Strains: An investigation on the Lipid Composition. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 4:2096–2101